

(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 1
C 12 N 15/02	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A C
C 07 K 16/18	(2006.01) C 07 K 16/18
C 12 N 5/10	(2006.01) C 12 N 5/00 B
C 12 P 21/08	(2006.01) C 12 P 21/08

請求項の数 10 (全 55 頁)

(21) 出願番号	特願平9-502179	(73) 特許権者	398050098 バイオジエン・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O2142マサチューセット州ケンブリッジ、ケンブリッジ・センター14番
(86) (22) 出願日	平成8年6月6日(1996.6.6)	(74) 代理人	100068526 弁理士 田村 恒生
(65) 公表番号	特表平11-508764	(74) 代理人	100100158 弁理士 鮫島 瞳
(43) 公表日	平成11年8月3日(1999.8.3)	(74) 代理人	100126778 弁理士 品川 永敏
(86) 国際出願番号	PCT/US1996/010053	(74) 代理人	100156111 弁理士 山中 伸一郎
(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)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒトB7.1および/またはB7.2に特異的なサルモノクローナル抗体、その靈長類化形態、医薬組成物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

ヒトCD80抗原に特異的に結合し、

(a) 配列番号9および配列番号10にそれぞれ示す抗体7B6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CD80抗原に結合する(a)のF(ab')<sub>2</sub>、FabまたはFv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。

10

## 【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4PE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。

20

**【請求項 5】**

非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 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' )<sub>2</sub>、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。

**【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。

**【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 トランスフェクトーマである、請求項 8 に記載の培養細胞。

**【請求項 10】**

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產生する、請求項 8 に記載の培養細胞。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【技術分野】**

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靈長類化 (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イアリー (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產生された、ヒト B 7 、すなわちヒト B 7 . 1 およびヒト B 7 . 2 に対するマカーカザル (macaque) 抗体の製造および同定に関する。

**【0002】**

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 に結合する特定の靈長類化抗体、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靈長類化抗

体を含む医薬組成物並びにB7：CD28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た。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。10

##### 【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.)、リツ (Ritz, J.)、ショウ (Shaw, S.)、シルバースタイン (Silverstein, R L)、スプリンガー (Springer, T A)、テッダー (Tedder, T F)、Todd (Todd, R F) : CD 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、最近ではコスティミュラトリ (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) ; ジエンキンス (Jenkins, M K)、ジョンソン (Johnson, J G) : 「T細胞コスティミュレーションに関する分子」、Curr. Opin. Immunol. 5 : 351, 1993; ゲッパート (Geppert, T.)、デービス (Davis, L.)、ガーリー (Gur, H.)、ワコルツ (Wacholtz, M.)、リップスキー (Lipsky, P.) : 「T細胞活性化に関するアクセサリー細胞」、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) ]。コスティミュラトリ分子は、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) ; ジエンキンス、ジョンソン : 「T細胞コスティミュレーションに関する分子」、Curr. Opin. Immunol. 5 : 351, 1993; ゲッパート、デービス、ガーリー、ワコルツ、リップスキー : 「T細胞活性化に関するアクセサリー細胞」、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CD28受容体の役割」、Immunol. Today 15 : 321 (1994) ]。203040

##### 【0005】

最近、B7：CD28と称する一つの特異的なコスティミュラトリ経路が、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50

[ ジュン、ブルーストーン、リンスレイ、トンプソン：「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、CTL A - 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、トンプソン：「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、CTL A - 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) ]。

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カーな役割を果たすことが報告されている。

#### 【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カーな役割

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 ; ジエンキンス ( 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病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 ] 。

#### 【0007】

ある種の他のコスティミュラトリーモルエット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CTL A - 4」 [ ジューン、レッドベター、リンスレイおよびトンプソン ( 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、プラディー、アーンズ、グロスマア ( L. S. Grosmaire ) 、ダムル ( N. K. Damle ) およびレッドベター ( 1991 ) 、「CTL A - 4はB細胞活性化抗原B7の第二の受容体である

10

20

30

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ーモルエット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)、セギル (J. M. Segil)、リー (G. Lee)、ホワイトマン (J. F. Whitman) およびナドラー (LM. 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ー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 細胞クローニング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. Gibben)、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 [レンショウ (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)、ブライディー、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臍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 かまたは 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 200 Nm 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单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. Lomarald)、ゾウ (L-J. Zhou)、ホワイト、

フィンゲロス ( J . D . F ingeroth ) 、グリベンおよびナドラー ( 1 9 9 1 ) 、「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 細胞コスティミュラトリ一活性」、 J . Exp . Med . 、 1 7 4 : 6 2 5 ~ 6 3 1 ] 。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、 N K 細胞および B リンパ球では促進される [ アズマ、イトー ( D . I to ) 、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 ) ( 1 9 9 3 ) 、「 B 7 0 抗原は C T L A - 4 および C D 2 8 の第二のリガンドである」、 Nature 、 3 6 6 : 7 6 ~ 7 9 ] 。 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 [ レンショード、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 ( 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 ; ブショティス ( 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 ( 1 9 9 3 ) 、「活性化されたヒト B リンパ球は、 T 細胞活性化をコスティミュレートする 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 、 9 0 : 1 1 0 5 9 ~ 1 1 0 6 3 ] 。 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 2 4 時間後までは検出できなかった [ ブショティス、フリーマン、グリベン、ダリー、グレイおよびナドラー ( 1 9 9 3 ) 、「活性化されたヒト B リンパ球は、 T 細胞活性化をコスティミュレートする 3 つの C T L A - 4 副受容体を発現する」、 Proc . Natl . Acad . Sci . U S A 、 9 0 : 1 1 0 5 9 ~ 1 1 0 6 3 ] 。それゆえ、 C T L A - 4 / C D 2 8 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 の差異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 2 8 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 . ) 、トレントーノ ( P . J . Tolentino ) 、フリーマン、ナドラーおよびハフラー ( D . A . Hafler ) ( 1 9 9 2 ) 、「 C D 2 8 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 . 、 1 7 6 : 1 7 7 ~ 1 8 6 ; 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、トンプソンおよびジュン ( 1 9 9 2 ) 、「抗体および B 7 / B B 1 媒体された C D 2 8 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 、 1 7 5 : 9 5 1 ~ 9 6 0 ] 。 T 細胞に対する C T L A - 4 および C D 2 8 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 ) ( 1 9 9 4 ) 、「リンパ球応答のシグナルおよび信号」、 C e II 、 7 6 . 2 7 5 2 8 5 ] 。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しうる可能性がある [ 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 ( 1 9 9 2 ) 、「活性化 T リンパ球上で 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 ] 。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 とコスティミュラトリーシグナルの両者が必要である [ グリーナン ( Greenan , V . ) およびクレーマー ( G . Kroemer ) ( 1 9 9 3 ) 、「細胞免疫寛容への複数の経路」、 Immunology Today 、 1 4 : 5 7 3 ] 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 ( 1 9 9 0 ) 、「 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 、 2 4 8 : 1 3 4 9 ; ジェンキンス ( 1 9 9 2 ) 、「

