

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-512574

(P2005-512574A)

(43) 公表日 平成17年5月12日(2005.5.12)

(51) Int.C1.⁷

F 1

テーマコード(参考)

C12N 15/09

C12N 15/00 ZNAA

2GO45

C07K 14/705

C07K 14/705

4B024

C07K 14/735

C07K 14/735

4B063

C07K 19/00

C07K 19/00

4B065

C12N 5/10

C12Q 1/02

4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-554914 (P2003-554914)	(71) 出願人	596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・9408 0-4990・サウス・サン・フランシス コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(86) (22) 出願日	平成14年12月3日 (2002.12.3)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月23日 (2004.8.23)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/038805	(72) 発明者	プレスター, レナード ジー. アメリカ合衆国 カリフォルニア 941 09, サン フランシスコ, ゴフ ストリ ート 1900, 206号
(87) 國際公開番号	W02003/054213		
(87) 國際公開日	平成15年7月3日 (2003.7.3)		
(31) 優先権主張番号	10/027,736		
(32) 優先日	平成13年12月19日 (2001.12.19)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】非ヒト靈長類Fcレセプターおよびその利用方法

(57) 【要約】

本発明は、単離された非ヒト靈長類のFcレセプターポリペプチド、Fcレセプターポリペプチドをコードする核酸分子、およびFcレセプターポリペプチドの融合体、変異体ならびに誘導体を含む組換え型の生成法を提供する。本発明は、非ヒト靈長類のFcレセプターポリペプチドを用い、Fc領域含有分子の安全性、有効性および生物特性を評価する方法も提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号：9，配列番号：11，配列番号：15，配列番号：17，配列番号：18，配列番号：20，配列番号：25，配列番号：29，配列番号：64，配列番号：65，配列番号：66，配列番号：67，配列番号：68，配列番号：69，配列番号：70，配列番号：71，配列番号：72のアミノ酸配列を有する非ヒト靈長類のFcレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸、または該断片。

【請求項 2】

前記ポリヌクレオチド配列が配列番号：1，配列番号：3，配列番号：5，配列番号：7，配列番号：13，配列番号：22，配列番号：23または配列番号：27のヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の単離された核酸配列。 10

【請求項 3】

a) プライマーセットを配列番号：31と配列番号：32，配列番号：33と配列番号：34，配列番号：35と配列番号：36，配列番号：37と配列番号：38，配列番号：39と配列番号：40，配列番号：41と配列番号：42，配列番号：43と配列番号：44，配列番号：45と配列番号：46，配列番号：47と配列番号：48，配列番号：49と配列番号：50，配列番号：51と配列番号：52および配列番号：53と配列番号：54からなる群から選択し、フォワードとリバースプライマーを含んでなる該プライマーセットにより非ヒト靈長類細胞由来の核酸を増幅し、 20

b) 該増幅した核酸を単離する

ことを含んでなる、Fcレセプターポリペプチドをコードする核酸配列を得る方法。 25

【請求項 4】

請求項3に記載の方法によって調製した単離した核酸。

【請求項 5】

非ヒト靈長類細胞が脾臓細胞である、請求項3に記載の方法。

【請求項 6】

非ヒト靈長類細胞がカニクイザル細胞またはチンパンジー細胞である、請求項3に記載の方法。 30

【請求項 7】

ポリヌクレオチドがFcレセプターポリペプチドの細胞外断片をコードする、請求項1，2または4に記載の単離した核酸。 35

【請求項 8】

請求項1，2または4に記載の核酸を含んでなるベクター。

【請求項 9】

請求項8に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 10】

細胞が哺乳類細胞である、請求項9に記載の宿主細胞。

【請求項 11】

Fcレセプターポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に作用可能に連結した異種ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を更に含んでなる、請求項1，2，または4に記載の核酸。 40

【請求項 12】

前記異種ポリペプチドがFcレセプターポリペプチドの精製を供する請求項11に記載の核酸。

【請求項 13】

前記異種ポリペプチドがグルタチオンSトランスフェラーゼ、6-Hisタグ、チオレドキシンタグ、ヘマグルチニンタグ、Gly1h156タグおよびOmpAシグナル配列タグに融合したGly/His₆からなる群から選択される、請求項12に記載の核酸。

【請求項 14】

50

配列番号：9，配列番号：15，配列番号：17，配列番号：18，配列番号：20，配列番号：29，配列番号：25，配列番号：11，配列番号：64，配列番号：65，配列番号：66，配列番号：67，配列番号：68，配列番号：69，配列番号：71，配列番号：72もしくは配列番号：70のアミノ酸配列を含んでなる単離したポリペプチド、または該断片。

【請求項 15】

配列番号：65のアミノ酸1～269番、配列番号：66の1～182番、配列番号：68の1～184番、配列番号：69の1～187番、配列番号：71の1～274番、または配列番号：72の1～274番のアミノ酸配列を有するFcレセプターポリペプチド断片と結合した異種ポリペプチドを含んでなる単離した融合タンパク質。 10

【請求項 16】

異種ポリペプチドがgly/his6-gstタグである、請求項15に記載の単離した融合ポリペプチド。

【請求項 17】

請求項14に記載のFcレセプターポリペプチドと結合した異種ポリペプチドを含んでなる、単離した融合ポリペプチド。

【請求項 18】

配列番号：9のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性があるアミノ酸配列を有する単離したポリペプチド変異体。

【請求項 19】

配列番号：15のアミノ酸と少なくとも90%の配列同一性があるアミノ酸配列を有する単離したポリペプチド変異体。

【請求項 20】

配列番号：17のアミノ酸と少なくとも98%の配列同一性があるアミノ酸配列を有する単離したポリペプチド変異体。

【請求項 21】

配列番号：18のアミノ酸と少なくとも92%の配列同一性があるアミノ酸配列を有する単離したポリペプチド変異体。

【請求項 22】

配列番号：20のアミノ酸配列と少なくとも92%の配列同一性があるアミノ酸配列を有する単離したポリペプチド変異体。 30

【請求項 23】

配列番号：25のアミノ酸配列と少なくとも93%の配列同一性があるアミノ酸配列を有する単離したポリペプチド変異体。

【請求項 24】

配列番号：29のアミノ酸配列と少なくとも97%の配列同一性があるアミノ酸配列を有する単離したポリペプチド変異体。

【請求項 25】

a) 単離した非ヒト靈長類FcレセプターポリペプチドをFc領域含有分子に接触させ、

b) Fc領域含有分子の少なくとも一つの生物特性に対する前記接触の効果を判定することを含んでなる、Fc領域含有分子の少なくとも一つの生物特性を評価する方法。 40

【請求項 26】

Fc領域含有分子が抗体である、請求項25または35に記載の方法。

【請求項 27】

抗体がヒト化抗体である、請求項26または35に記載の方法。

【請求項 28】

非ヒト靈長類Fcレセプターポリペプチドが可溶性レセプターである、請求項25または35に記載の方法。

【請求項 29】

非ヒト靈長類 F c レセプターポリペプチドが F c R I 鎖、 F c R I I A 、 F c R I I B 、 F c R I I I A 鎖、 F c R n 鎖およびその混合物からなる群から選択される、請求項 28 または 35 に記載の方法。

【請求項 30】

非ヒト靈長類レセプターポリペプチドが細胞で発現される、請求項 25 または 35 に記載の方法。

【請求項 31】

生物特性が非ヒト靈長類 F c レセプターポリペプチドに対する F c 領域含有分子の結合親和性である、請求項 25 または 35 に記載の方法。

【請求項 32】

生物特性が F c 領域含有分子の傷害性である、請求項 25 または 35 に記載の方法。

【請求項 33】

単離した非ヒト靈長類 F c レセプターポリペプチドが F c R n 鎖であり、生物特性が F c 領域含有分子の半減期である、請求項 25 または 35 に記載の方法。

【請求項 34】

非ヒト靈長類レセプターが配列番号：65 のアミノ酸 1 ~ 265 番、配列番号：66 の 1 ~ 172 番、配列番号：68 の 1 ~ 174 番、配列番号：69 の 1 ~ 172 番、または配列番号：67 の 1 ~ 171 番のアミノ酸配列を含む、請求項 25 または 35 に記載の方法。

【請求項 35】

a) F c 領域含有分子を請求項 1, 2 または 4 に記載の単離した核酸により形質転換した細胞に接触させ、

b) F c 領域含有分子の少なくとも一つの生物特性に対する前記接触の効果を判定することを含んでなる、F c 領域含有分子の少なくとも一つの生物特性を評価する方法。

【請求項 36】

a) I T A M 領域を有するポリペプチドをともなう少なくとも一つのカニクイザル F c レセプターポリペプチドに対する薬剤の結合親和性を判定し、

b) 対応するヒト F c レセプターポリペプチドに対する薬剤の結合親和性を判定し、

c) I T A M 領域を有するポリペプチドに関連し、対応するヒト F c レセプターに比し、カニクイザル F c レセプターポリペプチドに対し親和性が向上した薬剤を選択すること

を含んでなる、ヒト F c レセプターポリペプチドに比し、I T A M 領域を有する少なくとも一つのカニクイザル F c レセプターポリペプチドに対し親和性が向上した薬剤を同定する方法。

【請求項 37】

薬剤が抗体である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

薬剤が I g G 抗体である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

F c レセプターポリペプチドが F c R I 鎖、 F c R I I A 、 F c R I I I A 鎖およびその混合物からなる群から選択される、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

a) 少なくとも一つのカニクイザル F c R I I B レセプターポリペプチドに対する薬剤の結合親和性を判定し、

b) 対応するヒト F c R I I B レセプターポリペプチドに対する薬剤の結合親和性を判定し、

c) 対応するヒト F c レセプターに比し、I T I M 領域を有するカニクイザル F c R I I B レセプターポリペプチドに対し親和性が変化した薬剤を選択することを含んでなる、対応するヒト F c レセプターポリペプチドに比し、I T I M 領域を有するカニクイザル F c レセプターポリペプチドに対し親和性が変化した薬剤を同定する方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 1】

薬剤が抗体である、請求項 4 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0 0 0 1】

本願は、2002年12月3日付で米国国内法人であるGenentech, Inc.の名において(米国を除く全ての国に対する出願人)、および両人とも米国市民ならびに居住米国人であるLeonard G.PrestaならびにAngela K.Namenukの名において(米国指定のみの出願人)、全ての国を指定し、PCT国際特許出願として出願するものである。

【0 0 0 2】

10 発明の分野

本発明は、一般的に、単離・精製された非ヒト靈長類 Fc レセプターポリペプチドと、FcR ポリペプチドをコードする核酸分子と、非ヒト靈長類 Fc レセプターポリペプチドの製造方法および治療薬の安全性・有効性と生物学的特性の評価方法に関する。

【0 0 0 3】

発明の背景

Fc レセプター (FcRs) は、多くの免疫エフェクター細胞に発現される膜レセプターである。FcRs は標的免疫グロブリンとの相互作用により、細胞媒介の殺傷活性化、細胞からの媒介物質放出の誘導、抗体被覆粒子の取込み・破壊、免疫グロブリンの輸送等、多くの細胞応答を媒介する。Deoら Immunology Today 第18巻 127 ~ 135頁 (1997年) を参照。更に、例えばマクロファージや樹状細胞のような抗原提示細胞は、FcRの媒介により抗原抗体複合体の内部移行が生じ、抗原提示およびその結果としての免疫応答の増幅を可能にすることが示されている。このように、FcRs は抗体の特異性およびエフェクター細胞の機能の発達において中心的な役割を果している。Deoら Immunology Today 第18巻 127 ~ 135頁 (1997年) を参照。

【0 0 0 4】

FcR は免疫グロブリンアイソタイプに対する特異性により規定される。IgG 抗体に対する Fc レセプターは FcR、IgE 抗体に対する Fc レセプターは FcR、IgA 抗体に対する Fc レセプターは FcR というように呼ばれている。FcRn は新生児の細胞に認められる特殊なクラスの Fc レセプターであり、特に、母親の乳汁由来の IgG を乳児の腸上皮細胞に渡り輸送することに関与する。ヒトガンマレセプターのサブクラスが三つ同定されており、それぞれ FcRI (CD64), FcRII (CD32), FcRIII (CD16) である。ヒト FcR の各サブクラスは二つまたは三つの遺伝子にコードされ、また、選択的 RNA スプライシングにより複数の転写物が生じるため、Fc のイソフォームには多様性がある。ヒト FcRI のサブクラス (FcRIA, FcRIIB および FcRIC) をコードする三つの遺伝子は、第 1 染色体長腕の 1q21.1 領域に密集し、FcRII のイソフォーム (FcRIIA, FcRIIB および FcRIC) をコードする遺伝子、および FcRIII (FcRIIIA および FcRIIIB) をコードする二つの遺伝子は、全て 1q22 領域に密集している。FcRs は、Ravetch および Kinet Annu. Rev. Immunol. 第9巻 457 ~ 92 頁 (1991年) 、Capelら Immunomethods 第4巻 25 ~ 34 頁 (1994年) 、および de Haas ら J. Lab. Clin. Med. 第126巻 330 ~ 41 頁 (1995年) において検討されている。

【0 0 0 5】

ヒト FcRI は、鎖および鎖からなるヘテロオリゴマー複合体である。鎖は、細胞外 C-2 Ig 様の 3 ドメイン、21 アミノ酸膜ドメイン、および 61 アミノ酸の荷電細胞質側末端部を有する 70 ~ 72 kDa の糖蛋白である。van de Winkel ら Immunology Today 第14巻 215 ~ 221 頁 (1993年) を参照。鎖はホモダイマーであり、細胞表面アセンブリ、および細胞内への細胞シグナル伝達に関与する。ホモダイマーの各鎖は細胞活性に関与するモチーフを有し、これは ITAM モチーフと呼ばれる。ヒト FcRI は、第 3 の細胞外 C-2 ドメインを介し、モノマーの IgG に高親和性 (10^{-7} ~ 10^{-9} M) にて結合する。

10

20

30

40

50

【0006】

Fc RIIは40kDaの糖蛋白であり、C-2セットIg様の2細胞外ドメイン、27~29アミノ酸膜貫通ドメイン、および44~76の可変長アミノ酸を有する細胞質ドメインを有する。ヒトFc RIIには既知の6イソフォームがあり、その大部分は異種細胞質ドメインの点で異なる。ヒトFc RIIAは分子の細胞質領域にITAMモチーフを有し、レセプターの架橋により、該モチーフは細胞活性に関連する。対照的に、Fc RIIBは細胞質領域に抑制モチーフを有し、これはITIMと呼ばれる。Fc RIIBが架橋されると、細胞活性は抑制される。概して、Fc RIIはモノマーIgGとの結合力は弱いが($> 10^7 \text{ M}^{-1}$)、複合IgGに対しては高親和性を有する。

【0007】

ヒトFc RIIIは主たる2イソフォームであるFc RIIIAおよびFc RIIBを有し、両イソフォームとも50~80kDaであり、C2 Ig様の2細胞外ドメインを有する。Fc RIIIAの鎖は25アミノ酸膜貫通ドメインにより膜に固着され、ヒトFc RIIBはグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーを介し、膜に結合している。Fc RIIIAは、ヘテロダイマーの- (ガンマ デルタ)鎖または-鎖により複合した鎖を有するヘテロオリゴマー複合体である。鎖はITAMモチーフを有する細胞質側末端部を含む。鎖は鎖と相同であり、細胞シグナル伝達および細胞表面アセンブリにも関与する。- (ガンマ デルタ)鎖も細胞質領域にITAMモチーフを有する。どちらの場合でも、Fc RIIIはモノマーのIgGには低親和性にて結合し、複合IgGに対しては高親和性にて結合する。

【0008】

ヒトFcRnは、2ミクログロブリン鎖および鎖からなるヘテロダイマーである。2ミクログロブリン鎖は約15kDaであり、MHCクラスIヘテロダイマーに存在する2ミクログロブリン鎖に類似している。FcRnに2ミクログロブリン鎖が存在することにより、FcRnはMHCクラスIファミリータンパク質に含まれる唯一既知のFcレセプターである。Ghetieら Immunology Today第18巻第12号592~598頁(1997年)を参照。鎖は37~40kDaの内在性膜糖蛋白であり、一つの糖鎖形成部位を有する。FcRnは母親のIgGを新生児の腸に輸送し、血清IgG濃度を調節することに関与していると、科学的根拠により示唆されている。FcRnは成人の多くの組織にも認められる。

【0009】

上記のように、ヒトFc RsはFc RIIBを除き、細胞質~26アミノ酸免疫レセプターチロシンベースの活性モチーフ(ITAM)を有する。該モチーフは、細胞シグナル伝達およびエフェクター細胞機能に関与していると考えられている。Fc Rsの架橋により、srcファミリーのチロシンキナーゼ(PTKs)によりITAMモチーフ内のチロシン残基がリン酸化され、次にリン酸化されたITAMモチーフはsykファミリーのPTKsに会合し、活性化される。Deoら Immunology Today第18巻127~135頁(1997年)を参照。活性化が生じると、まだよく理解されていないシグナル伝達カスケードが生物反応に転換される。

【0010】

ヒトFc RIIBメンバーは、特徴的な13アミノ酸免疫レセプターチロシンベースの抑制モチーフ(ITIM)を細胞質ドメインに有する。ヒトFc RIIBはBリンパ球に発現され、IgG複合体に結合する。しかし、IIBレセプターの架橋により、細胞が活性化されるというよりは、シグナル伝達抑制的にB細胞が活性化され、抗体が分泌される。(Camigorela Science第256巻1808頁Cytoplasmic Domain Heterogeneity and Function of IgG Receptors in B Lymphocytes(1992年)を参照。)

【0011】

Fc Rはトリガー分子として多くの免疫応答において中心的な役割を果すため、潜在的治療薬開発の標的になっている。例えば、現在進行中の幾つかの臨床試験は、腫瘍特異性モノクローナル抗体(Mabs)により患者を治療することによって、癌患者のエフェクター細胞を活性化させることに基づいている。腫瘍特異性抗体が一つにはFc Rとの結合を介して効果を媒介し、引き続きエフェクター細胞の活性化を媒介することが同研究により示されている。Adamsら Proc.Natl.Acad.Sci.第81巻3506~3510頁(1984年)、Takahashiら Gastroe

10

20

30

40

50

nterology第108巻172～182頁(1995年)、RiethmeullerらLancet第343巻1177～1183頁(1994年)、Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G.およびRavetch, J.V. Nature Med. 第6巻443～446頁(2000年)を参照。更に、片方の腕が腫瘍細胞に特異性を有し、他方の腕が標的のFc Rに特異性を有するように操作された分子である、新規の二重特異性分子抗体(BS Ms)系が臨床試験中であり、Fc Rの媒介によりエフェクター細胞が腫瘍細胞を破壊すべく、腫瘍を特異的に標的にしようとしている。ValoneらJ.Clin.Oncol.第13巻2281～2292頁(1995年)、ReppらHematother第4巻415～421頁(1995年)を参照。加えて、Fc Rsは幾つかの感染症において治療標的として利用可能であり、また幾つかの自己免疫疾患でも同様である。感染症に関しては、患者のFc R発現エフェクター細胞に対し、いくつもの微生物を標的にするBSMsが開発中であり(DeoらImmunology Today第18巻127～135頁(1997年)を参照)、また、アルサス反応を抑制すべく、可溶性のFc Rsが用いられており、幾つかの自己免疫疾患の重症度を低下すべく、Fc R阻害剤が用いられている。IerinoらJ.Exp.Med.第178巻1617～1628頁(1993年)、DebreらLancet第342巻945～949頁(1993年)を参照。

10

【0012】

治療薬として抗体が使用される頻度が高くなり、この種の治療薬の毒性、有効性および薬物動態を評価するための動物モデルを開発する必要がある。抗体療法の有効性を評価するためのげっ歯類モデルに加え、治療用抗体の薬物動態、毒性および有効性を評価すべく、靈長類モデルが用いられている(Anderson, D.R., Grillo-Lopez, A., Varns, C., Chambers, K.S.およびHanna, N. Biochem. Soc. Trans. 第25巻705～708頁(1997年)を参照)。しかし、ヒト抗体と靈長類Fc レセプターとの相互作用や、該相互作用が靈長類における薬物動態、毒性および有効性の研究の解釈に及ぼす影響に関する情報は少ない。

20

【0013】

Fc R活性の解明およびFc Rリガンドの同定・操作には多くの進展があったが、当技術分野において、活性作用および抑制作用の双方にて、他のFc Rsを同定し、他のFc Rリガンドを同定・操作する必要が残されている。このような新規のレセプターおよびレセプターリガンドには、腫瘍細胞や感染物質の破壊等、幾つかの疾患において潜在的治療価値があり、また、幾つかの自己免疫疾患に関する免疫応答部分を阻害する点においても潜在的治療価値がある。抗体や他のFc Rリガンドが治療薬として用いられているため、特にインビボで該治療薬の有効性、毒性および薬物動態を試験するためのモデルを開発する必要もある。

30

【0014】

発明の概要

本発明は、特に、カニクイザルやチンパンジーのような非ヒト靈長類由来のFcレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの単離・配列決定に基づく。本発明のカニクイザルまたはチンパンジーのFcRポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、特に、靈長類においてインビボで評価する前に、カニクイザルまたはチンパンジーのFcRポリペプチドに対する抗体(如何なるサブクラスであれ、特に治療に役立つ見込みのある抗体)の結合能を評価するのに有用である。

【0015】

本発明は、非ヒト靈長類のFcレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子を提供する。本発明のポリヌクレオチドは、非ヒト靈長類のFcレセプターポリペプチドを、配列番号：9，配列番号：11，配列番号：15，配列番号：17，配列番号：18，配列番号：20，配列番号：25，配列番号：29，配列番号：64のアミノ酸配列、または該配列の断片にてコードする。本発明のFcレセプターポリヌクレオチド分子は、配列番号：1，3，5，7，13，22および27に示されるような核酸配列を有するポリヌクレオチド分子、および配列番号：1，3，5，7，13，22および27の核酸配列とほぼ同一の核酸を有するポリヌクレオチドを含む。また、本発明の2ミクログロプリン・ポリヌクレオチド分子は、配列番号：23に示されるような核酸配列を有する分子、および配列番号：23の核酸配列とほぼ同一の核酸を有するポリヌクレオチドを含む。

40

50

【0016】

本発明は、非ヒト靈長類のFc レセプターおよび非ヒト靈長類の 2ミクログロプリンも提供する。本発明のFc ポリペプチドは、配列番号：:9, 11, 15, 17, 18, 20, 29ならびに64に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、およびアミノ酸配列：9, 11, 15, 17, 18, 20, 29ならびに64とほぼ同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドと該配列の有用な断片を含む。本発明の 2ミクログロプリン・ポリペプチドは、配列番号:25に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、および配列番号：25のアミノ酸配列とほぼ同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドと該配列の有用な断片を含む。

【0017】

本発明は、別の態様において、成熟した非ヒト靈長類のFcレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子を提供する。本発明のポリヌクレオチドは、成熟した非ヒト靈長類のFc レセプターポリペプチドを、配列番号：65, 配列番号：66, 配列番号：67, 配列番号：68, 配列番号：69, 配列番号：70, 配列番号：71, 配列番号：72のアミノ酸配列または該配列の断片にてコードする。本発明のFc レセプターポリヌクレオチド分子は、配列番号：1, 3, 5, 7, 13, 22, 23および27に示されるような核酸配列を有するポリヌクレオチド分子、および配列番号：1, 3, 5, 7, 13, 22, 23および27の核酸配列とほぼ同一の核酸を有するポリヌクレオチドを含む。

【0018】

本発明の別の態様において、非ヒト靈長類のFc レセプターをコードする核酸を得る方法を提供する。該方法は、フォワードおよびリバースプライマーを含むとともに、配列番号：31および配列番号：32, 配列番号：33および配列番号：34, 配列番号：35および配列番号：36, 配列番号：37および配列番号：38, 配列番号：39および配列番号：40, 配列番号：41および配列番号：42, 配列番号：43および配列番号：44, 配列番号：45および配列番号：46, 配列番号：47および配列番号：48, 配列番号：49および配列番号：50, 配列番号：51および配列番号：52, 配列番号：53および配列番号：54からなる群から選択されるプライマーセットにより非ヒト靈長類由来の核酸を增幅し、該增幅核酸を単離することを含む。非ヒト靈長類の細胞は、好ましくはカニクイザルの脾臓細胞またはチンパンジーの脾臓細胞である。

【0019】

本発明は、非ヒト靈長類のFc レセプターポリペプチドおよび 2ミクログロプリンの変異体、誘導体および融合タンパク質を含む。例えば、本発明の融合タンパク質は、精製、安定性または分泌のように所望の機能を付与する異種のタンパク質またはペプチドに融合される、非ヒト靈長類のFc レセプターポリペプチドを含む。本発明の融合タンパク質は、例えば、本発明のポリペプチドの一つをコードするポリヌクレオチド分子を、異種タンパク質をコードするポリヌクレオチド分子とインフレームに有する発現構築物から生成可能である。

【0020】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドを有するベクター、プラスミド、発現系、宿主細胞等も提供する。本発明のポリペプチドを生成するための幾つかの組換え法は、既知の方法に基づき、細胞を含まない発現系、細胞の宿主、組織、および動物モデルにおけるポリヌクレオチド分子の発現を含む。

【0021】

非ヒト靈長類のFc レセプターは、特にFc領域を有する薬剤の安全性、有効性および薬物動態を評価するための動物モデルにおいて有用である。本発明の1方法は、Fcレセプター結合領域を有する薬剤を非ヒト靈長類のFcレセプターポリペプチドに、好ましくは成熟した可溶性ポリペプチドに接触させ、Fc領域含有分子の、少なくとも生物特性に対する接触効果を判断することを伴う。本発明の1方法は、少なくとも一つの非ヒト靈長類のFc レセプターポリペプチドを発現する細胞を、Fc領域を有する薬剤に接触させ、該薬剤が細

10

20

30

40

50

胞の生物活性を変化させるか否か、または細胞に対して毒性を示すか否かを判断することを伴う。本発明は、FcRsに対する結合能および活性化能に対し、Fc領域を有する薬剤の変種をスクリーニングする方法も含む。該薬剤の変種例は、一つ以上のFcレセプタークラスに対する結合親和性を変化させる可能性がある、特定残基におけるアミノ酸置換を有する抗体を含む。

【0022】

FcR結合ドメインを有する薬剤のスクリーニングの更なる例は、ITIM領域を有するFcレセプターに比し、ITAM領域を有するFcレセプターに対し変化した親和性を有する薬剤を同定することを含む。加えて、本発明は、ITIM領域を有するFcレセプターに対し変化した親和性を有する薬剤を同定するのに有用な試薬、成分ならびに方法、またはITAM領域を有するFcレセプターに対し結合親和性が増大した薬剤を同定する方法を提供する。

10

【0023】

本発明を特徴付ける上記ならびに種々の他の特徴および利点は、後述する詳細な説明を読み、付随の特許請求の範囲を検討すれば明らかであろう。

【0024】

発明の詳細な説明

以下の定義は、本明細書において頻繁に使用する特定の用語の理解を助けるために提供されるものであって、本開示内容を限定することを意図したものではない。

【0025】

本明細書及び請求の範囲を通じて、IgG重鎖の残基の番号付けは、Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) に規定されているEUの指針に従っており、ここに参照することにより本明細書に包含される。「Kabatに規定されているEUの指針」とは、ヒトIgG1 EU抗体の残基番号付けを指す。

20

【0026】

「アミノ酸」という用語は、天然に生じる12のアミノ酸のいずれか、及び任意の修飾アミノ酸配列を意味する。修飾は、翻訳後プロセシングを含み得るか、または当技術分野において既知の化学修飾を含み得る。修飾は、リン酸化、ユビキチン結合、アセチル化、アミド化、グリコシル化、フラビンの共有接着、ADP-リボシル化、架橋、ヨウ素化、メチル化等を含むが、これらに限定されない。

30

【0027】

「抗体」という用語は、最も広い意味で用いられ、所望の生物学的活性を示すものである限り、特に、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異的抗体（例えば二重特異的抗体）、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全合成抗体、及び抗体断片をカバーする。

【0028】

「アンチセンス」という用語は、標的の「センス」ポリヌクレオチド配列に相補的なポリヌクレオチド配列を意味する。

【0029】

「相補的」または「相補性」という用語は、ポリヌクレオチド分子中のポリヌクレオチドが、第二のポリヌクレオチド分子中の別のポリヌクレオチドと塩基対を形成する能力を意味する。例えば、配列A-G-Tは配列T-C-Aと相補的である。ポリヌクレオチドの一部のみが塩基対により適合する塩基性が不完全な場合と、全てのポリヌクレオチドが塩基対により適合する塩基性が完全な場合がある。

40

【0030】

「発現」という用語は、宿主細胞内で生じる転写又は翻訳を意味する。宿主細胞におけるDNA分子の発現レベルは、細胞に存在している対応するmRNAの量か、又は宿主細胞により生成されたDNA分子にコードされるタンパク質の量に基づいて決定されうる（Sambrook等, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 18.1-18.88）。

【0031】

50

「F c 領域」という用語は、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。Ig G重鎖のF c領域の境界には若干の変化があるかも知れないが、ヒトIg G重鎖のF c領域は、Cys 226の位置のアミノ酸残基からカルボキシル末端まで伸展する。 「F c 領域含有分子」とは、抗体またはイムノアドヘシンなど、F c領域を有する分子を意味する。Ig GのF c領域は、一般的に、二つの定常ドメイン、CH2ドメイン及びCH3ドメインを含む。ヒトIg G F c領域の「CH2」ドメイン（「C2」ドメインとも呼ばれる）は、通常アミノ酸231からアミノ酸340まで延びている。CH2ドメインは、別のドメインと親密な対にならないという点で独特である。代わりに、2つのN結合分岐炭水化物鎖が、無傷の天然Ig G分子の2つのCH2ドメインの間に挿入される。Burton, Molec. Immunol. 22:161-206(1985)。

10

【0032】

「F c レセプター」という用語は、抗体のF c領域、または分子を含むF c領域に結合するレセプターを意味する。好適なF c レセプターは、Ig G抗体(F c R)に結合し、F c RI、F c RII、F c RIII、およびF c Rnサブクラスのレセプターを含むものであり、これらのレセプターの対立遺伝子変異体及び選択的スプライシング型を含む。 「F c R ポリペプチド」は、抗体のF c領域又は分子を含むF c領域に結合するレセプターを形成するポリペプチドを表すために使用される。「F C レセプター ポリペプチド」という用語もまた、成熟ポリペプチドおよびシグナル配列を有するポリペプチドの両方を含む。「F c R ポリペプチド」という用語は、Ig G抗体のF c領域または分子を含むIg G F c領域に結合するレセプターを形成するポリペプチドを表すために使用される。例えば、F c RI及びF c RIIIレセプターの各々は、鎖のF c レセプター ポリペプチドホモ二量体またはヘテロ二量体及びF c レセプター ポリペプチド鎖を含む。F c RnレセプターはF c レセプター ポリペプチド鎖および-2ミクログロブリンを含む。通常、鎖は、作用物質を含むF c領域に結合する細胞外領域を有する。F c Rは、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及び de Haas等, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)に解説されている。本明細書において使用する「F c R」という用語は、未来に同定されるものを含めた他のF c Rを含有する。

