

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4382163号
(P4382163)

(45) 発行日 平成21年12月9日(2009.12.9)

(24) 登録日 平成21年10月2日(2009.10.2)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	

請求項の数 3 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-540989
(86) (22) 出願日	平成10年3月26日(1998.3.26)
(65) 公表番号	特表2001-522235(P2001-522235A)
(43) 公表日	平成13年11月13日(2001.11.13)
(86) 国際出願番号	PCT/AU1998/000208
(87) 国際公開番号	W01998/044129
(87) 国際公開日	平成10年10月8日(1998.10.8)
審査請求日	平成17年3月18日(2005.3.18)
(31) 優先権主張番号	P05891
(32) 優先日	平成9年3月27日(1997.3.27)
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)
(31) 優先権主張番号	PP1830
(32) 優先日	平成10年2月13日(1998.2.13)
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)

(73) 特許権者	ザ カウンシル オブ ザ クイーンズランド インスティテュート オブ メディカル リサーチ オーストラリア国 4029 クイーンズランド州, ハーストン, ハーストン ロード 300
(73) 特許権者	コモンウェルス サイエントフィック アンド インダストリアル リサーチ オーガナイゼーション オーストラリア国 2601 オーストラリアン キャピタル テリトリー, キャンプベル, ライムストーン アベニュー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ターゲッティング分子を用いた免疫応答の増強

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体において抗原に対する免疫応答を誘起するための医薬であって、C T L A 4 をコードする第 1 の配列と、前記抗原またはそのエピトープをコードする第 2 の配列とを含んでなる D N A 分子又は前記 D N A 分子によってコードされるポリペプチドを含む医薬。

【請求項 2】

前記第 2 の配列によりコードされる抗原またはそのエピトープが、前記 D N A 分子によりコードされる産物の二量体化または多量体化を促進するポリペプチドである、請求項 1 に記載の医薬。

【請求項 3】

前記 D N A 分子が、該 D N A 分子によってコードされる産物の二量体化または多量体化を促進するポリペプチドをコードする第 3 の配列を更に含む、請求項 1 に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、免疫原に対する免疫応答を増強する方法およびこうした方法に使用するための組成物に関する。特に、本発明は、DNAおよびタンパク質ワクチン接種におけるターゲッティング分子の使用に関する。

発明の背景

ウイルスタンパク質をコードする非複製プラスミドDNAの直接注入により実験室モデルおよび前臨床モデルにおいて防御免疫応答を誘発することができるため、DNA免疫化に対す

る関心が高まっている。DNAワクチン接種についての有用なレビューは、Donnelly et al, Journal of Immunological Methods 176 (1994) 145-152に報告されている。この報告の開示内容は、参照により本明細書に組み入れる。

ワクチン接種の手段としてDNAを筋肉内注射すると、細胞性および体液性応答の両方を誘発することができる(1)。リポータータンパク質を用いた研究により、筋肉細胞は筋肉内DNA注射後のトランスフェクションの主要な標的であることが実証された(2)。DNA免疫化後の免疫応答の誘発の根底をなす機構ははっきりしていない。筋細胞は低レベルでMHCクラスIを発現するがクラスIIまたはB-7のような共刺激性分子(costimulatory molecule)を構成的に発現しないため(3)、AbまたはCTL応答の誘発を引き起こす候補にはならないと思われる。注射部位で抗原提示細胞(APC)の低レベルのトランスフェクションが起こり、次いで、これらのAPCがリンパ系器官に移動し、コードされた抗原をBおよびT細胞に提示する可能性がある(4)。これについては、皮内DNA免疫化(5)およびバイオリスティック(biolistic)DNA免疫化(6)の後で起こることが実証されている。このほか、筋細胞が単に抗原の供給源として働く可能性があり、ドレーン性リンパ節(drainage lymph node)中で初回抗原刺激が起こる。後者の場合、分泌によりまたは細胞損傷に続いて筋細胞から抗原が放出される場合に最適の免疫誘導が得られるであろう。

ポリヌクレオチドまたはDNAのワクチン接種に対する応答を増大させることが実証された方法の1つは、サイトカインまたは共刺激性分子をコードする配列を使用するものである(Conry et al, (1996) Gene Therapy 3:67-74)。これらの研究者らは、投与されるDNAが、対象の抗原だけでなくB7-1をもコードする場合に、応答が増大することを示した。本発明者らは、APCまたは免疫誘導部位にターゲティングされるように抗原を改変する効果について調べた。これにより免疫応答が著しく強化されるだけでなく、免疫偏向をも生じることが分かった。

発明の概要

第1の態様において、本発明は、抗原に対する免疫応答を誘起するために使用するDNA分子からなる。このDNA分子には、ターゲティング分子をコードする第1の配列と、抗原またはそのエピトープをコードする第2の配列と、場合により、コードされた産物の二量体化または多量体化を促進するポリペプチドをコードする第3の配列とが含まれる。

当業者には分かるであろうが、多くの場合、第2の配列によりコードされる抗原またはエピトープは、コードされた産物の二量体化または多量体化を促進するポリペプチドである。この場合には、第3の配列が省略可能であることが理解されるであろう。

第2の態様において、本発明は、本発明の第1の態様のDNA分子によりコードされるポリペプチドからなる。

第3の態様において、本発明は、個体中で免疫応答を誘起する方法からなる。この方法には、本発明の第1の態様のDNA分子または本発明の第2の態様のポリペプチドを個体に投与するステップが含まれる。

ターゲティング分子として使用可能な分子は多岐にわたる。こうした分子としては、リンパ球様細胞(この細胞は免疫誘導部位に存在するかもしくは該部位にAgを提供するであろう)、リンパ系部位(例えば、脾臓、リンパ節、パイエル板)、またはAPCを直接標的とするリガンドが挙げられる。このようなりガンドとしては、例えば、CD40L、OX40、APC上の受容体(例えば、DEC205、CD23、CD11c、MHCクラスII)に対する抗体、CD28、CTLA4、およびL-セレクチンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。現在のところ、ターゲティング分子はCTLA4またはL-セレクチンであることが好ましい。

第4の態様において、本発明は、個体中で抗原に対する免疫応答を偏向させる方法からなる。この方法には、CTLA4をコードする第1の配列と、抗原またはそのエピトープをコードする第2の配列と、場合により、コードされた産物の二量体化または多量体化を促進するポリペプチドをコードする第3の配列とを含むDNA分子を個体に投与するステップが含まれる。

二量体化または多量体化を起こす方法は多数存在する。例えば、縦列重複および通常多量体を形成する任意の分子(例えば、免疫グロブリン、CD8、TNF、グルタチオン、s-トラン

10

20

30

40

50

スフェラーゼ、ジンクフィンガー二量体など)の使用が挙げられる。この分野に関連した技術文献中には多数の参考文献が存在する。こうした文献としては、Classon BJ et al (1992)「CD8 鎖のヒンジ領域：構造、抗原性、および免疫グロブリンスーパーファミリードメインの発現における効用」*Int Immunol* 4:215-25;Yang J,Moyana T,Xiang J (1995)「遺伝子工学的に調製された1本鎖FV/TNF分子は、FVの抗腫瘍免疫反応性および腫瘍壊死因子の細胞傷害活性を有する」*Mol Immunol*.32:873-81;Tudyka T,Skerra A (1977)「グルタチオンS-トランスフェラーゼを、組換えプロテアーゼ阻害剤用のc-末端酵素活性二量体化モジュールとして使用してEscherichia coliの周辺質中に機能的に分泌させることができる」*Protein Science*,6:2180-2187;Pomerantz JL,Wolfe SA,Pabo CO (1998)「構造に基づく二量体ジンクフィンガータンパク質のデザイン」*Biochemistry* 37:965-970;およびWhiteheart SW,Rosnagel K,Buhrow SA,Brunner M,Jaenicke R,Rothman JE (1994)「N-エチルマレイミド感受性融合タンパク質：膜融合に必要とされる三量体ATPアーゼのATPの加水分解」*J Cell Biol* 126:945-54が挙げられる。これらの参考文献および本願で引用されている他の参考文献の開示内容は、相互参照により本明細書に組み入れる。当業者には分かるであろうが、本発明の構築物において、第1、第2、および第3のDNA配列は、任意の特定の順序であってよい。現在のところ、この順序は第1、第3、次に第2であることが好ましい。

10

本明細書全体にわたり、文脈上、他の意味が必要となる場合を除き、「含む」という用語またはその変化形、例えば、「含んでなる」もしくは「含有する」という用語は、記載の要素もしくは完全体または要素もしくは完全体のクラスを包含することを意味するが、いかなる他の要素もしくは完全体または要素もしくは完全体のクラスをも除外するものではないことは理解されるであろう。

20

発明の詳細な説明

次に、本発明の特徴を更にはっきりと理解できるように、以下の実施例および図を参照して本発明の好ましい形態について説明する。

図1：NITトランスフェクタントからの Ig、CTLA4Ig、およびL-SEL1gタンパク質の分泌。pRep10::CD5L-hIg、pRep7::mCTLA4-hIg、およびpRep10::hL-SEL-hIg発現プラスミドを用いてNIT細胞をトランスフェクトした。固定化プロテインAを用いて分泌タンパク質を精製し、還元および非還元条件下でサンプルをSDS PAGEにかけた。

図2：DNA免疫化マウスにおけるhIg特異的IgG応答。pRep10::CD5L-hIg、pRep7::mCTLA4-hIg、およびpRep10::hL-SEL-hIgで免疫したBALB/cマウスから、免疫化後、記載の時間で血清を採取し、ELISAによりhIg特異的IgGについてアッセイを行うまで-20 で保存した。450nmで0.2 ODを与える最大希釈度として力価を定義した。結果は、各グループ中の5匹のマウスから得られたlog力価の平均値±SEMとして表されている。正常マウス血清および高度免疫マウス血清をそれぞれ陰性および陽性の対照として使用した。

30

図3：DNA免疫化マウスにおけるhIg特異的IgGサブクラス応答。A：pRep10::CD5L-hIg、pRep7::mCTLA4-hIg、およびpRep10::hL-SEL-hIgで免疫したBALB/cマウスから免疫化8週間後に血清を採取し、ELISAによりhIg特異的IgG1、IgG2a、およびIgG2bについてアッセイを行うまで-20 で保存した。450nmでODが0.2に達する最大希釈度として力価を定義した。結果は、各グループ中の5匹のマウスから得られたlog力価の平均値±SEMとして表されている。B：各マウスごとにlog IgG1力価を対応するlog IgG2a力価で割ってlog IgG1:log IgG2a比を求めた。結果は、各グループ中の5匹のマウスから得られた平均値±SEMとして表されている。

40

図4：可溶性タンパク質免疫化マウスにおけるhIg特異的IgGサブクラス応答。5gのhIgまたは5μgのCTLA4Igタンパク質を含有するPBS 100μlで免疫したBALB/cマウスから免疫化2週間後に血清を採取し、ELISAによりhIg特異的IgGについてアッセイを行った。450nmでODが0.2に達する最大希釈度として力価を定義した。結果は、各グループ中の5匹のマウスから得られたlog力価の平均値±SEMとして表されている。




図5：CTLA4Ig DNA免疫化マウスにおけるhIg特異的IgGサブクラス応答。記載の用量のpRep7::mCTLA4-hIgで免疫したBALB/cマウスから免疫化2週間後に血清を採取し、ELISAによりh

50

Ig特異的IgG1、IgG2a、およびIgG2bについてアッセイを行った。450nmでODが0.2に達する最大希釈度として力価を定義した。結果は、各グループ中の5匹のマウスから得られたlog力価の平均値±SEMとして表されている。

図6：DNAの同時注入後におけるOVA特異的IgGおよびIgGサブクラス応答。pRep10::hL-SEL-hIlgおよびpCI-OVAまたはpRep7::mCTLA4-hIlgおよびpCI-OVAで免疫したBALB/cマウスから免疫化4週間後に血清を採取し、ELISAによりOVA特異的IgG(A)、またはOVA特異的IgG1、IgG2a、もしくはIgG2b(B)についてアッセイを行った。450nmでODが0.2に達する最大希釈度として力価を定義した。結果は、各グループ中の5匹のマウスから得られたlog力価の平均値±SEMとして表されている。

図7：hIlg、Lsel-hIlg、およびCTLA4-hIlgを用いたときの刺激指数を表している。

( HuIg 1mg/ml ;  HuIg 1mg/ml ;  HuIg 1mg/ml)

10

図8：種々の構築物を用いたときの抗オボアルブミンIgG力価を表している。



( 2週間 ;  4週間)

