

(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 1
C07K 16/18	(2006.01) C07K 16/18
C07K 19/00	(2006.01) C07K 19/00
C12N 15/09	(2006.01) C12N 15/00 ZNAA
C12N 1/15	(2006.01) C12N 1/15
C12N 1/19	(2006.01) C12N 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) 國際出願番号	PCT/EP2004/010471
(87) 國際公開番号	W02005/026210
(87) 國際公開日	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 リヒトシュトーレセ 35
(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 葉
(74) 代理人	100067035 弁理士 岩崎 光隆
(72) 発明者	フランク・コルビングガー 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ペルヒトルツドルフ、ペルンハルト・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】

10

20

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 10 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。

【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】

臍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。

【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 1 1 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 1 2 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 1 2 に記載の使用。

【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 1 2 に記載の使用。

【請求項 16】

該医薬が臍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 1 2 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

(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。

【 0 0 0 2 】

(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、成熟したクローニング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。

【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。

【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。

【0006】

CD45抗原は膜貫通糖タンパク質を含む様々な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な細胞外ドメインを有するが、2つの相同的な、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。様々な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別的に発現される（Thomas ML. et al, Immunol. Today 1988; 9:320-325）。モノクローナル抗体には様々な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

10

20

30

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 HuAb6-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-G1 HuAb6-VHEのプラスミドマップを示す。 10

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-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-K HuAb-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。 20

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HCVHEN73D_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HCVHQN73D_Sp20のプラスミドマップを示す。 30

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。 40

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 50

D 4 5 R O / R B 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 M L R において C D 4 5 R O / R B 結合分子の不在時でさえ、2 次 M L R における増殖応答を低下させて いるのが好ましい。2 次 M L R 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 C D 4 5 R O / R B 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 (T reg) 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。

【 0 0 0 9 】

さらにコントロール処置マウスと比較して、ヒト P B M C を注射した後に異種性 G V H D を経験している重篤な複合免疫不全 (S C I D) マウスへの C D 4 5 R O / R B 結合分子のインビオ投与は、C D 4 5 R O / R B 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。C D 4 5 R O / R B 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 C D 4 5 R O / R B 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 S C I D マウスにおけるインビオ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 C D 4 5 R O / R B 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オ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。

【 0 0 1 0 】

「 C D 4 5 R O / R B 結合分子」とは C D 4 5 抗原の C D 4 5 R B および C D 4 5 R O 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 C D 4 5 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 (F A C S) 分析、酵素結合免疫吸着測定法 (E L I S A) 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、C D 4 5 R O / R B 結合分子の存在下または不在下で、1 次または 2 次 M L R の阻害を決定するための、および 1 次 M L R 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バ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 (M L R) の阻害を決定することができる。

【 0 0 1 1 】

これに代えて、例えば M L R 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 (P H A) もしくは抗 C D 3 および抗 C D 2 8 抗体もしくはホルボールエステルおよび C a ²⁺ 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、P M B C または T 細胞または C D 4 ⁺ 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 M L R に関して記載されるのと類似の様式で培養を準備する。³ H 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。

【 0 0 1 2 】

サイトカイン捕捉抗体を 9 6 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イッチ E L I S A 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（Kd）<20nMで、好ましくはKd<15nMまたは<10nMで、さらに好ましくはKd<5nMでCD45ROアイソフォームに結合する。好ましくは、結合分子はKd<50nMで、好ましくはKd<15nMまたは<10nMで、さらに好ましくはKd<5nM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) 記憶およびインビポ同種活性化された(alloactivated)T細胞を認識する；および/または

2) 例えばPER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Kd<15nM、さらに好ましくはKd<10nM、もっとも好ましくはKd<5nMである）；および/または

3) 好ましくは約100nM未満、好ましくは50nMまたは30nM未満のIC₅₀で、さらに好ましくは約10nMまたは5nMのIC₅₀で、最も好ましくは約0.5nMまたはさらには0.1nMのIC₅₀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PBM Cの注射によりSCIDマウスにおいて誘起された致死的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（T_{reg}）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ポ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」と同一の工

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(RASQNIGTSIQ)(配列番号：19)を有し、CDR2'はアミノ酸配列Ser-Ser-Ser-Glu-Ser-Ile-Ser(SSSESIS)(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(QQSNTWPFT)(配列番号：21)を有していた。

【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(YFNPYNHGTKYNEKFKG)(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。

【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單一ドメイン抗体と称される。

【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(YFNPYNHGTKYNEKFKG)(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。

【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

(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。

【0023】

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。

【0024】

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。

【0025】

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か、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。

【0026】

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。

【0027】

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。

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。

【0028】

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本鎖または單一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ンカーにより共有結合した抗体重鎖および軽鎖

10

20

30

40

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スペーサー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。

【0034】

例えば本明細書にて特記する配列、例えばCDR1(配列番号：2 2)、CDR2(配列番号：2 3)、CDR3(配列番号：2 4)、CDR1'(配列番号：1 9)、CDR2'(配列番号：2 0)、CDR3'(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。

【0035】

「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(CDR移植)モノクローナル抗体である。ヒト化(CDR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(FR)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、そしてなおさらには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(FR')に存在しない。

【0036】

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CD45ROおよびCD45RB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65%、さらに好ましくは少なくとも約75%、なおさらには好ましくは少なくとも約85%、最も好ましくは少なくとも約95%の全体配列相同性を有し、そしてCD45ROおよびCD45RB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：10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。

【0037】

「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CD45ROおよびCD45RB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

10

20

30

40

50

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。グルタミニルおよびアスパラギニル残基はしばしば翻訳後に対応するグルタミ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ル化、セリル、チロシンまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、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, *Protein s: 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ー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单一か、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GGCCAGTCAGAACATTTGGCACAA
AGCATACAGTG(配列番号:25);

CDR2のアミノ酸配列をコードするTTCTTCTGAGTCTATCTCTGG(配列番号:26);

CDR3のアミノ酸配列をコードするACAAAGTAATACCTGGCCATTCA
CGTT(配列番号:27);

CDR1'のアミノ酸配列をコードするTTATATTATCCACTG(配列番号:28);

CDR2'のアミノ酸配列をコードするTTTTAATCCTTACAATCATGGT
ACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCCAG(配列番号:29);

CDR3'のアミノ酸配列をコードするAGGACCCATGCCCTGGTTGAC
ACCTG(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

10

20

30

40

50

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m A b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；

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

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、

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

10

20

30

40

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

【0044】

配列番号：34もしくは配列番号：35のポリヌクレオチド、および／または、好ましくは配列番号：33；配列番号：14もしくは13のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド；

配列番号：34のポリペプチドおよび配列番号：33のポリペプチド、

配列番号：34のポリペプチドおよび配列番号：14のポリペプチド、

配列番号：34のポリペプチドおよび配列番号：13のポリペプチド、

10

配列番号：35のポリペプチドおよび配列番号：33のポリペプチド、

配列番号：35のポリペプチドおよび配列番号：14のポリペプチド、または

配列番号：35のポリペプチドおよび配列番号：13のポリペプチド。

【0045】

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。

【0046】

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：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：33、配列番号：34、もしくは配列番号：35のポリヌクレオチドのような、CDR1、CDR2、CDR3、CDR1'、CDR2'、CDR3'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：10、配列番号：31もしくは配列番号：32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：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：33、配列番号：34、または配列番号：35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：10、配列番号：31または配列番号：32に少なくとも80%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：10、配列番号：31または配列番号：32と少なくとも65%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：10、配列番号：31または配列番号：32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：10、配列番号：31または配列番号：32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：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：33、配列番号：34、もしくは配列番号：35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：10、配列番号：31もしくは配列番号：32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：10、配列番号：31もしくは配列番号：32のアミノ酸配列と少なくとも80%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：10のポリペプチドおよび／または配列番号：7もしく

20

30

30

31または配列番号：32に少なくとも80%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：10、配列番号：31または配列番号：32と少なくとも65%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：10、配列番号：31または配列番号：32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：10、配列番号：31または配列番号：32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：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：33、配列番号：34、もしくは配列番号：35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：10、配列番号：31または配列番号：32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：10、配列番号：31もしくは配列番号：32のアミノ酸配列と少なくとも80%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：10のポリペプチドおよび／または配列番号：7もしく

40

41

40

41または配列番号：32に少なくとも80%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：10、配列番号：31または配列番号：32と少なくとも65%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：10、配列番号：31または配列番号：32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：10、配列番号：31または配列番号：32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：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：33、配列番号：34、もしくは配列番号：35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：10、配列番号：31または配列番号：32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：10、配列番号：31もしくは配列番号：32のアミノ酸配列と少なくとも80%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：10のポリペプチドおよび／または配列番号：7もしく

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：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のポリペプチドのヒト化抗体の結合親和性を有する。

【0047】

例えばキメラまたはヒト化抗体であるCD45RO/RB結合分子を組換えDNA技術により生成することができる。したがって、CD45RO/RB結合分子をコードする1つまたはそれより多いDNA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。

【0048】

別の態様では本発明は本発明によるCD45RO/RB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CD45RO/RB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

【0049】

CD45RO/RB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の方法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239400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mAb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DNAセグメントを決定し、そして超可変領域をコードするDNAセグメントを除去する。2本鎖合成CDRカセットを本明細書にて特記するようなCDRおよびCDR'配列に従ってDNA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、例えば従来の方法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

【0050】

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

【0051】

別の態様では本発明は本発明によるCD45RO/RB結合分子をコードする、例えば配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：36、配列番号：37、配列番号：38、配列番号：39、配列番号：40または配列番号：41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。

【0052】

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CD45RO/RB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

【0053】

さらに本発明によるCD45RO/RB結合分子がインビトロMLR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CD45RO/RB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できが示される。これにより、本発明によるCD45RO/RB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事が確認される。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つたが、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応答する能力において低下したことが見出された。阻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応答する能力により実証された。したがつて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応答性、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。

【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事が見出された。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応答性の低減は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に応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、真の不応答状態にあることを示している。この応答の特異性は、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。

【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応答を阻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応答をも阻害する。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応答を阻害する能力により、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、同種反応性の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応答、ならびに記憶応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応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。

【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細胞増殖応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阻害特性を有することが見出された。

【0057】

したがつて本発明による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オ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

10

20

30

40

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、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/もしくは膵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、例えば膵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、例えば膵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む、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む、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徵候を低減させる、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 C D 4 5 R O / R B 結合分子をカルシニューリン阻害剤、例えばシクロスボリン A、シクロスボリン G、F K - 5 0 6、A B T - 2 8 1、A S M 9 8 1；m T O R 阻害剤、例えばラパマイシン、4 0 - O - (2 - ヒドロキシ)エチル - ラパマイシン、C C I 7 7 9、A B T 5 7 8、A P 2 3 5 7 3、A P 2 3 4 6 4、A P 2 3 6 7 5、A P 2 3 8 4 1、T A F A - 9 3、バイオリムス - 7 もしくはバイオリムス - 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；S 1 P 受容体アゴニスト、例えばF T Y 7 2 0 もしくはその類似体；レフルノミドもしくはその類似体；ミゾリビン；ミコフェノール酸；ミコフェノール酸モフェチル；15 - デオキシスペ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M H C、C D 2、C D S、C D 4、C D 1 1 a / C D 1 8、C D 7、C D 2 5、C D 2 7、B 7、C D 4 0、C D 4 5、C D 5 8、C D 1 3 7、I C O S、C D 1 5 0 (S L A M)、O X 4 0、4 - 1 B B もしくはそのリガンド、例えばC T L A 4 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C T L A 4 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C T L A 4 の少なくとも細胞外部分もしくは非C T L A 4 タンパク質配列に連結されたその変異体、例えばC T L A 4 1 g (例えばA T C C 6 8 6 2 9 に指定されている) もしくはその変異体、例えばL E A 2 9 Y、もしくはその他の付着分子阻害剤、例えばm A b もしくはL F A - 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V L A - 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

【 0 0 6 5 】

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 C D 4 5 R O / R B 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。20

【 0 0 6 6 】

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 C D 4 5 R O / R B 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合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。

【 0 0 6 7 】

「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、適合する担体、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

【 0 0 6 8 】

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ールのような適当な保存剤を含有することもできる。

【 0 0 6 9 】

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】

経口投与に適當な組成物を、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】

非経口投与に適當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。適當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當な担体処方を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ボリンA、FTY720、RAD、ラバマイシン、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

【0074】

単独でまたはその他の薬物と組み合わせて本発明の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、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を含む移植片拒絶、骨

40

50

髓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。

【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。

【0077】

以下の略語を用いる：

A P C	抗原提示細胞	
C E X	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	
d h f r	ジヒドロ葉酸リダクター	
E D T A	エチレンジニトリロ四酢酸	
E L I S A	酵素結合免疫吸着測定法	
E S I - Q - T O F	エレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間型	
F A C S	蛍光活性化細胞分類	
F c	結晶化可能フラグメント	
F (a b') ₂	抗原結合性フラグメント；2価	
F I T C	フルオレセインイソチオシアナート	
F B S	ウシ胎仔血清	40
G V H D	移植片対宿主病	
H C M V	ヒトサイトメガロウイルスプロモーター	
H P L C	高速液体クロマトグラフィー	
I F N -	インターフェロンガンマ	
I g E	免疫グロブリンアイソタイプE	
I g G	免疫グロブリンアイソタイプG	
I L - 2	インターロイキン-2	
I U	国際単位	
M A L D I - T O F	マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型	
M L R	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	10
T _{reg}	T調節細胞	
X G V H D	異種移植片対宿主病	

【0078】

実施例 1：1次混合リンパ球培養反応 (MLR)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。MLR 実験では 40 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 (Dynal, 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。ビーズおよび夾雜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。

【0079】

P B M C、C D 3⁺ T 細胞または C D 4⁺ T 細胞を MLR 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。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 > 75 % であった。10 % 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。

【0080】

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 1992 による。

【0081】

1次混合リンパ球培養反応 (MLR)

96 ウエル培養プレート (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 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 (50 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 μg / ml で加える実験もある。混合した細胞を 5 % C O₂ 中 37 度 4 または 5 日間培養し、そして最後の 16 から 20 時間の培養の間 ³H - 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 10 % 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

10

20

30

40

50

用いる；2) 2次架橋工程として抗マウス全 IgG (5 μg / 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 mA b」またはコントロールキメラ IgG1 (10 μg / 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 μg / ml) を用いて 1 次 MLR を実施する。「候補 mA b」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】

10

本発明による 10 μg / ml 候補 mA b 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】

20

表 1 で示し得るように本発明による候補 mA b 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 ± 6.83 % であり、そして統計的に有意である。

「候補 mA b」による 1 次 MLR の阻害は図 1 に示されるように「候補 mA b」の 0.001 および 10 μg の範囲で用量依存的であることが示される。

【0085】

「候補 mA b」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 mA b」またはコントロールキメラ A b の存在下で 10 μg / 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 A b の存在下の T 細胞増殖と比較して、「候補 mA b」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 ± 0.35 nM (0.13 ± 0.052 μg / ml) になる。

30

【0086】

実施例 2：2 次 MLR

「候補 mA b」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 MLR 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 MLR)。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 U / 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。

40

【0087】

具体的には、10 μg / ml 「候補 mA b」、コントロール IgG1 キメラ A b 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 mA b」の存在下

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(50U/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*

10

*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(50U/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細胞の機能的变化によるものであることが示される。

20

【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)。

30

【0091】

実施例3：SCIDマウスにおけるインビオ生存試験

SOLID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 100μl中最終濃度5mg/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。

40

【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/

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は肝臓、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 $\times G v H D$ 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】

C O S 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* のためのヒトカッパ軽鎖発現ベクター

ヒトカッパ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 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スクリプ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。*L B / 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 *3 m l* 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

VHQ 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 VHQ 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 PCR により組み立て、そして同一の酵素を用いて C21 インサートが除去されている C21 - HCMV - ガンマ - 1 発現にサブクローニングした。完全可変領域を含有する PCR スクリプトクローニング VHQ の Hind III / Bam HI 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 C21 - HCMV - ガンマ - 1 にサブクローニングした。これはヒト化抗体バージョン VHQ のための最終発現ベクターを生じた。

【0099】

VHE のためのヒトガンマ - 1 重鎖発現ベクター

10

ヒト化抗 IgE 抗体 TESC - 21 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 C21 - HCMV - ガンマ - 1 発現ベクターの Hind III および Bam HI 部位に、種々の領域をコードする Hind III および Bam HI 制限 PCR 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 VHE 発現ベクターの構築を達成した。

【0100】

COS 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 301305、Qiagen) を用いて以下のトランスフェクションプロトコルを 150 mm 細胞培養皿中の付着 COS 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 VHE または VHQ) を、軽鎖をコードする 2 つのクローンの各々 (各々 humV1 または humV2) 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 (VHE / humV1、VHE / humV2、VHQ / humV1 および VHQ / humV2) 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 Pvu 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に、新鮮培養培地 30 ml 中 4×10^6 COS 細胞を 150 mm 細胞培養皿に加える。この細胞密度での播種は一般に 24 時間後に 80% 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 DNA 発現ベクターの 4 つの異なる組み合わせ (各 15 μ g) を血清および抗生物質を含まない新鮮培地全容量 900 μ l に希釀する。次いで SuperFect トランスフェクション試薬 180 μ l を DNA 溶液と完全に混合する。DNA 混合物を室温で 10 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 COS 細胞培養から除去し、そして細胞を PBS で 1 回洗浄する。次に新鮮培養培地 9 ml (10% FBS 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 DNA 複合体と共に 37 および 5% CO₂ 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 30 ml で置換する。トランスフェクション後 48 時間に培養上澄を収集する。

20

30

30

40

【0101】

培養上澄の濃度

ELISA および FACS 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 COS 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 4310、Millipore) に製造者により記載されるように各上澄 10 ml を加える。Centriprep フィルターを室温で 3000 rpm で 10 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 20 ml で遠心工程を繰り返す。濃縮した上澄の中間体 500 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 42412、Microcon) に移

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3000 rpmで24分間を4回、6000 rpm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120 μl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一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骨髄腫トランスフェクタントの作成

マウス骨髄腫細胞系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(0.4 cmギャップ)中で各プラスミドのスーパーコイルDNA 20 μgをDMEM/10% FCS培養培地に懸濁した8 × 10⁶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1500 V、25 μF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1 mg活性薬物/mlまで加え、そして細胞を各ウェル200 μlの96ウェルプレートにウェルあたり約10⁵セルで分配する。10から15日後、G418生存クローニングを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ー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ニングを選択する。G418生存サブクローニングの生産性を再度前記したように決定する。培養容量が150 mlに到達するまでサブクローニングを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ーニングの後、最良の2個の生産体はVHE/humV1に関してはクローン1.33.25(3.87 pg/セル/日)およびクローン1.33.26(3.43 pg/セル/日)、そしてVHQ/humV1に関してはクローン12.1.4(1.19 pg/セル/日)およびクローン12.1.20(1.05 pg/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骨髄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 のためのヒトカッパ軽鎖発現ベクター：

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： 17 または配列番号： 18 から、 プライマー H u C D 4 5 L C - M 1 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： 42) および H u C D 4 5 L C - H i n d (5 ' - 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： 43) 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 1 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： 36 ; 図 6) および L C V L 2 S p 2 0 (配列番号： 39 ; 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。
。

【 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： 16 ; 図 3) および H C M V - G 1 H u A 6 - V H Q (配列番号： 15 ; 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 G G T G C A G C T G G T G G A G T C A - 3 ' ; 配列番号： 44) 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 G T G C A G C T G G T G G A G T C A - 3 ' ; 配列番号： 45) 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： 46) 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 で切斷した重鎖カセットベクター H C c a s s R E A L にクローニングする。 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。 このサブクロー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： 47) であるが、 これはサブクローニングの間に M A W V W T L P F L M A A A Q S V Q A (配列番号： 48) と置き換えられている。

【 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： 40 ; 図 10) および H C V H Q S P 2 0 (配列番号： 41 ; 図 11) 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。

【 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： 40 ; 図 10) および H C V H Q S P 2 0 (配列番号： 41 ; 図 11) 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HCVHEN73DSP20およびHCVHQN73DSP20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。HCVHEN73DSP20(配列番号：37)を軽鎖発現構築物LCV1SP20(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骨髄腫トランスフェクタントの作成

マウス骨髄腫細胞系SP2/0 Ag14.10をヒト化CD45RO/RB結合分子VHEN73D/humV1の重鎖(HCVHEN73DSP20；配列番号：37)および軽鎖(LCV1SP20；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2×10⁷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15μgと混合し、そして氷上に10分間置く。Biorad Gene Pulser(280Vおよび25μF)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(FC-S不含のRPMI基盤の培地)50mlに移し、そして37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(Genticin, G418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1μMに上げること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、サンドウィッチャ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プレート(カタログ番号4-39454、Nunc Immunoplate Maxisorp)をPBS中最終濃度0.5μl/mlのヤギ抗ヒトIgG(全分子、カタログ番号I1011、SIGMA)100μl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100μl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カッパ軽鎖(カタログ番号A-7164、SIGMA)100μl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100μl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

10

20

30

40

50

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ェ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 $100 \mu\text{l}$ 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 $100 \mu\text{l}$ の添加により比色反応を停止させ、そして E L I S A 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 = $8.26 \mu\text{g}/\text{ml}$

10

VHE/humV2 上澄 = $6.27 \mu\text{g}/\text{ml}$

VHQ/humV1 上澄 = $5.3 \mu\text{g}/\text{ml}$

VHQ/humV2 上澄 = $5.56 \mu\text{g}/\text{ml}$

【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 (約 10 min) 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。

20

【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% ト里斯-グリシングル、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。ウェスタンプ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。

30

【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。

40

【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

50

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。

【 0 1 1 7 】

E S I - Q - T O F 質量分析

次に S E C 分画 F 1、F 2 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 1 4 8 , 0 0 0 D a 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 1 5 2 , 5 0 0 D a の別の群のシグナルに加えて、(約 1 5 0 , 3 0 0 D a の) 第 2 のシグナル群が検出される。約 1 5 0 , 3 2 0 D a の第 2 のシグナル群は抗体形態で通常観察されるいすれとも相関し得なかった。これらの知見により、S E C の 2 個のピークおよび還元 S D S - P A G E の 2 個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 10 当することが示唆される。

【 0 1 1 8 】

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 (R P) クロマトグラフィー (SORBAX, Poroshell 300 S B - C 8) 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の後とほぼ同一である。保持時間のシフトが観察される。S E C 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、S E C 分画 1 および S E C 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、F 1 および F 2) が、その強度は分画 2 においては非常に低い (図 1 4)。 20

【 0 1 1 9 】

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 (R P) 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 個のピークを収集する。次いでこれらの R P 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 G 0 および G 1 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

【 0 1 2 0 】

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 S P 2 / 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 (N 7 3) を同定する。 40

【 0 1 2 1 】

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す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。S P 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 2 5 m M リン酸ナトリウムバッファー、p H 6 . 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 2 5 0 m M N a C l (= バッファー B ; 0 - 6 5 % 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 S E C 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 SEC 分析のプレピークに相関し、CEX のピークの第 2 の群は、タンパク質プールの SEC 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 CEX の最後のピークは SEC 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（SEC 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 CEX パターン、CEX で収集された分画に関して得られた SEC 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) SEC において二重ピークに至る質量異種性、および b) CEX パターンに至る還元 SDS-PAGE 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】

CEX 分画の分析的特徴付け

大きな抗体種は CEX 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 CEX により得られた様々な分画でシアル酸（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 CEX 分画で非常に豊富であるのと対照的に、ある CEX 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。CEX 分画を ESI-Q-TOF 質量分析により分析する。

20

【0124】

SDS-PAGE

また同一の分画を還元条件下で SDS-PAGE 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 CEX 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 CEX 分画約 1 mg をパパインで処理して抗体の F ab 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 RP カラムに再注入して F ab 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 ESI-Q-TOF 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 (G0)、1 個 (G1) または 2 個の末端 (G2) 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 (N73) 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 N73 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 SDS-PAGE、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】

VHE-N73D/humV1 の特徴付け

ヒト化 VHE/humV1、VHE/humV2、VHQ/humV1 および VHQ/humV2 抗体の異種性を排除するために、重鎖の可変ドメインの N73 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 VHE-N73D/humV1 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レ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。

10

【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】

20

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分で)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)。

30

【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、参考として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。PEER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25μl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200μlで洗浄する。続いて細胞をFACSバッファー25μl中最終濃度20μg/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2μg/mlヨウ化プロピジウムを含有するFACSバッファー300μlに再懸濁する。細胞調製物をフローサイトメーター(FACSCalibur, B

40

50

ecton Dickinson) で分析する。

【0134】

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。

【0135】

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 10 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 度 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 1 0 0 μL を各試料に加え、そして 4 度さらに 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。

【0136】

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 20 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。

【0137】

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。

【0138】

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オシアナート (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 4 0 0 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 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。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 5 0 μL 中 4 度 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 1 5 0 μL 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 5 0 μL 中 4 度 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 2 0 0 μL 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。

【0139】

10

20

30

40

50

蛍光シグナルの低減により未標識V H E - N 7 3 D / h u m V 1 および未標識キメラ抗C D 4 5 R O / R B m A b はF I T C 標識キメラ抗C D 4 5 R O / R B m A b のC D 4 5 発現P E E R 細胞への結合を防御するが、I g G 1 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、V H E / h u m V 1 抗体のV H E - N 7 3 D / h u m V 1 への修飾はヒト化抗C D 4 5 R O / R B 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。

【 0 1 4 0 】

V H E - N 7 3 D / h u m V 1 のヒトまたはカニクイザルC D 4 5 に関する親和性

V H E - N 7 3 D / h u m V 1 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、V H E - N 7 3 D / h u m V 1 のヒトC D 4 5 発現T 細胞系P E E R またはカニクイザルC D 4 5 発現T 細胞系H S C - 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

【 0 1 4 1 】

簡単には、種々の濃度の未標識競合抗体の存在下、P E E R またはH S C - F のF I T C 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、F I T C 標識マウス由来の抗ヒトC D 4 5 R O / R B 結合分子A 6 (m A 6) 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F I T C 結合m A 6 y e s (マウス由来抗h u C D 4 5) 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P E E R またはH S C - F 細胞系の表面上の標的分子、C D 4 5 の濃度を決定する。細胞性C D 4 5 受容体および既知のそのF I T C 結合リガンドの濃度で、F I T C 結合m A 6 の細胞性C D 4 5 受容体に対する親和性をF A C S 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V H E - N 7 3 D / h u m V 1 の親和性を、V H E - N 7 3 D / h u m V 1 の全濃度の関数として、F I T C 蛍光の増加を測定する、P E E R またはH S C - F 細胞上のF I T C 結合m A 6 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V H E - N 7 3 D / h u m V 1 に関する解離定数(K d) 値を算出する。 20

【 0 1 4 2 】

1つの実験では、標的C D 4 5 R O / R B 結合分子に結合する2価抗体と仮定すれば、ヒトP E E R 細胞性標的に関するV H E - N 7 3 D / h u m V 1 の解離定数は2.44 ± 0.07 n Mと算出され、カニクイザルH S C - F 細胞標的に関しては1.67 ± 0.00 n Mと算出される。 30

【 0 1 4 3 】

実施例7：C D 4 5 R B / R O 結合分子の生物学的活性

この研究では、C D 4 5 R B / R O 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T r e g 表現型を有するT 細胞の分化を支持する、(i i) 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(i i i) 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

【 0 1 4 4 】

C D 4 5 R B / R O 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(C D 4 + およびC D 8 + T サブセットの混合物)をC D 4 5 R B / R O 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C D 3 プラス抗C D 2 8 m A b (各々2 0 0 n g / m l)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D N A 染色色素として7 - アミノアクチノマイシンD(7 - A A D)を用いて活性化の後の細胞死を測定する。結果により、C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体の存在下でのT 細胞の活性化が7 - A A D 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。

10

【 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事が報告されている。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。

20

【 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。

30

【 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 10 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事を示し得る。

40

【 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 】

D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S F S C R A S Q N I G T S I Q W Y Q Q R T N G S P R I L I R S S S E S I S G I P S R F S G

S G S G T D F T L S I N S V E S E D I A D Y Y C Q Q S N T W P F T F G S G T K L E I K

50

【0150】

配列番号：2

キメラ重鎖のアミノ酸配列の一部

【表4】

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIIHWVKQEPGQGLEWIGYFNPYNHGTKY
NEKFGRATLTADKSSNTAYMDLSSLTSEDSAIYYCARSGPYAWFDTWGQGTTVTVSS

【0151】

配列番号：3

キメラ軽鎖のアミノ酸配列

【表5】

DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQNIQTSIQWYQQRTNGSPRLLIRSSSESISGIPSRFSG
 SGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSNTWPFSGSTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLTLKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

【0152】

配列番号：4

キメラ重鎖のアミノ酸配列

20

【表6】

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIIHWVKQEPGQGLEWIGYFNPYNHGTKY
NEKFGRATLTADKSSNTAYMDLSSLTSEDSAIYYCARSGPYAWFDTWGQGTTVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

【0153】

配列番号：5

配列番号：1のポリペプチドをコードするスクレオチド配列

【表7】

GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCA
 GTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAAGCATAAGTGGTATCAACAAAGA
 ACAAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAGGTCTTCTGAGTCTATCTCTGGATCCCT
 TCCAGGTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACTCTAGCATCACAGTGTGGA
 GTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACGTTGG
 CTCGGGACCAAGCTTGAATCAA

40

【0154】

配列番号：6

配列番号：2のポリペプチドをコードするスクレオチド配列

【表 8】

GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGAACCTGGTAAAGCCTGGGCTTCAGTGAAG
 ATGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTAAATCCTACAATCATGGTACTA
 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCTCCAACACA
 GCCTACATGGACCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGATCTACTACTGTGCAA
 GATCAGGACCCATGCCTGGTTGACACCTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
 CTCA

10

【0155】

配列番号：7

humV2 (humV2 = VLm) 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 FTLTISSELP EDFAVYYCQQ SNTWPFTFGQ GTKLEIK

【0156】

配列番号：8

humV1 (humV1 = VLh) 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 FTLTISSELP EDFAVYYCQQ SNTWPFTFGQ GTKLEIK

【0157】

配列番号：9

VHE と称されるヒト化重鎖のアミノ酸配列の一部

【表 11】

30

EVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIHWVKQE PGQGLEWIGY
FNPYNHGT KY NEKFGRATL TANKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

【0158】

配列番号：10

VHQ と称されるヒト化重鎖のアミノ酸配列の一部

【表 12】

40

QVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIHWVKQE PGQGLEWIGY
FNPYNHGT KY NEKFGRATL TANKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

【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】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTAAAAAGCCTGGGCTTCAGTGAAG
 GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATAACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGTGAAGCA
 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAAACAAATCCATCAGCACA
 GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
 GATCAGGACCCATGCCTGGTTGACACCTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC

CTCA

10

【0160】

配列番号：12

配列番号：10 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列

【表 1 4】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTAAAAAGCCTGGGCTTCAGTGAAG
 GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATAACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGTGAAGCA
 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAAACAAATCCATCAGCACA
 GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
 GATCAGGACCCATGCCTGGTTGACACCTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC

CTCA

20

【0161】

配列番号：13

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】

GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
 CTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATAAGTGGTATCAACAAAAAA
 ACAAAATGGTGCTCCAAGGCTTCTCATAGGTCTTCTGAGTCTATCTCTGGATCCC
 TTCCAGGTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
 AGCCTGAAGATTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATAACCTGGCCATTACGTTC
 GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA

