

(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.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 14/705	4 B O 2 4
C 0 7 K 14/735	C 0 7 K 14/735	4 B O 6 3
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	4 H O 4 5
	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 義敦
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/038805	(72) 発明者	プレスタ, 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) 国際公開番号	W02003/054213		
(87) 国際公開日	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】 非ヒト霊長類Fcレセプターおよびその利用方法

(57) 【要約】

本発明は、単離された非ヒト霊長類の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、非ヒト霊長類の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霊長類の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霊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。

【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】

非ヒト霊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】

非ヒト霊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。

【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。 30

【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】

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 / his 6 - g s t 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。

20

【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) 単離した非ヒト霊長類 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】

非ヒト霊長類 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】

50

非ヒト霊長類FcレセプターポリペプチドがFcRI鎖、FcRIIA、FcRIIB、FcRIIIA鎖、FcRn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】

非ヒト霊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】

生物特性が非ヒト霊長類Fcレセプターポリペプチドに対するFc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Fc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】

単離した非ヒト霊長類FcレセプターポリペプチドがFcRn鎖であり、生物特性がFc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】

非ヒト霊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) Fc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) 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。

【請求項36】

a) ITAM領域を有するポリペプチドをとまなう少なくとも一つのカニクイザルFc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Fc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) ITAM領域を有するポリペプチドに関連し、対応するヒトFcレセプターに比し、カニクイザルFc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Fcレセプターポリペプチドに比し、ITAM領域を有する少なくとも一つのカニクイザルFc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IgG抗体である、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

FcレセプターポリペプチドがFcRI鎖、FcRIIA、FcRIIIA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FcRIIB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FcRIIB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Fcレセプターに比し、ITIM領域を有するカニクイザルFcRIIB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Fcレセプターポリペプチドに比し、ITIM領域を有するカニクイザルFc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 41】

薬剤が抗体である、請求項 40 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

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)、および兩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。

【0002】

10

発明の分野

本発明は、一般的に、単離・精製された非ヒト霊長類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、非ヒト霊長類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。

【0003】

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たしている。DeoらImmunology Today第18巻127~135頁(1997年)を参照。

20

【0004】

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 of 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、FcR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、FcRIb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FcRIIc)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)、Capele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。

30

40

【0005】

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70~72kDa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。

50

【0006】

Fc RI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 RI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 RIはモノマーIgGとの結合力は弱い($> 10^7 \text{ M}^{-1}$)、複合IgGに対しては高親和性を有する。

【0007】

10

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γ(ガンマ)鎖またはδ(デルタ)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。γ(ガンマ)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】

20

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。

30

【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。(CamigoreaらScience第256巻1808頁Cytoplasmic Domain Heterogeneity and Function of IgG Receptors in B Lymphocytes(1992年)を参照。)

40

【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たすため、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

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、霊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、ヒト抗体と霊長類Fc レセプターとの相互作用や、該相互作用が霊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与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霊長類由来の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、霊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、非ヒト霊長類の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、非ヒト霊長類の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ミクログロブリン・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、非ヒト霊長類のFc レセプターおよび非ヒト霊長類の 2ミクログロブリンも提供する。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ミクログロブリン・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、成熟した非ヒト霊長類の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、成熟した非ヒト霊長類の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、非ヒト霊長類の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霊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。非ヒト霊長類の細胞は、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、非ヒト霊長類のFc レセプターポリペプチドおよび 2ミクログロブリンの変異体、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、非ヒト霊長類の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ション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】

非ヒト霊長類の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霊長類の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霊長類の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、翻訳後プロセッ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 GF c領域の「CH2」ドメイン（「C 2」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】

「Fcレセプター」という用語は、抗体のFc領域、または分子を含むFc領域に結合するレセプターを意味する。好適なFcレセプターは、Ig G抗体(Fc R)に結合し、Fc RI、Fc RII、Fc RIII、およびFc 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。「FcRポリペプチド」は、抗体のFc領域又は分子を含むFc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。「Fc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。「Fc Rポリペプチド」という用語は、Ig G抗体のFc領域または分子を含むIg GF 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、Fc RI及びFc RIIレセプターの各々は、鎖のFc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Fcレセプターポリペプチド鎖を含む。Fc RnレセプターはFc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Fc領域に結合する細胞外領域を有する。Fc 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「Fc R」という用語は、未来に同定されるものを含めたその他のFc Rを含有する。

20

【0033】

「断片」という用語は、Fcレセプターポリペプチド、またはFc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Fc領域に対する結合能を有する。Fc RI / III及びFc RIIA又はBのFc -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、またそれの特徴とする。Fcレセプター鎖またはFc RIIAまたはBは、Fc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Fc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。FcレセプターポリペプチドまたはFc Rの場合には、結合ドメインは、免疫グロブリンのFc領域または他のFc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Fc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トランスフェラーゼに融合したFcレセプターポリペプチド、およびGly6-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Fc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、エキソピボ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、Fc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(Summer s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ェンシー、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Fc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Fc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FcRあるいはFc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

プ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。

10

【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。

20

【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：

30

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の長さとは等しくない場合、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ることが理解できる。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。

40

【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

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、ALIGN - 2 配列比較コンピュータプログラムはW000 / 15796に記載されているように使用できる。

【0049】

「ストリンジェンシー」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 SSC / 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 SSC、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。

10

【0050】

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。

【0051】

「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FcRIのcDNA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。

20

【0052】

発明の実施の形態

30

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霊長類由来の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FcR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FcR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。

【0053】

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、霊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）の結合を評価するのに有用である。評価には、ELISA法型による霊長類のFcR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霊長類の細胞（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霊長類のFcRs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FcRnまたはFcRn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

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】

霊長類の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、霊長類またはヒトの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、霊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、霊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。

【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。

20

【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.Deutschcer"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フトン)。

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、成熟した非霊長類の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】

非ヒト霊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、配列同一性を定量すべく、ヒトの配列と並べられてきた。霊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、Gen Bank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（Gen Bank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（Gen Bank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（Gen Bank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：17）。成熟したチンパンジーのFcRIIA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：22）。配列番号：22の配列を有する核酸配列は、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FcRIIB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FcRIIB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FcRIIB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FcRIIB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FcRIIBをコードする核酸配列は、FcRIIB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）。

10

【0067】

本発明は、一実施例において、カニクイザルのFcRIIA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FcRIIA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FcRIIA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FcRIIA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FcRIIA鎖の核酸配列は、FcRIIA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）。

20

【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）。

30

【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）。

40

【0070】

本発明の非ヒト霊長類の核酸は、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

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FcγR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、非ヒト霊長類のFcγ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霊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。非ヒト霊長類の細胞は、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Fcγレセプターポリペプチドの細胞外断片を増幅する。

10

【0072】

本願に記載のカニクイザルおよびチンパンジーのFcγR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/ノーザンブロット法にてFcγR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。FcγR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、核酸分子の末端と一致する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、FcγR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。

20

【0073】

カニクイザルの異なるFcγRポリヌクレオチドの他の有用な断片は、標的FcγR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。

30

【0074】

他の有用な断片は、Fcγ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、Fcγ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。Fcγ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。

40

【0075】

本発明は、カニクイザルならびにチンパンジーの異型FcγR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

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のように該目的に対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。

10

【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 BioTechniques12~19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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

において記載する。

【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霊長類の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霊長類由来のFcRポリペプチドに関する。FcRポリペプチドは、FcRIの鎖、FcRIIA、FcRIIB、FcRIIIAの鎖、FcRnの鎖、FcRI/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を定量する。霊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、総残基数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番はアスタ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、非ヒト霊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霊長類の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巻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FcRIポリペプチドである。カニクイザルFcRI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I

10

20

30

40

50

g Gに結合する。カニクイザルFc RI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Fc RI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Fc RI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、Fc RI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Fc RI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。

10

【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Fc RI鎖はヒトのFc RI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Fc RI鎖の細胞内ドメインは、ヒトのFc RI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Fc RI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Fc RIに類似する。

20

【0089】

IおよびIIIAサブクラスのFc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FcR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。

30

【0090】

本発明の別の実施例はカニクイザルのFcRIIAである。カニクイザルのFcRIIAは、免疫グロブリン及び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FcRIIA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FcRIIA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FcRIIA配列を、表11に示すように、ヒトのFcRIIA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MAMETQ配列と併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FcRIIAはヒトのFcRIIA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FcRIIAはヒトのFcRIIA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)。カニクイザルのFcRIIAは

40

50

、ヒトのレセプターに認められるように二つの同一 I T A M モチーフを有することに留意されたい (表 1 1)。

【0092】

カニクイザルの F c R I I A は、次の結合パターンによりサブクラスの I g G 六量体複合体に結合する。I g G 3 = I g G 2 > I g G 1 > I g G 4 b , I g G 4。アミノ酸 1 3 1 番に対応するアミノ酸にアルギニンをも有するヒトの F c R I I A イソフォーム (R 1 3 1) は、六量体の I g G サブクラスに次のように結合する。I g G 3 I g G 1 > > > I g G 2 I g G 4。アミノ酸 1 3 1 番に対応するアミノ酸にヒスチジンを有するヒトの F c R I I A イソフォーム (H 1 3 1) は、六量体の I g G サブクラスに次のように結合する。I g G 3 I g G I = I g G 2 > > > I g G 4。配列番号：15 のアミノ酸配列を有するカニクイザルの F c R I I A は H 1 3 1 を有し、H 1 3 1 イソフォーム変異体をも有するヒトのレセプターと同様に、ヒト I g G のサブクラスに結合する。しかし、カニクイザルの F c レセプターは I g G 3 に結合するのと同様に効率的に I g G 2 に結合する。

10

【0093】

本発明の別の実施例はチンパンジーの F c R I I A である。チンパンジーの F c R I I A は、免疫グロブリンおよび F c 領域をも有する他の分子に、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 I g 免疫複合体に結合する。チンパンジーの F c R I I A の一例は配列番号：17 のアミノ酸配列をも有する。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 F c R I I A は配列番号：67 のアミノ酸配列をも有する。

20

【0094】

チンパンジーの F c R I I A アミノ酸配列を、表 1 1 に示すように、シグナル配列と共に開始し、ヒトの F c R I I A 配列番号：16 と並べた (登録番号 P 1 2 3 1 8)。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 F c R I I A は、シグナルペプチド配列においてヒトの F c R I I A 鎖に認められるよりアミノ酸が一つ少ない (表 1 1)。チンパンジーの 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 1 1)。チンパンジーの F c R I I A 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 I T A M モチーフを有することに留意されたい (表 1 1)。

30

【0095】

本発明の別の実施例はカニクイザルの F c R I I B である。カニクイザルの F c R I I B は、免疫グロブリンおよび F c 領域をも有する他の分子に、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 I g 免疫複合体に結合する。カニクイザルの F c R I I B の一例は配列番号：18 のアミノ酸配列をも有する。カニクイザルの成熟 F c R I I B は配列番号：68 のアミノ酸配列をも有する (表 2 2)。例 1 のプライマーを用いて得られる細胞外断片は、表 2 2 に示すように、1 ~ 184 のアミノ酸配列をも有する。

40

【0096】

カニクイザルの F c R I I B は表 1 1 に示すように、ヒト F c R I I B 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 X 5 2 4 7 3)。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 F c R I I B はヒトの F c R I I B 配列に認められるのと同数のアミノ酸を、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 1 1)。カニクイザルの F c R I I B 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 F c R I I B と比較) (表 1 1)。カニクイザルの F c R I I B は、ヒトのレセプターに認められる I T I M モチーフと同一の I T I M モチーフを有することに留意されたい (表 1 1)。