図9：pCI::mCTLA4-g3h-OVAおよびpCI::mCTLA4-hIlg-OVAを用いたときの抗OVA IgG力価を表している。

図10：0日目および28日目に0.1mgのpCI::mCTLA4-hIlg-45W(黒丸)またはpCI::CD5L-hIlg-45W(灰色の丸)を筋肉内投与することにより、各グループ5匹ずつのBalb/cマウスにワクチン投与した。0、7、14、28、35、および42日目にマウスに餌を与えた。組換え45W(His)6を用いてELISAにより血清の抗45w抗体をアッセイした。2つのグループを比較するために学生t検定を行い、各時点における2種のワクチンに対する確率の値(P)を図の上部に示した。

20

図11：20gの組換え45w(His)6タンパク質(灰色の丸)を含むフロイント完全アジュバンドを腹腔内投与するかまたは0.1mgのpCI::mCTLA4-hIlg-45W(黒丸)を含む生理食塩水0.1mlを筋肉内投与することにより、各グループ5匹ずつのBalb/cマウスにワクチン投与した。ワクチン投与後0、2、5、8、14、および28日目にマウスに餌を与え、45W(His)6タンパク質を用いてELISAにより抗45w抗体のアッセイを行った。学生t検定により応答を比較したところ、8日目に差異を生じた($p < 0.05$)。

図12：Plasmodium chabaudi adami DSでチャレンジした後のマウスの生存%を表している

30

( pCI::CD5L-hIlg-AMA ;  pCI::CTLA4-hIlg-AMA ;  pCI::CTLA4-hIlg) 。

図13は、抗体力価を表している。

図14は、種々の免疫化における14日目の抗体力価を表している。

図15は、種々の免疫化における54日目の抗体力価を表している。

図16は、肺ウイルス力価を表している。

図17：免疫化後の抗hIlg抗体力価の誘導動態。黒ぬりの記号は、hIlgを含有するプラスミドを表し、黒ぬりの四角形(pCI::bCTLA4-hIlg-PLD)、黒ぬりの丸(pCI::CD5L-hIlg-PLD)、黒ぬりの三角形(pCI::bCTLA4-hIlg)で記されている。白ぬきの記号は、いずれの形態のhIlgをも注入されていない対照動物グループを表し、白ぬきの丸(pCI::PLD)、白ぬきの四角形(ワクチン接種なしの対照)、および白ぬきの三角形(Glan-Vac)で記されている。

40

図18：真核および原核細胞により発現されたPLDのウェスタンブロット。レーン1~3：pCI::PLD(レーン1)、pCI::PLD(レーン2)、およびpCI単独(レーン3)でトランスフェクトしたCos-m6細胞由来の上清。レーン4：Corynebacterium pseudotuberculosisから発現されたPLDを含有する細胞濾液。

図19：Corynebacterium pseudotuberculosisによるチャレンジからの防御。蹄冠(coronet)上に注入された 10^6 CFUのCorynebacterium pseudotuberculosisによるチャレンジから防御された動物のパーセント。次のリンパ節：膝窩リンパ節、鼠径リンパ節、および左右両方の前大腿部リンパ節のいずれにも膿瘍をもたない動物として防御を定義した。

50

図20は、L.majorでチャレンジした後の種々の時点における病変を有するマウスの数を表している (PBS; pCI::CD5L-hlg-PSA2; pCI::mCTLA4-hlg-PSA2; pCI::PSA2)。

実施例1

材料および方法

マウス

すべての実験で6~8週齢の雌のマウス (BALB/c、CBA、およびC57Bl/6) を使用した。SPF条件下でマウスを保持した。

プラスミドおよび免疫化

分泌形態のヒトIgG1のFc断片 (hlg) を産生するように、Rep7またはRep10ベクター (これらのベクターは、多重クローニング部位の方向だけが異なる。Invitrogen, San Diego, CA, USA) 中においてRSVプロモーターの制御下で、Cd5リーダー配列 (CD5L) を単独で、またはマウスCTLA4 (mCTLA4lg) もしくはヒトL-セレクチン (hL-SELlg) と融合させて使用することにより、発現プラスミドを構築した。pREP7::CTLA4-hlgの配列を配列番号1に示す - プロモーターRSV:13-640,CTLA4-hlg:703-2462。これらの構築物は、P.Lane博士 (Basel Institute, Switzerland)、B.Seed博士 (Massachusetts General Hospital, Boston, USA)、およびD.L.Simmons博士 (Institute of Molecular Medicine, Oxford, UK) から戴いたプラスミドから得たものであった。以下の構築物を作製した。

pRep10::CD5T-hlg

pRep7::mCTLA4-hlg

pRep10::hLSEL-hlg

注入用プラスミドは、(7)に記載のPEG沈降によりE.coliから調製した。ただし、溶液I、II、およびIIIの体積は、使用したプロス培地各1リットルあたり50mLの溶液I中にペレットを再懸濁するように調節した。Triton X-114相分離 (8) を4回行うことにより、プラスミド調製物からエンドトキシンを除去し、注入を行うまで、-20 で生理食塩水中に保存した。リムルス変形細胞分解産物アッセイ (limulus amoebocyte lysate assay) (QCL-1000 BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) により測定したところ、得られたプラスミド調製物1mgあたり10 IU未満のエンドトキシンが含まれていた。各実験の0日目および14日目に、マウスの両方の大腿四頭筋中にまたは尾の基部の皮内に100 μgのプラスミドDNAを投与した。

抗体アッセイ

4 で一晩インキュベートすることよりヒトIg (hlg) タンパク質 (Intragam, CSL, Parkville, Australia; 10 μg/mlのPBS溶液) でマイクロタイタープレート (Dynatech, Chantilly, VA, USA) をコーティングし、PBSで4回洗浄して未結合抗原を除去した。プレートは、ブロッキング緩衝液 (粉乳5%を含むPBS溶液) で段階的に希釈した血清と共に4 で一晩インキュベートした。PBSで5回洗浄して未結合Abを除去した後、ブロッキング緩衝液で希釈したペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG、IgG1、IgG2a、およびIgG2b抗体 (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA) と共にプレートをインキュベートした。PBSで5回洗浄した後、基質溶液 (3,3,5,5-テトラメチルベンジジン (T2885, Sigma St.Louis, MO, USA) 0.1mg/mlおよびH₂O₂ 0.03%を含む0.1M酢酸ナトリウム溶液 (pH6.0)) を添加することにより、結合Abの量を測定した。1M H₂SO₄で反応を停止させ、450nmにおけるODを読みとった。ODが0.2に達する最大希釈度として力価を定義した。

IgGサブクラスELISAの検量を行うために、4 で一晩かけてマウス骨髄腫由来のIgG1、IgG2a、またはIgG2b (0.5倍のPBS溶液中に10 μg/mlの量で含まれる) でプレートをコーティングし、PBSで3回洗浄し、次いで、段階的に希釈した抗マウスIgGサブクラスHRP結合Abと共にインキュベートした。この後、ELISAにおいて同等の吸光度を与える各抗マウスサブクラスAbの希釈度を使用した。

結果および考察

ヒトIgG1 H鎖を単独で (pRep10::CD5L-hlg) またはCTLA4 (pRep7::mCTLA4-hlg) もしくはL-セレクチン (pRep10::hLSEL-hlg) との融合体として分泌形態で産生するように、発

10

20

30

40

50

現プラスミドを構築した。これらのプラスミドでトランスフェクトした細胞は、予想したサイズのジスルフィド結合二量体として3種の分子を分泌した(図1)。他の場合(1)と同じように、B細胞欠損免疫化マウスの筋肉ホモジネートおよび/または血清由来プロテインA精製物質のウェスタンブロットにより、in vivoタンパク質発現を検出することはできなかった(データは示さない)。しかしながら、免疫化マウスにおいて免疫応答を検出できることから、in vivo発現が示唆される。非免疫化マウスまたはベクターだけを与えたマウスでは、ヒトIgに対する免疫応答は検出されなかった(データは示さない)。しかしながら、pRep10::CD5L-hIg、pRep10::hL-SEL-hIg Ig、またはpRep7::mCTLA4-hIgで免疫したマウスは、著しく異なる応答を示した(図2)。pRep7::mCTLA4-hIg免疫化マウスの応答は、2、4、および8週間後の3つのすべての時点で、より速くかつより大きかった。4週間後、pRep7::mCTLA4-hIgおよびpRep10::hLSEL-hIg免疫化マウスは共に、それぞれpRep10::CD5L-hIg対照の1000倍および100倍のIgG応答を示した。観測された差異はエンドトキシンのアジュバント効果とはまったく関係なかった。なぜなら、Triton X-114を用いてエンドトキシンを除去し(8)、そのレベルは<10IU/mg(プラスミドDNA)であったからである。BALB/cおよびCBAマウスを用いた3つの実験においても同様の結果が得られた(データは示さない)。

すべてのマウスにおいてpRep10::CD5L-hIgに対する応答は、IgG2aが優位であった(図3)。これはウイルス感染とよく似ており、DNA免疫化後に他の抗原を用いた場合について報告が出されている(9,10)。pRep10::hLSEL-hIg免疫化マウスにおけるIgGサブクラス応答は、pRep10::CD5L-hIg対照と類似していたが(ただし、より大きい)、pRep7::mCTLA4-hIg 20
IgG応答はIgG1優位に偏向していた(図3B)。用量が原因でAb応答に差異を生じた可能性は少ない。なぜなら、構築物はいずれも、同等なプラスミドを基礎として用いて調製されたものであり、可溶性CTLA4Igタンパク質で免疫したマウス(図4)は、同用量のhIgを投与したマウスよりも高いAb応答を示したからである。また、pRep7::mCTLA4-hIgに対する応答でIgG1優位となる原因が用量であるかを調べるために、様々な量のpRep7::mCTLA4-hIgでマウスを免疫し、pRep10::hLSEL-hIgのマウスを基準にして全IgG抗体レベルのマウスを比較できるようにした(図2および3)。pRep7::mCTLA4-hIgのすべての用量においてIgG1優位であることが分かった(図5)。

CTLA4を用いた実験から、CTLA4はB-7と結合し、他の免疫原に対する応答を低減させる共刺激をブロックできることが実証された(11)。いくつかの理由により、CTLA4の非特異 30
的免疫調節作用が観測される見込みはなかった。第1に、本発明者らがDNAおよびタンパク質免疫化で実証したように、少なくとも高用量のCTLA4Igタンパク質(この場合はB-7はブロックされる)では免疫抑制性は生じるが免疫刺激性は生じなかった(11)。更に、CTLA4IgとオボアルブミンをコードするDNA(pCI-OVA)とが同時注入されたマウスは、対照マウスと類似のオボアルブミン特異的IgGおよびIgGサブクラス力価を示したことから、CTLA4の免疫抑制作用はまったく存在しなかったことが示唆される。

実施例2

T細胞増殖応答を増強させるためのターゲッティングリガンドの使用および二量体化の必要性

緒言

実施例1において、抗原をターゲッティングリガンドCTLA4またはL-セレクチンと融合させた場合、モデルDNAワクチンに対するAbレベルを増強できることが実証された。

hIg成分はまちがいなく二量体化を起こすであろう。一般に、二量体を用いると、受容体へのリガンドの結合は強くなるので、本発明者らは、こうした二量体化は好ましいことであると考へた。しかしながら、本発明の系において、抗原ターゲッティングリガンド融合タンパク質の二量体化が免疫応答を増大させるために必要であるかは明確ではなかった。タンパク質をコードする抗原ターゲッティングベクターによるAb応答の強化が二量体形成に依存するかを調べるために、単量体の抗原ターゲッティングリガンド融合タンパク質をコードするプラスミドによる免疫化を基準にしてAb応答を比較した。二量体を形成しないと思われる他のモデル抗原(オボアルブミン:OVA)に対するコード配列でベクターのhIg 50

成分を置き換えた。

材料および方法

すべての実験で6~8週齢の雌のマウスを使用し、SPF条件下で保持した。

PCR増幅によりMlu I制限酵素認識配列を導入した後、Nsi I部位において4アミノ酸グリシンリンカーを介してヒト免疫グロブリンFc (hlg) 遺伝子の後ろにOVA cDNA (bp 470~1170) を挿入した。これらのベクターは、hlgの鎖間ジスルフィド結合により二量体を形成するであろう。これは接尾辞hlg-OVAで表されている。二量体を形成しないと思われるターゲティングベクターは、OVAのcDNAをCTLA4のcDNAに (pCI::mCTLA4-OVA) または対照としてCD5のリーダー配列に (pCI::CD5L-OVA) 直接融合することによって得た。PCR増幅によりHind IIIおよびNsi I制限部位を導入した後、pCI::mCTLA4-hlg-OVAの全hlg成分をヒトIgG3ヒンジ領域 (日本のY Akahori博士よりの提供品) で置き換え、pCI::mCTLA4-g3h-OVAを形成した。注入用プラスミドは、製造業者の取扱説明書に従ってendofree QIAGEN maxiキットを用いてE.coliから調製し、注入を行うまで、-20℃で生理食塩水中に保存した。各実験の0日目に、50µgのプラスミドDNAを含む生理食塩水100µlをマウスの両方の大腿四頭筋中に筋肉内投与した。