30

【0162】

配列番号：14

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】

40

GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
 CTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATAAGTGGTATCAACAAAAAA
 CCAGGTCAAGGCTCCAAGGCTTCTCATAGGTCTTCTGAGTCTATCTCTGGATCCC
 TTCCAGGTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
 AGCCTGAAGATTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATAACCTGGCCATTACGTTC
 GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA

【0163】

配列番号：15

50

発現ベクター H C M V - G 1 H u A 6 - V H Q のヌクレオチド配列
 (3 9 2 1 - 4 2 7 4 からの配列番号 : 1 2 (V H Q) を含むヒト化重鎖発現ベクターの
 完全 D N A 配列)
 【表 1 7 】

1	AGCTTTTGCAAAAGCCTAG GCCTCCAAAA AAGCCTCCCTC ACTACTCTG	
51	GAATAGCTCA GAGGCCGAGG CGGCCTCGGC CTCTGCATAA ATAAAAAAA	
101	TTAGTCAGCC ATGGGGCGGA GAATGGCGGG AACTGGGCAG AGTTAGGGC	
151	GGGATGGCGG CAGTTAGGGG CGGGACTATG GTTGCTGACT AATTGAGATG	
201	CATGCTTTGCA ATACCTCTGC CTGCTGGGA GCCTGGTTGC TGACTAATG	10
251	AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT GGGGAGCCAG GGGACTTTCC	
301	ACACCCCTAAC TGACACACAT TCCACAGCTG CCTCGCGCGT TTCCGTGATG	
351	ACGGTAAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACAGGT CACAGCTTGT	
401	CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG	
451	TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACCGT AGCGATAGCG	
501	GAGTGTATACT TGGCTTAACAT ATGCCGCATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG	
551	TGGCACCATAAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC	
601	CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCCTGCTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT	20
651	CGTTGGCTG CGGGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGGC GTAATACGGT	
701	TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC	
751	CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA	
801	TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA	
851	GGTGGCGAAA CGCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCCTT TCCCCCTGGA	
901	AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCCGACC CTGCGCTTA CCGGATAACCT	
951	GTCCGGCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAT AGCTCACCGCT	
1001	GTTAGGTATCT CAGTTGGTG TAGGTGTTG GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG	
1051	CAAGAACCCC CCGTTTCAGCC CGACCGCTCC GCCTTATCCG GTAACATATCG	30
1101	TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA	
1151	CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC	
1201	TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT	
1251	CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT	
1301	GATCCGGCAA ACAAACCAAC GCTGGTAGCG GTGGTTTTT TGTTGCAAG	

【表18】

1351	CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT	
1401	TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAACTCACGT TAAGGGATTT	
1451	TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCTT TTTAAATTAA	
1501	AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA	
1551	CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT	
1601	TTCGTTCATC CATACTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTAACGATA	
1651	CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC	10
1701	ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG	
1751	CCGAGGCGAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT	
1801	AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGC	
1851	CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG	
1901	GTATGGCTTC ATTCAAGCTCC GGTTCCCAAC GATCAAGGGCG AGTTACATGA	
1951	TCCCCCATGT TGTGCAAAAA ACCGGTTAGC TCCCTTCGGTC CTCCGATCGT	
2001	TGTCAAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC	
2051	TGCATAATTTC TCTTACTPGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT	
2101	GGTGAGTACG CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TACTGTATGC GGCGACCGAG	20
2151	TTGCTCTTGC CGCGCGTCAA CACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA	
2201	CTTTAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTGGGGCG AAAACTCTCA	
2251	AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTGGTGCACC	
2301	CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC CAGCGTTCT GGGTGAGCAA	
2351	AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA	
2401	TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA	
2451	GGGTTATTGT CTCACTGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA	
2501	AACAAATAGG GGTCCCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC	
2551	TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GGCGTATCAC	30
2601	GAGGCCCTTT CGCTTCAAG AATTCAGCTT GGCTGCAGTG AATAATAAAA	
2651	TGTGTGTTTG TCCGAAATAC GCGTTTGAG ATTTCTGTGCG CCGACTAAAT	
2701	TCATGTGCG CGATAGTGTT GTTATCGCC GATAGAGATG GCGATATTGG	
2751	AAAAATCGAT ATTGAAAAT ATGGCATATT GAAAATGTGCG CCGATGTGAG	
2801	TTTCTGTGTA ACTGATATCG CCATTTTCC AAAAGTGATT TTTGGGCATA	
2851	CGCGATATCT GGCGATAGCG CTTATATCGT TTACCGGGGA TGGCGATAGA	
2901	CGACTTTGGT GACTGGCG ATTCCTGTGCG TCGCAAATAT CGCAGTTTCG	
2951	ATATAGGTGA CAGACGATAT GAGGCTATAT CGCCGATAGA GGCGACATCA	40
3001	AGCTGGCACA TGGCCAATGC ATATCGATCT ATACATTGAA TCAATATTGG	
3051	CCATTAGCCA TATTATTATCAT TGGTTATATA GCATAAAATCA ATATTGGCTA	
3101	TTGGCCATTG CATACTGTGT ATCCATATCA TAATATGTAC ATTTATATTG	
3151	GCTCATGTCC AACATTACCG CCATGTTGAC ATTGATTATT GACTAGTTAT	

【表19】

3201	TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT CATAGCCCAT ATATGGAGTT	
3251	CCCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA CCGCCCAACG	
3301	ACCCCCGCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA	
3351	ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTTAC GGTAAACTGC	
3401	CCACTTGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCCCTATTG	
3451	ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC	
3501	TTATGGGACT TTCTTACCTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT	10
3551	TACCATGGTG ATGCGGGTTTT GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT	
3601	TTGACTCACG GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGACT	
3651	TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC GTAACAACTC	
3701	CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA	
3751	TAAGCAGAGC TCGTTTAGTG AACCGTCAGA TCGCCTGGAG ACGCCATCCA	
3801	CGCTGTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCAA	
3851	GCTTGCCTGCC ACCATGGACT GGACCTGGAG GGTGTTCTGC CTGCTGGCCG	
3901	TGGCCCCCGG CGCCACACAGC CACGTGCACC TGTCGGAGTC AGGAGCCGAA	
3951	GTGAAAAAGC CTGGGGCTTC AGTGAACGTG TCCTGCAAGG CCTCTGGATA	20
4001	CACATTCACT AATTATATTA TCCACTGGGT GAAGCAGGAG CCTGGTCAGG	
4051	GCCTTGAATG GATTGGATAT TTTAATCCTT ACAATCATGG TACTAAGTAC	
4101	AATGAGAAAGT TCAAAGGCAG GGCCACACTA ACTGCAAACA AATCCATCAG	
4151	CACAGCCTAC ATGGAGCTCA CCAGCCTGCG CTCTGAGGAC ACTGGGTCT	
4201	ACTACTGTGC AAGATCAGGA CCCTATGCCT GGTGGACAC 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	30
4451	TCTGOGCCCT GGGCCCAGCT CTGTCCCACA CCGCGGTAC ATGGCACCAC	
4501	CTCTCTTGCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT	
4551	CCTCCAAAGAG CACCTCTGGG GGCACACGGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG	
4601	GAECTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTG TGGAACTCAG GCGCCCTGAC	
4651	CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCT ACAGTCCTCA GGACTCTACT	
4701	CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC	
4751	TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA	
4801	AGTTGGTGAG AGGCCACGCAG AGGGAGGGAG GGTGTCTGCT CGAAGCCAGG	40
4851	CTCAGCGCTC CTGCCCTGGAC GCATCCCGGC TATGCAGCCC CAGTCCAGGG	
4901	CAGCAAGGCA GGCCCCGTCT GCCTCTTCAC CCGGAGGCCT CTGCCCCGCC	
4951	CACTCATGCT CAGGGAGAGG GTCTTCTGGC TTTTTCCCCA GGCTCTGGGC	
5001	AGGCACAGGC TAGGTGCCCT TAACCCAGGC CCTGCACACA AAGGGCCAGG	

【表20】

5051	TGCTGGGCTC AGACCTGCCA AGAGCCATAT CGGGGAGGAC CCTGCCCTG	
5101	ACCTAAGCCC ACCCAAAGG CCAAACCTCTC CACTCCCTCA GCTCGGACAC	
5151	CTTCTCTCCT CCCAGATTCC AGTAACCTCCC AATCTTCTCT CTGCAGAGCC	
5201	CAAATCTTGT GACAAAACTC ACACATGCCA ACCGTGCCA GGTAAGCCAG	
5251	CCCAGGCCCTC CCCCTCCAGC TCAAGGGGGG ACAGGTGCC TAGAGTAGCC	
5301	TGCATCCAGG GACAGGGCCCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT	
5351	CTTCCTCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC	10
5401	CCAAAACCCA AGGACACCCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTACATG	
5451	CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACCAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT	
5501	ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG	
5551	CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCTCACCG TCCIGCACCA	
5601	GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC	
5651	TCCCCAGCCCG CATCCAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG TGGGACCCGT	
5701	GGGGTGGCGAG GGCCACATGG ACAGAGGCCG GCTGGGCCCA CCCTCTGCC	
5751	TGACAGTGAC CGCTGTACCA ACCTCTGTCC CTACAGGGCA GCGCCGAGAA	
5801	CCACAGGTGT ACACCCCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA	20
5851	GGTCAGGCCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATGCCCG	
5901	TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACCCCT	
5951	CCCGTGTGG ACTCCGACGG CTCTTCTCTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT	
6001	GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC	
6051	ATGAGGCTCT GCACAACAC TACACGCCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG	
6101	GGTAAATGAG TGCACGGCC GGCAAGCCCC CGCTCCCCGG GCTCTCGCGG	
6151	TCCCACGGAGG ATGCTTGGCA CGTACCCCCCT GTACATACTT CCCGGGGCGCC	
6201	CACCATGGAA ATAAGCACC CAGCGCTGCC CTGGGCCCC GCGAGACTGT	
6251	GATGGTTCTT TCCACGGGTC AGGCCGAGTC TGAGGCCTGA GTGGCATGAG	30
6301	ATCTGATATC ATCGATGAAT TCGAGCTCGG TACCCGGGGA TCGATCCAGA	
6351	CATGATAAGA TACATTGATG AGTTTGACA AACCAACAAT AGAATGCAGT	
6401	AAAAAAATG CTTTATTGTG GAAATTGTG ATGCTATTGC TTTATTGTGTA	
6451	ACCATTATAA GCTGAAATAA ACAAGTTAAC AACAAACAATT GCATTCAITTT	
6501	TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA GGTTTTTAA AGCAAGTA	
6551	ACCTCTACAA ATGTGGTATG GCTGATTATG ATCTCTAGTC AAGGCACTAT	
6601	ACATCAAAATA TTCCCTTATTA ACCCCTTAC AAATTAAAAA GCTAAAGGTA	
6651	CACAAATTGTT GAGCATAGTT ATTAATAGCA GACACTCTAT GCCTGTGTGG	40
6701	AGTAAGAAAA AACAGTATGT TATGATTATA ACTGTTATGC CTACTTATAA	
6751	AGGTTACAGA ATATTTTCC ATAATTCTCT TGTATAGCAG TGCAGCTTT	
6801	TCCTTGTGG TGTAAATAGC AAAGCAAGCA AGAGTTCTAT TACTAAACAC	
6851	ACCATGACTC AAAAACCTTA GCAATTCTGA AGGAAAGTCC TTGGGGTCTT	

【表21】

6901 CTACCTTTCT CTTCTTTTTT GGAGGGAGTAG AATGTTGAGA GTCAGGCAGTA
 6951 GCCTCATCAT CACTAGATGG CATTCTTCT GAGCAAAACA GGTTTCCCTC
 7001 ATTAAGGCA TTCCACCACT GCTCCCATTG ATCAGTTCCA TAGGTTGGAA
 7051 TCTAAAATAC ACAAAACAATT AGAATCAGTA GTTTAACACA TTATACACTT
 7101 AAAAATTTA TATTACCTT AGAGCTTAA ATCTCTGTAG GTAGTTGTC
 7151 CAATTATGTC ACACCCACAGA AGTAAGGTTG CTTACAAAG ATCCGGGACC
 7201 AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC AGTTGGGGG CATGGATGCG
 7251 CCGATAGCCG CTGCTGGTT CCTGGATGCC GACGGATTG CACTGCCGGT 10
 7301 AGAACTCCGC GAGGTCGTCC AGCCTCAGGC AGCAGCTGAA CCAACTCGCG
 7351 AGGGGATCGA GCCCGGGGTG GGGGAAGAAC TCCAGCATGA GATCCCCGCG
 7401 CTGGAGGATC ATCCAGCCGG CGTCCCCGAA AACGATTCCG AAGCCCAACC
 7451 TTTCATAGAA GGCAGGGGTG GAATCGAAAT CTCGTGATGG CAGGTTGGCC
 7501 GTCGCTTGGT CGGTCTTTC GAACCCAGA GTCCCGCTCA GAAGAACTCG
 7551 TCAAGAAGGC GATAGAAGGC GATGCCGTGC GAATGGGAG CGGGATACC
 7601 GTAAAGCACG AGGAAGCGGT CAGCCCCATTG GCCGCCAAGC TCTTCAGCAA
 7651 TATCACGGGT ACCCARCGCT ATGTCCTGAT AGCGGTCCCG CACACCCAGC 20
 7701 CGGCCACAGT CGATGAATCC AGAAAGCGG CCATTTCCA CCATGATATT
 7751 CGGCAAGCAG GCATGCCAT GGGTCACGAC GAGATCCTCG CGTCCGGGCA
 7801 TGGCGCCCTT GAGCCTGGCG AACAGTCGG CTGGCCGAG CCCCTGATGC
 7851 TCTTOGTCCA GATCATCCTG ATCGACAAGA CCGGCTTCCA TCCGAGTACG
 7901 TGCTCGCTCG ATGCCATGTT TCGCTGGTG GTCGAATGGG CAGGTAGCCG
 7951 GATCAAGCGT ATGCAGCCGC CGCATTGCAAT CAGCCATGAT GGATACTTTC
 8001 TCGGCAGGAG CAAGGTGAGA TGACAGGAGA TCCTGCCCG GCACCTCGCC
 8051 CAATAGCAGC CAGTCCCTTC CCGCTTCAGT GACAACGTG AGCACAGCTG 30
 8101 CGCAAGGAAC GCCCCTCGTG GCCAGCCACG ATAGCCGCGC TGCCTCGTCC
 8151 TGCAGTTCAT TCAGGGCACC GGACAGGTG GTCTTGACAA AAAGAACCGG
 8201 GCGCCCCCTGC GCTGACAGCC GGAACACGGC GGCATCAGAG CAGCCGATTG
 8251 TCTGTTGTGC CCAGTCATAG CGAATAGCC TCTCCACCCA AGCGGCCGG
 8301 GAACCTGCGT GCAATCCATC TTGTTCAATC ATGCGAARCG ATCCTCATCC
 8351 TGTCTCTTGA TCAGATCTTG ATCCCCCTGCG CCATCAGATC CTTGGCGGGCA
 8401 AGAAAGCCAT CCAGTTACT TTGCAGGGCT TCCCAACCTT ACCAGAGGGC
 8451 GCCCCAGCTG GCAATTCCGG TTGCGCTGCT GTCCATAAAA CGGCCAGTC
 8501 TAGCTATCGC CATGTAAGCC CACTGCAAGC TACCTGCTTT CTCTTGC
 8551 TTGCGTTTTC CCTTGTCCAG ATAGCCAGT AGCTGACATT CATCCGGGT 40
 8601 CAGCACCGTT TCTGCCGACT GGCTTCTAC GTGTTCCGCT TCCTTTAGCA
 8651 GCGCTTGCCT CCTGAGTGCT TGCGCCAGCG TGAAGCT

【0164】

配列番号：16

発現ベクターHCMV-G1 HuA6-VHEのヌクレオチド配列

(3921-4274からの配列番号：11(VHE)を含むヒト化重鎖発現ベクターの完全DNA配列)

【表 2 2】

1	AGCTTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAAGCCTCCTC	ACTACTTCTG				
51	GAATAGCTCA	GAGGCCGAGGCGGCCTCGGC	CTCTGCATAAATAAAAAAA			
101	TTAGTCAGCC	ATGGGGCGGA	GAATGGGCGGAACTGGGCGGAGTTAGGGGC			
151	GGGATGGGCG	GAGTTAGGGGCGGGACTATG	GTTGCTGACTAATTGAGATG			
201	CATGCTTGC	ATACTTCTGC	CTGCTGGGGA	GCCTGGTTC	TGACTAATTG	
251	AGATGCATGC	TTTGCATACT	TCTGCCCTGCT	GGGGAGCCTG	GGGACTTTCC	
301	ACACCCCTAAC	TGACACACAT	TCCACAGCTG	CCTCGCCGT	TTCGGTGATG	10
351	ACGGTGAAAA	CCTCTGACAC	ATGCAGCTCC	CGGAGACGGT	CACAGCTTGT	
401	CTGTAAGCGG	ATGCCGGGAG	CAGACAAGCC	CGTCAGGGCG	CGTCAGCGGG	
451	TGTTGGCGGC	TGTCCGGGCG	CAGCCATGAC	CCAGTCACGT	AGCGATAGCG	
501	GAGTGTATAAC	TGGCTTAAC	ATGCCGCATC	AGAGCAGATT	GTACTGAGAG	
551	TGCCACATAT	GGGGTGTGAA	ATACCGCACA	GATGCGTAAG	GAGAAAATAC	
601	CGCATCAGGC	GCTCTCCGC	TTCCCTCGCTC	ACTGACTCGC	TGCGCTCGGT	
651	CGTTCGGCTG	CGGGAGCGG	TATCAGCTCA	CTCAAAGGGCG	GTAATACGGT	
701	TATCCACAGA	ATCAGGGAT	AACGCAGGAA	AGAACATGTG	AGCAAAAGGC	
751	CAGCAAAAGG	CCAGGAACCG	TAAAAAGGCC	GGTTGCTGG	CGTTTTTCCA	20
801	TAGGCTCCGC	CCCCCTGACG	AGCATCACAA	AAATCGACGC	TCAAGTCAGA	
851	GGTGGCCAAA	CCCCACAGGA	CTATAAAGAT	ACCAGGCGTT	TCCCCCTGGAA	
901	AGCTCCCTCG	TGCGCTCTCC	TGTTCCGACC	CTGCCGCTTA	CCGGATACCT	
951	GTCCGCCTTT	CTCCCCCTCGG	CAAGCGTGGC	GCTTCTCAT	AGCTCACGCT	
1001	GTAAGGTATCT	CAGTTGGTG	TAGGTGGTTC	GCTCCAAGCT	GGGCTGTGTG	
1051	CAOGAACCCCC	CCGTTCAGCC	CGACCGCTGC	GCCTTATCCG	GTAACTATCG	
1101	TCTTGAGTCC	AACCCGGTAA	GACACGACTT	ATGCCCACTG	GCAGCAGCCA	
1151	CTGGTAACAG	GATTAGCAGA	GGGAGGTATG	TAGGGCTGC	TACAGAGTT	30
1201	TTGAAGTGGT	GGCCTAACTA	CGGCTACACT	AGAAGGACAG	TATTTGGTAT	
1251	CTGGCGCTCTG	CTGAAGCCAG	TTACCTTCGG	AAAAAGAGTT	GGTAGCTCTT	
1301	GATCCGGCAA	ACAAACCACC	GCTGGTAGCG	GTGGTTTTTT	TGTTTGCAAG	
1351	CAGCAGATTA	CGCGCAGAAA	AAAAGGATCT	CAAGAAGATC	CTTTGATCTT	
1401	TTCTAAGGGG	TCTGACGCTC	AGTGGAACGA	AAACTCACGT	TAAGGGATTT	
1451	TGGTCATGAG	ATTATCAAAA	AGGATCTTCA	CCTAGATCCT	TTTAAATTAA	
1501	AAATGAAGTT	TTAAATCAAT	CTAAAGTATA	TATGAGTAAA	CITGGTCTGA	

【表23】

1551	CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT	
1601	TTCGTTCATC CATACTGCC TGACTCCCCG TGGTGTAGAT AACTACGATA	
1651	CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT GCAATGATAAC CGCGAGACCC	
1701	ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG	
1751	CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT	
1801	AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG ACTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG	
1851	CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG	
1901	GTATGGCTTC ATTCAAGCTCC GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATCA	10
1951	TCCCCCATGT TGTCCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT	
2001	TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATPC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC	
2051	TGCATAATTTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT	
2101	GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG	
2151	TTGCTCTTGC CCGCGTCAA CACGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA	
2201	CTTTAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTGGGGCG AAAACTCTCA	
2251	AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC	
2301	CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTCAC CAGCGTTCTI GGCGAGCAA	20
2351	AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA	
2401	TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA	
2451	GGGTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA	
2501	AACAAATAGG GGTCGCGCG ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC	
2551	TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GGCGTATCAC	
2601	GAGGCCCTT CGTCTTCAAG AATTCAAGCTT GGCTCCAGTG AATAATAAA	
2651	TGTGTGTTG TCGAAATAC GCGTTTGAG ATTCTGTGCG CCGACTAAAT	
2701	TCATGTGCG CGATAGTGGT GTTTATGCC GATAGAGATG GCGATATTGG	
2751	AAAAATCGAT ATTGAAAT ATGGCATATT GAAAATGTOG CCGATGTGAG	30
2801	TTTCTGTGTA ACTGATATCG CCATTTTCC AAAAGTGTATT TTGGGCATA	
2851	CCCGATATCT GGCGATAGCG CTTATATCGT TIAACGGGGA TGGCGATAGA	
2901	CGACTTTGGT GACTGGCG ATTCTGTG TGCGAAATAT CGCAGTTTCG	
2951	ATATAGGTGA CAGACGATAT GAGGCTATAT CGCCGATAGA GGCGACATCA	
3001	ACCTGGCACA TGGCCAATGC ATATCGATCT ATACATTGAA TCAATATTGG	
3051	CCATTAGCCA TATTATTCA TGGTTATATA GCATAAAATCA ATATGGCTA	
3101	TTGGCCATTG CATACTGTT ATCCATATCA TAATATGTAC ATTATATTG	
3151	GCTCATGTCC AACATTACCG CCATGTGAC ATGATTATT GACTAGTTAT	40
3201	TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCAATTAGTT CATAGCCCAT ATATGGAGTT	
3251	CCCGGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA CGGCCAACG	
3301	ACCCCCGCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAAACGCCA	
3351	ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGTG GAGTATTAC GGTAAACTGC	

【表24】

3401	CCACTTGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCGAAGTAOG CCCCTTATTG	
3451	ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC	
3501	TTATGGGACT TTCCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT	
3551	TACCATGGTG ATGCCGTTTT GGCAGTACAT CAATGGCGT GGATAGCGGT	
3601	TTGACTCACCG GGGATTTCGA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGACT	
3651	TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC GTAAACAACTC	10
3701	CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA	
3751	TAAGCAGAGC TCGTTTACTG AACCCTCAGA TCGCCCTGGAG ACGCCATCCA	
3801	CGCTGTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCOA 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 GATGGATAT TTTAATCCTT ACAATCATGG TACTAAGTAC	
4101	AATGAGAAAGT TCAAAGGCAG GGCCACACTA ACTGCAAACA AATCCATCAG	
4151	CACAGCCTAC ATGGAGCTCA GCAGCCTGGC CTCTGAGGAC ACTGCCGTCT	20
4201	ACTACTGTGC AAGATCAGGA CCCTATGCCT GGTGACAC CTGGGGCCAA	
4251	GGGACCAACGG TCACCGTCTC CTCAGGTGAG TTCTAGAAGG ATCCCAAGCT	
4301	AGCTTCTGG GGCAGGCCAG GCCTGACCTT GGCTTGGGG CAGGGAGGGC	
4351	GCTAAGGTGA GGCAGGTGGC GCCAGCCAGG TGACACCCCA ATGCCATGA	
4401	GCCCAGACAC TGGACGCTGA ACCTCGCGGA CAGTTAAGAA CCCAGGGGCC	
4451	TCTGCGCCCT GGGCCCAGCT CTGTCACACA CGCGGGTCAC ATGGCACCAC	
4501	CTCTCTTGCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT	
4551	CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG	
4601	GAATACTTCC CGAACCCGGT GACGGTGTGCG TGGAACTCAG GCGCCCTGAC	30
4651	CAGCGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTC ACAGTCCTCA GGACTCTACT	
4701	CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC	
4751	TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA	
4801	AGTTGGTGAG AGGCCAGCAC AGGGAGGGAG GGTGTCCTGCT GGAAGCCAGG	
4851	CTCAGCGCTC CTGCCCTGGAC GCATCCCGGC TATGCAGCCCC CAGTCCAGGG	
4901	CAGCAAGGCA GGCCCCGTCT GCCTCTTCAC CCCGAGGCCCT CTGCCCGCCC	
4951	CACTCATGCT CAGGGAGAGG GTCTTCTGGC TTTTTCCCCA GGCTCTGGC	
5001	AGGCACAGGC TAGGTCCCCC TAACCCAGGC CCTGCACACAA AAGGGCAGG	40
5051	TGCTGGGCTC AGACCTGCCA AGAGCCATAT CCGGGAGGAC CCTGCCCTG	
5101	ACCTAAGCCC ACCCCAAAGG CCAAACCTCTC CACTCCCTCA CCTCGGACAC	
5151	CTTCTCTCCT CCCAGATTCC AGTAACCTCCC AATCTTCTCT CTGCAGAGCC	
5201	CAAATCTTGT GACAAAATC ACACATGCC ACCGTGCCCA GTAAAGCCAG	

【表25】

5251	CCCAGGCCCTC	GCCCTCCAGC	TCAAGGGGGG	ACAGGTGCC	TAGAGTAGCC	
5301	TGCATCCAGG	GACAGGCC	AGCCGGGTGC	TGACACGTCC	ACCTCCATCT	
5351	CTTCCTCAGC	ACCTGAACTC	CTGGGGGGAC	CGTCAGTCTT	CCTCTTCCCC	
5401	CCAAAACCCA	AGGACACCC	CATGATCTCC	CGGACCCCTG	AGGTACACATG	
5451	CGTGGTGGTG	GACGTGAGCC	ACGAAGACCC	TGAGGTCAAG	TTCAACTGGT	10
5501	ACGTGGACGG	CGTGGAGGTG	CATAATGCCA	AGACAAAGCC	GGGGGAGGAG	
5551	CAGTACAACA	GCACGTACCG	TGTGGTCAGC	GTCTCAGCG	TCTGCACCA	
5601	GGACTGGCTG	AATGCCAAGG	AGTACAAGTG	CAAGGTCTCC	AACAAAGCCC	
5651	TCCCAGCCCC	CATCGAGAAA	ACCATCTCCA	AAGCCAAAGG	TGGGACCCGT	
5701	GGGGGTGCGAG	GGCCACATGG	ACAGAGGCCG	GCTCGGCCCC	CCCTCTGCC	
5751	TGAGAGTGAC	CGCTGTACCA	ACCTCTGTCC	CTACAGGGCA	GCCCCGAGAA	
5801	CCACAGGTGT	ACACCCCTGCC	CCCATCCCC	GATGAGCTGA	CCAAGAACCA	
5851	GGTCAGCCTG	ACCTGCCCTG	TCAAAGGCTT	CTATCCCAGC	GACATGCCCG	
5901	TGGAGTGGGA	GAGCAATGGG	CAGCCGGAGA	ACAACATACAA	GACCACGCC	
5951	CCCGTGCTGG	ACTCCGACGG	CTCTTCTTC	CTCTACAGCA	AGCTCACCGT	
6001	GGACAAAGAGC	AGGTGGCAGC	AGGGGAACGT	CTTCTCATGC	TCCGTGATGC	20
6051	ATGAGGCTCT	GCACAACCAC	TACACCCAGA	AGAGGCTCTC	CCTGTCCTCG	
6101	GGTAAATGAG	TGGCACGGCC	GGCAAGCCCC	CGCTCCCCGG	GCTCTCGCGG	
6151	TCGCACGAGG	ATGCTTGGCA	CGTACCCCT	GTACATACTT	CCCCGGCGCC	
6201	CAGCATGGAA	ATAAAGCACC	CAGCGCTGCC	CTGGGGCCCT	GCGAGACTGT	
6251	GATGGTTCTT	TCCACGGGTC	AGGGCGAGTC	TGAGGCTGTA	GTGGCATGAG	
6301	ATCTGATATC	ATCGATGAAT	TCGAGCTCGG	TACCCGGGGA	TCGATCCAGA	
6351	CATGATAAGA	TACATTGATG	AGTTTGAGCA	AACCACAACT	AGAATGCAGT	
6401	GAAAAAATG	CTTTATTTGT	GAAATTGTG	ATGCTATTC	TTTATTTGTA	
6451	ACCATTATAA	GCTGCAATAA	ACAAGTTAAC	AACAACAATT	GCATTCAATT	30
6501	TATGTTTCAG	GTTCAGGGGG	AGGTGTGGGA	GGTTTTTAA	AGCAAGTAA	
6551	ACCTCTACAA	ATGTGGTATG	GCTGATTATG	ATCTCTAGTC	AAGGCACTAT	
6601	ACATCAATA	TTCCCTTATTA	ACCCCTTAC	AAATTAAATA	GCTAAAGGTA	
6651	CACAATTTT	GAGCATAGTT	ATTAATAGCA	GACACTCTAT	GCCTGTGTGG	
6701	AGTAAGAAA	AACAGTATGT	TATGATTATA	ACTGTTATGC	CTACTTATAA	
6751	AGGTTACAGA	ATATTTTCC	ATAATTTC	TGTATAGCAG	TGCAGCTTT	
6801	TCCTTTGTGG	TGTAAATAGC	AAAGCAAGCA	AGAGTTCTAT	TACTAAACAC	
6851	AGCATGACTC	AAAAAACTTA	GCAATTCTGA	AGGAAAGTCC	TTGGGGTCTT	40
6901	CTACCTTTCT	CTTCTTTTT	GGAGGAGTAG	AATGTTGAGA	GTCAGCAGTA	
6951	GCCTCATCAT	CACTAGATGG	CATTCTCT	GAGCAAAACA	GGTTTTCTC	
7001	ATTAAGGCA	TTCCACCACT	GCTCCCATTC	ATCAGTTCCA	TAGGTTGGAA	
7051	TCTAAATAC	ACAAACAATT	AGAATCAGTA	GTAAACACA	TTATACACTT	

