

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4762142号
(P4762142)

(45) 発行日 平成23年8月31日 (2011.8.31)

(24) 登録日 平成23年6月17日 (2011.6.17)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K	16/18	(2006.01)	C O 7 K	16/18	
C O 7 K	19/00	(2006.01)	C O 7 K	19/00	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	

請求項の数 16 (全 102 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-526599 (P2006-526599)
 (86) (22) 出願日 平成16年9月17日 (2004.9.17)
 (65) 公表番号 特表2007-529196 (P2007-529196A)
 (43) 公表日 平成19年10月25日 (2007.10.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2004/010471
 (87) 国際公開番号 W02005/026210
 (87) 国際公開日 平成17年3月24日 (2005.3.24)
 審査請求日 平成19年9月12日 (2007.9.12)
 (31) 優先権主張番号 10/666,332
 (32) 優先日 平成15年9月18日 (2003.9.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 0414309.5
 (32) 優先日 平成16年6月25日 (2004.6.25)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセ
 35
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稔
 (74) 代理人 100067035
 弁理士 岩崎 光隆
 (72) 発明者 フランク・コルビンガー
 ドイツ連邦共和国デー79395ノイエ
 ンブルク、トゥーナー・リング4番
 (72) 発明者 ホセ・エメ・カルバリド・エレラ
 オーストリア、アー2380ベルヒトル
 ツドルフ、ベルンハルト・ヴァイスガッセ
 6/3番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療用結合分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D 4 5 R O および C D 4 5 R B の双方に関して結合特異性を有する、配列番号：31
 もしくは配列番号：32のポリペプチドの重鎖可変領域および配列番号：7もしくは配列
 番号：8のポリペプチドの軽鎖可変領域を含むヒト化抗体である結合分子。

【請求項 2】

配列番号：31のポリペプチドの重鎖可変領域および配列番号：7のポリペプチドの軽
鎖可変領域、

配列番号：31のポリペプチドの重鎖可変領域および配列番号：8のポリペプチドの軽鎖
可変領域、

配列番号：32のポリペプチドの重鎖可変領域および配列番号：7のポリペプチドの軽鎖
可変領域、または

配列番号：32のポリペプチドの重鎖可変領域および配列番号：8のポリペプチドの軽鎖
可変領域、

を含むヒト化抗体である、請求項1に記載の結合分子。

【請求項 3】

請求項1または2に記載の結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項3に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の発現系であって、該発現系が適合する宿主細胞に存在するとき、該発現系が請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドを生成することができるものである、発現系。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の発現系を含む単離された宿主細胞。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの薬学的に許容される担体または希釈剤に随伴されて請求項 1 または 2 に記載の結合分子を含む医薬組成物。

【請求項 8】

自己免疫疾患、移植片拒絶、乾癬、皮膚炎、炎症性腸疾患および / またはアレルギーに関連する疾患の処置および / または予防において使用される、請求項 7 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 9】

自己免疫疾患、移植片拒絶、乾癬、皮膚炎、炎症性腸疾患および / またはアレルギーの処置および / または予防において使用される、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

移植片対宿主病 (G V H D) の処置および / または予防において使用される、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

脾臓島細胞移植片拒絶の処置および / または予防において使用される、請求項 7 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 12】

医薬の製造における、請求項 1 または 2 に記載の結合分子または請求項 7 から 11 のいずれかに記載の医薬組成物の使用。

【請求項 13】

該医薬が自己免疫疾患、移植片拒絶、乾癬、皮膚炎、炎症性腸疾患および / またはアレルギーに関連する疾患の処置および / または予防において使用される、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

該医薬が自己免疫疾患、移植片拒絶、乾癬、皮膚炎、炎症性腸疾患および / またはアレルギーの処置および / または予防において使用される、請求項 12 に記載の使用。

30

【請求項 15】

該医薬が移植片対宿主病 (G V H D) の処置および / または予防において使用される、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 16】

該医薬が脾臓島細胞移植片拒絶の処置および / または予防において使用される、請求項 12 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

40

(発明の分野)

本発明は C D 4 5 抗原アイソフォームに対する結合分子、例えばモノクローナル抗体 (m A b) のような有機化合物、およびその使用に関する。

【0002】

(発明の背景)

種々の疾患の処置における 1 つのアプローチは、病原性白血球の排除または不活性化および病原性免疫応答を不活性化するための寛容の誘導のための可能性を達成することである。器官、細胞および組織移植片拒絶ならびに種々の自己免疫疾患は一次的にはマクロファージおよび樹状細胞のような抗原提示細胞 (A P C) により抗原 M H C 複合体の形態で捕捉され、加工され、そしてヘルパー T 細胞に提示される特異的抗原を認識することがで

50

きるヘルパーT細胞により誘発されるT細胞媒介の免疫応答の結果である、すなわちヘルパーT細胞は特異的抗原を認識するときに刺激されてIL-2のようなサイトカインを生成し、そしていくつかのサイトカイン受容体およびその他の活性化分子を発現または上方制御し、そして増殖すると考えられている。これらの活性化されたヘルパーT細胞には直接的または間接的に作用し得る、すなわちエフェクター細胞毒性T細胞またはB細胞を補助して選択された抗原を発現する細胞または組織を破壊し得るものがある。免疫応答が終了した後、成熟したクローン的に選択された細胞は記憶ヘルパーおよび記憶細胞毒性T細胞として残り、これは体内を循環し、そして抗原が再度現れた場合にそれを迅速に認識する。この応答を誘発する抗原が無害な環境抗原である場合、結果はアレルギーであり、抗原が外来抗原でないが、自己抗原である場合、自己免疫疾患に至り；抗原が移植された器官からの抗原である場合、結果は移植片拒絶である。

10

【0003】

免疫系は非自己から自己を認識するために発達してきた。この特性により器官が病原体の日々の挑戦に曝された環境において生存することが可能になる。この非自己に関する特異性および自己に対する寛容は胸腺においてT細胞レパートリーの発達の間に、陽性および陰性選択の過程を通じて生じ、これはまた自己反応性T細胞の認識および排除をも含む。この型の寛容を中枢性寛容と称する。しかしながら、これらの自己反応性細胞にはこの選択機構を回避し、そして自己免疫疾患の発達に関する潜在的危険性を引き起こすものがある。末梢に回避した自己反応性T細胞を制御するために、免疫系は自己免疫性に対して保護を提供する末梢制御機構を有している。これらの機構は末梢性寛容の基礎である。

20

【0004】

特異的mAbにより認識される細胞表面抗原は一般に代々の国際白血球分類研究会により割り当てられたCD(分化抗原群)数により指定され、そしてCD45なる用語は本明細書では細胞表面白血球共通抗原CD45を意味し；そしてその抗原に対するmAbを本明細書では「抗CD45」と称する。

【0005】

白血球共通抗原に対する抗体(LCA)すなわちCD45は抗リンパ球グロブリン(ALG)の主要な成分である。CD45は膜貫通型チロシンホスファターゼのファミリーに属し、そして受容体相互作用に依存して細胞活性化の陽性および陰性双方の調節因子である。CD45のホスファターゼ活性はBおよびTリンパ球の抗原受容体に随伴されるSrcファミリーキナーゼの活性化に必要であるようだ(Trowbridge IS et al, Annu Rev Immunol. 1994;12:85-116)。したがって、T細胞活性化においてCD45はシグナル1に必須であり、そしてCD45欠乏細胞はTCR媒介の活性化事象において深刻な欠陥を有する。

30

【0006】

CD45抗原は膜貫通糖タンパク質を含む様々のアイソフォームで存在する。CD45の異なるアイソフォームはCD45細胞外領域の一部をコードする3つの可変エクソンの選択的スプライシングから生じるその細胞外ドメイン構造において異なる(Streuli MF. et al, J. Exp. Med. 1987; 166:1548-1566)。CD45の種々のアイソフォームは様々の細胞外ドメインを有するが、2つの相同な、高度に保存されたおよそ300残基のホスファターゼドメインを有する同一の膜貫通および細胞質セグメントを有する。様々のアイソフォームの組み合わせはTおよびBリンパ球の亜集団において差次的に発現される(Thomas ML. et al, Immunol. Today 1988; 9:320-325)。モノクローナル抗体には様々のアイソフォーム全てに共通するエピトープを認識するものがあるが、選択的にスプライシングされたエクソン(A、BまたはC)のうちのどれをそれらが認識するかに依存して限定的な(CD45R)特性を有するmAbもある。例えば、エクソンAの生成物を認識するモノクローナル抗体は結果的にCD45RAと称され、エクソンBを含有する種々のアイソフォームを認識するものはCD45RBと称されている(Beverley PCL et al, Immunol. Supp. 1988; 1:3-5)。UCHL1のような抗体は、180kDaのアイソフォームCD45RO(可変エクソンA、BまたはCのいずれをも含まない)に選択的に結合し、これは活

40

50

性化されたT細胞、記憶細胞および皮質胸腺細胞のサブセットに限定されるようであり、そしてB細胞上では検出されない(Terry LA et al, Immunol. 1988; 64:331-336)。

【0007】

(図面の説明)

図1 「候補mAb」による1次MLRの阻害は0.001から10μg/mlの範囲で用量依存的であることを示している。「濃度」は「候補mAb」の濃度である。

図2 配列番号：15の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：12(3921-4274)のヌクレオチド配列を有する重鎖を含む発現ベクターHCMV-G1HuA6-VHQのプラスミドマップを示す。

図3 配列番号：16の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：11(3921-4274)のヌクレオチド配列を有する重鎖を含む発現ベクターHCMV-G1HuA6-VHEのプラスミドマップを示す。

図4 配列番号：17の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：14(3964-4284)のヌクレオチド配列を有する軽鎖を含む発現ベクターHCMV-KHuAb-VL1humV1のプラスミドマップを示す。

図5 配列番号：18の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：13(3921-4274)のヌクレオチド配列を有する軽鎖を含む発現ベクターHCMV-KHuAb-VL1humV2のプラスミドマップを示す。

図6 配列番号：36の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：33のヌクレオチド配列を有する軽鎖を含む発現ベクターLCVL1SP20のプラスミドマップを示す。

図7 配列番号：39の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：13のヌクレオチド配列を有する軽鎖を含む発現ベクターLCVL2SP20のプラスミドマップを示す。

図8 配列番号：37の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：34のヌクレオチド配列を有する重鎖を含む発現ベクターHCVEN73D Sp20のプラスミドマップを示す。

図9 配列番号：38の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：35のヌクレオチド配列を有する重鎖を含む発現ベクターHCVEN73D Sp20のプラスミドマップを示す。

図10 配列番号：40の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：11のヌクレオチド配列を有する重鎖を含む発現ベクターHCVEN Sp20のプラスミドマップを示す。

図11 配列番号：41の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：12のヌクレオチド配列を有する重鎖を含む発現ベクターHCVEN Sp20のプラスミドマップを示す。

図12 VHE/humV1、VHE/humV2、VHQ/humV1およびVHQ/humV2、ならびにVHE-N73D/humV1と一緒にVHE/humV1のサイズ排除クロマトグラフィー分析を示す。

図13 VHE/humV2、VHE/humV1、VHQ/humV2およびVHQ/humV1、ならびにVHE-N73D/humV1と一緒にVHE/humV2の陽イオン交換クロマトグラフィーを示す。

図14 VHE/humV2およびVHE-N73D/humV1の逆相クロマトグラフィーを示す。

【0008】

(発明の説明)

今、本明細書にて以後「CD45RO/RB結合分子」とも称するCD45ROおよびCD45RBに結合するポリペプチド配列を含む結合分子を見出した。本発明によるこれらの結合分子は免疫抑制を誘起し、1次T細胞応答を阻害し、そしてT細胞寛容を誘起し得る。さらに、本発明の結合分子は1次混合リンパ球培養反応(MLR)を阻害する。C

10

20

30

40

50

CD45RO/RB結合分子で処理した培養から誘導された細胞はまた2次MLRにおいてCD45RO/RB結合分子の不在時でさえ、2次MLRにおける増殖応答を低下させているのが好ましい。2次MLRにおけるかかる低下した増殖応答は寛容を誘起する本発明の結合分子の能力の指標である。加えて、本発明のCD45RO/RB結合分子はヒトTリンパ球におけるアポトーシスを通じて細胞死を誘起することができ、特徴的なT調節細胞(Treg)表現型を有するT細胞の分化を支えることができ；そして/または未処理のT細胞の活性化を抑制することができるT調節細胞を誘起することができる。

【0009】

さらにコントロール処置マウスと比較して、ヒトPBMCを注射した後に異種性GVHDを経験している重篤な複合免疫不全(SCID)マウスへのCD45RO/RB結合分子のインビボ投与は、CD45RO/RB結合分子処置マウスにおいて循環ヒトT細胞を依然検出できたとしても、マウスの生存を延長し得ることが見出されている。CD45RO/RB結合分子はまたヒト同種移植片皮膚拒絶を媒介する炎症過程をも抑制し得る。加えてCD45RO/RB結合分子はヒト同種移植片皮膚拒絶を媒介する炎症過程を抑制し得る、特にヒト皮膚を移植された、および単核脾細胞を正着されたSCIDマウスにおけるインビボヒト同種移植片皮膚拒絶を媒介する炎症過程を抑制し得ることが見出されている。そしてさらにCD45RO/RB結合分子は移植片浸潤を防御することにより、および白血球媒介のインビボ拒絶反応を阻害することによりヒト島同種移植片の生存延長に至り得ることが見出されている。

【0010】

「CD45RO/RB結合分子」とはCD45抗原のCD45RBおよびCD45ROアイソフォームに、単独でまたはその他の分子に随伴されてのいずれかで、特異的に結合することができる任意の分子を意味する。例えば特定のCD45アイソフォームを発現する細胞への分子の結合を可視化することができる蛍光顕微鏡もしくは細胞蛍光測定(FACS)分析、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)またはラジオイムノアッセイと一緒にした直接的または間接的免疫蛍光のような任意の種類の結合アッセイを含む標準的な方法(定性的アッセイ)により結合反応を示すことができる。加えて、この分子の結合はこれらのアイソフォームを発現する細胞の機能の変化をもたらし得る。例えば、CD45RO/RB結合分子の存在下または不在下で、1次または2次MLRの阻害を決定するための、および1次MLR阻害における差異を決定するためのインビトロアッセイまたはパイオアッセイのように1次または2次合リンパ球培養反応(MLR)の阻害を決定することができる。

【0011】

これに代えて、例えばMLRにおける細胞活性化の後、または破傷風トキソイドのような特異的抗原もしくはその他の抗原で、またはフィトヘマグルチニン(PHA)もしくは抗CD3および抗CD28抗体もしくはホルポールエステルおよびCa²⁺イオノフォアのような多クローン性刺激剤で刺激した後に、PMBcまたはT細胞またはCD4⁺T細胞の増殖、サイトカインの生成、細胞表面分子の発現の変化を測定することによってもインビトロ機能調節効果を決定することができる。刺激剤として同種細胞の代わりに前記で記載したもののような可溶性抗原または多クローン性刺激剤を用いる以外はMLRに関して記載されるのと類似の様式で培養を準備する。³Hチミジンの取り込みにより前記で記載したようなT細胞増殖を測定するのが好ましい。

【0012】

サイトカイン捕捉抗体を96ウェルプレートの表面にコーティングし、培養物からの上澄を加え、そして室温で1時間インキュベートし、そして次に特定のサイトカインに特異的な検出抗体、続いて西洋ワサビペルオキシダーゼのような酵素に結合した第2段階の抗体、続いて対応する基質を加え、そしてプレートリーダーで吸光度を測定するサンドウィッチELISAによりサイトカイン生成を測定するのが好ましい。標的細胞を特定の細胞表面分子に特異的な抗体で染色した後、細胞表面分子の変化を直接的または間接的免疫蛍光により測定できるのが好ましい。抗体を直接的に蛍光色素で標識するか、または蛍光標

10

20

30

40

50

識された第1抗体に特異的な第2段階の抗体を用いることができるかのいずれかであり、そして細胞を細胞蛍光測定器で分析する。

【0013】

本発明の結合分子はCD45ROおよびCD45RBの双方に関して結合特異性を有している(「CD45RO/RB結合分子」)。

好ましくは、結合分子は解離常数(K_d) < 20 nMで、好ましくは $K_d < 15$ nMまたは < 10 nMで、さらに好ましくは $K_d < 5$ nMでCD45ROアイソフォームに結合する。好ましくは、結合分子は $K_d < 50$ nMで、好ましくは $K_d < 15$ nMまたは < 10 nMで、さらに好ましくは $K_d < 5$ nMでCD45RBアイソフォームに結合する。

【0014】

さらに好ましい実施態様では、本発明の結合分子は

- 1) CD45分子のAおよびBエピトープを含むが、Cエピトープを含まない；および/または
 - 2) CD45分子のBエピトープを含むが、Aを含まずそしてCエピトープを含まない；および/または
 - 3) CD45分子のA、BまたはCエピトープのいずれも含まない；
- であるこれらのCD45アイソフォームに結合する。

【0015】

さらに好ましい実施態様では、本発明の結合分子は：

- 1) CD45分子のA、BおよびCエピトープの全て；および/または
- 2) CD45分子のBおよびCエピトープの双方であるが、Aエピトープでない；を含むCD45アイソフォームに結合しない。

【0016】

さらに好ましい実施態様では、本発明の結合分子はさらに：

- 1) 記憶およびインビボ同種活性化された(alloactivated) T細胞を認識する；および/または
- 2) 例えばPEER細胞のようなヒトT細胞上のその標的に結合する(ここで該結合は好ましくは $K_d < 15$ nM、さらに好ましくは $K_d < 10$ nM、もっとも好ましくは $K_d < 5$ nMである)；および/または
- 3) 好ましくは約100 nM未満、好ましくは50 nMまたは30 nM未満の IC_{50} で、さらに好ましくは約10 nMまたは5 nMの IC_{50} で、最も好ましくは約0.5 nMまたはさらには0.1 nMの IC_{50} でインビトロ同種活性化された(alloactivated) T細胞機能を阻害する；および/または
- 4) ヒトTリンパ球におけるアポトーシスを通じて細胞死を誘起する；および/または
- 5) インビトロで同種抗原特異的T細胞寛容を誘起する；および/または
- 6) 有効量で投与されたときにヒトPBMCの注射によりSCIDマウスにおいて誘起された致死の異種移植片対宿主病(GvHD)を防御する；および/または
- 7) Tリンパ球、単球、幹細胞、ナチュラルキラー細胞および/または顆粒球に結合するが、血小板またはBリンパ球には結合しない；および/または
- 8) 特徴的なT調節細胞(Treg)表現型を有するT細胞の分化を支持する；および/または
- 9) 未処理T細胞活性化を抑制することができるT調節細胞を誘起する；および/または
- 10) ヒト同種移植片皮膚拒絶を媒介する炎症過程を抑制する、特にヒト皮膚を移植された、および単核脾細胞を正着されたSCIDマウスにおけるインビボヒト同種移植片皮膚拒絶を媒介する炎症過程を抑制する；および/または
- 11) hu-PBL-NOD/SCIDマウスモデルにおいてヒト島同種移植片生存を延長させる。

【0017】

さらに好ましい実施態様では、本発明の結合分子はAversa et al., Cellular Immunology 158, 314-328 (1994)により記載されるようなモノクローナル抗体「A6」と同一のエ

10

20

30

40

50

ピトープに結合する。

前記した結合特性および生物学的活性のために、本発明のかかる結合分子は特に医薬品において、治療および/または予防のために有用である。本発明の結合分子が特に有用である疾患には、さらに以下で示すような、自己免疫疾患、移植片拒絶、皮膚炎、炎症性腸疾患および/またはアレルギーが挙げられる。

【0018】

配列番号：1のポリペプチドおよび配列番号：2のポリペプチドを含む分子はCD45RO/RB結合分子であることを見出した。また配列番号：1のCD45RO/RB結合分子における超可変領域CDR1'、CDR2'およびCDR3'をも見出し、CDR1'はアミノ酸配列Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Ile-Gly-Thr-Ser-Ile-Gln(RASQNIQTISIQ)(配列番号：19)を有し、CDR2'はアミノ酸配列Ser-Ser-Ser-Glu-Ser-Ile-Ser(SSSESIIS)(配列番号：20)を有し、そしてCDR3'はアミノ酸配列Gln-Gln-Ser-Asn-Thr-Trp-Pro-Phe-Thr(QQSNTPWFFT)(配列番号：21)を有していた。

10

【0019】

また配列番号：2のCD45RO/RB結合分子における超可変領域CDR1、CDR2およびCDR3を見出し、CDR1はアミノ酸配列Asn-Tyr-Ile-Ile-His(NYIIH)(配列番号：22)を有し、CDR2はアミノ酸配列Tyr-Phe-Asn-Pro-Tyr-Asn-His-Gly-Thr-Lys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly(YFNPNYHGTKYNEKFKG)(配列番号：23)を有し、そしてCDR3はアミノ酸配列Ser-Gly-Pro-Tyr-Ala-Trp-Phe-Asp-Thr(SGPYAWFDT)(配列番号：24)を有していた。

20

【0020】

CDRは本質的に抗原結合特性を決定する超可変領域とも称される3つの特異的な相補性決定領域である。これらのCDRは例えば配列番号：1または配列番号：2の可変領域の一部であり、各々ここでCDRはフレームワーク領域(FR)、例えば定常領域と交替する。配列番号：1は本発明によるキメラ抗体の軽鎖、例えば配列番号：3の一部であり、そして配列番号：2は重鎖、例えば配列番号：4の一部である。重鎖のCDRは随伴される軽鎖のCDRと一緒に本質的に本発明の分子の抗原結合部位を構成する。軽鎖可変領域により為される結合のエネルギー論への寄与は、随伴される重鎖可変領域により為されるものに比較して小さく、そして単独の重鎖可変領域は独自で抗原結合活性を有していることが解っている。かかる分子は一般的に単一ドメイン抗体と称される。

30

【0021】

1つの態様では、本発明は少なくとも1つの抗原結合部位、例えばCD45RO/RB結合分子を含み、配列に超可変領域CDR1、CDR2およびCDR3を含む結合分子；および例えばその直接均等物(direct equivalent)を提供し、該CDR1はアミノ酸配列Asn-Tyr-Ile-Ile-His(NYIIH)(配列番号：22)を有し、該CDR2はアミノ酸配列Tyr-Phe-Asn-Pro-Tyr-Asn-His-Gly-Thr-Lys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly(YFNPNYHGTKYNEKFKG)(配列番号：23)を有し、そして該CDR3はアミノ酸配列Ser-Gly-Pro-Tyr-Ala-Trp-Phe-Asp-Thr(SGPYAWFDT)(配列番号：24)を有している。

40

【0022】

別の態様では、本発明は

a) 配列に超可変領域CDR1、CDR2およびCDR3を含み、該CDR1はアミノ酸配列Asn-Tyr-Ile-Ile-His(NYIIH)(配列番号：22)を有し、該CDR2はアミノ酸配列Tyr-Phe-Asn-Pro-Tyr-Asn-His-Gly-Thr-Lys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly

50

(Y F N P Y N H G T K Y N E K F K G) (配列番号 : 23) を有し、そして該 C D R 3 はアミノ酸配列 S e r - G l y - P r o - T y r - A l a - T r p - P h e - A s p - T h r (S G P Y A W F D T) (配列番号 : 24) を有している第 1 ドメイン ; および b) 配列に超可変領域 C D R 1 '、C D R 2 ' および C D R 3 ' を含み、C D R 1 ' はアミノ酸配列 A r g - A l a - S e r - G l n - A s n - I l e - G l y - T h r - S e r - I l e - G l n (R A S Q N I G T S I Q) (配列番号 : 19) を有し、C D R 2 ' はアミノ酸配列 S e r - S e r - S e r - G l u - S e r - I l e - S e r (S S S E S I S) (配列番号 : 20) を有し、そして C D R 3 ' はアミノ酸配列 G l n - G l n - S e r - A s n - T h r - T r p - P r o - P h e - T h r (Q Q S N T W P F T) (配列番号 : 21) を有している第 2 ドメイン ;
を含む少なくとも 1 つの抗原結合部位、例えば C D 4 5 R O / R B 結合分子を含む分子 ; および例えばその直接均等物を提供する。

10

【 0 0 2 3 】

好ましい実施態様では、配列に超可変領域 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む第 1 ドメインは免疫グロブリン重鎖であり、そして配列に超可変領域 C D R 1 '、C D R 2 ' および C D R 3 ' を含む第 2 ドメインは免疫グロブリン軽鎖である。

【 0 0 2 4 】

別の態様では、本発明は分子、例えば配列番号 : 1 のポリペプチドおよび / または配列番号 : 2 のポリペプチドを含む、好ましくは 1 つのドメインに配列番号 : 1 のポリペプチドおよび別のドメインに配列番号 : 2 のポリペプチドを含む C D 4 5 R O / R B 結合分子、例えばキメラモノクローナル抗体、ならびに別の態様では分子、例えば配列番号 : 3 のポリペプチドおよび / または配列番号 : 4 のポリペプチドを含む、好ましくは 1 つのドメインに配列番号 : 3 のポリペプチドおよび別のドメインに配列番号 : 4 のポリペプチドを含む C D 4 5 R O / R B 結合分子、例えばキメラモノクローナル抗体を提供する。

20

【 0 0 2 5 】

抗原結合部位が第 1 および第 2 ドメインの双方または配列番号 : 1 もしくは配列番号 : 3 の各々のポリペプチド、および配列番号 : 2 もしくは配列番号 : 4 の各々のポリペプチドを含む場合、これらは同一のポリペプチドに位置してよい、または好ましくは各ドメインは異なる鎖に存在してよく、例えば第 1 ドメインは重鎖、例えば免疫グロブリン重鎖の一部、またはそのフラグメントであり、そして第 2 ドメインは軽鎖、例えば免疫グロブリン軽鎖の一部、またはそのフラグメントである。

30

【 0 0 2 6 】

さらに本発明による C D 4 5 R O / R B 結合分子が哺乳動物、例えばヒトの体内環境における C D 4 5 R O / R B 結合分子であることを見出した。本発明による C D 4 5 R O / R B 結合分子は、それゆえにモノクローナル抗体 (m A b) と称され、ここで結合活性は主に前記で記載したような C D R 領域により決定され、例えば該 C D R 領域は実質的にヒト起源であるフレームワーク、例えば定常領域のような結合特異性を有さないその他の分子に随伴される。

【 0 0 2 7 】

別の態様では、本発明は Aversa et al., Cellular Immunology 158, 314-328 (1994) (A 6 を特徴づける一節に関して出典明示により本明細書の一部とする) に記載されるようなモノクローナル抗体「 A 6 」ではない C D 4 5 R O / R B 結合分子を提供する。

40

別の態様では、本発明はキメラ、ヒト化または完全なヒトモノクローナル抗体である本発明による C D 4 5 R O / R B 結合分子を提供する。

【 0 0 2 8 】

C D 4 5 R O / R B 結合分子の実例には、B 細胞またはハイブリドーマにより生成されるような抗体および、またはその任意のフラグメント、例えば F (a b ')₂ および F a b フラグメントから誘導されるキメラまたはヒト化抗体、ならびに 1 本鎖または単ドメイン抗体が挙げられる。1 本鎖抗体は、通常 10 から 30 個のアミノ酸、好ましくは 15 から 25 個のアミノ酸からなるペプチドリinker により共有結合した抗体重鎖および軽鎖

50

の可変領域からなる。したがって、かかる構造は重鎖および軽鎖の定常部分を含まず、そして小型のペプチド Spacer は定常部分全体よりも抗原性が少ないはずであると考えられている。キメラ抗体とは重鎖および軽鎖の定常領域または双方がヒト起源であるが、重鎖および軽鎖双方の可変ドメインはヒト以外（例えばマウス）の起源であることを意味する。ヒト化抗体とは超可変領域（CDR）がヒト以外（例えばマウス）の起源であるが、全てのまたは実質的に全てのその他の部分、例えば定常領域および可変領域の高度に保存された部分はヒト起源である抗体を意味する。しかしながらヒト化抗体は超可変領域に隣接する可変領域の部分にマウス配列の数個のアミノ酸を保持し得る。

【0029】

超可変領域、すなわち本発明による CDR' は任意の種類のフレームワーク領域、例えばヒト起源の軽鎖および重鎖の定常部分に随伴され得る。適当なフレームワーク領域は例えば「免疫学的に興味深いタンパク質配列」（Kabat, E.A. et al、米国国立衛生研究所、保健社会福祉省、公衆衛生局）に記載されている。好ましくはヒト重鎖の定常部分はサブタイプを含む IgG1 型のものでよく、好ましくはヒト軽鎖の定常部分は または 型、さらに好ましくは 型のものでよい。好ましくは該重鎖は多くて 1 個のグリコシル化部位を含み、最も好ましくはグリコシル化部位は N - グリコシル化部位であり、そして最も好ましくは 1 個のグリコシル化部位が重鎖の定常部分に位置する。最も好ましくはグリコシル化部位が可変領域に存在せず、好ましくはフレームワーク領域にグリコシル化部位が存在しない。

【0030】

重鎖の好ましい定常部分は配列番号：4（前記で特記した CDR1'、CDR2' および CDR3' 配列部分を含まない）のポリペプチドであり、そして軽鎖の好ましい定常部分は配列番号：3（前記で特記した CDR1、CDR2 および CDR3 配列部分を含まない）のポリペプチドである。

【0031】

また本発明による CDR1'、CDR2' および CDR3' を含む配列番号：7 のアミノ酸または配列番号：8 のアミノ酸の軽鎖可変領域ならびに / または本発明による CDR1、CDR2 および CDR3 を含む配列番号：9 もしくは配列番号：10 の重鎖可変領域を含むヒト化抗体をも見出した。また本発明による CDR1'、CDR2' および CDR3' を含む配列番号：7 のアミノ酸もしくは配列番号：8 のアミノ酸の軽鎖可変領域ならびに / または本発明による CDR1、CDR2 および CDR3 を含む配列番号：31 もしくは配列番号：32 の重鎖可変領域を含むさらに別のヒト化抗体を提供する。

【0032】

別の態様では本発明は配列番号：9 または配列番号：10 のポリペプチドおよび配列番号：7 または配列番号：8 のポリペプチドを含むヒト化抗体を提供する。本発明のさらに別の態様は配列番号：31 または配列番号：32 のポリペプチドおよび配列番号：7 または配列番号：8 のポリペプチドを含むヒト化抗体である結合分子を提供する。

【0033】

別の態様では本発明は：

（VHE / humV2 のような）配列番号：9 のポリペプチドおよび配列番号：7 のポリペプチド、

（VHE / humV1 のような）配列番号：9 のポリペプチドおよび配列番号：8 のポリペプチド、

（VHQ / humV2 のような）配列番号：10 のポリペプチドおよび配列番号：7 のポリペプチド、

（VHQ / humV1 のような）配列番号：10 のポリペプチドおよび配列番号：8 のポリペプチド、

（VHEN73D / humV2 のような）配列番号：31 のポリペプチドおよび配列番号：7 のポリペプチド、

（VHEN73D / humV1 のような）配列番号：31 のポリペプチドおよび配列番号

10

20

30

40

50

: 8 のポリペプチド、
(V H E N 7 3 D / h u m V 2 のような) 配列番号 : 3 2 のポリペプチドおよび配列番号
: 7 のポリペプチド、または
(V H Q N 7 3 D / h u m V 1 のような) 配列番号 : 3 2 のポリペプチドおよび配列番号
: 8 のポリペプチド、
を含むヒト化抗体を提供する。

【 0 0 3 4 】

例えば本明細書にて特記する配列、例えば C D R 1 (配列番号 : 2 2)、C D R 2 (配列番号 : 2 3)、C D R 3 (配列番号 : 2 4)、C D R 1 ' (配列番号 : 1 9)、C D R 2 ' (配列番号 : 2 0)、C D R 3 ' (配列番号 : 2 1) の、または配列番号 : 1、配列番号 : 2、配列番号 : 3、配列番号 : 4、配列番号 : 7、配列番号 : 8、配列番号 : 9、配列番号 : 1 0、配列番号 : 3 1 もしくは配列番号 : 3 2 の本発明によるポリペプチドは該 (ポリ) ペプチド (配列) の直接均等物を含み ; 例えば該ポリペプチドの機能的誘導体を含む。該機能的誘導体は特記した配列の共有結合性修飾を含んでよく、そして / または該機能的誘導体は特記した配列のアミノ酸配列変種を含んでよい。

【 0 0 3 5 】

「ポリペプチド」は、特記しない場合、互いにペプチド結合により連結されたアミノ酸を含み、N末端で始まり、そしてC末端で終わるアミノ酸配列を有する任意のペプチドまたはタンパク質を含む。好ましくは本発明のポリペプチドはモノクローナル抗体であり、さらに好ましくはキメラ (V 移植) またはヒト化 (C D R 移植) モノクローナル抗体である。ヒト化 (C D R 移植) モノクローナル抗体はさらにアクセプター抗体のフレームワーク (F R) 配列に導入された別の変異を含んでも、または含まなくてもよい。好ましくはヒト化またはキメラ抗体は 1 個しかグリコシル化部位を含まない。最も好ましくは該 1 個のグリコシル化部位は N グリコシル化部位である。最も好ましくはグリコシル化部位は可変領域に存在せず、そしてなおさらに好ましくはグリコシル化部位は重鎖の可変領域に存在せず、最も好ましくはグリコシル化部位はフレームワーク領域 (F R ') に存在しない。

【 0 0 3 6 】

本明細書で用いるポリペプチドの機能的誘導体には、本発明のポリペプチドに共通する定性的生物学的活性を有する、すなわち C D 4 5 R O および C D 4 5 R B に結合する能力を有する分子が含まれる。機能的誘導体には本発明によるポリペプチドのフラグメントおよびペプチド類似体が含まれる。フラグメントは本発明による、例えば特記した配列のポリペプチド配列内の領域を含む。「誘導体」なる用語は本発明による、例えば特記した配列のポリペプチドのアミノ酸配列変種、および共有結合性修飾を定義するために用いられる。本発明による、例えば特記した配列のポリペプチドの機能的誘導体は、本発明による、例えば特記した配列のポリペプチドのアミノ酸配列と、好ましくは少なくとも約 6 5 %、さらに好ましくは少なくとも約 7 5 %、なおさらに好ましくは少なくとも約 8 5 %、最も好ましくは少なくとも約 9 5 % の全体配列相同性を有し、そして C D 4 5 R O および C D 4 5 R B に結合する能力を実質的に保持している。好ましくは機能的誘導体は少なくとも、配列番号 : 1 のポリペプチドおよび / もしくは配列番号 : 2 のポリペプチドを含む結合分子、配列番号 : 9 もしくは配列番号 : 1 0 のポリペプチドおよび / または配列番号 : 7 もしくは配列番号 : 8 のポリペプチドを含むヒト化抗体、または配列番号 : 3 1 もしくは配列番号 : 3 2 のポリペプチドおよび / または配列番号 : 7 もしくは配列番号 : 8 のポリペプチドのヒト化抗体の結合親和性を有する。

【 0 0 3 7 】

「共有結合性修飾」は本発明による、例えば特記した配列のポリペプチド ; またはそのフラグメントの有機タンパク質性または非タンパク質性誘導体化剤での修飾、異種性ポリペプチド配列への融合、および翻訳後修飾を含む。例えば特記した配列の共有結合性修飾されたポリペプチドは架橋により C D 4 5 R O および C D 4 5 R B に依然結合する能力を有している。共有結合性修飾は従来、ターゲティングされたアミノ酸残基を選択された側

または末端残基と反応できる有機誘導体化剤と反応させることにより、または選択された組換え宿主細胞で機能する翻訳後修飾の機構を利用することにより導入される。特定の翻訳後修飾は発現されたポリペプチドに及ぼす組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミンイルおよびアスパラギンイル残基はしばしば翻訳後に対応するグルタミンイルおよびアスパルチル残基に脱アミド化される。これに代えて、これらの残基は穏やかな酸性条件下で脱アミド化される。その他の翻訳後修飾にはプロリンおよびリジンのヒドロキシ化、セリル、チロシンまたはスレオニル残基のヒドロキシ基のリン酸化、リジン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖のアミノ基のメチル化が挙げられ、例えばT. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)を参照のこと。共有結合性修飾は例えば本発明による、例えば特記した配列のポリペプチドおよびそのアミノ酸配列変種を含むイムノアドヒージョンのような融合タンパク質、ならびに異種性シグナル配列へのN末端融合を含む。

【0038】

元来のポリペプチドおよびその機能的誘導体に関する「相同性」は本明細書では、最大相同パーセントを達成するために必要により配列をアラインしそしてギャップを導入した後、対応する元来のポリペプチドの残基と同一である候補配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージとして定義され、そして保存置換を配列同一性の一部とは見なさない。NまたはC末端伸張も挿入も同一性または相同性を減じるとは解釈されない。アラインメントに関する方法およびコンピュータプログラムは周知である。「アミノ酸」とは全ての天然に存在するL-アミノ酸を意味し、そして例えばD-アミノ酸を含む。アミノ酸は周知である1文字または3文字いずれかの記号表示により識別される。

【0039】

「アミノ酸配列変種」なる用語は本発明による、例えば特記した配列のポリペプチドに比較してアミノ酸配列にいくつかの差異を伴う分子を意味する。本発明による、例えば特記した配列のポリペプチドのアミノ酸配列変種は依然CD45ROおよびCD45RBに結合する能力を有している。置換変種は、本発明による、例えば特記した配列のポリペプチドにおいて少なくとも1つのアミノ酸残基が除去され、そして同一の位置でその場に挿入された異なるアミノ酸を有するものである。これらの置換は分子において1個のアミノ酸だけが置換されている単一か、または同一の分子に2個もしくはそれより多いアミノ酸が置換されている多重でよい。挿入変種は、本発明による、例えば特記した配列のポリペプチドにおいて特定の位置で、あるアミノ酸に直ぐ隣接して挿入された1つまたはそれより多いアミノ酸を有するものである。アミノ酸に直ぐに隣接するとはアミノ酸の-カルボキシまたは-アミノ官能基のいずれかに連結されていることを意味する。欠失変種は本発明による、例えば特記した配列のポリペプチドにおいて1つまたはそれより多いアミノ酸が除去されているものである。通常欠失変種は分子の特定の領域で1または2個のアミノ酸が欠失している。

【0040】

CDR1のアミノ酸配列をコードするGGCCAGTCAAGAACATTGGCACAAAGCATACAGTG(配列番号:25);
CDR2のアミノ酸配列をコードするTTCCTTCTGAGTCTATCTCTGG(配列番号:26);
CDR3のアミノ酸配列をコードするACAAAGTAATACTTGGCCATTCACTGTT(配列番号:27);
CDR1'のアミノ酸配列をコードするTTATAATTAATCCACTG(配列番号:28);
CDR2'のアミノ酸配列をコードするTTTTAATCTTACAATCATGGTACTAAGTACAAATGAGAAAGTTCAAAAGGCAG(配列番号:29);
CDR3'のアミノ酸配列をコードするAGGACCCCTATGCTTGGTTTGACACCTG(配列番号:30);
配列番号:1のポリペプチドをコードする配列番号:5、すなわち本発明によるmAbの

軽鎖の可変領域；

配列番号：２のポリペプチドをコードする配列番号：６、すなわち本発明によるｍＡｂの重鎖の可変領域；

配列番号：９のポリペプチドをコードする配列番号：１１、すなわち本発明によるＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含む重鎖可変領域；

配列番号：１０のポリペプチドをコードする配列番号：１２、すなわち本発明によるＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含む重鎖可変領域；

配列番号：７のポリペプチドをコードする配列番号：１３、すなわち本発明によるＣＤＲ１'、ＣＤＲ２'およびＣＤＲ３'を含む軽鎖可変領域；

配列番号：８のポリペプチドをコードする配列番号：１４、すなわち本発明によるＣＤＲ１'、ＣＤＲ２'およびＣＤＲ３'を含む軽鎖可変領域； 10

配列番号：８のポリペプチドをコードする配列番号：３３、すなわち本発明によるＣＤＲ１'、ＣＤＲ２'およびＣＤＲ３'を含む軽鎖可変領域；

配列番号：３１のポリペプチドをコードする配列番号：３４、すなわち本発明によるＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含む重鎖可変領域；ならびに

配列番号：３２のポリペプチドをコードする配列番号：３５、すなわち本発明によるＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含む重鎖可変領域；

のポリヌクレオチド配列もまた見出された。

【００４１】

別の態様では本発明はＣＤ４５ＲＯ／ＲＢ結合分子をコードする、例えば本発明による 20
ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、および／または好ましくはおよび、本発明によるＣＤＲ１'、ＣＤＲ２'およびＣＤＲ３'のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチドを提供する；ならびに

配列番号：５のポリヌクレオチドおよび／または、好ましくはおよび、配列番号：６のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド；ならびに

例えば

配列番号：７のポリペプチドおよび配列番号：９のポリペプチド、

配列番号：７のポリペプチドおよび配列番号：１０のポリペプチド、

配列番号：８のポリペプチドおよび配列番号：９のポリペプチド、または 30

配列番号：８のポリペプチドおよび配列番号：１０のポリペプチド、

をコードする配列番号：７もしくは配列番号：８のポリペプチドおよび／または、好ましくはおよび、配列番号：９もしくは配列番号：１０のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド；ならびに

【００４２】

好ましくは

配列番号：１１のポリヌクレオチドおよび配列番号：１３のポリヌクレオチド、

配列番号：１１のポリヌクレオチドおよび配列番号：１４のポリヌクレオチド、

配列番号：１２のポリヌクレオチドおよび配列番号：１３のポリヌクレオチド、または

配列番号：１２のポリヌクレオチドおよび配列番号：１４のポリヌクレオチド、 40

を含む配列番号：１１もしくは配列番号：１２のポリヌクレオチドおよび／または、好ましくはおよび、配列番号：１３のポリヌクレオチドもしくは配列番号：１４のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド；ならびに

【００４３】

例えば

配列番号：３１のポリペプチドおよび配列番号：７のポリペプチド、

配列番号：３１のポリペプチドおよび配列番号：８のポリペプチド、

配列番号：３２のポリペプチドおよび配列番号：７のポリペプチド、または

配列番号：３２のポリペプチドおよび配列番号：８のポリペプチド、

をコードする配列番号：３１もしくは配列番号：３２のポリペプチドおよび／または、好 50

ましくはおよび、配列番号： 7 もしくは配列番号： 8 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド；

ならびに

【 0 0 4 4 】

配列番号： 3 4 もしくは配列番号： 3 5 のポリヌクレオチド、および / または、好ましくは配列番号： 3 3 ；配列番号： 1 4 もしくは 1 3 のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド；

配列番号： 3 4 のポリペプチドおよび配列番号： 3 3 のポリペプチド、

配列番号： 3 4 のポリペプチドおよび配列番号： 1 4 のポリペプチド、

配列番号： 3 4 のポリペプチドおよび配列番号： 1 3 のポリペプチド、

配列番号： 3 5 のポリペプチドおよび配列番号： 3 3 のポリペプチド、

配列番号： 3 5 のポリペプチドおよび配列番号： 1 4 のポリペプチド、または

配列番号： 3 5 のポリペプチドおよび配列番号： 1 3 のポリペプチド。

【 0 0 4 5 】

本明細書にて特記しない場合、「ポリヌクレオチド」は任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを含み、これは未修飾 RNA もしくは DNA、または修飾 RNA もしくは DNA でよく、限定するものではないが 1 本鎖および 2 本鎖 RNA ならびに 1 本鎖および 2 本鎖領域の混合物である RNA を含む。

【 0 0 4 6 】

本発明によるポリヌクレオチド、例えば各々配列番号： 5、配列番号： 6、配列番号： 1 1、配列番号： 1 2、配列番号： 1 3、配列番号： 1 4、配列番号： 3 3、配列番号： 3 4、もしくは配列番号： 3 5 のポリヌクレオチドのような、CDR 1、CDR 2、CDR 3、CDR 1'、CDR 2'、CDR 3' または各々配列番号： 1、配列番号： 2、配列番号： 3、配列番号： 4、配列番号： 7、配列番号： 8、配列番号： 9、配列番号： 1 0、配列番号： 3 1 もしくは配列番号： 3 2 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドはその対立遺伝子変種および / またはその相補体を含み；例えば各々配列番号： 5、配列番号： 6、配列番号： 1 1、配列番号： 1 2、配列番号： 1 3、配列番号： 1 4、配列番号： 3 3、配列番号： 3 4、または配列番号： 3 5 のヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含み；例えば各々配列番号： 1、配列番号： 2、配列番号： 3、配列番号： 4、配列番号： 7、配列番号： 8、配列番号： 9、配列番号： 1 0、配列番号： 3 1 または配列番号： 3 2 に少なくとも 8 0 % の同一性を有するポリペプチドをコードし、例えば該ポリペプチドの機能的誘導体、例えば各々配列番号： 1、配列番号： 2、配列番号： 3、配列番号： 4、配列番号： 7、配列番号： 8、配列番号： 9、配列番号： 1 0、配列番号： 3 1 または配列番号： 3 2 と少なくとも 6 5 % の相同性を有する該機能的誘導体を含み、例えば該機能的誘導体は各々配列番号： 1、配列番号： 2、配列番号： 3、配列番号： 4、配列番号： 7、配列番号： 8、配列番号： 9、配列番号： 1 0、配列番号： 3 1 または配列番号： 3 2 の共有結合性修飾を含み、例えば該機能的誘導体は各々配列番号： 1、配列番号： 2、配列番号： 3、配列番号： 4、配列番号： 7、配列番号： 8、配列番号： 9、配列番号： 1 0、配列番号： 3 1 または配列番号： 3 2 のアミノ酸配列変種を含み、例えば各々配列番号： 5、配列番号： 6、配列番号： 1 1、配列番号： 1 2、配列番号： 1 3、配列番号： 1 4、配列番号： 3 3、配列番号： 3 4、もしくは配列番号： 3 5 は遺伝子コードの冗長（縮重）の結果である配列を含み、各々配列番号： 1、配列番号： 2、配列番号： 3、配列番号： 4、配列番号： 7、配列番号： 8、配列番号： 9、配列番号： 1 0、配列番号： 3 1 もしくは配列番号： 3 2 のポリペプチドをもまたコードするか、または各々配列番号： 1、配列番号： 2、配列番号： 3、配列番号： 4、配列番号： 7、配列番号： 8、配列番号： 9、配列番号： 1 0、配列番号： 3 1 もしくは配列番号： 3 2 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有するアミノ酸を伴うポリペプチドをコードする。好ましくは対立遺伝子変種または機能的誘導体は少なくとも、配列番号： 1 のポリペプチドおよび / もしくは配列番号： 2 のポリペプチドを含む結合分子、配列番号： 9 もしくは配列番号： 1 0 のポリペプチドおよび / または配列番号： 7 もしくは

10

20

30

40

50

は配列番号： 8 のポリペプチドを含むヒト化抗体、または配列番号： 3 1 もしくは配列番号： 3 2 のポリペプチドおよび / または配列番号： 7 もしくは配列番号： 8 のポリペプチドのヒト化抗体の結合親和性を有する。

【 0 0 4 7 】

例えばキメラまたはヒト化抗体である C D 4 5 R O / R B 結合分子を組換え D N A 技術により生成することができる。したがって、C D 4 5 R O / R B 結合分子をコードする 1 つまたはそれより多い D N A 分子を構築し、適切な制御配列下に置き、そして適切なベクターにより発現させるために適当な宿主（生物体）に移すことができる。

【 0 0 4 8 】

別の態様では本発明は本発明による C D 4 5 R O / R B 結合分子の単一の重鎖および / または軽鎖をコードするポリヌクレオチド；および組換え手段による本発明による C D 4 5 R O / R B 結合分子の生成のための本発明によるポリヌクレオチドの使用を提供する。

10

【 0 0 4 9 】

C D 4 5 R O / R B 結合分子を例えば本明細書にて提供する情報と一緒に、例えば超可変または可変領域のアミノ酸配列およびこれらの領域をコードするポリヌクレオチド配列の知識を用いて従来と同じように得ることができる。可変ドメイン遺伝子を構築する方法は、例えば欧州特許第 2 3 9 4 0 0 号に記載されており、そして簡単には以下のように要約できる：いかなる特異性があっても m A b の可変領域をコードする遺伝子をクローニングすることができる。フレームワークおよび超可変領域をコードする D N A セグメントを決定し、そして超可変領域をコードする D N A セグメントを除去する。2 本鎖合成 C D R カセットを本明細書にて特記するような C D R および C D R ' 配列に従って D N A 合成により調製する。これらのカセットは付着末端を提供するので、これらはヒト起源の望ましいフレームワークの接合部でライゲートできるようになる。1 本鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを、例えば従来と同じように調製することができる。このように調製された本発明によるポリヌクレオチドを都合よく適切な発現ベクターに移すことができる。