初回免疫の6週間後、標準的な5日間の³H-チミジン取込プロトコルにより 2×10^5 個の脾臓細胞の増殖を測定した。平均刺激指数は、抗原併用時のcpm / 脾臓細胞単独時のcpmとして計算した。

4℃で一晩インキュベートすることよりOVAタンパク質 (A-5503, Sigma, St. Louis, MO; 10µg/mlのPBS溶液) でマイクロタイタープレート (NUNC, Maxisorb) をコーティングし、PBSで4回洗浄して未結合抗原を除去した。プレートは、ブロッキング緩衝液 (カゼイン1%を含むPBS溶液) で段階的に希釈された血清と共に4℃で一晩インキュベートした。PBSで5回洗浄して未結合Abを除去した後、ブロッキング緩衝液で希釈したペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) と共にプレートをインキュベートした。PBSで5回洗浄した後、テトラメチルベンジジン基質溶液を添加することにより、結合Abの量を測定した。1M H₂SO₄で反応を停止させ、450nmにおけるODを読みとった。ODが0.2に達する最大希釈度として力価を定義した。

結果および考察

初回免疫の6週間後、標準的な5日間³H-チミジン取込プロトコルにより増殖脾臓細胞を測定した (図7)。刺激指数は、抗原併用時のcpm / 脾臓細胞単独時のcpmとして計算した。3つの異なる抗原濃度でインキュベートした後、各グループ中の3匹のマウスから得られた平均値 ± SDが示されている。DNA構築物pCI::mCTLA4-hlgおよびpCI::Lsel-hlgで免疫したマウスは、それぞれ対照 (pCI::CD5L-hlg) の8倍および3倍のT細胞増殖応答を示した。このデータから、抗原のターゲティングにはT細胞の活性化を増強する作用があることが示唆された。

0日目に、単量体のターゲティングベクターpCI::mCTLA4-OVA、単量体の対照pCI::CD5L-OVA、または二量体のベクターpCI::CD5L-hlg-OVA (対照)、pCI::Lsel-hlg-OVA、もしくはpCI::CTLA4-hlg-OVAを発現するDNAで各グループ8匹ずつのマウスを免疫し、免疫化の2および4週間後に餌を与えた。ELISAによりOVA特異的IgGレベルを測定した。免疫化の2および4週間後に得られた結果を図8に示す (2週間後: 陰影カラム、4週間後: 黒ぬりカラム)。pCI::CD5L-OVAまたはpCI::mCTLA4-OVA単量体DNAベクターで免疫したマウスでは、2または4週間後のAbレベルに差異は生じなかった。単量体 (pCI::CD5L-OVA) または二量体 (pCI::CD5L-hlg-OVA) 対照と比較して、二量体を形成するpCI::mCTLA4-hlg-OVAベクターを用いたときに最も高いAb応答が得られた。

驚くべきことに、pCI::Lsel-hlg-OVA免疫化マウスは、両方の時点で最も低い応答を示した。このデータは、L-セレクチンとだけ融合させたときにhlgに対する応答が増強したと対照的である。pCI::Lsel-hlg-OVAを用いて得られた応答の大きさが単量体抗原融合体を用いて得られたものと類似したものであったという観察結果は、Lsel-hlgへのOVA (または他の抗原) の融合がリガンドへのL-セレクチンの結合の効率を低下させている可能性があることを示唆するものである (例えば、二量体化による妨害、アロステリック効果

10

20

30

40

50

、またはL-セレクチンに対する配座変化が原因となって)。これに代わる融合方法を調べる必要がある。

全体として、これらの結果から、効果的な抗原ターゲティングを行うためには、抗原自体が二量体化または多量体化を促進する場合を除き、二量体化を促進するhIgのような分子を導入することが不可欠であることが示唆される。このデータは、ヒトIgG1のヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを使用して得られたものであった。hIgの二量体化は、ヒンジドメイン中のシステイン残基間のジスルフィド結合により促進される。同様に二量体化を促進する他の分子をhIg成分と置き換えることが可能であるかを調べるために、ヒトIgG3のヒンジ領域を使用してmCTLA4をOVAと連結させた。ターゲティングベクターpCI::mCTLA4-hIg-OVAまたはpCI::mCTLA4-g3h-OVAを発現するDNAで各グループ中の8匹のマウスを免疫した。免疫化の2週間後、血清を回収したところ、同レベルの抗OVA抗体が含まれていることが分かった(図9)。従って、このことから、ヒンジ領域だけに対して抗原ターゲティングベクターのhIg成分を減少させるか、またはhIgG1成分を、他の免疫グロブリンヒンジ領域、他の分子またはその一部分(例えば、hIgG3ヒンジ)と置き換えて二量体化を促進することが可能であることが示唆される。このことは、ターゲティングリガンドが、二量体化しないL-セレクチンもしくは他の分子である場合、またはhIgを介して抗原の融合を行うことにより構造的に阻害を受ける場合、特に適用可能性があるだろう。

実施例1から、ターゲティングリガンドhIg融合体を用いて、DNAおよびタンパク質免疫化後におけるhIgに対する免疫応答を増強させることができることが実証された。それに続く実施例は、hIg以外の抗原を用いて免疫応答を増強させることができるかを調べるために行った。これらのデータは、hIg単独の場合に見られたように、二量体形成を促進しうるhIgのC-末端に抗原を付加させることによって得たものであった。hIgと抗原との間に、gly-gly-gly-gly-thrスペーサーを導入した。これらの構築物を使用したか、常法を用いた最適化により応答を改良できることは分かるであろう。こうした最適化としては、本発明の範囲内にあるとみなされる構築物の改変、例えば、異なるターゲティング分子、多量体化を促進する様々な配列、異なるリンカーが挙げられる。

実施例 3

45Wとして知られる*Taenia ovis*の宿主保護抗原に対する免疫応答を促進するためのCTLA4の使用

序論

45W抗原は、*Taenia ovis*オンスフェラ中に存在し、またはその被膜に潜在する推定上の膜糖タンパク質である。*T. ovis*は、ニュージーランド及び他の重要なヒツジ産出国においてヒツジ肉および羊毛の商業的損失の原因となるヒツジの病原体である。*T. ovis*から部分精製した45Wタンパク質を用いた初期の免疫研究では、それが有望なワクチン抗原であることを表していた。大腸菌で発現させた45Wの組換え体をワクチンとして用いるその後の試用によれば、保護レベルが非常に高い(約95%)ことが報告された¹³。45W抗原はヒツジにおいてDNAワクチンとして用いられ、45Wの組換え体を用いて測定したところ、抗体レベルが低いことが観察された¹⁴。

材料および方法

CMVプロモーター、並びにCTLA4、ヒト免疫グロブリン(hIg)のFc部分及びCD5シグナルペプチドをコードする遺伝子を含むプラスミドは上述した。45Wをコードする遺伝子はMarshall Lightowers博士(メルボルン大学、獣医学部)より得た。

6-8週齢の同系Balb/cマウスはメルボルン大学、微生物学・免疫学アニマルハウス部(Dept. Microbiology and Immunology Animal House)から得た。

標準的DNA操作法とCsCl精製法を用いた。45Wをコードする遺伝子は二つのDNAワクチンにライゲートした。

構築物pCI::mCTLA4-hIg-45WはCTLA4シグナルペプチド、マウスCTLA4エクトドメイン、hIg及び45W抗原を含む融合タンパク質を発現した。構築物pCI::CD5L-hIg-45Wは、CD5由来のシグナルペプチド、hIg及び45W抗原を含む融合タンパク質を発現した。

DNA(100 µg)を0日目と28日目にマウスの大腿四頭筋に注射した。ワクチン後、適当

10

20

30

40

50

な間隔で血清を採取し、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウスIgGを用いたELISA滴定¹⁵で、組換え45W抗原に特異的な全抗体について分析した。

精製組換え45W(His)₆は、Rotheら¹⁴に従い、ポリヒスチジンタグ(' tag ')とニックルアフィニティークロマトグラフィーを用いて大腸菌から得た。

結果

DNAワクチンpCI::mCTLA4-hIg-45W又はpCI::CD5L-hIg-45W(図10)を用いて免疫した。0日目と28日目にDNA100ugを投与したマウスから一週間隔で採血した。hIg/45Wワクチンに融合したCTLA4を発現するDNAワクチンを接種したマウスは、類似のプラスミドワクチン構築物、即ちCTLA4遺伝子を含まないpCI::CD5L-hIg-45Wを接種したマウスよりも迅速な抗体応答を起こした。CTLA4を有するワクチンを接種したマウスは7、14及び28日目に高力価(即ち、10,000以上)の血清抗体を産生した。これに対して、CTLA4を欠いた構築物を接種したマウスは28日目の第2回の免疫後まで高力価(即ち、10,000以上)の抗体を産生しなかった。CTLA4を欠くDNAワクチンを接種したマウスは1匹/5匹しか免疫後7日目までに抗体を産生しなかったのに対し、CTLA4を含む同等のDNAワクチンを接種した全てのマウス(即ち、5匹/5匹)は免疫後7日目までに45W-特異的抗体を産生した。データは学生t検定を用いて分析した。

完全フロイントアジュバント中の精製組換え45W(His)₆タンパク質を20µg、またはCTLA4 DNAワクチン(即ち、pCI::mCTLA4-hIg-45)(図11)のいずれかをマウスに投与する第2回の試行に取りかかった。血清抗体応答を0、2、5、8、14及び28日目に調べた。45Wに特異的な血清抗体応答は、8日目には45Wタンパク質ワクチンを接種したマウスよりもDNAワクチンを接種したマウスの方が高かった。

考察

45W DNAワクチン接種に対するマウス血清抗体応答は、CTLA4のhIg-45W融合タンパク質への融合によって促進された。45Wに対する抗体応答はT.ovis病に対するヒツジの防御と相關する。CTLA4を添加すると、免疫後、より短い非防御期間を伴って、より迅速で高力価の応答へと導かれる。抗-45W応答の大きさに対するCTLA4の効果は、上記のヒトIgに対する効果ほど劇的ではなかった。これは、45W抗原の種々の分子の融合からの立体抑制または幾つかの固有の性質によるものであるかもしれない。さらに、本実施例で用いた免疫感作プロトコールは、2週間というよりむしろ4週間で追加接種を行う点で実施例1と異なっている。CTLA4ターゲティングを介した応答のより速い動力学のために、追加接種は最適ではなかったかもしれず、よってその大きさは達成されなかった。

実施例4

マウスにおけるPlasmodium chabaudi adamiに対する防御のためのCTLA4とAMA1との併用序論

AMA1¹⁶はマラリアに対する候補ワクチン抗原である。我々は、AMA1のドメイン3が個々に折り畳まれているという証拠を有しており、それでhIgとの融合タンパク質を産生する上で優れた候補であるかもしれない。しかしながら、AMA1はマウスマラリアに防御を与えることが示されているにもかかわらず¹⁷、ドメイン3が防御的であることを示す研究はこれまで見つかっていない。

材料および方法

CMVプロモーター及びCTLA4、ヒト免疫グロブリン(hIg)のFc部分、及びCD5シグナルペプチドをコードする遺伝子を含むプラスミドは上述した。Plasmodium chabaudi adami DS株¹⁶由来AMA-1のドメイン3をCTLA4Ig及びCD5LIgに融合した(pCI::mCTLA4-hIg-AMA及びpCI::CD5L-hIg-AMA)。プラスミドpCI::mCTLA4-hIgを陰性対照として用いた。

6-8週齢の同系雌性Balb/cマウスを使用した。

DNA(100ug)を0日目にのみマウスの大腿四頭筋に注射した。マウスをPlasmodium chabaudi adami DSでチャンレンジし、死亡数を記録した。

抗体力価は、大腸菌中で発現させたAMA1の再生全エクドメインを用いるELISAによって測定した¹⁷。力価はOD>0.1を与える最終血清希釈度の逆数の対数として表わした。

結果

1 回目の試験においては、1 グループ当り 8 匹のマウスとした。DNA ワクチン pCI::mCTLA4-hlg-AMA での一回の免疫感作で、100,000 の寄生生物の腹腔内チャレンジに対して部分的な防御を与えた (図 12)。チャレンジは免疫感作後 14 日目に行った。これは対照 pCI::mCTLA4-hlg 群に比べて顕著であった (log ランク検定; $p < 0.05$)。CTLA4 は pCI::CD5L-hlg-AMA 群よりも良好な防御を与えることが明白に示されたが、これは統計学的有意性までは到達しなかった。その抗体力価 (図 13) は CTLA4 標的化リガンドが AMA1 に対する抗体応答を増強することを示す ($p < 0.005$)。

2 回目の試験は、より大きなグループ (16 / グループ) を用い且つ 10,000 の寄生生物の静脈内チャレンジを用いて行われた。この 2 回目の試験では、防御は見られなかった。