【表26】

7101 AAAAATTTA TATTACCTT AGAGCTTAA ATCTCTGTAG GTAGTTGTC
 7151 CAATTATGTC ACACCACAGA AGTAAGGTC CTTCACAAAG ATCCGGGACC
 7201 AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC AGTCGGGGG CATGGATGCG
 7251 CGGATAGCCG CTGCTGGTT CCTGGATGCC GACGGATTG CACTGCCGGT
 7301 AGAACTCCGC GAGGTCGTCC AGCCTCAGGC AGCAGCTGAA CCAACTCGCG
 7351 AGGGGATCGA GCCCGGGGTG GGCGAAGAAC TCCAGCATGA GATCCCGCG
 7401 CTGGAGGATC ATCCAGCCCG CGTCCCCGAA AACGATTCCG AAGCCCAACC 10
 7451 TTTCATAGAA GGCGGGGGTG GAATCGAAAT CTCGTGATGC CAGGTTGGGC
 7501 GTCGCTGGT CGGTCATTTC GAACCCAGA GTCCCGCTCA GAAGAACTCG
 7551 TCAAGAAGGC GATAGAAGGC GATGCCGTGC GAATCGGGAG CGGGGATAACC
 7601 GTAAAGCAAG AGGAAGCGGT CAGCCCATTC GCCGCCAAGC TCTTCAGCAA
 7651 TATCACGGGT AGCCAACGCT ATGTCCTGAT AGCGGTCCGC CACACCCAGC
 7701 CGGCCACAGT CGATGAATCC AGAAAAGCGG CCATTTCCA CCATGATATT
 7751 CGGCAAGCAG GCATGCCAT GGGTCACGAC GAGATCCTCG CGTCCGGCA
 7801 TGGCGCCCTT GAGCCTGGCG AACAGTTCGG CTGGCGCGAG CGCGTGCATGC
 7851 TCTTCGTCCA GATCATCCTG ATCGACAAAGA CGCGCTTCCA TCCGAGTAGC 20
 7901 TGCTCGCTCG ATGOGATGTT TCGCTTGGTG GTCGAATGGG CAGGTAGCCG
 7951 GATCAAGCGT ATGCAGCCGC CGCATTCAT CAGCCATGAT GGATACTTT
 8001 TCGGCAGGAG CAAGGTGAGA TGACAGGAGA TCCTGCCCG GCACCTCGCC
 8051 CAATAGCAGC CAGTCCCITC CCGCTTCAGT GACAACGTG AGCACAGCTG
 8101 CGCAGGAAAC CGCCGTCGTG GCCAGCCACG ATAGCCCGC TGCCTCGTCC
 8151 TGCAGTTCAT TCAGGGCACC GGACAGGTG GTCTTGACAA AAAGAACCGG
 8201 GCGCCCCCTGC GCTGACAGCC GGAACACCGC CGCATCAGAG CAGCCGATIG
 8251 TCTGTTGTGC CCAGTCATAG CCGAATAGCC TCTCCACCCA AGCGGCCGGGA
 8301 GAAACCTGCGT GCAATCCATC TTGTTCAATC ATGCGAAACG ATCCTCATCC 30
 8351 TGTCTCTTGA TCAGATCTTG ATCCCGTGC CGCATCAGATC CTTGGCGGGCA
 8401 AGAAAGCCAT CCAGTTACT TTGCAGGGCT TCCCAACCTT ACCAGAGGGC
 8451 CGCCCGAGCTG GCAATTCCGG TTGCGCTTGCT GTCCCATAAAA CGGCCAGTC
 8501 TAGCTATCGC CATGTAAGCC CACTGCAAGC TACCTGCTTT CTCTTGCGC
 8551 TTGCGTTTTC CCTTGTCCAG ATAGCCCAGT AGCTGACATT CATCCGGGGT
 8601 CAGCACCGTT TCTGCGGACT GGCTTCTAC GTGTTCCGCT TCCTTTAGCA
 8651 GCCCTTGCGC CCTGAGTGCT TGCAGGAGCG TGAAGCT 40

【0165】

配列番号：17

発現ベクターH C M V - K H u A b - V L 1 h u m V 1 のヌクレオチド配列
(3964 - 4284からの配列番号：14 (h u m V 1 = V L h) を含むヒト化軽鎖発現ベクターの完全DNA配列)

【表27】

1 CTAGCTTTT GCAAAGCCT AGGCCTCCAA AAAAGCCTCC TCACTACTTC
 51 TGGAAATAGCT CAGAGGCCGA GGCGGCCCTCG GCCTCTGCAT AAATAAAAAA
 101 AATTAGTCAG CCATGCCCG GAGAATGGGC GGAACCTGGGC CGAGTTAGGG
 151 GCGGGATGGG CGGAGTTAGG GGCGGGACTA TGGTTGCTGA CTAATTGAGA
 201 TGCACTGCTTT GCATACTTCT GCCTGCTGGG GACCTGGTT GCTGACTAAT
 251 TGAGATGCAT GCTTGCATA CTTCTGCTG CTGGGGAGCC TGGGACTTT
 301 CCACACCCCTA ACTGACACAC ATTCACACAGC TGCCTCGCGC GTTTCGGTGA
 351 TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG GTCACAGCIT 10
 401 GTCTGTAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAAG CCCGTCAGGG CGCGTCAGCG
 451 GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CGCAGCOATG ACCCAGTCAC GTAGCGATAG
 501 CGGAGTGTAT ACTGGCTTAA CTATGCAGCA TCAGAGCAGA TTGTACTGAG
 551 AGTGCACCAT ATGCCGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA AGGAGAAAAT
 601 ACCGCATCAG GCGCTCTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCCCTCG
 651 GTCGTTGGC TGCGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATAACG
 701 GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG
 751 GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CGCGTTGCT GCGTTTTTC 20
 801 CATAGGCTCC GCCCCCTGA CGAGCATTAC AAAATCGAC GCTCAGTC
 851 GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGGG TTTCCCCCTG
 901 GAAGCTCCCT CGTGCCTCT CCTGTCAGCA CCCTGCCGCT TACCGGATAC
 951 CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGGAAAGCGTG CGCTTTCTC ATAGCTCAGG
 1001 CTGTAGGTAT CTCAGTTCCG TGTAGGTCTG TCGCTCCAAG CTGGCIGTG
 1051 TGCACGAACC CCCCCTTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACATAT
 1101 CGTCTTGAAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATGCCAC TGGCAGCAGC
 1151 CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGGGGT GCTACAGAGT
 1201 TCTTGAAGTG GTGCCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGCT 30
 1251 ATCTGCCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAGAAAGAG TTGGTAGCTC
 1301 TTGATCCGGC AAACAAACCA CGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTGCA
 1351 AGCAGCAGAT TACGCCAGA AAAAAGGGAT CTCAGAAGA TCCCTTGATC
 1401 TTTCTACGG CGCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACCTCAC GTTAAGGGAT
 1451 TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTAAATT
 1501 AAAATGAAG TTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTGGTCT

【表28】

1551	GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT	
1601	ATTCGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACCTACGA	
1651	TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGGAGAC	
1701	CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAACCCAGC CAGCCGGAAAG	
1751	GGCCGAGCCG AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCTCC ATCCAGTCTA	
1801	TTRATTGTTG CCGGGAAAGCT AGAGTAAAGTA GPTCGCCAGT TAATAGTTTG	
1851	CCCAACGTTG TTGCCATTGTC TCCAGGCATC GTGGGTGTAC GCTCGTCGTT	
1901	TGGTATGGCT TCATTCAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT	10
1951	GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGTTA GCTCCCTCGG TCCTCCGATC	
2001	GTTGTCAAGAA GTAAAGTTGGC CGCAGTGTAA TCACTCATGG TTATGGCAGC	
2051	ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA	
2101	CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG	
2151	AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AACACGGGAT AATACCGCCG CACATAGCAG	
2201	AACTTTAAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACCTCT	
2251	CAAGGATCTT ACCGCTGTTC AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTCA	
2301	CCCAACTGAT CTTCAAGCATC TTTTACCTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC	
2351	AAAAACAGGA AGGCAAAATG CGCAGAAAAAA GCGAATAAGG GCGACACCGA	20
2401	AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCCTTTTC AATATTAAATG AAGCATTAT	
2451	CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAAA	
2501	TAAACAAATA GGGCTTCCGC GCACATTTC CCGAAAAGTG CCACCTGACG	
2551	TCTAAGAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAAA TAGGGCTATC	
2601	ACGAGGCCCT TTGGTCTTCA AGAATTCCACC TTGGCTGCAG TGAATAATAA	
2651	AATGTGTGTT TGTCCGAAAT ACGCGTTTG AGATTTCTGT CGCCGACTAA	
2701	ATTCACTGTCG CGCGATAGTG GTGTTATCG CCGATAGAGA TGGCGATATT	
2751	GGAAAAATCG ATATTGAAA ATATGGCATA TTGAAAATGT CGCCGATGTG	30
2801	AGTTTCTGTG TAACTGATAT CGCCATTTC CCAAAAGTGA TTTTTGGGCA	
2851	TACCGGATAT CTGGCGATAG CGCTTATATC GTTTACGGGG GATGGCGATA	
2901	GACGACTTTG GTGACTTGGG CGATTCTGTG TGTGCAAAT ATCGCACTTT	
2951	CGATATAGGT GACAGACGAT ATGAGGCTAT ATCGCCGATA GAGGCGACAT	
3001	CAAGCTGGCA CATGGCCAAT GCATATCGAT CTATACATTG AATCAATATT	
3051	GGCCATTAGC CATAATTATTC ATTGGTTATA TAGCATTAAT CAATATTGGC	
3101	TATTGGCCAT TGCATACGTT GTATCCATAT CATAATATGT ACATTTATAT	
3151	TGGCTCATGT CCAACATTAC CGCCATGTG ACATTGATTA TTGACTAGTT	
3201	ATTAATAGTA ATCAATTACG CGGTCAATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG	40
3251	TTCCCGCTTA CATAACTTAC GGTAAATGGC CGCCCTGGCT GACCGCCCAA	
3301	CGACCCCGCG CCAATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC	
3351	CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCATGGG TGGAGTATTACCGTAAACT	

【表29】

3401	GCCCCACTTGG CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT	
3451	TGAOGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA	
3501	CCTTATGGGA CTTTCCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT	
3551	ATTACCATGG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG	
3601	GTTTGACTCA CGGGGATTTTC CAAGTCTCCA CCCCATTGAC GTCAATGGGA	
3651	GTTTGTGTTG GCACCAAAAT CAACGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAC	
3701	TCCGCCCAT TGACGCAAAT CGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA	
3751	TATAAGCAGA GCTCGTTAG TGAACCGTCA GATOGCCTGG AGACGCCATC	10
3801	CACGCTGTT TGACCTCCAT AGAAGACACC GGGACCGATC CAGCCTCCGC	
3851	AAGCTTGATA TCGAATTCT GCAGCCCCGG GGATCCGCC GCTTGCCGCC	
3901	ACCATGGAGA CCCCCGCCA GCTGCTGTC CTGCTGCTGC TGTGGCTGCC	
3951	CGACACCAACC GGCACACATTC TGCTGACCCA GTCTCCAGCC ACCCTGTCTC	
4001	TGAGTCCAGG AGAAAGAGCC ACTCTCTCCT GCAGGGCCAG TCAGAACATT	
4051	GGCACAAGCA TACAGTGGTA TCAACAAAAA CCAGGTCAAGG CTCCAAGGCT	
4101	TCTCATAAGG TCTTCTTCTG AGTCTATCTC TGGGATCCCT TCCAGGTTA	
4151	GTGGCAGTGG ATCAGGGACA GATTTCATTC TTACCATCAG CAGTCTGGAG	
4201	CCTGAACATT TTGCACTGTA TTACIGTCAA CAAAGTAATA CCTGCCATT	20
4251	CACGTTCGGC CAGGGGACCA AGCTGGAGAT CAAACGTGAG TATTCTAGAA	
4301	AGATCCTAGA ATTCTAAACT CTGAGGGGT CGGATGACGT GGCCATTCTT	
4351	TGCCTAAAGC ATTGAGTTTA CTGCAAGGTC AGAAAAGCAT GCAAAGCCCT	
4401	CAGAAATGGCT GCAAAGAGCT CCAACAAAC AATTTAGAAC TTTATTAAGG	
4451	AATAGGGGAA AGCTAGGAAG AAACCTCAAAT CATCAAGATT TAAATACGC	
4501	TTCTTGGTCT CCTTGCTATA ATTATCTGGG ATAAGCATGC TGTTTCTCT	
4551	CTGTCCCTAA CATGCCCTGT GATTATCCGC AAACACACACA CCCAAGGGCA	
4601	GAACTTTGTGTT ACTTAAACAC CATCCTGTT GCTTCTTCTC TCAGGAACCTG	30
4651	TGGCTGCACC ATCTGCTCTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA	
4701	TCTGGAACCTG CCTCTGTTGT GTGCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA	
4751	GGCCAAAGTA CAGTGGAAAGG TGGATAACCGC CCTCCAATCG GGTAACCTCCC	
4801	AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC	
4851	AGCACCCCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC	
4901	CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCCTCACA AAGAGCTTCA	
4951	ACAGGGGAGA GTGTTAGAGG GAGAAGTGC CCCACCTGCT CCTCAGTTCC	
5001	AGCCCTGACCC CCTCCCATCC TTTGCCCTCT GACCCTTTT CCACAGGGGA	
5051	CCTACCCCTA TTGGCGTCCT CCAGCTCATC TTTCACCTCA CCCCCCTCCT	40
5101	CCTCCTTGGC TTTAATTATG CTAATGTTGG AGGAGAAATGA ATAATAAAG	
5151	TGAATCTTG CACCTGTTGG TTCTCTCTT CCTCATTAA TAATTATTAT	
5201	CTGTTGTTTA CCAACTACTC AATTTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG	

【表30】

5251	TCATCCTAAG GCGCATAACC ATTTATAAAA ATCATCCTTC ATTCTATTT	
5301	ACCCATATCAT CCTCTGCAAG ACAGTCCTCC CTCAAACCCA CAAGCCTCT	
5351	GTCCTCACAG TCCCCTGGGC CATGGTAGGA GAGACTTGCT TCCTTGT	
5401	CCCCTCCTCA GCAAGCCCTC ATAGTCCTT TTAAGGGTGA CAGGTCTTAC	
5451	AGTCATATAT CCTTTGATTC AATTCCCTGA GAATCCTACCA AAGCAAATT	
5501	TTCAAAAGAA GAAACCTGCT ATAAAGAGAA TCATTCTTGA CAACATGATA	10
5551	TAAAATAACA ACACAATAAA AGCAATTAAA TAAACCTAACCA ATAGGGAAAT	
5601	GTTTAAGTTC ATCATGGTAC TTAGACTTAA TCGAATGTCA TGCCTTATTT	
5651	ACATTTTTAA ACAGGTACTG AGGGACTCCT GTCTGCCAAG GGCCTATTG	
5701	AGTACTTTCC ACAACCTAAT TTAATCCACA CTATACTGTG AGATTAAAAA	
5751	CATTCAATTAA AATGTTGCAA AGGTCTATA AAGCTGAGAG ACAAAATATAT	
5801	TCTATAACTC AGCAATCCC CTTCTAGATG ACTGAGTGTG CCCACCCACC	
5851	AAAAAAACTAT GCAAGAATGT TCAAAGCAGC TTTATTTACA AAAGCCAAAAA	
5901	ATTCGAAATA GCCCGATTGT CCAACAAATAG AATGAGTTAT TAAACTGTGG	
5951	TATGTTATAA CATTAGAATA CCCAATGAGG AGAATTAAACA AGCTACAACT	
6001	ATACCTACTC ACACAGATGA ATCTCATAAA AATAATGTAA CATAAGAGAA	20
6051	ACTCAATGCA AAAGATATGT TCTGTATGTT TTCATCCATA TAAAGTTCAA	
6101	AAACCAGGTAA AAATAAAGTT AGAAAATTGG ATGGAAATTA CTCTTAGCTG	
6151	GGGGTGGCG AGTTAGTGCC TGGGAGAAGA CAAGAAGGGG CTTCTGGGT	
6201	CTTGGTAATG TTCTGTTCCCT CGTGTGGGT TGTGCAGTTA TGATCTGTGC	
6251	ACIGTTCTGT ATACACATTA TGCTTCAAA TAACTTCACA TAAAGAACAT	
6301	CTTATACCCA GTTAATAGAT AGAAGAGGAA TAAGTAATAG GTCAAGACCA	
6351	CGCAGCTGGT AAGTGGGGGG GCCTGGGATC AAATAGCTAC CTGCCCTAAC	
6401	CTGCCCTCTT GAGCCCTGAA TGAGTCTGCC TTCCAGGGCT CAAGGTGCTC	
6451	ACACAAACAA CAGGCCCTGCT ATTTTCTGG CATCTGTGCC CTGTTGGCT	30
6501	AGCTAGGAGC ACACATACAT AGAAAATTAAA TGAAACAGAC CTTCAGCAAG	
6551	GGGACAGAGG ACAGAATTAA CCTTGCCCAG ACACCTGGAAA CCCATGTATC	
6601	AACACTCACA TGTTGGGAA GGGGAAGGG CACATGTAAA TGAGGACTCT	
6651	TCCTCATTCT ATGGGGCACT CTGGCCCTGC CCCTCTCAGC TACTCATCCA	
6701	TCCAACACAC CTTCTTAAGT ACCTCTCTCT GCCTACACTC TGAAGGGGTT	
6751	CAGGAGTAAC TAACACAGCA TCCCCTCCCT CAAATGACTG ACAATCCCTT	
6801	TGTCTGCTT TGTTTTCTT TCCAGTCAGT ACTGGGAAAG TGGGGAAGGA	
6851	CAGTCATGGA GAAACTACAT AAGGAAGCAC CTGCCCTTC TGCCTCTTGA	40
6901	GAATGTTGAT GAGTATCAA TCTTCAAAAC TTTGGAGGTT TGAGTAGGGG	
6951	TGAGACTCAG TAATGTCCCT TCCAATGACA TGAACCTGCT CACTCATCCC	
7001	TGGGGGCCAA ATTGAACAAT CAAAGGCAGG CATAATCCAG CTATGAATT	
7051	TAGGATCGAT CCAGACATGA TAAGATACAT TGATGAGTTT GGACAAACCA	

【表31】

7101	CAACTAGAAT GCAGTGAAAA AAATGCCTTA TTTGTGAAAT TTGTGATGCT	
7151	ATTGCTTTAT TTGTAACCAT TATAAGCTGC AATAAACAAAG TTAACAACAA	
7201	CAATTGCATT CATTATGTGTTCA GGGGGAGGTG TGGGAGGTTT	
7251	TTTAAAGCAA GTAAAACCTC TACAAATGTG GTATGGCTGA TTATGATCTC	
7301	TAGTCARGGC ACTATACATC AAATATTCCCT TATTAACCCC TTTACAAATT	
7351	AAAAAGCTAA AGGTACACAA TTTTGAGCA TAGTTATTAA TAGCAGACAC	
7401	TCTATGCCTG TGTGGAGTAA GAAAAAACAG TATGTTATGA TTATAACTGT	10
7451	TATGCCTACT TATTAAGCTT ACAGAATATT TTTCCATAAT TTTCTTGTAT	
7501	AGCACTGCAG CTTTTCCCTT TGTGGTGTAA ATAGCAAGC AAGCAAGAGT	
7551	TCTATTACTA AACACAGCAT GACTCAAAA ACTTAGCAAT TCTGAAGGAA	
7601	AGTCCTTGGG GTCTCTTACCC TTTCTCTCT TTTTTGGAGG AGTAGAATGT	
7651	TGAGAGTCAG CAGTAGCCTC ATCATCACTA GATGCCATT CTTCTGAGCA	
7701	AAACAGGTTT TCCTCATTAA AGGCATTCCA CCACTGCTCC CATTCACTAG	
7751	TTCCATAGGT TGGAATCTAA AATACACAAA CAATTAGAAT CAGTAGTTA	
7801	ACACATTATA CACTAAAAA TTTTATATTT ACCTTAGAGC TTTAAATCTC	
7851	TGTAGGTAGT TTGTCCTAATT ATGTCACACC ACAGAAAGTAA GGTTCCCTCA	20
7901	CAAAGATCCG GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT CCTGCAGTTC	
7951	GGGGGCATGG ATGGCGGGAT AGCCGCCTGCT GGTTTCCCTGG ATGCCGACGG	
8001	ATTTGCACTG CCGGTAGAAC TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT CAGGCAGCAG	
8051	CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCG GGGTGGCGA AGAACTCCAG	
8101	CATGAGATCC CCGCCCTGGA GGATCATCCA GCCGGCGTCC CGGAAAACGA	
8151	TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCCG CGGTGGAATC GAAATCTCGT	
8201	GATGGCAGGT TGGGCGTCGC TTGGTCGGTC ATTTGGAACC CCAGAGTCCC	
8251	GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC GCTGCGAATC	
8301	GGGAGCGCG ATACCGTAAA GCACGGAGGAA CGGGTCAGCC CATTGCGCCG	30
8351	CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGCCA ACGCTATGTC CTGATAGCGG	
8401	TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA AGCGGCCATT	
8451	TTCCACCATG ATATTCGGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTC ACGACGAGAT	
8501	CCTCGCCGTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG TTGGCTGGC	
8551	GCGAGCCCCCT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA CAAGACCGGC	
8601	TTCCATCCGA GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTGCCT TGGTGGTCGA	
8651	ATGGCCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA CCCGCCGCA TGCATCAGCC	
8701	ATGATGGATA CTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA GGAGATCCTG	40
8751	CCCCGGCACT TCGCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCGCT TCAGTGACAA	
8801	CGTCGAGCAC AGCTCCGCAA GGAACGCCCG TCGTGGCCAG CCACGATAGC	
8851	CGCGCTGCCT CGTCCTGCAG TTCATTCAAGG GCACCGGACA GGTGGTCTT	
8901	GACAAAAAGA ACCGGGGGCC CCTGCCTGA CAGCCGGAAC ACGGCGGCAT	

【表 3 2】

8951 CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCAGT CATAGCCGAA TAGCCTCTCC
 9001 ACCCAAGCGG CCGGAGAACCC TCGGTGCAAT CCATCTTGTGTT CAATCATGCG
 9051 AAACGATCCT CATCCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC CTGCGCCATC
 9101 AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GCCATCCAGT TTACTTTGCA GGGCTTCCCA
 9151 ACCTTACCCAG AGGGGGCCCC AGCTGGCAAT TCCGGTTCCG TTGCTGTCCA
 9201 TAAACCGCC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCCACIG CAAGCTACCT
 9251 GCTTTCTCTT TGCCTTGCG TTTTCCCTTG TCCAGATAGC CCAGTAGCTG
 9301 ACATTCATCC GGGGTCAAGCA CCGTTCTGCA GCACTGGCTT TCTACGTGTT
 9351 CCGCTTCCTT TAGCAGCCCT TGGCCCTGGA GTGCTTGCGG CAGCGTGAAG

10

【0166】

配列番号：18

発現ベクターHCMV-K HuAb-VL1 humV2のヌクレオチド配列
 (3926-4246からの配列番号：13 (humV2=VLm) を含むヒト化軽鎖発現ベクターの完全DNA配列)

【表 3 3】

1 CTAGCTTTT GCAAAAGCCT AGGCCTCCAA AAAAGCCTCC TCACTACTTC
 51 TGGAATAGCT CAGAGGCCGA GCGGGCCTCG GCCTCTGCAT AAATAAAAAAA
 101 AATTAGTCAG CCATGGGGCG GAGAATGGGC GGAACCTGGGC GGAGTTAGGG
 151 GCGGGATGGG CGGAGTTAGG CGCGGGACTA TGGTTGCTGA CTAATTGAGA
 201 TGCATGCTTT GCATACTTCT GCCTGCTGGG GAGCCTGGTT GCTGACTAAT
 251 TGAGATGCAT GCTTGCATA CTTCTGCCTG CTGGGGACCC TGGGGACTTT
 301 CCACACCCCTA ACTGACACAC ATTCCACACG TGCCCTCGCGC GTTTCGGTGA
 351 TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG GTCACAGCTT
 401 GTCTGTAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCCGTCAGGG CGCGTCAGCG
 451 GGTGPTGGCG GGTGTCGGGG CGCAGCCATG ACCCAGTCAC GTAGCGATAG
 501 CGGAGTGTAT ACTGGCTTAA CTATGCGCA TCAGAGCAGA TTGTACTGAG
 551 AGTGCACCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATCCGTA AGGAGAAAAT
 601 ACCGCATCAG GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCCTCG
 651 GTCGTTCGGC TGCGGGAGGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG
 701 GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAG
 751 GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CGCGTTGCT GGCCTTTTC
 801 CATAGGCTCCTT GCCCCCTGAA CGAGCATCAC AAAATCGAC GCTCAAGTCA
 851 GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAAGCG TTTCCCCCTG
 901 GAAGCTCCCT CGTGGCTCT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC
 951 CTGTCCTTCTT TTCTCCCTTC GGGAAAGCGTG GCGCCTTCTC ATAGCTCACG
 1001 CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG

20

30

40

【表34】

1051	TGCCACGAACC CCCCGTTCAAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACATAT	
1101	CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC	
1151	CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGGCGGT GCTACAGAGT	
1201	TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT	
1251	ATCTGGCCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC	
1301	TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTGCA	
1351	AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAGAAGA TCCTTTGATC	10
1401	TTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGGAT	
1451	TTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT	
1501	AAAAATGAAG TTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT	
1551	GACAGTTAAC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT	
1601	ATTCGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACATACGA	
1651	TACGGGAGGG CTTACCATCTT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGGCGAGAC	
1701	CCACGCTCAC CGGCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG	
1751	GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCTCC ATCCAGTCTA	
1801	TTAATTCPTG CCGGGAAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTG	20
1851	CGCAACGTTG TTGCCATTGC TGCAGGCATC GTGGTGTACAC GCTCGTCGTT	
1901	TGGTATGGCT TCATTCAAGCT CCGGTTCCCCA ACGATCAAGG CGACTTACAT	
1951	GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC	
2001	GTTGTCAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTAA TCACTCATGG TTATGGCAGC	
2051	ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA	
2101	CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GGGCGACCG	
2151	AGTTGCTCTT GCCCGGGCTC AACACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG	
2201	AACTTTAAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAAGC TTCTTCGGGG CGAAAACCTCT	
2251	CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA	30
2301	CCCAACTGAT CTTCAAGCATC TTTTACTTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC	
2351	AAAAACAGGA AGGCAAATG CCGCAAAAGA CGGAATAAGG GCGACACGGA	
2401	AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCCTTTTC AATATTATGG AAGCATTTAT	
2451	CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTGAAATGTA TTTAGAAAAA	
2501	TAAACAAATA GGGGTTCCCGC GCACATTTC CCGAAAAGTG CCACCTGACG	
2551	TCTAAGAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAA TAGCGTATC	
2601	ACGAGGGCCCT TTGCTTTCA AGAATTICAGC TTGGCTGCAG TGAATAATAA	
2651	AATGTTGTGT TGTCCGAAAT CGCGTTTTG AGATTTCTGT CGCCGACTAA	40
2701	ATTCACTGTCG CGCGATAGTG GTGTTTATCG CCGATAGAGA TGGCGATATT	
2751	CGAAAAAATCG ATATTTGAAA ATATGGCATA TTGAAAATGT CGCCGATGTG	
2801	AGTTTCTGTG TAACTGATAT CGCCATTTC CCAAAAGTGA TTTTGGGCA	
2851	TACGGGATAT CTGGCGATAG CGCTTATATC GTTACGGGG GATGGCGATA	

【表35】

2901	GACGACTTGTG GTGACTTGGG CGATTCTGTG TGTGCAAAT ATCGCAGTT	
2951	CGATATAGGT GACAGACGAT ATGAGGCTAT ATCGCCGATA GAGGCGACAT	
3001	CAAGCTGGCA CATGGCCAAT GCATATCGAT CTATACATTG AATCAATATT	
3051	GGCCATTAGC CATATTATTC ATTGGTTATA TAGCATAAAT CAATATTGGC	
3101	TATTGGCCAT TGCATACTGTT GTATCCATAT CATAATATGT ACATTATAT	
3151	TGGCTCATGT CCAACATTAC CGCCATGTTG ACATTGATTA TTGACTAGTT	10
3201	ATTAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG	
3251	TTCCCGCTTA CATAACTTAC GGTAAATGGC CCCGCTGGCT GACCGCCCAA	
3301	CGACCCCCGC CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC	
3351	CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATT ACGGTAAACT	
3401	GCCCCACTTGG CAGTACATCA AGIGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCTTAT	
3451	TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCGCTTG GCATTATGCC CAGTACATGA	
3501	CCTTATGGGA CTTTCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT	
3551	ATTACCATCG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGC GTGGATAGCG	
3601	GTTTGAATCA CGGGGATTTC CAAGTCTCCA CCCCATGAC GTCAATCGGA	
3651	GTTTGTGTTG GCACCAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC	20
3701	TCCGGCCCAT TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA	
3751	TATAAGCAGA GCTCGTTAG TGAACCGTCA GATGCCCTGG AGACGCCATC	
3801	CACCGCTGTT TGACCTCCAT ACAAGACACC GGGACCGATC CAGCCTCCGC	
3851	AAGCTTGGCG CCACCATGGA GACCCCGGCC CAGCTGCTGT TCCTGCTGCT	
3901	GCTGTGGCTG CCCGACACCA CCGGGACAT TCTGCTGACC CAGTCTCCAG	
3951	CCACCCCTGTC TCTGAGTCCA CGAGAAAGAG CCACCTTCCTC CTGCAGGGCC	
4001	AGTCAGAACAA TTGGCACAAG CATAACGTGG TATCAACAAA AACAAATGG	
4051	TGCTCCAAAGG CTTCTCATAA GGTCTCTTC TGAGTCTATC TCTGGGATCC	
4101	CTTCCAGGTT TAGTGGCACT GGATCAGGGA CAGATTTTAC TCTTACCATC	30
4151	AGCAGTCTGG AGCCTGAAGA TTTTGCAGTG TATTAATCTGTC AACAAAGTAA	
4201	TACCTGGCCA TTCACGTTCG GCCAGGGGAC CAAGCTGGAG ATCAAACGTC	
4251	AGTATTCTAG AAAAGATCCTA GAATTCTAAA CTCTGAGGGG GTCCGGATGAC	
4301	GTGGCCATTC TTGCTCTAAA GCATTGAGTT TACTGCAAGG TCAGAAAAGC	
4351	ATGCAAAGCC CTCAGAATGG CTGCAAAGAG CTCCAACAAA ACAATTAGA	
4401	ACTTIAATTAA CGAATAGGGG GAAGCTAGGA AGAAAATCAA AACATCAAGA	
4451	TTTTAAATAC GCTCTTGGT CTCTTGCTA TAATTATCTG GGATAAGCAT	
4501	GCTGTTTCT GTCTGTCCT AACATGCCCT GTGATTATCC GCAAACAACA	40
4551	CACCCAAGGG CAGAACTTTG TIACTTAAAC ACCATCCTGT TTGGCTCPTT	
4601	CCTCAGGAAC TGTGGCTGCA CCATCTGCT TCATCTTCCC GCCATCTGAT	
4651	GAGCAGTTGA AATCTGGAAC TGCCTCTGTT GTGTGCCTGC TGAATAACTT	
4701	CTATCCCAGA GAGGCCAAAG TACAGTGGAA GGTGGATAAC GCCCTCCAAT	

