

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 2 月 20 日 (20.02.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/014728 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: G01N 33/15, 33/50, A61K 39/395, 45/00, A61P 31/12, 1/16, C07K 16/10, C12N 15/51
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/08175
- (22) 国際出願日: 2002 年 8 月 9 日 (09.08.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2001-243947 2001 年 8 月 10 日 (10.08.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱ウェルファーマ株式会社 (MITSUBISHI PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒541-0046 大阪府 大阪市中央区 平野町 2 丁目 6 番 9 号 Osaka (JP). 国立感染症研究所長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR GENERAL OF AGENCY OF NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES) [JP/JP]; 〒162-8640 東京都 新宿区 戸山一丁目 2 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 伊丹 清馬 (ITAMI, Seima) [JP/JP]; 〒103-8405 東京都 中央区 日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内 Tokyo (JP). 関誠 (SEKI, Makoto) [JP/JP]; 〒103-8405 東京都 中央区 日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内 Tokyo (JP). 鬼頭 正博 (KITO, Masahiro) [JP/JP]; 〒103-8405 東京都 中央区 日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内 Tokyo (JP). 松浦 善治 (MATSUURA, Yoshiharu) [JP/JP]; 〒565-0821 大阪府 吹田市 山田東 4 丁目 3 5 番 1-1 3 1 4 Osaka (JP). 宮村 達男 (MIYAMURA, Tatsuo) [JP/JP]; 〒168-0065 東京都 杉並区 浜田山 4-2 1-2 2-1 1 3 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都 中央区 京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,

[続葉有]

(54) Title: REMEDIES FOR HEPATITIS C

(54) 発明の名称: C型肝炎治療薬

(57) Abstract: A method of screening a substance inhibiting the binding of hepatitis C virus E2/NS1 protein to an antibody having an affinity for the protein, which involves: (1) the step of bringing the hepatitis C virus E2/NS1 protein into contact with the above-described antibody in the presence and absence of a test substance; and (2) the step of comparing the binding of the hepatitis C virus E2/NS1 protein to the antibody in the presence and absence of a test substance. Thus, it becomes possible to provide novel drugs having antiviral effects of, for example, preventing infection with HCV.

(57) 要約:

本発明によれば、(1) 被験物質の存在下および非存在下において、C型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白と、C型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体を接触させる工程;並びに、(2) 被験物質の存在下および非存在下における C型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白と、上記抗体との結合を比較する工程を含む、C型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白と上記抗体との結合を阻害する物質のスクリーニング方法が提供される。本発明によると、HCV の感染阻止作用などの抗ウイルス効果を有する新規な医薬品が提供可能である。



WO 03/014728 A1



LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

### C型肝炎治療薬

#### 技術分野

本発明は、C型肝炎ウイルス（以下「HCV」ということもある）のエンベロープ糖蛋白に結合する抗体、並びに該抗体と該糖蛋白質との結合を阻害する物質のスクリーニング方法に関する。より詳細には、本発明は、HCV のエンベロープ糖蛋白と結合することにより HCV の感染阻止作用などの抗ウイルス効果を有する抗体、並びに該抗体のスクリーニング方法に関する。

#### 背景技術

1989 年米国カイロン社によって、従来非 A 非 B 型肝炎ウイルスと呼ばれていたヒト肝炎ウイルスの遺伝子断片がクローニングされ、HCV と命名された (SCIENCE, Vol. 244, 359-362, 1989)。HCV は一本鎖+鎖 RNA をゲノムとするウイルスである。その後カイロン社の他、国立癌センターの下遠野ら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87, 9524-9528, 1990)、大阪大・微研の高見沢ら (J. Virol, Vol. 65, No. 3, 1105-1113, 1990) によって、C型肝炎ウイルスの全遺伝子の配列が発表されている。その後 HCV にはコア、エンベロープ 1（以下「E1」または「E1 蛋白」ということもある）、エンベロープ 2（以下「E2/NS1」または「E2/NS1 蛋白」ということもある）の 3 種類の構造蛋白質と 6 種類の非構造蛋白質が存在することが分かった。

HCV が発症すると高い確率で急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変を発症させ、最終的には肝癌へと移行し患者を死亡させる。従来は治療には抗ウイルス薬であるインターフェロンが代表的に使われているが、治療効果は患者ごとにばらつきがある点、発熱等の副作用がある点が問題となっている (J. Med. Virol., Vol. 42, 299-305, 1994) (日消会誌, Vol. 91, 995-1002, 1994)。

またリバビリン等、他の抗ウイルス薬による治療も検討されているがこれも十

分な効果は得られておらず (Lancet, Vol. 337, 1058-1061, 1991)、新たな抗 HCV 薬の開発が待たれているのが現状であった。

一方、HCV の遺伝子は非常に変異がしやすいと考えられていて、HCV はその高変異性ゆえに患者の体内の免疫から逃れているものと考えられていた。特に HCV の E2/NS1 の N 末端には 25 個から 30 個のアミノ酸からなる hyper variable region (超可変領域) と呼ばれる変異に富む領域があるとされており、ヒトの免疫系のエピトープは hyper variable region なのではないかと加藤らにより予測されている (J. Virol., Vol. 67, No. 7, 3923-3930, 1993) (J. Virol., Vol. 68, No. 8, 4776-4784, 1994)。すなわち、ヒトの免疫系、例えば中和抗体の認識する領域は hyper variable region 内にあるので中和抗体が感染患者生体内でできても hyper variable region がすぐに変異してウィルスが抗体からエスケープしてしまうのではないかと考えられている。しかし、石井らの報告で E2/NS1 とヒト T 細胞 Molt-4 の結合を阻害する抗体が、HCV から自然治癒した患者の血中にのみ高活性で見られ、HCV の高変異性にも関わらず HCV の治癒に液性免疫が関与していることが示唆された (Hepatology, Vol. 28, No. 4, 1117-1120, 1998)。

ところで、1999 年米国カイロン社により E2/NS1 が結合する細胞表面の蛋白として CD81 が単離された (SCIENCE, Vol. 282, 938-941, 1999)。大腸菌で発現した CD81 と E2/NS1 は石井らの報告と同様に結合し、また HCV 自然治癒患者の血清はこの結合を阻害した。この結果より CD81 は HCV のレセプターであることが示唆された。

以上より HCV の細胞への感染に深く関与していると思われるエンベロープ蛋白に結合し、かつ、HCV の感染性のあるヒト細胞への結合を阻止する、例えば、抗体のような物質を薬剤として利用すると、血中の HCV が新たに肝臓等の感染対象臓器に感染することを阻止することが可能となり、HCV 患者を治癒へと導くことが可能であると考えられた。しかしながら、HCV に起因する疾患に対する感染阻止物質については、まだ十分な検討が行われていなかったのが現状であった。

## 発明の開示

本発明は上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、HCV の細胞への感染に深く関与していると思われるエンベロープ蛋白に結合し、かつ、HCV の感染性のあるヒト細胞への結合を阻止することができる抗体、並びに当該抗体を用いた医薬を提供することを解決すべき課題とした。

HCV は RNA ウィルスであるため非常に変異しやすいことが知られている。この変異により HCV の構造蛋白、非構造蛋白ともに様々な箇所が変異をする。この変異のため HCV の感染を阻止する物質、例えばある特定の蛋白配列を認識する抗体等を開発することは困難であると考えられていた。しかし、本発明者らは、石井らの報告にある中和抗体は、治癒患者ごとに感染しているウィルスの配列が異なるにもかかわらず、ただ一種類の E2/NS1 への結合を阻止しているという点に着目した。すなわち、抗原の特定の領域あるいは構造を認識する物質ならば、ウィルスの配列の多様性にも関わらず、E2/NS1 と HCV の感染性のあるヒト細胞、CD81 発現細胞または CD81 との結合を阻止し、感染阻止が可能であると考えた。

本発明では、C 型肝炎患者の症状を改善する薬剤開発のため、E2/NS1 と HCV 感染性のある細胞、CD81 発現細胞または CD81 の結合を阻害する物質の探索を重ねた結果、HCV の HCV 感染性細胞への結合および感染阻止が期待される物質を取得することに成功した。さらに、取得した物質と E2/NS1 との結合を阻害する物質をスクリーニングすることにより、HCV の HCV 感染性細胞への結合および感染阻止が期待されるさらに異なる別の物質を取得できることを確認した。

即ち、本発明によれば、(1) 被験物質の存在下および非存在下において、C 型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白と、下記の (a)、(b) 又は (c) の何れかの抗体を接触させる工程；

(a) 重鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号：9 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：9 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C 型肝炎ウィルスの

E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体；

(b) 軽鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号：1～4又は75に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：1～4又は75に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体；

(c) 配列表の配列番号34～37、67～70又は71～74の何れかに記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号34～37、67～70又は71～74の何れかに記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する一本鎖抗体；並びに、

(2)被験物質の存在下および非存在下におけるC型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白と、上記抗体との結合を比較する工程を含む、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白と上記抗体との結合を阻害する物質のスクリーニング方法が提供される。

本発明のスクリーニング方法では、好ましくは、抗体は、該抗体を検出可能な物質で標識した抗体であり、さらに好ましくは、蛍光法または発色法により該抗体を検出することができる物質で標識した抗体である。好ましくは、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白は、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白にタグをつけた蛋白であり、さらに好ましくは、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白のC末端にタグをつけた蛋白である。本発明のスクリーニング方法で用いる被験物質は、好ましくは、蛋白質、硫酸化多糖類または低分子化合物である。

本発明の別の側面によれば、上記した本発明のスクリーニング方法により得られる、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白とC型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体との結合を阻害する物質が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、軽鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むか、配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ

酸配列を含み、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体が提供される。

好ましくは、本発明の抗体は、重鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含む。

本発明の別の側面によれば、上記の抗体をコードする核酸が提供される。

好ましくは、本発明の核酸は、配列表の配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 又は配列番号 8 のいずれかに記載の塩基配列を含有する。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の核酸を用いた抗体の生産方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記の方法によって得ることができ、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する組換え抗体が提供される。

好ましくは、本発明の組み換え抗体の Fc 領域はヒト型である。好ましくは、本発明の組み換え抗体は、1 本鎖抗体である。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の抗体を有効成分として含有する医薬、並びに、上記した本発明の組換え抗体を有効成分として含有する医薬が提供される。本発明の医薬は、C型肝炎の治療および/または予防のために使用でき、あるいはC型肝炎の診断のために使用できる。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の抗体を有効成分として含有する抗HCV剤、並びに、上記した本発明の組換え抗体を有効成分として含有する抗HCV剤が提供される。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の抗体のNOB活性を示す図である。

図 2 は、発現プラスミド pEX gamma1 1W loxp-Hyg HCVI の構築を示す図である。

図 3 は、発現プラスミド pEX kappa Km HCV3-1~3-4 の構築を示す図である。

図 4 は、発現プラスミド pEX loxp-Hyg HCV3-1W~3-4W Km の構築を示す図であ

る。

図 5 は、Whole Ab 1-1 と whole Ab 3-3 の競合アッセイの結果を示す図である。

図 6 は、Whole Ab 1-1 と whole Ab 3-3 の競合アッセイの結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下本発明に関して詳細に説明する。

本発明のスクリーニング方法は、(1) 被験物質の存在下および非存在下において、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白と、下記の (a)、(b) 又は (c) の何れかの抗体を接触させる工程；

(a) 重鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号：9 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：9 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体；

(b) 軽鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号：1～4 又は 75 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：1～4 又は 75 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体；

(c) 配列表の配列番号 34～37、67～70 又は 71～74 の何れかに記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号 34～37、67～70 又は 71～74 の何れかに記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する一本鎖抗体；並びに、

(2) 被験物質の存在下および非存在下における C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白と、上記抗体との結合を比較する工程を含むことを特徴とするものであり、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白と上記抗体との結合を阻害する物質をスクリーニングするための方法である。

上記 (a)、(b) 又は (c) に記載の抗体は、国際出願番号 PCT/J P 0 1

／ 0 0 9 6 7（国際公開WO 0 1／5 8 4 5 9）に記載の抗体である。これらの抗体は何れもC型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有することを特徴とする。これらの抗体の重鎖のアミノ酸配列の一例である本出願の配列表の配列番号：9に記載のアミノ酸配列は、国際出願番号PCT／JP 0 1／0 0 9 6 7（国際公開WO 0 1／5 8 4 5 9）の配列表の配列番号40に記載のアミノ酸配列に対応し、これらの抗体の軽鎖のアミノ酸配列の一例である本出願の配列表の配列番号：75に記載のアミノ酸配列は、国際出願番号PCT／JP 0 1／0 0 9 6 7（国際公開WO 0 1／5 8 4 5 9）の配列表の配列番号41に記載のアミノ酸配列に対応する。

本出願の配列表の配列番号34～37に記載の配列は、ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及びScFv3-4のアミノ酸配列と塩基配列を示し、国際出願番号PCT／JP 0 1／0 0 9 6 7（国際公開WO 0 1／5 8 4 5 9）の配列表の配列番号62～65に対応する。

本出願の配列表の配列番号67～70に記載の配列は、ScFv1-1、ScFv1-2、ScFv1-3、及びScFv1-4のアミノ酸配列と塩基配列を示し、国際出願番号PCT／JP 0 1／0 0 9 6 7（国際公開WO 0 1／5 8 4 5 9）の配列表の配列番号26～29に対応する。

本出願の配列表の配列番号71～74に記載の配列は、ScFv2-1、ScFv2-2、ScFv2-3、及びScFv2-4のアミノ酸配列と塩基配列を示し、国際出願番号PCT／JP 0 1／0 0 9 6 7（国際公開WO 0 1／5 8 4 5 9）の配列表の配列番号36～39に対応する。

本発明のスクリーニング方法では、好ましくは、抗体は、該抗体を検出可能な物質で標識した抗体であり、さらに好ましくは、蛍光法または発色法により該抗体を検出することができる物質で標識した抗体である。具体的には、ビオチン、フルオレセイン、DIG、FITC、アルカリフォスファターゼまたはHRP等の、蛍光を発するか、その物質とある物質、例えば酵素の基質を混合した際に発色をする物質で標識した抗体を使用することができる。

本発明のスクリーニング方法では、好ましくは、C型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白は、C型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白にタグをつけた蛋白である。具体的には、HCV ゲノム上の 384 番目から 711 番目までのアミノ酸からなる蛋白質の C 末端に、それ自体公知である E tag (ファルマシア社)、Histag、myctag、FLAGtag、HA tag、GST、IgG Fc 領域等の 5 個以上のアミノ酸からなる、特異的抗体に認識されうる配列を付加した蛋白質を使用することができるが、これには限定されない。さらに言えば、先に論じたとおり HCV の E2/NS1 の N 末端には hyper variable region という免疫系のエピトープが存在すると考えられている。ゆえに、E2/NS1 にタグを結合させて発現させる場合、C 末端にタグを結合させたものを使用することが望ましい。またこのようにして得られた蛋白は、可溶性である。この可溶性の E2/NS1 は 384 番目のアミノ酸から 746 番目のアミノ酸までの間の E2/NS1 の膜外ドメインを発現させたものであれば特に制限なく使用可能である。タグのついた可溶化蛋白 E2/NS1 は、動物細胞、昆虫細胞、酵母等蛋白に糖鎖を付加することが可能な細胞に発現させることができる。

本発明のスクリーニング方法で用いる被験物質は、好ましくは、蛋白質、硫酸化多糖類または低分子化合物である。

本発明で用いる被験物質としては、抗体のほか、抗体以外の蛋白質、硫酸化多糖類または低分子化合物などを使用することができる。

抗体以外の蛋白質としては、ラクトフェリン等が挙げられる。硫酸化多糖類としては、例えば分子量が平均分子量 5000Da から 1000000Da の範囲のヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸 1 およびケラタン硫酸 2 等のいわゆるグリコサミノグリカン類およびデキストラン硫酸等のことを言うが、好ましくは 5000Da から 30000Da 程度の大きさのヘパリンがよい。低分子化合物としては、suramin 等であるが、HCV の E2/NS1 と HCV の感染を阻止する物質であればこれに限らない。

この低分子化合物の結合部位はさまざまな箇所が考えられるが、上記ヘパリンが結合する箇所に結合する物質であるならば、硫酸基が付加している化合物が好

ましい。

上記した本発明のスクリーニング方法により得られる、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白とC型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体との結合を阻害する物質も本発明の範囲内のものである。

さらに本発明によれば、軽鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むか、配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体、並びに、重鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号9に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、軽鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むか、配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体が提供される。

本発明の抗体は、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体であり、好ましくは、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白と、C型肝炎ウイルスの感染性のある細胞（以下「HCV感染性細胞」ということもある）、CD81を発現する細胞（以下「CD81発現細胞」ということもある）またはCD81との結合を阻害する抗体である。

上述のような抗体を選び出し、それぞれの抗体がE2/NS1と、HCV感染性細胞、CD81発現細胞またはCD81との結合を阻害することが可能であるかを以下に示す。

前述のとおりHCVのエンベロープ蛋白にはE1とE2/NS1がある。そのうちE2/NS1のhyper variable regionと呼ばれる変異に富む領域がヒトの免疫系のエピトープではないかと予測されている。すなわち、ウイルスの感染の第一段階である細

胞との結合には E2/NS1 が深く関与していることが予想されるので、本発明では E2/NS1 と HCV 感染性細胞、CD81 発現細胞または CD81 との結合を阻止する物質を HCV の細胞への結合または感染阻止物質として開発に至った。

E2/NS1 は HCV のゲノムから発現される蛋白の 384 番目のアミノ酸から 746 番目のアミノ酸までである。本発明においては、E2/NS1 の HCV 感染細胞への結合は、例えば、HCV 遺伝子の E2/NS1 の C 末端にタグをつけた蛋白を可溶化した形で発現させ、HCV 感染性細胞または CD81 発現細胞に結合させ、そのタグに対する抗体を使い、発光法または発色法にて E2/NS1 の上記細胞への結合を確認した。結合を阻害する物質は、結合を確認する系にて可溶化 E2/NS1 と前述の細胞を結合させる前に E2/NS1 と結合阻害を確認したい物質を混合し、その後該細胞を混合して発光または発色の変化を測定することにより確認した。結合を阻害する物質は、詳しくは後述するが、例えば H 鎖に配列番号 10 から 12 に記載のアミノ酸配列があり、L 鎖に配列番号 13 から 15 に記載のアミノ酸配列がある抗体等が挙げられるが、E2/NS1 と HCV 感染性細胞または CD81 発現細胞との結合を阻害する物質であればこれに限らない。また、可溶化 CD81 と E2 が結合することも報告されている (SCIENCE, Vol. 282, 938-941) ので、上記物質を用いても可溶化 CD81 と E2 の結合を阻害することが可能であることは容易に類推される。

本発明でいう抗体とは、通常生体内に存在する形の抗体の他に、抗体の H 鎖もしくは L 鎖の変換領域もしくはその組み合わせで形成される抗原結合部位を少なくとも 1 つ含むペプチド、1 組の H 鎖断片と L 鎖断片からなる Fab、2 組の H 鎖断片と L 鎖断片からなる  $F(ab')_2$ 、H 鎖断片と L 鎖断片が同一ペプチドに直列に結合した一本鎖抗体 (以下「scFv」ということもある) など含まれる。

本発明では、whole 抗体が最も好ましい。whole 抗体は全長抗体とも称し、全長 H 鎖と全長 L 鎖の 2 対の組み合わせから構成される、通常生体内に存在する形の抗体である。

なお、本発明における  $F(ab')_2$  及び Fab とは、イムノグロブリンを、蛋白分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、

ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgG1をパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL（L鎖可変領域）とCL（L鎖定常領域）からなるL鎖、及びVH（H鎖可変領域）とCH $\gamma$ 1（H鎖定常領域中の $\gamma$ 1領域）とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々Fab'という。またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab'がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをF(ab')<sub>2</sub>という。

