

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4242451号
(P4242451)

(45) 発行日 平成21年3月25日(2009.3.25)

(24) 登録日 平成21年1月9日(2009.1.9)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A C

C O 7 K 16/18 (2006.01)

C O 7 K 16/18

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 B

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

請求項の数 10 (全 55 頁)

(21) 出願番号 特願平9-502179
 (86) (22) 出願日 平成8年6月6日(1996.6.6)
 (65) 公表番号 特表平11-508764
 (43) 公表日 平成11年8月3日(1999.8.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1996/010053
 (87) 国際公開番号 W01996/040878
 (87) 国際公開日 平成8年12月19日(1996.12.19)
 審査請求日 平成15年5月20日(2003.5.20)
 (31) 優先権主張番号 08/487,550
 (32) 優先日 平成7年6月7日(1995.6.7)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 398050098
 バイオジェン・アイデック・インコーポレ
 イテッド
 Biogen Idec Inc.
 アメリカ合衆国02142マサチューセッ
 ツ州ケンブリッジ、ケンブリッジ・センタ
 ー14番
 (74) 代理人 100068526
 弁理士 田村 恭生
 (74) 代理人 100100158
 弁理士 鮫島 睦
 (74) 代理人 100126778
 弁理士 品川 永敏
 (74) 代理人 100156111
 弁理士 山中 伸一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト B 7. 1 および／または B 7. 2 に特異的なサルモノクローナル抗体、その霊長類化形態、
 医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト C D 8 0 抗原に特異的に結合し、

(a) 配列番号 9 および配列番号 1 0 にそれぞれ示す抗体 7 B 6 の軽鎖可変領域ポリペ
 プチドのアミノ酸配列および重鎖可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列；および(b) ヒト C D 8 0 抗原に結合する (a) _ の F (a b ') _ 2、F a bまたはF vフラグメン
 トよりなる群から選ばれた軽鎖可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列および重鎖可変領域ポ
 リペプチドのアミノ酸配列を含む、サルモノクローナル抗体またはサル可変領域およびヒ
 ト定常領域を含むサルノヒトキメラモノクローナル抗体。

【請求項 2】

ヒト抗体軽鎖の軽鎖定常領域およびヒト抗体重鎖の重鎖定常領域を含む、請求項 1 _ に記
 載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 3】

ヒトガンマ 1 定常領域、ヒトガンマ 4 定常領域およびヒトガンマ 4 P E 定常領域よりなる
 群から選ばれた重鎖定常領域を含む、請求項 2 _ に記載のモノクローナル抗体またはそのフ
 ラグメント。

【請求項 4】

枯渇抗体である請求項 1 ないし 3 _ のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはそのフラ
 グメント。

【請求項 5】

非枯渴抗体である請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 6】

(a) 配列番号 7 および配列番号 8 にそれぞれ示す抗体 7 C 1 0 の軽鎖可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列および重鎖可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

(b) 配列番号 9 および配列番号 1 0 にそれぞれ示す抗体 7 B 6 の軽鎖可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列および重鎖可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

(c) 配列番号 1 1 および配列番号 1 2 にそれぞれ示す抗体 1 6 C 1 0 の軽鎖可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列および重鎖可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；または

(d) (a) ~ (c) のいずれかの F (a b ')₂、F a b または F_v フラグメントであって、ヒト C D 8 0 抗原に特異的に結合する軽鎖可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列および重鎖可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするものを含む組換え核酸。

10

【請求項 7】

(a) 配列番号 1 および配列番号 2 に示すヌクレオチド配列；

(b) 配列番号 3 および配列番号 4 に示すヌクレオチド配列；および

(c) 配列番号 5 および配列番号 6 に示すヌクレオチド配列

よりなる群から選ばれたヌクレオチド配列を含む、請求項 6 に記載の組換え核酸。

20

【請求項 8】

請求項 6 または 7 に記載の組換え核酸を発現する培養細胞。

【請求項 9】

C H O トランスフェクターマである、請求項 8 に記載の培養細胞。

【請求項 1 0】

ヒト C D 8 0 抗原に特異的に結合するキメラ抗体であって、ヒト抗体軽鎖の軽鎖定常領域およびヒト抗体重鎖の重鎖定常領域を含み、さらに

(a) 配列番号 7 および配列番号 8 にそれぞれ示す抗体 7 C 1 0 の軽鎖可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列および重鎖可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列；

(b) 配列番号 9 および配列番号 1 0 にそれぞれ示す抗体 7 B 6 の軽鎖可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列および重鎖可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列；および

(c) 配列番号 1 1 および配列番号 1 2 にそれぞれ示す抗体 1 6 C 1 0 の軽鎖可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列および重鎖可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列；

よりなる群から選ばれた可変領域ポリペプチドのアミノ酸配列を含むキメラ抗体を産生する、請求項 8 に記載の培養細胞。

30

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【技術分野】

40

本発明は、ヒト B 7、すなわちヒト B 7 . 1 およびヒト B 7 . 2 に対する新規モノクローナル抗体およびその霊長類化 (primatized) 形態の製造および同定に関する。さらに詳しくは、本発明は、B 7 免疫したサルから得た B リンパ球を用いたファージ提示ライブラリー (phage display libraries) およびサルヘテロハイブリドーマのスクリーニングにより産生された、ヒト B 7、すなわちヒト B 7 . 1 およびヒト B 7 . 2 に対するマカークザル (macaque) 抗体の製造および同定に関する。

【0 0 0 2】

本発明はさらに、ヒト B 7、すなわちヒト B 7 . 1 および B 7 . 2 に結合する特定の霊長類化抗体、並びにその対応アミノ酸配列および核酸配列に関する。本発明はまた、ヒト B 7 . 1 および / またはヒト B 7 . 2 に特異的なサルモノクローナル抗体または霊長類化抗

50

体を含む医薬組成物並びに B 7 : C D 2 8 経路を調節することによる、たとえば自己免疫疾患の治療や臓器移植拒絶の防止のための免疫抑制剤としてのその使用に関する。

【背景技術】

【0003】

免疫学、血液学および腫瘍学の間での臨床的相互領域が長らく認識されている。血液学者または腫瘍学者によって処置される多くの状態は、その病理生理学に自己免疫または免疫不全要因のいずれかを有し、それが血液学者による免疫抑制剤療法の広範な採用となり、一方、腫瘍学者は腫瘍に対する内生の免疫を高めるための免疫アジュバントを探し求めている。今日ではこれらの介入措置は、一般に非特異的なモードの免疫抑制および免疫刺激からなる。これら介入措置の効能が限られていることに加え、その非特異性による毒性もまた、その全的成功を制限していた。それゆえ、別の戦略が探し求められている。

【0004】

迅速にその数を増している細胞表面分子の機能的役割の解明は、免疫学と臨床血液学および腫瘍学との統合に多大な貢献をしている。200近い細胞表面抗原が免疫系および造血系の細胞で同定されている [シュロスマン (Schlossman, S F)、ブムセル (Boumsell, L.)、ジルクス (Gilks, J M)、ハーラン (Harlan, T.)、キシモト (Kishimoto, C.)、モリモト (Morimoto, C.)、リッツ (Ritz, J.)、ショー (Shaw, S.)、シルバースタイン (Silverstein, R L)、スプリンガー (Springer, T A)、テッター (Tedder, T F)、トッド (Todd, R F) : C D antigens (1993)、Blood 83 : 879、1994]。これら抗原は、細胞認識、接着、増殖の誘発および維持、サイトカイン分泌、エフェクター機能、および細胞死さえも含む種々のプロセスに関与する、系統に限定された分子および広く分布する分子の両方を提示する。これら分子の機能的貢献の認識は、免疫応答を操作する新規な試みを呼び起こした。以前には細胞接着および抗原特異的な認識に関与する分子が治療用免疫学的介入の標的とされたが、最近ではコストимуラトリー (co-stimulatory) 分子と呼ばれる細胞表面分子のサブグループに関心が集まっている [ブレッチャー (Bretcher, P.) : 「21年後のリンパ球活性化の2シグナルモデル」、Immunol. Today 13 : 73 (1992) ; ジェンキンス (Jenkins, M K)、ジョンソン (Johnson, J G) : 「T細胞コストimulationに関与する分子」、Curr. Opin. Immunol. 5 : 351、1993 ; ゲッパート (Gelpert, T.)、デービス (Davis, L.)、ガー (Gur, H.)、ワコルツ (Wacholtz, M.)、リップスキー (Lipsky, P.) : 「T細胞活性化に関与するアクセサリ細胞」、Immunol. Rev. 117 : 5 (1990) ; ウィーバー (Weaver, C T)、ウナウエ (Unaue, E R) : 「抗原提示細胞のコスティミュラトリー機能」、Immunol. Today 11 : 49 (1990) ; ステナム (Stennam, R M)、ヤング (Young, J W) : 「抗原提示細胞から生じるシグナル」、Curr. Opin. Immunol. 3 : 361 (1991)]。コストimulation分子は、抗原特異的なT細胞応答およびエフェクター機能の生成および増幅を開始はしないが、むしろ可能にする [ブレッチャー : 「21年後のリンパ球活性化の2シグナルモデル」、Immunol. Today 13 : 73 (1992) ; ジェンキンス、ジョンソン : 「T細胞コストimulationに関与する分子」、Curr. Opin. Immunol. 5 : 351、1993 ; ゲッパート、デービス、ガー、ワコルツ、リップスキー : 「T細胞活性化に関与するアクセサリ細胞」、Immunol. Rev. 117 : 5 (1990) ; ウィーバー、ウナウエ : 「抗原提示細胞のコスティミュラトリー機能」、Immunol. Today 11 : 49 (1990) ; ステナム、ヤング : 「抗原提示細胞から生じるシグナル」、Curr. Opin. Immunol. 3 : 361 (1991) ; ジュン (June, C H)、ブルーストーン (Bluestone, J A)、リンスレイ (Linsley, P S)、トンプソン (Thompson, C D) : 「T細胞活性化におけるC D 2 8 受容体の役割」、Immunol. Today 15 : 321 (1994)]。

【0005】

最近、B 7 : C D 2 8 と称する一つの特異的なコストimulation経路が、B細胞およびT細胞活性化におけるその有意の役割のために、異なる研究グループにより研究された

[ジュン、ブルーストーン、リンスレイ、トンブソン：「T細胞活性化におけるCD28受容体の役割」、Immunol. Today 15：321（1994）；ジュン、レッドベター（Ledbetter, J A）：「T細胞の抗原への応答の間のCD28受容体の役割」、Ann. Rev. Immunol. 11：191（1993）；シュワルツ（Schwartz, R H）：「Tリンパ球のコスティミュレーション：インターロイキン2の産生および免疫療法におけるCD28、CTLA-4およびB7/BB1の役割」、Cell 71：1065（1992）]。このリガンド：受容体経路は4年前に発見されたので、B7：CD28相互作用が免疫応答性とアレルギーとを決定するうえでの重大な接点の一つを代表することを示唆する膨大な証拠が得られてきている[ジュン、ブルーストーン、リンスレイ、トンブソン：「T細胞活性化におけるCD28受容体の役割」、Immunol. Today 15：321（1994）；ジュン、レッドベター：「T細胞の抗原への応答の際のCD28受容体の役割」、Ann. Rev. Immunol. 11：191（1993）；シュワルツ：「Tリンパ球のコスティミュレーション：インターロイキン2の産生および免疫療法におけるCD28、CTLA-4およびB7/BB1の役割」、Cell 71：1065（1992）；コーエン（Cohen, J.）：「望んでいない免疫応答に対して開始される攻撃」（ニュースコメント）Science 257：751（1992）；コーエン：「“コスティミュレーター”として注目を浴びる新たなタンパク質」（ニュースコメント）Science 262：844（1993）]。

10

とりわけ、ヒトB7抗原、すなわちヒトB7.1およびB7.2は、T細胞活性化においてコスティミュラトリーな役割を果たすことが報告されている。

20

【0006】

1. T細胞活性化におけるB7.1およびB7.2のコスティミュラトリーな役割
首尾よい免疫応答の精巧さは、T細胞と抗原提示細胞との間の一連の特異的な相互作用に依存する。このプロセスにおける最初の必須のステップはMHCクラスII分子との関連での抗原のT細胞受容体への結合に依存するが[レイン（Lane, P. J. L.）、マッコネル（F. M. McConnell）、シーベン（G. L. Schieven）、クラーク（E. A. Clark）、およびレッドベター（1990）、「ヒトB細胞活性化におけるクラスII分子の役割」、The Journal of Immunology、144：3684-3692]、この相互作用だけでは所定の抗原に対する継続した応答に必要なすべての事象を引き起こすのに充分ではない[シュワルツ、「Tリンパ球クローナルアネルギーの細胞培養モデル」、Science 248：1349；ジェンキンス（1992）「クローナルアネルギーの誘発における細胞分裂の役割」、Immunology Today、13：69；アズマ（Azuma, M.）、カタビアブ（M. Catabyab）、バック（D. Buck）、フィリップス（J. H. Phillips）およびラニエ（L. L. Lanier）（1992）、「ヒトナチュラルキラー白血球細胞株により媒体されるMHC非制限細胞毒性へのCD28の関与」、The Journal of Immunology、149：1556-1561；アズマ、カタビアブ、バック、フィリップスおよびラニエ（1992）、「CD28とB7との相互作用は、小さな静止Tリンパ球によって媒体される一次同種増殖応答および細胞毒性をコスティミュレートする」、J. Exp. Med. 175：353-360]。

30

【0007】

ある種の他のコスティミュラトリー分子の関与が必要である[ノートン（Norton, S. D.）、ズッカーマン（L. Zuckerman）、アーダール（K. B. Urdahl）、シェフナー（R. Shefner）、ミラー（J. Miller）およびジェンキンス（1992）「CD28リガンドであるB7は、T細胞にコスティミュラトリーシグナルを提供することによりIL-2の産生を促進する」The Journal of Immunology、149：1556-1561]。「T細胞上で発現されたホモダイマーCD28およびCTLA-4」[ジュン、レッドベター、リンスレイおよびトンブソン（1990）「T細胞活性化におけるCD28受容体の役割」、Immunology Today、11：211-216；リンスレイ、ブラディー、アーンズ、グロスマイア（L. S. Grosmaire）、ダムル（N. K. Damle）およびレッドベター（1991）、「CTLA-4はB細胞活性化抗原B7の第二の受容体である

40

50

」、J. Exp. Med.、174:561]が、抗原提示細胞上で発現されたB7.1(CD80)およびB7.2(CD86)とともに、持続された免疫応答に必要なコスティミュラトリ分子の主要なペアである[アズマ、イッセル(H. Yssel)、フィリップス、スピッツ(H. Spits)およびラニエ(1993)、「活性化Tリンパ球上でのB7/BB1の機能的発現」、J. Exp. Med.、177:845~850;フリーマン(Freeman, G. J.)、フリードマン(A. S. Freedman)、セジル(J. M. Segil)、リー(G. Lee)、ホワイトマン(J. F. Whitman)およびナドラー(L. M. Nadler)(1989)、「活性化された新生物B細胞上でのみ発現されるIgスーパーファミリーの新たな成員であるB7」、The Journal of Immunology、143:2714~2722;ハスコック(Hathcock, K. S.)、ラスロ(G. Laslo)、ディックラー(H. B. Dickler)、ブラッドショー(J. Bradshaw)、リンスレイおよびホーズ(R. J. Hodes)(1993)、「T細胞活性化のコスティミュラトリの他のCTLA-4リガンドの同定」、Science、262:905~911;ハート(Hart, D. N. J.)、スターリング(G. C. Starling)、カルダー(V. L. Calder)およびフェルナンド(N. S. Fernando)(1993)、「B7/BB1は、活性化により誘発されたヒト樹状細胞上の白血球分化抗原である」、Immunology、79:616~620]。インビトロでは、これらコスティミュラトリシグナルの不在が未発達のT細胞活性化経路および特定の抗原に対する応答の欠如すなわちアネルギーを導くことを示すことができる[たとえば、ハーディング(Harding, F. A.)、マッカーサー(J. G. McArthur)、グロス(J. A. Gross)、ラウレット(D. M. Raulet)およびアリソン(J. P. Allison)(1992)、「CD28により媒体されたシグナル伝達は、マウスT細胞をコスティミュレートし、T細胞クローンにおけるアネルギーの誘発を防ぐ」、Nature、356:607~609;ギミ(Gimmi, C. D.)、フリーマン、グリベン(J. G. Gribben)、グレイ(G. Gray)およびナドラー(1993)、「ヒトT細胞クローナルアネルギーは、B7コスティミュレーションの不在下での抗原提示により誘発される」、Proc. Natl. Acad. Sci.、90:6586~6590;タン(Tan, P.)、アナセフティ(C. Anasefti)、ハンセン(J. A. Hansen)、メルローズ(J. Melrose)、ブランバンド(M. Brunvand)、ブラッドショー、レッドベターおよびリンスレイ(1993)、「CD28とその天然リガンドであるB7/BB1との間の相互作用を阻止することによるヒトTリンパ球でのアロ抗原特異的な低応答性の誘発」、J. Exp. Med.、177:165~173]。インビボの寛容の達成は、免疫抑制のメカニズムおよび臓器移植拒絶や自己免疫疾患の治療のための実行可能な療法を構成する。このことは、CTLA-4-Ig投与後の実験モデルでは達成されている[レンショー(Lenshow, D. J.)、ゼング(Y. Zeng)、ジスルスウェイト(R. J. Thistlethwaite)、モンタグ(A. Montag)、ブラディー、ギブソン(M. G. Gibson)、リンスレイおよびブルーストーン(J. A. Bluestone)(1992)、「CTLA4-Igにより誘発された異種個体脾臓島移植の長期生存」、Science、257:789~795]。

【0008】

B7.1分子およびB7.2分子はCD28またはCTLA-4のいずれかに結合することができるが、B7.1はCD28には200nmのKdで結合し、CTLA-4には20倍高い親和性で結合する[リンスレイ、クラークおよびレッドベター(1990)、「T細胞抗原CD28は、活性化抗原B7/BB1と相互作用することによりB細胞との接着を媒体する」、Proc. Natl. Acad. Sci.、87:5031~5035;リンスレイら(1993)、「抗原へのT細胞応答の際のCD28受容体の役割」、Annu. Rev. Immunol.、11:191~192;リンスレイら(1993)、「B7/BB1とCD28との連動が、CD28合成の一過性のダウンレギュレーションおよびCD28シグナル伝達に対する長期化した応答の欠如を誘発する」、The Journal of Immunology、150:3151~3169]。B7.2は活性化されたB細胞およびインターフェロン誘発された単球上では発現されるが、静止状態のB細胞では発現されない[フリーマン、グレイ、ギミ、ロマルド(D. B. Lomard)、ゾウ(L. J. Zhou)、ホワイト、

10

20

30

40

50

フィンゲロス (J . D . Fingeroth)、グリベンおよびナドラー (1991)、「ヒト B リンパ球活性化抗原 B 7 のマウスホモログの構造、発現および T 細胞コストимуレータリー活性」、J . Exp . Med .、174 : 625 ~ 631]。一方、B 7 . 2 は、静止状態の単球、樹状細胞および B 細胞上で非常に低レベルではあるが構成的に発現され、その発現は活性化された T 細胞、NK 細胞および B リンパ球では促進される [アズマ、イトー (D . Ito)、ヤギタ (H . Yagita)、オクムラ (K . Okumura)、フィリップス、ラニエおよびゾモザ (C . Zomoza) (1993)、「B 7 0 抗原は C T L A - 4 および C D 28 の第二のリガンドである」、Nature、366 : 76 ~ 79]。B 7 . 1 および B 7 . 2 は同じ細胞型上で発現されうるが、B 細胞上での発現は異なる動力学で起こる [レンショー、ス (G . H . Su)、ズッカーマン、ナバビ (N . Nabavi)、ジェリス (C . L . Jellis)、グレイ、ミラーおよびブルーストーン (1993)、「C T L A - 4 の別のリガンドの発現および機能的有意」、Proc . Natl . Acad . Sci . U S A、90 : 11054 ~ 11058 ; プシヨティス (Boussiotis , V . A .)、フリーマン、グリベン、ダリー (J . Daley)、グレイおよびナドラー (1993)、「活性化されたヒト B リンパ球は、T 細胞活性化をコストимуレートする 3 つの C T L A - 4 対応受容体を発現する」、Proc . Natl . Acad . Sci . U S A、90 : 11059 ~ 11063]。R N A レベルでさらに分析したところ、B 7 . 2 m R N A が構成的に発現されるのに対して、B 7 . 1 M R N A は活性化の 4 時間後に検出され、初期低レベルの B 7 . 1 タンパク質は刺激から 24 時間後までは検出できなかった [プシヨティス、フリーマン、グリベン、ダリー、グレイおよびナドラー (1993)、「活性化されたヒト B リンパ球は、T 細胞活性化をコストимуレートする 3 つの C T L A - 4 副受容体を発現する」、Proc . Natl . Acad . Sci . U S A、90 : 11059 ~ 11063]。それゆえ、C T L A - 4 / C D 28 対応 (counter) 受容体は、B 細胞活性化後の種々の時間に発現される。