考察

1 回目の試験では、CTLA4 は、抗原 AMA1 のドメイン 3 によってマラリアに対していくらかの防御を与えた。これは 2 回目の試験では見られなかった。我々には、何故この 2 回の試験の間に差異が存在したのかわからなかった。なぜなら比較のためのフルセットの抗体データがなかったからであり、我々には到達した抗体のレベルが、試験 2 において死亡したマウス中で十分であったかどうか、またはこの効果が異なるチャレンジ経路のためであったのかわからなかった。我々はまた、追加抗原投与が行われた場合、CTLA4lgAMA がどのくらい効果的で有り得るのかもわからない。

実施例 5

マウスのインフルエンザ感染における CTLA4 の使用

序論

防御効果を試験するための別のモデルとして、我々はマウス気道のインフルエンザ感染を使用した。インフルエンザ赤血球凝集素 (HA) 遺伝子を標的化分子の後ろにクローン化し、そして得られた DNA ワクチンを、より高い抗ウイルス抗体力価を生じ、そして標的化分子を発現しない対照ワクチンと比較して、生のウイルスチャレンジに対し、より高い防御を与える能力について試験した。

材料及び方法

ウイルス

この研究に使用した A 型インフルエンザウイルスは、PR8 = A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) であった。ウイルスを 35 で 2 日間、10 日目の胚発生させたニワトリの卵の尿膜腔中で増殖させた。この尿膜液を遠心分離 (2000g, 15 分間、4) によって、回収しそして清澄化した。感染ウイルスを含む尿膜液のアリコートをして -70 にて保存し、マウスの免疫感作及びチャレンジに使用した。ELISA アッセイに用いた精製 PR8 ウイルスは、CSL Ltd (Parkville, Victoria, Australia) から、区分的に精製されたストックとして得た。赤血球凝集アッセイ¹⁸を用いてウイルスを定量し、力価を 1 ml 当りの赤血球凝集単位 (HAU) として表わした。

免疫感作

10 匹の BALB/c マウスの群を、50 μ g のプラスミドを含む DNA ワクチン 0.1 ml を、0 日目に麻酔下で筋肉内 (i.m.) 注射することにより免疫感作した。免疫感作に使用した構築物は、pCI::CD5L-hlg-HA、pCI::mCTLA4-hlg-HA (これらは、シグナル及び膜貫通配列を欠く PR8 HA に基づいている)、及び陰性対照として pCI::CD5L-hlg-SIINFEKL (ニワトリオボアルブミン由来の 8 アミノ酸配列を発現するもの) であった。陽性対照として、一群の 10 匹 BALB/c マウスを感染性 PR8 ウイルスの 50 プラーク形成単位 (pfu) で鼻内 (i.n.) 感染させ、そして別のグループを -プロピオラクトン (BPL) で不活性化され且つタウロデオキシコール酸ナトリウムで破壊された 1 μ g の PR8 ウイルス (破片化ウイルス) で皮下に免疫感作した。血清サンプルを 7 日目、14 日目及び 54 日目に全てのマウスから採取し、次いでマウスを 65 日目にチャレンジした。

マウスの鼻内チャレンジ及びマウス肺抽出物の調製

ペンサレン (penthrene) で麻酔したマウスを 50 pfu の感染性 PR8 インフルエンザウイルスで鼻内チャレンジした。各マウスには、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 中に希釈した尿膜液の形態で 50 μ l のウイルスを接種した。チャレンジ 5 日後、マウスを頸部脱臼によっ

10

20

30

40

50

て殺し、肺を取り出し、100U/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシン及び30 μ g/mlのゲンタマイシンを補充した1.5mlのハンクス平衡塩類溶液 (HBSS) を含むボトル中に無菌的に移した。組織ホモゲナイザーを用いて肺ホモジネートを調製した。次いで、各肺懸濁液を300 \times gで5分間遠心分離し、上清を取り出し、小分けし、感染性ウイルスのアッセイを行う前に -70 $^{\circ}$ Cにて保存した。

酵素結合イムノソルベントアッセイ

酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA) を、1ウエル当り50HAUの精製PR8ウイルスを含む溶液でコーティングした96ウエルのポリビニルマイクロタイタートレイ (Dynatech, Australia) を用い、Jacksonら¹⁹によって先に記載されたようにして実施した。抗体力価は0.2単位の吸収を与える抗体希釈の逆数として表わした。

10

感染性ウイルスのプラークアッセイ

ウイルス力価を35mmペトリ皿 (Nunc, Roskilde, Denmark) 中のMadin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞の単層上のプラークアッセイによって測定した。培地は、2mMグルタミン、2mMピルビン酸ナトリウム、100単位/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシン、30 μ g/mlのゲンタマイシン及び10% (vol/vol) のウシ胎児血清 (56 $^{\circ}$ Cで30分間熱不活性化したもの) を補充したRPMI-1640であった。単層を抗生物質を含む無血清RPMI-1640で洗浄し、そして同培地中で肺ホモジネートの100 μ lの希釈液を用い2連で接種した。ウイルス吸着のために加湿インキュベーター (37 $^{\circ}$ C、5%CO₂) 中に45分間放置後、45 $^{\circ}$ Cのアガロース重層培地 3mlを加えた。インキュベーションをさらに3日間続け、そしてプラーク数を計測した。アガロース重層培地は、100U/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシン、0.01M HEPES緩衝液pH6.8 (Calbiochem, Australia)、0.1%トリプシン-TPCK (Worthington, Biological Systems Inc., U.S.A.) 及び0.9%アガロース (ICN Biomedicals Sydney, Australia) を補充したレイボピッツ L-15培地pH6.8 (Gibco Laboratories, U.S.A.) であった。

20

統計学的分析

データは、非パラメトリックなMann-Whitney U検定 (nonparametric Mann-Whitney U test) を用いて2組の不对サンプルを比較することにより分析した。帰無仮説 (null hypothesis) によれば、2つの集団の中央値 (median) は等しく、特定の比較によって得られるP値が与えられる。

結果と考察

30

マウスの血清抗体応答

DNA構築物、破片化PR8ウイルスのPBS溶液、または感染性PR8ウイルスで免疫感作したマウスから採取した血清の抗ウイルス抗体をELISAによってアッセイした。初回免疫後7日目に、感染性PR8ウイルスで免疫感作したマウスだけが、対照DNA構築物pCI::CD5L-hlg-SIINFEKLを投与したマウスで検出されたバックグラウンドの力価よりも有意に高い抗ウイルス抗体力価を示した (p=0.0002)。しかし、14日目には、ウイルスを感染させたマウスで検出された高い抗ウイルス抗体力価に加えて、pCI::mCTLA4-hlg-HA構築物で免疫感作したマウスの抗体力価が、対照DNA構築物pCI::CD5L-hlg-HA (p=0.0003) またはpCI::CD5L-hlg-SIINFEKL (p=0.0004) を投与したマウスよりも有意に高かった (図14)。さらに、pCI::mCTLA4-hlg-HA構築物で免疫感作したマウスでは、破片化ウイルスワクチンを投与したマウスと同レベルの抗ウイルス抗体が生じた (p=0.97)。初回免疫後54日目に採取した血清の抗ウイルス抗体力価も測定した (図15)。全体的にみて、54日目の力価は14日目に採取した血清において測定した力価と類似していた。さらに、pCI::mCTLA4-hlg-HA構築物を投与したマウスの54日目の血清における抗体レベルは、pCI::CD5L-hlg-HA (p=0.009) またはpCI::CD5L-hlg-SIINFEKL (p=0.0028) を投与したマウスよりも有意に高いレベルを維持し、破片化ウイルスと同レベルであった (p=0.85)。

40

PR8 HA構築物の防御免疫誘発能

ワクチン接種したマウスのインフルエンザ感染からの防御を、感染後5日間で肺からチャレンジ量 (challenge dose) のウイルスを除去するマウスの能力を測定することにより評価した。抗体と細胞障害性T細胞の両者が媒介する応答は、この5日間でウイルス力価の低

50

下を生じさせ得ることに留意すべきである。マウスを初回免疫後65日目にチャレンジし、肺におけるウイルス力価をブランク法によって測定した。図16は、感染性ウイルスで免疫感作した全てのマウスがチャレンジ量のウイルスを除去できたことを示す。DNA構築物を投与したマウスのうち、pCI::mCTLA4-hIlg-HA構築物で免疫感作したマウスの肺におけるウイルス力価は、pCI::CD5L-hIlg-HA (p=0.0004) またはpCI::CD5L-hIlg-SI INFEKL (p=0.0002) のいずれかで免疫感作したマウスよりも有意に低かった。また、pCI::mCTLA4-hIlg-HA構築物で免疫感作したマウスで観察された除去 (clearance) のレベルは、破片化ウイルスワクチンを投与したマウスで観察されたレベルとほとんど同等であった。

結論

pCI::CTLA4-hIlg-HAは、対照ベクターpCI::CD5L-hIlg-HAと比較して、より高レベルの抗体とチャレンジに対するより良好な防御を与えた。このことは、標的化分子との結合により増強した免疫効果を示す。

10

実施例 5

ヒツジのコリネバクテリウム・シュードツベルクローシス (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) におけるCTLA4の使用

緒言

コリネバクテリウム・シュードツベルクローシスは、ヒツジにおける乾酪性リンパ節炎 (CLA) の病原体である。これらの細菌による感染が成立すると、リンパ節、特に感染部位のドレーン性 (draining) リンパ節において膿瘍が形成される。ホスホリパーゼD (PLD) は、病原性因子及びCLAに対する防御性抗原として特徴づけられている。実際に、ホルマリンで処理したPLD²⁰または遺伝的にトキシイド化したPLD (PLD²²) がCLAからヒツジを防御することが示されている。

20

本発明者らは、遺伝的にトキシイド化したPLDを本発明のDNAワクチン接種アプローチの基礎として使用し、ウシ (b) CTLA4-hIlgまたはhIlgのみを PLD構築物へ付加することによりPLD及びhIlgに対する免疫応答が増強されるかを検討した。

材料及び方法

DNA構築物

bCTLA4の公知の配列 (GenBank登録番号X15070) を利用して、bCTLA4遺伝子をウシ末梢血単核細胞から単離した。bCTLA4のPCR産物 (729bp) を製造業者の説明書に従ってZeroBlunt TMクローニングベクター (Invitrogen) にクローニングし、Applied Biosystems automated sequencerを使用して配列決定した。bCTLA4の配列は、公表されている配列と同一であった。

30

DNA免疫感作のために、pCIベクターを用いて以下の構築物を作製した。

pCI::bCTLA4-hIlg- PLD

pCI:: PLD

pCI::bCTLA4-hIlg

pCI::CD5L-hIlg- PLD

CD5Lは、hIlg- PLDタンパク質の分泌を可能にするCD5のリーダー配列である。

実験動物及び免疫感作法

雑種の雌羊 (12週令) をチャレンジ実験に使用した。10匹の動物を任意に各グループに割り当てた。各動物について、PLD及びコリネバクテリウム・シュードツベルクローシス溶解物に対する抗体の存在を予めスクリーニングしておいた。陽性の動物はこの実験から排除した。動物に対して剪毛しワクチン接種すること及び断尾することは、コリネバクテリウム・シュードツベルクローシスの感染の危険性を最小化するために避けた。

40

動物に対して、LPS不含pCIプラスミドDNA (pCI::bCTLA4-hIlg- PLD、pCI:: PLD、pCI::bCTLA4-hIlgまたはpCI::CD5L-hIlg- PLDのいずれかをコードする) 500 µgを含有するPBS 5mlを筋肉内に注射した。対照動物は、Glanvacを投与するか、または免疫感作せずにおいた。4週間後、全ての動物に同一のワクチンを、同一の投与量で投与した。

チャレンジ

野生型のコリネバクテリウム・シュードツベルクローシスの培養物を、0.1% Tween80 (BH

50

1) 含有ブレインハートインヒュージョンブロス (Brain heart in fusion broth) (Difco Laboratories) 中、37 °C で増殖させた。

初回免疫感作の 6 週間後に、 10^6 CFU の *Corynebacterium pseudotuberculosis* の 1ml 用量を左後側爪の蹄冠の直上に注射することにより、全てのヒツジをチャレンジした。

免疫学的アッセイ

血清を上記のヒツジから一週間毎に採取し、遺伝的に無毒化した PLD (PLD) および hIlg に対する抗体の存在について ELISA を用いてアッセイした。1/50 の PLD 発現 *Corynebacterium pseudotuberculosis* からの培養物上清または 5 g/ml の hIlg タンパク質でプレートをコーティングした。抗 PLD および抗 hIlg 抗体の検出のために、血清をそれぞれ 1/100 および 1/10 からスタートして 2 倍ステップで希釈した。グラフの直線部分の二重対数スケールで 10