本発明においては、モノクローナル抗体の作製は、C型肝炎治癒患者のB細胞より抗体の遺伝子を取得することにより行った。ヒト由来の複数のB細胞より目的とする抗体の遺伝子のみを単離する方法として、EBVを患者のB細胞にtransformしてB細胞を不死化してから目的の抗体を生産する細胞のみクローニングする等の手法が従来あるが、本発明者は鋭意検討の結果ファージディスプレイ法によりscFvを取得するに至った。

ファージディスプレイ法による抗体の取得の一例を挙げれば、C型肝炎治癒患者からヘパリン採血を行い、Ficoll法にて末梢血単核球を取得し、抗CD19抗体単体を利用してB細胞のみを精製した。この後、ヒトIL-2、ヒトIL-10、E2/NS1抗原1ng/ml、抗ヒトCD40抗体1 $\mu$ g/mlを用いてB細胞に抗体遺伝子のmRNAへの転写を刺激した。このB細胞の精製は、B細胞を特異的に分離できるものであれば特に制限されない。また、B細胞の刺激についても、前述以外の方法を用いてもよいし、適宜省略した方法を用いても問題ない。その後、B細胞より抗体mRNA、さらに抗体cDNAを取得した。さらに、scFv発現プラスミドにH鎖とL鎖可変領域の遺伝子を組み込める一本鎖抗体の遺伝子の枠組みを作製し、さらにその下流にM13ファージのgene3遺伝子を結合した。そのH鎖およびL鎖の可変領域を組

み込む場所に上記取得 cDNA から PCR 法にてランダムに取得した H 鎖および L 鎖を組み込んだ。このプラスミドを用いて M13 ファージの先端に gene3 蛋白と融合蛋白の形で組み込んだ一本鎖抗体を発現させ、そのうち E2/NS1 に結合するもののみ選択することにより、H 鎖の可変領域の CDR1、CDR2、CDR3 がそれぞれ配列表の配列番号 10、11 および 12 に記載のアミノ酸配列であり、L 鎖の可変領域の CDR1、CDR2、CDR3 がそれぞれ配列表の配列番号 13、14 および 15 に記載のアミノ酸配列である一本鎖抗体 scFv2-1 及び該 scFv2-1 を発現するファージを取得した。そして、scFv2-1 及び該 scFv2-1 を発現するファージが、特に E2/NS1 に対して親和性が強く、E2/NS1 と HCV 感染性細胞、CD81 発現細胞または CD81 の結合を強く阻害することを見いだした。

なお、上記では、M13 ファージのシステムを用いて一本鎖抗体をスクリーニングする手法を挙げたが、本発明においては、「抗体」とファージの表面に提示される蛋白が、融合蛋白の形で発現させる手法であれば特に制限されない。

本発明でいう C 型肝炎治癒患者とは、血液中に HCV の mRNA が検出され肝機能を測定する値、例えば ALT 等の値に異常が見られる、いわゆる C 型肝炎の状態であった患者の血液中の HCV の mRNA が検出限界以下になり、ALT 等の肝機能測定値が正常化した状態が 6 ヶ月以上続いた状態の患者のことを指す。

上記で本発明の抗体の代表例として例示した scFv2-1 は、BIACORE (BIACORE 社) を用いて E2/NS1 との結合定数  $K_a$  を測定すると、 $4.5 \times 10^8$  (M)、解離定数  $K_d$  は  $2.2 \times 10^{-9}$  (1/M) であった。また、本発明者らは、scFv2-1 と同じ可変領域の H 鎖を持ち L 鎖の可変領域が異なる一本鎖抗体も複数取得しそれぞれの一本鎖抗体の結合能力と E2/NS1 と HCV 感染性細胞ならびにヒト CD81 発現細胞との結合を阻害する能力を比較したところ、それぞれの結合能力と E2/NS1 と細胞の結合阻止能力には相関が見られた。

その中で結合定数が  $10^8$  (M) 以上、解離定数が  $10^{-8}$  (1/M) 以下である一本鎖抗体 scFv2-1 が、その阻害活性から鑑みるに医薬品としての能力が十分であると判断できる。すなわち、E2/NS1 への結合定数が BIACORE で測定して  $10^8$  (M) 以上、解離

定数が  $10^{-8}$  (1/M) 以下である抗体が、HCV 感染性細胞へ感染することを阻止する医薬品としてはより好ましい。抗体の能力をさらに上げるためには、結合定数が  $10^9$  (M) 以上、解離定数が  $10^{-9}$  (1/M) 以下の抗体がさらに好ましいものとして挙げられる。

通常の抗体は大小二種類のポリペプチドからなり、大きい方のサブユニットを「H鎖」、小さい方のサブユニットを「L鎖」という。また、それぞれのペプチドはN末端側に存在して抗原結合部位を形成する「可変領域」と抗体のクラス別に一定の「定常領域」からなっている。可変領域はさらに特に抗原結合部位の形成に密接に関与している相補性決定領域「CDR」とその間に存在する「フレームワーク」に分けられる。CDRにはH鎖とL鎖のそれぞれについてN末端側から「CDR1」、「CDR2」、「CDR3」と呼ばれる3つの領域があることが知られている。

以下、抗体 ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 について説明する。抗体 ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 の配列は配列表の配列番号 10 から 37 に記載される。

抗体の可変領域を構成するアミノ酸は抗体により異なることが多い。ScFv3-1 の H 鎖の部分のアミノ酸配列は配列番号 25 に示した。ここで、配列番号 25 には、scFv を大腸菌に発現させるための配列、すなわち scFv3-1 の H 鎖の N 末端に 2 アミノ酸を付加した配列のものを示した。ゆえに抗体としてのフレームワークとして考えると配列番号 25 のアミノ酸の 3 位から 32 位はフレームワーク 1、33 位から 37 位までは「CDR1」、38 位から 51 位まではフレームワーク 2、52 位から 68 位までは「CDR2」、69 位から 100 位まではフレームワーク 3、101 位から 117 位までは「CDR3」、118 位から 128 位まではフレームワーク 4 を示す。ScFv3-1 の L 鎖の部分のアミノ酸配列は配列番号 26 に示した。配列番号 26 のアミノ酸の 1 位から 23 位まではフレームワーク 1、24 位から 34 位までは「CDR1」、35 位から 49 位まではフレームワーク 2、50 位から 56 位までは「CDR2」、57 位から 88 位まではフレームワーク 3、89 位から 97 位までは「CDR3」、98 位から 111 位まではフレームワーク 4 を示す。ScFv3-2 および 3-3 および 3-4 の H 鎖のアミノ酸配列は

すべて配列番号 25 に示したものである。

L 鎖については、それぞれ下記の通りである。ScFv3-2 の L 鎖の部分のアミノ酸配列は配列番号 27 に示した。配列番号 27 のアミノ酸の 1 位から 23 位まではフレームワーク 1、24 位から 34 位までは「CDR1」、35 位から 49 位まではフレームワーク 2、50 位から 56 位までは「CDR2」、57 位から 88 位まではフレームワーク 3、89 位から 98 位までは「CDR3」、99 位から 112 位まではフレームワーク 4 を示す。ScFv3-3 の L 鎖の部分のアミノ酸配列は配列番号 28 に示した。配列番号 28 のアミノ酸の 1 位から 23 位まではフレームワーク 1、24 位から 34 位までは「CDR1」、35 位から 49 位まではフレームワーク 2、50 位から 56 位までは「CDR2」、57 位から 88 位まではフレームワーク 3、89 位から 97 位までは「CDR3」、98 位から 111 位まではフレームワーク 4 を示す。ScFv3-4 の L 鎖の部分のアミノ酸配列は配列番号 29 に示した。配列番号 29 のアミノ酸の 1 位から 23 位まではフレームワーク 1、24 位から 34 位までは「CDR1」、34 位から 49 位まではフレームワーク 2、50 位から 56 位までは「CDR2」、57 位から 88 位まではフレームワーク 3、89 位から 97 位までは「CDR3」、98 位から 111 位まではフレームワーク 4 を示す。これらのフレームワークと CDR の境目は Kabat らの「免疫学的に有利な蛋白の配列」(National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987)および(1991))を参考にして決定された。

ScFv の調製には Recombinant Phage Antibody System (ファルマシア社) などを利用することが可能であるが、生産宿主となる大腸菌にとって該一本鎖抗体が毒性を持ち、大腸菌の死滅、該一本鎖抗体の分解を起こすような場合には、キットを有効に利用できず多くの工夫を要する。一本鎖抗体は、pSE380 プラスミド(インビトロジェン社)や pET24d(+)プラスミド(ノバジェン社)などの誘導性のベクターと宿主となる菌体を検討することにより調製しうる。また、生産においては、上述の方法の他、動物細胞発現系、昆虫細胞発現系、酵母細胞発現系も有効に利用しうる。H 鎖および L 鎖を結合するリンカーは実施例では (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) ×3 回繰り返しの 15 残基のアミノ酸を利用したが、本

発明においては、本配列に限定されずに利用することが可能である。

配列表の配列番号 30 から 33 には、抗体 ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 の L 鎖の塩基配列を示した。なお、これらの塩基配列においても、本願で述べているような効果を呈する限り、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含むものも本発明の範囲に含まれる。

抗体の抗原特異性と抗原への結合の強さが、主に CDR のアミノ酸配列によって決定されることはマウスの抗体のヒト化で示されている (Methods in Enzymology, 203, 99-121, 1991)。

さらに、scFv から通常生体内にある形の抗体を作製することが可能である。一例を挙げると、E2/NS1 に結合する scFv のプラスミドから H 鎖および L 鎖の可変領域部分のみを PCR 法にて増幅する。それぞれの断片は、例えば、ヒトの抗体の H 鎖遺伝子及び/または L 鎖遺伝子を有するプラスミドに組み換えて、上記 scFv 上にある可変領域を持つ通常生体内にある形の抗体にすることが可能である。具体的には、例えば、プラスミドから H 鎖および L 鎖の可変領域を増幅するとき得られる遺伝子断片の両端に、適当な制限酵素切断部位を入れておいて、ヒト抗体の H 鎖及び/または L 鎖を有するプラスミド上の適当な制限酵素切断部位と組み合わせ、フレームシフトが起こらないように可変領域の遺伝子を入れ替える。このような方法によりプラスミド上にあった可変領域の配列をそのまま持つ通常生体内にある形の抗体を作ることは可能である。この抗体からさらに、抗体の H 鎖もしくは L 鎖の可変領域もしくはその組み合わせで形成される抗原結合部位を少なくとも 1 つ含むペプチド、1 組の H 鎖断片と L 鎖断片からなる Fab、2 組の H 鎖断片と L 鎖断片からなる (Fab' 2) を作ることも可能である。

さらに、本発明に示した H 鎖の可変領域の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 がそれぞれ配列表の配列番号 10、11 および 12 に記載のアミノ酸配列であり、L 鎖の可変領域の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 がそれぞれ配列表配列番号 13、14 および 15 に記載のアミノ酸配列である抗体、または H 鎖の可変領域の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 がそれぞれ配列表配列番号 10、11 および 12 に記載のア

ミノ酸配列であり、L鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2、およびCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号16、17および18に記載のアミノ酸配列である抗体、またはH鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2、およびCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号10、11、および12に記載のアミノ酸配列であり、L鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2、およびCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号19、20および21に記載のアミノ酸配列である抗体、またはH鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2、およびCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号10、11および12に記載のアミノ酸配列であり、L鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2、およびCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号22、23および24に記載のアミノ酸配列である抗体の配列を置換することによりE2/NS1への結合能力ならびに中和活性を高めることは可能である。例えば、CDR3の配列をランダムに置換して抗体を取り直すことも可能であり、H鎖およびL鎖のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列および遺伝子の配列を置換することにより高活性の抗体を取得することも可能である。この際、アミノ酸配列を変換した抗体については、中和活性を失わない限り問題ない。すなわち、本発明においては、E2/NS1と、HCV感染性細胞、CD81発現細胞またはCD81との結合を阻害する能力を有する限り、上記アミノ酸配列において、置換、欠失、挿入等の修飾を加えたものについても、本発明の範囲に含まれる。

本発明でいう抗体の発現には、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等を用いることができるが、人に医薬品として投与することを考えた場合、糖鎖修飾のされ方がよりヒト型に近い動物細胞を用いるのが好ましい。一例を挙げると、COS細胞やCHO細胞にて抗体を発現させるときにはpCDNA3.1(+)やpMAMneo (CLONETECH社)等を使用することが可能である。例えば、上記の手法で取得した抗体のH鎖の遺伝子をpCDNA3.1(+)のマルチクローニングサイトに、L鎖の遺伝子をpMAMneoにそれぞれ組み込む。その上でH鎖の組み込まれたベクターの適当なサイトにプロモーターとpolyAの間にL鎖の遺伝子がある発現ユニットを組み込む。このベクターをCOS細胞やCHO-K1、またはCHO DG44に遺伝子工学の定法にて導入することにより目的の抗体の生産が行える。さらに、上記作製したベクターに例えば

pSV2/DHFR (Nature, 1981. Vol. 294, Lee F. et al.,) から DHFR 遺伝子の発現ユニットを切り出し、H 鎖と L 鎖を発現するベクターに組み込む。このベクターを CHO DG44 に遺伝子工学の定法にて遺伝子導入する。これにより選択した細胞は MTX を用いた DHFR 遺伝子増幅系を使用することにより抗体の生産性を大幅に上昇させることが可能である。COS 細胞では一過性の抗体の発現のみしか行えないが、CHO 細胞では抗体の遺伝子が染色体の組み込まれた形で発現することが可能である。また、先に論じた DHFR 遺伝子増幅系を用いることにより抗体を高発現させることも可能であり、無血清培地で抗体生産を行うことができるので工業生産は CHO 細胞を用いるのがより好ましい。

COS 細胞は、通常 10%ウシ胎児血清 (FBS) を加えた Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium (DMEM) を用い、5%CO<sub>2</sub> 存在下 37℃で培養する。COS 細胞への遺伝子導入後の細胞の育種生産法は、「バイオマニュアルシリーズ 4 遺伝子導入と発現・解析法; 横田崇、新井賢一」(羊土社、1994) 等の実験書に記載されている。COS 細胞への遺伝子導入法は電気穿孔法その他、DEAE デキストラン法、lipofectin 等のトランスフェクション試薬を用いた方法であってもよい。

CHO K-1 細胞、CHO-DG44 細胞は、DMEM に 10% FBS を加えた培地の他、例えば CHO S SFM2 (GIBCO 社) 等の市販されている無血清培地を用いて 5%CO<sub>2</sub> 存在下 37℃で培養することも可能である。CHO 細胞への遺伝子導入も COS 細胞と同様に電気穿孔法その他、DEAE デキストラン法、lipofectin 等のトランスフェクション試薬を用いた方法を用いることが可能である。特に CHO DG44 ではヒポキサンチン、チミジンのない培地で培養し、DHFR の阻害剤である MTX を培地に加えることにより遺伝子増幅による抗体の生産性の上昇が可能である。

本発明での抗体の生産時には、血清由来のウシ抗体の混入を避けるために、無血清の培地にて培養することが望ましい。無血清培地に馴化していない COS および CHO の血清培地で培養している細胞については、血清を入れていない DMEM によって培養することが望ましい。こうして培養上清中に得られた本発明の抗体は、例えばプロテイン A カラムやプロテイン G カラムを用いる一般的な IgG 抗体の精

製法によって容易に精製することが可能である。

本発明で生産した抗体は HCV の治療に利用可能である。抗体の形状としては、生産抗体分子をそのまま利用することも可能であるが、各種プロテアーゼ処理により得られる抗原結合部位を含む断片である Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、あるいは Fd なども適用することができるが、whole 抗体が最も好ましい。これらの断片については「抗体工学入門」(地人書館)に詳細な説明がなされている。断片ペプチドの場合は抗体分子の酵素処理により得ることができるが、遺伝子工学的な手法により細菌、酵母などに生産させることも可能である。これらの方法により得たモノクローナル抗体、モノクローナル抗体由来抗体断片、ペプチド等を組み合わせることにより、より強固な結合性を生じる。

本発明で生産した抗体を利用し、HCV 感染患者の血液中の HCV 粒子を減少しうる。例えば、HCV の mRNA または、市販の HCV 診断薬により抗 HCV 抗体が血液中に観察される患者に本発明で生産した抗体を投与することにより血液中の HCV 粒子の量を減少させることにより HCV の再感染を防ぎ、HCV の治癒へと患者を導くことが可能である。さらに、本抗体は HCV 患者に投与されると HCV 患者の体内で HCV が感染している細胞のうち特に細胞表面に E2/NS1 が提示されている細胞にも結合しうる。この結合と生体内の補体等の免疫系の活性化により HCV の感染している細胞に対する障害能力をも期待できる。また、他の抗体由来の可変領域の遺伝子を組み合わせることにより、バイスペシフィック抗体、マルチスペシフィック抗体の生産も可能となる。マルチスペシフィック抗体とは、異なる抗原もしくは同じ抗原の異なるエピトープを認識する抗原結合部位を少なくとも 2 種類以上保有する抗体を言う。中でもバイスペシフィック抗体とは、異なる抗原もしくはエピトープを認識する抗原結合部位を 2 種類以上有する抗体を言う。例えば、通常の抗体の一方の抗原結合部位ともう一方の抗原結合部位が異なるバイスペシフィック抗体は通常の抗体よりも抗原と強くまた、幅広い配列の HCV と結合可能であると考えられる。さらに IgM としてより多価に抗原を認識する抗体の作成も可能である。こうした生産時にバイスペシフィック化する以外に、モノクローナル抗

体を生産、精製し、その後に抗体同士を結合させバイスペシフィック化、マルチスペシフィック化することができる。このバイスペシフィック化は同一抗原のみでなく他の抗原に対する組み合わせも可能である。例えば、HCV 粒子に表出していると言われている E1 に対する抗体を利用してバイスペシフィック抗体、およびマルチスペシフィック抗体を作製することも可能である。

一本鎖抗体 ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 のアミノ酸配列は配列表の配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6 および配列番号 3 7 に示した。また、それをコードする核酸配列の例をアミノ酸配列とともに示した。配列番号 3 4 のアミノ酸配列の 1 位から 22 位は大腸菌からの分泌用シグナルを含む配列、23 位から 148 位は H 鎖の可変領域、149 位から 165 位はリンカー、166 位から 276 位は L 鎖の可変領域、277 位から 299 位は tag を含む配列を示す。配列番号 3 5 のアミノ酸配列の 1 位から 22 位は大腸菌からの分泌用シグナルを含む配列、23 位から 148 位は H 鎖の可変領域、149 位から 165 位はリンカー、166 位から 277 位は L 鎖の可変領域、278 位から 300 位は tag を含む配列を示す。配列番号 3 6 のアミノ酸配列の 1 位から 22 位は大腸菌からの分泌用シグナルを含む配列、23 位から 148 位は H 鎖の可変領域、149 位から 165 位はリンカー、166 位から 276 位は L 鎖の可変領域、277 位から 299 位は tag を含む配列を示す。配列番号 3 7 のアミノ酸配列の 1 位から 22 位は大腸菌からの分泌用シグナルを含む配列、23 位から 148 位は H 鎖の可変領域、149 位から 165 位はリンカー、166 位から 276 位は L 鎖の可変領域、277 位から 299 位は tag を含む配列を示す。

配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6 および配列番号 3 7 に記載のアミノ酸配列の 1 位から 22 位を欠失させ大腸菌菌体内に一本鎖抗体を発現することも可能である。また、配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6 および配列番号 3 7 に記載のアミノ酸の 277 位から 299（又は 300）位までは一本鎖抗体の検出、ならびに精製のための配列であり、欠失あるいは如何なる配列にも置換しうる。

大腸菌からの分泌シグナルおよび精製のための配列を含むベクターの作製は実施例に示したとおりである。配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6 および

配列番号 3 7 に記載のアミノ酸配列の 149 位から 165 位のリンカー配列は H 鎖および L 鎖の可変領域の立体構造を実質的に scFv3-1 と同様に保持できるものであれば如何なる配列にも置換しうる。一本鎖抗体は動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞の他大腸菌でも生産可能である。