【 0 0 0 9 】

B 7 . 1 および B 7 . 2 の差別的な時間をずらした (differential temporal) 発現は、これら 2 つの分子と C T L A - 4 および / または C D 28 との相互作用が T 細胞への別個だが関連したシグナルを送達することを示唆している [ラサル (LaSalle , J . M .)、トレンチーノ (P . J . Tolentino)、フリーマン、ナドラーおよびハフラー (D . A . Hafler) (1992)、「C D 28 および T 細胞抗原受容体シグナル伝達は、スーパー抗原刺激に応答したインターロイキン 2 遺伝子発現を共同的に制御する」、J . Exp . Med .、176 : 177 ~ 186 ; バンデンベルグ (Vandenberghe , P .)、フリーマン、ナドラー、フレッチャー (M . C . Fletcher)、カモウン (M . Kamoun)、ツルカ (L . A . Turka)、レッドベター、トンブソンおよびジュン (1992)、「抗体および B 7 / B B 1 媒体された C D 28 受容体のライゲーションはヒト T 細胞においてチロシンリン酸化を誘発する」、The Journal of Experimental Medicine、175 : 951 ~ 960]。T 細胞に対する C T L A - 4 および C D 28 の正確なシグナル伝達機能は、現在のところ知られていない [ジェインウェイ (Janeway , C . A . , Jr .) およびボトムリー (K . Bottomly) (1994)、「リンパ球応答のシグナルおよび信号」、Cell、76 : 275 ~ 285]。しかしながら、1 セットの受容体が T 細胞活性化の初期刺激および第二の持続されたシグナルを提供し、該経路のさらなる精巧さ (elaboration) およびクローン拡張が起こるのを可能にする可能性がある [リンスレイ、グリーン (J . L . Greene)、タン、ブラッドショー、レッドベター、アナセッティ (C . Anasetti) およびダムル (1992)、「活性化 T リンパ球上での C T L A - 4 および C D 28 の同時発現および機能的協同」、J . Exp . Med .、176 : 1595 ~ 1604]。現在のデータは、T 細胞拡張、リンホカイン分泌およびエフェクター機能の完全な発達のために T C R とコストимуレータリーシグナルの両者が必要である [グリーナン (Greenan , V .) およびクローマー (G . Kroemer) (1993)、「細胞免疫寛容への複数の経路」、Immunology Today、14 : 573] というジェンキンスおよびシュワルツにより提唱された 2 シグナル仮説 [シュワルツ (1990)、「T リンパ球クローナルアネルギーのための細胞培養モデル」、Science、248 : 1349 ; ジェンキンス (1992)、「

10

20

30

40

50

クローナルアレルギーの誘発における細胞分裂の役割」、Immunology Today、13:69]を支持している。第二のシグナルの送達ができないとT細胞がIL-2を分泌できず、細胞は抗原に対して非応答性となる。

【0010】

構造的には、B7.1およびB7.2の両者ともに、細胞外免疫グロブリンスーパーファミリーVおよびC様ドメイン、疎水性膜貫通領域および細胞質テールを含む[フリーマン、グリベン、ブショティス、ング(J. W. Ng)、レスティボ(V. Restivo, Jr.)、ロンバード(L. A. Lombard)、グレイおよびナドラー(1993)、「B7.2のクローニング: ヒトT細胞増殖をコストимуレートするCTLA-4対応受容体」、Science、262:909]。B7.1およびB7.2はともに高程度にグリコシル化されている。B7.1は、223アミノ酸の細胞外ドメイン、23アミノ酸の膜貫通ドメインおよび61アミノ酸の細胞質テールからなる44~54kDの糖タンパク質である。B7.1は、3つの潜在的なプロテインキナーゼリン酸化部位を含む[アズマ、イッセル、フィリップス、スピッツおよびラニエ(1993)、「活性化Tリンパ球上でのB7/B7.1の機能的発現」、J. Exp. Med.、177:845~850]。B7.2は、306アミノ酸の膜糖タンパク質である。B7.2は、220アミノ酸の細胞外領域、23アミノ酸の疎水性膜貫通ドメインおよび60アミノ酸の細胞質テールからなる[フリーマン、フリードマン、セジル、リー、ホワイトマンおよびナドラー(1989)、「活性化された新生物B細胞上でのみ発現されるIgスーパーファミリーの新たな成員であるB7」、The Journal of Immunology、143:2714~2722]。B7.1およびB7.2の両遺伝子は同じ染色体領域中に局在するが[フリーマン、ロンバード、ギミ、ブロード(S. A. Brod)、リー、レイニング(J. C. Laning)、ハフラー、ドーフ(M. E. Dorf)、グレイ、レイサー(H. Reiser)、ジュン、トンブソンおよびナドラー(1992)、「CTLA-4およびCD28のMRNAは活性化後に大抵のT細胞で同時に発現される」、The Journal of Immunology、149:3795~3801; シュワルツ(1992)、「Tリンパ球のコstimulatory: CD28、CTLA-4およびB7/B7.1の役割」、セルバクマール(Selvakumar, A.)、モハンラジュ(B. K. Mohanraj)、エディ(R. L. Eddy)、ショーズ(T. B. Shows)、ホワイト(P. C. White)、ペリン(C. Perrin)およびデュポン(B. Dupont)(1992)、「Bリンパ球活性化抗原B7をコードするヒト遺伝子のゲノム構成および染色体位置」、Immunogenetics、36:175~181]、これら抗原は高レベルのホモロジーを共有してはいない。B7.1とB7.2との間の全体のホモロジーは26%であり、マウスB7.1とヒトB7.1との間の全体のホモロジーは27%である[アズマ、イッセル、フィリップス、スピッツおよびラニエ(1993)、「活性化Tリンパ球上でのB7/B7.1の機能的発現」、J. Exp. Med.、177:845~850; フリーマン、フリードマン、セジル、リー、ホワイトマンおよびナドラー(1989)、「活性化された新生物B細胞上でのみ発現されるIgスーパーファミリーの新たな成員であるB7」、The Journal of Immunology、143:2714~2722]。ヒトB7.1、ヒトB7.2およびマウスB7.1配列のアラインメントは、長いホモロジーを示す領域は殆どないことを示すが、これら3つの分子はすべてヒトCTLA-4およびCD28に結合することが知られている。従って、これら3つの分子に共通する隣接しているかまたは立体配置的な共通した密接に関連した相同領域が存在する可能性が高い。この領域は、B7.1分子およびB7.2分子の対応受容体への結合部位を構成する。これらエピトープに対して産生された抗体は、T細胞上でのB7と対応受容体との相互作用を阻止する可能性がある。さらに、B7.1分子とB7.2分子との両者の上の該領域と交差反応する抗体は、B7.1またはB7.2に対して別々に向けられた抗体よりも実際的に有利である可能性がある。

【0011】

2. B7/CD28相互作用の阻止

B7/CD28相互作用の阻止は特異的な免疫抑制の可能性を与え、長期間持続する抗原

特異的な治療効果が得られる可能性がある。B 7 . 1 かまたは B 7 . 2 のいずれかに対する抗体は、インビトロでの I L - 2 産生の抑制により測定されるように T 細胞活性化を阻止することが示されている [デュボア (DeBoer , M .) 、パレン (P . Parren) 、ドーブ (J . Dove) 、オッセンドープ (F . Ossendorp) 、ファン・デア・ホルスト (van der Horst) およびリーダー (J . Reeder) (1 9 9 2) 、 「 新規な抗 B 7 モノクローナル抗体の機能的特徴付け 」 、 Eur . Journal of Immunology 、 2 2 : 3 0 7 1 ~ 3 0 7 5 ; アズマ、イッセル、フィリップス、スピッツおよびラニエ (1 9 9 3) 、 「 活性化 T リンパ球上での B 7 / B B 1 の機能的発現 」 、 J . Exp . Med . 、 1 7 7 : 8 4 5 ~ 8 5 0] 。しかしながら、種々の抗体が免疫抑制能においてさまざまであることが示されており、これは親和性かまたはエピトープ特異性のいずれかを反映しているかもしれない。C T L A - 4 / I g 融合タンパク質および抗 C D 2 8 F a b は、I L - 2 産生のダウンレギュレーションに対して同様の作用を有することが示された。

【 0 0 1 2 】

可溶性の C T L A - 4 / I g 融合タンパク質のインビボ投与は、マウスにおいて T 細胞依存性の抗体応答を抑制することが示されており [リンスレイ、グリーン、タン、ブラッドショー、レッドベター、アナセッティおよびダムル (1 9 9 2) 、 「 活性化 T リンパ球上での C T L A - 4 および C D 2 8 の同時発現および機能的協同 」 、 J . Exp . Med . 、 1 7 6 : 1 5 9 5 ~ 1 6 0 4 ; リン (L i n , H .) 、ピリング (S . F . Builing) 、リンスレイ、ウェイ (R . O . Wei) 、トンブソンおよびツルカ (L . A . Turka) (1 9 9 3) 、 「 C T L A - 4 - I g とドナー特異的な輸血によって誘発された主要組織適合複合体の不適合な心臓同種移植の長期受容 」 、 J . Exp . Med . 、 1 7 8 : 1 8 0 1] 、さらに大用量の投与は第二の免疫に対する応答を抑制することができ、このアプローチが抗体に媒体された自己免疫疾患の治療に対して実行可能であることが示されている。さらに、C T L A - 4 - I g は、T 細胞と B 7 . 1 / B 7 . 2 抗原提示細胞との間の相互作用を直接抑制することにより、マウスにおいて脾臓島細胞の拒絶を防ぐことができた [レンショー、ス、ズッカーマン、ナバビ、ジェリス、グレイ、ミラーおよびブルーストーン (1 9 9 3) 、 「 C T L A - 4 の別のリガンドの発現および機能的有意 」 、 Proc . Natl . Acad . Sci . U S A 、 9 0 : 1 1 0 5 4 ~ 1 1 0 5 8] 。この場合、長期のドナー特異的な寛容が達成された。

【 0 0 1 3 】

3 . 抗体選択のための組換えファージ提示 (Display) 法

今日まで、B 7 . 1 および B 7 . 2 の両者に交差反応するモノクローナル抗体は報告されていない。記載したように、かかる抗体は免疫抑制剤として非常に望ましいものである。ファージ提示法は免疫応答の際に産生される抗体を単離するための従来法に置き換わりつつある。なぜなら、従来法を用いた場合に比べてはるかに高いパーセントの免疫範囲 (immune repertoire) を評価することが可能であるからである。このことは、一部、P E G 融合の非効率性、染色体の不安定性、およびヘテロハイブリドーマ産生に伴う大量の組織培養およびスクリーニングによるものである。対照的にファージ提示法は、所定の抗原に応答した免疫グロブリン遺伝子の全範囲を潜在的に捕捉するための分子技術に依存している。

【 0 0 1 4 】

この技術はバーバー (Barber) らの Proc . Natl . Acad . Sci . U S A 、 8 8 、 7 9 7 8 ~ 7 9 8 2 (1 9 9 1) に記載されている。本質的に、免疫グロブリンの重鎖遺伝子を P C R 増幅し、繊維状ファージ M 1 3 のマイナーコートタンパク質をコードする遺伝子を含むベクター中に重鎖融合タンパク質が生成されるような仕方でクローニングする。重鎖融合タンパク質は、それが組み立てられるときに軽鎖遺伝子とともに M 1 3 ファージ粒子中に取り込まれる。各組換えファージはそのゲノム内に異なる抗体 F a b 分子の遺伝子を含み、これはファージの表面上に提示される。これらライブラリー内に 1 0 6 を越える異なる抗体がクローニングされ、提示されうる。ファージライブラリーを抗原をコーティングしたマイクロタイターウエル上でえり分け、非特異的なファージを洗い落とし、抗原結

合したファージを溶出する。抗原特異的なクローンからのゲノムを単離し、さらに特徴付けるために可溶性の F a b 形態で抗体が発現できるように遺伝子IIIを切り出す。潜在的な治療候補として単一の F a b が一旦選択されたら、これを容易に全抗体に変換することができる。F a b 配列を全抗体に変換するために以前に記載された発現系は、I D E C の哺乳動物発現ベクター N E O S P L A である。このベクターは、ヒトガンマ 1 かまたはガンマ 4 のいずれかの定常領域遺伝子を含む。C H O 細胞を N E O S P L A ベクターでトランスフェクションし、増幅後、このベクター系は非常に高い発現レベル (> 3 0 p g / 細胞 / 日) を達成できることが報告された。

【 0 0 1 5 】

4 . 霊長類化抗体

組換え抗体を生成するための他の非常に効率的な手段がニューマン (Newman) によって開示されている [ニューマン (1 9 9 2) 、 B i o t e c h n o l o g y 、 1 0 、 1 4 5 5 ~ 1 4 6 0] 。さらに詳しくは、この技術によりサル可変ドメインおよびヒト定常配列を含む霊長類化抗体を得ることができる。上記文献を参照のためその全体を本明細書中に引用する。さらに、この技術はまた、本願と同一の出願人である 1 9 9 5 年 1 月 2 5 日に出願した米国特許出願第 0 8 / 3 7 9 , 0 7 2 号 (これは 1 9 9 2 年 7 月 1 0 日に出願した米国特許出願第 0 7 / 9 1 2 , 2 9 2 号 (これは 1 9 9 2 年 3 月 2 3 日に出願した米国特許出願第 0 7 / 8 5 6 , 2 8 1 号 (これは 1 9 9 1 年 7 月 2 5 日に出願した米国特許出願第 0 7 / 7 3 5 , 0 6 4 号の一部継続出願である) の一部継続出願である) の継続出願である) にも記載されている。米国特許出願第 0 8 / 3 7 9 , 0 7 2 号およびその親出願を参照のためその全体を本明細書中に引用する。

【 0 0 1 6 】

この技術は、抗体をヒトに投与したときに抗原的に拒絶されないように修飾するものである。この技術は、ヒト抗原または受容体でカニクイザルを免疫することによっている。この技術は、ヒト細胞表面抗原に向けられた高親和性のモノクローナル抗体を産生するために開発された。

【 0 0 1 7 】

このようにして生成された抗体は、ヒトエフェクター機能を示すこと、免疫原性が低減していること、および長期の血清半減期を有することが以前に報告されている。この技術は、カニクイザルがヒトと系統発生的には類似しているという事実にもかかわらず、カニクイザルが依然として多くのヒト抗原を異物として認識し、それゆえ免疫応答を誘起するという事実によっている。さらに、カニクイザルがヒトに系統発生的に近接しているため、これらサルで産生された抗体はヒトで産生された抗体に対して高度のアミノ酸ホモロジーを有することが見出された。実際、マーカーザルの免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域遺伝子を配列決定したところ、各遺伝子ファミリーはヒトにおけるその対応遺伝子と 8 5 ~ 9 8 % 相同であることがわかった [ニューマンら (1 9 9 2) 、上掲] 。このようにして産生された最初の抗体である抗 C D 4 抗体は、ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域のコンセンサス配列に 9 1 ~ 9 2 % 相同であった [ニューマンら、B i o t e c h n o l o g y 、 1 0 、 1 4 5 8 ~ 1 4 6 0 (1 9 9 2)] 。

【 0 0 1 8 】

ヒト B 7 抗原に特異的なモノクローナル抗体は、以前に文献に記載されている。たとえば、ワイル (W e y l) ら [H u m . I m m u n o l . 、 3 1 (4) 、 2 7 1 ~ 2 7 6 (1 9 9 1)] は、天然および変異抗原変異体を用いた H L A - B - 2 7 に対するヒトモノクローナル抗体のエピトープマッピングを記載している。また、トゥバート (T o u b e r t) ら [C l i n . E x p . I m m u n o l . 、 8 2 (1) 、 1 6 ~ 2 0 (1 9 9 0)] は、3 5 K D の細菌外膜タンパク質とも反応する H L A - B - 2 7 モノクローナル抗体のエピトープマッピングを記載している。また、バル (V a l l e) ら [I m m u n o l . 、 6 9 (4) 、 5 3 1 ~ 5 3 5 (1 9 9 0)] は、活性化 B 細胞および H T L V - 1 形質転換 T 細胞で発現された B 7 抗原を認識する I g G 1 サブクラスモノクローナル抗体を記載している。さらに、トゥバートら [J . I m m u n o l . 、 1 4 1 (7) 、 2 5 0 3 ~ 9 (1 9 8 8)] は、H L A - B - 2 7 およ

びHLA-B-7抗原遺伝子の対立遺伝子間でのハイブリッド遺伝子は大腸菌で作成することにより構築したドメイン内組換え体を用いたこれら抗原のエピトープマッピングを記載している。

【0019】

B7抗原の高発現が自己免疫疾患と相関関係を有することが何人かの研究者によって示されている。たとえば、イオネスコーチルゴビスト(Ionesco-Tirgoviste)ら[Med. Interre、24(1)、11~17(1986)]は、1型インスリン依存性糖尿病での増大したB7抗原発現を報告している。また、乾癬患者から得た皮膚樹状細胞上でのB7抗原の関与が報告されている[ネスル(Nestle)ら、J. Clin. Invest.、94(1)、202~209(1994)]。

10

【0020】

さらに、アフィニティー精製した可溶性HLA-B7を用いた抗HLA-B7同種反応性CTLの抑制が文献で報告されている[ザバザバ(Zavazava)ら、Transplantation、51(4)、838~42(1991)]。さらに、動物モデルにおいてB7活性を阻止するためのB7受容体可溶性リガンドCTLA-4-Igの使用[たとえば、レンショーら、Science、257、789、7955(1992)を参照]およびB7を抑制しうるB7-1-Ig融合タンパク質が報告されている。

【0021】

本発明の目的は、ヒトB7抗原、より詳しくはヒトB7.1抗原および/またはヒトB7.2抗原に対する新規なマーカーザル抗体を製造および同定することにある。

20

【0022】

さらに詳しくは、本発明の目的は、ヒトB7抗原、すなわちヒトB7.1抗原またはB7.2抗原で免疫したサルから得たBリンパ球を用いたファージ提示ライブラリーおよび/またはサルヘテロハイブリドーマのスクリーニングによる、ヒトB7抗原、すなわちヒトB7.1抗原およびヒトB7.2抗原に対する新規なマーカーザル抗体の製造および同定にある。

【0023】

本発明の他の特別の目的は、ヒトB7.1抗原および/またはB7.2抗原に特異的に結合し、B7/CD86経路および活性化T細胞のB7刺激を抑制することによりIL-2産生およびT細胞増殖を抑制し有効な免疫抑制剤として機能する、抗B7サルモノクローナル抗体およびその霊長類化形態を提供することにある。

30

【0024】

本発明の他の目的はまた、ドナー脾臓細胞培養中での抗原誘発応答、たとえば、抗原特異的なIgG応答、IL-2産生および細胞増殖を抑制する、抗ヒトB7.1および抗ヒトB7.2サルモノクローナル抗体およびその霊長類化形態を提供することにある。

【0025】

本発明の他の目的はまた、有利な特性、すなわち親和性、免疫抑制活性を有する、治療剤として有用な、ヒトB7.1抗原およびヒトB7.2抗原に特異的な特定のサルモノクローナル抗体およびその霊長類化形態を同定することにある。さらに詳しくは、これらサル抗体およびその霊長類化形態は、たとえば免疫抑制剤として、すなわち抗原誘発免疫応答を阻止するため、自己免疫疾患(乾癬、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス(SLE)、1型糖尿病、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)など)を治療するため、および臓器移植拒絶を防ぐために用いることができる。

40

【0026】

本発明の他の目的は、ヒトB7抗原、すなわちヒトB7.1抗原および/またはヒトB7.2抗原に特異的な1またはそれ以上のサルモノクローナル抗体、またはその霊長類化形態および薬理的に許容しうる担体または賦形剤を含む医薬組成物を提供することにある。これら組成物は、たとえば、自己免疫疾患、たとえば、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)や全身性エリテマトーデス(SLE)を治療するため、抗原誘発免疫応答を阻止するため、および移植受容者における臓器移植拒絶を防ぐための免疫抑制剤として用いられ

50

るであろう。

【 0 0 2 7 】

本発明の他の目的は、ヒト B 7 抗原、すなわちヒト B 7 . 1 抗原および / またはヒト B 7 . 2 抗原に特異的に結合する 1 またはそれ以上のサルまたは霊長類化モノクローナル抗体の治療学的有効量を投与することによる新規な治療方法を提供することにある。そのような治療方法は、B 7 : C D 2 8 経路の抑制により治療可能な疾患、たとえば、特発性血小板減少性紫斑病 (I T P)、全身性エリテマトーデス (S L E)、1 型糖尿病、乾癬、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、再生不能性貧血などの自己免疫疾患の治療、並びに移植患者において移植拒絶を防ぐために有用である。

【 0 0 2 8 】

本発明のさらに他の目的は、ヒト B 7 . 1 抗原および / または B 7 . 2 抗原に特異的なサルモノクローナル抗体の少なくとも可変重鎖および軽鎖ドメインを発現するトランスフェクタント、たとえば C H O 細胞を提供することにある。

【 0 0 2 9 】

本発明の他の目的は、ヒト B 7 . 1 抗原および / またはヒト B 7 . 2 抗原に特異的なサルモノクローナル抗体の可変重鎖および / または軽鎖ドメインをコードする核酸配列、およびこれら核酸配列を含む、霊長類化抗体の発現を提供する発現ベクターを提供することにある。