の線形回帰法により抗体価を算出した。抗体価は希釈率として定義し、ELISA では 0.D.0.3 であった。
T 細胞増殖アッセイは、抗原として 2 種の濃度の PLD (1/50 および 1/250) または hIlg (5 g/ml および 25 g/ml) を用いて、三重で (つまり、それぞれにつき 3 回) 行った。PBMC は、フィコール勾配により精製し、in vitro で 3 日間培養した。培養物を 3 H-メチル-チミンで 18 時間にわたってパルスした後、ガラス繊維フィルターで収集し、放射能取込みの評価を行った。結果は刺激指数 (すなわち、抗原を用いた場合に得られるカウント数と抗原を用いなかった場合に得られるカウント数との比率) として表わす。

統計学的分析を Systat プログラムを用いて行った。非パラメトリックな Mann-Whitney U 検定を用いて、有意性を算出した。0.05 未満の p 値は有意であると考えた。 20

結果

抗 hIlg 抗体レベル

ヒト免疫グロブリン (hIlg) に対する抗体価は、bCTLA4-hIlg- PLD、CD5L-hIlg- PLD および bCTLA4-hIlg の場合、融合タンパク質の hIlg 部分に対する DNA ワクチン接種への免疫応答を反映するものである。pCI::bCTLA4-hIlg- PLD を注射した動物由来の hIlg に対する応答を pCI::CD5L-hIlg- PLD を注射した動物由来の hIlg に対する応答と比較することにより、hIlg の免疫原性を対象とした bCTLA4 の効果を具体的に評価することが可能になる。図 17 に示す結果から、pCI::bCTLA4-hIlg- PLD を注射した動物における hIlg に対する抗体応答 (黒四角) が、pCI::CD5L-hIlg- PLD で免疫感作した動物において誘発される抗 hIlg 応答 (黒丸) よりも早く、しかも強いことが示される。Mann-Whitney U 検定から、第 3 週および第 4 週 30

抗 PLD 抗体レベル

無毒化 PLD タンパク質抗原 (Glan-Vac) で免疫感作したところ、免疫感作後の最初の 7 週間の間には、検出可能な抗体はほとんど、または全く生じなかった。チャレンジの 2 週間後、抗体レベルは飛躍的に増大した。このことは、先に報告されている結果²¹と一致する。

PLD 抗原をコードする pCI を単独で、または bCTLA4-hIlg もしくは CD5L-hIlg との融合タンパク質として用いて免疫感作した群は全て、同様の抗体産生の動態を示した。実際、チャレンジ後 2 週間 (つまり第 8 週目) までは有意な抗 PLD 抗体レベルは全く検出されなかった。各時点で、異なる pCI 構築物により誘導される抗体のレベルの間には有意な差異はなく、このことは、全ての構築物が PLD に対して同様の免疫記憶誘発能を有することを示している。しかし、この結果は、2 用量のタンパク質抗原 (Glan-Vac 群) が実質的な抗体レベルを誘発できなかったという点において無毒化 PLD が古典的な抗原ではないという事実 40

に鑑みれば、驚くことではない。この結果は、他の研究者によっても報告されている²²。したがって、無毒化 PLD により、高い抗体価の誘発を伴わずに免疫記憶の誘発が起こると思われる。その後、この免疫記憶は、*Corynebacterium pseudotuberculosis* により発現される PLD によるチャレンジの初期段階に活性化される。興味深いことに、真核細胞 (COS m6 細胞) において発現される PLD が、*Corynebacterium pseudotuberculosis* において発 50

現される PLDと比較してわずかに大きなサイズを有することに注目されたい(図18)。この差は、真核細胞内では PLDのグリコシル化が起こり得ることによって説明できる。抗hIlg抗体レベルの場合、ヒツジは、マウスとは違って、DNAワクチン接種の後では長期間にわたって抗体を産生しないことに注目されたい。

PLDおよびhIlgに対するT細胞の応答

PLDおよびhIlgに対するT細胞の応答を3週目、6週間目および9週間目に分析した。末梢血単核細胞(PBMC)においては、いずれの時点においても、これら2種の抗原に対する有意な抗原特異的増殖は実証できなかった。これはおそらく、技術的困難性によるものと思われる。何故ならば、抗 PLD応答の動態は、ワクチン接種した動物において記憶T細胞の存在の可能性を示しているからである。

10

ビルレントC.pseudotuberculosisでチャレンジした後の抗 PLD応答

チャレンジは、免疫感作の6週間後(すなわち、追加免疫の2週間後)に行った。第10週目に接種部位を観察しても、免疫感作法との相関関係はわからなかった。ワクチン接種しなかった対照およびpCI::bCTLA4-hIlgで免疫感作した動物の場合、PLDに対する抗体応答はチャレンジの2週間後(第8週目)に増大した。このことは、DNAで免疫感作することにより誘発される免疫記憶が、Corynebacterium pseudotuberculosisにより産生されるPLDによって高まり得ることを示している。このことは、DNAワクチン接種により産生されるPLDは最もグリコシル化を受けやすいと思われるが、依然として細菌性野生型PLDとの交差反応があることを示している。

非免疫感作対照動物では、抗 PLD抗体のレベルはチャレンジ後3~4週間(第9週目)までは低いままである。抗体出現のこの動態は先に文献記載されている²²。興味深いことに、DNAワクチン接種により PLDで、またはGlan-Vac注射により無毒化PLDで刺激(prime)した動物における抗体レベルは第8週以後は減少し、このことは、PLD抗原がもはや免疫応答を高めていないことを示している。これは、Corynebacterium pseudotuberculosisを浄化(cleaning)している動物による低下したPLD分泌レベルに起因している可能性がある。

20

毒性コリネバクテリウム・シュードツベルクローシス(Corynebacterium pseudotuberculosis)によるチャレンジからの防御

ワクチン接種後12週(チャレンジ後6週)で全ての動物の剖検を行って免疫感作プロトコールの防御効力を評価した。左と右の膝窩、鼠蹊部および大腿前リンパ節を切開し、コリネバクテリウム・シュードツベルクローシスにより生じた特徴的な膿瘍を肉眼で評価した。肺を触診して膿瘍を調べたところ、肺の膿瘍はいずれの動物にも存在しなかった。防御は、いずれのリンパ節にも特徴的なコリネバクテリウム・シュードツベルクローシス膿瘍が存在しないことと定義される。2匹のヒツジでは、ドレーン性(drainage)膝窩リンパ節に小さな乾いた病巣が認められ、これは他の動物における膿瘍と明らかに区別される。これらの病巣は、有効な免疫応答に直面して退行していたコリネバクテリウム・シュードツベルクローシスの巣である可能性が最も高かった。これらの動物も「防御された」と評価された。図19から、非ワクチン接種動物の約10%は病巣を発生しなかったが、90%はGlan-Vacを接種することにより防御されたことがわかる。pCI::CTLA4-hIlgを注射した10匹の動物のうち1匹だけが、リンパ節に膿瘍を有さなかった。PLD(pCI::bCTLA4-hIlg- PLD, pCI:: PLDおよびpCI::CD5L-hIlg- PLD)をコードするDNAを接種した全ての動物はいくらか防御された。防御レベルは40~70%の範囲であり、最大防御レベルはpCI::CTLA4-hIlg- PLDを注射したグループに観察された。

30

40

結論

この研究では、ヒツジのDNA免疫感作において抗原に対する免疫応答を高めるbCTLA4の能力が試験された。bCTLA4はhIlgに対する免疫応答を促進しかつ増加する能力がある。コリネバクテリウム・シュードツベルクローシスによるチャレンジは、DNAワクチン接種が防御免疫応答を引き出し得ることを示した。pCI::bCTLA4-hIlg- PLDおよびpCI::CD5L-hIlg- PLDの場合に得られた防御と比べると、実質的な差異が認められた。

CD5L-hIlg- PLDにより誘導された防御は、それ自体上の PLDにより誘導された防御より

50

低いものである。この差異は、PLD分子がbCD5L-hlg- PLDよりもかなり小さく、それゆえに許容可能なコンホメーションで容易に発現され得るという事実によるのかもしれない。したがって、さらに大きなbCTLA4-hlg- PLD分子はより一層発現されにくいことが予想されよう。それゆえ、bCTLA4-hlg- PLD分子がより高いレベルの防御を引き出したという事実は、CTLA4分子が融合タンパク質の免疫原性を効率的に高めることを示している。前記分子の発現レベルおよびフォールディング (folding) を向上させることにより、一層良好な防御が得られることが、理にかなって期待される。これを達成するための一方法は、融合タンパク質のhlg部分のサイズを縮小することであろう。

実施例 7

リュウシュマニア・メジャー (Leishmania major) の寄生表面抗原 2 (Parasite Surface Antigen 2:PSA2) をコードするDNAによるC3H/Heマウスのワクチン接種
10
序

この真正細胞内寄生虫による感染からの防御は、マクロファージ活性化Th1型のCD4+ T細胞により提供される。我々は、全長PSA2をコードするプラスミドDNAの注射がC3H/Heマウスにおいてチャレンジ感染に対する顕著な防御を引き出したことを示した。この防御は、非常に低いが一応したTh1型の免疫応答の誘導、すなわちインターフェロン を分泌するがIL-4は分泌しないT細胞の誘導と関連していた。ここでは、我々はCTLA4-Igの防御レベル改善能について調べることを目的としている。

材料および方法

残基33-357をコードするPSA2 (リーダーおよびgpiシグナルを欠失) をpCI::CD5L-hlgまたはpCI::mCTLA4-hlgのいずれかのC末端側に融合させた。分泌型のPSA2 (残基1-357) をコードするDNAも作製した (pCI::PSA2)。
20

1群8匹のマウスに、リン酸緩衝化食塩水 (PBS) 100 μ l中のDNA 100 μ gを2週間おきに2回筋肉内注射した。各注射の2週間後、マウスから採血し、血清をPSA2に対する抗体について試験した。2回目の注射の2週間後、マウスに100,000個のプロマスチゴートを皮内注射した。感染部位での病巣の発生を毎週モニタリングして、大きさにより評価した。病巣をドレーンするリンパ節中の寄生虫量は、チャレンジ感染の7週間後に限界希釈法により測定した。

結果

抗体生産

抗体は、1点のELISA ODのみによって測定した。最初の免疫感作の2週間後に、pCI::mCTLA4-hlg-PSA2で免疫感作したマウス8匹のうちの4匹が、そしてpCI::CD5L-hlg-PSA2を与えたマウス8匹のうちの3匹が、1:500希釈において有意な量の抗体を生産した。しかし、2回目のDNA注入の後に、pCI::mCTLA4-hlg-PSA2、pCI::CD5L-hlg-PSA2及び我々独自の分泌型のPSA-2で免疫感作したマウスは、同じ希釈において有意なレベルの抗体を示した。PBS対照はバックグラウンドの抗体を有していた。
30

感染に対する防御

pCI::CD5L-hlg-PSA2をコードするDNA、並びに対照PBS及びベクターDNAで免疫感作したマウスでは、チャレンジの1週間後に、感染部位において病巣が発生した。pCI::mCTLA4-hlg-PSA2又はpCI::PSA2で免疫感作したマウスでは、感染の3週間後まで病巣が発生せず、病巣のサイズは他と比べて小さかった。また、pCI::mCTLA4-hlg-PSA2又はpCI::PSA2で免疫感作したマウスでは、病巣の発生するマウスの数が最も少なく、疾患曲線のピークにおいて何らかの病巣が見られたマウスは8匹のうちの5匹だけだった (図20)。特筆すべきは、pCI::mCTLA4-hlg-PSA2がpCI::CD5L-hlg-PSA2よりも良好な防御を与えたということである ($p=0.0001$; logランク検定)。
40

まとめ

DNA免疫感作において応答性が低いか又は無いという問題を抗原ターゲティングによって克服することにより、遺伝子ワクチンの潜在能力が増強される。本発明者らもまた、DNAの筋肉内注射を用いて、同じ抗原に対する免疫応答を偏移させることもでき、これにより、防御を最も与えやすい応答を得ることのできるワクチンの開発が可能となることを
50

示す。

発現プラスミドの筋肉内注射は、遺伝子ワクチンに対する大いなる可能性を示している。本発明者らは、抗原及び細胞表面受容体リガンドからなる融合タンパク質が抗原を免疫誘発部位に送達でき、これにより、免疫応答が増強され、そして遺伝子ワクチンの有効性も増強され得ることを示した。上述のように、マウスを、ヒトIgG1のFcフラグメントをコードするプラスミドを抗原として、免疫感作した。このIgフラグメントは、B-7を発現する抗原提示細胞（APC）への送達のためにCTLA4と融合させたもの（CTLA4Ig）、又はリンパ節の高内皮性細静脈細胞への送達のためにL-セレクチンと融合させたもの（L-SEL1g）である。L-セレクチンはCD34及びMadCAM-1に結合するため、これらの受容体を有するあらゆるリンパ系器官をその標的とすることができる（12）。抗体応答の増強が、CTLA4Ig免疫感作マウス及びL-SEL1g免疫感作マウスの双方において示され、4週間でそれぞれ1000倍及び100倍であった。さらに、CTLA4Ig免疫感作後の応答が最も迅速だった。IgG2aからIgG1への免疫偏移がCTLA4Ig免疫感作マウスにおいて生じた主要な応答であり、これにより、防御を最も与えやすい応答を得ることのできるワクチンの開発が可能となる。