【0097】

50

カニクイザルの F c R I I B は、次の結合パターンにより、サブクラスの I g G の六量体複合体に結合する。I g G 2 I g G 3 > I g G 1 > I g G 4 b , I g G 4。ヒトの F c R I I B は六量体の I g G サブクラスに次のように結合する。I g G 3 I g G 1 > I g G 2 > I g G 4。カニクイザルの F c R I I B はヒトの F c R I I B より遥かに効率的に I g G 2 に結合する。

【 0 0 9 8 】

本発明の別の実施例はカニクイザルの F c R I I I A である。カニクイザルのレセプター F c R I I I A は、免疫グロブリンおよび F c 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 I g 免疫複合体に結合する。F c R I I I A 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 F c R I I I A 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。

10

【 0 0 9 9 】

カニクイザルの F c R I I I A 鎖の配列を、表 11 に示すように、ヒトの F c R I I I A のアミノ酸配列と並べた（配列番号：21）（登録番号 P 0 8 6 3 7）。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 F c R I I I A 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 F c R I I I A 鎖はヒトの F c R I I I A 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 I T A M モチーフを有さない。ヒトの F c R I I I A に対する I T A M 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。

20

【 0 1 0 0 】

カニクイザルの F c R I I I A 鎖は、次の結合パターンによりサブクラスの I g G 六量体複合体に結合する。I g G 1 > I g G 3 > > I g G 2 I g G 4 b , I g G 4。アミノ酸 158 番に対応するアミノ酸にフェニルアラニン（F 158）を有するヒトの F c R I I I A イソフォーム（F 158）は、六量体の I g G サブクラスに次のように結合する。I g G 3 = I g G 1 > > > I g G 2 , I g G 4。アミノ酸 158 番に対応するアミノ酸にバリン（V 158）を有するヒトの F c R I I A イソフォーム（V 158）は、六量体の I g G サブクラスに次のように結合する。I g G 1 > I g G 3 > > > I g G 2 A , I g G 4。アミノ酸配列配列番号：20 を有するカニクイザルの F c R I I I A 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 F c R I I I A の V 158 と同様にヒト I g G のサブクラスに結合する。

30

【 0 1 0 1 】

ヒト I g G 1 は、ヒト F c R I I I A - F 158 に対してよりもヒト F c R I I I A V 158 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 巻 1109 ~ 1114 頁 (1997 年), Wu, J., E dberg, J.C., Redecha, P.B., Bansal, V., Guyre, P.M., Coleman, K., Salmon, J.E. および K imberly, R.P. J.Clin. Invest. 第 100 巻 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 巻 6591 ~ 6604 頁 (2001 年) を参照)。ヒトにおいて、F c R I I I A F 158 対立遺伝子は、少なくとも一つの F c R I I I A F 158 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., Fosterr, C.B., Zhu, S., Leitman, S.F., Goldin, L.R., Huppi, K. および Chanock, S.J. Blood 第 94 巻 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 F c R I I

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)。チンパンジーおよびカニクイザルの Fc R I I I A が 1 5 8 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 R I I I A およびヒト Fc R I I I A V 1 5 8 (ヒト Fc R I I I A F 1 5 8 と対照的に) に対するヒト Ig G の 4 サブクラスの結合能が類似しているということは、霊長類モデルにおいてヒト抗体を評価するには、Fc R I I I A レセプターに関し、僅か少数のヒト、即ち Fc R I I I A V 1 5 8 / V 1 5 8 ホモ接合体を表す霊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 R I I I A V 1 5 8 は、ヒト Fc R I I I A F 1 5 8 に比し、卓越した抗体依存性細胞傷害性 (A D C C) 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))、霊長類モデルでは Fc R I I I A に関連するヒト抗体のエフェクター機能の効果を過大評価する可能性がある。

10

【0102】

しかし、カニクイザルの他の Fc R s、特に Fc R I に対するヒト Ig G のサブクラスの結合パターンは、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、非ヒト霊長類を効果的に用い得ることを示す。

20

【0103】

本発明は Fc R 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 1 4 にカニクイザルの Fc R n のアミノ酸配列を示す。表 1 4 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 1 4 に示す。カニクイザルの Fc R 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 Fc R 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パラギンを有する。Fc R n 鎖 S 3 および Fc R n 鎖 N 3 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 Fc R n の細胞外断片は、表 1 4 に示すように、1 ~ 274 のアミノ酸配列を有する。

30

【0104】

ヒト Fc R n 鎖の配列 (配列番号：20) (Gen Bank 登録番号 U12255) に対し、カニクイザル Fc R 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 Fc R n (S3) および Fc R n (N3) の鎖は、次の結合パターンにて Ig G のサブクラスに結合する。Ig G 3 > Ig G 4 > Ig G 2 > Ig G 1。該結合パターンはヒト Fc R n 鎖の結合パターンに類似している。

40

【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 1 3 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) (Gen Bank 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 Fc R 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

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 RI 鎖アミノ酸残基 270 ~ 336 番、配列番号：66 の Fc RI IA アミノ酸残基 183 ~ 282 番、配列番号：67 のチンパンジー Fc RI IA アミノ酸残基 172 ~ 281 番、配列番号：68 の Fc RI IB アミノ酸残基 185 ~ 252 番、配列番号：69 の Fc RI IA 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 Rn アミノ酸残基 275 ~ 342 番。可溶性 Fc R ポリペプチドは、ポリペプチドを産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 RI のアミノ酸残基 1 ~ 269 番 (表 10)、カニクイザル Fc RI IA のアミノ酸残基 1 ~ 182 番 (表 21)、カニクイザル Fc RI IB のアミノ酸残基 1 ~ 184 番 (表 22)、カニクイザル Fc RI IA のアミノ酸残基 1 ~ 187 番 (表 23) およびカニクイザル Fc Rn 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、Bowling Science 第 247 巻 1306 ~ 1310 頁 (1990 年) に見出し得る。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。

10

【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 s₆ / G S T タグ、チオレドキシントグ、ヘマグルチニントグ、G l y l 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 s₆ / 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。

20

【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、アフィニティークロマトグラフィー、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。

30

【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

40

50

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

【0115】

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も可能である。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。

【0116】

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。

【0117】

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。

【0118】

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 DNA 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 DNA 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。

【0119】

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。

【0120】

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

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スダ)、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 R n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ペ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カ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。

10

【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。

20

【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COS-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。

30

【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、霊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IgG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

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Fc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。

【0126】

本発明の一方法は、Fc領域含有分子をカニクイザルまたはチンパンジーのFc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Fcレセプターポリペプチドに対するFc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Fc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Fcレセプターポリペプチドに対するFc領域含有分子の結合能は、霊長類においてインビボに評価する上でFc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FcRn分子に対する結合能は、Fc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。

10

【0127】

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Fc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Fc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、ELISA法型アッセイまたは過渡的感染細胞において用い得る。FcRII、FcRIIIまたはFcRnまたはFcRIIAまたはFcRIIBの鎖のような、カニクイザル及び/又はチンパンジーのFcRポリペプチドに結合する抗体変異体は、治療薬として霊長類におけるインビボ評価に妥当な変異体である。

20

【0128】

異なるFc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FcR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FcRの膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインは、Gly-His₆タグまたはグルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）をコードするDNAに置換され得る（例3を参照）。Gly-His₆タグまたはGSTは、レセプターのFc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、ELISA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Fc領域含有分子はカニクイザルの可溶性FcRと直接相互作用し、対応するヒトFcRに比し、カニクイザルFcRに対して同等以上の結合親和性を有する。

30

【0129】

本発明の別の態様は、ITAM及び/又はITIM領域を有するカニクイザルFcR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、ITAM領域を有するFcRに対し結合親和性が向上し、ITIM領域を有するFcRに対し親和性が低下した薬剤の同定を伴う。

【0130】

標的薬剤は、Fc領域を有する分子、好ましくは抗体、より好ましくはIgG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、Fc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IgG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PCR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巻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。

40

【0131】

抗体及び/又は変異抗体の結合親和性は、ShieldsらJ.Biol.Chem.第276巻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、

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 R I I A に比し、カニクイザル Fc R I I A に対する親和性が向上した変異抗体は、ヒト I g G 1 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。この種の変異体はセリンからアラニンまでの位置に改変が生じ、S 298 A と表される。該位置に改変が生じている別の変異抗体は S 298 A / E 333 A / K 334 と表され、未変性配列の I g G 1 のアミノ酸 298, 333 および 334 番に対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 R I I A に比し、カニクイザル Fc R I I A に対する結合親和性が向上している。

10

【0133】

本発明の別の方法において、ヒト Fc R I I B に比し、カニクイザル Fc R I I B 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 R I I B に対する結合能が向上した薬剤は、I T I M 抑制機能を選択的に刺激する。カニクイザル Fc R I I B 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 R I I B に比し、カニクイザル Fc R I I B に対する結合親和性が低下した変異抗体は、R 255 A, E 258 A, S 37 A, D 280 A および R 301 M である。

20

【0135】

本発明の別の実施例は、I T A M を有する Fc レセプターを活性化し得るが I T I M 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 S 298 A または S 298 A / E 333 A / K 334 の使用を伴う。

【0136】

S 298 A および S 292 A / E 333 A / K 334 変異抗体は、カニクイザル Fc R I I A に対する結合親和性が向上し、カニクイザル Fc R I I B 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。

30

【0137】

この種の方法は、I T A M 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 I T I M 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。

40

【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 D N A 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 D N A はヒト D N A 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 P C R 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

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、PCR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。

【0140】

表 1

制限部位に下線

レセプター	カニクイザル FcγRI 完全長	
フォワードプライマー	CAGGTCAATCTCTAGACTCCCACCAGCTTGGAG (配列番号:31)	10
リバースプライマー	GGTCAACTATAAAGCTTGGACGGTCCAGATCGAT (配列番号:32)	
制限部位	XbaI/HindIII	
レセプター	カニクイザル FcγRI-H6-GST	
フォワードプライマー	CAGGTCAATCATCGATATGTGGTTCTTGACAGCT (配列番号:33)	20
リバースプライマー	GGTCAACTATGCTAGCATGGTGATGATGGTGGTGCC AGACAGGAGTTGGTA (配列番号:34)	
制限部位	ClaI/NheI	
レセプター	カニクイザル FcγRIIB 完全長	
フォワードプライマー	CAGGTCAATCTCTAGAATGGGAATCCTGTCATTCTT (配列番号:35)	
リバースプライマー	GGTCAACTATAAAGCTTCTAAATACGGTTCTGGTC (配列番号:36)	30
制限部位	XbaI/HindIII	
レセプター	カニクイザル FcγRIIB-H6-GST	
フォワードプライマー	CAGGTCAATCATCGATATGCTTCTGTGGACAGC (配列番号:37)	
リバースプライマー	GGTCAACTATGGTGACCTATCGGTGAAGAGCTGC (配列番号:38)	40
制限部位	ClaI/BstEII	