20

【 0 0 5 0 】

適切な細胞系を例えば従来の方法によるのと同じように見出すことができる。例えば適当な（複数の）プロモーターを含む発現ベクターならびに重鎖および軽鎖定常部分をコードする遺伝子は公知であり、市販により入手可能である。適切な宿主は公知であるか、または例えば従来の方法によるのと同じように見出すことができ、そして細胞培養またはトランスジェニック動物を含む。

30

【 0 0 5 1 】

別の態様では本発明は本発明による C D 4 5 R O / R B 結合分子をコードする、例えば配列番号： 1 5、配列番号： 1 6、配列番号： 1 7、配列番号： 1 8、配列番号： 3 6、配列番号： 3 7、配列番号： 3 8、配列番号： 3 9、配列番号： 4 0 または配列番号： 4 1 の配列のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。

【 0 0 5 2 】

別の態様では本発明は：
発現系またはその一部が適合する宿主細胞に存在する場合、該発現系またはその一部が本発明による C D 4 5 R O / R B 結合分子を生成することができる、本発明によるポリヌクレオチドを含む該発現系；および
前記で定義したような発現系を含む単離された宿主細胞；
を提供する。

40

【 0 0 5 3 】

さらに本発明による C D 4 5 R O / R B 結合分子がインビトロ M L R により決定されるように用量依存的な様式で 1 次同種免疫応答を阻害することを見出した。その結果により本発明による C D 4 5 R O / R B 結合分子の存在下で同種活性化されている細胞は同種抗原に対するその応答性を低下させることが示される。これにより、本発明による C D 4 5 R O / R B 結合分子はエフェクター同種反応性 T 細胞に直接作用し、そしてその機能を調

50

節することができることが確認される。加えて、観察された機能効果の特異性を評価するために1次MLRから誘導されたT細胞の機能特性が、特異的刺激細胞または第三者刺激剤を用いて2次MLRにおける再刺激実験においてさらに研究された。2次培養には抗体は加えられなかったが、本発明によるCD45RO/RB結合分子が存在する1次MLRから誘導された細胞は、続く特異的刺激細胞での最適な刺激に应答する能力において低下したことが見出された。障害の特異性は本発明によるCD45RO/RB結合分子で処理した細胞の無関係の第三者供与体からの刺激細胞に正常に应答する能力により実証された。したがって1次MLR培養から誘導されたT細胞を用いる再刺激実験により、本発明によるCD45RO/RB結合分子で同種活性化された細胞は元来の同種抗原に対して低应答性、すなわち寛容であることが示される。別の生物学的活性を実施例7、および9から13にて記載する。

10

【0054】

さらに本発明によるCD45RO/RB結合分子で予め処理された細胞における細胞増殖を外因性IL-2により救出することができることが見出された。これにより、本発明によるCD45RO/RB結合分子での同種活性T細胞の処理は寛容の状態を誘起することが示される。実際に、本発明によるCD45RO/RB結合分子で処理された細胞において観察された増殖应答性の低減はT細胞機能の低下によるものであり、そしてこれらの細胞は外因性IL-2に应答することができたが、これはこれらの細胞がアネルギー性の、真の不应答状態にあることを示している。この应答の特異性は、本発明によるCD45RO/RB結合分子で処理した細胞が無関係の供与体細胞をコントロール処理細胞のレベルまで正常に増殖させる能力により示された。

20

【0055】

加えて、実験により本発明によるCD45RO/RB結合分子のCD45ROおよびCD45RBへの結合は免疫された提供者からの末梢血単核球(PBMC)の特異的リコール抗原に対する記憶应答を障害し得ることが示される。本発明によるCD45RO/RB結合分子のCD45ROおよびCD45RBへの結合はまた可溶性抗原に対する記憶应答をも障害する。本発明によるCD45RO/RB結合分子の、免疫された提供者からのPBMCにおける破傷風に対するリコール应答を障害する能力により、本発明によるCD45RO/RB結合分子が記憶T細胞の活性化をターゲティングおよび調節できることが示される。例えばこれらのデータにより、本発明によるCD45RO/RB結合分子は、同種反応性および活性化されたT細胞を認識することに加えて、その機能を調節することができ、結果的にT細胞アネルギーの誘導に至ることが示される。この特性は自己抗原およびアレルゲンに対する、そして恐らく自己免疫疾患、アレルギーおよび慢性拒絶で認められるような同種抗原に対する進行中の免疫应答、ならびに記憶应答が疾病状態の維持において役割を果たす乾癬、炎症性腸疾患のような疾患の処置に重要であろう。自己抗原に対する記憶应答が疾患の維持に関して主要な役割を果たし得る自己免疫疾患におけるような疾患の状況において重要な特徴であると考えられている。

30

【0056】

本発明によるCD45RO/RB結合分子がインビボで混合リンパ球培養反応(MLR)におけるT細胞増殖应答を調節し得ることもまた見出された、すなわち本発明によるCD45RO/RB結合分子は例えば致死的な異種移植片対宿主病(GvHD)の防御またはSCIDマウスモデルにおけるヒト同種移植片皮膚拒絶を媒介する炎症過程の抑制、またはhu-PBL-NOD/SCIDマウスモデルにおけるヒト島同種移植片生存の延長のようなインビボ試験における対応する障害特性を有することが見出された。

40

【0057】

したがって本発明によるCD45RO/RB結合分子は免疫抑制性および寛容原性特性を有し得て、そして同種抗原、自己抗原、アレルゲンおよび細菌叢抗原に対するインビボおよびエキソビボ寛容誘導に有用であり得て、例えば本発明によるCD45RO/RB結合分子は、例えば限定するものではないが、リウマチ性関節炎、乾癬性関節炎、自己免疫性甲状腺炎、グレーブス病、I型およびII型糖尿病、多発性硬化症、クローン病(CD

50

）、潰瘍性大腸炎（UC）、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、強皮症、自己免疫性胃炎、糸球体腎炎、限定するものではないが、例えば心臓、肺、複合心肺、肝臓、腎臓、脾臓、皮膚もしくは角膜移植の受体の処置のための、器官および組織同種移植片および異種移植片拒絶のような移植片拒絶、骨髄移植の後のような移植片対宿主病（GVHD）、および/もしくは脾臓島細胞移植片拒絶のような自己免疫疾患を含み、ならびに/または乾癬、アレルギー性接触性皮膚炎を含むアトピー性および接触性皮膚炎のような皮膚炎、炎症性腸疾患および/もしくはアレルギー性喘息を含むアレルギーもまた含む疾患の処置および予防に有用であり得る。

別の態様では本発明は、本発明によるCD45RO/RB結合分子の、例えば自己免疫疾患、移植片拒絶、例えば脾臓島移植片拒絶または移植片対宿主病（GVHD）、乾癬、皮膚炎、炎症性腸疾患および/またはアレルギーの処置および予防における薬剤としての使用を提供する。

10

【0058】

別の態様では本発明は、自己免疫疾患、移植片拒絶、例えば脾臓島移植片拒絶または移植片対宿主病（GVHD）、乾癬、皮膚炎、炎症性腸疾患および/またはアレルギーに関連する疾患の処置および予防における医薬品の生成のための本発明によるCD45RO/RB結合分子を提供する。

【0059】

別の態様では本発明は、かかる処置および/または予防を必要とする対象に有効量の本発明によるCD45RO/RB結合分子を例えば本発明による医薬組成物の形態で投与することを含み、自己免疫疾患、移植片拒絶、乾癬、皮膚炎、炎症性腸疾患および/またはアレルギーに関連する疾患の処置および予防の方法を提供する。

20

【0060】

本発明の1つの実施態様は、かかる処置および/または予防を必要とする対象に有効量の本発明による分子またはヒト化抗体を投与することを含み、島細胞移植片拒絶に関連する疾患、例えば島細胞移植片拒絶の処置および/または予防の方法を提供する。

【0061】

好ましい実施態様では、薬剤として使用するための、医薬品を製造するための、または自己免疫疾患、移植片拒絶、乾癬、皮膚炎、炎症性腸疾患および/またはアレルギーに関連する疾患の処置および/または予防の方法における該CD45RO/RB結合分子は配列番号：31もしくは配列番号：32のポリペプチドおよび/または配列番号：7もしくは配列番号：8のポリペプチドを含む。好ましくはCD45RO/RB結合分子は配列番号：31のポリペプチドおよび配列番号：8のポリペプチドを含む。

30

【0062】

CD45RO/RB結合分子の「有効量」は、直接的または間接的のいずれかで、自己免疫疾患、移植片拒絶、乾癬、皮膚炎、炎症性腸疾患および/またはアレルギーの結果である1つまたはそれより多い徴候を低減させる、これらを患うものの生活の質を高める、かかる疾患を処置するのに必要なその他の薬物療法の用量を減少させる、別の薬物療法の効果を増強する、疾患の進行を遅延させる、および/または患者の生存を延長するような臨床結果を含む有益なまたは望ましい結果を起こすのに十分な量である。

40

【0063】

有効量を1回またはそれより多い投与で投与することができ、そして別の薬物、化合物または医薬組成物と併用して達成してもしなくてもよい。したがって、「有効量」を、1つまたはそれより多い治療薬を投与する局面で考えることができ、そして1つまたはそれより多いその他の薬剤と併用して望ましい結果を達成し得るかまたは達成する場合、単一の薬剤を有効量で与えると考えることができる。

【0064】

さらに例えば自己免疫疾患、移植片拒絶、乾癬、皮膚炎、炎症性腸疾患および/またはアレルギーに関連する疾患の処置または予防のために本発明のCD45RO/RB結合分子を単独で活性な成分として、または免疫調節投薬計画におけるその他の薬物またはその

50

他の抗炎症剤と一緒に投与できることも提供される。例えば本発明のCD45RO/RB結合分子をカルシニューリン阻害剤、例えばシクロスポリンA、シクロスポリンG、FK-506、ABT-281、ASM981；mTOR阻害剤、例えばラパマイシン、40-O-（2-ヒドロキシ）エチル-ラパマイシン、CCI779、ABT578、AP23573、AP23464、AP23675、AP23841、TAF-93、パイオリムス-7もしくはパイオリムス-9；副腎皮質ステロイド；シクロホスファミド；アザチオプリン；メソトレキセート；S1P受容体アゴニスト、例えばFTY720もしくはその類似体；レフルノミドもしくはその類似体；ミゾリピン；ミコフェノール酸；ミコフェノール酸モフェチル；15-デオキシスベルグアリンもしくはその類似体；免疫抑制性モノクローナル抗体、例えば白血球受容体、例えばMHC、CD2、CD5、CD4、CD11a/CD18、CD7、CD25、CD27、B7、CD40、CD45、CD58、CD137、ICOS、CD150（SLAM）、OX40、4-1BBもしくはそのリガンド、例えばCD154に対するモノクローナル抗体；またはその他の免疫調節化合物、例えばCTLA4もしくはその変異体の細胞外ドメインの少なくとも一部を有する組換え結合分子、例えばCTLA4の少なくとも細胞外部分もしくは非CTLA4タンパク質配列に連結されたその変異体、例えばCTLA4lg（例えばATCC68629に指定されている）もしくはその変異体、例えばLEA29Y、もしくはその他の付着分子阻害剤、例えばmAbもしくはLFA-1アンタゴニストを含む低分子量阻害剤、セレクチンアンタゴニストおよびVLA-4アンタゴニストと組み合わせて用いることができる。

10

20

【0065】

単独のまたは他の薬物、化合物もしくは医薬組成物と併用した有効量の本発明のCD45RO/RB結合分子を、注射を含む任意の従来の経路により、または時間をかけた漸次注入により投与することができる。投与は例えば経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、腔内、皮下、局所または経皮でよい。「同時投与」とは、経口投与時に例えば双方の化合物が同時に消化管に存在するように、一緒にまたは実質的に同時に、同一のベヒクルまたは別個のベヒクルのいずれかでの本発明の組成物の成分の投与を意味する。好ましくは化合物を固定された組み合わせで投与する。

【0066】

別の態様では本発明は少なくとも1つの薬学的に許容される担体または希釈剤に随伴される本発明によるCD45RO/RB結合分子を含む医薬組成物を提供する。

30

本明細書で用いる「薬学的に許容される担体または希釈剤」なる用語は、ヒトを含む哺乳動物への投与に適当な1つまたはそれより多い適当した固体または液体充填剤、希釈剤、または封入物質を意味する。

【0067】

「担体」なる用語は、適用を促すために活性成分と組み合わせる、天然または合成の有機または無機成分を意味する。

「薬学的に許容される」なる用語は、活性成分の生物学的活性の有効性と干渉しない無毒の材料を意味する。かかる製剤は通常薬学的に許容される濃度の塩、緩衝剤、保存剤、適当する担体、アジュバントおよびサイトカインのような免疫補助増強剤、ならびに場合によっては化学療法剤のようなその他の治療薬を含有する。

40

【0068】

医薬品を用いる場合、塩は薬学的に許容されるべきであるが、薬学的に許容されない塩を都合よく用いてその薬学的に許容される塩を調製することができ、そして本発明の範囲から排除されない。

医薬組成物は：酢酸の塩；クエン酸の塩；ホウ酸の塩；およびリン酸の塩を含む適当な緩衝剤を含有することができる。

医薬組成物はまた場合によっては：塩化ベンザルコニウム；クロロブタノール；パラベンおよびチメロサルのような適当な保存剤を含有することもできる。

【0069】

50

対象に投与されるポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする核酸の用量を種々のパラメーターに従って、とりわけ用いる投与の様式および対象の状態に従って選択することができる。その他の因子には望ましい処置期間が挙げられる。対象における応答が適用された最初の用量で不十分である場合には、患者の寛容が許容される程度まで高用量（または異なる、さらに局所化された分配経路による効果的な高量）を用いることができる。

【0070】

医薬組成物を単位投与形態で都合よく提示することができ、そして薬学の分野で周知のいずれかの方法により調製することができる。全ての方法は、1つまたはそれより多い副成分を構成する担体に活性薬剤を随伴させる工程を含む。一般に、液体担体、微細に分割された固体担体、または双方に活性化合物を均一におよび十分に随伴させ、そして次に必要により生成物を成形することにより組成物を調製する。

10

【0071】

経口投与に適当な組成物を、各々予め決定された量の活性化合物を含有するカプセル、錠剤、トローチ剤のような個々の単位として提示することができる。その他の組成物には水性液体またはシロップ、エリキシルまたはエマルジョンのような非水性液体の懸濁液が挙げられる。

【0072】

非経口投与に適当な組成物はポリペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸の滅菌水性または非水性調製物を含むのが都合よく、これは受体の血液と等張であるのが好ましい。適当な分散または湿潤剤および懸濁化剤を用いて公知の方法に従ってこの製剤を処方することができる。滅菌注射用製剤はまた、無毒の非経口用に許容される希釈剤または溶媒中、例えば1,3-ブタンジオール溶液として、滅菌注射用溶液または懸濁液でよい。許容されるベヒクルおよび溶媒のうち、水、リンガー溶液、および等張塩化ナトリウム溶液を用いてよい。加えて、滅菌不揮発性油を溶媒または懸濁溶媒として用いるのが都合よい。この目的のために合成モノまたはジグリセリドを含む任意の無刺激性不揮発性油を用いることができる。加えて、オレイン酸のような脂肪酸を注射用の製剤に用いることができる。経口、皮下、静脈内、筋肉内等の投与に適当な担体処方をRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.に見出すことができる。

20

【0073】

医薬組成物はさらに例えば活性な成分、限定するものではないが、例えば前記したような抗ICOS、抗CD154、抗CD134Lのようなその他の免疫調節抗体、または限定するものではないがrCTLA-4(CD152)、rOX40(CD134)のような組換えタンパク質、または限定するものではないがシクロスポリンA、FTY720、RAD、ラパマイシン、FK506、15-デオキシスペルグアリン、ステロイドのような抗炎症剤もしくは免疫調節化合物を含み得る。かかる医薬組成物は使用のための指示書、場合によっては成分化合物の投与のコンプライアンスを促すためのさらなる手段、例えばラベルまたは図面を伴って、本発明によるCD45RO/RB結合分子ならびに別個の単位投与形態の免疫調節薬および/または抗炎症剤を含むことができ、ここで好ましくは単位投与形態は相乗効果量の成分化合物の投与に適當である。本発明の組成物を自由な組み合わせとして投与できるか、または固定された組み合わせに処方することができる。化合物の絶対投与量を多くの因子、例えば個体、投与経路、望ましい期間、活性物質の放出速度、ならびに処置される状態の特性および重篤度に依存して変える。

30

40

【0074】

単独でまたはその他の薬物と組み合わせる本発明のCD45RO/RB結合分子で処置される前記で概要を示したような疾患には、限定するものではないが、リウマチ性関節炎、乾癬性関節炎、自己免疫性甲状腺炎、グレーブス病、I型およびII型糖尿病、多発性硬化症、クローン病(CD)、潰瘍性大腸炎(UC)、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、強皮症、自己免疫性胃炎、糸球体腎炎を含む自己免疫疾患；限定するものではないが、例えば心臓、肺、複合心肺、肝臓、腎臓、膵臓、皮膚もしくは角膜移植の受体の処置のための器官および組織同種移植片および異種移植片拒絶を含む移植片拒絶、骨

50

髄移植の後のような移植片対宿主病（GVHD）、および／もしくは膵臓島細胞移植片拒絶；乾癬；アレルギー性接触性皮膚炎を含むアトピー性および接触性皮膚炎のような皮膚炎；炎症性腸疾患ならびに／またはアレルギー性喘息を含むアレルギーが挙げられる。

【0075】

（実施例）

以下の実施例を参照することにより本発明はさらに十分に理解されよう。しかしながらこれらは本発明の範囲を限定するとして解釈すべきではない。以下の実施例では全ての温度はセルシウス度である。

「候補mAb」または「キメラ抗体」は、配列番号：3の軽鎖および配列番号：4の重鎖を含む本発明によるCD45RO/RB結合分子である。

10

【0076】

「ヒト化抗体」は配列番号：8のポリペプチドおよび配列番号：9のポリペプチド（VHE/humV1、VHE/VL1またはVHE/VLh）、配列番号：8のポリペプチドおよび配列番号：10のポリペプチド（VHQ/humV1、VHQ/VL1またはVHQ/VLh）；配列番号：7のポリペプチドおよび配列番号：9のポリペプチド（VHE/humV2、VHE/VL2またはVHE/VLm）；配列番号：7のポリペプチドおよび配列番号：10のポリペプチド（VHQ/humV2、VHQ/VL2またはVHQ/VLm）；配列番号：8のポリペプチドおよび配列番号：31のポリペプチド（VHEN73D/humV1、VHEN73D/VL1またはVHEN73D/VLh）；配列番号：8のポリペプチドおよび配列番号：32のポリペプチド（VHQN73D/humV1、VHQN73D/VL1またはVHQN73D/VLh）；配列番号：7のポリペプチドおよび配列番号：31のポリペプチド（VHEN73D/humV2、VHEN73D/VL2またはVHEN73D/VLm）；または配列番号：7のポリペプチドおよび配列番号：32のポリペプチド（VHQN73D/humV2、VHQN73D/VL2またはVHEN73D/VLm）を含む本発明によるCD45RO/RB結合分子である。

20

【0077】

以下の略語を用いる：

APC	抗原提示細胞	
CEx	陽イオン交換クロマトグラフィー	30
c.p.m.	分あたりのカウント数	
dhfr	ジヒドロ葉酸リダクターゼ	
EDTA	エチレンジニトリロ四酢酸	
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法	
ESI-Q-TOF	エレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間型	
FACS	蛍光活性化細胞分類	
Fc	結晶化可能フラグメント	
F(ab') ₂	抗原結合性フラグメント；2価	
FITC	フルオレセインイソチオシアナート	
FBS	ウシ胎仔血清	40
GVHD	移植片対宿主病	
HCMV	ヒトサイトメガロウイルスプロモーター	
HPLC	高速液体クロマトグラフィー	
IFN-	インターフェロンガンマ	
IgE	免疫グロブリンアイソタイプE	
IgG	免疫グロブリンアイソタイプG	
IL-2	インターロイキン-2	
IU	国際単位	
MALDI-TOF	マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型	
MLR	混合リンパ球培養反応	50

M L C	混合リンパ球培養
M P 1	ヘモフィラス・インフルエンザ由来のマトリックスプロテイン 1
M T X	メソトレキセート
P B S	リン酸緩衝生理食塩水
P B L	末梢血白血球
P B M C	末梢血単核球
P C R	ポリメラーゼ連鎖反応
R P	逆相クロマトグラフィー
S E C	サイズ排除クロマトグラフィー
S C I D	重症複合免疫不全
T r e g	T 調節細胞
x G V H D	異種移植片対宿主病

10

【 0 0 7 8 】

実施例 1 : 1 次混合リンパ球培養反応 (M L R)細胞

血液試料を健常ヒト提供者から入手する。Ficoll-Hypaque (Pharmacia LKB) 上で遠心することにより全末梢血、白血球搬出またはバフィーコートからの白血球から公知の血液型であるが未知の H L A 型である末梢血単核球 (P B M C) を単離する。M L R 実験では 4 0 G y 照射の後、P B M C を刺激細胞として直接用いることもある。C D 2 または C D 3 Dynabeads (DynaI, Oslo, Norway) を用いることにより T 細胞を P B M C から枯渇させる実験もある。ビーズおよび夾雑する細胞を磁場により除去する。照射の後、T 細胞枯渇 P B M C を刺激細胞として用いる。

20

【 0 0 7 9 】

P B M C、C D 3 + T 細胞または C D 4 + T 細胞を M L R における応答細胞として用いる。異なる提供者からの細胞を刺激細胞に対して調製する。抗 C D 1 6 m A b (Zymed, CA)、ヤギ抗マウス I g G Dynabeads、抗 C D 1 4 Dynabeads、C D 1 9 Dynabeads を用いて C D 3 + T 細胞を陰性選択により精製する。加えて、抗 C D 8 Dynabeads を用いて C D 4 + T 細胞を精製する。FACSscanまたは FACSCalibur (Becton Dickinson & Co., CA) により得られた細胞を分析し、そして得られた細胞の純度は > 7 5 % であった。1 0 % 熱不活性化 F B S、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび L - グルタミンを補充した R P M I 1 6 4 0 培地に細胞を懸濁する。

30

【 0 0 8 0 】

試薬

キメラ抗 C D 4 5 R 0 / R B m A b 「候補 m A b」およびアイソタイプ対応コントロールキメラ抗体をも作成する。K L H (キーホールリンペットヘモシアニン) または組換えヒト I L - 1 0 に特異的なマウス (ヒト) コントロール I g G 1 抗体を BD Pharmingen (San Diego, CA) から購入する。抗ヒト C D 1 5 4 m A b 5 c 8 は Lederman et al 19 92 による。

【 0 0 8 1 】

1 次混合リンパ球培養反応 (M L R)

40

9 6 ウェル培養プレート (Costar, Cambridge, MA) の各ウェル中、示した m A B の存在下または A b の不在下で 1×10^5 個の P B M C または 5×10^4 個の C D 3 + もしくは C D 4 + 細胞のアリコートをして 1×10^5 個の照射 P B M C または 5×10^4 個の T 細胞枯渇照射 (5 0 G y) P B M C と混合する。最適な標的 C D 4 5 分子のインビトロ架橋を確実にするために、候補 m A b に加えて F c 部分に特異的なヤギ抗マウス I g またはヤギ抗ヒト I g の F (a b ') ₂ フラグメント (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) を $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ で加える実験もある。混合した細胞を 5 % C O ₂ 中 3 7 ° で 4 または 5 日間培養し、そして最後の 1 6 から 2 0 時間の培養の間 ³ H - チミジンと共に細胞をパルスすることにより増殖を決定する。前記したものに類似するが、以下 : 1) 用いる培地は 1 0 % F B S および 1 % ヒト血漿を含有する E X - V I V O (Bio-Whittaker) を

50

用いる；2) 2次架橋工程として抗マウス全IgG ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$) を用いる；3) 刺激細胞の照射は 60 Gy である；は例外である実験もある。

【0082】

「候補mAb」またはコントロールキメラIgG1 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) の存在下、双方共に2次工程試薬、Fc部分に特異的なヤギ抗ヒトIgのF(ab')₂フラグメント ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) を用いて1次MLRを実施する。「候補mAb」による阻害パーセンテージをコントロールIgG₁の存在下の細胞増殖と比較して算出する。結果を以下の表1に示す：

【0083】

【表1】

本発明による $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 候補mAbによる1次MLRの阻害

応答体	刺激剤(Irr. PBMC)	阻害%
#211 CD4	#219 CD3	63.51
#220 CD4	#219 CD3 depl.	63.07
#227 CD4	#220 CD3 depl.	65.96
#229 CD4	#219 CD3 depl.	50.76
平均±SD		60.83 ± 6.83 *

* コントロール値とは有意に異なる ($P < 0.001$)

【0084】

表1で示し得るように本発明による候補mAbは1次MLRを阻害する。平均阻害効果は4つの異なる提供者由来のCD4⁺T細胞で $60.83 \pm 6.83\%$ であり、そして統計的に有意である。

「候補mAb」による1次MLRの阻害は図1に示されるように「候補mAb」の 0.001 および $10 \mu\text{g}$ の範囲で用量依存的であることが示される。

【0085】

「候補mAb」による1次MLRの阻害に関するIC₅₀は応答細胞として1提供者PBMCを用いる3つの別個のMLR実験の結果から決定される。したがって、#229および#219提供者からの応答CD4⁺T細胞および刺激剤としてT細胞を枯渇した照射PBMCを「候補mAb」またはコントロールキメラAbの存在下で $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヤギ抗ヒトIgのF(ab')₂フラグメントと混合する。実験を3回繰り返し、そしてコントロールAbの存在下のT細胞増殖と比較して、「候補mAb」の存在下の増殖のパーセンテージを算出する。Origin (V. 6.0 (登録商標)) を用いてIC₅₀値を決定する。細胞活性IC₅₀値は、算出して $0.87 \pm 0.35 \text{ nM}$ ($0.13 \pm 0.052 \mu\text{g}/\text{ml}$) になる。

【0086】

実施例2：2次MLR

「候補mAb」がCD4⁺T細胞の特異的同種抗原に対する非応答性を誘起するかどうかを評価するために、1次MLCの後に抗体を何ら存在させないで2次MLRを実施する。96ウェル培養プレート中示した抗体の存在下で10日間CD4⁺T細胞を照射した同種刺激細胞(T細胞枯渇PBMC)と共に培養する(1次MLC)。次いで細胞を収集し、Ficoll-Hypaqueグラジエント上に積層して死細胞を除去し、RPMIで2回洗浄し、そして同一の刺激剤、第三者刺激細胞またはIL-2 ($50 \text{ U}/\text{ml}$) で再刺激する。細胞を3日間培養し、そして3H-チミジンで最後の16から20時間の培養の間細胞をパルスすることにより増殖性応答を決定する。

【0087】

具体的には、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 「候補mAb」、コントロールIgG1キメラAbおよびヤギ抗ヒトIgのF(ab')₂フラグメントの存在下でCD4⁺T細胞を照射した同種刺激細胞(別の提供者から採取したT細胞枯渇PBMC)と共に培養する。1次MLR増殖を5日に決定する。2次MLRのために応答および刺激細胞を「候補mAb」の存在下

10

20

30

40

50

10日間培養し、次いで細胞を収集し、RPMI 1640で2回洗浄し、そして抗体を何ら存在させないで特異的刺激剤、第三者刺激剤またはIL-2 (50 U/ml) で再刺激する。細胞増殖を3日に決定する。結果を表2に示す：

【0088】

【表2】

応答CD4+T細胞提供者 #	2 nd MLR 阻害 %
#211	49.90*
#220	59.33*
#227	58.68*

* コントロール値とは有意に異なる (p = < 0.001、t 検定により決定、SigmaStat V.2.03)。# p = < 0.046

【0089】

低下した増殖が「候補mAb」との処理の結果としての非応答性によるのかどうかを検定するために、1次MLRから誘導された細胞をIL-2 (50 U/ml) の存在下で培養する。IL-2の添加の結果、1次MLRにおいて「候補mAb」で処理されたT細胞の増殖応答はIgG₁ コントロールAbにおいて観察されたものに類似するレベルまで救出される。これらのデータにより、「候補mAb」で処理されたT細胞における2次応答の低下は、特異的刺激細胞に対して非応答性になる応答T細胞の機能的変化によるものであることが示される。

【0090】

阻害パーセンテージを以下の式に従って算出する：

【数1】

$$\frac{\text{コントロールAbでのc.p.m.} - \text{「候補mAb」でのc.p.m.}}{\text{コントロールAbでのc.p.m.}} \times 100$$

SigmaStat (Vers. 2.03)を用いて統計分析を実施する。

二元配置分散分析 (two-way ANOVA) に続いてDunnett法によりデータを分析する。全ての検定手順で確率 < 0.05 を有意と考える。t 検定を用いる実験もある (SigmaStat V.2.03)。

【0091】

実施例3：SCIDマウスにおけるインビボ生存試験

SLIDマウスにおけるhu-PBLの生着

SCIDマウスC.B17/GbmsTac-Prkdc^{scid} Lyst^{bg}マウス (Taconic, Germantown, NY) に、ヒト末梢血単核球 (PMBC) を細胞移入から4週以内に > 90% のマウスに致死的な異種移植片対宿主病 (xGvHD) を誘起するに十分な量で腹腔内注射する。かかる処置をされたSCIDマウスを以後hu-PBL-SCIDマウスと称する。

【0092】

hu-PBL-SCIDマウスのMab処置

0日、PMBC注射後すぐ、3日、7日およびその後毎週の間隔でhu-PBL-SCIDマウスを「候補mAb」またはマウスもしくはキメラアイソタイプ対応mAbコントロールで処置する。MabをPBS 100 µl 中最終濃度 5 mg/kg 体重で皮下に分配する。全てのコントロールマウスが死亡したときに処置を停止した。

【0093】

処置結果の評価

この試験で「候補mAb」の効果を評価するための主要な基準はhu-PBL-SCIDマウスの生存であった。Systat v9.01ソフトウェアの助けを借りて、ログランク検定 (Mantel法) を用いる生存分析の統計学的方法により結果の有意性を評価する。生存分析の方法はノンパラメトリック検定であり、これは特定のマウスが依然生存しているかどうかを考慮するのみならず、その器官/細胞でのインビトロ分析の実施の要求のような処置 /

10

20

30

40

50

疾患に関係のない理由のために屠殺されたかどうかもまた考慮する。さらに評価するために肝臓、肺、腎臓および脾臓の生検を死亡したマウスから入手する。加えて、健康状態を間接的に推定するのに $h u - P B L - S C I D$ マウスの重量測定を最初（細胞移植の前）および実験期間中（2日毎）に行う。各マウスから得られた体重対 $P B M C$ 移入後日数の値を用いて線形回帰線を作成し、そして続いてノンパラメトリック Mann-Whitney 検定を用いてその勾配（コントロール対抗 $C D 4 5$ 処置マウス）を比較した。

【0094】

結果

マウス $m A b$ コントロールで処置した全ての $h u - P B L - S C I D$ マウスは肺、肝臓および脾臓でヒト白血球の浸潤があり、そして細胞移入後約2から3週以内に死亡した（4/4）。死亡はおそらく $x G v H D$ の結果である。コントロール $m A b$ 処置マウスはさらに直線的な様式で3週以内に約10%以上体重が減少した。

10

【0095】

「候補 $m A b$ 」で処置した全ての $h u - P B L - S C I D$ マウスは、3週後に「候補 $m A b$ 」処置を停止しても、何ら疾患の明白な徴候もなく4週以上生存した（4/4）。「候補 $m A b$ 」処置マウスは直線的な様式で4週以内に約5%まで体重が増加した。

【0096】

実施例4：本発明の抗体の発現

配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：31または配列番号：32を含むヒト化抗体の発現

20

各々ヒト化軽鎖可変領域 $h u m V 1$ （配列番号：8；図4および6）、ヒト化軽鎖可変領域 $h u m V 2$ （配列番号：7；図5および7）、ヒト化重鎖可変領域 $V H E$ （配列番号：9；図3および10）、またはヒト化重鎖可変領域 $V H Q$ （配列番号：10；図2および11）、ヒト化重鎖可変領域 $V H E - N 7 3 D$ （配列番号：31；図8）、またはヒト化重鎖可変領域 $V H Q - N 7 3 D$ （配列番号：32；図9）のアミノ酸配列をコードする対応するヌクレオチドを含む図2から11に示すプラスミドマップによる発現ベクターを構築する。これらの発現ベクターは配列番号：15および配列番号：41（ $V H Q$ ）、配列番号：16および配列番号：40（ $V H E$ ）、配列番号：17および配列番号：36（ $h u m V 1$ ）、配列番号：18および配列番号：39（ $h u m V 2$ ）、または配列番号：37（ $V H E - N 7 3 D$ ）および配列番号：38（ $V H Q - N 7 3 D$ ）のDNA（ヌクレオチド）配列を有する。

30

【0097】

COS細胞における発現のためのヒト化抗体重鎖および軽鎖発現ベクターの構築

バージョン $V L h$ および $V L m$ のためのヒトカップパ軽鎖発現ベクター

ヒトカップアイソタイプの完全ヒト化軽鎖をコードする最終発現ベクターを構築するために、 $H i n d I I I$ および $B g l I I I$ を用いて完全軽鎖可変領域（ $V L h$ および $V L m$ ）をコードするDNAフラグメントを $V L h$ および $V L m$ 含有PCRスク립トクローニングベクター（Stratagene）（ $V L m$ 領域）から切り取った。ゲル精製したフラグメントを、ヒト化抗 $I g E$ 抗体 $T E S C - 2 1$ （Kolbinger et al 1993）の構築の間に創られ、そして元はM. Bendig（MRC Collaborative Centre, London, UK）（Maeda et al. 1991）から入手した $C 2 1 - H C M V$ カップパ発現ベクターの $H i n d I I I$ および $B a m H I$ 部位にサブクローニングした。フェノール/クロロホルム抽出によりライゲーション生成物を精製し、そしてエレクトロポレーションコンピテント *Epicurian Coli*（登録商標）XL1-Blue 株（カタログ番号200228、Stratagene）にエレクトロポレートした。LB / $a m p$ 寒天平板に37℃で一晩蒔いた後、各12コロニーを取り、BioRobot 9600（Qiagen）を用いて3ml培養物からプラスミドDNAを調製した。これは図でさらに記載するように、ヒト化抗体バージョン $V L h$ および $V L m$ 各々のための軽鎖発現ベクターを生じた。

40

【0098】

$V H Q$ のためのヒトガンマ - 1 重鎖発現ベクター

50

V H Q 発現ベクターの構築のために、段階的アプローチを採用した。最初に V H Q の完全な可変領域を Kolbinger et al 1993 (Protein Eng. 1993 Nov; 6(8):971-80) に記載されるような方法によって P C R により組み立て、そして同一の酵素を用いて C 2 1 インサートが除去されている C 2 1 - H C M V - ガンマ - 1 発現にサブクロニングした。完全可変領域を含有する P C R スクリプトクロニング V H Q の H i n d I I I / B a m H I フラグメントを次いで同一の酵素で切断した発現ベクター C 2 1 - H C M V - ガンマ - 1 にサブクロニングした。これはヒト化抗体バージョン V H Q のための最終発現ベクターを生じた。

【 0 0 9 9 】

V H E のためのヒトガンマ - 1 重鎖発現ベクター

ヒト化抗 I g E 抗体 T E S C - 2 1 の構築の間に創られた (Kolbinger et al. 1993) 、およびまた元は M. Bendig (MRC Collaborative Centre, London, UK) (Maeda et al. 1991) から入手した C 2 1 - H C M V - ガンマ - 1 発現ベクターの H i n d I I I および B a m H I 部位に、種々の領域をコードする H i n d I I I および B a m H I 制限 P C R フラグメントを直接ライゲートすることによりヒトガンマ - 1 アイソタイプの完全なヒト化重鎖をコードする最終 V H E 発現ベクターの構築を達成した。

【 0 1 0 0 】

C O S 細胞における一過性発現

SuperFect (商標) トランスフェクション試薬 (カタログ番号 3 0 1 3 0 5、Qiagen) を用いて以下のトランスフェクションプロトコルを 1 5 0 m m 細胞培養皿中の付着 C O S 細胞に適合させる。前記で記載した 4 つの異なる発現ベクターを細胞の一過性トランスフェクションに用いる。ヒト化抗体の発現のために、重鎖インサートを含有する 2 つのクローンの各々 (各々 V H E または V H Q) を、軽鎖をコードする 2 つのクローンの各々 (各々 h u m V 1 または h u m V 2) と共に、重鎖および軽鎖発現ベクターの全部で 4 つの異なる組み合わせ (V H E / h u m V 1、V H E / h u m V 2、V H Q / h u m V 1 および V H Q / h u m V 2) を細胞に同時トランスフェクトする。トランスフェクションの前に、アンピシリンの耐性遺伝子をコードする領域で切断する制限エンドヌクレアーゼ P v u I でプラスミドを直線化する。トランスフェクションの前日に、新鮮培養培地 3 0 m l 中 4×10^6 C O S 細胞を 1 5 0 m m 細胞培養皿に加える。この細胞密度での播種は一般に 2 4 時間後に 8 0 % 細胞集密度を生じた。トランスフェクションの日に直線化した重鎖および軽鎖 D N A 発現ベクターの 4 つの異なる組み合わせ (各 1 5 μ g) を血清および抗生物質を含まない新鮮培地全容量 9 0 0 μ l に希釈する。次いで SuperFect トランスフェクション試薬 1 8 0 μ l を D N A 溶液と完全に混合する。D N A 混合物を室温で 1 0 分間インキュベートして複合体を形成させる。複合体形成を生じる間、成長培地を C O S 細胞培養から除去し、そして細胞を P B S で 1 回洗浄する。次に新鮮培養培地 9 m l (1 0 % F B S および抗生物質を含有する) をトランスフェクション複合体が入った各反応チューブに加え、そして十分に混合する。最終調製物を即座に 4 つの培養物の各々に移してトランスフェクトさせ、そして穏やかに混合する。次いで細胞培養物を D N A 複合体と共に 3 7 および 5 % C O ₂ で 3 時間インキュベートする。インキュベーションの後、トランスフェクション複合体を含有する培地を除去し、そして新鮮培養培地 3 0 m l で置換する。トランスフェクション後 4 8 時間に培養上澄を収集する。

【 0 1 0 1 】

培養上澄の濃度

E L I S A および F A C S 分析のために、重鎖および軽鎖プラスミドでトランスフェクトされた C O S 細胞から収集した培養上澄を以下のように濃縮する。Centriprep YM-50 遠心分離器フィルター装置 (カタログ番号 4 3 1 0、Millipore) に製造者により記載されるように各上澄 1 0 m l を加える。Centriprep フィルターを室温で 3 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心する。次いで 5 分間のみの遠心を用い、そして濃度の漸進的变化を監視して、再度残りの上澄 2 0 m l で遠心工程を繰り返す。濃縮した上澄の中間体 5 0 0 μ l を回収し、新しい Microcon 遠心分離器フィルター装置 (カタログ番号 4 2 4 1 2、Microcon) に移

10

20

30

40

50

し、そして以下の製造者のプロトコルに従ってさらに濃縮する。室温で3000rpmで24分間を4回、6000rpmで10分間を1回、そして次に5分間を3回、濃縮した上澄を遠心し、いつも濃度の漸進的变化を監視する。達成した濃縮条件培地の最終容量は100から120μlであり、元の培養培地の250から300倍の濃度に相当し、そして用時まで4で保存する。比較およびコントロールのためにトランスフェクトしていない細胞からの培養培地を前記したのと同じの遠心プロトコルを用いて同様に濃縮する。

【0102】

ヒト化抗CD45RO/RB抗体を分泌する安定したSp2/0骨髓腫トランスフェクタントの作成

マウス骨髓腫細胞系Sp2/0(ATCC、CRL-1581)を前記したCD45RO/RB結合ヒト化抗体の重鎖(VHEまたはVHQ)および軽鎖(humV1またはhumV2)をコードするCHO発現ベクターと共にエレクトロポレートする。重鎖および軽鎖発現ベクターの4つの異なる組み合わせ(VHE/humV1、VHE/humV2、VHQ/humV1およびVHQ/humV2)を以下のプロトコルに従ってトランスフェクションに用いる：エレクトロポレーションキュベット(0.4cmギャップ)中で各プラスミドのスーパーコイルDNA20μgをDMEM/10% FCS培養培地に懸濁した 8×10^6 個の生存Sp2/0細胞と混合する。BioRad GenePulser装置を用いるエレクトロポレーションの設定は1500V、25μFである。エレクトロポレーションの後、細胞を培養培地(10% FCS、ペニシリン、ストレプトマイシンおよびL-グルタミンを補充したDEME)中20時間培養する。2日に選択薬物G418(カタログ番号10131-019、Gibco)を最終濃度1mg活性薬物/mlまで加え、そして細胞を各ウェル200μlの96ウェルプレートにウェルあたり約 10^5 セルで分配する。10から15日後、G418生存クローンをG418含有培地に広げる。コーティング抗体ヤギ抗ヒトIgG/Fc(カタログ番号109-005-098、Jackson Labs)およびヒトカッパ軽鎖に対するペルオキシダーゼ結合抗体(カタログ番号A-7164、Sigma)を用いて、これらのトランスフェクタントからのヒト化mAbの分泌をELISAにより評価する。再度ELISAを用いて、このアッセイで正のスコアであったトランスフェクタントを細胞あたり日あたりで生産性を比較するために選択する(以下を参照)。ウェルあたり1セルの播種密度を用いて、限界希釈により即座にサブクロニングするために各トランスフェクタントのもっともよいクローンを選択する。G418生存サブクローンの生産性を再度前記したように決定する。培養容量が150mlに到達するまでサブクローンをG418含有選択培地に広げ、この段階でローラボトルに供給することになっているフラスコ中、G418を含まないで培養を続ける。

【0103】

最初のトランスフェクションおよび選択の後、安定したトランスフェクタントはVHE/humV1に関して20.8%、VHQ/humV1に関して11.5%、VHE/humV2に関して18.8%、およびVHQ/humV2に関して7.3%の頻度で96ウェルプレートから生じる。2ラウンドのサブクロニングの後、最良の2個の生産体はVHE/humV1に関してはクローン1.33.25(3.87pg/セル/日)およびクローン1.33.26(3.43pg/セル/日)、そしてVHQ/humV1に関してはクローン12.1.4(1.19pg/セル/日)およびクローン12.1.20(1.05pg/セル/日)である。VHE/humV1およびVHQ/humV1に関する安定したSp2/0トランスフェクタントを続いて抗体生成および精製のために拡大する。

【0104】

固定された抗ヒトIgGFcマトリックスおよびサイズ排除クロマトグラフィーを用いるアフィニティークロマトグラフィーの組み合わせにより、10%FCSを含有する安定してトランスフェクトされたSp2/0骨髓腫細胞系の上澄から抗体を精製する。必要によりActiclean Etoxカラム(Sterogene Bioseparations)を用いてエンドトキシンを除去する。

【0105】

10

20

30

40

50

S p 2 / 0 細胞における発現のためのヒト化抗体重鎖および軽鎖発現ベクターの構築
バージョン V L h および V L m のためのヒトカップ軽鎖発現ベクター :

h u m V 1 (= V L 1) または h u m V 2 (= V L 2) c D N A を P C R により各々 C H O 発現プラスミド配列番号 : 1 7 または配列番号 : 1 8 から、プライマー H u C D 4 5 L C - M l u (5 ' - A A A A C G C G T T G T G A C A T T C T G C T G A C C C A G T C T - 3 ' ; 配列番号 : 4 2) および H u C D 4 5 L C - H i n d (5 ' - A A A A A A G C T T G G T C C C C T G G C C G A A C G T G A A - 3 ' ; 配列番号 : 4 3) を用いて増幅する。3 2 1 b p の P C R フラグメント各々を M l u I および H i n d I I I で消化し、そして同一の酵素で消化した軽鎖発現ベクター c h A 6 H C k . d h f r に直接ライゲートする。得られたプラスミドを各々 L C V L 1 S p 2 0 (配列番号 : 3 6 ; 図 6) および L C V L 2 S p 2 0 (配列番号 : 3 9 ; 図 7) と称する。次に L C V L 1 S p 2 0 を S p 2 / 0 細胞におけるヒト化 C D 4 5 R O / R B 結合分子 V H E / h u m V 1 、 V H Q / h u m V 1 または V H E - N 7 3 D / h u m V 1 の発現に用い ; 次に L C V L 2 S p 2 0 を S p 2 / 0 細胞におけるヒト化 C D 4 5 R O / R B 結合分子 V H E / h u m V 2 、 V H Q / h u m V 2 または V H E - N 7 3 D / h u m V 2 の発現に用いることができる。

10

【 0 1 0 6 】

V H Q および V H E のためのヒトガンマ - 1 重鎖発現ベクター

2 つのヒト化 V_H c D N A 領域を P C R により各々組換えプラスミド H C M V - G 1 H u A 6 - V H E (配列番号 : 1 6 ; 図 3) および H C M V - G 1 H u A 6 - V H Q (配列番号 : 1 5 ; 図 2) から P C R プライマー H u C D 4 5 H C E u p (5 ' - C A G G C A G A G G T G C A G C T G G T G G A G T C A - 3 ' ; 配列番号 : 4 4) または H u C D 4 5 H C Q u p (5 ' - C A G G C A C A G G T G C A G C T G G T G G A G T C A - 3 ' ; 配列番号 : 4 5) および H u C D 4 5 H C l o (5 ' - A A A T C C T T C T A G A A C T C A C C T G A G G A G A C - 3 ' ; 配列番号 : 4 6) を用いて増幅する。P C R フラグメントの 3 ' 末端を B s t E I I で消化した。次いで各 P C R フラグメントを B s t E I I および平滑末端カッター H i n c I I I で切断した重鎖カセットベクター H C c a s s R E A L にクローン化する。得られたプラスミドは最終発現ベクター構築物への中間体であり、そして各々 H C c a s s H V E S P 2 0 および H C c a s s H V Q S P 2 0 と称される。このサブクロニングはまた元来のベクターの V_H 領域の双方に随伴されているリーダー配列を変化させる。古いリーダー配列のアミノ酸配列は M D W T W R V F C L L A V V A P G A H S (配列番号 : 4 7) であるが、これはサブクロニングの間に M A W V W T L P F L M A A A Q S V Q A (配列番号 : 4 8) と置き換えられている。

20

30

【 0 1 0 7 】

中間体 H C c a s s V H E S P 2 0 または H C c a s s V H Q S P 2 0 を S c a I で消化し、そして続いてプラスミドを B a m H I および E c o R I で消化する。I g 重鎖プロモーターおよび V H 領域を含有する 2 . 9 k b のフラグメントを精製し、そして重鎖発現構築物を B a m H I および E c o R I で消化した 8 . 7 k b フラグメントとライゲートする。得られたプラスミドは各々 H C V H E S p 2 0 (配列番号 : 4 0 ; 図 1 0) および H C V H Q S p 2 0 (配列番号 : 4 1 ; 図 1 1) と称され ; そして S p 2 / 0 細胞におけるヒト化 C D 4 5 R O / R B 結合分子 V H E / h u m V 1 、 V H Q / h u m V 1 の発現に用いられる。

40

【 0 1 0 8 】

V H E N 7 3 D のためのヒトガンマ - 1 重鎖発現ベクター

発現ベクター H C V H E S p 2 0 (配列番号 : 4 0 ; 図 1 0) および H C V H Q S p 2 0 (配列番号 : 4 1 ; 図 1 1) を鋳型として部位特異的変異誘発に用いて N 7 3 D 変異を達成する (C D 4 5 R O / R B 結合分子の重鎖の 7 3 位置のアミノ酸においてアスパラギンをアスパラギン酸に交換する) 。この変異は推定上の N - グリコシル化部位を排除する。QuikChange (登録商標) Multi-Site Directed Mutagenesis キット (Stratagene) およびプライマー C D 4 5 H - N 7 3 D (5 ' - ホスホ G C C A C A C T A A C T G C A G A C