【 0 0 3 0 】

本発明を一層明確に理解できるように下記術語を定義する。

枯渇 (Depleting) 抗体 : 活性化 B 細胞または他の抗原提示細胞を殺す抗体。

【 0 0 3 1 】

非枯渇 (Non - depleting) 抗体 : B 7 と T 細胞活性化リガンド C D 2 8 および C T L A - 4 とのコスティミュラトリ作用を阻止する抗体。それゆえ、この抗体は免疫性を減少させる (anergizes) が抗原提示細胞を排除はしない。

【 0 0 3 2 】

霊長類化抗体 : サル抗体、とりわけカニクイザル抗体の可変重鎖および軽鎖ドメインを含み、ヒト定常ドメイン配列、好ましくはヒト免疫グロブリンガンマ 1 またはガンマ 4 定常ドメイン (または P E 変異体) を含むように設計した組換え抗体。かかる抗体の調製は、ニューマンら (1 9 9 2)、「ヒト疾患の免疫療法のための組換え抗体の霊長類化 : ヒト C D H に対するマーカーザル / ヒトキメラ抗体」、B i o t e c h n o l o g y、1 0 : 1 4 5 8 ~ 1 4 6 0 ; および本願と同じ出願人に係る米国特許出願第 0 8 / 3 7 9 , 0 7 2 号 (両文献を参照のため本明細書中にその全体を引用する) に記載されている。これら抗体は、ヒト抗体と高程度の高モロロジー、すなわち 8 5 ~ 9 8 % の高モロロジーを示し、ヒトエフェクター機能を示し、免疫原性が減少しており、ヒト抗原に対して高い親和性を示すことが報告されている。

【 0 0 3 3 】

B 7 抗原 : 本願における B 7 抗原は、たとえばヒト B 7 . 1 抗原および B 7 . 2 抗原を含む。これら抗原は C D 2 8 および / または C T L A - 4 に結合する。これら抗原は T 細胞活性化においてコスティミュラトリ機能を有する。また、これら抗原はすべて、細胞外免疫グロブリンスーパーファミリー V および C 様ドメイン、疎水性膜貫通領域および細胞質テールを含み [フリーマンら、S c i e n c e、2 6 2 : 9 0 9 (1 9 9 3) を参照]、高度にグリコシル化されている。

【 0 0 3 4 】

抗 B 7 抗体 : ヒト B 7 抗原、たとえばヒト B 7 . 1 抗原および / または B 7 . 2 抗原に十分な親和性にて特異的に結合して B 7 : C D 2 8 相互作用を阻止し、それによって免疫抑制を誘発するサルモノクローナル抗体またはその霊長類化形態。

【 0 0 3 5 】

【 図面の簡単な説明 】

図 1 は、マーカーザル免疫グロブリン配列に基づくプライマーを含む、繊維状ファージの

10

20

30

40

50

表面に示された B 7 に対して産生された組換え免疫グロブリンライブラリーをスクリーニングするのに用いる p M S ベクターを示す。

図 2 は、本願発明のヒト B 7 . 1 抗原に特異的な霊長類化抗体を発現させるのに用いる N E O S P L A 発現ベクターを示す。

図 3 は、トランスフェクションした C H O 細胞上の細胞表面 B 7 . 1 に対して向けられたサル血清抗 B 7 . 1 力価を示す。

図 4 は、非標識 S B 7 および M a b L 3 0 7 . 4 マウス抗 B 7 . 1 の存在下での S B 7 . 1 アフィニティー精製サル抗体による放射性標識 s B 7 . 1 結合の抑制を示す。

図 5 は、アフィニティー精製 S B 7 . 1 との競合による、放射性標識サル 1 3 5 および L 3 7 0 7 . 4 抗 B 7 . 1 抗体の B 7 陽性ヒト S B 細胞への結合の抑制を示す。

図 6 は、非標識 S B 7 . 1 マウス抗 B 7 . 1 (L 3 0 7 . 4) およびサル 1 1 2 7 アフィニティー精製血清抗体との競合による、放射性標識 B 7 - I g の活性化ヒト末梢血 T 細胞への結合の抑制を示す。

図 7 は、抗 B 7 . 1 アフィニティー精製サル血清抗体による、混合リンパ球培養液中の I L - 2 タンパク質の抑制を示す。

図 8 a は、7 C 1 0 の軽鎖の霊長類化形態のアミノ酸配列および核酸配列を示す。

図 8 b は、7 C 1 0 の重鎖の霊長類化形態のアミノ酸配列および核酸配列を示す。

図 9 a は、7 B 6 の軽鎖の霊長類化形態のアミノ酸配列および核酸配列を示す。

図 9 b は、7 B 6 の重鎖の霊長類化形態のアミノ酸配列および核酸配列を示す。

図 1 0 a は、霊長類化軽鎖 1 6 C 1 0 のアミノ酸配列および核酸配列を示す。

図 1 0 b は、霊長類化重鎖 1 6 C 1 0 のアミノ酸配列および核酸配列を示す。

【 0 0 3 6 】

上記のように、本発明は、ヒト B 7 . 1 抗原および / またはヒト B 7 . 2 抗原に特異的に結合する新規なサルモノクローナル抗体、並びにそれから得られる霊長類化抗体の製造に関する。これら抗体はヒト B 7 . 1 および / または B 7 . 2 に対する高い親和性を有し、それゆえ B 7 : C D 2 8 経路を抑制する免疫抑制剤として用いることができる。

【 0 0 3 7 】

サルモノクローナル抗体の調製は、ファージ提示ライブラリーのスクリーニングにより、または B 7 (たとえば、ヒト B 7 . 1 および / または B 7 . 2) で免疫したサルから得た B リンパ球を用いたサルヘテロハイブリドーマの調製により、行うことができる。

【 0 0 3 8 】

記載のように、抗 B 7 抗体の第一の製造方法は、組換えファージ提示技術を含む。この技術は一般に上記文献に記載されている。

【 0 0 3 9 】

本質的に、この技術は、繊維状ファージの表面上に提示された B 7 抗原に対する組換え免疫グロブリンライブラリーを合成し、B 7 . 1 抗原および / または B 7 . 2 抗原に対する高い親和性を有する抗体を分泌するファージを選択することを含むであろう。上記に記載したように、ヒト B 7 . 1 および B 7 . 2 の両者に結合する抗体を選択するのが好ましいであろう。かかる方法を行うため、本発明者らは組換えの可能性を減少させ安定性を改善したサルライブラリーのための独特のライブラリーを作成した。このベクター p M S は以下に詳細に記載するが、図 1 に示してある。

【 0 0 4 0 】

本質的に、マーカーザルライブラリーに使用するファージ提示を採用するため、このベクターはサル免疫グロブリン遺伝子を P C R 増幅するための特定のプライマーを含んでいる。これらプライマーは、霊長類化技術を開発する際に得られるマーカーザル配列およびヒト配列を含むデータベースに基づく。

【 0 0 4 1 】

適当なプライマーは、本願と同じ出願人に係る米国特許出願第 0 8 / 3 7 9 , 0 7 2 号 (参照のため本明細書中に引用する) に開示されている。

【 0 0 4 2 】

第二の方法は、ヒト B 7 抗原、好ましくはヒト B 7 . 1 抗原および B 7 . 2 抗原に対してサル、すなわちマカークザルを免疫することを含む。マカークザルをモノクローナル抗体の再生に使用することの本来的な利点は上記に記載してある。とりわけ、かかるサル、すなわちカニクイザルはヒト抗原または受容体に対して免疫することができる。さらに、得られた抗体は、ニューマンら、B i o t e c h n o l o g y、1 0、1 4 5 5 ~ 1 4 6 0 (1 9 9 2) およびニューマンらの本願と同じ出願人に係る米国特許出願第 0 8 / 3 7 9 , 0 7 2 号 (1 9 9 5 年 1 月 2 5 日出願) (その全体を参照のため本明細書中に引用する) に記載の方法に従って霊長類化抗体を作成するのに用いることができる。

【 0 0 4 3 】

カニクイザルから得られる抗体の有意な利点は、これらサルが多くのヒトタンパク質を異物として認識し、それゆえ所望のヒト抗原、たとえばヒト表面タンパク質および細胞受容体に対して高い親和性を有する抗体を作成できることである。さらに、カニクイザルはヒトと系統発生的に近接しているため、それから得られる抗体はヒトで産生される抗体と高度のアミノ酸ホモロジーを示す。上記に記載したように、マカークザルの免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域遺伝子の配列決定したところ、各遺伝子ファミリーの配列はヒトの対応配列と 8 5 ~ 8 8 % 相同であることがわかった (ニューマンら (1 9 9 2)、上掲)。

【 0 0 4 4 】

本質的に、カニクイザルにヒト B 7 抗原、たとえばヒト B 7 . 1 抗原および / またはヒト B 7 . 2 抗原を投与し、それから B 細胞を単離し、たとえばリンパ節生検を該動物から採取し、ついでポリエチレングリコール (P E G) を用いて B リンパ球を K H 6 / B 5 (マウス x ヒト) と融合させる。ついで、ヒト B 7 抗原、たとえばヒト B 7 . 1 抗原および / またはヒト B 7 . 2 抗原に結合する抗体を分泌するヘテロハイブリドーマを同定する。

【 0 0 4 5 】

B 7 . 1 および B 7 . 2 の両者に結合する抗体が望ましい。なぜなら、そのような抗体は、B 7 と同様に B 7 . 1 および B 7 . 2 とその対応受容体、すなわちヒト C T L A - 4 および C D 2 8 との相互作用を抑制するのに用いることができるからである。これらエピトープに対する抗体は、ヒト B 7 . 1 およびヒト B 7 . 2 の両者が T 細胞上の対応受容体と相互作用するのを抑制する。このことは、相乗作用を付与する可能性がある。

【 0 0 4 6 】

しかしながら、ヒト B 7 抗原、B 7 . 1 抗原または B 7 . 2 抗原の一方のみに結合する抗体もまた、これら分子がともに T 細胞活性化、クローン拡張、リンホカイン (I L - 2) 分泌、および抗原に対する応答性に関与することから非常に望ましい。ヒト B 7 . 1 および B 7 . 2 の両者がヒト C T L A - 4 および C D 2 8 に結合するなら、おそらく、それに対してマカークザル抗体が潜在的に産生される少なくとも一つの共通したまたは相同な領域 (おそらく、共通する立体配置エピトープ) が存在するに違いない。

【 0 0 4 7 】

本発明者らは、マカークザルの免疫を、C H O 細胞中で産生され L 3 0 7 . 4 - セファロースアフィニティーカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した組換え可溶性 B 7 . 1 抗原に対して行うことを選択した。しかしながら、特定の投与 B 7 抗原および潜在的に他の B 7 抗原に対して特異的な抗体応答となるに十分な純度を有する限りにおいて、ヒト B 7 抗原、ヒト B 7 . 1 抗原またはヒト B 7 . 2 抗原の特定の採取源は重要ではない。

【 0 0 4 8 】

ヒト B 7 抗原、ヒト B 7 . 1 抗原 (C D 8 0 と称される) 遺伝子およびヒト B 7 . 2 抗原 (C D 8 6 と称される) 遺伝子はクローニングおよび配列決定されており、それゆえ組換え法により容易に製造することができる。

【 0 0 4 9 】

好ましくは、投与するヒト B 7 抗原、ヒト B 7 . 1 抗原および / またはヒト B 7 . 2 抗原は、たとえば膜貫通ドメインと細胞質ドメインを除去することによって細胞外部分、すな

10

20

30

40

50

わち細胞外スーパーファミリーVおよびC様ドメインのみを有するB7、B7.1またはB7.2遺伝子を発現させることにより、可溶性の形態で投与されるであろう[たとえば、グルメット(Grumet)ら、Hum. Immunol.、40(3)、228~234、1994(可溶性形態のB7の発現を教示する；参照のためその全体を本明細書中に引用する)を参照]。

【0050】

マーカーザルをB7抗原、B7.1抗原および/またはB7.2抗原、好ましくはその可溶性形態で、これら抗原に対する抗体が産生される条件下にて免疫するであろう。好ましくは、可溶性のヒトB7抗原、B7.1抗原またはB7.2抗原をアジュバント、たとえばフロントの完全アジュバント(CFA)、アルミニウム、サポニンまたは他の公知のアジュバント並びにそれらの組み合わせとともに投与されるであろう。一般に、これには、たとえば繰り返し注射することにより数カ月にわたって繰り返し免疫することが必要であろう。たとえば、可溶性のB7.1抗原の投与をアジュバント中でブースター免疫とともに3~4カ月間行い、ヒトB7.1抗原に結合する抗体を含む血清を生成した。

10

【0051】

免疫後、B細胞をたとえば免疫動物からリンパ節生検を採取することにより回収し、ポリエチレングリコールを用いてB細胞をKH6/B5(マウス×ヒト)ヘテロハイブリドーマと融合させる。かかるヘテロハイブリドーマの作成方法は知られており、1995年1月25日に出版されたニューマンらの米国特許出願第08/379,072号(参照のため本明細書中に引用する)に記載されている。

20

【0052】

ついで、ヒトB7、B7.1および/またはB7.2に結合する抗体を分泌するヘテロハイブリドーマを同定する。このことは公知技術により行うことができる。たとえば、このことは酵素または放射性核種で標識したヒトB7、B7.1および/またはB7.2を用いたELISAまたはラジオイムノアッセイにより決定することができる。

【0053】

ついで、ヒトB7、B7.1および/またはB7.2抗原に対する所望の特異性を有する抗体を分泌する細胞株をサブクローニングしてモノクローナル化する。

【0054】

本発明においては、本発明者らは、ELISAアッセイにおける可溶性B7.1抗原コーティングプレート、抗原陽性B7.1細胞、および細胞表面上にヒトB7.1抗原を発現するCHOトランスフェクタントに結合する能力について精製抗体をスクリーニングした。さらに、混合リンパ球反応(MLR)におけるIL-2産生およびトリチウム化チミジンの取り込みにより測定されるように(B7結合は125I放射性標識した可溶性B7.1(SB7.1)を用いて検出)、B細胞/T細胞相互作用を阻止する能力について抗体をスクリーニングした。

30

【0055】

また、マーカーザルからのアフィニティー精製した抗体を、B7.1/Ig融合タンパク質を発現するCHOトランスフェクタントに対する反応性、およびヒトB7.2抗原を産生するCHO細胞に対する反応性について試験した。これら結果は、B7.1免疫血清がB7.2トランスフェクトーマに結合することを示した。B7.2抗原への抗体の結合は、可溶性のB7.2-Ig試薬を用いて確認することができる。実施例に記載するように、このことは、B7.2-Ig-セファロースアフィニティーカラムを調製するのに十分な量でB7.2-IgをCHOトランスフェクトーマから調製および精製することにより行う。B7.2に交差反応する抗体はB7.2-Ig-セファロースカラムに結合するであろう。

40

【0056】

ついで、ヒトB7抗原、B7.1抗原および/またはB7.2抗原に特異的に結合する抗体を発現する細胞株を用い、本質的にニューマンら(1992)、上掲、および1995年1月25日に出版されたニューマンらの米国特許出願第08/379,072号(とも

50

に参照のため本明細書中に引用する)に記載されたようにして霊長類化抗体を作成するために可変ドメイン配列をクローニングする。本質的に、このことには、該細胞株からのRNAの抽出、cDNAへの変換、およびIg特異的プライマーを用いたPCRによる増幅が含まれる。適当なプライマーは、ニューマンら(1992)、上掲、および米国特許出願第08/379,072号明細書(とりわけ、米国特許出願第08/379,072号の図1を参照)に記載されている。

【0057】

ついで、クローニングしたサル可変遺伝子を、ヒト重鎖および軽鎖定常領域遺伝子を含む発現ベクター中に挿入する。好ましくは、このことはIDEC, Inc.の特許発現ベクターであるNEOSPLAを用いて行う。このベクターは図2に示してあり、サイトメガロウイルスプロモーター/エンハンサー、マウスグロビン主要プロモーター、SV40の複製起点、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼエクソン1およびエクソン2、ヒト免疫グロブリンまたは定常領域、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子、ヒト免疫グロブリン1または4PE定常領域およびリーダー配列を含む。このベクターは、サル可変領域遺伝子の導入、CHO細胞中でのトランスフェクション、ついでG418含有培地中での選択およびメトトレキセート増幅の後に非常に高レベルの霊長類化抗体が発現されることがわかった。

【0058】

たとえば、この発現系は、これまでにCD4その他のヒト細胞表面受容体に対して高い結合活性(K_d 10 - 10 M)を有する霊長類化抗体が得られることが開示されている。さらに、これら抗体は、もともとのサル抗体と同じ親和性、特異性および機能的活性を示すことがわかっている。このベクター系は、本願と同じ出願人に係る米国特許出願第379,072号(参照のため本明細書中に引用する)、および1993年11月3日に出願された米国特許出願第08/149,099号(参照のためその全体を本明細書中に引用する)に実質的に開示されている。この系は高発現レベル、すなわち > 30 pg/細胞/日を提供する。

【0059】

以下に記載するように、本発明者らは、B7.1抗原に特異的に結合し、B7.2抗原にも結合する4つの先導(lead)候補サルモノクローナル抗体を選択した。これらサルモノクローナル抗体は、本明細書において7B6、16C10、7C10および20C9と称する。

【0060】

以下にさらに詳細に記載するように、これら抗体を、T細胞結合についてのT細胞結合実験のための混合リンパ球反応中でのIL-2産生およびトリチル化チミジンの取り込みによって測定されるように、B細胞/T細胞相互作用を阻止する能力について評価し、ヒト体コート(human body coat)末梢血リンパ球をPHA刺激物質の存在下で3~6日間培養した。B7結合を125I-放射性標識した可溶性B7.1を用いてラジオアッセイした。観察した結果は、減少したIL-2産生および混合リンパ球培養の減少した増殖により示されるように、これらすべての抗体がB7.1抗原と高い親和性にて結合し、B細胞/T細胞相互作用を有効に阻止することを示す。

【0061】

これら特定のサルモノクローナル抗体の特性は、まとめると以下のとおりである。

【0062】

1. これらサル抗体がCTLA4-Ig間の物理的相互作用を阻止する能力を示すため、種々の濃度のサル抗B7.1抗体および非標識CTLA4-Igを放射性標識したCTLA4-Ig I 125とともにインキュベートした。抑制アッセイの結果は、サル抗体のIC50(50%抑制となるインヒビターの濃度)が以下のとおりであることを示した:

- a: 7C10: 0.39 μ g/M1
- b: 16C10: 1.60 μ g/M1
- c: 20C9: 3.90 μ g/M1

10

20

30

40

50

d : 7 B 6 : 3 9 . 0 μ g / M 1

【 0 0 6 3 】

2 . スキャッチャード分析は、B 7 - I g コーティングプレートに結合したサル抗体の見かけの親和定数 (K d) がおよそ以下のとおりであることを示した :

a : 7 C 1 0 : 6 . 2 $\times 10^{-9}$ M

b : 1 6 C 1 0 : 8 . 1 $\times 10^{-9}$ M

c : 7 B 6 : 1 0 . 7 $\times 10^{-9}$ M

d : 2 0 C 9 : 1 6 . 8 $\times 10^{-9}$ M

【 0 0 6 4 】

3 . 抗体を混合リンパ球反応アッセイ (M L R) においてインビトロで試験した。M L R は、4 つのすべての抗 B 7 . 1 抗体が下記 I b g o 値に示されるように異なる程度に I L - 2 産生を抑制することを示した :

a : 7 B 6 : 5 . 0 μ g / M

b : 1 6 C 1 0 : < 0 . 1 μ g / M

c : 2 0 C 9 : 2 . 0 μ g / M

d : 7 C 1 0 : 5 . 0 μ g / M

【 0 0 6 5 】

4 . サル抗 B 7 . 1 抗体を、ヒト末梢血リンパ球 (P B L) 上の B 7 に結合する能力について試験した。F A C S 分析は、4 つのすべてのサル抗体が陽性であることを示した。

【 0 0 6 6 】

5 . サル抗体 1 6 C 1 0 、 7 B 6 、 7 C 1 0 および 2 0 C 9 を F A C S 分析により C 1 q 結合について試験した。その結果は、B 7 . 1 C H O トランスフェクション細胞とともにインキュベートした後に 7 C 1 0 サル I g が強いヒト C 1 q 結合を有することを示した。1 6 C 1 0 は陽性であったが、2 0 C 9 および 7 B 6 サル抗体は陰性であった。

【 0 0 6 7 】

6 . 病理 - 毒性 (path-tox) 研究のための動物モデルを選択するため、異なる種からの動物血でサル抗体を試験した。サル抗 B 7 . 1 抗体は、ヒト、チンパンジーおよびおそくヒヒと交差反応した。

【 0 0 6 8 】

これら特性に基づき、3 つのサルモノクローナル抗体、1 6 C 1 0 、 7 C 1 0 および 2 0 C 9 が最も有利な特性を備えていると思われ、そのうちでも 1 6 C 1 0 および 7 C 1 0 は 2 0 C 9 に比べて若干優れていた。

【 0 0 6 9 】

上記技術および本願と同じ出願人に係る米国特許出願第 0 8 / 3 7 9 , 0 7 2 号に開示された技術を用い、本発明者らは 7 C 1 0 、 7 B 6 および 1 6 C 1 0 の可変ドメインをクローニングし、7 C 1 0 軽鎖、7 C 1 0 重鎖、7 B 6 軽鎖、7 B 6 重鎖、1 6 C 1 0 軽鎖および 1 6 C 1 0 重鎖の霊長類化形態のアミノ酸配列および核酸配列を提供する。これらアミノ酸配列および核酸配列は、図 8 a および 8 b 、 9 a および 9 b 、 および 1 0 a および 1 0 b に示されている。ヒトガンマ 1 定常ドメインの D N A 配列およびアミノ酸配列は米国特許出願第 0 8 / 3 7 9 , 0 7 2 号に記載されている。