20

【0033】

「断片」という用語は、F c レセプター ポリペプチド、またはF c レセプター ポリペプチドの核酸コード化部分を表すために使用される。好ましくは断片は分子含有F c領域に対する結合能を有する。F c RI / I II 及びF c R I I A又はBのF c -鎖の構造は、シグナル配列である2または3の細胞外C-2 Ig様ドメイン；膜貫通ドメインおよび細胞間細胞質尾部を含み、またそれを特徴とする。F c レセプター鎖またはF c R I I AまたはBは、F c レセプター ポリペプチドの細胞外C-2 Ig様ドメイン、膜貫通ドメイン、または細胞間ドメインのうちの1以上を有する可溶性F c レセプター ポリペプチドを含むが、これらに限定されるものではない。

30

【0034】

「結合ドメイン」なる用語は、他の分子に結合するポリペプチドの領域を意味する。F c レセプター ポリペプチドまたはF c Rの場合には、結合ドメインは、免疫グロブリンのF c領域または他のF c領域含有分子への結合の原因であるそのポリペプチド鎖の一部(例えばその鎖)を含みうる。一つの有用な結合ドメインはF c レセプター鎖 ポリペプチドの細胞外ドメインである。

40

【0035】

「融合タンパク質」とは、二つの部分が組み合わさったポリペプチドで、各部分は異なった特性を有するポリペプチドである。この特性は、インビトロ又はインビボにおける活性のような生物学的特性であり得る。また、特性とは、標的分子へ結合すること、反応の触媒などのような、単純な化学的又は物理的特性である。二つの部分は、一本のペプチド結合、又は一つ以上のアミノ酸残基を含むペプチドリンカーを通して直接に結合してもよい。融合ポリペプチドは、特に、細胞における融合タンパク質の位置を決定するため、融

50

合タンパク質の安定性を強化するため、タンパク質のオリゴマー形成を促進するため、または融合タンパク質の精製を促進するために使用することができる。このような融合タンパク質の例には、免疫グロブリン分子の一部との融合として発現するタンパク質、ロイシンジッパー成分を有する融合タンパク質として発現するタンパク質、グルタチオンSトランسفエラーゼに融合したF c レセプターポリペプチド、およびGly 6 - Hisタグなどのレセプターの検出または精製を可能にする役割を担う1以上のアミノ酸に融合したF c レセプターポリペプチドがある。

【0036】

「相同性」とは、ポリヌクレオチド間の相補性の度合い、または配列同一性を指す。

【0037】

「宿主細胞」とは、エキソビオ培地で確立された細胞を意味する。本明細書において説明する宿主細胞の特徴は、F c レセプターを発現できることである。本発明の態様に使用できる適切な宿主細胞の例として昆虫および哺乳動物の細胞を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。このような細胞の特定の例は、SF9昆虫細胞 (Summers および Smith, 1987, Texas Agriculture Experiment Station Bulletin, 1555) 、ヒト胚性腎臓細胞 (293細胞) 、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (Puck等, 1958, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 1275-1281) 、ヒト頸癌細胞 (HELA) (ATCC CCL 2) 、ヒト肝細胞 (Hep G2) (ATCC HB8065) 、ヒト乳癌細胞 (MCF-7) (ATCC HTB22) 、およびヒト大腸癌細胞 (DLD-1) (ATCC CCL 221) 、ダウディ細胞 (ATCC CRL-213) 等を含むが、これらに限定されない。

【0038】

「ハイブリダイゼーション」という用語は、アニーリング期間に相補的ポリヌクレオチドの対形成をすることを意味する。2つのポリヌクレオチド分子間のハイブリダイゼーションの強度は、2つの分子間の相同性、使用する条件のストリンジエンシー、形成されたハイブリッドの融点、およびポリヌクレオチド内のG : Cの割合に影響される。

【0039】

本明細書で使用する「イムノアドヘシン」という用語は、異種「アドヘシン」タンパク質 (例えばレセプター、リガンドまたは酵素) の「結合ドメイン」と1以上の免疫グロブリン定常ドメインとを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、抗体の抗原認識及び結合部位 (抗原結合部位) 以外 (即ち「異種の」) に所望の結合特異性を持つアドヘシンアミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。免疫グロブリン定常ドメイン配列は、好ましくは、免疫グロブリンのF c 部である。

【0040】

「免疫複合体」は、少なくとも一つの標的分子と少なくとも一つのF c 領域含有ポリペプチドが互いに結合してより大きな分子量の複合体を形成する場合に生じる比較的安定した構造を意味する。免疫複合体の例は抗原-抗体凝集体及び標的分子-イムノアドヘシン凝集体である。免疫複合体は、例えば哺乳動物における免疫複合体のクリアランスを評価するために哺乳動物に投与することができるか、またはF c RあるいはF c レセプターポリペプチドの結合特性を評価するために使用できる。

【0041】

「単離された」という用語は、その自然環境の少なくとも一つの汚染物質から分離されたか又は回収されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。一自然環境の汚染成分とは、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの診断又は治療への使用を妨害する物質である。通常、単離されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは少なくとも1つの精製工程により調製される。

【0042】

「天然配列」ポリペプチドは、天然由来の対応するポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでいる。この用語には、特に、ポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態、自然に生じる変異形態 (例えば、選択的にスプライシングされた形態) 及び自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。「成熟ポリペプチド」とは、シグナルペ

10

20

30

40

50

チドを含まないポリペプチドを意味する。

【0043】

「核酸配列」という用語は、デオキシリボ核酸の鎖に沿ったデオキシリボヌクレオチドの順序または配列を意味する。これらのデオキシリボヌクレオチドの順序により、ポリペプチド鎖に沿ったアミノ酸の順序が決定する。よって、デオキシリボヌクレオチド配列はアミノ酸配列をコードする。

【0044】

「ポリヌクレオチド」という用語はヌクレオチドの線形配列を意味する。ヌクレオチドは、ポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチド、或いはそれらの混合の線形配列である。本発明の範囲におけるポリヌクレオチドの例として、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖RNA、および一本鎖および二本鎖のDNAおよびRNAの両方の混合を有するハイブリッド分子が挙げられる。さらに、本発明のポリヌクレオチドは1以上の修飾ヌクレオチドを有してもよい。

【0045】

「タンパク質」、「ペプチド」および「ポリペプチド」は、アミノ酸重合体、或いは互いに作用するか、または結合した2つ以上のアミノ酸重合体の組を表すために交換可能に使用される。

【0046】

「精製する」、または「精製された」とは、少なくとも5～10%の不純タンパク質が除去された標的タンパク質を意味する。不純タンパク質からのタンパク質の精製は、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、ヒドロキシルアバタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーを含め、任意の数の周知の技術を使用して行うことができる。様々なタンパク質精製技術が、*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel等編 (Wiley & Sons, New York, 1988, and quarterly updates)に解説されている。

【0047】

「パーセント(%)核酸またはアミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大の配列同一性を達成するために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないものとしたときの、基準となるポリペプチド中のアミノ酸と同一である核酸配列またはアミノ酸残基のパーセントと定義される。本発明の目的のための、任意のアミノ酸配列Bに対する、所定のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性(或いは、任意のアミノ酸配列Bに対して特定の%アミノ酸配列同一性を有する任意の配列Aということもできる)は、以下のようにして計算できる：

分率X / Yの100倍

ここで、Xは、A及びBのそのプログラムのアラインメントにおいて配列アラインメントプログラムALIGN-2によって完全に一致していると判定されたアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと等しくない場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは等しくならないことが理解できる。好ましくは、%配列同一性は、手作業で配列を整列させ、分率X / Yを再度100倍することにより決定することができる。ここで、Xは手作業による比較により完全に一致すると判定されたアミノ酸の数であり、YはBの全アミノ酸数である。さらに、上述の方法を%核酸配列同一性の決定のために使用することもできる。或いは、これらの目的のために共通に使用される、SmithおよびWatermanのアルゴリズム(1981, *Adv. Appl. Math.*, 2:482-489)を使用するコンピュータプログラム、例えばGapプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wisconsin)を使用することができる。

【0048】

特に注釈していない限り、本明細書で使用する全ての%アミノ酸配列同一性の値は、手

10

20

30

40

50

動による整列によって獲得されたものである。しかしながら、A L I G N - 2 配列比較コンピュータプログラムは WO 00 / 15796 に記載されているように使用できる。

【 0 0 4 9 】

「ストリングエンシー」という用語は、ポリヌクレオチド間のハイブリダイゼーションが起こる条件（温度、イオン強度、溶媒等）を意味する。高度にストリンジェントな条件の下に行われたハイブリダイゼーション反応は、相補性の高い塩基対形成（約 85% ~ 100% の配列同一性）を持つポリヌクレオチド分子間でのみ起こるものである。高度にストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は、例えば、6 X S S C / 0.1% SDS 中で約 2.5 時間約 42 で夜間インキュベートした後、65 の 1.0 X S S C 、 0.1% SDS 中においてフィルタを洗浄することである。中程度にストリンジェントな条件の下に行われたハイブリダイゼーション反応は、中程度に相補的な塩基対形成（約 50% ~ 84% の配列同一性）を持つポリヌクレオチド分子間でのみ起こるものである。

【 0 0 5 0 】

本明細書において使用する「変異体」という用語は、天然のポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なる配列を有するポリヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。変異体は、完全長天然配列または成熟ポリペプチド配列と比較したとき、結果として得られる変異体ポリペプチドにアミノ酸の置換、添加、および欠落を生じさせる変化を含む。

【 0 0 5 1 】

「ベクター」、「染色体外ベクター」または「発現ベクター」とは、通常二本鎖の DNA の第一の断片を指し、該第一の断片には、DNA の第二の断片、例えばカニクイザル Fc R I の c DNA のような異種 DNA の断片が挿入されている場合がある。異種 DNA は、宿主細胞中に天然に見られる、又は天然に見られない DNA であり、宿主ゲノムに天然に存在する核酸配列の追加コピーを含む。ベクターは異種 DNA を適切な宿主細胞中に運搬する。宿主細胞中に入ったら、ベクターは宿主細胞の染色体中に一体化できる。ベクターはまた、一体化された DNA を含む細胞を選択するために必要な要素、並びに形質移入された DNA からの mRNA 転写を促進するのに必要な要素を含むことができる。本発明の範囲に含まれるベクターの例として、プラスミド、バクテリオファージ、コスミド、レトロウイルス、及び人工染色体が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 2 】

発明の実施の形態

本発明は、特に、カニクイザルやチンパンジーのような非ヒト靈長類由来の Fc レセプター ポリペプチドをコードする核酸の単離・配列決定に基づく。特に、本発明は、配列番号 : 9, 11, 15, 17, 18, 20, 29, 64 のアミノ酸配列または該配列の断片を有する Fc R ポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。本発明は、配列番号 : 65, 66, 67, 68, 69, 71 もしくは 72 のアミノ酸配列または該配列の断片を有する成熟 Fc R ポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドも提供する。本発明は、配列番号 : 25 または配列番号 : 70 のアミノ酸配列を有する 2 ミクログロブリンをコードする、単離されたポリヌクレオチドも提供する。

【 0 0 5 3 】

本発明のカニクイザルまたはチンパンジーの Fc レセプター ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、靈長類においてインビボで評価する前に、カニクイザルまたはチンパンジーの Fc R ポリペプチドに対する抗体（如何なるサブクラスであれ、特に治療に役立つ見込みのある抗体）の結合を評価するのに有用である。評価には、ELISA 法型による靈長類の Fc R または Fc レセプター ポリペプチドに対する結合、または過渡的もしくは安定にトランスフェクトされたヒトもしくは靈長類の細胞（例えば、CHO, COS）に対する結合の試験を含めることができる。カニクイザルまたは他の靈長類の Fc R s または Fc レセプター ポリペプチドに対するヒト抗体の結合能評価は（ELISA 法またはトランスフェクトされた細胞のいずれかの形式にて）、インビボで薬物動態 / 薬力を評価する前に、予備試験として利用可能といえる。カニクイザルの Fc R n または Fc R n ポリペプチドに対する抗体または抗体変異体の結合は、インビボでより長い半減期を有し得る抗

10

20

30

40

50

体または抗体変異体の同定に有用であろう。FcRnに対する抗体の結合能は、インビボで半減期が延びることと相関性がある。

【0054】

靈長類のFcRまたはFcレセプターポリペプチドは、該レセプターまたはレセプターポリペプチドに対する結合能の向上または低下のいずれかを示す、靈長類またはヒトのIgGの変異体（例えば、タンパク質配列または糖質）のスクリーニングに利用可能である。次に、該変異体は、例えばIgGエフェクター機能の増大または抑止のような抗体の有効性の変化をみるべく、靈長類モデルにおいてインビボで評価可能である。加えて、カニクイザルまたはチンパンジーの可溶性Fcレセプターポリペプチドは、靈長類モデルにおいて治療薬として評価可能である。

10

【0055】

例えば、本発明の一態様では、標的FcレセプターにおけるITAMモチーフを選択的に活性化するが、他のFcレセプターにおけるITIMモチーフを活性化させない薬剤を同定する方法を提供する。好ましくは、該薬剤は抗体であり、より好ましくは、該薬剤はモノクローナル抗体である。同定された該薬剤は、ITAM含有FcRのみに選択的に結合するとともにこれを活性化させる（即ち、抑制ITIM含有レセプターと同時に結合しない）治療用抗体の設計に有用であろう。従って、治療用抗体の細胞傷害性もしくは食作用、または治療用抗体が抗原提示細胞により内部移行される作用が向上し、標的抗原に対する免疫系の応答が向上しよう。

20

【0056】

最後に、本発明のカニクイザルのFcRポリヌクレオチドおよびポリペプチドにより、FcRが媒介する分子相互作用のより詳細な解析が可能になる。ヒトFcRと相互作用するヒトIgG1のアミノ酸がマッピングされている（Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J.A.およびPresta, L.G. J. Biol. Chem. 第276巻6591～6604頁(2001年)を参照）。カニクイザルFcRに対する同一ヒトIgG1の変異体の結合能を試験することにより、ヒトIgG1の特定のアミノ酸とFcRのアミノ酸との相互作用をマッピングするのに役立ち得る。

【0057】

本出願の範囲内において、特に記載がなければ、利用する技法は次のような幾つかの周知の文献のいずれにおいても見出すことができよう。SambrookらMolecular Cloning: A Laboratory Manual(Molecular cloning: A Laboratory Manual(1989年))、Gene Expression Technology(D. Goeddel(編)Methods in Enzymology第185巻、Academic Press社、カリフォルニア州サンディエゴ市(1991年))、M.P.Deutshcer"Guide to Protein Purification"Methods in Enzymology(Academic Press社、第3版(1990年))、InnisらPCR Protocols:A Guide to Methods and Applications(Academic Press社、カリフォルニア州サンディエゴ市(1990年))、R.I.Freshney Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique(Liss社、ニューヨーク州ニューヨーク市、第2版(1987年))、およびE.J.Murray(編)Gene Transfer and Expression Protocols, 109～128頁(The Humana Press社、ニュージャージー州クリifton)。

30

【0058】

ポリヌクレオチド配列

本発明の一態様は、カニクイザルおよびチンパンジー由来のFcレセプターポリペプチドをコードする、単離された核酸分子を提供する。遺伝暗号の縮退により二つのDNA配列は異なる可能性があるが、同一のアミノ酸配列をコードする。従って、本発明は、カニクイザルのFcRポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を有する、単離された核酸分子を提供する。該ポリヌクレオチド配列はポリペプチドを配列番号：9または配列番号：11または配列番号：15または配列番号：18または配列番号：20または配列番号：29または配列番号：64のアミノ酸配列または該配列の断片によりコードする。本発明は、本発明のチンパンジーのFcRポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

40

50

配列を有する、単離された核酸分子も提供する。該ポリヌクレオチド配列はポリペプチドを配列番号：17のアミノ酸配列または該配列の断片によりコードする。本発明は、カニクイザルの2ミクログロブリンを配列番号：25のアミノ酸配列によりコードするポリヌクレオチド配列を有する、単離された核酸分子も提供する。

【0059】

本発明は、成熟した非靈長類のFcRポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を有する、単離された核酸分子も提供する。該ポリヌクレオチド配列はポリペプチドを配列番号：65, 66, 68, 67, 69, 70, 71または72のアミノ酸配列によりコードする。

【0060】

表に示すヌクレオチド配列は、大部分の例では、Fcレセプターポリペプチドのシグナル配列に対するコード配列において開始する。

【0061】

非ヒト靈長類のレセプターのヌクレオチド配列は、FcRポリペプチドまたは2ミクログロブリンに対し、配列同一性率を定量すべく、ヒトの配列と並べられてきた。靈長類およびヒトのタンパク質のヌクレオチド配列は手作業にて並べられ、ヌクレオチドまたはタンパク質配列における相違点に留意する。同一性率は同一残基数/総残基数として計算される。配列が総残基数で異なる場合には、総残基に対し二つの異なる番号を用い、同一性率に対し2値が付与される。ヒトFcRに対する核酸配列の一部は当業者には自明であり、GenBankの登録番号により同定される。

【0062】

本発明は、一実施例において、カニクイザルのFcRIの鎖をコードするポリヌクレオチドを有する、単離された核酸分子を提供する。カニクイザルのFcRI鎖の一例は、表10に示すようにシグナル配列を含むアミノ酸配列を有する（配列番号：9）。成熟したカニクイザルのFcRI鎖は、表10に示すアミノ酸配列を有する（配列番号：65）。カニクイザルのFcRI鎖をコードする、単離された核酸の一例を表3に示す（配列番号：1）。カニクイザルのFcRI鎖をコードする核酸配列は、FcRI鎖をコードするヒトの核酸配列（配列番号：2）と並べた場合、表3に示すように約91%または96%の配列同一性を有する（GenBank登録番号L03418）。

【0063】

本発明は、一実施例において、カニクイザルのFcRI/IIIのガンマ鎖をコードするポリヌクレオチド配列を有する、単離された核酸を提供する。該核酸配列の一例を表4に示す（配列番号：13）。カニクイザルのガンマ鎖ポリペプチドの一例を表12に示す（配列番号：11）。カニクイザルのガンマ鎖をコードする核酸は、FcRガンマ鎖をコードするヒトの核酸配列（配列番号：14）と並べた場合、表4に示すように約99%の配列同一性を有する（GenBank登録番号M33195）。

【0064】

本発明は、一実施例において、カニクイザルのFcRIIAをコードするポリヌクレオチドを有する、単離された核酸分子を提供する。カニクイザルのFcRIIAの一例は、表11に示すようにシグナル配列を含むアミノ酸配列を有する（配列番号：15）。成熟したカニクイザルのFcRIIAは、表21に示すようなアミノ酸配列を有する（配列番号：66）。カニクイザルのFcRIIAをコードする、単離された核酸の一例を表5に示す（配列番号：3）。カニクイザルのFcRIIAの鎖をコードする核酸配列は、FcRIIAをコードするヒトの核酸配列（配列番号：4）と並べた場合、表5に示すように約94%の配列同一性を有する（GenBank登録番号M28697）。

【0065】

本発明は、FcRIIAレセプターをコードするポリヌクレオチドを有する、単離された核酸のような、チンパンジー由来のFcRをコードするポリヌクレオチドを有する

10

20

30

40

50

、単離された核酸も提供する。チンパンジーの Fc RIIA の一例は、表 11 に示すようにシグナル配列を含むアミノ酸配列を有する（配列番号：17）。成熟したチンパンジーの Fc RIIA は、表 11 に示すようなアミノ酸配列を有する（配列番号：67）。チンパンジーの Fc RIIA をコードする、単離された核酸の一例を表 5 に示す（配列番号：22）。配列番号：22 の配列を有する核酸配列は、Fc RIIA をコードするヒトの核酸配列（配列番号：4）と並べた場合、表 5 に示すように約 99% の配列同一性を有する（GenBank 登録番号 M28697）。

【0066】

本発明は、一実施例において、カニクイザルの Fc RIIIB をコードするポリヌクレオチドを有する、単離された核酸分子を提供する。カニクイザルの Fc RIIIB の一例は、表 11 に示すようなアミノ酸配列を有する（配列番号：18）。成熟したカニクイザルの Fc RIIIB は、表 22 に示すようなアミノ酸配列を有する（配列番号：68）。カニクイザルの Fc RIIIB をコードする、単離された核酸の一例を表 6 に示す（配列番号：5）。カニクイザルの Fc RIIIB をコードする核酸配列は、Fc RIIIB をコードするヒトの核酸配列（配列番号：6）と並べた場合、表 6 に示すように約 94% の配列同一性を有する（GenBank 登録番号 X52473）。

【0067】

本発明は、一実施例において、カニクイザルの Fc RIIIA の鎖をコードするポリヌクレオチドを有する、単離された核酸分子を提供する。カニクイザルの Fc RIIIA の一例は、表 11 に示すようなアミノ酸配列を有する（配列番号：20）。成熟したカニクイザルの Fc RIIIA は、表 23 に示すようなアミノ酸配列を有する（配列番号：69）。カニクイザルの Fc RIIIA 鎖をコードする、単離された核酸の一例を表 7 に示す（配列番号：7）。カニクイザルの Fc RIIIA 鎖の核酸配列は、Fc RIIIA 鎖をコードするヒトの核酸配列（配列番号：8）と並べた場合、表 7 に示すように約 96% の配列同一性を有する（GenBank 登録番号 X52645）。

【0068】

本発明は、カニクイザルの Fc レセプター（FcRn）の鎖をコードするポリヌクレオチド配列を有する、単離された核酸分子も提供する。カニクイザルの Fc レセプター鎖（S3）の一例は、表 14 に示すような配列番号：29 のアミノ酸配列を有する。成熟ポリペプチドの 3 番残基におけるセリンをアスパラギンに置換することにより、配列番号：29 のアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする対立遺伝子が同定されている。該ポリペプチド配列は配列番号：64 と表示されている。FcRn 鎖（S3）および FcRn 鎖（N3）の成熟ポリペプチドは、それぞれアミノ酸配列番号：71, 72 を有する。カニクイザルの FcRn 鎖をコードする、単離された核酸の一例は、表 9 に示す配列番号：27 である。カニクイザルの FcRn をコードする核酸は、ヒトの FcRn 鎖をコードするヒトの配列（配列番号：28）と並べた場合、表 9 に示すように約 97% の配列同一性を有する（GenBank 登録番号 U12255）。

【0069】

本発明は、他の実施例において、カニクイザルの 2 ミクログロブリンをコードするポリヌクレオチド配列を有する、単離された核酸分子を提供する。カニクイザルの 2 ミクログロブリンの一例は、表 13 に示すようなアミノ酸配列を有する（配列番号：25）。成熟 2 ミクログロブリンは、表 13 に示すような配列を有する（配列番号：70）。カニクイザルの 2 ミクログロブリンをコードする、単離された核酸の一例を表 8 に示す（配列番号：23）。カニクイザルの 2 ミクログロブリンの核酸は、2 ミクログロブリンをコードするヒトの配列（配列番号：24）と並べた場合、表 8 に示すように約 95% の配列同一性を有する（GenBank 登録番号 AB021288）。

【0070】

本発明の非ヒト靈長類の核酸は、cDNA、化学合成されたDNA、PCR により単離されたDNA、および該DNAの組合せを含む。カニクイザルまたはチンパンジーのcDNA から転写されたRNAも本発明に含む。カニクイザルのDNAは、標準的な方法によ

10

20

30

40

50

り脾臓または肝臓のような組織から得ることが可能であり、後述の例に記載のように得ることができる。チンパンジーの Fc R の DNA は、標準的な方法により脾臓または肝臓のような組織から得ることが可能であり、後述の例に記載のように得ることができる。

【0071】

本発明の別の態様において、非ヒト靈長類の Fc レセプターをコードする核酸を得る方法を提供する。該方法は、フォワードおよびリバースプライマーを含むとともに配列番号：31 および配列番号：32，配列番号：33 および配列番号：34，配列番号：35 および配列番号：36，配列番号：37 および配列番号：38，配列番号：39 および配列番号：40，配列番号：41 および配列番号：42，配列番号：43 および配列番号：44，配列番号：45 および配列番号：46，配列番号：47 および配列番号：48，配列番号：49 および配列番号：50，配列番号：51 および配列番号：52，配列番号：53 および配列番号：54 からなる群から選択されるプライマーセットにより非ヒト靈長類由来の核酸を増幅し、該増幅核酸を単離することを含む。非ヒト靈長類の細胞は、好ましくはカニクイザルの脾臓細胞またはチンパンジーの脾臓細胞である。プライマーセットの一部は、GlyHis-GST に融合した Fc レセプターポリペプチドの細胞外断片を増幅する。

【0072】

本願に記載のカニクイザルおよびチンパンジーの Fc R をコードする核酸分子の断片、および該核酸分子にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドは、ポリメラーゼ鎖反応 (PCR) におけるプローブまたはプライマーとしての利用等、幾つかの方法で利用可能である。該プローブは、例えば、インビトロアッセイおよびサザン/ノーザンプロット法にて Fc R ポリヌクレオチドの存在を検出するのに利用可能である。Fc R を発現する細胞型も該プローブを用いることにより同定可能である。該方法は周知であり、当業者は特定の用途に適う長さのプローブを選択することができよう。PCR に関しては、核酸分子の終端と一致する 5' および 3' プライマーを用い、従来の技法により該配列を単離・増幅する。プローブとして有用な断片は、通常、約 18 ~ 20 ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドであり、Fc R をコードするポリヌクレオチド全長に至る長さを含む。PCR プライマーとして有用な断片は、通常、20 ~ 50 ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドである。

【0073】

カニクイザルの異なる Fc R ポリヌクレオチドの他の有用な断片は、標的 Fc R の mRNA (センス鎖を利用) または DNA (アンチセンス鎖を利用) 配列に結合可能な一本鎖の核酸配列を有する、アンチセンスまたはセンス・オリゴヌクレオチドである。

【0074】

他の有用な断片は、Fc レセプターポリペプチドのドメインをコードするポリヌクレオチドを含む。該断片は、好ましくは、Fc 領域含有分子に結合可能である。ポリヌクレオチド断片の一実施例は、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインが欠失している、Fc レセプターポリペプチドの細胞外ドメインをコードする断片である。Fc レセプターの他のドメインは、例えば、表 10 および表 11 において同定される。一つ以上のポリペプチド・ドメインをコードする核酸断片は、本発明の範囲内に含まれる。

【0075】

本発明は、カニクイザルならびにチンパンジーの異型 Fc R 核酸分子、およびカニクイザルの異型 2 ミクログロブリン核酸分子も提供する。変異ポリヌクレオチドは、例えば、配列番号：9, 11, 15, 17, 18, 20, 25, 29 または 64 のような未変性ポリペプチドと比較した場合、結果として生じる変異ポリペプチドにおけるアミノ酸の置換、付加および欠失を生じる核酸配列の改変を含み得る。変異核酸配列の改変は、一つの脂肪族残基 (Ile, Val, Leu または Ala) を別の脂肪族残基に置換し、または塩基性残基 Lys と Arg、酸性残基 Glu と Asp、アミド残基 Gln と Asn、ヒドロキシル残基 Ser と Tyr、もしくは芳香族残基 Phe と Tyr の間ににおける置換のように、類似の生理化学的特性を有する残基によりアミノ酸が置換されてしまう、核酸

10

20

30

40

50

配列の改変を含み得る。本発明の変異ポリヌクレオチド配列は、未変性配列の全長をコードする核酸配列、シグナル配列を欠失したポリペプチド、ポリペプチドの細胞外ドメイン、または配列番号：1，3，5，7，23もしくは27のFcレセプターポリペプチドもしくは2ミクログロブリンの断片をコードする核酸に対し、好ましくは少なくとも約95%同一であり、より好ましくは少なくとも約96%同一であり、より好ましくは少なくとも約97%または98%同一であり、最も好ましくは少なくとも約99%同一である。

【0076】

上記の配列と変異配列との配列同一性率は、例えば、ALIGN-2のように該目的に對して一般的に用いられる、任意のコンピュータプログラムを用い、または手作業配列により、変異配列を対照配列と比較することにより、定量することも可能である。同一性率は[同一残基数]/[総残基数]として計算される。配列が総残基数で異なる場合には、総残基に対しこの異なる番号を用い、同一性率に対し2値が付与される。

【0077】

カニクイザルならびにチンパンジーのFcRポリペプチド、およびカニクイザルの2ミクログロブリンの核酸・アミノ酸の配列は、任意の幾つかの既知技法により改変可能である。例えば、オリゴヌクレオチドを標的とした突然変異誘発のような当業者には自明の方法により、特定位置に変異を導入することが可能である。前記に関しては、WalderらGene第42巻133頁(1986年)、BauerらGene第37巻73頁(1985年)、Craik BioTechniques 12~19頁(1985年)、SmithらGenetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press社(1981年)、および米国特許第4,518,584号ならびに米国特許第4,737,462号に記載されている。

【0078】

本発明は、異種ポリヌクレオチドに結合し融合タンパク質をコードする、カニクイザルならびにチンパンジーのFcRポリペプチド、カニクイザルのFcRnポリペプチド、2ミクログロブリンの核酸分子、または該核酸分子の断片ならびに変異体も提供する。異種ポリヌクレオチドは、例えば、配列番号：1，3，5，7，13，22，25または27のように、結果として生じる、カニクイザルならびにチンパンジーのFcR、カニクイザルのFcRnおよび2ミクログロブリンのポリペプチドのインフレーム発現に対する干渉を避けるべく、本発明の核酸分子の3'または5'末端に結合可能である。また、異種ポリヌクレオチドは本発明の核酸分子のコード化領域内に結合可能である。異種ポリヌクレオチドは、本発明のカニクイザルおよびチンパンジーのコードされたポリペプチドの分泌を付与し、安定性を向上させ、または精製を促進する、一つのアミノ酸、ペプチドまたはポリペプチドをコードすることが可能である。

【0079】

好ましい実施例は、例1に記載したように得られる、Gly(His)₆-gstタグに融合したFcRI, FcIIIもしくはFcRn、またはGly(His)₆-gstタグに融合したFcRIIAもしくはIIBの鎖の細胞外ドメインをコードする核酸配列である。Gly(His)₆-gstタグは、核酸にコードされるポリペプチドの精製を簡便にする。