レセプター	カニクイザル FcγRIIIA 完全長	
フォワードプライマー	CAGGTCAATCTCTAGAATGTGGCAGCTGCTCCT (配列番号:39)	
リバープライマー	TCAACTATAAGCTTATGTTTCAGAGATGCTGCTG (配列番号:40)	
制限部位	XbaI/HindIII	
レセプター	カニクイザル FcγRIIIA-H6-GST	10
フォワードプライマー	CAGGTCAATCTCTAGAATGTGGCAGCTGCTCCT (配列番号:41)	
リバープライマー	GGTCAACTATGGTCACCTTGGTACCCAGGTGGAAA (配列番号:42)	
制限部位	XbaI/BstEI	
レセプター	カニクイザル Fcγ 鎖	
フォワードプライマー	CAGGTCAATCATCGATGAATTCCCACCATGATTCCA GCAGTGGTC (配列番号:43)	20
リバープライマー	GGTCAACTATAAGCTTCTACTGTGGTGGTTTCTCA (配列番号:44)	
制限部位	EcoRI/HindIII	
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	CAGGTCAATCATCGATTCCGGGCCGAGATGTCT (配列番号:45)	30
リバープライマー	GGTCAACTATTCTAGATTACATGTCTCGATCCCA (配列番号:46)	
制限部位	Clal/XbaI	
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	CAGGTCAATCTCTAGAATGTCTCAGAATGTATGTC (配列番号:47)	
リバープライマー	GGTCAACTATAAGCTTTTAGTTATTACTGTTGTCATA (配列番号:48)	40
制限部位	XbaI/HindIII	

レセプター カニクイザル **FcγRIIA-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**
 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**

10

レセプター カニクイザル **FcRn-H6**
 フォワードプライマー **CAGGTCAATCATCGATAGGTCGTCCTCTCAGC**
 (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**

20

【 0 1 4 1 】

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ベクターライブラリ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(FcRI, FcRIIA, FcRn: 1100塩基対、FcRIIA, FcRIIB: 1000塩基対、Fc鎖: 300塩基対、 γ 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 シークエンシングキット(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。

30

40

【 0 1 4 2 】

FcRIIA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FcRIIAが存在するか否かを判定すべく、ヒトFcRIIA、ヒトFcRIIBおよびカニクイザルFcRIIBの間に保存された領域にセンスプライマーを設計した(OF1、表2)。ヒトFcRIIA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(OR1、表2)。上記二つのPCRプライマー(OF1, OR1)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

50

クローニングし、個々のクローンを単離し、シーケンスした。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増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ケンスした。

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ケンスした。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	CAGGTCAATCTCTAGACAGTGGTTCCACAATGG (配列番号:55)
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 GCTTTATTTGTGAAATTTGTG (配列番号:61)
OF5	CAGGTCAATC TCTAGA ACTTGGACGTCAAACGATT (配列番号:62)
OR4	GGTCAACTAT AAGCTT CTGCAATAAACAAGTTGGG (配列番号:63)

30

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】

霊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

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

	10	20	30	40	50	
ヒト	ATGTGGTTCTTGACA	ACTCTGCTCCTTTGGG	TTCAGTTGATGGG	CAAGT		
カニクイザル	ATGTGGTTCTTGACAG	CTCTGCTCCTTTGGG	TTCAGTTGATGGG	CAAGT		
	60	70	80	90	100	
ヒト	GGACACCACAAAGG	CAGTGATCACTTTGC	AGCCTCCATGGGT	CAGCGTGT		
カニクイザル	GGATACCACAAAGG	CAGTGATCACTTTGC	AGCCTCCATGGGT	CAGCGTGT		
	110	120	130	140	150	
ヒト	TCCAAGAGGAAACCG	TAACTTGCAGTGTG	AGGTGCTCCATCTG	CCTGGG		
カニクイザル	TCCAAGAGGAAACTG	TAACTTACAGTGTG	AGGTGCCCCGTCTG	CCTGGG		
	160	170	180	190	200	
ヒト	AGCAGCTCTACACAG	TGGTTTCTCAATGG	CACAGCCACTCAGAC	CTCGAC		
カニクイザル	AGCAGCTCCACACAG	TGGTTTCTCAATGG	CACAGCCACTCAGAC	CTCGAC		
	210	220	230	240	250	
ヒト	CCCCAGCTACAGAAT	CACCTCTGCCAGTG	TCAATGACAGTGGT	GAAATACA		
カニクイザル	TCCCAGCTACAGAAT	CACCTCTGCCAGTG	TCAAGGACAGTGGT	GAAATACA		
	260	270	280	290	300	
ヒト	GGTGCCAGAGAGGTCT	CTCAGGGCGAAGTG	ACCCCATACAGCTGG	AAATC		
カニクイザル	GGTGCCAGAGAGGTCC	CTCAGGGCGAAGTG	ACCCCATACAGCTGG	AAATC		
	310	320	330	340	350	
ヒト	CACAGAGGCTGGCTACT	ACTGTCAGGTCTCCAG	CAGAGTCTTCACGGA	AGG		
カニクイザル	CACAGAGACTGGCTACT	ACTGTCAGGTATCCAG	CAGAGTCTTCACAGA	AGG		
	360	370	380	390	400	
ヒト	AGAACCTCTGGCCTTG	AGGTGTCATGCGTGGA	AAGGATAAGCTGGTGT	TACA		
カニクイザル	AGAACCTCTGGCCTTG	AGGTGTCATGCATGGA	AAGGATAAGCTGGTGT	TACA		
	410	420	430	440	450	
ヒト	ATGTGCTTTACTATCG	AAATGGCAAAGCCTTT	AAGTTTTTCCACTGGA	AT		
カニクイザル	ATGTGCTTTACTATCA	AAATGGCAAAGCCTTT	AAGTTTTTCTACCGGA	AT		
	460	470	480	490	500	
ヒト	TCTAACCTCACCATTCT	GAAAACCAACATAAGT	CACAATGGCACCTACCA			
カニクイザル	TCTCAACTCACCATTCT	GAAAACCAACATAAGT	CACAACGGCGCCTACCA			

10

20

30

40

	510	520	530	540	550	
ヒト	TTGCTCAGGCATGGGAAAGCATCGCTACACATCAGCAGGAATATCTGTCA					
	●			●		
カニクイザル	CTGCTCAGGCATGGGAAAGCATCGCTACACATCAGCAGGAGTATCTGTCA					
	560	570	580	590	600	
ヒト	CTGTGAAAGAGCTATTTCCAGCTCCAGTGCTGAATGCATCTGTGACATCC					
				●		
カニクイザル	CTGTGAAAGAGCTATTTCCAGCTCCAGTGCTGAATGCATCCGTGACATCC					
	610	620	630	640	650	
ヒト	CCACTCCTGGAGGGGAATCTGGTCACCCTGAGCTGTGAAACAAAGTTGCT					10
	●					
カニクイザル	CCGCTCCTGGAGGGGAATCTGGTCACCCTGAGCTGTGAAACAAAGTTGCT					
	660	670	680	690	700	
ヒト	CTTGCAGAGGCCTGGTTTGCAGCTTTACTTCTCCTTCTACATGGGCAGCA					
	●●					
カニクイザル	TCTGCAGAGGCCTGGTTTGCAGCTTTACTTCTCCTTCTACATGGGCAGCA					
	710	720	730	740	750	
ヒト	AGACCCTGCGAGGCAGGAACACATCCTCTGAATACCAAATACTAACTGCT					
		●				
カニクイザル	AGACCCTGCGAGGCAGGAACACGTCCTCTGAATACCAAATACTAACTGCT					20
	760	770	780	790	800	
ヒト	AGAAGAGAAGACTCTGGGTTATACTGGTGCGAGGCTGCCACAGAGGATGG					
		●		●●	●●	
カニクイザル	AGAAGAGAAGACTCTGGGTTTATACTGGTGCGAGGCCACCACAGAAGACGG					
	810	820	830	840	850	
ヒト	AAATGTCCTTAAGCGCAGCCCTGAGTTGGAGCTTCAAGTGCTTGGCCTCC					
カニクイザル	AAATGTCCTTAAGCGCAGCCCTGAGTTGGAGCTTCAAGTGCTTGGCCTCC					
	860	870	880	890	900	
ヒト	AGTTACCAACTCCTGTCTGGTTTCATGTCTTTTCTATCTGGCAGTGGGA					30
		●		●		
カニクイザル	AGTTACCAACTCCTGTCTGGCTTCATGTCTTTTCTATCTGGTAGTGGGA					
	910	920	930	940	950	
ヒト	ATAATGTTTTAGTGAACACTGTTCTCTGGGTGACAATACGTAAAGAACT					
カニクイザル	ATAATGTTTTAGTGAACACTGTTCTCTGGGTGACAATACGTAAAGAACT					
	960	970	980	990	1000	
ヒト	GAAAAGAAAGAAAAGTGGGATTTAGAAATCTCTTTGGATTCTGGTCATG					
		●	●		●	
カニクイザル	GAAAAGAAAGAAAAGTGGGAATTTAGAAATATCTTTGGATTCTGCTCATG					40
	1010	1020	1030	1040	1050	
ヒト	AGAAGAAGGTAATTTCCAGCCTTCAAGAAGACAGACATTTAGAAGAAGAG					
	●					
カニクイザル	AGAAGAAGGTAACCTCCAGCCTTCAAGAAGACAGACATTTAGAAGAAGAG					

	1060	1070	1080	1090	1100
ヒト	CTGAAATGTCAGGAACAAAAGAAGAACAGCTGCAGGAAGGGGTGCACCG				
	••	•	•		
カニクイザル	CTGAAGAGTCAGGAACAAGAATAA				
	1110	1120			
ヒト	GAAGGAGCCCCAGGGGGCCACGTAGCAG 3' 伸展				

【 0 1 5 0 】

表3に示すヒト D N A 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 1 family gene products in human mononuclear cells,J.Clin.Invest.第90巻2 102~2109頁(1992年)を参照。

【 0 1 5 1 】

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。

【 0 1 5 2 】

配列同一性率の解析により、ヒトとカニクイザルの F c R I / I I I ガンマ鎖をコードする核酸配列は、約 9 9 % の同一性を有することが示される。

【 0 1 5 3 】

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

	10	20	30	40	50
ヒト	ATGATTCCAGCAGTGGTCTTGCTCTTACTCCTTTTGGTTGAACAAGCAGC				
カニクイザル	ATGATTCCAGCAGTGGTCTTGCTCTTACTCCTTTTGGTTGAACAAGCAGC				
	60	70	80	90	100
ヒト	GGCCCTGGGAGAGCCTCAGCTCTGCTATATCCTGGATGCCATCCTGTTTC				
カニクイザル	GGCCCTGGGAGAGCCTCAGCTCTGCTATATCCTGGATGCCATCCTGTTTC				
	110	120	130	140	150
ヒト	TGTATGGAATTGTCCTCACCCCTCTTACTGTGCGACTGAAGATCCAAGTG				
カニクイザル	TGTATGGAATTGTCCTCACCCCTCTTACTGTGCGACTGAAGATCCAAGTG				
	160	170	180	190	200
ヒト	CGAAAGGCAGCTATAACCAGCTATGAGAAATCAGATGGTGTGTTACACGGG				
カニクイザル	CGAAAGGCAGCTATAGCCAGCTATGAGAAATCAGATGGTGTGTTACACGGG				
	210	220	230	240	250
ヒト	CCTGAGCACCAGGAACCAGGAGACTTACGAGACTCTGAAGCATGAGAAAC				
カニクイザル	CCTGAGCACCAGGAACCAGGAAACTTATGAGACTCTGAAGCATGAGAAAC				
			260		
ヒト	CACCACAGTAG				
カニクイザル	CACCACAGTAG				