【 0 0 7 0 】

上記に記載したように、これら霊長類化抗体は図 2 に示した N E O S P L A 発現ベクター (実質的に、本願と同じ出願人に係る米国特許出願第 0 8 / 3 7 9 , 0 7 2 号および 0 8 / 1 4 9 , 0 9 9 号 (両出願を参照のため本明細書中に引用する) に記載されている) を用いて発現させるのが好ましい。

【 0 0 7 1 】

上記で記載したように、本発明の霊長類化抗体はヒト免疫グロブリンガンマ 1 またはガンマ 4 定常領域のいずれかを含むのが好ましく、ガンマ 4 は 2 つの位置にて突然変異させてガンマ 4 P E を作成するのが好ましいであろう。このガンマ 4 P E 変異体は 2 つの変異、すなわち残留 F C R 結合を排除するために導入した C H 2 領域中のグルタミン酸、および

10

20

30

40

50

重鎖ジスルフィド結合相互作用の安定性を増大させることを意図したヒンジ領域におけるプロリン置換を含んでいる [アレグル (Alegre) ら、J. Immunol.、148、3461 ~ 3468 (1992) ; およびエンジェル (Angel) ら、Mol. Immunol.、30、105 ~ 158 (1993) ; とともに参照のため本明細書中に引用する]。

【0072】

本発明の霊長類化抗体がガンマ1、ガンマ4またはガンマ4 P E 定常領域のいずれを含むかは、特定の疾患標的にほぼ依存する。好ましくは、枯渇および非枯渇霊長類化 I g G 1 および I g G 4 抗体を作成し、特定の疾患標的に対して試験する。

【0073】

本発明のサルモノクローナル抗体が上記結合特性および機能的特性を有するとするなら、これら抗 B 7 . 1 モノクローナル抗体およびその霊長類化形態は B 7 : C D 2 8 相互作用を阻止するための治療剤として十分に適しているに違いなく、かくして免疫抑制剤が提供される。とりわけ、混合リンパ球培養における I L - 2 産生およびトリチウム化チミジンの取り込みによって測定されるような B 7 . 1 抗原への高親和性および B 細胞 / T 細胞相互作用を阻止する能力、並びに減少した抗原特異的 I g G 応答、I L - 2 産生および細胞増殖によって示されるようなドナー脾臓細胞培養において抗原誘発応答を有効に抑制する能力を有するとするなら、これらサルモノクローナル抗体およびその霊長類化形態は B 7 : C D 2 8 経路を調節する有効な免疫抑制剤として機能するに違いない。このことは、免疫抑制が治療上望ましい多くの疾患、たとえば自己免疫疾患を治療するため、望ましくない抗原特異的 I g G 応答を抑制するため、および臓器移植拒絶および移植片対宿主病を防ぐために重要である。本質的に、本発明の抗体は、B 7 : C D 2 8 経路の抑制が治療上望ましいあらゆる疾患を治療するうえで有用であろう。

【0074】

本発明の抗 B 7 . 1 抗体の重要な治療適応症としては、例として、特発性血小板減少性紫斑病 (I T P) 、全身性エリテマトーデス (S L E) 、1 型糖尿病、多発性硬化症、再生不能性貧血、乾癬および慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患が挙げられる。

【0075】

本発明の抗 B 7 . 1 抗体の他の治療適応症は、臓器移植および骨髄移植 (B M T) の際の移植片対宿主病 (G V H D) を防ぐことである。本発明の抗体は、ドナー特異的な同種抗原に対する宿主寛容を誘発し、それによって移植を容易にし、移植拒絶の発生を低減するのに用いることができる。同種抗原心臓移植のマウスモデルにおいて、C T L A 4 - I g の静脈内投与が免疫抑制あるいは同種抗原に対する寛容の誘発とさえなりうることを示されている [リン (L i n) ら、J. Exp. Med. 178] 1801、1993 ; トルカ (T o r k a) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A、89 : 11102、1992]。本発明の霊長類化抗 B 7 . 1 抗体は同様またはそれ以上の活性を示すであろうことが期待される。

【0076】

上記方法によりまたは同等の技術により産生した抗体は、機能的生物学的アッセイにおいて特徴付けるためにアフィニティークロマトグラフィーとサイズ排除クロマトグラフィーとの組み合わせにより精製することができる。これらアッセイには、特異性および結合親和性の決定並びに発現されたイソ型に伴うエフェクター機能、たとえば A D C C 、または補体固定化が含まれる。かかる抗体は、多くのヒト疾患、たとえば、B 細胞リンパ腫、A I D S などの感染疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、および移植に対する受動および能動治療剤として用いることができる。これら抗体は、その天然型か、または抗体 / キレート複合体、抗体 / 薬剤複合体もしくは抗体 / 毒素複合体の一部として用いることができる。さらに、全抗体または抗体フラグメント (F (a b ') ₂、F a b、F v) を造影試薬として、または抗イディオタイプ応答を生成するための能動免疫療法における潜在的なワクチンまたは免疫原として用いることができる。

【0077】

治療効果を得るのに有用な抗体の量は、当業者によく知られた標準法により決定すること

ができる。これら抗体は一般に、標準法により薬理学的に許容しうる緩衝液中にて提供され、所望の経路にて投与できる。本願の請求に係る抗体の有効性およびヒトによる寛容のため、ヒトにおける種々の疾患または疾患状態を治療するためにこれら抗体を繰り返し投与することが可能である。

【0078】

本発明の抗B7.1抗体（またはそのフラグメント）は、免疫抑制を誘発するのに、すなわちヒトまたは動物の免疫系の抑制を誘発するのに有用である。それゆえ、本発明は、本発明の抗体の有効な非毒性量を免疫抑制を必要とするヒトその他の動物に投与することによる、かかるヒトその他の動物において免疫抑制を予防的または治療的に誘発する方法に関する。

10

【0079】

本発明の化合物が免疫抑制を誘発する能力は、この目的のために使用される標準的な試験、たとえば、混合リンパ球反応試験またはチミジンの取り込みにより測定されるT細胞増殖の抑制を測定する試験で示される。

【0080】

本発明の抗体が免疫抑制を誘発するうえで有用性を有するという事実は、本発明の抗体が移植臓器または組織（たとえば、腎臓、心臓、肺、骨髄、皮膚、角膜など）に対する抵抗または拒絶の治療または予防；自己免疫疾患、炎症疾患、増殖性および過増殖性疾患、および免疫学的に媒体された疾患の皮膚症状（たとえば、慢性関節リウマチ、エリテマトーデス、全身性エリテマトーデス、橋本甲状腺炎、多発性硬化症、重症筋無力症、1型糖尿病、ぶどう膜炎、ネフローゼ症候群、乾癬、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、およびさらなる（further）湿疹性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、偏平苔せん、天疱瘡、水泡性天疱瘡、表皮水泡症、蕁麻疹、血管浮腫、脈管炎、紅斑、皮膚好酸球増加症、円形脱毛症など）の治療または予防；可逆性閉塞性気道疾患（reversible obstructive airways disease）、胃腸炎症およびアレルギー（たとえば、小児脂肪便症、直腸炎、好酸球増加性胃腸炎、肥満細胞症、クローン病および潰瘍性大腸炎）および食物関連アレルギー（たとえば、偏頭痛、鼻炎および湿疹）の治療に有用であるに違いないことを示している。

20

【0081】

当業者であれば日常的な実験により、免疫抑制を誘発する目的のための抗体の有効かつ非毒性の量を決定できるであろう。しかしながら、一般に、有効投与量は1日当たり体重1

30

【0082】

kg当たり約0.05～100mgの範囲であろう。本発明の抗体（またはそのフラグメント）はまた、哺乳動物において腫瘍を治療するうえでも有用であるに違いない。一層詳しくは、本発明の抗体は、腫瘍のサイズを小さくし、腫瘍の増殖を抑制し、および/または腫瘍を有する動物の生存時間を延ばすのに有用であるに違いない。さらに、本発明はまた、ヒトその他の動物に有効かつ非毒性量の抗体を投与することによるヒトその他の動物における腫瘍の治療方法にも関する。当業者であれば日常的な実験により、発癌性腫瘍を治療する目的のための抗B7抗体の有効かつ非毒性の量を決定できるであろう。しかしながら、一般に、有効投与量は1日当たり体重1kg当たり約0.05～100mgの範囲であることが期待される。

40

【0083】

本発明の抗体は、上記治療方法に従い、治療または予防効果が期待できる程度に十分な量にてヒトその他の動物に投与することができる。かかる本発明の抗体は、公知技術に従って本発明の抗体を通常の薬理学的に許容しうる担体または希釈液と混合することにより調製した通常の剤型にて、かかるヒトその他の動物に投与することができる。当業者であれば薬理学的に許容する担体または希釈液の形態および特性が、混合する活性成分の量、投与経路および他のよく知られた変量によって決定されることが認識されるであろう。

【0084】

本発明の抗体（またはそのフラグメント）の投与経路は、経口、非経口、吸入または局所投与であってよい。本明細書において用いる非経口なる術語は、静脈内、腹腔内、筋肉内

50

、皮下、直腸内または腔内投与を含む。皮下および筋肉内形態の非経口投与が一般に好ましい。

【0085】

本発明の化合物を予防的または治療的に免疫抑制を誘発するためまたは発癌性腫瘍を治療するために用いる際の毎日の非経口および経口投与計画は、一般に1日当たり体重1kg当たり約0.05～100mgの範囲だが、約0.5～10mgの範囲であるのが好ましいであろう。

【0086】

本発明の抗体はまた吸入によっても投与することができる。「吸入」とは鼻内および経口吸入投与を意味する。かかる投与に適した剤型、たとえばエアロゾル製剤や定量吸入器(metered dose inhaler)などは通常の技術により製造できる。本発明の化合物の好ましい投与量は、一般に約10～100mgの範囲である。本発明の抗体はまた、局所投与することもできる。局所投与とは非全身投与をいい、本発明の抗体(またはそのフラグメント)化合物を表皮や頬面窩洞に外用したり、かかる抗体を眼、耳および鼻や血流に実質的に浸入しない場所に点滴注入することを含む。全身投与とは、経口、静脈内、腹腔内および筋肉内投与を意味する。治療または予防効果を得るのに必要な抗体の量は、もちろん、選択した抗体、治療しようとする状態の性質および重篤度および治療を受ける動物により変わるであろうが、最終的には医師の裁量による。本発明の抗体の局所投与の適当な投与量は、一般に1日当たり体重1kg当たり約1～100mgの範囲であろう。

【0087】

製剤

本発明の抗体またはそのフラグメントは単独でも投与することが可能であるが、医薬製剤として投与することが好ましい。活性成分は、局所投与の場合、医薬製剤の0.001～10%w/w、たとえば1重量%～2重量%を構成してよいが、10%w/wを構成してもよく、好ましくは医薬製剤の5%w/wを越えない量、さらに好ましくは0.1～1%w/wである。

【0088】

本発明の局所製剤は、活性成分を1またはそれ以上の許容しうる担体および任意の他の治療成分とともに含む。担体は、製剤の他の成分と適合し、適用者に有害でないという意味で「許容しうる」ものでなければならない。

【0089】

局所投与に適した製剤としては、リニメント剤、ローション剤、クリーム剤、軟膏またはパスタ剤などの治療が必要な部位へ皮膚を通して浸透していくのに適した液状または半液状の製剤、および眼、耳または鼻に投与するのに適した滴剤が含まれる。

【0090】

本発明による滴剤は滅菌した水性または油性の溶液または懸濁液を含み、殺菌剤および/または殺真菌剤および/または他の適当な保存剤の適当な水溶液(好ましくは表面活性剤を含む)中に活性成分を溶解することにより調製できる。ついで、得られた溶液を濾過により清澄化し、適当な容器に移し、ついでこれを密封し、90～100℃にて半時間オートクレーブまたは維持することにより滅菌する。別法として、溶液を濾過により滅菌し、無菌技術により容器に移す。滴剤中に含めるのに適した殺菌剤および殺真菌剤の例は、硝酸フェニル水銀または酢酸フェニル水銀(0.002%)、塩化ベンザルコニウム(0.01%)および酢酸クロルヘキシジン(0.01%)である。油性溶液を調製するのに適した溶媒には、グリセリン、希アルコールおよびプロピレングリコールが含まれる。

【0091】

本発明によるローション剤には、皮膚または眼に適用するのに適したものが含まれる。眼用ローション剤は、任意に殺菌剤を含む滅菌水溶液を含み、滴剤の調製と同様の方法により調製できる。皮膚に適用するローション剤またはリニメント剤はまた、アルコールやアセトンなどの乾燥促進剤や皮膚冷却剤、および/またはグリセリンなどの加湿剤またはヒマシ油や落花生油などの油をも含む。

【 0 0 9 2 】

本発明によるクリーム剤、軟膏またはパスタ剤は、活性成分の外用のための半固形製剤である。これら製剤は、微細に粉碎したまたは粉末形態の活性成分を単独で、または水性もしくは非水性流体中の溶液または懸濁液中にて、適当な機械の助けを借りて脂肪性 (greasy) または非脂肪性 (non-greasy) 基剤を用いて混合することにより調製できる。基剤は、固形パラフィン、軟パラフィンまたは流動パラフィン、グリセリン、蜜蝋、金属石鹸などの炭水化物；粘漿薬；扁桃油、トウモロコシ油、落花生油、ヒマシ油またはオリーブ油などの天然起源の油；羊毛脂もしくはその誘導体、またはステアリン酸やオレイン酸などの脂肪酸をプロピレングリコールやマクロゴールなどのアルコールとともに含む。製剤は、陰イオン性、陽イオン性または非イオン性界面活性剤などの適当な界面活性剤、たとえば、ソルビタンエステルまたはそのポリオキシエチレン誘導体などを含んでいてよい。天然ゴム、セルロース誘導体または無機物質 (シリカ (silicaceous silicas) などの懸濁化剤、およびラノリンなどの他の成分も含まれていてよい。本発明の抗 B 7 . 1 抗体またはそのフラグメントはまた、B 7 : C D 2 8 経路を調節する他の分子 (moieties) とともに投与することもできる。かかる分子としては、その例として、I L - 7 や I L - 1 0 などのサイトカイン、C T L A 4 - I g、可溶性 C T L A 4 および抗 C D 2 8 抗体およびそのフラグメントが挙げられる。

10

【 0 0 9 3 】

当業者には、本発明の抗体またはそのフラグメントの個々の投与量の最適および期間 (spacing) が治療しようとする状態の性質および程度、投与の形態、経路および部位、および治療しようとする特定の動物により決定されるであろうこと、およびかかる最適が通常の技術により決定されることが認識されるであろう。当業者にはまた、治療の最適コース、すなわち所定日数の間の 1 日あたりに投与する本発明の抗体またはそのフラグメントの投与の回数が治療決定試験 (treatment determination tests) の通常のコースを用いて当業者により評価されることが認識されるであろう。

20

【 0 0 9 4 】

さらに詳述するまでもなく、当業者であれば上記の記載を用いて本発明を最大限に活用することができると思われる。それゆえ、以下に記載する製剤例は例示的な態様を示すのであって、本発明の範囲をいかなる意味においても限定することを意図するものではない。

【 0 0 9 5 】

カプセル組成物

カプセル剤の形態の本発明の医薬組成物は、標準的な 2 片 (two-piece) ハードゼラチンカプセルに粉末形態の本発明の抗体またはそのフラグメント (5 0 m g)、乳糖 (1 0 0 m g)、タルク (3 2 m g) およびステアリン酸マグネシウム (8 m g) を充填することにより調製する。

30

【 0 0 9 6 】

注射可能な非経口組成物

注射により投与するのに適した形態の本発明の医薬組成物は、本発明の抗体またはそのフラグメント (1 . 5 重量%) を 1 0 容量% のプロピレングリコールおよび水の中で攪拌することにより調製する。この溶液を濾過滅菌する。

40

【 0 0 9 7 】

軟膏組成物

本発明の抗体またはそのフラグメントを 1 . 0 g

白色軟パラフィンを 1 0 0 . 0 g まで。

本発明の抗体またはそのフラグメントを少量のビヒクル中に分散させて滑らかな均一な生成物を得る。ついで、この分散液を折り畳み式金属チューブに充填する。

【 0 0 9 8 】

局所クリーム組成物

本発明の抗体またはそのフラグメントを 1 . 0 g

ボラワックス G P 2 0 0 を 2 0 . 0 g

50

無水ラノリンを 2 . 0 g

白色蜜蝋を 2 . 5 g

ヒドロキシ安息香酸メチルを 0 . 1 g

蒸留水を 100 . 0 g まで。

パラワックス、蜜蝋およびラノリンをいっしょに 60 で加熱する。ヒドロキシ安息香酸メチルの溶液を加え、高速で攪拌して均一な溶液とする。ついで、温度を 50 まで下げる。ついで、本発明の抗体またはそのフラグメントを加え、充分に分散させ、ゆっくりとした速度で攪拌して組成物を冷却する。

【0099】

局所ローション組成物

本発明の抗体またはそのフラグメントを 1 . 0 g

ソルビタンモノラウレート 0 . 6 g

ポリソルベート 20 を 0 . 6 g

セトステアリルアルコールを 1 . 2 g

グリセリンを 6 . 0 g

ヒドロキシ安息香酸メチルを 0 . 2 g

精製水 B . P . を 100 - 00 ml (B . P . = 英国薬局方) 。

【0100】

ヒドロキシ安息香酸メチルおよびグリセリンを 75 の水 (70 ml) 中に溶解する。ソルビタンモノラウレート、ポリソルベート 20 およびセトステアリルアルコールをいっしょに 75 で溶融し、上記水溶液に加える。得られた乳濁液をホモジナイズし、連続攪拌して冷却し、本発明の抗体またはそのフラグメントを残りの水中の懸濁液として加える。全懸濁液を均一になるまで攪拌する。

【0101】

点眼組成物

本発明の抗体またはフラグメントを 0 . 5 g

ヒドロキシ安息香酸メチルを 0 . 01 g

ヒドロキシ安息香酸プロピルを 0 . 04 g

精製水 B . P . を 100 - 00 ml

【0102】

ヒドロキシ安息香酸メチルおよびヒドロキシ安息香酸プロピルを 70 ml の精製水に 75 にて溶解し、得られた溶液を静置して冷却する。ついで、本発明の抗体またはそのフラグメントを加え、溶液をメンブレンフィルター (孔径 0 . 022 μ m) で濾過して滅菌し、ついで適当な滅菌容器に無菌的に充填する。

【0103】

吸入投与のための組成物

15 - 20 ml 容のエアロゾル容器用：

本発明の抗体またはそのフラグメント (10 mg) をポリソルベート 85 またはオレイン酸などの滑沢剤 (0 . 2 - 0 . 5 %) と混合し、この混合物をフレオン (好ましくは (1 , 2ジクロロテトラフルオロエタン) とジフルオロクロロメタンとの組み合わせ) などのプロペラント中に分散し、鼻内かまたは経口吸入投与に適合させた適当なエアロゾル容器に入れる。

【0104】

吸入投与のための組成物

15 - 20 ml 容のエアロゾル容器用：

本発明の抗体またはそのフラグメント (10 mg) をエタノール (6 ~ 8 ml) 中に溶解し、ポリソルベート 85 またはオレイン酸などの滑沢剤 (0 . 1 - 0 . 2 %) を加え、このものをフレオン (好ましくは (1 , 2ジクロロテトラフルオロエタン) とジフルオロクロロメタンとの組み合わせ) などのプロペラント中に分散し、鼻内かまたは経口吸入投与に適合させた適当なエアロゾル容器に入れる。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 5 】

本発明の抗体および医薬組成物は、非経口投与、すなわち皮下、筋肉内または静脈内投与に特に有用である。非経口投与用の組成物は一般に、許容しうる担体、好ましくは水性担体中に溶解した本発明の抗体またはそのフラグメントまたはその組み合わせの溶液を含むであろう。種々の水性担体、たとえば、水、緩衝水溶液、0.4%食塩水、0.3%グリシンなどを用いることができる。これらの溶液は滅菌してあり、一般に粒状物質を含まない。これら溶液は、通常よく知られた滅菌法により滅菌することができる。本発明の組成物は、pH調節剤や緩衝剤など、適当な生理条件に必要とされる薬理学的に許容可能な補助物質を含んでいてよい。かかる医薬組成物中の本発明の抗体またはフラグメントの濃度は広範囲に変わりうる、すなわち約0.5重量%未満、通常少なくとも約1重量%から15または20重量%までであってよく、選択した特定の投与方法に従って主として流体容量、粘度などに基づいて選択されるであろう。

10

【 0 1 0 6 】

それゆえ、本発明の筋肉内投与用医薬組成物は、1mlの滅菌緩衝水溶液および50mgの本発明の抗体またはそのフラグメントを含むように調製できる。同様に、本発明の静脈内投与用医薬組成物は、250mlまでの滅菌リンゲル溶液および150mgの本発明の抗体またはそのフラグメントを含むように調製できる。非経口投与可能な組成物の実際の調製法は当業者によく知られているかまたは当業者には明らかであり、たとえば、レミントンズ・ファーマシューティカル・サイエンス (Remington's Pharmaceutical Science)、第15版、マック・パブリッシング・カンパニー (Mack Publishing Company)、イーストン、ペンシルベニア (参照のため本明細書中に引用する) に一層詳細に記載されている。