【0080】

本発明のカニクイザルおよびチンパンジーのFcRポリペプチドおよび2ミクログロブリンの核酸分子は、原核生物の宿主細胞または真核生物の宿主細胞中にクローン化され、その結果得られる本発明のポリペプチドを発現することが可能である。本発明の標的ポリペプチドを発現する宿主細胞を作製するには、任意の組換えDNA法またはRNA法を利用することが可能であり、該方法は形質移入、形質転換または形質導入を含むが、これに限定されるものではない。断片および変異体を含む、本発明のポリヌクレオチドにより宿主細胞を遺伝子操作する方法およびベクターは、当業者には自明であり、Ausubelら(編)Current Protocols in Molecular Biology(Wiley&Sons社、ニューヨーク(1988年)および最新版)に見出し得る。本発明に用いるベクターおよび宿主細胞は、本願の例に

10

20

30

40

50

おいて記載する。

【0081】

本発明は、成熟 Fc レセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する、単離された核酸も提供する。単離された核酸は、変異シグナル配列をコードする核酸配列を更に有し得る。変異シグナル配列は、本発明の未変性配列の非ヒト靈長類の Fc レセプターポリペプチドと異なるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドから得られる配列である。変異シグナル配列は、ヒトの Fc レセプターポリペプチド由来のシグナル配列、および組織プラスミノゲンアクチベーターのようなポリペプチド由来のシグナル配列を含む。

【0082】

ポリペプチド配列

本発明の別の態様は、カニクイザルおよびチンパンジーのような非ヒト靈長類由来の FcR ポリペプチドに関する。FcR ポリペプチドは、FcR I の鎖、FcR II A、FcR II B、FcR II IA の鎖、FcR II n の鎖、FcR I / II II の鎖および 2 ミクログロブリンを含む。ポリペプチドは IgG 抗体または Fc 領域を有する他の分子に結合する。レセプターの一部は、IgG 抗体複合体に選択的に結合する低親和性レセプターである。FcR ポリペプチドは、抗体依存性細胞傷害性、細胞からの媒介物質放出の誘導、抗体被覆粒子の取込み・破壊、免疫グロブリンの輸送のようなエフェクター細胞の機能も媒介する。

【0083】

カニクイザルおよびチンパンジー由来の FcR ポリペプチドのアミノ酸配列は、ヒトの FcR ポリペプチドをコードするアミノ酸配列と並べられ、ヒトの配列との配列同一性率を定量する。靈長類およびヒトのタンパク質のアミノ酸配列は手作業にて並べられ、ヌクレオチドまたはタンパク質の配列における相違点に留意する。同一性率は同一残基数 / 総残基数として計算される。配列が総残基数で異なる場合には、総残基に対し二つの異なる番号を用い、同一性率に対し 2 値が付与される。ヒト FcR ポリペプチドをコードするアミノ酸配列の一部は当業者には自明であり、GenBank の登録番号により同定される。

【0084】

表に示すポリペプチド配列は、シグナル配列または成熟タンパク質の 1 番アミノ酸から開始して番号付ける。ポリペプチドのアミノ酸残基がシグナル配列から開始して番号付けられる場合、その番号は残基数および直線により同定される。また、ポリペプチドのアミノ酸残基がヒトの成熟タンパク質の 1 番アミノ酸から開始して番号付けられる場合、アミノ酸はその番号および記号により表される。表 11 において、カニクイザルの配列の N 末端残基 1 番はアステリスクにより示されるが、番号付けはヒトの成熟タンパク質に一致する番号付けである。ヒト FcR ポリペプチドのアミノ酸残基の番号付けは連続的である。

【0085】

また、非ヒト靈長類のレセプターを解析し、ヒト IgG および IgG 変異体の種々のサブクラスに対する非ヒト靈長類の Fc レセプターポリペプチドの結合能をヒトの Fc レセプターと比較した。該サブクラスに対する結合は IgG4b も含んだ。IgG4b は IgG4 の一形態であるが、ヒンジ領域のアミノ酸残基 228 番において、セリンからプロリンへの改変を有する。Angal, S., King, D.J., Bodmer, M.W., Turner, A., Lawson, D.G., Robert, G., Pedley, B. および Adair, J. R. Molec. Immunology 第 30 卷 105 ~ 108 頁 (1993 年) A single amino acid substitution abolishes heterogeneity of chimeric-mouse/human(IgG4) antibody に記載のように、該改変は鎖間ジスルフィド結合の形成増大により、未変性 IgG4 より安定性が高い分子を生じさせる。

【0086】

本発明の一実施例はカニクイザルの FcR I ポリペプチドである。カニクイザル FcR I は IgG および Fc 領域を有する他の分子に結合し、好ましくはヒトのモノマーア

10

20

30

40

50

g G に結合する。カニクイザル F c R I の鎖の一例は、配列番号：9 の配列を有するポリペプチドである。ヒトの配列とのアラインメントに基づき、カニクイザルの成熟 F c R I は配列番号：65 の配列を有する。例1に記載するように得られる細胞外断片は、表10に示すように 1 ~ 269 のアミノ酸配列を有する。

【0087】

また、ヒトおよびカニクイザル由来 F c R I のアミノ酸配列 鎖のアラインメントを表10に示す。記号を付したアミノ酸の下部に示す番号は、シグナル配列を含まない成熟ポリペプチドの開始点から番号付けられる。アミノ酸残基の上部に示す番号は、シグナル配列から開始する残基の番号付けを表す。シグナル配列、細胞外ドメイン1、細胞外ドメイン2、細胞外ドメイン3、および膜貫通・細胞内配列を含む、F c R I 鎖の各ドメインを示す。ヒトの配列番号：10 の配列 (GenBank登録番号 P12314) に、シグナル配列から開始するカニクイザルの F c R I 鎖配列を並べると、ヒトの配列に存在する3'伸展が算出に用いられたか否かにより、ヒトの配列に対し約90%または94%の配列同一性が示される。

【0088】

カニクイザルの配列をヒトの配列に並べると、カニクイザルの F c R I 鎖はヒトの F c R I 配列に認められるのと同数のアミノ酸を、シグナル配列、3細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインに有することが示される(表10)。対照的に、カニクイザルの F c R I 鎖の細胞内ドメインは、ヒトの F c R I 鎖の細胞内ドメインより17アミノ酸分短い(表10)。カニクイザルの F c R I 鎖はヒトのモノマーサブクラスに、IgG3 IgG1 > IgG4b >> IgG2 のように結合し、これはヒトの F c R I に類似する。

【0089】

I および I I I A サブクラスの F c レセプターは、鎖のホモダイマーまたはヘテロダイマーのいずれかに複合化した鎖を含む、複合分子である。本発明はカニクイザルの F c R のガンマ鎖も含む。ガンマ鎖ポリペプチドの一例は、表12に示すように、配列番号：11 のアミノ酸配列を有する。カニクイザルのガンマ鎖アミノ酸配列を、ガンマ鎖配列番号：12 (GenBank登録番号 P30273) のヒトの配列と並べた場合、ヒトの配列と約99%の配列同一性を有する。カニクイザルのガンマ鎖の ITAM モチーフは、ヒトのガンマ鎖の ITAM モチーフと同一である。

【0090】

本発明の別の実施例はカニクイザルの F c R I I A である。カニクイザルの F c R I I A は、免疫グロブリン及び F c 領域を有する他の分子に、好ましくは抗原または相互に複合した免疫グロブリンに結合する。より好ましくは、レセプターは二量体または六量体のヒト Ig 免疫複合体に結合する。カニクイザルの F c R I I A の一例は配列番号：15 のアミノ酸配列を有する。カニクイザルの成熟 F c R I I A は配列番号：66 のアミノ酸配列を有する(表21)。例1のプライマーを用いて得られる細胞外断片は、表21に示すように、1 ~ 182 のアミノ酸配列を有する。

【0091】

カニクイザルの F c R I I A 配列を、表11に示すように、ヒトの F c R I I A のアミノ酸配列と並べた(配列番号：16) (登録番号 P12318)。表11において、記号を付したアミノ酸の下部に示す番号は、シグナル配列を含まない成熟ヒトポリペプチドの開始点から番号付けられる。アミノ酸残基の上部に示す番号は、シグナル配列から開始する残基の番号付けを表す。カニクイザルの配列は、ヒトの配列と整列すると、アラインメントが M A M E T Q 配列と供に開始するか否かにより、ヒトの配列に対し約87%または89%の配列同一性を有する。このアラインメントにより、カニクイザルの F c R I I A はヒトの F c R I I A に認められるアミノ酸よりも少ないアミノ酸をシグナルペプチド配列に有することが示される(表11)。カニクイザルの F c R I I A はヒトの F c R I I A 配列に認められるのとほぼ同数のアミノ酸を、2細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインに有する(表11)。カニクイザルの F c R I I A は

10

20

30

40

50

、ヒトのレセプターに認められるように二つの同一ITAMモチーフを有することに留意されたい(表11)。

【0092】

カニクイザルのFc RIIAは、次の結合パターンによりサブクラスのIgG六量体複合体に結合する。IgG3 = IgG2 > IgG1 > IgG4b, IgG4。アミノ酸131番に対応するアミノ酸にアルギニンを有するヒトのFc RIIAイソフォーム(R131)は、六量体のIgGサブクラスに次のように結合する。IgG3 IgG1 > > > IgG2 IgG4。アミノ酸131番に対応するアミノ酸にヒスチジンを有するヒトのFc RIIAイソフォーム(H131)は、六量体のIgGサブクラスに次のように結合する。IgG3 IgGI = IgG2 > > > IgG4。配列番号:15のアミノ酸配列を有するカニクイザルのFc RIIAはH131を有し、H131イソフォーム変異体を有するヒトのレセプターと同様に、ヒトIgGのサブクラスに結合する。しかし、カニクイザルのFcレセプターはIgG3に結合するのと同様に効率的にIgG2に結合する。

【0093】

本発明の別の実施例はチンパンジーのFc RIIAである。チンパンジーのFc RIIAは、免疫グロブリンおよびFc領域を有する他の分子に、好ましくは抗原または相互に複合した免疫グロブリンに結合する。好ましくは、レセプターは二量体または六量体のヒトIg免疫複合体に結合する。チンパンジーのFc RIIIAの一例は配列番号:17のアミノ酸配列を有する。ヒトの配列とのアラインメントに基づき、チンパンジーの成熟Fc RIIAは配列番号:67のアミノ酸配列を有する。

【0094】

チンパンジーのFc RIIAアミノ酸配列を、表11に示すように、シグナル配列と共に開始し、ヒトのFc RIIA配列番号:16と並べた(登録番号P12318)。チンパンジーの配列はヒトの配列と比較した場合、約97%の配列同一性を有することもアラインメントにより示される。チンパンジーのFc RIIAは、シグナルペプチド配列においてヒトのFc RIIA鎖に認められるよりアミノ酸が一つ少ない(表11)。チンパンジーのFc RIIAは、ヒトのFc RIIA配列に認められるのと同数のアミノ酸を、2細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインに有する(表11)。チンパンジーのFc RIIAは、ヒトおよびカニクイザルのレセプターに認められるように二つの同一ITAMモチーフを有することに留意されたい(表11)。

【0095】

本発明の別の実施例はカニクイザルのFc RIIIBである。カニクイザルのFc RIIIBは、免疫グロブリンおよびFc領域を有する他の分子に、好ましくは抗原または相互に複合した免疫グロブリンに結合する。より好ましくは、レセプターは二量体または六量体のヒトIg免疫複合体に結合する。カニクイザルのFc RIIIBの一例は配列番号:18のアミノ酸配列を有する。カニクイザルの成熟Fc RIIIBは配列番号:68のアミノ酸配列を有する(表22)。例1のプライマーを用いて得られる細胞外断片は、表22に示すように、1~184のアミノ酸配列を有する。

【0096】

カニクイザルのFc RIIIBは表11に示すように、ヒトFc RIIIBのアミノ酸配列と約92%の配列同一性を有する(配列番号:19)(登録番号X52473)。カニクイザルの配列はヒトの配列と並べると、カニクイザルのFc RIIIBはヒトのFc RIIIB配列に認められるのとほぼ同数のアミノ酸を、シグナルペプチド、2細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインに有することが示される(表11)。カニクイザルのFc RIIIBには細胞内ドメインのN末端部分に3アミノ酸が挿入される(ヒトのFc RIIIBと比較)(表11)。カニクイザルのFc RIIIBは、ヒトのレセプターに認められるITIMモチーフと同一のITIMモチーフを有することに留意されたい(表11)。

【0097】

10

20

30

40

50

カニクイザルの Fc RIIIB は、次の結合パターンにより、サブクラスの IgG の六量体複合体に結合する。 IgG2 > IgG3 > IgG1 > IgG4b, IgG4。ヒトの Fc RIIIB は六量体の IgG サブクラスに次のように結合する。 IgG3 > IgG1 > IgG2 > IgG4。カニクイザルの Fc RIIIB はヒトの Fc RIIIB より遙かに効率的に IgG2 に結合する。

【0098】

本発明の別の実施例はカニクイザルの Fc RIIIA である。カニクイザルのレセプター Fc RIIIA は、免疫グロブリンおよび Fc 領域を有する他の分子に、好ましくは免疫グロブリン複合体に結合する。好ましくは、レセプターは二量体または六量体のヒト Ig 免疫複合体に結合する。 Fc RIIIA 鎖のアミノ酸配列の一例は配列番号： 20 である。カニクイザルの成熟 Fc RIIIA 鎖は配列番号： 69 の配列を有する（表 23）。例 1 に記載のプライマーを用いて得られる細胞外断片は、表 23 に示すように、 1 ~ 187 のアミノ酸配列を有する。

【0099】

カニクイザルの Fc RIIIA 鎖の配列を、表 11 に示すように、ヒトの Fc RIIIA のアミノ酸配列と並べた（配列番号： 21 ）（登録番号 P 08637 ）。表 11 において、記号を付したアミノ酸の下部に示すアミノ酸番号は、シグナル配列を含まない成熟ヒトポリペプチドの開始点から番号付けられる。アミノ酸残基の上部に示す番号は、シグナル配列から開始する残基の番号付けを表す。ヒトおよびカニクイザルの Fc RIIIA の配列を並べると、該配列はヒトの配列に対し約 91% の配列同一性を有することが示される。このようにカニクイザルの配列をヒトの配列と並べることにより、カニクイザルの Fc RIIIA 鎖はヒトの Fc RIIIA 配列に認められるのとほぼ同数のアミノ酸を、シグナルペプチド、2 細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインに有することが示される（表 11）。カニクイザルおよびヒトの細胞内ドメインは双方とも ITAM モチーフを有さない。ヒトの Fc RIIIA に対する ITAM モチーフの活性化は会合する 鎖により付与され、カニクイザルの場合にも同様のことが生じる可能性が高い。

【0100】

カニクイザルの Fc RIIIA 鎖は、次の結合パターンによりサブクラスの IgG 六量体複合体に結合する。 IgG1 > IgG3 > > IgG2 > IgG4b, IgG4。アミノ酸 158 番に対応するアミノ酸にフェニルアラニンを有するヒトの Fc RIIIA イソフォーム（ F158 ）は、六量体の IgG サブクラスに次のように結合する。 IgG3 = IgG1 > > > IgG2, IgG4。アミノ酸 158 番に対応するアミノ酸にバリンを有するヒトの Fc RIIIA イソフォーム（ V158 ）は、六量体の IgG サブクラスに次のように結合する。 IgG1 > IgG3 > > > IgG2A, IgG4。アミノ酸配列番号： 20 を有するカニクイザルの Fc RIIIA は、アミノ酸 158 番に対応するアミノ酸位置にイソロイシンを有し、ヒトの Fc RIIIA の V158 と同様にヒト IgG のサブクラスに結合する。

【0101】

ヒト IgG1 は、ヒト Fc RIIIA - F158 に対してよりもヒト Fc RIIIA V158 に対する方が結合し易い（ Koene, H.R., Kleijer, M., Algra, J., Roos, D., von dem Borne, E.G.K. および de Hass, M. Blood 第 90 卷 1109 ~ 1114 頁 (1997 年), Wu, J., Edberg, J.C., Redecha, P.B., Bansal, V., Guyre, P.M., Coleman, K., Salmon, J.E. および Kimberly, R.P. J.Clin.Invest. 第 100 卷 1059 ~ 1070 頁 (1997 年), Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J.A. および Presta, L.G. J.Biol.Chem. 第 276 卷 6591 ~ 6604 頁 (2001 年) を参照）。ヒトにおいて、 Fc RIIIA F158 対立遺伝子は、少なくとも一つの Fc RIIIA F158 対立遺伝子を有するヒトの約 90% 占めるほどに優勢である（ Lehrnbecher, T., Foster, C.B., Zhu, S., Leitman, S.F., Goldin, L.R., Huppi, K. および Chanock, S.J. Blood 第 94 卷 4220 ~ 4232 頁 (1999 年) を参照）。加えて、近年の研究では特定の疾患と個人の Fc RIIIA

10

20

30

40

50

I A 多形性との相関関係を示し始めている(Wu, J., Edberg, J.C., Redecha, P.B., Bansal, V., Guyre, P.M., Coleman, K., Salmon, J.E. および Kimberly, R.P. J.Clin.Invest. 第100巻 1059 ~ 1070頁 (1997年)、 Lehrnbecher, T., Foster, C.B., Zhu, S., Venzon, D., Steinberg, S.M., Wyvill, K., Metcalf, J.A., Cohen, S.S., Kovacs, J., Yarchoan, R., Blauvelt, A. および Chanock, S. J. Blood 第95巻 2386 ~ 2390頁 (2000年)、 Nieto, A., Caliz, R., Pascual, M., Mataran, L., Garcia, S. および Martin, J. Arthritis & Rheumatism 第43巻 735 ~ 739頁 (2000年)を参照)。チ 10
ンパンジー および カニクイザル の Fc RI IIA が 158 番位置に それ ぞれ バリン、 イソロイシン を 有 す る こ と に 留 意 さ れ た い。 カニクイザル Fc RI IIA および ヒト Fc RI IIA V158 (ヒト Fc RI IIA F158 と 対 照 的 に) に 対 す る ヒト IgG の 4 サブ クラス の 結 合 能 が 類 似 し て い る と い う こ と は、 靈 長 類 モ デ ル に お い て ヒ ト 抗 体 を 評 価 す る に は、 Fc RI IIA レセプター に 關 し、 僅 か 少 数 の ヒ ト、 即ち Fc RI IIA V158 / V158 ホモ接合体 を 表 す 靈 長 類 モ デ ル の 説 明 が 必 要 で あ る と い う こ と が 示 唆 さ れ る。 例 え ば、 ヒ ト Fc RI IIA V158 は、 ヒ ト Fc RI IIA F158 に 比 し、 卓 越 し た 抗 体 依 存 性 細 胞 傷 害 性 (ADCC) を 示 す た め (Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J.A. および Presta, L.G. J.Biol.Chem. 第276巻 6591 ~ 6604頁 (2001年))、 靈 長 類 モ デ ル で は Fc RI IIA に 關 連 す る ヒ ト 抗 体 の エ フ ェ ク タ イ 機能 の 効 果 を 過 大 評 価 す る 可 能 性 が あ る。

【0102】

し か し、 カニクイザル の 他 の FcR_s、 特 に Fc RI に 対 す る ヒ ト IgG の サブ クラス の 結 合 パ た ー ン は、 Fc 領 域 結 合 分 子 の 安 全 性、 有 効 性 お よ び 薬 物 動 態 を 評 価 す る の に、 非 ヒ ト 靈 長 類 を 効 果 的 に 用 い 得 る こ と を 示 す。

【0103】

本 発 明 は FcR_n と 同 定 さ れ る Fc レセプター ポリペプチド も 提 供 す る。 表 14 に カニクイザル の FcR_n の アミノ酸 配 列 を 示 す。 表 14 に お い て、 アミノ酸 の 下 部 に 示 す と と も に 記 号 で 表 す 番 号 は、 成 熟 ポリペプチド の 開 始 点 か ら 番 号 付 け ら れ る。 2 対 立 遺 伝 子 が 同 定 さ れ、 こ れ を 表 14 に 示 す。 カニクイザル の FcR_n 鎖 は、 成 熟 ポリペプチド の 3 番 残 基 に お い て セ リ ン を 有 す る アミノ酸 配 列 配 列 番 号： 29 を 有 す る。 カニクイザル の FcR_n 鎖 は 配 列 番 号： 64 の 配 列 を 有 し、 成 熟 ポリペプチド の 3 番 残 基 に お い て アス 30
パ ラ ギン を 有 す る。 FcR_n 鎖 S3 お よ び FcR_n 鎖 N3 の 成 熟 ポリペプチド は、 そ れ ぞ れ 配 列 番 号： 71, 72 の 配 列 を 有 す る。 例 1 に 記 載 す る プ ラ イ マ ー を 用 い て 得 ら れ る よ う な FcR_n の 細 胞 外 断 片 は、 表 14 に 示 す よ う に、 1 ~ 274 の アミノ酸 配 列 を 有 す る。

【0104】

ヒ ト FcR_n 鎖 の 配 列 (配 列 番 号： 20) (GenBank 登 録 番 号 U12255) に 対 し、 カニクイザル FcR_n 鎖 の 配 列 を 整 列 さ せ る と、 カニクイザル の 配 列 は ヒ ト の 配 列 と 約 97% 同 一 で あ る こ と が 示 さ れ る。 カニクイザル の FcR_n (S3) お よ び FcR_n (N3) の 鎖 は、 次 の 結 合 パ た ー ン に て IgG の サブ クラス に 結 合 す る。 IgG3 >> IgG4 > IgG2 > IgG1。 該 結 合 パ た ー ン は ヒ ト FcR_n 鎖 の 結 合 パ た ー ン に 類 似 し て い る。

【0105】

本 発 明 は カニクイザル の 2 ミクログロブリン・ポリペプチド も 含 む。 表 13 に 示 す よ う に、 カニクイザル の 2 ミクログロブリン・ポリペプチド は 配 列 番 号： 25 を 有 す る。 成 熟 2 ミクログロブリン・ポリペプチド は 配 列 番 号： 70 を 有 す る。 カニクイザル の 2 ミクログロブリン 配 列 を ヒ ト の 2 ミクログロブリン (配 列 番 号： 26) (GenBank 登 録 番 号 P01884) 配 列 と 並 べ る と、 カニクイザル の 配 列 は ヒ ト 2 ミクログロブリン に 対 し 約 92% の 配 列 同 一 性 を 有 す る こ と が 示 さ れ る。

【0106】

変 異 体、 誘 導 体、 融 合 タンパク質、 お よ び FcR_s の 任 意 の 生 物 活 性 を 保 持 す る、 カニクイザル な ら び に チンパンジー の 異 な る Fc R ポリペプチド の 断 片 も、 本 発 明 の 範 囲 内

10

20

30

40

50

である。例3に後述するように、通常の当業者であれば、変異体、誘導体またはFc Rポリペプチドの断片を免疫グロブリン結合アッセイにかけることにより、変異体、誘導体またはFc Rポリペプチドの断片が活性を示すか否かを容易に判断でき得るということに留意されたい。

【0107】

カニクイザルおよびチンパンジーの異なるFc R_sの誘導体は、グリコシル基、ポリエチレン・グリコール(PEG)基、脂質、リン酸、アセチル基等の他の化学成分を用いて共有結合性または集合性の共役を形成することにより改変されたポリペプチドにすることが可能である。

【0108】

別の実施例において、本発明のポリペプチドは、例えば成熟ポリペプチドのアミノ酸残基のように、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインの一部もしくは全部を欠失したポリペプチドの断片を含む。該アミノ酸残基には次のようなものがある。配列番号：65のFc R_I鎖アミノ酸残基270～336番、配列番号：66のFc R_II Aアミノ酸残基183～282番、配列番号：67のチンパンジーFc R_II Aアミノ酸残基172～281番、配列番号：68のFc R_II Bアミノ酸残基185～252番、配列番号：69のFc R_II I A鎖アミノ酸残基188～234番、または配列番号：71もしくは配列番号：72のFc R_nアミノ酸残基275～342番。可溶性Fc Rポリペプチドは、ポリペプチドを產生する細胞からポリペプチドが分泌されているのであれば、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインの一部を含み得る。好ましくは、該断片はFc領域含有分子に結合可能である。

【0109】

ポリペプチド断片は、表10または表11にて同定されるポリペプチドの一つ以上のドメインも含み、これにはシグナルペプチド、ドメイン1、ドメイン2、ドメイン3、膜貫通/細胞内ドメイン、またはITAMモチーフもしくはITIMモチーフを含む細胞質ドメインが含まれる。ポリペプチドの典型的な断片は、対応する成熟Fc Rポリペプチドのアミノ酸配列のドメイン1、ドメイン2およびドメイン3のみを有する可溶性ポリペプチドも含む。例えば、該断片はカニクイザルFc R_Iのアミノ酸残基1～269番(表10)、カニクイザルFc R_II Aのアミノ酸残基1～182番(表21)、カニクイザルFc R_II Bのアミノ酸残基1～184番(表22)、カニクイザルFc R_II I Aのアミノ酸残基1～187番(表23)およびカニクイザルFc R_nのアミノ酸1～274番(表14)である。

【0110】

本発明の範囲内のカニクイザルまたはチンパンジーのFc R変異体は、控えめに置換された配列を有することがあるが、これは各ポリペプチドの一つ以上のアミノ酸残基が、ポリペプチドの二次及び/又は三次構造を改変しない、異なる残基に置換されることがある、ということである。該置換には、一つの脂肪族残基(Ile, Val, LeuまたはAla)を別の脂肪族残基に置換、または塩基性残基LysとArg、酸性残基GluとAsp、アミド残基GlnとAsn、ヒドロキシル残基SerとTyr、もしくは芳香族残基PheとTyrの間ににおける置換のような、類似の生理化学的特性を有する残基によるアミノ酸置換が含まれ得る。表現型的にサイレントなアミノ酸交換をすることに関する更なる情報は、BowieらScience第247巻1306～1310頁(1990年)に見出しえる。タンパク質の生物活性をほぼ保持する可能性がある他の変異体は、タンパク質の機能領域外の部位にてアミノ酸が置換されている変異体である。

【0111】

本発明は、カニクイザルおよびチンパンジーの変異型Fc Rポリペプチドも提供する。変異ポリペプチドは、例えば、配列番号：9, 15, 17, 18, 20, 25, 29または64のような未変性ポリペプチドと比較した場合、結果として生じる変異ポリペプチドにおいてアミノ酸の置換、付加および欠失を生じる、ポリペプチド配列の改変を含み得る。変異ポリペプチドの改変は、一つの脂肪族残基(Ile, Val, LeuまたはAla)

10

20

30

40

50

)と別の脂肪族残基の置換、または塩基性残基 L y s と A r g 、酸性残基 G l u と A s p 、アミド残基 G l n と A s n 、ヒドロキシル残基 S e r と T y r 、もしくは芳香族残基 P h e と T y r の間ににおける置換のように、類似の生理化学的特性を有する残基によりアミノ酸が置換されてしまう、核酸配列の改変を含み得る。本発明の変異ポリペプチド配列は、未変性配列の全長、シグナル配列を欠失したポリペプチド、ポリペプチドの細胞外ドメイン、または配列番号：9，15，17，18，20，25，29もしくは64の配列のF c レセプターもしくは2ミクログロブリンの断片に対し、好ましくは少なくとも約90%同一であり、より好ましくは少なくとも約91%同一であり、より好ましくは少なくとも約92%または93%同一であり、より好ましくは約94%同一であり、より好ましくは95%または96%同一であり、より好ましくは97%または98%同一であり、最も好ましくは少なくとも約99%同一である。

【0112】

本発明の別の実施例は、変異型のアミノ酸、ペプチドまたはポリペプチドに融合したポリペプチドである。該アミノ酸、ペプチドまたはポリペプチドは、好ましくはポリペプチドの精製を促進する。そのような機能に対して用いられて得られるペプチドの多くは、結合パートナーに対する融合タンパク質の選択的結合を可能にする。例えば、配列番号：9に示すような配列を有する、カニクイザルのF c R I ポリペプチドは、改変されてペプチド、即ちペプチドタグを有し、結合パートナーに特異的に結合する融合タンパク質を形成し得る。該ペプチドタグの非限定的例には、6-H i s タグ、G l y / H i s ₆ / G S T タグ、チオレドキシンタグ、ヘマグルチニンタグ、G l y 1 h 1 5 6 タグおよびO m p A シグナル配列タグが含まれる。本発明の全長ポリペプチド、変異ポリペプチドおよび切断ポリペプチドは、このような異種のアミノ酸、ペプチドまたはポリペプチドに融合し得る。例えば、カニクイザルF c R I A の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインは、H i s 2 7 1 として融合したG l y / H i s ₆ / G S T タグをコードするD N A により置換可能である。当業者には理解されるであろうが、ペプチドを認識するとともにペプチドに結合する結合パートナーは、任意の分子または化合物でよく、金属イオン（例えば金属アフィニティーカラム）、抗体もしくはこれらの断片、およびF L A G タグのようなペプチドに結合する任意のタンパク質もしくはペプチドを含む。本発明のポリペプチドは、抗体の免疫グロブリンの定常ドメインに融合され、イムノアドヘシン分子も形成し得る。

【0113】

本発明のポリペプチドは、好ましくは単離された形状にて提供され、好ましくは精製される。ポリペプチドは、硫酸アンモニウム沈殿またはエタノール沈殿、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水的相互作用クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法により、組換え細胞培養から回収・精製し得る。好ましい実施例において、精製には高速液体クロマトグラフィー(H P L C)が用いられる。

【0114】

ベクターおよび宿主細胞

本発明は、本発明のポリヌクレオチド分子を有するベクター、および該ベクターにより形質転換される宿主細胞にも関する。本発明のポリヌクレオチド分子はいずれもベクターに結合可能であり、通常、ベクターは宿主内にて増殖すべく、選択可能なマーカーおよび複製開始点を含む。宿主細胞は遺伝子操作され、本発明のポリペプチドを発現する。ベクターは、哺乳類、微生物、ウイルスまたは昆虫の遺伝子由来の調節配列のような、転写または翻訳の適切な調節配列に機能可能に連結した、上記または下記の任意のポリペプチドをコードするD N A を含む。調節配列の例には、転写プロモーター、転写オペレーター、転写エンハンサー、m R N A リボソーム結合部位、および転写ならびに翻訳を制御する適切な配列が含まれる。調節配列が標的タンパク質をコードするD N A に機能的に関連すると、ヌクレオチド配列は機能可能に連結する。従って、プロモーターのヌクレオチド配列がF c R 配列の転写を指示すれば、プロモーターのヌクレオチド配列は、カニクイザル