10

20

30

40

50

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]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細胞増殖をコスティミュレートする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/BB1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、プロッド(S.A.Brod)、リー、レイニング(J.C.Lanning)、ハフラー、ドーフ(M.E.Dorf)、グレイ、レイサー(H.Reiser)、ジュン、トンプ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リンパ球のコスティミュレーション：CD28、CTLA-4およびB7/BB1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/BB1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B.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

10

20

30

40

50

特異的な治療効果が得られる可能性がある。B7.1かまたはB7.2のいずれかに対する抗体は、インビトロでのIL-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)、ドープ(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)(1992)、「新規な抗B7モノクローナル抗体の機能的特徴付け」、Eur. Journal of Immunology, 22:3071~3075; 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/BB1の機能的発現」、J. Exp. Med., 177:845~850]。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。

CTL A - 4 / Ig融合タンパク質および抗CD28 Fabは、IL-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。

## 【0012】

可溶性のCTL A - 4 / Ig融合タンパク質のインビオ投与は、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[リンクレイ、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(1992)、「活性化Tリンパ球上でのCTL A - 4 およびCD28の同時発現および機能的協同」、J. Exp. Med., 176:1595~1604; リン(Lin, H.)、ビリング(S. F. Builing)、リンクレイ、ウェイ(R. O. Wei)、トンプソンおよびツルカ(L. A. Turka)(1993)、「CTL A - 4 - Ig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., 178:1801]、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、CTL A - 4 - Igは、T細胞とB7.1/B7.2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、マウスにおいて臍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(1993)、「CTL A - 4 の別のリガンドの発現および機能的有意」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11054~11058]。この場合、長期のドナー特異的な寛容が達成された。

## 【0013】

3. 抗体選択のための組換えファージ提示(Display)法

今まで、B7.1およびB7.2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產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(imune repertoire)を評価することができるからである。このことは、一部、PEG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产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。

## 【0014】

この技術はバーバー(Barber)らのProc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 7978~7982(1991)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PCR增幅し、纖維状ファージM13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M13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Fab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106を超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ェル上でえり分け、非特異的なファージを洗い落とし、抗原結

10

20

30

40

50

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、增幅後、このベクター系は非常に高い発現レベル (> 30 p g / 細胞 / 日) を達成できることが報告された。

## 【 0 0 1 5 】

## 4 . 灵長類化抗体

10

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 (1992) 、 Biotechnology, 10, 1455 ~ 1460 ] 。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靈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 1995 年 1 月 25 日に出願した米国特許出願第 08 / 379,072 号 (これは 1992 年 7 月 10 日に出願した米国特許出願第 07 / 912,292 号 (これは 1992 年 3 月 23 日に出願した米国特許出願第 07 / 856,281 号 (これは 1991 年 7 月 25 日に出願した米国特許出願第 07 / 735,064 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 08 / 379,072 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。

20

## 【 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ジニーを有することが見出された。実際、マカーカ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 85 ~ 98 % 相同であることがわかった [ ニューマンら (1992) 、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 91 ~ 92 % 相同であった [ ニューマンら、 Biotechnology, 10, 1458 ~ 1460 (1992) ] 。

30

## 【 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 (Weyl) ら [ Hum. Immunol. 、 31 (4) 、 271 ~ 276 (1991) ] は、天然および変異抗原変異体を用いた H L A - B - 27 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 (Toubert) ら [ Clin. Exp. Immunol. 、 82 (1) 、 16 ~ 20 (1990) ] は、 35 K D の細菌外膜タンパク質とも反応する H L A - B - 27 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 (Valle) ら [ Immunol. 、 69 (4) 、 531 ~ 535 (1990) ] 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 サブクラスの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. Immunol. 、 141 (7) 、 2503 ~ 9 (1988) ] は、 H L A - B - 27 およ

40

50

び H L A - 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を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。

【 0 0 1 9 】

B 7 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 - Tirogoviste ) 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 B 7 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 B 7 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

【 0 0 2 0 】

さらに、アフィニティー精製した可溶性 H L A - B 7 を用いた抗 H L A - B 7 同種反応性 C T L 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 B 7 活性を阻止するための B 7 受容体可溶性リガンド C T L A - 4 - I g の使用 [ たとえば、レンショーラ、 Science、 257、 789、 7955 ( 1992 ) を参照 ] および B 7 を抑制しうる B 7 - 1 - I g 融合タンパク質が報告されている。

【 0 0 2 1 】

本発明の目的は、ヒト B 7 抗原、より詳しくはヒト B 7 . 1 抗原および／またはヒト B 7 . 2 抗原に対する新規なマカーカザル抗体を製造および同定することにある。

20

【 0 0 2 2 】

さらに詳しくは、本発明の目的は、ヒト B 7 抗原、すなわちヒト B 7 . 1 抗原または B 7 . 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 B 7 抗原、すなわちヒト B 7 . 1 抗原およびヒト B 7 . 2 抗原に対する新規なマカーカザル抗体の製造および同定にある。