20

【 0 1 0 7 】

本発明の抗体 (またはそのフラグメント) は貯蔵のために凍結乾燥し、使用前に適当な担体中で再構成することができる。この技術は通常の免疫グロブリンにおいて有効であることが示されており、技術分野で公知の凍結乾燥および再構成法を用いることができる。

【 0 1 0 8 】

本発明の医薬組成物は、意図する結果に依存して予防および/または治療のために投与することができる。治療の目的で適用する場合には、すでに疾患を患っている患者に該疾患およびその合併症を治癒もしくは少なくとも部分的に寛解させるに十分な量の組成物を投与する。予防の目的で適用する場合には、未だ疾患状態にない患者に本発明の抗体またはその混合物を含む組成物を投与して患者の耐性を高める。

30

【 0 1 0 9 】

本発明の医薬組成物の単回投与または多回投与を、治療にあたった医師により選択された投与量レベルおよびパターンにて行うことができる。いずれの場合においても、本発明の医薬組成物は患者を有効に治療するのに十分な所定量の本発明の改変抗体 (またはそのフラグメント) を提供できなくてはならない。

【 0 1 1 0 】

本発明の抗体はまた、該抗体と同じ療法において有用なペプチド性かまたは非ペプチド性の化合物 (模倣物) の設計および合成に用いることができる [たとえば、サラゴビ (Saragovi) ら、Science、253、792~795 (1991) を参照]。

40

本発明をさらに説明するため、下記実施例を記載する。これら実施例は本発明を限定することを意図するものではない。

【 0 1 1 1 】

実施例 1

繊維状ファージの表面上に提示された組換え免疫グロブリンライブラリーは、マッカファーティー (McCafferty) ら、Nature、348:552~554、1990およびバーバス (Barbas) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978~7982、1991に最初に記載された。この技術を用い、高親和性抗体を免疫ヒト組換えライブラリーから単離した [バーバスら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 589:1016

50

4 ~ 1 0 1 6 8、1 9 9 2]。本発明で使用したファージ提示の概念はバーバス (1 9 9 1、上掲) によって記載されたものと実質的に同じであるが、組換えの可能性を低減し安定性を改善するため、サルライブラリーの独特のベクターを代用することにより該技術を修飾した。このベクター、p M S (図 1) は、ポリシストロン性の重鎖および軽鎖サル D N A の効率的な転写および翻訳のための単一の l a c プロモーター / オペレーターを含む。このベクターは、2 つの異なるリーダー配列、すなわち、軽鎖のための o m p A [モッバ (Movva) ら、J . Biol . Chem .、2 5 5 : 2 7 ~ 2 9 (1 9 8 0)] および重鎖 F d のための p e l B [レイ (Lei) ら、J . Bact .、4 3 7 9 ~ 1 0 9 : 4 3 8 3 (1 9 8 7)] を含む。両リーダー配列は、重鎖および軽鎖クローニング生成物の細胞周辺腔への分泌を指令する疎水性のシグナルペプチドに翻訳される。ペリプラスムの酸化環境中では、これら 2 つの鎖は折り畳まれ、ジスルフィド結合を生成して安定な F a b フラグメントを形成する。本発明者らは、このベクターの骨格をファージミドである bluescript (ストラタジーン、ラジョラ、カリフォルニア) から得た。それは、p M S D N A を含む細菌にアンピシリン (カルベニシリン) 耐性を付与する酵素 - ラクタマーゼの遺伝子を含む。本発明者らはまた、マルチコピープラスミド C o l E 1 の複製起点および繊維状バクテリオファージ f 1 の複製起点を bluescript から得た。ファージ f 1 の複製起点 (いわゆる遺伝子内領域) は、一本鎖 p M S D N A の合成の開始、カプシド形成の開始およびウイルス酵素による R N A 合成の終止を指令する。p M S D N A 鎖の複製およびファージ粒子への組み立てには、ヘルパーファージによって提供されなければならないウイルスタンパク質を必要とする。本発明者らはヘルパーファージ V C S M 1 3 を用いたが、これはカナマイシン耐性をコードする遺伝子をも含んでいるため特にこの目的に適している。V C S M 1 3 および p M S が感染した細菌は、増殖培地にカナマイシンおよびカルベニシリンの両者を加えることにより選択できる。これら細菌は、最終的に p M S ゲノムまたは V C S M 1 3 ゲノムのいずれかを含有する繊維状ファージ粒子を生成するであろう。ヘルパーファージのパッケージングは p M S のパッケージングに比べて効率が悪く、その結果、組換え p M S ファージを優勢に含む混合ファージ集団が得られる。このファージの両末端は各末端に特異的なマイナーコートタンパク質を拾い上げる (pick up)。本発明において特に興味深いのは、該ファージの一端に 5 コピーのうち 3 コピー中に存在する遺伝子 III 生成物である。この遺伝子 III 生成物は 4 0 6 アミノ酸残基からなり、F 線毛を介した大腸菌のファージ感染に必要である。重鎖の最初の 2 つのドメイン、すなわち可変ドメインおよび C H 1 ドメインは遺伝子 III タンパク質のカルボキシ末端半分に融合している。この組換え線毛タンパク質 (p e l B リーダーにより指令される) はペリプラスムに分泌され、そこで蓄積し、ファージのコート中に組み込まれる前に軽鎖とジスルフィド結合を生成する。また、他のベクターは遺伝子 III の下流に組み込んだ F L A G 配列を含む。この F L A G は、F d タンパク質のカルボキシ末端にて発現される 8 アミノ酸ペプチドである。本発明者らは、ファージ F a b の精製および E L I S A による検出の両目的のために市販のモノクローナル抗 F L A G M 2 を用いている [ブリザード (Brizzard)、Bio Technology、1 6 (4) : 7 3 0 - 7 3 1 (1 9 9 4)]。

【 0 1 1 2 】

ベクター p M S を構築した後、本発明者らは該ベクターがファージ結合 F a b を産生する能力について対照の抗体遺伝子を用いて試験した。本発明者らは抗破傷風毒素抗体 (カルロス・バーバス (Carlos Barbas) 博士より入手) を p M S 中にクローニングし、X L I - blue を形質転換した。本発明者らは V C S M 1 3 および得られた抗破傷風毒素抗体を提示するファージで本発明者らの細胞を同時感染させた。本発明者らは効率実験を行い、その際、抗破傷風毒素ファージを関連のない抗体を結合した (beading) ファージと 1 : 1 0 0 , 0 0 0 にて組み合わせた。本発明者らは、混合ファージ (5 0 μ l) を抗原 (破傷風毒素) コーティングポリスチレンウエルに適用することにより 3 回のえり分けを行った。接着しなかったファージは洗い落とし、接着したファージは酸で溶出した。溶出したファージを用いて X L 1 - B l u e 細菌の新たなアリコートに感染させ、ヘルパーファージを加えた。一夜増幅させた後、ファージを調製し、抗原をコーティングしたプレート上で

再びえり分けた。3回のえり分けの後、本発明者らは抗破傷風毒素ファージに首尾よく富むことを示すことができた。この技術が首尾よくいくかどうかはまた、最終のえり分け生成物の特徴付けのために可溶性のF a bを調製する能力にも依存する。このことは、制限酵素N h e Iを用いてp M S D N Aから遺伝子IIIを切り出し、ついで再ライゲートすることにより行った。遺伝子IIIを切り出した後はF a bはもはやファージ表面上には提示されず、細胞周辺腔中に蓄積した。可溶性のF a bを発現する細菌から溶解液を調製し、E L I S Aを用いて抗原特異性を試験した。高レベルの可溶性F a bが検出された。

【0113】

ファージ提示法をマーカーザルライブラリーに使用するため、本発明者らはサル免疫グロブリン遺伝子のP C R増幅のために特別のプライマーを開発した。これらプライマーは、
10 霊長類化 (PRIMATIZED T M) 抗体法 (米国特許出願第08 / 379, 072号を参照; 参照のため本明細書中に引用する) を開発する際に本発明者らが得たマーカーザル配列およびヒト配列を含むデータベース (カバット (Kabat) ら (1991)、「免疫学的に興味のあるタンパク質の配列」、U . S . Dept . of Health and Human Services、National Institute of Health) に基づいていた。

【0114】

本発明者らは、マーカーザルの範囲 (repertoire) の増幅をカバーするために3セットのプライマーを開発した。本発明者らの第一のプライマーのセットは、重鎖のV HおよびC H 1 (F d) ドメインの増幅のために設計したものであった。それは、3' C H 1ドメインプライマーおよびフレームワーク1領域に結合する6つの5' V Hファミリー特異的
20 プライマーからなっていた。本発明者らの第二のプライマーのセットは全ラムダ鎖を増幅するためのものであり、多くのラムダ鎖サブグループをカバーしている。それは、3' プライマーおよびV Lフレームワーク1領域に結合する3つの5' 縮重プライマーからなっている。本発明者らの第三のプライマーのセットは、カッパ鎖サブグループの増幅のために設計したものであった。それは、3' プライマーおよび5つのV Kフレームワーク1プライマーからなる。これら各セットのプライマーを用い、ライブラリーのクローニングに利用するのに十分な物質を利用できるように各プライマーセットから十分に強いシグナルを得るべくP C Rパラメータを最適化した。本発明者らは最近、これら最適化P C R条件を用いて本発明者らのp M S ベクターにおいてマーカーザル組み合わせ (combinatorial) ライブラリーを作成した。免疫グロブリンR N Aの採取源として骨髓生検をC D 4免疫サルから採取した。これらライブラリーは約106の成員を含んでおり、目下、抗原コーティングウエル上で特異的結合についてえり分けている。
30

【0115】

実施例2

B7 / C T L A - 4 試薬の開発

本発明者らは、サルの免疫、インビトロでの結合および機能アッセイの開発、ヘテロハイブリドーマのスクリーニングおよびファージライブラリーのえり分けの目的のために多くの試薬を作成した。表1には各試薬とその意図する目的を掲げてある。B7 . 1の場合には、R N AをS B細胞から抽出し、逆転写酵素を用いてc D N Aに変換した。第一鎖のc D N AをB7 . 1特異的プライマーを用いてP C R増幅し、I D E CのN E O S P L A 哺乳動物発現ベクター中にクローニングした。このB7 . 1 N E O S P L A D N AでC H O細胞をトランスフェクションし、膜結合B7 . 1を発現するクローンを同定した。B7 . 1融合タンパク質も同様に生成したが、ヒトC H 2およびC H 3免疫グロブリン遺伝子を含むN E O S P L A カセットベクター中にP C R増幅B7 . 1遺伝子をクローニングした。このB7 . 1 / I g N E O S P L A D N AでC H O細胞を形質転換し、B7 . 1 / I g融合タンパク質を分泌する安定なクローンを増幅した。一般に、B7 . 2およびC T L A - 4試薬も同様に生成したが、B7 . 2ではR N Aを抗1 gおよびI L - 4で24時間刺激したヒト脾臓細胞から単離し、C T L A 4構築物については遺伝子の採取源はP H A活性化したヒトT細胞であった。

【0115】

10

20

30

40

50

表1

| 試薬 | 目的 | CHO発現 |
|-----------------|---------------|-------|
| 可溶性B7.1 | 免疫、イムノアッセイ | 有 |
| B7.1トランスフェクタント | スクリーニング、ELISA | 有 |
| B7.1/Ig融合タンパク質 | 抑制試験、えり分け | 有 |
| B7.2トランスフェクタント | スクリーニング、ELISA | 有 |
| B7.2/Ig融合タンパク質 | 抑制試験、えり分け | 未完 |
| CTLA4トランスフェクタント | 抑制試験 | 未完 |
| CTLA4/Ig | 抑制試験 | 未完 |

10

【0116】

これら試薬が、B7.1に対するモノクローナル抗体(L3074)[ベクトン・ディッキンソン(Becton Dickinson)、1994]、B7.2に対するモノクローナル抗体(Fun-1)[エンジェル(Engel)ら、Blood、84、1402~1407(1994)]およびサルFabフラグメントを検出すべく特別に開発した精製ヤギおよびウサギ血清とともに利用できることは、所望の特性を有する抗体の同定を容易にする。

【0117】

実施例3

カニクイザルにおける可溶性および細胞結合ヒトB7.1に対する免疫応答の研究

ヒトB7.1抗原に対するサル抗体の産生の実行可能性を評価するため、本発明者らは、まずL307.4-セファロースアフィニティークラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによりCHO細胞培養液から組換えSB7.1を精製した。ついで、SB7.1をアジュバントとともに5匹の成熟カニクイザルに注射した。ブースター免疫の3~4カ月後、SB7.1またはヒトSB細胞で免疫したサルからの血清について抗原結合を試験した。

20

【0118】

SB7.1で免疫した5匹のサルおよびB7.1陽性ヒトSB細胞で免疫したさらに3匹の動物からの血清試料について、トランスフェクションしたCHO細胞中で発現された膜結合B7.1に対する抗体力価を試験した。図3にまとめて示した結果は、アフィニティー精製したSB7.1で免疫した5匹のサルのうち4匹が1:5000を越える抗体力価を産生することを示した。細胞結合したB7.1を含むSB細胞で免疫した3匹のサルは、1:1400から1:2800の範囲のより低い抗体力価を発現した。

30

【0119】

実施例4

本発明者らは、SB7.1-セファロースを用いて8匹の免疫したすべてのサルから抗体を精製し、ついで(1)ELISAにおけるSB7.1コーティングプレート；(2)抗原陽性B細胞；および(3)B7.1CHOトランスフェクトマヘ結合する能力について試験した。さらに、これら抗体について、混合リンパ球反応(MLR)におけるIL-2産生およびトリチウム化チミジンの取り込みにより測定されるように、B細胞相互作用を抑制する能力を評価した。T細胞結合実験については、ヒト軟膜末梢血リンパ球をPHA刺激剤の存在下で3~6日培養した。B7結合は125I-放射性標識した可溶性B7.1(SB7.1)を用いたラジオアッセイにより検出した。

40

【0120】

実施例5

サル抗体の放射性標識SB7への直接結合

125I放射性標識SB7.1を、溶液中の4、1および0.25μg/mlの抗B7.1抗体への結合について試験した。表2に示す結果は、SB7.1で免疫したサルにより産生された抗体のほとんどがアフィニティー精製した125I-SB7.1に濃度に依存した仕方で結合しうることを示唆している。標識SB7.1への結合の特異性を評価するため、2匹の動物からの抗体を用いて非標識SB7.1競合実験を行った。サル1133

50

および 1144 からのアフィニティー精製抗体を 400 ng / ウエルにてマイクロウエルプレート上にコーティングした。アフィニティー精製した非標識 SB7.1 (500 および 1000 ng / ウエル) を競合物として用いた。図 4 に示す結果は、SB7.1 調製物が 125I - SB7.1 の抗体への結合を抑制するのに有効であることを示した。

【0121】

表 2

SB7-セファロースアフィニティーカラム上でアフィニティー精製したサル抗体への SB7-I125 の結合

| 抗体 ($\mu\text{g/ml}$) | サルの番号 | | | | | | | |
|----------------------------|-------|-----|-------|--------|-------|------|-------|------|
| | 769 | 908 | 1133 | 1135 | 1137 | 1139 | 1144 | 1146 |
| 4 | 175 | 213 | 9,056 | 12,771 | 4,318 | 226 | 5,781 | 108 |
| 1 | 106 | 142 | 6,569 | 7,940 | 3,401 | 110 | 3,901 | 80 |
| 0.25 | 95 | 104 | 1,803 | 2,673 | 1,219 | 100 | 1,186 | 94 |

データは 2 回行ったアッセイの平均値であり、結合した SB7-I125 の cpm を表す。

【0122】

実施例 6

放射性標識したアフィニティー精製サル抗体の B7 + 細胞への直接結合および SB7.1 による抑制

サル PRI135 からのアフィニティー精製した放射性標識サル抗 B7.1 抗体を、B7 陽性ヒト SB 細胞への直接結合について放射性標識した L307.4 MA b と比較した。特異性の対照として非標識 SB7.1 (0.002 - 20 $\mu\text{g/ml}$) を加えて両放射性標識抗体と競合させた。本発明者らは、サル抗体が細胞に結合した B7.1 に結合することができ、図 5 に示すように SB7.1 によって抑制されることを示した。SB7.1 で 90% もの高さの抑制が観察された。

【0123】

実施例 7

放射性標識 B7-Ig 融合タンパク質の活性化 T 細胞への直接結合およびアフィニティー精製したサル抗体による抑制

ヒト末梢血 T リンパ球を 3 ~ 6 日間活性化し、125I - B7.1 - Ig の直接結合について試験した。活性化したヒト T 細胞上には Fc 受容体がアップレギュレーションされているため、細胞に B7.1 - Ig を加える前に、細胞を熱凝集した前免疫 (pre-immune) 免疫グロブリンとともに前インキュベートして Fc 結合部位をブロックする必要がある。SP2/0 マウスミエローマ細胞を用いたバックグラウンド対照を含めることにより、バックグラウンド結合の補正をした。図 6 は、活性化 T 細胞への 125I - B7.1 - Ig 融合タンパク質結合の抑制が 200 ~ 8 $\mu\text{g/ml}$ の濃度のアフィニティー精製したサル抗体で達成されることを示している。対照として用いた非標識 SB7.1 および L307.4 MA b もまた B7.1 - Ig 融合タンパク質の細胞への結合を抑制するのに有効であった。

【0124】

実施例 8

サル抗 B7 抗体による混合リンパ球反応における IL-2 産生の抑制

CD28/B7 相互作用の阻止は T リンパ球による IL-2 産生の抑制へと導く。図 7 に示す実験において、SB7.1 で免疫した 2 匹のサル (サル 1137 および 1135) および B7 陽性 SB 細胞で免疫した 1 匹のサル (サル 1146) からのアフィニティー精製したサル抗体を、IL-2 産生の抑制によって測定されるように、混合リンパ球反応 (M

10

20

30

40

50

LR)におけるヒトT細胞活性化を抑制する能力について評価した。この実験の結果は、サル1146および1137からのアフィニティー精製抗B7.1抗体が50 µg/mlの濃度で添加したときにIL-2産生を抑制することを示している。サル1135抗体に関しては、材料欠如のために2つの最も高い濃度では評価することができなかったが、それでも一層低濃度で有意の抑制を示した。マウスMAb L307.4は10 µg/mlの濃度で抑制した。これら濃度で試験した他のサル血清は陰性であった(データは示していない)。これら結果は、可溶性および膜結合の両形態のB7抗原で免疫したサルの少なくとも3匹が、免疫抑制能を有するB7阻止抗体を産生することを示している。

【0125】

実施例9

B7.1免疫したサル血清のB7.2抗原への交差反応性の研究

B7.1に対して産生された抗体を、B7.2に対する交差反応性について試験する。B7.1免疫血清からのB7.1アフィニティー精製抗体を用いた予備的な結果は、B7.2でトランスフェクションしたCHO細胞への結合の示唆的な証拠を提供した(示していない)。これらデータは、可溶性のB7.2 Ig試薬を用いて確認しなければならない。本発明者らは、まず、B7.1免疫した動物からB7.1 Ig-セファロース上のアフィニティークロマトグラフィーによりさらにサル抗体を精製するであろう。ついで、本発明者らは、CHO細胞からB7.2 Igを十分な量で産生および精製してB7.2 Ig-セファロースアフィニティークラムを調製するであろう。本発明者らは、B7.1特異的な抗体の集団から、B7.2 Ig-セファロースカラムへの結合によりB7.2と交差反応する抗体を選択するであろう。すべての交差反応抗体は、B7.1トランスフェクションCHO細胞およびB7.2トランスフェクションCHO細胞の両者への直接結合およびB7.1 IgによるB7.2トランスフェクション細胞への結合の抑制により、さらに特徴付けられるであろう。

【0126】

実施例10

ファージ提示ライブラリーの作成

組換えファージ提示ライブラリーをB7.1およびB7.2免疫サルから作成する。免疫の7~12日後にリンパ節および骨髄生検を採取し、RNAに富むB細胞および形質細胞を回収する。チョンチンスキー(Chomczynski)により記載された方法[Anal. Biochem., 162(1), 156~159(1987)]を用い、リンパ球からRNAを単離する。オリゴdTプライマーおよび逆転写酵素を用いてRNAをcDNAに変換する。第一鎖cDNAをアリコートに分け、以前に記載されたカッパ、ラムダ、および重鎖Fd領域のプライマーセット並びにPfuポリメラーゼ(ストラタジーン、サンジエゴ)かまたはTaqポリメラーゼ(プロメガ、マジソン)のいずれかを用い、PCR増幅する。重鎖PCR増幅生成物をプールし、Xho VspEI制限酵素で切断し、ベクターpMS中にクローニングする。その後、軽鎖PCR生成物をクローニングし、SacI/XbaI制限酵素で切断し、クローニングして組換えライブラリーを作成する。XLBlue大腸菌を該ライブラリーDNAで形質転換し、VCsM13で重感染させて抗体を提示するファージを生成させる。このライブラリーを、B7.1抗原またはB7.2抗原をコーティングしたポリスチレンウエル上で4回えり分ける。各回のえり分けからの個々のファージクローンを分析する。pMSベクターDNAを単離し、遺伝子IIIを切り出す。可溶性のFabフラグメントが生成し、B7.1およびB7.2への結合についてELISAで試験する。