10

20

30

40

50

もしくはチンパンジーの F c R の D N A 配列、 F c R n 鎖の D N A 配列、または 2 ミクログロブリンの D N A 配列に機能可能に連結する。

【 0 1 1 5 】

本発明の非ヒト霊長類のレセプターの発現は、シグナル配列をコードする未変性核酸を除去し、または未変性核酸のシグナル配列を異種シグナル配列に置換することによって也可能である。異種シグナル配列は、ヒト F c レセプターポリペプチド、または組織プラスミノゲンアクチベーターのような他のポリペプチド由来のシグナル配列を含む。異種源由来のシグナル配列をコードする核酸は当業者には自明である。

【 0 1 1 6 】

本発明の標的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子のクローニングに用いるのに妥当なベクターを選択するには、ベクターが形質転換される宿主細胞、および、適用可能な場合、標的ポリペプチドが発現される宿主細胞により決定される。本発明のポリペプチドの発現に妥当な宿主細胞は、原核生物、酵母菌および高等真核生物の細胞を含み、該細胞の各々に関しては後述する。

【 0 1 1 7 】

本発明のカニクイザルまたはチンパンジーの機能性 F c R ポリペプチドを発現させるには、二つ以上のポリペプチド分子を同時に発現させるべく、宿主細胞の遺伝子操作が必要になる。前述したように、大部分の F c R s は、 I g G 結合およびシグナル変換ポリペプチド鎖の双方の発現を必要とする複合分子である。二つ以上のポリペプチド鎖複合体は機能性レセプターを形成する。上記のように、例えば、宿主細胞は、第一の選択マーカーを有し F c R I 鎖を発現させる第一のベクター、および第二の選択マーカーを有し F c R I 鎖を発現させる第二のベクターにより同時形質移入されよう。両ベクターを得るとともに両ポリペプチドを発現させる宿主細胞のみが生き残り、機能性 F c R I を発現させよう。標的宿主細胞にポリペプチド複鎖を同時形質移入する他の方法も想定され、これには同一ベクター由来の標的ポリペプチドの連鎖発現が含まれる。

【 0 1 1 8 】

上記のような宿主細胞に発現される、カニクイザルまたはチンパンジーの F c R 、 F c R n または 2 ミクログロブリンのポリペプチドは、異種タンパク質由来の領域を含む融合タンパク質でもよい。該領域は、例えば、ポリペプチドの分泌、安定性向上または精製促進を可能にするように含まれよう。例えば、妥当なシグナルペプチドをコードする配列を発現ベクターに組み込むことが可能である。シグナルペプチド（分泌リーダー）に対する D N A 配列が標的配列にインフレームに融合され、標的タンパク質が該シグナルペプチドを有する融合タンパク質として翻訳されよう。シグナルペプチドに対する D N A 配列はシグナルペプチドをコードする未変性核酸を置換し、またはこれに加えて未変性シグナルペプチド配列をコードする核酸配列を置換し得る。対象宿主細胞内にて機能するシグナルペプチドは、ポリペプチドの細胞外分泌を促進する。好ましくは、シグナル配列は細胞から分泌される際に標的ポリペプチドから切断される。本発明を実施するのに利用可能なシグナル配列の非限定的な例には、酵母菌の I 因子、および昆虫細胞 S f 9 中のミツバチのメラチンリーダーが含まれる。

【 0 1 1 9 】

本発明の標的ポリペプチドを発現させるのに妥当な宿主細胞は、原核生物、酵母菌および高等真核生物の細胞を含む。該ポリペプチドの発現に用いるのに妥当な原核生物宿主は、エシェリキア属、バシラス属ならびにサルモネラ属の細菌、およびシュードモナス属、ストレプトマイセス属ならびにスタフィロコッカス属のメンバーを含む。例えば大腸菌における発現には、標的ポリペプチドは原核生物宿主において組換えポリペプチドの発現を促進すべく、 N 末端のメチオニン残基を含むことがある。次に、 N 末端の Met が発現されたポリペプチドから任意に切断される。

【 0 1 2 0 】

通常、原核生物の宿主において用いられる発現ベクターは、一つ以上の選択可能な表現型マーカー遺伝子を有する。通常、該遺伝子は、例えば抗菌剤耐性または栄養要求量を付

10

20

20

30

40

50

与するタンパク質をコードする。この種のベクターは広範囲にわたり市販品から容易に入手可能である。この例として、pSPORTベクター、pGEMベクター(Promega社)、pPROEXベクター(LTI社、メリーランド州ベセズダ)、Bluescriptベクター(Stratagene社)およびpQEベクター(Qiagen社)が含まれる。

【0121】

カニクイザルまたはチンパンジーのFc R、Fc Rnまたは2ミクログロブリンは、サッカロマイセス属、ピキア属およびクリュイベロミセス属を含む酵母菌宿主細胞においても発現され得る。好ましい酵母菌宿主はサッカロマイセス・セレビシエおよびピキア・パストリスである。酵母菌のベクターは、2T酵母菌プラスミド由来の複製開始点、自己複製配列(ARS)、プロモーター領域、ポリアデニル化配列、転写終了配列、および選択可能なマークー遺伝子を有する場合が多い。酵母菌および大腸菌の双方において複製可能なベクター(シャトルベクターと呼ぶ)を用いることも可能である。酵母菌のベクターの上記特徴に加え、シャトルベクターは大腸菌において複製・選択配列も含む。酵母菌宿主において発現される標的ポリペプチドを直接分泌させるには、カニクイザルのFc Rをコードするヌクレオチド配列の5'末端において酵母菌のI因子リーダー配列をコードするヌクレオチド配列を含むことにより可能である。

【0122】

本発明のポリペプチドを発現させるには、昆虫の宿主細胞培養系を用いることも可能である。好ましい実施例において、本発明の標的ポリペプチドはバキュロウイルス発現系を用いて発現される。昆虫の細胞において異種タンパク質を発現させるバキュロウイルス系の利用に関する更なる情報については、LuckowおよびSummers Bio/Technology第6巻47頁(1988年)により検討されている。

【0123】

別の好ましい実施例において、カニクイザルFc Rポリペプチドは哺乳類宿主細胞において個々に発現される。妥当な哺乳類細胞株の非限定的な例には、サルの腎臓細胞CO-S-7(GluzmanらCell第23巻175頁(1981年))、チャイニーズハムスターの卵巣細胞(CHO)(PuckらProc. Natl. Acad. Sci. USA第60巻1275~1281頁(1958年))、CV 1およびヒト頸部癌細胞(HELA)(ATCC CCL 2)が含まれる。好ましくは、本発明の標的タンパク質の発現にはHEK293細胞が用いられる。

【0124】

本発明の標的ポリペプチドを発現させるのに妥当な発現ベクターを選択するには、使用する個々の哺乳類宿主細胞により決定されるのは当然であり、通常の当業者の技術範囲内である。妥当な発現ベクターの例には、pCDNA3.1/Hygro(Invitrogen社)、409およびpSVL(Pharmacia Biotech社)が含まれる。カニクイザルFc Rポリペプチドを発現させるのに好ましいベクターは、pRKである。Eaton,D.L., Wood, W.I., Eaton,D., Hass,P.E., Hollingshead,P., Wion,K., Mather,J., Lawn,R.M., Vehar,G.A.およびGorman,C. Biochemistry第25巻8343~47頁(1986年)を参照。哺乳類宿主細胞において用いられる発現ベクターは、ウイルスゲノム由来の転写・翻訳制御配列を含み得る。本発明において用いられ得る、一般的に用いられるプロモーター配列およびエンハンサー配列は、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)、アデノウイルス2型、ポリオーマウイルスおよびシミアンウイルス40(SV40)を含むが、これに限定されるものではない。哺乳類発現ベクターの作製法は、例えばOkayamaおよびBerg(Mol. Cell. Biol.第3巻280頁(1983年))、Cosmanら(Mol. Immunol.第23巻935頁(1986年))、およびCosmanら(Nature第312巻768頁(1984年))により開示されている。

【0125】

Fc領域含有分子の生物特性、安全性および有効性の評価法

本発明の一態様は、靈長類においてインビオで評価する前に、カニクイザルまたはチンパンジーのFcレセプターと、ヒト化抗体のようなFc R結合分子の薬物動態/薬力を評価する方法を含む。本発明の該態様は、カニクイザルおよびチンパンジーのFc RポリペプチドがヒトFcレセプターポリペプチドとの高度な配列同一性を有し、同様にしてIg Gサブクラスに結合するという知見に基づく。評価には、例えばELISA法型アッセイ

10

20

30

40

50

にて任意のサブクラスのヒト化抗体（特に治療に役立つ見込みのある抗体）を本発明の標的 F c レセプターに接触させ、または過渡的に発現する細胞に曝す試験を含み得る。

【 0 1 2 6 】

本発明の一方法は、F c 領域含有分子をカニクイザルまたはチンパンジーの F c レセプターポリペプチドに接触させることにより、カニクイザルまたはチンパンジーの F c レセプターポリペプチドに対する F c 領域含有ポリペプチドまたは薬剤の結合評価を伴う。カニクイザルまたはチンパンジーの F c レセプターポリペプチドは可溶性で良く、または過渡的に感染した細胞上に膜結合タンパク質として発現可能である。カニクイザルまたはチンパンジーの F c レセプターポリペプチドに対する F c 領域含有分子の結合能は、靈長類においてインビボに評価する上で F c 領域含有分子またはポリペプチドが妥当であることを示す。カニクイザル F c R n 分子に対する結合能は、F c 領域含有分子またはポリペプチドがインビボで半減期が延びることを示す。

【 0 1 2 7 】

本発明は、生物特性、安全性および薬物動態の点から、抗体変異体のような F c 領域含有分子変異体のスクリーニングも提供する。通常、抗体変異体は一つ以上の残基において改変されており、次に該変異体は F c レセプターに対する結合親和性の変化を含む生物活性上の変化につき解析される。変異体による生物活性変化のスクリーニングは、インビボおよびインビトロの双方にて試験可能である。例えば、本発明のレセプターポリペプチドは、E L I S A 法型アッセイまたは過渡的感染細胞において用い得る。F c R I I 、F c R I I I または F c R n または F c R I I A または F c R I I B の鎖のような、カニクイザル及び／又はチンパンジーの F c R ポリペプチドに結合する抗体変異体は、治療薬として靈長類におけるインビボ評価に妥当な変異体である。

【 0 1 2 8 】

異なる F c 領域含有分子間における直接結合および結合親和性の判定は、好ましくはカニクイザル F c R ポリペプチドの可溶性細胞外ドメインに対して為される。例えば、標的 F c R の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインは、G l y - H i s₆ タグまたはグルタチオン S トランスフェラーゼ (G S T) をコードする DNA に置換され得る（例 3 を参照）。G l y - H i s₆ タグまたは G S T は、レセプターの F c 結合領域を固定化する簡便な方法を提供し、レセプターと標的抗体変異体との結合親和性の同定及び／又は判定に有用である。利用可能なアッセイは、E L I S A 法型アッセイ、共沈殿型アッセイ、およびカラムクロマトグラフィー型アッセイを含む。同定された F c 領域含有分子はカニクイザルの可溶性 F c R と直接相互作用し、対応するヒト F c R に比し、カニクイザル F c R に対して同等以上の結合親和性を有する。

【 0 1 2 9 】

本発明の別の態様は、I T A M 及び／又は I T I M 領域を有するカニクイザル F c R に対する結合能が変化した薬剤を同定する方法を提供する。本発明の一方法は、I T A M 領域を有する F c R に対し結合親和性が向上し、I T I M 領域を有する F c R に対し親和性が低下した薬剤の同定を伴う。

【 0 1 3 0 】

標的薬剤は、F c 領域を有する分子、好ましくは抗体、より好ましくは I g G 抗体を含む。標的薬剤が抗体であれば、抗体の未変性配列に比し、改変されたアミノ酸配列を有する変異抗体となり得る。好ましくは、変異抗体は、F c レセプターに対する結合能に関連する抗体の領域にアミノ酸置換が生じており、該置換にはヒト I g G のアミノ酸 226 ~ 436 番に対応するアミノ酸が含まれる。前述したような部位特異性オリゴヌクレオチドまたは P C R 媒介法のような標準方法により、変異抗体は調製可能である。変異抗体の例には、Shields ら J. Biol. Chem. 第 276 卷 6591 頁 (2001 年) に記載のように調製される、ヒト IgG1 のアラニン変異体、抗 IgE E27 が含まれる。

【 0 1 3 1 】

抗体及び／又は変異抗体の結合親和性は、Shields ら J. Biol. Chem. 第 276 卷 6591 頁 (2001 年)、および後述する例 3 ~ 7 に記載のような標準方法により判定される。好ましくは、

10

20

30

40

50

結合親和性は、解析される型の Fc レセプターを発現させる細胞に対する結合能により判定される。しかし、抗体またはFc領域含有分子の結合親和性は、可溶性Fc レセプターまたは宿主細胞に発現されるとともに宿主細胞から分泌されるFc レセプターを用いて判定される。

【0132】

ヒトFc RI IA に比し、カニクイザルFc RI IA に対する親和性が向上した変異抗体は、ヒトIgG1のアミノ酸298番に対応する位置にてアミノ酸配列が改変されている抗体である。この種の一変異体はセリンからアラニンまでの位置に改変が生じ、S298Aと表される。該位置に改変が生じている別の変異抗体はS298A/E333A/K334と表され、未変性配列のIgG1のアミノ酸298, 333および334番に對応する位置にてアラニンを有する変異抗体である。この種の変異抗体はヒトFc RI IA に比し、カニクイザルFc RI IA に対する結合親和性が向上している。

【0133】

本発明の別の方法において、ヒトFc RI IB に比し、カニクイザルFc RI IB に対する結合親和性が変化した標的薬剤が同定される。好ましくは、該薬剤は未変性配列抗体の変異体である。結合親和性は上記および後述の例に示すように判定される。Fc RI IB に対する結合能が向上した薬剤は、ITIM抑制機能を選択的に刺激する。カニクイザルFc RI IB に対する親和性が低下した薬剤は、抑制機能の刺激作用が低下し得る。

【0134】

ヒトFc RI IB に比し、カニクイザルFc RI IB に対する結合親和性が低下した変異抗体は、R255A, E258A, S37A, D280A およびR301Mである。

【0135】

本発明の別の実施例は、ITAMを有するFc レセプターを活性化し得るがITIM領域を有するFc レセプターには結合しない薬剤を同定すべく、変異抗体S298AまたはS298A/E333A/K334の使用を伴う。

【0136】

S298A およびS292A/E333A/K334変異抗体は、カニクイザルFc RI IA に対する結合親和性が向上し、カニクイザルFc RI IB に対する結合親和性が低下する。この種の方法はインビボまたはインビトロで実施可能である。

【0137】

この種の方法は、ITAM領域を有するFc R ポリペプチド、好ましくはヒトおよびカニクイザルのFc R に対する抗体の結合能を向上させ、及び/又はITIM領域を有するFc R に対する結合親和性を低下させるべく、改変可能な未変性配列抗体のアミノ酸位置を同定するのに有用である。同定位置におけるアミノ酸配列の改変は、標準方法により調製可能である。

【0138】

以上、本発明の概要を記載したが、例として提供したのであって限定的ではない次の例を参照することにより、前記内容がより容易に理解されよう。

【実施例】

【0139】

実施例1：カニクイザル・チンパンジーのFcレセプターDNAおよび2ミクログロブリンの分子クローニング

材料および方法：

カニクイザルFc R のクローニング

カニクイザルDNAはヒトDNAに対し約90%の相同性を有するため、対応するヒトレセプターの配列に基づき、各Fc R に対する一連のPCRプライマーが設計された。各センスプライマーはコード化領域の5'直近部位、またはコード化領域の開始点にて開始する。アンチセンスプライマーも同様に、即ちC末端の停止コドンの3'直近、またはC末端

10

20

40

50

の停止コドンにて開始するように設計された。プライマーは、P C R 産物をpRKベクターにサブクローニングするのに用いられるエンドヌクレアーゼ制限部位を組み込んだ(Eatonら)。このプライマーの配列は、表 1 に示されている。

【 0 1 4 0 】

表 1

制限部位に下線

レセプター	カニクイザル Fc_YRI 完全長	
フォワードプライマー	CAGGTCAATCT<u>CTAGACT</u>CCCACCAGCTGGAG	10 (配列番号:31)
リバースプライマー	GGTCAACTATA<u>AAGCTT</u>GGACGGTCCAGATCGAT	 (配列番号:32)
制限部位	Xba I/ Hind III	
レセプター	カニクイザル Fc_YRI-H6-GST	
フォワードプライマー	CAGGTCAAT<u>CATCGAT</u>ATGTGGTTCTGACAGCT	 (配列番号:33)
リバースプライマー	GGTCAACTAT<u>GCTAGC</u>ATGGTGATGATGGTGGTGC AGACAGGAGTTGGTA	20 (配列番号:34)
制限部位	Cl I/ Nhe I	
レセプター	カニクイザル Fc_YRIIB 完全長	
フォワードプライマー	CAGGTCAATCT<u>CTAGA</u>ATGGGAATCCTGTCATTCTT	 (配列番号:35)
リバースプライマー	GGTCAACTATA<u>AAGCTT</u>CTAAATACGGTTCTGGTC	30 (配列番号:36)
制限部位	Xba I/ Hind III	
レセプター	カニクイザル Fc_YRIIB-H6-GST	
フォワードプライマー	CAGGTCAAT<u>CATCGAT</u>ATGCTTCTGTGGACAGC	 (配列番号:37)
リバースプライマー	GGTCAACTAT<u>GGTGACCT</u>ATCGGTGAAGAGCTGC	40 (配列番号:38)
制限部位	Cl I/ Bst EII	

レセプター	カニクイザル FcγRIIA 完全長	
フォワードプライマー	CAGGTCAATCT<u>CTAGA</u>ATGTGGCAGCTGCTCCT (配列番号:39)	
リバースプライマー	TCAACTATA<u>AAGCTT</u>ATGTTCAGAGATGCTGCTG (配列番号:40)	
制限部位	Xba I/ Hind III	
レセプター	カニクイザル FcγRIIA-H6-GST	10
フォワードプライマー	CAGGTCAATCT<u>CTAGA</u>ATGTGGCAGCTGCTCCT (配列番号:41)	
リバースプライマー	GGTCAACTAT<u>GGTCAC</u>CTTGGTACCCAGGTGGAAA (配列番号:42)	
制限部位	Xba I/ Bst EII	
レセプター	カニクイザル Fcγ 鎖	
フォワードプライマー	CAGGTCAATCATCGAT<u>GAATTCCCACCATGATTCCA</u> GCAGTGGTC	20
リバースプライマー	(配列番号:43)	
	GGTCAACTATA<u>AAGCTT</u>ACTGTGGTGGTTCTCA (配列番号:44)	
制限部位	Eco RI/ Hind III	
レセプター	カニクイザル β-2 ミクログロブリン	
フォワードプライマー	CAGGTCAAT<u>CATCGATT</u>CGGGCCGAGATGTCT (配列番号:45)	30
リバースプライマー	GGTCAACTAT<u>TCTAGATT</u>ACATGTCTCGATCCCA (配列番号:46)	
制限部位	Cl I/ Xba I	
レセプター	カニクイザル FcγRIIA 完全長	
フォワードプライマー	CAGGTCAATCT<u>CTAGA</u>ATGTCTCAGAATGTATGTC (配列番号:47)	
リバースプライマー	GGTCAACTATA<u>AAGCTT</u>AGTTATTACTGTTGTCATA (配列番号:48)	40
制限部位	Xba I/ Hind III	

レセプター カニクイザル **Fc γ RIIA-H6-GST**
 フォワードプライマー **CAGGTCAATCATCGATATGTCTCAGAATGTATGTC**
 (配列番号:49)
 リバースプライマー **GGTCAACTATGGTGACCCATCGGTGAAGAGCTGC**
 (配列番号:50)
 制限部位 **Clal/BstEII**

レセプター カニクイザル **FcRn** 完全長 10
 フォワードプライマー **CAGGTCAATCATCGATAGGTCGTCCTCTCAGC**
 (配列番号:51)
 リバースプライマー **GGTCAACTATGAATTCTCGGAATGGCGGATGG**
 (配列番号:52)
 制限部位 **Clal/EcoRI**

レセプター カニクイザル **FcRn-H6**
 フォワードプライマー **CAGGTCAATCATCGATAGGTCGTCCTCTCAGC** 20
 (配列番号:53)
 リバースプライマー **GGTCAACTATGAATTCATGGTGATGATGGTGGTGCG**
AGGACTTGGCTGGAGTTTC
 (配列番号:54)
 制限部位 **Clal/EcoRI**

【0141】

表1に示すようなプライマーを用い、オリゴ(dT)の初回刺激を受けたRNAの逆転写酵素PCR法(GeneAmp, PerkinElmer Life Sciences社)により、カニクイザルの脾臓細胞からFcRに対するcDNAを単離した。EatonらBiochemistry第25巻8343~8347頁(1986年)に記載のように、cDNAは前述のpRK哺乳類細胞の発現ベクターにサブクローニングした。製造者の指示に従い、カニクイザルの脾臓由来のcDNAベクターライブリ200ng、およびExTaq Premix(Panvera社、ウィスコンシン州マジソン)を用い、PCR反応を設定した。90°で30秒間変性させた後、55°で1分間のアニーリングにて25サイクルを行い、72°で3分間伸長させ、98°で30秒間変性させた。予想サイズ(Fc RI, Fc RIIIA, FcRn:1100塩基対、Fc RIIA, Fc RIIB:1000塩基対、Fc鎖:300塩基対、-2ミクログロブリン:400塩基対)にて移動するDNAバンドを単離し、pRKベクターにクローニングし、次に大腸菌XL1-Blue(Stratagene社、カリフォルニア州サンディエゴ)に形質転換した。個々のクローンを選別し、Qiagen mini-prep DNAキット(Qiagen社、カタログNo.27106)を用い、各クローンの二重鎖DNAを精製した。Big-Dye Terminator Cycleシーケンシングキット(Applied Biosystems社、カリフォルニア州フォスター・シティ)を用い、Applied Biosystems377型シーケンサーにDNAシーケンシングを行った。

【0142】

Fc RIIIAに対する初回のPCR反応ではPCR産物を示さなかった。カニクイザルにFc RIIIAが存在するか否かを判定すべく、ヒトFc RIIIA、ヒトFc RIIBおよびカニクイザルFc RIIBの間に保存された領域にセンスプライマーを設計した(0F1、表2)。ヒトFc RIIIAのITAMをコードする領域の共通配列に基づき、アンチセンスプライマーを設計した(0R1、表2)。上記二つのPCRプライマー(0F1, 0R1)および上記のPCRプロトコルを用い、約700塩基対のPCR産物を得た。上記のようにPCRバンドを単離し、pRKベクターにサブ

クローニングし、個々のクローンを単離し、シークエンスした。配列解析により、断片はヒトFc RIIAに対し90%の同一性を有することが示された。

【0143】

レセプターの5'末端におけるDNA配列を決定すべく、入れ子PCR (nested PCR) 反応を用いた。入れ子PCR反応の第一段階として、センスPCRプライマー(OF2、表2)をベクタークローニング部位のpRKベクター5'に固着するように設計した。該プライマーをリバースプライマーOR1と共に用いた。上記のようなcDNAライブラリにPCR反応を実施し、産物を1:500にて希釈し、入れ子PCR反応の第二段階用テンプレートとして1μL用いた。プライマーOF2がcDNAライブラリの全てのメンバーに固着すると考えられる事実により(全てのメンバーが別のpRKベクターにクローニングされている)、僅か少量のPCR断片が得られ、従ってこれを第二段階の增幅用テンプレートとして用いた。第二段階用のセンスプライマー(OF3、表2)をOF2のpRKベクター配列3'に固着するように設計し、リバースプライマー(OR2、表2)は上記のように決定したFc RIIAの部分配列に基づいた。入れ子PCR反応の第二段階は約600塩基対のバンドを示した。上記のように該バンドを単離し、個々のクローンを調製しシークエンスした。

10

【0144】

レセプターの3'末端におけるDNA配列を同様に決定した。Fc RIIA断片の配列から設計したフォワードプライマーOF4、およびFc RIIA端部からpRKベクター3'に固着するように設計したリバースプライマーOR3を用い、cDNAライブラリに初回のPCR反応を実施した。結果的に生じた断片は入れ子PCR反応の第二段階用テンプレートとして用いた。第二段階では、Fc RIIA断片の配列から設計したフォワードプライマーOF5、およびプライマーOR3からpRKベクター5'に固着するように設計したリバースプライマーOR4を用いた。入れ子PCR反応の第二段階は約800塩基対のバンドを示した。上記のように該バンドを単離し、個々のクローンをシークエンスした。入れ子PCR反応から得た情報に基づき、Fc RIIA全長に対するPCRプライマーを設計した。他の全てのレセプターにつき記載した方法により、Fc RIIA全長をクローニングした。表2に上記プライマーの配列を示す。

20

【0145】

表2

OF1 CAGGTCAATCTCTAGACAGTGGTCCACAATGG (配列番号:55)

30

OR1 GGTCAACTATAAGCTTAAGAGTCAGGTAGATGTTT (配列番号:56)

OF2 CAGGTCAATC TCTAGA ATACATAACCTTATGTATCAT (配列番号:57)

OF3 CAGGTCAATC TCTAGA TATAGAATAACATCCACTTTG (配列番号:58)

OR2 GGTCAACTAT AAGCTT CAGAGTCATGTAGCCG (配列番号:59)

OF4 CAGGTCAATC TCTAGA ATTCCACTGATCCTGTGAA (配列番号:60)

OR3 GGTCAACTAT AAGCTT GCTTTATTGTGAAATTGTG (配列番号:61)

OF5 CAGGTCAATC TCTAGA ACTTGGACGTCAAACGATT (配列番号:62)

OR4 GGTCAACTAT AAGCTT CTGCAATAACAAGTTGGG (配列番号:63)

40

【0146】

実施例2: カニクイザル、チンパンジーおよびヒトのFc Rのヌクレオチド・アミノ酸配列のアラインメント

ヒト、カニクイザルおよびチンパンジー由来FcRポリペプチドのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を並べ、配列同一性率を算出した。

【0147】

靈長類およびヒトのタンパク質のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を手作業にて並べ、ヌクレオチドまたはタンパク質配列における相違に留意した。同一性率は[同一残基数]/[総残基数]として計算した。配列が総残基数で異なる場合には、総残基に対し二つの異なる

50

る番号を用い、同一性率に対し2値を付与する。ヌクレオチド配列はシグナル配列のコード化配列から開始する。

【 0 1 4 8 】

ヒト(配列番号:2)およびカニクイザル(配列番号:1)のFc RI 鎖の核酸配列を後述の表3に示す。ドットはヌクレオチド配列の相違位置を示す。配列同一性率の解析により、Fc RI 鎖をコードするヒトとカニクイザルのヌクレオチド配列は、3'伸展のヌクレオチドが算出に含まれるか否かにより、約91%または96%の配列同一性を有することが示される。

【 0 1 4 9 】

表 3

ヒトおよびカニクイザルの高親和性Fc γ RI DNAのアラインメント

重複1074中1030の一致：95.9% 同一性

重複1128中1030の一致：91.3% 同一性

ヒト	ATGTGGTTCTGACAACTCTGCTCCTTGGGTTCCAGTTGATGGCAAGT	10	20	30	40	50	
カニクイザル	ATGTGGTTCTGACAGCTCTGCTCCTTGGGTTCCAGTTGATGGCAAGT		•				10
ヒト	GGACACCAAAAGGCAGTGATCACTTGACGCCTCCATGGGTCAGCGTGT	60	70	80	90	100	
カニクイザル	GGATACCAAAAGGCAGTGATCACTTGACGCCTCCATGGGTCAGCGTGT		•				
ヒト	TCCAAGAGGAAACCGTAACCTTGCACTGTGAGGTGCTCCATCTGCCTGG	110	120	130	140	150	
カニクイザル	TCCAAGAGGAAACTGTAACCTTACAGTGTGAGGTGCCCCGTCTGCCTGG		•	•	•	•	
ヒト	AGCAGCTCTACACAGTGGTTCTCAATGGCACAGCCACTCAGACCTCGAC	160	170	180	190	200	
カニクイザル	AGCAGCTCCACACAGTGGTTCTCAATGGCACAGCCACTCAGACCTCGAC		•				20
ヒト	CCCCAGCTACAGAATCACCTCTGCCAGTGTCAATGACAGTGGTGAATACA	210	220	230	240	250	
カニクイザル	TCCCAGCTACAGAATCACCTCTGCCAGTGTCAAGGACAGTGGTGAATACA		•		•		
ヒト	GGTGCCAGAGAGGTCTCTCAGGGCGAAGTGACCCATACAGCTGGAAATC	260	270	280	290	300	
カニクイザル	GGTGCCAGAGAGGTCCCTCAGGGCGAAGTGACCCATACAGCTGGAAATC		•				30
ヒト	CACAGAGGCTGGCTACTACTGCAGGTCTCCAGCAGAGTCTTCACGGAAGG	310	320	330	340	350	
カニクイザル	CACAGAGACTGGCTACTACTGCAGGTATCCAGCAGAGTCTTCACAGAAGG		•		•		
ヒト	AGAACCTCTGGCCTTGAGGTGTCATGCGTGGAAAGGATAAGCTGGTGTACA	360	370	380	390	400	
カニクイザル	AGAACCTCTGGCCTTGAGGTGTCATGCAATGGAAGGATAAGCTGGTGTACA		•				
ヒト	ATGTGCTTACTATCGAAATGGCAAAGCCTTAAGTTTCACTGGAAT	410	420	430	440	450	
カニクイザル	ATGTGCTTACTATCAAATGGCAAAGCCTTAAGTTTCACTGGAAT		•		•	•	40
ヒト	TCTAACCTCACCATTCTGAAAACCAACATAAGTCACAATGGCACCTACCA	460	470	480	490	500	
カニクイザル	TCTCAACTCACCATTCTGAAAACCAACATAAGTCACAACGGCGCTACCA		•	•	•	•	