50

AAATCCATCAGCACAGC - 3' ; 配列番号 : 49) を用いてキットマニュアルに従って変異誘発を実施する。得られた構築物 HCVHEN73D Sp20 および HCVHQN73D Sp20 の配列を確認し、そして各々配列番号 : 37 および配列番号 : 38、ならびに図8および9に開示する。HCVHEN73D Sp20 (配列番号 : 37) を軽鎖発現構築物 LCVL1SP20 (配列番号 : 36) と一緒に Sp2/0 細胞におけるヒト化 CD45RO/RB 結合分子 VHE - N73D / humV1 の発現に用いる。

【0109】

ヒト化抗 CD45RO/RB 抗体 VHE - N73D / humV1 を分泌する安定した Sp2/0 骨髓腫トランスフェクタントの作成

マウス骨髓腫細胞系 Sp2/0 Ag14.10 をヒト化 CD45RO/RB 結合分子 VHEN73D / humV1 の重鎖 (HCVHEN73D Sp20 ; 配列番号 : 37) および軽鎖 (LCVL1SP20 ; 配列番号 : 36) をコードするベクターと共にエレクトロポレートする。トランスフェクションのために、95%以上の生存性を有する指数増殖期の細胞を用いる。細胞を冷TFバッファー (272mM スクロース、1mM MgCl₂、7mM リン酸バッファー、pH7.4) で2回洗浄し、そして細胞濃度をTFバッファーで 2×10^7 セル/ml に調整する。細胞懸濁液 0.8ml を重鎖および軽鎖構築物各 15 μ g と混合し、そして氷上に10分間置く。Biorad Gene Pulser (280V および 25 μ F) を用いてエレクトロポレーションにより5つのトランスフェクションを行う。エレクトロポレーションの後、細胞を氷上に15分間置き、続いて冷培養培地 (FCS 不含の RPMI 基盤の培地) 50ml に移し、そして 37 °C および 5% CO₂ で2日間インキュベートする。

【0110】

トランスフェクタントを選択するために、1.1mg/ml G418 (Geneticin, Gibco ロット 3069464) の存在下、およそ2から3週間細胞を培養した。軽鎖構築物に位置する dhfr (ジヒドロ葉酸リダクターゼ) 増幅マーカーにより葉酸類似体メソトレキセート (MTX) による dhfr 遺伝子および導入遺伝子の増幅が可能になる。遺伝子増幅のために、G418 耐性細胞を 200nM MTX の存在下、2から3週間培養し、続いて MTX 濃度をさらに 1 μ M に上げることににより異種性の細胞プールの増幅に至る。分析用プロテイン A HPLC により抗体濃度を決定する。ウェルあたり 0.3セルの播種密度を用いて限界希釈によりクローニングのためにもっとも良好な生成プールを選択して高生産クローンを単離する。

【0111】

実施例5 : ELISA による組換えヒト IgG 発現の決定

VHE / humV1、VHE / humV2、VHQ / humV1 および VHQ / humV2 の特徴付け

培養上澄に発現された組換えヒト抗体の IgG 濃度を決定するために、サンドウィッチ ELISA プロトコルを発展させ、そしてヒト IgG を標準として用いて最適化した。平底 96 ウェルマイクロタイタープレート (カタログ番号 4-39454、Nunc Immunoplate Maxisorp) を PBS 中最終濃度 0.5 μ l/ml のヤギ抗ヒト IgG (全分子、カタログ番号 I1011、SIGMA) 100 μ l で4 で一晩コートする。次いでウェルを洗浄バッファー (0.05% Tween 20 含有 PBS) で3回洗浄し、そしてブロッキングバッファー (PBS 中 0.5% BSA) で37 °C で1.5時間遮断する。3回洗浄サイクルの後、抗体試料および標準ヒト IgG (カタログ番号 I4506、SIGMA) をブロッキングバッファー中連続1.5倍希釈により調製する。希釈した試料または標準 100 μ l を2検体ずつでコーティングしたプレートに移し、そして室温で1時間インキュベートする。インキュベーションの後、プレートを洗浄バッファーで3回洗浄し、そして続いてブロッキングバッファーで1/4000に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒト IgG カップ軽鎖 (カタログ番号 A-7164、SIGMA) 100 μ l と共に1時間インキュベートする。コントロールウェルにブロッキングバッファーまたは濃縮した通常の培養培地 100 μ l を入れた。洗浄後、TMB ペルオキシダーゼ EIA 基質キット (カタログ番

号 172 - 1067、Bio-Rad) を用いて製造者の指示書に従って試料中の結合ペルオキシダーゼおよび標準ウエルの比色定量を実施する。ペルオキシダーゼ混合物をウェルあたり 100 μ l で加え、そして暗中室温で 30 分間インキュベートする。1 M 硫酸 100 μ l の添加により比色反応を停止させ、そして ELISA プレートリーダー (3350 - UV モデル、BioRad) を用いて各ウェルの吸光度を 450 nm で読む。

【0112】

IgG 標準曲線に関する相関係数 0.998 で、トランスフェクトされた COS 細胞から得られた 4 つの異なる培養濃度 (約 250 から 300 倍濃縮) に関して以下の濃度を決定する:

VHE / humV1 上澄 = 8.26 μ g / ml

VHE / humV2 上澄 = 6.27 μ g / ml

VHQ / humV1 上澄 = 5.3 μ g / ml

VHQ / humV2 上澄 = 5.56 μ g / ml

【0113】

サイズ排除クロマトグラフィー分析 (SEC)

タンパク質含量、小型凝集 (オリゴマー抗体) および恐らく副産物および分解産物のパーセンテージを決定するために、アフィニティー精製抗体 VHE / humV1、VHE / humV2、VHQ / humV1 および VHQ / humV2 を TSKgel Super SW3000 SWXL でサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により分析する。VHE / humV1、VHE / humV2、VHQ / humV1 および VHQ / humV2 に関するクロマトグラムにより主要なピークは分裂しており、そして分離は重鎖 E のプールに関してさらに顕著であることが示される (図 12)。結果により各試料に存在する IgG 抗体に典型的な保持時間を有する少なくとも 2 つの分子が存在することが示唆される。

【0114】

還元条件下での SDS - PAGE

ヒト化 CD45RO / RB 結合分子 VHE / humV1、VHE / humV2、VHQ / humV1 および VHQ / humV2 の還元条件下での SDS - PAGE による分析 (グラジエントゲル、4 から 20% トリス - グリシゲル、Novex) により、各試料の重鎖に相当するバンドより上にわずかに移動した、予測されないさらなるバンドの存在が示される。質量の差は 2 から 4 kDa の範囲であると推定される。ウェスタンブロット分析により上位のバンドは抗ヒト (H + L) 抗体により認識されることが示され、これはさらなるバンドが重鎖変種であることを示唆している。

【0115】

陽イオン交換クロマトグラフィー (CEX)

PolyCatA カラム (PolyLC Inc) を用いて電荷の異種性を陽イオン交換クロマトグラフィー (CEX) により評価する。キメラ mAb は本質的に C 末端リジン変種以外に電荷異種性を含まないが、全てのヒト化 CD45RO / RB 結合分子、すなわち VHE / humV1、VHE / humV2、VHQ / humV1 および VHQ / humV2 は電荷で非常に異種性であることが見出される。抗体の電荷異種性の共通する理由は抗体重鎖の C 末端での Lys の存在 / 不在であり、これにより CEX における 3 個のピークに至る。各クロマトグラムでの多数の可視ピーク (> 10; 図 13) は、少なくとも 1 つのさらなる修飾が 4 つの CD45RO / RB 結合分子全てに存在することを示している。

【0116】

SDS - PAGE

VHE / humV1、VHE / humV2、VHQ / humV1 および VHQ / humV2 のタンパク質プールで見出された 2 つの抗体種間の分子の差異を評価するために、VHE / humV2 を選択してさらに分析する。半調製用 (semi-preparative) 様式で VHE / humV2 の 2 個の SEC ピークを収集し、そしてその純度を確認するために SEC により再分析する。SEC により収集した分画 (分画 1 および分画 2) を次に還元条件下で SDS - PAGE により分析する。約 49 kDa での予測されないさらなるバンドの比

率は2つ分画間で異なる。分画2はこのさらなる高いバンドをほとんど含まない。

【0117】

E S I - Q - T O F 質量分析

次にSEC分画F1、F2およびV H E / h u m V 2のタンパク質プールをE S I - Q - T O F 質量分析によりさらに分析する。タンパク質プールおよび分画2のスペクトログラムでは、同一の群のシグナルが観察される。約148,000Daの第1のシグナル群はタンパク質プールおよび分画2において見出され、分画1では検出されない。分画1では、約152,500Daの別の群のシグナルに加えて、(約150,300Daの)第2のシグナル群が検出される。約150,320Daの第2のシグナル群は抗体形態で通常観察されるいずれとも関連し得なかった。これらの知見により、SECの2つのピークおよび還元SDS - P A G Eの2つの上位のバンドは予測されるタンパク質の変種に各々相当することが示唆される。

10

【0118】

逆相クロマトグラフィー

質量分析であまり複雑でないパターンを得るために、抗体鎖をさらに別個に分析する。分画を還元し、そしてアルキル化する。反応の完全性を確認するために、還元およびアルキル化した試料を逆相(RP)クロマトグラフィー(SORBAX, Poroshell 300SB-C8)により分析する。還元およびアルキル化の後、ピーク形状は還元のみ後とほぼ同一である。保持時間のシフトが観察される。SEC分画1および分画2還元およびアルキル化試料で類似のパターンが得られる。V H E / h u m V 2タンパク質プール試料、SEC分画1およびSEC分画2(還元およびアルキル化)をE S I - Q - T O F 質量分析で分析する。いくつかの質量ピークを予測される抗体形態に割り当てることができる。同一の主要なピークは3つの試料全てで見出される(タンパク質プール、F1およびF2)が、その強度は分画2においては非常に低い(図14)。

20

【0119】

重鎖変種の炭水化物分析

還元およびアルキル化した抗体を逆相(RP)クロマトグラフィーカラムに中収支、そして重鎖変種に相当する2つのピークを収集する。次いでこれらのRP分画化した抗体のオリゴ糖プロファイルを決定する。全ての試料で見出された予想されたG0およびG1オリゴ糖のうち、分画1のクロマトグラムでいくつかのその他のピークが検出される(これらのピークはわずかに分画2およびタンパク質プールのクロマトグラムにおいても検出される)。

30

【0120】

これらを考慮して、結果により、より大きな抗体種がさらなるグリコシル化を含有するが、典型的にはSP2/0発現モノクローナル抗体では見出されず、これは質量差を説明していることを示唆している。炭水化物分析および質量分析により見出された大きな複合グリコシル化は抗体の定常領域の保存されたグリコシル化部位である可能性が極めて低いので、ヒト化抗体のアミノ酸配列のその他の可能性のある部位に関する検索が行われる。2つの重鎖変種の可変ドメインでN-グリコシル化(N-X-S)に可能性のある部位(N73)を同定する。

40

【0121】

C E Xによる調製用分画

プールV H E / h u m V 1から精製された材料を用いてさらなる分析を実施する。材料の異種性を低減させるためにカルボキシペプチダーゼ-B処理でC末端リジンを除去する。SPセファロース(Pharmacia)を用いる調製用陽イオン交換クロマトグラフィーによりV H E / h u m V 1抗体を分画化する。カラムを25mMリン酸ナトリウムバッファー、pH6.0(=バッファーA)で平衡にし、そして結合タンパク質をバッファーA中250mM NaCl(=バッファーB; 0-65% Bのグラジエント)で溶出する。C E Xを用いることにより分画の純度を分析する。収集した分画をSECカラムに再注入して2つの技術で得られた結果の間の相関を探す。クロマトグラムはC E Xのピークの最

50

初の群が抗体のS E C分析のプレピークに相関し、C E Xのピークの第2の群は、タンパク質プールのS E C分析では一緒に第1のピーク（または分画1）になり、そしてC E Xの最後のピークはS E Cで最後のピーク（または分画2）として溶出される事を示している。

【0122】

要するに、前記した結果（S E C分画1および分画2に関するオリゴ糖プロファイル、脱カルボキシル化の後に得られたC E Xパターン、C E Xで収集された分画に関して得られたS E Cパターン、質量分析）により複合オリゴ糖と共に抗体種が存在することが強く示唆され、これがa) S E Cにおいて二重ピークに至る質量異種性、およびb) C E Xパターンに至る還元S D S - P A G E電荷異種性で観察された二重重鎖バンド、の原因となる。

10

【0123】

C E X分画の分析的特徴付け

大きな抗体種はC E Xで先に溶出されるので（これらが正にあまり電荷していないことを示している）、調製用C E Xにより得られた様々の分画でシアル酸（複合グリコシル化の成分であり、そして負に電荷している）の存在を測定する。シアル酸は様々な度合いで4つ全ての試料に存在する。見出されたシアル酸はN - グリコリルノイラミン酸形態である可能性が最も高い（N - アシルノイラミン酸標準と比較して短い保持時間に基づく）。別のC E X分画で非常に豊富であるのと対照的に、あるC E X分画でシアル酸の存在が非常に少ないということは、負に電荷した糖成分が質量 / 電荷異種性に寄与していることを強く示唆している。C E X分画をE S I - Q - T O F質量分析により分析する。

20

【0124】

S D S - P A G E

また同一の分画を還元条件下でS D S - P A G Eにより分析する。重鎖上位バンドはシアル酸を含有する複合オリゴ糖プロファイルを有する抗体の部分に相当すると結論づけることができる。重鎖下位バンドは従来のオリゴ糖プロファイルを表示する予測される抗体に相当する。

【0125】

パパイン消化C E X分画のMono-Sカラムでの分離

重鎖の可変ドメインでの可能性のあるグリコシル化部位の使用を確実にするために、各C E X分画約1 m gをパパインで処理して抗体のF a bおよびF c部分を分離する。Mono-Sカラムで調製用クロマトグラフィーを実施する。収集した亜分画の各々をR Pカラムに再注入してF a bおよび / またはF cドメインに関してその含量を同定する。次いで収集した亜分画の各々をE S I - Q - T O F質量分析で分析する。得られた結果によりa) 重鎖F c部分の保存されたグリコシル化部位は0個（G 0）、1個（G 1）または2個の末端（G 2）ガラクトース単位を伴う二分岐オリゴ糖形態に占領されていること；b) 対照的に、不規則なグリコシル化部位（N 7 3）はN - グリコリルノイラミン酸を含有する複合オリゴ糖を担持することが示される。

30

【0126】

要するに、重鎖可変ドメインのアスパラギン残基N 7 3は部分的にN - グリコシル化されていることが見出される。これらの糖種はS D S - P A G E、サイズ排除クロマトグラフィーおよび陽イオン交換クロマトグラフィーにより検出される質量異種性および電荷異種性を引き起こす。

40

【0127】

V H E - N 7 3 D / h u m V 1の特徴付け

ヒト化V H E / h u m V 1、V H E / h u m V 2、V H Q / h u m V 1およびV H Q / h u m V 2抗体の異種性を排除するために、重鎖の可変ドメインのN 7 3位置でアスパラギン残基をアスパラギン酸残基により置換する（実施例4参照）。次いでV H E - N 7 3 D / h u m V 1をさらに分析する：

【0128】

50

サイズ排除クロマトグラフィー分析 (SEC)

前記で記載したようにSECを実施する。SECにおいてVHE / humV1とVHE - N73D / humV1との間に明確な差異が観察される。VHE / humV1に関して得られた二重ピークと対照的に、VHE - N73D / humV1に関しては1つのピークしか得られない(図12)。SECによりおよそ0.2%の凝集物が定量される。

【0129】

還元条件下でのSDS-PAGE

前記で概要を示したような還元条件下でVHE / humV2およびVHE - N73D / humV1をSDS-PAGEによりさらに分析する。VHE - N73D / humV1に関しては予測される重鎖(HC)位置(約50kDa)で1個バンドのみが可視である。VHE - N73D / humV1に関して観察されたHCバンドはVHE / humV2に関して観察された下位のダブルットのバンドに相当する。軽鎖バンドの位置は分析されたタンパク質に関して同一である。

【0130】

陽イオン交換クロマトグラフィー (CEX)

陽イオン交換クロマトグラフィー(CEX)を前記で概要を示したように実施する。CEXの分析に関して得られた結果により、VHE - N73D / humV1の電荷異種性はVHE / humV2の高い電荷異種性と比較してC末端リジン変種(3個ピーク)まで低減されることが示される(>10; 図13)。

【0131】

MALDI TOF 分析 (質量分析)

MALDI TOF 分析(質量分析)により得られた重鎖および軽鎖に関して検出された質量はVHE - N73D / humV1の配列から推定される予測される質量と密接に一致する。

【0132】

逆相クロマトグラフィー (RP)

DDTで還元した後、2つのヒト化抗体VHE / humV2およびVHE - N73D / humV1を逆相クロマトグラフィー(RP)により分析する。アスパラギンN73での部分的グリコシル化のために、とりわけ軽鎖に相当するピーク(約17.3分)のうちVHE / humV2(約18.5分で二重ピーク)に関して2つの「重鎖」が観察される。VHE - N73D / humV1に関しては、重鎖に関しては1つのピークしか観察されない(図14)。

【0133】

実施例6: FACS 競合分析 (結合親和性)

ヒトT細胞系PEERはその細胞表面にCD45抗原を発現するので、それをFACS分析のための標的細胞として選択する。ヒト化抗体上澄の結合親和性を分析するために、参照としてFITC標識キメラ抗体を用いて競合実験を実施し、そして精製されたマウス抗体の、およびキメラ抗体の阻害と比較する。FEER細胞培養物を3000rpmで10秒間遠心し、そして培地を除去する。細胞をFACSバッファー(1% FBSおよび0.1% アジ化ナトリウム含有PBS)に懸濁し、そして96ウェル丸底マイクロタイタープレートにウェルあたり 1×10^5 セルの密度で播種する。プレートを遠心し、そして上澄を捨てる。遮断研究のために、最初に各ウェルに25 μ lの濃縮したトランスフェクトしていない培地またはアイソタイプ対応コントロール抗体(陰性コントロール)、未標識マウス抗体またはキメラ抗体(陽性コントロール)および種々の組み合わせのヒト化抗体を含有する濃縮した上澄(試料)をテキストに示された濃度で加える。4で1時間インキュベートした後、遠心によりPEER細胞をFACSバッファー200 μ lで洗浄する。続いて細胞をFACSバッファー25 μ l中最終濃度20 μ g/mlでFITCに結合したキメラ抗体と共に4で1時間インキュベートする。細胞を洗浄し、そして生存細胞のゲーティングを可能にする2 μ g/mlヨウ化プロピジウムを含有するFACSバッファー300 μ lに再懸濁する。細胞調製物をフローサイトメーター(FACSCalibur, B

10

20

30

40

50

ecton Dickinson) で分析する。

【 0 1 3 4 】

F A C S 分析により、濃縮ヒト化抗体培養上澄による蛍光色素標識したキメラ抗体の用量依存的遮断が示される。アイソタイプ対応コントロール抗体ではキメラ抗体結合の用量依存的な遮断が認められず、これは種々のヒト化抗体の組み合わせによる遮断効果がエピトープ特異的であり、そしてエピトープ特異性はヒト化抗体過程の後にも保持されるようであることを示している。

【 0 1 3 5 】

前記した S P 2 / 0 トランスフェクタントまたはキメラ抗体 (陽性コントロール) またはアイソタイプ対応コントロール抗体 (陰性コントロール) からの希釈していない上澄を培養培地中 $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ で $100 \mu\text{l}$ 中 1.5×10^5 個の P E E R 細胞と共に 4 で 30 分間インキュベートする。次いで F I T C 標識したキメラ抗体を含有する P B S $100 \mu\text{l}$ を各試料に加え、そして 4 でさらに 30 分間インキュベーションを続ける。洗浄後、細胞を $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ 7 - アミノアクチノマイシン D を含有する F A C S - P B S に再懸濁し、そして Becton Dickinson FACSCalibur 装置および CellQuest Pro ソフトウェアを用いてフローサイトメトリーにより分析する。生存細胞でゲーティングした、すなわち否定事象として 7 - アミノアクチノマイシン D を用いた。

【 0 1 3 6 】

F A C S 分析により未標識ヒト化 C D 4 5 R O / R B 結合分子、例えば V H E / h u m V 1 および V H Q / h u m V 1 はヒト C D 4 5 陽性 T 細胞系 P E E R に結合するための F I T C 標識キメラ抗体と競合するが、アイソタイプ対応コントロール抗体は競合しないことが示される。

【 0 1 3 7 】

V H E - N 7 3 D / h u m V 1 の特異性

ヒト化 C D 4 5 R O / R B 結合分子 V H E / h u m V 1 の修飾、すなわち C D 4 5 R O / R B 結合分子の重鎖の 7 3 位置のアミノ酸でのアスパラギンのアスパラギン酸への交換が同族エピトープとの反応性を修飾するかどうかを評価するために、V H E - N 7 3 D / h u m V 1 の C D 4 5 発現ヒト T 細胞系 P E E R との反応性を競合結合実験で分析する。

【 0 1 3 8 】

P E E R 細胞を V H E - N 7 3 D / h u m V 1 と、そのキメラの祖先と、または非結合性アイソタイプコントロール I g G 抗体と共にインキュベートする。非結合性抗体を洗い流し、そして細胞を蛍光色素フルオレセインイソチシアナート (F I T C) 標識キメラ抗 C D 4 5 R O / R B m A b または F I T C 標識アイソタイプ I g G 1 コントロール抗体とのインキュベーションに供する。洗浄後、細胞をフローサイトメトリー分析に供して、プレインキュベートした P E E R 細胞に結合した F I T C 標識抗体の量を定量する：P E E R 細胞培養物を標準重力 (g) の 400 倍で 10 分間遠心し、そして培地を除去する。細胞を F A C S バッファー (1 容量 / 容量 % F B S 、 0.1 重量 / 容量 % E D T A および 0.1 重量 / 容量 % アジ化ナトリウムを含有する P B S) に再懸濁し、そして 96 ウェル V 底マイクロタイタープレートにウェルあたり 1×10^5 セルの細胞密度で播種する。プレートを遠心し、そして上澄を捨てる。細胞の各試料をキメラ抗 C D 4 5 R O / R B m A b 、 V H E - N 7 3 D / h u m V 1 または I g G 1 コントロール A b のいずれか $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ を含有する F A C S バッファー $50 \mu\text{l}$ 中 4 で 30 分間インキュベートする。次に遠心により P E E R 細胞を F A C S バッファー $150 \mu\text{l}$ で 2 回洗浄する。続いて細胞を F I T C 結合キメラ m A b または F I T C 結合 3 G 5 コントロール A b のいずれか $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ を含有する F A C S バッファー $50 \mu\text{l}$ 中 4 で 30 分間インキュベートする。最後に細胞を洗浄し、そして分析の間の生存細胞の同定を可能にする 7 - アミノアクチノマイシン D (7 - A A D) を $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ で含有する F A C S バッファー $200 \mu\text{l}$ に再懸濁する。細胞調製物を FACSCalibur フローサイトメーター (Becton Dickinson) で分析する。

【 0 1 3 9 】

蛍光シグナルの低減により未標識VHE - N73D / humV1および未標識キメラ抗CD45RO / RBmAbはFITC標識キメラ抗CD45RO / RB mAbのCD45発現PEER細胞への結合を防御するが、IgG1コントロール抗体は防御しないことが観察される。要するに、VHE / humV1抗体のVHE - N73D / humV1への修飾はヒト化抗CD45RO / RB結合分子のエピトープ特異性を変化しないことが見出される。

【0140】

VHE - N73D / humV1のヒトまたはカニクイザルCD45に関する親和性

VHE - N73D / humV1抗体のそのエピトープに関する親和性を決定するために、VHE - N73D / humV1のヒトCD45発現T細胞系PEERまたはカニクイザルCD45発現T細胞系HSC - Fとの反応性をin Daley et al., 1995; J. Mol. Biol. 253:243に記載される手順に類似した競合結合実験で定量することができる。

10

【0141】

簡単には、種々の濃度の未標識競合抗体の存在下、PEERまたはHSC - FのFITC標識抗体との染色強度を用いて未標識抗体の親和性を算出する。さらに正確には、第1の工程で、FITC標識マウス由来の抗ヒトCD45RO / RB結合分子A6 (mA6) の濃度および蛍光色素標識化学量を測定する。次に、前記したFITC結合mA6 y e s (マウス由来抗huCD45) の助けを借りて、そして分子標識の程度が既知である蛍光ビーズを用いてPEERまたはHSC - F細胞系の表面上の標的分子、CD45の濃度を決定する。細胞性CD45受容体および既知のそのFITC結合リガンドの濃度で、FITC結合mA6の細胞性CD45受容体に対する親和性をFACS基盤の平衡滴定手順により決定する。最終的に未標識抗体VHE - N73D / humV1の親和性を、VHE - N73D / humV1の全濃度の関数として、FITC蛍光の増加を測定する、PEERまたはHSC - F細胞上のFITC結合mA6との競合染色反応から決定する。1つの受容体に結合する2個の競合リガンドの混合物における結合平衡の代数的に明白な記載を表す三次方程式がプログラムOrigin 7.5に導入されている場合、再反復曲線適合分析でソフトウェアプログラムを用いてVHE - N73D / humV1に関する解離定数 (Kd) 値を算出する。

20

【0142】

1つの実験では、標的CD45RO / RB結合分子に結合する2価抗体と仮定すれば、ヒトPEER細胞性標的に関するVHE - N73D / humV1の解離定数は 2.44 ± 0.07 nMと算出され、カニクイザルHSC - F細胞標的に関しては 1.67 ± 0.00 nMと算出される。

30

【0143】

実施例7：CD45RB / RO結合分子の生物学的活性

この研究では、CD45RB / RO結合キメラ抗体は、多クローン的に活性化された1次ヒトT細胞の培養中に存在する場合、(i)特徴的なTreg表現型を有するT細胞の分化を支持する、(ii)T細胞の活性化の後アポトーシスを防御または増強する、ならびに(iii)再刺激後のサブセット特異的抗原および受容体の発現に影響するかどうかに着目した。

40

【0144】

CD45RO / RB結合分子キメラ抗体は多クローン的に活性化されたT細胞を増強する

1次T細胞 (CD4 + およびCD8 + Tサブセットの混合物) をCD45RB / RO結合分子キメラ抗体の存在下または不在下 (= コントロール) で抗CD3プラス抗CD28mAb (各々200 ng / ml) による活性化に供した。2日に過剰の抗体を洗浄により除去した。アポトーシスおよび壊死細胞により取り込まれるDNA染色色素として7 - アミノアクチノマイシンD (7 - AAD) を用いて活性化の後の細胞死を測定する。結果により、CD45RB / RO結合キメラ抗体の存在下でのT細胞の活性化が7 - AAD陽性

50

の分画を、活性化後 2 日で 2 倍以上増加させたことが示される。7 日に、7 - A A D 陽性細胞の部分は再度 C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体処理およびコントロール培養で類似した。

【 0 1 4 5 】

C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体は T 調節細胞 (T r e g) 表現型を表示するがコントロール m A b 処理 T 細胞は表示しない

C D 2 5 および陰性調節タンパク質 C T L A - 4 (C D 1 5 2) の発現の増加は T r e g 細胞のマーカーである。C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体による 1 次および 2 次 T 細胞応答の機能抑制は T r e g 細胞の誘導によるのであろう。この問題を解決するために、抗 C D 3 + 抗 C D 2 8 m A b により T 細胞を活性化し、そして C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体または抗 L P S コントロール m A b の存在下で培養した。C T L A - 4 および C D 2 5 発現の時間経過により 2 次刺激の 1 日および 3 日後コントロールと C D 4 5 R O / R B 結合キメラ抗体処理 T 細胞との間に著明な差異が表され、これは T r e g 表現型を示している。

【 0 1 4 6 】

細胞内 C T L A - 4 発現は C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体の存在下で持続する

C T L A - 4 の実質的な量を細胞内でも見出すことができることが報告されている。したがって、表面 C T L A - 4 染色に並行して細胞内 C T L A - 4 発現を分析した。刺激後 4 日に T 細胞培養間で中程度の差異が認められた。しかしながら培養の延長の後に、高レベルの細胞内 C T L A - 4 が C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体処理 T 細胞においてのみ持続したが、コントロール T 細胞では持続しなかった。

【 0 1 4 7 】

C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体処理 T 細胞が C D 4 および C D 8 に関して二重陽性になる

刺激後、T 細胞は C D 2 5、C D 1 5 2 (C T L A - 4)、C D 1 5 4 (C D 4 0 リガンド) およびその他のようないくつかの表面受容体の発現を誘起および上方制御する。対照的に、C D 4 または C D 8 の発現レベルは比較的一定に保たれると考えられる。活性化の後、C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体処理 T 細胞における C D 4 および C D 8 抗原の双方の強い増加が再現性よく観察されたが、コントロール A b 処理 T 細胞では観察されなかった。C D 4 / C D 8 二重陽性 T 細胞集団の出現は C D 8 + サブセットでの C D 4、および逆に C D 4 + サブセットでの C D 8 の上方制御によるものと思われる。これはコントロール培養において中程度に低いパーセンテージの二重陽性 T 細胞と対照的である。

【 0 1 4 8 】

C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体処理 T 細胞による I L - 2 受容体 アルファ鎖の発現は高いが、ベータ鎖の発現は非常に低い

T r e g 細胞は C D 2 5、I L - 2 受容体 アルファ鎖に関して構成的に陽性であることが知られている。T r e g 細胞上の三量体 I L - 2 受容体のその他のサブユニットの調節は知られていない。最近、例えば C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体の存在下または不在下で活性化し、そして増殖させた T 細胞上の I L - 2 受容体、C D 1 2 2 のベータ鎖の発現を比較した。結果により、C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体処理 T 細胞はコントロール培養の T 細胞と比較して C D 1 2 2 を約 1 0 倍低く発現することが示される。この差異は T r e g 細胞が増殖するために I L - 2 以外の因子を必要とすることを示し得る。

【 0 1 4 9 】

実施例 8 : 本発明の配列 (本発明の C D R 配列には下線を付してある)

配列番号 : 1

キメラ軽鎖のアミノ酸配列の一部

【 表 3 】

DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQNI~~GT~~SIQWYQQRTNGSPRL~~LI~~RS~~SS~~ESISGIPSRFSG
SGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSNTWPF~~TF~~GSGGTKLEIK

10

20

30

40

50

【 0 1 5 0 】

配列番号： 2

キメラ重鎖のアミノ酸配列の一部

【 表 4 】

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIIHWVKQEPGQGLEWIGYFNPYNHGTKY
 NEKFKGRATLTADKSSNTAYMDLSSLTSEDSAIYYCARSGPYAWFDTWGQGTTVTVSS

【 0 1 5 1 】

配列番号： 3

キメラ軽鎖のアミノ酸配列

【 表 5 】

DILLTQSPAILSVPGERVVSFSCRASQNIQTSIQWYQQRTNGSPRLLIRSSSESISGIPSRFSG
 SGGTDFTLINSVESEDIADYYCQOSNTWPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

【 0 1 5 2 】

配列番号： 4

キメラ重鎖のアミノ酸配列

【 表 6 】

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIIHWVKQEPGQGLEWIGYFNPYNHGTKY
 NEKFKGRATLTADKSSNTAYMDLSSLTSEDSAIYYCARSGPYAWFDTWGQGTTVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

30

【 0 1 5 3 】

配列番号： 5

配列番号： 1 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列

【 表 7 】

GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCA
 GTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAGA
 ACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCT
 TCCAGGTTTAGTGCCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGA
 GTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACGTTCCG
 CTCGGGGACCAAGCTTGAAATCAAA

40

【 0 1 5 4 】

配列番号： 6

配列番号： 2 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列

【表 8】

GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGAACTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 ATGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACCTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCTCCAACACA
 GCCTACATGGACCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGATCTACTACTGTGCAA
 GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
 CTCA

10

【0155】

配列番号：7

humV2 (humV2 = V L m) と称されるヒト化軽鎖のアミノ酸配列の一部

【表 9】

DILLTQSPAT LSLSPGERAT FSCRASQNIG TSIQWYQQKT NGAPRLLIRS SSESISGIPS
 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SNTWPFTFGQ GTKLEIK

【0156】

配列番号：8

humV1 (humV1 = V L h) と称されるヒト化軽鎖のアミノ酸配列の一部

20

【表 10】

DILLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQNIG TSIQWYQQKP GQAPRLLIRS SSESISGIPS
 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SNTWPFTFGQ GTKLEIK

【0157】

配列番号：9

V H E と称されるヒト化重鎖のアミノ酸配列の一部

【表 11】

EVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
FNPYNHGTTY NEKFKGRATL TANKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDITWGQ GTTIVTVSS

30

【0158】

配列番号：10

V H Q と称されるヒト化重鎖のアミノ酸配列の一部

【表 12】

QVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
FNPYNHGTTY NEKFKGRATL TANKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDITWGQ GTTIVTVSS

40

【0159】

配列番号：11

配列番号：9 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列

【表 1 3】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAAACAAATCCATCAGCACA
 GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
 GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
 CTCA

10

【 0 1 6 0 】

配列番号： 1 2

配列番号： 1 0 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列

【表 1 4】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAAACAAATCCATCAGCACA
 GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
 GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
 CTCA

20

【 0 1 6 1 】

配列番号： 1 3

配列番号： 7 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列

【表 1 5】

GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
 CTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAAA
 ACAAATGGTGCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
 TTCCAGGTTTAGTGCCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
 AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACAGTTC
 GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

30

【 0 1 6 2 】

配列番号： 1 4

配列番号： 8 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列

【表 1 6】

GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
 CTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAAA
 CCAGGTCAGGCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
 TTCCAGGTTTAGTGCCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
 AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACAGTTC
 GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

40

【 0 1 6 3 】

配列番号： 1 5

50

発現ベクターHCMV-G1 HuA6-VHQのヌクレオチド配列
 (3921-4274からの配列番号: 12(VHQ)を含むヒト化重鎖発現ベクターの
 完全DNA配列)
 【表17】

```

1  AGCTTTTTCG AAAAGCCTAG GCCTCCAAAA AAGCCTCCTC ACTACTTCTG
51  GAATAGCTCA GAGGCCGAGG CGGCCTCGGC CTCTGCATAA ATAAAAAAAA
101 TTAGTCAGCC ATGGGGCGGA GAATGGGCGG AACTGGGCGG AGTTAGGGGC
151 GGGATGGGCG GAGTTAGGGG CGGGACTATG GTTGCTGACT AATTGAGATG
201 CATGCTTTTC ATACTTCTGC CTGCTGGGGA GCCTGGTTGC TGAATAATTG
251 AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT GGGGAGCCTG GGGACTTTCC
301 ACACCCCTAAC TGACACACAT TCCACAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG
351 ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT
401 CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG
451 TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACGT AGCGATAGCG
501 GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG
551 TGCACCATAT GCGGTGTCAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
601 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TCGCTCGGT
651 CGTTCCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAAGCG GTAATACGGT
701 TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC
751 CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA
801 TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
851 GGTGGCGAAA CCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
901 AGCTCCCTCG TCGCTCTCC TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT
951 GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAT AGCTCACGCT
1001 GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTC GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG
1051 CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACATCG
1101 TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
1151 CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
1201 TTGAAGTGGT GGCCTAACIA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT
1251 CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT
1301 GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTGTCAGAG

```

10

20

30

【表 18】

1351	CAGCAGATT	CGCGCAGAAA	AAAAGGATCT	CAAGAAGATC	CTTTGATCTT
1401	TTCIACGGGG	TCTGACGCTC	AGTGGAAACGA	AAACTCACGT	TAAGGGATTT
1451	TGGTCATGAG	ATTATCAAAA	AGGATCTTCA	CCTAGATCCT	TTTAAATTAA
1501	AAATGAAGTT	TTAAATCAAT	CTAAAGTATA	TATGAGTAAA	CTTGGTCTGA
1551	CAGTTACCAA	TGCTTAATCA	GTGAGGCACC	TATCTCAGCG	ATCTGTCTAT
1601	TTCTGTTTATC	CATAGTTGCC	TGACTCCCCG	TCGTGTAGAT	AACTACGATA
1651	CGGGAGGGCT	TACCATCTGG	CCCCAGTGCT	GCAATGATAC	CGCGAGACCC
1701	ACGCTCACCG	GCTCCAGATT	TATCAGCAAT	AAACCAGCCA	GCCGGAAGGG
1751	CCGAGCGCAG	AAGTGGTCCT	GCAACTTTAT	CCGCCTCCAT	CCAGTCTATT
1801	AATTGTTGCC	GGGAAGCTAG	AGTAAGTAGT	TCGCCAGTTA	ATAGTTTGCG
1851	CAACGTTGTT	GCCATTGCTG	CAGGCATCGT	GGTGTCACGC	TCGTCTTTG
1901	GTATGGCTTC	ATTCAGCTCC	GGTTCCCAAC	GATCAAGGCG	AGTTACATGA
1951	TCCCCCATGT	TGTGCAAAA	AGCGGTTAGC	TCCTTCGGTC	CTCCGATCGT
2001	TGTCAGAAAGT	AAGTTGGCCG	CAGTGTATATC	ACTCATGGTT	ATGGCAGCAC
2051	TGCATAATTC	TCTTACTGTC	ATGCCATCCG	TAAGATGCTT	TTCTGTGACT
2101	GGTGAGTACT	CAACCAAGTC	ATTCTGAGAA	TAGTGTATGC	GGCGACCGAG
2151	TTGCTCTTGC	CCGGCGTCAA	CACGGGATAA	TACCGCGCCA	CATAGCAGAA
2201	CTTTAAAGT	GCTCATCATT	GGAAAACGTT	CTTCGGGGCG	AAAACCTCTCA
2251	AGGATCTTAC	CGCTGTTGAG	ATCCAGTTCC	ATGTAACCCA	CTCGTGCACC
2301	CAACTGATCT	TCAGCATCTT	TTACTTTTAC	CAGCGTTTCT	GGGTGAGCAA
2351	AAACAGGAAG	GCAAAATGCC	GCAAAAAGG	GAATAAGGGC	GACACGGAAA
2401	TGTTGAATAC	TCATACTCTT	CCTTTTTC	TATTATTGAA	GCATTTATCA
2451	GGGTTATTGT	CTCATGAGCG	GATACATATT	TGAATGTATT	TAGAAAAATA
2501	AACAAATAGG	GGTTCGCGC	ACATTTCCCC	GAAAAGTGCC	ACCTGACGTC
2551	TAAGAAACCA	TTATTATCAT	GACATTAAAC	TATAAAAATA	GGCGTATCAC
2601	GAGGCCCTTT	CGTCTTCAAG	AATTCAGCTT	GGCTGCAGTG	AATAATAAAA
2651	TGTGTGTTTG	TCCGAAATAC	GCGTTTTGAG	ATTTCTGTCTG	CCGACTAAAT
2701	TCATGTCGCG	CGATAGTGGT	GTTTATCGCC	GATAGAGATG	GCGATATTGG
2751	AAAAATCGAT	ATTTGAAAAT	ATGGCATATT	GAAAATGTCTG	CCGATGTGAG
2801	TTTCTGTGTA	ACTGATATCG	CCATTTTTC	AAAAGTGATT	TTTGGGCATA
2851	CGCGATATCT	GGCGATAGCG	CTTATATCGT	TTACGGGGGA	TGGCGATAGA
2901	CGACTTTGGT	GACTTGGGCG	ATTCTGTGTG	TCGCAAAATAT	CGCAGTTTTCG
2951	ATATAGGTGA	CAGACGATAT	GAGGCTATAT	CGCCGATAGA	GGCGACATCA
3001	AGCTGGCACA	TGGCCAATGC	ATATCGATCT	ATACATTGAA	TCAATATTGG
3051	CCATTAGCCA	TATTATTTCAT	TGGTTATATA	GCATAAATCA	ATATTGGCTA
3101	TTGGCCATTG	CATACGTTGT	ATCCATATCA	TAATATGTAC	ATTTATATTG
3151	GCTCATGTCC	AACATTACCG	CCATGTTGAC	ATTGATTATT	GACTAGTTAT

10

20

30

40

【表 19】

3201	TAATAGTAAT	CAATTACGGG	GTCATTAGTT	CATAGCCCAT	ATATGGAGTT
3251	CCGCGTTACA	TAACTTACGG	TAAATGGCCC	GCCTGGCTGA	CCGCCCAACG
3301	ACCCCCGCCC	ATTGACGTCA	ATAATGACGT	ATGTTCCCAT	AGTAACGCCA
3351	ATAGGGACTT	TCCATTGACG	TCAATGGGTG	GAGTATTTAC	GGTAAACTGC
3401	CCACTTGGCA	GTACATCAAG	TGTATCATAT	GCCAAGTACG	CCCCCTATTG
3451	ACGTCAATGA	CGGTAAATGG	CCCGCCTGGC	ATTATGCCCC	GTACATGACC
3501	TTATGGGACT	TTCTACTTG	GCAGTACATC	TACGTATTAG	TCATCGCTAT
3551	TACCATGGTG	ATGCGGTPTT	GGCAGTACAT	CAATGGGCGT	GGATAGCGGT
3601	TTGACTCACG	GGGATTTCCA	AGTCTCCACC	CCATTGACGT	CAATGGGAGT
3651	TTGTTTTTGGC	ACCAAAATCA	ACGGGACTTT	CCAAAATGTC	GTAACAACTC
3701	CGCCCCATTG	ACGCAAATGG	GCGGTAGGCG	TGTACGGTGG	GAGGTCTATA
3751	TAAGCAGAGC	TCGTTTAGTG	AACCGTCAGA	TCGCCTGGAG	ACGCCATCCA
3801	CGCTGTTTTG	ACCTCCATAG	AAGACACCGG	GACCGATCCA	GCCTCCGCAA
3851	GCTTGCCGCC	ACCATGGACT	GGACCTGGAG	GGTGTCTGTC	CTGCTGGCCG
3901	TGGCCCCCGG	CGCCCACAGC	CAGGTGCAGC	TGGTGGAGTC	AGGAGCCGAA
3951	GTGAAAAGC	CTGGGGCTTC	AGTGAAGGTG	TCCTGCAAGG	CCTCTGGATA
4001	CACATTCACT	AATTATATTA	TCCACTGGGT	GAAGCAGGAG	CCTGGTTCAGG
4051	GCCTTGAATG	GATTGGATAT	TTTAATCCTT	ACAATCATGG	TACTAAGTAC
4101	AATGAGAAGT	TCAAAGGCAG	GGCCACACTA	ACTGCAAACA	AATCCATCAG
4151	CACAGCCTAC	ATGGAGCTCA	GCAGCCTGCG	CTCTGAGGAC	ACTGCGGTCT
4201	ACTACTGTGC	AAGATCAGGA	CCCTATGCCT	GGTTTGACAC	CTGGGGCCAA
4251	GGGACCACGG	TCACCGTCTC	CTCAGGTGAG	TTCTAGAAGG	ATCCCAAGCT
4301	AGCTTTCTGG	GGCAGGCCAG	GCCTGACCTT	GGCTTTGGGG	CAGGGAGGGG
4351	GCTAAGGTGA	GGCAGGTGGC	GCCAGCCAGG	TGCACACCCA	ATGCCCATGA
4401	GCCCAGACAC	TGGACGCTGA	ACCTCGCGGA	CAGTTAAGAA	CCCAGGGGCC
4451	TCTGCGCCCT	GGGCCCAGCT	CTGTCCCACA	CCGCGGTCAC	ATGGCACCAC
4501	CTCTCTTGCA	GCCTCCACCA	AGGGCCCATC	GGTCTTCCCC	CTGGCACCCT
4551	CCTCCAAGAG	CACCTCTGGG	GGCAGAGCGG	CCCTGGGCTG	CCTGGTCAAG
4601	GACTACTTCC	CCGAACCGGT	GACGGTGTG	TGGAACTCAG	GCGCCCTGAC
4651	CAGCGGCGTG	CACACCTTCC	CGGCTGTCTT	ACAGTCCTCA	GGACTCTACT
4701	CCCTCAGCAG	CGTGGTGACC	GTGCCCTCCA	GCAGCTTGGG	CACCCAGACC
4751	TACATCTGCA	ACGTGAATCA	CAAGCCCAGC	AACACCAAGG	TGGACAAGAA
4801	AGTTGGTGA	AGGCCAGCAC	AGGGAGGGAG	GGTGTCTGCT	GGAAGCCAGG
4851	CTCAGCGCTC	CTGCCTGGAC	GCATCCCGGC	TATGCAGCCC	CAGTCCAGGG
4901	CAGCAAGGCA	GGCCCCGTCT	GCCTCTTCAC	CCGGAGGCCT	CTGCCCCGCC
4951	CACTCATGCT	CAGGGAGAGG	GTCTTCTGGC	TTTTTCCCCA	GGCTCTGGGC
5001	AGGCACAGGC	TAGGTGCCCC	TAACCCAGGC	CCTGCACACA	AAGGGGCAGG

10

20

30

40

【表 2 0】

5051	TGCTGGGCTC	AGACCTGCCA	AGAGCCAFAT	CGGGGAGGAC	CCTGCCCCCTG
5101	ACCTAAGCCC	ACCCCAAAGG	CCAAACTCTC	CACTCCCTCA	GCTCGGACAC
5151	CTTCTCTCCT	CCCAGATTCC	AGTAACTCCC	AATCTTCTCT	CTGCAGAGCC
5201	CAAATCTTGT	GACAAAACTC	ACACATGCCC	ACCGTGCCCA	GGTAAGCCAG
5251	CCCAGGCCTC	GCCCTCCAGC	TCAAGGCGGG	ACAGGTGCCC	TAGAGTAGCC
5301	TGCATCCAGG	GACAGGCCCC	AGCCGGGTGC	TGACACGTCC	ACCTCCATCT
5351	CTTCTTCAGC	ACCTGAACTC	CTGGGGGGAC	CGTCAGTCTT	CCTCTTCCCC
5401	CCAAAACCCA	AGGACACCCCT	CATGATCTCC	CGGACCCCTG	AGGTCACATG
5451	CGTGGTGGTG	GACGTGAGCC	ACGAAGACCC	TGAGGTCAAG	TTCAACTGGT
5501	ACGTGGACGG	CGTGGAGGTG	CATAATGCCA	AGACAAAGCC	GCGGGAGGAG
5551	CAGTACAACA	GCACGTACCG	TGTGGTCAGC	GTCCTCACCG	TCCTGCACCA
5601	GGACTGGCTG	AATGGCAAGG	AGTACAAGTG	CAAGGTCTCC	AACAAAGCCC
5651	TCCCAGCCCC	CATCGAGAAA	ACCATCTCCA	AAGCCAAAGG	TGGGACCCGT
5701	GGGGTGCGAG	GGCCACATGG	ACAGAGGCCG	GCTCGGCCCA	CCCTCTGCCC
5751	TGAGAGTGAC	CGCTGTACCA	ACCTCTGTCC	CTACAGGGCA	GCCCCGAGAA
5801	CCACAGGTGT	ACACCCTGCC	CCCATCCCCG	GATGAGCTGA	CCAAGAACCA
5851	GGTCAGCCTG	ACCTGCCTGG	TCAAAGGCTT	CTATCCCAGC	GACATCGCCG
5901	TGGAGTGGGA	GAGCAATGGG	CAGCCGGAGA	ACAACTACAA	GACCACGCCT
5951	CCCGTGCTGG	ACTCCGACGG	CTCCTTCTTC	CTCTACAGCA	AGCTCACCGT
6001	GGACAAGAGC	AGGTGGCAGC	AGGGGAACGT	CTTCTCATGC	TCCGTGATGC
6051	ATGAGGCTCT	GCACAACCAC	TACACGCAGA	AGAGCCTCTC	CCTGTCTCCG
6101	GGTAAATGAG	TGCGACGGCC	GGCAAGCCCC	CGCTCCCCGG	GCTCTCGCGG
6151	TCGCACGAGG	ATGCTTGCCA	CGTACCCCTT	GTACATACTT	CCCGGGCGCC
6201	CAGCATCGAA	ATAAAGCACC	CAGCGCTGCC	CTGGGCCCCCT	GCGAGACTGT
6251	GATGGTTCTT	TCCACGGGTC	AGGCCGAGTC	TGAGGCCTGA	GTGGCATGAG
6301	ATCTGATATC	ATCGATGAAT	TCGAGCTCGG	TACCCGGGGA	TCGATCCAGA
6351	CATGATAAGA	TACATTGATG	AGTTTGGACA	AACCACAACCT	AGAATGCAGT
6401	GAAAAAATG	CTTTATTTGT	GAAATTTGTG	ATGCTATTGC	TTTATTTGTA
6451	ACCATTATAA	GCTGCAATAA	ACAAGTTAAC	AACAACAATT	GCATTCAITT
6501	TATGTTTCAG	GTTTCAGGGGG	AGGTGTGGGA	GGTTTTTTTAA	AGCAAGTAAA
6551	ACCTCTACAA	ATGTGGTATG	GCTGATTATG	ATCTCTAGTC	AAGGCACAT
6601	ACATCAAATA	TTCCTTATTA	ACCCCTTTAC	AAATTAAAAA	GCTAAAGGTA
6651	CACAAATTTT	GAGCATAGTT	ATTAATAGCA	GACACTCTAT	GCCTGTGTGG
6701	AGTAAGAAAA	AACAGTATGT	TATGATTATA	ACTGTTATGC	CTACTTATAA
6751	AGGTTACAGA	ATATTTTTCC	ATAATTTTCT	TGTATAGCAG	TGCAGCTTTT
6801	TCCTTTGTGG	TGTAAATAGC	AAAGCAAGCA	AGAGTTCTAT	TACTAAACAC
6851	AGCATGACTC	AAAAAACTTA	GCAATTTCTGA	AGGAAAGTCC	TTGGGGTCTT