【 0 1 5 4 】

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Fcγ RIIA DNAのアラインメント

ヒト/カニクイザル	重複933中878の一致：94.1%	同一性			
	3ヌクレオチドのギャップなし				
	重複936中878の一致：93.8%	同一性			
	3ヌ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の一致：99.0%	同一性			
	3ヌクレオチドのギャップなし				
	重複936中924の一致：98.7%	同一性			
	3ヌクレオチドのギャップあり				
	10	20	30	40	50
チンパンジー	ATGTCTCAGAAATGTATGTCCCAGAAACCTGTGGCTGCTTCAACCATTGAC				
ヒト	ATGTCTCAGAAATGTATGTCCCAGAAACCTGTGGCTGCTTCAACCATTGAC				
		● ●			
カニクイザル	ATGTCTCAGAAATGTATGTCCCGCAACCTGTGGCTGCTTCAACCATTGAC				
	60	70	80	90	100
チンパンジー	AGTTTTGCTGCTGCTGGCTTCTGCAGACAGTCAAGCT---GCTCCCCCAA				
ヒト	AGTTTTGCTGCTGCTGGCTTCTGCAGACAGTCAAGCTGCAGCTCCCCCAA				
				● ● ●	
カニクイザル	AGTTTTGCTGCTGCTGGCTTCTGCAGACAGTCAAACT---GCTCCCCCGA				
				● ● ● ●	●

20

30

	110	120	130	140	150
チンパンジー	AGGCTGTGCTGAAACTTGAGCCCCCGTGGATCAACGTGCTCCAGGAGGAC				
ヒト	AGGCTGTGCTGAAACTTGAGCCCCCGTGGATCAACGTGCTCCAGGAGGAC				
カニクイザル	AGGCTGTGCTGAAACTCGAGCCCCCGTGGATCAACGTGCTCCGGGAGGAC				
	160	170	180	190	200
チンパンジー	TCTGTGACTCTGACATGCCGGGGGGCTCGCAGCCCTGAGAGCGACTCCAT				
ヒト	TCTGTGACTCTGACATGCCAGGGGGCTCGCAGCCCTGAGAGCGACTCCAT				
カニクイザル	TCTGTGACTCTGACGTGCGGGGGCGCTCACAGCCCTGACAGCGACTCCAC				
	210	220	230	240	250
チンパンジー	TCAGTGGTTCACAAATGGGAATCTCATCCCCACCCACACGCAGCCCAGCT				
ヒト	TCAGTGGTTCACAAATGGGAATCTCATCCCCACCCACACGCAGCCCAGCT				
カニクイザル	TCAGTGGTTCACAAATGGGAATCGCATCCCCACCCACACAGCCCAGCT				
	260	270	280	290	300
チンパンジー	ACAGGTTC AAGGCCAACAACAATGACAGCGGGGAGTACACGTGCCAGACT				
ヒト	ACAGGTTC AAGGCCAACAACAATGACAGCGGGGAGTACACGTGCCAGACT				
カニクイザル	ACAGGTTC AAGGCCAACAACAATGATAGCGGGGAGTACAGGTGCCAGACT				
	310	320	330	340	350
チンパンジー	GGCCAGACCAGCCTCAGCGACCCTGTGCATCTGACTGTGCTTTCCGAATG				
ヒト	GGCCAGACCAGCCTCAGCGACCCTGTGCATCTGACTGTGCTTTCCGAATG				
カニクイザル	GGCCGGACCAGCCTCAGCGACCCTGTTTCATCTGACTGTGCTTTCTGAGTG				
	360	370	380	390	400
チンパンジー	GCTGGTGCTCCAGACCCCTCACCTGGAGTTCCAGGAGGGAGAAACCATCG				
ヒト	GCTGGTGCTCCAGACCCCTCACCTGGAGTTCCAGGAGGGAGAAACCATCA				
カニクイザル	GCTGGCGCTTCAGACCCCTCACCTGGAGTTCCGGGAGGGAGAAACCATCA				
	410	420	430	440	450
チンパンジー	TGCTGAGGTGCCACAGCTGGAAGGACAAGCCTCTGGTCAAGGTCACATTC				
ヒト	TGCTGAGGTGCCACAGCTGGAAGGACAAGCCTCTGGTCAAGGTCACATTC				
カニクイザル	TGCTGAGGTGCCACAGCTGGAAGGACAAGCCTCTGATCAAGGTCACATTC				
	460	470	480	490	500
チンパンジー	TTCCAGAATGGAAAATCCCAGAAATTCTCCCATTTGGATCCCAACCTCTC				
ヒト	TTCCAGAATGGAAAATCCCAGAAATTCTCCCGTTTGGATCCCACTTCTC				
カニクイザル	TTCCAGAATGGAATAGCCAAGAAATTTTCCCATATGGATCCCAATTTCTC				

10

20

30

40

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

560 570 580 590 600
チンパンジー ACATAGGCTACACGCTGTTCTCATCCAAGCCTGTGACCATCACTGTCCAA
ヒト ACATAGGCTACACGCTGTTCTCATCCAAGCCTGTGACCATCACTGTCCAA
カニクイザル ACATAGGCTACACACCATACTCATCCAACCTGTGACCATCACTGTCCAA

610 620 630 640 650
チンパンジー GCGCCAGCGTGGGCAGCTCTTCACCAAGTGGGGATCATTGTGGCTGTGGT
ヒト GTGCCCAGCATGGGCAGCTCTTCACCAATGGGGATCATTGTGGCTGTGGT
カニクイザル GTGCCCAGCGTGGGCAGCTCTTCACCGATGGGGATCATTGTGGCTGTGGT

660 670 680 690 700
チンパンジー CATTGCGACTGCTGTAGCAGCCATTGTTGCTGCTGTAGTGGCCTTGATCT
ヒト CATTGCGACTGCTGTAGCAGCCATTGTTGCTGCTGTAGTGGCCTTGATCT
カニクイザル CACTGGGATTGCTGTAGCGGCCATTGTTGCTGCTGTAGTGGCCTTGATCT

710 720 730 740 750
チンパンジー ACTGCAGGAAAAAGCGGATTTTCAGCCAATTCCTACTGATCCTGTGAAGGCT
ヒト ACTGCAGGAAAAAGCGGATTTTCAGCCAATTCCTACTGATCCTGTGAAGGCT
カニクイザル ACTGCAGGAAAAAGCGGATTTTCAGCCAATTCCTACTGATCCTGTGAAGGCT

760 770 780 790 800
チンパンジー GCCCAATTTGAGCCACCTGGACGTCAAATGATTGCCATCAGAAAGAGACA
ヒト GCCCAATTTGAGCCACCTGGACGTCAAATGATTGCCATCAGAAAGAGACA
カニクイザル GCCCGATTTGAGCCACTTGGACGTCAAACGATTGCCCTCAGAAAGAGACA

810 820 830 840 850
チンパンジー ACTTGAAGAAACCAACAATGACTATGAAACAGCTGACGGCGGCTACATGA
ヒト ACTTGAAGAAACCAACAATGACTATGAAACAGCTGACGGCGGCTACATGA
カニクイザル ACTTGAAGAAACCAACAATGACTATGAAACAGCCGACGGCGGCTACATGA

860 870 880 890 900
チンパンジー CTCTGAACCCCAGGGCACCTACTGACGATGATAAAAAACATCTACCTGACT
ヒト CTCTGAACCCCAGGGCACCTACTGACGATGATAAAAAACATCTACCTGACT
カニクイザル CTCTGAACCCCAGGGCACCTACTGATGATGATAGAAACATCTACCTGACT

10

20

30

40

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

【 0 1 5 7 】

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

【 0 1 5 8 】

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。

【 0 1 5 9 】

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。

【 0 1 6 0 】

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）

	10	20	30	40	50
ヒト	ATGCGAATCCTGTCATTCTTACCTGTCCTTGCCACTGAGAGTGACTGGGC				
カニクイザル	ATGCGAATCCTGTCATTCTTACCTGTCCTTGCTACTGAGAGTGACTGGGC				
	60	70	80	90	100
ヒト	TGACTGCAAGTCCCCCAGCCTTGGGGTTCATATGCTTCTGTGGACAGCTG				
カニクイザル	TGACTGCAAGTCTCCAGCCTTGGGGCCACATGCTTCTGTGGACAGCTG				
	110	120	130	140	150
ヒト	TGCTATTCTGCTCCTGTTGCTGGGACACCTGCAGCTCCCCCAAAGGCT				
カニクイザル	TGCTATTCTGCTCCTGTTGCTGGGACACCTGCAGCTCCCCGAAGGCT				
	160	170	180	190	200
ヒト	GTGCTGAAACTCGAGCCCCAGTGGATCAACGTGCTCCAGGAGGACTCTGT				
カニクイザル	GTGCTGAAACTCGAGCCCCGTTGGATCAACGTGCTCCGGGAGGACTCTGT				
	210	220	230	240	250
ヒト	GACTCTGACATGCCGGGGGACTCACAGCCCTGAGAGCGACTCCATTCACT				
カニクイザル	GACTCTGACGTGCGGGGGCGCTCACAGCCCTGACAGCGACTCCACTCACT				
	260	270	280	290	300
ヒト	GGTTCCACAATGGGAATCTCATTTCCACCCACACGCAGCCAGCTACAGG				

30

40

カニクイザル	GGTTCCACAATGGGAATCTCATCCCCACCCACACGCAGCCCAGCTACAGG	
	310 320 330 340 350	
ヒト	TTCAAGGCCAACAACAATGACAGCGGGGAGTACACGTGCCAGACTGGCCA	
カニクイザル	TTCAAGGCCAACAACAATGATAGCGGGGAGTACAGGTGCCAGACTGGCCG	
	360 370 380 390 400	
ヒト	GACCAGCCTCAGCGACCCTGTGCATCTGACTGTGCTTTCTGAGTGGCTGG	
カニクイザル	GACCAGCCTCAGCGACCCTGTTTCATCTGACTGTGCTTTCTGAGTGGCTGG	10
	410 420 430 440 450	
ヒト	TGCTCCAGACCCCTCACCTGGAGTTCCAGGAGGGAGAAACCATCGTGCTG	
カニクイザル	CGCTCCAGACCCCTCACCTGGAGTTCCGGGAGGGAGAAACCATCTTGCTG	
	460 470 480 490 500	
ヒト	AGGTGCCACAGCTGGAAGGACAAGCCTCTGGTCAAGGTCACATTCTTCCA	
カニクイザル	AGGTGCCACAGCTGGAAGGACAAGCCTCTGATCAAGGTCACATTCTTCCA	
	510 520 530 540 550	20
ヒト	GAATGGAAAATCCAAGAAATTTTCCCGTTCCGATCCCAACTTCTCCATCC	
カニクイザル	GAATGGAAATATCCAAGAAATTTTCCCATATGAATCCCAACTTCTCCATCC	
	560 570 580 590 600	
ヒト	CACAAGCAAACCCACAGTCACAGTGGTGATTACCACTGCACAGGAAACATA	
カニクイザル	CACAAGCAAACCCACAGTCACAGTGGTGATTACCACTGCACAGGAAACATA	
	610 620 630 640 650	
ヒト	GGCTACACGCTGTACTCATCCAAGCCTGTGACCATCACTGTCCAAGCTCC	
カニクイザル	GGCTACACACCATACTCATCCAACCTGTGACCATCACTGTCCAAGTGCC	30
	660 670 680 690 700	
ヒト	-----CAGCTCTTCACCGATGGGGATCATTGTGGCTGTGGTCACTG	
カニクイザル	CAGCATGGGCAGCTCTTCACCGATAGGGATCATTGTGGCTGTGGTCACTG	
	710 720 730 740 750	
ヒト	GGATTGCTGTAGCGGCCATTGTTGCTGCTGTAGTGGCCTTGATCTACTGC	
カニクイザル	GGATTGCTGTAGCGGCCATTGTTGCTGCTGTAGTGGCCTTGATCTACTGC	
	760 770 780 790 800	40
ヒト	AGGAAAAAGCGGATTTTCAGCCAATCCCACTAATCCTGATGAGGCTGACAA	
カニクイザル	AGGAAAAAGCGGATTTTCAGCCAATCCCACTAATCCTGACGAGGCTGACAA	