ヒト	510	520	530	540	550	
	TTGCTCAGGCATGGGAAAGCATCGCTACACATCAGCAGGAATATCTGTCA					
	•				•	
カニクイザル	CTGCTCAGGCATGGGAAAGCATCGCTACACATCAGCAGGAGTATCTGTCA					
ヒト	560	570	580	590	600	
	CTGTGAAAGAGCTATTCAGCTCCAGTGCTGAATGCATCTGTGACATCC					
	•				•	
カニクイザル	CTGTGAAAGAGCTATTCAGCTCCAGTGCTGAATGCATCCGTGACATCC					
ヒト	610	620	630	640	650	
	CCACTCCTGGAGGGAACTGGTCACCCCTGAGCTGTGAAACAAAGTTGCT					
	•				•	
カニクイザル	CCGCTCCTGGAGGGAACTGGTCACCCCTGAGCTGTGAAACAAAGTTGCT					
ヒト	660	670	680	690	700	
	CTTGAGAGGCCTGGTTGCAGCTTACTTCTCCTTACATGGCAGCA					
	••				••	
カニクイザル	TCTGCAGAGGCCTGGTTGCAGCTTACTTCTCCTTACATGGCAGCA					
ヒト	710	720	730	740	750	
	AGACCCCTGCGAGGCAGGAACACATCCTCTGAATACCAAATACTAACTGCT					
	•				•	
カニクイザル	AGACCCCTGCGAGGCAGGAACACATCCTCTGAATACCAAATACTAACTGCT					
ヒト	760	770	780	790	800	
	AGAAGAGAAGACTCTGGTTACTGGTGCAGGCTGCCACAGAGGATGG					
	•				••	
カニクイザル	AGAAGAGAAGACTCTGGTTACTGGTGCAGGCCACACAGAAGACGG					
ヒト	810	820	830	840	850	
	AAATGTCCTTAAGCGCAGCCCTGAGTTGGAGCTCAAGTGCTTGGCCTCC					
カニクイザル	AAATGTCCTTAAGCGCAGCCCTGAGTTGGAGCTCAAGTGCTTGGCCTCC					
ヒト	860	870	880	890	900	
	AGTTACCAACTCCTGTCTGGTTCATGTCCTTCTATCTGGCAGTGGGA					
	•				•	
カニクイザル	AGTTACCAACTCCTGTCTGGCTTATGTCCTTCTATCTGGTAGTGGGA					
ヒト	910	920	930	940	950	
	ATAATGTTTTAGTGAACACTGTTCTGGGTGACAATACGTAAAGAACT					
カニクイザル	ATAATGTTTTAGTGAACACTGTTCTGGGTGACAATACGTAAAGAACT					
ヒト	960	970	980	990	1000	
	GAAAAGAAAGAAAAAGTGGATTAGAAATCTCTGGATTCTGGTCATG					
	•				•	
カニクイザル	GAAAAGAAAGAAAAAGTGGATTAGAAATCTCTGGATTCTGGTCATG					
ヒト	1010	1020	1030	1040	1050	
	AGAAGAAGGTAATTCCAGCCTCAAGAAGACAGACATTAGAAGAAGAG					
	•				•	
カニクイザル	AGAAGAAGGTAATTCCAGCCTCAAGAAGACAGACATTAGAAGAAGAG					

10

20

30

40

ヒト	1060 1070 1080 1090 1100
	CTGAAATGTCAGGAACAAAAAGAAGAACAGCTGCAGGAAGGGGTGCACCG
	• • •
カニクイザル	CTGAAGAGTCAGGAACAAAGAATAA
ヒト	1110 1120
	GAAGGAGCCCCAGGGGCCACGTAGCAG 3' 伸展

【0150】

表3に示すヒトDNA配列はGenBank登録番号L03418を有する。Porges,A.J.,Redecha,P.B.,Doebele,R.,Pan,L.C.,Salmon,J.E.およびKimberly,R.P.,Novel Fc gamma receptor 10 I family gene products in human mononuclear cells,J.Clin.Invest.第90巻2 102~2109頁(1992年)を参照。

【0151】

ヒト(配列番号:14)およびカニクイザル(配列番号:13)のガンマ鎖をコードする核酸配列のアラインメントを表4に示す。

【0152】

配列同一性率の解析により、ヒトとカニクイザルのFc RI/IIIガンマ鎖をコードする核酸配列は、約99%の同一性を有することが示される。

【0153】

表4

20

ヒトおよびカニクイザルのガンマ鎖DNAのアラインメント

重複261中258の一致:98.9% 同一性

ヒト	10 20 30 40 50
	ATGATTCCAGCAGTGGTCTGCTCTTACTCCTTTGGTTAACAAAGCAGC
カニクイザル	ATGATTCCAGCAGTGGTCTGCTCTTACTCCTTTGGTTAACAAAGCAGC
ヒト	60 70 80 90 100
	GGCCCTGGGAGAGCCTCAGCTCTGCTATATCCTGGATGCCATCCTGTTTC
カニクイザル	GGCCCTGGGAGAGCCTCAGCTCTGCTATATCCTGGATGCCATCCTGTTTC
ヒト	110 120 130 140 150
	TGTATGGAATTGTCCTCACCCCTCTACTGTCGACTGAAGATCCAAGTG
カニクイザル	TGTATGGAATTGTCCTCACCCCTCTACTGTCGACTGAAGATCCAAGTG
ヒト	160 170 180 190 200
	CGAAAGGCAGCTATAACCAGCTATGAGAAATCAGATGGTGTACACGGG
カニクイザル	CGAAAGGCAGCTATAGCCAGCTATGAGAAATCAGATGGTGTACACGGG
ヒト	210 220 230 240 250
	CCTGAGCACCAGGAACCAGGAGACTTACGAGACTCTGAAGCATGAGAAC
カニクイザル	CCTGAGCACCAGGAACCAGGAAACTTATGAGACTCTGAAGCATGAGAAC
ヒト	260
	CACCAACAGTAG
カニクイザル	CACCAACAGTAG

【0154】

50

ヒトガンマ鎖のDNA配列はGenBank登録番号M33195 J05285として表される。Kuester, H., Thompson, H. および Kinet, J.-P., Characterization and expression of the gene for the human receptor gamma subunit: Definition of a new gene family, J. Biol. Chem. 第265巻 6448 ~ 6452頁(1990年)を参照。

【0155】

Fc RIIAをコードするヒト(配列番号:4)、チンパンジー(配列番号:22)およびカニクイザル(配列番号:3)の核酸配列のアラインメントを表5に示す。%配列同一性の分析により、Fc RIIAをコードするヒトの配列およびカニクイザルの配列が約94%の配列同一性を有していることが示された。Fc RIIAをコードするチンパンジーの配列とヒトの配列を比較したところ、約99%の配列同一性を有していた。

10

【0156】

表5

ヒト、カニクイザルおよびチンパンジーの低親和性Fc γ RIIA DNAのアラインメント

ヒト/カニクイザル 重複933中878の一一致: 94.1% 同一性

3スクレオチドのギャップなし

重複936中878の一一致: 93.8% 同一性

3スクレオチドのギャップあり

ヒト/チンパンジー 重複933中924の一一致: 99.0% 同一性

3スクレオチドのギャップなし

重複936中924の一一致: 98.7% 同一性

3スクレオチドのギャップあり

20

	10	20	30	40	50	
チンパンジー	ATGTCTCAGAATGTATGTCCCAGAACCTGTGGCTGCTTCAACCATTGAC					
ヒト	ATGTCTCAGAATGTATGTCCCAGAACCTGTGGCTGCTTCAACCATTGAC	• •				
カニクイザル	ATGTCTCAGAATGTATGTCCCGGAAACCTGTGGCTGCTTCAACCATTGAC					
		60	70	80	90	100
チンパンジー	AGTTTTGCTGCTGCTGGCTTCTGCAGACAGTCAAGCT---GCTCCCCCAA	• • •				
ヒト	AGTTTTGCTGCTGCTGGCTTCTGCAGACAGTCAAGCTGCAGCTCCCCCAA		•	• • •		
カニクイザル	AGTTTTGCTGCTGCTGGCTTCTGCAGACAGTCAAACCT---GCTCCCCCGA				•	

30

チンパンジー	110	120	130	140	150	
	AGGCTGTGCTGAAACTTGGAGCCCCGTGGATCAACGTGCTCCAGGAGGAC					
ヒト	AGGCTGTGCTGAAACTTGGAGCCCCGTGGATCAACGTGCTCCAGGAGGAC					
カニクイザル	AGGCTGTGCTGAAACTCGAGCCCCGTGGATCAACGTGCTCCGGGAGGAC					•
チンパンジー	160	170	180	190	200	
	TCTGTGACTCTGACATGCCGGGGGCTCGCAGCCCTGAGAGCGACTCCAT					
ヒト	TCTGTGACTCTGACATGCCAGGGGGCTCGCAGCCCTGAGAGCGACTCCAT					•
カニクイザル	TCTGTGACTCTGACGTGCGGGGGCGCTCACAGCCCTGACAGCGACTCCAC					•
チンパンジー	210	220	230	240	250	
	TCAGTGGTTCCACAATGGGAATCTCATCCCCACCCACACGCAGCCCAGCT					
ヒト	TCAGTGGTTCCACAATGGGAATCTCATCCCCACCCACACGCAGCCCAGCT					•
カニクイザル	TCAGTGGTTCCACAATGGGAATCGCATCCCCACCCACACACAGCCCAGCT					•
チンパンジー	260	270	280	290	300	
	ACAGGTTCAAGGCCAACACAATGACAGCGGGAGTACACGTGCCAGACT					
ヒト	ACAGGTTCAAGGCCAACACAATGACAGCGGGAGTACACGTGCCAGACT					•
カニクイザル	ACAGGTTCAAGGCCAACACAATGATAGCGGGAGTACAGGTGCCAGACT					•
チンパンジー	310	320	330	340	350	
	GGCCAGACCAGCCTCAGCGACCCTGTGCATCTGACTGTGCTTCCGAATG					
ヒト	GGCCAGACCAGCCTCAGCGACCCTGTGCATCTGACTGTGCTTCCGAATG					•
カニクイザル	GGCCGGACCAGCCTCAGCGACCCTGTGCATCTGACTGTGCTTCTGAGTG					•
チンパンジー	360	370	380	390	400	
	GCTGGTGCTCCAGACCCCTCACCTGGAGTTCCAGGAGGGAGAAACCATCG					
ヒト	GCTGGTGCTCCAGACCCCTCACCTGGAGTTCCAGGAGGGAGAAACCATCA					•
カニクイザル	GCTGGCGCTTCAGACCCCTCACCTGGAGTTCCGGGAGGGAGAAACCATCA					•
チンパンジー	410	420	430	440	450	
	TGCTGAGGTGCCACAGCTGGAGGACAAGCCTCTGGTCAAGGTACATTC					
ヒト	TGCTGAGGTGCCACAGCTGGAGGACAAGCCTCTGGTCAAGGTACATTC					•
カニクイザル	TGCTGAGGTGCCACAGCTGGAGGACAAGCCTCTGATCAAGGTACATTC					•
チンパンジー	460	470	480	490	500	
	TTCCAGAATGAAAATCCCAGAAATTCTCCCATTGGATCCAACCTCTC					
ヒト	TTCCAGAATGAAAATCCCAGAAATTCTCCCATTGGATCCAACCTCTC					•
カニクイザル	TTCCAGAATGGAATGCCAGAAATTCCCATTGGATCCAACCTCTC					•

10

20

30

40

510 520 530 540 550
 チンパンジー CATCCCACAAGCAAACCACAGTCACAGTGGTATTACCACTGCACAGGAA
 ヒト CATCCCACAAGCAAACCACAGTCACAGTGGTATTACCACTGCACAGGAA
 カニクイザル CATCCCACAAGCAAACCACAGTCACAGTGGTATTACCACTGCACAGGAA

560 570 580 590 600
 チンパンジー ACATAGGCTACACGCTGTTCTCATCCAAGCCTGTGACCACACTGTCCAA
 ヒト ACATAGGCTACACGCTGTTCTCATCCAAGCCTGTGACCACACTGTCCAA
 カニクイザル ACATAGGCTACACACCATACTCATCCAAACCTGTGACCACACTGTCCAA 10
 610 620 630 640 650
 チンパンジー GCGCCCAGCGTGGGCAGCTTCAACCAGTGGGATCATTGTGGCTGTGGT
 ヒト GTGCCAGCATGGCAGCTTCAACCAATGGGATCATTGTGGCTGTGGT
 カニクイザル GTGCCAGCGTGGGCAGCTTCAACCAATGGGATCATTGTGGCTGTGGT

660 670 680 690 700
 チンパンジー CATTGCGACTGCTGTAGCAGCCATTGTTGCTGCTGTAGTGGCCTTGATCT
 ヒト CATTGCGACTGCTGTAGCAGCCATTGTTGCTGCTGTAGTGGCCTTGATCT
 カニクイザル CACTGGGATTGCTGTAGCGGCCATTGTTGCTGCTGTAGTGGCCTTGATCT 20
 710 720 730 740 750
 チンパンジー ACTGCAGGAAAAGCGGATTTCAGCCAATTCCACTGATCCTGTGAAGGCT
 ヒト ACTGCAGGAAAAGCGGATTTCAGCCAATTCCACTGATCCTGTGAAGGCT
 カニクイザル ACTGCAGGAAAAGCGGATTTCAGCCAATTCCACTGATCCTGTGAAGGCT

760 770 780 790 800
 チンパンジー GCCCAATTGAGCCACCTGGACGTCAAATGATTGCCATCAGAAAGAGACA 30
 ヒト GCCCAATTGAGCCACCTGGACGTCAAATGATTGCCATCAGAAAGAGACA
 カニクイザル GCCCGATTGAGCCACCTGGACGTCAAACGATTGCCCTCAGAAAGAGACA

810 820 830 840 850
 チンパンジー ACTTGAAAGAAACCAACAATGACTATGAAACAGCTGACGGCGGCTACATGA
 ヒト ACTTGAAAGAAACCAACAATGACTATGAAACAGCTGACGGCGGCTACATGA
 カニクイザル ACTTGAAAGAAACCAACAATGACTATGAAACAGCTGACGGCGGCTACATGA 40
 860 870 880 890 900
 チンパンジー CTCTGAACCCCAGGGCACCTACTGACGATGATAAAACATCTACCTGACT
 ヒト CTCTGAACCCCAGGGCACCTACTGACGATGATAAAACATCTACCTGACT
 カニクイザル CTCTGAACCCCAGGGCACCTACTGACGATGATAAAACATCTACCTGACT

910 920 930
 チンパンジー CTTCCCTCCCAACGACCATGTCAACAGTAATAACTAA
 ヒト CTTCCCTCCCAACGACCATGTCAACAGTAATAACTAA
 ● ● ●
 カニクイザル CTTTCTCCCAACGACTATGACAACAGTAATAACTAA

【0157】

ヒトFc RIIAレセプターの配列はGenBank登録番号M28697を有する。Seki,T.,Identification of multiple isoforms of the low-affinity human IgG Fc receptor,Immunogenetics第30巻5~12頁(1989年)を参照。

10

【0158】

ヒト(配列番号:6)およびカニクイザル(配列番号:5)のFc RIIBをコードする核酸配列のアラインメントを表6に示す。

【0159】

配列同一性率の解析により、Fc RIIBをコードするヒトとカニクイザルの配列は、約94%の同一性を有することが示される。

【0160】

表 6

ヒトおよびカニクイザルの低親和性Fc γ RIIB DNAのアラインメント

20

885中837が一致：94.6%の同一性 (ギャップなし)
 894中837が一致：93.6%の同一性 (ギャップあり)

ヒト	10 20 30 40 50	
	ATGGGAATCCTGTCATTCTTACCTGTCCTGCCACTGAGAGTGACTGGGC	
カニクイザル	ATGGGAATCCTGTCATTCTTACCTGTCCTGCCACTGAGAGTGACTGGGC	●
ヒト	60 70 80 90 100	
	TGACTGCAAGTCCCCCAGCCTGGGGTCATATGCTTCTGTGGACAGCTG	
カニクイザル	TGACTGCAAGTCCCTCCCAGCCTGGGGCACATGCTTCTGTGGACAGCTG	● ● ●
ヒト	110 120 130 140 150	
	TGCTATTCCCTGGCTCCTGTTGCTGGACACCTGCAGCTCCCCAAAGGCT	
カニクイザル	TGCTATTCCCTGGCTCCTGTTGCTGGACACCTGCAGCTCCCCGAAGGCT	●
ヒト	160 170 180 190 200	
	GTGCTGAAACTCGAGCCCCAGTGGATCAACGTGCTCCAGGAGGACTCTGT	
カニクイザル	GTGCTGAAACTCGAGCCCCGTGGATCAACGTGCTCCGGAGGACTCTGT	● ●
ヒト	210 220 230 240 250	
	GAECTCTGACATGCCGGGGACTCACAGCCCTGAGAGCGACTCCATTCACT	
カニクイザル	GAECTCTGACGTGCCGGGGCGCTCACAGCCCTGACAGCGACTCCACTCACT	● ● ●
ヒト	260 270 280 290 300	
	GGTTCCACAATGGGAATCTCATTCCCACCCACACGCCAGCTACAGG	

30

40

カニクイザル GGTTCCACAATGGGAATCTCATCCCCACCCACACGCAGCCCAGCTACAGG

ヒト 310 320 330 340 350
TTCAAGGCCAACACAATGACAGCGGGGAGTACACGTGCCAGACTGGCCA

カニクイザル TTCAAGGCCAACACAATGATAGCGGGGAGTACAGGTGCCAGACTGGCG

ヒト 360 370 380 390 400
GACCAGCCTCAGCGACCCTGTGCATCTGACTGTGCTTCTGAGTGGCTGG

カニクイザル GACCAGCCTCAGCGACCCTGTTCATCTGACTGTGCTTCTGAGTGGCTGG

ヒト 410 420 430 440 450
TGCTCCAGACCCCTCACCTGGAGTTCCAGGAGGGAGAAACCATCGTGCTG

カニクイザル CGCTCCAGACCCCTCACCTGGAGTTCCAGGAGGGAGAAACCATCTGCTG

ヒト 460 470 480 490 500
AGGTGCCACAGCTGGAAGGACAAGCCTCTGGTCAAGGTACACATTCTCCA

カニクイザル AGGTGCCACAGCTGGAAGGACAAGCCTCTGATCAAGGTACACATTCTCCA

ヒト 510 520 530 540 550
GAATGGAAAATCCAAGAAATTTCCCGTTCGGATCCAACTTCTCCATCC

カニクイザル GAATGGAAATATCCAAGAAATTTCCCATATGAATCCAACTTCTCCATCC

ヒト 560 570 580 590 600
CACAAGCAAACCAACAGTCACAGTGGTGATTACCACTGCACAGGAAACATA

カニクイザル CACAAGCAAACCAACAGTCACAGTGGTGATTACCACTGCACAGGAAACATA

ヒト 610 620 630 640 650
GGCTACACGCTGTACTCATCCAAGCCTGTGACCATCACTGTCCAAGCTCC

カニクイザル GGCTACACACCATACTCATCCAAACCTGTGACCATCACTGTCCAAGTGCC

ヒト 660 670 680 690 700
-----CAGCTTTCACCGATGGGATCATTGTGGCTGTGGTCAGT

カニクイザル CAGCATGGGCAGCTCTCACCGATAGGGATCATTGTGGCTGTGGTCAGT

ヒト 710 720 730 740 750
GGATTGCTGTAGCGGCCATTGTTGCTGCTGTAGTGGCTTGATCTACTGC

カニクイザル GGATTGCTGTAGCGGCCATTGTTGCTGCTGTAGTGGCTTGATCTACTGC

ヒト 760 770 780 790 800
AGGAAAAAGCGGATTCAGCCAATCCCACTAATCCTGATGAGGCTGACAA

カニクイザル AGGAAAAAGCGGATTCAGCCAATCCCACTAATCCTGACGAGGCTGACAA

10

20

30

40

ヒト	810	820	830	840	850
	AGTTGGGGCTGAGAACACAATCACCTATTCACTTCTCATGCACCCGGATG				
カニクイザル	AGTTGGGGCTGAGAACACAATCACCTATTCACTTCTCATGCACCCGGACG				
ヒト	860	870	880		
	CTCTGGAAGAGCCTGATGACCAGAACCGTATTTAG				
カニクイザル	CTCTGGAAGAGCCTGATGACCAGAACCGNGTAG				

【0161】

Fc RIIBのヒト配列はGenBank登録番号X52473を有する。Engelhardt,W.,Geerds,C.およびFrey,J.,Distribution,inducibility and biological function of the cloned and expressed human beta Fc receptorII,Eur.J.Immunol.第20巻第6号1367~1377頁(1990年)を参照。

10

【0162】

ヒト(配列番号:8)およびカニクイザル(配列番号:7)のFc RIIIAをコードする核酸配列のアラインメントを表7に示す。

【0163】

配列同一性率の解析により、Fc RIIIAをコードするヒトとカニクイザルの核酸配列は、約96%の同一性を有することが示される。

20

【0164】

表7

ヒトおよびカニクイザルの低親和性Fc γ RIIIA DNAのアラインメント

重複765中733の一一致: 95.8% 同一性

ヒト	10	20	30	40	50
	ATGTGGCAGCTGCTCCTCCAACTGCTCTGCTACTTCTAGTTCAAGCTGG				
カニクイザル	ATGTGGCAGCTGCTCCTCCAACTGCTCTGCTACTTCTAGTTCAAGCTGG				
ヒト	60	70	80	90	100
	CATGCGGACTGAAGATCTCCAAAGGCTGTGGTGTTCCTGGAGCCTCAAT				
カニクイザル	CATGCGGCTGAAGATCTCCAAAGGCTGTGGTGTTCCTGGAGCCTCAAT				
ヒト	110	120	130	140	150
	GGTACAGGGTGCTCGAGAACAGTGTGACTCTGAAGTGCCAGGGAGCC				
カニクイザル	GGTACAGGGTGCTCGAGAACAGTGTGACTCTGAAGTGCCAGGGAGCC				
ヒト	160	170	180	190	200
	TACTCCCTGAGGACAATTCCACACAGTGGTTTACAATGAGAGCCTCAT				
カニクイザル	TACTCCCTGAGGACAATTCCACACAGTGGTTTACAATGAGAGCCTCAT				

30

40

210 220 230 240 250
 ヒト CTCAGCCAGGCCCTCGAGCTACTTCATTGACGCTGCCACAGTCGACGACA
 カニクイザル CTCAGCCAGACCTCGAGCTACTTCATTGCTGCCAGAGTCAACACA
 260 270 280 290 300
 ヒト GTGGAGAGTACAGGTGCCAGACAAACCTCTCCACCCCTCAGTGACCCGGTG
 カニクイザル GTGGAGAGTACAGGTGCCAGACAAAGCCTCTCCACACTCAGTGACCCGGTG
 310 320 330 340 350
 ヒト CAGCTAGAAGTCCATATCGGCTGGCTGGCTCCAGGCCCCCTCGGTGGGT 10
 カニクイザル CAGCTGGAAGTCCATATCGGCTGGCTATTGCTCCAGGCCCCCTCGGTGGGT
 360 370 380 390 400
 ヒト GTTCAAGGAGGAAGACCTATTCACCTGAGGTGTCACAGCTGGAAGAAC
 カニクイザル GTTCAAGGAGGAAGAACATCTATTCACCTGAGGTGTCACAGCTGGAAGAAC
 410 420 430 440 450
 ヒト CTGCTCTGCATAAGGTACACATATTACAGAATGGCAAAGGCAGGAAGTAT
 カニクイザル CTCTTCTGCATAAGGTACGTATTACAGAATGGCAAAGGCAGGAAGTAT 20
 460 470 480 490 500
 ヒト TTTCATCATAATTCTGACTTCTACATTCCAAAAGCCACACTCAAAGACAG
 カニクイザル TTTCATCAGAATTCTGACTTCTACATTCCAAAAGCCACACTCAAAGACAG
 510 520 530 540 550
 ヒト CGGCTCCTACTTCTGCAGGGGGCTTTGGAGTAAAATGTGTCTTCAG
 カニクイザル CGGCTCCTACTTCTGCAGGGGACTTATTGGGAGTAAAATGTATCTTCAG 30
 560 570 580 590 600
 ヒト AGACTGTGAACATCACCATCACTCAAGGTTGGCAGTGTCAACCCTCA
 カニクイザル AGACTGTGAACATCACCATCACTCAAGATTGGCAGTGTCAACCCTCA
 610 620 630 640 650
 ヒト TCATTCTTCCACCTGGGTACCAAGTCTCTTCTGCTTGGTATGGTACT
 カニクイザル TCATTCTTCCACCTGGGTACCAAGTCTCTTCTGCTTGGTATGGTACT
 660 670 680 690 700
 ヒト CCTTTTGCACTGGACACAGGACTATATTCTCTGTGAAGACAAACATTCA 40
 カニクイザル CCTTTTGCACTGGACACAGGACTATATTCTCTGTGAAGACAAACATTCA
 710 720 730 740 750
 ヒト GAAGCTCAACAAGAGACTGGAGGACATAAAATTAAATGGAGAAAGGAC
 カニクイザル CAAGCTCAACAAGGGACTGGAGGACATAAAATTAAATGGAGCAAGGAC
 760
 ヒト CCTCAAGACAAATGA
 カニクイザル CCTCAAGACAAATGA 50

【0165】

Fc IIIのヒト配列はGenBank登録番号X52645 M31937を有する。Ravetch,J.V.およびPerussia,B.,Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils.Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions,J.Exp.Med.第170巻第2号481~497頁(1989年)を参照。

【0166】

ヒト(配列番号:24)およびカニクイザル(配列番号:23)の2ミクログロブリンをコードする核酸配列のアラインメントを表8に示す。

【0167】

配列同一性率の解析により、2ミクログロブリンをコードするヒトとカニクイザルの核酸配列は、約95%の同一性を有することが示される。

【0168】

表8

ヒトおよびカニクイザルのβ2-ミクログロブリンDNAのアラインメント

341/360 = 94.7% 同一性

	10	20	30	40	50	
ヒト	ATGTCTCGCTCCGTGGCCTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTCTGG					
	•	•	•	•	•	
カニクイザル	ATGTCTCCCTCAGTGGCCTAGCCGTGCTGGCGCTACTCTCTCTTCTGG					
	60	70	80	90	100	
ヒト	CCTGGAGGCTATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAAGGTTACTCACGTCATC					
カニクイザル	CCTGGAGGCTATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAAGGTTACTCACGCCATC					
	110	120	130	140	150	
ヒト	CAGCAGAGAATGGAAAGTCAAATTCTGAATTGCTATGTGTCTGGTT					
カニクイザル	CACCAAGAGAATGGAAAGCCAAATTCTGAATTGCTATGTGTCTGGATT					
	160	170	180	190	200	
ヒト	CATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAGAATTGA					
カニクイザル	CATCCATCTGATATTGAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAAAATGG					
	210	220	230	240	250	
ヒト	AAAAGTGGAGCATTCAAGACTTGTCTTCAGCAAGGACTGGTCTTCTATC					
カニクイザル	AAAAGTGGAGCATTCAAGACTTGTCTTCAGCAAAGACTGGTCTTCTATC					
	260	270	280	290	300	
ヒト	TCTTGTACTACACTGAATTCAACCCCCACTGAAAAAGATGAGTATGCCATC					

10

20

30

40

カニクイザル TCTTGACTACACTGAATTACCCCCAATGAAAAAGATGAGTATGCCTGC
 ヒト 310 320 330 340 350
 CGTGTGAACCATGTGACTTGTACAGCCCAAGATAGTTAAGTGGGATCG
 ● ● ● ● ●
 カニクイザル CGTGTGAACCATGTGACTTGTACAGGCCAGGACAGTTAAGTGGGATCG
 360
 ヒト AGACATGTAA
 カニクイザル AGACATGTAA

10

【0169】

ヒト 2ミクログロブリンのDNA配列はGenBank登録番号AB021288を有する。Matsumoto,K.,Minamitani,T.,Human mRNA for beta2 microglobulin,DDBJ/EMBL/GenBank databases(1998年)を参照。

【0170】

ヒト(配列番号:28)およびカニクイザル(配列番号:27)のFcRn鎖をコードする核酸配列のアラインメントを表9に示す。

【0171】

配列同一性率の解析により、FcRn鎖をコードするヒトとカニクイザルの核酸配列は、約97%の同一性を有することが示される。

【0172】

表 9

ヒトおよびカニクイザルのFcRn α 鎖DNAのアラインメント

1062/1098 = 96.7% 同一性

10 20 30 40 50
 ヒト ATGGGGTCCC CGCGCCTCAGCCCTGGCGCTGGGCTCCTGCTCTTCT
 ●
 カニクイザル ATGAGGGTCCC CGCGCCTCAGCCCTGGCGCTGGGCTCCTGCTCTTCT
 30
 60 70 80 90 100
 ヒト CCTTCCTGGAGCCTGGCGCAGAAAGCCACCTCTCCCTCCTGTACCA
 ● ●
 カニクイザル CCTGCCGGAGCCTGGCGCAGAAAGCCACCTCTCCCTCCTGTACCA
 110 120 130 140 150
 ヒト TTACCGCGGTGTCCCTCGCCTGCCCCGGGACTCCTGCCTTCTGGGTGTCC
 ● ● ●
 カニクイザル TCACCCGGTGTCCCTGCCCGCCCCGGGACGCCTGCCTTCTGGGTGTCC
 40
 160 170 180 190 200
 ヒト GGCTGGCTGGGCCCGCAGCAGTACCTGAGCTACAATAGCCTGCAGGGCGA
 ● ● ● ●
 カニクイザル GGCTGGCTGGGCCCGCAGCAGTACCTGAGCTACGACAGCCTGAGGGGCCA
 210 220 230 240 250