特定の実施形態において示した本発明に対し、広範に記載された本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、様々な変更及び/又は改変をなし得ることが当業者には理解されるであろう。従って、ここに示す実施形態は、いかなる場合にも説明のためのものとして考慮されるべきであり、制限的に考慮してはならない。

参考文献

1. Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, S. E. Parker, G. H. Rhodes, P. L. Felgner, V. J. Dwarki, S. H. Gromkowski, R. R. Deck, C. M. De Witt, A. Friedman, L. A. Hawe, K. R. Laender, D. Martinez, H. C. Perry, J. W. Shiver, D. L. Montgomery, and M. A. Liu. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259:1745.
2. Wolff, J. A., P. Williams, G. Acsadi, S. Jiao, A. Jani, and W. Chong. 1991. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle *in vivo*. *Biotechniques* 11:474. 10
3. Hohlfeld, R., and A. G. Engel. 1994. The immunobiology of muscle. *Immunol. Today* 15:269.
4. Pardoll, D. M., and A. M. Beckerleg. 1995. Exposing the immunology of naked DNA vaccines. *Immunity* 3:165.
5. Raz, E., D. A. Carson, S. E. Parker, T. B. Parr, A. M. Abai, G. Aichinger, S. H. Gromkowski, M. Singh, D. Lew, M. A. Yankauckas, S. M. Baird and G. H. Rhodes. 1994. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:9519. 20
6. Condon, C., S. C. Watkins, C. M. Celluzzi, K. Thompson and L. D. Falo, Jr. 1996. DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. *Nature Med.* 2: 1122.
7. In *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. 1989. J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, eds. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p1.38.
8. Aida, Y., and M. J. Pabst. 1990. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J. Immunol. Methods.* 132:191. 30
9. Major M. E., L. Vitvitski, M. A. Mink, M. Schleef, R. G. Whalen, C. Treppe and G. Inchauspe. 1995. DNA-based immunization with chimeric vectors for the induction of immune responses against the hepatitis C virus nucleocapsid. *J. Virol* 69:5798.
10. Manickan, E., R. J. Rouse, Z. Yu, W. S. Wire, and B. T. Rouse. 1995. Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 155:259. 40

11. Linsley P. S., P. M. Wallace, J. Johnson, M. G. Gibson, J. L. Greene, J. A. Ledbetter, C. Singh and M. A. Tepper. 1992. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 257:792.
12. Varki A. 1994. Selectin Ligands. *PNAS* 91:7390.
13. Rickard MD (1991). Cestode vaccines. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 22 Suppl:287-290.
14. Rothel JS, Waterkeyn JG, Strugnell RA, Wood PR, Seow HF, Vadolas J, Lightowlers MW. (1997) Nucleic acid vaccination of sheep: Use in combination with a conventional adjuvanted vaccine against *Taenia ovis*. *Immunol Cell Biol* 75:41-46. 10
15. Rothel JS, Lightowlers MW, Seow HF, Wood PR, Rothel LJ, Heath DD, Harrison GB. (1996) Immune responses associated with protection in sheep vaccinated with a recombinant antigen from *Taenia ovis*. *Parasite Immunol* 18:201-208.
16. Hodder AN, Crewther PE, Matthew ML, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Anders RF (1996) The disulfide bond structure of Plasmodium apical membrane antigen-1. *J Biol Chem* 271:29446-52. 20
17. Crewther PE, Matthew ML, Flegg RH, Anders RF (1996) Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of Plasmodium chabaudi involve recognition of strain-specific epitopes. *Infection & Immunity*. 64:3310-7
18. Fazekas de St. Groth, Webster RG (1966) Disquisitions of Original Antigenic Sin. I. Evidence in man. *J Exp Med* 124:331-45
19. Jackson DC, Tang XL, Brown LE, Murray JM, White DO, Tregear GW (1986) Antigenic determinants of influenza virus hemagglutinin. XII. the epitopes of a synthetic peptide representing the C-terminus of HA1. *Virology* 155:625-32 30
20. Burrell DH (1983) Caseous lymphadenitis vaccine *NSW Vet. Proc.* 19, 53-57
21. Hodgson AL, Krywult J, Corner LA, Rothel JS, Radford AJ (1992) Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect Immun* 60, 2900-2905 40
22. Hodgson AL, Tachedjian M, Corner LA, Radford AJ (1994) Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect Immun* 62, 5275-5280

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 11265塩基対

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー：環状

配列の種類：DNA（ゲノム）

ハイポセティカル：No

アンチセンス：No

配列

TCTAGAGTCG ACCAATTCTC ATGTTTGACA GCTTATCATC GCAGATCCTG AGCTTGTATG	60	
GTGCACTCTC AGTACAATCT GCTCTGCTGC CGCATAGTTA AGCCAGTATC TGCTCCCTGC	120	
TTGTGTGTTG GAGGTCGCTG ACTAGTGCGC GAGCAAAATT TAAGCTACAA CAAGGCAAGG	180	
CTTGACCGAC AATTGCATGA AGAATCTGCT TAGGGTTAGG CGTTTTGCGC TGCTTCGCGA	240	10
TGTACGGGCC AGATATACGC GTATCTGAGG GGACTAGGGT GTGTTTAGGC GCCCAGCGGG	300	
GCTTCGGTTG TACGCGGTTA GGAGTCCCCT CAGGATATAG TAGTTTCGCT TTTGCATAGG	360	
GAGGGGGAAA TGTAGTCTTA TGCAATACAC TTGTAGTCTT GCAACATGGT AACGATGAGT	420	
TAGCAACATG CCTTACAAGG AGAGAAAAAG CACCGTGAT GCGGATTGGT GGAAGTAAGG	480	
TGGTACGATC GTGCCTTATT AGGAAGGCAA CAGACAGGTC TGACATGGAT TGGACGAACC	540	
ACTGAATTCC GCATTGCAGA GATAATTGTA TTTAAGTGCC TAGCTCGATA CAATAAACGC	600	
CATTTGACCA TTCACCACAT TGGTGTGCAC CTCCAAGCTG GGTACCAGCT GCTAGCAAGC	660	20
TTGCTAGCGG CCGCTCGAGC TCAGCACATT TGCCCCCAG CCATGGCTTG TCTTGGACTC	720	
CGGAGGTACA AAGCTCAACT GCAGCTGCCT TCTAGGACTT GGCCTTTTGT AGCCCTGCTC	780	
ACTCTTCTTT TCATCCCAGT CTTCTCTGAA GCCATACAGG TGACCCAACC TTCAGTGGTG	840	
TTGGCTAGCA GCCATGGTGT CGCCAGCTTT CCATGTGAAT ATTCACCATC ACACAACACT	900	
GATGAGGTCC GGGTGAAGT GCTGCGGCAG ACAAATGACC AAATGACTGA GGTCTGTGCC	960	
ACGACATTCA CAGAGAAGAA TACAGTGGGC TTCCTAGATT ACCCCTTCTG CAGTGGTACC	1020	
TTTAATGAAA GCAGAGTGAA CCTCACCATC CAAGGACTGA GAGCTGTTGA CACGGGACTG	1080	
TACCTCTGCA AAGTGGAACT CATGTACCCA CCGCCATACT TTGTGGGCAT GGGCAACGGG	1140	30
ACGCAGATTT ATGTCATGA TCCAGAACCA TGCCCGGATT CTGGTAAGTA TAAGCTTCAG	1200	
CGCTCCTGCC TGGACGCATC CCGGCTATGC AGCCCCAGTC CAGGGCAGCA AGGCAGGCCC	1260	
CGTCTGCCTC TTCACCCGGA GCCTCTGCCC GCCCACTCA TGCTCAGGGA GAGGGTCTTC	1320	
TGGCTTTTTT CCAGGCTCTG GGCAGGCACA GGCTAGGTGC CCCTAACCCA GGCCCTGCAC	1380	
ACAAAGGGGC AAGTGTCTGG CTCAGACCTG CCAAGAGCCA TATCCGGGAG GACCCTGCCC	1440	

CTGACCTAAG CCCACCCCAA AGGCCAAACT CTCCACTCCC TCAGCTCGGA CACCTTCTCT 1500
 CCTCCCAGAT TCCAGTAACT CCCAATCTTC TCTCTGCAGA GCCCAAATCT TGTGACAAAA 1560
 CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGGTAAGC CAGCCCAGGC CTCGCCCTCC AGCTCAAGGC 1620
 GGGACAGGTG CCCTAGAGTA GCCTGCATCC AGGGACAGGC CCCAGCCGGG TGCTGACACG 1680
 TCCACCTCCA TCTCTTCTC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG GACCGTCAGT CTTCTCTTC 1740
 CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG 1800
 GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG 1860
 GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGGGTGGTC 1920
 AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC 1980
 TCCAACAAAG CCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGTGGGACC 2040
 CGTGGGGTGC GAGGGCCACA TGGACAGAGG CCGGCTCGGC CCACCCTCTG CCCTGAGAGT 2100
 GACCGCTGTA CCAACCTCTG TCCTACAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG 2160
 CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC 2220
 TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACCTAC 2280
 AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC 2340
 GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT 2400
 CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAATG AGTCCGACGG 2460
 CCGGATCCAG ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGGAC AAACCACAAC TAGAATGCAG 2520
 TGAAAAAAT GCTTTATTG TGAAATTTGT GATGCTATTG CTTTATTTGT AACCATTATA 2580
 AGCTGCAATA AACAAGTTAA CAACAACAAT TGCATTCATT TTATGTTTCA GGTTCAAGGG 2640
 GAGGTGGGGA GGTTTTTTAA AGCAAGTAAA ACCTCTACAA ATGTGGTATG GCTGATTATG 2700
 ATCCGGCTGC CTCGCGCGTT TCGGTGATGA CGGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC 2760
 GGAGACGGTC ACAGCTTGTG TGTAAGCGGA TGCCGGGAGC AGACAAGCCC GTCAGGGCGC 2820
 GTCAGCGGGT GTTGGCGGGT GTCGGGGCGC AGCCATGACC GGTCGACCAC TGGGCGCCAG 2880
 AAATCCGCGC GGTGGTTTTT GGGGGTCGGG GGTGTTTGGC AGCCACAGAC GCCCGGTGTT 2940
 CGTGTGCGCG CAGTACATGC GGTCCATGCC CAGGCCATCC AAAAACCATG GGTCTGTCTG 3000
 CTCAGTCCAG TCGTGGACCA GACCCACGC AACGCCAAA ATAATAACCC CCACGAACCA 3060
 TAAACCATTC CCCATGGGGG ACCCCGTCCC TAACCCACGG GGCCAGTGGC TATGGCAGGG 3120
 CCTGCCGCCC CGACGTTGGC TGCGAGCCCT GGGCCTTCAC CCGAACTTGG GGGGTGGGGT 3180
 GGGGAAAAGG AAGAAACGCG GCGGTATTGG CCCCAATGGG GTCTCGGTGG GGTATCGACA 3240
 GAGTGCCAGC CCTGGGACCG AACCCGCGT TTATGAACAA ACGACCCAAC ACCCGTGCCT 3300
 TTTATTCTGT CTTTTATTG CCGTCATAGC GCGGGTTCCT TCCGGTATTG TCTCCTCCG 3360
 TGTTTCAGTT AGCCTCCCC ATCTCCCCTA TTCCTTTGCC CTCGGACGAG TGCTGGGGCG 3420
 TCGGTTTCCA CTATCGGCGA GTACTTCTAC ACAGCCATCG GTCCAGACGG CCGCGCTTCT 3480