	810	820	830	840	850
ヒト	AGTTGGGGCTGAGAACACAATCACCTATTCACCTTCTCATGCACCCGGATG				
カニクイザル	AGTTGGGGCTGAGAACACAATCACCTATTCACCTTCTCATGCATCCGGACG				
	860	870	880		
ヒト	CTCTGGAAGAGCCTGATGACCAGAACCGTATTTAG				
カニクイザル	CTCTGGAAGAGCCTGATGACCAAACCGNGTTTAG				

【 0 1 6 1 】

10

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。

【 0 1 6 2 】

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。

【 0 1 6 3 】

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

【 0 1 6 4 】

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の一致:95.8% 同一性

	10	20	30	40	50
ヒト	ATGTGGCAGCTGCTCCTCCCAACTGCTCTGCTACTTCTAGTTTCAGCTGG				
カニクイザル	ATGTGGCAGCTGCTCCTCCCAACTGCTCTGCTACTTCTAGTTTCAGCTGG				
	60	70	80	90	100
ヒト	CATGCGGACTGAAGATCTCCCAAAGGCTGTGGTGTTCCTGGAGCCTCAAT				
カニクイザル	CATGCGGGCTGAAGATCTCCCAAAGGCTGTGGTGTTCCTGGAGCCTCAAT				
	110	120	130	140	150
ヒト	GGTACAGGGTGCTCGAGAAGGACAGTGTGACTCTGAAGTGCCAGGGAGCC				
カニクイザル	GGTACAGGGTGCTCGAGAAGGACCGTGTGACTCTGAAGTGCCAGGGAGCC				
	160	170	180	190	200
ヒト	TACTCCCCTGAGGACAATTCCACACAGTGGTTTCACAATGAGAGCCTCAT				
カニクイザル	TACTCCCCTGAGGACAATTCCACACGGTGGTTTCACAATGAGAGCCTCAT				

30

40

210 220 230 240 250
ヒト CTCAAGCCAGGCCCTCGAGCTACTTCATTGACGCTGCCACAGTCGACGACA
カニクイザル CTCAAGCCAGACCTCGAGCTACTTCATTGCTGCTGCCAGAGTCAACAACA
260 270 280 290 300
ヒト GTGGAGAGTACAGGTGCCAGACAAACCTCTCCACCCTCAGTGACCCGGTG
カニクイザル GTGGAGAGTACAGGTGCCAGACAAGCCTCTCCACACTCAGTGACCCGGTG
310 320 330 340 350
ヒト CAGCTAGAAGTCCATATCGGCTGGCTGTTGCTCCAGGCCCTCGGTGGGT
カニクイザル CAGCTGGAAGTCCATATCGGCTGGCTATTGCTCCAGGCCCTCGGTGGGT
360 370 380 390 400
ヒト GTTCAAGGAGGAAGACCTATTACCTGAGGTGTCACAGCTGGAAGAACA
カニクイザル GTTCAAGGAGGAAGAATCTATTACCTGAGGTGTCACAGCTGGAAGAACA
410 420 430 440 450
ヒト CTGCTCTGCATAAGGTCACATATTTACAGAATGGCAAAGGCAGGAAGTAT
カニクイザル CTCTTCTGCATAAGGTCACGTATTTACAGAATGGCAAAGGCAGGAAGTAT
460 470 480 490 500
ヒト TTTCATCATAATTCTGACTTCTACATTCCAAAAGCCCACTCAAAGACAG
カニクイザル TTTCATCAGAATTCTGACTTCTACATTCCAAAAGCCCACTCAAAGACAG
510 520 530 540 550
ヒト CGGCTCCTACTTCTGCAGGGGGCTTTTGGGAGTAAAAATGTGTCTTCAG
カニクイザル CGGCTCCTACTTCTGCAGGGGACTTATTGGGAGTAAAAATGTATCTTCAG
560 570 580 590 600
ヒト AGACTGTGAACATCACCATCACTCAAGGTTTGGCAGTGTCAACCATCTCA
カニクイザル AGACTGTGAACATCACCATCACTCAAGATTGGCAGTGTCAACCATCTCA
610 620 630 640 650
ヒト TCATTCTTTCCACCTGGGTACCAAGTCTCTTCTGCTTGGTGATGGTACT
カニクイザル TCATTCTTTCCACCTGGGTACCAAGTCTCTTCTGCCTGGTGATGGTACT
660 670 680 690 700
ヒト CCTTTTGCAGTGGACACAGGACTATATTCTCTGTGAAGACAAACATTC
カニクイザル CCTTTTGCAGTGGACACAGGACTATATTCTCTATGAAGAAAAGCATTC
710 720 730 740 750
ヒト GAAGCTCAACAAGAGACTGGAAGGACCATAAATTTAAATGGAGAAAGGAC
カニクイザル CAAGCTCAACAAGGGACTGGGAGGACCATAAATTTAAATGGAGCAAGGAC
760
ヒト CCTCAAGACAAATGA
カニクイザル CCTCAAGACAAATGA

10

20

30

40

50

【 0 1 6 5 】

F c I I I 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。

【 0 1 6 6 】

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。

【 0 1 6 7 】

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。

【 0 1 6 8 】

表 8

ヒトおよびカニクイザルの β 2-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	ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGG				
カニクイザル	ATGTCTCCCTCAGTGGCCTTAGCCGTGCTGGCGCTACTCTCTCTTTCTGG				
	60	70	80	90	100
ヒト	CCTGGAGGCTATCCAGCGTACTCCAAAGATTGAGGTTTACTCACGTCATC				
カニクイザル	CCTGGAGGCTATCCAGCGTACTCCAAAGATTGAGGTTTACTCACGCCATC				
	110	120	130	140	150
ヒト	CAGCAGAGAATGGAAAGTCAAATTTCTGAATTGCTATGTGTCTGGGTTT				
カニクイザル	CACCAGAGAATGGAAAGCCAAATTTCTGAATTGCTATGTGTCTGGATTT				
	160	170	180	190	200
ヒト	CATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAGAATTGA				
カニクイザル	CATCCATCTGATATTGAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAAAATGGG				
	210	220	230	240	250
ヒト	AAAAGTGGAGCATTGAGACTTGTCTTTCAGCAAGGACTGGTCTTTCTATC				
カニクイザル	AAAAGTGGAGCATTGAGACTTGTCTTTCAGCAAAGACTGGTCTTTCTATC				
	260	270	280	290	300
ヒト	TCTTGTACTIONACTGAATTCACCCCCACTGAAAAAGATGAGTATGCCTGC				

10

20

30

40

カニクイザル TCTTGTACTACACTGAATTCAACCCCAATGAAAAAGATGAGTATGCCTGC

310 320 330 340 350

ヒト CGTGTGAACCATGTGACTTTGTGCACAGCCCAAGATAGTTAAGTGGGATCG

カニクイザル CGTGTGAACCATGTGACTTTGTGCAGGGCCCAGGACAGTTAAGTGGGATCG

360

ヒト AGACATGTAA

カニクイザル AGACATGTAA

10

【 0 1 6 9 】

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

【 0 1 7 0 】

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。

【 0 1 7 1 】

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。

20

【 0 1 7 2 】

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 ATGGGGGTCCCGCGGCTCAGCCCTGGGCGCTGGGGCTCCTGCCTCTTTCT

カニクイザル ATGAGGGTCCCGCGGCTCAGCCCTGGGCGCTGGGGCTCCTGCCTCTTTCT

60 70 80 90 100

ヒト CCTTCCTGGGAGCCTGGGCGCAGAAAGCCACCTCTCCCTCCTGTACCACC

カニクイザル CCTGCCCGGAGCCTGGGCGCAGAAAGCCACCTCTCCCTCCTGTACCACC

110 120 130 140 150

ヒト TTACCGCGGTGTCCTCGCCTGCCCCGGGGACTCCTGCCTTCTGGGTGTCC

カニクイザル TCACCGCGGTGTCCTCGCCCCGGGGACGCCTGCCTTCTGGGTGTCC

160 170 180 190 200

ヒト GGCTGGCTGGGCCCCGAGCAGTACCTGAGCTACAATAGCCTGCGGGGCGA

カニクイザル GGCTGGCTGGGCCCCGAGCAGTACCTGAGCTACGACAGCCTGAGGGGCCA

210 220 230 240 250

30

40

ヒト GGC GGAGCCCTGTGGAGCTTGGGTCTGGGAAAACCAGGTGTCCTGGTATT
カニクイザル GGC GGAGCCCTGTGGAGCTTGGGTCTGGGAAAACCAAGTGTCTGGTATT

260 270 280 290 300
ヒト GGGAGAAAAGAGACCACAGATCTGAGGATCAAGGAGAAGCTCTTTCTGGAA
カニクイザル GGGAGAAAAGAGACCACAGATCTGAGGATCAAGGAGAAGCTCTTTCTGGAA

310 320 330 340 350
ヒト GCTTTCAAAGCTTTGGGGGAAAAGGTCCCTACACTCTGCAGGGCCTGCT
カニクイザル GCTTTCAAAGCTTTGGGGGAAAAGGCCCTACACTCTGCAGGGCCTGCT

360 370 380 390 400
ヒト GGGCTGTGAACTGGGCCCTGACAACACCTCGGTGCCACCGCCAAGTTCTG
カニクイザル GGGCTGTGAACTGAGCCCTGACAACACCTCGGTGCCACCGCCAAGTTCTG

410 420 430 440 450
ヒト CCCTGAACGGCGAGGAGTTCATGAATTTGACCTCAAGCAGGGCACCTGG
カニクイザル CCCTGAACGGCGAGGAGTTCATGAATTTGACCTCAAGCAGGGCACCTGG

460 470 480 490 500
ヒト GGTGGGGACTGGCCCGAGGCCCTGGCTATCAGTCAGCGGTGGCAGCAGCA
カニクイザル GGTGGGGACTGGCCCGAGGCCCTGGCTATCAGTCAGCGGTGGCAGCAGCA

510 520 530 540 550
ヒト GGACAAGGCGGCCAACAAGGAGCTCACCTTCCTGCTATTCTCCTGCCCGC
カニクイザル GGACAAGGCGGCCAACAAGGAGCTCACCTTCCTGCTATTCTCCTGCCCAC

560 570 580 590 600
ヒト ACCGCCTGCGGGAGCACCTGGAGAGGGGCCGCGGAAACCTGGAGTGAAG
カニクイザル ACCGGCTGCGGGAGCACCTGGAGAGGGGCCGTGGAAACCTGGAGTGAAG

610 620 630 640 650
ヒト GAGCCCCCTCCATGCGCCTGAAGGCCCCGACCCAGCAGCCCTGGCTTTTC
カニクイザル GAGCCCCCTCCATGCGCCTGAAGGCCCCGACCCGGCAACCCTGGCTTTTC

660 670 680 690 700
ヒト CGTGCTTACCTGCAGCGCCTTCTCCTTCTACCCTCCGGAGCTGCAACTTC
カニクイザル CGTGCTTACCTGCAGCGCCTTCTCCTTCTACCCTCCGGAACCTGCAACTGC