【表36】

4751	CGGGTAACTC CCAGGAGAGT GTCACAGAGC AGGACAGCAA GGACAGCACC	
4801	TACAGCCTCA GCAGCACCCCT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACGAGAAACA	
4851	CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG TCACCCATCA GGGCCTGAGC TCGCCCGTCA	
4901	CAAAGAGCTT CAACAGGGGA GAGTGTAGA GGGAGAAAGTG CCCCCACCTG	
4951	CTCCTCAGTT CCAGCCTGAC CCCCTCCCAT CCTTTGGCCT CTGACCCCTT	
5001	TTCCACAGGG GACCTACCCC TATTGCGGTC CTCCAGCTCA TCTTTCACCT	
5051	CACCCCCCTC CTCCCTCTTG GCTTTAATTA TGCTAATGTT GGAGGAGAAT	10
5101	GAATAAAATAA AGTGAATCTT TGCACCTGTG GTTTCTCTCT TTCCCTCATTT	
5151	AATAATTATT ATCIGTTGTT TACCAACTAC TCAATTCTC TTATAAGGGA	
5201	CTAAATATGT AGTCATCCCTA AGGCGCATAA CCATTTATAA AAATCATTCT	
5251	TCATTCTATT TTACCCCTATC ATCCTCTGCA AGACAGTCCT CCCTCAAAACC	
5301	CACAAGCCTT CTGTCCTCAC AGTCCCCTGG GCCATGGTAG GAGAGACTTG	
5351	CTTCCCTGTT TTCCCCCTCCT CAGCAAGCCC TCATAGTCCT TTTTAAGGTT	
5401	GACAGGTCTT ACAGTCATAT ATCCTTTGAT TCAATTCCCT GAGAATCAAC	
5451	CAAGCAAAT TTTTCAAAAG AAGAACCTG CTATAAAAGAG AATCATTCTAT	
5501	TGCAACATGA TATAAATAA CAACACAATA AAAGCAATTA AATAAACAAA	20
5551	CAATAGGGAA ATGTTAAAGT TCATCATGGT ACTTAGACTT AATGGAAATGT	
5601	CATGCCTTAT TTACATTTTT AAACAGGTAC TGAGGGACTC CTGTCCTGCCA	
5651	AGGGCGGTAT TGAGTACTTT CCPACAACCTA ATTTAATCCA CACTATACTG	
5701	TGAGATTAAA AACATTCAATT AAAATGTGTC AAGGTTCTA TAAAGCTGAG	
5751	AGACAAATAT ATTCTATAAC TCAGCAATCC CACTTCTAGA TGACTGAGTG	
5801	TCCCCACCCA CCAAAAAACT ATGCAAGAAAT GTTCAAAGCA GCTTTATTTA	
5851	CAAAGCCAA AAATTGGAAA TAGCCCGATT CTCCAACAAAT AGAATGAGTT	
5901	ATTAAACTGT GGTATGTTA TACATTAGAA TACCCATGA GGAGAATTAA	
5951	CAAGCTACAA CTATACCTAC TCACACAGAT GAATCTCATA AAAATAATGT	30
6001	TACATAAGAG AAACCTCAATG CAAAGATAT GTTCTGTATG TTTTCATCCA	
6051	TATAAAGTTC AAAACCAGGT AAAAATAAAG TTAGAAATTT GGATGGAAAT	
6101	TACTCTTAGC TGGGGGTGGG CGAGTTAGTG CCTGGGAGAA GACAAGAAGG	
6151	GGCTTCTGGG GTCTGGTAA TGTTCCTGTTG CTCGTGTGGG GTTGTGCAGT	
6201	TATGATCTGT GCACCTGTCT GTATACACAT TATGCTTCAA AATAACTCTCA	
6251	CATAAAGAAC ATCTTATACC CAGTTAATAG ATAGAAAGAGG AATAAGTAAT	
6301	AGGTCAAGAC CACCGCAGCTG GTAAAGTGGGG GGGCCTGGGA TCAAATAGCT	
6351	ACCTGCCTAA TCCCTGCCCTC TTGAGCCTG AATGAGTCTG CCTTCAGGG	40
6401	CTCAAGGTGC TCAACAAAC AACAGGCCTG CTATTTTCCTT GGCATCTGTG	
6451	CCCTGTTGG CTAGCTAGGA GCAACACATAC ATAGAAATTA AATGAAACAG	
6501	ACCTCAGCA AGGGGACAGA GGACAGAATT AACCTGCC AGACACTGG	
6551	AACCCATGTA TGAACACTCA CATGTTGGG AAGGGGGAAAG GCCACATGTA	

【表37】

6601	AATGAGGACT CTTCCCTCATT CTATGGGGCA CTCTGGCCCT GCCCCCTCTCA	
6651	GCTACTCATC CATCCAACAC ACCCTTCTAA GTACCTCTCT CTGCCTACAC	
6701	TCTGAAGGGG TTCAGGAGTA ACTAACACAG CATCCCTTCC CTCAAATGAC	
6751	TGACAAATCCC TTTGTCCTGTC TTIGTTTTTC TTTCCAGTCA GTACTGGGAA	
6801	AGTGGGAAAG GACAGTCATG GAGAAACTAC ATAAGGAAGC ACCTTGCCT	
6851	TCTGCCTCTT GAGAAATGTTG ATGAGTATCA AATCTTCAA ACTTTGGAGG	10
6901	TTTGAGTAGG GGTGAGACTC AGTAATGTCC CTTCCAATGA CATGAACCTG	
6951	CTCACTCATC CCTGGGGGCC AAATTGAACA ATCAAAGGCA GGCATAATCC	
7001	ACCTATGAAT TCTAGGATCG ATCCAGACAT GATAAGATAAC ATTGATGAGT	
7051	TTGGACAAAC CACAACTAGA ATGCAGTGAA AAAAATGCTT TATTGTGAA	
7101	ATTTGTGATG CTATGCTTT ATTTGTAAACC ATTATAAGCT GCAATAAACAA	
7151	AGTTAACAAAC AACAAATTGCA TTCATTTAT GTTTCAGGTT CAGGGGGAGG	
7201	TGTGGGAGGT TTTTAAAGC AAGTAAAACC TCTACAAATG TGGTATGGCT	
7251	GATTATGATC TCTAGTCAG GCACTATACA TCAAATATTC CTTATTAACC	
7301	CCTTTACAAA TTAAAAAGCT AAAGGTACAC AATTTTGAG CATA GTTATT	
7351	AATAGCAGAC ACTCTATGCC TGTGTGGAGT AAGAAAAAAC AGTATGTTAT	20
7401	GATTATAACT GTTATGCCIA CTTATAAAGG TTACAGAATA TTTTTCCATA	
7451	ATTTTCTTGT ATAGCAGTGC AGCTTTTCC TTTGTGGTGT AAATAGCAA	
7501	GCAAGCAAGA CTTCTATTAC TAAACACAGC ATGACTCAAA AAACCTTAGCA	
7551	ATTCTGAAGG AAAGTCCTG GGGTCITCTA CCTTTCTCTT CTTTTTGGA	
7601	GGAGTACAAT GTGAGAGTC AGCAGTAGCC TCATCATCAC TAGATGGCAT	
7651	TTCTTCTGAG CAAACAGGT TTTCTCATT AAAGGCATTC CACCACTGCT	
7701	CCCATTCACTC AGTTCCATAG GTTGGAAATCT AAAAATACACA AACAAATTAGA	
7751	ATCAGTAGTT TAACACATTA TACACTAAA AATTTTATAT TTACCTTAGA	
7801	GCTTTAAATC TCTGTAGGTA GTTGTCCAA TTATGTCACA CCACAGAAGT	30
7851	AAGGTTCCCTT CACAAAGATC CGGGACAAA CGGGCCATCG TGCCTCCCCA	
7901	CTCCTGCAGT TCGGGGGCAT GGATGCGCGG ATAGCCGCTG CTGGTTTCCT	
7951	GGATGCCGAC GGATITGCAC TGCCGGTAGA ACTCCGCGAG GTCGTCCAGC	
8001	CTCAGGCAGC AGCTGAACCA ACTCGCGAGG GGATCGAGCC CGGGGTGGGC	
8051	GAAGAACTCC AGCATGAGAT CCCCCCGCTG GAGGATCATC CAGCCGGCGT	
8101	CCCAGAAAAC GATTCCGAAG CCCAACCTTT CATAGAAGGC GGCGGTGGAA	
8151	TCGAAATCTC GTGATGGCAG GTTGGCGTC GCCTGGTCGG TCATTTCGAA	
8201	CCCCAGAGTC CCGCTCAGAA GAACCTGTCAGA AGAAGGCGAT AGAAGGCGAT	40
8251	GCGCTGCCAA TCGGGAGCGG CGATACCGTA AAGCACGAGG AAGCCGTCAG	
8301	CCCATTGCGCC GCGAAGCTCT TCAGCAATAT CACGGGTAGC CAAAGCTATG	
8351	TCCTGATAGC GGTCCGCCAC ACCCAGCCGG CCACAGTCGA TGAATCCAGA	
8401	AAAGCCGCCA TTTTCCACCA TGATATTGCG CAAGCAGGCA TCGCCATGGG	

【表38】

8451 TCACGGACGAG ATCCCTCGCCG TCGGGCATGC GCGCCCTTGAG CCTGGCGAAC
 8501 AGTTGGCTG GCGCGAGCCC CTGATGCTCT TCGTCCAGAT CATCCTGATC
 8551 GACAAAGACCG GCTTCCATCC GAGTACGTGC TCGCTCGATG CGATGTTCG
 8601 CTTGGTGGTC GAATGGGAG GTAGCCGGAT CAAGCGTATG CAGCCGCCGC
 8651 ATTGCATCAG CCATGATGGA TACTTTCTCG GCAGGAGCAA GGTGAGATGA
 8701 CAGGAGATCC TGCCCCGGCA CTTCGCCAA TAGCAGCCAG TCCCTTCCCC
 8751 CTTCACTGAC AACGTCGAGC ACAGCTCGGC AAGGAACGCC CGTCGTGGCC
 8801 AGCCACGATA GCCGCGCTGC CTCGTCCTGC AGTTCAATTCA GGGCACCGGA
 8851 CAGGTGGTC TTGACAAAAAA GAACCGGGCG CCCCTGCGCT GACAGCCGGA
 8901 ACACGGCGGC ATCAGAGCGAG CCGATTGTCT GTTGTGCCCA GTCATAGCCG
 8951 AATAGCCTCT CCACCCAAAGC GGCGGGAGAA CCTGCGTGCA ATCCATCTG
 9001 TTCAATCATG CGAAACGATC CTCATCCTGT CTCTTGATCA GATCTTGATC
 9051 CCCTGGGCCA TCAGATCCTT GGCGGCAAGA AAGCCATCCA GTTTACTTTG
 9101 CAGGGCTTCC CAACCTTACC AGAGGGCGCC CCAGCTGGCA ATTCCGGTTTC
 9151 GCTTGCTGTC CATAAAACCG CCCAGTCTAG CTATGCCAT GTAAGCCCCAC
 9201 TGCAAGCTAC CTGCTTCTC TTTGCGCTTG CGTTTTCCCT TGTCCAGATA
 9251 GCCCAGTAGC TGACATTCAAT CCGGGGTCAAG CACCGTTCT GCGGACTGGC
 9301 TTTCTACGTG TTCCGCTTCC TTTAGCAGCC CTTGCGCCCT GAGTNGCTTGC
 9351 GGCAGCGTGA AG

10

20

【0167】

配列番号：31

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39】

EVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
ENPYNHGKY NEFKGRATL TADKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSSG
PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

30

【0168】

配列番号：32

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40】

QVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
ENPYNHGKY NEFKGRATL TADKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSSG
PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

40

【0169】

配列番号：33

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41】

GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCGTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
 CTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATAAGTGGTATCAACAAAAA
 CCAGGTAGGGCTCCAAGGCTCTCATAGGTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
 TTCCAGGTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
 AGCCTGAAGATTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACTGGCCATTACGTTC
 GGCCAGGGACCAAGCTTGAAATCAAA

【0170】

10

配列番号：34

配列番号：31のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列

【表42】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGCTTCAGTGAAG
 GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCATCAGCACA
 GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
 GATCAGGACCCATGCCTGGTTGACACCTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
 CTCA

20

【0171】

配列番号：35

配列番号：32のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列

【表43】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGCTTCAGTGAAG
 GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCATCAGCACA
 GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
 GATCAGGACCCATGCCTGGTTGACACCTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
 CTCA

30

【0172】

配列番号：36

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44】

1 CTAGAGTCCT AGAGAGGTCT GGTGGAGCCT GCAAAAGTCC AGCTTCAAA
 51 GGAACACAGA AGTATGTGTA TGGAAATATTA GAAGATGTTG CTPTTACTCT
 101 TAAGTTGGTT CCTAGGAAAA ATAGTTAAT ACTGTGACTT TAAAATGTGA

【表45】

151	GAGGGTTTTC AAGTACTCAT TTTTTAAAT GTCCAAAATT TTTGTCAATC	
201	AATTTGAGGT CTTGTTGTG TAGAACTGAC ATTACTTAAA GTTTAACCGA	
251	GGAATGGGAG TGAGGCTCTC TCATACCCCA TTCAGAACTG ACTTTAACCA	
301	ATAATAAATT AAGTTAAAAA TATTTTAAA TGAATTGAGC AATGTTGAGT	
351	TGGAGTCAAG ATGGCCGATC AGAACCRGAA CACCTGCAGC AGCTGGCAGG	
401	AAGCAGGTCA TGTGCCAAGG CTATTTGGGG AAGGGAAAAT AAAACCACTA	
451	GGTAAACTTG TAGCTGTGGT TTGAAGAAGT GGTTTGAAA CACTCTGTCC	10
501	AGCCCCACCA AACCGAAAGT CCAGGCTGAG CAAAACACCA CCTGGGTAAT	
551	TTGCATTCTC AAAATAAGTT GAGGATTCAAG CCGAAACTGG AGAGGTCCCTC	
601	TTTTAACCTTA TTGAGTTCAA CCTTTAAATT TTAGCTTGAG TAGTTCTAGT	
651	TTCCCCAAC TTAAGTTAT CGACTTCTAA AATGTATTTA GAACTCATTT	
701	TCAAAATTAG GTTATGTAAG AAATTGAAGG ACTTTAGTGT CTTTAATTTC	
751	TAATATATTT AGAAAACCTTC TTAAAATTAC TCTATTATTC TTCCCTCTGA	
801	TTATTGGTCT CCATTCAATT CTTTCCAAAT ACCCGAAGCA TTACAGTGA	
851	CTTTGTTCAT GATCTTTTT AGTTGTTGT TTTGCCTTAC TATTAAGACT	
901	TTGACATTCT GGTCAAAACCG GCTTCACAAA TCTTTTCAA GACCACTTTC	20
951	TGAGTATTCA TTTTAGGAGA AATACTTTT TTTTAATGA ATGCAATTAT	
1001	CTAGGACCTG CAGGCATGCT GTTTCTGTC TGTCCCTAAC ATGCCCTGTC	
1051	ATTATCCGCA AACACACAC CCAAGGGCAG AACTTGTTA CTTAACACCC	
1101	ATCCTGTTTG CTTCTTCCT CAGGAACGTGT GGCTGCACCA TCTGTCTCA	
1151	TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACGTGC CTCTGTTGTG	
1201	TGCCTGCTGA ATAACITCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGGT	
1251	GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACTCCCA GGAGAGTCAC ACAGAGCAGG	
1301	ACAGCAAGGA CACACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCCTGAC GCTGAGCAAA	
1351	GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TGCGAAGTCA CCCATCAGGG	30
1401	CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CACGGGAGAG TGTTAGAGGC	
1451	AGAAAGTCCCC CCACCTGCTC CTCAGTTCCA GCCTGACCCCC CTCCCATCCT	
1501	TTGGCCTCTG ACCCTTTTC CACAGGGAC CTACCCCTAT TGCGGTCCTC	
1551	CAGCTCATCT TTCACCTCAC CCCCCCTCTC CTCCCTGGCT TTAATTATGC	
1601	TAATGTTGGA GGAGAATGAA TAAATAAAAGT GAATCTTGC ACCTGTGGTT	
1651	TCTCTCTTTC CTCAATTAAAT AATTATTATC TGTTGTTTA CCAACTACTC	
1701	AATTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG TCATCCTAAG CGGGGATATC	
1751	GAGATCTGAA GCTGATCCAG ACATGATAAG ATACMTTGAT GAGTTGGAC	40
1801	AAACCAACAC TAGAAATGCAG TGAAAAAAAT GCTTTATTG TGAAATTGT	
1851	GATGCTATTG CTTTATTGT AACCATTATA AGCTGCAATA AACAACTTAA	
1901	CAACAAACAAT TGCATTCAATT TTATGTTCA GGTCAGGGG GAGGTGTGGG	
1951	AGGTTTTTA AAGCAAGTAA AACCTCTACA AATGTGGTAT GGCTGATTAT	

【表 4 6】

2001	GATCTCTAGT CAAGGCAC TA TACATCAAAT ATTCCCTTATT AACCCCTTTA	
2051	CNAATTAAAA AGCTAAAGGT ACACAATT TGAGGCATAGT TATTAATAGC	
2101	AGACACCTCTA TGCCCTGIGTG GAGTAAGAAA AAACAGTATG TTATGATTAT	
2151	AACTGTTATG CCTACTTATA AAGGTTACAG AATATTTTC CATAATTTTC	
2201	TTGTATAAGCA GTGCAGCTTT TTCCCTTGIG GTGTAAATAG CAAAGCAAGC	
2251	AAGAGTCTA TTAACCAAACA CAGCATGACT CAAAAAACTT AGCAATTCTG	
2301	AAGGAAAGTC CTTGGGGTCT TCTACCTTTC TCTTCTTTT TGGAGGAGTA	10
2351	GAATGTTGAG AGTCAGGAGT AGCCTCATCA TCACCTAGATG GCATTTCTTC	
2401	TGAGCAAAAC AGGTTTTCCCT CATTAAAGGC ATTCCACCCAC TGCTCCCATT	
2451	CATCAGTTCC ATAGGTTGGA ATCTTAAATA CACAAACAAT TAGAATCAGT	
2501	AGTTAACAC ATTATACACT TAAAAATT TT ATATTTACCT TAGAGCTTTA	
2551	AATCTCTGTA GGTAGTTGT CCAATTATGT CACACCACAG AAGTAAGGTT	
2601	CCTTCACAAA GATCCGGACC AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCCTGC	
2651	AGTTGGGGGG CATGGATGCG CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC	
2701	GACGGATTIG CACTGCCGGT AGAAACTCCCG CAGGTGCTCC AGCCTCAGGC	
2751	AGCAGCTGAA CCAACTCGCG AGGGGATCGA GCATCCCCCA TGGTCTTATA	20
2801	AAAATCCATA CCTTTAGGAG CGGAGCAGAG AACTTGAAAG CATCTTCTTC	
2851	TTAGTCCTTC TTCTCGTAGA CTTCAAACCTT ATACCTGATG CCTTTTTCCCT	
2901	CCTGGACCTC AGAGAGGACG CCTGGGTATT CTGGGAGAAG TTTATATTTTC	
2951	CCCAAATCAA TTTCTGGGAA AAACCTGTCA CTTTCAAATT CCTGCATGAT	
3001	CCTTGTCA CA AAGAGTCTGA GGTGGCCTGG TTGATTCTAG GCTTCCTGGT	
3051	AAACAGAACT GCCTCCGACT ATCCAAACCA TGTCTACTTT ACTTGCCAAT	
3101	TCCGGTTGTT CAATAAGTCT TAAGGCATCA TCCAAACCTT TGGCAAGAAA	
3151	ATGAGCTCCT CGTGGTGGTT CTTTGAGTTC TCTACTGAGA ACTATATTAA	
3201	TTCTGTCCCT TAAAGGTGCA TTCTTCTCAG GAATGGAGAA CCAGGTTTTC	30
3251	CTACCCATAA TCACCAAGATT CTGTTTACCT TCCACTGAAG AGGTTGTGGT	
3301	CATTCTTGG AAGTACTTGA ACTCGTTCCCT GAGCCGGAGGC CAGGGTCCGGT	
3351	CTCCGTTCTT GCCAATCCCC ATATTTGGG ACACGGCGAC GATGCAGTTC	
3401	AATGGTCGAA CCATGATGGC AGCGGGGATA AAATCCTACC AGCCCTCAGC	
3451	CTAGGATTGC CGTCAGTTTT GGGGGTACCG AGCTCGAATT AGCTTTTGC	
3501	AAAAGCCTAG GCCTCCAAA AAGCCTCCTC ACTACTTCTG GAATAGCTCA	
3551	GAGGGCCGAG CGGGCCTCGG CCTCTGCATA AATAAAAAAA ATTAGTCAGC	
3601	CATGGGGCGGG AGAATGGGCG GAACTGGGCG GAGTTAGGG CGGGATGGGC	40
3651	GGAGTTAGGC CGGGGACTAT GTTGCTGAC TAATTGAGAT GCATGCTTTC	
3701	CATACTTCTG CCTGCTGGGG AGCCTGGGA CTTTCCACAC CTGGTTGCTG	
3751	ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG	
3801	GACTTTCCAC ACCCTAACTG ACACACATTC CACAGCTGCC TCGCGCGTTT	

【表 4 7】

3851	CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA	
3901	CAGCTTGTCT GTAAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGGCGCG	
3951	TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGCGGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG	
4001	CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACATAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT	
4051	ACTGAGAGTG CACCATATGC GCGCGCATAT CGGGTGTGAA ATACCGCACCA	
4101	GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCCTCGCTC	
4151	ACTGACTCGC TGCCTCGGT CGTTCCGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA	10
4201	CTCAAAGGCG GTAAATACCGGT TATCCACAGA ATCAGGGAT AACCCAGGAA	
4251	AGAACATGTG ACCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAAGGCC	
4301	CGCTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACCG AGCATCACAA	
4351	AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCGACAGGA CTATAAAGAT	
4401	ACCAGGGCGTT TCCCCCTCGGA AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCCGACC	
4451	CTGCCGCTTA CGGGATACCT GTCCGCGCTT CTCCCTTGG GAAGCGTCCC	
4501	GCTTTCTCAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTTC	
4551	GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACCAACCCC CCCGTCAGCC CGACCGCTGC	
4601	GCCTTATCCG GTAACTATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT	20
4651	ATCGCCACTG GCACCGAGCA CTGGTAACAG CATTAGCAGA CGGAGGTATG	
4701	TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAACTGGT GGCCCTAACTA CGGCTACACT	
4751	AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAAGCCAG TTACCTTCGG	
4801	AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCAAC GCTGGTAGCG	
4851	GTGGTTTTTG TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT	
4901	CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA	
4951	AAACTCACGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA	
5001	CCTAGATCCT TTTAAATTAA AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA	
5051	TAIGAGTAAA CTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC	30
5101	TATCTCAGCG ATCTGTCIAT TTGTTTCATC CATACTGCC TGACTCCCG	
5151	TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT	
5201	GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT	
5251	AAACCGAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGCTCT GCAACTTTAT	
5301	CCGCCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT	
5351	TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT	
5401	GGTGTCAACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCACTGTC GGTTCCCAAC	
5451	GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCRAAAA AGCGGTTAGC	40
5501	TCCCTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAAGT AAGTGGCGG CAGTGTATC	
5551	ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG	
5601	TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA	
5651	TACTGTATGC CGCGACCGAG TTGCTCTTGC CGGGCGTCAA CACGGGATAA	

【表48】

5701	TACCGCGOCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT	
5751	CITCGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG	
5801	ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGGCATCTT TTACCTTCAC	
5851	CAGCGTTCTC GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAAGG	
5901	GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA	
5951	TATTATTGAA CCATTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATAACATATT	
6001	TGAATCTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCC ACATTTCCCC	10
6051	GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTTATCAT GACATTAACC	
6101	TATAAAAATA GGCGTATCAC GAGGCCCTT CGTCTTCAG AATTCAAGCTG	
6151	CTCGAGGAAG AGCTCAAACC CATGCTACTC TCTGGCTTGA TGGAAGCAAC	
6201	GCTTTCATAG CTGAGCTGTC ATAAATAATA AAGAGATTTT TTTATTAATA	
6251	TTGAAAAGAT GGGTTATTCA TGTAAGACTC TGTCTTCATT TTAAAAACCA	
6301	CACCTTCCAG TAGTATTCTG TTACTGTTCT GGCATTCACT GTGATCAAGA	
6351	AGCTACACGG TGAGTTGTGC TTCTCAGTCC TAAGGGATAC ATCTACAAGA	
6401	GGCTCCCATCA CTCGAAGCTC AGGAAACATT GTAGAAAAGG AGGCAAAAGA	
6451	CTGACAGAGC CAGAGGACCA AGAAATTGTG TGTGAGGTTG TGTCTCCTAC	20
6501	TAACAAATATA AGCAATATCT ATAAATTGTT GATATCATGG CTACTAAANT	
6551	GTGAGTTGAA CGAGGAGGAC ACAATGAAC ATGACAATCA GAATGAGGCC	
6601	TCTCACCTGC AAAAAACACT ATAGAGAAGC AGATAAAGCT GTCAGCAGAA	
6651	GAGGCGCACC TCCITTATAGA AGAAGCCTAC CAGGTTTGAT ATATCAGCCT	
6701	TGAAAACCTA CATACTATTTC ACATTATATC GAGTCTATGA GACATATTAA	
6751	GTAATGCATA TGTATGTGTG TGTGTGCATG TATGTGTGTA AATACATATG	
6801	TTCATAGAAA AATGTGTAAA AAGAGATCAT GAATTAAAGA GAGAACTGGG	
6851	ACAATTTTTC TCAGGGAGTT GTAATCAGGA AAGTTAACGG AAAAAATGTIG	30
6901	TAATTTAAAT TCAGGCTCAG AAACAAACAA AGGAAAGAA AAAAAAACAA	
6951	CAACAACAAAC AAAAAACAA AACAAAGGAG AAGCTGTATG GCCACAATAG	
7001	CATCTACAGC TAACTGTGAA AGGATAATGG AACAACTTAT GTACTGCCTA	
7051	GAGCAGTATG ATGCCTAAAT CATCTCGACA TGGAGGAAAA TAGAACAAAG	
7101	ACACTCTACA TAGACTATGA TGAATCAA AATAAGGTGT AAGACATAGA	
7151	ACATTAGTTT TGTTTGTGT TCAAAGAGAC TCACATTCCTT ACAAAAAAAAT	
7201	CTGTGGGATT TTACAGGTCT GCAATAAGCT CCTGACCTGA TGATTTCTGC	
7251	AGCTGTGCCT ACCCTTGTCT GATTGTCATG TACCCAAAGC ATAGCTTACT	
7301	GACATGAGGA TTCTTCATA GTCAGGTAC ACCCTTGCT GGAGTCAGAA	40
7351	TCACACTGAT CACACACAGT CATGAGTGTG CTCACTCAGG TCCTGGCGTT	
7401	GCTGCTGCTG TGGCTTACAG GTAATGAAGA CAGCACTAGA ATTTCATTGA	
7451	GCTTCCTGTA CACTGTGCTG CTTGTCTCTG TGAAAATTCT CTTGTCAATT	
7501	AATCATGTGG GGATCTGTTT TCAATTTC AATTGTAGGT AGCGCGTGTG	

【表49】

7551 ACATTCCTGCT GACCCAGTCT CCAGCCACCC TGTCTCTGAG TCCAGGGAGAA
 7601 AGAGCCACTC TCTCCTGCAG GGCCAGTCAG AACATTGGCA CAAGCATA
 7651 GTGGTATCAA CAAAAACCAG GTCAGGCTCC AAGGCTTCTC ATAAGGTCTT
 7701 CTTCTGAGTC TATCTCTGGG ATCCCTTCCA GGTTTAGTGG CAGTGGATCA
 7751 GGGACAGATT TTACTCTTAC CATCAGCAGT CTGGAGCCTG AAGATTTGC
 7801 AGTGTATTAC TGTCAACAAA GIAATACCTG GGCATTACCG TTGGGCCAGG
 7851 GGACCAAGCT TGAAATCAA CGTAAGTAGA ATCCAAAGTC TCTTTCTTCC
 7901 GTTGTCTATG TCTGTGGCTT CTATGTCTAA AAATGATGTA TAAAATCTTA
 7951 CTCTGAAACC AGATTCTGGC ACTCTCCAAG GCAAAGATAC AGAGTAAC
 8001 CGTAACCAA GCTGGAAATA GGCTAGACAT GTTCTCTGGA GAATGAATGC
 8051 CAGTGTAAATA ATTAACACAA GTGATAGTTT CAGAAATGCT CTAGTT

10

【0173】

配列番号: 37

発現ベクターHCVHEN73DSp20のスクレオチド配列

【表50】

1 ctagagaggt ctgggtgggc ctgcaaaagt ccagctttca aaggaacaca gaagtatgtg
 61 batggaatat tagaagatgt tgctttact cttaaatgttgg ttcccttagaa aaatagttaa
 121 atactgtgac tttaaaatgt gagaggggtt tcaagttactc atttttttaa atgtccaaaa
 181 tttttgtcaa tcaatttgag gtcttgggg tgtagaactg acattactta aagtttaacc
 241 gaggaatggg agtgaggcgc ttcataccccc tattcagaac tgacttttaaa caataataaa
 301 ttaagtttaa aatattttta aatgaattga gcaatgttga gttggagtca agatggccga
 361 tcagaaccag aacacccctgca gcaagttggca ggaaggcaggt catgtggcaa ggcttatttgg
 421 ggaagggaaa ataaaaaccac tagttaaact tgtagctgtg gtttgaagaa gtgggttttga
 481 aacactctgt ccagccccac caaaaccggaa gtccaggcgt agcaaaacac cacctgggta
 541 atttgcattt ctaaaataaag ttgaggattt cgcggaaaact ggagagggtcc ttttttaact
 601 tattgagtttcc aaccttttaa ttttagcttgc agtagttttaa gttttcccaa acttaagttt
 661 atcgacttctt aaaaatgtttaa taagtttctt ggggcaggcc aggcttgcacc ttggctttgg
 721 ggcaggagg gggctaagggt gaggcagggtg ggcgcgcaca ggtgcacacc caatgccttcat
 781 gagcccaagac actggacgtt gaaaccttgcg gacagtttaag aaccctgggg cttctgcggcc
 841 ctggcccaag ctctgttccca caccgggttcc acatggcacc acctcttttgc cagcttccac
 901 caaggggccca tccgttccca cccctggcacc ctcccttcaag agcacccctgt gggggcacaggc
 961 ggccttgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaaccg gtgcacgggtt cgtggaaactc
 1021 aggcccccctg accagggcg tgcacacccctt cccggctgtc ctacagtccct caggactctt
 1081 ctcccttcaggc agcgtgggtca cccgttccctt cccctggcacc ggcacccaga octacatctg
 1141 caacgtgaat cacaaggccca gcaacacccaa ggtggacaag agagttggtg agaggccaggc
 1201 acaggggaggg agggtgtctg ctggaaaggca ggctcaggcgc tccctgcctgg acgcattcccg
 1261 gctatgcagt cccagtcagg ggcaggcaagg caggccccgtt ctgccttcc accccggaggc
 1321 ctctggcccgcc cccactcatg ctccaggaga gggtcttctg gttttttccc caggctctgg
 1381 gcaaggccacag gcttaggtgtcc cccaaacccag gccctgcacca caaaggggca ggtgcgtggc
 1441 tcagacccat caagagccat atccgggaggg accctggcccc tgacctaagc ccaccccaaa