【0127】

実施例11

ファージFabフラグメントの特徴付け

サルファージFabフラグメントを、その特異性、およびCTLA-4-IgまたはCTLA-4トランスフェクション細胞へのB7.1-IgおよびB7.2-Ig結合を阻止する能力について特徴付ける。ファージフラグメントはまた、高親和性のフラグメントを

10

20

30

40

50

選択するため、免疫に使用した B 7 種上で 4 回行った最初のえり分け後の交差反応性について特徴付けを行う。B 7 . 1 抗原または B 7 . 2 抗原のいずれかをコーティングした表面上で 4 回えり分けたものから同定した F a b フラグメントを、大腸菌の 2 4 時間発酵培養液中での感染および増殖によりスケールアップする。フラグメントを、抗 F L A G アフィニティーカラムへのコダック F L A G 結合により精製する。精製したファージ F a b を、西洋ワサビペルオキシダーゼをコンジュゲートしたヤギ抗サル F a b 抗体または抗 F L A G M A b を用いた E L I S A ベースの直接結合改変スキャッチャード分析 [カトー (Katoh) ら、J . Chem . Bio Eng .、7 6 : 4 5 1 ~ 4 5 4 (1 9 9 3)] により親和性を試験する。抗サル F a b 試薬は、ヒト重鎖定常領域 I g に対して吸着され、B 7 - I g への交差反応性は除かれるであろう。B 7 . 1 - I g または B 7 . 2 - I g をコーティングしたプレートへの直接結合の測定の後、各フラグメントについて K d 値を計算する。

【 0 1 2 8 】

実施例 1 2

ファージ F a b フラグメントによる C T L A - 4 / B 7 結合の阻止

最も低い濃度で B 7 - I g の結合を最も有効に阻止する F a b フラグメントを先導候補として選択する。選択は、C T L A - 4 - I g または C T L A - 4 トランスフェクション細胞への 1 2 5 I - B 7 - I g 結合を競合し尽くすことにより行う。他の選択基準には、応答細胞での 3 H - チミジンの取り込みの抑制 [アズマら、J . Exp . Med .、1 7 7 : 8 4 5 ~ 8 5 0 ; アズマら、Nature、3 0 1 : 7 6 ~ 7 9 (1 9 9 3)] および I L - 2 アッセイキットを用いた I L - 2 産生の直接分析により測定されるように、混合リンパ球反応 (M L R) の阻止が含まれる。M L R の抑制および C T L A - 4 結合アッセイにおいて最も有効な 3 または 4 の候補が、C H O 細胞へのトランスフェクションおよびキメラサル / ヒト抗体の発現のための上記哺乳動物発現ベクター中へクローニングするために選択される。

【 0 1 2 9 】

実施例 1 3

サルヘテロハイブリドーマの生成

モノクローナル抗体を分泌するサルヘテロハイブリドーマを、その血清が B 7 . 1 および / または B 7 . 2 に対して陽性と試験された生存 (existing) 免疫動物から作成する。いずれかまたは両方の抗原に対して陽性の動物からリンパ節生検を採取する。ハイブリドーマの産生方法は、サル抗 C D 4 抗体の作成に使用する確立された方法 [ニューマン、1 9 9 2 (上掲)] と同様である。高い血清力価を有するサルは、鼠蹊部のリンパ節の切片を麻酔下で取り除かれるであろう。組織からのリンパ球を洗浄し、ポリエチレングリコール (P E G) を用いて K H 6 / B 5 ヘテロハイブリドーマ細胞 [キャロル (Carrol) ら、J . Immunol . Meth .、8 9 : 6 1 ~ 7 2 (1 9 8 6)] と融合させる。ハイブリドーマを H . A . T . 培地上で選択し、9 6 ウエルプレート中で繰り返しサブクローニングすることにより安定化させる。

【 0 1 3 0 】

B 7 . 1 抗原に特異的なサルモノクローナル抗体を B 7 . 2 への交差反応性についてスクリーニングする。サル抗 B 7 抗体は、1 2 5 I - B 7 - I g 結合アッセイを用いて B 7 / C T L A - 4 結合の阻止について特徴付けられるであろう。3 H - チミジンの取り込みおよび I L - 2 産生の直接測定による M L R の抑制を用い、3 つの候補を選択する。2 つの候補はフェーズ II の試験に持ち込まれ、すべての機能的な研究を繰り返しながら C H O 細胞中に発現されるであろう。インビボ薬理学のための動物モデルを開発する目的のため、抗 B 7 抗体が幾つかの動物種の細胞上で試験されるであろう。動物モデルの確立は、選択した臨床適応のために前臨床研究を行うことを可能にするであろう。

【 0 1 3 1 】

実施例 1 4

上記のように上記ヘテロハイブリドーマ法を用いて 4 つの先導サル抗 B 7 . 1 抗体 : 1 6 C 1 0、7 B 6、7 C 1 0 および 2 0 C 9 が同定された。これら抗体は以下のように特徴

付けられた：

【 0 1 3 2 】

これらサル抗体が C T L A 4 - I g 間の物理的相互作用を阻止する能力を示すため、種々の濃度のサル抗 B 7 . 1 抗体および非標識 C T L A 4 - I g を放射性標識した C T L A 4 - I g I 1 2 5 とともにインキュベートした。抑制アッセイの結果は、サル抗体の I C 5 0 (5 0 % 抑制となるインヒビターの濃度) が以下のとおりであることを示した：

a : 7 C 1 0 : 0 . 3 9 μ g / M l

b : 1 6 C 1 0 : 1 . 6 0 μ g / M l

c : 2 0 C 9 : 3 . 9 0 μ g / M l

d : 7 B 6 : 3 9 . 0 μ g / M l

10

【 0 1 3 3 】

スキャッチャード分析は、B 7 - I g コーティングプレートへのサル抗体の結合の見かけの親和定数 (K d) がおよそ以下のとおりであることを示した：

a : 7 C 1 0 : 6 . 2 $\times 10^{-9}$ M

b : 1 6 C 1 0 : 8 . 1 $\times 10^{-9}$ M

c : 7 B 6 : 1 0 . 7 $\times 10^{-9}$ M

d : 2 0 C 9 : 1 6 . 8 $\times 10^{-9}$ M

【 0 1 3 4 】

抗体を混合リンパ球反応アッセイ (M L R) においてインビトロで試験し々 M L R は、4 つのすべての抗 B 7 . 1 抗体が異なる程度に I L - 2 産生を抑制することを示した：

20

a : 7 B 6 : 5 . 0 μ g / M

b : 1 6 C 1 0 : 0 . 1 μ g / M

c : 2 0 C 9 : 2 . 0 μ g / M

d : 7 C 1 0 : 5 . 0 μ g / M

【 0 1 3 5 】

サル抗 B 7 . 1 抗体を、ヒト末梢血リンパ球 (P B L) 上の B 7 に結合する能力について試験した。F A C S 分析は、4 つのすべてのサル抗体が陽性であることを示した。

【 0 1 3 6 】

サル抗体 1 6 C 1 0、7 B 6、7 C 1 0 および 2 0 C 9 を F A C S 分析により C l q 結合について試験した。その結果は、7 C 1 0 サル I g が B 7 . 1 C H O トランスフェクション細胞とともにインキュベートした後に強いヒト C l q 結合を有することを示した。1 6 C 1 0 は、2 0 C 9 および 7 B 6 サル抗体が陰性であったように陰性であった。

30

【 0 1 3 7 】

実施例 1 5

本明細書中に参照のために引用した米国特許出願第 0 8 / 3 7 9 , 0 7 2 号の霊長類化抗体法を用い、および図 2 に示す N E O S P L A ベクター系を用い、7 C 1 0、7 B 6 および 1 6 C 1 0 の重鎖および軽鎖可変ドメンをクローニングし、その霊長類化形態を N E O S P L A ベクター系を用いて C H O 細胞中で合成した。霊長類化 7 C 1 0 の軽鎖および重鎖、7 B 6 の軽鎖および重鎖、および 1 6 C 1 0 の軽鎖および重鎖のアミノ酸配列および核酸配列を、それぞれ、図 8 a、図 8 b、図 9 a、図 9 b、図 1 0 a および図 1 0 b に示す。

40

【 0 1 3 8 】

これら霊長類化抗体は、おそらく低い抗原性およびヒトエフェクター機能のために治療剤として極めて適しているであろうことが期待される。実際、最近になって霊長類化 1 6 C 1 0 はヒト C 1 9 結合を示すことが明らかにされたが、1 6 C 1 0 は結合を示さない。

【 0 1 3 9 】

配列表

配列番号 1：

配列の長さ：7 0 5

配列の型：核酸

50

起源 : Homo sapiens

配列の特徴 : CDS、(1)..(702)

配列 :

| | | |
|---|-----|----|
| atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg ctc cca | 48 | |
| Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro | | |
| 1 5 10 15 | | |
| ggt gca cga tgt gcc tat gaa ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg | 96 | |
| Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val | | |
| 20 25 30 | | |
| tcc cca gga cag acg gcc agg atc acc tgt ggg gga gac aac agt aga | 144 | 10 |
| Ser Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ser Arg | | |
| 35 40 45 | | |
| aat gaa tat gtc cac tgg tac cag cag aag cca gcg cgg gcc cct ata | 192 | |
| Asn Glu Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Arg Ala Pro Ile | | |
| 50 55 60 | | |
| ctg gtc atc tat gat gat agt gac cgg ccc tca ggg atc cct gag cga | 240 | |
| Leu Val Ile Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg | | |
| 65 70 75 80 | | |
| ttc tct ggc tcc aaa tca ggg aac acc gcc acc ctg acc atc aac ggg | 288 | 20 |
| Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Asn Gly | | |
| 85 90 95 | | |
| gtc gag gcc ggg gat gag gct gac tat tac tgt cag gtg tgg gac agg | 336 | |
| Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg | | |
| 100 105 110 | | |
| gct agt gat cat ccg gtc ttc gga gga ggg acc cgg gtg acc gtc cta | 384 | |
| Ala Ser Asp His Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Thr Val Leu | | |
| 115 120 125 | | |
| ggt cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct | 432 | 30 |
| Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser | | |
| 130 135 140 | | |
| gag gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac | 480 | |
| Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp | | |
| 145 150 155 160 | | |
| ttc tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc ccc | 528 | |
| Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro | | |
| 165 170 175 | | |
| gtc aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac | 576 | 40 |
| Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn | | |
| 180 185 190 | | |
| aag tac gcg gcc agc agc tac ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag | 624 | |
| Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys | | |
| 195 200 205 | | |
| tcc cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg | 672 | |
| Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val | | |
| 210 215 220 | | |
| gag aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca tga | 705 | |
| Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser | | |
| 225 230 | | |

配列番号 2 :

50

配列の長さ : 1 4 3 1

配列の型 : 核酸

起源 : Homo sapiens

配列の特徴 : CDS、(1)..(1428)

配列 :

| | | |
|---|-----|----|
| atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctc ctg gtg gca gct ccc aga tgg | 48 | |
| Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp | | |
| 1 5 10 15 | | |
| gtc ctg tcc cag gtg aag ctg cag cag tgg ggc gaa gga ctt ctg cag | 96 | |
| Val Leu Ser Gln Val Lys Leu Gln Gln Trp Gly Glu Gly Leu Leu Gln | | 10 |
| 20 25 30 | | |
| cct tcg gag acc ctg tcc cgc acc tgc gtt gtc tct ggt ggc tcc atc | 144 | |
| Pro Ser Glu Thr Leu Ser Arg Thr Cys Val Val Ser Gly Gly Ser Ile | | |
| 35 40 45 | | |
| agc ggt tac tac tac tgg acc tgg atc cgc cag acc cca ggg agg gga | 192 | |
| Ser Gly Tyr Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Arg Gly | | |
| 50 55 60 | | |
| ctg gag tgg att ggc cat att tat ggt aat ggt gcg acc acc aac tac | 240 | |
| Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Gly Asn Gly Ala Thr Thr Asn Tyr | | 20 |

| | | | | |
|---|------|-----|-----|--|
| 65 | 70 | 75 | 80 | |
| aat ccc tcc ctc aag agt cga gtc acc att tca aaa gac acg tcc aag | 288 | | | |
| Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys | | | | |
| 85 | 90 | 95 | | |
| aac cag ttc ttc ctg aac ttg aat tct gtg acc gac gcg gac acg gcc | 336 | | | |
| Asn Gln Phe Phe Leu Asn Leu Asn Ser Val Thr Asp Ala Asp Thr Ala | | | | |
| 100 | 105 | 110 | | |
| gtc tat tac tgt gcg aga ggc cct cgc cct gat tgc aca acc att tgt | 384 | | | |
| Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Arg Pro Asp Cys Thr Thr Ile Cys | | | | |
| 115 | 120 | 125 | | |
| tat ggc ggc tgg gtc gat gtc tgg ggc ccg gga gac ctg gtc acc gtc | 432 | | | |
| Tyr Gly Gly Trp Val Asp Val Trp Gly Pro Gly Asp Leu Val Thr Val | | | | |
| 130 | 135 | 140 | | |
| tcc tca gct agc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc | 480 | | | |
| Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser | | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 | |
| tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag | 528 | | | |
| Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys | | | | |
| 165 | 170 | 175 | | |
| gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg | 576 | | | |
| Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu | | | | |
| 180 | 185 | 190 | | |
| acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc | 624 | | | |
| Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu | | | | |
| 195 | 200 | 205 | | |
| tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc | 672 | | | |
| Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr | | | | |
| 210 | 215 | 220 | | |
| cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg | 720 | | | |
| Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val | | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 | |
| gac aag aaa gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca | 768 | | | |
| Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro | | | | |
| 245 | 250 | 255 | | |
| ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc | 816 | | | |
| Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe | | | | |
| 260 | 265 | 270 | | |
| ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc | 864 | | | |
| Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val | | | | |
| 275 | 280 | 285 | | |
| aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc | 912 | | | |
| Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe | | | | |
| 290 | 295 | 300 | | |
| aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg | 960 | | | |
| Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro | | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 | |
| cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc | 1008 | | | |
| Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr | | | | |
| 325 | 330 | 335 | | |
| gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc | 1056 | | | |

10

20

30

40

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|----|
| Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | | |
| tcc | aac | aaa | gcc | ctc | cca | gcc | ccc | atc | gag | aaa | acc | atc | tcc | aaa | gcc | 1104 | |
| Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | | |
| aaa | ggg | cag | ccc | cga | gaa | cca | cag | gtg | tac | acc | ctg | ccc | cca | tcc | cgg | 1152 | |
| Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | | |
| | | 370 | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | | |
| gat | gag | ctg | acc | aag | aac | cag | gtc | agc | ctg | acc | tgc | ctg | gtc | aaa | ggc | 1200 | |
| Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | | 10 |
| 385 | | | | | 390 | | | | 395 | | | 400 | | | | | |
| ttc | tat | ccc | agc | gac | atc | gcc | gtg | gag | tgg | gag | agc | aat | ggg | cag | ccg | 1248 | |
| Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | | |
| | | | 405 | | | | | 410 | | | | 415 | | | | | |
| gag | aac | aac | tac | aag | acc | acg | cct | ccc | gtg | ctg | gac | tcc | gac | ggc | tcc | 1296 | |
| Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | | |
| | | 420 | | | | | 425 | | | | 430 | | | | | | |
| ttc | ttc | ctc | tac | agc | aag | ctc | acc | gtg | gac | aag | agc | agg | tgg | cag | cag | 1344 | |
| Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | | 20 |
| | | 435 | | | | 440 | | | | | 445 | | | | | | |
| ggg | aac | gtc | ttc | tca | tgc | tcc | gtg | atg | cat | gag | gct | ctg | cac | aac | cac | 1392 | |
| Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | | |
| | 450 | | | | 455 | | | | 460 | | | | | | | | |
| tac | acg | cag | aag | agc | ctc | tcc | ctg | tct | ccg | ggt | aaa | tga | | | | 1431 | |
| Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys | | | | | | |
| 465 | | | | 470 | | | | 475 | | | | | | | | | |

配列番号 3 :

配列の長さ : 7 2 0

配列の型 : 核酸

起源 : Homo sapiens

配列の特徴 : CDS、(1)..(717)

配列 :

| | | |
|---|-----|----|
| atg agc ctc cct gct cag ctc ctc ggg ctg cta ttg ctc tgc gtc ccc | 48 | |
| Met Ser Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Cys Val Pro | | |
| 1 5 10 15 | | |
| ggg tcc agt ggg gaa gtt gtg atg act cag tct cca ctg tcc ctt ccc | 96 | |
| Gly Ser Ser Gly Glu Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro | | |
| 20 25 30 | | |
| atc aca cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgt agg tct agt caa agc | 144 | |
| Ile Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser | | |
| 35 40 45 | | |
| ctt aaa cac agt aat gga gac acc ttc ctg agt tgg tat cag cag aag | 192 | 10 |
| Leu Lys His Ser Asn Gly Asp Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys | | |
| 50 55 60 | | |
| cca ggc caa cct cca agg ctc ctg att tat aag gtt tct aac cgg gac | 240 | |
| Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp | | |
| 65 70 75 80 | | |
| tct ggg gtc cca gac aga ttc agc ggc agt ggg gca ggg aca gat ttc | 288 | |
| Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe | | |
| 85 90 95 | | |
| aca ctg aaa atc agc gca gtg gag gct gaa gat gtt ggg gtt tat ttc | 336 | 20 |
| Thr Leu Lys Ile Ser Ala Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe | | |
| 100 105 110 | | |
| tgc ggg caa ggt aca agg act cct ccc act ttc ggc gga ggg acc aag | 384 | |
| Cys Gly Gln Gly Thr Arg Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys | | |
| 115 120 125 | | |
| gtg gaa atc aaa cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg | 432 | |
| Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro | | |
| 130 135 140 | | |
| cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg | 480 | 30 |
| Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu | | |
| 145 150 155 160 | | |
| ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat | 528 | |
| Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp | | |
| 165 170 175 | | |
| aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac | 576 | |
| Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp | | |
| 180 185 190 | | |
| agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa | 624 | |
| Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys | | |
| 195 200 205 | | 40 |
| gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag | 672 | |
| Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln | | |
| 210 215 220 | | |
| ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tga | 720 | |
| Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys | | |
| 225 230 235 | | |

配列番号 4 :

配列の長さ : 1 4 3 7

配列の型 : 核酸

起源 : Homo sapiens

配列の特徴：CDS、(1)..(1434)

配列：

| | | |
|---|-----|----|
| atg ggt tgg agc ctc atc ttg ctc ttc ctt gtc gct gtt gct acg cgt | 48 | |
| Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg | | |
| 1 5 10 15 | | |
| gtc cag tgt gag gtg caa ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag | 96 | |
| Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln | | |
| 20 25 30 | | |
| cct ggc ggg tcc ctg aga gtc tcc tgt gca gtc tct gga ttc acc ttc | 144 | |
| Pro Gly Gly Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe | | 10 |
| 35 40 45 | | |
| agt gac cac tac atg tat tgg ttc cgc cag gct cca ggg aag ggg ccg | 192 | |
| Ser Asp His Tyr Met Tyr Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro | | |
| 50 55 60 | | |
| gaa tgg gta ggt ttc att aga aac aaa ccg aac ggt ggg aca aca gaa | 240 | |
| Glu Trp Val Gly Phe Ile Arg Asn Lys Pro Asn Gly Gly Thr Thr Glu | | |
| 65 70 75 80 | | |

| | | |
|---|------|----|
| tac gcc gcg tct gtg aaa gac aga ttc acc atc tcc aga gat gat tcc | 288 | |
| Tyr Ala Ala Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser | | |
| 85 90 95 | | |
| aaa agc atc gcc tat ctg caa atg agc agc ctg aaa atc gag gac acg | 336 | |
| Lys Ser Ile Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr | | |
| 100 105 110 | | |
| gcc gtc tat tac tgt act aca tcc tac att tca cat tgt cgg ggt ggt | 384 | |
| Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Ser Tyr Ile Ser His Cys Arg Gly Gly | | |
| 115 120 125 | | |
| gtc tgc tat gga ggt tac ttc gaa ttc tgg ggc cag ggc gcc ctg gtc | 432 | 10 |
| Val Cys Tyr Gly Gly Tyr Phe Glu Phe Trp Gly Gln Gly Ala Leu Val | | |
| 130 135 140 | | |
| acc gtc tcc tca gct agc acc aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gca | 480 | |
| Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala | | |
| 145 150 155 160 | | |
| ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg | 528 | |
| Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu | | |
| 165 170 175 | | |
| gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcc tgg aac tca ggc | 576 | 20 |
| Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly | | |
| 180 185 190 | | |
| gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca | 624 | |
| Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser | | |
| 195 200 205 | | |
| gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg | 672 | |
| Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu | | |
| 210 215 220 | | |
| ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc | 720 | |
| Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr | | |
| 225 230 235 240 | | |
| aag gtg gac aag aaa gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca | 768 | 30 |
| Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr | | |
| 245 250 255 | | |
| tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc | 816 | |
| Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe | | |
| 260 265 270 | | |
| ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct | 864 | |
| Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro | | |
| 275 280 285 | | |
| gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc | 912 | 40 |
| Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val | | |
| 290 295 300 | | |
| aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca | 960 | |
| Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr | | |
| 305 310 315 320 | | |
| aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc | 1008 | |
| Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val | | |
| 325 330 335 | | |
| ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc | 1056 | |
| Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys | | |

| | | | |
|---|------|-----|-----|
| 340 | 345 | 350 | |
| aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc | 1104 | | |
| Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca | 1152 | | |
| Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc | 1200 | | |
| Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg | 1248 | | |
| Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly | | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac | 1296 | | |
| Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp | | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg | 1344 | | |
| Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp | | | |
| 435 | 440 | 445 | |
| cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac | 1392 | | |
| Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His | | | |
| 450 | 455 | 460 | |
| aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga | 1437 | | |
| Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys | | | |
| 465 | 470 | 475 | |