ヒト GGC GGAG CCCT GTGG AGCT TGGG TCTGG AAA ACCAG GTGC CTGG TATT
 カニクイザル GGC GGAG CCCT GTGG AGCT TGGG TCTGG AAA ACCAG GTGC CTGG TATT
 ヒト 260 270 280 290 300
 GGG AGAA AGAG ACCAC AGAT CTGAGG ATCA AGGAGA AGCT CTT CTGG AA
 カニクイザル GGG AGAA AGAG ACCAC AGAT CTGAGG ATCA AGGAGA AGCT CTT CTGG AA
 ヒト 310 320 330 340 350
 GCT TTCAA AGCT TGGGGG AAAAGG CCTAC ACTCT GCAG GG CCTG CT
 カニクイザル GCT TTCAA AGCT TGGGGG AAAAGG CCTAC ACTCT GCAG GG CCTG CT
 ヒト 360 370 380 390 400
 GGG CTGT GAACT GGGCC CTGACA AACAC CCTCGGTGCC ACCGCC AAGT TCG
 カニクイザル GGG CTGT GAACT GAGCC CTGACA AACAC CCTCGGTGCC ACCGCC AAGT TCG
 ヒト 410 420 430 440 450
 CCCT GAA CGCG GAGG AGTT CATGA ATT CGAC CTCA AGCAGGGCAC CTGG
 カニクイザル CCCT GAA CGCG GAGG AGTT CATGA ATT CGAC CTCA AGCAGGGCAC CTGG
 ヒト 460 470 480 490 500
 GGT GGGG ACTGGCC GAGGCC CTGG CTAT CAGTCAGCGGTGGCAGCAGCA
 カニクイザル GGT GGGG ACTGGCC GAGGCC CTGG CTAT CAGTCAGCGGTGGCAGCAGCA
 ヒト 510 520 530 540 550
 GGACA AGGCGG CCAACA AGGAG CTCAC CCTCTG CTATT CCTG CCCC GC
 カニクイザル GGACA AGGCGG CCAACA AGGAG CTCAC CCTCTG CTATT CCTG CCCC GC
 ヒト 560 570 580 590 600
 ACCG CCTG CGGG AGC ACCTGG AGAGGG CGCG AAAC CTGG AGT GGA AG
 カニクイザル ACCG CCTG CGGG AGC ACCTGG AGAGGG CGCG AAAC CTGG AGT GGA AG
 ヒト 610 620 630 640 650
 GAG CCCC CCTCC ATGCG CCTG AAGG CCG ACCC AGCAG CCTG GCTTT
 カニクイザル GAG CCCC CCTCC ATGCG CCTG AAGG CCG ACCC AGCAG CCTG GCTTT
 ヒト 660 670 680 690 700
 CGT GCTT ACCTG CAGCG CCTT CTCC TTAC CCTG GAGCT GCA ACTTC
 カニクイザル CGT GCTT ACCTG CAGCG CCTT CTCC TTAC CCTG GAGCT GCA ACTTC
 ヒト 710 720 730 740 750
 GGTT CCTG CGGA ATGGG ATGGG CTGG CGCTGG CACCGG CAGGGT GACTTC CGGC
 カニクイザル GGTT CCTG CGGA ATGGG ATGGG CTGG CGCTGG CACCGG CAGGGT GACTTC CGGC

10

20

30

40

ヒト	760 CCCAACAGTGACGGATCCTCCACGCCTCGTCGTCACTAACAGTCAAAAG	770	780	790	800	
•						
カニクイザル CCCAACAGTGACGGATCCTCCACGCCTCGTCGTCACTAACAGTCAAAAG						
ヒト	810 TGGCGATGAGCACCACACTGCTGCATTGTGCAGCACGCCGGGGCTGGCGC	820	830	840	850	
•						
カニクイザル TGGCGATGAGCACCACACTGCTGCATCGTGAGCACGCCGGGGCTGGCGC						
ヒト	860 AGCCCCTCAGGGTGGAGCTGGAATCTCCAGCCAAGTCCTCCGTGCTCGTG	870	880	890	900	
•						
カニクイザル AGCCCCTCAGGGTGGAGCTGAAACTCCAGCCAAGTCCTCCGTGCTCGTG						
ヒト	910 GTGGGAATCGTCATCGGTGCTTGCTACTCACGGCAGCGGCTGTAGGAGG	920	930	940	950	
•						
カニクイザル GTGGGAATCGTCATCGGTGCTTGCTACTCACGGCAGCGGCTGTAGGAGG						
ヒト	960 AGCTCTGTTGTGGAGAAGGATGAGGAGTGGAGTGGCTGCCAGCCCCTTGGATCT	970	980	990	1000	
•						
カニクイザル AGCTCTGTTGTGGAGAAGGATGAGGAGTGGAGTGGCTGCCAGCCCCTTGGATCT						
ヒト	1010 CCCTTCGTGGAGACGACACCGGGGTCCCTGCCACCCCAGGGGAGGCC	1020	1030	1040	1050	
•						
カニクイザル CCCTCCGTGGAGATGACACCGGGTCCCTGCCACCCCAGGGGAGGCC						
ヒト	1060 CAGGATGCTGATTGAAGGATGTAAATGTGATTCCAGCCACCGCCTGA	1070	1080	1090		
•						
カニクイザル CAGGATGCTGATTGAAGGATATAATGTGATCCCAGCCACTGCCTGA						

【0173】

30

ヒトFcRn鎖のDNA配列はGenBank登録番号U12255を有する。Story,C.M.,Mikulska,J.およびSimister,N.E.,A major histocompatibility complex classI-like Fc receptor cloned from human placenta:Possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus,J.Exp.Med.第180巻2377~2381頁(1994年)を参照。

【0174】

40

ヒト(配列番号:10)およびカニクイザル(配列番号:9)のFc RI鎖の核酸配列のアライメントを表10に示す。前述したように、Fc RIの鎖は、シグナルペプチド、3細胞外C-2 Ig様ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含む種々のドメインを有する。記号を付したアミノ酸の下部に示すアミノ酸番号は、シグナル配列を含まない成熟ポリペプチドの開始点から番号付けられている。ヒト配列との配置に基づき、カニクイザルの成熟Fc RIはアミノ酸残基 1~ 336の配列を有する(配列番号:65)。カニクイザルFc RIの配列のn末端配列は、以下に示す配列と異なる可能性がある。カニクイザルFc RIの配列をコードする核酸配列を発現させ、n末端配列を同定するのは当業者の範囲内であろう。例1のプライマーを用いて得られるカニクイザルFc RIの細胞外断片は、1~ 269のアミノ酸配列を有する。アミノ酸残基上部のいずれの番号も、シグナル配列から開始する残基の番号付けを表す。

【0175】

50

配列同一性率の解析により、ヒトとカニクイザルのFc RIのアミノ酸配列は、3'伸展を考慮に入れた場合に約90%、3'伸展を含まない場合に約94%の同一性を有することが示される。

【 0 1 7 6 】

表 10

ヒトおよびカニクイザル高親和性Fc γ RIのアラインメント

ヒト	MWFLTLLLWVPVDGQVDTTK				
カニクイザル	MWFL <u>T</u> ALLLWVPVDGQVDTTK				
ドメイン1					
ヒト	AVISLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNGTAT				
カニクイザル	AVITLQPPWVSVFQEETVTL <u>Q</u> CEVPR <u>L</u> PGSSSTQWFLNGTAT				
	Δ 1	Δ 10	Δ 20	Δ 30	Δ 40
	70	80	90	100	
ヒト	QTSTPSYRITSASVND <u>S</u> GEYRCQR <u>G</u> LSGRSDPIQLEIHR				
カニクイザル	QTSTPSYRITSASV <u>K</u> D <u>S</u> GEYRCQR <u>G</u> PSGRSDPIQLEIHR				
	Δ 50	Δ 60	Δ 70	Δ 80	
ドメイン2					
ヒト	GWLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAW <u>K</u> DKLVYNVLYYRNGKAFKF				
カニクイザル	DWLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAW <u>K</u> DKLVYNVLYYQNGKAFKF				
	Δ 90	Δ 100	Δ 110	Δ 120	
	150	160	170	180	190
ヒト	FHWNSNL <u>T</u> ILKT <u>N</u> ISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFP				
カニクイザル	FYRNSQLT <u>T</u> ILKT <u>N</u> ISHNGAYHCSGMGKHRYTSAGVS <u>T</u> V <u>K</u> ELFP				
	Δ 130	Δ 140	Δ 150	Δ 160	

10

20

30

ドメイン3

ヒト APVLNASVTSPILLEGNLVTLSCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRG
 カニクイザル APVLNASVTSPILLEGNLVTLSCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRG
 Δ 170 Δ 180 Δ 190 Δ 200 Δ 210

ヒト RNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLQLP
 カニクイザル RNTSSEYQILTARREDSGFYWCEATTEDGNVLKRSPELELQVLGLQLP
 Δ 220 Δ 230 Δ 240 Δ 250 Δ 260

膜貫通/細胞内
 ヒト TPVWFHVLFYLVGIMFLVNTVLWVTIRKELKRKKWDLEISLDGHE
 カニクイザル TPVWLHVLFYLVGIMFLVNTVLWVTIRKELKRKKWNLEISLDAHE
 Δ 270 Δ 280 Δ 290 Δ 300 Δ 310

ヒト KKVTSSLQEDRHLEELKCQEQQKEQLQEGVHRKEPQGAT
 カニクイザル KKVTSSLQEDRHLEELKSQEQE
 Δ 320 Δ 330 Δ 340 Δ 350

ヒト 対 カニクイザル 335/357 = 93.8% の同一性
 ヒト 3' 伸展なし

335/374 = 89.6% の同一性
 ヒト 3' 伸展あり

10

20

40

【0177】

ヒトFc RIのアミノ酸配列は登録番号P12314, P12315, EMBL, X14356, CAA32537.1.EMBL, X14355, CAA32536.1.PIR, S03018.PIR, S03019.PIR, A41357.PIR, B41357.HSSP, P12319, 1ALT.MIM, 146760, -.InterPro, IPR003006, -.Pfam, PF00047を有する。Allen J.M., Seed B., Nucleic Acids Res.第16巻11824~11824頁(1988年)Nucleotide sequence of three cDNAs for the human high affinity Fc receptor(FcRI), Allen J.M., Seed B., Science第243巻378~381頁(1989年)Isolation and expression of functional high-affinity Fc receptor complementary DNAsを参照。

【0178】

ヒト、カニクイザルおよびチンパンジーのFc RIIA(カニクイザル/配列番号:15、ヒト/配列番号:16、チンパンジー/配列番号:17)、Fc RIIB(カニクイザル/配列番号:18、ヒト/配列番号:19)、およびFc RIIIA(カニクイザル/配列番号:20、ヒト/配列番号:21)の配列のアミノ酸配列のアラインメントを表11に示す。

【0179】

配列を前記のようにドメイン、即ちシグナルペプチド、3細胞外C-2様ドメインおよび膜貫通細胞内ドメインに分割する。表11において、記号を付したアミノ酸の下部に示すアミノ酸番号は、シグナル配列を含まない成熟ヒトポリペプチドの開始点から番号付けられている。カニクイザルおよびチンパンジーのFc RIIA、カニクイザルFc RIIBおよびカニクイザルFc RIIIAの成熟ポリペプチドは、表11においてアステリスクにて同定されるアミノ酸から開始し、これを表21,22および23に別々に示し、以下のようになる。

1. カニクイザルFc RIIAアミノ酸 1~ 282(配列番号:66)、N末端配列TAPPKA(表21)
2. チンパンジーFc RIIAアミノ酸 1~ 249(配列番号:67)(ヒト配列との配置に基づく)
3. カニクイザルFc RIIBアミノ酸 1~ 252(配列番号:68)、N末端配列TPAAPP(表22)

50

4. カニクイザルFc RIIIAアミノ酸 1~234(配列番号:69)、N末端配列EDLPKA(表23)表11において、アミノ酸残基上部の番号はいずれもシグナル配列から開始する残基の番号付けを表す。表中のアステリスクは、カニクイザルのFc RIIA, Fc RIIBおよびFc RIIIAを示す。

【0180】

Fcレセプターポリペプチドの細胞外断片は、例1に記載したプライマーを用いて得た。例1のプライマーを用いて得られるFc RIIIAの細胞外断片は、表21に示すように 1~182のアミノ酸配列を有する。例1のプライマーを用いて得られるFc RIIBの細胞外断片は、表22に示すように 1~184のアミノ酸配列を有する。例1のプライマーを用いて得られるFc RIIIAの細胞外断片は、表23に示すように 1~187のアミノ酸配列を有する。 10

【0181】

配列同一性率の解析により次のことが示される。

1. チンパンジーとヒトのFc RIIIAのアミノ酸配列は約97%同一である。
2. カニクイザルとヒトのFc RIIIAのアミノ酸配列は、配置にMAMETQ(シグナルペプチドの予想部分)を伴うと約87%同一であり、MAMETQを伴わなければ約89%同一である。
3. カニクイザルとチンパンジーのFc RIIIAのアミノ酸配列は、配置にMAMETQを含むと約87%同一であり、配置にMAMETQを伴わなければ約89%同一である。
4. カニクイザルとヒトのFc RIIBのアミノ酸配列は約92%同一である。
5. カニクイザルとヒトのFc RIIIAのアミノ酸配列は約91%同一である。

【0182】

表 11

ヒト、カニクイザルおよびチンパンジーの
低親和性FcRIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIIA

シグナルペプチド

IIA- ヒト	-----MAMETQMSQNVCPRNLWLLQPLTVLLLLASADSQAA
IIA- チンパンジー	-----MAMETQMSQNVCPRNLWLLQPLTVLLLLASADSQA-
IIA- カニクイザル	-----MSQNVCVCPGNLWLLQPLTVLLLLASADSQT-

*

10

IIB- ヒト	MGILSFLPVVLATESDWADCKSPQPWGHMLLWTAVLFLAPVAGTPA
IIB- カニクイザル	MGILSFLPVVLATESDWADCKSSQPWGHMLLWTAVLFLAPVAGTPA

*

IIIA- ヒト	MWQLLLPTALLLLVSAGMRTE
IIIA- カニクイザル	MWQLLLPTALLLLVSAGMRAE

Δ *

1

ドメイン1

IIA- ヒト	APPKAVLKLEPPWINVLQEDSVTLCQGARSPESDSIQWFHN
IIA- チンパンジー	APPKAVLKLEPPWINVLQEDSVTLCRGARSPESDSIQWFHN
IIA- カニクイザル	APPKAVLKLEPPWINVLREDSVTLCGGAHSPDSDSTQWFHN

Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
1	10	20	30	40

20

IIB- ヒト	APPKAVLKLEPQWINVLQEDSVTLCRGTHSPESDSIQWFHN
IIB- カニクイザル	APPKAVLKLEPPWINVLREDSVTLCGGAHSPDSDSTQWFHN

30

IIIA- ヒト	DLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHN
IIIA- カニクイザル	DLPKAVVFLEPQWYRVLEKDRVTLKCQGAYSPEDNSTRWFHN

Δ	Δ	Δ	Δ
10	20	30	40

IIA- ヒト
IIA- チンパンジー
IIA- カニクイザル

GNLIPHTHQPSYRFKANNNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSE
GNLIPHTHQPSYRFKANNNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSE
GNRIPHTHQPSYRFKANNNDSGEYRCQTGRTSLSDPVHLTVLSE

Δ 50 Δ 60 Δ 70 Δ 80

IIB- ヒト
IIB- カニクイザル

GNLIPHTHQPSYRFKANNNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSE
GNLIPHTHQPSYRFKANNNDSGEYRCQTGRTSLSDPVHLTVLSE

III A- ヒト
III A- カニクイザル

ESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIG
ESLISSQTSSYFIAARVNNSGEYRCQTSLSLSDPVQLEVHIG

Δ 50 Δ 60 Δ 70 Δ 80

ドメイン2

IIA- ヒト
IIA- チンパンジー
IIA- カニクイザル

WLVLQTPHLEFQEGETIMLRCHSWKDKPLVKVTFFQNGKSQKFS
WLVLQTPHLEFQEGETIVLRCHSWKDKPLVKVTFFQNGKSQKFS
WLALQTPHLEFREGETIMLRCHSWKDKPLIKVTFFQNGIAKKFS

Δ 90 Δ 100 Δ 110 Δ 120 Δ 130

IIB- ヒト
IIB- カニクイザル

WLVLQTPHLEFQEGETIVLRCHSWKDKPLVKVTFFQNGKSKKFS
WLALQTPHLEFREGETILLRCHSWKDKPLIKVTFFQNGISKKFS

III A- ヒト
III A- カニクイザル

WLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYF
WLLLQAPRWVFKEEESIHLRCHSWKNTLLHKVTYLQNGKGRKYF

Δ 90 Δ 100 Δ 110 Δ 120 Δ 130

IIA- ヒト
IIA- チンパンジー
IIA- カニクイザル

RLDPTFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLFSSKPVTITVQV
HLDPNLSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLFSSKPVTITVQA
HMDPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTPSSKPVTITVQV

Δ 131 Δ 140 Δ 150 Δ 160 Δ 170

IIB- ヒト
IIB- カニクイザル

RSDPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLYSSKPVTITVQA
HMNPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTPSSKPVTITVQV

III A- ヒト
III A- カニクイザル

HHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSETVNITITQ
HQNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLIGSKNVSETVNITITQ

Δ 140 Δ 150 Δ 158 Δ 170

膜貫通/細胞内

• • •
IIA- ヒト PSMGSSSPMGIIVAVVIATAVAAIVAAVVALIYCRKKRISANSTD
IIA- チンパンジー PSVGSSSPVGIIVAVVIATAVAAIVAAVVALIYCRKKRISANSTD
IIA- カニクイザル PSVGSSSPMGIIVAVVTGIAVAAIVAAVVALIYCRKKRISANSTD
 Δ 180 Δ 190 Δ 200 Δ 210

• • •
IIB- ヒト P---SSSPMGIIVAVVTGIAVAAIVAAVVALIYCRKKRISANPTN
IIB- カニクイザル PSMGSSSPIGIIVAVVTGIAVAAIVAAVVALIYCRKKRISANPTN

10

• • •
IIIA- ヒト GLAVSTISSLFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSST
IIIA- カニクイザル DLAVSSISSLFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSMKKSISSST
 Δ 180 Δ 190 Δ 200 Δ 210

• • • •
IIA- ヒト ITAM モチーフ
IIA- チンパンジー PVKAAQFEPGGRQMIAIRKRQLEETNNNDYETADGGYMTLNPRAPT
IIA- カニクイザル PVKAAQFEPGGRQMIAIRKRQLEETNNNDYETADGGYMTLNPRAPT
 Δ 220 Δ 230 Δ 240 Δ 250 Δ 260

20

•
IIB- ヒト PDEADKVGAENTITYSLLMHPDALEEPDDQNRI
IIB- カニクイザル PDEADKVGAENTITYSLLMHPDALEEPDDQNRV
ITIM モチーフ

• •
IIIA- ヒト RDWKDHFKWRKDQDK
IIIA- カニクイザル RDWEDHKFKWSKDQDK
 Δ 220 Δ 230

30

ITAM モチーフ
• • •
IIA- ヒト DDDKNIYLTLPPPNDHVNSNN
IIA- チンパンジー DDDKNIYLTLPPPNDHVNSNN
IIA- カニクイザル DDDRNIYLTLSPNYDNSNN
 Δ 270 Δ 280

IIA チンパンジー/ヒト 308/317 = 97.2% の同一性
カニクイザル/ヒト 277/317 = 87.4% の同一性 (+MAMETQ)
277/311 = 89.1% の同一性 (-MAMETQ)
カニクイザル/チンパンジー 276/316 = 87.3% の同一性 (+MAMETQ)
276/310 = 89.0% の同一性 (-MAMETQ)

40

IIB カニクイザル/ヒト 270/294 = 91.8% の同一性

IIIA カニクイザル/ヒト 232/254 = 91.3% の同一性

【 0 1 8 3 】

ヒトのFc RIIAのアミノ酸配列は次の登録番号を有する。P12318, EMBL, M31932, AAA3582
7.1.EMBL, Y00644, CAA68672.1.EMBL, J03619, AAA35932.1.EMBL, A21604, CAA01563.1.PIR, A31
932.PIR, JL0118.PIR, S02297.PIR, S00477.PIR, S06946.HSSP, P12319, 1ALT.MIM, 146790, -.In 50

terPro, IPR003006, -.Pfam, PF00047。Brooks D.G., Qiu W.Q., Luster A.D., Ravetch J.V., J.Exp.Med.第170巻1369~1385頁(1989年), Structure and expression of human IgG FcRII(CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes, Stuart S.G., Trounstein M.L., Vaux D.J. T., Koch T., Martens C.L., Moore K.W., J.Exp.Med.第166巻1668~1684頁(1987年), Isolation and expression of cDNA clones encoding a human receptor for IgG(Fc gamma RII), Hibbs M.L., Bonadonna L., Scott B.M., McKenzie I.F.C., Hogarth P.M., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.第85巻2240~2244頁(1988年), Molecular cloning of a human immunoglobulin G Fc receptor, Stengelin S., Stamenkovic I., Seed B., EMBO J.第7巻1053~1059頁(1988年), Isolation of cDNAs for two distinct human Fc receptors by ligand affinity cloning, Salmon J.E., Millard S., Schachter L.A., Arnett F.C., Ginzler E.M., Gourley M.F., Ramsey-Goldman R., Peterson M.G.E., Kimberly R.P., J.Clin.Invest.第97巻1348~1354頁(1996年), Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans.を参照。

【0184】

ヒトのFc RIIBの配列は登録番号X52473を有する。Engelhardt, W., Geerds, C. および Frey, J., Distribution, inducibility and biological function of the cloned and expressed human beta Fc receptor II, Eur.J.Immunol.第20巻第6号1367~1377頁(1990年)を参照。

【0185】

ヒトのFc RIIIAの配列は登録番号P08637, EMBL; X52645, CAA36870.1.EMBL, Z46222, CAA86295.1.PIR, JL0107.MIM, 146740, -.InterPro, IPR003006, -.Pfam, PF00047を有する。Ravetch J.V., Perussia B., J.Exp.Med.第170巻481~497頁(1989年), Alternative membrane forms of Fc gamma RIIIA(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions, Gessner J.E., Grussemeyer T., Kolanus W., Schmidt R.E., J.Biol.Chem.第270巻1350~1361頁(1995年), The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor IIIA and III-B genes: Molecular characterization of the promoter regions, de Haas M., Koene H.R., Kleijer M., de Vries E., Simsek S., van Tol M.J.D., Roos D., von dem Borne A.E.G.K., J. Immunol.第156巻3948~3955頁(1996年), A triallelic Fc gamma receptor type IIIA polymorphism influences the binding of human IgG by NK cell Fc gamma RIIIA, Koene H.R., Kleijer M., Algra J., Roos D., von dem Borne A.E.G.K., de Haas M., Blood第90巻1109~1114頁(1997年), Fc gamma RIIIA-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gamma RIIIA, independently of the Fc gamma RIIIA-48L/R/H phenotype, Wu J., Edberg J.C., Redecha P.B., Bansal V., Guyre P.M., Coleman K., Salmon J.E., Kimberly R.P., J.Clin.Invest.第100巻1059~1070頁(1997年), A novel polymorphism of Fc gamma RIIIA(CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease.を参照。

【0186】

10

20

30

40

表 21
成熟FcRIIAの配列

ドメイン1

TAPPKAVLKLEPPWINVLREDSVTLCGGAHSPDSDSTQWFHN

Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
1	10	20	30	40

GNRIPHTQPSYRFKANNNDSGEYRCQTGRTSLSDPVHLTVLSE

10

Δ	Δ	Δ	Δ
50	60	70	80

ドメイン2

WLALQTPHLEFREGETIMLRCHSWKDKPLIKVTFFQNGIAKKFS

Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
90	100	110	120	130

HMDPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTPYSSKPVTITVQV

Δ	Δ	Δ	Δ
140	150	160	170

20

細胞内/膜貫通 ドメイン

PSVGSSSPMGIIIVAVVTGIAVAAIVAAVVALIYCRKKRISANSTD

Δ	Δ	Δ	Δ
180	190	200	210

ITAM

PVKAARFEPLGRQTIALRKQRQLEETNNNDYETADGGYMTLNPRAPT

Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
220	230	240	250	260

30

ITAM

DDDRNIYLTLSPNDYDNSNN

Δ	Δ
270	280

【 0 1 8 7 】

表 22

成熟Fc γ RIIBの配列

ドメイン1

TPAAPPKAVLKLEPPWINVLREDSVTLCGGAHSPDSDSTQWFHN

 Δ_1 Δ_{10} Δ_{20} Δ_{30} Δ_{40}

GNLIPHTHTQPSYRFKANNNDSGEYRCQTGRTSLSDPVHLTVLSE

 Δ_{50} Δ_{60} Δ_{70} Δ_{80}

10

ドメイン2

WLALQTPHLEFREGETILLRCHSWKDKPLIKVTFFQNGISKKFS

 Δ_{90} Δ_{100} Δ_{110} Δ_{120} Δ_{130}

HMNPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTPYSSKPVTITVQV

 Δ_{140} Δ_{150} Δ_{160} Δ_{170}

20

膜貫通/細胞内

PSMGSSSPIGIIVAVVTGIAVAAIVAAVVALIYCRKKRISANPTN

 Δ_{180} Δ_{190} Δ_{200} Δ_{210}

ITIM モチーフ

PDEADKVGAENTITYSLLMHPDALEEPDDQNRV Δ_{220} Δ_{230} Δ_{240} Δ_{250}

30

【 0 1 8 8 】

表 23

成熟Fc γ RIIIAの配列

ドメイン1

EDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDRVTLKCQGAYSPEDNSTRWFHN

 Δ_1 Δ_{10} Δ_{20} Δ_{30} Δ_{40}

ESLISSQTSSYFIAARVNNSGEYRCQTSLSLSDPVQLEVHIG

 Δ_{50} Δ_{60} Δ_{70} Δ_{80}

10

ドメイン2

WLLLQAPRWVFKEEESIHLRCHSWKNTLLHKVTLQNGKGRKYF

 Δ_{90} Δ_{100} Δ_{110} Δ_{120} Δ_{130}

HQNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLIGSKNVSETVNITITQ

 Δ_{140} Δ_{150} Δ_{160} Δ_{170}

20

膜貫通/細胞内

DLAVSSISSLFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSMKKSIPSSST

 Δ_{180} Δ_{190} Δ_{200} Δ_{210}

RDWEDHKFKWSKDPQDK

 Δ_{220} Δ_{230}

30

【0189】

ヒト(配列番号:12)およびカニクイザル(配列番号:11)のFc RI/IIIのガンマ鎖をコードする核酸配列のアライメントを表12に示す。

【0190】

配列同一性率の解析により、ヒトとカニクイザルのFc RI/IIIガンマ鎖をコードする核酸配列は、約99%の同一性を有することが示される。

【0191】

表 12

ヒトおよびカニクイザルFc γ RI/III

ガンマ鎖

1 10
| |
ヒト M I P A V V L L L L L V E O A A A

カニクイザル **MIPAVVLLLLLVEQAAA**

20 30 40 50
| | | |
LGEPOLCYIILDAILFLYIVLTLLYCRLKIOV

カニクイザル LGEPOLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQV

60 70 80

| | |

RKAAITSYEKSDGVYTLGLSTRNOETYETLKHKEKPPQ

カニクイザル RKAIAISYEKSDGVTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ
ITAM モチーフ ITAM モチーフ

カニクイザル 対 ヒト = 85/86 = 98.8% の同一性

【 0 1 9 2 】

ヒトのガンマ鎖のアミノ酸配列は登録番号P30273, EMBL, M33195, AAA35828.1.EMBL, M33196,-.PIR, A35241.MIM, 147139,-.を有する。Kuester H., Thompson H., Kinet J.-P., J. Biol. Chem. 第 265巻 6448~6452頁(1990年), Characterization and expression of the gene for the human Fc receptor gamma subunit. Definition of a new gene family.を参照。

【 0 1 9 3 】

ヒト(配列番号:26)およびカニクイザル(配列番号:25)の 2ミクログロブリンのアミノ酸配列のアライメントを表13に示す。成熟 2ミクログロブリンはアミノ酸 1~99(配列番号:70)のアミノ酸配列を有する。

【 0 1 9 4 】

配列同一性率の解析により、ヒトとカニクイザルの 2ミクログロブリンのアミノ酸配列は削除や挿入がなく、約 92%の同一性を有することが示される。

【 0 1 9 5 】

表 13

ヒトおよびカニクイザル β 2-ミクログロブリンのアラインメント

ヒト	MSRSVALAVLALLSLSGLEA								
カニクイザル	MSPSVALAVLALLSLSGLEA	•							
ヒト	IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSD								
カニクイザル	IQRTPKIQVYSRHPENGKPNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGEKGKVEHSD	•	•				•••		10
	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ			
	1	10	20	30	40	50			
ヒト	LSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRCM								
カニクイザル	LSFSKDWSFYLLYYTEFTPNEKDEYACRVNHVTLSQPKRTVKWDRCM	•		•	•				
	Δ	Δ	Δ	Δ					
	60	70	80	90					

カニクイザル 対 ヒト 109/119 = 91.6% の同一性

20

【0196】

ヒト 2ミクログロブリンのアミノ酸配列は登録番号P01884, EMBL, M17987, AAA51811.1.EMBL, M17986, AAA51811.1.EMBL, AB021288, BAA35182.1.EMBL, AF072097, AAD48083.1.EMBL, V00567, CAA23830.1.EMBL, M30683, AAA87972.1.EMBL, M30684, AAA88008.1.PIR, A02179.PIR, A28579.PDB, 1HLA.を有する。Guessow D.,Rein R.,Ginjaar I.,Hochstenbach F.,Seemann G.,Kottman A.,Ploegh H.L.,The human beta2-microglobulin gene.Primary structure and definition of the transcriptional unit,J.Immunol.第139巻3132~3138頁(1987年)、Matsumoto K.,Minamitani T.,Human mRNA for beta 2-microglobulin,Medline:Embl/genbank/ddbj database(1998年)、Zhao Z.,Huang X.,Li N.,Zhu X.,Cao X.,A novel gene from human dendritic cell,Embl/genbank/ddbj databases(1998年)、Rosa F.,Berissi H.,Weissenbach J.,Maroteaux L.,Fellous M.,Revel M.,The beta-2-microglobulin mRNA in human Daudi cells has a mutated initiation codon but is still inducible by interferon,EMBO J.第2巻239~243頁(1983年)、Suggs S.V.,Wallace R.B.,Hirose T.,Kawashima E.H.,Itakura K.,Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes:isolation of cloned cDNA sequences for human beta2-microglobulin,Proc.Natl.Acad.Sci.USA第78巻6613~6617頁(1981年)、Cunningham B.A.,Wang J.L.,Berggard I.,Peterson P.A.,The complete amino acid sequence of beta2-microglobulin,Biochem.第12巻4811~4822頁(1973年)、Lawlor D.A.,Warren E.,Ward F.E.,Parham P.,Comparison of class I MHC alleles in human and apes,Immunol.Rev.第113巻147~185頁(1990年)、Bjorkman P.J.,Saper M.A.,Samraoui B.,Bennett W.S.,Strominger J.L.,Wiley D.C.,Structure of the human class I histocompatibility antigen,HLA-A2,Nature第329巻506~512頁(1987年)、Saper M.A.,Bjorkman P.J.,Wiley D.C.,Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution,J.Mol.Biol.第219巻277~319頁(1991年)、Collins E.J.,Garboczi D.N.,Karpusas M.N.,Wiley D.C.,The three-dimensional structure of a class I major histocompatibility complex molecule missing the alpha 3 domain of the heavy chain,Proc.Natl.Acad.Sci USA第92巻1218~1221頁(1995年)を参照。