【 0 0 2 3 】

本発明の他の特別の目的は、ヒト B 7 . 1 抗原および／または B 7 . 2 抗原に特異的に結合し、 B 7 / C D 86 経路および活性化 T 細胞の B 7 刺激を抑制することにより I L - 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 B 7 サルモノクローナル抗体およびその靈長類化形態を提供することにある。

30

【 0 0 2 4 】

本発明の他の目的はまた、ドナー脾臓細胞培養中の抗原誘発応答、たとえば、抗原特異的な I g G 応答、 I L - 2 産生および細胞増殖を抑制する、抗ヒト B 7 . 1 および抗ヒト B 7 . 2 サルモノクローナル抗体およびその靈長類化形態を提供することにある。

【 0 0 2 5 】

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 B 7 . 1 抗原およびヒト B 7 . 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靈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靈長類化形態は、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（ S L E ）、 1 型糖尿病、特発性血小板減少性紫斑病（ I T P ）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

【 0 0 2 6 】

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、またはその靈長類化形態および薬理学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（ I T P ）や全身性エリテマトーデス（ S L E ）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。

**【0027】**

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抗原に特異的に結合する1またはそれ以上のサルまたは靈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、B7：CD28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（ITP）、全身性エリテマトーデス（SLE）、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。

**【0028】**

10

本発明のさらに他の目的は、ヒトB7.1抗原および／またはB7.2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CHO細胞を提供することにある。

**【0029】**

本発明の他の目的は、ヒトB7.1抗原および／またはヒトB7.2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、靈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。

**【0030】**

20

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。

**【0031】**

非枯渇（Non-depleting）抗体：B7とT細胞活性化リガンドCD28およびCTLA-4とのコスティミュラトリーアクションを阻止する抗体。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。

**【0032】**

靈長類化抗体：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PE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（1992）、「ヒト疾患の免疫療法のための組換え抗体の靈長類化：ヒトCDHに対するマカーカザル／ヒトキメラ抗体」、Biotechnology、10：1458～1460；および本願と同じ出願人に係る米国特許出願第08/379,072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ホモロジー、すなわち85～98%のホモロジーを示し、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。

30

**【0033】**

B7抗原：本願におけるB7抗原は、たとえばヒトB7.1抗原およびB7.2抗原を含む。これら抗原はCD28および／またはCTLA-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ーアクションを有する。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、Science、262：909（1993）を参照]、高密度にグリコシル化されている。

40

**【0034】**

抗B7抗体：ヒトB7抗原、たとえばヒトB7.1抗原および／またはB7.2抗原に充分な親和性にて特異的に結合してB7：CD28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靈長類化形態。

**【0035】**

**【図面の簡単な説明】**

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

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 抗原に特異的な靈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。 10

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 の軽鎖の靈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 の重鎖の靈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 の軽鎖の靈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 の重鎖の靈長類化形態のアミノ酸配列および核酸配列を示す。

図 10 a は、 素長類化軽鎖 1 6 C 1 0 のアミノ酸配列および核酸配列を示す。 20

図 10 b は、 素長類化重鎖 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靈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。 30

#### 【 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、纖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的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。 40

#### 【 0 0 4 0 】

本質的に、マカーカ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、靈長類化技術を開発する際に得られるマカーカ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 】

10

20

30

40

50

第二の方法は、ヒトB7抗原、好ましくはヒトB7.1抗原およびB7.2抗原に対してサル、すなわちマカーカザルを免疫することを含む。マカーカ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、Biotechnology、10、1455～1460(1992)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08/379,072号(1995年1月25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靈長類化抗体を作成するのに用いることができる。

#### 【0043】

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、マカーカ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85～88%相同であることがわかった(ニューマンら(1992)、上掲)。

10

#### 【0044】

本質的に、カニクイザルにヒトB7抗原、たとえばヒトB7.1抗原および/またはヒトB7.2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 EG)を用いてBリンパ球をK H 6 / B 5(マウス×ヒト)と融合させる。ついで、ヒトB7抗原、たとえばヒトB7.1抗原および/またはヒトB7.2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。

20

#### 【0045】

B7.1およびB7.2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、B7と同様にB7.1およびB7.2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B7.1およびヒトB7.2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。

#### 【0046】

30

しかしながら、ヒトB7抗原、B7.1抗原またはB7.2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B7.1およびB7.2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カ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。

#### 【0047】

本発明者らは、マカーカザルの免疫を、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カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した組換え可溶性B7.1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B7抗原および潜在的に他のB7抗原に対して特異的な抗体応答となるに充分な純度を有する限りにおいて、ヒトB7抗原、ヒトB7.1抗原またはヒトB7.2抗原の特定の採取源は重要ではない。

40

#### 【0048】

ヒトB7抗原、ヒトB7.1抗原(C D 8 0とも称される)遺伝子およびヒトB7.2抗原(C D 8 6とも称される)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。

#### 【0049】

好ましくは、投与するヒトB7抗原、ヒトB7.1抗原および/またはヒトB7.2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

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;参考のためその全体を本明細書中に引用する)を参照]。

#### 【0050】

マカークザルを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vant、たとえばフロントの完全アジュvant(CFA)、アルミニウム、サポニンまたは他の公知のアジュvant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vant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KHB6/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日に出願されたニューマンらの米国特許出願第08/379,072号(参考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、マカーク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、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充分な量で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日に出願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靈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クレアーゼエクソン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クレーション、ついでG418含有培地中での選択およびメトレキセート増幅の後に非常に高レベルの靈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 - 10M)を有する靈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 $> 30 \mu\text{g}/\text{細胞}/\text{日}$ 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細胞相互作用を有效地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CTL A4-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CTL A4-Igを放射性標識したCTL A4-Ig I125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 μg/M1
- b : 16C10 : 1.60 μg/M1
- c : 20C9 : 3.90 μg/M1