配列番号 5 :

配列の長さ : 7 1 1

配列の型 : 核酸

起源 : Homo sapiens

配列の特徴 : CDS、(1)..(708)

配列 :

10

20

30

| | | |
|---|-----|----|
| atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg ctc cca | 48 | |
| Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Pro | | |
| 1 5 10 15 | | |
| ggt gca cga tgt gag tct gtc ctg aca cag ccg ccc tca gtg tct ggg | 96 | |
| Gly Ala Arg Cys Glu Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly | | |
| 20 25 30 | | |
| gcc cca ggg cag aag gtc acc atc tcg tgc act ggg agc acc tcc aac | 144 | |
| Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Thr Ser Asn | | |
| 35 40 45 | | |
| att gga ggt tat gat cta cat tgg tac cag cag ctc cca gga acg gcc | 192 | 10 |
| Ile Gly Gly Tyr Asp Leu His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala | | |
| 50 55 60 | | |
| ccc aaa ctc ctc atc tat gac att aac aag cga ccc tca gga att tct | 240 | |
| Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ile Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Ser | | |
| 65 70 75 80 | | |
| gac cga ttc tct ggc tcc aag tct ggt acc gcg gcc tcc ctg gcc atc | 288 | |
| Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ala Ala Ser Leu Ala Ile | | |
| 85 90 95 | | |
| act ggg ctc cag act gag gat gag gct gat tat tac tgc cag tcc tat | 336 | 20 |
| Thr Gly Leu Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr | | |
| 100 105 110 | | |
| gac agc agc ctg aat gct cag gta ttc gga gga ggg acc cgg ctg acc | 384 | |
| Asp Ser Ser Leu Asn Ala Gln Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr | | |
| 115 120 125 | | |
| gtc cta ggt cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc | 432 | |
| Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro | | |
| 130 135 140 | | |
| tcc tct gag gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata | 480 | 30 |
| Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile | | |
| 145 150 155 160 | | |
| agt gac ttc tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc | 528 | |
| Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser | | |
| 165 170 175 | | |
| agc ccc gtc aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc | 576 | |
| Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser | | |
| 180 185 190 | | |
| aac aac aag tac gcg gcc agc agc tac ctg agc ctg acg cct gag cag | 624 | |
| Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln | | |
| 195 200 205 | | |
| tgg aag tcc cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc | 672 | 40 |
| Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser | | |
| 210 215 220 | | |
| acc gtg gag aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca tga | 711 | |
| Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser | | |
| 225 230 235 | | |

配列番号 6 :

配列の長さ : 1 4 3 1

配列の型 : 核酸

起源 : Homo sapiens

配列の特徴：CDS、(1)..(1428)

配列：

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| atg | aaa | cac | ctg | tgg | ttc | ttc | ctc | ctc | ctg | gtg | gca | gct | ccc | aga | tgg | 48 |
| Met | Lys | His | Leu | Trp | Phe | Phe | Leu | Leu | Leu | Val | Ala | Ala | Pro | Arg | Trp | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| gtc | ctg | tcc | cag | gtg | cag | ctg | cag | gag | tcg | ggc | cca | gga | ctg | gtg | aag | 96 |
| Val | Leu | Ser | Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Glu | Ser | Gly | Pro | Gly | Leu | Val | Lys | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| cct | tcg | gag | acc | ctg | tcc | ctc | acc | tgc | gct | gtc | tct | ggg | ggc | tcc | atc | 144 |
| Pro | Ser | Glu | Thr | Leu | Ser | Leu | Thr | Cys | Ala | Val | Ser | Gly | Gly | Ser | Ile | |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| agc | ggt | ggt | tat | ggc | tgg | ggc | tgg | atc | cgc | cag | ccc | cca | ggg | aag | ggg | 192 |
| Ser | Gly | Gly | Tyr | Gly | Trp | Gly | Trp | Ile | Arg | Gln | Pro | Pro | Gly | Lys | Gly | |
| | | | 50 | | | | 55 | | | | 60 | | | | | |
| ctg | gag | tgg | att | ggg | agt | ttc | tat | agt | agt | agt | ggg | aac | acc | tac | tac | 240 |
| Leu | Glu | Trp | Ile | Gly | Ser | Phe | Tyr | Ser | Ser | Ser | Gly | Asn | Thr | Tyr | Tyr | |
| | | | 65 | | | 70 | | | | 75 | | | | 80 | | |
| aac | ccc | tcc | ctc | aag | agt | caa | gtc | acc | att | tca | aca | gac | acg | tcc | aag | 288 |

10

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Asn | Pro | Ser | Leu | Lys | Ser | Gln | Val | Thr | Ile | Ser | Thr | Asp | Thr | Ser | Lys | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| aac | cag | ttc | tcc | ctg | aag | ctg | aac | tct | atg | acc | gcc | gcg | gac | acg | gcc | 336 |
| Asn | Gln | Phe | Ser | Leu | Lys | Leu | Asn | Ser | Met | Thr | Ala | Ala | Asp | Thr | Ala | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| gtg | tat | tac | tgt | gtg | aga | gat | cgt | ctt | ttt | tca | gtt | gtt | gga | atg | gtt | 384 |
| Val | Tyr | Tyr | Cys | Val | Arg | Asp | Arg | Leu | Phe | Ser | Val | Val | Gly | Met | Val | |
| | | | 115 | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| tac | aac | aac | tgg | ttc | gat | gtc | tgg | ggc | ccg | gga | gtc | ctg | gtc | acc | gtc | 432 |
| Tyr | Asn | Asn | Trp | Phe | Asp | Val | Trp | Gly | Pro | Gly | Val | Leu | Val | Thr | Val | |
| | | | 130 | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| tcc | tca | gct | agc | acc | aag | ggc | cca | tcg | gtc | ttc | ccc | ctg | gca | ccc | tcc | 480 |
| Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| tcc | aag | agc | acc | tct | ggg | ggc | aca | gcg | gcc | ctg | ggc | tgc | ctg | gtc | aag | 528 |
| Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | |
| | | | | 165 | | | | 170 | | | | 175 | | | | |
| gac | tac | ttc | ccc | gaa | ccg | gtg | acg | gtg | tcg | tgg | aac | tca | ggc | gcc | ctg | 576 |
| Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | 190 | | | | |
| acc | agc | ggc | gtg | cac | acc | ttc | ccg | gct | gtc | cta | cag | tcc | tca | gga | ctc | 624 |
| Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | |
| | | | 195 | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| tac | tcc | ctc | agc | agc | gtg | gtg | acc | gtg | ccc | tcc | agc | agc | ttg | ggc | acc | 672 |
| Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | |
| | | | 210 | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| cag | acc | tac | atc | tgc | aac | gtg | aat | cac | aag | ccc | agc | aac | acc | aag | gtg | 720 |
| Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| gac | aag | aaa | gca | gag | ccc | aaa | tct | tgt | gac | aaa | act | cac | aca | tgc | cca | 768 |
| Asp | Lys | Lys | Ala | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| ccg | tgc | cca | gca | cct | gaa | ctc | ctg | ggg | gga | ccg | tca | gtc | ttc | ctc | ttc | 816 |
| Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | |
| ccc | cca | aaa | ccc | aag | gac | acc | ctc | atg | atc | tcc | cgg | acc | cct | gag | gtc | 864 |
| Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | |
| | | | 275 | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| aca | tgc | gtg | gtg | gtg | gac | gtg | agc | cac | gaa | gac | cct | gag | gtc | aag | ttc | 912 |
| Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | |
| | | | 290 | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| aac | tgg | tac | gtg | gac | ggc | gtg | gag | gtg | cat | aat | gcc | aag | aca | aag | ccg | 960 |
| Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| cgg | gag | gag | cag | tac | aac | agc | acg | tac | cgt | gtg | gtc | agc | gtc | ctc | acc | 1008 |
| Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| gtc | ctg | cac | cag | gac | tgg | ctg | aat | ggc | aag | gag | tac | aag | tgc | aag | gtc | 1056 |
| Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | |

| | |
|---|------|
| tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc | 1104 |
| Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala | |
| 355 360 365 | |
| aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg | 1152 |
| Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg | |
| 370 375 380 | |
| gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc | 1200 |
| Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly | |
| 385 390 395 400 | |
| ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg | 1248 |
| Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro | |
| 405 410 415 | |
| gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc | 1296 |
| Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser | |
| 420 425 430 | |
| ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag | 1344 |
| Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln | |
| 435 440 445 | |
| ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac | 1392 |
| Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His | |
| 450 455 460 | |
| tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga | 1431 |
| Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys | |
| 465 470 475 | |

配列番号 7 :

配列の長さ : 2 3 4

配列の型 : アミノ酸

起源 : Homo sapiens

配列 :

10

20

30

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val
 20 25 30
 Ser Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ser Arg
 35 40 45
 Asn Glu Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Arg Ala Pro Ile
 50 55 60
 Leu Val Ile Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Asn Gly
 85 90 95
 Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg
 100 105 110
 Ala Ser Asp His Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Thr Val Leu
 115 120 125
 Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 130 135 140
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 165 170 175
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 180 185 190
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 195 200 205
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 210 215 220
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230

10

20

30

配列番号 8 :

配列の長さ : 4 7 6

配列の型 : アミノ酸

起源 : Homo sapiens

配列 :

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Lys Leu Gln Gln Trp Gly Glu Gly Leu Leu Gln
 20 25 30
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Arg Thr Cys Val Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45
 Ser Gly Tyr Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Arg Gly
 50 55 60
 Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Gly Asn Gly Ala Thr Thr Asn Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
 85 90 95
 Asn Gln Phe Phe Leu Asn Leu Asn Ser Val Thr Asp Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Arg Pro Asp Cys Thr Thr Ile Cys
 115 120 125
 Tyr Gly Gly Trp Val Asp Val Trp Gly Pro Gly Asp Leu Val Thr Val
 130 135 140
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 145 150 155 160
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 165 170 175
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 180 185 190
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 195 200 205
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 210 215 220
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 225 230 235 240
 Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 245 250 255
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 260 265 270

10

20

30

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 275 280 285
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 290 295 300
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 305 310 315 320
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 325 330 335
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 340 345 350
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 355 360 365
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 370 375 380
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 385 390 395 400
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 405 410 415
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 420 425 430
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 435 440 445
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 450 455 460
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475

10

20

配列番号 9 :

配列の長さ : 2 3 9

配列の型 : アミノ酸

起源 : Homo sapiens

配列 :

30

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Met | Ser | Leu | Pro | Ala | Gln | Leu | Leu | Gly | Leu | Leu | Leu | Leu | Cys | Val | Pro | |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | | | |
| Gly | Ser | Ser | Gly | Glu | Val | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Leu | Ser | Leu | Pro | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| Ile | Thr | Pro | Gly | Glu | Pro | Ala | Ser | Ile | Ser | Cys | Arg | Ser | Ser | Gln | Ser | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| Leu | Lys | His | Ser | Asn | Gly | Asp | Thr | Phe | Leu | Ser | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| Pro | Gly | Gln | Pro | Pro | Arg | Leu | Leu | Ile | Tyr | Lys | Val | Ser | Asn | Arg | Asp | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | 10 |
| Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ala | Gly | Thr | Asp | Phe | |
| | | | | 85 | | | | 90 | | | | | 95 | | | |
| Thr | Leu | Lys | Ile | Ser | Ala | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Val | Tyr | Phe | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| Cys | Gly | Gln | Gly | Thr | Arg | Thr | Pro | Pro | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| Val | Glu | Ile | Lys | Arg | Thr | Val | Ala | Ala | Pro | Ser | Val | Phe | Ile | Phe | Pro | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| Pro | Ser | Asp | Glu | Gln | Leu | Lys | Ser | Gly | Thr | Ala | Ser | Val | Val | Cys | Leu | 20 |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| Leu | Asn | Asn | Phe | Tyr | Pro | Arg | Glu | Ala | Lys | Val | Gln | Trp | Lys | Val | Asp | |
| | | | 165 | | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| Asn | Ala | Leu | Gln | Ser | Gly | Asn | Ser | Gln | Glu | Ser | Val | Thr | Glu | Gln | Asp | |
| | | 180 | | | | | 185 | | | | | | 190 | | | |
| Ser | Lys | Asp | Ser | Thr | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Ser | Lys | |
| | 195 | | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| Ala | Asp | Tyr | Glu | Lys | His | Lys | Val | Tyr | Ala | Cys | Glu | Val | Thr | His | Gln | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| Gly | Leu | Ser | Ser | Pro | Val | Thr | Lys | Ser | Phe | Asn | Arg | Gly | Glu | Cys | | 30 |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | | |

配列番号 10 :

配列の長さ : 478

配列の型 : アミノ酸

起源 : Homo sapiens

配列 :

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asp His Tyr Met Tyr Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro
 50 55 60
 Glu Trp Val Gly Phe Ile Arg Asn Lys Pro Asn Gly Gly Thr Thr Glu
 65 70 75 80
 Tyr Ala Ala Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 85 90 95
 Lys Ser Ile Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Ser Tyr Ile Ser His Cys Arg Gly Gly
 115 120 125
 Val Cys Tyr Gly Gly Tyr Phe Glu Phe Trp Gly Gln Gly Ala Leu Val
 130 135 140
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 145 150 155 160
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 165 170 175
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 180 185 190
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 195 200 205
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 210 215 220
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 225 230 235 240
 Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 245 250 255

10

20

30

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 260 265 270
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 275 280 285
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 290 295 300
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 305 310 315 320
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 325 330 335
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 340 345 350
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 355 360 365
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 370 375 380
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 385 390 395 400
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 405 410 415
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 420 425 430
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 435 440 445
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 450 455 460
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475

10

20

配列番号 1 1 :

配列の長さ : 2 3 6

配列の型 : アミノ酸

起源 : Homo sapiens

配列 :

30

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Met | Arg | Val | Pro | Ala | Gln | Leu | Leu | Gly | Leu | Leu | Leu | Leu | Trp | Leu | Pro | |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | | | |
| Gly | Ala | Arg | Cys | Glu | Ser | Val | Leu | Thr | Gln | Pro | Pro | Ser | Val | Ser | Gly | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| Ala | Pro | Gly | Gln | Lys | Val | Thr | Ile | Ser | Cys | Thr | Gly | Ser | Thr | Ser | Asn | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| Ile | Gly | Gly | Tyr | Asp | Leu | His | Trp | Tyr | Gln | Gln | Leu | Pro | Gly | Thr | Ala | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | Tyr | Asp | Ile | Asn | Lys | Arg | Pro | Ser | Gly | Ile | Ser | |
| 65 | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | 10 |
| Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Lys | Ser | Gly | Thr | Ala | Ala | Ser | Leu | Ala | Ile | |
| | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | |
| Thr | Gly | Leu | Gln | Thr | Glu | Asp | Glu | Ala | Asp | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Ser | Tyr | |
| | | 100 | | | | | 105 | | | | | | 110 | | | |
| Asp | Ser | Ser | Leu | Asn | Ala | Gln | Val | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Arg | Leu | Thr | |
| | 115 | | | | | 120 | | | | | | 125 | | | | |
| Val | Leu | Gly | Gln | Pro | Lys | Ala | Ala | Pro | Ser | Val | Thr | Leu | Phe | Pro | Pro | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | 140 | | | | | | |
| Ser | Ser | Glu | Glu | Leu | Gln | Ala | Asn | Lys | Ala | Thr | Leu | Val | Cys | Leu | Ile | |
| 145 | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | 20 |
| Ser | Asp | Phe | Tyr | Pro | Gly | Ala | Val | Thr | Val | Ala | Trp | Lys | Ala | Asp | Ser | |
| | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | |
| Ser | Pro | Val | Lys | Ala | Gly | Val | Glu | Thr | Thr | Thr | Pro | Ser | Lys | Gln | Ser | |
| | | 180 | | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| Asn | Asn | Lys | Tyr | Ala | Ala | Ser | Ser | Tyr | Leu | Ser | Leu | Thr | Pro | Glu | Gln | |
| | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | |
| Trp | Lys | Ser | His | Arg | Ser | Tyr | Ser | Cys | Gln | Val | Thr | His | Glu | Gly | Ser | |
| | 210 | | | | 215 | | | | | | 220 | | | | | |
| Thr | Val | Glu | Lys | Thr | Val | Ala | Pro | Thr | Glu | Cys | Ser | | | | | 30 |
| 225 | | | | 230 | | | | | | 235 | | | | | | |

配列番号 1 2 :

配列の長さ : 4 7 6

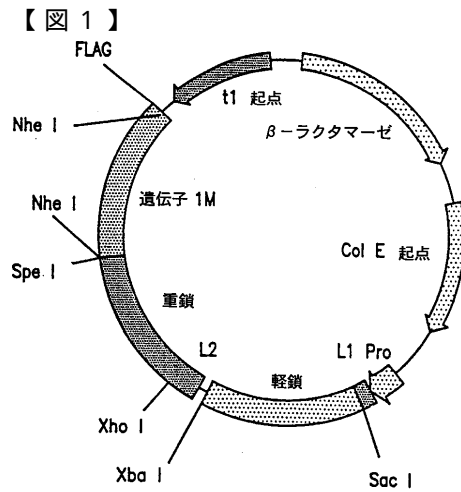
配列の型 : アミノ酸

起源 : Homo sapiens

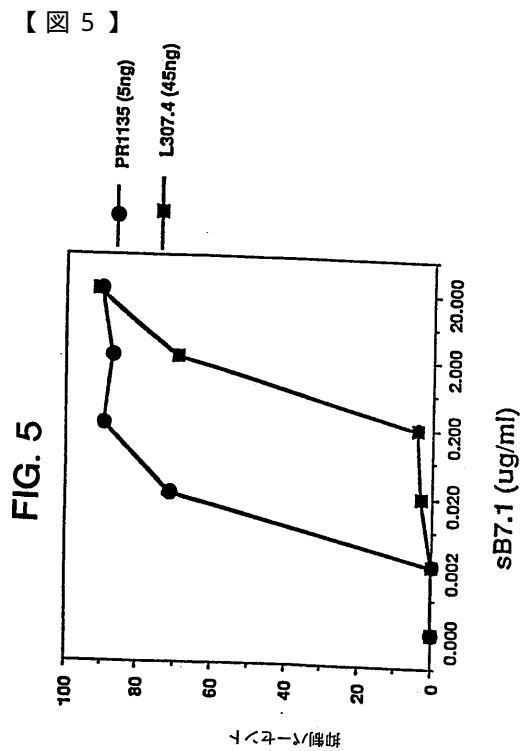
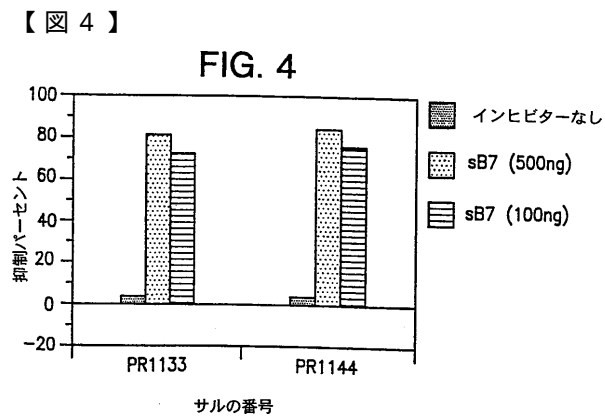
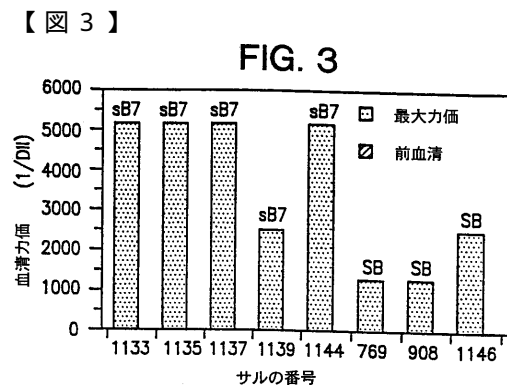
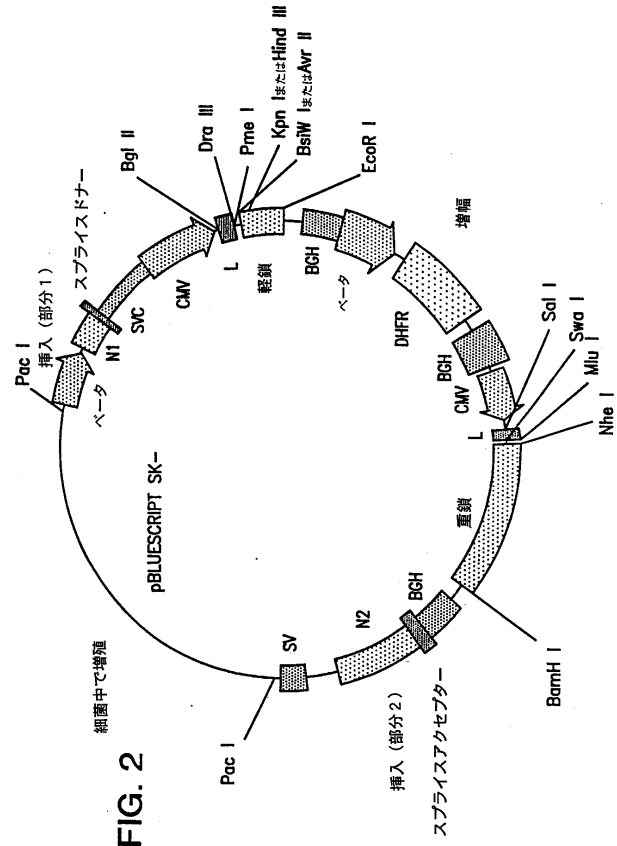
配列 :