710 720 730 740 750
ヒト GGTTCCTGCGGAATGGGCTGGCCGCTGGCACC GGCCAGGGTGACTTCGGC
カニクイザル GGTTCCTGCGGAATGGGATGGCCGCTGGCACC GGACAGGGCGACTTCGGC

10

20

30

40

	760	770	780	790	800
ヒト	CCCAACAGTGACGGATCCTTCCACGCCTCGTCGTCCTAACAGTCAAAG				
		●			
カニクイザル	CCCAACAGTGACGGCTCCTTCCACGCCTCGTCGTCCTAACAGTCAAAG				
	810	820	830	840	850
ヒト	TGGCGATGAGCACCCTACTGCTGCTGTCAGCAGCGGGGCTGGCGC				
			●		
カニクイザル	TGGCGATGAGCACCCTACTGCTGCTGTCAGCAGCGGGGCTGGCGC				
	860	870	880	890	900
ヒト	AGCCCCCAGGGTGGAGCTGGAATCTCCAGCCAAGTCCTCCGTGCTCGTG				
			●		●
カニクイザル	AGCCCCCAGGGTGGAGCTGGAATCTCCAGCCAAGTCCTCCGTGCTCGTG				
	910	920	930	940	950
ヒト	GTGGGAATCGTCATCGGTGTCTTGCTACTCACGGCAGCGGCTGTAGGAGG				
カニクイザル	GTGGGAATCGTCATCGGTGTCTTGCTACTCACGGCAGCGGCTGTAGGAGG				
	960	970	980	990	1000
ヒト	AGCTCTGTTGTGGAGAAGGATGAGGAGTGGGCTGCCAGCCCCCTGGATCT				
カニクイザル	AGCTCTGTTGTGGAGAAGGATGAGGAGTGGGCTGCCAGCCCCCTGGATCT				
	1010	1020	1030	1040	1050
ヒト	CCCTTCGTGGAGACGACACCGGGGTCCTCCTGCCCACCCAGGGGAGGCC				
	●	●	●●		●
カニクイザル	CCCTCCGTGGAGATGACACCGGGTCCCTCCTGCCCACCCAGGGGAGGCC				
	1060	1070	1080	1090	
ヒト	CAGGATGCTGATTTGAAGGATGTAAATGTGATTCCAGCCACCGCCTGA				
		●	●	●	●
カニクイザル	CAGGATGCTGATTCGAAGGATGTAAATGTGATCCAGCCACTGCCTGA				

10

20

30

40

50

【 0 1 7 3 】

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 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。

【 0 1 7 4 】

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。

【 0 1 7 5 】

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	MWFLTTLLLLWVPVDGQVDTTK	
	•	
カニクイザル	MWFLTALLLLWVPVDGQVDTTK	
ドメイン1		
ヒト	AVISLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNGTAT	10
	• • •	
カニクイザル	AVITLQPPWVSVFQEETVTLQCEVPRLPGSSSTQWFLNGTAT	
	Δ Δ Δ Δ Δ	
	1 10 20 30 40	
	70 80 90 100	
ヒト	QTSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHR	
	• •	
カニクイザル	QTSTPSYRITSASVKDSGEYRCQRGPSGRSDPIQLEIHR	
	Δ Δ Δ Δ	
	50 60 70 80	20
ドメイン2		
ヒト	GWLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKF	
	• •	
カニクイザル	DWLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYQNGKAFKF	
	Δ Δ Δ Δ	
	90 100 110 120	
	150 160 170 180 190	
ヒト	FWNSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFP	
	• • • • •	
カニクイザル	FYRNSQLTILKTNISHNGAYHCSGMGKHRYTSAGVSVTVKELFP	30
	Δ Δ Δ Δ	
	130 140 150 160	

ドメイン3

ヒト APVLNASVTSPILLEGNLVTLSCE TKLL LQRPGLQLYFSFYMGSKTLRG

カニクイザル APVLNASVTSPILLEGNLVTLSCE TKLL LQRPGLQLYFSFYMGSKTLRG

Δ Δ Δ Δ Δ
170 180 190 200 210

ヒト RNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLQLP

カニクイザル RNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLQLP

Δ Δ Δ Δ Δ
220 230 240 250 260

膜貫通/細胞内

ヒト TPVWFHVLFFYLAVGIMFLVNTVLWVTIRKELKRKKKWDLEISLDSGHE

カニクイザル TPVWLHVLFFYLVVGIMFLVNTVLWVTIRKELKRKKKWNLEISLDSAHE

Δ Δ Δ Δ Δ
270 280 290 300 310

ヒト KKVTSSLQEDRHLEELKCEQKEEQLEQEGVHRKEPQGAT

カニクイザル KKVTSSLQEDRHLEELKSQEQE

Δ Δ Δ Δ
320 330 340 350

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

30

40

50

【 0 1 7 7 】

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。

【 0 1 7 8 】

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。

【 0 1 7 9 】

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においてアスタ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)

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。表中のアステリクスは、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 RIIA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 RIIA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 RIIA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 RIIA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】

20

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	-----MSQNVCPGNLWLLQPLTVLLLLASADSQT-	●●●●●●●●●●
		*
IIB- ヒト	MGILSFLPVLATESDWADCKSPQPWGHMLLWTAVLFLAPVAGTPA	●
IIB- カニクイザル	MGILSFLPVLATESDWADCKSSQPWGHMLLWTAVLFLAPVAGTPA	●
		*
IIIA- ヒト	MWQLLLPTALLLVVSAGMRTE	●
IIIA- カニクイザル	MWQLLLPTALLLVVSAGMRAE	●
		Δ *
		1

10

ドメイン1

IIA- ヒト	APPKAVLKLEPPWINVLQEDSVTLTCQGARSPESDSIQWFHN	●●●●●●●●●●
IIA- チンパンジー	APPKAVLKLEPPWINVLQEDSVTLTCRGARSPESDSIQWFHN	●●●●●●●●●●
IIA- カニクイザル	APPKAVLKLEPPWINVLREDSVTLCGGAHSPDSDSTQWFHN	●●●●●●●●●●
	Δ Δ Δ Δ Δ	
	1 10 20 30 40	
IIB- ヒト	APPKAVLKLEPPWINVLQEDSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHN	●●●●●●●●●●
IIB- カニクイザル	APPKAVLKLEPPWINVLREDSVTLCGGAHSPDSDSTQWFHN	●●●●●●●●●●
IIIA- ヒト	DLPKAVVFLEPPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHN	●●●●●●●●●●
IIIA- カニクイザル	DLPKAVVFLEPPQWYRVLEKDRVTLCQGAYSPEDNSTRWFNH	●●●●●●●●●●
	Δ Δ Δ Δ	
	10 20 30 40	

20

30

IIA- ヒト GNLIPHTHTQPSYRFKANNNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSE
 IIA- チンパンジー GNLIPHTHTQPSYRFKANNNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSE
 IIA- カニクイザル GNRIPHTHTQPSYRFKANNNDSGEYRCQTGRTSLSDPVHLTVLSE
 Δ Δ Δ Δ
 50 60 70 80

IIB- ヒト GNLIPHTHTQPSYRFKANNNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSE
 IIB- カニクイザル GNLIPHTHTQPSYRFKANNNDSGEYRCQTGRTSLSDPVHLTVLSE

IIIA- ヒト ESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIG
 IIIA- カニクイザル ESLISSQTSSYFIAAARVNNSGEYRCQTSLSLSTLSDPVQLEVHIG
 Δ Δ Δ Δ
 50 60 70 80

10

ドメイン2

IIA- ヒト WLVLTQTPHLEFQEGETIMLRCHSWKDKPLVKVTTFFQNGKSQKFS
 IIA- チンパンジー WLVLTQTPHLEFQEGETIVLRCHSWKDKPLVKVTTFFQNGKSQKFS
 IIA- カニクイザル WLALQTPHLEFREGETIMLRCHSWKDKPLIKVTTFFQNGIAKKFS
 Δ Δ Δ Δ Δ
 90 100 110 120 130

20

IIB- ヒト WLVLTQTPHLEFQEGETIVLRCHSWKDKPLVKVTTFFQNGKSKKFS
 IIB- カニクイザル WLALQTPHLEFREGETILLRCHSWKDKPLIKVTTFFQNGISKKFS

IIIA- ヒト WLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYF
 IIIA- カニクイザル WLLLQAPRWVFKEEESIHLRCHSWKNTLLHKVITYLQNGKGRKYF
 Δ Δ Δ Δ Δ
 90 100 110 120 130

30

IIA- ヒト RLDPTFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLFSSKPVTITVQV
 IIA- チンパンジー HLDPNLSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLFSSKPVTITVQA
 IIA- カニクイザル HMDPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTPYSSKPVTITVQV
 Δ Δ Δ Δ Δ
 131 140 150 160 170

IIB- ヒト RSDPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLYSSKPVTITVQA
 IIB- カニクイザル HMNPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTPYSSKPVTITVQV

IIIA- ヒト HHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSSSETVNITITQ
 IIIA- カニクイザル HQNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLIGSKNVSSSETVNITITQ
 Δ Δ Δ Δ
 140 150 158 170

40

IIA- ヒト PSMGSSSPMGIIIVAVVIATAVAAIIVA^ΔVVALIYCRKKRISANSTD
IIA- チンパンジー PSVGSSSPVGIIIVAVVIATAVAAIIVA^ΔVVALIYCRKKRISANSTD
IIA- カニクイザル PSVGSSSPMGIIIVAVVTGI^ΔA^ΔVAAIIVA^ΔVVALIYCRKKRISANSTD

IIB- ヒト P---SSSPMGIIIVAVVTGIAVAAIIVAAVVALIYCRKKRISANPTN
 IIB- カニクイザル PSMGSSSPIGIIIVAVVTGIAVAAIIVAAVVALIYCRKKRISANPTN

IIIA- ヒト GLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFYSVKTNIRSST
 IIIA- カニクイザル DLAVSSISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSMKKSIPSST
 Δ Δ Δ Δ
 180 190 200 210

	•	•	•	•		ITAM モチーフ
IIA- ヒト	PVKAAQFEPPGRQMI A IRKRL E ETNN D YETADGGY M TLNPRAPT					
IIA- チンパンジー	PVKAAQFEPPGRQMI A IRKRL E ETNN D YETADGGY M TLNPRAPT					
IIA- カニクイザル	PVKAARFEPLGRQTIALRKRL E ETNN D YETADGGY M TLNPRAPT					
	Δ		Δ		Δ	
	220		230		240	
					250	
					260	

IIB- ヒト PDEADKVGAENTITYSLLMHPDALEEPDDQNR**I**
 IIB- カニクイザル PDEADKVGAENTITYSLLMHPDALEEPDDQNR**V**
 ITIM モチーフ

IIIA- ヒト RDWKHDKFKWRKDPQDK
 IIIA- カニクイザル RDWEDHKFKWSKDPQDK
 Δ Δ
 220 230

ITAM モチーフ

●	●	●●
IIA- ヒト	DDDKNI[●]<u>YLTL</u>PPNDHVNSNN	
IIA- チンパンジー	DDDKNI[●]<u>YLTL</u>PPNDHVNSNN	
IIA- カニクイザル	DDDRNI^{●●}<u>YLTL</u>SPNDYDSNN	
	Δ	Δ
	270	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)