20

30

40

【表 5 1】

1501 ggccaaactc tccactccct cagctcgac accttotctc ctcccagatt ccagtaactc		
1561 ccaatcttct ctctgcagag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgc		
1621 cagtaagcc agcccaggcc tcgcctccca gctcaaggcg ggacaggtgc cctagagtag		
1681 cctgcatcca gggacaggcc ccagccgggt gctgacacgt ccacccatcttccatca		
1741 gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc cccaaaaacc caaggacacc		
1801 ctcatgtct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgttgg tggacgtgag ccacgaagac		
1861 cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag		
1921 cccggggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtgtca gctcctcac cgtcctgcac	10	
1981 cagactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtt ccaacaaagc cttcccaagcc		
2041 cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa ggtggggaccc gtgggggtgc agggccacat		
2101 ggacagaggg cggctcgcc caccctctgc cctgagagtg accgtgtac caacctctgt		
2161 ccctacaggg cagccccag aaccacaggt gtacaccctg ccccccateccc gggaggagat		
2221 gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcg		
2281 cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccggtgt		
2341 ggactccgac ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca		
2401 gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgt gcatgaggct ctgcacaacc actacacgc		
2461 gaagaccc tccctgtccc cggtaaatg agtgcgacgg cggcaagcc cccgtctccc		
2521 ggctctcgcc ggtcgacacga ggatgtttgg cacgtacccc gtctacatac ttcccagggca	20	
2581 cccagcatgg aaataaaagca cccaccactg ccctggggcc ctggagact gtgtatgggtc		
2641 ttcccacggg tcaggcccgag tctgaggccct gagtggcatg agggaggccag agcgggttccc		
2701 actgtccccca cactggccca ggctgtgcag gtgtgcctgg gccccttagg gtggggctca		
2761 gccaggggct gcccctggca ggggtggggta ttgcctggc tggccctccc tccagcagca		
2821 gtcgtccctgg gtcggccac gagaagccct aggagccctt gggacacagac acacagcccc		
2881 tgcctctgtt ggagactgtc ctgttctgtt agcgtccctgtt ctcggaccc cgatgcccac		
2941 tccggggcat gcttagtcca tgcgtgttgg gacaggccctt ccctcaccaca tctacccca		
3001 cggcactaac ccctggcage cctgccccccg ctgcaccccg catggggaca caaccgactc		
3061 cggggacatg cactctcgcc ccctgtggag ggactgggtc agatgcccac acacacactc		
3121 agccagacc cgttcaacaa accccgcact gaggttggtc gagggggagt gggccagag	30	
3181 cctgcctcgcc cggcaggaa ggactcccccgtcactcgac agggagggtcc accatatttcag		
3241 ctttggtagc ttttcttctt ctttaaaatt ttctaaagct cattaattgt ttttgatgttt		
3301 tcttttgc tgcataataaa atatactttt taagtctttt acttcgtgtt gggagccgccc		
3361 ttccctgttgc cacgcgcctc ctgcctccgg tgggaagcac ggtcaggagg aggctggcc		
3421 agctgcaccc cgggggttcc ctgcactgc ccccccgcctc ctgcagccac acgcattgtcc		
3481 cggcgtaccc tccctggccc ctgtcactac atggaccctt gggcttctc ctcttttctt		
3541 catggatgca gtttctcttctt ctgtggca cgggtgtgtcc tgcctggtc actctgtgggg		
3601 ggacagggcc tccaggaaa gctgggttgc ggcgtggagg tggctcaggc tggccaggca		
3661 gagccacagg gagggccctt cagaacccaaac catggtcgac agcgtggagg ggggtgtcaga		
3721 tccagacatg ataagataca ttgtatgtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa		
3781 aaaaatgtttt atttgtgaaa tttgtgttgc tatttgcattt tttgttaacca ttataaagctg		
3841 caataaaacaa gttaaacaaca acaattgtcat tcatatgttgc tttcagggttcc aggggggaggt		
3901 gtggggaggtt ttttaaagca agtaaaaaccc ctacaaatgt ggtatggctt attatgtat	40	

【表 5 2】

3961	ctagtcaagg cactatacat caaatattcc ttat	taaaaaagcta	
4021	aaggtacaca atttttgagc atagttatta atagcagaca	ctctatgcct gtgtggagta	
4081	agaaaaamaca gtatgttagt attataactg ttatgcctac	ttataaaaggt tacagaatat	
4141	tttccataa ttttcttgc tagcagtgcg cttttttctt	ttgtgggtga aatagcaag	
4201	caagcaagag ttcttattact aaacacagea tgactcaaaa	aacttagcaa ttctgaagga	
4261	aagtcccttgg ggtcttctac ctttcttctt ttttttggag	gagtagaaatg ttgagatca	
4321	gcagtagcct catcatcaat agatggcatt tcttctgagc	aaaaacagggtt ttcttcatta	
4381	aaggcattcc accactgttc ccattcatca gttccatagg	ttgaaatcta aaatacaca	10
4441	acaatttagaa tcaatgtttt aacacattat acacttaaaa	attttatatt taccttagag	
4501	ctttaaatct ctgttaggtag tttgtccaaat tatgtcaacac	cacagaagta aggttccttc	
4561	acaaagatcc ggaccggaa ggcacatgtg cctcccccact	cctgcagttc gggggcatgg	
4621	atgcgcggat agccgctgtt ggtttcttgg atgcccacgg	atttgcactg cccgttgcac	
4681	tccgcgcaggat cgtccacgtt caggcagcag ctgaaccaac	tcgcgagggg atcgagcccg	
4741	gggtggggcga agaactccag catgagatcc cccgcgttgg	ggatcatcca gcccgggtcc	
4801	cggaaaacgaa ttccgaagcc caacctttca tagaaggcgg	cggtggaaatc gaaatctcg	
4861	gatggcaggat tgggcgtcgc ttggcgggtc atttcgaacc	ccagagtcgg gtcagaaga	
4921	actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc	gggagggcgg ataccgttaa	
4981	gcacgaggaa gccggcagcc cattcgccgc caagcttttc	agcaatataca cgggttgc	20
5041	acgttatgtc ctgatagcgg tccgcacac ccagccggcc	acagtcgtatg aatccagaaa	
5101	agccggccatt ttccaccatg atattcggca agcaggcattc	gccatgggtc acgacgagat	
5161	cctcgccgtc gggcatgcgc gcccgttgc tggcgttgc	ggcgttgc gggggccct	
5221	gatgttcttc gtccagatca tccgtatcga caagaccggc	ttccatccga gtacgtgttc	
5281	gctcgatgcg atgtttcgat tgggtggcga atgggcaggat	agccggatca agcgatgc	
5341	gcgcgcgcgt tgcattcagcc atgatggata ctttctggc	aggagcaagg ttagatgaca	
5401	ggagatccgt ccccgccact tcgcccataa gcagccagtc	cctcccgatc tcaatgtgaca	
5461	cgtcgagcac agctgcgc aa ggaacggccg tccgtggccag	ccacgtatgc cgcgttc	
5521	cgtccgtcag ttcattcagg gcacccggaca ggtcggtt	gacaaaaaaga accggggcgc	
5581	cctcgccgtga cagccggaaac acggccgtat cagagcagcc	gattgttgc tgcgttgc	30
5641	catagccgaa tagcttcacc acccaagccg cccggagaacc	tgcgtgcatt ccatcttgc	
5701	caatcatgcg aaacgtatcc catctgtct cttgtatcga	tcttgcatttgc tgcgcgcata	
5761	agatccttgg cggcaagaaa gccatccagt ttactttgc	gggtttccca accttaccag	
5821	agggccccc agctggcaat tccgggttcgc tgggtgttca	aaaaacccgc cagtcttagt	
5881	atcgccatgt aagcccaactg caagctaccc gttttcttgc	tgcgttgcg ttttcccttg	
5941	tccagatagc ccagtagctg acattcatcc ggggtcagca	ccgtttatgc ggactgggtt	
6001	tctacgtgtt ccgtttccctt tagcagccct tgccgcgttgc	gtgtttgcgg cagcgttgc	
6061	ctttttgc当地 aaggcttaggc ctccaaaaaa	ccgttgcac tacttcttgc atagctcaga	
6121	ggccggaggcg ccgttgcctt ctgcataat aaaaaaaaaatt	agtcagccat gggggcggaga	
6181	atggccggaa ctggccggag tttagggccgg gatggccgg	gttagggccgg ggactatgg	
6241	tgcgtactaa ttgagatgc tgcgttgc atcttgcctt	gtggggcgc ctggggactt	
6301	tccacacctg gttgttgcact aattgagatg catgtttgc	atacttgc tgcgtgggaa	
6361	gcctggggac ttccacacc ctaactgaca cacattccac	agctgcctcg cgcgttgc	40

【表 5 3 】

6421	tatgtacgggt gaaaacctct gacacatgca gtcggcggag acggcacag ctgtctgtt	
6481	agcggatgcc gggagcagac aagcccgtaa gggcggtca gcggtgttg gcggtgtcg	
6541	ggggcggcc atgacccagt cacgtacgca tagcggagtg tatactggct taactatgcg	
6601	gcatcagac agattgtact gagagtgcac catatgcgggt gtaaaatacc gcacagatgc	
6661	gtaaggagaa aataccgcatt caggcgctct tccgcttcct cgctcaactga ctcgtcgcc	
6721	tccgtcggttcc ggtcgccggcg agcggtatca gtcactcaaa aggccgtaa acggttatcc	
6781	acagaatcag gggataacgc agggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg	
6841	aaccgtaaaa aggccgggtt gtcgggttt ttccataggc tcggcccccc tgacgagcat	10
6901	cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccgcg caggactata aagataccag	
6961	cggtttcccc ctggaaagtc ctcgtcgcc tcttcgttcc cgaccctgca gtttaccgga	
7021	tacatgtccg ctttttccccc ttccggaaagc gtggcgctt ctcatagctc acgtgtttagg	
7081	tatctcagtt cgggttaggt cgttcgttcc aagctgggt gtgtgcacga accccccgtt	
7141	cagcccgacc gtcggccctt atccggtaac ttcgttccgtt agtccaaaccc ggtaagacac	
7201	gacttatacgc cactggcage agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgttagg	
7261	ggtgcgtacag agtttttgcggaa gtgggtggctt aactacggctt acactagaag gacagtattt	
7321	ggtatctgcg ctctgtgttca gccagttacc ttccggaaaaaa gagttggtag ctcttgcattcc	
7381	ggcaaaacaaa ccaccgttgg tagccgttggg ttttttgggtt gcaagcagca gattacgcgc	
7441	agaaaaaaaaa gatctcaaga agatcccttg atcttttca cggggcttca cgctcaactgg	20
7501	aacgaaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat ctccacccat	
7561	atcccttttaa ataaaaatgtt aagtttttcaaa tcaatctttaa gtatatatgtt gtaaaacttgg	
7621	tctgacagtt accaatgtt aatcaactgtt gtcacccatct cagcgatctt tctatttgcgt	
7681	tcatccatag ttgcctgtact ccccgctgtt tagataacta cgatacggga gggcttacca	
7741	tctggccccca gtgctgcaat gataccgcga gacccacgtt caccggctcc agatttatca	
7801	gcaataaaacc agccagccgg aaggcccgag cgccagaatgt gtcctgcacac tttatccgccc	
7861	tccatccatgtt atttatgtt ttgcgggaa gtcagatgtt gtagttgcac agttaatagt	
7921	ttgcgcacacg ttgttgcattt tgctgcaggc atcggtgtt ctcgttgcgtt gtttggatgt	
7981	gttcattca gtcgggttcc ccaacgttca agggcgatgtt catgttcccc catgttgcgtt	
8041	aaaaaaaggccgg ttatgttccctt cgggttccgtt atcggtgttca gaagtaatgtt ggccgcgttgc	30
8101	ttatctca tggttatggc agcaactgtt aatcttcttta ctgtcatgtcc atccgttaaaa	
8161	tgcttttcttgc tgactgggttca gtactcaacc aagtcattttt gagaatagtgtt tatgcggcgaa	
8221	ccgagttgtt cttggccggc gtcacacccgg gataatccgg cgccacatag cagaacttttta	
8281	aaagtgttca tcaattggaaa acgttcttgcgtt gggcgaaaaac ttcgttgcgtt cttaccgttgc	
8341	tttgcgttgcgtt acccaactgtt gtcacccaaact gatcttgcgtt atcttttact	
8401	tttgcgttgcgtt ttttgcgttgcgtt agcaaaaaacca ggaaggccaaa atgcgcacaa aaaggaaata	
8461	agggcgacac ggaaatgttca aataacttcaatcttccctt ttcaatattttt ttgaagcatt	
8521	tatcagggtt attgttctat gtcggatatac atatgttcaatgtt gtagtttagaa aaataaaacaa	
8581	ataggggttc cggccacattt tcccgaaaaaa gtgcacccatgtt acgttcaaga aaccattttt	
8641	atcatgacat taaacctataa aaatagggtt atcaacggatcc ctttcgttcc tcaagaatgtt	
8701	gagctcggtt cccatcagcc aaaaaggcatg ctcgttgcacac aacatcaattt ttcggaaaaac	
8761	gttacactta atttttcttca gtagaaacagc tttttgggtt gccaaaaaaaga atcaccatata	
8821	gtggcatata agcacaaaaaa ggagaaaaaa atcacaatataa aatgttgcgtt acgttcaaga aaccattttt	40

【表 5 4】

8881	aaaattatca	aaaaattatg	agttttacga	tttcatctt	ttccaagttg	aaatcatagg		
8941	gtggctttaa	cacagtgaca	aggaatgtgc	atgctgccat	tatggtgctc	tgcctaaaat		
9001	ggttggagcc	ttgtcatgtc	acagagaaac	tgtcatacag	caggggggtgc	caaatttcca		
9061	tatttttta	tatcatgtag	caggtgcaca	gaagaccaga	aagcacttgc	tatcaggctg		
9121	gccttcctct	tccttccag	tatgaagcaa	aaactgccaa	tgaaaacttagc	aattgttaaa		
9181	ttcctttttc	aaacagtatt	tgtgtatca	gaacatagtg	cattcaaaaag	tctagcctga		
9241	gagaacaacc	cagttttatt	cattcctct	actaaccttc	tcatteccac	tgtttgtgtt		
9301	ctccctccca	ttttaattgt	ctatctagtc	caaactaaggc	acacgatcca	gtcccacatta	10	
9361	aaaaacatgt	tttcaclta	agtcaatad	aaagacaccc	taatatcago	ccttggtcat		
9421	aatogtgctt	ctagtgactt	aatgtacatg	tcacactgta	ctgttgggtt	ttgtgtctca		
9481	tcatgaacaa	tgttgtgaag	gtatataagt	gagagtaagc	agaatttagat	tcctctaattg		
9541	atgcacaccc	acactaagag	cagaataat	ataaaaata	aaaaaaaaag	ttttacatga		
9601	gatttcaaat	acccaggtat	gagctgcagt	ttcttcaagt	taaagcatcg	aggttgtcag		
9661	ttacactatt	acagggaaaca	tatgcagagt	ttttatattt	gtatatttagt	tttcacatata		
9721	gtggaaattac	tatcaaacta	ttctttctt	tcaatgcctt	accattgtaa	atgagtttgt		
9781	gactttgtgt	aggtgagtgc	acatgactct	ggatgcctaa	gaggactgaa	gaagttggag		
9841	ttataggttag	ttttattcta	tttgactgtt	cagtgcctaa	aatacaactg	aggtcottta		
9901	aactgctgtt	catgaacttc	ttaattgata	tatctcatga	gatotctaa	ctatttttat		
9961	tatgacacgt	ttcaccatit	tcactgtac	gatttttatg	tttttatattt	atgtaactat		
10021	atgacacttc	ccaaaatccc	cataattcaca	attgaactgt	ttcaaagttt	taccttgact		
10081	tatggaaaat	aaaaacccac	attttataat	ttttaaatga	aatgtttatt	ttatattttct		
10141	gcaaatttca	caagggaaaga	ttagtcaactg	gtgtgtgaga	gcagaggagc	ataagagttc		
10201	aggaatagaa	tccattatga	ttctggaggc	aggaaagaa	tgatgccaag	gtttcaagtat		
10261	aagagcagta	tccactggaa	aggataaaagt	cactacatct	gagcacagag	caggacatct		
10321	acataatgag	tggbcactaa	tggccactg	ttacactgtt	atatgtataa	ggctcaagaa		
10381	tgagcaactg	ggctgttaagg	tgtatgggtg	aggacatcag	gatgtaaacc	cagctcaggt		
10441	agaggactca	gaggacagca	cagtcagcat	gaactaataa	acatcagata	agataaggca		
10501	caagctcagc	tatatagggt	aagggtatctt	tgttaatctg	attgtcattc	cagtcctagtt		
10561	caatgtgact	taggaagccc	agtcatatgc	aaatctagag	aagactttag	agtagaaatc		
10621	tgaggctcac	ctcacatacc	agcaagegag	tgaccaggta	gtcttaaggg	accacccctt		
10681	agacatcatg	gcttgggtgt	ggaccttgc	attccctgatg	gcagctgccc	aaagtaagac		
10741	atcagaaaaaa	agagttccaa	ggggatttga	agcagttcca	tgaataactca	cottctgtg		
10801	ttcttttccac	aggtgtccag	gcagagggtgc	agctgggtga	gtcaggagcc	gaagtaaaa		
10861	agccctggggc	ttcagtgaag	gtgtctgtca	aggcccttgg	atggatttga	tattttata		
10921	ttatccactg	ggtgaagcag	gagcctggc	agggccttga	atggatttga	tattttata		
10981	cttacaatca	tggactaaag	tacaatgaga	agttcaaagg	cagggccaca	ctaaactgcag		
11041	acaaatccat	cagcacagcc	tacatggagc	tcagcagct	gcgcotctgag	gacactgggg	40	
11101	tctactactg	tgcaagatca	ggaccctatg	cctgggttga	cacctggggc	caaggagcca		
11161	cggtcacccgt	ctcctcaggt	aagaatggcc	actctagggc	ctttgttttc	tgctgtgtcc		
11221	tgtgggattt	catgagcatt	gaaaagttgt	cctcggaca	tgttccgagg	ggacctgggc		
11281	ggactggcca	ggaggggacg	ggcactgggg	tgccttgagg	atctggagc	ctctgtggat		

【表 5 5】

11341 ttcccgatgc ctttgaaaaa tgggactgag gttgggtgcg tctgagacag taactcagcc
 11401 tgggggcttg gtgaagatcg ccgcacagca gcgcgcgt gaaaatatctt attttagactt
 11461 gtgaggtgcg ctgtgtgtca atttacatct taaatccctt attggctgga aagagaattg
 11521 ttggagtgccc tgaatccagc caggagggac gcggggggat cca

【0174】

配列番号: 38

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

10

【表 5 6】

1 CTCAGAGAGGT CTGGTGGAGC CTGCAAAAGT CCAGCTTCAG AAGGAACACA GAAGTATGTG
 61 TATGGAATAT TAGAAGATGT TGCTTITACT CTTAAGTTGG TTCTAGGAA AAATAGTTAA
 121 ATACTGTGAC TTTAAATGT GAGAGGGTTT TCAAGTACTC ATTTTTTTAA ATGTCCAAAA
 181 TTTTGTCAG TCAATTGAG CTCTGTGTTG TGTAGAACTG ACATTAACCTA AAGTTAAACC
 241 CAGGAATGGG AGTGAGGCTC TCTCATACCC TATTCAGAAC TGACTTTTAA CAAATAATAA
 301 TTAAGTTAA ATATTTTTA AATGAATTGA GCAATGTTGA GTTGGACTCA AGATGGCCGA
 361 TCAGAACCAAG AACACCTGCA GCAGCTGCCA CGAACCGAGT CATGTGGCAA GGCTATTTGG
 421 GGAAGGGAAA ATAAAACCAC TAGTTAAACT TGTAGCTGTG GTTTGAAGAA GTGGTTTTGA
 481 AACACTCTGT CCAGCCCCAC CAAACCGAAA GTCCAGGCTG AGCAGAACAC CACCTGGGTA
 541 ATTTGCATTT CTAAAATAAG TTGAGGATTG AGCCGAAACT GGAGAGGTCC TCTTTAACT
 601 TATTGAGTTG AACCTTTAA TTTTAGCTTG ACTAGTTCTA GTTTCCCCAA ACTTAAGTT
 661 ATCGACTTCT AAAATGTATT TAAGCTTCT GGGGCAAGGCC AGGCCTGACCC TTGGCTTTGG
 721 GGCAGGGAGG GGGCTAAGGT GAGCCAGCTG CGCCCAAGGCC GGTGCACACC CAATCCCCAT
 781 GAGCCCCAGAC ACTGGACGCT GAACCTCGCG GACAGTTARG AACCCAGGGG CCTCTGGGCC
 841 CTGGGCCCCAG CTCTGTCCCA CACCGCGGTC ACATGGCACC ACCTCTCTTG CAGCCCTCCAC
 901 CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCCTCCAAG AGCACCTCTG GGGCACACAGC
 961 GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGGTGT CGTGGAACTC
 1021 AGGCGCCCTG ACCAGCGCCCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA
 1081 CTCCCTCGAGC AGCGTGGTGA CGCTGGCTTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG
 1141 CAACGTGAAT CACAACCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAAG AGAGTTCGTG AGAGGCCAGC
 1201 ACAGGGAGGG AGGGTGTCTG CTGGAAAGCCA GGCTCAGGCC TCCCTGGCTGG ACGCATCCCG
 1261 GCTATGCCAGT CCCAGTCCAG GGCAGCAAGG CAGGGCCCCGT CTGGCTCTTC ACCCGGAGGC
 1321 CTCTGCCCGC CCCACTCATG CTCAGGGAGA GGGTCTTCTG CCTTTTTCCC CAGGCTCTGG
 1381 GCAGGGCACAG CCTAGGTGCC CCTAAACCCAG GCCCTGCACA CAAAGGGCCA GGTGCTGGGC
 1441 TCAGACCTGC CAAGACCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAAGC CCACCCCCAAA
 1501 GGGCAAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC CTCCCCAGATT CCAGTAACCTC
 1561 CCAATCTTCT CTCTGGCAGAG CCCAAATCTT GTGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
 1621 CAGGTAAAGCC AGCCCAAGGCC TCGCCCTCA GCTCAAGGGC GGACAGGTGC CCTAGAGTAG
 1681 CCTGCATCCA GGGACAGGCC CCAGCCGGGT GCTGACACGT CCACCTCCAT CTCTTCTCA
 1741 GCACCTGAAC TCCCTGGGGG ACCGTCAGTC TTCTCTTCC CCCAAAAACC CAAGGACACC
 1801 CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA TCCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAGAC
 1861 CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG
 1921 CCCGGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC
 1981 CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGACTACAAAG TGCAAGGTCT CCACAAAGC CCTCCAGCC

20

30

40

【表 5 7】

2041	CCCATCGAGA AAACCACATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGGACCC GTGGGGGTGCG AGGGGCCACAT	
2101	GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC CAACCTCTGT	
2161	CCCTACAGGG CAGCCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCCTG CCCCCATCCC GGGAGGGAGAT	
2221	GACCAAGAAC CAGCTCAGCC TGACCTGCGT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA CGGACATCGC	
2281	CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACMACTAC AAGACCCACGC CTCCCGTGCT	
2341	GGACTCTCCAC CGCTCCCTCTC TCTCTATAG CAAGCTCACC GTGGACAGAA GCAGCTGGCA	
2401	GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAAACC ACTACACGCA	
2461	GAAGAGCCCTC TCCCTGTCCC CGGGTAAATG AGTGGGACGG CGGGAAGGCC CGCGCTCCCC	10
2521	GGGCTCTCGC GGTCGGCACCA GGATGCTTGG CACGTACCCC GTCTACATAC TTCCCCAGGCA	
2581	CCCAGCATGG AAATAAAGCA CCCACCACTG CCCTGGGGCC CGTGGAGACT GTGATGGTTC	
2641	TTTCCACGGG TCAGGCCGAG TCTGAGGCGT GAGTGGCATG AGGGAGGGAG AGCGGGCTCCC	
2701	ACTGTCCCCA CACTGGCCCA GGCTGTGAG GTGTCCCTGG CGCGCCTAGG GTGGGGCTCA	
2761	GCCAGGGGCT GCCCTCGGCA GGGTGGGGGA TTGCGCAGCG TGGCCCTCCC TCCAGCAGCA	
2821	GCTGCCCTGG CGTGGGCCAC GAGAAGCCCT AGGAGCCCT GGGGACAGAC ACACAGCCCC	
2881	TGCCCTCTGTA GGAGACTGTC CTGTCTCTGT AGCGCCCTGT CCTCCGACCC CGATGCCAC	
2941	TGGGGGGCAT GCCTAGTCCA TGGCGGTAGG GACAGGCCCT CCCTCACCCCA TCTACCCCCA	
3001	CGGCACTAAC CCCTGGCAGC CCTGCCCAAGC CTGGCACCCCG CATGGGACCA CAACCGACTC	
3061	CGGGGACATG CACTCTCGGG CCCTGTGGAG CGACTGGTTC AGATGCCAC ACACACACTC	20
3121	AGCCCAGACC CGTTCAACAA ACCCGCGACT GAGCTTGCTC GAGGGGAGT CGGGCCAGAG	
3181	CCTGCCTCGG CGGTCAAGGGG GAACCTCCCCG CCTCACTCGA AGGAGGTCCC ACCATTCAG	
3241	CTTTGGTAGC TTTCTTCCTT CTTTAAATT TTCTAAAGCT CAITAATTGT CTTTGATGTT	
3301	TCTTTGTGA TGACRATAAA ATATCCTTT TAAGTCTTGT ACTTCGTGAT GGGAGGGCCC	
3361	TTCCCTGTGTC CACCGCGCTTC CTGGCCCCGG TGGGAAGCAC GTTCAGGGAGG AGGCTGGTCC	
3421	AGCTGCACCT CGGGGGCTCC CTGCACTCGC CCCCCGCCTC CTGCAGCCAC ACGCATTGCC	
3481	CGAGCGACCC TCCCTGGCCC CTGTCACTAC ATGGACCCCT CGGGCTTCTC CTCTTTCTA	
3541	CATGGATGCA GTTTCTCCCTC CTGCTGGCCA CGGTGCTGCC TGGCCCTGGTC ACTCTGGGG	
3601	GGACAGGGGCT TCCAGGGAAA GCTGGGTCCA GGCTGGGAGC TGGCTCAGGC TGGCCAGGCA	
3661	GAGCCACAGG GAGGGCCCTTC CAGAACCAAC CATGGTCCGA AGCGAGAGGT CGGTGTCAGA	30
3721	TCCAGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT TGGACAAACC ACAACTAGAA TCCAGTGAAA	
3781	AAAATGCTTT ATTTGTGAAA TTGCTGATGC TATGGCTTTA TTGTAACCA TTATAACCTG	
3841	CAATAAACAA GTTAACAACA ACAATTGCAT TCATTTCATG TTTCAGGTTT AGGGGGAGGT	
3901	GTGGGAGGTT TTTAAAGCA AGTAAACCTT CTACAAATGT GGTATGGCTG ATTATGATCT	
3961	CTAGTCAGG CACTATACAT CAAATATTCC TTATTAACCC CTTCACAAAT TAAAAAGCTA	
4021	AAGGTACACA ATTTTGAGC ATAGTTATTA ATAGCAGACA CTCTATGCC GTGTGGAGTA	
4081	AGAAAAAACCA GTATGTTATG ATTATAACTG TTATGCCCTAC TTATAAGGT TACAGAATAT	
4141	TTTTCCATAA TTTTCTTGTA TAGCAGTCCA GCTTTTCTT TTGTGGTGT AATAGCAAAG	
4201	CAAGCAAGAG TTCTATTACT AAACACAGCA TGACTCAAAA AACTTAGCAA TTCTGAAGGA	
4261	AAGTCCTTGG GGTCTCTAC CTTCCTCTTC TTTTTGGAG GAGTAGAATG TTGAGAGTCA	
4321	GCAGTAGCCT CTCATCACT AGATGGCATT TCTCTGAGC AAAACAGGTT TTCCTCATTA	
4381	AAGGCATTCC ACCACTGCTC CCATTCTCA GTTCCATAGG TTGGAATCTA AAAATACACAA	
4441	ACAAATTAGAA TCAGTAGTTT AACACATTAT ACACCTAAAA ATTTTATTTT TACCTTAGAG	40

【表 5 8】

4501	CTTTAAATCT CTGTAGGTAG TTTGTCCAAT TATGTCACAC CTCAGAAAGTA AGGTTCCCTTC	
4561	ACAAAGATCC GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT CCTGCAGTTC GGGGGCATGG	
4621	ATGCCGCGGAT AGCCGCTGCT GGTTTCCCTGG ATGCCGACGG ATTTGACTG CCGGTAGAAC	
4681	TCGGCGAGGT CGTCCAGCCT CAGGCAGCAG CTGAACCAAC TCCGGAGGGG ATCGAGCCCG	
4741	GGGTGGCGA AGAACTCCAG CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCGGGCGTCC	
4801	CGGAAAACGA TTCCGAAGCC CAACCTTCA TAGAAGGGCGG CGCTGGAATC GAAATCTCGT	
4861	GATGGCAGGT TGGGCGTCGC TTGGTCCGTC ATTTGGAACC CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA	10
4921	ACTCGTCAAG AAGGGGATAG AAGGCGATGC CCTCCGAATC GGGAGCGGGG ATACGTTAA	
4981	GCACGAGGAA GCGGTCAAGCC CATTGCGC CAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGCCA	
5041	ACGCTATGTC CTGATAGCGG TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA	
5101	AGCGGCCATT TTCCACCATG ATATTCGGCA AGCAGGCATC GCCATGGTTC ACGACGAGAT	
5161	CCTCGCCGTC GGGCATGCGC GCGTTGAGCC TGGGAACAG TTGGGCTGGC GCGAGCCCT	
5221	GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCGTATCGA CAACACCGGC TICCATCCGA TAACTGCTC	
5281	GCTCGATGCC ATGTTTCGCT TGGTGGTCCG ATGGGAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA	
5341	CCCGCCGCAT TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA	
5401	GGAGATCCTG CCCCCGCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCGCT TCAGTGACAA	
5461	CGTGGAGCAC AGCTGGCAA GGAACCCCG TCGTGGCCAG CCACGATAGC CGCGCTGCCT	
5521	CGTCCTGCAAG TTCAATTCAAGG CCACCCGACA CCTCGGTCTT GACAAAAGA ACCGGCGCC	20
5581	CCTGCGCTGA CACCCGGAAC ACCGGCGCAT CAGACGAGCC GATTGCTCTGT TGTCCCAGT	
5641	CATAGCCGAA TAGCCTCTCC ACCCAAGCGG CCAGAGAACCC TCGGTGCAAT CCATCTTGTT	
5701	CAATCATGCG AAACGATCCT CATTCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC CTGGGCCATC	
5761	AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GCCATCCAGT TTACTTTGCA GGGCTTCCCCA ACCTTACAG	
5821	AGGGCGCCCG AGCTGGCACT TCGGTTGCG TTGGTGTCCA TAAACCGCC CAGTCTAGCT	
5881	ATCGCCATGT AAGCCCACGT CAAGCTACCT CCTTTCTCTT TCGGCTTGCG TTTTCCCTTG	
5941	TCCAGATAGC CCAGTAGCTG ACATTGATCC GGGGTCAGCA CGGTTTCTGC GGACTGGCTT	
6001	TCTACGTGTT CGGCTTCCTT TACGAGCCCT TGGCCCTGCA GTGCTTGCG CAGGGTGAAG	
6061	CTTTTTGCAA AAGCTTAGGC CTCCAAAAAA GCCTCCCTCAC TACTTCTGGA ATAGCTCAGA	
6121	GGCCGAGGCG GCCTGGCCT CTGCATAAAT AAAAAAAATT AGTCAGCCAT GGGGGCGAGA	30
6181	ATGGGGGGA CTGGGGGAG TTAGGGGCG GATGGGGGA GTAGGGGCG GCACTATGGT	
6241	TGCTGACTAA TTGAGATGCA TCCCTTGCAAT ACTTGTGCTT CCTGGGGAGC CTGGGACTT	
6301	TCCACACCTG GTTGTGACT AATTGAGATG CATGCTTGC ATACCTCTGC CTGCTGGGA	
6361	GCCTGGGGAC TTTOCACACC CTAACGTACA CACATTCCAC AGCTGGCTCG CCGCTTCCG	
6421	TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCGGAG AGGGTCACAG CTTGCTGTA	
6481	AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTC GGGGGCTCA GCGGGTGTG GCGGGCTGTCC	
6541	GGGCGAGCC ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCC	
6601	GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGCAC CATATGCGGT GTGAAATACC GCACAGATGC	
6661	GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTGGCTGCC	40
6721	TCGGTCGTC CGCTGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCCGTAAT AGGGTTATCC	
6781	ACAGAATCAG GGGATAACGC AAGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG	
6841	AACCGTAAAAA AGGCCCCGGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCGGCCCCCC TGACGGACAT	
6901	CACAAAAATC GACCGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAAG	