10

20

30

40

【表 2 1】

```

6901 CTACCTTTCT CTTCTTTTTT GGAGGAGTAG AATGTTGAGA GTCAGCAGTA
6951 GCCTCATCAT CACTAGATGG CATTTCTTCT GAGCAAAACA GGTTTTCCTC
7001 ATTAAAGGCA TTCCACCACT GCTCCCAATC ATCAGTTCCA TAGGTTGGAA
7051 TCTAAAATAC ACAAACAATT AGAATCAGTA GTTTAACACA TTATACACTT
7101 AAAAAATTTA TATTTACCTT AGAGCTTTAA ATCTCTGTAG GTAGTTTGTC
7151 CAAATTATGTC ACACCACAGA AGTAAGGTTT CTTTACAAAG ATCCGGGACC
7201 AAAGCGGCCA TCGTGCCCTC CCACTCCTGC AGTTCCGGGG CATGGATGCG
7251 CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC GACGGATTTG CACTGCCGGT
7301 AGAACTCCGC GAGGTCGTCC AGCCTCAGGC AGCAGCTGAA CCAACTCGCG
7351 AGGGGATCGA GCCCGGGGTG GGCGAAGAAC TCCAGCATGA GATCCCCGCG
7401 CTGGAGGATC ATCCAGCCGG CGTCCCGGAA AACGATTCCG AAGCCCAACC
7451 TTTCATAGAA GCGGCGGGTG GAATCGAAT CTCTGTATGG CAGGTTGGGC
7501 GTCGCTTGGT CGGTCATTTT GAACCCCGAG GTCCCGCTCA GAAGAACTCG
7551 TCAAGAAGGC GATAGAAGGC GATGCGCTGC GAATCGGGAG CGGCGATACC
7601 GTAAAGCAG AGGAAGCGGT CAGCCCATTG GCCGCCAAGC TCTTCAGCAA
7651 TATCAGGGGT AGCCAACGCT ATGTCCTGAT AGCGGTCCGC CACACCCAGC
7701 CGGCCACAGT CGATGAATCC AGAAAAGCGG CCATTTTCCA CCATGATATT
7751 CGGCAAGCAG GCATCGCCAT GGGTCACGAC GAGATCCTCG CCGTCGGGCA
7801 TGCGCGCCTT GAGCCTGGCG AACAGTTCGG CTGGCGCGAG CCCCTGATGC
7851 TCTTCGTCCA GATCATCCTG ATCGACAAGA CCGGCTTCCA TCCGAGTACG
7901 TGCTCGCTCG ATGCGATGTT TCGCTTGGTG GTCGAATGGG CAGGTAGCCG
7951 GATCAAGCGT ATGCAGCCGC CGCATTCGAT CAGCCATGAT GGATACTTTC
8001 TCGGCAGGAG CAAGGTGAGA TGACAGGAGA TCCTGCCCCG GCACTTCGCC
8051 CAATAGCAGC CAGTCCCTTC CCGCTTCAGT GACAACGTCG AGCACAGCTG
8101 CGCAAGGAAC GCCCGTCGTG GCCAGCCACG ATAGCCGCGC TGCCTCGTCC
8151 TGCAGTTCAT TCAGGGCACC GGACAGGTCG GTCTTGACAA AAAGAACCGG
8201 GCGCCCCCTG GCTGACAGCC GGAACACGGC GGCATCAGAG CAGCCGATTG
8251 TCTGTTGTGC CCAGTCATAG CCGAATAGCC TCTCCACCCA AGCGGCCGGA
8301 GAACCTGCGT GCAATCCATC TTGTTCAATC ATGCGAAACG ATCCTCATCC
8351 TGTCCTTGA TCAGATCTTG ATCCCCTGCG CCATCAGATC CTTGGCGGCA
8401 AGAAAGCCAT CCAGTTTACT TTGCAGGGCT TCCCAACCTT ACCAGAGGGC
8451 GCCCCAGCTG GCAATTCCGG TTCGCTTGCT GTCCATAAAA CCGCCAGTC
8501 TAGCTATCGC CATGTAAGCC CACTGCAAGC TACCTGCTTT CTCTTTGCGC
8551 TTGCGTTTTT CCTTGTCCAG ATAGCCCAGT AGCTGACATT CATCCGGGGT
8601 CAGCACCGTT TCTGCGGACT GGCTTTCTAC GTGTTCCGCT TCCTTTAGCA
8651 GCCCTTGCGC CCTGAGTGCT TGCGGCAGCG TGAAGCT

```

10

20

30

40

【 0 1 6 4 】

配列番号：16

発現ベクター H C M V - G 1 H u A 6 - V H E のヌクレオチド配列

(3 9 2 1 - 4 2 7 4 からの配列番号：11 (V H E) を含むヒト化重鎖発現ベクターの完全 D N A 配列)

【表 2 2】

```

1  AGCTTTTTCG AAAAGCCTAG GCCTCCAAAA AAGCCTCCTC ACTACTTCTG
51  GAATAGCTCA GAGGCCGAGG CGGCCTCGGC CTCTGCATAA ATAAAAAAAA
101 TTAGTCAGCC ATGGGGCGGA GAATGGGCGG AACTGGGCGG AGTTAGGGGC
151 GGGATGGGCG GAGTTAGGGG CGGGACTATG GTTGCTGACT AATTGAGATG
201 CATGCTTTGC ATACTTCTGC CTGCTGGGGA GCCTGGTTGC TGACTAATTG
251 AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT GGGGAGCCTG GGGACTTTCC
301 ACACCCCTAAC TGACACACAT TCCACAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG
351 ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT
401 CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG
451 TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACGT AGCGATAGCG
501 GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG
551 TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
601 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TCGCTCGGT
651 CGTTCGGCTG CCGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT
701 TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC
751 CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA
801 TAGGCTCGGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
851 GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
901 AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCGGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT
951 GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAT AGCTCACGCT
1001 GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG
1051 CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACTATCG
1101 TCTTGAGTCC AACC CGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
1151 CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
1201 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT
1251 CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAGAGTT GGTAGCTCTT
1301 GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG
1351 CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
1401 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAAACGA AAAGTCACGT TAAGGGATTT
1451 TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA
1501 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA

```

10

20

30

【表 2 3】

```

1551 CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT
1601 TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGA CTCCCCG TCGTG TAGAT AACTACGATA
1651 CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
1701 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG
1751 CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
1801 AATTGTTGCC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG
1851 CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG
1901 GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA
1951 TCCCCATGT TGTGCAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCGATCGT
2001 TGT CAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
2051 TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
2101 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GCGGACCGAG
2151 TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA
2201 CTTTAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTCCGGGCG AAACTCTCA
2251 AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCC ATGTAACCCA CTCGTGCACC
2301 CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA
2351 AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGCGC GACACGGA
2401 TGT TGAATAC TCATACTCTT CTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA
2451 GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA
2501 AACAAATAGG GGTTCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC
2551 TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GCGGTATCAC
2601 GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTCAGCTT GGCTGCAGTG AATAATAAAA
2651 TGTGTGTTTG TCGAAATAC GCGTTTTGAG ATTTCTGTG CCGACTAAT
2701 TCATGTCGCG CGATAGTGGT GTTATCGCC GATAGAGATG GCGATATTGG
2751 AAAAATCGAT ATTTGAAAA ATGGCATATT GAAAATGTCG CCGATGTGAG
2801 TTTCTGTGTA ACTGATATCG CCATTTTTC AAAAGTGATT TTTGGGCATA
2851 CCGGATATCT GCGGATAGCG CTTATATCGT TTACGGGGGA TGGCGATAGA
2901 CGACITTTGGT GACTTGGGCG ATTCTGTGTG TCGCAAATAT CGCAGTTTCG
2951 ATATAGGTGA CAGACGATAT GAGGCTATAT CGCCGATAGA GCGACATCA
3001 AGCTGGCACA TGGCCAATGC ATATCGATCT ATACATTGAA TCAATATTGG
3051 CCATTAGCCA TATTATTAT TGGTTATATA GCATAAATCA ATATTGGCTA
3101 TTGGCCATTG CATACGTTGT ATCCATATCA TAATATGTAC ATTTATATTG
3151 GCTCATGTCC AACATTACCG CCATGTTGAC ATTGATTATT GACTAGTTAT
3201 TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT CATAGCCCAT ATATGGAGTT
3251 CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA CCGCCCAACG
3301 ACCCCCGCCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA
3351 ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTTAC GGTAAACTGC

```

10

20

30

40

【表 2 4】

3401 CCACTTGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG
 3451 ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC
 3501 TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT
 3551 TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT
 3601 TTGACTCACG GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCAITGACGT CAATGGGAGT
 3651 TTGTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC GTAACAACTC
 3701 CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA
 3751 TAAGCAGAGC TCGTTTAGTG AACCCTCAGA TCGCCTGGAG ACGCCATCCA
 3801 CGCTGTTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCAA
 3851 GCTTGCCGCC ACCATGGACT GGACCTGGAG GGTGTTCTGC CTGCTGGCCG
 3901 TGGCCCCCGG CGCCCACAGC GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC AGGAGCCGAA
 3951 GTGAAAAAGC CTGGGGCTTC AGTGAAGGTG TCCTGCAAGG CCTCTGGATA
 4001 CACATTCACT AATTATATTA TCCACTGGGT GAAGCAGGAG CCTGGTCAGG
 4051 GCCTTGAATG GATTGGATAT TTAAATCCTT ACAATCATGG TACTAAGTAC
 4101 AATGAGAAAT TCAAAGGCAG GGCCACACTA ACTGCAAACA AATCCATCAG
 4151 CACAGCCTAC ATGGAGCTCA GCAGCCTGCG CTCTGAGGAC ACTGCGGTCT
 4201 ACTACTGTGC AAGATCAGGA CCTATGCCT GGTTCGACAC CTGGGGCCAA
 4251 GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGGTGAG TTCTAGAAGG ATCCCAAGCT
 4301 AGCTTTCCTG GGCAGGCCAG GCCTGACCTT GGCTTTGGGG CAGGGAGGGG
 4351 GCTAAGGTGA GGCAGGTGGC GCCAGCCAGG TGCACACCCA ATGCCCATGA
 4401 GCCCAGACAC TGGACGCTGA ACCTCGCGGA CAGTTAAGAA CCCAGGGGCC
 4451 TCTGCGCCCT GGGCCCAGCT CTGTCCCACA CCGCGGTAC ATGGCACCAC
 4501 CTCTCTTGCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT
 4551 CCTCCAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG
 4601 GACTACTTCC CCGAACCAGT GACGGTGTG TGGAACTCAG GCGCCCTGAC
 4651 CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCT ACAGTCTCA GGACTCTACT
 4701 CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC
 4751 TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA
 4801 AGTTGGTGAG AGGCCAGCAC AGGGAGGGAG GGTGTCTGCT GGAAGCCAGG
 4851 CTCAGCGCTC CTGCCTGGAC GCATCCCGGC TATGCAGCCC CAGTCCAGGG
 4901 CAGCAAGGCA GGCCCCGTCT GCCTCTTCAC CCGGAGGCCT CTGCCCGCCC
 4951 CACTCATGCT CAGGGAGAGG GTCTTCTGGC TTTTTCCTCA GGCTCTGGGC
 5001 AGGCACAGGC TAGGTGCCCC TAACCCAGGC CCTGCACACA AAGGGGCAGG
 5051 TGCTGGGCTC AGACCTGCCA AGAGCCATAT CCGGGAGGAC CCTGCCCTG
 5101 ACCTAAGCCC ACCCCAAAGG CCAAACTCTC CACTCCCTCA GCTCGGACAC
 5151 CTTCTCTCT CCCAGATTCC AGTAACTCCC AATCTTCTCT CTGCAGAGCC
 5201 CAAATCTTGT GACAAAACCT ACACATGCCC ACCGTGCCCA GGTAAGCCAG

10

20

30

40

【表 2 5】

5251 CCCAGGCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC
 5301 TGCATCCAGG GACAGGCCCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT
 5351 CTTCTCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
 5401 CCAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG
 5451 CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT
 5501 ACGTGGACCG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG
 5551 CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACC GTCCTGCACCA
 5601 GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC
 5651 TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG TGGGACCCGT
 5701 GGGGTGCGAG GGCCACATGG ACAGAGGCCG GCTCGGCCCA CCCTCTGCCC
 5751 TGAGAGTGAC CGCTGTACCA ACCTCTGTCC CTACAGGGCA GCCCCGAGAA
 5801 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCCG GATGAGCTGA CCAAGAACCA
 5851 GGTCAAGCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCOG
 5901 TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT
 5951 CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT
 6001 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC
 6051 ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
 6101 GGTAAATGAG TGCGACGGCC GGCAAGCCCC CGCTCCCCGG GCTCTCGCGG
 6151 TCGCACGAGG ATGCTTGGCA CGTACCCCTT GTACATACTT CCGGGGCGCC
 6201 CAGCATGGAA ATAAAGCACC CAGCGCTGCC CTGGGCCCCT GCGAGACTGT
 6251 GATGGTTCTT TCCACGGGTC AGGCCGAGTC TGAGGCCTGA GTGGCATGAG
 6301 ATCTGATATC ATCGATGAAT TCGAGCTCGG TACCCGGGGA TCGATCCAGA
 6351 CATGATAAGA TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAACCT AGAATGCAGT
 6401 GAAAAAATG CTTTATTTGT GAAATTTGTG ATGCTATTGC TTTATTTGTA
 6451 ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACAACAATT GCATTCAITTT
 6501 TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA GGTTTTTTAA AGCAAGTAAA
 6551 ACCTCTACAA ATGTGGTATG GCTGATTATG ATCTCTAGTC AAGGCACTAT
 6601 ACATCAAATA TTCCTTATTA ACCCCTTTAC AAATTAAAAA GCTAAAGGTA
 6651 CACAATTTTT GAGCATAGTT ATTAATAGCA GACACTCTAT GCCTGTGTGG
 6701 AGTAAGAAAA AACAGTATGT TATGATTATA ACTGTTATGC CTACTTATAA
 6751 AGGTACAGA ATATTTTTC ATAATTTTCT TGTATAGCAG TGCAGCTTTT
 6801 TCCTTTGTGG TGTAATAGC AAAGCAAGCA AGAGTTCTAT TACTAAACAC
 6851 AGCATGACTC AAAAAACTTA GCAATTCTGA AGGAAAGTCC TTGGGGTCTT
 6901 CTACCTTTCT CTTCTTTTTT GGAGGAGTAG AATGTTGAGA GTCAGCAGTA
 6951 GCCTCATCAT CACTAGATGG CATTTCTTCT GAGCAAAACA GGTTTTCCTC
 7001 ATTAAAGGCA TTCCACCACT GCTCCCATTC ATCAGTTCCA TAGGTTGGAA
 7051 TCTAAAATAC ACAAACAATT AGAATCAGTA GTTTAACACA TTATACACTT

10

20

30

40

【表 2 6】

```

7101  AAAAATTTTA TATTTACCTT AGAGCTTTAA ATCTCTGTAG GTAGTTTGTC
7151  CAATTATGTC ACACCACAGA AGTAAGGTTT CTTACACAAAG ATCCGGGACC
7201  AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC AGTTCGGGGG CATGGATGCG
7251  CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC GACGGATTTG CACTGCCGGT
7301  AGAACTCCGC GAGGTCGTCC AGCCTCAGGC AGCAGCTGAA CCAACTCGCG
7351  AGGGGATCGA GCCCGGGGTG GGCGAAGAAC TCCAGCATGA GATCCCCGCG
7401  CTGGAGGATC ATCCAGCCGG CGTCCCGGAA AACGATTCCG AAGCCCAACC
7451  TTTTCATAGAA GGCGGCGGTG GAATCGAAAT CTCGTGATGG CAGGTTGGGC
7501  GTCGCTTGGT CGGTCATTTT GAACCCCAAG GTCCCGCTCA GAAGAACTCG
7551  TCAAGAAGGC GATAGAAGGC GATGCGCTGC GAATCGGGAG CGGCGATACC
7601  GTAAAGCACG AGGAAGCGGT CAGCCCATTC GCCGCCAAGC TCTTCAGCAA
7651  TATCACGGGT AGCCAACGCT ATGTCCTGAT AGCGGTCCGC CACACCCAGC
7701  CGGCCACAGT CGATGAATCC AGAAAAGCGG CCATTTTCCA CCATGATATT
7751  CGGCAAGCAG GCATCGCCAT GGGTCACGAC GAGATCCTCG CCGTCGGGCA
7801  TGCGCGCCTT GAGCCTGGCG AACAGTTCGG CTGGCGCGAG CCCCTGATGC
7851  TCTTCGTCCA GATCATCCTG ATCGACAAGA CCGGCTTCCA TCCGAGTACG
7901  TGCTCGCTCG ATGCGATGTT TCGCTTGGTG GTCGAATGGG CAGGTAGCCG
7951  GATCAAGCGT ATGCAGCCGC CGCATTGCAT CAGCCATGAT GGATACTTTC
8001  TCGGCAGGAG CAAGGTGAGA TGACAGGAGA TCCTGCCCCG GCACTTCGCC
8051  CAATAGCAGC CAGTCCCTTC CCGCTTCAGT GACAACGTCG AGCACAGCTG
8101  CGCAAGGAAC GCCCGTCGTG GCCAGCCACG ATAGCCGCGC TGCCTCGTCC
8151  TGCAGTTCAT TCAGGGCACC GGACAGGTCG GTCTTGACAA AAAGAACCGG
8201  GCGCCCCCTG GCTGACAGCC GGAACACGCG GGCATCAGAG CAGCCGATTG
8251  TCTGTTGTGC CCAGTCATAG CCGAATAGCC TCTCCACCCA AGCGGCCGGA
8301  GAACCTGCGT GCAATCCATC TTGTTCAATC ATGCGAAACG ATCCTCATCC
8351  TGTCTCTTGA TCAGATCTTG ATCCCTGCG CCATCAGATC CTTGGCGGCA
8401  AGAAAGCCAT CCAGTTTACT TTGCAGGGCT TCCCAACCTT ACCAGAGGGC
8451  GCCCCAGCTG GCAATTCCGG TTCGCTTGCT GTCCATAAAA CCGCCCAGTC
8501  TAGCTATCGC CATGTAAGCC CACTGCAAGC TACCTGCTTT CTCTTTGCGC
8551  TTGCGTTTTT CCTTGTCAG ATAGCCCAAGT AGCTGACATT CATCCGGGGT
8601  CAGCACCGTT TCTGCGGACT GGCTTTCTAC GTGTTCCGCT TCCTTTAGCA
8651  GCCCTTGCGC CCTGAGTGCT TGCGGCAGCG TGAAGCT

```

10

20

30

40

【0 1 6 5】

配列番号：17

発現ベクター-HCMV-K HuAb-VL1 humV1のヌクレオチド配列
 (3964-4284からの配列番号：14(humV1=VLh)を含むヒト化軽鎖発
 現ベクターの完全DNA配列)

【表 2 7】

```

1   CTAGCTTTTT GCAAAAGCCT AGGCCTCCAA AAAAGCCTCC TCACTACTTC
51  TGGAAATAGCT CAGAGGCCGA GCGGGCCTCG GCCTCTGCAT AAATAAAAAA
101 AATTAGTCAG CCATGGGGCG GAGAATGGGC GGAAGTGGGC GGAGTTAGGG
151 GCGGGATGGG CGGAGTTAGG GCGGGGACTA TGGTTGCTGA CTAATTGAGA
201 TGCATGCTTT GCATACTTCT GCCTGCTGGG GAGCCTGGTT GCTGACTAAT
251 TGAGATGCAT GCTTTGCATA CTTCTGCCTG CTGGGGAGCC TGGGGACTTT
301 CCACACCCTA ACTGACACAC ATTCCACAGC TGCCTCGCGC GTTTCGGTGA
351 TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG GTCACAGCTT
401 GTCTGTAAAG GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCCGTCAGGG CGCGTCAGCG
451 GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CGCAGCCATG ACCCAGTCAC GTAGCGATAG
501 CGGAGTGTAT ACTGGCTTAA CTATGCGGCA TCAGAGCAGA TTGTACTGAG
551 AGTGCACCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA AGGAGAAAAT
601 ACCGCATCAG GCGCTCTTCC GCTTCTCTCG TCACTGACTC GCTGCGCTCG
651 GTCGTTCCGC TCGGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCARAGG CGGTAATACG
701 GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG
751 GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GGCGTTTTTC
801 CATAGGCTCC GCGCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA
851 GAGGTGGCGA AACCAGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG
901 GAAGCTCCCT CGTGCGCTCT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC
951 CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGGAAAGCGT GCGCTTTCTC ATAGCTCAG
1001 CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG
1051 TGCACGAACC CCGGTTTCAG CCGGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAAGTAT
1101 CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC
1151 CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT
1201 TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT
1251 ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC
1301 TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTTGCA
1351 AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC
1401 TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGGAT
1451 TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT
1501 AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT

```

10

20

30

【表 2 8】

1551	GACAGTTACC	AATGCTTAAT	CAGTGAGGCA	CCTATCTCAG	CGATCTGTCT
1601	ATTTGCTTCA	TCCATAGTTG	CCTGACTCCC	CGTCGTGTAG	ATAACTACGA
1651	TACGGGAGGG	CTTACCATCT	GGCCCCAGTG	CTGCAATGAT	ACCGCGAGAC
1701	CCACGCTCAC	CGGCTCCAGA	TTATTCAGCA	ATAAACCAGC	CAGCCGGAAG
1751	GGCCGAGCGC	AGAAGTGGTC	CTGCAACTTT	ATCCGCCTCC	ATCCAGTCTA
1801	TTAATTGTTG	COGGGAAGCT	AGAGTAAGTA	GPTCGCCAGT	TAATAGTTTG
1851	CGCAACGTTG	TTGCCATTGC	TGCAGGCATC	GTGGTGTCCAC	GCTCGTCTGT
1901	TGGTATGGCT	TCATTACAGCT	CCGGTTCCCA	ACGATCAAGG	CGAGTTACAT
1951	GATCCCCCAT	GTTGTGCAAA	AAAGCGGTTA	GCTCCTTCGG	TCCTCCGATC
2001	GTTGTCAGAA	GTAAGTTGGC	CGCAGTGTTA	TCACTCATGG	TTATGGCAGC
2051	ACTGCATAAT	TCTCTTACTG	TCATGCCATC	CGTAAGATGC	TTTTCTGTGA
2101	CTGGTGAGTA	CTCAACCAAG	TCATTCTGAG	AATAGTGTAT	GCGGCGACCG
2151	AGTTGCTCTT	GCCCCGCGTC	AACACGGGAT	AATACCGCGC	CACATAGCAG
2201	AACTTTAAAA	GTGCTCATCA	TTGGAAAACG	TTCTTCGGGG	CGAAAACCTCT
2251	CAAGGATCTT	ACCGCTGTTG	AGATCCAGTT	CGATGTAACC	CACCTCGTGCA
2301	CCCAACTGAT	CTTCAGCATC	TTTTACITTC	ACCAGCGTTT	CTGGGTGAGC
2351	AAAAACAGGA	AGGCAAAATG	CGCAAAAAAA	GGGAATAAGG	GCGACACGGA
2401	AATGTTGAAT	ACTCATACTC	TTCTTTTTTC	AATATTATTG	AAGCATTIAT
2451	CAGGGTTIAT	GTCTCATGAG	CGGATACATA	TTTGAATGTA	TTTAGAAAAA
2501	TAAACAAATA	GGGGTTCCGC	GCACATTTCC	CCGAAAAGTG	CCACCTGACG
2551	TCTAAGAAAC	CATTATTATC	ATGACATTAA	CCTATAAAAA	TAGGCGIATC
2601	ACGAGGCCCT	TTGCTCTTCA	AGAATTCAGC	TTGGCTGCAG	TGAATAATAA
2651	AATGTGTGTT	TGTCCGAAAT	ACGCGTTTTG	AGATTTCTGT	CGCCGACTAA
2701	ATTCATGTCG	CGCGATAGTG	GTGTTTATCG	CCGATAGAGA	TGGCGATATT
2751	GGAAAAATCG	ATATTTGAAA	ATATGGCATA	TTGAAAATGT	CGCCGATGIG
2801	AGTTTCTGTG	TAACTGATAT	CGCCATTTTT	CCAAAAGTGA	TTTTTGGGCA
2851	TACGCGATAT	CTGGCGATAG	CGCTTATATC	GTTTACGGGG	GATGGCGATA
2901	GACGACTTTG	GTGACTTGGG	CGATTCTGTG	TGTCGCAAAT	ATCGCAGTTT
2951	CGATATAGGT	GACAGACGAT	ATGAGGCTAT	ATCGCCGATA	GAGGCGACAT
3001	CAAGCTGGCA	CATGGCCAAT	GCATATCGAT	CTATACATTG	AATCAATATT
3051	GGCCATTAGC	CATATTATTC	ATTGGTTATA	TAGCATAAAT	CAATATTGGC
3101	TATTGGCCAT	TGCATACGTT	GATCCATAT	CATAATATGT	ACATTTATAT
3151	TGGCTCATGT	CCAACATTAC	CGCCATGTTG	ACATTGATTA	TTGACTAGTT
3201	ATTAATAGTA	ATCAATTACG	GGGTCAATAG	TTCATAGCCC	ATATATGGAG
3251	TTCCGCGTTA	CATAACTTAC	GGTAAATGGC	CCGCCTGGCT	GACCGCCCAA
3301	CGACCCCCGC	CCATTGACGT	CAATAATGAC	GTATGTTCCC	ATAGTAACGC
3351	CAATAGGGAC	TTTCCATTGA	CGTCAATGGG	TGGAGTATTT	ACGGTAAACT

10

20

30

40

【表 2 9】

3401	GCCCACTTGG	CAGTACATCA	AGTGTATCAT	ATGCCAAGTA	OGCCCCCTAT
3451	TGACGTCAAT	GACGGTAAAT	GGCCCCGCCTG	GCATTATGCC	CAGTACATGA
3501	CCTTATGGGA	CTTTCCTACT	TGGCAGTACA	TCTACGTATT	AGTCATOGCT
3551	ATTACCATGG	TGATGCGGTT	TTGGCAGTAC	ATCAATGGGC	GTGGATAGCG
3601	GTTTGACTCA	CGGGGATTTC	CAAGTCTCCA	CCCCATTGAC	GTCAATGGGA
3651	GTTTGTTTTG	GCACCAAAAT	CAACGGGACT	TTCCAAAATG	TCGTAACAAC
3701	TCCGCCCCAT	TGACGCAAAT	GGGCGGTAGG	CGTGTACGGT	GGGAGGTCTA
3751	TATAAGCAGA	GCTCGTTTAG	TGAACCGTCA	GATCGCCTGG	AGACGCCATC
3801	CACGCTGTTT	TGACCTCCAT	AGAAGACACC	GGGACCGATC	CAGCCTCCGC
3851	AAGCTTGATA	TCGAATTCC	GCAGCCCGGG	GGATCCGCCC	GCTTGCCGCC
3901	ACCATGGAGA	CCCCCGCCCA	GCTGCTGFTC	CTGCTGCTGC	TGTGGCTGCC
3951	CGACACCACC	GGCGACATTC	TGCTGACCCA	GTCTCCAGCC	ACCCTGTCTC
4001	TGAGTCCAGG	AGAAAGAGCC	ACTCTCTCCT	GCAGGGCCAG	TCAGAACATT
4051	GGCACAAGCA	TACAGTGGTA	TCAACAAAA	CCAGGTCAGG	CTCCAAGGCT
4101	TCTCATAAGG	TCTTCTTCTG	AGTCTATCTC	TGGGATCCCT	TCCAGGTTTA
4151	GTGGCAGTGG	ATCAGGGACA	GATTTTACTC	TTACCATCAG	CAGTCTGGAG
4201	CCTGAAGATT	TTGCAGTGTA	TTACTGTCAA	CAAAGTAATA	CCTGGCCATT
4251	CACGTTCCGC	CAGGGGACCA	AGCTGGACAT	CAAACGTGAG	TATTCTAGAA
4301	AGATCCTAGA	ATTCTAAACT	CTGAGGGGGT	CGGATGACGT	GGCCATTCTT
4351	TGCCTAAAGC	ATTGAGTTTA	CTGCAAGGTC	AGAAAAGCAT	GCAAAGCCCT
4401	CAGAATGGCT	GCAAAGAGCT	CCAACAAAAC	AATTTAGAAC	TTTATTAAAGG
4451	AATAGGGGGA	AGCTAGGAAG	AACTCRAAA	CATCAAGATT	TTAAATACGC
4501	TTCTTGGTCT	CCTTGCTATA	ATTATCTGGG	ATAAGCATGC	TGTTTTCTGT
4551	CTGTCCCTAA	CATGCCCTGT	GATTATCCGC	AAACAACACA	CCCAAGGGCA
4601	GAACTTTGTT	ACTTAAACAC	CATCCTGTTT	GCTTCTTTCC	TCAGGAACTG
4651	TGGCTGCACC	ATCTGTCTTC	ATCTTCCCGC	CATCTGATGA	GCAGTTGAAA
4701	TCTGGAACTG	CCTCTGTTGT	GTGCCTGCTG	AATAACTTCT	ATCCAGAGA
4751	GGCCAAAGTA	CAGTGGAAGG	TGGATAACGC	CCTCCAATCG	GGTAACTCCC
4801	AGGAGAGTGT	CACAGAGCAG	GACAGCAAGG	ACAGCACCTA	CAGCCTCAGC
4851	AGCACCCCTGA	CGCTGAGCAA	AGCAGACTAC	GAGAAACACA	AAGTCTACGC
4901	CTGCGAAGTC	ACCCATCAGG	GCCTGAGCTC	GCCCCGTCACA	AAGAGCTTCA
4951	ACAGGGGAGA	GTGTTAGAGG	GAGAAGTGCC	CCCACCTGCT	CCTCAGTTCC
5001	AGCCTGACCC	CCTCCCATCC	TTTGGCCTCT	GACCCTTTTT	CCACAGGGGA
5051	CCTACCCCTA	TTGCGGTCCT	CCAGCTCATC	TTTCACCTCA	CCCCCTCCT
5101	CCTCCTTGCC	TTTAATTATG	CTAATGTTGG	AGGAGAATGA	ATAAATAAAG
5151	TGAATCTTTG	CACCTGTGGT	TTCTCTCTTT	CCTCATTTAA	TAATTATTAT
5201	CTGTTGTTTA	CCAACTACTC	AATTTCTCTT	ATAAGGGACT	AAATATGTAG

10

20

30

40

【表 3 0】

5251	TCATCCTAAG	GCGCATAACC	ATTTATAAAA	ATCATCCTTC	ATTCTATTTT
5301	ACCCCTATCAT	CCTCTGCAAG	ACAGTCCTCC	CTCAAACCCA	CAAGCCTTCT
5351	GTCCCTCACAG	TCCCCTGGGC	CATGGTAGGA	GAGACTTGCT	TCCTTGTTTT
5401	CCCCTCCTCA	GCAAGCCCTC	ATAGTCCTTT	TTAAGGGTGA	CAGGTCTTAC
5451	AGTCATATAT	CCTTTGATTC	AATTCCCTGA	GAATCAACCA	AAGCAAATTT
5501	TTCAAAAAGAA	GAAACCTGCT	ATAAAGAGAA	TCATTTCATTG	CAACATGATA
5551	TAAAATAACA	ACACAATAAA	AGCAATTAAA	TAAACAAACA	ATAGGGGAAAT
5601	GTTTAAAGTTC	ATCATGGTAC	TTAGACTTAA	TGGAATGTCA	TGCCTTATTT
5651	ACATTTTTTAA	ACAGGTACTG	AGGGACTCCT	GTCTGCCAAG	GGCCGTATTG
5701	AGTACTTTCC	ACAACCTAAT	TTAATCCACA	CTATACTGTG	AGATTAAAAA
5751	CATTTCATTAA	AATGTTGCAA	AGGTTCTATA	AAGCTGAGAG	ACAAATATAT
5801	TCTATAACTC	AGCAATCCCA	CTTCTAGATG	ACTGAGTGTC	CCCACCCACC
5851	AAAAAACTAT	GCAAGAATGT	TCAAAGCAGC	TTTATTTACA	AAAGCCAAAA
5901	ATTGGAAATA	GCCCGATTGT	CCAACAATAG	AATGAGTTAT	TAAACTGTGG
5951	TATGTTTATA	CATTAGAATA	CCCAATGAGG	AGAATTAACA	AGCTACAACT
6001	ATACCTACTC	ACACAGATGA	ATCTCATAAA	AATAATGTTA	CATAAGAGAA
6051	ACTCAATGCA	AAAGATATGT	TCTGTATGTT	TTCATCCATA	TAAAGTTCAA
6101	AACCAGGTAA	AAATAAAGTT	AGAAATTTGG	ATGGAAATTIA	CTCTTAGCTG
6151	GGGGTGGGCG	AGTTAGTGCC	TGGGAGAAGA	CAAGAAGGGG	CTTCTGGGGT
6201	CTTGGTAAATG	TTCTGTTCTT	CGTGIGGGGT	TGTGCAGTTA	TGATCTGTGC
6251	ACTGTTCTGT	ATACACATTA	TGCTTCAAAA	TAACTTCACA	TAAAGAACAT
6301	CTTATACCCA	GTTAATAGAT	AGAAGAGGAA	TAAGTAATAG	GTCAAGACCA
6351	CGCAGCTGGT	AAGTGGGGGG	GCCTGGGATC	AAATAGCTAC	CTGCCAATC
6401	CTGCCCTCTT	GAGCCCTGAA	TGAGTCTGCC	TTCCAGGGCT	CAAGGTGCTC
6451	AACAAAACAA	CAGGCCTGCT	ATTTTCCTGG	CATCTGTGCC	CTGTTTGGCT
6501	AGCTAGGAGC	ACACATACAT	AGAAATTAAA	TGAAACAGAC	CTTCAGCAAG
6551	GGGACAGAGG	ACAGAATTAA	CCTTGCCCAG	AACTGGAAA	CCCATGTATG
6601	AACACTCACA	TGTTTGGGAA	GGGGGAAGGG	CACATGTAAA	TGAGGACTCT
6651	TCCTCATTCT	ATGGGGCACI	CTGGCCCTGC	CCCTCTCAGC	TACTCATCCA
6701	TCCAACACAC	CTTTCTAAGT	ACCTCTCTCT	GCCTACACTC	TGAAGGGGTT
6751	CAGGAGTAAC	TAACACAGCA	TCCCTTCCCT	CAAATGACTG	ACAATCCCTT
6801	TGTCCCTGCTT	TGTTTTTCTT	TCCAGTCAGT	ACTGGGAAAG	TGGGGAAGGA
6851	CAGTCATGGA	GAAACTACAT	AAGGAAGCAC	CTTGCCCTTC	TGCCTCTTGA
6901	GAATGTTGAT	GAGTATCAAA	TCTTTCAAAC	TTTGGAGGTT	TGAGTAGGGG
6951	TGAGACTCAG	TAATGTCCCT	TCCAATGACA	TGAACTTGCT	CACTCATCCC
7001	TGGGGGCCAA	ATTGAACAAT	CAAAGGCAGG	CATAATCCAG	CTATGAATTC
7051	TAGGATCGAT	CCAGACATGA	TAAGATACAT	TGATGAGTTT	GGACAAACCA

10

20

30

40

【表 3 1】

7101	CAACTAGAAT	GCAGTGAAAA	AAATGCTTTA	TTTGTGAAAT	TTGTGATGCT
7151	ATTGCTTTAT	TTGTAACCAT	TATAAGCTGC	AATAACAAG	TTAACAACAA
7201	CAATTGCATT	CATTTTATGT	TTCAGGTTCA	GGGGGAGGTG	TGGGAGGTTT
7251	TTTAAAGCAA	GTAAAACCTC	TACAAATGTG	GTATGGCTGA	TTATGATCTC
7301	TAGTCAAGGC	ACTATACATC	AAATATTCCT	TATTAACCCC	TTTACAAATT
7351	AAAAAGCTAA	AGGTACACAA	TTTTTGAGCA	TAGTTATTAA	TAGCAGACAC
7401	TCTATGCCTG	TGTGGAGTAA	GAAAAAACAG	TATGTTATGA	TTATAACTGT
7451	TATGCCTACT	TATAAAGGTT	ACAGAATATT	TTCCATAAT	TTTCTTGTAT
7501	AGCAGTGCAG	CTTTTTCCTT	TGTGGTGTA	ATAGCAAGC	AAGCAAGAGT
7551	TCTATTACTA	AACACAGCAT	GACTCAAAAA	ACTTAGCAAT	TCTGAAGGAA
7601	AGTCCTTGGG	GTCTTCTACC	TTTCTCTTCT	TTTTTGGAGG	AGTAGAATGT
7651	TGAGAGTCAG	CAGTAGCCTC	ATCATCACTA	GATGGCATT	CTTCTGAGCA
7701	AAACAGGTTT	TCCTCATPAA	AGGCATTCCA	CCACTGCTCC	CATTCATCAG
7751	TTCCATAGGT	TGGAATCTAA	AATACACAAA	CAATTAGAAT	CAGTAGTTTA
7801	ACACATTATA	CACTTAAAAA	TTTTATATTT	ACCTTAGAGC	TTTAAATCTC
7851	TGTAGGTAGT	TTGTCCAATT	ATGTCACACC	ACAGAAGTAA	GGTTCCTTCA
7901	CAAAGATCCG	GGACCAAAGC	GGCCATCGTG	CCTCCCCACT	CCTGCAGTTC
7951	GGGGGCATGG	ATGCGCGGAT	AGCCGCTGCT	GGTTTCCTGG	ATGCCGACGG
8001	ATTTGCACTG	CCGGTAGAAC	TCCGCGAGGT	CGTCCAGCCT	CAGGCAGCAG
8051	CTGAACCAAC	TCGCGAGGGG	ATCGAGCCCG	GGGTGGGCGA	AGAACTCCAG
8101	CATGAGATCC	CCGCGCTGGA	GGATCATCCA	GCCGGCGTCC	CGGAAAACGA
8151	TTCCGAAGCC	CAACCTTTCA	TAGAAGGCGG	CGGTGGAATC	GAAATCTCGT
8201	GATGGCAGGT	TGGGCGTCGC	TTGGTCGGTC	ATTCGAACC	CCAGAGTCCC
8251	GCTCAGAAGA	ACTCGTCAAG	AAGGCGATAG	AAGGCGATGC	GCTGCGAATC
8301	GGGAGCGGCG	ATACCGTAAA	GCACGAGGAA	GCGGTCAGCC	CATTCGCCGC
8351	CAAGCTCTTC	AGCAATATCA	CGGGTAGCCA	ACGCTATGTC	CTGATAGCGG
8401	TCCGCCACAC	CCAGCCGGCC	ACAGTCGATG	AATCCAGAAA	AGCGGCCATT
8451	TTCCACCATG	ATATTCGGCA	AGCAGGCATC	GCCATGGGTC	ACGACGAGAT
8501	CCTCGCCGTC	GGGCATGCGC	GCCTTGAGCC	TGGCGAACAG	TTCCGGCTGGC
8551	GCGAGCCCCCT	GATGCTCTTC	GTCCAGATCA	TCCTGATCGA	CAAGACCGGC
8601	TTCCATCCGA	GTACGTGCTC	GCTCGATGCG	ATGTTTCGCT	TGGTGGTCTGA
8651	ATGGGCAGGT	AGCCGGATCA	AGCGTATGCA	GCCGCCGCAT	TGCATCAGCC
8701	ATGATGGATA	CTTCTCTCGC	AGGAGCAAGG	TGAGATGACA	GGAGATCCTG
8751	CCCCGGCACT	TCGCCCCAATA	GCAGCCAGTC	CCTTCCCCGCT	TCAGTGACAA
8801	CGTCGAGCAC	AGCTGCGCAA	GGAACGCCCCG	TCGTGGCCAG	CCACGATAGC
8851	CGCGCTGCCT	CGTCCTGCAG	TTCAATTCAGG	GCACCGGACA	GGTCCGTCTT
8901	GACAAAAAGA	ACCGGGCGCC	CCTGCGCTGA	CAGCCGGAAC	ACGGCGGCAT

10

20

30

40

【表 3 2】

8951 CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCCAGT CATAGCCGAA TAGCCTCTCC
 9001 ACCCAAGCGG CCGGAGAACC TGCCTGCAAT CCATCTTGTT CAATCATGCG
 9051 AAACGATCCT CATCCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC CTGCGCCATC
 9101 AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GCCATCCAGT TTACTTTGCA GGGCTTCCCA
 9151 ACCTTACCAG AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCCGGTTCGC TTGCTGTCCA
 9201 TAAAACCGCC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCCACTG CAAGCTACCT
 9251 GCTTTCTCTT TGGGCTTGCG TTTTCCCTTG TCCAGATAGC CCAGTAGCTG
 9301 ACATTTCATCC GGGGTCAGCA CCGTTTCTGC GGACTGGCTT TCTACGTGTT
 9351 CCGCTTCCTT TAGCAGCCCT TGGGCCCTGA GTGCTTGCGG CAGCGTGAAG

10

【 0 1 6 6 】

配列番号：1 8

発現ベクター H C M V - K H u A b - V L 1 h u m V 2 のヌクレオチド配列
 (3 9 2 6 - 4 2 4 6 からの配列番号：1 3 (h u m V 2 = V L m) を含むヒト化軽鎖発
 現ベクターの完全 D N A 配列)

【表 3 3】

1 CTAGCTTTTT GCAAAAGCCT AGGCCTCCAA AAAAGCCTCC TCACTACTTC
 51 TGGAAATAGCT CAGAGGCCGA GCGGGCCTCG GCCTCTGCAT AAATAAAAAA
 101 AATTAGTCAG CCATGGGGCG GAGAATGGGC GGAAGTGGGC GGAGTTAGGG
 151 GCGGGATGGG CGGAGTTAGG GCGGGGACTA TGGTTGCTGA CTAATTGAGA
 201 TGCATGCTTT GCATACTTCT GCTTGTCTGG GAGCCTGGTT GCTGACTAAT
 251 TGAGATGCAT GCTTTGCATA CTTCTGCCTG CTGGGGAGCC TGGGGACTTT
 301 CCACACCCTA ACTGACACAC ATTCCACAGC TGCCCTCGCG GTTTCGGTGA
 351 TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG GTCACAGCTT
 401 GTCTGTAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCCGTCAGGG CGCGTCAGCG
 451 GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CGCAGCCATG ACCCAGTCAC GTAGCGATAG
 501 CGGAGTGTAT ACTGGCTTAA CTATGCGGCA TCAGAGCAGA TTGTACTGAG
 551 AGTGCACCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATGCCGT AGGAGAAAAT
 601 ACCGCATCAG GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG
 651 GTCGTTCCGC TCGCGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG
 701 GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG
 751 GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GCGTTTTTTC
 801 CATAGGCTCC GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA
 851 GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG
 901 GAAGCTCCCT CGTCCGCTCT CCTGTTCCGA CCTGCCCCT TACCGGATAC
 951 CTGTCCGCTT TTCTCCCTTC GGAAGCGTG GCGCTTTCTC ATAGCTCAGC
 1001 CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG

20

30

40

【表 3 4】

1051 TGCACGAACC CCCCGTTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACATAT
 1101 CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACAACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC
 1151 CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT
 1201 TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT
 1251 ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC
 1301 TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CCGTGCTTTT TTTGTTTGCA
 1351 AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC
 1401 TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGGAT
 1451 TTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT
 1501 AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT
 1551 GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT
 1601 ATTTCTGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACCTACG
 1651 TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC
 1701 CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG
 1751 GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCNACTTT ATCCGCTCC ATCCAGTCTA
 1801 TTAATGTGTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG
 1851 CGCAACGTTG TTGCCATTGC TGCAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGTT
 1901 TGGTATGGCT TCATTCAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT
 1951 GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC
 2001 GTTGTGAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC
 2051 ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA
 2101 CTGGTGAGTA CTCACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG
 2151 AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AACACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG
 2201 AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACTCT
 2251 CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA
 2301 CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC
 2351 AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG GCGACACGGA
 2401 AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTC AATATTATTG AAGCATTAT
 2451 CAGGGTATTT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA
 2501 TAAACAAATA GGGGTTCGCG GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG
 2551 TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC
 2601 ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA AGAATTCAGC TTGGCTGCAG TGAATAATAA
 2651 AATGTGTGTT TGTCGAAAT ACGCGTTTTG AGATTTCTGT CGCCGACTAA
 2701 ATTCATGTCG CGCGATAGTG GTGTTTATCG CCGATAGAGA TGCCGATATT
 2751 GGAAAAATCG ATATTTGAAA ATATGCCATA TTGAAAATGT CGCCGATGTG
 2801 AGTTTCTGTG TAACTGATAT CGCCATTTTT CCAAAAGTGA TTTTGGGCA
 2851 TACGCGATAT CTGGCGATAG CGCTTATATC GTTTACGGGG GATGGCGATA

10

20

30

40

【表 3 5】

2901	GACGACTTTG	GTGACTTGGG	CGATTCTGTG	IGTCGCAAAT	ATCGCAGTTT
2951	CGATATAGGT	GACAGACGAT	ATGAGGCTAT	ATCGCCGATA	GAGGCGACAT
3001	CAAGCTGGCA	CATGGCCAAT	GCATATCGAT	CTATACATTG	AATCAATATT
3051	GGCCATTAGC	CATATTATTG	ATTGGTTATA	TAGCATAAAT	CAATATTGGC
3101	TATTGGCCAT	TGCATACGTT	GTATCCATAT	CATAATATGT	ACATTTATAT
3151	TGGCTCATGT	CCAACATTAC	CGCCATGTTG	ACATTGATTA	TTGACTAGTT
3201	ATTAATAGTA	ATCAATTACG	GGGTCATTAG	TTCATAGCCC	ATATATGGAG
3251	TTCCGCGTTA	CATAACTTAC	GGTAAATGGC	CCGCCTGGCT	GACCGCCCAA
3301	CGACCCCCGC	CCATTGACGT	CAATAATGAC	GTATGTTCCC	ATAGTAACGC
3351	CAATAGGGAC	TTTCCATTGA	CGTCAATGGG	TGGAGTATTT	ACGGTAAACT
3401	GCCCCACTTG	CAGTACATCA	AGTGTATCAT	ATGCCAAGTA	CGCCCCCTAT
3451	TGACGTCAAT	GACGGTAAAT	GGCCCGCCTG	GCATTATGCC	CAGTACATGA
3501	CCTTATGGGA	CTTTCCTACT	TGGCAGTACA	TCTACGTATT	AGTCATCGCT
3551	ATTACCATGG	TGATGCGGTT	TTGGCAGTAC	ATCAATGGGC	GTGGATAGCG
3601	GTTTGACTCA	CGGGGATTTC	CAAGTCTCCA	CCCCATTGAC	GTCAATGGGA
3651	GTTTGTTTTG	GCACCAAAT	CAACGGGACT	TTCCAAAATG	TCGTAACAAC
3701	TCCGCCCCAT	TGACGCAAAT	GGGCGGTAGG	CGTGTACGGT	GGGAGGTCTA
3751	TATAAGCAGA	GCTCGTTTAG	TGAACCGTCA	GATCGCCTGG	AGACGCCATC
3801	CACGCTGTTT	TGACCTCCAT	AGAAGACACC	GGGACCGATC	CAGCCTCCGC
3851	AAGCTTGCCG	CCACCATGGA	GACCCCGGCC	CAGCTGCTGT	TCCTGCTGCT
3901	GCTGTGGCTG	CCCGACACCA	CCGGCGACAT	TCTGCTGACC	CAGTCTCCAG
3951	CCACCCTGTC	TCTGAGTCCA	GGAGAAAGAG	CCACTTTCTC	CTGCAGGGCC
4001	AGTCAGAACA	TTGGCACAAG	CATACAGTGG	TATCAACAAA	AAACAAATGG
4051	TGCTCCAAGG	CTTCTCATAA	GGTCTTCTTC	TGAGTCTATC	TCTGGGATCC
4101	CTTCCAGGTT	TAGTGGCAGT	GGATCAGGGA	CAGATTTTAC	TCTTACCATC
4151	AGCAGTCTGG	AGCCTGAAGA	TTTTCAGTGG	TATTAAGTGC	AACAAAGTAA
4201	TACCTGGCCA	TTCACGTTGG	GCCAGGGGAC	CAAGCTGGAG	ATCAAACGTG
4251	AGTATTCTAG	AAAGATCCTA	GAATCTTAAA	CTCTGAGGGG	GTCCGATGAC
4301	GTGGCCATTG	TTTGCCCTAAA	GCATTGAGTT	TACTGCAAGG	TCAGAAAAGC
4351	ATGCAAAAGC	CTCAGAATGG	CTGCAAAGAG	CTCCAACAAA	ACAATTTAGA
4401	ACTTTATTAA	GGATAGGGG	GAAGCTAGGA	AGAAACTCAA	AACATCAAGA
4451	TTTTAAATAC	GCTTCTTGGT	CTCCTTGCTA	TAATTATCTG	GGATAAGCAT
4501	GCTGTTTTCT	GTCTGTCCCT	AACATGCCCT	GTGATTATCC	GCAAACAACA
4551	CACCCAAGGG	CAGAACTTTG	TTACTTAAAC	ACCATCCTGT	TTGCTTCTTT
4601	CCTCAGGAAC	TGTGGCTGCA	CCATCTGTCT	TCATCTTCCC	GCCATCTGAT
4651	GAGCAGTTGA	AATCTGGAAC	TGCCTCTGTT	GTGTGCCTGC	TGAATAACTT
4701	CTATCCCAGA	GAGGCCAAAG	TACAGTGGAA	GGTGGATAAC	GCCCTCCAAT