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

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,AAA35827.1.EMBL,Y00644,CAA68672.1.EMBL,J03619,AAA35932.1.EMBL,A21604,CAA01563.1.PIR,A31932.PIR,JL0118.PIR,S02297.PIR,S00477.PIR,S06946.HSSP,P12319,1ALT.MIM,146790,-. In

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。

10

【 0 1 8 4 】

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。

20

【 0 1 8 5 】

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 RIII(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 III-A 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。

30

40

【 0 1 8 6 】

表 21

成熟FcRIIAの配列

ドメイン1

TAPPKAVLKLEPPWINVLREDSVTLTCGGAHSPDSDSTQWFHN
 Δ Δ Δ Δ Δ
 1 10 20 30 40
 GNRIPTHQTQPSYRFKANNNDSGEYRCQTGRSTLSDPVHLTVLSE
 Δ Δ Δ Δ
 50 60 70 80

10

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

PSVGSSSPMGIIVAVVTGIAVAAIIVAAVVALIYCRKKRISANSTD
 Δ Δ Δ Δ
 180 190 200 210
 PVKAARFEPLGRQTIALRKQLEETNNDYETADGGYMTLNPRAPT
 Δ Δ Δ Δ Δ
 220 230 240 250 260
 ITAM
 DDDRNIYLTLSPPNDYDNSNN
 Δ Δ
 270 280

30

表 22

成熟Fc γ RIIBの配列

ドメイン1

TPAAPPKAVLKLEPPWINVLREDSVTLTCTGGAHSPDSDSTQWFHN

Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
1	10	20	30	40

GNLIPHTHTQPSYRFKANNNDSGEYRCQTGRITSLSDPVHLTVLSE

Δ	Δ	Δ	Δ
50	60	70	80

10

ドメイン2

WLALQTPHLEFREGETILLRCHSWKDKPLIKVTFFQNGISKKFS

Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
90	100	110	120	130

HMNPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTPYSSKPVITITVQV

Δ	Δ	Δ	Δ
140	150	160	170

20

膜貫通/細胞内

PSMGSSSPIGIIIVAVVTGIAVAAIIVAAVVALIYCRKKRISANPTN

Δ	Δ	Δ	Δ
180	190	200	210

ITIM モチーフ

PDEADKVGAENTITYSLLMHPDALEEPDDQNRV

Δ	Δ	Δ	Δ
220	230	240	250

30

表 23
成熟Fc γ RIIIAの配列

ドメイン1

EDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDRVTLKCQGAYSPEDNSTRWFHN

Δ Δ Δ Δ Δ
1 10 20 30 40

ESLISSQTSSYFIAAARVNNSGEYRCQTSLSLSDPVQLEVHIG

Δ Δ Δ Δ
50 60 70 80

10

ドメイン2

WLLLQAPRWVFKEEESIHLRCHSWKNTLLHKVTYLQNGKGRKYF

Δ Δ Δ Δ Δ
90 100 110 120 130

HQNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLIGSKNVSETVNITITQ

Δ Δ Δ Δ
140 150 160 170

20

膜貫通/細胞内

DLAVSSISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGlyFSMKKSIPSSST

Δ Δ Δ Δ
180 190 200 210

RDWEDHKFKWSKDPQDK

Δ Δ
220 230

30

【 0 1 8 9 】

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ンメントを表12に示す。

【 0 1 9 0 】

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。

【 0 1 9 1 】

ヒトおよびカニクイザルFc γ RI/III

```

      1      10
      |      |
ヒト MIPAVVLLLLLLLVEQAAA

```

10

ヒト
20 30 40 50
| | | |
LGEPOLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIOV

ヒト RKAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ

20

カニクイザル 対 ヒト = $85/86 = 98.8\%$ の同一性

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。

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ンメントを表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。

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	● ● ● ● ● IQRTPKIQVYSRHPPENGKPNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGEKMGKVEHSD	
	Δ Δ Δ Δ Δ Δ	
	1 10 20 30 40 50	
ヒト	LSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDM	
カニクイザル	● ● ● ● LSFSKDWSFYLLYYTEFTPNEKDEYACRVNHVTLSPGRTVKWDRDM	
	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

【 0 1 9 6 】

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, AAA5181 I.I.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。

【 0 1 9 7 】

10

20

30

40

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 MRVPRPQPWALGLLLFLPPGSLG

ヒト MGVP RPQPWALGLLLFLPPGSLG

20

細胞外ドメイン

カニクイザル AESHLSLLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGPPQYLSYDSL RQAEP CGA

カニクイザル N3 N

ヒト AESHLSLLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGPPQYLSYN SLRGEAEP CGA

Δ Δ Δ Δ Δ
10 20 30 40 50

カニクイザル WVENQVSWYWEKETTDLR I KEKLFLEAFKALGGKGPYTLQGLLGCELSP

30

ヒト DNTSVPTAKFALNGEEFMNFDLKQGTWGGDWPEALAI SQRWQQDKAANK
 Δ Δ Δ Δ Δ
 110 120 130 140 150

ヒト **ELTFLLFSCPHRLREHLERGRGNLEWKEPPSMRLKARPSSPGFSVLTCSA**

Δ Δ Δ Δ Δ

160 170 180 190 200

ヒト **FSFYPPQLRFLRNGLAAGTGQDGFGPSNDGSFHASSSLTVKSGDEHHY**

Δ Δ Δ Δ Δ

210 220 230 240 250

ヒト CCIVQHAGLAQPLRVELESPAKSS
 Δ Δ
 260 270

ヒト **VLVVGIVIGVLLLTAAAVGGALLWRRMRSGLPAPWISLRGDDTGVLLPTP**

Δ Δ Δ Δ Δ

280 290 300 310 320

ヒト GEAQDADLKDVNVIPATA
 Δ Δ
 330 340

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。

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

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.Engin. 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、2 mM 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-.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 μ l 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 μ g/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-抗ヒトカップパ軽鎖を用いたヒトIgGの滴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 Fc γ RI			ヒト Fc γ RI
	ProtG ^b	抗-huIgG	抗-kappa	ProtG
E27IgG1	1.00	1.00	1.00	1.00
E27IgG2	0.13 \pm 0.04	0.04, 0.04	0.11, 0.14	0.08, 0.08
E27IgG3	1.01 \pm 0.06	1.22, 1.15	1.32, 1.37	1.14, 1.03
E27IgG4	0.52 \pm 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プパ軽鎖 (抗kappa) であった。値は、0.37 μ g/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 \pm 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

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にも留意されたい。

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

カニクイザル FcγRIIA				10
サブクラス	ProtG	抗-huIgG	抗-kappa	
E27IgG1	1.00	1.00	1.00	10
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 FcγRIIA(H131)				20
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	30
ヒト FcγRIIA(R131)				
E27IgG1	1.00	1.00	1.00	
E27IgG2	0.63	0.40	0.47	
E27IgG3	1.17	1.14	0.85	30
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 . 1 2 3 μ g / m l における O D _{4 9 0 n m} (E27IgG1) に対する O D _{4 9 0 n m} (E27IgGサブクラス) の割合である。 40

b 平均 \pm S D , n = 3

【 0 2 1 5 】

通例、各IgGサブクラスに対するカニクイザルFc 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)。

【 0 2 1 6 】

表16および図2のデータは、カニクイザルFc RIIAがヒトIgG2およびIgG3に高親和性にて結合し、ヒトFc 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。 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、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 ± SD, n = 8

c 平均 ± SD, n = 5

d 平均 ± SD, 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。

【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

【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

20

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1 μ g/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0.370 μ g/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。

【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 RIIIA-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。

【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。

【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 RIIA
S239A				
ヒト	0.81 \pm 0.09	0.73 \pm 0.25	0.76 \pm 0.36	0.26 \pm 0.08
カニクイザル	N/A	0.68 \pm 0.04	N/A	N/A
R255A				
ヒト	0.99 \pm 0.12	1.30 \pm 0.20	1.59 \pm 0.42	0.98 \pm 0.18
カニクイザル	0.85 \pm 0.15	1.09 \pm 0.07	0.80 \pm 0.06	0.91 \pm 0.08
E258A				
ヒト	1.18 \pm 0.13	1.33 \pm 0.22	1.65 \pm 0.38	1.12 \pm 0.12
カニクイザル	0.91 \pm 0.08	0.88 \pm 0.05	0.99 \pm 0.07	0.93 \pm 0.11
D265A				
ヒト	0.16 \pm 0.05	0.07 \pm 0.01	0.13 \pm 0.05	0.09 \pm 0.06
カニクイザル	N/A	0.05 \pm 0.02	0.05	0.04 \pm 0.01
S37A				
ヒト	1.09 \pm 0.08	1.52 \pm .22(R) 1.10 \pm .12(H)	1.84 \pm 0.43	1.05 \pm 0.24
カニクイザル	1.02 \pm 0.09	1.23 \pm 0.34	1.04 \pm 0.30	0.88 \pm 0.11
H268A				
ヒト	1.10 \pm 0.11	1.21 \pm .14(R) 0.97 \pm .15(H)	1.44 \pm 0.22	0.54 \pm 0.12
カニクイザル	1.02 \pm 0.09	0.99 \pm 0.07	1.20	0.86 \pm 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	$0.40 \pm .15(R)$	0.23 ± 0.13	$1.34 \pm$
		$0.24 \pm .08(H)$		$0.20(F)$
カニクイザル	1.06 ± 0.09	2.07 ± 0.30	0.20 ± 0.09	$1.07 \pm .07(V)$
				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	$1.39 \pm$
				$0.19(F)$
カニクイザル	1.08 ± 0.09	0.92 ± 0.15	0.66 ± 0.14	$1.10 \pm .07(V)$
				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	$1.51 \pm 0.31(F)$
カニクイザル	1.19 ± 0.08	1.99 ± 0.24	0.12 ± 0.04	$1.11 \pm .08(V)$ 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

10

ヒトの脾臓 cDNA ライブ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。

20

【 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。

30

【 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. ineer. 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 PS0₄ 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。

40

【 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 にて一晚、50mM 炭酸緩衝液 pH9.6 にて、2 μg/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

50

トコルにより、biotin-X-NHS(Research Organics社、オハイオ州クリーブランド)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 にて1時間、ストレプトアビジ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。

20

【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]=50ng/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]=50ng/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 \pm 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、 $[mAb] = 50 \text{ ng/ml}$ 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。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良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ヤー

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 RIIA 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 γ RI-H6-GST フォワードプライマー	表 1
3 4	カニクイザル Fc γ RI-H6-GST リバースプライマー	表 1
3 5	カニクイザル Fc γ 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 γ RIIB 完全長リバースプライマー	表 1
3 7	カニクイザル Fc γ RIIB-H6-GST フォワードプライマー	表 1
3 8	カニクイザル Fc γ RIIB-H6-GST リバースプライマー	表 1
3 9	カニクイザル Fc γ RIIA 完全長フォワードプライマー	表 1
4 0	カニクイザル Fc γ RIIA 完全長リバースプライマー	表 1
4 1	カニクイザル Fc γ RIIA-H6-GST フォワードプライマー	表 1
4 2	カニクイザル Fc γ RIIA-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 ミクログロブリンフォワードプライマー	表 1
4 6	カニクイザル β -2 ミクログロブリンリバースプライマー	表 1
4 7	カニクイザル Fc γ 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 γ RIIA 完全長リバースプライマー	表 1
4 9	カニクイザル Fc γ RIIA-H6-GST フォワードプライマー	表 1
5 0	カニクイザル Fc γ 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