10

20

30

40

50

d : 7 B 6 : 3 9 . 0 μ g / M 1

【 0 0 6 3 】

2 . スキヤッチャード分析は、B 7 - Ig 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 × 1 0 - 9 M

b : 1 6 C 1 0 : 8 . 1 × 1 0 - 9 M

c : 7 B 6 : 1 0 . 7 × 1 0 - 9 M

d : 2 0 C 9 : 1 6 . 8 × 1 0 - 9 M

【 0 0 6 4 】

3 . 抗体を混合リンパ球反応アッセイ (MLR) においてインビトロで試験した。MLR 10 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 IL - 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 (PBL) 上の B 7 に結合する能力について試験した。FACS 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 FACS 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 CHO 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 Ig 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ら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 重鎖の靈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 DNA 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、これら靈長類化抗体は図 2 に示した NEO SPLA 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、本発明の靈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 PE を作成するのが好ましいであろう。このガンマ 4 PE 変異体は 2 つの変異、すなわち残留 FCR 結合を排除するために導入した CH 2 領域中のグルタミン酸、および

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 (A legr e) ら、J. Immunol.、148、3461～3468 (1992)；およびエンジェル (Angel) ら、Mol. Immunol.、30、105～158 (1993)；ともに参考のため本明細書中に引用する]。

## 【0072】

本発明の靈長類化抗体がガンマ1、ガンマ4またはガンマ4PE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、枯渴および非枯渴靈長類化IgG1およびIgG4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B7.1モノクローナル抗体およびその靈長類化形態はB7：CD28相互作用を阻止するための治療剤として充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IL-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B7.1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IgG応答、IL-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靈長類化形態はB7：CD28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、免疫抑制が治療学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IgG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、B7：CD28経路の抑制が治療学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。

10

20

## 【0074】

本発明の抗B7.1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 (ITP)、全身性エリテマトーデス (SLE)、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B7.1抗体の他の治療適応症は、臓器移植および骨髄移植 (BMT) の際の移植片対宿主病 (GVHD) 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、CTL A4-Ig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れなりうることが示されている [リン (Lin) ら、J. Exp. Med. 178] 1801、1993；トルカ (Tor ka) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89：11102、1992]。本発明の靈長類化抗B7.1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。

30

## 【0076】

上記方法によりまたは同等の技術により產生した抗体は、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ADC 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、AIDS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 ( $F(ab')、Fab、Fv) を造影試薬として、または抗イディオタイプ応答を生成するための能動免疫療法における潜在的なワクチンまたは免疫原として用いることができる。$

40

## 【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

50

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、尋麻疹、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1kg当たり約0.05～100mgの範囲であろう。30

**【0082】**

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充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变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つてよい。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、直腸内または膣内投与を含む。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。

10

20

30

40

50

## 【0092】

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体製剤である。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、固体パラフィン、軟パラフィンまたは流動パラフィン、グリセリン、蜜蝋、金属石鹼などの炭水化物；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B7.1抗体またはそのフラグメントはまた、B7：CD28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、IL-7やIL-10などのサイトカイン、CTLA4-Ig、可溶性CTLA4および抗CD28抗体およびそのフラグメントが挙げられる。

10

## 【0093】

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量および期間(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、およびかかる最適量が通常の技術により決定されう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日当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うることも認識されるであろう。

20

## 【0094】

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。

30

## 【0095】

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(50mg)、乳糖(100mg)、タルク(32mg)およびステアリン酸マグネシウム(8mg)を充填することにより調製する。

## 【0096】

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10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

## 【0097】

軟膏組成物

本発明の抗体またはそのフラグメントを1.0g  
白色軟パラフィンを100.0g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。

## 【0098】

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1.0g  
ポラワックスGP200を20.0g

50

無水ラノリンを 2 . 0 g

白色蜜蠟を 2 . 5 g

ヒドロキシ安息香酸メチルを 0 . 1 g

蒸留水を 1 0 0 . 0 g まで。

ポラワックス、蜜蠟およびラノリンをいっしょに 6 0 度で加熱する。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 5 0 度まで下げる。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。

#### 【 0 0 9 9 】

##### 局所ローション組成物

10

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を 0 . 6 g

ポリソルベート 2 0 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 1 0 0 - 0 0 m l ( B . P . = 英国薬局方 )。

#### 【 0 1 0 0 】

ヒドロキシ安息香酸メチルおよびグリセリンを 7 5 の水 ( 7 0 m l ) 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 2 0 およびセトステアリルアルコールをいっしょに 7 5 度で溶融し、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。

20

#### 【 0 1 0 1 】

##### 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 . 0 1 g

ヒドロキシ安息香酸プロピルを 0 . 0 4 g

精製水 B . P . を 1 0 0 - 0 0 m l

#### 【 0 1 0 2 】

30

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 7 0 m l の精製水に 7 5 度にて溶解し、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 . 0 2 2 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。

#### 【 0 1 0 3 】

##### 吸入投与のための組成物

1 5 - 2 0 m l 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 ( 1 0 m g ) をポリソルベート 8 5 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中に入れる。

40

#### 【 0 1 0 4 】

##### 吸入投与のための組成物

1 5 - 2 0 m l 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 ( 1 0 m g ) をエタノール ( 6 ~ 8 m l ) 中に溶解し、ポリソルベート 8 5 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中に入れる。

50

## 【0105】

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おり、一般に粒状物質を含まない。これら溶液は、通常の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

## 【0106】

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

## 【0107】

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。

## 【0108】

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充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

## 【0109】

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充分な所定量の本発明の変形抗体(またはそのフラグメント)を提供できなくてはならない。