30

40

50

【0197】

50

ヒト(配列番号:30)およびカニクイザル(配列番号:29)のFcRn 鎖の核酸配列のアラインメントを表14に示す。カニクイザルFcRnの2対立遺伝子を同定した。一つの配列は配列番号:29であり、成熟ポリペプチドの位置3(S3)にセリンを有する。別の配列は配列番号:64であり、成熟ポリペプチドの位置3(N3)にアスパラギンを有する。FcRnS3 鎖の成熟ポリペプチドは 1~ 342のアミノ酸配列を有する(配列番号:71)。FcRnN3 鎖の成熟ポリペプチドは 1~ 342の配列を有する(配列番号:72)。例1の方法により調製したFcRnの細胞外断片は 1~ 274のアミノ酸配列を有する。

【 0 1 9 8 】

配列同一性率の解析により、ヒトとカニクイザルのFcRnアミノ酸配列は、削除や挿入がなく、約97%の同一性を有することが示される。

10

【 0 1 9 9 】

表 14

ヒトおよびカニクイザルの FcRn α 鎖 のアラインメント

354/365 = 97% の同一性

シグナル

カニクイザル MRVPRPQPWALGLLLFLLPGSLG

•

ヒト MGVPVRPQPWALGLLLFLLPGSLG

20

細胞外ドメイン

カニクイザル AESHLSLLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGPQQYLSYDSL RGQAEPCGA
カニクイザル N3 N

ヒト

AESHLSLLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGPQQYLSYN SLRG EAEP CGA

△

△

△

△

△

10

20

30

40

50

カニクイザル WVWENQVSWYWEKETTDLRIKEKLFLEAFKALGGKGPYTLQGLLGCELSP

•

30

ヒト WVWENQVSWYWEKETTDLRIKEKLFLEAFKALGGKGPYTLQGLLGCELGP
 Δ Δ Δ Δ Δ
 60 70 80 90 100

カニクイザル DNTSVPTAKFALNGEEFMNFDLKQGTWGGDWPEALAIISQRWQQQDKAANK

ヒト DNTSVPTAKFALNGEEFMNFDLKQGTWGGDWPEALAIISQRWQQQDKAANK
 Δ Δ Δ Δ Δ
 110 120 130 140 150

10

カニクイザル ELTFLLFSCPHRLREHLERGRGNLEWKEPPSMRLKARPGNPGFSVLTCSA

ヒト ELTFLLFSCPHRLREHLERGRGNLEWKEPPSMRLKARPSSPGFSVLTCSA
 Δ Δ Δ Δ Δ
 160 170 180 190 200

カニクイザル FSFYPPELQLRFLRNGMAAGTGQGDFGPNSDGSFHASSSLTVKSGDEHHY

ヒト FSFYPPELQLRFLRNGLAAGTGQGDFGPNSDGSFHASSSLTVKSGDEHHY
 Δ Δ Δ Δ Δ
 210 220 230 240 250

20

カニクイザル CCIVQHAGLAQPLRVELETPAKSS

ヒト CCIVQHAGLAQPLRVELESPAKSS
 Δ Δ
 260 270

膜貫通/細胞内

カニクイザル VLVVGIVIGVLLTAAAVGGALLWRRMRSGLPAPWISLRGDDTGSLLLPTP

ヒト VLVVGIVIGVLLTAAAVGGALLWRRMRSGLPAPWISLRGDDTGVLPTP
 Δ Δ Δ Δ Δ
 280 290 300 310 320

30

カニクイザル GEAQDADSKDINVIPATA

ヒト GEAQDADLKDVNIPATA
 Δ Δ
 330 340

【0200】

ヒトのFcRnアミノ酸配列は登録番号U12255を有する。Story C.M., Mikulska J., Simister N.E., A major histocompatibility complex class-I-like Fc receptor cloned from human placenta: Possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus, J. Exp. Med. 第180巻2377~2381頁(1994年)を参照。

【0201】

実施例3: カニクイザルFc RIとヒトFc RIはヒトIgGサブクラスに同レベルで結合する
材料および方法

ヒトの脾臓cDNAライブラリ由来の妥当な重鎖Fc cDNAを、E27重鎖可変ドメインを有するpRKベクターにサブクローニングすることにより、E27(IgG1)のヒトIgG2, IgG3およびIgG4イソフォームを作製した。Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J.A.およびPresta, L.G. J. Biol. Chem. 第276巻6591~6604頁(2001年)、または米国特許第6,194,551号

50

に記載のものと同一のE27 軽鎖を用い、全てのIgGサブクラスおよび変異体が発現された。

【0202】

重鎖と軽鎖のプラスミドを293細胞に同時形質移入した後、タンパク質AクロマトグラフィーによりIgG1, IgG2, IgG4および変異体を精製した。IgG3はタンパク質Gクロマトグラフィーにより精製した。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法、ELISA法および分光法を組み合わせて用い、全てのタンパク質製剤を分析した。

【0203】

鎖細胞外ドメインをコードする断片を生成するプライマーを用い、U937細胞由来のオリゴ(dt)の初回刺激を受けたRNAの逆転写酵素PCR法(GeneAmp, PerkinElmer Life Sciences社)により、ヒトFc RIに対するcDNAを単離した。Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J.A.およびPresta, L.G. J. Biol. Chem. 第276巻6591~6604頁(2001年)、または米国特許第6,194,551に記載のように、Gly/6-His/GST融合に結合したヒトFc R細胞外ドメインを調製した。EatonらBiochemistry第25巻8343~8347頁(1986年)に記載のように、cDNAを前記のpRK哺乳類細胞発現ベクターにサブクローニングした。カニクイザルFc RIに対するcDNAは例1に記載のように単離した。

【0204】

発現されたヒトおよびカニクイザルのFc RIの精製を促進すべく、各々の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを、Gly-His₆タグおよびヒトグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)をコードするDNAに置換した。GST配列はPCR法により、5'末端、3'末端にそれぞれNheI制限部位、XbaI制限部位を有するpGEX-4T2プラスミド(Amersham Pharmacia Biotech社)から得た。発現されたFc RIは、His271においてGly/His₆/GSTに融合した鎖の細胞外ドメインを有した。カニクイザルFc RI鎖の細胞外部分をサブクローニングするのに用いられるプライマーを表1に示す。

【0205】

リン酸カルシウム沈殿法(Gorman, C., M., Gies, D.R.およびMcCray, G. DNA Prot. Engineer. Tech. 第2巻3~10頁(1990年))により、カニクイザルおよびヒトのFc RIプラスミドをヒトの胚性腎細胞に形質移入した。10mg/L組換えウシインスリン、1mg/Lヒトトランスフェリン、および微量元素により補充された無血清PSO₄培地に転換後72時間にて上澄みを回収した。ニッケル・ニトリロ三酢酸クロマトグラフィー(Qiagen社、カリフォルニア州Valencia)によりタンパク質を精製した。精製タンパク質は4~20% SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法、ELISA法およびアミノ酸分析法を組み合わせて分析した。

【0206】

カニクイザルFc RIまたはヒトFc RIと、ヒトIgG1, IgG2, IgG3またはIgG4との相互作用を検出・定量すべく、標準的な酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を実施した(表15)。PBSにて1.5μg貯蔵液のカニクイザルFc RIまたはヒトFc RIを100μL加えることにより、4にて48時間、ELISAプレート(Nunc)を150ng/ウェルにて被覆した。洗浄緩衝液(PBS, pH7.4, 0.5%Tween-20含有)にてプレートを5回洗浄後、25にて1時間、250μLのアッセイ緩衝液(50mMトリス緩衝生理食塩水、0.05%Tween-20、0.5%RIAグレードウシ血清アルブミン、2mM EDTA、pH7.4)にてプレートをブロックした。プレートは洗浄緩衝液にて5回洗浄した。

【0207】

モノマー抗体の連続3倍希釈液(10.0~0.0045μg/ml)をプレートに加え、2時間インキュベートした。アッセイ緩衝液にて5回洗浄した後、検出試薬を加えた。幾つかの異なる西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)抱合試薬を用い、IgG Fc RIの相互作用を検出した。該試薬にはHRP タンパク質G(Bio-Rad社)、ヤギHRP-抗ヒトIgG(Boehringer-Mannheim社、インディアナ州インディアナポリス)、およびマウスHRP-抗ヒトカッパ軽鎖が含まれる。25にて90分間、検出試薬にてインキュベーションした後、洗浄緩衝液にてプレートを5回洗浄し、0.4mg/ml o-フェニレンジアミン二塩酸塩(Sigma社、ミズーリ州セントルイス)を1

10

20

30

40

50

00 μl 加えた。Vmaxプレートリーダー(Molecular Devices社、カリフォルニア州Mountain View)を用い、490nmにて吸着度を読み取った。表15にて報告した数値は、IgG濃度0.370 μg/mlにおけるヒトIgG1の結合に対する平均偏差であることに留意されたい。カニクイザルFc RI(図1B)およびヒトFc RI(図1A)に対し、検出試薬としてマウスHRP-抗ヒトカッパ軽鎖を用いたヒトIgGの検定プロットを図に示す。

【0208】

結果および論考

表15に示すように、ヒトIgGの4サブクラスに対するカニクイザルFc RIとヒトFc RIの結合パターンは、検出試薬に関わらず、類似していた。各例において、ヒトまたはカニクイザルはIgG3に対し最高水準の結合能を、IgG2に対し最低水準の結合能を示した。特に、ヒトおよびカニクイザルの双方のレセプター-IgG相互作用パターンは、IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2であった。ヒトFc RI IgG結合相互作用のデータが、前記データに一致することに留意されたい。Gessnerら Ann.Hematol. 第76巻231～248頁(1998年)、Deoら Immunology Today第18巻127～135頁(1997年)、Van de Winkel Immunology Today第14巻215～221頁(1993年)を参照。

【0209】

表 15

単量体ヒトIgGサブクラスの
カニクイザルおよびヒトFc γ RI^aに対する結合

サブクラス	カニクイザル FcγRI		ヒト FcγRI	
	ProtG ^b	抗-huIgG	抗-kappa	ProtG
E27IgG1	1.00	1.00	1.00	1.00
E27IgG2	0.13 ± 0.04	0.04, 0.04	0.11, 0.14	0.08, 0.08
E27IgG3	1.01 ± 0.06	1.22, 1.15	1.32, 1.37	1.14, 1.03
E27IgG4	0.52 ± 0.04	0.44, 0.45	0.60, 0.63	0.27, 0.27

a 検出用試薬は、HRP複合タンパク質G(ProtG)、HRP複合マウス抗ヒトIgG、重鎖用(抗huIgG)、またはHRP複合マウス抗ヒトカッパ軽鎖(抗kappa)であった。値は、0.37 μg/mlにおけるOD_{490nm}(E27IgG1)に対するOD_{490nm}(E27IgGサブクラス)の割合である。

b 平均 ± S.D., n = 4

【0210】

図1Aおよび図1Bに示すように、ヒトとカニクイザルのFc RIの結合親和性は、試験を行った各IgGサブクラスに対し類似している。ヒトとカニクイザルのレセプターは、双方ともIgG4およびIgG2に比し、IgG3およびIgG1に対し顕著に高い親和性を示した。図1Aおよび図1Bは、Fc RIに対するIgGサブクラスの結合が濃度依存性かつ飽和性であることも示す。

【0211】

ヒトとカニクイザルは各IgGサブクラスに対し互いに類似した親和性を有し、類似した結合相互作用パターンを示すため、IgGサブクラスの検出にあたりヒトFc RIの代わりに

10

20

30

40

50

カニクイザルFc RIを用いることが可能なことを本データは示す。

【0212】

例4：カニクイザルFc RIIAはヒトIgG2に結合する 材料および方法

例3に記載の方法を本質的に用い、カニクイザルFc RIIAに対するヒトIgGサブクラスの結合を分析するELISAアッセイ法を実施した。しかし、Fc RIIAは低親和性Fc Rであるため、Fcレセプターに加える前にヒトIgGの各サブクラスの六量体複合体を形成した。モル比1:1にてヒトIgGサブクラスとヒトIgGとを混合し、六量体複合体を形成した。Liu,J., Lester,P., Builder,S. および Shire,S.J. Biochemistry第34巻10474～10482頁(1995年)を参照。六量体複合体の調製、およびFc RII・Fc RIIIアッセイにおけるその使用法に関しては、Shields,R.L., Namenuk,A.K., Hong,K., Meng,Y.G., Rae,J., Briggs,J., Xie,D., Lai,J., Stadlen,A., Li,B., Fox,J.A. および Presta,L.G. J.Biol.Chem.第276巻6591～6604頁(2001年)に記載された。ヒトFc RIIA(R131)をコードするプラスミドは、GenBankや他の刊行物に記載のような配列情報を用い、容易に調製可能であり、WarmerdamらJ.of Immunology第147巻1338～1343頁(1991年)、およびClarkらJ.of Immunology第21巻1911～1916頁(1991年)を参照されたい。10

【0213】

結果および論考

表16に示すように、ヒトIgGサブクラスの六量体複合体に対するカニクイザルFc RIIAの結合パターンは、IgG3=IgG2>IgG1>IgG4であった。ヒトFc RIIA多形型二種に対するヒトIgGサブクラスの結合に関する以前の分析では、次のパターンを示した。ヒトFc RIIA(R131)-IgG3 IgG1>>IgG2 IgG4、およびFc RIIA(H131)-IgG3 IgG1=IgG2>>IgG4である。GessnerらAnn.Hematol.第76巻231～248頁(1998年)、Deoら Immunology Today第18巻127～135頁(1997年)、Van de Winkel Immunology Today第14巻215～221頁(1993年)を参照。これら結合パターンは、アミノ酸131番にヒスチジンを有するカニクイザルFc RIIAが、ヒトFc RIIA(H131)に匹敵することを示すものであり、双方ともヒトIgG2に結合する。対照的に、ヒトFc RIIA(R131)はヒトIgG2に対する結合が弱いと報告されている。カニクイザルFc RIIAはヒトIgG3に結合するのと同様に効率的にヒトIgG2に結合し、これはヒトFc RIIA(H131)レセプターとの相違点であることも留意されたい。20

【0214】

表 16

ヒトIgGサブクラスの六量体複合体の
カニクイザルおよびヒトFc γ RIIA^aに対する結合

サブクラス	カニクイザル Fc γ RIIA		
	ProtG	抗-huIgG	抗-kappa
E27IgG1	1.00	1.00	1.00
E27IgG2	2.11	1.27	2.20 ± 0.93 ^b
E27IgG3	1.10	1.56	2.44 ± 0.47
E27IgG4	0.12	0.12	0.42 ± 0.18
ヒト Fc γ RIIA(H131)			
E27IgG1	1.00	1.00	1.00
E27IgG2	0.95	0.83	0.84
E27IgG3	0.78	1.03	0.98
E27IgG4	0.25	0.47	0.19
ヒト Fc γ RIIA(R131)			
E27IgG1	1.00	1.00	1.00
E27IgG2	0.63	0.40	0.47
E27IgG3	1.17	1.14	0.85
E27IgG4	0.59	0.44	0.27

a 検出用試薬は、H R P 複合タンパク質 G (ProtG)、H R P 複合マウス抗ヒトIgG、重鎖用 (抗huIgG)、またはH R P 複合マウス抗ヒトカッパ軽鎖 (抗kappa) であった。値は、0.123 μg/ml におけるOD_{490nm} (E27IgG1) に対するOD_{490nm} (E27IgGサブクラス)の割合である。

b 平均 ± S D, n = 3

【0215】

通例、各IgGサブクラスに対するカニクイザルFc γ RIIAの結合能は、各IgGサブクラスの濃度が上昇するに従い、向上した(図2)。

【0216】

表16および図2のデータは、カニクイザルFc γ RIIAがヒトIgG2およびIgG3に高親和性にて結合し、ヒトFc γ RIIA多形型二種のいずれよりも、該ヒトサブクラスを検出するのに用いる好ましい薬剤といえることを示す。

10

20

30

40

50

【0217】

実施例5：カニクイザルFc RIIBはヒトIgG2に結合する 材料および方法

ヒトIgGサブクラスに対するFc RIIBの結合を検出するのに用いる方法は、本質的に例3および例4に示した。ヒトFc RIIBをコードするプラスミドは周知であり、当業者はこれを容易に得ることができる。Kuruczら Immunol. Lett第75巻第1号33~40頁(2000年)を参照されたい。表17に報告するデータは、IgG1濃度0.370 μg/mlにおけるヒトIgG1の結合に対する平均偏差を表す。

【0218】

結果および論考

表17は、ヒトおよびカニクイザルのFc RIIBに対するヒトIgGサブクラス六量体複合体の結合を示す。IgGサブクラスとヒトFc RIIBとの結合パターンは、IgG3 IgG1 > IgG2 > IgG4であり、IgGサブクラスとカニクイザルFc RIIBとでは、IgG2 IgG3 > IgG1 > IgG4である。該結合パターンは、IgGの一定濃度範囲内においてヒト(図3A)およびカニクイザル(図3B)の双方にて同様であった。

【0219】

本データは、カニクイザルFc RIIBがヒトFc RIIBより結合親和性が高いことを示す。

【0220】

表 17

ヒトIgGサブクラスの六量体複合体の
カニクイザルおよびヒトFc γ RIIBに対する結合

サブクラス	カニクイザル FcγRIIB			ヒト FcγRIIB
	ProtG ^b	抗-huIgG ^c	抗-kappa ^d	ProtG ^d
E27IgG1	1.00	1.00	1.00	1.00
E27IgG2	1.89 ± 0.37	1.26 ± 0.15	2.73 ± 1.00	0.43 ± 0.10
E27IgG3	1.25 ± 0.17	1.69 ± 0.20	2.99 ± 1.26	1.03 ± 0.13
E27IgG4	0.48 ± 0.11	0.58 ± 0.16	0.64 ± 0.21	0.23 ± 0.08

a 検出用試薬は、H R P 複合タンパク質G (ProtG)、H R P 複合マウス抗ヒトIg G、重鎖用(抗huIgG)、またはH R P 複合マウス抗ヒトカッパ軽鎖(抗kappa)であった。値は、0.37 μg / mlにおけるOD_{490nm} (E27IgG1)に対するOD_{490nm} (E27IgGサブクラス)の割合である。

b 平均 ± S D , n = 8

c 平均 ± S D , n = 5

d 平均 ± S D , n = 3

【0221】

実施例6：カニクイザルFc RIIIAとヒトFc RIIIA-V158は、ヒトIgGサブクラスに対し同等の結合能を示す

材料および方法

ヒトIgGサブクラスに対するFc RIIIAの結合を検出するのに用いる方法は、本質的に例3および例4に示す通りであった。前述したようにFc RIIIA鎖のヒトDNA配列は周知であり、当業者であれば用意に入手可能である。表18に報告するデータは、IgG1濃度0.370 μg/mlにおけるヒトIgG1の結合に対する平均偏差を表す。

10

20

30

40

50

【0222】

結果および論考

表18に示すようにカニクイザルFc RIIIAおよびヒトFc RIIIA-V158は、双方とも本質的に同パターン IgG1 > IgG3 > > IgG2 IgG4にてヒトIgGサブクラスに結合し、IgG3=IgG1 > > IgG2=IgG4のパターンにて結合するヒトFc RIIIA-F158と対照的である。ヒトFc RIIIA-F158 - ヒトIgGサブクラスの結合データは以前の報告に一致する。Gessnerら Ann. Hematol 第76巻 231~248頁(1998年)、Deoら Immunology Today 第18巻 127~135頁(1997年)、Van de Winkel Immunology Today 第14巻 215~221頁(1993年)を参照。図4A、図4Bおよび図4Cは、それぞれヒトFc RIIIA-F158、ヒトFc RIIIA-V158、カニクイザルFc RIIIAの結合パターンを、各IgGサブクラスの濃度上昇に対応して示すとともに、結合相互作用が特異的、濃度依存的かつ飽和性であることを示す。

10

20

【0223】

本データは、カニクイザルFc RIIIAとヒトFc RIIIA-V158がヒトIgGサブクラスとの同等の結合相互作用を有し、特にヒトFc RIIIAに比し、カニクイザルFc RIIIAがIgG2サブクラスに対する好ましい結合能を有することを示す。

【0224】

表 18

ヒトIgGサブクラスの六量体複合体の
カニクイザルおよびヒトFc γ RIIIAに対する結合

サブクラス	カニクイザル ^b	ヒト (F158) ^c	ヒト (V158) ^c
E27IgG1	1.00	1.00	1.00
E27IgG2	0.11 ± 0.02	0.06, 0.13	0.06, 0.03
E27IgG3	0.82 ± 0.08	0.75, 0.82	0.79, 0.82
E27IgG4	0.15 ± 0.04	0.06, 0.11	0.06, 0.04

30

a 検出用試薬は、HRP複合タンパク質Gであった。値は、カニクイザルFc RIIIAおよびヒトFc RIIIA(V158)については0.37 μg/ml、ヒトFc RIIIA(F158)については1.11 μg/mlにおける、OD_{490nm} (E27IgG1)に対するOD_{490nm} (E27IgGサブクラス)の割合である。

b 平均 ± SD, n = 4

c ヒト(F158)およびヒト(V158)は、レセプター位置158にフェニルアラニンまたはバリンを有するヒトFc RIIIAの多型形態である。

【0225】

実施例7: カニクイザルFc RIIIAはヒトIgG1変異体S298AおよびS298A/E333A/K334Aに結合する

40

材料および方法

E27 IgG1における部位特異的変異誘発は、本質的にShieldsら J. Biol. Chem. 第276巻 6591~6604頁(2001年)に記載の通りであった。簡潔に述べると、部位特異的変異誘発は、CH2およびCH3ドメインにおける溶剤曝露残基の幾つかが個々にアラニンに改変されたIgG1変異体を生成するために用いた。アラニン変異体はD265A, S298A, S37A, R292A, D280AおよびS298A/E333Aであった。

【0226】

ELISA反応は本質的に例3~例6に記載の通りであり、未変性IgGタンパク質ではなく、FcレセプターにてIgG変異体をインキュベートした。表19に示す数値につき、ヒトレセプタ

50

ーは1μg/mlであり(吸着変異体／吸着未変性IgG1)、カニクイザルレセプターでは数値は0.370μg/mlであった(吸着変異体／吸着未変性IgG1)。

【0227】

結果および論考

表19および図5～図7に示すように、カニクイザルFc RIに対する全てのIgG変異体の結合パターンは、ヒトFc RIに対する結合パターンに類似した。カニクイザルFc RIIAに対するIgG変異体に関しては、通常、結合パターンはヒト多形体Fc RIIA(H131)と同一のパターンに従った(図5)。上記のように、このことはカニクイザルFc RIIAが残基131番にヒスチジンを有するという事実を表すと考えられる。しかし、留意すべき二つの例外があり、変異体S298Aおよび変異体S298A/E333A/K334Aは未変性ヒトIgG1に比し、カニクイザルFc RIIAに対する結合能が向上し、これら同じ変異体がヒトFc RIIAに対し結合しにくかったことに留意されたい。
10

【0228】

表19および図6につき、カニクイザルFc RIIBに対する変異IgGの結合パターンは、ヒトFc RIIBに対する結合パターンと幾つか異なる点を示した。特に、変異体R255A,E255A,E258A,S37A,D280AおよびR301Aは、未変性ヒトIgGを有するためカニクイザルFc RIIBに対し同等に結合したが、これら同じ変異体が全て、未変性ヒトIgGに比し、ヒトFc RIIBに対し結合能が向上したことを示した。

【0229】

表19および図7につき、カニクイザルFc RIIIAに対する変異IgGの結合パターンは、ヒト多形体Fc RIIIA-F158に対する結合パターンに比し、ヒト多形体Fc IIIA-V158にて確立した結合パターンに従った。このことは、カニクイザルFc RIIIAがヒトFc RIIIA-V158のように位置158に類似したアミノ酸残基のイソロイシン(Fc RIIIA-F158内に位置するフェニルアラニンに比し)を有するという事実を表していると考えられる。
20

【0230】

Fcレセプターに媒介される活性化シグナル(例えばITAM含有Fc RI,Fc RIIAおよびFc RIIIA)を平衡させる、Fcレセプターに媒介される抑制シグナル(例えばITIM含有Fc RIIB)を阻止すれば、抗体の治療効果が向上するであろう。表19に示す予期しない結果は、S298Aを有する変異体がカニクイザルFc RIIAに対し向上した結合能を示し、カニクイザルFc

RIおよびFc RIIIAに対し未変性様の結合能を維持し、カニクイザルFc RIIBに対し著明に低下した結合能を示したことである。二変異体、詳細にはS298AおよびS298A/E333A/K334Aは、活性化ITAM含有Fcレセプターに選択的に結合すると同時に、抑制的ITIM含有Fc RIIBには結合しないように用いることが考えられる。
30

【0231】

表 19

ヒト E27 IgG1変異体のヒトおよびカニクイザルFc γ Rに対する結合

変異体	Fc γ RI	Fc γ RIIA	Fc γ RIIB	Fc γ RIIIA
S239A				
ヒト	0.81 ± 0.09	0.73 ± 0.25	0.76 ± 0.36	0.26 ± 0.08
カニクイザル	N/A	0.68 ± 0.04	N/A	N/A
R255A				
ヒト	0.99 ± 0.12	1.30 ± 0.20	1.59 ± 0.42	0.98 ± 0.18
カニクイザル	0.85 ± 0.15	1.09 ± 0.07	0.80 ± 0.06	0.91 ± 0.08
E258A				
ヒト	1.18 ± 0.13	1.33 ± 0.22	1.65 ± 0.38	1.12 ± 0.12
カニクイザル	0.91 ± 0.08	0.88 ± 0.05	0.99 ± 0.07	0.93 ± 0.11
D265A				
ヒト	0.16 ± 0.05	0.07 ± 0.01	0.13 ± 0.05	0.09 ± 0.06
カニクイザル	N/A	0.05 ± 0.02	0.05	0.04 ± 0.01
S37A				
ヒト	1.09 ± 0.08	1.52 ± .22(R) 1.10 ± .12(H)	1.84 ± 0.43	1.05 ± 0.24
カニクイザル	1.02 ± 0.09	1.23 ± 0.34	1.04 ± 0.30	0.88 ± 0.11
H268A				
ヒト	1.10 ± 0.11	1.21 ± .14(R) 0.97 ± .15(H)	1.44 ± 0.22	0.54 ± 0.12
カニクイザル	1.02 ± 0.09	0.99 ± 0.07	1.20	0.86 ± 0.07

10

20

30

D280A				
ヒト	1.04 ± 0.08	1.34 ± 0.14	1.60 ± 0.31	1.09 ± 0.20
カニクイザル	0.97 ± 0.08	1.45 ± 0.18	1.20 ± 0.11	0.99 ± 0.04
R292A				
ヒト	0.95 ± 0.05	0.27 ± 0.13	0.17 ± 0.07	0.89 ± 0.17
カニクイザル	0.87 ± 0.08	0.80 ± 0.23	0.63 ± 0.06	0.90 ± 0.09
E293A				
ヒト	1.11 ± 0.07	1.08 ± 0.19	1.07 ± 0.20	0.31 ± 0.13
カニクイザル	N/A	0.92 ± 0.07	N/A	N/A
S298A				
ヒト	1.11 ± 0.03	0.40 ± .15(R) 0.24 ± .08(H)	0.23 ± 0.13	1.34 ± 0.20(F)
カニクイザル	1.06 ± 0.09	2.07 ± 0.30	0.20 ± 0.09	1.07 ± .07(V) 0.98 ± 0.13
R301M				
ヒト	1.06 ± 0.12	1.29 ± 0.17	1.56 ± 0.12	0.48 ± 0.21
カニクイザル	1.00 ± 0.09	1.62 ± 0.30	1.27 ± 0.20	0.85 ± 0.08
P329A				
ヒト	0.48 ± 0.10	0.08 ± 0.02	0.12 ± 0.08	0.21 ± 0.03
カニクイザル	N/A	0.21 ± 0.06	N/A	N/A
E333A				
ヒト	0.98 ± 0.15	0.92 ± 0.12	0.76 ± 0.11	1.27 ± 0.17
カニクイザル	N/A	0.67 ± 0.09	N/A	N/A
K334A				
ヒト	1.06 ± 0.07	1.01 ± 0.15	0.90 ± 0.12	1.39 ± 0.19(F)
カニクイザル	1.08 ± 0.09	0.92 ± 0.15	0.66 ± 0.14	1.10 ± .07(V) 1.00 ± 0.15
A339T				
ヒト	1.06 ± 0.04	1.09 ± 0.03	1.20 ± 0.03	1.34 ± 0.09
カニクイザル	N/A	1.05 ± 0.02	N/A	N/A

10

20

30

40

S298A/E333A/K334A				
ヒト	N/A	0.35 ± 0.13	0.18 ± 0.08	1.51 ± 0.31(F)
カニクイザル	1.19 ± 0.08	1.99 ± 0.24	0.12 ± 0.04	1.11 ± 0.08(V) 1.08 ± 0.15

【 0 2 3 2 】

実施例8：カニクイザルFcRnとヒトFcRnはヒトIgGサブクラスに同等に結合する
材料および方法

ヒトの脾臓cDNAライプラリ由来の妥当な重鎖Fc cDNAを、E27可変重鎖ドメインを有するpRKベクターにサブクローニングすることにより、E27(IgG1)のヒトIgG2, IgG3およびIgG4イソタイプを作製した。同一のE27 軽鎖を用い、全てのIgGサブクラスおよび変異体を発現させた。

【 0 2 3 3 】

重鎖および軽鎖プラスミドを293細胞に同時形質移入した後、タンパク質AクロマトグラフィーによりIgG1, IgG2, IgG4および変異体を精製した。IgG3はタンパク質Gクロマトグラフィーにより精製した。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法、ELISA法および分光法を組み合わせて用い、全てのタンパク質製剤を分析した。

【 0 2 3 4 】

本質的にCoussensらScience第230巻1132～39頁(1985年)に記載のように、HerceptinTM IgG1を作製した。HerceptinTM IgG1は組換えDNA由来のモノクローナル抗体であり、IgG1鎖を有する。該鎖は、HER2に結合するマウス抗体(4D5)の相補性決定領域とコンセンサスなアミノ酸フレームワークを有する。

【 0 2 3 5 】

例1に記載のように、鎖細胞外ドメインをコードする断片を生成するプライマーを用い、オリゴ(dt)の初回刺激を受けたRNAの逆転写酵素PCR法(GeneAmp, PerkinElmer Life Sciences社)により、カニクイザルの脾臓細胞からカニクイザルFcRnのcDNAを単離した。EatonらBiochemistry第25巻8343～8347頁(1986年)に記載のように、前述のpRK哺乳類細胞の発現ベクターにcDNAをサブクローニングした。77番塩基にて異なる二本のDNA配列が同定・確認され、一配列はG塩基を有し成熟ポリペプチドにて3番Serを付与し、他方の配列はA塩基を有し成熟ポリペプチドにて3番アスパラギンを付与した。本質的に例1に記載のように、カニクイザルのFcRn(S3)およびFcRn(N3)のcDNAを単離した。