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Met | Lys | His | Leu | Trp | Phe | Phe | Leu | Leu | Leu | Val | Ala | Ala | Pro | Arg | Trp | |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | | 15 | | |
| Val | Leu | Ser | Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Glu | Ser | Gly | Pro | Gly | Leu | Val | Lys | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| Pro | Ser | Glu | Thr | Leu | Ser | Leu | Thr | Cys | Ala | Val | Ser | Gly | Gly | Ser | Ile | |
| | | | 35 | | | | 40 | | | | | | 45 | | | |
| Ser | Gly | Gly | Tyr | Gly | Trp | Gly | Trp | Ile | Arg | Gln | Pro | Pro | Gly | Lys | Gly | |
| 50 | | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| Leu | Glu | Trp | Ile | Gly | Ser | Phe | Tyr | Ser | Ser | Ser | Gly | Asn | Thr | Tyr | Tyr | 10 |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| Asn | Pro | Ser | Leu | Lys | Ser | Gln | Val | Thr | Ile | Ser | Thr | Asp | Thr | Ser | Lys | |
| | | | | 85 | | | | 90 | | | | | 95 | | | |
| Asn | Gln | Phe | Ser | Leu | Lys | Leu | Asn | Ser | Met | Thr | Ala | Ala | Asp | Thr | Ala | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| Val | Tyr | Tyr | Cys | Val | Arg | Asp | Arg | Leu | Phe | Ser | Val | Val | Gly | Met | Val | |
| | | | 115 | | | | 120 | | | | | | 125 | | | |
| Tyr | Asn | Asn | Trp | Phe | Asp | Val | Trp | Gly | Pro | Gly | Val | Leu | Val | Thr | Val | |
| | | | 130 | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | 20 |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | |
| | | | | 165 | | | | 170 | | | | | 175 | | | |
| Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | |
| | | | 195 | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | |
| | | | 210 | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | 30 |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |

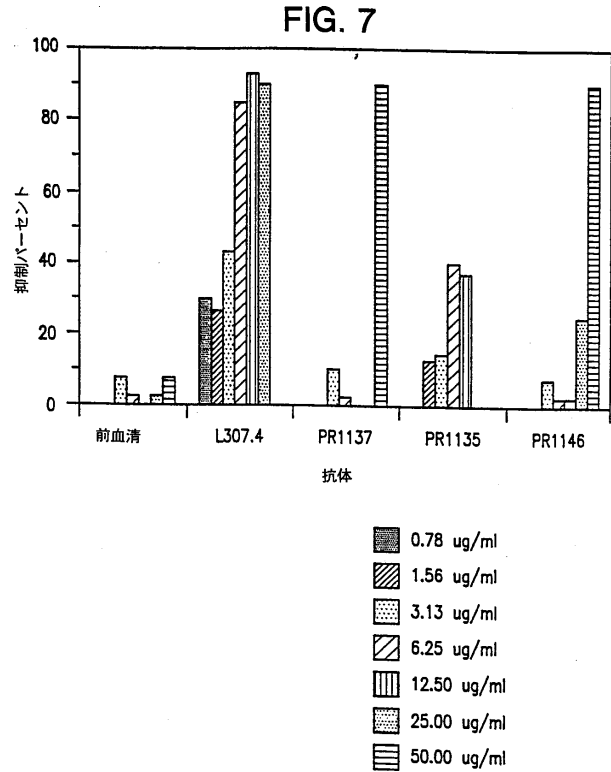
30



【 図 2 】



【圖 7】



【 図 8 b - 1 】

[illegible]

FIG. 8b-1

【 図 8 b - 2 】

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|------|------|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|------|-----|-----|------|-----|
| H | N | A | K | T | K | P | R | G | E | Q | Y | N | S | T | Y | R |
| CMT | AMT | GCC | ACA | ACA | CCG | CGG | GAG | GAG | QAT | AAAC | AGC | ACG | TAC | CTG | CGT | |
| 945 | | 954 | | | 963 | | | | 972 | | | 981 | | | 990 | |
| L | T | V | L | H | O | D | W | L | N | G | K | E | Y | K | K | A |
| CTC | ACG | GTC | CTG | CAG | GAC | TGG | CTG | AMT | GCC | KAG | AAE | YAC | TAC | CAC | KAC | |
| 1008 | | 1017 | | | 1026 | | | | 1035 | | | 1044 | | | 1053 | |
| A | L | P | A | P | I | E | K | T | I | S | K | A | A | G | Q | P |
| GCC | CTC | CCA | GCC | CCC | ATC | GAG | AAA | ACC | ATC | TCC | AAA | GCC | AAA | GGG | CAG | CTC |
| 1071 | | | 1080 | | | 1089 | | | 1098 | | | 1107 | | | 1116 | |
| V | T | Y | T | A | L | P | P | S | R | D | E | L | T | K | N | Q |
| GTC | TAC | ACC | CTG | CCA | TCC | CGG | CAG | GAG | CTC | ACC | AAE | AAE | CAG | QAC | CTG | AGC |
| 1134 | | | 1143 | | | 1152 | | | 1161 | | | 1170 | | | 1179 | |
| V | K | G | F | Y | P | S | D | I | A | V | E | W | E | S | N | G |
| GTC | AAA | GCC | TTC | TAT | CCC | AGC | GAC | ATC | GCC | GTC | GAG | TGG | GAG | AGC | AMT | GCG |
| 1197 | | | 1206 | | | 1215 | | | 1224 | | | 1233 | | | 1242 | |
| N | Y | K | T | T | P | P | V | L | D | S | D | G | S | F | F | L |
| AMC | TAC | AAE | ACC | ACG | CCT | CCC | GTC | CTG | GAC | CCC | GAC | GCC | TTC | TTC | CTC | CTC |
| 1260 | | | 1269 | | | 1278 | | | 1287 | | | 1296 | | | 1305 | |
| T | C | V | D | K | S | R | W | Q | Q | G | N | V | F | S | C | S |
| ACC | GTC | AAE | AGC | AGC | AGC | TGG | CGA | GAG | GGG | AAE | ATC | TTC | TCA | TCC | CTC | GTC |
| 1323 | | | 1332 | | | 1341 | | | 1350 | | | 1359 | | | 1368 | |
| L | K | H | N | H | Y | T | Q | K | S | L | S | L | S | P | G | K |
| CTG | CAC | AAE | CAC | TAC | AGC | CAG | AAE | AGC | CTC | TCC | CTC | CTC | CTC | GGT | AAA | TGC |
| 1386 | | | 1395 | | | 1404 | | | 1413 | | | 1422 | | | 1431 | |

FIG. 8b-2

【 図 9 a 】

[illegible]

FIG. 9a

【 図 9 b - 1 】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| フレーム 1 | M | G | T | G | S | L | I | L | L | L | V | A | V | A | T | R | V | Q | C |
| | ATG | GGT | TGG | AGC | CTC | ATC | CTC | TTC | TTC | CTT | GTC | GCT | GCT | GAT | CGT | GTC | GTC | 54 | |
| | | | 9 | | | | 18 | | | 27 | | 36 | | | 45 | | | | |
| E | V | Q | L | V | E | G | S | G | G | L | V | C | G | G | G | S | L | R | V |
| GAG | GTC | GAA | CTG | GTC | GAT | GTC | GGA | GGC | TGT | GTC | CAG | CGT | GCG | GGG | TCC | LR | AGA | GTC | |
| 63 | | | 72 | | | | 81 | | | 90 | | 99 | | | 108 | | | 117 | |
| C | A | V | S | G | F | T | F | S | D | H | Y | M | Y | W | F | R | Q | A | P |
| TGT | GCA | TCT | TCT | GAA | TTC | ACC | TTC | AGT | GAC | TAC | ATG | TAT | TGC | TGG | CGC | CAG | GCT | CCT | |
| 126 | | | 135 | | | | 144 | | | 153 | | 162 | | | 171 | | | 180 | |
| K | G | C | P | C | T | G | G | F | T | I | R | N | K | P | N | G | A | T | A |
| AGG | GGC | GAA | TGG | GTA | GCT | TTC | ATT | ACA | AAC | AAA | CAA | NGG | AGC | GGT | GGG | ACA | GYA | TAA | |
| 189 | | | 198 | | | | 207 | | | 216 | | 225 | | | 234 | | | 243 | |
| A | S | V | K | D | R | F | T | I | S | R | D | D | S | K | S | I | A | Y | A |
| GCG | TCT | TGT | AAA | GAC | AGA | TTC | ACC | TTC | TCC | ACA | GAT | GAT | CAA | AGC | ATC | GCC | TAT | CTC | |
| 252 | | | 261 | | | | 270 | | | 279 | | 288 | | | 297 | | | 306 | |
| M | S | S | L | K | I | E | D | G | T | A | V | Y | Y | C | T | T | S | I | S |
| AGC | AGC | CTG | AAA | ATC | GAG | GAC | TAC | ACG | GCC | GTC | TAC | TAT | TCT | ACT | ACA | TCC | YAT | TCA | |
| 315 | | | 324 | | | | 333 | | | 342 | | 351 | | | 360 | | | 369 | |
| C | R | G | G | V | C | Y | G | C | T | T | A | T | T | F | E | G | A | L | V |
| TGT | CGG | GGT | GAT | CTC | TAT | GGA | GGT | GAC | GAT | GAT | GAA | TTC | TGC | GGC | GAC | GCC | CTC | ATC | |
| 378 | | | 387 | | | | 396 | | | 405 | | 414 | | | 423 | | | 432 | |
| V | S | S | A | G | T | K | G | P | S | V | F | P | L | A | F | S | S | K | S |
| GTC | TCC | TCA | GCT | AGC | AAG | GCG | CCA | TGG | GTC | TTC | CCC | CTG | ACA | CCC | TCC | TCC | AGC | AGC | |
| 441 | | | 450 | | | | 459 | | | 468 | | 477 | | | 486 | | | 495 | |
| S | G | G | T | A | A | A | L | C | G | C | L | V | K | D | Y | F | F | E | P |
| TCT | GGG | GCT | ACA | GCC | CTC | GTC | GCC | TGC | GTG | ATG | GAC | TAC | TAT | FTC | FTC | GAA | CGC | TGC | |
| 504 | | | 513 | | | | 522 | | | 531 | | 540 | | | 549 | | | 558 | |
| S | W | N | S | G | A | L | T | S | G | V | H | T | F | P | A | V | L | Q | S |
| TGT | GGT | AAC | TCA | GCG | GCC | CTC | AGC | GGC | GCC | GTC | CAC | ACC | TAT | TCG | GCT | CTA | GTC | TCC | |
| 567 | | | 576 | | | | 585 | | | 594 | | 603 | | | 612 | | | 621 | |
| G | A | L | Y | S | L | S | S | V | V | T | G | V | P | S | S | L | G | T | Q |
| GGA | CTC | TAC | TCC | CTC | AGC | AGC | GTC | GTC | ATC | GTC | CCC | CCC | AGC | AGC | TTG | GCG | ACC | CAC | |
| 630 | | | 639 | | | | 648 | | | 657 | | 666 | | | 675 | | | 684 | |
| I | C | N | V | N | H | K | P | C | S | N | T | K | V | D | K | A | E | P | K |
| ATC | TGC | AAC | GTA | ATG | AAC | CAC | AGC | AGC | AAC | ACC | TTC | K | AVG | GTG | D | K | A | A | |
| 693 | | | 702 | | | | 711 | | | 720 | | 729 | | | 738 | | | 747 | |

【 図 9 b - 2 】

[illegible]

FIG. 9b-2

FIG. 9b-1

【 図 1 0 b - 1 】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| フレーム 1 | M | K | K | H | C | L | W | F | T | F | L | C | T | V | A | A | P | R | W | V | L | S | |
| | ATG | AAA | | | | CTG | TGG | TTC | TTT | CTC | CTC | CTC | CTC | GTG | ACA | GCT | CCC | AGA | ATG | GGC | TTC | TCC | |
| | | | | | 9 | | | 18 | | | | 27 | | | 36 | | | 45 | | | 54 | | |
| Q | V | C | L | Q | E | G | G | G | C | G | A | L | V | A | P | C | T | R | W | V | L | S | |
| CGT | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | |
| 63 | | | | 72 | | | | 81 | | | | 90 | | | 99 | | | 108 | | | 117 | | |
| C | A | V | T | G | G | G | G | I | X | A | S | G | G | Y | G | W | G | I | R | Q | P | P | |
| TGC | CTC | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | TCT | |
| 126 | | | | 135 | | | | 144 | | | | 153 | | | 162 | | | 171 | | | 180 | | |
| G | K | A | G | L | E | W | I | G | S | F | T | A | A | G | G | G | G | N | T | Y | Y | N | P |
| GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | GGG | |
| 189 | | | | 198 | | | | 207 | | | | 216 | | | 225 | | | 234 | | | 243 | | |
| S | L | K | S | Q | V | T | I | S | T | D | T | S | T | K | A | N | Q | F | T | T | L | K | L |
| TCC | CTC | ATG | AGT | ACA | GTC | ACC | ATT | TCA | TCA | ACA | GAC | ACG | TCC | K | AG | C | ATC | TTC | TCC | CTC | CTC | CTC | |
| 252 | | | | 261 | | | | 270 | | | | 279 | | | 288 | | | 297 | | | 306 | | |
| N | S | H | T | A | A | D | C | T | A | G | C | C | T | Y | Y | C | V | R | D | R | L | F | S |
| AAC | TCT | ATG | ACC | ACA | CGG | GAC | GAC | ATC | GCC | GTG | TAT | YAC | TGT | GTG | ACA | GAT | CGT | CTT | TTT | TTT | CTC | CTC | |
| 315 | | | | 324 | | | | 333 | | | | 342 | | | 351 | | | 360 | | | 369 | | |
| V | G | A | M | G | T | T | Y | A | N | A | C | W | F | D | V | W | G | C | P | G | V | L | V |
| GTG | CTC | ATG | GTT | TAC | AA | ACC | TTC | GAT | CTC | GAT | CTC | GAT | CTC | GAT | CTC | GAT | CTC | GAT | CTC | GAT | CTC | CTC | |
| 378 | | | | 387 | | | | 396 | | | | 405 | | | 414 | | | 423 | | | 432 | | |
| S | A | S | T | K | G | P | S | V | F | P | C | L | A | P | S | S | C | T | S | S | T | S | G |
| TCA | GCT | ACC | ACC | ACC | GGC | CCA | TTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | |
| 441 | | | | 450 | | | | 459 | | | | 468 | | | 477 | | | 486 | | | 495 | | |
| G | C | A | C | G | C | C | L | T | G | C | L | V | K | D | Y | F | P | E | P | V | T | V | S |
| GGC | ACA | CGC | GCC | CTG | GCC | CTG | CTG | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | CTC | |
| 504 | | | | 513 | | | | 522 | | | | 531 | | | 540 | | | 549 | | | 558 | | |
| N | S | G | A | L | T | C | S | G | V | H | T | T | F | C | A | G | T | C | T | C | T | C | T |
| AAC | TCA | GGC | GCC | CTG | ACC | AGC | GTC | GTG | ACC | ACC | ACC | ACC | ACC | ACC | ACC | ACC | ACC | ACC | ACC | ACC | ACC | ACC | |
| 567 | | | | 576 | | | | 585 | | | | 594 | | | 603 | | | 612 | | | 621 | | |
| Y | S | L | S | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

FIG. 10a

FIG. 10b-1

【 ㊦ 1 0 b - 2 】

| 882 | | | | 891 | | | | 900 | | | | 909 | | | | 918 | | | | 927 | | | | 936 | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|---|---|---|------|---|---|---|------|---|---|---|------|---|---|---|------|---|---|---|------|---|---|---|------|---|---|---|------|---|---|---|------|---|---|--|------|--|--|--|
| C | A | T | N | G | A | K | A | T | K | P | G | C | G | E | G | A | G | C | A | T | N | S | T | Y | T | R | C | V | V | S | V | | | | | | | | |
| H | A | T | A | G | A | A | A | A | A | C | C | G | G | E | G | A | G | C | A | T | N | S | T | Y | T | R | C | V | V | S | V | | | | | | | | |
| C | A | T | A | G | A | A | A | A | A | C | C | G | G | E | G | A | G | C | A | T | N | S | T | Y | T | R | C | V | V | S | V | | | | | | | | |
| 945 | | | | 954 | | | | 963 | | | | 972 | | | | 981 | | | | 990 | | | | 1000 | | | | 1010 | | | | 1020 | | | | | | | |
| L | T | V | L | H | Q | D | W | L | N | G | L | N | G | K | E | Y | K | A | C | K | V | S | N | K | A | A | L | T | C | A | A | A | A | A | | | | | |
| C | T | C | A | G | T | C | G | C | A | G | C | A | G | K | E | Y | K | A | C | K | V | S | N | K | A | A | L | T | C | A | A | A | A | A | | | | | |
| 1008 | | | | 1017 | | | | 1026 | | | | 1035 | | | | 1044 | | | | 1053 | | | | 1062 | | | | 1071 | | | | 1080 | | | | 1089 | | | |
| A | L | P | A | P | I | E | K | A | T | I | S | K | A | A | K | G | Q | G | G | P | R | E | P | Q | C | A | G | A | A | A | A | A | A | | | | | | |
| G | C | C | C | C | C | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | | | | | | |
| 1071 | | | | 1080 | | | | 1089 | | | | 1098 | | | | 1107 | | | | 1116 | | | | 1125 | | | | 1134 | | | | 1143 | | | | 1152 | | | |
| V | T | Y | A | T | L | P | P | S | R | D | E | L | T | A | K | N | Q | V | S | L | T | C | L | C | L | T | C | T | C | T | C | T | C | | | | | | |
| G | T | C | A | G | T | C | C | C | A | T | C | A | G | C | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | | | | | | |
| 1134 | | | | 1143 | | | | 1152 | | | | 1161 | | | | 1170 | | | | 1179 | | | | 1188 | | | | 1197 | | | | 1206 | | | | 1215 | | | |
| V | K | G | F | Y | P | S | D | I | A | V | E | W | E | H | S | N | G | G | G | P | E | A | N | A | C | A | A | A | A | A | A | A | A | | | | | | |
| G | T | C | A | G | T | C | C | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | | | | | | |
| 1197 | | | | 1206 | | | | 1215 | | | | 1224 | | | | 1233 | | | | 1242 | | | | 1251 | | | | 1260 | | | | 1269 | | | | 1278 | | | |
| N | A | C | T | K | A | T | P | P | V | L | D | S | D | G | S | F | T | F | L | Y | S | K | L | C | L | A | A | A | A | A | A | A | A | | | | | | |
| A | C | A | T | A | A | C | C | C | C | C | C | T | G | C | T | G | C | T | G | C | T | G | C | T | G | A | A | A | A | A | A | A | A | | | | | | |
| 1260 | | | | 1269 | | | | 1278 | | | | 1287 | | | | 1296 | | | | 1305 | | | | 1314 | | | | 1323 | | | | 1332 | | | | 1341 | | | |
| T | V | D | K | S | R | A | G | Q | Q | G | N | V | F | S | C | S | V | H | E | A | G | A | G | C | T | A | A | A | A | A | A | A | A | | | | | | |
| A | C | C | G | A | A | A | A | A | A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

FIG. 10b-2

フロントページの続き

- (72)発明者 アンダーソン, ダレル・アール
アメリカ合衆国 9 2 0 2 9 カリフォルニア州 エスコンディド、ナバホ・プレイス 1 8 5 1 番
- (72)発明者 ブラムズ, ピーター
アメリカ合衆国 9 2 1 1 6 カリフォルニア州 サンディエゴ、プロクター・プレイス 4 3 0 3 番
- (72)発明者 ハンナ, ナビル
アメリカ合衆国 9 2 0 2 4 カリフォルニア州 オリブンヘイン、フォートゥナ・ランチ・ロード
3 2 5 5 番
- (72)発明者 シーズトースキー, ウィリアム・エス
アメリカ合衆国 9 2 1 0 9 カリフォルニア州 サンディエゴ、トーマス・アベニュー 1 1 5 5 番

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 特表平 0 6 - 5 0 9 7 0 8 (J P , A)
Biotechnology, 1 9 9 2 年, Vol.10, p.1455-1460
Cell, 1 9 9 5 年 3 月, Vol.80, p.707-718

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/02
C07K 16/18
C12N 5/10
C12P 21/08
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)