## 【0110】

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。

## 【0111】

実施例1

纖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リーは、マッカフアーティー(McCafferty)ら、Nature、348:552~554、1990およびバーバス(Barbas)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 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リーから単離した[バーバスら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 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(1991、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、サルライブリリーの独特的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、pMS(図1)は、ポリシストロン性の重鎖および軽鎖サルDNAの効率的な転写および翻訳のための单一のlac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ompA[モッバ(Movva)ら、J. Biol. Chem.、255:27~29(1980)]および重鎖FdのためのpelB[レイ(Lei)ら、J. Bact.、4379~109:4383(1987)]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。ペリプラズムの酸化的環境中では、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Fab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、pMS DNA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-Lактамаз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ColE1の複製起点および纖維状バクテリオファージf1の複製起点をbluescriptから得た。ファージf1の複製起点(いわゆる遺伝子内領域)は、一本鎖pMS DNA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RNA合成の終止を指令する。pMS DNA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VCSM13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。VCSM13およびpMS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pMSゲノムかまたはVCSM13ゲノムのいずれかを含有する纖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pMSのパッケージングに比べて効率が悪く、その結果、組換えpMS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406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CH1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(pelBリーダーにより指令される)はペリプラズムに分泌され、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FLAG配列を含む。このFLAGは、Fd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Fabの精製およびELISAによる検出の両目的のために市販のモノクローナル抗FLAG M2を用いている[ブリザード(Brizzard)、Bio Technology、16(4):730~731(1994)]。

#### 【0112】

ベクターpMSを構築した後、本発明者らは該ベクターがファージ結合Fabを產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pMS中にクローニングし、XL1-blueを形質転換した。本発明者らはVCSM13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1:100,000にて組み合わせた。本発明者らは、混合ファージ(50μl)を抗原(破傷風毒素)コーティングポリスチレンウェ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XL1-blue細菌の新たなアリコートを感染させ、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

10

20

30

40

50

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。

#### 【 0 1 1 3 】

ファージ提示法をマカーカ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、靈長類化 (PRIMATIZED T M ) 抗体法 (米国特許出願第 0 8 / 3 7 9 , 0 7 2 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カーカ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。

#### 【 0 1 1 4 】

本発明者らは、マカーカザルの範囲 (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充分な物質を利用できるように各プライマーセットから充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カーカザル組み合わせ (combinatorial) ライブラリーを作成した。免疫グロブリン R N A の採取源として骨髄生検を C D 4 免疫サルから採取した。これらライブラリーは約 1 0 6 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。

#### 【 0 1 1 5 】

##### 実施例 2

###### B 7 / 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。B 7 . 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 B 7 . 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 B 7 . 1 N E O S P L A D N A で C H 0 細胞をトランスフェクションし、膜結合 B 7 . 1 を発現するクローナンを同定した。B 7 . 1 融合タンパク質も同様にして生成したが、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 力セットベクター中に P C R 増幅 B 7 . 1 遺伝子をクローニングした。この B 7 . 1 / I g N E O S P L A D N A で C H 0 細胞を形質転換し、B 7 . 1 / I g 融合タンパク質を分泌する安定なクローナンを増幅した。一般に、B 7 . 2 および C T L A - 4 試薬も同様にして生成したが、B 7 . 2 では R N A を抗 1 g および I L - 4 で 2 4 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。

#### 【 0 1 1 5 】

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・ディックキンソン(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產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に対する抗体力値を試験した。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を越える抗体力値を產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値を発現した。

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トランスフェクトーマへ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產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 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	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 PR135 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 MAb と比較した。特異性の対照として非標識 SB7.1 (0.002 - 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 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 結合部位をロックする必要があった。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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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 MAb 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效であった。

## 【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

L R )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つたが、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

10

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 を充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カ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。

20

## 【0126】

実施例 10ファージ提示ライプラリーの作成

組換えファージ提示ライプラリーを 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。チョンチンスキイ（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、XbaI 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プラリーを作成する。XL1-Blue 大腸菌を該ライプラリー 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。このライプラリーを、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ェル上で 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ニングを分析する。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。

30

## 【0127】

実施例 11

40

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

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 24 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 アファイ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ヤッチャード分析 [ カトー ( Kato ) ら、 J. Chem. BioEng. 、 76 : 451 ~ 454 ( 1993 ) ] 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。  
10

#### 【 0128 】

##### 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 125 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. 、 177 : 845 ~ 850 ; アズマら、 Nature 、 301 : 76 ~ 79 ( 1993 ) ] および I L - 2 アッセイキットを用いた I L - 2 產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ノヒト抗体の発現のための上記哺乳動物発現ベクター中ヘクローニングするために選択される。  
20

#### 【 0129 】

##### 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。ハイブリドーマの产生方法は、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、 1992 ( 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 glycol ( 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 ( Carroll ) ら、 J. Immunol. Meth. 、 89 : 61 ~ 72 ( 1986 ) ] と融合させる。ハイブリドーマを H . A . T . 培地上で選択し、 96 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。  
30

#### 【 0130 】

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、 125 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 產生の直接測定による M L R の抑制を行い、 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。  
40

#### 【 0131 】

##### 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 : 16 C 10 、 7 B 6 、 7 C 10 および 20 C 9 が同定された。これら抗体は以下のように特徴  
50

付けられた：

**【0132】**

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 1

10

**【0133】**

スキヤッチャード分析は、 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 × 1 0 - 9 M  
 b : 1 6 C 1 0 : 8 . 1 × 1 0 - 9 M  
 c : 7 B 6 : 1 0 . 7 × 1 0 - 9 M  
 d : 2 0 C 9 : 1 6 . 8 × 1 0 - 9 M

**【0134】**

抗体を混合リンパ球反応アッセイ ( M L R ) においてインピトロで試験し々 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：

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

20

**【0135】**

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。

**【0136】**

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、 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 1 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

**【0137】**

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 号の靈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、その靈長類化形態を 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。靈長類化 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

**【0138】**

これら靈長類化抗体は、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、最近になって靈長類化 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。

**【0139】**

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

配列番号 2 :

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 <u>cag</u> 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	
20 25 30	10
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 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 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	
cgf 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 3 :

配列の長さ : 720

配列の型 : 核酸

起源 : Homo sapiens

配列の特徴 : CDS、(1)..(717)

配列 :