一本鎖抗体でもバイスペシフィック化およびマルチスペシフィック化が可能である。例えば、1 ペプチド内に複数の抗原認識部位の組み合わせの H 鎖と L 鎖を繰り返して並べることにより生産させることができる。また、生産、精製後に連結することも可能である。H 鎖および L 鎖の組み合わせによらず、H 鎖のみもしくは L 鎖のみでも利用は可能である。こうした抗体種の選択は利用用途により行うことが可能であり、結合強度、抗原結合部位等により選択しうる。

本発明の抗体は、軽鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 又は配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列表の配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 又は配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体である。本発明の抗体は、好ましくは、重鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むものである。

さらに本発明は、上記の抗体を有効成分として含有する医薬、例えば上記抗体と薬学的に許容しうる担体とからなる医薬組成物を提供する。特に、本発明における抗 E2/NS1 抗体遺伝子は、効率的に抗 E2/NS1 抗体を生産することを可能とし、種々の形態の治療用製剤を提供する。こうして生産された組換え抗体は、例えば薬学的に許容される成分組成の担体や安定化剤などの人体への投与に際し、該抗体の活性を保持させるために使用される物質とともに医薬用組成物中に含まれていてもよい。

本発明における医薬組成物は、本発明の抗体又は組み換え抗体を有効成分として、薬学的に許容され得る担体、即ち、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定

剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等の一つ以上とともに医薬組成物とし、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トロー剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態により経口あるいは非経口的に投与することができる。薬学的に許容され得る担体の具体例としては、ヒト血清アルブミン、ゼラチン等を例示することができる。薬学的に許容されるとは、悪心、目眩、吐き気等投与に伴う望ましくない副作用、頻回投与時の製剤に対する免疫応答などがおきないことを意味する。さらに、本発明の抗体に例えば毒素等の物質を結合させた抗体も医薬品として使用可能である。

本発明の医薬組成物としては、例えば、薬学的に許容される適当な溶剤や希釈剤、安定化剤とともに溶解された液状の医薬用組成物でもよい。とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容される担体中に  $0.1 \mu\text{g}$  抗体/ $\text{ml}$  担体  $\sim$   $10 \text{mg}$  抗体/ $\text{ml}$  担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において  $1 \text{kg}$  体重あたり、 $1 \mu\text{g} \sim 100 \text{mg}$  の割合で、好ましくは  $10 \mu\text{g} \sim 50 \text{mg}$  の割合で、1日あたり1回～数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。

さらに上記の医薬組成物に加えて生体内における濃度調節を目的とするミクロスフィア、リポソームにおいて非経口（注射）する場合は、抗体および一本鎖抗体で  $1 \mu\text{g} \sim 50 \text{mg}$  / 体重  $\text{kg}$  が適当であるがこの範囲に限らない。

なお、上記一本鎖抗体の場合には、C型肝炎ウイルスの診断用途として好適に用いることができる。

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

## 実施例

### 1. E2 の発現

#### (E2tag 発現ベクターの構築)

HCV J1 クローンの遺伝子 (Genbank 登録番号:D89815) の内 E2/NS1 の HCV ゲノムにおける 384 番目のアミノ酸より 711 アミノ酸からなる部分 100ng を用い、PCR 増幅用プライマーとして動物細胞での分泌を促すシグナルペプチド配列を有する PCR プライマー (5' CCC AAG CTT ACC ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GTG CTG CTG CTG TGT GGA GCA GTC TTC GTT TCG GCT AGC CAT ACC CGC GTG ACG GGG GGG GTG CAA GG 3' ; 配列番号 38) 遺伝子を 5' 側に用い、E-tag の配列を有する PCR プライマー (5' CCC CCT CGA GTC TAG ATT AAC GCG GTT CCA GCG GAT CCG GAT ACG GCA CCG GCG CAC CGG AGA CGA CCG CCG ACC CTA TAC C 3' ; 配列番号 39) を遺伝子 3' 側に用い、PCR 反応により DNA (tPA シグナル+E2 (384-711) +tag) 断片を増幅した。PCR 反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler を用い、ポリメラーゼに KOD (東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った) を用いて行った。その後、所望の DNA 断片は、5 % アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片 1  $\mu$ g を 1 ユニットの HIndIII と XbaI を用いて 50  $\mu$ L の系 M (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>) で 37°C で 2 時間反応させて切断し、70°C 10 分の熱処理により酵素を失活させた。これと、動物細胞用発現ベクター pCDNA3.1 (+) (Invitrogen 社より購入) 1  $\mu$ g を 1 ユニットの HindIII と XbaI を用いて 50  $\mu$ L の系 M (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>) で 37°C で 2 時間反応させて切断し 70°C 10 分の熱処理により酵素を失活させたものとともに、フェノールとクロロホルムとイソアミルアルコールを 25:24:1 で混合した溶液を酵素液と等量添加し混合し遠心を行い水層のみを回収した (今後この操作をフェノールクロロホルム抽出と呼ぶ)。さらに回収した水層に 10 分の 1 容の 3M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍容のエタノールを混合し -20°C で一晩、もしくは -80°C で 15 分静置し、遠心して DNA 断片を回収した。さらに 70% のエタノールを加えてからデカンテーションを行

い、真空乾燥を行った（今後このエタノールを加えて DNA 断片を回収する一連の操作をエタノール沈殿と呼ぶ）後、5  $\mu$ L の滅菌水に回収した DNA 断片を溶かした。この精製 DNA 断片どうしをリガーゼキット（宝酒造より購入、反応は説明書に従った）を用い連結し、大腸菌 JM109 株（宝酒造より購入、反応は説明書に従った）を形質転換し、所望の E2tag 発現プラスミド pE2tag を得た。

#### （E2tag の動物細胞での発現）

プラスミド pE2tag を保有する大腸菌を 50mL バッフルフラスコで一晩培養した。菌体を 8,000rpm で 10 分遠心により回収し QIAGEN Plasmid Midi kit（QIAGEN 社より購入）を用いて説明書に従いプラスミドを精製した。

さらに精製したプラスミドを lipofectin（LIFETECH 社より購入）を用いて説明書に従い 5%FBS を添加した EX-CELL302（JRH より購入）で培養した CHO DG44 株にトランスフェクションした。CHO DG44 は 5% CO<sub>2</sub> 中 37°C にて培養した。トランスフェクション 2 日後、細胞を 0.25% トリプシンではがした後、G418 を 400  $\mu$ g/mL 添加した EX-CELL302 に細胞を播種した。2 週間程度 G418 添加培地を用いて培地の交換を行い、コロニーが立ち上がってくるのを確認した。

得られた細胞の E2tag の発現の確認は細胞の上清をウェスタンブロッティングする事により確認した。ウェスタンブロッティングはファルマシア社より購入した Anti-E Tag Antibody の説明書に従った。検出抗体には HRP 結合ヤギ抗マウス IgG 抗体を用いた。発光反応は ECL Western blotting detection reagents（アマシャムファルマシアバイオテックより購入）を用いて説明書に従い X 線フィルムに感光させることにより行った。複数得られたクローンのうち発現がもっとも高い細胞を以後の実験に用いた。

#### （E2tag の精製）

上記の方法で得た E2tag 発現株を EX-CELL302 にて必要量の上清が得られるよう培養した。細胞の対数増殖期が終了した時点で細胞を遠心にて除き上清を回収し

た。上清はさらに  $0.45\mu\text{m}$  のフィルターを用いて混入物を除いた。そのようにして得られた上清は RPAS Purification Module (ファルマシア社より購入) を用いてアフィニティー精製を行った。精製は RPAS Purification Module に添付の説明書に従い行った。E2tag は RPAS Purification Module に添付の Elution buffer 中に得られるので PBS へ置換した。具体的には、セントリコン 30 (アミコン社より購入) のフィルター上部に上記 E2tag が含まれる Elution 各分を添加し中に含まれる buffer 量が  $100\mu\text{L}$  以下になるまで 5000rpm で遠心を行った。さらに、そこへ PBS を 2mL 程度添加し同様の遠心操作を行った。この操作を 4 回以上繰り返すことにより PBS 中に溶解している E2tag を回収した。

## 2. NOB assay 系構築

### (CD81 発現ベクターの構築)

ヒト CD81 遺伝子 (Genbank 登録番号 M33680) の全長 DNA を取得するため、Hela 細胞から精製した mRNA  $1\mu\text{g}$  から、RT-PCR kit ver2.1 (TAKARA 社) を用いて、添付資料に従いランダムプライマーを用い cDNA を合成した。次にこの kit の添付資料に従い、PCR 増幅用プライマーとして 5' 側を GCGCCGCCATGGGAGTGGAGGGCTGC (配列番号 40) に設定し、3' 側を CTCAGTACACGGAGCTGTTCCGGA (配列番号 41) に設定して PCR 反応を行った。PCR 産物は 0.8% アガロースゲル電気泳動し、目的のバンドを QIAEXII Gel Extraction Kit (QIAGEN 社より購入) を用いて添付の説明書に従い精製した。さらに、TOPO TA Cloning KIT with TOP10F' Cells (インビトロゲン社より購入) を用いて、添付の説明書に従い pCR2.1-TOPO と上記目的 CD81 のフラグメントを結合および大腸菌へのトランスフォーメーションを行い、目的とする pCRhCD81 を得た。さらに、pCRhCD81  $1\mu\text{g}$  を 1 ユニットの EcoRI を用いて  $50\mu\text{L}$  の系 H (10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 2mM  $\text{MgCl}_2$ ) で  $37^\circ\text{C}$  2 時間反応させて切断し、 $70^\circ\text{C}$  10 分の熱処理により酵素を失活させた後 QIAEX I I Gel Extraction Kit (QIAGEN 社より購入) を用いて添付の説明書に従い CD81 遺伝子を含むフラグメントを精製した。pCDNA3.1(+) も別途同様の系にて EcoRI 処理し酵素を失活させ

た後、バクテリアルアルカリフォスファターゼ (TOYOBO 社より購入) を  $1\mu\text{L}$  加え  $65^{\circ}\text{C}$  で 1 時間インキュベートした。その後、フェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿で精製後、 $5\mu\text{L}$  の滅菌水にそれぞれ回収した DNA 断片を溶かした。その上、両断片をリガーゼキット (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を用い連結し、大腸菌 JM109 株 (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を形質転換し、所望の CD81 発現プラスミド pCDNA3.1(+)/CD81 を得た。

#### (CD81 発現細胞構築)

プラスミド pCDNA3.1(+)/CD81 を保有する大腸菌を 50mL バッフルフラスコで一晩培養した。菌体を 8000rpm の遠心により QIAGEN Plasmid Midi kit (QIAGEN 社より購入) を用いて説明書に従いプラスミドを精製した。

さらに精製したプラスミドを lipofectin (LIFETECH 社より購入) を用いて説明書に従い 10%FBS を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) で培養しておいた NIH3T3 株にトランスフェクションした。NIH3T3 は以下すべて 5%  $\text{CO}_2$  中  $37^{\circ}\text{C}$  にて培養した。トランスフェクション 2 日後、細胞を 0.25%トリプシンではがし、10%FBS と G418 を  $800\mu\text{g/mL}$  添加した DMEM に細胞を播種した。2 週間程度 G418 添加培地を用いて培地の交換を行い、コロニーが立ち上がってくるのを確認した。

得られた細胞株における CD81 発現の確認は下記の操作により行った。得られた細胞株を選択培地中で 6well plate にてコンフルエントになるまで培養した。細胞を PBS/0.05%EDTA で一度洗った後、PBS/0.05%EDTA を用いてはがした後 0.1% BSA と 0.1%アサイドを含む PBS (以下 FACS buffer と呼ぶ)  $20\mu\text{L}$  に懸濁し、抗 CD81 抗体 (ファージン社より購入) の終濃度が  $0.025\text{mg/mL}$  となるように加え混合後、氷上で 1 時間インキュベートした。FACS buffer を  $200\mu\text{L}$  加えた後 3000rpm で遠心して細胞を回収する操作を 2 回繰り返した。回収した細胞を  $30\mu\text{L}$  の FACS buffer に懸濁し、FITC 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (カペル社より購入) を終濃度が  $0.05\text{mg/mL}$  となるように加え混合後、遮光して氷上で 1 時間インキュベート

した。FACS buffer を  $200\ \mu\text{L}$  加えた後  $3000\text{rpm}$  で遠心して細胞を回収する操作を 2 回繰り返した後、 $200\ \mu\text{L}$  の FACS buffer に細胞を懸濁して FACScan (ベクトンディッキンソン社) により細胞の蛍光量を測定しもっとも蛍光量の大きい細胞を選択し NIH3T3/CD81 と命名した。

(E2tag と Molt-4 または NIH3T3/CD81 との結合確認)

Molt-4 (理研 RCB No. 0206) または NIH3T3/CD81 を終濃度  $5 \times 10^6\text{cell/mL}$  とし、E2tag が最終濃度  $50\ \mu\text{g/mL}$  以下となるように濃度をふって混合し 1% の FBS を含む RPMI 1640 中にて  $20\ \mu\text{L}$  の系で氷上で 1 時間インキュベートした。5% FBS を含む PBS を  $200\ \mu\text{L}$  加え、 $3000\text{rpm}$  で遠心し細胞を回収する操作を 2 回繰り返した。1% の FBS を含む RPMI 1640 にて抗 Etag 抗体を  $10\ \mu\text{g/mL}$  に希釈し各サンプルに  $10\ \mu\text{L}$  加え混合後 1 時間氷上にてインキュベートした。5% FBS を含む PBS を  $200\ \mu\text{L}$  加え、 $3000\text{rpm}$  で遠心し細胞を回収する操作を 2 回繰り返した。5% FBS を含む PBS にて FITC 標識ウサギ抗マウス IgG (カペル社より購入) を終濃度  $25\ \mu\text{g/mL}$  となるように希釈した溶液  $10\ \mu\text{L}$  を各サンプルに加え混合後 1 時間氷上にてインキュベートした。5% FBS を含む PBS を  $200\ \mu\text{L}$  加え、 $3000\text{rpm}$  で遠心し細胞を回収する操作を 2 回繰り返した。サンプルを 5% FBS を含む PBS を  $200\ \mu\text{L}$  に懸濁後 FACScan (ベクトンディッキンソン社) により細胞の蛍光量の変化を測定し、E2tag が Molt-4 または NIH3T3/CD81 と結合していることを確認した。

(取得 whole 抗体による E2tag と Molt-4 または NIH3T3/CD81 との結合阻止の確認)

本実施例以下に説明する手法で取得した whole 抗体を用いて、E2tag と Molt-4 または NIH3T3/CD81 との結合阻止を確認した。

E2tag の最終濃度  $25\ \mu\text{g/mL}$  となるように 1% の FBS を含む RPMI 1640 で希釈した溶液と、1% の FBS を含む RPMI1640 で whole Ab 3-1、whole Ab 3-2、whole Ab 3-3、whole Ab 3-4 をそれぞれ  $0\ \mu\text{g/mL} \sim 15\ \mu\text{g/mL}$  の範囲で希釈した溶液をそれぞれ  $5\ \mu\text{L}$  ずつ混合し、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分インキュベートした。 $1 \times 10^7\text{cell/mL}$  の濃度に Molt-4

または NIH3T3/CD81 を 1% の FBS を含む RPMI 1640 中に懸濁した溶液 10  $\mu$  L を混合し 1 時間氷上にてインキュベートした。5% FBS を含む PBS を 200  $\mu$  L 加え、3000 回転で遠心し細胞を回収する操作を 2 回繰り返した。1% の FBS を含む RPMI 1640 にて抗 Etag 抗体を 10  $\mu$  g/mL に希釈し各サンプルに 10  $\mu$  L 加え混合後 1 時間氷上にてインキュベートした。5% FBS を含む PBS を 200  $\mu$  L 加え、3000 回転で遠心し細胞を回収する操作を 2 回繰り返した。5% FBS を含む PBS にて biotin 化抗マウス抗体を 10  $\mu$  g/mL に希釈し各サンプルに 10  $\mu$  L 加え混合後 1 時間氷上にてインキュベートした。PBS を 200  $\mu$  L 加え、3000 回転で遠心し細胞を回収する操作を 2 回繰り返した。PBS にて FITC 標識アビジン（ピアス社より購入）を 1/200 に希釈し各サンプルに 10  $\mu$  L 加え混合後 1 時間氷上にてインキュベートした PBS を 200  $\mu$  L 加え、3000 回転で遠心し細胞を回収する操作を 2 回繰り返した。サンプルを PBS 200  $\mu$  L に懸濁後フローサイトメーター BD-LSR（ベクトンディッキンソン社）により細胞の蛍光量の変化を測定し、E2tag と Molt-4 または NIH3T3/CD81 の結合が添加した患者血清または抗体で阻止されていることを確認した。

結果を図 1 に示す。図 1 は、全長抗体 1-1、3-1、3-2、3-3、及び 3-4 の中和活性を示す。

各取得抗体の結合阻止活性（中和活性）は以下の通りであった。

|              |              |
|--------------|--------------|
| Whole Ab 3-1 | 3 $\mu$ g/mL |
| Whole Ab 3-2 | 2 $\mu$ g/mL |
| Whole Ab 3-3 | 1 $\mu$ g/mL |
| Whole Ab 3-4 | 1 $\mu$ g/mL |

本発明の組み換え whole 抗体を Whole Ab 3-1、Whole Ab 3-2、Whole Ab 3-3、及び Whole Ab 3-4 と称し、それらの L 鎖全長アミノ酸配列をそれぞれ配列表の配列番号 1 ～ 4 に記載し、それらの H 鎖全長アミノ酸配列及び塩基配列を配列表の配列番号 9 に記載する。

また、全長抗体 1-1 (Whole Ab 1-1) のH鎖全長のアミノ酸配列及び塩基配列を配列番号 9 に記載し、L 鎖全長のアミノ酸配列及び塩基配列を配列番号 6 6 に記載する。

### 3. 抗体ライブラリーの作製

(HCV 治癒患者からの mRNA の精製)

採血した血清に E2tag と Molt-4 および NIH3T3/CD81 発現細胞との結合を阻止する能力のある抗体を有する HCV 治癒患者から 40mL ヘパリン採血を行い、血液を取得した。末梢血リンパ球を分離する為、比重遠心法 (Ficoll-Paque:ファルマシア) を行い、 $4 \times 10^7$  のリンパ球細胞を得た。MACS (第一化学薬品, Miltenyi Biotec GmbH 社製) を用いて抗 CD19 抗体を利用した B 細胞精製と行い、 $2.8 \times 10^6$  の細胞を得た。精製した細胞のうちの B 細胞の純度を確認するため、抗 CD19 抗体で精製した細胞を染色しフローサイトメトリー解析法にて 95%以上の精製度であることを確認した。この精製 B 細胞を用いて、ヒト IL-2 (ジェンザイム) 200unit/mL、ヒト IL-10 (ジェンザイム) 10ng/mL、E2/NS1 抗原 1ng/mL、抗ヒト CD40 抗体 (ジェンザイム)  $1 \mu\text{g/mL}$  の刺激の元、 $5 \times 10^5$  B 細胞/mL 10%FCS RPMI の条件で 72 時間培養した。B 細胞の活性化を顕微鏡にて確認し、PBS で 2 回洗浄し、RNAlater (Ambion 社) を用いて説明書に従って操作して B 細胞より mRNA を取得、精製した。

(抗体ライブラリー 1 の作製)

抗体ライブラリー作製は By-Passing Immunization Human Antibodies from V-gene Libraries Displayed on Phage (Journal of Molecular Biology 1991 222 582-597) の記載方法に従い行った。精製した mRNA  $1 \mu\text{g}$  から、RT-PCR kit ver2.1 (TAKARA 社) を用いて、添付資料に従いランダムプライマーを用い cDNA を合成した。次にこの kit の添付資料に従い、この cDNA を鋳型にし、抗体の H 鎖、L 鎖 ( $\lambda$  鎖、 $\kappa$  鎖) をそれぞれ PCR で増幅した。抗体遺伝子クローニング用のプライマー及びリンカーは、上記論文の記載に従い作製した物を用いた。PCR 産物は