10

20

30

40

【表 3 6】

4751 CGGGTAACTC CCAGGAGAGT GTCACAGAGC AGGACAGCAA GGACAGCACC
 4801 TACAGCCTCA GCAGCACCCT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACGAGAAACA
 4851 CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG TCACCCATCA GGGCCTGAGC TCGCCCGTCA
 4901 CAAAGAGCTT CAACAGGGGA GAGTGTTAGA GGGAGAAGTG CCCCCACCTG
 4951 CTCCTCAGTT CCAGCCTGAC CCCCTCCCAT CCTTTGGCCT CTGACCCCTT
 5001 TTCCACAGGG GACCTACCCC TATTGCGGTC CTCCAGCTCA TCTTTCACCT
 5051 CACCCCCCTC CTCCTCCTTG GCTTTAATTA TGCTAATGTT GGAGGAGAA
 5101 GAATAAATAA AGTGAATCTT TGCACCTGTG GTTCTCTCTT TTCTTCATTT
 5151 AATAATTATT ATCTGTTGTT TACCAACTAC TCAATTTCTC TTATAAGGGA
 5201 CTAAATATGT AGTCATCCTA AGGCGCATAA CCATTTATAA AAATCATCCT
 5251 TCATTCTATT TTACCCTATC ATCCTCTGCA AGACAGTCCT CCTCAAACC
 5301 CACAAGCCTT CTGTCCTCAC AGTCCCTGCG GCCATGGTAG GAGAGACTTG
 5351 CTTCTTGTGTT TTCCCCTCCT CAGCAAGCCC TCATAGTCCT TTTTAAGGGT
 5401 GACAGGTCTT ACAGTCATAT ATCCTTTGAT TCAATTCCTT GAGAATCAAC
 5451 CAAAGCAAAT TTTTCAAAAG AAGAAACCTG CTATAAAGAG AATCATTCAT
 5501 TGCAACATGA TATAAAATAA CAACACAATA AAAGCAATTA AATAAACAAA
 5551 CAATAGGGAA ATGTTTAAAGT TCATCATGGT ACTTAGACTT AATGGAATGT
 5601 CATGCCTTAT TTACATTTTT AAACAGGTAC TGAGGGACTC CTGTCTGCCA
 5651 AGGGCCGTAT TGAGTACTTT CCACAACCTA APTTAATCCA CACTATACTG
 5701 TGAGATTAAA AACATTCAAT AAAATGTTGC AAAGGTTCTA TAAAGCTGAG
 5751 AGACAAATAT ATTCTATAAC TCAGCAATCC CACTTCTAGA TGAAGTGTG
 5801 TCCCCACCCA CCAAAAACT ATGCAAGAAT GTTCAAAGCA GCTTTATTTA
 5851 CAAAAGCCAA AAATTGGAAA TAGCCCGATT GTCCAACAAT AGAATGAGTT
 5901 ATTAACTGT GGTATGTTTA TACATTAGAA TACCCAATGA GGAGAATTAA
 5951 CAAGCTACAA CTATACCTAC TCACACAGAT GAATCTCATA AAAATAATGT
 6001 TACATAAGAG AAACCTCAATG CAAAAGATAT GTTCTGTATG TTTTCATCCA
 6051 TATAAAGTTC AAAACCAGGT AAAAATAAAG TTAGAAATTT GGATGGAAAT
 6101 TACTCTTAGC TGGGGGTGGG CGAGTTAGTG CCTGGGAGAA GACAAGAAAG
 6151 GGCTTCTGGG GTCTTGGTAA TGTCTGTTC CTCGTGTGGG GTTGTGCAGT
 6201 TATGATCTGT GCACTGTTCT GTATACACAT TATGCTTCAA AATAACTTCA
 6251 CATAAAGAAC ATCTTATACC CAGTTAATAG ATAGAAGAGG AATAAGTAAT
 6301 AGGTCAAGAC CACGCAGCTG GTAAGTGGGG GGGCCTGGGA TCAAATAGCT
 6351 ACCTGCCTAA TCCTGCCCTC TTGAGCCCTG AATGAGTCTG CCTTCCAGGG
 6401 CTCAAGGTGC TCAACAAAAC AACAGGCCTG CTATTTTCCT GGCATCTGTG
 6451 CCCTGTTTGG CTAGCTAGGA GCACACATAC ATAGAAATTA AATGAAACAG
 6501 ACCTTCAGCA AGGGGACAGA GGACAGAAAT AACCTTGCCC AGACACTGGA
 6551 AACCCATGTA TGAACACTCA CATGTTTGGG AAGGGGGAAG GGCACATGTA

10

20

30

40

【表 3 7】

6601 AATGAGGACT CTTCCTCATT CTATGGGGCA CTCTGGCCCT GCCCCTCTCA
 6651 GCTACTCATC CATCCAACAC ACCTTTCTAA GTACCTCTCT CTGCCTACAC
 6701 TCTGAAGGGG TTCAGGAGTA ACTAACACAG CATCCCTTCC CTCAAATGAC
 6751 TGACAATCCC TTTGTCTGTC TTTGTTTTTC TTTCCAGTCA GTACTGGGAA
 6801 AGTGGGGGAG GACAGTCATG GAGAACTAC ATAAGGAAGC ACCTTGCCCT
 6851 TCTGCCTCTT GAGAATGTTG ATGAGTATCA AATCTTTCAA ACTTTGGAGG
 6901 TTTGAGTAGG GGTGAGACTC AGTAATGTCC CTTCCAATGA CATGAACTTG
 6951 CTCCTCATC CCTGGGGGCC AAATTGAACA ATCAAAGGCA GGCATAATCC
 7001 AGCTATGAAT TCTAGGATCG ATCCAGACAT GATAAGATAC ATTGATGAGT
 7051 TTGGACAAAC CACAAC TAGA ATGCAGTGAA AAAAATGCTT TATTTGTGAA
 7101 ATTTGTGATG CTATTGCTTT ATTTGTAACC ATTATAAGCT GCAATAAACA
 7151 AGTTAACAAC AACAAATTGCA TTCATTTTAT GTTTCAGGTT CAGGGGGAGG
 7201 TGTGGGAGGT TTTTAAAGC AAGTAAACC TCTACAAATG TGGTATGGCT
 7251 GATTATGATC TCTAGTCAAG GCACTATACA TCAAATATTC CTTATTAAACC
 7301 CCTTTACAAA TTAAAAAGCT AAAGGTACAC AATTTTGTGAG CATAGTTATT
 7351 AATAGCAGAC ACTCTATGCC TGTGTGGAGT AAGAAAAAAC AGTATGTTAT
 7401 GATTATAACT GTTATGCCTA CTTATAAAGG TTACAGAATA TTTTTCATA
 7451 ATTTTCTTGT ATAGCAGTGC AGCTTTTCC TTTGTGGTGT AAATAGCAAA
 7501 GCAAGCAAGA GTTCTATTAC TAAACACAGC ATGACTCAAA AACTTAGCA
 7551 ATTCTGAAGG AAAGTCCTTG GGGTCTTCTA CCTTTCTCTT CTTTTTTGGA
 7601 GGAGTAGAAT GTTGAGAGTC AGCAGTAGCC TCATCATCAC TAGATGGCAT
 7651 TTCTTCTGAG CAAAACAGGT TTTCTCATT AAAGGCATTC CACCACTGCT
 7701 CCCATTTCATC AGTTCCATAG GTTGGAACTT AAAATACACA AACAAATTAGA
 7751 ATCAGTAGTT TAACACATTA TACACTTAAA AATTTTATAT TTACCTTAGA
 7801 GCTTTAAATC TCTGTAGGTA GTTTGTCCAA TTATGTCACA CCACAGAAGT
 7851 AAGGTTCTTT CACAAAGATC CGGGACCAA GCGGCCATCG TGCCTCCCCA
 7901 CTCCTGCAGT TCGGGGGCAT GGATGCGCGG ATAGCCGCTG CTGGTTTCCT
 7951 GGATGCCGAC GGATTGTCAC TGCCGGTAGA ACTCCGCGAG GTCGTCCAGC
 8001 CTCAGGCAGC AGCTGAACCA ACTGCGGAGG GGATCGAGCC CGGGGTGGGC
 8051 GAAGAACTCC AGCATGAGAT CCCGCGCTG GAGGATCATC CAGCCGGCGT
 8101 CCCGGAAAAC GATTCCGAAG CCCAACCTTT CATAGAAGGC GCGGTTGGAA
 8151 TCGAAATCTC GTGATGGCAG GTTGGGCGTC GCTTGGTCGG TCATTTGAA
 8201 CCCAGAGTC CCGCTCAGAA GAACTCGTCA AGAAGGCGAT AGAAGGCGAT
 8251 GCGCTGCGAA TCGGGAGCGG CGATACCGTA AAGCACGAGG AAGCGGTCAG
 8301 CCCATTGCCC GCCAAGCTCT TCAGCAATAT CACGGGTAGC CAACGCTATG
 8351 TCCTGATAGC GGTCCGCCAC ACCCAGCCGG CCACAGTCGA TGAATCCAGA
 8401 AAAGCGGCCA TTTTCCACCA TGATATTCGG CAAGCAGGCA TCGCCATGGG

10

20

30

40

【表 3 8】

8451 TCACGACGAG ATCCTCGCCG TCGGGCATGC GCGCCTTGAG CCTGGCGAAC
 8501 AGTTCGGCTG GCGCGAGCCC CTGATGCTCT TCGTCCAGAT CATCCTGATC
 8551 GACAAGACCG GCTTCCATCC GAGTACGTGC TCGCTCGATG CGATGTTTCG
 8601 CTTGGTGGTC GAATGGGCAG GTAGCCGGAT CAAGCGTATG CAGCCGCCGC
 8651 ATTGCATCAG CCATGATGGA TACTTTCTCG GCAGGAGCAA GGTGAGATGA
 8701 CAGGAGATCC TGCCCCGGCA CTTGCGCCAA TAGCAGCCAG TCCCTTCCCCG
 8751 CTTCAGTGAC AACGTCGAGC ACAGCTGCGC AAGGAACGCC CGTCGTGGCC
 8801 AGCCACGATA GCCGCGCTGC CTCGTCCTGC AGTTCATTCA GGGCACCGGA
 8851 CAGGTCGGTC TTGACAAAAA GAACCGGGCG CCCCTGCGCT GACAGCCGGA
 8901 ACACGGCGGC ATCAGAGCAG CCGATTGTCT GTTGTGCCCA GTCATAGCCG
 8951 AATAGCCTCT CCACCCAAGC GGCCGGAGAA CCTGCGTGCA ATCCATCTTG
 9001 TTCAATCATG CGAAACGATC CTCATCCTGT CTCTTGATCA GATCTTGATC
 9051 CCCTGCGCCA TCAGATCCTT GGCGGCAAGA AAGCCATCCA GTTACTTTTG
 9101 CAGGGCTTCC CAACCTTACC AGAGGGCGCC CCAGCTGGCA ATTCCGGTTC
 9151 GCTTGCTGTC CATAAAACCG CCCAGTCTAG CTATCGCCAT GTAAGCCCAC
 9201 TGCAAGCTAC CTGCTTTCTC TTTGCGCTTG CGTTTTCCCT TGTCCAGATA
 9251 GCCCAGTAGC TGACATTTCAT CCGGGGTCAG CACCGTTTCT GCGGACTGGC
 9301 TTTCTACGTG TTCCGCTTCC TTTAGCAGCC CTTGCGCCCT GAGTGCTTGC
 9351 GGCAGCGTGA AG

10

20

【0 1 6 7】

配列番号：3 1

V H E - N 7 3 D と称されるヒト化重鎖のアミノ酸配列の一部

【表 3 9】

EVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
ENPYNHGTKY NEKFKGRATL TADKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

30

【0 1 6 8】

配列番号：3 2

V H Q - N 7 3 D と称されるヒト化重鎖のアミノ酸配列の一部

【表 4 0】

QVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
ENPYNHGTKY NEKFKGRATL TADKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

40

【0 1 6 9】

配列番号：3 3

配列番号：8 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列

【表 4 1】

GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
 CTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAA
 CCAGGTCAGGCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
 TTCCAGGTTTGTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
 AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACGTTT
 GGCCAGGGGACCAAGCTTGAAATCAAA

【 0 1 7 0 】

10

配列番号：3 4

配列番号：3 1 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列

【表 4 2】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCATAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCATCAGCACA
 GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
 GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
 CTCA

20

【 0 1 7 1 】

配列番号：3 5

配列番号：3 2 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列

【表 4 3】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCATAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCATCAGCACA
 GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
 GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
 CTCA

30

【 0 1 7 2 】

配列番号：3 6

発現ベクター L C V L 1 S p 2 0 のヌクレオチド配列

40

【表 4 4】

1 CTAGAGTCCT AGAGAGGTCT GGTGGAGCCT GCAAAAGTCC AGCTTTCAAA
 51 GGAACACAGA AGTATGTGTA TGGAATATTA GAAGATGTTG CTFTTACTCT
 101 TAAGTTGGTT CCTAGGAAAA ATAGTTAAAT ACTGTGACTT TAAAATGTGA

【表 4 5】

```

151  GAGGGTTTTTC AAGTACTCAT TTTTTTAAAT GTCCAAAATT TTTGTCAATC
201  AATTTGAGGT CTTGTTTGTG TAGAACTGAC ATTACTTAAA GTTTAACCGA
251  GGAATGGGAG TGAGGCTCTC TCATACCCTA TTCAGAACTG ACTTTTAACA
301  ATAATAAATT AAGTTTAAAA TATTTTTTAAA TGAATTGAGC AATGTTGAGT
351  TGGAGTCAAG ATGGCCGATC AGAACCAGAA CACCTGCAGC AGCTGGCAGG
401  AAGCAGGTCA TGTGGCAAGG CTATTTGGGG AAGGGAAAAT AAAACCACTA
451  GGTAAACTTG TAGCTGTGGT TTGAAGAAGT GGTTTTGAAA CACTCTGTCC
501  AGCCCCACCA AACCGAAAGT CCAGGCTGAG CAAAACACCA CCTGGGTAAT
551  TTGCATTTCT AAAATAAGTT GAGGATTCAG CCGAAACTGG AGAGGTCTCT
601  TTTTAACTTA TTGAGTTCAA CCTTTTAAAT TTAGCTTGAG TAGTTCTAGT
651  TTCCCCAAAC TTAAGTTTAT CGACTTCTAA AATGTAFTTA GAACTCATTT
701  TCAAAATTAG GTTATGTAAG AAATTGAAGG ACTTTAGTGT CTTTAATTTT
751  TAATATATTT AGAAAACCTC TTAAATTAC TCTATTATTC TTCCCTCTGA
801  TTATTGGTCT CCATTCAATT CTTTTCCAAT ACCCGAAGCA TTTACAGTGA
851  CTTTGTTTCT GATCTTTTTT AGTTGTTTGT TTTGCCTTAC TATTAAGACT
901  TTGACATTCT GGTCAAAACG GCTTCACAAA TCTTTTTCAA GACCACTTTC
951  TGAGTATTCA TTTTAGGAGA AATACTTTTT TTTTAAATGA ATGCAATTAT
1001 CTAGGACCTG CAGGCATGCT GTTTTCTGTC TGTCCCTAAC ATGCCCTGTG
1051 ATTATCCGCA AACAACACAC CCAAGGGCAG AACTTTGTTA CTTAAACACC
1101 ATCCTGTTTG CTTCTTTCCT CAGGAACTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA
1151 TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG
1201 TGCCTGCTGA ATAACCTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGT
1251 GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTG ACAGAGCAGG
1301 ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA
1351 GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TGCGAAGTCA CCCATCAGGG
1401 CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGAGGG
1451 AGAAGTGCCC CCACCTGCTC CTCAGTTCCA GCCTGACCCC CTCCCATCCT
1501 TTGGCCTCTG ACCCTTTTTT CACAGGGGAC CTACCCCTAT TGCGGTCTCT
1551 CAGCTCATCT TTCACCTCAC CCCCCTCCTC CTCCTTGGCT TTAATTATGC
1601 TAATGTTGGA GGAGAATGAA TAAATAAAGT GAATCTTTGC ACCTGTGGTT
1651 TCTCTCTTTC CTCATTTAAT AATTATTATC TGTTGTTTTA CCAACTACTC
1701 AATTTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG TCATCCTAAG GCGGGATATC
1751 GAGATCTGAA GCTGATCCAG ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGGAC
1801 AAACCACAAC TAGAATGCAG TGAAAAAAT GCTTTATTTG TGAAATTTGT
1851 GATGCTATTG CTTTATTTGT AACCATTAATA AGCTGCAATA AACAGTTAA
1901 CAACAACAAT TGCATTCATT TTATGTTTCA GGTTCAAGGG GAGGTGTGGG
1951 AGGTTTTTTA AAGCAAGTAA AACCTCTACA AATGTGGTAT GGCTGATTAT

```

10

20

30

40

【表 4 6】

2001	GATCTCTAGT	CAAGGCACTA	TACATCAAAT	ATTCCCTTATT	AACCCCTTTA
2051	CAAATTAAAA	AGCTAAAGGT	ACACAATTTT	TGAGCATAGT	TATTAATAGC
2101	AGACACTCTA	TGCCTGTGTG	GAGTAAGAAA	AAACAGTATG	TTATGATTAT
2151	AACTGTTATG	CCTACTTATA	AAGGTTACAG	AATATTTTTC	CATAATTTTC
2201	TTGTATAGCA	GTGCAGCTTT	TTCCTTTGTG	GTGTAAATAG	CAAAGCAAGC
2251	AAGAGTTCTA	TTACTAAACA	CAGCATGACT	CAAAAACTT	AGCAATTCTG
2301	AAGGAAAGTC	CTTGGGGTCT	TCTACCTTTC	TCTTCTTTTT	TGGAGGAGTA
2351	GAATGTTGAG	AGTCAGCAGT	AGCCTCATCA	TCACTAGATG	GCATTTCTTC
2401	TGAGCAAAAC	AGGTTTTCTT	CATTAAAGGC	ATTCCACCAC	TGCTCCCATT
2451	CATCAGTTCC	ATAGGTTGGA	ATCTAAAATA	CACAAACAAT	TAGAATCAGT
2501	AGTTTAAACAC	ATTATACACT	TAAAAATTTT	ATATTTACCT	TAGAGCTTTA
2551	AATCTCTGTA	GGTAGTTTGT	CCAATTATGT	CACACCACAG	AAGTAAGGTT
2601	CCTTCACAAA	GATCCGGACC	AAAGCGGCCA	TCGTGCCTCC	CCACTCCTGC
2651	AGTTCGGGGG	CATGGATGCG	CGGATAGCCG	CTGCTGGTTT	CCTGGATGCC
2701	GACGGATTTG	CACTGCCGGT	AGAACTCCGC	GAGGTCGTCC	AGCCTCAGGC
2751	AGCAGCTGAA	CCAACTCGCG	AGGGGATCGA	GCATCCCCCA	TGGTCTTATA
2801	AAAATGCATA	GCTTTAGGAG	GGGAGCAGAG	AACTTGAAAG	CATCTTCCTG
2851	TTAGTCTTTC	TTCTCGTAGA	CTTCAAACCT	ATACTTGATG	CCTTTTTCTT
2901	CCTGGACCTC	AGAGAGGACG	CCTGGGTATT	CTGGGAGAAG	TTTATATTTT
2951	CCCAAATCAA	TTTCTGGGAA	AAACGTGTCA	CTTTCAAATT	CCTGCATGAT
3001	CCTTGTCACA	AAGAGTCTGA	GGTGGCCTGG	TTGATTCATG	GCTTCCTGGT
3051	AAACAGAACT	GCCTCCGACT	ATCCAAACCA	TGTCTACTTT	ACTTGCCAAT
3101	TCCGGTTTGT	CAATAAGTCT	TAAGGCATCA	TCCAAACTTT	TGGCAAGAAA
3151	ATGAGCTCCT	CGTGGTGGTT	CTTTGAGTTC	TCTACTGAGA	ACTATATTAA
3201	TTCTGTCTCT	TAAAGGTCTG	TTCTTCTCAG	GAATGGAGAA	CCAGGTTTTT
3251	CTACCCATAA	TCACCAGATT	CTGTTTACCT	TCCACTGAAG	AGGTTGTGGT
3301	CATTCTTTGG	AAGTACTTGA	ACTCGTTCCT	GAGCGGAGGC	CAGGGTCGGT
3351	CTCCGTTCTT	GCCAATCCCC	ATATTTTGGG	ACACGGCGAC	GATGCAGTTC
3401	AATGGTCGAA	CCATGATGGC	AGCGGGGATA	AAATCCTACC	AGCCTTCACG
3451	CTAGGATTGC	CGTCAAGTTT	GGGGGTACCG	AGCTCGAATT	AGCTTTTTTG
3501	AAAAGCCTAG	GCCTCCAAAA	AAGCCTCCTC	ACTACTTCTG	GAATAGCTCA
3551	GAGGGCCGAG	GCGGCCTCGG	CCTCTGCATA	AATAAAAAAA	ATTAGTCAGC
3601	CATGGGGCGG	AGAATGGGCG	GAACTGGGCG	GAGTTAGGGG	CGGGATGGGC
3651	GGAGTTAGGG	GCGGGACTAT	GGTTGCTGAC	TAATTGAGAT	GATGCTTTTG
3701	CATACTTCTG	CCTGCTGGGG	AGCCTGGGGA	CTTTCCACAC	CTGGTTGCTG
3751	ACTAATTGAG	ATGCATGCTT	TGCATACTTC	TGCCTGCTGG	GGAGCCTGGG
3801	GACTTTCCAC	ACCCTAACTG	ACACACATTC	CACAGCTGCC	TCGCGCGTTT

10

20

30

40

【表 4 7】

3851 CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA
 3901 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG
 3951 TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG
 4001 CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT
 4051 ACTGAGAGTG CACCATATGC GGCCGCATAT GCGGTGTGAA ATACCSCACA
 4101 GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCTCGCTC
 4151 ACTGACTCGC TCGCTCGGT CGTTCGGCTG CCGCGAGCGG TATCAGCTCA
 4201 CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA
 4251 AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC
 4301 GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA
 4351 AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCGACAGGA CTATAAAGAT
 4401 ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TCGCTCTCC TGTTCGACC
 4451 CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC
 4501 GCTTTCTCAT AGCTCAGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT
 4551 GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
 4601 GCCTTATCCG GTAACATATG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT
 4651 ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG
 4701 TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT
 4751 AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG
 4801 AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG
 4851 GTGGTTTTTTT TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
 4901 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAAACGA
 4951 AAACCTACGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA
 5001 CCTAGATCCT TTTAAATTAA AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA
 5051 TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC
 5101 TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG
 5151 TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT
 5201 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACC GCTCCAGATT TATCAGCAAT
 5251 AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT
 5301 CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT
 5351 TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT
 5401 GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCCAAC
 5451 GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTEAGC
 5501 TCCTTCGGTC CTCGATCGT TGTGAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC
 5551 ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATC TCTTACTGTC ATGCCATCCG
 5601 TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA
 5651 TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA

10

20

30

40

【表 4 8】

5701	TACCGCGCCA	CATAGCAGAA	CTTTAAAAGT	GCTCATCATT	GGAAAACGTT
5751	CTTCGGGGCG	AAAACCTCTCA	AGGATCTTAC	CGCTGTTGAG	ATCCAGTTCCG
5801	ATGTAACCCA	CTCGTGACC	CAACTGATCT	TCAGCATCTT	TTACTTTTCAC
5851	CAGCGTTTCT	GGGTGAGCAA	AAACAGGAAG	GCAAAATGCC	GCAAAAAGG
5901	GAATAAGGGC	GACACGGAAA	TGTTGAATAC	TCATACTCTT	CCTTTTTCAA
5951	TATTATTGAA	GCATTTATCA	GGGTATTGT	CTCATGAGCG	GATACATATT
6001	TGAATGTATT	TAGAAAAATA	AACAAATAGG	GGTTCGCGC	ACATTTCCCC
6051	GAAAAGTGCC	ACCTGACGTC	TAAGAAACCA	TTATTATCAT	GACATTAACC
6101	TATAAAAATA	GGCGTATCAC	GAGGCCCTTT	CGTCTTCAAG	AATTCAGCTG
6151	CTCGAGGAAG	AGCTCAAACC	CATGCTACTC	TCTGGCTTGA	TGGAAGCAAC
6201	GCTTTCATAG	CTGAGCTGTC	ATAAATAATA	AAGAGATTTT	TTTATTAATA
6251	TTGAAAAGAT	GGGTTATTTA	TGTAAGACTC	TGTCTTCATT	TTAAAAACCA
6301	CACCTTCCAG	TAGTATTCTG	TTACTGTTCT	GGCAATCACT	GTGATCAAGA
6351	AGCTACACGG	TGAGTTGIGC	TTCTCAGTCC	TAAGGGATAC	ATCTACAAGA
6401	GGCTCCCAT	CTCGAAGCTC	AGGAAACATT	GTAGAAAAGG	AGGCAAAAGA
6451	CTGACAGAGC	CAGAGGACCA	AGAAATTTGT	TGTGAGGTTG	TGTCTCCTAC
6501	TAACAATATA	AGCAATATCT	ATAAATTGTT	GATATCATGG	CTACTAAAAT
6551	GTGAGTTGAA	CGAGGAGGAC	ACAAATGAAC	ATGACAATCA	GAATGAGGCC
6601	TCTCACCTGC	AAAAAACACT	ATAGAGAAGC	AGATAAAGCT	GTCAGCAGAA
6651	GAGGCGCACC	TCCTTATAGA	AGAAGCCTAC	CAGGTTTGAT	ATATCAGCCT
6701	TGAAAACCTA	CATAGTAFTT	ACATTATATC	GAGTCTATGA	GACATATTTA
6751	GTAATGCATA	TGTATGTGTG	TGTGTGCATG	TATGTGTGTA	AATACATATG
6801	TTCATAGAAA	AATGTGTAAA	AAGAGATCAT	GAATTTAAGA	GAGAACTGGG
6851	ACAATTTTTT	TCAGGGAGTT	GTAATCAGGA	AAGTTAAGGG	AAAAATGTTG
6901	TAATTAATA	TCAGGCTCAG	AAACAAACAA	AGGAAAAGAA	AAAAAAACAA
6951	CAACAACAAC	AAAAAAACAA	AACAAAGGAG	AAGCTGTATG	GCCACAATAG
7001	CATCTACAGC	TAACTGTGAA	AGGATAATGG	AACAAGTTAT	GTACTGCCTA
7051	GAGCAGTATG	ATGCCTAAAT	CATCTCGACA	TGGAGGAAAA	TAGAACAAAG
7101	ACACTCTACA	TAGACTATGA	TAGAAATCAA	AATAAGGTGT	AAGACATAGA
7151	ACATTAGTTT	TGTTTGTTGT	TCAAAGAGAC	TCACATTCCC	ACAAAAAAT
7201	CTGTGGGATT	TTACAGGTCT	GCAATAAGCT	GCTGACCTGA	TGATTTCTGC
7251	AGCTGTGCCT	ACCTTTTGCT	GATTTGCATG	TACCCAAAGC	ATAGCTTACT
7301	GACATGAGGA	TTCTTTCATA	GTCAGGTCAC	ACCTTTTGCT	GGAGTCAGAA
7351	TCACACTGAT	CACACACAGT	CATGAGTGTG	CTCACTCAGG	TCCTGGCGTT
7401	GCTGCTGCTG	TGGCTTACAG	GTAATGAAGA	CAGCACTAGA	ATTTTATTGA
7451	GCTTCCTGTA	CCTGTGCTG	CTTGTCTCTG	TGAAAATTCT	CTTGTGAATT
7501	AATCATGTGG	GGATCTGTTT	TCAATTTTTC	AATTGTAGGT	ACGCGTTGTG

10

20

30

40

【表 4 9】

7551 ACATTCTGCT GACCCAGTCT CCAGCCACCC TGTCTCTGAG TCCAGGAGAA
 7601 AGAGCCACTC TCTCCTGCAG GGCCAGTCAG AACATTGGCA CAAGCATACA
 7651 GTGGTATCAA CAAAAACCAG GTCAGGCTCC AAGGCTTCTC ATAAGGTCTT
 7701 CTCTCTGAGTC TATCTCTGGG ATCCCTTCCA GGTTTAGTGG CAGTGGATCA
 7751 GGGACAGATT TTA CTCTTAC CATCAGCAGT CTGGAGCCTG AAGATTTTGC
 7801 AGTGTATTAC TGTCAACAAA GTAATACCTG GCCATTCAAG TTCGGCCAGG
 7851 GGACCAAGCT TGAAATCAAAA CGTAAGTAGA ATCCAAAGTC TCTTTCTTCC
 7901 GTTGCTCTATG TCTGTGGCTT CTATGTCTAA AAATGATGTA TAAAATCTTA
 7951 CTCTGAAACC AGATTCTGGC ACTCTCCAAG GCAAAGATAC AGAGTAACTC
 8001 CGTAAGCAAA GCTGGGAATA GGCTAGACAT GTTCTCTGGA GAATGAATGC
 8051 CAGTGTAATA ATTAACACAA GTGATAGTTT CAGAAATGCT CTAGTT

10

【 0 1 7 3 】

配列番号 : 3 7

発現ベクター H C V H E N 7 3 D S p 2 0 のヌクレオチド配列

【表 5 0】

1 cttagagaggt ctggtggagc ctgcaaaagt ccagctttca aaggaacaca gaagtatgtg
 61 tatggaatat tagaagatgt tgcctttact cttaagttgg ttctaggaa aaatagttaa
 121 atactgtgac tttaaaatgt gagagggttt tcaagtactc atttttttaa atgtccaaaa
 181 tttttgtcaa tcaatttgag gtcttgtttg tgtagaactg acattactta aagtttaacc
 241 gaggaatggg agtgaggctc tctcatacc tattcagaac tgacttttaa caataataaa
 301 ttaagtttaa aatattttta aatgaattga gcaatgttga gttggagtca agatggccga
 361 tcagaaccag aacacctgca gcagctggca ggaagcaggt catgtggcaa ggctatattg
 421 ggaagggaaa ataaaaccac taggtaaact tgtagctgtg gtttgaagaa gtggttttga
 481 aacactctgt ccagcccccac caaacgaaa gtccaggctg agcaaaacac caacctggga
 541 atttgcattt ctaaaataag ttgaggattc agccgaaact ggagaggtcc tcttttaact
 601 tattgagttc aaccttttaa ttttagcttg agtagttota gtttcccaa acttaagttt
 661 atcgacttct aaaatgtatt taagctttct ggggcaggcc aggcctgacc ttggctttgg
 721 ggcaggaggg gggctaaggt gaggcagggt ggcgcagcca ggtgcacacc caatgcccat
 781 gagccagac actggaagct gaacctgcg gacagttaag aaccagggg cctctgcgcc
 841 ctgggcccag ctctgtccca caccgcggtc acatggcacc acctctcttg cagcctccac
 901 caagggccca tcggtcttcc cctggcacc ctctccaag agcacctctg ggggcacagc
 961 ggccctgggc tgcctggtca aggactactt cccgaaacc gtgacgggtg cgtggaaact
 1021 aggcgccttg accagggcg tgcacacctt ccggctgtc ctacagtcct caggactcta
 1081 ctccctcagc agcgtggtga cctgacctc cagcagcttg ggcaccaga cctacatctg
 1141 caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag agagtgggtg agaggccagc
 1201 acagggaggg aggggtgtctg ctggaagcca ggctcagcgc tctgctctg acgcatcccg
 1261 gctatgcagt cccagtcag ggcagcaagg caggccccgt ctgcctcttc acccgaggcc
 1321 ctctgcccgc cccactcatg ctccaggaga gggctctctg gctttttccc caggctctgg
 1381 gcaggcacag gctaggtgac cctaaccag gccctgcaca caaaggggca ggtgctgggc
 1441 tcagacctgc caagagccat atccgggagg acctgcacc tgacctaac ccaccccaaa

20

30

40

【表 5 1】

1501 ggccaaactc tccactccct cagctcggac accttctctc ctcccagatt ccagtaactc
 1561 ccaatcttct ctctgcagag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccacogtgc
 1621 caggtaagcc agcccaggcc tcgcccctca gctcaaggcg ggacaggtgc cctagagtag
 1681 cctgcaccca gggacaggcc ccagccgggt gctgacacgt ccaacctccat ctcttctcca
 1741 gcacctgaac tccctggggg accgtcagtc ttctctcttc ccccaaaacc caaggacacc
 1801 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgogtgggtg tggacgtgag ccacgaagac
 1861 cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggogtggagg tgcataatgc caagacaaag
 1921 ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtgttca ggtctctcac cgtcctgac
 1981 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaagggtt ccaacaaagc cctcccagcc
 2041 cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa ggtgggaccc gtgggggtgc agggccacat
 2101 ggacagaggg cggctcggcc caccctctgc cctgagagtg accgctgtac caacctctgt
 2161 ccttacaggg cagcccccag aaccacaggt gtacacccct ccccatccc gggaggagat
 2221 gaccaagaac caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctatccca ggcacatgc
 2281 cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccggt
 2341 ggactcggac ggctccttct tctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca
 2401 gcagggggac gtcttctcat gctccgtgat gcctgaggct ctgcacaacc actacacgca
 2461 gaagagcctc tccctgtccc cgggttaaat agtgccacgg ccggcaagcc cccgctcccc
 2521 gggctctcgc ggtcgcacga ggatgcttgg cagctacccc gtctacatac ttcccaggca
 2581 cccagcatgg aaataaagca cccaccactg ccttgggccc ctgcgagact gtgatggttc
 2641 ttccacggg tcaggccgag tctgaggcct gagtggcatg agggaggcag agcgggtccc
 2701 actgtcccca cactggccca ggctgtgcag gtgtgcctgg gccgcctagg gtgggggtca
 2761 gccaggggct gccctcggca ggggtgggga ttgcccagcg tggcctccc tcacagcga
 2821 gctgccttgg gctgggccc gagaaagcct aggagccctt ggggacagac acacagcccc
 2881 tgctctgtga ggagactgtc ctgtctctgt agccctctgt cctccgacct cgatgccac
 2941 tcgggggcat gcctagtcca tgcggtagg gacaggccct cctcaccoca tctaccccca
 3001 cggcactaac ccctggcagc cctgcccagc ctgcaccccg catggggaca caaccgactc
 3061 cggggacatg cactctcggg cctgtggag ggactgggtc agatgccac acacacactc
 3121 agcccagacc cgttcaacaa accccgcaat gaggttggtc gagggggagt gggccagag
 3181 cctgcctcgg ccgtcaggga ggactccggg gctcactcga aggaggtgac accatttcag
 3241 ctttggttagc ttttcttctt cttttaaat ttctaaagct cattaattgt ctttgatgtt
 3301 tcttttgtga tgacaataaa atatcctttt taagtcttgt acttcgtgat gggagccgcc
 3361 ttctgtgtgc cagcgccctc ctgccccgg tgggaagcac ggtcaggagg aggtcgttc
 3421 agctgcacct cggggggtcc ctgcactcgc ccccgccctc ctgcagccac acccattgac
 3481 cgagcgaccc tccctggccc ctgtcactac atggaccctt ggggtctctc ctcttttcta
 3541 catggatgca gtttctctc ctgctgggca cgggtgctgc tgccttggtc actctgcggg
 3601 ggacagggcc tcacgggaaa gctgggtcga ggctgggagc tggctcaggc tggccaggca
 3661 gagccacagg gagggccttc cagaaccaac catggtccga agcgagaggt ggggtgtcga
 3721 tcacagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtga
 3781 aaaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg
 3841 caataaacaa gtttaacaaca acaattgcat tcattttatg ttccagggtc agggggagggt
 3901 gtggggagggt ttttaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtatggctg attatgatct

10

20

30

40

【表 5 2】

3961 ctagtcaagg cactatacat caaatattcc ttattaaccc ctttacaaat taaaaagcta
 4021 aaggtagaca atttttgagc atagttatta atagcagaca ctctatgcct gtgtggagta
 4081 agaaaaaaca gtatgttatg attataactg ttatgcctac ttataaaggt tacagaatat
 4141 ttttccataa ttttcttgta tagcagtgcg gctttttcct ttgtgggtga aatagcaaag
 4201 caagcaagag ttctattact aaacacagca tgactcaaaa aacttagcaa ttctgaagga
 4261 aagtccttgg ggtctttctac ctttctcttc ttttttggag gagtagaatg ttgagagtca
 4321 gcagtagcct catcatcact agatggcatt tcttctgagc aaaacagggt ttcttcatta
 4381 aaggcattcc accactgctc ccattcatca gttccatagg ttggaatcta aaatacacaa
 4441 acaattagaa tcagtagttt aacacattat acacttaaaa attttatatt taccttagag
 4501 ctttaaatct ctgtaggttag ttgttccaat tatgtcacac cacagaagta aggttctctc
 4561 acaaagatcc ggaccaaago ggccatcgtg cctccccact cctgcagttc gggggcatgg
 4621 atgcgcggat agccgctgct ggtttcctgg atgcgcagg atttgactg ccggtagaac
 4681 tccgcgaggt cgtccagcct caggcagcag ctgaaccaac tccgcagggg atcgagcccg
 4741 ggggtgggga agaactccag catgagatcc ccgcgctgga ggatcatcca gcggcgctcc
 4801 cggaaaacga ttccgaagcc caacctttca tagaaggcgg cgggtggaatc gaaatctcgt
 4861 gatggcaggt tgggcgtcgc ttgggtcggc atttogaacc ccagagtccc gtcagaaga
 4921 actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaato gggagcggcg ataccgtaaa
 4981 gcacgaggaa gcggtcagcc cattcgccgc caagctcttc agcaatatca cgggtagcca
 5041 acgctatgtc ctgatagcgg tcggccacac ccagccggcc acagtcgatg aatccagaaa
 5101 agcggccatt ttccaccatg atattcggca agcaggcacc gccatgggtc acgacgagat
 5161 cctcgcctgc gggcatgcgc gccttgagcc tggcgaacag ttccggtggc gcgagccct
 5221 gatgctcttc gtccagatca tctgatcga caagaccggc ttccatccga gtacgtgctc
 5281 gctcgatgag atgtttcgtc tgggtggcga atgggcaggt agccggatca agcgtatgca
 5341 gccgcgcgat tgcacagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg tgagatgaca
 5401 ggagatcctg ccccgccact tcgcccata gcagccagtc ccttcccgct tcagtgaaca
 5461 cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccg tcgtggccag ccacgatagc cgcgtgcct
 5521 cgtcctgcag ttcattcagg gcaccggaca ggtcggctctt gacaaaaaga accggcgcc
 5581 cctgcgctga cagccggaac acggcggcat cagagcagcc gattgtctgt tgtgcacagt
 5641 catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat ccattctgtt
 5701 caatcatgag aaacgatcct catcctgtct cttgatcaga tcttgatccc ctgcgcctac
 5761 agatccttgg cggcaagaaa gccatccagt ttactttgca gggcttccca acctaccag
 5821 agggcgcccc agctggcaat tcgggttcgc ttgctgtcca taaaaccgcc cagtctagct
 5881 atcgccatgt aagcccactg caagetaact gctttctctt tgcgcttgag ttttcccttg
 5941 tccagatagc ccagtagctg acattcatcc ggggtcagca ccgtttctgc ggaactggctt
 6001 tctacgtgtt ccgcttctct tagcagccct tgcgcctga gtgcttgagg cagcgtgaag
 6061 ctttttgcaa aagcctaggg ctccaaaaaa gctctctcac tacttctgga atagctcaga
 6121 ggcgagggcg gctcggcct ctgcataaat aaaaaaatt agtcagccat ggggcggaga
 6181 atggggcgaa ctggggcgag ttggggcgag gatgggcgga gttggggcg ggactatggt
 6241 tgctgactaa ttgagatgca tgctttgcac acttctgcct gctggggagc ctggggactt
 6301 tccacacctg gttgctgact aattgagatg catgctttgc atacttctgc ctgctgggga
 6361 gcctggggac ttccacacac cttaactgaca cacattccac agctgcctcg ccggtttcgg

10

20

30

40

【表 5 3】

6421	tgatgaagggt	gaaaacctct	gacacatgca	gtcccgagg	acggtcacag	cttgtctgta	
6481	agcggatgcc	gggagcagac	aagcccgta	gggcgcgta	gcgggtgttg	gcgggtgtcg	
6541	ggggcgagcc	atgacccagt	caogtagcga	tagcggagt	tatactgggt	taactatgag	
6601	gcatacagagc	agattgtact	gagagtgcac	catatgcggt	gtgaaatacc	gcacagatgc	
6661	gtaaggagaa	aataccgcac	caggcgctct	tcgccttctt	cgctcaactga	ctcgctgagc	
6721	tcgggtogttc	ggctggggcg	agcggatatca	gtcactcaa	aggcggtaat	acggttatcc	
6781	acagaatcag	gggataacgc	aggaaagaac	atgtgagcaa	aaggccagca	aaaggccagg	
6841	aacogtaaaa	aggcgcggtt	gtcggcggtt	ttccatagga	tcggccccc	tgacgagcat	10
6901	cacaaaaatc	gacgctcaag	tcagagggtg	cgaaacccga	caggactata	aagataccag	
6961	gcgtttcccc	ctggaagctc	cctcgtgcgc	tctcctgttc	cgacctgac	gcttaccgga	
7021	tacctgtccg	cctttctccc	ttcgggaagc	gtggcgcttt	ctcatagctc	acgctgtagg	
7081	tatctcagtt	cgggtgtaggt	cgttcogctc	aagctgggct	gtgtgcacga	acccccggt	
7141	cagcccgacc	gtgcgcctt	atccggtaac	tatcgtcttg	agtccaaacc	ggtaagacac	
7201	gacttatcgc	cactggcagc	agccactggg	aacaggatta	gcagagcgag	gtatgtaggc	
7261	gggtgtacag	agttcttgaa	gtgggtggct	aactacggct	acactagaag	gacagtattt	
7321	ggtatctgcg	ctctgctgaa	gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	ctcttgatcc	
7381	ggcaaacaaa	ccaccgctgg	tagcgggtgg	ttttttgttt	gcaagcagca	gattacgcgc	
7441	agaaaaaaag	gatctcaaga	agatcccttg	atcttttcta	cggggtotga	cgctcagtgg	20
7501	aacgaaaaact	cacgttaagg	gattttgggt	atgagattat	caaaaaggat	cttcaactag	
7561	atcctttttaa	attaaaaatg	aagtttttaa	tcaatctaaa	gtatatatga	gtaaacttgg	
7621	tctgacagtt	accaatgctt	aatcagtgag	gcacctatct	cagcgatctg	tctatttcgt	
7681	tcatacatag	ttgcctgact	ccccgctcgt	tagataacta	cgatacggga	gggcttacca	
7741	tctggcccca	gtgctgcaat	gataccgcga	gaccacgct	caccggctcc	agatttatca	
7801	gcaataaaacc	agccagccgg	aagggcgcgag	cgcagaagtg	gtcctgcaac	tttatccgcc	
7861	tccatccagt	ctattaattg	ttgcggggaa	gctagagtaa	gtagttcgcc	agttaatagt	
7921	ttgcgcacag	ttgttgccat	tgtgcaggc	atcgtgggtg	cacgctcgtc	gtttggtagt	
7981	gcttcattca	gtcccggttc	ccaacgatca	aggcgagtta	catgatcccc	catgttgtgc	30
8041	aaaaaaagcgg	ttagctcctt	cggctcctcc	atcgttgtca	gaagtaagtt	ggcgcagtg	
8101	ttatcactca	tgggtatggc	agcaactgac	aattctctta	ctgtcatgcc	atccgtaaga	
8161	tgtttttctg	tgactggtga	gtactcaacc	aagtcattct	gagaatagtg	tatgcgcgca	
8221	ccgagttgct	cttgcccggc	gtcaacacgg	gataataacc	cgccacatag	cagaacttta	
8281	aaagtgcctca	tcattggaaa	acgttctctg	gggcgaaaaa	tctcaaggat	cttaccgctg	
8341	ttgagatcca	gttcgatgta	acccactcgt	gcacccaact	gatcttcagc	atcttttact	
8401	ttcaccagcg	tttctgggtg	agcaaaaaa	ggaaggcaaa	atgccgcaaa	aaagggaata	
8461	agggcgacac	ggaaatgttg	aatactcata	ctcttccttt	ttcaatatta	ttgaagcatt	
8521	tatcagggtt	attgtctcat	gagcggatac	atatttgaat	gtatttagaa	aaataaacaa	
8581	ataggggttc	cgcgacacatt	ccccgaaaa	gtgccacctg	acgtctaaga	aaccattatt	40
8641	atcatgacat	taacctataa	aaataggcgt	atcagagggc	cctttcgtct	tcaagaattc	
8701	gagctcggta	ccatccagcc	aaaaagcatg	cctgccacac	aacatcaatt	tctggaaaaa	
8761	gtacacttta	attattttcta	gtagaacagc	tctttgggtt	gccaaaaaga	atcacctata	
8821	gtggcatcta	agcacaacaaa	ggagaaaaaa	atcacaaaga	aatgattgag	aggcataata	