10

20

30

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

10

30

40

50

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 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	
35 40 45	10
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 Tyr Ala Ala Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser 85 90 95	288	
aaa agc atc gcc tat ctg caa atg agc agc ctg aaa atc gag gag acg Lys Ser Ile Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr 100 105 110	336	
gcc gtc tat tac tgt act aca tcc tac att tca cat tgt cgg ggt ggt Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Ser Tyr Ile Ser His Cys Arg Gly Gly 115 120 125	384	
gtc tgc tat gga ggt tac ttc gaa ttc tgg ggc cag ggc gcc ctg gtc Val Cys Tyr Gly Gly Tyr Phe Glu Phe Trp Gly Gln Gly Ala Leu Val 130 135 140	432	10
acc gtc tcc tca gct agc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala 145 150 155 160	480	
ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu 165 170 175	528	
gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly 180 185 190	576	20
gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser 195 200 205	624	
gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu 210 215 220	672	
ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr 225 230 235 240	720	
aag gtg gac aag aaa gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr 245 250 255	768	30
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe 260 265 270	816	
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc ccg acc cct Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 275 280 285	864	
gag gtc aca tgc gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 290 295 300	912	40
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 305 310 315 320	960	
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 325 330 335	1008	
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	1056	

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

配列番号 5 :

配列の長さ : 711

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

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			10
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			20
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			30
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 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 : 234

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 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 10  
 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 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 20  
 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 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 30  
 225 230

配列番号 8 :

配列の長さ : 476

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            10  
 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            20  
 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            30  
 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

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

配列番号 9 :

配列の長さ : 239

配列の型 : アミノ酸

起源 : Homo sapiens

配列 :

10

20

30

Met Ser Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly 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 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  
   145            150            155            160             20  
 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  
   225            230            235             30

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 10  
 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 20  
 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 30  
 Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 245 250 255

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 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

配列番号 11 :

30

配列の長さ : 236

配列の型 : アミノ酸

起源 : Homo sapiens

配列 :

10

20

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly 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 10  
 65 70 75 80  
 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 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 20  
 145 150 155 160  
 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 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 Gly Asn Thr Tyr Tyr			
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			
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	
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	10 320
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	20 400
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	30

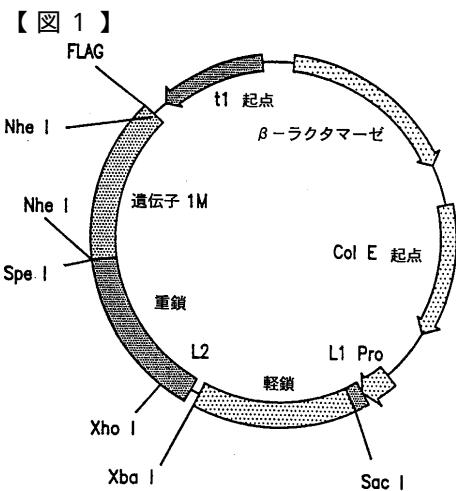


FIG. 1

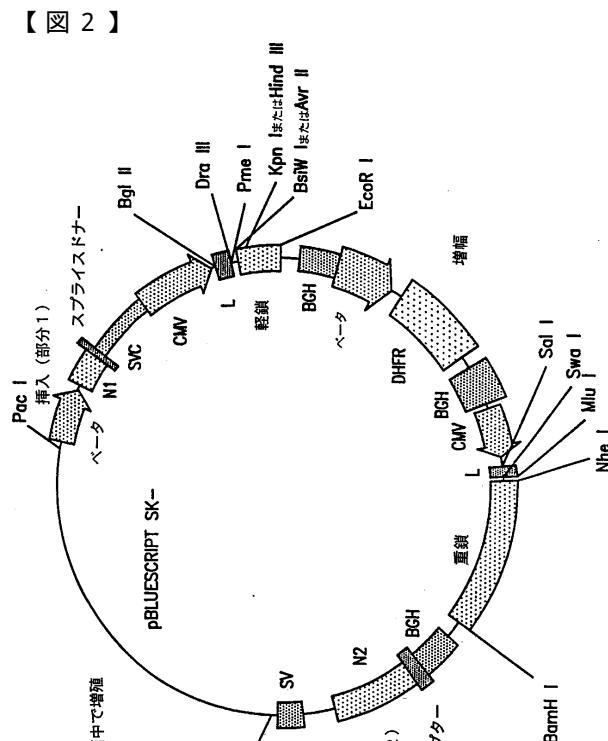
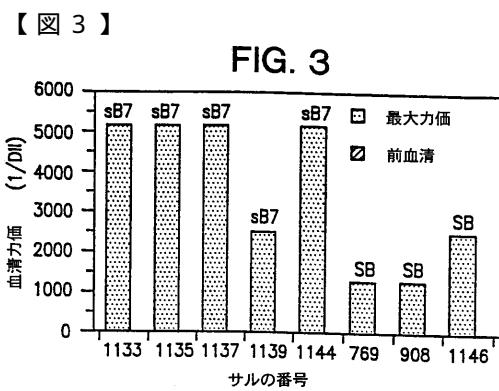
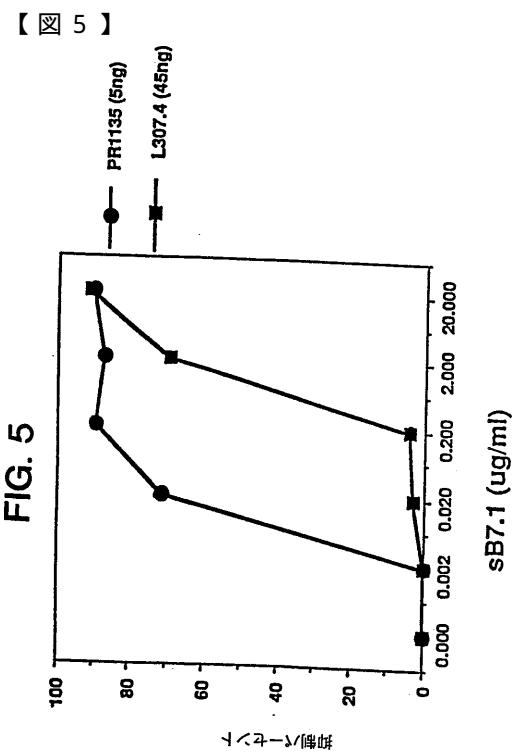
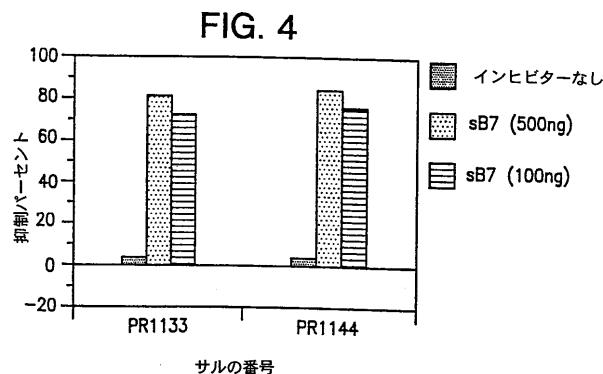