1%アガロースゲルで電気泳動を行い、抗体の H 鎖、L 鎖のバンドを切り出した。切り出したアガロースゲルから QIAEX II Gel extraction kit(QIAGEN 社)を用いて DNA を抽出した。次に抽出した H 鎖、L 鎖、リンカーを同モルになるようにして混合し、連結用プライマーを用いて PCR を行った。PCR は 50  $\mu$ L の系で、Taq polymerase(PerkinElmer 社)1 単位を用い、94°C で 5 分加熱した後、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒を 30 サイクル、その後 72°C で 5 分間加熱し完了した。PCR 産物は 1 %アガロースゲルで電気泳動を行い、H 鎖、L 鎖、リンカーが一本に連結したバンドを切り出した。切り出したアガロースゲルから QIAEX II Gel extraction kit(QIAGEN 社)を用いて DNA を抽出した。次に制限酵素 Sfi I と 50 マイクロリットルの系 M (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>) で 55°C 2 時間反応させて切断し、70°C 10 分の熱処理により酵素を失活させた。さらに制限酵素 Not I を加え 50 マイクロリットルの系 M (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>) で 37°C 2 時間反応させて切断し、70°C 10 分の熱処理により酵素を失活させた。DNA をフェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿を順次行い精製し 50  $\mu$ L の滅菌水に溶解した。この DNA 断片 100ng と、50ng の pCantab5MycHis (pCantab5E (アマシャムファルマシア) の Etag 配列を Myc-Histag に入れ換えたベクター) とを、TAKARA 社のリガーゼキットを用いて説明書に従い結合させた。ライゲーションサンプルをフェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿で順次精製し 10  $\mu$ L の滅菌水に溶解した。この半量を用いて Molecular Cloning(1982)p249, Cold Spring Harbor Labs. に従い形質転換した。こうして  $1 \times 10^6$  のコロニーを得た。これを一本鎖抗体ライブラリー (抗体ライブラリー 1) として以後用いた。

#### (抗体ライブラリー 2 の作製)

抗体ライブラリー作製は By-Passing Immunization Human Antibodies from V-gene Libraries Displayed on Phage (Journal of Molecular Biology 1991 222 582-597) の記載方法に従い行った。

まず、pCantab5scFv3-1MycHis (pCantab5MycHis の Sfi I site と Not I site の

間に実施例に示した scFv2-1 遺伝子が挿入されており L 鎖の 5' 末に Alw44 I、3' 末に Not I のサイトが配してある)の L 鎖部分を HCV 抗原に反応性のない L 鎖に入れ替えたベクターを作製した。これを Pcantab5scFv3-1/L-/MycHis と呼ぶ。

精製した mRNA 1  $\mu$ g から、RT-PCR kit ver2.1 (TAKARA 社)を用いて、添付資料に従いランダムプライマーを用い cDNA を合成した。次にこの kit の添付資料に従い、この cDNA を鋳型にし、抗体の L 鎖 ( $\lambda$  鎖、 $\kappa$  鎖)をそれぞれ PCR で増幅した。抗体遺伝子クローニング用のプライマーは、上記論文の記載に従い作製した物を用いた。PCR 産物は 1%アガロースゲルで電気泳動を行い、抗体の H 鎖、L 鎖のバンドを切り出した。切り出したアガロースゲルから QIAEX II Gel extraction kit (QIAGEN 社)を用いて DNA を抽出した。

次に制限酵素 Alw44 I と 50 マイクロリットルの系 M (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 2mM  $MgCl_2$ ) で 37°C 2 時間反応させて切断し、70°C 10 分の熱処理により酵素を失活させた。さらに制限酵素 Not I を加え 100 マイクロリットルの系 H (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 2mM  $MgCl_2$ ) で 37°C 2 時間反応させて切断し、70°C 10 分の熱処理により酵素を失活させた。DNA をフェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿を順次行い精製し 50  $\mu$ L の滅菌水に溶解した。この DNA 断片 100ng と、同様に Alw44 I と Not I で処理した 50ng の pCantab5scFv3-1/L-/MycHis とを、TAKARA 社のリガーゼキットを用いて説明書に従い結合させた。ライゲーションサンプルをフェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿で順次精製し 10  $\mu$ L の滅菌水に溶解した。この半量を用いて Molecular Cloning (1982) p249, Cold Spring Harbor Labs. に従い形質転換した。こうして  $1 \times 10^6$  のコロニーを得た。これを一本鎖抗体ライブラリー (抗体ライブラリー 2) として以後用いた。

#### 4. ライブラリーのスクリーニング

(ファージの調製)

プレート上に生えている大腸菌を 2ml の 2xTY 液体培地で回収し、そのうち 20  $\mu$ l を 20ml の 2xTY 液体培地 (100  $\mu$ g/L アンピシリンと 2% グルコースを含む) に加

えた。37℃で 200rpm で振とうしながら、吸光度 600nm の値が 1.0 になるまで培養した。この培養液に  $1 \times 10^{11}$  pfu/mL のヘルパーファージ M13K07 を加え、37℃に 30 分静置した。続いて、37℃200rpm で振とうした。30 分後、溶液を 3000rpm で 10 分間遠心して、大腸菌を回収した。上清を廃棄し、20ml の 2xTY 液体培地 (100  $\mu$ g/L アンピシリンと 50  $\mu$ g/L カナマイシンを含む) に懸濁し、37℃で 200rpm で振とうしながら、一晩培養した。翌日、培養液を 15000rpm で遠心し、大腸菌を沈殿させ、上清を回収した。この上清をファージ溶液として用いた。

(スクリーニング操作)

50mM NaHCO<sub>3</sub> (pH9.6) 溶液に溶解した、10  $\mu$ g/ml の E2 抗原 1ml をプラスチックチューブ (Nunc MaxisorpTube) に加え、4℃に一晩おいた。翌日、抗原溶液を廃棄し、次に PBS 溶液 5mL でそのチューブを洗い、これを 3 回繰り返した。その後 5ml の 5%BSA を加え、37℃に置いた。2 時間後、BSA 溶液を廃棄し、5ml の PBS 溶液でチューブを洗った。次に、用意したファージ溶液 250  $\mu$ L と 5%BSA 溶液 750  $\mu$ L を混合し、これをチューブに加えて 37℃に置いた。1 時間後、加えた溶液を廃棄し、PBST (0.1%) 溶液 5ml でチューブを洗った。これを 20 回繰り返した。次に PBS 溶液 5mL でチューブを洗った。これを 20 回繰り返した。このチューブに 1mL の 100mM トリエチルアミンを加え、室温に 10 分間置いた。その後、トリエチルアミン溶液を回収し、これに 500  $\mu$ L の 1MTris-HCl (pH7.5) を加え、よく混合した。この溶液 750  $\mu$ L を吸光度 600nm の値が 0.6 になるまで培養した 10mL の大腸菌 TG-1 に加え、37℃に 30 分置いた。続いて、37℃で 200rpm で振とうした。30 分後、溶液を 3000rpm で 10 分間遠心して、大腸菌を回収した。この大腸菌を 2xTY プレート培地 (100  $\mu$ g/L アンピシリンと 2%グルコースを含む) に撒き、37℃で一晩置いた。翌日、プレート上に生えている大腸菌から、(ファージの調製) に記した操作でファージを回収し、(スクリーニング操作) に記した操作を繰り返した。このスクリーニング操作を 3 回繰り返した。

抗体ライブラリー 1 を用いたスクリーニングの結果、抗体 ScFv1-1、及び抗体

ScFv2-1 を取得した。

抗体 ScFv1-1 のアミノ酸配列と塩基配列を配列番号 6 7 に示し、抗体 ScFv2-1 のアミノ酸配列と塩基配列を配列番号 7 1 に示す。

抗体ライブラリー 2 を用いたスクリーニングの結果、配列表の配列番号 1 0 ～ 3 7 に記載のアミノ酸配列を有する抗体 ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 が得られた。

配列表の配列番号 1 0 ～ 1 2 は、抗体抗体 ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 の H 鎖の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 1 3 ～ 1 5 は、抗体 ScFv3-1 の L 鎖の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 1 6 ～ 1 8 は、抗体 ScFv3-2 の L 鎖の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 1 9 ～ 2 1 は、抗体 ScFv3-3 の L 鎖の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 2 2 ～ 2 4 は、抗体 ScFv3-4 の L 鎖の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 2 5 は、抗体 ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 の H 鎖の部分アミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 2 6 ～ 2 9 はそれぞれ、抗体 ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 の L 鎖のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 3 0 ～ 3 3 はそれぞれ、抗体 ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 の L 鎖の塩基配列を示す。

配列表の配列番号 3 4 ～ 3 7 はそれぞれ、抗体 ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 の塩基配列とアミノ酸配列を示す。

## 5. 抗体発現ベクター構築

P C R 法により p R C / C M V (I n v i t r o g e n 社より購入) の C M V プロモータ

ーを含む領域、マルチクロニングサイト、poly A シグナル配列領域（同社遺伝子マップ 209-1250 塩基領域を増幅する。使用したプライマーの配列は、5' 側は 5' CCC TGA TCA GAA TTC GCA GGA TCC CTC GAG ACT AGT GAT GAT CGG GCC AGA TAT ACG CG 3'（配列番号 42）、3' 側は 5' CCC TGA TCA AGA TCT GCT AGC GTC GAC TCC CCA GCA TGC CTG CTG CTA TTG 3'（配列番号 43）であり、Applied Biosystems Model 394 用い合成後、定法にて調製した。PCR 反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler を用い、ポリメラーゼに KOD（東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った）を用いて行った。その後、所望の約 1.0 Kbp DNA 断片は、5% アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片約 1 マイクログラムを 1 ユニットの BclI を用いて 50 マイクロリットルの系 H で 37℃ 2 時間反応させて切断する。別に ppUC119（宝酒造社より購入）DNA 1 マイクログラムを 1 ユニットの BamHI を用いて 50 マイクロリットルの系 H で 37℃ 2 時間反応させて切断する。切断した DNA 断片と切断したプラスミドをリガーゼキット（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を用い連結し、大腸菌 JM109 株（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を形質転換し、所望の発現プラスミド pKS1 を得た。

上記で得た pKS1（1 マイクログラム）を SpeI 1 ユニットを用い 50 マイクロの系 M にて 37℃、2 時間反応させ切断する。

pcDNA3.1/Hygro(+)（Invitrogen 社より購入）を用い、PCR により loxP-Hygromycin 融合遺伝子を増幅する。使用したプライマーの配列は、5' 側は Hyg-stop: cccagatctctattcctttgccctcggacgag（配列番号 44）3' 側は Hy-atg: ccccaagcttatgaaaaagcctgaactcaccgcg 3'（配列番号 45）であり、サイメディア社に合成を依頼し購入した。PCR 反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler を用い、ポリメラーゼに KOD（東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った）を用いて行った。その後、所望の DNA 断片は、5% アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring

Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片約 1 マイクログラムを 1 ユニットの NheI 及び NaeI を用いて 50 マイクロリットルの系 M で 37℃、2 時間反応させて切断する。

pNeo β gal (Stratagene 社より購入) を用い、PCR により TK (A) n を含む DNA を増幅する。使用したプライマーの配列は、5' 側は cccgccggctgggtgtggcggaccgc3' (配列番号 46)、3' 側は 5' cccctctagaaagtataggaacttcaagc 3' (配列番号 47) であり、Applied Biosystems Model 394 用い合成後、定法にて調製した。PCR 反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cyclor を用い、ポリメラーゼに KOD (東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った) を用いて行った。その後、所望の DNA 断片は、5% アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片約 1 マイクログラムを 1 ユニットの XbaI 及び NaeI を用いて 50 マイクロリットルの系 M で 37℃、2 時間反応させて切断する。

切断したプラスミドと切断した loxP-hygromycin DNA 断片と Tk(A)n DNA 断片とをリガーゼキット (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を用い連結し、大腸菌 JM109 株 (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を形質転換し、所望の発現プラスミド pEX loxP-Hyg を得た。

pEX1-3-1W を WO 01/94571 に記載の方法に従い調製した。先ず、特開平 5-304987 (EP 520499B1) に記載の 1-3-1 抗体遺伝子の内、H 鎖が γ 1、L 鎖がラムダのサブタイプのもを用い PCR 法により両鎖の 5' 側に HindIII、3' 側に SpeI 切断部位を付加した。使用したプライマーの配列は、H 鎖 5' 側は 5' CCC AAG CTT CAC CAT GGC CTG GAT TCC TCT ACT TCT CCC CC 3' (配列番号 48)、3' 側は 5' CCC ACT AGT CTA TGA ACA TTC TGT AGG GGC CAC TGT CTT C 3' (配列番号 49)、L 鎖 5' 側は 5' CCC AAG CTT CAC CAT GAA GCA CCT GTG GTT CTT CCT CCT GC 3' (配列番号 50)、3' 側は 5' CCC ACT AGT TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG GC 3' (配列番号 51) であり、Applied Biosystems Model 394 を

用いて合成後、定法にて調製した。P C R 反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cyclor を用い、ポリメラーゼに KOD（東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った）を用いて行った。その後、所望の DNA 断片は、5 % アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48、Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片約 1 マイクログラムを 1 ユニットの HindIII 及び SpeI を用いて 50  $\mu$  l の系 M で 37 °C で 2 時間反応させて切断する。別に上記 pKS1 DNA 1  $\mu$  g を 1 ユニットの HindIII 及び XbaI を用いて 50  $\mu$  l の系 M で 37 °C で 2 時間反応させて切断する。切断したプラスミドを切断した H 鎖 DNA 断片と L 鎖 DNA 断片を別々にリガーゼキット（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を用い連結し、大腸菌 JM109 株（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を形質転換し、所望の H 鎖発現プラスミド pEX1-3-1H 及び L 鎖発現プラスミド pEX1-3-1L を得た。

上記 pEX1-3-1L DNA 1  $\mu$  g を 1 ユニットの SpeI 及び NheI を用いて 50  $\mu$  l の系 M で 37 °C 2 時間反応させて切断する。その後、約 1.0 kbp の抗体 L 鎖発現 DNA 断片を 5 % アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48、Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。別に上記 pEX1-3-1H DNA 1  $\mu$  g を 1 ユニットの NheI を用いて 50  $\mu$  l の系 M で 37 °C で 2 時間反応させて切断する。切断した H 鎖発現プラスミドと L 鎖発現プラスミドをリガーゼキット（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を用い連結し、大腸菌 JM109 株（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を形質転換し、所望の 1-3-1 抗体発現プラスミド pEX1-3-1W を得た。

上記した pEX1-3-1W (WO 01/94571) を用い、P C R により重鎖定常域を含む DNA 断片を増幅する。使用したプライマーの配列は、5' 側は 5' ccccaagcttctcgcgactagtagtaccgaaggcccatcggtcttccc3' (配列番号 52)、3' 側は 5' ccccgaggccctctagtagctttcatttaccggagacaggg3' (配列番号 53) であり、サイメディア社に合成を依頼し購入した。P C R 反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cyclor を用い、ポリメラーゼに KOD（東洋紡社より購入、反応条件は説

明書に従った) を用いて行った。その後、所望の DNA 断片は、5 % アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片約 1 マイクログラムを 1 ユニットの HindIII 及び ApaI を用いて 50 マイクロリットルの系 M で 37 °C、2 時間反応させて切断する。

pEX loxP-Hyg DNA 1 マイクログラムを HindIII, ApaI 1 ユニットを用い 50 マイクロの系 M にて 37 °C、2 時間反応させ切断する。

切断したプラスミドと切断した重鎖定常域を含む DNA 断片とをリガーゼキット (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を用い連結し、大腸菌 JM109 株 (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を形質転換し、所望の発現プラスミド pEX gamma1 loxP-Hyg を得た。

S c F v 1 - 1 を用い、P C R により重鎖可変域を含む DNA 断片を増幅する。使用したプライマーの配列は、HB1-N 5' cccaagcttcaccATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTC CCAGGTGCAGCtggtgcagtctg3' (配列番号 54) , HB1-C 5' cccgctagcACTCGAGACGGTGACCAGGGTGCC3' (配列番号 55) であり、サイメディア社に合成を依頼し購入した。P C R 反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cyclor を用い、ポリメラーゼに KOD (東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った) を用いて行った。その後、所望の DNA 断片は、5 % アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片約 1 マイクログラムを 1 ユニットの HindIII 及び NheI を用いて 50 マイクロリットルの系 M で 37 °C、2 時間反応させ切断する。

pEX gamma1 loxP-Hyg DNA 1 マイクログラムを HindIII, SpeI 1 ユニットを用い 50 マイクロの系 M にて 37 °C、2 時間反応させ切断する。

切断したプラスミドと切断した重鎖可変域を含む DNA 断片とをリガーゼキット (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を用い連結し、大腸菌 JM109

9株（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を形質転換し、所望の発現プラスミド pEX gamma1 loxP-Hyg HCVI を得た（図2）。

pEGFPN2（クローンテック社より購入）を用い、PCRによりカナマイシン耐性遺伝子を含むDNA断片を増幅する。使用したプライマーの配列は、H鎖5'側は5' cccagagctagtcctgcaggcggggaaatgtgcgcggaacccct3'（配列番号56）、3'側は5' ccccgtagcctgcaagtcatttcgaacccagcgtccc3'（配列番号57）であり、サイメディア社に合成を依頼し購入した。PCR反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cyclerを用い、ポリメラーゼにKOD（東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った）を用いて行った。その後、所望のDNA断片は、5%アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harbor 記載の方法により精製した。精製DNA断片約1マイクログラムを1ユニットのSpeI及びNheIを用いて50マイクロリットルの系Mで37℃、2時間反応させた後、37℃、2時間反応させ切断する。

pKS1 DNA 1マイクログラムを NheI 1ユニットを用い50マイクロの系Mにて37℃、2時間反応させ切断する。

切断したプラスミドと切断したカナマイシン耐性遺伝子を含むDNA断片とをリガーゼキット（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を用い連結し、大腸菌JM109株（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を形質転換し、所望の発現プラスミド pEX-1 Km、Amp を得た。

pEX-1 Km, Amp 1 DNA 1マイクログラムを DraI, ScaI 1ユニットを用い50マイクロの系Hにて37℃、2時間反応させ切断する。

切断したプラスミドをリガーゼキット（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を用い連結し、大腸菌JM109株（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を形質転換し、所望の発現プラスミド pEX-1 Kmを得た。

pCZ0k (T, Shibui ら Appl Microbiol Biotechnol (1993) 38, 770-775 記載)を用い、PCRにより軽鎖定常域を含むDNA断片を増幅する。使用したプライマーの配列は、H鎖5'側は

5' ccccaagcttctagagtcgacggtaccgtggaaatcaaacgaactgtgg3' (配列番号 58)、3' 側は 5' ccccgggccctctagcgccgcctaacaactctccctgttgaagc3' (配列番号 59) であり、サイメディア社に合成を依頼し購入した。PCR 反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler を用い、ポリメラーゼに KOD (東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った) を用いて行った。その後、所望の DNA 断片は、5% アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片約 1 マイクログラムを 1 ユニットの HindIII 及び ApaI を用いて 50 マイクロリットルの系 M で 37℃、2 時間反応させ切断する。

pEX-1 Km DNA 1 マイクログラムを HindIII, ApaI 1 ユニットを用い 50 マイクロの系 M にて 37℃、2 時間反応させ切断する。

切断したプラスミドと切断した軽鎖定常域を含む DNA 断片とをリガーゼキット (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を用い連結し、大腸菌 JM109 株 (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を形質転換し、所望の発現プラスミド pEXkappa Km を得た。

4 種の scFv 発現 vector、ScFv3-1、scFv3-2、scFv3-3、scFv3-4 を用い、PCR により軽鎖可変域を含む DNA 断片をそれぞれ増幅する。使用したプライマーの配列は以下の通りである。