【表 5 4】

8881 aaaattatca aaaaattatg agttttacga tttcatcttt ttccaagttg aaatcatagg
 8941 gtggcctttaa cacagtgcac aggaatgtgc atgctgccat tatgggtgctc tgcctaaaat
 9001 ggttgaggcc ttgtcatgct acagagaaac tgtcatacag caggggggtgc caaattttcca
 9061 tatttttttta tatcattgag caggtgcaca gaagaccaga aagcactttc tatcaggctg
 9121 gccttcctct tcctttccag tatgaagcaa aaactgccaa tgaaactagc aattgtttaa
 9181 ttcttttttc aaacagtatt tgtgctatca gaacatagtg cattcaaaag tctagcctga
 9241 gagaacaacc cagttttatt cattcctcct actacctctc tcattcccaac tgtttgtggt
 9301 ctccctccca ttttaattgt ctatctagtc caaactaagc acacgatcca gtccacatta
 9361 aacaacatgt tttcacttta agtcaaatc aagacacott taatatcago ccttggttcat
 9421 aatcgtgctt ctagtgactt aatgtacatg tcacactgta ctggtgggtt ttgtgtctca
 9481 tcatgaacaa tgttgtgaag gtattaagtg gagagtaagc agaattagat tctctaatg
 9541 atgcacaccc aactaagag cagaaataat attaaaaata gaaaaaaaag ttttacatga
 9601 gatttcaaat acccaggtat gagctgcagt ttcttcaagt taaagcatcg aggttgtcag
 9661 ttacactatt acaggaaaca tatgcagagt ttttatttta gtatattagt tttcacatat
 9721 gtggaattac tattaacta ttctttcttt tcaaatgctt accattgtaa atgagtttgt
 9781 gacttttgtt aggtgagtgc acatgactct ggatgcctaa gaggactgaa gaagttggag
 9841 ttataggtag ttttattcta cttgactggt cagtgcctaa aatacaactg aggtccttta
 9901 aactgctgtt catgaacttc ttaattgata tatctcatga gatctctaaa ctatttttat
 9961 tatgacagt ttcaccattt tcaactgaac gatttttatg ttttatatta atgtaactat
 10021 atgacacttc ccaaaatccc catattcaca attgaactgt ttcaaagttt taacttgact
 10081 tatgggaaat gaaaaccac attttataat tttaaaatga aatgtttatt ttatatttct
 10141 gcaaatttca caaggaaaga ttagtcactg gtgtgtgaga gcagaggagc ataagagttc
 10201 aggaatagaa tccattatga ttctggaggc aaggaaagaac tgatgccaaag gtttcagtat
 10261 aagagcagta tccactggaa aggataaagt cactacatct gagcacagag caggacatct
 10321 acataatgag tggtcactaa tgggccactg ttacactggt atatgtataa ggctcaagaa
 10381 tgagcactga ggcgtgaagg tgtatgggtg aggacatcag gatgtaaacc cagctcaggt
 10441 agaggactca gaggacagca cagtcagcat gaactaataa acatcagata agataaggca
 10501 caagctcagc tatatagggg aagggatctt tgtaaatctg attgtgcac cagtctagtt
 10561 caatgtgact taggaagccc agtcatatgc aaatctagag aagactttag agtagaaatc
 10621 tgaggctcac ctacataacc agcaagcag tgaccagtta gtcttaaggc accacttctt
 10681 agacatcatg gcttgggtgt ggacctgccc attcctgatg gcagctgccc aaagtaagac
 10741 atcagaaaaa agagttccaa ggggaattga agcagttcca tgaatactca ccttctgtg
 10801 ttctttttcac aggtgtccag gcagagggtg agctgggtgga gtcaggagcc gaagtgaaaa
 10861 agcctggggc ttcagtgaag gtgtcctgca aggcctctgg atacacattc actaattata
 10921 ttatccactg ggtgaagcag gagcctggtc agggccttga atggattgga tattttaatc
 10981 cttacaatca tggactaag tacaatgaga agttcaaagg cagggccaca ctaactgcag
 11041 acaaatccat cagcacagcc tacatggagc tcagcagcct gcgctctgag gacactggg
 11101 tctactactg tgcaagatca ggacctatg cctggtttga cacctggggc caagggacca
 11161 cggtcacagt ctctcaggt aagaatggcc actctagggc ctttgttttc tgotgtgcc
 11221 tgtgggattt catgagcatt gcaagttgt cctcgggaca tgttccgagg ggacctgggc
 11281 ggactggcca ggaggggacg ggcactgggg tgccttgagg atctgggagc ctctgtggat

10

20

30

40

【表 5 5】

11341 tttccgatgc ctttggaaaa tgggaactgag gttgggtgcg totgagacag taactcagcc
 11401 tgggggcttg gtgaagatcg ccgcacagca gcgagtcogt gaaatatctt atttagactt
 11461 gtgaggtgcg ctgtgtgtca atttacatct taaatccttt attggctgga aagagaattg
 11521 ttggagtggt tgaatccagc caggaggagc ggggggggat cca

【 0 1 7 4 】

配列番号：3 8

発現ベクター H C V H Q N 7 3 D S p 2 0 のヌクレオチド配列

10

【表 5 6】

1 CTAGAGAGGT CTGGTGGAGC CTGCAAAAGT CCAGCTTTCA AAGGAACACA GAAGTATGTG
 61 TATGGAATAT TAGAAGATGT TGCTTTTACT CTTAAGTTGG TTCCTAGGAA AATAGTTAA
 121 AFACTGTGAC TTAAAATGT GAGAGGGTTT TCAAGTACTC ATTTTTTTAA ATGTCCAAAA
 181 TTTTTGTCAA TCAATTTGAG GTCTTGTTCG TGTAGAACTG ACATTACTTA AGTTTAAACC
 241 GAGGAATGGG AGTGAGGCTC TCTCATACCC TATTCAGAAC TGAATTTTAA CAATAATAAA
 301 TTAAGTTTAA AATATTTTAA AATGAATTGA GCAATGTTGA GTTGGAGTCA AGATGGCCGA
 361 TCAGAACCAAG AACACCTGCA GCAGCTGGCA GGAAGCAGGT CATGTGGCAA GGCTATTTGG
 421 GGAAGGGAAA ATAAAACCAC TAGGTAAACT TGTAGCTGTG GTTTGAAGAA GTGGTTTTGA
 481 AACACTCTGT CCAGCCCCAC CAAACCGAAA GTCCAGGCTG AGCAAAACAC CACCTGGGTA
 541 ATTTGCATTT CTAAAATAAG TTGAGGATTC AGCCGAAACT GGAGAGGTCC TCFTTTAACT
 601 TATTGAGTTC AACCTTTTAA TTTTAGCTTG AGTAGTTCTA GTTTCGCCAA ACTTAAAGTTT
 661 ATCGACTTCT AAAATGTATT TAAGCTTCTT GGGGCAGGCC AGGCCTGACC TTGGCTTTGG
 721 GGCAGGGAGG GGGCTAAGGT GAGGCAGGTG GCGCCAGCCA GGTGCACACC CAATGCCCAT
 781 GAGCCCAGAC ACTGGACGCT GAACCTCGCG GACAGTTAAG AACCCAGGGG CCTCTGCGCC
 841 CTGGGCCCCG CTCTGTCCCA CACCGCGGTC ACATGGCACC ACCTCTCTTG CAGCCTCCAC
 901 CAAGGGCCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCTTCCAAG AGCACCTCTG GGGGCACAGC
 961 GGGCCTGGGC TGCCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT CGTGGAACTC
 1021 AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCGGCTGTG CTACAGTCTT CAGGACTCTA
 1081 CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG
 1141 CAACGTGAAT CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGGTG AGAGGCCAGC
 1201 ACAGGGAGGG AGGGTGTCTG CTGGAAGCCA GGCTCAGGCG TCCTGCCTGG ACCCATCCCG
 1261 GCTATGCAGT CCCAGTCCAG GGCAGCAAGG CAGGCCCCGT CTGCCTCTTC ACCCGAGGGC
 1321 CTCTGCCCGC CCCACTCATG CTCAGGGAGA GGTCTTCTG GCTTTTTCCC CAGGCTCTGG
 1381 GCAGGCACAG GCTAGGTGCC CCTAACCCAG GCCCTGCACA CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC
 1441 TCAGACCTGC CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAAGC CCACCCAAA
 1501 GGCCAAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC CTCCAGATT CCAGTAACTC
 1561 CCAATCTTCT CTCTGCAGAG CCCAATCTT GTGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
 1621 CAGGTAAGCC AGCCCAGGCC TCGCCCTCCA GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG
 1681 CCTGCATCCA GGGACAGGCC CCAGCCGGGT GCTGACAGGT CCACCTCAT CTCTTCTCA
 1741 GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTGAGTC TTCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC
 1801 CTCATGATCT CCGGACCCC TGAGGTGACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC
 1861 CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GCGGTGGAGG TGCTAATGC CAAGACAAAG
 1921 CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCTGCAC
 1981 CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CTCCCAGCC

20

30

40

【表 5 7】

2041	CCCATCGAGA	AAACCATCTC	CAAAGCCAAA	GGTGGGACCC	GTGGGGTGCG	AGGGCCACAT
2101	GGACAGAGGC	CGGCTCGGCC	CACCCTCTGC	CCTGAGAGTG	ACCGCTGTAC	CAACCTCTGT
2161	CCCTACAGGG	CAGCCCCGAG	AACCACAGGT	GTACACCCTG	CCCCCATCCC	GGGAGGAGAT
2221	GACCAAGAAC	CAGGTCAGCC	TGACCTGCCT	GGTCAAAGGC	TTCTATCCCA	GCGACATCGC
2281	CGTGGAGTGG	GAGAGCAATG	GGCAGCCGGA	GAACAACTAC	AAGACCACGC	CTCCCGTGCT
2341	GGACTCCGAC	GGCTCCTTCT	TCCTCTATAG	CAAGCTCACC	GTGGACAAGA	GCAGGTGGCA
2401	GCAGGGGAAC	GTCTTCTCAT	GCTCCGTGAT	GCATGAGGCT	CTGCACAACC	ACTACACGCA
2461	GAAGAGCCTC	TCCCTGTCCC	CGGGTAAATG	AGTGCACGG	CCGGCAAGCC	CCCGCTCCCC
2521	GGGCTCTCGC	GCTCGCACGA	GGATGCTTGG	CACGTACCCC	GTCTACATAC	TTCCCAGGCA
2581	CCGAGCATGG	AAATAAAGCA	CCCACCACTG	CCCTGGGCCC	CTGCGAGACT	GTGATGGTTC
2641	TTTCCACGGG	TCAGGCCGAG	TCTGAGGCCT	GAGTGGCATG	AGGGAGGCAG	AGCGGGTCCC
2701	ACTGTCCCCA	CACGTGCCCC	GGCTGTGCAG	GTGTGCCTGG	GCCGCCTAGG	GTGGGGCTCA
2761	GCCAGGGGCT	GCCCTCGGCA	GGGTGGGGGA	TTTGCCAGCG	TGGCCCTCCC	TCCAGCAGCA
2821	GCTGCCCTGG	GCTGGGCCAC	GAGAAGCCCT	AGGAGCCCCCT	GGGGACAGAC	ACACAGCCCC
2881	TGCCCTCTGT	GGAGACTGTC	CTGTCTCTGT	AGCGCCCTGT	CCTCCGACCC	CGATGCCCAC
2941	TCGGGGGCAT	GCCTAGTCCA	TGCGCGTAGG	GACAGGCCCT	CCCTCACCCA	TCTACCCCCA
3001	CGGCACTAAC	CCCTGGCAGC	CCTGCCACAG	CTGCCACCCC	CATGGGGACA	CAACCGACTC
3061	CGGGGACATG	CACCTCTCGG	CCCTGTGGAG	GGACTGGTGC	AGATGCCAC	ACACCACTC
3121	AGCCCGAGCC	CGTCAACAA	ACCCCGCACT	GAGGTTGCTC	GAGCGGGAGT	GCGGCCAGAG
3181	CCTGCCCTCG	CCGTCAGGGA	GGACTCCCGG	GCTCACTCGA	AGGAGGTGCC	ACCATTTTCA
3241	CTTTGGTAGC	TTTCTTCTT	CTTTTAAAT	TTCTAAAGCT	CATTAAATGT	CTTTGATGTT
3301	TCTTTTGTGA	TGACAATAAA	ATATCCTTTT	TAAGTCTTGT	ACTTCGTGAT	GGGAGCCGCC
3361	TTCTGTGTTC	CACGCGCCTC	CTGCCCCCGG	TGGGAAGCAC	GCTCAGGAGG	AGGCTGGTCC
3421	AGCTGCACCT	CGGGGGCTCC	CTGCACTCGC	CCCCCGCCTC	CTGCAGCCAC	ACGCATTGCC
3481	CGAGCGACCC	TCCCTGGCCC	CTGTCACTAC	ATGGACCCCT	GGGGCTTCTC	CTCTTTTCTA
3541	CATGGATGCA	GTTTCTCCTC	CTGCTGGGCA	CGGTGCTGCC	TGCCCTGGTC	ACTCTGCGGG
3601	GGACAGGGCC	TCCAGGGAAA	GCTGGGTGGA	GGCTGGGAGC	TGGCTCAGGC	TGGCCAGGCA
3661	GAGCCACAGG	GAGGGCCCTC	CAGAACCAC	CATGGTCCGA	AGCGAGAGGT	GCGTGTGAGA
3721	TCCAGACATG	ATAAGATACA	TTGATGAGTT	TGGACAAACC	ACAAC TAGAA	TGCAGTGAAA
3781	AAAATGCTTT	ATTTGTGAAA	TTTGTGATGC	TATTTGCTTT	TTTGTAAACCA	TTATAAGCTG
3841	CAATAAACAA	GTTAACAACA	ACAATTGCAT	TCATTTTATG	TTTCAGGTTT	AGGGGGAGGT
3901	GTGGGAGGTT	TTTTAAAGCA	AGTAAACCT	CTACAAATGT	GGTATGGCTG	ATTATGATCT
3961	CTAGTCAAGG	CACTATACAT	CAAATATTCC	TTATTAACCC	CTTTACAAAT	TAAAAAGCTA
4021	AAGGTACACA	ATTTTGTGAG	ATAGTTATTA	ATAGCAGACA	CTCTATGCCT	GTGTGGAGTA
4081	AGAAAAAACA	GATGTTTATG	ATTATAACTG	TTATGCCTAC	TTATAAAGGT	TACAGAATAT
4141	TTTTCCATAA	TTTCTTGTGA	TAGCAGTGCA	GCTTTTCTCT	TTGTGGTGTA	AATAGCAAAG
4201	CAAGCAAGAG	TTCTATTACT	AAACACAGCA	TGACTCAAAA	AACTTAGCAA	TTCTGAAGGA
4261	AAGTCCTTGG	GGTCTTCTAC	CTTTCCTTTC	TTTTTTGGAG	GAGTAGAATG	TTGAGAGTCA
4321	GCASTAGCCT	CATCATCACT	AGATGGCATT	TCTTCTGAGC	AAAACAGGTT	TTCTCATTTA
4381	AAGGCATTCC	ACCACTGCTC	CCATTCTCA	GTTCCATAGG	TTGGAATCTA	AAATACACAA
4441	ACAATTAGAA	TCAGTAGTTT	AACACATTAT	ACACTTAAAA	ATTTTATATT	TACCTTAGAG

10

20

30

40

【表 5 8】

4501 CTTTAAATCT CTGTAGGTAG TTTGTCCAAT TATGTCACAC CACAGAAAGTA AGGTTTCCTTC
 4561 ACRAAGATCC GGACCAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT CCTGCAGTTC GGGGGCATGG
 4621 ATGCCCGGAT AGCCGCTGCT GGTTCCTGG ATGCCGACGG ATTGCACTG CCGGTAGAAC
 4681 TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT CAGGCAGCAG CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCG
 4741 GGGTGGGCGA AGAACTCCAG CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCGGCGGTCC
 4801 CGGAAAACGA TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CGGTGGAATC GAAATCTCGT
 4861 GATGGCAGGT TGGGCGTCGC TTGGTGGGTC ATTTGGAACC CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA
 4921 ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC GCTGCGAATC GGGAGCGGGC ATACCGTAAA
 4981 GCACGAGGAA GCGGTGAGCC CATTGCGCCG CRAGCTCTTC AGCAATATCA CCGGTAGCCA
 5041 ACGCTATGTC CTGATAGCGG TCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA
 5101 AGCGGCCATT TTCCACCATG ATATTCCGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTC ACGACGAGAT
 5161 CCTCGCCGTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG TTCGGCTGGC GCGAGCCCTC
 5221 GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA CAAGACCGGC TTCCATCCGA GTACGTGCTC
 5281 GCTCGATGCG ATGTTTCGCT TGGTGGTGA ATGGGCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA
 5341 GCGGCGCAT TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTCGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA
 5401 GGAGATCCTG CCGCGGCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCGCT TCAGTGACAA
 5461 CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCGCG TCGTGGCCAG CCACGATAGC CGCGCTGCCT
 5521 CGTCCTGCAG TTCATTGAGG GCACCGGACA GGTGGGTCTT GACAAAAAGA ACCGGGCGCC
 5581 CCTGCGCTGA CAGCCGGAAC ACGCGGCGAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCAGT
 5641 CATAGCCGAA TAGCCTCTCC ACCCAAGCGG CCGGAGAAC TCGGTGCAAT CCATCTTGTT
 5701 CAATCATGCG AAACGATCCT CATCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC CTGCGCCATC
 5761 AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GCCATCCAGT TTACTTTGCA GGGCTTTCCA ACCTTACCAG
 5821 AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCGGTTGCG TTGCTGTCCA TAAACCGCC CAGTCTAGCT
 5881 ATCGCCATGT AAGCCCACTG CAAGCTACCT GCTTCTCTT TCGCTTGGC TTTTCCCTTG
 5941 TCCAGATAGC CCAGTAGCTG ACATTATCC GGGGTGAGCA CCGTTTCTGC GGACTGGCTT
 6001 TCTACGTGTT CCGCTTCTT TAGCAGCCCT TCGGCCCTGA GTGCTTGGG CAGCGTGAAG
 6061 CTTTTTGCAA AAGCCTAGGC CTCAAAAAA GCCTCCTCAC TACTTCTGGA ATAGCTCAGA
 6121 GGCCGAGGCG GCCTCGGCC CTGCATAAAT AAAAAAAT AGTCAGCCAT GGGGCGGAGA
 6181 ATGGGCGGAA CTGGGCGGAG TTAGGGCGCG GATGGGCGGA GTTAGGGGCG GGAATATGGT
 6241 TGCTGACTAA TTGAGATGCA TGCTTTGCAT ACTTCTGCTT GCTGGGGAGC CTGGGGACTT
 6301 TCCACACCTG GTTGCTGACT AATTGAGATG CATGCTTTGC ATACTTCTGC CTGCTGGGGA
 6361 GCCTGGGGAC TTTCACACC CTAAGTACA CACATTCAC AGCTGCCTCG CGCGTTTCGG
 6421 TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA
 6481 AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGTGTTG GCGGTGTGCG
 6541 GGGCGCAGCC ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCG
 6601 GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGAC CATATGCGGT GTGAAATACC GCACAGATGC
 6661 GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC
 6721 TCGGTCTTTC GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC
 6781 ACAGAAATCAG GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG
 6841 AACCCTAAAA AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCGCCCCC TGACGAGCAT
 6901 CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCGGA CAGGACTATA AAGATACCAG

10

20

30

40

【表 5 9】

6961	GCGTTTCCCC	CTGGAAGCTC	CCTCGTGCGC	TCTCCTGTTC	CGACCCCTGCC	GCTTACCGGA
7021	TACCTGTCGG	CCTTTCTCCC	TTGGGGAAAG	GTGGCGCTTT	CTCATAGCTC	ACGCTGTAGG
7081	TATCTCAGTT	CGGTGTAGGT	CGTTCGCTCC	AAGCTGGGCT	GTGTGCACGA	ACCCCCGTT
7141	CAGCCCGACC	GCTGCGCCTT	ATCCGGTAAC	TATCGTCTTG	AGTCCAACCC	GGTAAGACAC
7201	GACTTATCGC	CACTGGCAGC	AGCCACTGGT	AACAGGATTA	GCAGAGCGAG	GTATGTAGGC
7261	GGTGCTACAG	AGTTCTTGAA	GTGGTGGCCT	AACTACGGCT	ACACTAGAAG	GACAGTATTT
7321	GGTATCTGCG	CTCTGCTGAA	GCCAGTTACC	TTGGGAAAAA	GAGTTGGTAG	CTCTTGATCC
7381	GGCAACAAA	CCACCGCTCG	TAGCGGTGGT	TTTTTTGTTT	GCAAGCAGCA	GATTACGGCC
7441	AGAAAAAAG	GATCTCAAGA	AGATCCTTTG	ATCTTTTCTA	CGGGGTCTGA	CGCTCAGTGG
7501	AACGAAAACT	CACGTTAAGG	GATTTTGGTC	ATGAGATTAT	CABAAAGGAT	CTTCACCTAG
7561	ATCCTTTTAA	ATTAAAAATG	AAGTTTFAAA	TCAATCTAAA	GTATATATGA	GTAAACTTGG
7621	TCTGACAGIT	ACCAATGCTT	AATCAGTGAG	GCACCTATCT	CAGCGATCTG	TCTATTTCGT
7681	TCATCCATAG	TTGCCTGACT	CCCCGTCTGT	TAGATAACTA	CGATACGGGA	GGGCTTACCA
7741	TCTGGCCCCA	GTGCTGCAAT	GATACCGCGA	GACCCACGCT	CACCGGCTCC	AGATTTATCA
7801	GCAATAAACC	AGCCAGCCGG	AAGGGCCGAG	CGCAGAAAGT	GTCTGCAAC	TTTATCCGCC
7861	TCCATCCAGT	CTATTAATTG	TTGCCGGGAA	GCTAGAGTAA	GTAGTTGCCC	AGTTAATAGT
7921	TTGCGCAACG	TTGTGCCAT	TGCTGCAGGC	ATCGTGGTGT	CACGCTCGTC	GTTTGGTATG
7981	GCTTCATTCA	GCTCCGGTTC	CCAACGATCA	AGGCGAGTTA	CATGATCCCC	CATGTTGTGC
8041	AAAAAAGCGG	TTAGCTCCTT	CGGTCTCTCG	ATCGTTGTCA	GAAGTAAGTT	GGCCGCGAGT
8101	TTATCACTCA	TGGTTATGGC	AGCACTGCAT	AATTCTCTTA	CTGTCATGCC	ATCCGTAAGA
8161	TGCTTTTCTG	TGACTGGTGA	GTACTCAACC	AAGTCATTCT	GAGAATACTG	TATGCGCCGA
8221	CCGAGTTGCT	CTTGCCCGGC	GTCAACACGG	GATAATACCG	CGCCACATAG	CAGAACTTTA
8281	AAAGTGCTCA	TCATTGGAAA	ACGTTCTTCG	GGGCGAAAAA	TCTCAAGGAT	CTTACCGCTG
8341	TTGAGATCCA	GTTCGATGTA	ACCCACTCGT	GCACCCAACT	GATCTTCAGC	ATCTTTTACT
8401	TTCAACAGCG	TTTCTGGGTG	AGCAAAACA	GGAAGGCAAA	ATGCCGCAAA	AAAGGGAATA
8461	AGGGCGACAC	GGAAATGTTG	AATACTCATA	CTCTTCCTTT	TTCAATATTA	TTGAAGCATT
8521	TATCAGGGTT	ATTGTCTCAT	GAGCGGATAC	ATATTTGAAT	GTATTTAGAA	AAATAAACAA
8581	ATAGGGGTTT	CGCGCACATT	TCCCCGAAAA	GTGCCACCTG	ACGTCTAAGA	AACCATTATT
8641	ATCATGACAT	TAACCTATAA	AAATAGGCGT	ATCAGGAGGC	CGTTTCGTCT	TCAAGAATTC
8701	GAGCTCGGTA	CCCATCAGCC	AAAAAGCATG	CCTGCCACAC	AACATCAATT	TCTGGAAAAC
8761	GCTACACTTA	ATTATTTCTA	GTAGAACAGC	TCTTTGGTTT	GCCAAAAAGA	ATCACCTATA
8821	GTGGCATCTA	AGCACAAAAA	GGAGAAAAAA	ATCACAAAGA	AATGATTGAG	AGGCATAATA
8881	AAAATTATCA	AAAAATTATG	AGTTTTACGA	TTTCATCTTT	TTCCAAGTTG	AAATCATAGG
8941	GTGGCTTTAA	CACAGTGACA	AGGAATGTGC	ATGCTGCCAT	TATGGTGCTC	TGCTTAAAT
9001	GGTTGGAGCC	TTGTCTATGT	ACAGAGAAAC	TGTCATACAG	CAGGGGGTGC	CAAATTTCCA
9061	TATTTTTTTA	TATCATTGAG	CAGGTGCRCA	GAAGACCAGA	AAGCACTTTC	TATCAGGCTG
9121	GCCTTCCTCT	TCCTTTCCAG	TATGAAGCAA	AAACTGCCAA	TGAAACTAGC	AATTGTTAAA
9181	TTCTTTTTTC	AAACAGTATT	TGTGCTATCA	GAACATAGTG	CATTCAAAG	TCTAGCCTGA
9241	GAGAACAACC	CAGTTTTATT	CATTCCCTCT	ACTACCTCTC	TCATTCCCAC	TGTTTGTGTT
9301	CTCCCTCCCA	TTTTAATTGT	CTATCTAGTC	CAAACTAAGC	ACACGATCCA	GTCCACATTA
9361	AACAACATGT	TTTCACTTTA	AGTCAAATAC	AAGACACCTT	TAATATCAGC	CCTTGTTCAT

10

20

30

40

【表 6 0】

```

9421  AATCGTGCTT CTAGTGACTT AATGTACATG TCACACTGTA CTGTTGGGTT TTGTGCTCA
9481  TCATGAACAA TGTTGTGAAG GTATTAAGTG GAGAGTAAGC AGAATTAGAT TCCTCTAATG
9541  ATGCACACCC ACACTAAGAG CAGAAATAAT ATTAAAAATA GAAAAAAAAG TTTTACATGA
9601  GATTTCAAAT ACCCAGGTAT GAGCTGCAGT TTCTTCAAGT TAAAGCATCG AGGTTGTCAG
9661  TTACACTATT ACAGGAAACA TATGCAGAGT TTTTATTTTA GTATATTAGT TTTACACATAT
9721  GTGGAATTAC TATTAAACTA TTCTTTCTTT TCAAATGCTT ACCATTGTAA ATGAGTTTGT
9781  GACTTTGTGT AGGTGAGTGC ACATGACTCT GGATGCCATA GAGGACTGAA GAAGTTGAG
9841  TTATAGGTAG TTTTATTTCTA CTTGACTGTT CAGTGCTAAA AATACAACTG AGGTCCCTTA
9901  AACTGCTGTT CATGAACCTC TTAATTGATA TATCTCATGA GATCTCTAAA CTATTTTAT
9961  TATGACACGT TTCACCATT TCACTGTAAC GATTTTATG TTTTATATTA ATGTAACAT
10021 ATGACACTTC CCAAAATCCC CATATTACAA ATTGAACTGT TTCAAAGTTT TACCTTGACT
10081 TATGGGAAAT GAAAACCCAC ATTTTATAAT TTTAAATGA AATGTTTATT TTATATTTCT
10141 GCAAATTTCA CAAGGAAAGA TTAGTCACCTG GTGTGTGAGA GCAGAGGAGC ATAAGAGTTC
10201 AGGAATAGAA TCCATTATGA TTCTGGAGGC AAGGAAGAAC TGATGCCAAG GTTTCAGTAT
10261 AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAAGT CACTACATCT GAGCACAGAG CAGGACATCT
10321 ACATAATGAG TGGTCACTAA TGGGCCACTG TTACACTGTT ATATGTATAA GGCTCAAGAA
10381 TGAGCACTGA GGCTGTAAAG TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAAACC CAGCTCAGGT
10441 AGAGGACTCA GAGGACAGCA CAGTCAGCAT GAACATAATA ACATCAGATA AGATAAGGCA
10501 CAAGCTCAGC TATATAGGGT AAGGGATCTT TGTAAATCTG ATTGTGCATC CAGTCTAGTT
10561 CAATGTGACT TAGGAAGCCC AGTCATATGC AAATCTAGAG AAGACTTTAG AGTAGAAATC
10621 TGAGGCTCAC CTCACATACC AGCAAGCGAG TGACCAGTTA GTCTTAAGGC ACCACTTCTT
10681 AGACATCATG GCTTGGGTGT GGACCTTGCC ATTCCTGATG GCAGCTGCCC AAAGTAAGAC
10741 ATCAGAAAAA AGAGTTCCAA GGGGAATTGA AGCAGTTCCA TGAATACTCA CCTTCTGTG
10801 TTCTTTTCAC AGGTGTCCAG GCACAGGTGC AGCTGGTGGG GTCAGGAGCC GAAGTGAAAA
10861 AGCCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCTTGCA AGGCCTCTGG ATACACATTC ACTAATTATA
10921 TTATCCACTG GGTGAAGCAG GAGCCTGGTC AGGGCCTTGA ATGGATTGGA TATTTTAATC
10981 CTTACAATCA TGGTACTAAG TACAATGAGA AGTTCAAAGG CAGGGCCACA CTAAGTCAG
11041 ACAAATCCAT CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT GCGCTCTGAG GACACTGCGG
11101 TCTACTACTG TGCAAGATCA GGACCCATAT CCTGGTTTGA CACCTGGGGC CAAGGGACCA
11161 CGGTACCGT CTCCTCAGGT AAGAATGGCC ACTCTAGGGC CTTTGTTTTC TGCTGCTGCC
11221 TGTGGGATTT CATGAGCAAT GCAAAGTTGT CCTCGGGACA TGTTCCGAGG GGACCTGGGC
11281 GGAAGTGGCA GGAGGGGACG GGAAGTGGG TGCCTTGAGG ATCTGGGAGC CTCTGTGGAT
11341 TTTCCGATGC CTTTGGAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGCG TCTGAGACAG TAACTCAGCC
11401 TGGGGGCTTG GTGAAGATCG CCGCACAGCA GCGAGTCCGT GAAATATCTT ATTTAGACTT
11461 GTGAGGTGCG CTGTGTGTCA ATTTACATCT TAAATCCTT ATTGGCTGGA AAGAGAATTG
11521 TTGGAGTGGG TGAATCCAGC CAGGAGGGAC GCGGGGGGAT CCA

```

10

20

30

40

【 0 1 7 5 】

配列番号 : 3 9

発現ベクター L C V L 2 S p 2 0 のヌクレオチド配列

【表 6 1】

```

1      CTAGAGTCCT AGAGAGGTCT GGTGGAGCCT GCAAPAGTCC AGCTTTCAAA
51     GGAACACAGA AGTATGTGTA TGGAAATATA GAAGATGTTG CTTTACTCT

```

【表 6 2】

101	TAAAGTTGGTT	CCTAGGAAAA	ATAGTTAAAT	ACTGTGACTT	TAAATGTGA
151	GAGGGTTTTTC	AAGTACTCAT	TTTTTTAAAT	GTCCAAAATT	TTTGTCAATC
201	AATTTGAGGT	CTTGTTTTGT	TAGAACTGAC	ATTACTTAAA	GTTTAACCGA
251	GGAATGGGAG	TGAGGCTCTC	TCATACCCTA	TTCAGAACTG	ACTTTTAACA
301	ATAATAAATT	AAGTTTAAAA	TATTTTAAAA	TGAATTGAGC	AATGTTGAGT
351	TGGAGTCAAG	ATGGCCGATC	AGAACCAGAA	CACCTGCAGC	AGCTGGCAGG
401	AAGCAGGTCA	TGTGGCAAGG	CTATTTGGGG	AAGGGAAAAAT	AAAACCACTA
451	GGTAAACTTG	TAGCTGTGGT	TTGAAGAAAT	GGTTTTGAAA	CACTCTGTCC
501	AGCCCCACCA	AACCGAAAGT	CCAGGCTGAG	CAAAACACCA	CCTGGGTAAAT
551	TTGCATTTCT	AAAATAAGTT	GAGGATTCAG	CCGAAACTGG	AGAAGTCTCT
601	TTTTAACTTA	TTGAGTTCAA	CCTTTTAATT	TTAGCTTGAG	TAGTTCTAGT
651	TTCCCCAAAC	TTAAGTTTAT	CGACTTCTAA	AATGTATTTA	GAATCATTTT
701	TCAAAATTAG	GTTATGTAAG	AAATTGAAGG	ACTTTAGTGT	CTTTAATTTC
751	TAATATATTT	AGAAAACTTC	TTAAAAATTAC	TCTATTATTC	TTCCCTCTGA
801	TTATTGGTCT	CCATTCAATT	CTTTTCCAAT	ACCCGAAGCA	TTTACAGTGA
851	CTTTGTTCAT	GATCTTTTTT	AGTTGTTTGT	TTTGCCCTTAC	TATTAAGACT
901	TTGACATTCCT	GGTCAAAACG	GCTTCACAAA	TCTTTTTTCAA	GACCACTTTC
951	TGAGTATTCA	TTTTAGGAGA	AATACTTTTT	TTTTAAATGA	ATGCAATTAT
1001	CTAGGACCTG	CAGGCATGCT	GTTTTCTGTC	TGTCCCTAAC	ATGCCCTGTC
1051	ATTATCCGCA	AACAACACAC	CCAAGGGCAG	AACTTTGTTA	CTTAAACACC
1101	ATCCTGTGTTG	CTTCTTTTCT	CAGGAATGCT	GGCTGCACCA	TCTGTCTTCA
1151	TCTTCCCCGCC	ATCTGATGAG	CAGTTGAAAT	CTGGAAGTGC	CTCTGTTGTG
1201	TGCCCTGCTGA	ATAACTTTCTA	TCCCAGAGAG	GCCAAAGTAC	AGTGAAGGT
1251	GGATAACGCC	CTCCAATCGG	GTAACCTCCA	GGAGAGTGTC	ACAGAGCAGG
1301	ACAGCAAGGA	CAGCACCTAC	AGCCTCAGCA	GCACCCCTGAC	GCTGAGCAAA
1351	GCAGACTACG	AGAAACACAA	AGTCTACGCC	TCCGAAGTCA	CCCATCAGGG
1401	CCTGAGCTCG	CCCCTCACAA	AGAGCTTCAA	CAGGGGAGAG	TGTTAGAGGG
1451	AGAAGTGCCC	CCACCTGCTC	CTCAGTTCCA	GCCTGACCCC	CTCCCATCCT
1501	TTGGCCTCTG	ACCCTTTTTTC	CACAGGGGAC	CTACCCCTAT	TGCGGTCCTC
1551	CAGCTCATCT	TTCACTTCAC	CCCCCTCCTC	CTCCTTGGCT	TTAATTATGC
1601	TAATGTTGGA	GGAGAATGAA	TAAATAAAGT	GAATCTTTGC	ACCTGTGGTT
1651	TCTCTCTTTT	CTCATTTAAT	AATTATTATC	TGTTGTTTTA	CCAACTACTC
1701	AATTTCTCTT	ATAAGGGACT	AAATATGTAG	TCATCCTAAG	GCGGGATATC
1751	GAGATCTGAA	GCTGATCCAG	ACATGATAAG	ATACATTGAT	GAGTTTGGAC
1801	AAACCACAAC	TAGAATGCAG	TGAAAAAAT	GCTTTATTTG	TGAAATTTGT
1851	GATGCTATTT	CTTTATTTGT	AACCATTATA	AGCTGCAATA	AACAAGTTAA
1901	CAACAACAAT	TGCATTCAAT	TTATGTTTCA	GGTTCAGGGG	GAGGTGTGGG
1951	AGGTTTTTTTA	AAGCAAGTAA	AACCTCTACA	AATGTGGTAT	GGCTGATTAT
2001	GATCTCTAGT	CAAGGCACTA	TACATCAAAT	ATCCTTATTT	AACCCCTTTA
2051	CAAATTAAAA	AGCTAAAGGT	ACACAATTTT	TGAGCATAGT	TATTAATAGC
2101	AGACACTCTA	TGCCCTGTGT	GAGTAAGAAA	AAACAGTATG	TTATGATTAT

10

20

30

40

【表 6 3】

2151	AACTGTTATG	CCTACTTATA	AAGGTTACAG	AATATTTTTC	CATAATTTTC
2201	TTGTATAGCA	GTGCAGCTTT	TTCTTTGTG	GTGTAAATAG	CAAAGCAAGC
2251	AAGAGTTCTA	TTACTAAACA	CAGCATGACT	CAAAAACTT	AGCAATTCTG
2301	AAGGAAAGTC	CTTGGGGTCT	TCTACCTTTC	TCTTCTTTT	TGGAGGAGTA
2351	GAATGTTGAG	AGTCAGCAGT	AGCCTCATCA	TCACTAGATG	GCATTTCTTC
2401	TGAGCAAAAC	AGGTTTTTCT	CATTAAAGGC	ATTCCACCAC	TGCTCCCAT
2451	CATCAGTTCC	ATAGGTTGGA	ATCTAAAATA	CACAAACAAT	TAGAATCAGT
2501	AGTTTAACAC	ATTATACACT	TAAAAATTTT	ATATTTACCT	TAGAGCTTTA
2551	AATCTCTGTA	GGTAGTTTGT	CCAATTATGT	CACACCACAG	AAGTAAGGTT
2601	CCTTCACAAA	GATCCGGACC	AAAGCGGCCA	TGCTGCCTCC	CCACTCCTGC
2651	AGTTCGGGGG	CATGGATGCG	CGGATAGCCG	CTGCTGGTTT	CCTGGATGCC
2701	GACGGATTTG	CACTGCCGGT	AGAACTCCGC	GAGGTGCTCC	AGCCTCAGGC
2751	AGCAGCTGAA	CCAACTCGCG	AGGGGATCGA	GCATCCCCCA	TGGTCTTATA
2801	AAAATGCATA	GCTTTAGGAG	GGGAGCAGAG	AACTTGAAAG	CATCTTCCTG
2851	TTAGTCTTTC	TTCTCGTAGA	CTTCAAACCT	ATACTTGATG	CCTTTTTCCT
2901	CCTGGACCTC	AGAGAGGACG	CCTGGGTATT	CTGGGAGAAG	TTTATATTTC
2951	CCCAAATCAA	TTTCTGGGAA	AAACGTGTCA	CTTTCAAATT	CCTGCATGAT
3001	CCTTGTACAA	AAGAGTCTGA	GGTGGCCTGG	TTGATTGATG	GCTTCCTGGT
3051	AAACAGAACT	GCCTCCGACT	ATCCAAACCA	TGTCTACTTT	ACTTGCCAAT
3101	TCCGGTTGTT	CAATAAGTCT	TAAGGCATCA	TCCAAACTTT	TGGCAAGAAA
3151	ATGAGCTCCT	CGTGGTGGTT	CTTTGAGTTC	TCTACTGAGA	ACTATATTAA
3201	TTCTGTCTCT	TAAAGGTCGA	TTCTTCTCAG	GAATGGAGAA	CCAGGTTTTT
3251	CTACCCATAA	TCACCAGATT	CTGTTTACCT	TCCACTGAAG	AGGTTGTGGT
3301	CATTCTTTGG	AAGTACTTGA	ACTCGTTTCT	GAGCGGAGGC	CAGGGTCGGT
3351	CTCCGTTCTT	GCCAATCCCC	ATATTTTGGG	ACACGGCGAC	GATGCAGTTC
3401	AATGGTCGAA	CCATGATGGC	AGCGGGGATA	AAATCCTACC	AGCCTTCACG
3451	CTAGGATTGC	CGTCAAGTTT	GGGGGTACCG	AGCTCGAATT	AGCTTTTTCG
3501	AAAAGCCTAG	GCCTCCAAAA	AAGCCTCCTC	ACTACTTCTG	GAATAGCTCA
3551	GAGGGCCGAG	GCGGCCTCGG	CCTCTGCATA	AATAAAAAAA	ATTAGTCAGC
3601	CATGGGGCGG	AGAATGGGCG	GAACTGGGCG	GAGTTAGGGG	CGGGATGGGC
3651	GGAGTTAGGG	GCGGGACTAT	GTTTCTGAC	TAATTGAGAT	GCATGCTTTG
3701	CATACTTCTG	CCTGCTGGGG	AGCCTGGGGA	CTTTCCACAC	CTGGTTGCTG
3751	ACTAATTGAG	ATGCATGCTT	TGCATACTTC	TGCCTGCTGG	GGAGCCTGGG
3801	GACTTTCCAC	ACCCTAACTG	ACACACATTC	CACAGCTGCC	TGCGCGGTTT
3851	CGGTGATGAC	GGTGAAAACC	TCTGACACAT	GCAGCTCCCG	GAGACGGTCA
3901	CAGCTTGTCT	GTAAGCGGAT	GCCGGGAGCA	GACAAGCCCC	TCAGGGCGCG
3951	TCAGCGGGTG	TTGGCGGGTG	TCGGGGCGCA	GCCATGACCC	AGTCACGTA
4001	CGATAGCGGA	GTGTATACTG	GCTTAACTAT	GCGGCATCAG	AGCAGATTGT
4051	ACTGAGAGTG	CACCATATGC	GGCCGCATAT	GCGGTGTGAA	ATACCGCACA
4101	GATGCGTAAG	GAGAAAATAC	CSCATCAGGC	GCTCTTCCGC	TTCTCGCTC
4151	ACTGACTCGC	TGCGCTCGGT	CGTTCGGCTG	CGGCGAGCGG	TATCAGCTCA

10

20

30

40

【表 6 4】

4201	CTCAAAGGCG	GTAATACGGT	TATCCACAGA	ATCAGGGGAT	AACGCAGGAA
4251	AGAACATGTG	AGCAAAAGGC	CAGCAAAAGG	CCAGGAACCG	TAAAAAGGCC
4301	GCGTTGCTGG	CGTTTTTCCA	TAGGCTCCGC	CCCCCTGACG	AGCATCACAA
4351	AAATCGACGC	TCAAGTCAGA	GGTGGCGGAA	CCCCACAGGA	CTATAAAGAT
4401	ACCAGGCGTT	TCCCCCTGGA	AGCTCCCTCG	TGCGCTCTCC	TGTTCCGACC
4451	CTGCCGCTTA	CCGGATACCT	GTCCGCCTTT	CTCCCTTCGG	GAAGCGTGCC
4501	GCTTTCTCAT	AGCTCACGCT	GTAGGTATCT	CAGTTCGGTG	TAGGTGCTTC
4551	GCTCCAAGCT	GGGCTGTGTG	CACGAACCCC	CCGTTACGCC	CGACCGCTGC
4601	GCCTTATCCG	GTAACATATCG	TCTTGAGTCC	AACCCGGTAA	GACACGACTT
4651	ATCGCCACTG	GCAGCAGCCA	CTGGTAACAG	GATTAGCAGA	GCGAGGTATG
4701	TAGGCGGTGC	TACAGAGTTC	TTGAAGTGGT	GGCCTAACTA	CGGCTACACT
4751	AGAAGGACAG	TATTTGGTAT	CTGCGCTCTG	CTGAAGCCAG	TTACCTTCGG
4801	AAAAAGAGTT	GGTAGCTCTT	GATCCGCGCA	ACAAACCACC	GCTGGTAGCG
4851	GTGGTTTTTT	TGTTTGCAAG	CAGCAGATTA	CGCGCAGAAA	AAAAGGATCT
4901	CAAGAAGATC	CTTTGATCTT	TTCTACGGGG	TCTGACGCTC	AGTGGAACGA
4951	AAACTCACGT	TAAGGGATTT	TGGTCATGAG	ATTATCAAAA	AGGATCTTCA
5001	CCTAGATCCT	TTTAAATTAA	AAATGAAGTT	TTAAATCAAT	CTAAAGTATA
5051	TATGAGTAAA	CTTGGTCTGA	CAGTTACCAA	TGCTTAATCA	GTGAGGCACC
5101	TATCTCAGCG	ATCTGTCTAT	TTGTTTCATC	CATAGTTGCC	TGACTCCCCG
5151	TCGTGTAGAT	AACTACGATA	CGGGAGGGCT	TACCATCTGG	CCCCAGTGCT
5201	GCAATGATAC	CCCGAGACCC	ACGCTCACC	GCTCCAGATT	TATCAGCAAT
5251	AAACCAGCCA	GCCGGAAGGG	CCGAGCGCAG	AAGTGGTCCT	GCAACTTTAT
5301	CCGCCTCCAT	CCAGTCTATT	AATTGTTGCC	GGGAAGCTAG	AGTAAGTAGT
5351	TCGCCAGTTA	ATAGTTTGCG	CAACGTTGTT	GCCATTGCTG	CAGGCATCGT
5401	GGTGTACGCG	TCGTGTTTTG	GTATGGCTTC	ATTGAGCTCC	GGTTCCCAAC
5451	GATCAAGGCG	AGTTACATGA	TCCCCCATGT	TGTGCAAAAA	AGCGGTTAGC
5501	TCCTTCGGTC	CTCCGATCGT	TGTCAGAAAGT	AAGTTGGCCG	CAGTGTATTC
5551	ACTCATGGTT	ATGCCAGCAC	TGCATAATTC	TCTTACTGTC	ATGCCATCCG
5601	TAAGATGCTT	TTCTGTGACT	GGTGAGTACT	CAACCAAGTC	ATTCTGAGAA
5651	TAGTGTATGC	GGCGACCGAG	TTGCTCTTGC	CCGGCGTCAA	CACGGGATAA
5701	TACCGCGCCA	CATAGCAGAA	CTTTAAAAGT	GCTCATCATT	GGAAAACGTT
5751	CTTCGGGGCG	AAAACCTCTCA	AGGATCTTAC	CGCTGTTGAG	ATCCAGTTCC
5801	ATGTAACCCA	CTCGTGACCC	CAACTGATCT	TCAGCATCTT	TTACTTTTCAC
5851	CAGCGTTTTCT	GGGTGAGCAA	AAACAGGAAG	GCAAAATGCC	GCAAAAAAGG
5901	GAATAAGGGC	GACACGGAAA	TGTTGAATAC	TCATACTCTT	CCTTTTTCAA
5951	TATTATTGAA	GCATTTATCA	GGGTTATTGT	CTCATGAGCG	GATACATATT
6001	TGAATGTATT	TAGAAAAATA	AACAAATAGG	GGTCCGCGC	ACATTTCCCC
6051	GAAAAGTGCC	ACCTGACGTC	TAAGAAACCA	TTATTATCAT	GACATTAACC
6101	TATAAAAAATA	GGCGTATCAC	GAGGCCCTTT	CGTCTTCAAG	AATTCAGCTG
6151	CTCGAGGAAG	AGCTCAAACC	CATGCTACTC	TCTGGCTTGA	TGGAAGCAAC
6201	GCTTTTCATAG	CTGAGCTGTC	ATAAATAATA	AAGAGATTTT	TTTATTATAA

10

20

30

40

【表 6 5】

6251	TTGAAAAGAT	GGGTTATTTA	TGTAAGACTC	TGTCCTCATT	TTAAAAACCA	
6301	CACCTTCCAG	TAGTATTCTG	TTACTGTTCT	GGCAATCACT	GTGATCAAGA	
6351	AGCTACACGG	TGAGTTGTGC	TTCTCAGTCC	TAAGGGATAC	ATCTACAAGA	
6401	GGCTCCCAT	CTCGAAGCTC	AGGAAACATT	GTAGAAAAGG	AGGCAAAAGA	
6451	CTGACAGAGC	CAGAGGACCA	AGAAATTTGT	TGTGAGGTTG	TGTCTCCTAC	
6501	TAACAATATA	AGCAATATCT	ATAAATTGTT	GATATCATGG	CTACTAAAT	
6551	GTGAGTTGAA	CGAGGAGGAC	ACAAATGAAC	ATGACAATCA	GAATGAGGCC	
6601	TCTCACCTGC	AAAAAACACT	ATAGAGAAGC	AGATAAAGCT	GTCAGCAGAA	10
6651	GAGGUGCACC	TCCTTATAGA	AGAAGCCTAC	CAGGTTTGAT	ATATCAGCCT	
6701	TGAAAACCTA	CATAGTATTT	ACATTATATC	GAGTCTATGA	GACATATTTA	
6751	GTAATGCATA	TGTATGTGTG	TGTGTGCTTG	TATGTGTGTA	AATACATATG	
6801	TTCATAGAAA	AATGTGTAAA	AAGAGATCAT	GAATTTAAGA	GAGAAGCTGGG	
6851	ACAATTTTTT	TCAGGGAGTT	GTAATCAGGA	AAGTTAAGGG	AAAAATGTTG	
6901	TAATTTAAAT	TCAGGCTCAG	AAACAAACAA	AGGAAAAGAA	AAAAAAACAA	
6951	CAACAACAAC	AAAAAAACAA	AACAAAGGAG	AAGCTGTATG	GCCACAATAG	
7001	CATCTACAGC	TAACTGTGAA	AGGATAATGG	AACAAGTTAT	GTACTGCCTA	
7051	GAGCAGTATG	ATGCTTAAAT	CATCTCERCA	TGGAGGAAAA	TAGAACAAAG	
7101	ACACTCTACA	TAGACTATGA	TAGAAATCAA	AATAAGGTGT	AAGACATAGA	20
7151	ACATTAGTTT	TGTTTGTTGT	TCAAAGAGAC	TCACATTCCC	ACAAAAAAT	
7201	CTGTGGGATT	TTACAGGTCT	GCAATAAGCT	GCTGACCTGA	TGATTTCTGC	
7251	AGCTGTGCCT	ACCCTTTGCT	GATTTGCATG	TACCCAAAGC	ATAGCTTACT	
7301	GACATGAGGA	TTCTTCATA	GTCAGGTCAC	ACCCTTTGCT	GGAGTCAGAA	
7351	TCACACTGAT	CACACACAGT	CATGAGTGTG	CTCACTCAGG	TCCGGCGTT	
7401	GCTGCTGCTG	TGGCTTACAG	GTAATGAAGA	CAGCACTAGA	ATTTTATTGA	
7451	GCTTCTGTGA	CACTGTGCTG	CTTGTCTCTG	TGAAAATTCT	CTTGTGAATT	
7501	AATCATGTGG	GGATCTGTTT	TCAATTTTTC	AATTGTAGGT	ACGCGTTGTG	
7551	ACATTCTGCT	GACCCAGTCT	CCAGCCACCC	TGTCTCTGAG	TCCAGGAGAA	30
7601	AGAGCCACTT	TCTCTGCGAG	GGCCAGTCAG	AACATTGGCA	CAAGCATACA	
7651	GTGGTATCAA	CAAAAAACAA	ATGGTGTCTC	AAGGCTTCTC	ATAAGGTCTT	
7701	CTTCTGAGTC	TATCTCTGGG	ATCCCTTCCA	GGTTTAGTGG	CAGTGGATCA	
7751	GGGACAGATT	TTACTCTTAC	CATCAGCAGT	CTGGAGCCTG	AAGATTTTGC	
7801	AGTGTATTAC	TGTCAACAAA	GTAATACCTG	GCCATTCAAG	TTGGGCCAGG	
7851	GGACCAAGCT	TGAAATCAAA	CGTAAGTAGA	ATCCAAAGTC	TCTTTCTTCC	
7901	GTTGTCTATG	TCTGTGGCTT	CTATGTCTAA	AAATGATGTA	TAAATCTTA	
7951	CTCTGAAACC	AGATTCTGGC	ACTCTCCAAG	GCAAGGATAC	AGAGTAACTC	
8001	CGTAAGCAAA	GCTGGGAATA	GGCTAGACAT	GTTCTCTGGA	GAATGAATGC	
8051	CAGTGTAATA	ATTAAACAAA	GTGATAGTTT	CAGAAATGCT	CTAGTT	40