10

20

30

40

GCGGGCGATT TGTGTACGCC CGACAGTCCC GGCTCCGGAT CGGACGATTG CGTCGCATCG 3540
 ACCCTGCGCC CAAGCTGCAT CATCGAAATT GCCGTCAACC AAGCTCTGAT AGAGTTGGTC 3600
 AAGACCAATG CGGAGCATAT ACGCCCGGAG CCGCGGGCGAT CCTGCAAGCT CCGGATGCCT 3660
 CCGCTCGAAG TAGCGCGTCT GCTGCTCCAT ACAAGCCAAC CACGGCCTCC AGAAGAAGAT 3720
 GTTGGCGACC TCGTATTGGG AATCCCCGAA CATCGCCTCG CTCCAGTCAA TGACCGCTGT 3780
 TATGCGGCCA TTGTCCGTCA GGACATTGTT GGAGCCGAAA TCCGCGTGCA CGAGGTGCCG 3840
 GACTTCGGGG CAGTCTCGG CCCAAAGCAT CAGCTCATCG AGAGCCTGCG CGACGGACGC 3900
 ACTGACGGTG TCGTCCATCA CAGTTGCCA GTGATACACA TGGGGATCAG CAATCGCGCA 3960
 TATGAAATCA CGCCATGTAG TGTATTGACC GATTCCTTGC GGTCCGAATG GGCCGAACCC 4020
 GCTCGTCTGG CTAAGATCGG CCGCAGCGAT CGCATCCATG GCCTCCGCGA CCGGCTGCAG 4080
 AACAGCGGGC AGTTCGGTTT CAGGCAGGTC TTGCAACGTG ACACCCTGTG CACGGCGGGA 4140
 GATGCAATAG GTCAGGCTCT CGCTGAATTC CCCAATGTCA AGCACTTCCG GAATCGGGAG 4200
 CGCGGCCGAT GCAAAGTGCC GATAAACATA ACGATCTTTC TAGAAACCAT CGGCGCAGCT 4260
 ATTTACCCGC AGGACATATC CACGCCCTCC TACATCGAAG CTGAAAGCAC GAGATTCTTC 4320
 GCCCTCCGAG AGCTGCATCA GGTCGGAGAC GCTGTGCAAC TTTTCGATCA GAAACTTCTC 4380
 GACAGACGTC GCGGTGAGTT CAGGCTTTTT CATATCTCAT TGCCCGGGAT CTGCGGCACG 4440
 CTGTTGACGC TGTTAAGCGG GTCGCTGCAG GGTGCTCGG TGTTTCGAGGC CACACGCGTC 4500
 ACCTTAATAT GCGAAGTGGA CCTGGGACCG CGCCGCCCCG ACTGCATCTG CGTGTTCGAA 4560
 TTCGCCAATG ACAAGACGCT GGGCGGGGTT TGTGTCAATCA TAGAACTAAA GACATGCAAA 4620
 TATATTCTT CCGGGGACAC CGCCAGCAA CGCGAGCAAC GGGCCACGGG GATGAAGCAG 4680
 GGCATGGCGG CCGACGCGCT GGGCTACGTC TTGCTGGCGT TCGCGACGCG AGGCTGGATG 4740
 GCCTTCCCCA TTATGATTCT TCTCGCTTCC GCGGGCATCG GGATGCCCGC GTTGCAGGCC 4800
 ATGCTGTCCA GGCAGGTAGA TGACGACCAT CAGGGACAGC TTCAAGGATC GCTCGCGGCT 4860
 CTTACCAGCC TAACTTCGAT CACTGGACCG CTGATCGTCA CGGCGATTTA TGCCGCTCG 4920
 GCGAGCACAT GGAACGGGTT GGCATGGATT GTAGGCGCCG CCCTATACCT TGTCTGCCTC 4980
 CCCGCGTTGC GTCGCGGTGC ATGGAGCCGG GCCACCTCGA CCTGAATGGA AGCCGGCGGC 5040
 ACCTCGCTAA CGGATTCACC ACTCCAAGAA TTGGAGCCAA TCAATTCTTG CGGAGAACTG 5100
 TGAATGCGCA AACCAACCCT TGGCAGAACA TATCCATCGC GTCCGCCATC TCCAGCAGCC 5160
 GCACGCGGGC CAGCAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA 5220
 TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA 5280
 CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC 5340
 TGTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC 5400
 GCTTTCTCAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT 5460
 GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACATCG 5520

10

20

30

40

TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAAACAG 5580
 GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA 5640
 CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG 5700
 AAAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTTT 5760
 TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT 5820
 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AACTCACGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG 5880
 ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA AAATGAAGTT TTAATCAAT 5940
 CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC 6000
 TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGAATCCCCG TCGTGTAGAT 6060
 AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC 6120
 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG 6180
 AAGTGGTCTT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGAAGCTAG 6240
 AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT 6300
 GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTCCCAAC GATCAAGGCG 6360
 AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT 6420
 TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC 6480
 TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC 6540
 ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GCGGACCGAG TTGCTCTTGC CCGCGCTCAA CACGGGATAA 6600
 TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTCCGGGGC 6660
 AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC 6720
 CAACTGATCT TCAGCATCTT TTRACTTTCAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG 6780
 GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT 6840
 CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT 6900
 TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTCCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC 6960
 ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GCGGTATCAC 7020
 GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTCTCATG TTTGACAGCT TATCATCGAT AAGCTGATCC 7080
 TCACAGGCCG CACCCAGCTT TTCTTCCGTT GCCCCAGTAG CATCTCTGTC TGGTGACCTT 7140
 GAAGAGGAAG AGGAGGGGTC CCGAGAATCC CCATCCCTAC CGTCCAGCAA AAAGGGGGAC 7200
 GAGGAATTTG AGGCCTGGCT TGAGGCTCAG GACGCAAATC TTGAGGATGT TCAGCGGGAG 7260
 TTTTCCGGGC TGCGAGTAAT TGGTGATGAG GACGAGGATG GTTCGGAGGA TGGGGAATTT 7320
 TCAGACCTGG ATCTGTCTGA CAGCGACCAT GAAGGGGATG AGGGTGGGGG GGCTGTTGGA 7380
 GGGGGCAGGA GTCTGCACTC CCTGTATTCA CTGAGCGTCG TCTAATAAAG ATGTCTATTG 7440
 ATCTCTTTTA GTGTGAATCA TGTCTGACGA GGGGCCAGGT ACAGGACCTG GAAATGGCCT 7500
 AGGAGAGAAG GGAGACACAT CTGGACCAGA AGGCTCCGGC GGCAGTGGAC CTCAAAGAAG 7560

10

20

30

40

AGGGGGTGAT AACCATGGAC GAGGACGGGG AAGAGGACGA GGACGAGGAG GCGGAAGACC 7620
 AGGAGCCCCG GCGGGCTCAG GATCAGGGCC AAGACATAGA GATGGTGTCC GGAGACCCCA 7680
 AAAACGTCCA AGTTGCATTG GCTGCAAAGG GACCCACGGT GGAACAGGAG CAGGAGCAGG 7740
 AGCGGGAGGG GCAGGAGCAG GAGGGGCAGG AGGGAGGCCG GGGTCGAGGA GGTAGTGGAG 7800
 GCCGGGGTCG AGGAGGTAGT GGAGGCCGCC GGGGTAGAGG ACGTGAAAGA GCCAGGGGGG 7860
 GAAGTCGTGA AAGAGCCAGG GGGAGAGGTC GTGGACGTGG AGAAAAGAGG CCCAGGAGTC 7920
 CCAGTAGTCA GTCATCATCA TCCGGGTCTC CACCGCGCAG GCCCCCTCCA GGTAGAAGGC 7980
 CTTTTTCCA CCCTGTAGGG GAAGCCGATT ATTTTGAATA CCACCAAGAA GGTGGCCCG 8040
 ATGGTGAGCC TGACGTGCCC CCGGGAGCGA TAGAGCAGGG CCCCAGCAGAT GACCCAGGAG 8100
 AAGCCCCAAG CACTGGACCC CGGGGTCAGG GTGATGGAGG CAGGCGCAA AAAGGAGGGT 8160
 GGTGGGAAA GCATCGTGGT CAAGGAGGTT CCAACCCGAA ATTTGAGAAC ATTGCAGAAG 8220
 GTTTAAGAGC TCTCCTGGCT AGGAGTCACG TAGAAAGGAC TACCGACGAA GGAACCTGGG 8280
 TCGCCGGTGT GTTCGTATAT GGAGGTAGTA AGACCTCCCT TTACAACCTA AGGCGAGGAA 8340
 CTGCCCTTGC TATCCACAA TGTCGTCTTA CACCATTGAG TCGTCTCCCC TTTGGAATGG 8400
 CCCCTGGACC CGGCCACAA CCTGGCCCCG TAAGGGAGTC CATTGTCTGT TATTTTCATGG 8460
 TCTTTTTACA AACTCATATA TTTGCTGAGG TTTTGAAGGA TCGGATTAAG GACCTTGTTA 8520
 TGACAAAGCC CGCTCCTACC TGCAATATCA GGGTACTGT GTGCAGCTTT GACGATGGAG 8580
 TAGATTTGCC TCCCTGGTTT CCACCTATGG TGAAGGGGC TGCCGCGGAG GGTGATGACC 8640
 GAGATGACGG AGATGAAGGA GGTGATGGAG ATGAGGGTGA GGAAGGGCAG GAGTGATGTA 8700
 ACTTGTTAGG AGACGCCCTC AATCGTATTA AAAGCCGTGT ATTCCCCCGC ACTAAAGAAT 8760
 AAATCCCCAG TAGACATCAT GCGTGCTGTT GGTGTATTTT TGGCCATCTG TCTTGTACC 8820
 ATTTTCGTCC TCCCAACATG GGGCAATTGG GCATACCCAT GTTGTACCGT CACTCAGCTC 8880
 CGCGCTCAAC ACCTTCTCGC GTTGGAAAAC ATTAGCGACA TTTACCTGGT GAGCAATCAG 8940
 ACATGCGACG GCTTTAGCCT GGCCTCCTTA AATTCACCTA AGAATGGGAG CAACCAGCAT 9000
 GCAGGAAAAG GACAAGCAGC GAAAATTCAC GCCCCCTTGG GAGGTGGCGG CATATGCAA 9060
 GGATAGCACT CCCACTCTAC TACTGGGTAT CATATGCTGA CTGTATATGC ATGAGGATAG 9120
 CATATGCTAC CCGGATACAG ATTAGGATAG CATATACTAC CCAGATATAG ATTAGGATAG 9180
 CATATGCTAC CCAGATATAG ATTAGGATAG CCTATGCTAC CCAGATATAA ATTAGGATAG 9240
 CATATACTAC CCAGATATAG ATTAGGATAG CATATGCTAC CCAGATATAG ATTAGGATAG 9300
 CCTATGCTAC CCAGATATAG ATTAGGATAG CATATGCTAC CCAGATATAG ATTAGGATAG 9360
 CATATGCTAT CCAGATATTT GGGTAGTATA TGCTACCCAG ATATAAATTA GGATAGCATA 9420
 TACTACCCTA ATCTCTATTA GGATAGCATA TGCTACCCGG ATACAGATTA GGATAGCATA 9480
 TACTACCCAG ATATAGATTA GGATAGCATA TGCTACCCAG ATATAGATTA GGATAGCATA 9540
 TGCTACCCAG ATATAAATTA GGATAGCATA TACTACCCAG ATATAGATTA GGATAGCATA 9600

10

20

30

40

TGCTACCCAG ATATAGATTA GGATAGCCTA TGCTACCCAG ATATAGATTA GGATAGCATA 9660
 TGCTATCCAG ATATTTGGGT AGTATATGCT ACCCATGGCA ACATTAGCCC ACCGTGCTCT 9720
 CAGCGACCTC GTGAATATGA GGACCAACAA CCCTGTGCTT GGGCCTCAGG CGCAAGTGTG 9780
 TGTAATTTGT CCTCCAGATC GCAGCAATCG CGCCCCTATC TTGGCCCGCC CACCTACTTA 9840
 TGCAGGTATT CCCCAGGGTG CCATTAGTGG TTTTGTGGGC AAGTGGTTG ACCGCAGTGG 9900
 TTAGCGGGGT TACAATCAGC CAAGTTATTA CACCCTTATT TTACAGTCCA AAACCGCAGG 9960
 GCGGCCTGTG GGGGCTGACG CGTGCCCCCA CTCCACAATT TCAAAAAAAAA GAGTGGCCAC 10020
 TTGTCTTTGT TTATGGGCC CATTGGCGTG GAGCCCCGTT TAATTTICGG GGGTGTTAGA 10080
 GACAACCACT GGAGTCCGCT GCTGTGGCG TCCACTCTCT TCCCCTTGT TACAAATAGA 10140
 GTGTAACAAC ATGGTTCACC TGTCTTGGTC CCTGCCTGGG ACACATCTTA ATAACCCAG 10200
 TATCATATTG CACTAGGATT ATGTGTTGCC CATAGCCATA AATTCGTGTG AGATGGACAT 10260
 CCAGTCTTTA CGGCTTGTC CCACCCCATG GATTTCTATT GTTAAAGATA TTCAGAAATG 10320
 TTCATTCTTA CACTAGTATT TATTGCCCAA GGGGTTTGTG AGGGTTATAT TGGTGTCTTA 10380
 GCACAATGCC ACCACTGAAC CCCCCGTCCA AATTTTATTC TGGGGCGTC ACCTGAAACC 10440
 TTGTTTTGGA GCACCTCACA TACACCTTAC TGTTCAACAAC TCAGCAGTTA TTCTATTAGC 10500
 TAAACGAAGG AGAATGAAGA AGCAGGCGAA GATTCAGGAG AGTTCCTGC CCGCTCCTTG 10560
 ATCTTCAGCC ACTGCCCTTG TGAATAAAAT GGTTCCTACT CCTCGTGGAA TCCTGACCCC 10620
 ATGTAAATAA AACCGTGACA GCTCATGGGG TGGGAGATAT CGCTGTTCCCT TAGGACCCTT 10680
 TTAATAACCC TAATTCGATA GCATATGCTT CCCGTTGGGT AACATAIGCT ATTGAATTAG 10740
 GGTAGTCTG GATAGTATAT ACTACTACCC GGGGAGCATA TGCTACCCGT TTAGGGTTAA 10800
 CAAGGGGGCC TTATAACAC TATTGCTAAT GCCCTCTTGA GGGTCCGCTT ATCGGTAGCT 10860
 ACACAGGCCC CTCTGATTGA CGTTGGTGTA GCCTCCCGTA GTCTTCCCTGG GCCCCTGGGA 10920
 GGTACATGTC CCCAGCATT GGTGTAAGAG CTTAGCCAA GAGTTACACA TAAAGGCAAT 10980
 GTTGTGTTGC AGTCCACAGA CTGCAAAGTC TGCTCCAGGA TGAAAGCCAC TCAGTGTGG 11040
 CAAATGTGCA CATCCATTTA TAAGGATGTC AACTACAGTC AGAGAACCCC TTTGTGTTG 11100
 GTCCCCCCCC GTGTCACATG TGGAACAGGG CCCAGTTGGC AAGTTGTACC AACCACTGA 11160
 AGGGATTACA TGCCTGCCC CGAATACAAA ACAAAGCGC TCCTCGTACC AGCGAAGAAG 11220
 GGGCAGAGAT GCCGTAGTCA GGTTTAGTTC GTCCGGCGGC GGGGC 11265