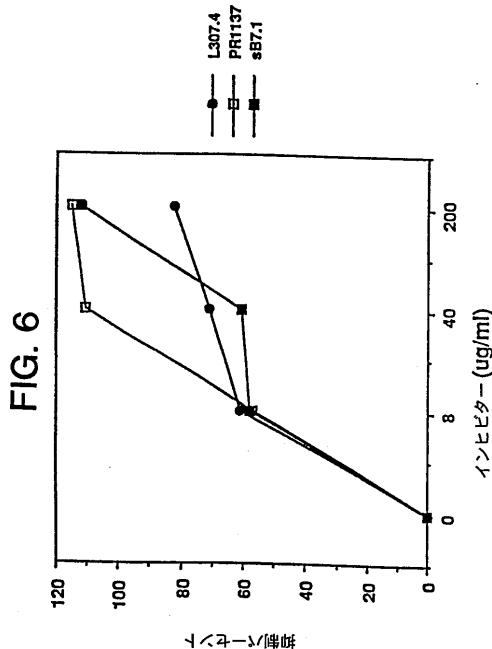
FIG. 2



【図4】



【図6】

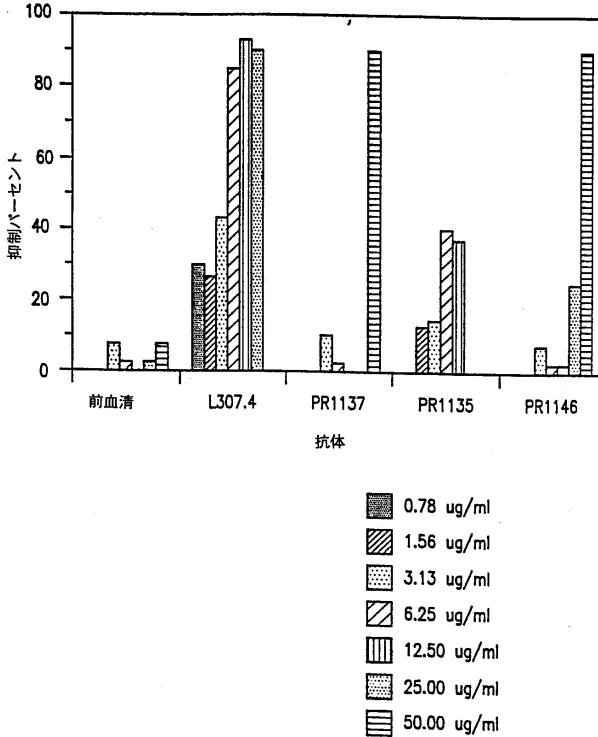


【图 8 a】

FIG. 8a

【図7】

FIG. 7



〔図 8 b - 1〕

L	E	M	K	K	H	L	W	F	F	L	L	V	A	A	P	R	W	V	L	G	S	
ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTC	CTG	GAG	GCA	GCT	CCC	AGA	TGG	GTC	GTC	GTC	TCC	54	45	
					9	18				27		36										
Q	V	K	L	Q	Q	W	G	A	G	G	L	L	Q	P	S	E	T	L	S	R	T	
CAG	CTG	AMG	CTG	CTG	CGG	CGG	GAA	GGA	CTT	CTG	CAG	CCT	CGG									
					63	72				81		90		99						108		117
C	V	V	S	G	G	S	I	G	G	Y	Y	Y	W	W	T	W	I	R	Q	T	P	
TTC	GTT	GTC	TCT	GCG	GCG	TCC	ATC	AGC	GCT	TAC	TAC	TAC	TGG	ACC	TGG	ATC	CGG	ACC	CAG	ACC	CCA	CCA
					126	135				144		153		162					171			180
G	R	G	L	E	W	I	G	H	I	Y	G	N	G	A	T	T	N	Y	N	T	P	
GGG	AGG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATC	GCG	CAT	ATT	TAT	GGT	ATM	GCT	GCG	ACC	ACC	AMC	ATC	AMT	AMC	AMC	AMC
					189	198				207		216		225					234			243
S	L	K	S	R	V	T	I	S	K	D	T	S	K	N	Q	P	F	L	N	T	C	
TCC	CTC	AMG	ATG	GAG	GTC	ACC	ATT	TCA	AAA	GAC	AGC	TTC	CAA	AGG	ACG	TTC	TTC	TTC	CTG	AMC	TTC	306
					252	261				270		279		288					297			
N	S	V	T	D	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	R	P	D	D	C	
AMT	TCT	GTG	ACC	GAC	GCG	GAC	AGC	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	GCC	CCT	CGC	CCT	GAT	TGC	TGC	
					315	324				333		342		351					360			369
T	T	I	C	Y	G	G	W	W	V	D	Y	W	G	P	G	D	L	V	T	V	S	
ACA	ACA	ATC	ATC	TGT	TAT	GGC	GCG	GTC	GTC	GAC	GAC	TGG	GGC	CGG	GGG	GAC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	378
					378	396				405		414		423					432			
S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G		
TCA	GCT	AGC	JAC	AMG	GCG	CCG	TCT	GTC	TTC	CCC	CTG	GCA	GCA	CCC	TCC	TCC	ATG	AGC	ACC	TCT	TGG	441
					441	450				459		466		477					486			495
G	T	A	A	L	G	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	
GCG	ACA	GCG	GCG	CTG	GCG	TGC	CTG	GTC	AGA	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CGG	TGG	AGC	GTC	TGG	TGG	TGG	504
					504	513				522		531		540					549			558
N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	O	S	S	G	L		
AMC	TCA	TCA	GCC	GCC	CTG	ACC	AGC	GCG	GTC	GAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CGG	TCC	TCA	TCA	GTC	567
					567	576				585		594		603					612			621
Y	S	L	S	CTG	ATC	JAC	AGC	GTC	AGC	CCC	TCC	AGC	TTC	GCG	ACC	TGG	AGC	ACC	TAC	ATC	TGC	630
					630	639				648		657		666					675			684
N	H	N	H	K	P	S	N	T	K	V	W	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	
AMC	GTC	JAM	CAC	AGC	GGG	ACC	AGC	ACC	AGC	GAG	GTC	GAC	AGA	GCA	GNG	CCC	AAA	TCT	TGT	GAC	693	
					693	702				711		720		729					738			747
K	T	H	T	C	F	P	C	P	A	F	E	L	G	G	S	P	V	C	D			
AAA	ACT	CAC	ACA	TGG	CCA	COG	TGG	CCA	GCA	TCT	GAA	CTC	CTG	GGG	GGG	CGG	TCA	GTC	TTC	TTC	TTC	756
					756	765				774		783		792					801			810
F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V		
TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACC	CTC	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACA	TGG	GTC	GTC	GTC	819
					819	828				837		846		855					864			873
V	D	V	S	H	E	D	P	F	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	
GTC	GAG	GTG	AGC	CAC	GAC	GAA	GAC	CCT	GAG	TTC	ATG	TTC	AGC	TGG	TAC	GTC	GAC	GCG	GTC	GTC	GTC	882
					882	891				900		909		918					927			936