ScFv3-1 N 末端側 配列番号 60

ScFv3-1 C 末端側 配列番号 61

ScFv3-2 N 末端側 配列番号 62

ScFv3-2 C 末端側 配列番号 63

ScFv3-3 N 末端側 配列番号 62

ScFv3-3 C 末端側 配列番号 61

ScFv3-4 N 末端側 配列番号 64

ScFv3-4 C 末端側 配列番号 65

それぞれサイメディア社に合成を依頼し購入した。PCR 反応は、Perkin Elmer

Cetus DNA Thermal Cyclor を用い、ポリメラーゼに KOD（東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った）を用いて行った。その後、所望の DNA 断片は、5 % アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片約 1  $\mu$  g を 1 ユニットの HindIII 及び BsiWI を用いて 50  $\mu$  l の系 M で 37 °C、2 時間反応させた後、50 °C、2 時間反応させ切断する。

pEX kappa Km DNA 1  $\mu$  g を HindIII, Asp187 I 1 ユニットを用い 50  $\mu$  l の系 M にて 37 °C、2 時間反応させ切断する。

切断したプラスミドと切断した重鎖可変域を含む DNA 断片とをリガーゼキット（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を用い連結し、大腸菌 JM109 株（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を形質転換し、所望の発現プラスミド 4 つを取得した（図 3）。

ScFv3-1 → pEXkappa Km HCV3-1

ScFv3-2 → pEXkappa Km HCV3-2

ScFv3-3 → pEXkappa Km HCV3-3

ScFv3-4 → pEXkappa Km HCV3-4

pEX kappa Km 3-1、pEX kappa Km 3-2、pEX kappa Km 3-3、pEX kappa Km 3-4 の DNA 1  $\mu$  g を SpeI, NheI 1 ユニットを用い 50  $\mu$  l の系 M にて 37 °C、2 時間反応させ切断する。

pEX gamma1 loxP-Hyg HCVI DNA 1  $\mu$  g を NheI 1 ユニットを用い 50  $\mu$  l の系 M にて 37 °C、2 時間反応させ切断する。

上記切断したプラスミドををリガーゼキット（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を用い連結し、大腸菌 JM109 株（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を形質転換し、所望のプラスミドを得た（図 4）。

ScFv 発現 vector との対応は以下の通りである。

ScFv3-1 → pEX loxp-Hyg HCV3-1 W Km

ScFv3-2 → pEX loxp-Hyg HCV3-2 W Km

ScFv3-3 → pEX loxp-Hyg HCV3-3 W Km

ScFv3-4 → pEX loxp-Hyg HCV3-4 W Km

## 6. CHO細胞への抗体遺伝子の導入

### (1) MKamp 1 株の調製

MKamp 1 株はWO 01/94571に記載の通り調製した。

5% FBS (牛胎児血清; Lifetech 社より購入) を含む CHO-S-SFM-II 培地 (Lifetech 社より購入) で培養した対数増殖期の CHODG44 株 (コロンビア大学、Chaisn 教授より入手) を用い、導入前日に培地を交換しトランスフェクションに用いた。

導入するベクター pMLGFP Zeo は、ベクター内の構造遺伝子に無関係なところで一ヶ所切れる制限酵素 Eco0109I (宝酒造) で切断し一本鎖とした。pMLGFP Zeo DNA 40  $\mu$ g を 40 ユニットの Eco0109I を用いて 500  $\mu$ l の系Mで 37℃で2時間反応させて切断する。切断後、0.8%アガロースゲル電気泳動し、完全に一本鎖となっていることを確認した。その後、反応液を同量のフェノール/クロロホルム溶液により抽出処理し、水層に2倍量のエタノールを加え、-80℃にて1時間置いた後、毎分15000回転の遠心により沈殿を集め、沈殿を70%エタノールでリンスし真空乾燥した後、100  $\mu$ l の無菌水にとかした。

細胞への遺伝子の導入はエレクトロポレーション法にて行った。

対数増殖期の細胞  $1 \times 10^7$  個を 0.8 ml の PBS に懸濁し、用意したベクター溶液 100  $\mu$ l と共にキュベットに入れ穏やかに混合した。

キュベットは、5分間氷冷し、Gene Pulser (BIORAD 社製) を用いて電気パルスを加した。印加条件は、1500 (V)、25  $\mu$ F、1回印加とした。電気パルス印加後、さらに5分間キュベットは氷冷した。

エレクトロポレーションを行った細胞を上記培地に懸濁し、96 well plate に各 well に  $1 \times 10^5$  (cell/mL) から  $4 \times 10^3$  (cell/mL) の細胞濃度で 50  $\mu$ L ずつ播種した。

96 well に細胞播種 2 日後、上記培地に 200mg/1 のゼオシン (Invitrogen 社より購入) を加えた培地に交換し、その後 3 日に一度の頻度で 100  $\mu$ L ずつ培地交換を細胞が立ち上がってくるまで (約 3 週間) 行った。

細胞集落約 300 個の発する蛍光はまず蛍光顕微鏡で視覚的に観察した。

その中から蛍光の強いもの (MKamp 候補株) を 16 株選択した。

細胞総蛍光量の測定には FACSscan (BECTON DICKINSON) を用いた (空冷アルゴンレーザー、励起波長 = 488 nm)。測定条件をあわせるため、測定はすべて同一条件の感度を用いて行った (PARAMETER: FSC=7.77; DETECTOR: FSC=E-1, FL1 = 400V)。この結果、Mkcamp 候補株 16 株はいずれも平均値約 100 ~ 370 の相対蛍光強度を示していた。

Mkcamp 候補株を上記培地にて培養し、対数増殖期の細胞を 10 nM の MTX (メトトレキセート; シグマ社より購入) を含む 5% FBS (牛胎児血清; Lifetech 社より購入) CHO-S-SFM-II 培地 (Lifetech 社より購入) に細胞を懸濁し、ウェル当たり  $2 \times 10^5$  個の細胞数になるように 6 穴プレートに撚く。その後、3 日毎に半量の培地を交換し、生育したコロニーの蛍光強度を FACS にて測定した。測定の結果、元株の蛍光強度が 259 であり、5 nM MTX 耐性コロニーの蛍光強度が 407 である株を遺伝子増幅可能株として選択し、これを Mkcamp 1 株と称する。

## (2) CHO 細胞への抗体遺伝子の導入

上記の MKamp 1 株に Lipofectin (lifetech 社より購入) を用いて pEX loxp-Hyg HCV3-1 W Km、pEX loxp-Hyg HCV3-2 W Km、pEX loxp-Hyg HCV3-3 W Km、pEX loxp-Hyg HCV3-4 W Km、をそれぞれトランスフェクトした (それぞれ 200 万個の細胞対し 1.0 マイクログラムの DNA を用いた)。5% FBS (牛胎児血清; Lifetech 社より購入) を含む CHO-S-SFM-II 地 (Lifetech 社より購入) にて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で、48 時間培養後、400mg/1 の G418 (Lifetech 社より購入) を加えた同培地により、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で、25 日間選択培養し、G418 耐性コロニーをそれぞれ選択した。

## 7. ELISA assay を用いた抗体生産量の測定

抗ヒト免疫グロブリンヤギ抗体 (Zymed 社より購入) 溶液 (溶液 1 で  $10 \mu\text{g/ml}$  に希釈) を  $50 \mu\text{l/well}$  で 96well プレートに加え、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間処理した。その後、well の溶液をすて、各 well に  $250 \mu\text{l}$  の溶液 2 を加え、 $4^\circ\text{C}$  で 16 時間以上保温した。溶液除去後、溶液 3 で各 well を 5 回ずつ洗浄し、溶液 4 で希釈した抗体 (スタンダード) もしくは試料溶液 (培養上清を溶液 4 で任意に希釈したもの) を  $50 \mu\text{l/well}$  で加えて、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間保温した。溶液除去、溶液 3 で 5 回洗浄後、溶液 5 を  $50 \mu\text{l/well}$  で加え、 $20^\circ\text{C}$  で 40 分間保温した。液除去、PBS で 5 回洗浄後、溶液 9 を  $100 \mu\text{l/well}$  で加えて室温で遮光して約 5 分間反応させた。等量の 10%硫酸を加えて反応を停止させた後、イムノリーダー (Inter Med 社製、Immuno Reader NJ-2000) を用いて各 well の  $\lambda_1=490\text{nm}$  及び  $\lambda_2=650\text{nm}$  における吸光度  $A_1$  及び  $A_2$  を測定し、 $(A_1-A_2)$  を求めた。希釈標準溶液を用いて検量線を作製し、サンプル中の 1-3-1 抗体 (スタンダードとして用いた) の濃度を測定した。

各溶液の組成は以下の通りである。

溶液 1 : 0.1% Sodium Azide を含む PBS

溶液 2 : 1% BSA、0.1% Sodium Azide を含む PBS

溶液 3 : 0.05% の Tween20 を含む PBS

溶液 4 : 1% BSA を含む PBS

溶液 5 : HRP 標識抗ヒト免疫グロブリンヤギ抗体 (Zymed 社より購入) 原液  $2 \mu\text{l}$  を 10ml の溶液 4 に溶かしたもの (用時調製)

溶液 6 : リン酸一水素ナトリウム 14.2g を取り、水を加えて 500ml とする

溶液 7 : クエン酸 1 水和物 10.5g を取り水を加えて 500ml とする

溶液 8 : 溶液 5 257ml に溶液 6 を 243ml 加え、水を加えて 1000ml とする

溶液 9 : 0-フェニレンジアミン (和光純薬より購入) 4.0mg を取り、溶液 7 を 10ml 及び 30% (v/v) 過酸化水素溶液 5 マイクロリットルを加えて溶かす (調製後 10 分以内に用いた)

## 8. 遺伝子導入株の抗体生産性の確認

上記 ELISA 法により以下の生産量が認められた。

表 1

| 導入ベクター                   | 抗体名          | 発現量     |
|--------------------------|--------------|---------|
| pEX loxp-Hyg HCV3-1 W Km | whole Ab 3-1 | 1.5mg/L |
| pEX loxp-Hyg HCV3-2 W Km | whole Ab 3-2 | 1.9mg/L |
| pEX loxp-Hyg HCV3-3 W Km | whole Ab 3-3 | 1.9mg/L |
| pEX loxp-Hyg HCV3-4 W Km | whole Ab 3-4 | 3.7mg/L |

## 9. 細胞融合アッセイ

細胞融合アッセイは Takikawa らの方法に従った (Takikawa et al., J. Virol., 74, 5066-5074, 2000)。組換え E1 および E2 蛋白を細胞表面に発現する CHO 細胞 (Matsuura et al., unpublished) をコラーゲンコートした 96 well plate の各ウェルに 2 万個ずつ接種し 5% CO<sub>2</sub> 存在下 37C で培養する。細胞を準備する際には、トリプシンを使用せず 10 mM EDTA 添加リン酸緩衝食塩水 (PBS) に 5 分間浸してから、できるだけ細胞が分散するようにフラスコを震盪し、ゆっくりとピペッティングしながら剥がす。24 時間培養後、細胞を 200  $\mu$ L の Opti-MEM (Gibco BRL) で 2 回洗い、T7 プロモーターの下流にホタルのルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだリポータープラスミド pT7EMCLuc (Aoki et al., Virology, 250, 140-150, 1998) と遺伝子導入効率の標準化のために CMV プロモーターの下流に海椎茸のルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ pRL-CMV (Promega) を Trans IT-LT1 (Mirus) を用いて細胞へ導入する。1 plate あたり以下の組成で用意し、15 分間静置後、1 well あたり 30  $\mu$ L ずつ添加する。2 時間後 10% 血清添加 D-MEM (Gibco) を 150  $\mu$ L ずつ添加し培養を継続する。

|              |             |
|--------------|-------------|
| Opti-MEM     | 3 ml        |
| Trans IT-LT1 | 50 $\mu$ L  |
| pT7EMCLuc    | 9 $\mu$ g   |
| pRL-CMV      | 0.6 $\mu$ g |

細胞融合反応の受容細胞としては、ヒト肝細胞癌由来の HepG2 細胞を用いる。HepG2 細胞を 6 well plate の各ウェルに  $8.0 \times 10^5$  個ずつ接種し、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で培養する。24 時間培養後に、T7 RNA ポリメラーゼを発現するプラスミド pCAGT7pol (Ishii et al., unpublished) を各ウェルあたり、以下の組成で細胞に導入し、2 時間後に 10% 血清添加 D-MEM を 1.5 ml 添加する。24~36 時間培養後、細胞をトリプシンで剥がし、25~30ml の 10% 血清添加 D-MEM に浮遊後、50ml の遠心管に移し、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で、震盪機の上で一晩浮遊培養する。

|               |             |
|---------------|-------------|
| Opti-MEM      | 100 $\mu$ L |
| Trans IT-LT11 | 5 $\mu$ L   |
| pCAGT7pol     | 1 $\mu$ g   |

96 well plate に用意したリポータープラスミドを導入した HCV エンベロープ蛋白を発現する CHO 細胞（トランスフェクト 48 時間後）の上に、T7RNA ポリメラーゼを発現するプラスミドを導入して一晩浮遊培養した HepG2 細胞を、 $2 \times 10^4$ /100  $\mu$  L ずつ各ウェルに加える。5 時間培養後、メディウムを捨て、100  $\mu$  L の pH 5.0 の PBS に 2 分間浸した後、直ちにその液を捨て、10% 血清添加 D-MEM を 200  $\mu$  L ずつ各ウェルに加え培養を継続する。培養 5 時間後に細胞を dual-luciferase reporter assay system (Promega) を用いて、添付プロトコールに従いルシフェラーゼ活性を測定し、細胞融合活性を評価した。

#### 10. 細胞融合阻止アッセイ

抗体による細胞融合阻止活性を調べる場合は、上記の細胞融合阻アッセイと基本的には同じであるが、CHO 細胞に HepG2 細胞を加える前に、Opti-MEM で HepG2 細胞を 2 回洗浄後、Opti-MEM で段階希釈した被検抗体 (whole 抗体 3-1、3-2、3-3、及び 3-4) と 60 分反応させてから共培養を行った。その後同様にルシフェラーゼ活性を測定し、細胞融合阻止活性を評価した。その結果、NOB 活性を示した単鎖抗体を基に作製した完全抗体の中に、HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合を特異的に阻止するものが認められた。

### 1 1. BIACORE によるアフィニティー測定

BIACORE による取得 whole 抗体のアフィニティー測定は添付の説明書に従った。

E2tag を透析により PBS に置換した。この E2tag (100  $\mu$ g/mL、20  $\mu$ L) をセンサーチップ CM5 (ビアコア社より購入) のそれぞれ異なるレーンに 5  $\mu$ L/min で送液することによりアミノカップリング法にて固定化し、E2tag 固定化センサーチップを得た。whole Ab 3-1、whole Ab 3-2、whole Ab 3-3、whole Ab 3-4 を透析により HBS buffer (10mM HEPES (pH7.4), 0.15M NaCl, 3.4mM EDTA, 0.005% Tween 20) に置換した。BIACOREX (ビアコア社) を用いて、先に作製した E2tag センサーチップ上に、この各 whole 抗体溶液を 5  $\mu$ L/min にて送液し結合時のセンサグラムを得た。その後、HBS buffer のみを 5  $\mu$ L/min にてセンサーチップに送液し解離時のセンサグラムを得た。これらのセンサグラムの解析により以下の E2tag と whole 抗体の解離定数を得た。

|              |           |
|--------------|-----------|
| Whole Ab 3-2 | 25.3 (nM) |
| Whole Ab 3-3 | 9.26 (nM) |
| Whole Ab 3-4 | 16.8 (nM) |

### 1 2. スクリーニング例 (競合アッセイ) 1

### (1) 抗体のビオチン化

抗体のビオチン化はアマシムファルマシア社の Protein Biotinylation Module を用いてプロトコールに従い行った。ビオチン化した抗体はアマシムファルマシア社の PD-10 を用いて定法に従い PBS に buffer 置換し、以下の操作に使用した。

### (2) whole Ab 1-1 による E2/NS 1 と whole Ab 3-3 の結合阻止試験

50mM NaHCO<sub>3</sub> (pH9.6) 溶液に溶解した、30  $\mu$ g/ml の E2tag 1ml を FALCON の 96well plate に 50  $\mu$ L づつ加え 37°C で 1 時間インキュベートした。各 well の溶液をデカンテーションで廃棄後、0.1% の Tween20 を加えた PBS を各 well に 200  $\mu$ L 加えデカンテーションで廃棄する操作を 5 回繰り返した。各 well の水分を切った後、アマシムファルマシア社の Protein Biotinylation Module に添付されていた membrane blocking agent 5% と 0.1% の Tween20 を含む PBS 溶液 (以下、blocking buffer と呼ぶ) を各 well に 200  $\mu$ L づつ加え 37°C で 1 時間、または 4°C で一晩インキュベートした。各 well の溶液をデカンテーションで廃棄後 0.1% の Tween20 を加えた PBS を各 well に 200  $\mu$ L 加えデカンテーションで廃棄する操作を 5 回繰り返した。Whole Ab1-1 および control 抗体を blocking buffer にて 0~1600ng/mL になるように希釈し各 well に 50  $\mu$ L づつ加え 37°C で 1 時間インキュベートした。各 well の溶液をデカンテーションで廃棄後、0.1% の Tween20 を加えた PBS を各 well に 200  $\mu$ L 加えデカンテーションで廃棄する操作を 5 回繰り返した。各 well の水分を切った後、ビオチン化した whole Ab 3-3 を最終濃度が 100ng/mL になるように blocking buffer にて希釈し、各 well に 50  $\mu$ L づつ加え 37°C で 1 時間インキュベートした。各 well の溶液をデカンテーションで廃棄後、0.1% の Tween20 を加えた PBS を各 well に 200  $\mu$ L 加えデカンテーションで廃棄する操作を 5 回繰り返した。HRP 標識 streptavidin を PBS にて 1500 倍希釈し、各 well に 50  $\mu$ L づつ加え室温で 1 時間インキュベートした。各 well の溶液をデカンテーションで廃棄後 0.1% の Tween20 を加えた PBS を各 well に 200  $\mu$ L 加えデカンテーションで廃棄する操作を 5 回繰り返した。OPD buffer 25mL にオルトフェニレンジアミン

10mg、30%過酸化水素水 12.5  $\mu$ L を加えた溶液を各 well に 100  $\mu$ L ずつ加え十分に発色するまで室温でインキュベートし、4N 硫酸を 100  $\mu$ L 加えて反応を停止し、490nm における吸光度を測定することにより、whole Ab 3-3 の E2tag に対する結合が whole Ab1-1 および control 抗体により阻害されているか確認した。結果を図 5 に示す。

## 1 2. スクリーニング例（競合アッセイ） 2

50mM NaHCO<sub>3</sub> (pH9.6) 溶液に溶解した、30  $\mu$ g/ml の E2tag 1mL を FALCON の 96well plate に 50  $\mu$ L ずつ加え 37°C で 1 時間インキュベートした。各 well の溶液をデカンテーションで廃棄後、0.1% の Tween20 を加えた PBS を各 well に 200  $\mu$ L 加えデカンテーションで廃棄する操作を 5 回繰り返した。各 well の水分を切った後、blocking buffer を各 well に 200  $\mu$ L ずつ加え、37°C で 1 時間、または 4°C で一晩インキュベートした。各 well の溶液をデカンテーションで廃棄後、0.1% の Tween20 を加えた PBS を各 well に 200  $\mu$ L 加えデカンテーションで廃棄する操作を 5 回繰り返した。Whole Ab3-3 および control 抗体を blocking buffer にて 0~1600ng/mL になるように希釈し各 well に 50  $\mu$ L ずつ加え 37°C で 1 時間インキュベートした。各 well の溶液をデカンテーションで廃棄後、0.1% の Tween20 を加えた PBS を各 well に 200  $\mu$ L 加えデカンテーションで廃棄する操作を 5 回繰り返した。各 well の水分を切った後、ビオチン化 whole Ab 1-1 を最終濃度が 100ng/mL になるように blocking buffer にて希釈し、各 well に 50  $\mu$ L ずつ加え 37°C で 1 時間インキュベートした。各 well の溶液をデカンテーションで廃棄後、0.1% の Tween20 を加えた PBS を各 well に 200  $\mu$ L 加えデカンテーションで廃棄する操作を 5 回繰り返した。HRP 標識 streptavidin を PBS にて 1500 倍希釈し、各 well に 50  $\mu$ L ずつ加え室温で 1 時間インキュベートした。各 well の溶液をデカンテーションで廃棄後 0.1% の Tween20 を加えた PBS を各 well に 200  $\mu$ L 加えデカンテーションで廃棄する操作を 5 回繰り返した。OPD buffer 25mL にオルトフェニレンジアミン 10mg、30%過酸化水素水 12.5  $\mu$ L を加えた溶液を各 well に 100  $\mu$ L ずつ加え十分に発色す