10

20

30

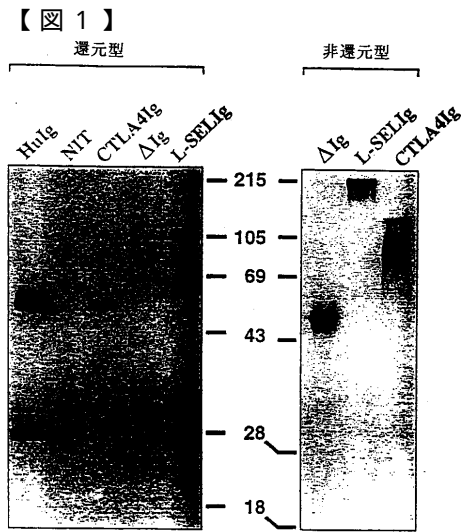


FIGURE 1

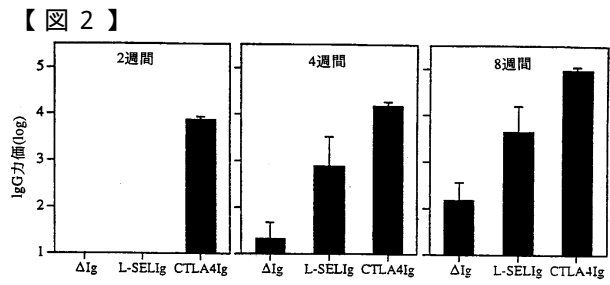


FIGURE 2

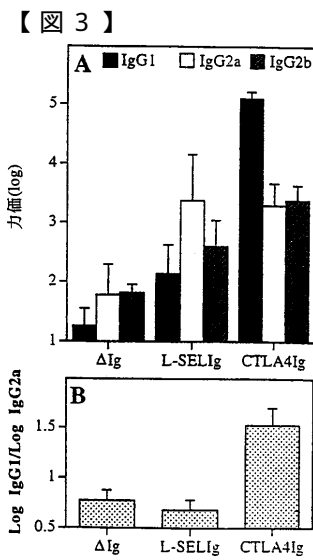


FIGURE 3

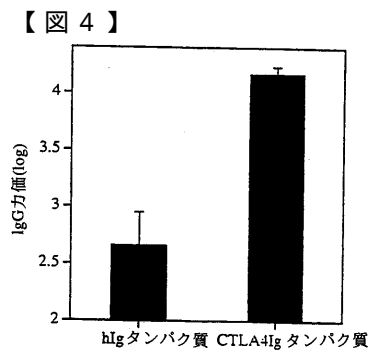


FIGURE 4

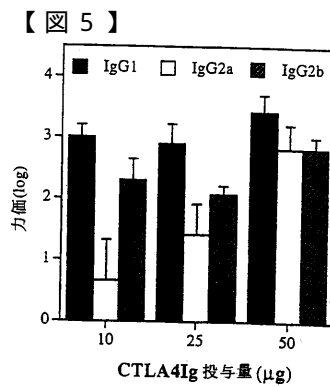


FIGURE 5

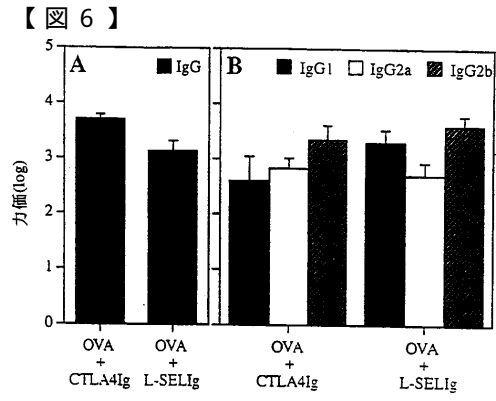


FIGURE 6

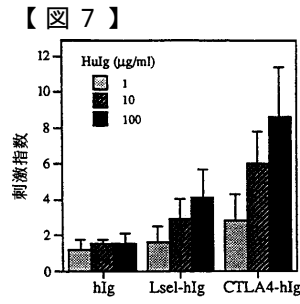


FIGURE 7

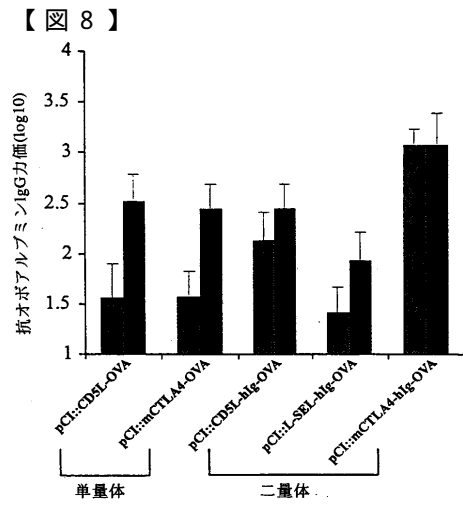


FIGURE 8

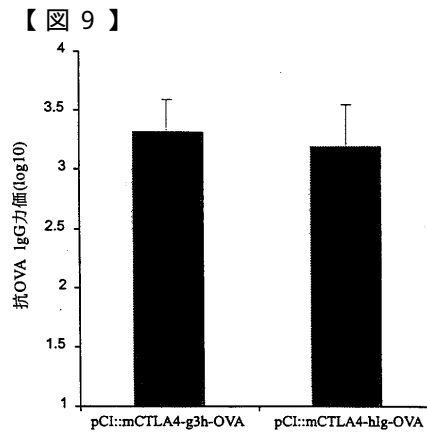


FIGURE 9

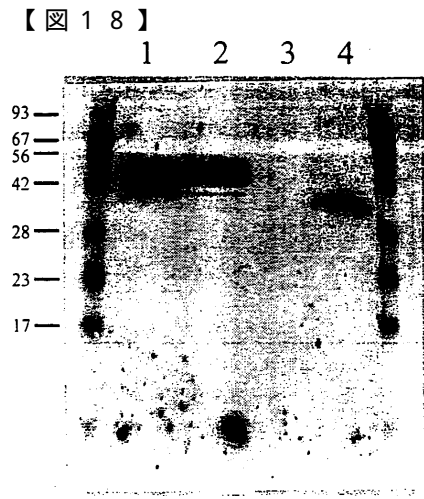


FIGURE 18

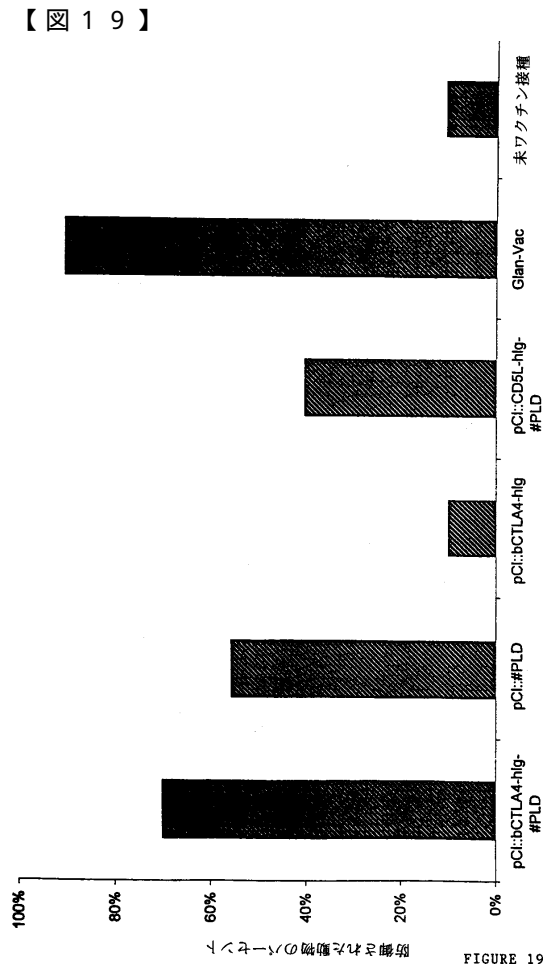


FIGURE 19

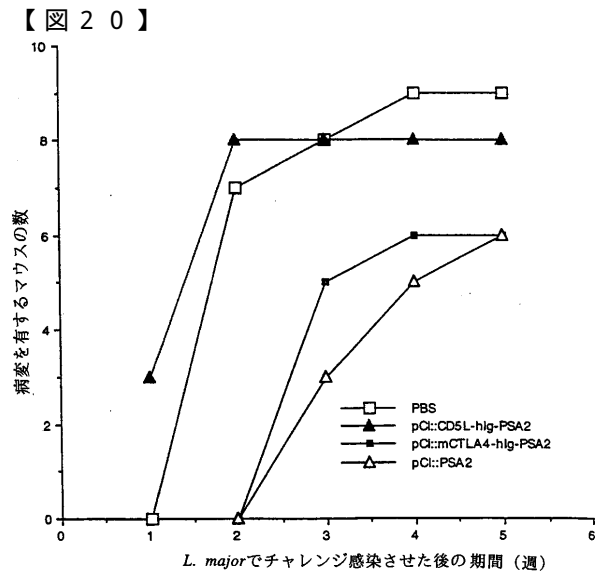


FIGURE 20

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 0 7 K 14/47 (2006.01) C 0 7 K 14/47
 C 0 7 K 16/28 (2006.01) C 0 7 K 16/28
 C 0 7 K 19/00 (2006.01) C 0 7 K 19/00

(73)特許権者

ザ ユニバーシティ オブ メルボルン
 オーストラリア国 3 0 5 2 ヴィクトリア州, パークビル, ロイヤル パレード

(73)特許権者

ザ ウォルター アンド エリザ ホール インスティテュート オブ メディカル リサーチ
 オーストラリア国 3 0 5 2 ヴィクトリア州, パークビル, ロイヤル パレード, ロイヤル メ
 ルボルン ホスピタル

(73)特許権者

シー エス エル リミテッド
 オーストラリア国 3 0 5 2 ヴィクトリア州, パークビル, ポプラー ロード 4 5

(74)代理人

弁理士 平木 祐輔

(74)代理人

弁理士 石井 貞次

(72)発明者 ボイル, ジェフリー, ステファン
 オーストラリア国 3 0 8 4 ヴィクトリア州, ハイデルベルク, ブラウン ストリート 1 6 2

(72)発明者 ブラディ, ジェイミー, ルイーズ
 オーストラリア国 3 0 7 0 ヴィクトリア州, ノースコート, オアマル ストリート 4

(72)発明者 リュー, アンドリュー, マーク
 オーストラリア国 3 0 4 0 ヴィクトリア州, エッセンドン, ワーナー ストリート 1 3

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 国際公開第9 6 / 0 4 0 9 4 1 (WO, A 1)
 国際公開第9 3 / 0 0 0 4 3 1 (WO, A 1)
 国際公開第9 6 / 0 1 3 2 7 7 (WO, A 1)
 J. Biol. Chem., 1 9 9 6年, Vol.271, No.52, p.33670-33677
 Am. J. Pathol., 1 9 9 7年 1月, Vol.150, No.1, p.187-199
 J. Clin. Invest., 1 9 9 6年, Vol.98, No.9, p.2001-2007
 Immunotechnology, 1 9 9 6年, Vol.2, p.85-95

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00 - 15/90
 PubMed