【表 5 9】

6961	GGGTTTCCCC CTGGAAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCGTGTC CGACCCCTGCC GCTTACCGGA	
7021	TACCTCTCGG CCTTTCTCCC TCGGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCTAGCTC ACGCTGTAGG	
7081	TATCTCAGTT CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGACCGA ACCCCCCGTT	
7141	CAGCCCGACC CCTCGCCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC	
7201	GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGGGAG GTATGTAGGC	
7261	GTTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGGCT AACTACGGCT ACACAGAAG GACAGTATTT	
7321	CGTATCTGGG CTCTCTCGAA GCCAGTTACC TTGGAAAGA GAGTTGTTAG CTCTTGATCC	
7381	GGCAAAACAAA CCACCCCTCG TAGCGGTGCT TTTTTGTTT GCAAGCAGCA CATTACGCC	10
7441	AGAAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTG ATCTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG	
7501	AACGAAAGT CACGTTAAGG GATTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTCACCTAG	
7561	ATCCTTTAA ATTTAAATG AAGTTTAAA TCAAATCTAAA GTATATATGA GTAAACCTGG	
7621	TCTGACAGTT ACCAAATGCTT AATCAGTGG AGCCTCTATCT CAGCGATCTG TCTATTCGT	
7681	TCATCCATAG TTGCTGACT CCCCGTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA	
7741	TCTGGCCCA GTGCTGAAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTATCA	
7801	GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCCTGCAAC TTTAACCGCC	
7861	TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGGCGGGAA CCTAGAGTAA GTAGTTGCC AGTTAATAGT	
7921	TTGCGCAACG TTGTTGOCAT TGCTGCAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG	
7981	GCTTCATTCA CCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGGAGTTA CATGATCCCC CATTGTTGTC	20
8041	AAAAAAAGCCG TTAGCTCTT CCGTCCTCGG ATCGTTGTC GAAAGTAAGTT GGCGCAGTG	
8101	TTATGACTCA TGGTTATGGC AGCACTGGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA	
8161	TGCTTTCTG TGACTGGTCA GTACTCCTACC AAATCATTCT GAGAAATAGTG TATGGGGCGA	
8221	CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC GTCAACACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA	
8281	AAAGTGCTCA TCATTCGAAA ACGTTCTCG CGCCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG	
8341	TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTGGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT	
8401	TTCACCRGGG TTTCTGGGTG AGCAAAACCA GGAAGGAAA ATGCGCAAA AAAGGGAATA	
8461	AGGGGGACAC CGAAATGTTG AATACTGATA CTCTTCTTT TICAAATATTA TTGAAGCATT	
8521	TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTITAGAA AAATAAACAA	
8581	ATAGGGGTTTC CGCGCACATT TCCCCGAAAGA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCAATTATT	30
8641	ATUATGACAT TAACCTATAA AAATAGGGGT ATCACGGAGC CCTTTCGTCT TCAAGAATTG	
8701	GAGCTCGGTA CCCATCAGCC AAAAGCATG CCTGCCACAC AACATCAATT TCTGGAAAAC	
8761	GCTACACTTA ATTATTTCTA GTAGAACAGC TCTTGGTTT GCCAAAAAGA ATCACCTATA	
8821	GTGGCATCTA AGCACAAAGA GGAGAAAAAA ATCACAAAGA ATGATTGAG AGGCATAATA	
8881	AAAATTATCA AAAAATTATG AGTTTACGA TTTCATCTTT TTCCAAGTIG AAATCTAGG	
8941	GTGGCTTTAA CACAGTGACA AGGAATGTGC ATGCTGCCAT TATGGTGCTC TGGCTTAAAT	
9001	GTGGGGAGCC TTGTCATGCT ACAGAGAAC TGTCATACAG CAGGGGGTGC CAAATTCTCA	
9061	TATTTTTTA TATCATTGAG CAGGTGCACA GAAGACCAGA AAGCACTTTC TATCAGGCTG	
9121	GCCTTCTCTC TCCCTTCCAG TATGAACCAA AAACAGCCAA TGAAACTAGC AATTGTTAAA	
9181	TTCCCTTTTC AAACAGTATT TGTGCTATCA GAACATAGTG CATTCAAAAG TCTAGCCTGA	40
9241	GAGAACAAACC CAGTTTATT CATTCTCTCT ACTACCTCTC TCATTCCCAC TCTTGTGTT	
9301	CTCCCTCCCA TTPTAATGTT CTATCTAGTC CAAACTAAGC ACACGATCCA GTOCACATTA	
9361	AACAAACATGT TTTCACTTTA AGTCAANTAC AAGACACCTT TAATATCAGC CCTTGTTCAT	

【表60】

9421 AATCGTGCTT CTAGTGACTT AATGTACATG TCACACTGTA CTGTTGGGTT TTGTGTCTCA
 9481 TCATGAAACAA TGTTGTGAAG GTATTAAGTG GAGAGTAAGC AGAATTAGAT TCCTCTAATG
 9541 ATGCACACCCC ACACATTAAGAG CAGAAATAAT ATTAAATAATAA GAAATAAAAG TTTTACATGA
 9601 GATTTCTAAT ACCCAGGTAT GAGCTCCAGT TTCTTCAGT TAAAGCATCG AGGTGTCTCAG
 9661 TTACACTTTT ACAGGAAACA TATGCACAGT TTTTATTTTA GTATATTAGT TTTCACATAT
 9721 GTGGAATTAC TATTAACTA TTCTTTCTTT TCAAATGCCT ACCATTGTAA ATGAGTTGT
 9781 GACTTTGTGT AGGTGACTGTC ACATGACTCT GGATGCCCTAA GAGGACTGAA GAACTGGAG
 9841 TTATAGGTAG TTTTATTCTA TTGACTGTT CAGTGCTAAA AATACACCTG AGGTCCCTTA 10
 9901 AACTGCTGTT CATGAACTTC TTAATTGATA TATCTCATGA GATCTCTAAA CTATTTTAT
 9961 TATGACACGT TPCACCAATT TCACTGTAAC GATTTTATG TTTTATATTA ATGTAACAT
 10021 ATGACACTTC CCAAAATCCC CATATTACA ATTGACTGTT TTCAAAGTTT TACCTTGACT
 10081 TATGGAAAT GAAACCCAC ATTTTATAAT TTAAATGAA AATGTTTATT TTATATTCT
 10141 GCAAATTTCA CAAGGAAAGA TTAGTCACTG GTGTGTGAGA GCAGAGGAGC ATAAGAGTTC
 10201 AGGAATAGAA TCCATTATGA TTCTGGAGGC AAGGAAGAAC TGATGCCAAG GTTTCACTAT
 10261 AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAGT CACTACATCT GACCACAGAG CAGCACATCT
 10321 ACATAATGAG TGGTCACTAA TGGGCCACTG TTACACTGTT ATATGTATAA GGCTCAAGAA
 10381 TGAGCACTGA GGCTGTAAGG TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAACC CAGCTCAGGT
 10441 AGAGGACTCA GAGGACAGCA CAGTCAGCAT GAACTAATAA ACATCAGATA AGATAAGGCA 20
 10501 CAAGCTCAGC TATATAGGGT AAGGGATCTT TGTAATCTG ATTGTGCTATC CAGTCTAGTT
 10561 CAATGTGACT TAGGAAGCCC AGTCATATGC AAATCTAGAG AAGACTTTAG AGTAGAAATC
 10621 TGAGGCTCAC CTCACATACC ACCAAGCGAG TGACCACTTA GTCTTAAGGC ACCACCTCTT
 10681 AGACATCATG CCTTGGGTGT GGACCTTGCC ATTCTGATG GCAGCTGCCA AAAGTAAGAC
 10741 ATCAGAAAAAA AGACTTCCAA GGGCAATTGA AGCPGTTCCA TGAATACTCA CCTTCCCTGTG
 10801 TTCTTTCAC AGGTGTCAG GCACACGTGC AGCTGGTGA GTCAGGAGCC GAAAGTGA
 10861 AGCCTGGGGC TTCACTGAAAG GTGTCTGCA AGGCCTCTGG ATACACATTC ACTAATTATA
 10921 TTNTCCACTG GGTGAAAGCAG GAGCCTGGTC AGGGCCTTGA ATGGATTGGA TATTTTATC
 10981 CTTACAATCA TGGTACTAAG TACAATGAGA AGTTCAAGG CAGGGCCACA CTAACCTGAG
 11041 ACAATCCAT CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT GCGCTCTGAG GACACTGCCG 30
 11101 TCTACTACTG TCCAGATCA GACCCCTATG CCTGGTTGAA CACCTGGGGC CAAGGGACCA
 11161 CGGTCACCGT CTCTCAGGT AAGAATGCC ACTCTAGGGC CTTTGTGTTTC TGCTGCTGCC
 11221 TGTGGGATT CATGAGCATT GCAAGTTGT CCTCGGGACA TGTTCGGAGG GGACCTGGGC
 11281 GGACTGCCA GGACCCACG GGCACCTGGG TGCCTTGAGC ATCTGGAGC CTCTGTGGAT
 11341 TTTCGGAAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGCG TCTGAGACAG TAACTCAGCC
 11401 TGGGGCTTG GTGAGATCG CGCAGCAGCA CGGAGTCCGT GAAATATCTT ATTTAGACTT
 11461 GTGAGGTGCG CTGTGTGTC ATTACATCT TAATCCTTT ATTGGCTGGA AACAGAATTG
 11521 TTGGACTGGG TGAATCCAGC CAGGAGGGAC GCGGGGGGAT CCA

【0175】

40

配列番号：39

発現ベクターLCVLSp20のヌクレオチド配列

【表61】

1 CTAGAGTCCT AGAGAGGTCT GGTGGAGCCT GCAAAAGTCC AGCTTTCAAA
 51 GGAACACAGA AGTATGTGTA TGGAAATATTA GAAAGATGTTG CTTTTACTCT

【表 6 2】

101 TAAGTTGGTT CCTAGGAAAA ATAGTTAAAT ACTGTGACTT TAAATGTGA
 151 GACGGTTTC AAGTACTCAT TTTTTAAAT GTCCAAATT TTTGTCAATC
 201 AATTTGAGGT CTTGTTGTG TAGAACTGAC ATTACTTAAAC TTGTAACCGA
 251 GGAATGGGAG TGAGGCTCTC TCATACCCCA TTTCAGAACTG ACTTTAAACA
 301 ATAATTAATT AAGTTTAAAAT TATTTTTAAA TGAATTGAGC AATGTTGAGT
 351 TGGAGTCAG AATGCCGATC AGAACCCAGAA CACCTGCAGC AGCTGGCAGG
 401 AAGCAGGTCA TGTGGCAAGG CTATTTGGGG AAGGGAAAAT AAAACCACTA
 451 CGTAAACTTG TAGCTGTGGT TTGAAGAGT GCTTTGAAA CACTCTGTCC
 501 AGCCCACCA AACCGAAAGT CCAGGCTGAG CAAACACCA CCTGGGTAAAT
 551 TTGCATTCTC AAAATAAGTT GAGGATTCAAG CCGAAACTGG AGAAGTCCTC
 601 TTTTAACCTA TTGAGTTCAA CCTTTAAATT TTAGCTTGAG TAGTTCTAGT
 651 TTCCCCAAC TTAAGTTAT CGACTTCATA AATGTATTAA GAACTCATTT
 701 TCAAAATTAG GTTATGTAAG AAATGAAAGG ACTTTAGTGT CTTTAATTTC
 751 TAAATATTTT AGAAAACCTTC TTAAAATTAC TCTATTATTC TTCCCTCTGA
 801 TTATTGGTCT CCATTCAATT CTTTTCCAAT ACCCGAAGCA TTTACAGTGA
 851 CTTTGTTCAT GATCTTTTT AGTTGTTGT TTTGCCTTAC TATTAAGACG
 901 TTGACATCTC GGTCPAAACCG GCTTCACACAA TCTTTTCAA GACCACTTTC
 951 TGAGTATTCA TTTTAAAGGAGA AATACTTTTT TTTTAATGA ATGCAATTAT
 1001 CTAGGACCTG CAGGCATGCT GTTTTCTGTC TGTCCCTAAC ATGCCCTGTG
 1051 ATTATCCGCA AACACACACAC CCAAGGGCGAG AACTTTGTTA CTTAAACACCC
 1101 ATCCCTTTTG CTTCTTCCT CAGGAACGTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA
 1151 TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACTGCG CTCTGTTGTG
 1201 TGGCTGCTGA ATAACCTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTCAC AGTGGAAAGGT
 1251 GGATAACGCC CTCCCATCGG GTAACTCCCA GGAGAGTGTG ACAGAGCAGG
 1301 ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCGTAC GCTGAGCAA
 1351 GCGAGACTACG AGAACACCAA AGTCTACGCC TGCAGAGTCA CCCATCAGGG
 1401 CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGAGGG
 1451 AGAAAGTCCCC CCACCTGCTC CTCAGTTCAA GCCTGACCCC CTCCCATCCT
 1501 TTGGCCCTTG ACCCTTTTC CACAGGGGAC CTACCCCTAT TGCAGGTCTC
 1551 CAGCTCATCT TTCACTTCAC CCCCCCTCTC CTCCTTGGCT TTAATTATGC
 1601 TAAATGTTGGA GGAGAATGAA TAAATTAAGT GAATCTTTGC ACCTGTGGTT
 1651 TCTCTCTTTC CTCATTTAAT AATTATTCATC TGTGTGTTA CCAACTACTC
 1701 AATTTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG TCATCCTAAG GCGGGATATC
 1751 GAGATCTGAA GCTGATCCAG ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGAC
 1801 AAACCAACACAG TAGAATGCAG TGAAAAAAAT GCTTTATTG TGAAATTGT
 1851 GATGCTATTCG CTTTATTGTTG AACCTTTATA AGCTGCATAA AACAAAGTTAA
 1901 CACACACAAAT TGCATTCAATT TTATGTTCA GGTTCAGGGG GAGGTGTGGG
 1951 AGGTTTTTA AAGCAAGTAA AACCTCTACA AATGTTGTTAT GGCTGATTAT
 2001 GATCTCTAGT CAAGGCACCA TACATCAAAT ATTCCCTTATT AACCCCTTTA
 2051 CAAATTTAAA AGCTAAAGGT ACACAAATTG TGAGGATAATG TATTAATAGC
 2101 AGACACTCTA TGCCTGTGTG GAGTANGAAA AACACAGTATG TTATGATTAT

【表 6 3】

2151	AACTGTTATG CCTACTTATA AAGGTTACAG AATATTTTC CATAATTTTC	
2201	TTGTATAGCA GTCCAGCTT TTCCCTTGTG GTGAAATAG CAAAGCAAGC	
2251	AAGAGTTCTA TTACTAAACA CAGCATGACT CAAAAAACTT AGCAATTCTG	
2301	AAGGAAAGTC CTGGGGTCT TCTACCTTTC TCTTCTTPTT TGGAGGAGTA	
2351	GAATGTTGAG AGTCAGCAGT AGCCTCATCA TCACTAGATG GCATTTCTTC	
2401	TGAGCAAAAC AGGTTTCTCCT CATTAAAGGC ATTCCACCAC TGCTCCCATT	
2451	CATCAGTTCC ATAGGTTGGA ATCTAAATA CACAAACAAAT TAGAATCAGT	
2501	AGTTTAAACAC ATTATAACACT TAAAAATTTT ATATTTACCT TAGAGCTTA	10
2551	ATCTCTGTA GGTAGTTTGT CCAATTATGT CACACCACAG AAGTAAGGTT	
2601	CCTTCACAAA GATCCGGACC AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCCTGC	
2651	AGTTGGGGGG CATGGATOCG CGGATAACCG C TGCTGGTTT CCTGGATGCC	
2701	GACGGATTTC CACTGCCGT AGAACTCCGC GAGGTGCTCC AGCCTCAGGC	
2751	AGCAGCTGAA CCAACTCCGC AGGGGATCGA GCATCCCCCA TGGTCTTATA	
2801	AAAATGCATA GCTTTAGGAG GGGAGCAGAG AACTTGAAAG CATCTTCTG	
2851	TTAGTCTTTC TTCTCGTAGA CTTCAAACCTT ATACTTGATG CCTTTTCTCCT	
2901	CCTGGACCTC AGAGAGGACG CCTGGGTATT CTGGGAGAAG TTTATATTTC	
2951	CCCAAAATCAA TTTCTGGAA AACGTGTCA CTTTCAAATT CCTGCATGAT	
3001	CCTTGTACAA AAGAGCTGTA GGTGGCTTGG TTGATTCTATG GCTTCCTGGT	20
3051	AAACAGAACT GCCTCCGACT ATCCAAACCA TGTCTACTTT ACTTGCCAT	
3101	TCCGGTTGTT CAATAAGTCT TAAGGCATCA TCCAAACTTT TGGCAAGAAA	
3151	ATGAGCTCCT CGTGGTGGTT CTTTGAGTT TC TACTGAGA ACTATATTA	
3201	TTCTGTCTT TAAAGGTGTA TTCTTCTCAG GAATGGAGAAG CCAGGTTTTC	
3251	CTACCCATAA TCACCCAGAAT CTGTTTACCT TCCACTGAGB AGGTTGTTGGT	
3301	CATTCTTTCGG AAGTACTTGA ACTCGTTCTT GAGCGGAGGC CAGGGTCGCT	
3351	CTCCGTTCTT CCCAAATCCCC ATATTTTCGG ACACGGCGAC GATGCAGTTC	
3401	AATGGTCGAA CCATGATGCC AGGGGGGATA AAAATCTTACG AGCCTTCACG	
3451	CTAGGATTTC CGTCRAAGTTT GGGGGTACCG AGCTCGAATT AGCTTTTGC	
3501	AAAAGCCTAG GCCTCCAAA AAGCCTCCCTC ACTACTTCTG GAATAGCTCA	30
3551	GGGGGGGAG GCGGCCCTGG CCTCTGCATA AATAAAAGAA ATTAGTCAGC	
3601	CATGGGGCGG AGAATGGGCG GAACTGGGCG GAGTTAGGGG CGGGATGGCC	
3651	GGAGTTAEGG GCGGGACTAT GGTTGCTGAC TAATTGAGAT GCATGCTTTC	
3701	CATACTTCTG CCTGCTGGGG AGCCTGGGGA CTTTCCACAC CTGGTTGCTG	
3751	ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG	
3801	GACTTTCCAC ACCCTAACCTG ACACACATTC CACAGCTGCC TCGCGCGTTT	
3851	CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA	
3901	CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGASCA GACAAGCCCC TCAGGGCCCG	
3951	TCAGGGCTG TTGGGGCTG TCGGGGGCGCA CCCATGACCC AGTCACGTAG	
4001	CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACCTAT CGGCATCAG AGCAGATTTGT	40
4051	ACTGAGAGTC CACCATATGTC CGCCGCAATAT CGCGTGTGAA ATACCGCACA	
4101	GATGGCTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGC GCTTTCCGC TTCCCTCGCTC	
4151	ACTGACTCGC TGCCTCGGT CGTTGGCTG CGGGGAGCGG TATCAGCTCA	

【表 6 4】

4201	CTCAAAGGCG	GTAATAACGGT	TATCCACAGA	ATCAGGGGAT	AACGCAGGAA	
4251	AGAACATGTG	ACCAAAAGGC	CAGCAGAAAGG	CCAGGAACCG	TAAGAAGGCC	
4301	CGGTTGCTGG	CGTTTTTCCA	TAGGCTCCGC	CCCCCTGACG	AGCATCACAA	
4351	AATTCGACGC	TCAAGTCAGA	GGTGGCGAAA	CCCCACACGA	CTATAAAGAT	
4401	ACCAGGGTT	TCCCCCTGGA	AGCTCCCTCG	TGCCTCTCC	TGTTCCGACC	
4451	CTGGCGCTTA	CGGGATACCT	GTCCCCCTT	CTCCCTTCGG	GAACCGTGGC	
4501	GCTTTCCTCAT	AGCTCACCGT	GTAGGTATCT	CAGTTGGTGC	TAGGTGGTTC	
4551	GCTCCAAGCT	GGGCTGTGTG	CACGAACCCC	CGGGTCAGCC	CGACCGCTGC	10
4601	GCCTTATCCG	GTAACATATCG	TCTTGAGTCC	AAACCCGGTAA	GACACGACTT	
4651	ATCGCCACTG	GCAGCGGCCA	CTGGTAACAG	GATTAGCAGA	GGGAGGTATG	
4701	TAGGCGGTGC	TACAGAGTTC	TTGAAGTCGT	GGCCTAACTA	CGGCTACACT	
4751	AGAAGGACAG	TATTTGGTAT	CTGGCTCTG	CTGARGGCCAG	TTACCTTCGG	
4801	AAAAAGAGTT	GGTAGCTCTT	GATCCCGCAA	ACAAACCAACC	GCTGGTAGCG	
4851	GTCGTTTTTT	TGTTTGCAAG	CAGCAGATTA	CGGGCAGAAA	AAAAGGATCT	
4901	CAAGAAGATC	CTTTCATCTT	TTCTACGGGG	TCTGACGCTC	ACTCCGAAACGA	
4951	AAACTCAACGT	TAAGGGATTT	TGGTCATGAG	ATTATCAAAA	AGGATCTTCA	
5001	CCTAGATCCT	TTTAAATTAA	AAATGAAGTT	TTAATCAAT	CTAAAGTATA	
5051	TATGAGTAAA	CTTGGTCTGA	CAGTTACCAA	TGCTTAATCA	GTGAGGCACC	20
5101	TATCTCAGCG	ATCTGTCTAT	TTCGGFTCATC	CATAAGTGCC	TGACTCCCCG	
5151	TGGTGTAGAT	AACTACGATA	CGGGAGGGCT	TACCATCTGG	CCCCAGTGCT	
5201	GCAATGNTAC	CCCGAGACCC	ACGCTCACCG	GCTCCAGATT	TATCAGCAAT	
5251	AAACCAGGCCA	GGCGGAGAGGG	CGGACCCGAG	AAGTGGTCCT	GCAACTTTAT	
5301	CCGGCTCCAT	CCRGTCATATT	AAATGGTCCC	GGGAAGCTAG	AGTAAGTAGT	
5351	TGGCCAGTTA	ATAGTTTGCG	CAACGGTTGT	GCCATTGCTG	CAGGCATCGT	
5401	GGTGTACCGC	TCGTGTTTG	GTATGGCTTC	ATTCAAGCTCC	GGTTCCCAAC	
5451	GATCAGGGCG	AGTTACATGA	TCCCCCATGT	TGTGCAAAAA	ACCGGTTAGC	
5501	TCCCTCGGTC	CTCCGATCGT	TGTCAGAACT	AAGTTGGCCG	CAGTGTATTC	30
5551	ACTCATGGTT	ATGGCAGCAC	TGCATAATTC	TCTTACTGTC	ATGCCATCCG	
5601	TAAGATGGTT	TTCTGTGACT	GGTGAGTAATC	CAACCAAGTC	ATTCTGAGAA	
5651	TAGTGTATGC	GGCGACCGAG	TTGCTCTTGC	CCGGCGTCAA	CACGGGATAAA	
5701	TACCGCGCCA	CATAGCAGAA	CTTTAAAGT	GCTCATCATT	GGAAACCGTT	
5751	CTTCGGGGCG	AAAGACTCTCA	AGGATCTTAC	CGCTGTTGAG	ATCCAGTTCG	
5801	ATGTAACCCA	CTCGTGCACC	CAACTGATCT	TCACCATCTT	TTACTTTCAC	
5851	CAGCGTTCT	GGGTGAGCAA	AAACAGGAAG	CGAAATGCC	GCAABAAAGG	
5901	GATTAAGGGC	GACACGGAAA	TGTTGAATAC	TCATACTCTT	CCTTTTCAA	
5951	TATTTATGAA	GCATTATCA	GGGTTATTGT	CTCAGGAGCG	GATACATATT	
6001	TGAATGTTATT	TAGAAATATA	AAACAAATAGG	GGTTCCCCCGC	ACATTTCCCC	40
6051	AAAAAGTGCC	ACCTGACGTC	TAAGAAACCA	TTATTATCAT	GACATTAACC	
6101	TATAAAATTA	GGCGTATCAC	GAGGCCCTTT	CGTCTTCAG	AAATCAGCTG	
6151	CTCGACCGAAG	AGCTCAAAACC	CATGCTACTC	TCTGGCTTGA	TGGAAAGCAAC	
6201	GCTTTCATAG	CTGAGGCTGTC	ATAATAATA	AAGAGATTTT	TTTATTATA	

【表 6 5】

6251	TTGAAAAAGAT GGGTATTATA TGTAAAGACTC TGTCTTCATT TTAAGAACCA	
6301	CACCTTCCAG TAGTATTCTG TTACTGTTCT GGCAATCACT GTGATCAAGA	
6351	AGCTACACGG TGAGTTGTGC TTCTCAGTCC TAAGGGATAC ATCTACAAAGA	
6401	GGCTCCCATA CTCGAAGCTC AGGAAACATT GTAGAAAAGG AGGCAAAAGA	
6451	CTGACAGAGC CAGAGGACCA AGAAAATTGTG TGTGAGGTTG TGTCTCCCTAC	
6501	TAACATATA AGCAATTTCT ATAAATTGTT GATATCATGG CTACTAAAT	
6551	GTGAGTTGAA CGACGAGGAC ACAAAATGAAAC ATGACAATCA GAATCAGGCC	
6601	TCTCACCTGC AAAAACACT ATAGAGAAGC AGATAAAGCT GTCAGGCAGCAA	10
6651	GAGGCGCACC TCCTTATAGA AGAAGCCTAC CAGGTTTGAT ATATCAGCCT	
6701	TGAAAACCTA CATACTATTT ACATTATATC GAGTCTATGA GACATATTTA	
6751	GTAATGCATA TGTATGTCTG TGTGTGCATG TATGTGTGTA AATACATATG	
6801	TTCATAGAAA AATGTGTAAA AAGAGATCAT GAATTTAAGA GAGAACTGGG	
6851	ACAATTTTTT TCAGGGAGTT GTAATCAGGA AAGTTAAGGG AAAAATGTTG	
6901	TAATTAAAAAT TCAGGCTCAG AAACAAACAA AGGAAAAGAA AAAAACACAA	
6951	CAACAAACAAAC AAAAACACAA AACAAAGGAG AAGCTGTATG GCCACAAATAG	
7001	CATCTACAGC TAACTGTGAA AGGATAATGG AACAGTTTAT GTAACGCCTA	
7051	GAGCAGTATG ATGCCTAAAT CATCTCCACA TGGAGGAAAGA TAGAACAAAC	
7101	ACACTCTACA TAGACTATGA TAGAAATCAA AATAACGTGT AAGACATAGA	20
7151	ACATTAGTTT TGTTTGTGTT TCAAAGAGAC TCACATTCCC ACAAAAAAAT	
7201	CTGTGGGATT TTACAGGTCT GCAATTCGCT GCTGACCTGTA TGATTTCTGC	
7251	AGCTGTGCCT ACCCTTTGCT GATTTGCATG TACCCAAAGC ATAGCTTACT	
7301	GACATGAGGA TTTCTTCATA GTCAGGTAC ACCCTTTGCT GGAGTCAGAA	
7351	TCACACCTCAT CACACACAGT CATGAGGTGTG CTCACCTCAGG TCCCTGGCGTT	
7401	GCTGCTGCTG TGGCTTACAG GTAATGAAGA CAGCACTAGA ATTTTATTGA	
7451	GCTTCCTGTA CACTGTCTG CTTGTCTCTG TGAAAATTCT CTTGTGAATT	
7501	AATCATGTGG GGATCTGTT TCAATTTC AATTTGAGGT ACGCGITGTG	
7551	ACATTCTGCT GACCCAGTCT CCAGCCACCC TGTCTCTGAG TCCCTGGAGAA	30
7601	AGAGCCACTT TCTCCTGCAAG GGCCAGTCAG AACATTGGCA CAAAGCATAACA	
7651	GTGGTATCAA CAAAAAACAA ATGGTGCTCC AAGGCTCTC ATAACGGTCTT	
7701	CTTCTGAGTC TATCTCTGGG ATCCCTTCCA GGTTTAGTGG CAGTGGATCA	
7751	GGGACAGATT TTACTCTTAC CATCAGGACT CTGGAGGCTG AAGATTTGCG	
7801	AGTGTATTAC TGTCAACAAA GTAATACCTG GCCATTCAAG TTCCGGCCAGG	
7851	GGACCAAGCT TGAATTCAGA CGTAAGTAGA ATCCAAAGTC TCTTTCTTCC	
7901	GTTGTCTATG TCTGTGGCTT CTATGTCTAA AAATGATGTA TAATATCTTA	
7951	CTCTGAAACC AGATTCTGGC ACTCTCCAAAG GCAAGATAC AGAGTAACCTC	
8001	CGTAAGCAAA GCTGGGAATA GGCTAGACAT GTTCTCTGGA GAAATGAATGC	
8051	CAGTGTAAATA ATTAAACACAA GTGATAGTTT CAGAAATGCT CTAGTT	40

【0176】

配列番号 : 40

発現ベクター H C V H E S p 2 0 のヌクレオチド配列

【表 6 6】

1	CTAGGGAGGT CTGGTGGAGC CTGCAAAAGT CCAGCTTTCA AAGCAACRCA	
51	CAAGTATGTG TATGAAATAT TAGAAGATGT TGCTTTACT CTTAAGTTGG	
101	TTCCTAGGAA AAATAGTTAA ATACTGTGAC TTAAATGT GAGAGGGTTT	
151	TCAAGTACTC ATTTTTTAA ATGTCCAAA TTTTTGTCAA TCAATTGAG	
201	GTCTTGTGTTG TGTAGAACTG ACATTAACCTA AAGTTAACCC GAGGAATGGG	
251	AGTGAGGCTC TCTCATACCC TATTCAAGAAC TGACTTTAA CAATAATAAA	
301	TTAAGTTAA AATATTTTTA AATGAAATGCA GCAATGTTGA GTGGAGTCA	
351	AGATGGCCGA TCAGAAACAG AACACCTGCA GCAGCTGGCA GGAAGCAGGT	
401	CATGTGGCAA GGCTATTTGG GGAAGGGAAA ATAAAPACCAC TAGGTAAC	10
451	TGTAGCTGTC CTTTGAAGAA GTGGTTTGCA AACACTCTGT CCAGCCCCAC	
501	CAAACCGAAA GTCCAGGCTG AGCAAAACAC CACCTGGTA ATTTGCAATT	
551	CTAAATAAG TTGAGGATTG AGCCGAACCT AGAGAGGTCC TCTTTAACT	
601	TATTGAGTTC AACCTTTAA TTTTAGCTTG AGTAGTTCTA GTTTCCCCAA	
651	ACTTAAGTTT ATCGACTTCT AAAATGTATT TAAGCTTTCT GGGGCAGGCC	
701	AGGCCCTGACC TTGGCTTTGG GGCGAGGCCGG GGGCTAAGGT GAGGCAGGTC	
751	GGGCCAGCCA CGTGCACACC CAATGCCCAT GAGCCCAGAC ACTGGACGCT	
801	GAACCTCGC GACAGTTAAG AACCCAGGGG CCTCTGOGCC CTGGGCCCCAG	
851	CTCTOTCCCA CACCGCGTC ACATGCCAAC ACCTCTCTTG CAGGCTCCAC	
901	CAAGGGCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACCC CTCTCCAAG AGCACCTCTG	20
951	GGGGCACAGC GGGCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCCGAACCG	
1001	GTGACGGTGT CGTGGAACTC AGGGCGCCCTG ACCAGCGCG TGACACACCTT	
1051	CCCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTCA	
1101	CGTGGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACTGAAAT	
1151	CACAAGCCCA GCAACACCAA GTGGACAAAG AGAGTTGGTG AGAGGCCAGC	
1201	ACAGGGAGGG AGGGTGTCTG CTGGAAAGCCA GGCTCAGCCC TCCTGCCTGG	
1251	ACGCAATCCCG GCTATGCAGT CCCAGTCCAG GGCAGCAAGG CAGGCCCCGT	
1301	CTGCCCTCTTC ACCCGGAGGC CTCTGCCCGC CCCACTCATG CTCAGGGAGA	
1351	GGGTCTTCTG GCTTTTCTCC CAGGCTCTGG GCAGGCACAG GCTAGGTGCCC	30
1401	CCTAACCCAG GCCCTGCAAA CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC TCAAGACCTGC	
1451	CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAAGC CCACCCCCAAA	
1501	GGCCAAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC CTCCCCAGATT	
1551	CCAGTAACTC CCAATCTTCT CTCTGCAGAG CCCAAATCTT GTGACAAAAAC	
1601	TCACACATGC CCACCGTGCC CAGGTAAAGCC AGCCCAGGCC TCGCCCTCCA	
1651	GCTCAAGGGG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG CCTGCATCCA GGGACAGGCC	
1701	CCAGGGGGGT GCTGACACGT CCACCTCCAT CTCTTCTCTA GCACCTGAAAC	
1751	TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC TTCTCTTCC CCCCCAAAACC CAAGGACACCC	
1801	CTCATGATCT CCAGGACCCCC TGAGGTCAACCA TGCCTGGTGG TGGACGTTGAG	
1851	CCACCGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCCTGGAGG	40
1901	TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC	