るまで室温でインキュベートし、4N 硫酸を 100  $\mu$ L 加えて反応を停止し、490nm における吸光度を測定することにより whole Ab 1-1 の E2tag に対する結合が whole Ab 3-3 および control 抗体により阻害されているか確認した。結果を図 6 に示す。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によると、HCV の感染阻止作用などの抗ウイルス効果を有する新規な医薬品が提供可能である。

なお、本出願は日本国特許出願番号：特願 2001-243947 に基づく優先権を主張して出願されたものであり、特願 2001-243947 の明細書に記載の内容は全て本明細書の開示の一部として本明細書中に引用されるものとする。

## 請求の範囲

1. (1) 被験物質の存在下および非存在下において、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白と、下記の (a)、(b) 又は (c) の何れかの抗体を接触させる工程；  
(a) 重鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号：9 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：9 に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体；  
(b) 軽鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号：1～4 又は 75 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：1～4 又は 75 に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体；  
(c) 配列表の配列番号 34～37、67～70 又は 71～74 の何れかに記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号 34～37、67～70 又は 71～74 の何れかに記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する一本鎖抗体；並びに、  
(2) 被験物質の存在下および非存在下における C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白と、上記抗体との結合を比較する工程を含む、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白と上記抗体との結合を阻害する物質のスクリーニング方法。
2. 抗体が、該抗体を検出可能な物質で標識した抗体である、請求項 1 に記載のスクリーニング方法。
3. 抗体が、蛍光法または発色法により該抗体を検出することができる物質で標識した抗体である、請求項 1 又は 2 に記載のスクリーニング方法。
4. C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白が、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白にタグをつけた蛋白である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のスクリーニング方法。
5. C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白が、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白の C

末端にタグをつけた蛋白である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

6. 被験物質が、蛋白質、硫酸化多糖類または低分子化合物である、請求項 1 から 5 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

7. 請求項 1 から 6 のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られる、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白と C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体との結合を阻害する物質。

8. 軽鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 又は配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列表の配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 又は配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体。

9. 重鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、軽鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 又は配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列表の配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 又は配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体。

10. 請求項 8 又は 9 に記載の抗体をコードする核酸。

11. 配列表の配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 又は配列番号 8 のいずれかに記載の塩基配列を含有する、請求項 10 に記載の核酸。

12. 請求項 10 又は 11 に記載の核酸を用いた抗体の生産方法。

13. 請求項 12 に記載の方法によって得ることができ、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する組換え抗体。

14. 抗体の Fc 領域がヒト型である、請求項 13 に記載の組換え抗体。

- 15. 抗体が1本鎖抗体である請求項14に記載の組換え抗体。
- 16. 請求項8又は9に記載の抗体を有効成分として含有する医薬。
- 17. 請求項13から15のいずれかに記載の組換え抗体を有効成分として含有する医薬。
- 18. C型肝炎の治療および/または予防のための請求項16又は17に記載の医薬。
- 19. C型肝炎の診断のための請求項16又は17に記載の医薬。
- 20. 請求項8又は9に記載の抗体を有効成分として含有する抗HCV剤。
- 21. 請求項13から15のいずれかに記載の組換え抗体を有効成分として含有する抗HCV剤。

図 1

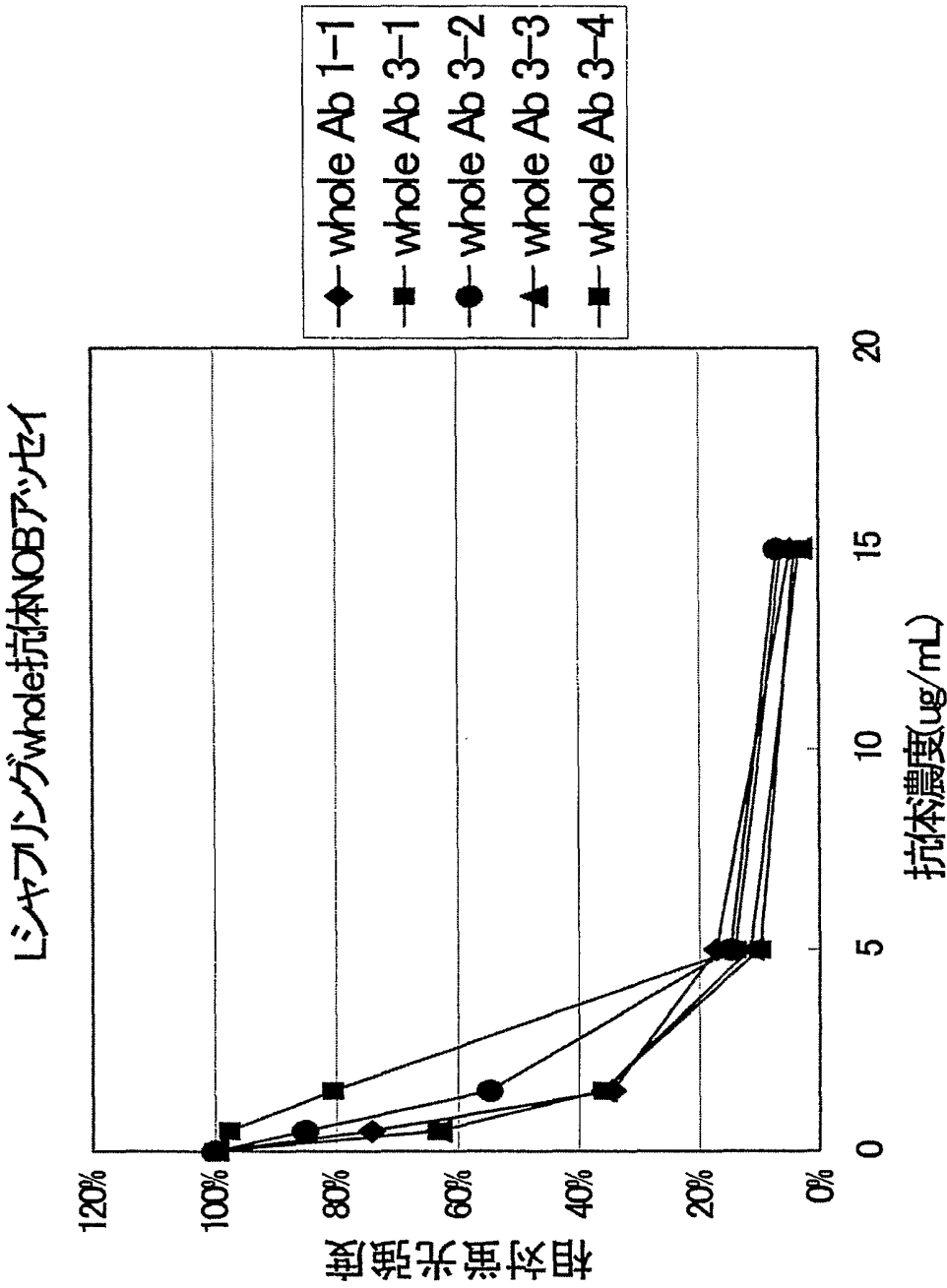


図 2

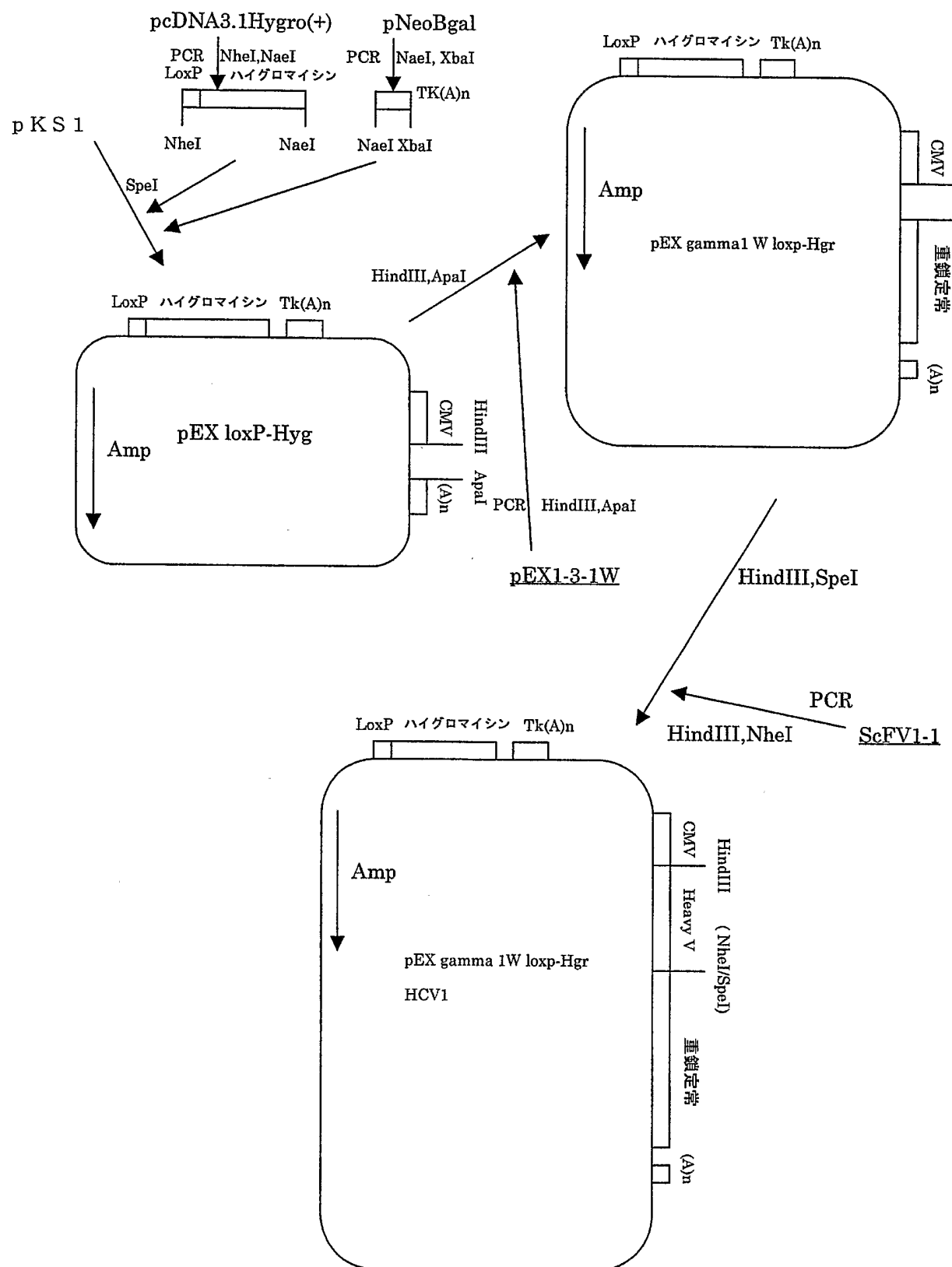


図 3

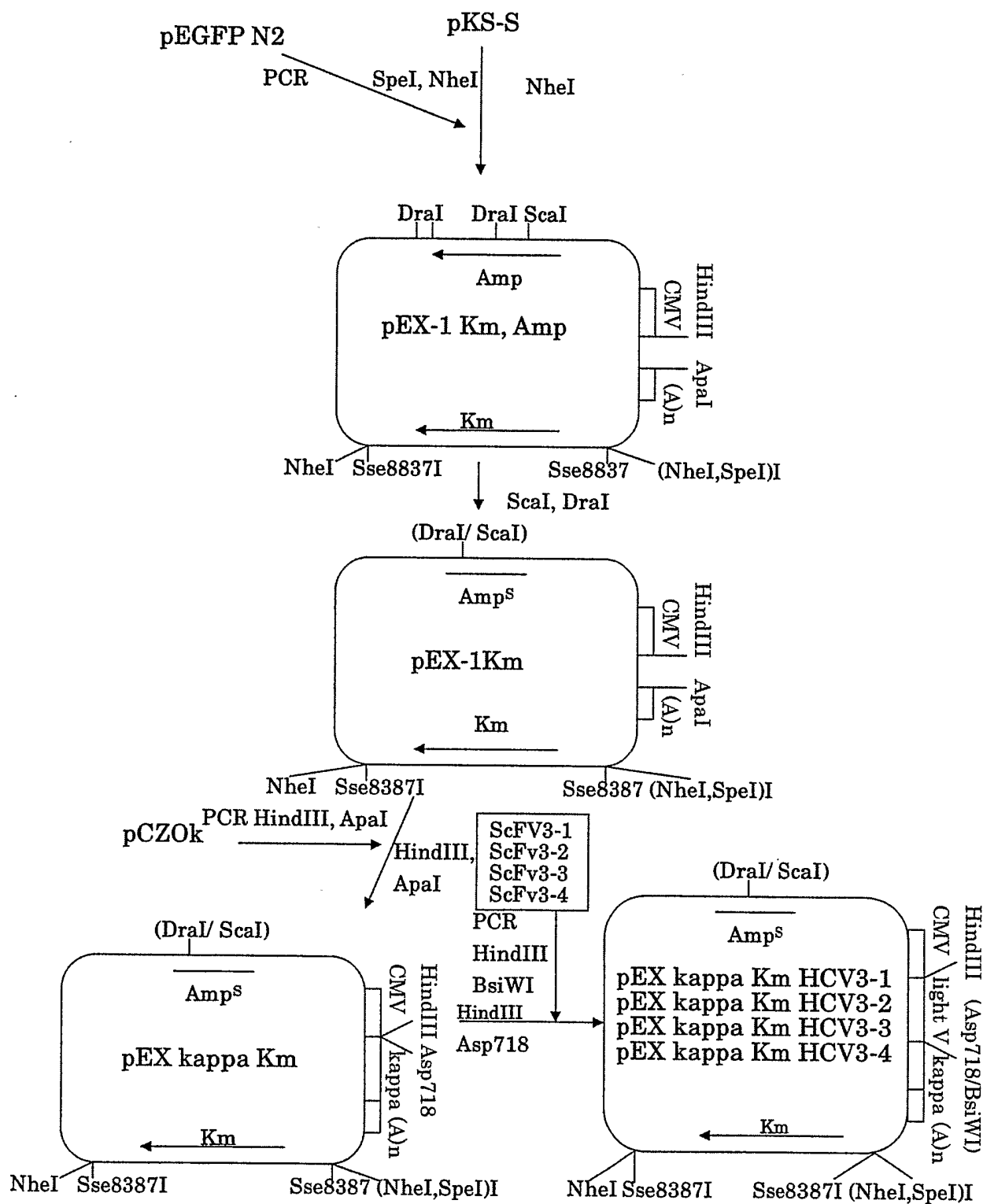


図 4

pEX gamma W loxp-Hgr HCV1

pEX kappa Km HCV3-1  
 pEX kappa Km HCV3-2  
 pEX kappa Km HCV3-3  
 pEX kappa Km HCV3-4

NheI

NheI, SpeI

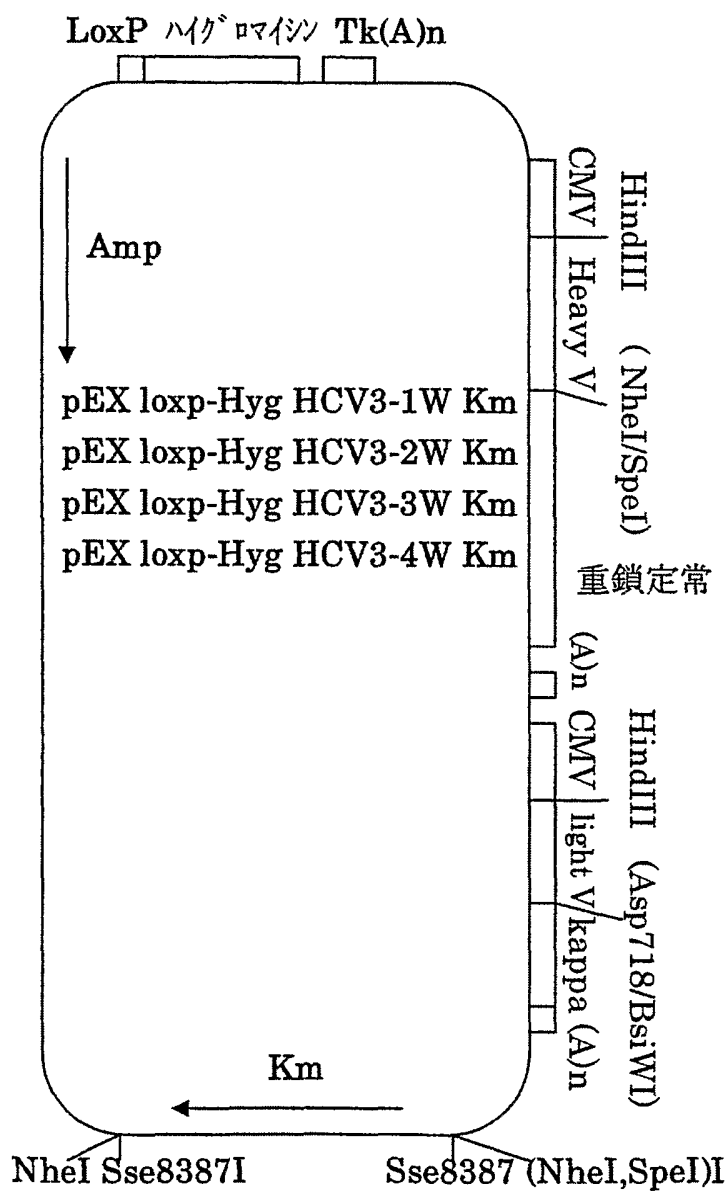


図 5

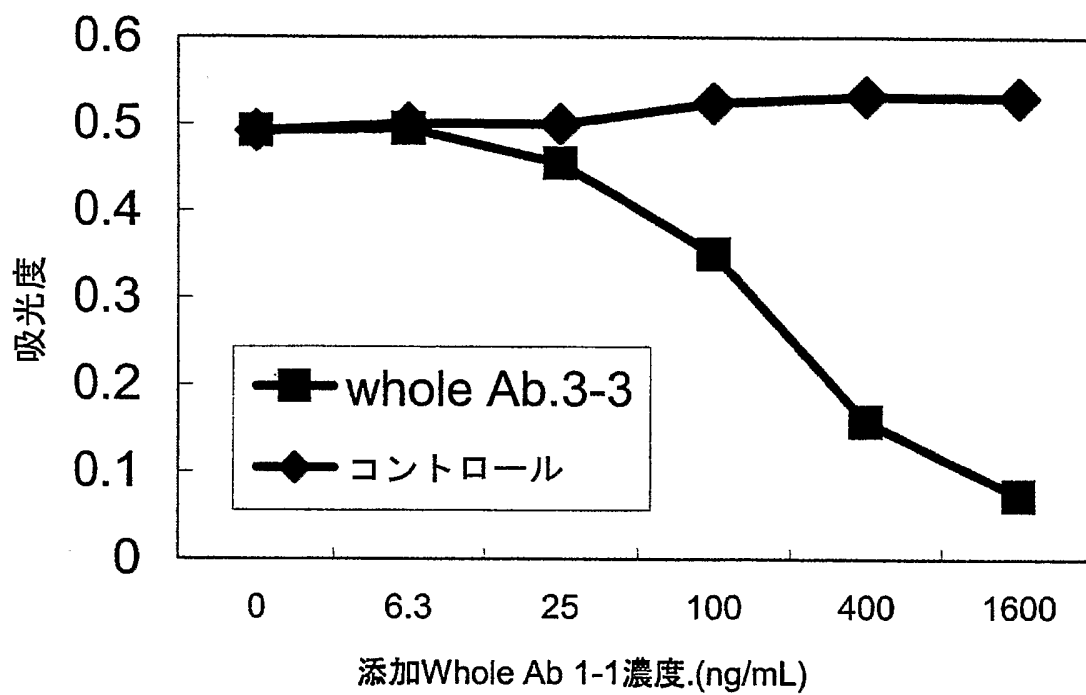
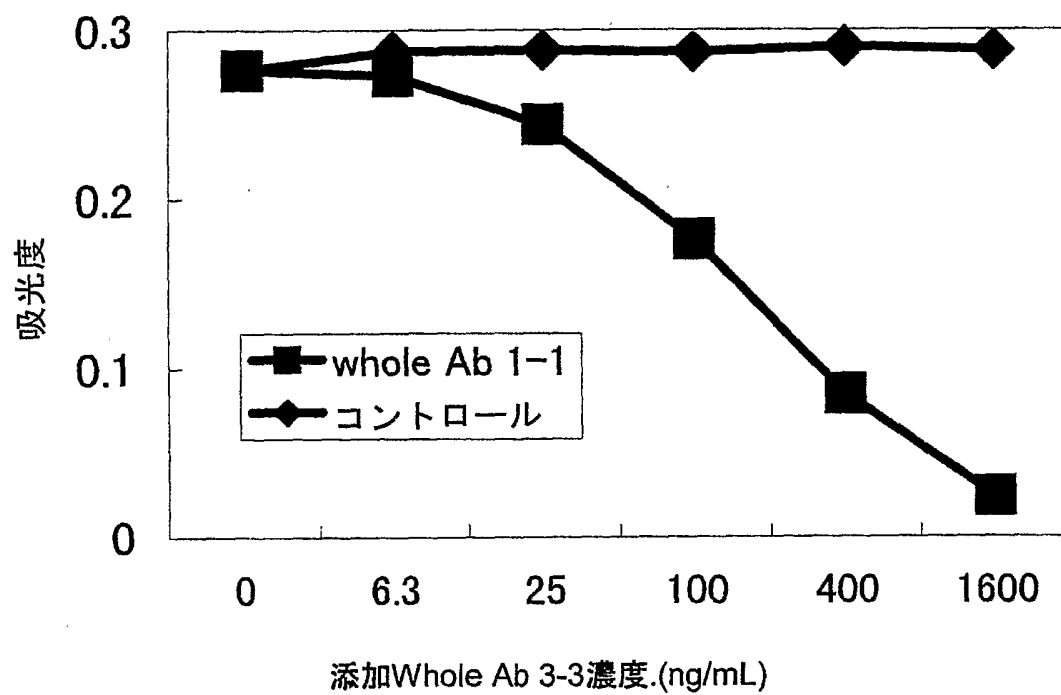