【図面の簡単な説明】

【 0 2 4 5 】

20

【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

30

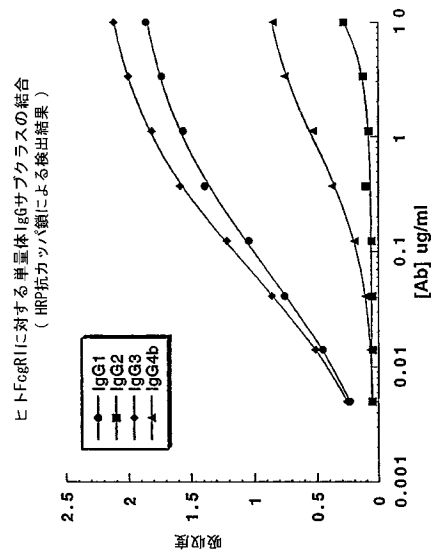
【図 7】ヒトIgG変異体をカニクイザルFc RIIIAに結合した六量体免疫複合体の説明図

【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

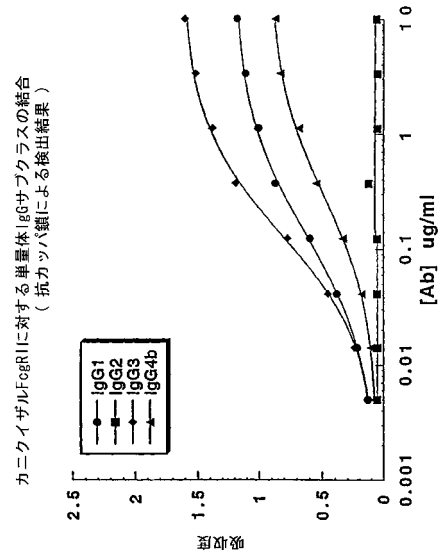
【図 9】カニクイザルFcRn(S3)に結合した濃度依存性モノマーIgGサブクラスの説明図

【図 1 0】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

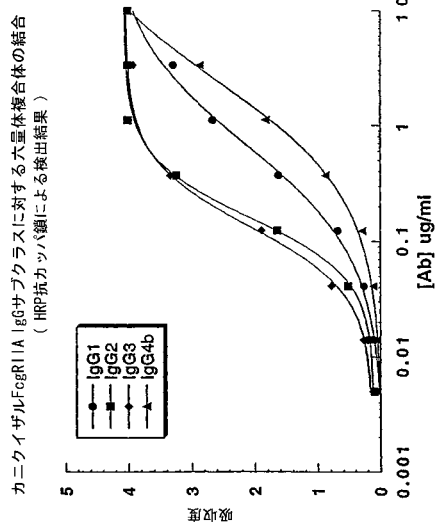
【図 1 A】



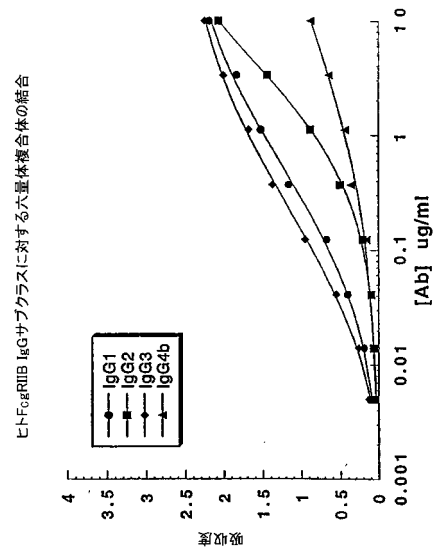
【図 1 B】



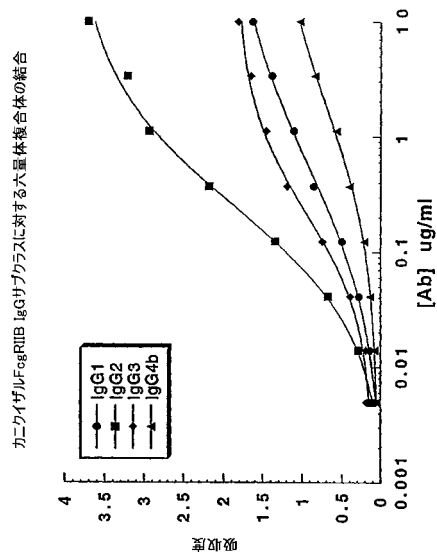
【図 2】



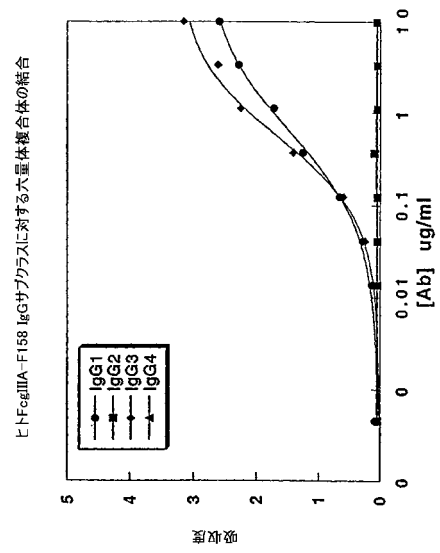
【図 3 A】



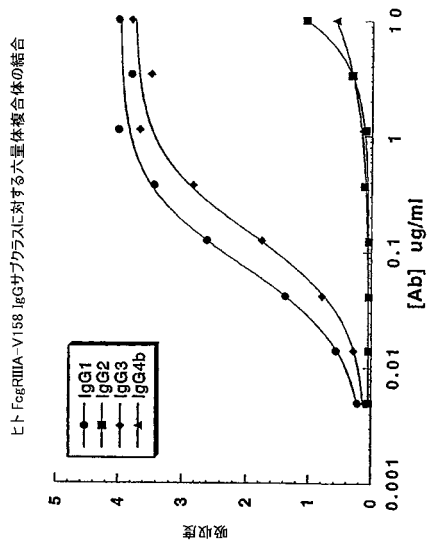
【図 3 B】



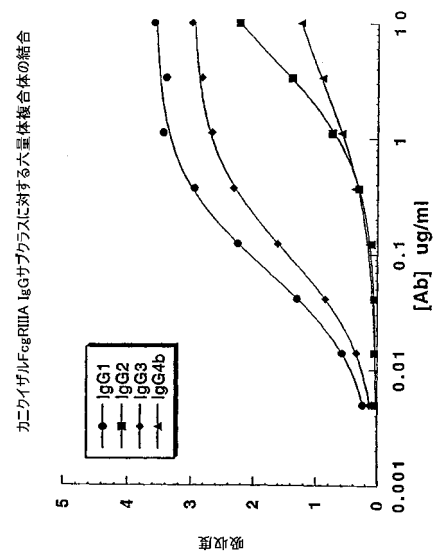
【図 4 A】



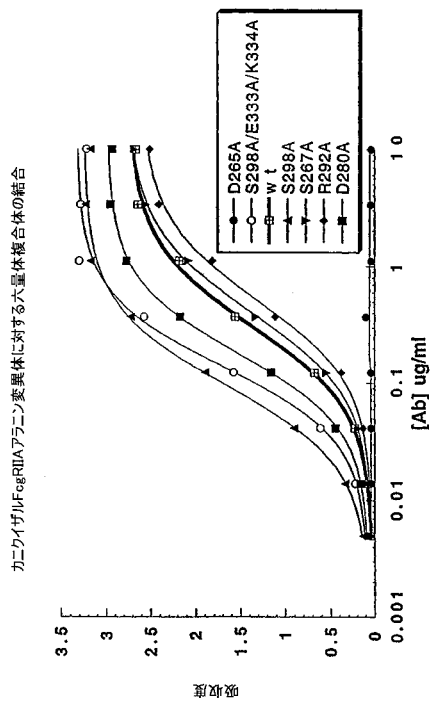
【図 4 B】



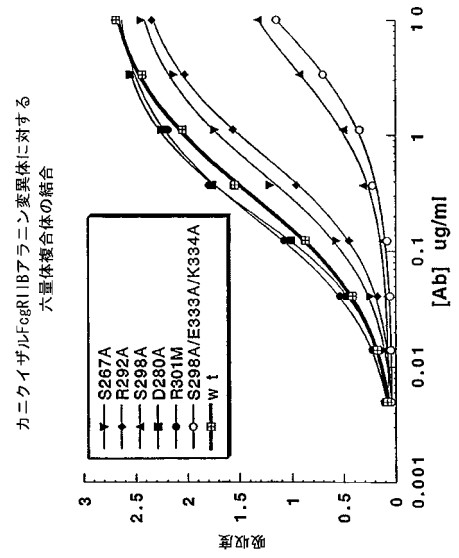
【図 4 C】



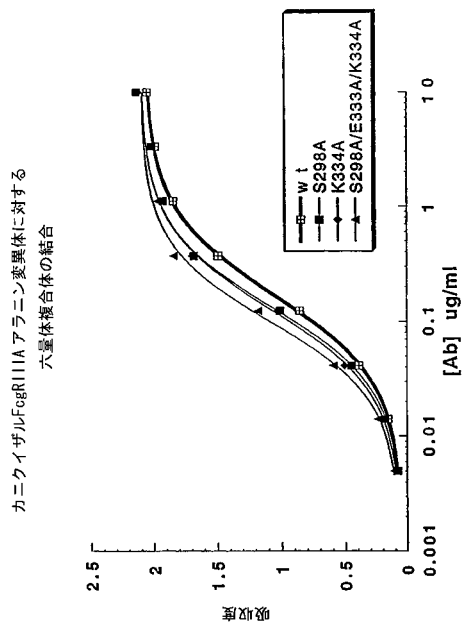
【図 5】



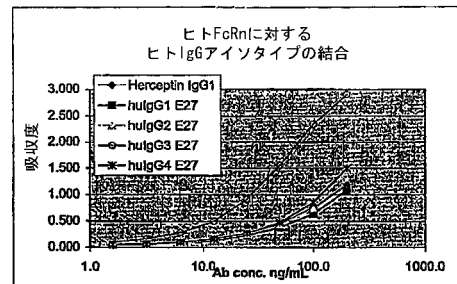
【図 6】



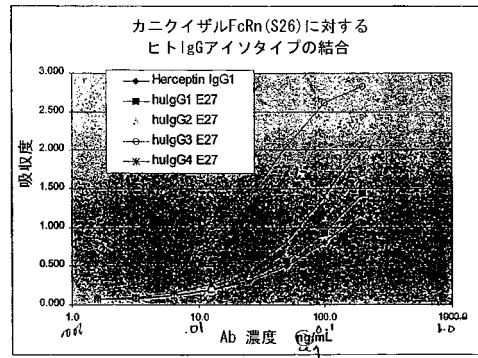
【図 7】



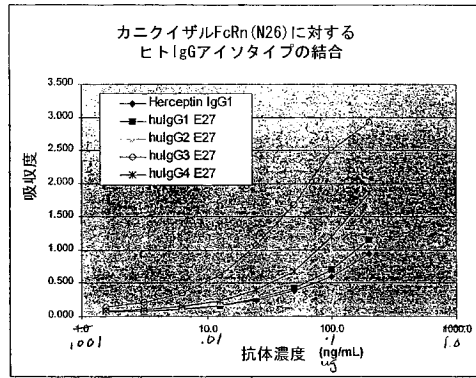
【図 8】



【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, PGFUB, 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	"T"
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"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

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

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 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	C 1 2 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,M Z,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)

U N I X

(72)発明者 ネームヌク, アンジェラ ケー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 2, オークランド, フロリダ ストリート 2 9 4 8

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