【 0 1 7 6 】

配列番号：40

発現ベクターHCVESp20のヌクレオチド配列

【表 6 6】

1	CTAGAGAGGT	CTGGTGGAGC	CTGCAAAAGT	CCAGCTTTCA	AAGGAACACA
51	GAAGTATGTG	TATGGAATAT	TAGAAGATGT	TGCTTTTACT	CTTAAGTTGG
101	TTCTTAGGAA	AAATAGTTAA	ATACTGTGAC	TTTAAAATGT	GAGAGGGTTT
151	TCAAGTACTC	ATTTTTTTAA	ATGTCCAAA	TTTGTGCAA	TCAATTTGAG
201	GTCTTGTGTTG	TGTAGAACTG	ACATTACTTA	AAGTTTAACC	GAGGAATGGG
251	AGTGAGGCTC	TCTCATACCC	TATTCAGAAC	TGACTTTTAA	CAATAATAAA
301	TTAAGTTTAA	AATATTTTAA	AATGAATTGA	GCAATGTTGA	GTTGGAGTCA
351	AGATGGCCGA	TCAGAACCAG	AACACCTGCA	GCAGCTGGCA	GGAAGCAGGT
401	CATGTGGCAA	GGCTATTTGG	GGAAGGGAAA	ATAAAACCAC	TAGGTAAACT
451	TGTAGCTGTG	GTTTGAAGAA	GTGGTTTTGA	AACACTCTGT	CCAGCCCCAC
501	CAAAACGAAA	GTCCAGGCTG	AGCAAAACAC	CACCTGGGTA	ATTTGCATTT
551	CTAAAATAAG	TTGAGGATTC	AGCCGAAACT	GGAGAGGTCC	TCTTTTAACT
601	TATTGAGTTC	AACCTTTTAA	TTTTAGCTTG	AGTAGTTCTA	GTTTCCCCAA
651	ACTTAAGTTT	ATCGACTTCT	AAAATGTATT	TAAGCTTTCT	GGGGCAGGCC
701	AGGCTTGACC	TTGGCTTTGG	GGCAGGGAGG	GGGCTAAGGT	GAGGCAGGTG
751	GCGCCAGCCA	GGTGACACCC	CAATGCCCAT	GAGCCAGAC	ACTGGACGCT
801	GAACCTCGCG	GACAGTTAAG	AACCCAGGGG	CCTCTGCGCC	CTGGGCCAG
851	CTCTGTCCCA	CACCGCGGTC	ACATGGCACC	ACCTCTCTTG	CAGCCTCCAC
901	CAAGGGCCCA	TGGTCTTCC	CCCTGGCACC	CTCCTCCAAG	AGCACCTCTG
951	GGGGCACAGC	GGCCCTGGGC	TGCCTGGTCA	AGGACTACTT	CCCCGAACCG
1001	GTGACGGTGT	CGTGGAACTC	AGGCGCCCTG	ACCAGCGGCG	TGCACACCTT
1051	CCCGGCTGTC	CTACAGTCCT	CAGGACTCTA	CTCCCTCAGC	AGCGTGGTGA
1101	CGGTGCCCTC	CAGCAGCTTG	GGCACCCAGA	CCTACATCTG	CAACGTGAAT
1151	CACAAGCCCA	GCAACACCAA	GGTGGACAAG	AGAGTTGGTG	AGAGGCCAGC
1201	ACAGGGAGGG	AGGGTGTCTG	CTGGAAGCCA	GGCTCAGCGC	TCCTGCCTGG
1251	ACGCATCCCG	GCTATGCAGT	CCCAGTCCAG	GGCAGCAAGG	CAGGCCCCGT
1301	CTGCCTCTTC	ACCCGAGGGC	CTCTGCCCCG	CCCACTCATG	CTCAGGGAGA
1351	GGGTCTTCTG	GCTTTTTCOC	CAGGCTCTGG	GCAGGCACAG	GCTAGGTGCC
1401	CCTAACCCAG	GCCCTGCACA	CAAAGGGGCA	GGTGTGGGGC	TCAGACCTGC
1451	CAAGAGCCAT	ATCCGGGAGG	ACCCTGCCCC	TGACCTAAGC	CCACCCCAA
1501	GGCCAAACTC	TCCACTCCCT	CAGCTCGGAC	ACCTTCTCTC	CTCCAGATT
1551	CCAGTAACTC	CCAATCTTCT	CTCTGCAGAG	CCCAAATCTT	GTGACAAAAC
1601	TCACACATGC	CCACCGTGCC	CAGGTAAGCC	AGCCCAGGCC	TCGCCCTCCA
1651	GCTCAAGGCG	GGACAGGTGC	CCTAGAGTAG	CCTGCATCCA	GGGACAGGCC
1701	CCAGCCGGGT	GCTGACACGT	CCACCTCCAT	CTCTTCTCTA	GCACCTGAAC
1751	TCCTGGGGGG	ACCGTCAGTC	TTCTCTTCC	CCCCAAAACC	CAAGGACACC
1801	CTCATGATCT	CCCGGACCCC	TGAGGTCACA	TGCGTGGTGG	TGGACGTGAG
1851	CCACGAAGAC	CCTGAGGTCA	AGTTCAACTG	GTACGTGGAC	GGCGTGGAGG
1901	TGCATAATGC	CAAGACAAAG	CCGCGGGAGG	AGCAGTACAA	CAGCACGTAC

10

20

30

40

【表 6 7】

1951	CCTGTGCTCA	GCGTCTTCAC	CGTCTTCAC	CAGGACTGGC	TGARTGGCAA
2001	GGAGTACAAG	TGCAAGGTCT	CCAACAAAGC	CCTCCAGCC	CCCATCGAGA
2051	AAACCATCTC	CAAGGCCAAA	GGTGGGACCC	GTGGGGTGCG	AGGGCCACAT
2101	GGACAGAGGC	CGGCTCGGCC	CACCCCTCTGC	CCTGAGAGTG	ACCGCTGTAC
2151	CAACCTCTGT	CCCTACAGGG	CAGCCCCGAG	AACCACAGGT	GTACACCCTG
2201	CCCCCATCCC	GGGAGGAGAT	GACCAAGAAC	CAGGTCAGCC	TGACCTGCCT
2251	GGTCAAAGGC	TTCTATCCCA	GCGACATCGC	CGTGGAGTGG	GAGAGCAATG
2301	GGCAGCCGGA	GAACAACTAC	AAGACCACGC	CTCCCGTGCT	GGACTCCGAC
2351	GGCTCCTTCT	TCCTCTATAG	CAAGCTCACC	GTGGACAAGA	GCAGGTGGCA
2401	GCAGGGGAAC	GTCTTCTCAT	GCTCCGTGAT	GCATGAGGCT	CTGCACAACC
2451	ACTACACGCA	GAGAGCCCTC	TCCCTGTCCC	CGGGTAAATG	AGTGGACGCG
2501	CCGGCAAGCC	CCCGCTCCCC	GGGCTCTCGC	GGTCGCACGA	GGATGCTTGG
2551	CACGTACCCC	GTCTACATAC	TTCCCAGGCA	CCCAGCATGG	AAATAAAGCA
2601	CCCACCACTG	CCCTGGGCCC	CTGCGAGACT	GTGATGGTTC	TTTCCACGGG
2651	TCAGGCCGAG	TCTGAGGCCT	GAGTGGCATG	AGGGAGCCAG	AGCGGCTCCC
2701	ACTGTCCCCA	CACTGGCCCA	GGCTGTGCAG	GTGTGCCTGG	GCCGCCTAGG
2751	GTGGGGCTCA	GCCAGGGGCT	GCCCTCGGCA	GGTGGGGGA	TTTGCCAGCG
2801	TGGCCCTCCC	TCCAGCAACA	GCTGCCCTGG	GCTGGGCCAC	GAGAAGCCCT
2851	AGGAGCCCCCT	GGGACAGAC	ACACAGCCCC	TGCCTCTGTA	GGAGACTGTC
2901	CTGTCTCTGT	AGCGCCCTGT	CCTCCGACCC	CGATGCCCAC	TCGGGGGCAT
2951	GCCTAGTCCA	TGCGCGTAGG	GACAGGCCCT	CCCTCACCCA	TCTACCCCCA
3001	CGGCACTAAC	CCCTGGCAGC	CCTGCCCAGC	CTCGCACCCG	CATGGGGACA
3051	CAACCGACTC	CGGGGACATG	CACTCTCGGG	CCCTGTGGAG	GGACTGGTGC
3101	AGATGCCCCAC	ACACACACTC	AGCCCAGACC	CGTTCAACAA	ACCCCGCACT
3151	GAGGTGTGTC	GAGCGGGAGT	GCGGCCAGAG	CCTGCCTCGG	CCGTCAAGGA
3201	GGACTCCCGG	GCTCACTCGA	AGGAGGTGCC	ACCATTTTCAG	CTTTGGTAGC
3251	TTTTCTTCTT	CTTTTAAATT	TTCTAAAGCT	CATTAAATTGT	CTTTGATGTT
3301	TCTTTTGTGA	TGACAATAAA	ATATCCTTTT	TAAGTCTTGT	ACTTCGTGAT
3351	GGGAGCCGCC	TTCTGTGTGC	CACGCGCCTC	CTGCCCCCGG	TGGGAAGCAC
3401	GGTCAGGAGG	AGGCTGGTCC	AGCTGCACCT	CGGGGGCTCC	CTGCACTCGC
3451	CCCCCGCCTC	CTGCAGCCAC	ACGCATTGCC	CGAGCGACCC	TCCCTGGCCC
3501	CTGTCACTAC	ATGGACCCCT	GGGGCTTCTC	CTCTTTTCTA	CATGGATGCA
3551	GTTTCTCCTC	CTGCTGGGCA	CGGTGCTGCC	TGCCCTGGTC	ACTCTGCGGG
3601	GGACAGGGCC	TCCAGGGAPA	GCTGGGTCCA	GGCTGGGAGC	TGGCTCAGGC
3651	TGCCCAGGCA	GAGCCACAGG	GAGGGCCTTC	CAGAACCAAC	CATGGTCCGA
3701	AGCGAGAGGT	GGGTGTCAGA	TCCAGACATG	ATAAGATACA	TTGATGAGTT
3751	TGGACAAACC	ACAAC TAGAA	TGCAGTGAAA	AAAATGCTTT	ATTTGTGAAA
3801	TTTGTGATGC	TATTGCTTTA	TTTGTAACCA	TTATAGCTG	CAATAAACAA
3851	GTTAACBACA	ACAATTGCAT	TCATTTTATG	TTTCAGSTTC	AGGGGGAGGT
3901	GTGGGAGGTT	TTTTAAGCA	AGTAAACCT	CTACAAATGT	GGTATGGCTG
3951	ATTATGATCT	CTAGTCAAGG	CACTATACAT	CAAATAFTCC	TTATTAACCC

10

20

30

40

【表 6 8】

```

4001 CTTTACAAAT TAAAAAGCTA AAGGTACACA ATTTTGTAGC ATAGTTATTA
4051 ATAGCAGACA CTCTATGCCT GTGTGGAGTA AGAAAAACA GTATGTTATG
4101 ATTATAACTG TTATGCCTAC TTATAAAGGT TACAGAATAT TTTTCCATAA
4151 TTTTCTTGTA TAGCAGTGCA GCTTTTTCCT TTGTGGTGTA AATAGCAAAG
4201 CAAGCAAGAG TTCTATTACT AAACACAGCA TGACTCAAAA AACTTAGCAA
4251 TTCTGAAGGA AAGTCCTTGG GGTCTTCTAC CTTTCTCTTC TTTTGTGGAG
4301 GAGTAGAATG TTGAGAGTCA GCAGTAGCCT CATCATCACT AGATGGCATT
4351 TCTTCTGAGC AAAACAGGTT TTCCTCATTA AAGGCATTCC ACCACTGCTC
4401 CCATTCTATCA GTTCCATAGG TTGGAACTTA AAATACACAA ACAATTAGAA
4451 TCAGTAGTET AACACATTAT ACACTTAAAA ATTTTATATT TACCTTAGAG
4501 CTTTAAATCT CTGTAGGTAG TTTGTCCAAT TATGTACAC CACAGAAGTA
4551 AGGTTCTTTC ACAAAGATCC GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT
4601 CCTGCAGTTC GGGGGCATGG ATGCGCGGAT AGCCGCTGCT GGTTCCTGG
4651 ATGCCGACGG ATTTGCACTG CCGGTAGAAC TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT
4701 CAGGCAGCAG CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCG GGGTGGGCGA
4751 AGAACTCCAG CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCCGGCGTCC
4801 CGGAAAACGA TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CCGTGGAAATC
4851 GAAATCTCGT GATGGCAGGT TGGGCGTCGC TTGTCGGTC ATTTCCGAACC
4901 CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC
4951 GCTGCGAATC GGGAGCGGCG ATACCGTAAA GCACGAGGAA GCGGTGAGCC
5001 CATTCGCGGC CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGATAGCCA ACGCTATGTC
5051 CTGATAGCGG TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA
5101 AGCGGCCATP TTCCACCATG ATATTGGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTC
5151 ACGACGAGAT CCTCGCCGTC GGGCATGCGC GCTTGAGCC TGGCGAACAG
5201 TTCGGCTGSC GCGAGCCCCCT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA
5251 CAAGACCGGC TTCCATCGGA GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCGCT
5301 TGGTGGTCGA ATGGGCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA GCCGCCGCAT
5351 TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA
5401 GGAGATCCTG CCCCGGCACT TCGCCCAATA GCAGCCASTC CTTTCCCGCT
5451 TCAGTGACAA CGTCGAGCAC AGCTGGGCAA GGAACGCCCC TGGTGGCCAG
5501 CCACGATAGC CCGGCTGCCT CGTCTGCAG TTCATTGAGG GCACCGGACA
5551 GGTGCGTCTT GACAAAAAGA ACCGGGCGGC CTTGCGCTGA CAGCCGGAAC
5601 ACGGCGGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCAGT CATAGCCGAA
5651 TAGCCTCTCC ACCCAAGCGG CCGGAGAAC TCGGTGCAAT CCATCTTGTT
5701 CAATCATGCG AAACGATCCT CATCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC
5751 CTGCGCCATC AGATCCTTGG CGGCAAGAA GCCATCCAGT TTACTTTGCA
5801 GGGCTTCCCA ACCTTACCAG AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCCGGTTGCG
5851 TTGCTGTCCA TAAAACCGCC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCCACTG
5901 CAAGCTACCT GCTTCTCTT TCGGCTTGCG TTTTCCCTTG TCCAGATAGC
5951 CCAGTAGCTG ACATTGATCC GGGGTCAGCA CCGTTTCTGC GGAATGGCTT
6001 TCTACGTGTT CCGCTTCCTT TAGCAGCCCT TCGGCCCTGA GTGCTTGCGG

```

10

20

30

40

【表 6 9】

6051	CAGCGTGAAG	C'TTTTTCGAA	AAGCCTAGGC	CTCCAAAAAA	GCCTCCTCAC
6101	TACTTCTGGA	ATAGCTCAGA	GGCCGAGGCG	GCCTCCGCCT	CTGCATAAAT
6151	AAAAAAATT	AGTCAGCCAT	GGGGCGGAGA	ATGGGCGGAA	CTGGGCGGAG
6201	TTAGGGGCGG	GATGGGCGGA	GTTAGGGGCG	GGACTATGGT	TGCTGACTAA
6251	TTGAGATGCA	TGCTTTGCAT	ACTTCTGCCT	GCTGGGGAGC	CTGGGGACTT
6301	TCCACACCTG	GTTGCTGACT	AATTGAGATG	CATGCTTTGC	ATACTTCTGC
6351	CTGCTGGGGA	GCCTGGGGAC	TTCCACACCC	CTAACTGACA	CACATTCCAC
6401	AGCTGCCTCG	CGCGTTTCGG	TGATGACGGT	GAAAACCTCT	GACACATGCA
6451	GCTCCCGGAG	ACGGTCACAG	CTTGTCTGTA	AGCGGATGCC	GGGAGCAGAC
6501	AAGCCCGTCA	GGGCGCGTCA	GCGGGTGTTC	GCGGGTGTTC	GGGCGCAGCC
6551	ATGACCCAGT	CACGTAGCGA	TAGCGGAGTG	TATACTGGCT	TAACTATGCG
6601	GCATCAGAGC	AGATTGTACT	GAGAGTGAC	CATATGCGGT	GTGAAATACC
6651	GCACAGATGC	GTAAGGAGAA	AATACCGCAT	CAGGCGCTCT	TCCGCTTCCT
6701	CGCTCACTGA	CTCGCTGCGC	TCGGTCGTTT	GGCTGCGGCG	AGCGGTATCA
6751	GCTCACTCAA	AGGCGGTAAT	ACGGTTATCC	ACAGAATCAG	GGGATAACGC
6801	AGGAAAGAAC	ATGTGAGCAA	AAGGCCAGCA	AAAGGCCAGG	AACCGTAAAA
6851	AGGCGCGGTT	GCTGGCGTTT	TTCCATAGGC	TCCGCCCCCC	TGACGAGCAT
6901	CACAAAAATC	GACGCTCAAG	TCAGAGGTGG	CGAAACCGGA	CAGGACTATA
6951	AAGATACCAG	GCGTTTCCCC	CTGGAAGCTC	CCTCGTGCGC	TCTCCTGTTT
7001	CGACCCGTCC	GCTTACCGGA	TACCTGTCCG	CCTTTCTCCC	TTCGGGAAGC
7051	GTTGGCGCTT	CTCATAGCTC	ACGCTGTAGG	TATCTCAGTT	CGGTGTAGGT
7101	CGTTCTGCTC	AAGCTGGGCT	GTGTGCACGA	ACCCCCGTT	CAGCCCGACC
7151	GCTGCGCCTT	ATCCGGTAAC	TATCGTCTTG	AGTCCAACCC	GGTAAGACAC
7201	GACTTATCGC	CACTGGCAGC	AGCCACTGGT	AACAGGATTA	GCAGAGCGAG
7251	GTATGTAGGC	GGTGCTACAG	AGTTCTTGAA	GTGGTGGCCT	AACTACGGCT
7301	ACACTAGAAG	GACAGTATTT	GGTATCTGCG	CTCTGCTGAA	GCCAGTTACC
7351	TTCCGAAAAA	GAGTTGGTAG	CTCTTGATCC	GGCAAACAAA	CCACCGCTGG
7401	TAGCGGTGGT	TTTTTTGTTT	GCAAGCAGCA	GATTACGCGC	AGAAAAAAG
7451	GATCTCAAGA	AGATCCTTTG	ATCTTTTCTA	CGGGGTCTGA	CGCTCAGTGG
7501	AACGAAACT	CACGTTAAGG	GATTTTGGTC	ATGAGATTAT	CAAAAAAGAT
7551	CTTCACCTAG	ATCCTTTTAA	ATTAAAAATG	AAGTTTTTAA	TCAATCTAAA
7601	GTATATATGA	GTAAACTTGG	TCTGACAGTT	ACCAATGCTT	AATCAGTGAG
7651	GCACCTATCT	CAGCGATCTG	TCTATTCTGT	TCATCCATAG	TTGCCTGACT
7701	CCCCGTCTGT	TAGATAACTA	CGATACGGGA	GGGCTTACCA	TCTGGCCCCA
7751	GTGCTGCAAT	GATACCGCGA	GACCCACGCT	CACCGGCTCC	AGATTTATCA
7801	GCAATAAACC	AGCCAGCCGG	AAGGGCCGAG	CGCAGAAAGT	GTCTTGCAAC
7851	TTTATCCGCC	TCCATCCAGT	CTATTAAATG	TTGCCGGGAA	GCTAGAGTAA
7901	GTAGTTTCGCC	AGTTAATAGT	TTGCGCAACG	TTGTTGCCAT	TGCTGCAGGC
7951	ATCGTGGTGT	CACGCTCGTC	GTTTGGTATG	GCTTCATTCA	GCTCCGGTTC
8001	CCACGATCA	AGGCGAGTTA	CATGATCCCC	CATGTTGTGC	AAAAAAGCGG
8051	TTAGCTCCCT	CGGTCCCTCC	ATCGTTGTCA	GAAGTAAGTT	GGCCGCGAGT

10

20

30

40

【表 7 0】

8101	TTATCACTCA	TGGTTATGGC	AGCACTGCAT	AATTCTCTTA	CTGTCATGCC
8151	ATCCGTAAGA	TGCTTTTCTG	TGACTGGTGA	GTACTCAACC	AAGTCATTCT
8201	GAGAATAGTG	TATGCGGCGA	CCGAGTTGCT	CTTGCCCGGC	GTCAACACGG
8251	GATAATACCG	CGCCACATAG	CAGAACTTTA	AAAGTGCTCA	TCATTGGAAA
8301	ACGTTCTTCG	GGGCGAAAC	TCTCAAGGAT	CTTACCGCTG	TTGAGATCCA
8351	GTTTCGATGA	ACCCACTCGT	GCACCCAACT	GATCTTCAGC	ATCTTTTACT
8401	TTCAACCAGCG	TTTCTGGGTG	AGCAAAAACA	GGAAGGCAAA	ATGCCGCAAA
8451	AAAGGGGAATA	AGGGCGACAC	GGAAATGTTG	AATACTCATA	CTCTTCCTTT
8501	TTCAATATTA	TTGAAGCATI	TATCAGGGTT	ATTGTCTCAT	GAGCGGATAC
8551	ATATTTGAAT	GTATTTAGAA	AAATAAACAA	ATAGGGGTTC	CGCGCACATT
8601	TCCCCGAAAA	GTGCCACCTG	ACGTCTAAGA	AACCATTATT	ATCATGACAT
8651	TAACCTATAA	AAATAGGCGT	ATCAGGAGGC	CCTTTCGTCT	TCAAGAATTC
8701	GAGCTCGGTA	CCCATCAGCC	AAAAAGCATG	CCTGCCACAC	AACATCAATT
8751	TCTGSAAAAC	GCTACACTTA	ATTATTTCTA	GTAGAACAGC	TCTTTGGTTT
8801	GCCAAAAAGA	ATCACCTATA	GTGGCATCTA	AGCACAAAAA	GGAGAAAAAA
8851	ATCACAAAGA	AATGATTGAG	AGGCATAATA	AAAATTATCA	AAAAATTATG
8901	AGTTTTACGA	TTTCATCTTT	TTCCAAGTTG	AAATCATAGG	GTGGCTTTAA
8951	CACAGTGACA	AGGAATGTGC	ATGCTGCCAT	TATGGTGCTC	TGCCTAAAT
9001	GGTTCGGAGCC	TTGTCTGTCT	ACAGAGAAAC	TGTCATACAG	CAGGGGGTGC
9051	CAAATTTCCA	TATTTTTTTA	TATCATTGAG	CAGGTGCACA	GAAGACCAGA
9101	AAGCACTTTC	TATCAGGCTG	GCCTTCTCT	TCCTTTCCAG	TATGAAGCAA
9151	AAACTGCCAA	TGAAACTAGC	AAITGTTAAA	TTCTTTTTTC	AAACAGTATT
9201	TGTGCTATCA	GAACATAGTG	CATTCAAAAG	TCTAGCCTGA	GAGAACAACC
9251	CAGTTTTIAT	CATTCCCTCCT	ACTACCTCTC	TCATTCCCAC	TGTTTGTGTT
9301	CTCCCTCCCA	TTTTAATTGT	CTATCTAGTC	CAAACTAAGC	ACACGATCCA
9351	GTCCACATTA	AACAACATGT	TTTCACTTTA	AGTCAAAATC	AAGACACCTT
9401	TAATATCAGC	CCTTGTTTCAT	AATCGTGCTT	CTAGTGACTT	AATGTACATG
9451	TCACACTGTA	CTGTTGGGTT	TTGTGCTCTA	TCATGAACAA	TGTTGTGAAG
9501	GTATTAAAGTG	GAGAGTAAGC	AGAAATTAGAT	TCCTCTAATG	ATGCACACCC
9551	ACACTAAGAG	CAGAAATRAAT	ATTAAAAATA	GAAAAAAAAG	TTTTACATGA
9601	GATTTCAAAT	ACCCAGGTAT	GAGCTGCAGT	TTCTTCAAGT	TAAGCATCG
9651	AGGTTGTGAG	TTACACTATT	ACAGGAAACA	TATGCAGAGT	TTTTATTTTA
9701	GTATATTAGT	TTTCACATAT	GTGGAATTAC	TATTAAACTA	TTCTTTCTTT
9751	TCAAATGCTT	ACCATTTGTAA	ATGAGTTTGT	GACTTTGTGT	AGGTGAGTGC
9801	ACATGACTCT	GGATGCCTAA	GAGGACTGAA	GAAGTTGGAG	TTATAGGTAG
9851	TTTTATTCTA	CTTGACTGTT	CAGTGCTAAA	AATACAACCTG	AGGTCCTTTA
9901	AACTGCTGTT	CATGAACCTC	TTAATTGATA	TATCTCATGA	GATCTCTAAA
9951	CTATTTTTAT	TATGACACGT	TTCAACATTT	TCACTGTAAC	GATTTTTATG
10001	TTTTATATTA	ATGTAACAT	ATGACACTTC	CCAAAATCCC	CATATTCACA
10051	ATTGAACTGT	TTCAAAGTTT	TACCTTGACT	TATGGGAAAT	GAAAACCCAC
10101	ATTTTATAAT	TTTAAATGA	AATGTTTATT	TTATATTTCT	GCAAAATTC

10

20

30

40

【表 7 1】

```

10151 CAAGGAAAGA TTAGTCACTG GTGTGTGAGA GCAGAGGAGC ATAAGAGTTC
10201 AGGAATAGAA TCCATTATGA TTCTGGAGGC AAGGAAGAAC TGATGCCAAG
10251 GTTTCAGTAT AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAAGT CACTACATCT
10301 GAGCACAGAG CAGGACATCT ACATAATGAG TGGTCACTAA TGGGCCACTG
10351 TTACACTGTT ATATGTATAA GGCTCAAGAA TGAGCACTGA GGCTGTAAAG
10401 TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAAACC CAGCTCAGGT AGAGGACTCA
10451 GAGGACAGCA CAGTCAGCAT GAACTAATAA ACATCAGATA AGATAAGGCA
10501 CAAGCTCAGC TATATAGGGT AAGGGATCTT TGTAATCTG ATTGTGCATC
10551 CAGTCTAGTT CAATGTGACT TAGGAAGCCC AGTCATATGC AAATCTAGAG
10601 AAGACTTTAG AGTAGAAATC TGAGGCTCAC CTCACATACC AGCAAGCGAG
10651 TGACCAGTTA GTCTTAAGGC ACCACTTCTT AGACATCATG GCTTGGGTGT
10701 GGACCTTGCC ATTCCTGATG GCAGCTGCCC AAAGTAAGAC ATCAGAAAAA
10751 AGAGTTCCAA GGGGAATTGA AGCAGTTCCA TGAATACTCA CCTTCCTGTG
10801 TTCTTTTCAC AGGTGTCCAG GCAGAGGTGC AGCTGGTGGA GTCAGGAGCC
10851 GAAGTGAAAA AGCCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCTTGCA AGGCCTCTGG
10901 ATACACATTC ACTAATTATA TTATCCACTG GGTGAAGCAG GAGCCTGGTC
10951 AGGGCCTTGA ATGGATTGGA TATTTTAATC CTTACAATCA TGGTACTAAG
11001 TACAATGAGA AGTTCAAAGG CAGGGCCACA CTAAGTGCAA ACAATCCAT
11051 CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT CCGCTCTGAG GACACTGCGG
11101 TCTACTACTG TGCAAGATCA GGACCCTATG CCTGGTTTGA CACCTGGGGC
11151 CAAGGGACCA CGGTCACCGT CTCCTCAGGT AAGAATGGCC ACTCTAGGGC
11201 CTTTGTTTTC TGCTGCTGCC TGTGGGATTT CATGAGCATT GCAAAGTTGT
11251 CCTCGGGACA TGTTCGGAGG GGACCTGGGC GGACTGGCCA GGAGGGGACG
11301 GGCACCTGGG TGCCCTGAGG ATCTGGGAGC CTCTGTGGAT TTTCCGATGC
11351 CTTTGGAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGCG TCTGAGACAG TAACTCAGCC
11401 TGGGGGCTTG GTGAAGATCG CCGCACAGCA GCGAGTCCGT GAAATATCTT
11451 ATTTAGACTT GTGAGGTGCG CTGTGTGTCA ATTTACATCT TAAATCCTTT
11501 ATTGGCTGGA AAGAGAATTG TTGGAGTGGG TGAATCCAGC CAGGAGGGAC
11551 GCGGGGGGAT CCA

```

10

20

30

【 0 1 7 7 】

配列番号 : 4 1

発現ベクター H C V H Q S p 2 0 のヌクレオチド配列

【表 7 2】

```

1 CTAGAGAGGT CTGGTGGAGC CTGCAAAAGT CCAGCTTTCA AAGGAACACA
51 GAAGTATGTG TATGGAATAT TAGAAGATGT TGCTTTTACT CTTAAGTTGG
101 TTCCTAGGAA AAATAGTTAA ATACTGTGAC TTTAAATGT GAGAGGGTTT
151 TCAAGTACTC ATTTTTTAA ATGTCCAAA TTTTGTCAA TCAATTTGAG
201 GTCTTGTGTTG TGTAGAAGTG ACATTACTTA AGTTTAACC GAGGAATGGG
251 AGTGAGGCTC TCTCATACCC TATTCAGAAC TGACTTTTAA CAATAATAAA
301 TTAAGTTTAA AATATTTTAA AATGAATTGA GCAATGTTGA GTTGGAGTCA
351 AGATGGCCGA TCAGAACCAG AACACCTGCA GCAGCTGGCA GGAAGCAGGT
401 CATGTGGCAA GGCTATTTGG GGAAGGGAAA ATAAAACCAC TAGGTAAACT

```

40

【表 7 3】

451	TGTAGCTGTG	GTTTGAAGAA	GTGGTTTTGA	AACACTCTGT	CCAGCCCCAC
501	CAAACCGAAA	GTCCAGGCTG	AGCAAAACAC	CACCTGGGTA	ATTTCGATTT
551	CTAAAATAAG	TTGAGGATTC	AGCCGAAACT	GGAGAGGTCC	TCTTTTAACT
601	TATTGAGTTC	AACCTTTTAA	TTTTAGCTTG	AGTAGTTCTA	GTTTCCCCAA
651	ACTTAAGTTT	ATCGACTTCT	AAAATGTATT	TAAGCTTTCT	GGGGCAGGCC
701	AGGCCTGACC	TTGGCTTTGG	GGCAGGGAGG	GGGCTAAGGT	GAGGCAGGTG
751	GGGCCAGCCA	GGTGACACAC	CAATGCCCCAT	GAGCCCAGAC	ACTGGACGCT
801	GAACCTCGCG	GACAGTTAAG	AACCCAGGGG	CCTCTGCGCC	CTGGGCCCCAG
851	CTCTGTCCCA	CACCGCGGTC	ACATGGCACC	ACCTCTCTTG	CAGCCTCCAC
901	CAAGGGCCCA	TCGGTCTTCC	CCCTGGCACC	CTCCTCCAAG	AGCACCTCTG
951	GGGGCACAGC	GGCCCTGGGC	TGCCTGGTCA	AGGACTACTT	CCCCGAACCG
1001	GTGACGGTGT	CGTGGAACCT	AGGCGCCCTG	ACCAGCGGCG	TGCACACCTT
1051	CCCGGCTGTC	CTACAGTCTT	CAGGACTCTA	CTCCCTCAGC	AGCGTGGTGA
1101	CCGTGCCCTC	CAGCAGCTTG	GGCACCCAGA	CCTACATCTG	CAACGTGAAT
1151	CACAAGCCCA	GCAACACCAA	GGTGGACRAG	AGAGTTGGTG	AGAGGCCAGC
1201	ACAGGGAGGG	AGGGTGTCTG	CTGGAAGCCA	GGCTCAGCGC	TCCTGCCTGG
1251	ACGCATCCCG	GCTATGCAGT	CCCAGTCCAG	GGCAGCAAGG	CAGGCCCCGT
1301	CTGCCCTCTT	ACCCGGAGGC	CTCTGCCCGC	CCCCTCATG	CTCAGGGAGA
1351	GGGTCTTCTG	GCTTTTTCCT	CAGGCTCTGG	GCAGGCACAG	GCTAGGTGCC
1401	CCTAACCCAG	GCCCTGCACA	CRAAGGGGCA	GGTGCTGGGC	TCAGACCTGC
1451	CAAGAGCCAT	ATCCGGGAGG	ACCCTGCCCC	TGACCTAAGC	CCACCCCAAA
1501	GGCCAAACTC	TCCACTCCCT	CAGCTCGGAC	ACCTTCTCTC	CTCCCAGATT
1551	CCAGTAACTC	CCAATCTTCT	CTCTGCAGAG	CCCAAATCTT	GTGACAAAAC
1601	TCACACATGC	CCACCGTGCC	CAGGTAAGCC	AGCCCAGGCC	TCGCCCTCCA
1651	GCTCAAGGCG	GGACAGGTGC	CCTAGAGTAG	CCTGCATCCA	GGGACAGGCC
1701	CCAGCCGGGT	GCTGACACGT	CCACCTCCAT	CTCTTCTCTA	GCACCTGAAC
1751	TCCTGGGGGG	ACCGTCAGTC	TTCCTCTTCC	CCCCAAAACC	CAAGGACACC
1801	CTCATGATCT	CCCGGACCCC	TGAGGTCACA	TGCGTGGTGG	TGGACGTGAG
1851	CCACGAGAC	CCTGAGGTCA	AGTTCAACTG	GTACGTGGAC	GGCGTGGAGG
1901	TGCATAATGC	CAAGACAAAG	CCGCCGGAGG	AGCAGTACAA	CAGCACGTAC
1951	CGTGTGGTCA	GGGTCTCTAC	CGTCCTGCAC	CAGGACTGGC	TGAATGGCAA
2001	GGAGTACAAG	TGCAAGGTCT	CCAACAAAGC	CCTCCCAGCC	CCCATCGAGA
2051	AAACCATCTC	CAAAGCCAAA	GGTGGGACCC	GTGGGGTGCG	AGGCCCACAT
2101	GGACAGAGGC	CGGCTCGGCC	CACCCCTCTGC	CCTGAGAGTG	ACCGCTGTAC
2151	CAACCTCTGT	CCCTACAGGG	CAGCCCCGAG	AACCCACAGT	GTACACCCCTG
2201	CCCCCATCCC	GGGAGGAGAT	GACCAAGAAC	CAGGTGAGCC	TGACCTGCCT
2251	GGTCAAAGGC	TTCTATCCCA	GCGACATCGC	CGTGGAGTGG	GAGAGCAATG
2301	GGCAGCCGGA	GAACAACCTAC	AAGACCACGC	CTCCCGTGCT	GGACTCCGAC
2351	GGCTCCTTCT	TCCTCTATAG	CAAGCTCACC	GTGGACAAGA	GCAGGTGGCA
2401	GCAGGGGAAC	GTCTTCTCAT	GCTCCGTGAT	GCATGAGGCT	CTGCACAACC
2451	ACTACACGCA	GAAGAGCCTC	TCCCTGTCCC	CGGATAAATG	AGTCCGACCG

10

20

30

40

【表 7 4】

2501	CCGGCAAGCC	CCCGCTCCCC	GGGCTCTCGC	GGTCGCACGA	GGATGCTTGG
2551	CACGTACCCC	GTCTACATAC	TTCCCAGGCA	CCCAGCATGG	AAATAAAGCA
2601	CCCACCACTG	CCCTGGGCCC	CTGCGAGACT	GTGATGGTTC	TTTCCACGGG
2651	TCAGGCGGAG	TCTGAGGCCT	GAGTGGCATG	AGGGAGGCAG	AGCGGGTCCC
2701	ACTGTCCCCA	CACTGGCCCC	GGCTGTGCAG	GTGTGCCTGG	GCCGCCCTAGG
2751	GTGGGGCTCA	GCCAGGGGCT	GCCCTCGGCA	GGGTGGGGGA	TTTGCCAGCG
2801	TGGCCCTCCC	TCCAGCAGCA	GCTGCCCTGG	GCTGGGCCAC	GAGAAGCCCT
2851	AGGAGCCCCCT	GGGGACAGAC	ACACAGCCCC	TGCCCTCTGT	GGAGACTGTC
2901	CTGTCTCTGT	AGCGCCCTGT	CCTCCGACCC	CGATGCCCCAC	TCGGGGGCAT
2951	GCCTAGTCCA	TGCGCGTAGG	GACAGGCCCT	CCCTCACCCA	TCTACCCCCA
3001	CGGCACTAAC	CCCTGGCAGC	CCTGCCCAGC	CTCGCACCCG	CATGGGGACA
3051	CAACCGACTC	CGGGGACATG	CACTCTCGGG	CCCTGTGGAG	GGACTGGTGC
3101	AGATGCCCCAC	ACACACACTC	AGCCCAGACC	CGTTCAACAA	ACCCCGCACT
3151	GAGGTTGGTC	GAGCGGGAGT	GCGGCCAGAG	CCTGCCTCGG	CCGTCAGGGA
3201	GGACTCCCGG	GCTCACTCGA	AGGAGGTGCC	ACCATTTCAG	CTTTGGTAGC
3251	TTTTCTTCTT	CTTTTAAATT	TTCTAAAGCT	CATTAAATTGT	CTTTGATGTT
3301	TCTTTTGTGA	TGACAATAAA	ATATCCTTTT	TAAGTCTTGT	ACTTCGTGAT
3351	GGGAGCCGCC	TTCCCTGTGT	CACGCGCCTC	CTGCCCCCGG	TGGAAGACAC
3401	GGTCAGGAGG	AGGCTGGTCC	AGCTGCACCT	CGGGGGCTCC	CTGCACTCGC
3451	CCCCCGCCTC	CTGCAGCCAC	ACGCATTGCC	CGAGCGACCC	TCCCTGGCCC
3501	CTGTCACTAC	ATGGACCCCT	GGGGCTTCTC	CTCTTTTCTA	CATGGATGCA
3551	GTTTCTCCTC	CTGCTGGGCA	CGGTGCTGCC	TGCCCTGGTC	ACTCTGCGGG
3601	GGACAGGGCC	TCCAGGGAAA	GCTGGGTGCA	GGCTGGGAGC	TGGCTCAGGC
3651	TGGCCAGGCA	GAGCCACAGG	GAGGGCCCTC	CAGAACCAAC	CATGGTCCGA
3701	AGCGAGAGGT	GGGTGTCAGA	TCCAGACATG	ATAAGATACA	TTGATGAGTT
3751	TGGACAAACC	ACAACTAGAA	TGCAGTGAAA	AAAATGCTTT	ATTTGTGAAA
3801	TTTGTGATGC	TATTGCTTTA	TTTGTAACCA	TTATAAGCTG	CAATAAACAA
3851	GTTAACAACA	ACAAATTGCAT	TCATTTTATG	TTTCAGGTTT	AGGGGGAGGT
3901	GTGGGAGGTT	TTTTAAAGCA	AGTAAAACCT	CTACAAATGT	GGTATGGCTG
3951	ATTATGATCT	CTAGTCAAGG	CACTATACAT	CAAAATATTCC	TTATTAACCC
4001	CTTTACAAAT	TAAAAAGCTA	AAGGTACACA	ATTTTGTAGC	ATAGTTATTA
4051	ATAGCAGACA	CTCTATGCCT	GTGTGGAGTA	AGAAAAAACA	GTATGTTATG
4101	ATTATAACTG	TTATGCCTAC	TTATAAAGGT	TACAGAATAT	TTTTCCATAA
4151	TTTTCTTGTA	TAGCAGTGCA	GCTTTTTCCT	TTGTGGTGTA	AATAGCAAAG
4201	CAAGCAAGAG	TTCTATTACT	AAACACAGCA	TGACTCAAAA	AACTTAGCAA
4251	TTCTGAAGGA	AAGTCCTTGG	GGTCTTCTAC	CTTCTCTTTC	TTTTTTGGAG
4301	GAGTAGAATG	TTGAGAGTCA	GCAGTAGCCT	CATCATCACT	AGATGGCATT
4351	TCTTCTGAGC	AAAACAGGTT	TTCTCATTA	AAGGCATTCC	ACCACTGCTC
4401	CCATTTCATCA	GTTCCATAGG	TTGGAATCTA	AAATACACAA	ACAATTAGAA
4451	TCAGTAGTTT	AACACATTAT	ACACTTAAAA	ATTTTATATT	TACCTTAGAG
4501	CTTTAAATCT	CTGTAGGTAG	TTTGTCCAAT	TATGTCACAC	CACAGAAGTA

10

20

30

40

【表 7 5】

```

4551  AGGTTCTCTC ACAAAGATCC GGACCAAAGC GGCATCTGTG CCTCCCCACT
4601  CCTGCAGTTC GGGGCGATGG ATGCGCGGAT AGCCGCTGCT GGTTCCTTGG
4651  ATGCCGACGG ATTGCACTG CCGGTAGAAC TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT
4701  CAGGCAGCAG CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCG GGGTGGGCGA
4751  AGAATCTCCAG CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCCGCGCTCC
4801  CGGAAAACGA TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CGGTGGAATC
4851  GAAATCTCGT GATGGCAGGT TGGGCGTCCG TTGGTCGGTC ATTTGGAACC
4901  CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC
4951  GCTGCGAATC GGGAGCGGCG ATACCGTAAA GCACGAGGAA GCGGTGAGCC
5001  CATTCGCGCG CAAGCTCTTC AGCAATATCA CCGGTAGCCA ACGCTATGTC
5051  CTGATAGCGG TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA
5101  AGCGGCCATT TTCCACCATG ATATTCGGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTC
5151  ACGACGAGAT CCTCGCCGTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG
5201  TTGCGCTGGC GCGAGCCCTT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA
5251  CAAGACCGGC TTCCATCCGA GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCGCT
5301  TGGTGCTCGA ATGGGCAAGT AGCCCGATCA AGCGTATGCA GCCGCCGCAT
5351  TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA
5401  GGAGATCTG CCCCCGCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCGCT
5451  TCACTGACAA CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCC TCGTGGCCAG
5501  CCACGATAGC CGCGCTGCCT CGTCCTGCAG TTCATTGAGG GCACCGGACA
5551  GGTGCTCTT GACAAAAAGA ACCGGCGGCC CCTGCGCTGA CAGCCGGAAC
5601  ACGGCGGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCAGT CATAGCCGAA
5651  TAGCCTCTCC ACCCAAGCGG CCGGAGAAC TCGGTGCAAT CCATCTTGT
5701  CAATCATGCG AAACGATCCT CATCCTGTCT CTGATCAGA TCTTGATCCC
5751  CTGCGCCATC AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GGCATCCAGT TTACTTTGCA
5801  GGGCTTCCCA ACCTTACCAG AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCCGGTTCCG
5851  TTGCTGTCCA TAAAACCGCC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCCACTG
5901  CAAGCTACCT GCTTCTCTT TCGCTTGGG TTTTCCCTTG TCCAGATAGC
5951  CCAGTAGCTG ACAATCATCC GGGGTCAGCA CCGTTTCTGC GGAATGGCTT
6001  TCTACGTGTT CCGCTTCTT TAGCAGCCTT TCGCCCTGA GTGCTTGCAG
6051  CAGCGTGAGG CTTTTTGCAA AAGCCTAGGC CTCCAAAAAA GCCTCCTCAC
6101  TACTTCTGGA ATAGCTCAGA GGCCGAGGCG GCCTCGGCCT CTGCATAAAT
6151  AAAAAAATT AGTCAGCCAT GGGGCGGAGA ATGGGCGGAA CTGGGCGGAG
6201  TTAGGGGCGG GATGGGCGGA GTTAGGGGCG GGAATATGTT TGCTGACTAA
6251  TTGAGATGCA TGCTTTGCAT ACTTCTGCCT GCTGGGGAGC CTGGGGACTT
6301  TCCACACCTG GTTGCTGACT AATTGAGATG CATGCTTTGC ATACTTCTGC
6351  CTGCTGGGGA GCCTGGGGAC TTTCCACACC CTAATGACA CACATTCCAC
6401  AGCTGCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA
6451  GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC
6501  AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTG GCGGTGTGCG GGGCGCAGCC
6551  ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCG

```

10

20

30

40

【表 7 6】

6601	GCATCAGAGC	AGATTGTACT	GAGAGTGAC	CATATGCGGT	GTGAATATACC
6651	GCACAGATGC	GTAAGGAGAA	AATACCGCAT	CAGGCGCTCT	TCCGCTTCCT
6701	CGCTCACTGA	CTCGCTGCCG	TCGGTCGTTC	GGCTGCGGCG	AGCGGTATCA
6751	GCTCACTCAA	AGGCGGTAAT	ACGGTTATCC	ACAGAATCAG	GGGATAACGC
6801	AGGAAAGAAC	ATGTGAGCAA	AAGGCCAGCA	AAAGGCCAGG	AACCGTAAAA
6851	AGGCCGCGTT	GCTGGCGTTT	TTCCATAGGC	TCCGCCCCCC	TGACGAGCAT
6901	CACAAAATC	GACGCTCAAG	TCAGAGGTGG	CGAAACCCGA	CAGGACTATA
6951	AAGATACCAG	GCGTTTCCCC	CTGGAAGCTC	CCTCGTGCGC	TCTCCTGTTC
7001	CGACCGTGCC	GCTTACCGGA	TACCTGTCCG	CCTTTCTCCC	TTCGGGAAGC
7051	GTGGCGCTTT	CTCATAGCTC	ACGCTGTAGG	TATCTCAGTT	CGGTGTAGGT
7101	CGTTGCTCC	AAGCTGGGCT	GTGTGCACGA	ACCCCCCGTT	CAGCCCCGACC
7151	GCTGCGCCTT	ATCCCGTAAC	TATCGTCTTG	AGTCCAACCC	GGTAAGACAC
7201	GACTTATCGC	CACTGSCAGC	AGCCACTGGT	AACAGGATTA	GCAGAGCGAG
7251	GTATGTAGGC	GGTGCTACAG	AGTTCTTGAA	GTGGTGGCCT	AACACGGCT
7301	ACACTAGAAG	GACAGTATTT	GGTATCTGCG	CTCTGCTGAA	GCCAGTTACC
7351	TTCGGAAAAA	GAGTTGGTAG	CTCTTGATCC	GGCAAACAAA	CCACCGCTGG
7401	TAGCGGTGGT	TTTTTTGTTT	GCAAGCAGCA	GATTACGCGC	AGAAAAAAG
7451	GATCTCAAGA	AGATCCTTTG	ATCTTTTCTA	CGGGGTCTGA	CGCTCAGTGG
7501	AACGAAAAC	CACGTTAAGG	GATTTTGGTC	ATGAGATTAT	CAAAAAGGAT
7551	CTTCACCTAG	ATCCTTTTAA	ATTAAAAATG	AAGTTTTTAA	TCAATCTAAA
7601	GTATATATGA	GTAAACTTGG	TCTGACAGTT	ACCAATGCTT	AATCAGTGAG
7651	GCACCTATCT	CAGCGATCTG	TCTATTTCTG	TCATCCATAG	TTGCCTGACT
7701	CCCCGTCGTG	TAGATAACTA	CGATAOEGGA	GGGCTTACCA	TCTGGCCCCA
7751	GTGCTGCAAT	GATACCGCGA	GACCCACGCT	CACCGGCTCC	AGATTTATCA
7801	GCAATAAACC	AGCCAGCCGG	AAGGGCCGAG	CGCAGAAGTG	GTCTTGCAAC
7851	TTTATCCGCC	TCCATCCAGT	CTATTAATTG	TTGCCGGGAA	GCTAGAGTAA
7901	GTAGTTCCGC	AGTTAATAGT	TTGCGCAACG	TTGTTGCCAT	TGCTGCAGGC
7951	ATCGTGGTGT	CACGCTCGTC	GTTTGGTATG	GCTTCATTCA	GCTCCGGTTC
8001	CCAACGATCA	AGGCGAGTTA	CATGATCCCC	CATGTTGTGC	AAAAAAGCGG
8051	TTAGCTCCTT	CGGTCCCTCG	ATCGTTGTCA	GAAGTAAGTT	GGCCGCACTG
8101	TTATCACTCA	TGGTTATGGC	AGCACTGCAT	AATTCTCTTA	CTGTCATGCC
8151	ATCGTAAAGA	TGCTTTTCTG	TGACTGGTGA	GTAICTAAC	AAGTCATTCT
8201	GAGAATAGTG	TATGCGGCGA	CCGAGTTGCT	CTTGCCCGGC	GTCAACACGG
8251	GATAATACCG	CGCCACATAG	CAGAACTTTA	AAAGTGCTCA	TCATTGGAAA
8301	ACGTTCTTCG	GGGCGAAAA	TCTCAAGGAT	CTTACCGCTG	TTGAGATCCA
8351	GTTGATGTA	ACCCACTCGT	GCACCCAACT	GATCTTCAGC	ATCTTTTACT
8401	TTCACCAGCG	TTCTGGGTG	AGCAAAAACA	GGAAGGCAAA	ATGCCGCAAA
8451	AAAGGGAATA	AGGGCGACAC	GGAAATGTTG	AATACTCATA	CTCTTCCTTT
8501	TTCAATATTA	TTGAAACATT	TATCAGGGTT	ATTGTCTCAT	GAGCGGATAC
8551	ATATTTGAA	GTATTTAGAA	AAATAAACAA	ATAGGGGTTT	CGCGCACATT
8601	TCCCCGAAAA	GTGCCACCTG	ACGTCTAAGA	AACCATTATT	ATCATGACAT

10

20

30

40

【表 7 7】

8651	TAACCTATAA	AAATAGGCGT	ATCACGAGGC	CCTTTCGTCT	TCAAGAATTC	
8701	GAGCTCGGTA	CCCATCAGCC	AAAAAGCATG	CCTGCCACAC	AACATCAATT	
8751	TCTGGAAAAC	GCTACACTTA	ATTATTTCTA	GTAGAACAGC	TCTTTGGTTT	
8801	GCCAAAAAGA	ATCACCTATA	GTGGCATCTA	AGCACAAAAA	GGAGAAAAAA	
8851	ATCACAAAGA	AATGATTGAG	AGGCATAATA	AAAATTATCA	AAAAATTATG	
8901	AGTTTTEACGA	TTTCATCTTT	TTCCAACTTG	AAATCATAGG	GTGGCTTTAA	
8951	CACAGTGACA	AGGAATGTGC	ATGCTGCCAT	TATGSGTCTC	TGCCTAAAAAT	
9001	GGTTGGAGCC	TTGTCATGCT	ACAGAGAAAC	TGTCATACAG	CAGGGGGTGC	10
9051	CAAAATTTCCA	TATTTTTTTA	TATCATTGAG	CAGGTGCACA	GAAGACCAGA	
9101	AAGCACTTTC	TATCAGGCTG	GCCTTCCTCT	TCCTTTCCAG	TATGABGCAA	
9151	AAACTGCCAA	TGAAACTAGC	AATTGTTAAA	TTCTTTTTTC	AAACAGTATT	
9201	TGTGCTATCA	GAACATAGTG	CATTCAAAAG	TCTAGCCTGA	GAGAACAACC	
9251	CAGTTTTTATT	CATTCTCTCT	ACTACCTCTC	TCATTCCCAC	TGTTTTGTGT	
9301	CTCCCTCCCA	TTTTAATTGT	CTATCTAGTC	CAAACTAAGC	ACACGATCCA	
9351	GTCCACATTA	AACAACATGT	TTTCACTTTA	AGTCAAATAC	AAGACACCTT	
9401	TAATATCAGC	CCTTGTTTCAT	AATCGTGCTT	CTAGTGACTT	AATGTACATG	
9451	TCACACTGTA	CTGTTGGGTT	TTGTGTCTCA	TCATGAACAA	TGTTGTGAAG	
9501	GTATTAAAGTG	GAGAGTAAGC	AGATTAGAT	TCCTCTAATG	ATGCACACCC	20
9551	ACACTAAGAG	CAGAAATAAT	ATTAAAAATA	GAAAAAAAAG	TTTTACATGA	
9601	GATTTCAAAT	ACCCAGGTAT	GAGCTGCAGT	TTCTTCAAGT	TAAAGCATCG	
9651	AGGTTGTCTAG	TTACACTATT	ACAGGAAACA	TATGCAGAGT	TTTTATTTTA	
9701	GTATATTAGT	TTTCACATAT	GTGGAATTAC	TATTAAACTA	TTCTTTCTTT	
9751	TCAAATGCTT	ACCATTGTAA	ATGAGTTTGT	GACTTTGTGT	AGGTGAGTGC	
9801	ACATGACTCT	GGATGCCTAA	GAGGACTGAA	GAAGTTGGAG	TTATAGGTAG	
9851	TTTTATTCTA	CTTGACTGTT	CAGTGCTAAA	AATACAACCTG	AGGTCTTTTA	
9901	AACTGCTGTT	CATGAACTTC	TTAATTGATA	TATCTCATGA	GATCTCTAAA	
9951	CTATTTTAT	TATGACACGT	TTCACCATTT	TCACTGTAAC	GATTTTATG	
10001	TTTTATATTA	ATGTAACAT	ATGACACTTC	CCAAAATCCC	CATATTCACA	30
10051	ATTGAACTGT	TTCAAAGTTT	TACCTTGACT	TATGGGAAAT	GAAAACCCAC	
10101	ATTTTATAAT	TTTAAANTGA	AATGTTTATT	TTATATTTCT	GCAAATTTCA	
10151	CAAGGAAAGA	TTAGTCACTG	GTGTGTGAGA	GCAGAGGAGC	ATAAGAGTTC	
10201	AGGAATAGAA	TCCATTATGA	TTCTGGAGGC	AAGGAAGAAC	TGATGCCAAG	
10251	GTTTCAGTAT	AAGAGCAGTA	TCCACTGGAA	AGGATAAAGT	CACTACATCT	
10301	GAGCACAGAG	CAGGACATCT	ACATAATGAG	TGGTCACTAA	TGGGCCACTG	
10351	TTACACTGTT	ATATGTATAA	GGCTCAAGAA	TGAGCACTGA	GGCTGTAAGG	
10401	TGTATGSGTG	AGGACATCAG	GATGTAAACC	CAGCTCAGGT	AGAGGACTCA	
10451	GAGGACAGCA	CAGTCAGCAT	GAACTAATBA	ACATCAGATA	AGATAAGGCA	40
10501	CAAGCTCAGC	TATATAGGGT	AAGGGATCTT	TGTAAATCTG	ATTGTGCATC	
10551	CAGTCTAGTT	CAATGTGACT	TAGGAAGCCC	AGTCATATGC	AAATCTAGAG	
10601	AAGACTTTAG	AGTAGAAATC	TGAGGCTCAC	CTCACATACC	AGCAAGCGAG	
10651	TGACCAGTTA	GTCTTAAGGC	ACCACTTCTT	AGACATCATG	GCTTGGGTGT	

【表 7 8】

10701 GGACCTTGCC ATTCCCTGATG GCAGCTGCCC AAAGTAAGAC ATCAGAAAAA
 10751 AGAGTTCCAA GGGGAATTGA AGCAGTTCCA TGAATACTCA CCTTCCTGTG
 10801 TTCTTTTCAC AGGTGTCCAG GCACAGGTGC AGCTGGTGGG GTCAGGAGCC
 10851 GAAGTGAAAA AGCCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCTTGCA AGGCCTCTGG
 10901 ATACACATTC ACTAATTATA TTATCCACTG GGTGAAGCAG GAGCCTGGTC
 10951 AGGGCCTTGA ATGGATTGGA TATTTTAATC CTTACAATCA TGGTACTAAG
 11001 TACAATGAGA AGTTCAAAGG CAGGGCCACA CTAAGTGCAA ACAAATCCAT
 11051 CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT GCGCTCTGAG GACACTGCGG
 11101 TCTACTACTG TGCAAGATCA GGACCCATG CCTGGTTTGA CACCTGGGGC
 11151 CAAGGGACCA CGGTCAACGT CTCCTCAGGT AAGAATGGCC ACTCTAGGGC
 11201 CTTTGTTTTT TGCTGCTGCC TGTGGGATTT CATGAGCATT GCAAAGTTGT
 11251 CCTCGGGACA TGTTCCGAGG GGACCTGGGC GGAAGTGGCA GGAGGGGACG
 11301 GGCAGTGGGG TGCCCTTGAGG ATCTGGGAGC CTCTGTGGAT TTTCCGATGC
 11351 CTTTGGAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGCG TCTGAGACAG TAACTCAGCC
 11401 TGGGGGCTTG GTGAAGATCG CCGCACAGCA GCGAGTCCGT GAAATATCTT
 11451 ATTTAGACTT GTGAGGTGCG CTGTGTGTCA ATTTACATCT TAAATCCTTT
 11501 ATTGGCTGGA AAGAGAATTG TTGGAGTGGG TGAATCCAGC CAGGAGGGAC
 11551 GCGGGGGGAT CCA

10

20

【0 1 7 8】

実施例 9 : C D 4 5 R O / R B 結合ヒト化抗体のインビトロ効果

V H E / h u m V 1 および V H Q / h u m V 1

キメラ抗体と比較して C D 4 5 R O / R B 結合ヒト化抗体 V H E / h u m V 1 および V H Q / h u m V 1 の効果を決定するために、ひと T 細胞においてアポトーシスを誘起する能力、およびヒト T 細胞増殖を阻害する能力もまた分析する。

【0 1 7 9】

細胞および試薬

既知の血液型を有するが、H L A 型は解らない健常ヒト提供者白血球搬出試料から Fico II-Hypaque (Pharmacia LKB) での遠心により末梢血単核球 (P B M C) を単離する。C D 3 コーティングした強磁性ビーズ (Miltenyi) を用いることにより、刺激剤として用いる P B M C は最初に T および N K 細胞を枯渇させる。ビーズおよび夾雑する細胞を磁場により除去する。照射 (5 0 G y) の後、T 細胞枯渇 P B M C を刺激細胞として用いる。C D 4 + T 細胞を M L R における応答細胞として用い、そして C D 4 T 細胞陰性選択キット (Miltenyi) で P B M C から単離する。

30

FACScan または FACSCalibur (Becton Dickinson & Co., CA) により得られた細胞を分析し、そして得られた細胞の純度は > 7 5 % である。1 0 % 熱不活性化 F C S、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび L - グルタミンを補充した R P M I 1 6 4 0 培地に細胞を懸濁する。

40

【0 1 8 0】

アポトーシスアッセイ

3 人の健常ボランティア提供者のヒト P B M C を C D 4 5 R O / R B 結合キメラ m A b、ヒト化抗体 (V H E / h u m V 1 および V H Q / h u m V 1) または抗 L P S コントロール m A b の存在下、成長培地 (R P M I 1 6 4 0 + 1 0 % F C S) 中一晚 (< 1 6 時間) 培養する。示す場合、架橋試薬、ヤギ抗ヒト I g G の F (a b ')₂ フラグメント (カタログ番号 1 0 9 - 0 0 6 - 0 9 8、JacksonLab) を、試料の抗 C D 4 5 抗体濃度の 2 倍になる μ g / m l 濃度で含む。抗体試薬を導入した全ウェルの P B S 濃度は全試料間で一定を保ち、すなわち架橋剤を含まない試料に関しては 2 0 (容量 / 容量) %、または架橋剤を含む試料に関しては 4 0 (容量 / 容量) % である。先の実験により P B S の量は読

50

み出しに影響しないことが実証されている。

【 0 1 8 1 】

抗体の存在下で一晩培養した後、試料をフローサイトメトリー分析に供し、そしてアポトーシスマーカーAnnexinV - F I T C (カタログ番号 5 5 6 4 1 9、BD/Pharmingen) およびT細胞マーカーC D 2 - P E (カタログ番号 5 5 6 6 0 9、BD/Pharmingen) と共に染色する。Becton Dickinson FACSCalibur装置に試料を流し、そしてデータをCellQuest Proソフトウェアを用いて分析する。

【 0 1 8 2 】

収集したデータから、ソフトウェアOrigin v7.0300を用いて曲線を適合させる。適合に用いた等式は：

【 数 2 】

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2$$

(「シグモイドロジスティック」)

A 1 : 最終値 (「共用」および「浮動」にセットしたフィットセッション用)

A 2 : 初期値 (「共用」および「浮動」にセットしたフィットセッション用)

p : 検出力

X₀ : E D₅₀ ; I C₅₀ (以下を参照)

【 0 1 8 3 】

架橋剤の不在下ではV H E / h u m V 1 が最も有効であり、E D₅₀ 値は 1 4 8 ± 7 1 n M で、次に 3 7 7 ± 2 1 9 n M の V H Q / h u m V 1 が続く。C D 4 5 R O / R B 結合キメラ抗体は E D₅₀ 値 2 4 4 0 ± 1 2 0 5 n M で、あまり有効でない。

【 0 1 8 4 】

架橋抗血清の存在下では E D₅₀ 値は少なくとも 2 桁まで高効率の方にシフトする。加えて、架橋剤の存在により、非常に高い抗体濃度で高レベルのアポトーシスが可能になり、今や 8 0 % にまで至るが、架橋剤の不在下ではアポトーシスが 5 0 % までしか可能にならない。架橋剤の存在下では、曲線 (抗体濃度 / アポトーシス %) は 2 つのプラトーを有する二相性であり：第 1 のプラトーには低抗体濃度で到達し (~ 5 n M)、ここでアポトーシスレベルは架橋剤の存在下で得られる最大レベルに相当する。第 2 のプラトーには高

低抗体濃度で到達し (~ 5 0 0 n M)、そしてT細胞集団の 7 0 - 8 0 % 内でアポトーシスが観察される。

C D 4 5 R O / R B 結合ヒト化 m A b 双方は同等に有効であり、そして 1 次ヒト T 細胞においてアポトーシスを誘起するその能力に関しては C D 4 5 R O / R B 結合キメラ m A b と比較してより良好または同等である。

【 0 1 8 5 】

混合リンパ球培養反応

9 6 ウェル培養プレートの各ウェル中、様々の濃度の m A B の存在下または不在下で 1 × 1 0⁵ 個の P B M C または 5 × 1 0⁴ 個の C D 4⁺ 細胞を 1 × 1 0⁵ 個または 5 × 1 0⁴ 個の T 細胞枯渇照射 (5 0 G y) P B M C と混合する。

混合した細胞を 5 日間培養し、そして培養の最後の 1 6 から 2 0 時間の間、細胞を ³ H - チミジンと共にパルスすることにより増殖を決定する。各抗体濃度で M L R 阻害を実施例 2 に記載するように阻害パーセンテージとして表す。

漸増濃度の V H E / h u m V 1 および V H Q / h u m V 1 の M L R に及ぼす影響を 3 つの応答体：刺激剤の組み合わせで評価する。全抗体は用量依存的な様式で M L R を阻害する。I C₅₀ 値 (前記を参照) はヒト化 A b V H E / h u m V 1 (7 ± 7 n M) および V H Q / h u m V 1 (3 9 ± 5 4 n M) に関して類似している。双方のヒト化抗体は M L R 阻害において親のキメラ抗体よりもさらに強力である (I C₅₀ は 3 4 7 ± 4 3 4 n M)。通常 M L R 実験で見られるように、これらの実験では提供者変動性が高い。

【 0 1 8 6 】

V H E - N 7 3 D / h u m V 1

ヒト末梢血単核球 (P B M C) でアポトーシスを誘起する V H E - N 7 3 D / h u m V 1 の生物学的効果を検討するために、種々濃度の V H E - N 7 3 D / h u m V 1 の存在下で標的 P B M C を一晩インキュベートし、そして続いてフローサイトメトリーによりアポトーシスマーカー AnnexinV の結合に関して分析し：ヒト P B M C を種々濃度の V H E - N 7 3 D / h u m V 1、または別のヒト化 C D 4 5 R O / R B 結合分子変種、V H E / h u m V 1、もしくはキメラ抗 C D 4 5 R O / R B m A b またはアイソタイプ I g G 1 コントロール m A b のいずれかを含有する組織培養培地 1 m l 中一晩インキュベートする。加えて、ヤギ抗ヒト I g F c の架橋 F (a b ') ₂ フラグメントを各 m A b の 2 倍の質量濃度で加え、F c 受容体により C D 4 5 R O / R B 結合分子の架橋を疑似するが、これはインビボで生じ得る。翌日に標準重力 (g) の 4 0 0 倍で 1 0 分間遠心することにより細胞を洗浄し、そして培地を除去する。細胞を F A C S バッファー (1 容量 / 容量 % F B S、0.1 重量 / 容量 % E D T A および 0.1 重量 / 容量 % アジ化ナトリウムを含有する P B S) に再懸濁し、そして 9 6 ウェル V 底マイクロタイタープレートにウェルあたり 1×10^5 セルの細胞密度で播種する。細胞の各試料を $100 \mu g / m l$ 正常マウス血清を含有する F A C S バッファー $50 \mu l$ 中 4 で 3 0 分間インキュベートして、細胞上の非特異的部位を遮断し、そしてフィコエリトリン (P E) 結合 C D 2 でヒト T 細胞を同定する。遠心により 2 回洗浄した後、1 : 1 0 0 容量 / 容量 F I T C 標識 AnnexinV を含有するカルシウム依存的 (calcium-proficient) AnnexinV 染色バッファー (Vendor BD/Phar mingen、キット 5 5 6 4 1 9) $100 \mu l$ に細胞を再懸濁する。暗中室温で 1 5 分間のインキュベーション時に 7 - アミノアクチノマイシン D (7 - A A D) を加え、最終濃度 $1 \mu g / m l$ にし、そして FACSCalibur フローサイトメーター (Becton Dickinson) を用いて分析する。アポトーシスを誘起するための抗体効果の $E D_{50}$ 値を、ソフトウェア Origin 7.5 を用いてシグモイド / ロジスティック曲線適合等式で抗体濃度の関数として誘起されるアポトーシスの量 (= AnnexinV - F I T C 蛍光の強度) の分析から算出することができる。

【 0 1 8 7 】

かかる分析時に全ての被験 C D 4 5 R O / R B 結合分子の二相性効果が観察される：低濃度の抗体で、3 0 % 未満の低レベルの T 細胞アポトーシスが見出される。V H E - N 7 3 D / h u m V 1 に関するこのレベルのアポトーシスに到達するための $E D_{50}$ 値は $0.31 \pm 0.13 n M$ として算出される。高濃度の抗体では、7 0 % までの T 細胞でアポトーシスを誘起することができる。V H E - N 7 3 D / h u m V 1 に関して、この高レベルのアポトーシスに到達するための $E D_{50}$ 値は $352 \pm 83 n M$ として算出される。要約すると、V H E - N 7 3 D / h u m V 1 はまたヒト T 細胞においてアポトーシスを誘起し、これは架橋により増強され得ることが見出される。

【 0 1 8 8 】

実施例 1 0 : C D 4 5 R O / R B 結合分子の特異性キメラ C D 4 5 R O / R B 結合分子

C D 4 5 分子は全ての白血球において発現される。しかしながら、様々の C D 4 5 アイソフォームは種々の白血球サブセットにより発現される。C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体分子の白血球サブセット反応性を決定するために、ヒト白血球のサブセット特異的マーカーでの免疫蛍光標識および色素結合 C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体での同時免疫蛍光標識を実施し、続いてフローサイトメトリー分析を実施する。

【 0 1 8 9 】

簡単には、ヒト末梢血単核球 (P B M C)、ヒト血小板、ヒト末梢血好中球またはヒト骨髓由来造血幹細胞の新たに単離された調製物の特異的サブセットは、C D 2 (T リンパ球)、C D 1 4 (単球)、C D 1 9 (B リンパ球)、C D 3 4 (幹細胞)、C D 4 2 a (血小板)、C D 5 6 (ナチュラルキラー細胞) または C D 6 6 b (顆粒球) に対するフィコエリトリン結合抗体と共にインキュベートすることにより同定される。F I T C 標識キメラ C D 4 5 R O / R B 結合分子の同時結合は T リンパ球、単球、幹細胞、ナチュラルキ

ラー細胞および／または顆粒球で検出されるが、血小板またはＢリンパ球では検出されない。

【 0 1 9 0 】

V H E - N 7 3 D / h u m V 1

V H E - N 7 3 D / h u m V 1 の白血球サブセット反応性を決定するために、ヒト白血球のサブセット特異的のマーカーでの免疫蛍光標識および色素結合 V H E - N 7 3 D / h u m V 1 での同時免疫蛍光標識を実施し、続いてフローサイトメトリー分析を実施する。

【 0 1 9 1 】

簡単には、ヒト末梢血単核球 (P B M C) またはヒト末梢血好中球の新たに単離された調製物の特異的サブセットは、C D 3、C D 4、C D 8 (T リンパ球)、C D 1 4 (単球)、C D 1 6 (ナチュラルキラー細胞および単球)、C D 1 9 (B リンパ球) または C D 6 6 b (顆粒球) に対するフィコエリトリン結合抗体と共にインキュベートしたときに同定される。F I T C 標識 V H E - N 7 3 D / h u m V 1 の同時結合は T リンパ球、単球、ナチュラルキラー細胞および顆粒球で検出されるが、B リンパ球では検出されない。したがって、V H E - N 7 3 D / h u m V 1 分子はヒト B リンパ球とは反応しない。

【 0 1 9 2 】

実施例 1 1 : サプレッサー T 細胞 (T 調節細胞) および機能的に無能な T 細胞のインビトロ誘導

C D 4 5 R O / R B 結合キメラ抗体のサプレッサー T 細胞を誘起する能力を実証するために、ヘモフィラス・インフルエンザの抗原マトリックスプロテイン 1 (M P 1) と反応する C D 8 + T 細胞系の作成の間、抗体を種々の濃度で含む。C D 8 + ヒトリンパ球との、抗原と共にパルスした C D 1 4 + ヒト単球との同時培養を繰り返すことによりこれらの系を作成する。後に、C D 1 4 + 単球を M P 1 抗原提示細胞 (A P C) としてヒト白血球抗原 - 2 陽性細胞系と置き換えることができる。C D 4 5 R O / R B 結合キメラ抗体を含む培養からのかかる M P 1 特異的 C D 8 + T 細胞を新たに単離したヒト C D 8 + T 細胞と混合し、そしてこの細胞の混合物を A P C 上の M P 1 抗原で刺激する場合、C D 4 5 R O / R B 結合分子の存在下での培養からの C D 8 + T 細胞の添加により、抗体用量依存的様式で I F N - 生成を低減させることができる。この I F N - アッセイ培養の間、C D 4 5 R O / R B 結合キメラ抗体は存在せず、これは C D 4 5 R O / R B m A b での前処理が新たに単離された T 細胞の活性化を抑制することができる C D 8 + T 細胞を誘起したことを示している。C D 4 5 R O / R B 結合キメラ抗体によるこのサプレッサー T 調節細胞の誘導のために抗体は、無調節なおよび／または活性化された T 細胞集団は病理の原因となると考えられる疾患において有用であり得る。かかる疾患の実例には、自己免疫疾患、移植片拒絶、乾癬、皮膚炎、炎症性腸疾患およびアレルギーが挙げられる。

【 0 1 9 3 】

キメラ C D 4 5 R O / R B 結合分子の、さらなる刺激に対して T 細胞低応答性 (アレルギー) にする、すなわち機能的に無能化する能力を実証するために、前記で概要を示したように、ヘモフィラス・インフルエンザの抗原マトリックスプロテイン 1 (M P 1) と反応する C D 8 + T 細胞系の作成の間、抗体を含む。を A P C により提示される M P 1 抗原で (C D 4 5 R O / R B 結合キメラ抗体の前に暴露した) T 細胞を活性化することにより無能を評価する。C D 4 5 R O / R B 結合分子は培養には存在しない。C D 4 5 R O / R B 結合キメラ抗体に暴露していない C D 8 + T 細胞は本来記載された刺激時に I F N を生成する。対照的に、C D 4 5 R O / R B 結合キメラ抗体で前処理した C D 8 + T 細胞は抗原刺激に応答してこのサイトカインの生成の不在までの著明な低減を示し、これは C D 4 5 R O / R B 結合キメラ抗体のヒト T 細胞を機能的に無能化する能力を実証している。C D 4 5 R O / R B 結合分子によるこの機能的 T 細胞低応答性の誘導のために抗体を、活性化された T 細胞集団は病理の原因となると考えられる自己免疫疾患、移植片拒絶、乾癬、皮膚炎、炎症性腸疾患またはアレルギーのような疾患において用いることができる。

【 0 1 9 4 】

実施例 1 2 : S C I D - h u 皮膚マウスにおけるインビボ研究

皮膚炎症におけるCD45RB/RO結合キメラ抗体の治療上の利点をSCIDマウスを用いて試験する。正常な個体からのヒト皮膚をSCIDマウス(SCID-hu皮膚)に移植し、そしてヒト皮膚提供者に無関係なヒト個体から単離した単核白血球を養子移入することにより炎症過程を疑似する。

【0195】

SCIDマウス(SCID-hu皮膚マウス)におけるヒト成体皮膚の移植

完全表皮、真皮乳頭層および網状真皮の一部からなるヒト成体皮膚(West Hungarian Regional Tissue Bank; WHRTB, Gyorから入手)の2個の小片(1cm²)をSCIDマウスC.B 17/GbmsTac-Prkdc^{scid}Lyst^{bg}マウス(Taconic, Germantown, NY)左右上背部にマウス皮膚と置き換えて移植する。移植後5から6週間、移植片の品質をモニタリングし、そして移植に成功したマウス(SCID-hu皮膚マウス、一般的に>85%)をCD45RO/RO結合キメラ抗体のインビボ試験のために選択する。

10

【0196】

SCIDマウスにおけるヒト単核球の正着

細胞懸濁(50メッシュサイズを装着した細胞解離ふるいを用いる)および標準的な密度勾配手順の後、単核白血球(Sp1)をヒト成体脾臓生検(WHRTB, Gyor)から単離する。~5×10⁸ Sp1のアリコートにRPMI-10% FCS 1.5MLに再懸濁し、そしてSCID-hu皮膚マウスに実験0日に腹腔内注射(i.p.)する。以前の試験でこれらのSp1数が細胞移入後4から6週内のマウス>90%で致死的な異種性GVHDを誘起するのに十分であることが見出されている。

20

【0197】

SCID-hu皮膚マウスの抗体処置

ヒトSp1で再構成したSCID-hu皮膚マウスをCD45RB/RO結合キメラ抗体または抗LPSコントロールmAbで0日、単核球注射直後、3日および7日、ならびにその後毎週の間隔で処置する。抗体をPBS 100μl中最終濃度1mg/kg体重(b.w.)で皮下(s.c.)に分配する。

【0198】

抗CD45処置の評価

CD45RB/RO結合キメラ抗体の効果を移植したマウスの生存および皮膚移植片の拒絶のモニタリングにより評価する。Systat v10ソフトウェアの助けを借りて、ログランク検定(Mantel法)を用いる生存分析の統計学的方法により結果の有意性を評価する。実験の終わりに、組織学の目的で屠殺したマウスからヒト皮膚移植片ならびにマウスの肝臓、肺、腎臓および脾臓の生検を入手する。健康状態を間接的に推定するのに全マウスの体重測定を最初(細胞移入の前)および実験期間中(2日毎)に行う。各マウスから得られた体重対PBM C移入後日数の値を用いて線形回帰線を作成し、そして続いてノンパラメトリックMann-Whitney検定を用いてその勾配(コントロール対抗CD45処置マウス)を比較する。

30

【0199】

結果

ヒト皮膚移植片はSCIDマウスにより非常に良好に寛容される。最初に移植片はケラチノサイト過剰増殖の期間を経験し、結果的に角化型痂皮の形成に至る。移植後約5週に、痂皮は移植片から剥がれ落ち、そして正常ヒト皮膚で観察される全ての特徴的な構造を含有する組織を露呈する。この過程の間にヒト皮膚移植片は隣接するマウス皮膚と融合し、そして下層のマウス組織と移植片をつなぐ新たに成長したヒト血管のネットワークを作成する。SCID-hu皮膚マウスに移入した循環ヒトSp1(実験0日、皮膚移植後およそ6週)は皮膚移植片に浸潤し、そしてヒト皮膚に発現された同種抗原分子を認識した後、乾癬性皮膚で生じる皮膚炎症過程と類似性を有し、そして完全に移植片を破壊する場合もある炎症応答が開始される。

40

【0200】

これらのマウスのCD45RB/RO結合キメラ抗体での処置により炎症過程が抑制さ

50

れ、そしてヒト皮膚移植片の拒絶が防御される。対照的に、コントロール処置されたマウスから得られた試料は、多様な壊死の徴候を伴う大規模な浸潤および劇的な表皮の破壊を示す。この過程は肉眼で容易にモニタリングされ、そしてマウスの簡単な写真により立証される。

【0201】

同種ヒト S p l を移入され、そしてコントロール抗 L P S m A b で処置された S C I D - h u 皮膚マウスのうちの6匹は、単核球の移入後23日に明らかに肉眼観察できる強い炎症応答を示す。全マウスは紅班、落屑および顕著な膿疱を含む相当な損傷を示す。対照的に、C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体で処置した全マウスの皮膚移植片は正常な外観を有している。全マウスのヒト皮膚は実験の始めには同一の外見を有していたので、マウスの2群間の劇的な差異は特に抗体処置に起因する。この態様は、コントロール群が皮膚損傷を進行させ始める、細胞移入後2週まで変化しない。単核球移入後34日に実験を終える。そのときまでに、コントロールマウスの1匹はすでに死亡し(30日)、そしてその他の4匹は強力な異種 G v H D のために屠殺された(27、27、27および30日)。抗体コントロール処置マウスで観察された病理学的反応はまたこれらの動物の体重減少とも相関する。対照的に、C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体処置群は全実験時間中健全な状態を示す。

10

【0202】

実施例13：ヒト島細胞移植モデルにおけるC D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体のインビボ活性
マウス

20

N O D / S C I D 雌マウス(Charles River Laboratories, Calco, Italy)を特定病原体除去状態に維持する。尾静脈血中のグルコースレベルをGlucometer Eliteシステム(Bayer, Germany)を用いて定量する。ストレプトゾトシン(Sigma, St.Luis, MO)180mg/kgの静脈内注射によりN O D / S C I D マウスにおいて糖尿病を誘起する。2回連続してグルコースの測定値が250mg/dlより高くなった後、糖尿病の診断を下す。

【0203】

島調製物および移植

脳死多臓器提供者から膵臓を入手する。Bertuzzi et al., Diabetes, 1999, 48: 1971-8に記載される方法に従って島を単離する。10% F C S、1% L - グルタミン、100単位/ml ペニシリンおよび100μg/ml ストレプトマイシンを補充したM199培地(Seromed Biochrom, Berlin, Germany)(完全培地)25mlの入った滅菌フラスコ中で精製した島を培養する。5% C O₂および95% 加湿空气中、30℃で島をインキュベートする。アベルチンの腹腔内注射でマウスを麻酔し、そしてDavalli A. M. et al., Diabetes, 1996, 45: 1161-7に記載されるようにヒト島の1500 I Eのアリコートを受容糖尿病性N O D / S C I D マウスの腎臓被膜の下に移植する。移植後、新たに単離した50×10⁶個のP B M CをN O D / S C I D マウスに腹腔内注射する。

30

【0204】

移植したマウスの処置

H u - P B L - N O D / S C I D 移植したマウスを0、+3および+5日にC D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体1mg/kgでs.c.処置する。コントロールマウスを生理食塩水溶液またはI g G 精製m A b (Vinci.Biochem, Italy)のいずれかで処置する。

40

【0205】

組織学的分析

ヒト島移植片を含有する腎臓の極をTissue Tek(Miles Lab., IN)中で急速凍結し、そして-70℃で保存する。5μm厚の凍結切片をヒトインスリンまたはヒトC D 3に対するピオチン化m A b、続いてストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体で染色する。ジアミノベンジジン(D A K O、Carpenteria, CA)を色素原として、そしてヘマトキシリンを対比染色として用いる。移植片のリンパ球浸潤をヘマトキシリンおよびエオシン染色した凍結切片で評価する。

50

【 0 2 0 6 】

結果

ヒト島を移植した正常なNOD / SCIDマウスは移植後100日まで正常血糖を維持するが、ヒト島を移植したhu - PBL - NOD / SCIDマウスの平均拒絶時間は35 ± 13日である。ヒト島を移植したhu - PBL - NOD / SCIDマウスの本発明のmAbでの短期間処置はヒト島生存を有意に延長し、生存率は移植後60日で>70%であり、そして100日では50%である。

【 0 2 0 7 】

移植後100日に実施したhu - PBL - NOD / SCIDマウスにおけるヒト島移植片の組織学的分析により、コントロール受体マウスにおいてCD3⁺、CD4⁺およびCD8⁺陽性T細胞の多量の浸潤が示される。対照的に、CD45RB / RO結合キメラ抗体で処置した受体マウスでは、ヒト細胞の浸潤が有意に低いことが観察される。インスリンに関する陽性染色により、コントロール受体マウスと比較して、CD45RB / RO結合キメラ抗体で処置したhu - PBL - NOD / SCID受体マウスにおける移植片機能が実証される。島移植された、およびCD45RB / RO結合キメラ抗体で処置されたhu - PBL - NOD / SCIDマウスでは、コントロール受体マウスと比較してより低量のヒトIFN- γ の血清中で検出される。

【 0 2 0 8 】

これらのデータにより、CD45RB / RO結合キメラ抗体での短期間処置は移植片浸潤を防御することにより、および白血球媒介のインビボ拒絶反応を阻害することによりヒト島同種移植片の生存延長に至ることが示される。

【図面の簡単な説明】

【 0 2 0 9 】

【図1】「候補mAb」による1次MLRの阻害は0.001から10 μ g / mlの範囲で用量依存的であることを示している。「濃度」は「候補mAb」の濃度である。

【図2】配列番号：15の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：12 (3921 - 4274)のヌクレオチド配列を有する重鎖を含む発現ベクターHCMV - G1 HuA6 - VH Qのプラスミドマップを示す。

【図3】配列番号：16の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：11 (3921 - 4274)のヌクレオチド配列を有する重鎖を含む発現ベクターHCMV - G1 HuA6 - VHEのプラスミドマップを示す。

【図4】配列番号：17の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：14 (3964 - 4284)のヌクレオチド配列を有する軽鎖を含む発現ベクターHCMV - K HuAb - VL1 humV1のプラスミドマップを示す。

【図5】配列番号：18の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：13 (3921 - 4274)のヌクレオチド配列を有する軽鎖を含む発現ベクターHCMV - K HuAb - VL1 humV2のプラスミドマップを示す。

【図6】配列番号：36の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：33のヌクレオチド配列を有する軽鎖を含む発現ベクターLCVL1SP20のプラスミドマップを示す。

【図7】配列番号：39の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：13のヌクレオチド配列を有する軽鎖を含む発現ベクターLCVL2SP20のプラスミドマップを示す。

【図8】配列番号：37の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：34のヌクレオチド配列を有する重鎖を含む発現ベクターHC V H E N 7 3 D Sp 2 0のプラスミドマップを示す。

【図9】配列番号：38の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：35のヌクレオチド配列を有する重鎖を含む発現ベクターHC V H Q N 7 3 D Sp 2 0のプラスミドマップを示す。

【図10】配列番号：40の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：11

10

20

30

40

50

のヌクレオチド配列を有する重鎖を含む発現ベクターHCVHESp20のプラスミドマップを示す。

【図11】配列番号：41の完全発現ベクターヌクレオチド配列において配列番号：12のヌクレオチド配列を有する重鎖を含む発現ベクターHCVHQSp20のプラスミドマップを示す。

【図12】VHE/humV1、VHE/humV2、VHQ/humV1およびVHQ/humV2、ならびにVHE-N73D/humV1と一緒にVHE/humV1のサイズ排除クロマトグラフィー分析を示す。

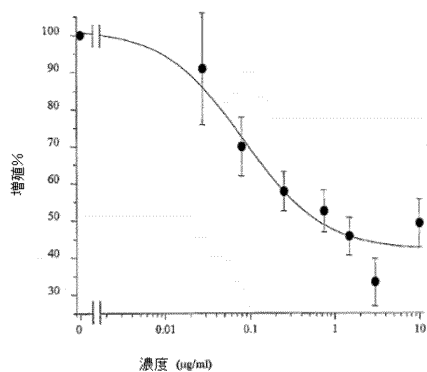
【図13】VHE/humV2、VHE/humV1、VHQ/humV2およびVHQ/humV1、ならびにVHE-N73D/humV1と一緒にVHE/humV2の陽イオン交換クロマトグラフィーを示す。

【図14】VHE/humV2およびVHE-N73D/humV1の逆相クロマトグラフィーを示す。

10

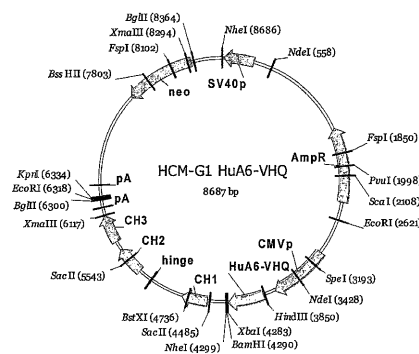
【図1】

Figure 1



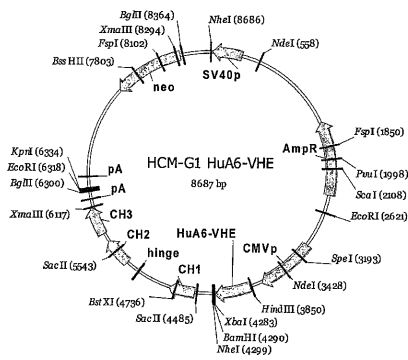
【図2】

Figure 2



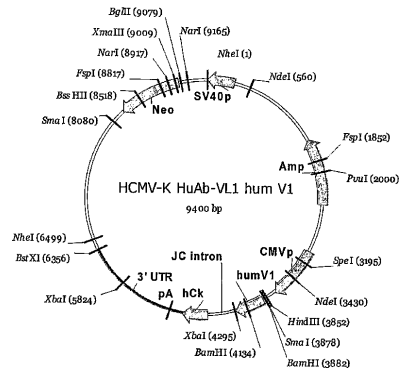
【 図 3 】

Figure 3



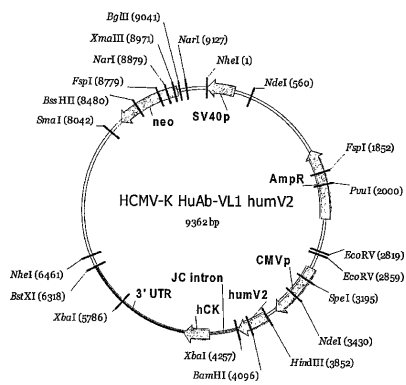
【 図 4 】

Figure 4



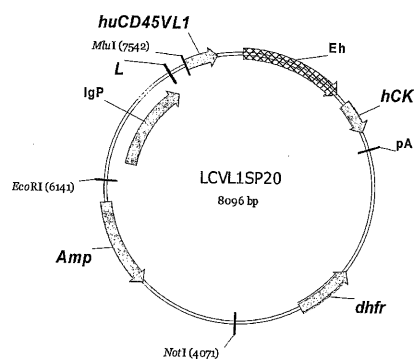
【 図 5 】

Figure 5



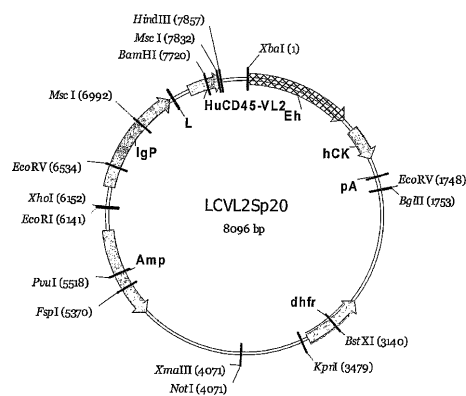
【 図 6 】

Figure 6



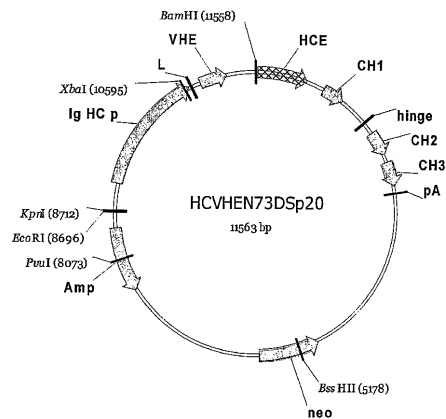
【 図 7 】

Figure 7



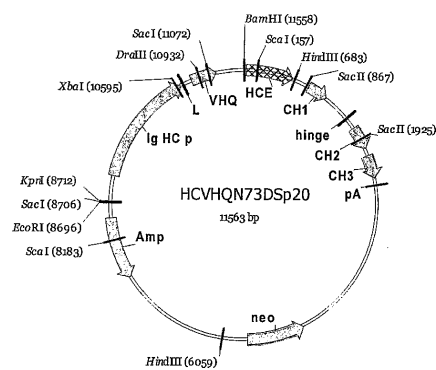
【 図 8 】

Figure 8



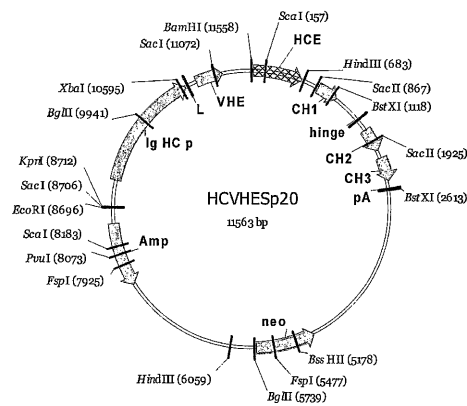
【 図 9 】

Figure 9



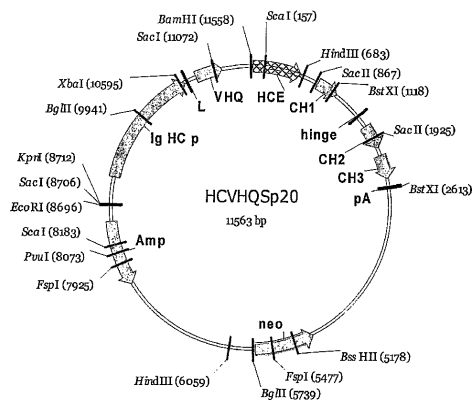
【 図 10 】

Figure 10



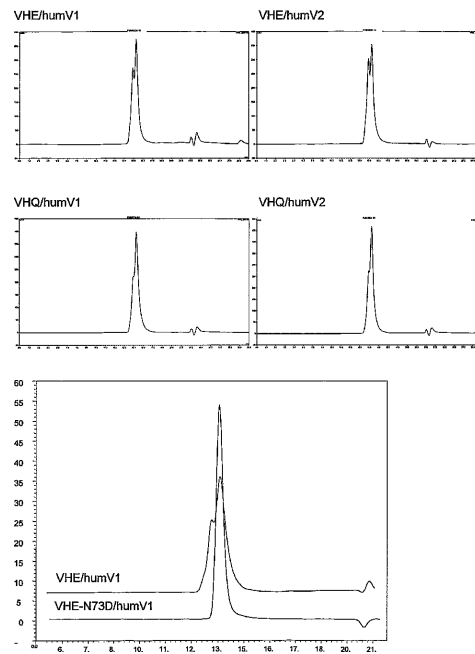
【 図 1 1 】

Figure 11



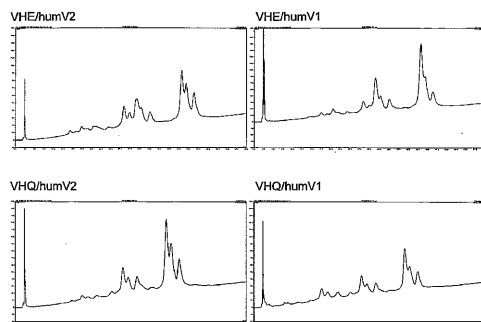
【 図 1 2 】

Figure 12



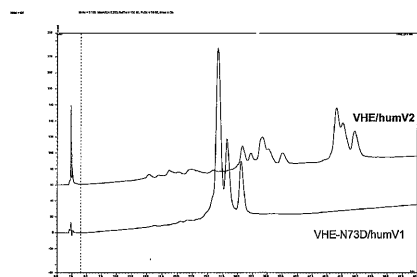
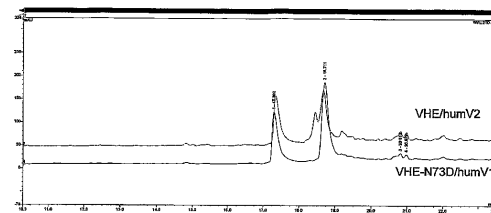
【 図 1 3 】

Figure 13



【 図 1 4 】

Figure 14



【配列表】

0004762142000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	H
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	17/04	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	A 6 1 P	17/04	
			C 1 2 P	21/02	C
			C 1 2 P	21/08	

(72)発明者 アンドラーシュ・アソーディ

オーストリア、アー - 1 1 4 0 ヴィエナ、ブヤッティガッセ 1 5 ベー / 1 9 番

(72)発明者 ホセ・ダブリュー・サルダナ

英国イーエヌ 1・3 ビーディ、ロンドン、エンフィールド、フィルブルック・アベニュー 2 1 番

(72)発明者 ブルース・エム・ホール

オーストラリア 2 1 3 5 ニュー・サウス・ウェールズ州ストラスフィールド、バーノン・ストリート 1 4 番

(72)発明者 シルヴィア・グレゴリー

イタリア、イ - 2 0 0 9 0 ブッチナスコ、ヴィア・ロマーニャ 1 9 番

(72)発明者 マリア・グラツィア・ロンカローロ

イタリア、イ - 2 0 0 9 0 セグラータ、レジデンツァ・アンドロメダ・イ 1 3 1、ヴィア・フラテッリ・チェルヴィ

(72)発明者 ヴェロニク・ルー

フランス、エフ - 6 8 8 7 0 バルテナム、リュ・デュ・1 9・ノバンブル 2 4 番

(72)発明者 グレゴリオ・アヴェルサ

カナダ、ブイ 6 アール・アイブイ 4、プリティッシュ・コロンビア、バンクーバー、ウエスト・シックス・アベニュー 4 5 2 5 番

(72)発明者 マルギット・イエシュケ

スイス、ツェーハー - 4 0 5 8 パーゼル、グレンツァッハー・シュトラッセ 1 0 番

審査官 福間 信子

(56)参考文献 国際公開第 0 2 / 0 7 2 8 3 2 (WO, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00-90

BIOSIS/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

PubMed