図 6



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Mitsubishi Pharma Corporation et al

&lt;120&gt; A therapeutic agent for hepatitis type C

&lt;130&gt; A21407A

&lt;160&gt; 75

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 240

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Met Ala Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Gln Asn

35 40 45

Ile Gly Asn Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

50 55 60

Lys Pro Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His

100 105 110

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

115 120 125

Thr Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
 130 135 140  
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
 165 170 175  
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
 180 185 190  
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
 195 200 205  
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
 210 215 220  
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235 240

<210> 2

<211> 241

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 50                                                              | 55  | 60  |     |
| Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Asp Ser Thr Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys |     |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 | 125 |
| Arg Thr Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile |     |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 | 140 |
| Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
| Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
| Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |
| His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Cys                                                             |     |     |     |

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 240

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

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

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
 195 200 205  
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
 210 215 220  
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235 240

<210> 4

<211> 240

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Thr Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
|                                                                 |     | 240 |

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 720

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| atg gcg ttg cag acc cag gtc ttc att tct ctg ttg ctc tgg atc tct | 48 |
| Met Ala Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser |    |
| 1 5 10 15                                                       |    |
| ggt gcc tac ggg gat gtt gtg atg act cag tct cca tcc tcc ctg tct | 96 |
| Gly Ala Tyr Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser |    |
| 20 25 30                                                        |    |

gca tct gta ggg gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca aat cag aac 144  
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Gln Asn  
 35 40 45  
 att ggt aat ttt tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192  
 Ile Gly Asn Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 50 55 60  
 aag ccc ctg atc tat gct gca tcc aat ttg caa agt ggg gtc cca tca 240  
 Lys Pro Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser  
 65 70 75 80  
 agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc agt ctc acc atc agc 288  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser  
 85 90 95  
 agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag agt cac 336  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His  
 100 105 110  
 aat atc ccg ctc act ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt 384  
 Asn Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125  
 acc gtg gaa atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc 432  
 Thr Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
 130 135 140  
 ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc 480  
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
 145 150 155 160  
 ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg 528  
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
 165 170 175

gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag 576  
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
 180 185 190  
 gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc 624  
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
 195 200 205  
 aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat 672  
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
 210 215 220  
 cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 720  
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235 240  
  
 <210> 6  
 <211> 723  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6  
 atg gcg ttg cag acc cag gtc ttc att tct ctg ttg ctc tgg atc tct 48  
 Met Ala Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser  
 1 5 10 15  
 ggt gcc tac ggg gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96  
 Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
 20 25 30  
 gca tct gta gga gac aga gtc acc atg act tgc cgg gca agt cag agt 144  
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
 35 40 45

```

att aac aac tat tta aat tgg tat caa caa aaa cca ggg aaa gcc cct 192
Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
      50              55              60
aag ctc ctg atc tct gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tcg 240
Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
      65              70              75              80
agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc acc 288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr
              85              90              95
agt ctg caa cct gag gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac 336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr
              100              105              110
gat tcc acc cta ttc act ttc ggc cct ggg acc aag gtg gaa atc aaa 384
Asp Ser Thr Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
              115              120              125
cgt acc gtg gaa atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc 432
Arg Thr Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
              130              135              140
ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg 480
Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
      145              150              155              160
tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag 528
Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
              165              170              175
gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag 576
Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
              180              185              190

```

cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg 624  
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu  
 195 200 205  
 agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc 672  
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr  
 210 215 220  
 cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag 720  
 His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu  
 225 230 235 240  
 tgt 723  
 Cys

<210> 7

<211> 720

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atg gcg ttg cag acc cag gtc ttc att tct ctg ttg ctc tgg atc tct 48  
 Met Ala Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser  
 1 5 10 15  
 ggt gcc tac ggg gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96  
 Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
 20 25 30  
 gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc 144  
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
 35 40 45  
 att agc agc tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192

Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 50 55 60  
 aag ctg ctg atc tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca 240  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser  
 65 70 75 80  
 agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc 288  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 85 90 95  
 agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac 336  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr  
 100 105 110  
 agt acc ccg ctc act ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt 384  
 Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125  
 acc gtg gaa atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc 432  
 Thr Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
 130 135 140  
 ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc 480  
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
 145 150 155 160  
 ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg 528  
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
 165 170 175  
 gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag 576  
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
 180 185 190  
 gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc 624

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
 195 200 205  
 aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat 672  
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
 210 215 220  
 cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 720  
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235 240

<210> 8  
 <211> 720  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8

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

Lys Leu Leu Val Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser  
 65 70 75 80  
 agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc 288  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 85 90 95  
 agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac 336  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr  
 100 105 110  
 act att ccg tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt 384  
 Thr Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125  
 acc gtg gaa atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc 432  
 Thr Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
 130 135 140  
 ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc 480  
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
 145 150 155 160  
 ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg 528  
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
 165 170 175  
 gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag 576  
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
 180 185 190  
 gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc 624  
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
 195 200 205  
 aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat 672

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His

210

215

220

cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 720

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225

230

235

240

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1428

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1

5

10

15

gtc ctg tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag 96

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20

25

30

cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc tac 144

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Tyr

35

40

45

atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192

Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

50

55

60

gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca cac tac gca 240

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro His Tyr Ala

65

70

75

80

cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag tcc acg agc 288

Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser  
                             85                            90                            95  
 aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac acg gcc gta 336  
 Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val  
                             100                            105                            110  
 tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt ggt tcc tgc 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg Gly Ser Cys  
                             115                            120                            125  
 tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tgc 432  
 Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
                             130                            135                            140  
 agt gct agt acc aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc 480  
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser  
                             145                            150                            155                            160  
 aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac 528  
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp  
                             165                            170                            175  
 tac ttc cct gaa ccg gtg acg gtg tgc tgg aac tca ggc gcc ctg acc 576  
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
                             180                            185                            190  
 agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac 624  
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
                             195                            200                            205  
 tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag 672  
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln  
                             210                            215                            220  
 acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac 720

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp |      |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |      |
| aag | aaa | gtt | gag | ccc | aaa | tct | tgt | gac | aaa | act | cac | aca | tgc | cca | ccg | 768  |
| Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro |      |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |      |
| tgc | cca | gca | cct | gaa | ctc | ctg | ggg | gga | cgg | tca | gtc | ttc | ctc | ttc | ccc | 816  |
| Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro |      |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |      |
| cca | aaa | ccc | aag | gac | acc | ctc | atg | atc | tcc | cgg | acc | cct | gag | gtc | aca | 864  |
| Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr |      |
|     |     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |      |
| tgc | gtg | gtg | gtg | gac | gtg | agc | cac | gaa | gac | cct | gag | gtc | aag | ttc | aac | 912  |
| Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn |      |
|     |     |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |      |
| tgg | tac | gtg | gac | ggc | gtg | gag | gtg | cat | aat | gcc | aag | aca | aag | ccg | cgg | 960  |
| Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg |      |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |      |
| gag | gag | cag | tac | aac | agc | acg | tac | cgg | gtg | gtc | agc | gtc | ctc | acc | gtc | 1008 |
| Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val |      |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |     |      |
| ctg | cac | cag | gac | tgg | ctg | aat | ggc | aag | gag | tac | aag | tgc | aag | gtc | tcc | 1056 |
| Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser |      |
|     |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |      |
| aac | aaa | gcc | ctc | cca | gcc | ccc | atc | gag | aaa | acc | atc | tcc | aaa | gcc | aaa | 1104 |
| Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys |      |
|     |     |     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |      |
| ggg | cag | ccc | cga | gaa | cca | cag | gtg | tac | acc | ctg | ccc | cca | tcc | cgg | gat | 1152 |

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 370 375 380  
 gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc 1200  
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 385 390 395 400  
 tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag 1248  
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 405 410 415  
 aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc 1296  
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 420 425 430  
 ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg 1344  
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 435 440 445  
 aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac 1392  
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 450 455 460  
 acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1428  
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Stop  
 465 470 475

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Gln Pro Ile Gly

1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp

1 5 10 15

Pro

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Arg Ala Asn Gln Asn Ile Gly Asn Phe Leu Asn

1 5 10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gln Gln Ser His Asn Ile Pro Leu Thr

1 5

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Gln Gln Ser Tyr Asp Ser Thr Leu Phe Thr

1 5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser

1 5

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 24

Gln Gln Ser Tyr Thr Ile Pro Tyr Thr

1 5

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 128

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 25

Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro

1 5 10 15

Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Tyr Ile

20 25 30

Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro His Tyr Ala Gln

50 55 60

Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr

65 70 75 80

Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg Gly Ser Cys Tyr

100 105 110

Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 26

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 27

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

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 28

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

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

<210> 29

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

100 105 110

<210> 30

<211> 333

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

gat gtt gtg atg act cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta ggg 48

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca aat cag aac att ggt aat ttt 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Gln Asn Ile Gly Asn Phe

20 25 30

tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ccc ctg atc 144

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile

35 40 45

tat gct gca tcc aat ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc agt ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag agt cac aat atc ccg ctc 288

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Asn Ile Pro Leu

85 90 95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt gcg gcc gca 333

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala

100 105 110  
 <210> 31  
 <211> 336  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 31  
 gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc ctg tct gca tct gta gga 48  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 gac aga gtc acc atg act tgc cgg gca agt cag agt att aac aac tat 96  
 Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Tyr  
 20 25 30  
 tta aat tgg tat caa caa aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 tct gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tcg agg ttc agt ggc 192  
 Ser Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc acc agt ctg caa cct 240  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 gag gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac gat tcc acc cta 288  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asp Ser Thr Leu  
 85 90 95  
 ttc act ttc ggc cct ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt gcg gcc gca 336  
 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala

100

105

110

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 333

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 32

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac agt acc ccg ctc 288

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu

85 90 95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt gcg gcc gca 333

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala

100

105

110

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 333

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 33

gac atc gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag cgc att agc aac tat 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Asn Tyr

20

25

30

tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg gtc 144

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val

35

40

45

tat gct gca tct aat ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac act att ccg tac 288

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Ile Pro Tyr

85

90

95

act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt gcg gcc gca 333

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala

| 100                                                             | 105 | 110 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| <210> 34                                                        |     |     |     |
| <211> 900                                                       |     |     |     |
| <212> DNA                                                       |     |     |     |
| <213> Homo sapiens                                              |     |     |     |
| <400> 34                                                        |     |     |     |
| gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg |     |     | 48  |
| Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala |     |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag |     |     | 96  |
| Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu |     |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |     |
| gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga |     |     | 144 |
| Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly |     |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |     |
| ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga |     |     | 192 |
| Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly |     |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |     |
| caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca |     |     | 240 |
| Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag |     |     | 288 |
| His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu |     |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |     |
| tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac |     |     | 336 |
| Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp |     |     |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 100                                                             | 105 | 110 |     |
| acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt |     |     | 384 |
| Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg |     |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |     |
| ggt tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc |     |     | 432 |
| Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt |     |     | 480 |
| Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| ggc gga agt gca ctt gat gtt gtg atg act cag tct cca tcc tcc ctg |     |     | 528 |
| Gly Gly Ser Ala Leu Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| tct gca tct gta ggg gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca aat cag |     |     | 576 |
| Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Gln |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| aac att ggt aat ttt tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc |     |     | 624 |
| Asn Ile Gly Asn Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| cct aag ccc ctg atc tat gct gca tcc aat ttg caa agt ggg gtc cca |     |     | 672 |
| Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| tca agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc agt ctc acc atc |     |     | 720 |
| Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| agc agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag agt |     |     | 768 |
| Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser |     |     |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
| cac aat atc ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa |     |     | 816 |
| His Asn Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
| cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg |     |     | 864 |
| Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser |     |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |
| agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag                 |     |     | 900 |
| Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala Stop                |     |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |     |

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 903

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 35

|                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg          | 48  |
| Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala          |     |
| 1                      5                      10                      15 |     |
| gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag          | 96  |
| Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu          |     |
| 20                      25                      30                       |     |
| gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga          | 144 |
| Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly          |     |
| 35                      40                      45                       |     |
| ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga          | 192 |
| Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly          |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 50                                                              | 55  | 60  |     |
| caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca |     |     | 240 |
| Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag |     |     | 288 |
| His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac |     |     | 336 |
| Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt |     |     | 384 |
| Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg |     |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 | 125 |
| ggt tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc |     |     | 432 |
| Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val |     |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 | 140 |
| acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt |     |     | 480 |
| Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| ggc gga agt gca ctt gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc ctg |     |     | 528 |
| Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atg act tgc cgg gca agt cag |     |     | 576 |
| Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Gln |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
| agt att aac aac tat tta aat tgg tat caa caa aaa cca ggg aaa gcc |     |     | 624 |
| Ser Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala |     |     |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| cct aag ctc ctg atc tct gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca | 672 |     |     |
| Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| tcg agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc | 720 |     |     |
| Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| acc agt ctg caa cct gag gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt | 768 |     |     |
| Thr Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
| tac gat tcc acc cta ttc act ttc ggc cct ggg acc aag gtg gaa atc | 816 |     |     |
| Tyr Asp Ser Thr Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
| aaa cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc | 864 |     |     |
| Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly |     |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |
| tcg agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag             | 903 |     |     |
| Ser Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala Stop            |     |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |     |

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 900

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 36

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg | 48 |
| Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala |    |

|                                                                 |     |     |    |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|----|-----|
| 1                                                               | 5   | 10  | 15 |     |
| gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag |     |     |    | 96  |
| Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu |     |     |    |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |    |     |
| gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga |     |     |    | 144 |
| Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly |     |     |    |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |    |     |
| ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga |     |     |    | 192 |
| Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly |     |     |    |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |    |     |
| caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca |     |     |    | 240 |
| Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro |     |     |    |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80 |     |
| cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag |     |     |    | 288 |
| His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu |     |     |    |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |    |     |
| tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac |     |     |    | 336 |
| Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp |     |     |    |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |    |     |
| acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt |     |     |    | 384 |
| Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg |     |     |    |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |    |     |
| ggc tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc |     |     |    | 432 |
| Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val |     |     |    |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |    |     |
| acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt |     |     |    | 480 |
| Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly |     |     |    |     |

|                                                                 |     |     |     |  |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|--|
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |  |
| ggc gga agt gca ctt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg | 528 |     |     |  |
| Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu |     |     |     |  |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |  |
| tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag | 576 |     |     |  |
| Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln |     |     |     |  |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |  |
| agc att agc agc tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc | 624 |     |     |  |
| Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala |     |     |     |  |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |  |
| cct aag ctc ctg atc tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca | 672 |     |     |  |
| Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro |     |     |     |  |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |  |
| tca agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc | 720 |     |     |  |
| Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile |     |     |     |  |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |  |
| agc agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt | 768 |     |     |  |
| Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser |     |     |     |  |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |  |
| tac agt acc ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa | 816 |     |     |  |
| Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys |     |     |     |  |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |  |
| cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg | 864 |     |     |  |
| Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser |     |     |     |  |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |  |
| agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag                 | 900 |     |     |  |
| Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala Stop                |     |     |     |  |

290 295 300

<210> 37

<211> 900

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg 48  
Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala

1 5 10 15

gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag 96  
Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu

20 25 30

gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga 144  
Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga 192  
Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

50 55 60

caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca 240  
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro

65 70 75 80

cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag 288  
His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu

85 90 95

tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac 336  
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 100                                                             | 105 | 110 |     |
| acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt |     |     | 384 |
| Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg |     |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |     |
| ggt tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc |     |     | 432 |
| Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt |     |     | 480 |
| Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| ggc gga agt gca ctt gac atc gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg |     |     | 528 |
| Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag |     |     | 576 |
| Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| cgc att agc aac tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc |     |     | 624 |
| Arg Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| cct aag ctc ctg gtc tat gct gca tct aat ttg caa agt ggg gtc cca |     |     | 672 |
| Pro Lys Leu Leu Val Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| tca agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc |     |     | 720 |
| Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| agc agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt |     |     | 768 |
| Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser |     |     |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
| tac act att ccg tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa |     |     | 816 |
| Tyr Thr Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
| cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg |     |     | 864 |
| Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser |     |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |
| agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag                 |     |     | 900 |
| Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala Stop                |     |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |     |

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 38

cccaagctta ccatggatgc aatgaagaga gggctctgct gtgtgctgct gctgtgtgga 60

gcagtcttcg ttteggctag ccatacccgc gtgacggggg gggtgcaagg 110

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 82

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

<400> 39

ccccctcgag tctagattaa cgcggttcca gcg gatccgg atacggcacc ggcgcaccgg 60  
agacgaccgc cgacctata cc 82