【表 6 7】

1951	CGTGTGGTCA GCGTCTTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA	
2001	GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCGAGCC CCCATCGAGA	
2051	AAACCATCTC CAAGCCAAA GTGGGAGCCC GTGGGCTGCG AGGGCCACAT	
2101	GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCCTGTC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC	
2151	CAACCTCTGT CCCTACAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCCTG	
2201	CCCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCGAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT	
2251	GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATGCC CGTGGAGTGG GAGAGGAAATG	10
2301	GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCCAGCC CTCCCCGTGCT GAACTCCGAC	
2351	GGCTCCTTCT TCCCTCTATAG CAAGCTCACCC GTGGACAAAGA GCAGGTGGCA	
2401	GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT CCTCCCGTGT GCATGAGGCT CTGCACAAACC	
2451	ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCCC CGGGTAAATG AGTCCGACGG	
2501	CGGGCAAGCC CGCGCTCGCC CGGCTCTCGC GGTCGGCACGA GGATCTTGG	
2551	CAOGTACCCCC GTCTACATAC TTCCCAGGCA CCCAGCATGG AAATAAAGCA	
2601	CCCACCACTG CCCTGGGCCC CTGCGAGACT GTGATGGTTC TTTCCACGGG	
2651	TCAGGGCGAG TCTGAGGCT GAGTGGCAGT AGGGGACCCAG AGCGGGCTCCC	
2701	ACTGTCCCCA CACTGGCCCA GGCTGTGCAAG GTGTGCCTGG CCCGCCTAGG	
2751	GTGGGGCTCA GCCAGGGCTT CCCTCGGCA GGCTGGGGGA TTTGCCAGCG	
2801	TGGCCCTCCC TCCAGCAAGCA CCTCCCCCTG GCTGGCCAC GAGAACCCCT	20
2851	AGGAGCCCCCT GGGGACAGAC ACACAGCCCC TGCTCTGTA GGAGACTGTC	
2901	CTETCCTGTG AGCCTCCCTGT CCTCCCGACCC CGATGCCAC TCGGGGGCAT	
2951	GCCTAGTCCA TGCGCGTAGG GACAGGCCCT CCCTCACCCCA TCTACCCCCA	
3001	CGGCRACTAAC CCCTGGCAGC CCTGCCAACG CTGCGACCCCG CATGGGACA	
3051	CAACCGACTC CGGGGACATG CACTCTCGGG CCCTGTGGAG GGACTGGTGC	
3101	AGATGCCAC ACACACACTC AGCCCCAGACCC CGTTCAACAA ACCCCCCACT	
3151	GAGGTTGGTC GAGGGGGAGT GCGGCCAGAG CCTGCCTCGG CGTCAGGGGA	
3201	GGACTCCCCG GCTCACTCGA AGGAGGTGCC ACCATTTCAAG CTTTGATGAGC	
3251	TTTTCTTCTT CTTTAAATT TTCTAAAGCT CATTAATTGT CTTTGATGTT	
3301	TCTTTTGTGA TGACAATAAA ATATCCTTT TAAGTCTTGT ACTTCGTGAT	30
3351	GGGAGCCGCC TTCCCTGTGTC CACCGCCCTC CTGCCCCCGG TGGGAAGCAC	
3401	GGTCAGGAGG AGGCTGGTCC AGCTGCACCT CGGGGGCTCC CTGCACTCGC	
3451	CCCCCGGCCCTC CTGCGAGCCAC ACACATTGCC CGAGCGACCC TCCCTGGCCC	
3501	CTGTCACTAC ATGGACCCCT GGCGCTTCTC CTCTTTCTA CATGGATGCA	
3551	TTTTCTCCTC CTGCTGGCA CGGTGCTGCC TGCCCTGGTC ACTCTGCGGG	
3601	GGACAGGGCC TCCAGGGAAA CCTGGGTGCA GGCTGGGAGC TGGCTCAGGC	
3651	TGGCCAGGGCA GAGCCACAGG GAGGGCCTTC CAGAACAAAC CATGGTCCGA	
3701	AGGCCAGAGGT GGCTGTGAGA TCCAGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT	
3751	TGGACAAACC ACAACTAGAA TGCAGTGAAG AAAATGCTTT ATTTGTGAAA	40
3801	TTTGTGATGC TATGTCTTAA TTTGTAACCA TTATAAGCTG CAATAAAACAA	
3851	GTAAACAACA ACAATTGCAT TCAATTATG TTPCAGGTT AGGGGGAGGT	
3901	GTGGGAGGTT TTTTAAAGCA AGTAAACCT CTACAAATGT GGTATGGCTG	
3951	ATTATGATCT CTAGTCAGG CACTATACTA CAAATATTCC TTAATTAAACCC	

【表 6 8】

4001	CTTTACAAAT TAAAAAGCTA AAGGTACACA ATTTTTGAGC ATAGTTAFTA	
4051	ATAGCAGACA CTCTATGCCCT GTGTGGAGTA AGAAAAAAACA GTATGTTATG	
4101	ATTATAACTG TTATGCCCTAC TTATAAAGGT TACAGARTAT TTTTCCATAA	
4151	TTTTCTTGTG TAGCAGTGCA CCTTTTTCCCT TTGTGGTCTA AATAGCRAAG	
4201	CAAGCAAGAG TTCTTAACT AAACACAGCA TGACTCAAAA AACTTAGCAA	
4251	TTCTGAAGGA AAGTCCTTGG GGTCTTCTAC CTTTCTCTTC TTTTTTGGAC	
4301	GAGTAGAATG TTGAGAGTC GAGTAGCCCT CATCATCACT AGATGCCATT	
4351	TCTTCTGAGC AAAACAGGTT TTCTCTATTA AAGGCATTCC ACCACTGCTC	10
4401	CCATTCCATCA GTTCCATAGC TTGGAAATCTA AAATACACAA ACAATTAGAA	
4451	TCAGTAGTTT AACACATTAT ACACCTTAAA AITTTATATT TACCTTAGAG	
4501	CTTTAAATCT CTGTAGGTAG TTTGTCCAAT TATGTCAACAC CACAGAAGTA	
4551	AGGTTCCCTTC ACAAAAGATCC GGACCAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT	
4601	CCTGCAGTTC CGGGCCATGG ATGGCCGGAT AGCCGCTGCT GTTITCCTGG	
4651	ATGCCCGACGG ATTTGCAGTG CCGGTAGAAC TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT	
4701	CGGGCGAGCG CTGAACCCAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCC CGCTGGCGA	
4751	AGAACTCCAG CATGAGATCC CGCGCGCTGGA GGATCATCCA CCCGGCGTCC	
4801	CGGAAAACGA TTCCGAAGCC CAACCTTTCAGAAGCCCC CGCTGGAAATC	
4851	GAAATCTCGT GATGCCAGGT TGGCGCTGCC TTGCTCGGTC ATTTGGAACC	20
4901	CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA ACTCGTCAG AAGGCCATAG AAGGCCATTC	
4951	GCTGCGAATC GGGAGCCCGG ATACCGTAAAC GCACGGAGAA CGGGTCAGCC	
5001	CATTGCGCCCA AAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGCCA ACGCTATGTC	
5051	CTGATAGCGG TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA	
5101	AGCGGGCATT TTCCACCACG ATATTOGGCA ACCAGGCATC CCCATGGGTC	
5151	ACGACCGAGAT CCTCGCCGTC GGGCATCGC CCCTTGAGCC TGGCGAACAG	
5201	TTCGGCTGGC GCGAGCCCT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCGTATCGA	
5251	CAAGACCGGGC TTCCATCCGA GTACGTGCTC CCTCGATGGG ATGTTTCGCT	
5301	TGGTGGTCCA ATGGGGCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA CCCGGCCCCAT	
5351	TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA	30
5401	GGAGATCTG CCCCGCCACT TCGCCCAATA GCACCCAGTC CCTTCGGCT	
5451	TCACTGACAA CGTCGAGCAC AGCTGGGCAA GGAAACCCCCG TCGTGGCCAG	
5501	CCACGATAGC CGCGCTGCCCT CGTCCTGCCAG TTCAATTCAAG GCACCGGGACA	
5551	GTCGGTCTT GACAAAGAGA ACCGGGCGCCC CCTGGCTGA CAGCGGGAAC	
5601	ACGGGGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCCAAGT CATAGCCGAA	
5651	TAGCCTCTCC ACCCAAGCCG CCGGAGAAC TGCCTGCAAT CCATCTTGT	
5701	CAATCATGGG AAACGATCCT CACCTCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC	
5751	CTGCGCCATC AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GCCATCCAGT TTACTTTGCA	
5801	GGGCTTCCCA ACCTTACCAAG AGGGCGCCCCC AGCTGCAAT TCCGGTTGGC	
5851	TTGCTGTCCA TAAAACGCC CAGTCTAGCT ATGCCATGT AAGGCCACTG	40
5901	CAAGCTACCT GCTTCTCTT TGCGCTTGG TTTTCCCTTG TCCAGATAGC	
5951	CCAGTAGCTG ACATTCATCC CGGGTCAGCA CCGTTCTGC CGACTGGCTT	
6001	TCTACGTGTT CCGCTTCCCT TAGCAGCCCC TGCCTCCCTGA GTGCTTGGCC	

【表 6 9】

6051	CAGCGTGAAAG CTTTTGCAA AAGCCTAGGC CTCCAAAAAA GCCTCCCTCAC	
6101	TACTTCTGGA ATAGCTCAGA GGGCGAGGCG GCCTCGGCCT CTGCATAAAT	
6151	AAAAAATT AGTCAGCCAT GGGGCGGAGA ATGGGCGGAA CTGGGCGGAG	
6201	TTAGGGCGG GATGGCGGA CTAGGGCGG GGACTATGGT TGCTGACTAA	
6251	PTGAGATGCA TGCTTTCAT ACTTCTGCCT GCTGGCGAGC CTGGGACTT	
6301	TCCACACCTG GTTCCCTGACT AATTGAGATG CATGCTTGC ATACTTCTGC	
6351	CTGCTGGGA GCCTGGGAC TTTCCACACG CTAACGTACA CACATTCCAC	
6401	AGCTGCCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA	10
6451	GCTCCCGGAG AGCGTCACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC	
6501	AAGCCCGTCA CGGCGCGTCA CGGGGTGTTG CGGGGTGTCG GGGCCAGCC	
6551	ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACATATGCG	
6601	GCATCAGAGC AGATGTACT GAGAGTGCAC CATATGGGT GTGAAATACC	
6651	GCACAGATGC GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGGCTCT TCCGCTTCCT	
6701	CGCTCACTGA CTGGCTGGCG TCGGTCGTTG GGCTGGGGCG AGCGGTATCA	
6751	GCTCACTCAA AGGGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC	
6801	ACGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA	
6851	AGGCCGGCTT CCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGGCCCCC TGACGAGCAT	
6901	CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCGA CAGGACTATA	20
6951	AAGATAACCGAG CGCTTTCCCC CTGGAAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCTGTTG	
7001	CGACCCCTGCC CCTTACCGGA TACCTGTCG CCTTCTCCC TTGGGAAGC	
7051	GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGTGTAGGT	
7101	CGTTCGCTCC AAGCTGGCT GTGTGACCGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC	
7151	GCTGCCCCPT ATCCGGTAAC TATCGTGTGAG AGTCCAACCC GGTAAGACAC	
7201	GAATTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACACGGATTA CGAGAGCGAG	
7251	GTATGTAGGC CGTGTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT	
7301	ACACTAGAAG GACAGTATTT CGTATCTGCG CTCTGCTGAA CCCAGTTACC	
7351	TTCCGAAAAA GAGTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA CCACCGCTGG	
7401	TAGCGGTGGT TTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGGCC AGAAAAAAAG	30
7451	GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG	
7501	AACGAAACT CACGTTAAGG GATTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT	
7551	CTTCACCTAG ATCCCTTTAA ATTTAAATG AAGTTTAA TCAATCTAAA	
7601	GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG	
7651	GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTAATTGCT TCATCCATAG TTGCCTGACT	
7701	CCCCGTCGTG TAGATAACTA CGATAACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA	
7751	GTGCTGCAAT GATAACCGGA GACCCACGGT CACCCGGCTCC AGATTTATCA	
7801	GCAATAAACCC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC	
7851	TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATG TTGCGGGAA CCTAGAGTAA	40
7901	GTAGTTCCGC AGTTAATAGT TTGCGCAAGG TTGTTGCCAT TGCTGCAGCC	
7951	ATCGTGGGTGT CACCGCTCGTC GTTGGTAAAG GCTTCATTCA GCTCCGGTTC	
8001	CCACGGATCA AGGGAGGTTA CATGATCCCC CATGGTGTGC AAAAAAGCGG	
8051	TTAGCTCCCT CGGTCCCTCG ATCGTTGTCG GAAAGTAAGTT GGCCGCAGTG	

【表 7 0】

8101	TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC	
8151	ATCCGTAAGA TGCTTTCTG TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT	
8201	GAGAATAGTG TATGCCGGCGA CGGAGTTGCT CTTGCCCGGC GTCAACACGG	
8251	GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACCTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA	
8301	ACGTTCTCG GGGCGAAAC TCTCAAGGAT CTTACCCCTG TTAGAGATCCA	
8351	TTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTACT	
8401	TTCCACAGCG TTCTCGGCTG AGCAAAACCA CGAAGGAAA ATGCCGCATA	
8451	AAAGGGAAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCCTT	10
8501	TTCAATATTA TTGAAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC	
8551	ATATTTGAAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATACGGGTTC CGCCGACATT	
8601	TCCCCGAAAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCAATTATT ATCATGACAT	
8651	TAACCTATAA AAATAAGCGT ATCACGAGGC CCTTTCTGTCT TCGAGAATT	
8701	GAGCTCGGTA CCCATCAGCC AAAAAGCATG CCTGCCACAC AACATCAATT	
8751	TCTGGAAAAC GCTACACTTA ATTATTTCTA CTAGAACAGC TCTTTGGTTT	
8801	GCCAAAAAGA ATCACCTATA GTGGCATCTA AGCACAAAAA CGAGAAAAAA	
8851	ATCACAAAGA ATGATTGAG AGGCATAATA AAAATTATCA AAAAATTATG	
8901	AGTTTTACGA TTTCATCTTT TTCCAAGTTG AATCATAGG GTGGCTTTAA	
8951	CACAGTGACA AGGAATGTGC ATGCTGCCAT TATGGTGCTC TGCCTAAAT	20
9001	GGTTGGAGCC TTGTCATGCT ACAGAGAAAC TGTCTACAG CAGGGGGTGC	
9051	CAAATTTCGA TATTTTTTA TATCATTTGAG CAGGTGCACA GAAGACCAGA	
9101	AAGCACTTTC TATCAGGCTG GCCTTCCTCT TCCCTTCCAG TATGAAGCAA	
9151	AAACTGCCAA TGAAACTAGC AAATGTTAAA TTCCCTTTTC AAACAGTATT	
9201	TGTGCTATCA GAACATAGTG CATTCAAAG TCTAGGCTGA GAGAACAAACC	
9251	CAGTTTTATT CATTCCCTCT ACTACCTCTC TCATTCCTCAC TGTTTGTGTT	
9301	CTCCCTCCCA TTTTATTGT CTATCTAGTC CAAACTAAGC ACACGATCCA	
9351	GTCCACATTA AACACATGT TTTCACTTTA AGTCAAATAC AAGACACCTT	
9401	TAATATCAGC CCTTGTTCAT AATCGTGCCTT CTAGTGACTT AATGTACATG	30
9451	TCACACTGTA CTGTTGGGTT TTGTGTCTCA TCATGAACAA TGTGTGAAG	
9501	GTATTAAGTG CAGAGTAAGC AGAATTAGAT TCTCTTAATG ATGCACACCCC	
9551	ACACTTAAGAG CAGAAATATAT ATTAAAAATA GAAAAAAAAG TTTTACATGA	
9601	GATTCAATT ACCCAGGTAT GAGCTGCAGT TTCTTCAGT TAARGCATCG	
9651	AGGITGTCAAG TTACACTATT ACAGGAAACA TATGCCAGAGT TTTTATTTTA	
9701	GTATATTAGT TTTCACATAT GTGGAATTAC TATTAACATA TTCTTTCTTT	
9751	TCAATGCTT ACCATTGTAA ATGAGTTTGT GACTTTGTGT AGGTGAGTGC	
9801	ACATGACTCT GGATGCCAA GAGGACTGAA GAAGTTGGAG TTATAGGTAG	
9851	TTTTATTCTA CTGACTGTT CAGTGCTAAA AATACAACTG AGGTCTTTA	
9901	AACTGCTGTT CATGAACTTC TTAATTGATA TATCTCATGA GATCTCTAA	40
9951	CTATTTTAT TATGACACGTT TTCAACCTTT TCACTGTAAC GATTTTATG	
10001	TTTTATATTA ATGTAACATAT ATGACACTTC CCAAAATCCC CATATTACA	
10051	ATTGAACTGTT TTCAAAGTTT TACCTTGACT TATGGGAAT GAAACCCAC	
10101	ATTTTATAAT TTAAATGAA AATGTATTTATT TTATTTCT GCAAATTCA	

【表 7 1】

10151 CAAGGAAMGA TTAGTCACTG GTGTGTGAGA GCAGAGGAGC ATRAGAGTTC
 10201 AGGAATAGAA TCCATTATGA TTCTGGAGGC AAGGAAGAAC TGATGCCAAG
 10251 GTTTCACTAT AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAAAGT CACTACATCT
 10301 GAGCACAGAG CAGGACATCT ACATAATGAG TGGTCACTAA TGGGCCACTG
 10351 TTACACTGTT ATATGTATAA CGCTCAAGAA TGACCACTGA GGCTGTAAGG
 10401 TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAACCC CAGCTCAGCT AGAGCACTCA
 10451 GAGGACAGCA CAGTCAGCAT GAACATAATAA ACATTCAGATA AGATAAGGCA
 10501 CAAGCTCAGC TATATAGGGT AAGGGATCTT TGTAATCTG ATTGTGCATC
 10551 CAGTCTAGTT CAATGTGACT TAGGAAGGCC AGTCATATGC AAATCTAGAG
 10601 AAGACTTTAG AGTAGAAATC TGAGGCTCAC CTCACATACC AGCAAGCGAG
 10651 TGACCAAGTA GTCTTAAGGC ACCACTTCTT AGACATCATG CCTTGGGTGT
 10701 GGACCTTGCC ATTCCCTGATG CGAGCTGCCA AAAGTAAGAC ATCAGAAAAA
 10751 AGAGTTCCAA GGGGAATTGA AGCAGTTCCA TGAATACTCA CCTTCCTGTG
 10801 TTCTTTTCAC AGGTGTCCAG GCAGAGGTGC AGCTGGTGA GTCAGGAGCC
 10851 GAAAGTAAAA AGCCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCCTGCA AGGCCCTCTGG
 10901 ATACACATTC ACTAATTATA TTATCCACTG GGTGAAGCAG GAGCCTGGTC
 10951 AGGGCCTTGA ATGGATTGGA TATTTTATC CTTACAAATCA TGGTACTAAG
 11001 TACAATGAGA AGTTCAAAGG CAGGGCCACA CTAACTGCA ACAAAATCCAT
 11051 CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGGCAGCT CGCCTCTGAG GACACTGGCG
 11101 TCTACTACTG TCCAAGATCA GGACCCCTATG CCTGGTTTGA CACCTGGGGC
 11151 CAAGGGACCA CGGTCAACCGT CTCTCTCAGGT AACAATGGCC ACTCTAGGGC
 11201 CTTTGTTTTC TGCTGCTGCC TGTGGGATTT CATGAGCATT GCAGAGTTGT
 11251 CCTCGGGACA TGTTCGGAGG GCACCTGGGC GGACTGGCCA GGAGGGGACG
 11301 GGCACCTGGGG TGCCTTGAGG ATCTGGGAGC CTCTGTGGAT TTTCCGATGC
 11351 CTTTGGAAAAA TGGCACTGAG GTTGGGTGCG TCTGAGACAG TAACTCAGCC
 11401 TGGGGGCTTG GTGAGACATCG CGGCACACCA CGGAGTCCGT GAAATATCTT
 11451 ATTTAGACTT GTGAGGTCG CTGTGTGTCA ATTTACATCT TAAATCCTTT
 11501 ATTGGCTGGA AAGAGAATTG TTGGAGTGGG TGAATCCAGC CAGGACGGAC
 11551 GCGGGGGAT CCA

【0177】

配列番号：41

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 GAAAGTATGTG TATGGATAT TAGAGATGT TGCTTTACT CTTAAGTTGG
 101 TTCTCTAGGAA AAATAGTTAA ATACTGTGAC TTTAAATGT GAGAGGGTTT
 151 TCAAGTACTC ATTTTTTAA ATGTCCAAA TTTTGTCAA TCAATTTGAG
 201 GTCTTGTGGT TGTAGAACTG ACATTACTTA AAGTTTAACC GAGGAATGGG
 251 AGTGAGGCTC TCTCATACCC TATTCAAGAAC TGACTTTAA CAATAATAAA
 301 TTAAGTTAA ATTTTTTA AATGAATTGA GCAATGTTGA GTTGGAGTCA
 351 AGATGGCGA TCAAGACCCAG AACACCTGCA GCAGCTGGCA GGAAGCAGGT
 401 CATCTGGCAA GGCTATTGAG GGAACGGAAA ATAAAACCAC TAGGTAAACT

【表 7 3】

451	TGTAGCTGTG GTTTGAAGAA GTGGTTTGA AACACTCTGT CCAGCCCCAC	
501	CAAACCGAAA GTCCAGGCTG AGCAAAACAC CACCTGGTA ATTTGCATT	
551	CTAAAATTAAG TTGAGGATTG AGCGGAAGT GGAGAGGTCC TCTTTTAAGT	
601	TATTGAGTTC AACCTTTAA TTTAGCTTG AGTAGTTCTA GTTTCACCAA	
651	ACTTAAGTTT ATCGACTTCT AAAATGTATT TAACCTTCT GGGGCAGGCC	
701	AGGCCTGACC TTGGCTTTCG GGCAGGGAGG GGGCTAACGT GAGGCAGGTG	
751	GCGCCAGCCA GGTGCRCACC CAATGCCAT GAGCCCAGAC ACTGGACGCT	
801	GAACCTCCCG GACAGTTAAG AACCCAGGGG CCTCTCCCGG CTGGGCCCCAG	10
851	CTCTCTCCCA CACCGGGGTC ACATGGCACC ACCTCTCTTG CAGCCCTCCAC	
901	CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCTGGCACC CTCTCCAAG AGCACCTCTG	
951	GGGGCACAGC GGCCTGGGC TCCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCCGAAACCG	
1001	GTGACGGGT GTGGAACTTC AGGCAGCCCTG ACCAGGGCG TGACACACCTT	
1051	CCCGGCTGTC CTACACTCTT CAGGACTCTA CTGCTCCAAG AGCGTGGTGA	
1101	CCGTGCCCCC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT	
1151	CACAAAGCCA GCAACACCAA GGTGGACRAG AGAGTTGGTG AGAGGCCAGC	
1201	ACAGGGACGG AGGGTGTCTG CTGGAGGCCA GGCTCAGCGC TCTGCTGG	
1251	ACGCATCCCCC GCTATGCAGT CCCAGTCCAG GGCAGCAAGG CAGGCCCCGT	
1301	CTGGCTCTTC ACCCGGAGGC CTCTGCCCCC CCCACTCATG CTCAGGGAGA	20
1351	GGGTCTTCTG CTTTTTCCC CAGGCTCTGG GCAGGGACAG GCTAGGTGCC	
1401	CCTTAACCCAG GCCCTGCACA CAAAGGGCA GGTGCTGGGC TCAGACCTGC	
1451	CAAGAGCCAT ATCCGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAAGC CCACCCAAA	
1501	GGCCAAACTC TCCACTCCCT CAGGCTGGAC ACCTCTCTTC CTCCAGATT	
1551	CCACTAACTC CCAACTCTCT CTCCTGGAGG CCCAAATCTT GTGACAAAAC	
1601	TCACACATGC CCACCGTGCC CAGGTAAGCC AGCCCAGGCC TCGCCCTCCA	
1651	GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG CCTGCATCCA GGGACAGGCC	
1701	CCAGGGGGT CCTGACACGT CCACCTCCAT CTCTTCTCA GCACCTGAAC	
1751	TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC TTCTCTTCC CCCCCAAACCA CAAGGACACC	
1801	CTCATGATCT CCCCCACCC TGAGGTCAAC TGGCTGGTGG TGGACGTGAG	30
1851	CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GCGCTGGAGG	
1901	TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGGCACGTAC	
1951	CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA	
2001	GGAGTACAAG TCCAAGGTCT CCAACAAACG CCTCCAGGCC CCCATCGAGA	
2051	AAACCACTTC CAAAGCCAAA CCTGGGACCC GTGGGGTGCG AGGGCCACAT	
2101	GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC	
2151	CAACCTCTGT CCCTACAGGG CAGCCCCGAG AACCCACAGGT GTACACCCCTG	
2201	CCCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGGCC TGACCTGCCT	
2251	GCTCAAAGGC TTCTATCCCA CGCACATCGC CGTGGAGTGG GAGGCAATG	40
2301	GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT CGACTCCGAC	
2351	GGCTCTTCTC TCCCTATAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA CGAGGTGGCA	
2401	GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT CCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGGCACAAACC	
2451	ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCCC CGGGTAAATG AGTGGCACGG	

【表74】

2501	CCGGCAGGCC CCCGCTCCCC GGGCTCTCGC GGTCCGCACGA GGATGCTTGC	
2551	CACGTACCCC GTCTACATAC TTCCCCAGGCA CCCAGCATGG AAATAAAAGCA	
2601	CCCACCACTG CCCCTGGGCC CTGGCAGACT GTGATGGTTC TTTCCAOGGG	
2651	TCAGGCCAG TCTGAGGCCT GAGTGGCATG AGGGAGGCAG AGCAGGGTCCC	
2701	ACTGTCCCCA CACTGGCCA GGCTGTGCAG GTGTCCTCTGG CCCCTCTAGG	
2751	GTGGGGCTCA GCCAGGGGCT CCCCTGGCA CGGTGGGGGA TTTGCCAGCG	
2801	TGGCCCTCCC TCCAGCAGCA GCTGCCCTGG CCTGGGCCAC GAGAAGCCCT	
2851	AGGAGCCCCCT GGGGACAGAC ACACAGCCCC TGCCTCTGTA GGAGACTGTC	10
2901	CTGTCCTGTG AGCGCCCTGT CCTCCGACCC CGATGCCAC TCGGGGGCAT	
2951	CCCTAGTCCA TGGCCGTAGG GACAGGCCCT CCCCTACCCCA TGTACCCCCA	
3001	CGGCACTAAC CCCCTGGCAGC CCTGCCAGC CTGGCACCCCG CATGGGGACA	
3051	CAACCGACTC CGGGGACATG CACTCTGGG CCCCTGTGGAG GGACTGGTGC	
3101	AGATGCCAC ACACACACTC AGCCCCAGACC CGTTCAACAA ACCCTGGCACT	
3151	GAGGTTGGTC GAGGGGGAGT CGGGCCAGAG CCTGCCTCGG CGTCAGGGGA	
3201	CGACTCCCGG CCTCAGCTCGA ACCAGGGTGC ACCATTTCAAG CTTTGGTAGC	
3251	TTTTCTCTTT CTTTTAAATT TTCTAAGCT CATTAATTGT CTTTGAAGTT	
3301	TCTTTTGTGA TGACAAATAA ATATCCCTTT TAAAGTCTTGT ACTTCGTGAT	
3351	GGGAGCCGCC TTCCGTGTC CACGCCCTC CTGCCCGG TGGGAAGCAC	20
3401	GGTCAGGGAGG AGGCTGGTCC AGCTGCACCT CGGGGGCTCC CTGCACTCGC	
3451	CCCCCGCCCTC CTGCAGCCAC ACGCATTCGC CGAGGGACCC TCCCTGGCCC	
3501	CTGTCACTAC ATGGACCCCT GGGGCTTCCTC CTCTTTCTA CATGGATGCA	
3551	TTTTCTCCCTC CTGCTGGCA CGCTCTGCC TGGCTGGTC ACTCTGGGG	
3601	GGACAGGGCC TCCAGGGAAA CCTGGGTGCA GGCTGGGAGC TGGCTCAGGG	
3651	TGGCCAGGCC GAGCCACAGG GAGGCCCTTC CAGAACCAAC CATGGTCCGA	
3701	AGGCCAGGGT GGGTGTGAGA TCCAGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT	
3751	TGGACAAACC ACAACTAGAA TCCAGTCAAA AARATGCTTAT ATTTCGTAAA	
3801	TTTGTGATGC TATTGCTTTA TTTGTAAACCA TTATAGCTG CAATAAACAA	
3851	TTTAACAAACA ACAATTGCAT TCACTTATG TTTCAGGGTTC AGGGGGAGGT	30
3901	GTGGCAGGGTT TTTTAAGCA AGTAAMACCT CTACAAATGT CGTATGGCTG	
3951	ATTATGATCT CTAGTCAAGG CACTATACAT CAAATATTCC TTATTAACCC	
4001	CTTTACAAAT TAAAMAGCTA AAGGTACACA ATTTTGAGC ATAGTTATTA	
4051	ATAGCAGACA CTCTATGCCCT GTGTGGACTA AGAAAACAA GTATGTTATG	
4101	ATTATAACTG TTATGCCCTAC TTATAAAGCT TACAGAAATAT TTTTCATAAA	
4151	TTTTCCTGTGTA TAGCAGTGCA CCTTTTCTT TTGTGGTGTAAATAGCAAAG	
4201	CAAGCAAGAG TTCTATTACT AAACACAGCA TGACTCAAAA AACTTAGCAA	
4251	TTCTGAAGGA AAGTCCTTGG GGTCTCTAC CTTTCTCTTC TTTTTGGAG	
4301	GAGTAGAAATG TTGAGAGTCA GCAGTACCCCT CATCATCACT AGATGCCATT	
4351	TCTTCTGAGC AAAACAGGGTT TTCCTCATTA AAGGCATTCC ACCACTGCTC	40
4401	CCATTCACTA GTTCCATAGG TTGGAATCTA AAATRCACAA ACAATTAGAA	
4451	TCAGTAGTTT AACACATTAT ACACCTAAAAA ATTTCATATT TACCTTGTAGAC	
4501	CTTTAAATCT CTGTCAGGTAG TTGTCCAAT TATGTCACAC CACAGAAGTA	