【 0 2 3 6 】

リン酸カルシウム沈殿法(Gorman, C., M., Gies, D.R.およびMcCray, G. DNA Prot. Eng. Iner. Tech.第2巻3～10頁(1990年))により、カニクイザルおよびヒトのFcRnプラスミドをヒト胚性腎細胞に形質移入した。10mg/L組換えウシインスリン、1mg/Lヒトトランスフェリン、および微量元素にて補充した無血清PSO₄培地に転換後72時間にて上澄みを回収した。ニッケル・ニトリロ三酢酸クロマトグラフィー(Qiagen社、カリフォルニア州Valencia)によりタンパク質を精製した。精製タンパク質は4～20% SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法、ELISA法およびアミノ酸分析法を組み合わせて分析した。

【 0 2 3 7 】

カニクイザルFcRn(S3), FcRn(N3)またはヒトFcRnと、ヒトIgG1(herceptin gG1を含む), IgG2, IgG3またはIgG4との相互作用を検出・定量すべく、標準的な酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を実施した(表20)。4にて一晩、50mM炭酸緩衝液pH9.6にて、2μg/mlストレプトアビジン(Zymed Laboratories社、カリフォルニア州サンフランシスコ)にてELISAプレート(Nunc)を被覆した。PBS, 0.5% BSA, 10ppm Proclin300(Supelco社、ペンシルベニア州Bellefonte)を用い、25にて1時間、pH7.2にてプレートをブロックした。標準的プロ

10

20

30

40

50

トコルにより、biotin-X-NHS(Research Organics社、オハイオ州クリープランド)を用い、FcRn-Gly-His₆をビオチニル化し、PBS, 0.5% BSA, 0.05% polysorbate-20(試料緩衝液)、pH7.2、25°Cにて1時間、ストレプトアビシン被覆したプレートに固着させた。次にpH6.0にて試料緩衝液でプレートを洗浄した。pH6.0にて試料緩衝液におけるE27標準型または変異体の8連続2倍希釈液を2時間インキュベートした。pH6.0にて試料緩衝液でプレートを洗浄し、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(Kirkegaard & Perry Laboratories社、メリーランド州Gaithersburg)を基質として用い、pH6.0試料緩衝液にてペルオキシダーゼ抱合ヤギF(ab')₂抗ヒトIgG F(ab')₂(Jackson ImmunoResearch社)により結合IgGを検出した。Vmaxプレートリーダー(Molecular Devices社)に450nmにて吸着度を読み取った。

10

【0238】

図20に示すデータは飽和結合曲線として表した。

【0239】

結果および論考

表20、および対応する図8～図10に示すように、ヒトIgGの4サブクラスに対するカニクイザルFcRn(S3), FcRn(N3)およびヒトFcRnの結合パターンは類似していた。各例において、ヒトおよびカニクイザルのFcRnはIgG3に対し最高水準の結合能を、IgG1に対し最低水準の結合能を示した。特に、ヒトおよびカニクイザルの双方のレセプター-IgG相互作用パターンは、IgG3 > > IgG4 > IgG2 > IgG1であった。ヒトFcRn-IgG結合相互作用のデータが、以前報告したデータに一致することに留意されたい。AP West Jr.およびP.J.Bjorkman Biochemistry第39巻9698頁(2000年)を参照。

【0240】

加えて、ヒトとカニクイザルのFcRnsの結合親和性はIgG1, IgG2およびIgG3に対し類似しており、IgG4に対するヒトFcRnに比し、カニクイザルFcRnがIgG4に対し僅かに親和性が高いことを本データは示す。図8～図10に示すように、ヒトIgGサブクラスに対するヒトおよびカニクイザルのFcRnsの結合は濃度依存性かつ飽和性である。

【0241】

表 20

ヒトIgGサブクラスのヒトFcRnに対する結合

30

サブクラス	Cyno S3 ^a	Cyno N3 ^a	ヒト ^b	ヒト ^c
E27IgG1	1.00, 1.00	1.00, 1.00	1.00	1.00
E27IgG2	1.30, 1.15	1.49, 1.39	1.06 ± 0.10	0.93 ± 0.16
E27IgG3	3.82, 3.59	4.34, 3.97	5.60 ± 1.31	1.55 ± 0.45
E27IgG4	1.52, 1.44	1.59, 1.62	1.06 ± 0.23	0.95 ± 0.14

40

a プレートをNeutrAvidinで被覆した後FcRn-ビオチンで被覆し、次いで試料で被覆し、HRP複合ヤギ抗ヒトF(ab')₂を用いて検出するアッセイ。値は、2回のアッセイについて、[mAb] = 50 ng/mlにおけるOD_{490nm} (E27IgG1)に対するOD_{490nm} (E27IgGサブクラス)の割合である。カニクイザルS3及びN3のアミノ酸は、位置3においてのみ異なる。

b プレートをNeutrAvidinで被覆した後FcRn-ビオチンで被覆し、次いで試料で被覆し、HRP複合ヤギ抗ヒトF(ab')₂を用いて検出するアッセイ。値は、5回のアッセイについて、[mAb] = 50 ng/mlにおけるOD_{490nm} (E27IgG1)に対するOD_{490nm}

50

_m (E27IgGサブクラス)の割合である。第2の、E27IgG1の別個のロットは、標準として使用したE27IgG1と比較して、0.81 ± 0.03 (平均 ± S.D., n = 3) を示した。
c プレートをヒトIgEで被覆した後試料で被覆し、次いでFcRn-ビオチンで被覆し、HRP複合ストレプトアビジンを用いて検出するアッセイ。値は、4回のアッセイについて、[mAb] = 50 ng/ml におけるOD_{490 nm} (E27IgG1) に対するOD_{490 nm} (E27IgGサブクラス)の割合である。第2の、E27IgG1の別個のロットは、標準として使用したE27IgG1と比較して、0.92 および 0.88 を示した。

【0242】

ヒトとカニクイザルのFcRnは各IgGサブクラスに対し互いに類似した親和性を有し、類似した結合相互作用パターンを示すため、IgGサブクラスの検出にあたり、ヒトFcRnの代わりにカニクイザルFcRnを用いることが可能であることを本データは示す。 10

【0243】

本発明は上記の目的ならびに利点、および内在する目的ならびに利点を実現するようによく適合されていることは自明であろう。本発明を開示する目的で現在好ましい実施例を記載しているが、本発明の範囲内であれば種々の変更および改変が可能である。当業者に容易に示唆され、本願において開示するとともに添付したクレームにて明示するような本発明の精神に含まれれば、他の多くの変更が可能である。

【0244】

配列の同定および
配列アイデンティファイラー

配列番号	定義	位置	登録番号
1	Fc γ RI α 鎖のカニクイザル DNA	表 3	—
2	Fc γ RI α 鎖のヒト DNA	表 3	GenBank L03418
3	Fc γ RIIA のカニクイザル DNA	表 5	—
4	Fc γ RIIA のヒト DNA	表 5	GenBank M28697
5	Fc γ RIIB のカニクイザル DNA	表 6	—
6	Fc γ RIIB のヒト DNA	表 6	GenBank X52473
7	Fc γ RIIIA α 鎖のカニクイザル DNA	表 7	—
8	Fc γ RIIIA α 鎖のヒト DNA	表 7	GenBank X52645
9	カニクイザル Fc γ RI α 鎖のアミノ酸配列	表 10	—
10	ヒト Fc γ RI α 鎖のアミノ酸配列	表 10	GenBank P12314
11	カニクイザル Fc γ RI/III ガンマ鎖のアミノ酸配列	表 12	—
12	ヒト Fc γ RI/III ガンマ鎖のアミノ酸配列	表 12	GenBank P30273
13	カニクイザルガンマ鎖 DNA の DNA 配列	表 4	—
14	ヒトガンマ鎖 DNA の DNA 配列	表 4	GenBank M33195
15	カニクイザル Fc γ RIIA のアミノ酸配列	表 11	—
16	ヒト Fc γ RIIA のアミノ酸配列	表 11	GenBank P12318
17	チンパンジーFc γ RIIA のアミノ酸配列	表 11	—
18	カニクイザル Fc γ RIIB のアミノ酸配列	表 11	—
19	ヒト Fc γ RIIB のアミノ酸配列	表 11	GenBank X52473
20	カニクイザル Fc γ RIIIA α 鎖のアミノ酸配列	表 11	—
21	ヒト Fc γ RIIIA α 鎖のアミノ酸配列	表 11	GenBank P08637
22	チンパンジーFc γ RIIIA の DNA 配列	表 5	—
23	カニクイザル β -2ミクログロブリン DNA	表 8	
24	ヒト β -2ミクログロブリン DNA	表 8	AB 021288
25	カニクイザル β -2ミクログロブリンのアミノ酸配列	表 13	—
26	ヒト β -2ミクログロブリンのアミノ酸配列	表 13	P01884
27	カニクイザル FcRn α 鎖 DNA	表 9	—
28	ヒト FcRn α 鎖 DNA	表 9	U12255
29	カニクイザル FcRn α 鎖 (S3) のアミノ酸配列	表 14	—
30	ヒト FcRn α 鎖のアミノ酸配列	表 14	U12255
31	カニクイザル Fc γ RI 完全長フォワードプライマー	表 1	
32	カニクイザル Fc γ RI 完全長リバースプライマー	表 1	

10

20

30

40

3 3	カニクイザル $Fc\gamma$ RI-H6-GST フォワードプライマー	表 1
3 4	カニクイザル $Fc\gamma$ RI-H6-GST リバースプライマー	表 1
3 5	カニクイザル $Fc\gamma$ RIIB 完全長フォワードプライマー	表 1
3 6	カニクイザル $Fc\gamma$ RIIB 完全長リバースプライマー	表 1
3 7	カニクイザル $Fc\gamma$ RIIB-H6-GST フォワードプライマー	表 1
3 8	カニクイザル $Fc\gamma$ RIIB-H6-GST リバースプライマー	表 1
3 9	カニクイザル $Fc\gamma$ RIIIA 完全長フォワードプライマー	表 1
4 0	カニクイザル $Fc\gamma$ RIIIA 完全長リバースプライマー	表 1
4 1	カニクイザル $Fc\gamma$ RIIIA-H6-GST フォワードプライマー	表 1
4 2	カニクイザル $Fc\gamma$ RIIIA-H6-GST リバースプライマー	表 1
4 3	カニクイザル Fc ガンマ鎖フォワードプライマー	表 1
4 4	カニクイザル Fc ガンマ鎖リバースプライマー	表 1
4 5	カニクイザル β -2ミクログロプリンフォワードプライマー	表 1
4 6	カニクイザル β -2ミクログロプリンリバースプライマー	表 1
4 7	カニクイザル $Fc\gamma$ RIIA 完全長フォワードプライマー	表 1
4 8	カニクイザル $Fc\gamma$ RIIA 完全長リバースプライマー	表 1
4 9	カニクイザル $Fc\gamma$ RIIA-H6-GST フォワードプライマー	表 1
5 0	カニクイザル $Fc\gamma$ RIIA-H6-GST リバースプライマー	表 1
5 1	カニクイザル $FcRn$ 完全長フォワードプライマー	表 1
5 2	カニクイザル $FcRn$ 完全長リバースプライマー	表 1
5 3	カニクイザル $FcRn$ -H6 フォワードプライマー	表 1
5 4	カニクイザル $FcRn$ -H6 リバースプライマー	表 1
5 5	PCR プライマー-0F1	表 2
5 6	PCR プライマー-0R1	表 2
5 7	PCR プライマー-0F2	表 2
5 8	PCR プライマー-0F3	表 2
5 9	PCR プライマー-0R2	表 2
6 0	PCR プライマー-0F4	表 2

10

20

30

6 1	PCR プライマー0R3	表 2
6 2	PCR プライマー0F5	表 2
6 3	PCR プライマー0R4	表 2
6 4	カニクイザル FcRn α 鎖(N3)のアミノ酸配列	表 1 4
6 5	成熟カニクイザル Fc γ RI α 鎖のアミノ酸配列	表 1 0
6 6	成熟カニクイザル Fc γ RIIA のアミノ酸配列	表 1 1・2 1
6 7	成熟チンパンジーFc γ RIIA のアミノ酸配列	表 1 1
6 8	成熟カニクイザル Fc γ RIIB のアミノ酸配列	表 1 1・2 2
6 9	成熟カニクイザル Fc γ RIIIA α 鎖のアミノ酸配列	表 1 1・2 3
7 0	成熟カニクイザル β ・2 ミクログロブリンのアミノ酸配列	表 1 3
7 1	成熟カニクイザル Fc γ Rn α 鎖(S3)のアミノ酸配列	表 1 4
7 2	成熟カニクイザル FcRn α 鎖(N3)のアミノ酸配列	表 1 4

10

20

30

【図面の簡単な説明】

【0 2 4 5】

【図 1 A】ヒトFc RIに結合したモノマーのIgGサブクラスの説明図

【図 1 B】カニクイザルFc RIに結合したモノマーのIgGサブクラスの説明図

【図 2】カニクイザルFc RIIAに結合した六量体免疫複合体の説明図

【図 3 A】ヒトFc RIIBに結合した六量体免疫複合体の説明図

【図 3 B】カニクイザルFc RIIBに結合した六量体免疫複合体の説明図

【図 4 A】ヒトFc RIIIA-F158に結合した六量体免疫複合体の説明図

【図 4 B】ヒトFc RIIIA-V158に結合した六量体免疫複合体の説明図

【図 4 C】カニクイザルFc RIIIAに結合した六量体免疫複合体の説明図

【図 5】ヒトIgG1変異体をカニクイザルFc RIIAに結合した六量体免疫複合体の説明図

【図 6】ヒトIgG変異体をカニクイザルFc RIIBに結合した六量体免疫複合体の説明図

【図 7】ヒトIgG変異体をカニクイザルFc RIIIAに結合した六量体免疫複合体の説明図

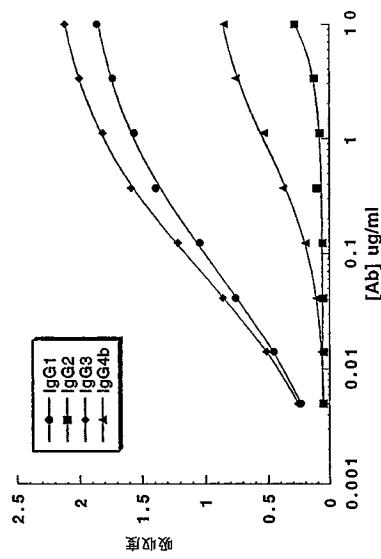
【図 8】ヒトFcRnに結合した濃度依存性モノマーIgGサブクラスの説明図

【図 9】カニクイザルFcRn(S3)に結合した濃度依存性モノマーIgGサブクラスの説明図

【図 10】カニクイザルFcRn(S3)に結合した濃度依存性モノマーIgGサブクラスの説明図

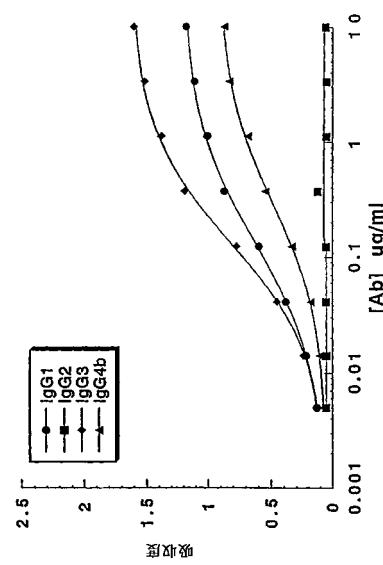
【図 1 A】

ヒトFcgrIIに対する単量体IgGサブクラスの結合
(HRP抗カツハ錆による検出結果)



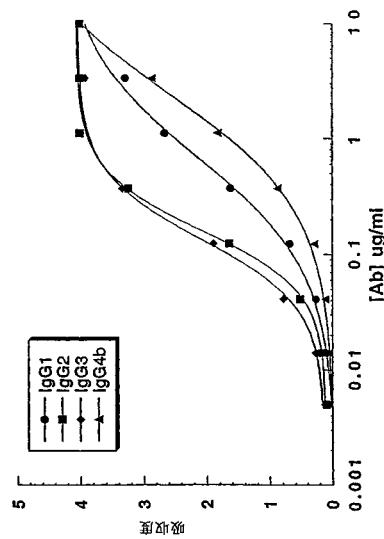
【図 1 B】

カニケイザルFcgrIに対する単量体IgGサブクラスの結合
(抗カツハ錆による検出結果)



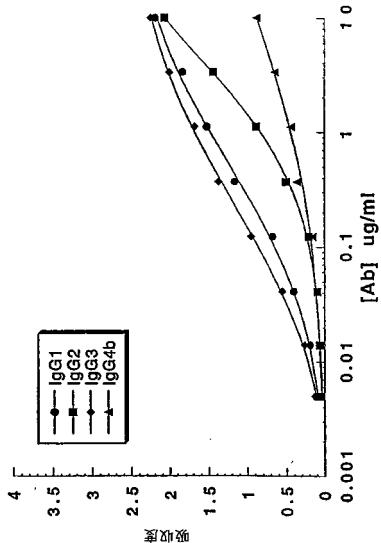
【図 2】

カニケイザルFcgrIIA IgGサブクラスに対する六量体複合体の結合
(HRP抗カツハ錆による検出結果)

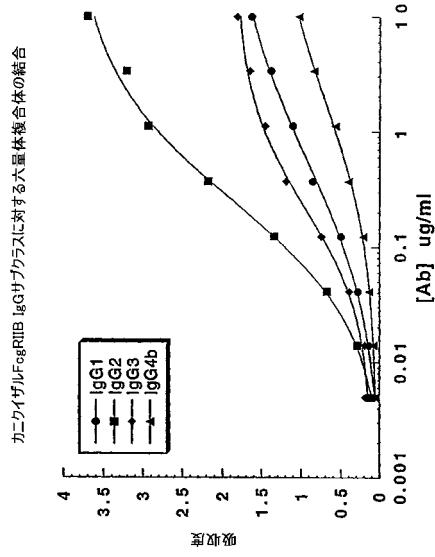


【図 3 A】

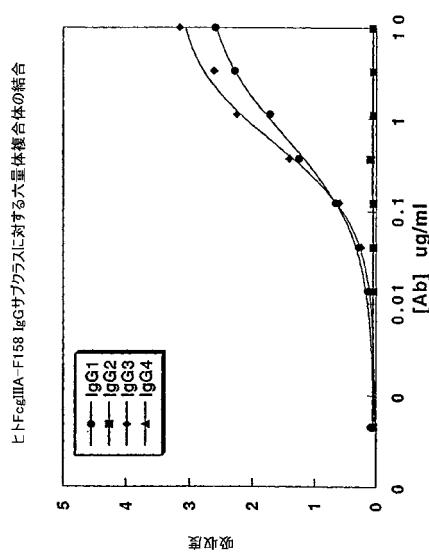
ヒトFcgrIIIB IgGサブクラスに対する六量体複合体の結合



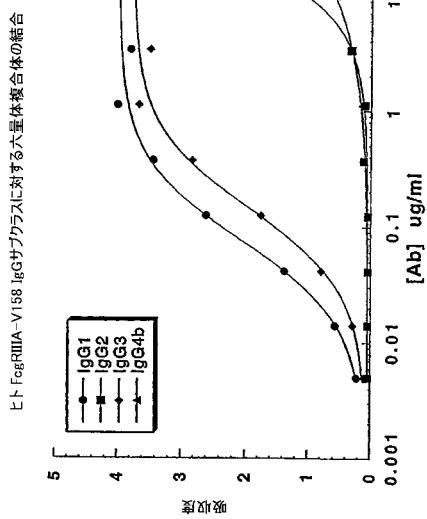
【図3B】



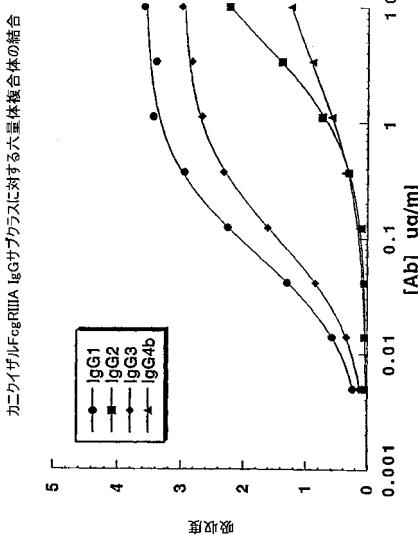
【図4A】



【図4B】

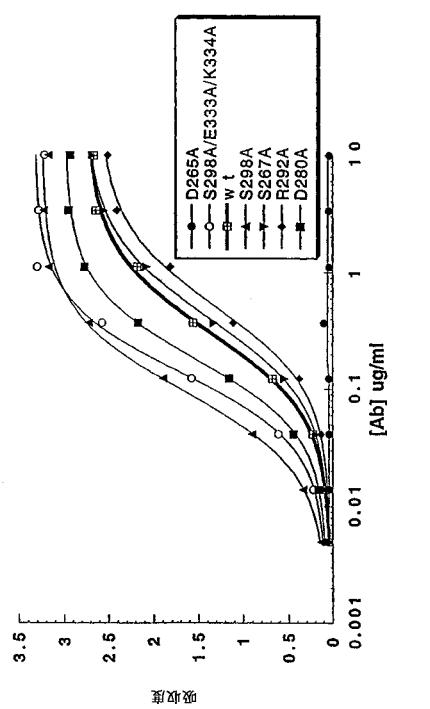


【図4C】

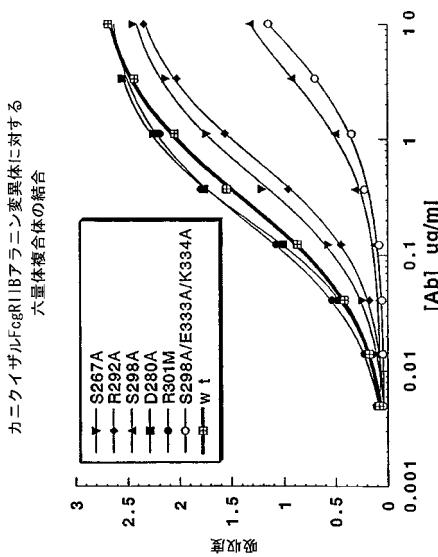


【図5】

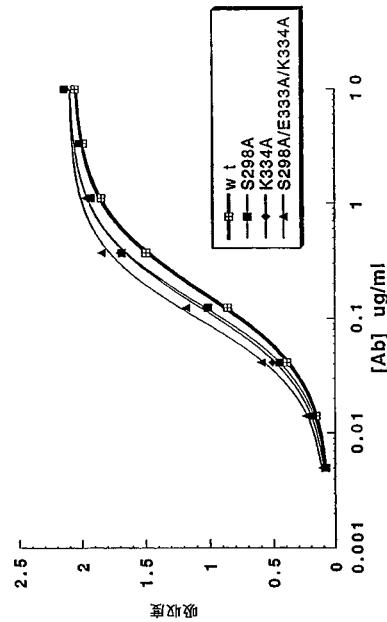
カニクイザルFcRn/IAアラニン変異体に対する大量体複合体の結合



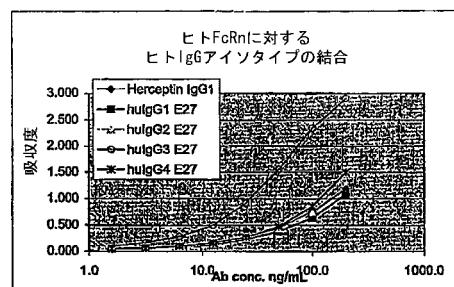
【図6】



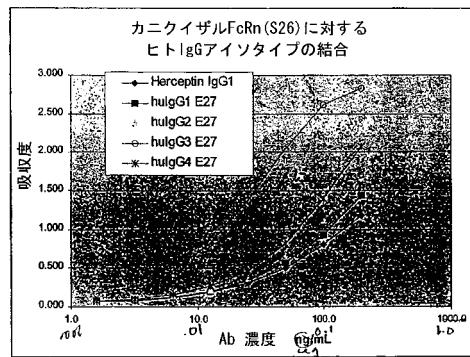
【図7】

カニクイザルFcRn/IAアラニン変異体に対する
大量体複合体の結合

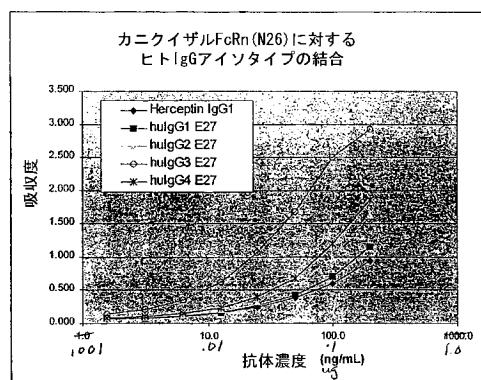
【図8】



【図9】



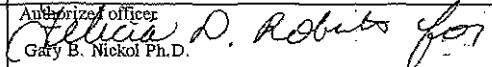
【図10】



【配列表】

2005512574000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/38805
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07H 21/04; C12N 15/00, 5/00 US CL : 536/23.5; 435/320.1,325 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) U.S. : 536/23.5; 435/320.1,325		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPATENT, GENESEQ, EST, PGPUB, GENEMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GenEmbl Database, National Center For Biotechnology Information, National Library of Medicine, NIH (Bethesda, MD, USA), Accession Number AF485812, NAMENUK et al, "Binding of human IgG to cynomolgus FcR", Gene Sequence, March 2002, 100% identical to SEQ ID NO:9.	1-2, 7-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 application or patent 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		
Date of the actual completion of the international search 22 October 2003 (22.10.2003)	Date of mailing of the international search report 14 NOV 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer  Gary B. Nickol Ph.D. Telephone No. 703-308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/38805

Continuation of Item 4 of the first sheet:
There is a misspelled word in the title.

NEW TITLE:

NON-HUMAN PRIMATE FC RECEPTORS AND METHODS OF USE

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group 1-17, claim(s) 1-2, 7-13, drawn to the special technical feature of ONE isolated nucleic acid encoding ONE of the seventeen non-human primate Fc receptor polypeptide from those sequences listed in Claims 1 and 2. Upon payment of additional search fees, applicant should indicate the nucleic acid and corresponding encoded polypeptide by SEQ ID NO. If no additional search fees are provided, the first sequence in Claim 1 (i.e. SEQ ID NO:9) will be searched together with the first sequence listed in Claim 2 (SEQ ID NO:1).

Groups 18-29, claim(s) 3-13, drawn to the special technical feature of a method for obtaining one nucleic acid sequence encoding an Fc receptor polypeptide comprising using ONE of the twelve sets of forward and reverse primers listed in Claim 3. Upon payment of additional search fees, applicant should indicate the sets of primers to be searched. If no additional search fees are provided, the first set of primers (i.e. SEQ ID NO: 31 and SEQ ID NO:32) will be searched.

Groups 30-46, claim(s) 14, 18-24 drawn to the special technical feature of ONE of the seventeen isolated polypeptides listed in Claim 14 and corresponding variant polypeptides cited in Claims 18-24. Upon payment of additional search fees, applicant should indicate the polypeptide by SEQ ID NO. If no additional search fees are provided, the first sequence in Claim 14 (i.e. SEQ ID NO:9 & variants) will be searched.

Groups 47-52, claim(s) 15-17, drawn to the special technical feature of ONE of the six isolated fusion polypeptides listed in Claim 15. Upon payment of additional search fees, applicant should indicate the selected fusion polypeptide by SEQ ID NO. If no additional search fees are provided, the first sequence in Claim 15 (i.e. amino acids 1-269 of SEQ ID NO: 65) will be searched.

Groups 53-57, claim(s) 25-35, drawn to the special technical feature of a method for evaluating at least one biological property of an Fc region containing molecule comprising contacting ONE of the five isolated non-human Fc receptor polypeptides from those listed in Claim 34. Upon payment of additional search fees, applicant should indicate the non-human Fc receptor polypeptide by SEQ ID NO. If no additional search fees are provided, the first sequence in Claim 34 (i.e. amino acids 1-265 of SEQ ID NO: 65) will be searched.

Group 58, claim(s) 36-39, drawn to the special technical feature of a method for identifying agents that have increased affinity for at least one cynomolgus Fc receptor polypeptide with an ITAM region compared to human Fc receptor polypeptides.

Group 59, claim(s) 40-41, drawn to the special technical feature of a method for identifying an agent that has an altered affinity for a cynomolgus Fc receptor polypeptide with an ITIM region compared to corresponding human Fc receptor polypeptide.

The inventions listed as Groups 1-59 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/38805

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

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

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim Nos.:
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:

3. Claim 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 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

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.: 1-2, 7-13 (SEQ ID NO:9; and 1)

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

PCT/US02/38805

The technical feature linking Groups 1-59 are isolated nucleic acids comprising polynucleotide sequences that encode non-human primate FC receptor polypeptides or fragments thereof. The polypeptide or fragments thereof can be any one of SEQ ID Nos: 9, 11, 15, 17-18, 20, 25, 29, or 64-72. It is noted that the specification teaches (page 13) that the term "fragment" is used to describe a portion of an Fc receptor polypeptide or a nucleic acid encoding a portion of an Fc receptor polypeptide.

However, the (GenEmbl Database, Accession No.L03418, May 1993) teaches an isolated nucleic acid comprising a polynucleotide sequence that encodes a polypeptide with 95% similarity to SEQ ID NO:9. Hence, the prior art reads on an isolated nucleic acid encoding a fragment of SEQ ID NO:9.

Therefore, the technical feature linking the inventions of Groups 1-59 does not constitute a special technical feature as defined by PCT Rule 13.2 as it does not define a contribution over the prior art.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 12 Q 1/02	G 01 N 33/15	Z
G 01 N 33/15	G 01 N 33/50	Z
G 01 N 33/50	C 12 N 5/00	B

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ, GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注:以下のものは登録商標)

UNIX

(72)発明者 ネームスク , アンジェラ ケ .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94602 , オークランド , フロリダ ストリート 2948

Fターム(参考) 2G045 AA35 DA13 FB02

4B024 AA01 AA11 BA31 BA63 CA04 DA02 EA04 GA11 HA14 HA15
4B063 QA01 QA05 QQ08 QR48 QR77 QS33 QS36 QX01
4B065 AA90Y AA93X AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA50 DA86 EA20 EA50 FA74 GA26