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 40

gcgccgccat gggagtggag ggctgc 26

<210> 41

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 41

ctcagtacac ggagctgttc cgga 24

<210> 42

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 42

ccctgatcag aattcgcagg atccctcgag actagtgatg atcgggccag atatacgcg 59

<210> 43

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 43

ccctgatcaa gatctgctag cgtcgactcc ccagcatgcc tgctgctatt g 51

<210> 44

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 44

ccccagatct ctattccttt gccctcggac gag 33

<210> 45

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 45

ccccaagctt atgaaaaagc ctgaactcac cgcg

34

<210> 46

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 46

cccgccggct ggggtgtggcg gaccgc

26

<210> 47

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 47

cccctctaga aagtatagga acttcaagc

29

<210> 48

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 48

cccaagcttc accatggcct ggattcctct acttctcccc c 41

<210> 49

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 49

cccactagtc tatgaacatt ctgtaggggc cactgtcttc 40

<210> 50

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 50

cccaagcttc accatgaagc acctgtggtt ctctctctg c 41

<210> 51

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 51

cccactagtt catttaccg gagacaggga gaggc

35

<210> 52

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 52

ccccaagctt ctcgagacta gtaccaaggg cccatcggtc ttccc

45

<210> 53

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 53

ccccgggccc tctagtagct ttcatttacc cggagacagg g

41

<210> 54

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 54

cccaagcttc accatgaaac acctgtggtt cttcctcctg ctggtggcag ctcccagatg 60

ggtcctgtcc caggtgcagc tgggtgcagtc tg 92

<210> 55

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 55

cccgctagca ctcgagacgg tgaccagggt gcc 33

<210> 56

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 56

ccccagagct agtcctgcag gcggggaaat gtgcgcggaa ccct 45

<210> 57

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 57

ccccgctagc ctgcaagtca ttctgaaccc cagcgtccc 39

<210> 58

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 58

ccccaagctt ctagagtga cggtaccgtg gaaatcaaac gaactgtgg 49

<210> 59

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 59

ccccgggccc tctagcggcc gcctaacact ctcccctgtt gaagc 45

<210> 60

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 60

cccaagcttc accatggcgt tgcagaccca ggtcttcatt tctctgttgc tctggatctc 60

tggtgcctac ggggatgttg tgatgactca gtctcc 96

<210> 61

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 61

ccccgtacgt ttgatttcca ccttggtccc ccgc 34

<210> 62

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 62

cccaagcttc accatggcgt tgcagaccca ggtcttcatt tctctgttgc tctggatctc 60

tggtgcctac ggggacatcc agatgaccca gtctcc 96

<210> 63

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 63

cccccgtagc ttgtatttcc accttggtcc cagggccgaa 40

<210> 64

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 64

cccaagcttc accatggcgt tgcagaccca ggtcttcatt tctctgttgc tctggatctc 60

tggtgcctac ggggacatcg tgatgaccca gtctcc 96

<210> 65

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 65

cccccgtagc ttgtatctcc agcttggtcc cctggccaaa 40

<210> 66

&lt;211&gt; 720

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 66

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| atg gcg ttg cag acc cag gtc ttc att tct ctg ttg ctc tgg atc tct | 48  |
| Met Ala Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| ggt gcc tac ggg gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct | 96  |
| Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cag gcg agt cag gac | 144 |
| Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| att agc aac tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct | 192 |
| Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| aag ctc ctg ctc tat gct aca tcc aga ttg tac agt ggg gtc cca tcc | 240 |
| Lys Leu Leu Leu Tyr Ala Thr Ser Arg Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc agc atc agc | 288 |
| Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt caa cag act aag | 336 |
| Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Lys |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| agt ttc ccc ctc act ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt | 384 |
| Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 115                                                             | 120 | 125 |     |
| acc gtg gaa atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc |     |     | 432 |
| Thr Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc |     |     | 480 |
| Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg |     |     | 528 |
| Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag |     |     | 576 |
| Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc |     |     | 624 |
| Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat |     |     | 672 |
| Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt |     |     | 720 |
| Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 900

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 67

```

gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg      48
Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala
      1              5              10              15
gcc cag ccg gcc atg gcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag      96
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
              20              25              30
gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga      144
Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
              35              40              45
ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga      192
Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
              50              55              60
caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca      240
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro
      65              70              75              80
cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag      288
His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu
              85              90              95
tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac      336
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp
              100              105              110
acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt      384
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg
              115              120              125
ggc tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc      432
Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

```

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt | 480 |     |     |
| Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| ggc gga agt gca ctt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg | 528 |     |     |
| Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cag gcg agt cag | 576 |     |     |
| Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| gac att agc aac tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc | 624 |     |     |
| Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| cct aag ctc ctg ctc tat gct aca tcc aga ttg tac agt ggg gtc cca | 672 |     |     |
| Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Ala Thr Ser Arg Leu Tyr Ser Gly Val Pro |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| tcc agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc agc atc | 720 |     |     |
| Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt caa cag act | 768 |     |     |
| Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
| aag agt ttc ccc ctc act ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa | 816 |     |     |
| Lys Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
| cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg | 864 |     |     |
| Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser |     |     |     |

275 280 285  
 agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag 900  
 Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala  
 290 295  
  
 <210> 68  
 <211> 900  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 68  
 gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg 48  
 Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala  
 1 5 10 15  
 gcc cag ccg gcc atg gcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag 96  
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu  
 20 25 30  
 gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga 144  
 Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
 35 40 45  
 ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga 192  
 Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 50 55 60  
 caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca 240  
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro  
 65 70 75 80  
 cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag 288  
 His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 85                                                              | 90  | 95  |     |
| tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac |     |     | 336 |
| Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp |     |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |     |
| acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt |     |     | 384 |
| Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg |     |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |     |
| ggt tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc |     |     | 432 |
| Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt |     |     | 480 |
| Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| ggc gga agt gca ctt gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc gtg |     |     | 528 |
| Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| tct gct tct gta ggg gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag |     |     | 576 |
| Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| gat att agc acc tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aga gcc |     |     | 624 |
| Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| cct aag ctc ctg atc tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca |     |     | 672 |
| Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| tca agg ttc agc ggc agt ggg tct ggg aca gaa ttc act ctc aca atc |     |     | 720 |
| Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile |     |     |     |

|                                                                 |     |     |     |  |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|--|
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |  |
| agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cta cag cat | 768 |     |     |  |
| Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His |     |     |     |  |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |  |
| gat agt tac ccc ttc tct ttc ggc cct ggg acc aag gtg gaa atc aaa | 816 |     |     |  |
| Asp Ser Tyr Pro Phe Ser Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys |     |     |     |  |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |  |
| cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg | 864 |     |     |  |
| Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser |     |     |     |  |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |  |
| agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag                 | 900 |     |     |  |
| Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala                     |     |     |     |  |
| 290                                                             | 295 |     |     |  |

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 900

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 69

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg | 48  |
| Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| gcc cag ccg gcc atg gcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag | 96  |
| Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga | 144 |
| Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 35                                                              | 40  | 45  |     |
| ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga | 192 |     |     |
| Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly |     |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |     |
| caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca | 240 |     |     |
| Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag | 288 |     |     |
| His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu |     |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |     |
| tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac | 336 |     |     |
| Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp |     |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |     |
| acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt | 384 |     |     |
| Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg |     |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |     |
| ggt tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc | 432 |     |     |
| Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt | 480 |     |     |
| Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| ggc gga agt gca ctt gac atc gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg | 528 |     |     |
| Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| tct gca tct gta gga gac aca gtc acc atc tct tgc cgg gca agt cag | 576 |     |     |
| Ser Ala Ser Val Gly Asp Thr Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln |     |     |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| agc att tcc aac ttt tta aac tgg tat cgg cag aaa cca gga aag gcc |     |     | 624 |
| Ser Ile Ser Asn Phe Leu Asn Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| cct gaa ctg atg att tat gct gcg tcc aga ctg caa cgt ggg gac cca |     |     | 672 |
| Pro Glu Leu Met Ile Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Arg Gly Asp Pro |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| tca agg ttt agt ggc agt gga tct ggg aca gaa ttc agt ctc acc atc |     |     | 720 |
| Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ser Leu Thr Ile |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| agc ggt ctg cag cct gag gat tct gca acc tat cac tgt caa cag agt |     |     | 768 |
| Ser Gly Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
| tac agt acc aat ccc acg ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gag atc aaa |     |     | 816 |
| Tyr Ser Thr Asn Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
| cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg |     |     | 864 |
| Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser |     |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |
| agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag                 |     |     | 900 |
| Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala                     |     |     |     |

290

295

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 915

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 70

```

gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg      48
Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala
      1              5              10              15
gcc cag ccg gcc atg gcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag      96
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
              20              25              30
gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga     144
Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
              35              40              45
ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga     192
Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
              50              55              60
caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca     240
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro
      65              70              75              80
cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag     288
His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu
              85              90              95
tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac     336
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp
              100             105             110
acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt     384
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg
              115             120             125
ggg tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc     432
Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

```

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt | 480 |     |     |
| Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| ggc gga agt gca ctt cag gct gtg ctc act cag ccg tcc tca gtg tct | 528 |     |     |
| Gly Gly Ser Ala Leu Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| ggg ccc cca ggg cag agg gtc acc atc tcc tgc act ggg agc agc tcc | 576 |     |     |
| Gly Pro Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| aac atc ggg gca ggt tat gat gta cac tgg tac cag cag ctt cca gga | 624 |     |     |
| Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| aca gcc ccc aaa ctc ctc atc tat ggt aac aac aat cgg ccc tca ggg | 672 |     |     |
| Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| gtc cct gac cga ttc tct ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg | 720 |     |     |
| Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| gcc atc act ggg ctc cag gct gag gat gag gct gat tat tac tgc cag | 768 |     |     |
| Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
| tcc tat gac agc agc ctg agt ggg ttt gag gtc ttc gga acc ggg acc | 816 |     |     |
| Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Phe Glu Val Phe Gly Thr Gly Thr |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
| aag gtg gag atc aaa cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa | 864 |     |     |
| Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu |     |     |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 275                                                             | 280 | 285 |     |
| gag gat ctg ggc tcg agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca |     |     | 912 |
| Glu Asp Leu Gly Ser Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala |     |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |     |
| tag                                                             |     |     | 915 |

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 900

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 71

|                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------|-----|
| gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg            | 48  |
| Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala            |     |
| 1                      5                      10                      15   |     |
| gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag            | 96  |
| Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu            |     |
| 20                      25                      30                         |     |
| gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga            | 144 |
| Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly            |     |
| 35                      40                      45                         |     |
| ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga            | 192 |
| Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly            |     |
| 50                      55                      60                         |     |
| caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca            | 240 |
| Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro            |     |
| 65                      70                      75                      80 |     |

cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag 288  
 His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu  
 85 90 95  
 tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac 336  
 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
 100 105 110  
 acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt 384  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg  
 115 120 125  
 ggt tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc 432  
 Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 130 135 140  
 acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt 480  
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 145 150 155 160  
 ggc gga agt gca ctt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg 528  
 Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu  
 165 170 175  
 tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cag gcg agt cag 576  
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln  
 180 185 190  
 gac att agc aac tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc 624  
 Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
 195 200 205  
 cct aag ctc ctg ctc tat gct aca tcc aga ttg tac agt ggg gtc cca 672  
 Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Ala Thr Ser Arg Leu Tyr Ser Gly Val Pro  
 210 215 220

tcc agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc agc atc 720  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile  
 225 230 235 240  
 agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt caa cag act 768  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr  
 245 250 255  
 aag agt ttc ccc ctc act ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa 816  
 Lys Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 260 265 270  
 cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg 864  
 Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser  
 275 280 285  
 agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag 900  
 Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala  
 290 295

<210> 72

<211> 900

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 72

gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg 48  
 Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala  
 1 5 10 15  
 gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag 96  
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu  
 20 25 30

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga | 144 |
| Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga | 192 |
| Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca | 240 |
| Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag | 288 |
| His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac | 336 |
| Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt | 384 |
| Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| ggt tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc | 432 |
| Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val |     |
| 130 135 140                                                     |     |
| acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt | 480 |
| Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |
| ggc gga agt gca ctt gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc gtg | 528 |
| Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val |     |
| 165 170 175                                                     |     |

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| tct gct tct gta ggg gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag | 576 |
| Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln |     |
| 180 185 190                                                     |     |
| gat att agc acc tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aga gcc | 624 |
| Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala |     |
| 195 200 205                                                     |     |
| cct aag ctc ctg atc tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca | 672 |
| Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro |     |
| 210 215 220                                                     |     |
| tca agg ttc agc ggc agt ggg tct ggg aca gaa ttc act ctc aca atc | 720 |
| Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile |     |
| 225 230 235 240                                                 |     |
| agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cta cag cat | 768 |
| Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His |     |
| 245 250 255                                                     |     |
| gat agt tac ccc ttc tct ttc ggc cct ggg acc aag gtg gaa atc aaa | 816 |
| Asp Ser Tyr Pro Phe Ser Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys |     |
| 260 265 270                                                     |     |
| cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg | 864 |
| Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser |     |
| 275 280 285                                                     |     |
| agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag                 | 900 |
| Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala                     |     |
| 290 295                                                         |     |

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 900

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 73

```

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

```

```

ggt tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc      432
Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
      130                      135                      140
acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt      480
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145                      150                      155                      160
ggc gga agt gca ctt gac atc gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg      528
Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
      165                      170                      175
tct gca tct gta gga gac aca gtc acc atc tct tgc cgg gca agt cag      576
Ser Ala Ser Val Gly Asp Thr Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
      180                      185                      190
agc att tcc aac ttt tta aac tgg tat cgg cag aaa cca gga aag gcc      624
Ser Ile Ser Asn Phe Leu Asn Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala
      195                      200                      205
cct gaa ctg atg att tat gct gcg tcc aga ctg caa cgt ggg gac cca      672
Pro Glu Leu Met Ile Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Arg Gly Asp Pro
      210                      215                      220
tca agg ttt agt ggc agt gga tct ggg aca gaa ttc agt ctc acc atc      720
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ser Leu Thr Ile
225                      230                      235                      240
agc ggt ctg cag cct gag gat tct gca acc tat cac tgt caa cag agt      768
Ser Gly Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser
      245                      250                      255
tac agt acc aat ccc acg ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gag atc aaa      816
Tyr Ser Thr Asn Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      260                      265                      270

```

cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg 864  
 Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser

275

280

285

agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag 900  
 Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala

290

295

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 915

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 74

gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg 48

Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala

1

5

10

15

gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag 96

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

20

25

30

gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga 144

Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35

40

45

ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga 192

Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

50

55

60

caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca 240

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro

65

70

75

80

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag | 288 |
| His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac | 336 |
| Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt | 384 |
| Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| ggt tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc | 432 |
| Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val |     |
| 130 135 140                                                     |     |
| acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt | 480 |
| Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |
| ggc gga agt gca ctt cag gct gtg ctc act cag ccg tcc tca gtg tct | 528 |
| Gly Gly Ser Ala Leu Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser |     |
| 165 170 175                                                     |     |
| ggg ccc cca ggg cag agg gtc acc atc tcc tgc act ggg agc agc tcc | 576 |
| Gly Pro Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser |     |
| 180 185 190                                                     |     |
| aac atc ggg gca ggt tat gat gta cac tgg tac cag cag ctt cca gga | 624 |
| Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly |     |
| 195 200 205                                                     |     |
| aca gcc ccc aaa ctc ctc atc tat ggt aac aac aat cgg ccc tca ggg | 672 |
| Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly |     |
| 210 215 220                                                     |     |

gtc cct gac cga ttc tct ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg 720  
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu  
 225 230 235 240  
 gcc atc act ggg ctc cag gct gag gat gag gct gat tat tac tgc cag 768  
 Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln  
 245 250 255  
 tcc tat gac agc agc ctg agt ggg ttt gag gtc ttc gga acc ggg acc 816  
 Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Phe Glu Val Phe Gly Thr Gly Thr  
 260 265 270  
 aag gtg gag atc aaa cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa 864  
 Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu  
 275 280 285  
 gag gat ctg ggc tcg agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca 912  
 Glu Asp Leu Gly Ser Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala  
 290 295 300  
 tag 915

<210> 75

<211> 720

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 75

atg gcg ttg cag acc cag gtc ttc att tct ctg ttg ctc tgg atc tct 48  
 Met Ala Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser  
 1 5 10 15  
 ggt gcc tac ggg gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96  
 Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 20                                                              | 25  | 30  |     |
| gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cag gcg agt cag gac |     |     | 144 |
| Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp |     |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |     |
| att agc aac tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct |     |     | 192 |
| Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro |     |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |     |
| aag ctc ctg ctc tat gct aca tcc aga ttg tac agt ggg gtc cca tcc |     |     | 240 |
| Lys Leu Leu Leu Tyr Ala Thr Ser Arg Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc agc atc agc |     |     | 288 |
| Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser |     |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |     |
| agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt caa cag act aag |     |     | 336 |
| Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Lys |     |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |     |
| agt ttc ccc ctc act ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt |     |     | 384 |
| Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg |     |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |     |
| acc gtg gaa atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc |     |     | 432 |
| Thr Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc |     |     | 480 |
| Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg |     |     | 528 |
| Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val |     |     |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag |     |     | 576 |
| Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc |     |     | 624 |
| Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat |     |     | 672 |
| Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt |     |     | 720 |
| Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08175

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/15, G01N33/50, A61K39/395, A61K45/00, A61P31/12, A61P1/16, C07K16/10, C12N15/51

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/15, G01N33/50, A61K39/395, A61K45/00, A61P31/12, A61P1/16, C07K16/10, C12N15/51

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2002 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2002 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2002 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, JICST FILE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | PILERI P. et al., "Binding of hepatitis C virus to CD81", Science, 1998, Vol.282, pages 938 to 941                                                                                                                                                  | 1-6, 8-21             |
| Y         | WO 99/18198 A1 (Chiron S.p.A.),<br>15 April, 1999 (15.04.99),<br>& EP 1021534 A1 & AU 9893633 A                                                                                                                                                     | 1-6, 8-21             |
| Y         | Shu KIKUCHI, "Ketsueki Baikai Kansensho HCV", Rinsho to Kenkyu, 1999, Vol.76, No.7, pages 1260 to 1266                                                                                                                                              | 1-6, 8-21             |
| Y         | Tobias Allander et al., "Recombinant human monoclonal antibodies against different conformational epitopes of the E2 envelope glycoprotein of hepatitis C virus that inhibit its interaction with CD81", 2000.10, Vol.81, No.10, pages 2451 to 2459 | 1-6, 8-21             |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
06 November, 2002 (06.11.02)

Date of mailing of the international search report  
26 November, 2002 (26.11.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP02/08175

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 7  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
The "substance inhibiting the binding of - - - to the antibody" as set forth in claim 7 is specified exclusively by a screening method whereby the substance is selected. Thus, a person skilled in the art cannot understand what substances are involved in the claim. (Continued to extra sheet.)
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08175

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

In the embodiment of the invention, a large amount of trial and errors are needed to screen and confirm an extremely large number of compounds beyond the reasonable extent that can be expected from a person skilled in the art. Thus, this claim is unclear.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> G01N33/15, G01N33/50, A61K39/395, A61K45/00, A61P31/12, A61P1/16, C07K16/10, C12N15/51

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> G01N33/15, G01N33/50, A61K39/395, A61K45/00, A61P31/12, A61P1/16, C07K16/10, C12N15/51

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |            |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2002年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2002年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2002年 |

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

BIOSIS, JICSTファイル

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Y               | PILERI P., et al. "Binding of hepatitis C virus to CD81",<br>Science, 1998, Vol. 282, p. 938-941 | 1-6, 8-21        |
| Y               | WO 99/18198 A1 (CHIRON S. P. A) 1999. 04. 15 & EP 1021534 A1<br>& AU 9893633 A                   | 1-6, 8-21        |
| Y               | 菊池秀, "血液媒介感染症 HCV", 臨床と研究, 1999, Vol. 76, No. 7,<br>p. 1260-1266                                 | 1-6, 8-21        |

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

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 11. 02

国際調査報告の発送日

26.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松本 征二



2 J

9 2 1 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                                  |                  |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                                | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| Y                     | Tobias Allander, et. al. "Recombinant human monoclonal antibodies against different conformational epitopes of the E2 envelope glycoprotein of hepatitis C virus that inhibit its interaction with CD81", 2000. 10., Vol. 81, No. 10, p2451-2459 | 1-6, 8-21        |

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 7 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
請求の範囲7に記載の「・・・抗体との結合を阻害する物質」は、前記物質が選択されるスクリーニング方法のみで特定されているので、請求項に包含される物質を当業者が理解できない。また、発明の実施にあたり、無数の化合物をスクリーニングして確認するという、期待しうる程度を越える試行錯誤が必要であるので、不明確である。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。