【表75】

4551	AGGITCCTTC ACAAAAGATCC GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT	
4601	CCTGCAGTTC CGGGGCGATGG ATGGCGGGAT AGCCCTCGCT GTTTCCCTGG	
4651	ATGCCGACGG ATTTGCACTG CCGGTAGAAC TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT	
4701	CAGGCAGCAG CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCCG GGGTGGGCGA	
4751	AGAACTCCAG CATGAGATCC CGCGCGCTGGA GGATCATCCA GCGGGCGTCC	
4801	CGGAAACCGA TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCCG CGGTGGAATC	
4851	GAAATCTCGT GATGGCAGGT TGGGCGTCGC TTGGTCCGTC ATTTCCGAAAC	10
4901	CCAGAGTCCC GCTCAGAAC AACTCGTCAAG AAGGGGATAG AAGGGGATGC	
4951	GCTGCGAATC GGGAGCGGGG ATACCGTAAA GCACGAGGAA GCGGTGAGCC	
5001	CATTGCGCCG CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGCCA ACGCTATGTC	
5051	CTGATAGCGG TCCGCGCACAC CGAGCGGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA	
5101	AGCGGCCATT TTCCACCGATG ATATTCGGCA AGCAGGCATC GCGATGGGTC	
5151	ACGACGAGAT CCTCGCCGTC GGGCATECGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG	
5201	TTCGGCTGGC GCGAGCGGGT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCGTGATCGA	
5251	CAAGACCGGC TTCCATCCGA GTACGTGTC GCTCGATGCC ATGTTTUGCT	
5301	TGGTGGTCCGA ATGGGCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCC GCGGCCGAT	
5351	TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCARGG TGAGATGACA	
5401	GGAGATCCTG CCCCAGCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCCCT	20
5451	TCAGTGACAA CGTCGAGCAC AGCTCGCGAA GGAACGCCCC TGCTGGCCAG	
5501	CCACGATAGC CGCGCTGCCT CGTCCTGCAG TTCATTCAGG GCACCGGACA	
5551	GGTGGTCTT GACAAAAACA ACCGGGCGCCC CCTGGCGCTGA CAGCCGGAAC	
5601	ACGGCGGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCCCAGT CATAGCCGAA	
5651	TAGCCTCTCC ACCCAAGCGG CGGGAGAACC TGCCTGCAAT CCATCTTGT	
5701	CAATCATGCC AAACGATCCT CTCCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC	
5751	CTGCGCCATC AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GGCATCCAGT TTRCTTTGCA	
5801	GGGCTTCCCCA ACCTTACCGAG AGGGGGCCCCC AGCTGGCAAT TCCGGTTCCG	
5851	TTGCTGTCCA TAAAACCGCC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCCACTG	
5901	CAAGCTACCT GCTTCTCTT TCGCGCTTCGG TTTTCCCTTG TCCAGATAGC	30
5951	CGAGTAGCTG ACATTCATCC GGGGTCAGCA CGGTTCTGTC GGAATGGCTT	
6001	TCTACGTGTT CGCTTCCCTT TAGCAGCCCT TCGCGCCCTGA GTGCTTGGGG	
6051	CAGCGTGAAG CTTTTGCCAA AAGCCTAGGC CTCCAAAAAA GCCTCCTCAC	
6101	TACITCTGGA ATAGCTCAGA GGCGAGGGCG GCCTCGGGCTT CTGCATAAAT	
6151	AAAAAAAATT AGTCAGCCAT GGGGGCGAGA ATGGGGCGAA CTGGGGCGAG	
6201	TTAGGGGCCG GATGGGCCGA GTTAGGGGCCG GGAATATGGT TGCTGACTAA	
6251	TTGAGATGCA TGCTTGCAT ACTTCTGCCT CCTGGGGAGC CTGGGGACTT	
6301	TOCACACCTG GTTGTGACT AATTGAGATG CATGCTTIGC AIACTTCTGC	
6351	CTGCTGGGGA GCCTGGGGAC TTTCCACACC CTAACGTACA CACATTCCAC	
6401	AGCTGCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA	40
6451	GCTCCCGGAG ACGGTACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC	
6501	AAGCCCGTCA CGGGCGGTCA CGGGGTGTTG CGGGGTGTCG GGGCGCAGCC	
6551	ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCG	

【表 7 6】

6601	GCATCAGAGC AGATTTGACT GAGAGTGCAC CATATGCGGT GTGAAATACC	
6651	GCACAGATGC GTRAGGGAGAA AATACCGCAT CAGGGCTCTCT TCCGCTTCCT	
6701	CGCTCACTGA CTCGCTGCAC TCGGTGTTTC GGCTGCGGCG AGCGGTATCA	
6751	GCTCACTCAA AGGGCGTAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACCC	
6801	AGGAAGAAC ATGTGACCAA AAGGCCACCA AAAGGCCAGG AACCGTAA	
6851	AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCCC TGACGAGCAT	10
6901	CACAAAATTC GACGGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA	
6951	AAGATACCAAG CGCTTTCCTCC CGTGGAAAGCTC CCTCGTGCAC TCTCGTGTTC	
7001	CGACCCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCGG CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC	
7051	GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGTGTAGGT	
7101	CGTTCGCTCC AAGCTGGCT GTGTGCACCGA ACCCCCCGTT CAGCCCCGACC	
7151	GCTGCGCCTT ATCCCGTAAC TATCGTCTTG AGTCCACACCC GTAAAGACAC	
7201	GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG	
7251	GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTTGA GTGGTGGCCT AACTACGGCT	
7301	ACACTAGAAG GACAGTAAATT CGTATCTGGG CTCTGCTGAA CCCAGTTAAC	
7351	TTCCGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGTATCC GGCAAAACAAA CCACCGCTGG	
7401	TAGCGGTGGT TTCTTGTGTT GCAAGCAGCA GATTACGCAC AGAAAAAAAG	
7451	GATCTCAAGA AGATCCTTGT ATCTTTTCTA CGGGGCTGCA CGCTCAGTGG	20
7501	AACGAAACT CACGTTAAGG GATTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT	
7551	CTTCACCTAG ATCCCTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA	
7601	GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG	
7651	GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCGT TCATCCATAG TTGCCTGACT	
7701	CCCCGCTGGTG TAGATACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA	
7751	GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA	
7801	GCAATTAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCTGCAAC	
7851	TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATG TTGCCCCGAA CCTAGAGTAA	
7901	GTAGTTCCCCC AGTTAATAGT TTGGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTGCAGGC	
7951	ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGGTTC	30
8001	CCAACGATCA AGGGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG	
8051	TTAGCTCCTT CGGTCTCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCGCGAGTG	
8101	TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCAGTGCAT AATTCCTTTA CTGTCACTGCC	
8151	ATCCGTAAGA TGCTTTCTG TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT	
8201	GAGAATAGTG TATGCCGCCA CCCAGTTGCT CTTGCCCGGC GTCAACACGG	
8251	GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA	
8301	ACGTTCTTCG GGGCGAARAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA	
8351	TTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT	
8401	TTCACCAAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAACCA GGAAGGCAAATGCCGCAA	40
8451	AAAGGGATAA AGGGCGACAC GAAAATGTIG AATACTCATA CTCTTCCCTT	
8501	TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC	
8551	ATATTTGAAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTG CGCCGACATT	
8601	TCCCCGAAAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCAATTATT ATCATGACAT	

【表 7 7】

8651	TAACCTATAA AAATAGGGGT ATCACGAGGC CCTTTUGTCT TCAAGAATT	
8701	GAGCTCGGT A CCCATCAGCC AAAAAGCAAG CCTGCACACAC AACATCAATT	
8751	TCTGGAAAAC GCTACACTTA ATTATTCCTA GTAGAACAGC TCTTGGTTT	
8801	GCCAAAAAGA ATCACCTATA GTGGCATCTA AGCACAAAAA CGAGAAAAAA	
8851	ATCACAAAGA AATGATTGAG AGGCATAATA AAAATTATCA AAAAATTATG	
8901	AGTTTACGA TTTCATCTT TTCCAGTTG AAATCATAGG GTGGCTTTAA	
8951	CACAGTGACA AGGAATGTGC ATGCTGCCAT TATGGTGCTC TGCCTAAAT	
9001	GGTTGGAGCC TTGTCATGCT ACAGAGAAC TGTCATACAG CAGGGGGTGC	10
9051	CAAATTTCCTA TATTTTTTTA TATCATTGAG CAGGGCACA GAAGACCAGA	
9101	AAGCACTTTC TATCAGGCTG CCCTTCCTCT TCCTTCCAG TATGAAGCAA	
9151	AAACTGCCAA TGAAACTAGC AATTGTTAA TTCTTTTTTC AAACAGTATT	
9201	TGIGCTATCA GAACATAGTG CATTCAAAAG TCTAGCCTGA GAGAACAAAC	
9251	CAGTTTATT CATTCTCTC ACTACCTCTC TCATCCCCAC TGTTTGTGTT	
9301	CTCCCTCCCCA TTTTAATTGT CTATCTAGTC CAAACTAAGC ACACGATCCA	
9351	GTCCACATTA AACAAACATGT TTTCACATTAGT AGTCAAATAC AAGACACCTT	
9401	TAATATCAGC CCTTGGTCAT AATCGTGCTT CTAGTGACTT AATGTACATG	
9451	TCACACTGTA CTGTTGGTT TTGTGTCTCA TCATGAACAA TGTTGTGAAG	
9501	GTATTAAGTG GAGAGTAAGC AGAATTAGAT TCCTCTAATG ATGCACACCC	20
9551	ACACTAAGAG CAGAAATAAT ATTAATAA GAAAAAAAG TTTTACATGA	
9601	GATTTCAATT ACCCAGGTAT GAGCTGCAGT TTCTTCAAGT TAAAGCATCG	
9651	AGGTTGTCAG TTACACTATT ACAGGAAACA TATGCAGAGT TTTTATTTTA	
9701	GTATATTAGT TTTCACATAT GTGGAATTAC TATTAACCTA TTCTTCTTT	
9751	TCAAATGCTT ACCATTGTAA ATGAGTTGT GACPTTGTGT AGGTGAGTGC	
9801	ACATGACTCT GGATGCCCTAA GAGGACTGAA GAAGTTGGAG TTATAGGTAG	
9851	TTTTATTCTA CTTGACTGTT CAGTGCTAAA AATACAACCTG AGGTCCCTTA	
9901	AACTGCTGTT CATGAACCTC TTAATTGATA TATCTCATGA GATCTCTAAA	
9951	CTATTTTAT TATGACACGT TTCACCATT TCACGTAAAC GATTTTTATG	
10001	TTTTATATTA ATGTAACATAT ATGACACTTC CCAAAATCCC CATATTACAA	30
10051	ATTGAACTGT TTCAACTTT TACCTTGACT TATGGAAAT GAAAACCCAC	
10101	ATTTTATAT TTTAAATGA AATGTTTATT TTATATTTCT GCAAATTTC	
10151	CAAGGAAAGA TTAGTCACTG GTGTGTGAGA GCAGAGGAGC ATAAGAGTTC	
10201	AGGAATAGAA TCCATTATGA TTCTGGAGGC AAGGAAGAAC TGAIGCCAAG	
10251	GTPTCAGTAT AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAAAGT CACTACATCT	
10301	GAGGCACAGAG CAGGACATCT ACATAATGAG TGGTCACTAA TGGGCCACTG	
10351	TTACACTGTT ATATGTATAA GGCTCAAGAA TGAGCACTGA GGCTGTAAGG	
10401	TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAAACC CAGCTCAGGT AGAGGACTCA	
10451	GAGGCACAGCA CAGTCAGCAT GAACTAATAA ACATCAGATA AGATAAGGCA	
10501	CAAGCTCAGC TATATAGGGT AAGGGATCTT TGTAATCTG ATTGTGCATC	40
10551	CAGTCTAGTT CAATGTGACT TAGGAAGCCC AGTCATATGC AAATCTAGAG	
10601	AAGACTTTAG AGTAGAAATC TGAGGCTCAC CTCACATACC AGCAAGCGAG	
10651	TGACCAAGTTA GTCTTAAGGC ACCACTCTT AGACATCATG CCTTGGGTGT	

【表78】

10701	GGACCTTGCC ATTCCGTATG GCAGCTGCCA AAGGTAAGAC ATCAGAAAAAA	
10751	AGAGTTCCAA GGGGAATTGA AGCAGTTCCA TGAATACTCA CCTTCCCTGTG	
10801	TTCTTTTCAC AGGTGTCCAG GCACAGGTGC AGCTGGTGGA GTCAGGAGCC	
10851	GAAGTAAAAA AGCCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCCCTGCA AGGCCTCTGG	
10901	ATACACATTC ACTAATTATA TTATCCACTG CCTGAAGCAG GAGCCTGGTC	
10951	AGGGCCTTGA ATGGATTGGA TATTTTAATC CTTACAAATCA TGGTACTAAG	10
11001	TACAATGAGA AGTTCAAAAGG CAGGGCCACAA CTAACTGCAA ACAAAATCCAT	
11051	CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT GCGCTCTGAG GACACTGGGG	
11101	TCTACTACTG TCCAAAGATCA GGACCCATATG CCTGGTTTGA CACCTGGGGC	
11151	CAAGGGACCA CGGTCAACCGT CTCCTCAGGT AAGAATGGCC ACTCTAGGGC	
11201	CTTTGTTTTC TGCTGCTGCC TGTGGGATTT CATGAGCATT GCAAAGTTGT	
11251	CCTCGGGACA TGTTCGGAGG GGACCTGGGC CGACTGGCCA GGAGGGGAGC	
11301	GGCACTGGGG TGCCTTGAGG ATCTGGGAGC CTCTGTGGAT TTTCCGATCC	
11351	CTTTGGAAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGGG TCTGAGACAG TAACTCAGCC	
11401	TGGGGGCTTG GTGAAGATCG CGGCACAGCA CGGAGTCGGT GAAATATCTT	
11451	ATTTAGACTT GTGAGGTGGG CTGTGTGTCA ATTACATCT TAAATCCTTT	
11501	ATTGGCTGGA AAGAGAAATTG TTGGACTGGG TGAATCCAGC CAGGAGGGAC	
11551	GGGGGGGAT CCA	20

【0178】

実施例9：CD45RO/RB結合ヒト化抗体のインピトロ効果VHE/humV1およびVHQ/humV1

キメラ抗体と比較してCD45RO/RB結合ヒト化抗体VHE/humV1およびVHQ/humV1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。

【0179】

細胞および試薬

既知の血液型を有するが、HLA型は解らない健常ヒト提供者白血球搬出試料からFico II-Hyque (Pharmacia LKB) での遠心により末梢血単核球(PBMC)を単離する。CD3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PBMCは最初にTおよびNK細胞を枯渇させる。ビーズおよび夾雜する細胞を磁場により除去する。照射(50Gy)の後、T細胞枯渇PBMCを刺激細胞として用いる。CD4⁺T細胞をMLRにおける応答細胞として用い、そしてCD4T細胞陰性選択キット(Miltenyi)でPBMCから単離する。

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>75%である。10%熱不活性化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 RPMI1640 培地に細胞を懸濁する。

【0180】

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PBMCをCD45RO/RB結合キメラmAb、ヒト化抗体(VHE/humV1およびVHQ/humV1)または抗LPSコントロールmAbの存在下、成長培地(RPMI1640+10%FCS)中一晩(<16時間)培養する。示す場合、架橋試薬、ヤギ抗ヒトIgGのF(ab')₂フラグメント(カタログ番号109-006-098, JacksonLab)を、試料の抗CD45抗体濃度の2倍になるμg/ml濃度で含む。抗体試薬を導入した全ウェルのPBS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20(容量/容量)%、または架橋剤を含む試料に関しては40(容量/容量)%である。先の実験によりPBSの量は読

30

40

50

み出しに影響しないことが実証されている。

【0181】

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-FITC（カタログ番号556419、BD/Pharmingen）およびT細胞マーカーCD2-PE（カタログ番号556609、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。

【0182】

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」）

A1：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）

A2：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：ED₅₀；IC₅₀（以下を参照）

【0183】

架橋剤の不在下ではVHE/humV1が最も有効であり、ED₅₀値は148±71nMで、次に377±219nMのVHQ/humV1が続く。CD45RO/RB結合キメラ抗体はED₅₀値2440±1205nMで、あまり有効でない。

【0184】

架橋抗血清の存在下ではED₅₀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80%にまで至るが、架橋剤の不在下ではアポトーシスが50%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（~5nM）、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（~500nM）、そしてT細胞集団の70-80%内でアポトーシスが観察される。

CD45RO/RB結合ヒト化mAb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CD45RO/RB結合キメラmAbと比較してより良好または同等である。

【0185】

混合リンパ球培養反応

96ウェル培養プレートの各ウェル中、様々な濃度のmAbの存在下または不在下で1×10⁵個のPBMCまたは5×10⁴個のCD4⁺細胞を1×10⁵個または5×10⁴個のT細胞枯渇照射（50Gy）PBMC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16から20時間の間、細胞を³H-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MLR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VHE/humV1およびVHQ/humV1のMLR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MLRを阻害する。IC₅₀値（前記を参照）はヒト化Ab VHE/humV1（7±7nM）およびVHQ/humV1（39±54nM）に関して類似している。双方のヒト化抗体はMLR阻害において親のキメラ抗体よりもさらに強力である（IC₅₀は347±434nM）。通常MLR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。

【0186】

10

20

30

40

50

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、これはインピボで生じ得る。翌日に標準重力（g）の400倍で10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1×10⁵セルの細胞密度で播種する。細胞の各試料を100μg/m l正常マウス血清を含有するF A C Sバッファー50μl中4で30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、1:100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556419）100μlに細胞を再懸濁する。暗中室温で15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1μg/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 D₅₀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。

【0187】

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、30%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 D₅₀値は0.31±0.13nMとして算出される。高濃度の抗体では、70%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 D₅₀値は352±83nM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。

【0188】

実施例10：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。

【0189】

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髄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。

【0190】

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。

【0191】

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。

【0192】

実施例11：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 - γ 生成を低減させることができる。この I F N - γ 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。

【0193】

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 (アネルギー) 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 - γ 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。

【0194】

実施例12：S C I D - h u 皮膚マウスにおけるインビオ研究

10

20

30

40

50

皮膚炎症における C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体の治療上の利点を S C I D マウスを用いて試験する。正常な個体からのヒト皮膚を S C I D マウス (S C I D - h u 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。

【 0 1 9 5 】

S C I D マウス (S C I D - h u 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, Györ から入手) の 2 個の小片 (1 c m ²) を S C I D 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 (S C I D - h u 皮膚マウス、一般的に > 85 %) を C D 4 5 R O / R B 結合キメラ抗体のインビオ試験のために選択する。

【 0 1 9 6 】

S C I D 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 (S p 1) をヒト成体脾臓生検 (WHRTB, Györ) から単離する。 ~ 5 × 10 ⁸ S p 1 のアリコートを R P M I - 10 % F C S 1.5 M L に再懸濁し、そして S C I D - h u 皮膚マウスに実験 0 日に腹腔内注射 (i . p .) する。以前の実験でこれらの S p 1 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 G v H D を誘起するのに十分であることが見出されている。

【 0 1 9 7 】

S C I D - h u 皮膚マウスの抗体処置

ヒト S p 1 で再構成した S C I D - h u 皮膚マウスを 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 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 P B S 1 0 0 μ l 中最終濃度 1 m g / k g 体重 (b . w .) で皮下 (s . c .) に分配する。

【 0 1 9 8 】

抗 C D 4 5 処置の評価

C D 4 5 R B / R O 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、組織学的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 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) を比較する。

【 0 1 9 9 】

結果

ヒト皮膚移植片は S C I D 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。 S C I D - h u 皮膚マウスに移入した循環ヒト S p 1 (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。

【 0 2 0 0 】

これらのマウスの C D 4 5 R B / R O 結合キメラ抗体での処置により炎症過程が抑制さ

10

20

30

40

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、多様な壊死の徵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 1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常な状態を示す。

【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オ活性

マウス

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臍臓を入手する。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 ベニシリンおよび100μg / ml ストレプトマイシンを補充したM 199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 O ₂および95% 加湿空気中、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のアリコートを受体糖尿病性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。

【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。

【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に対するビオチン化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ソ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ソおよびエオシン染色した凍結切片で評価する。

10

20

30

40

50

【0206】

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。

【0207】

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に比較して、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 が血清中で検出される。

【0208】

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】

【0209】

【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スクレオチド配列において配列番号：12(3921-4274)のス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-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スクレオチド配列において配列番号：11(3921-4274)のス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スクレオチド配列において配列番号：14(3964-4284)のス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-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スクレオチド配列において配列番号：13(3921-4274)のス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-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スクレオチド配列において配列番号：33のス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スクレオチド配列において配列番号：13のス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スクレオチド配列において配列番号：34のスクレオチド配列を有する重鎖を含む発現ベクターHCVHEN73D-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スクレオチド配列において配列番号：35のスクレオチド配列を有する重鎖を含む発現ベクターHCVHQN73D-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ス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 H C V H E S p 2 0 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-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-H C V H Q S p 2 0のプラスミドマップを示す。

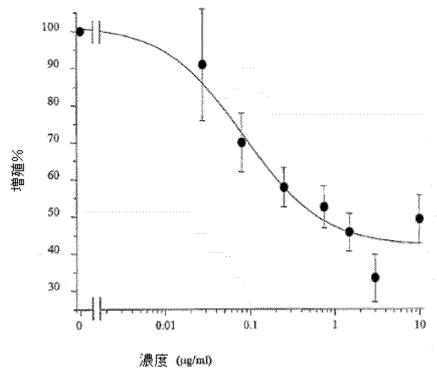
【図12】VHE/humV1、VHE/humV2、VHQ/humV1およびVHQ/humV2、ならびにVHE-N73D/humV1と一緒にVHE/humV1のサイズ排除クロマトグラフィー分析を示す。

【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。

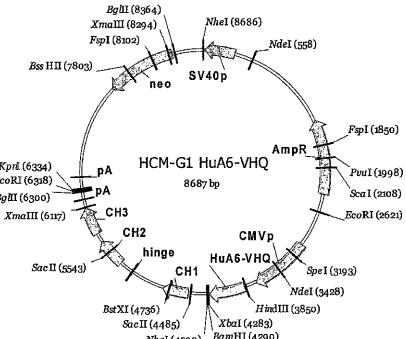
〔 1 〕

Figure 1



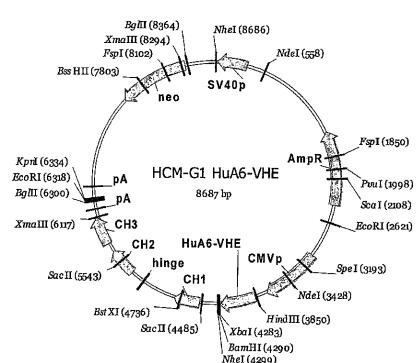
〔 2 〕

Figure 2



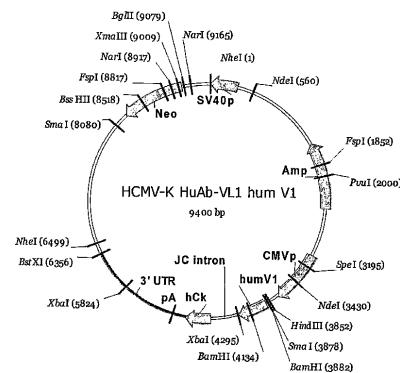
【図3】

Figure 3



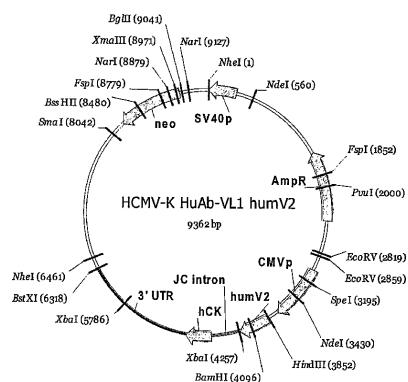
【 図 4 】

Figure 4



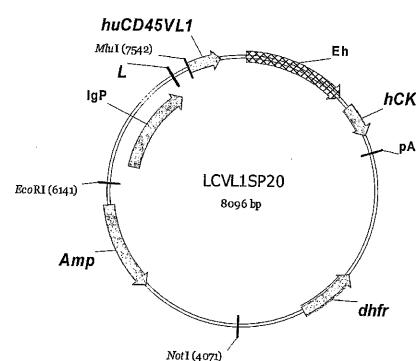
【 図 5 】

Figure 5



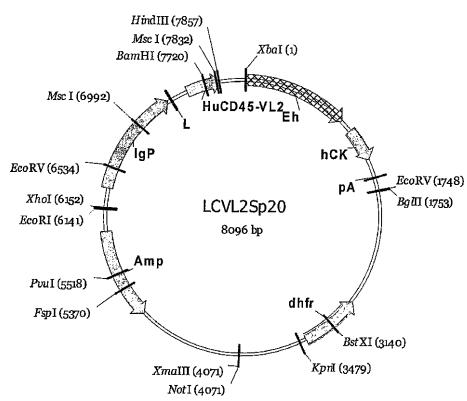
【図6】

Figure 6



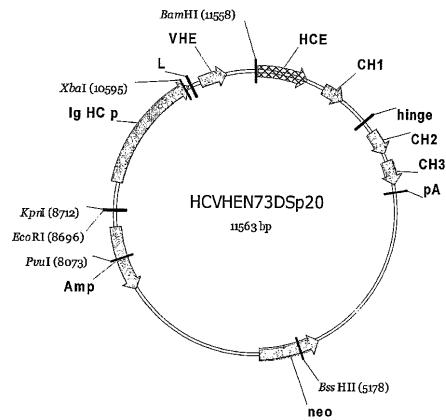
【図7】

Figure 7



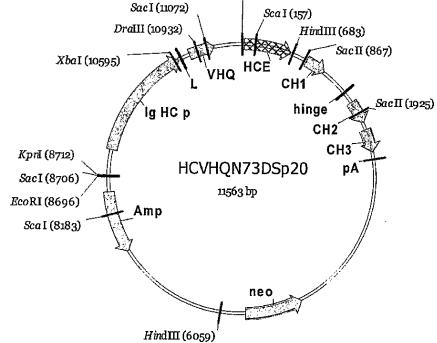
【図8】

Figure 8



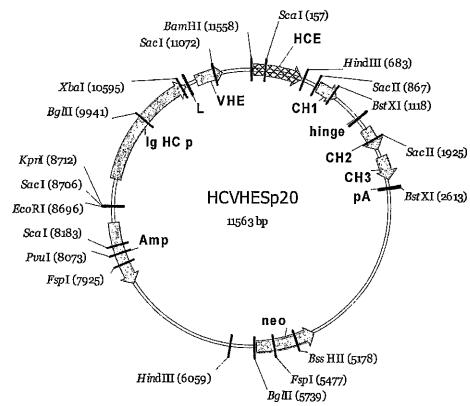
【図9】

Figure 9



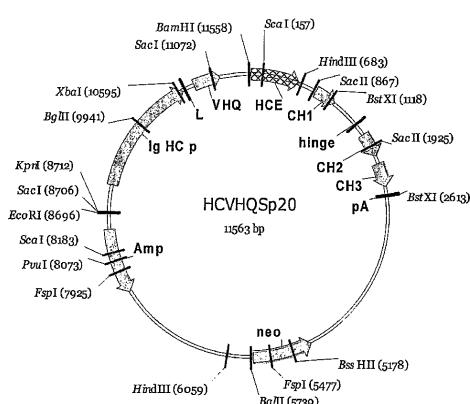
【図10】

Figure 10



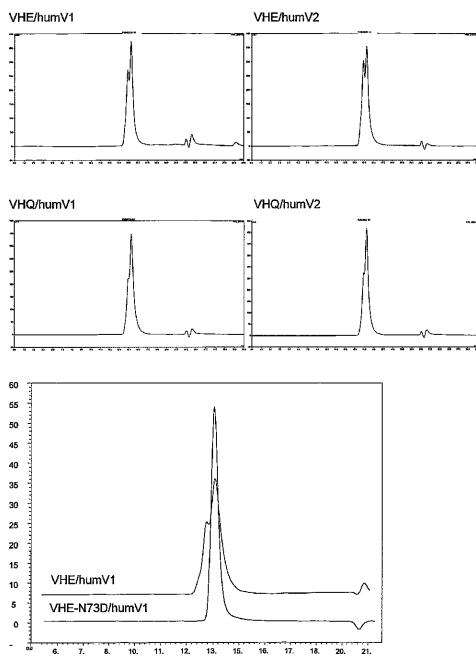
【図11】

Figure 11



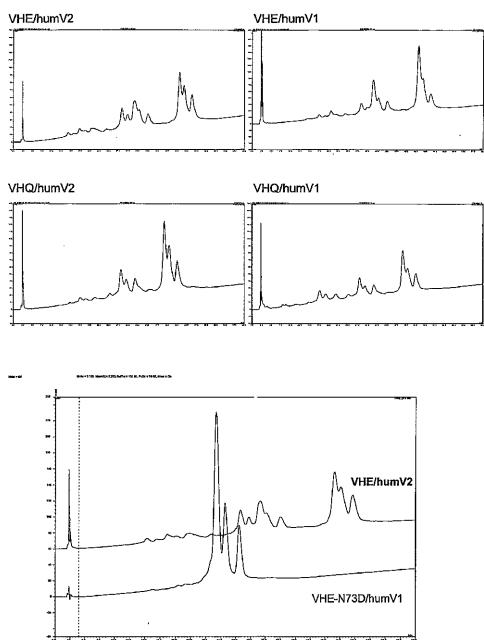
【図12】

Figure 12



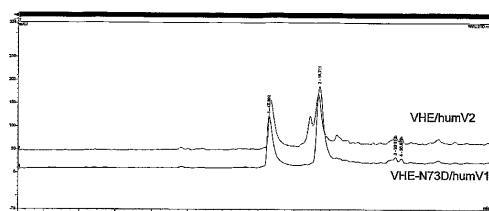
【図13】

Figure 13



【図14】

Figure 14



【配列表】

0004762142000001.app

フロントページの続き

			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・アゾーディ
オーストリア、アー-1140ヴィエナ、ブヤッティガッセ15ベー/19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21番
- (72)発明者 ブルース・エム・ホール
オーストラリア2135ニュー・サウス・ウェールズ州ストラスフィールド、パー・ノン・ストリート14番
- (72)発明者 シルヴィア・グレゴーリ
イタリア、イ-20090ブッチナスコ、ヴィア・ロマニヤ19番
- (72)発明者 マリア・グラツィア・ロンカローロ
イタリア、イ-20090セグラーテ、レジデンツァ・アンドロメダ・イ131、ヴィア・フラティリ・チェルヴィ
- (72)発明者 ヴェロニク・ルー
フランス、エフ-68870バルテネム、リュ・デュ・19・ノバンブル24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、ブリティッシュ・コロンビア、バンクーバー、ウエスト・シックスス・アベニュー4525番
- (72)発明者 マルギット・イエシュケ
スイス、ツェーハー-4058バーゼル、グレンツァッハ・シュトラーセ10番

審査官 福間 信子

(56)参考文献 国際公開第02/072832 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90

BIOSIS/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