FIG. 8b-1

[ FIG. 8 b - 2 ]

H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V  
CAT ATC AGG ACA AAG CGG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC AGC TAC CGT CGT GTC AGC GTC  
945 954 963 972 981 990 999

L T V L H Q D W L H G K E Y K C K V S N K  
CTC ACC GTC CTG CAC CGG GAG TCG ATC AGG AGC TAC AAC TCC AGC AAA  
1008 1017 1026 1035 1044 1053 1062

A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q  
GCC CTC CCA GCC CCC ATC AGG AAA ACC ATC TCC AAA AGC CGG CGG CCC CGA GAA CGA CGC  
1071 1080 1089 1098 1107 1116 1125

V Y T P P S R D E L T K N Q V S L T C L Q  
GTC TAC ACC CTG CGG CCA TCC CGG GAT CGG CTG ACC AGC TCC ACC TGG CTG  
1134 1143 1152 1161 1170 1179 1188

V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N  
GTC AAA GGC TTC TAT CCC ACC AGC ATC GCC GTG GAG TCG AGC AAA CGG CGM CGG GAG AAC  
1197 1206 1215 1224 1233 1242 1251

N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L  
ATC TAC AAC ACC AGC CCT CCC GTG CTG GAC GGC TCC TTC TCC CTC TAC AGC AGG AAC  
1260 1269 1278 1287 1296 1305 1314

T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A  
ACC GTG GAC AAC AGC TGG CGG CGG AAC GTG TCC TCA TCC GTG ATG CAT GAG GCT  
1323 1332 1341 1350 1359 1368 1377

L H N H Y T Q K S L S L S P G K  
CTG AAC AAC TAC AGC CGG AGC TCC CTG TGT CGG GGT AAA TGA  
1386 1395 1404 1413 1422 1431

FIG. 8b-2

[ FIG. 9 a ]

フレーム 1 M S L P A Q L L G L L L C V P G S S  
ATG AGC CTC CCT GCT CGG CTC CTC CGG CTG CTA TGT CTC TGC GTC CCC GGG TCC AGT  
9 18 27 36 45 54 59 63 72 81 90 99 108 117  
GGG GAA GTT GTG ATG ACT CGG TCT CCA CTG CCT CCC ATC AGC CCT GCA GAG CGG  
1008 1017 1026 1035 1044 1053 1062 1071 1080 1089 1098 1107 1116 1125  
I S C R S S Q S L K H S N G D T F L S W Y  
ATC TCC TGT AGG TCT ACT CGA AGC CCT CCC ATC AGC AGT ATC GGA GAC ACC TCC CTG AGT TGG TAT  
1134 1143 1152 1161 1170 1179 1188 1197 1206 1215 1224 1233 1242 1251  
Q Q K P G Q P P R L L I Y K V S N R D S G  
CAG CAG AGG CCA CGG CAA CCT CCA AGG CTC CGT ATT TAT AGG GTT TCT AAC CGG GAC TCT GGG  
1189 1198 1207 1216 1225 1234 1243  
V P D R F S G S G A G T D F T L K I S A V  
GTC CGA GAC AGA TCT AGC GGC AGT GGG CGA GGG ACA GAT TTC ACA CTG AAA ATC AGC GCA GTG  
252 261 270 279 288 297 306  
E A E D V G V Y F C G Q G T R T P P T F G  
GAG CCT GAA GTT GTG GGT GTT TAT TTC TOC GGG CAA GGT AGC AGG ACT CCT CCC ACT TTC GGC  
315 324 333 342 351 360 369  
G G T K V E I K R T V A A P S V P I F P P  
GGA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CCT AGC GTG GCT GCA CCA TCT TGT GTC ATC TTC CCA  
378 387 396 405 414 423 432  
S D E K S G T A S V C L L N N F Y P  
TCT GAT GAG CGG CTG AAA CCT GGA ACT GGC TCT GTT GTG TOC CTG ATC AAC TTC TAT CCC  
441 450 459 468 477 486 495  
R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S  
AGA GAG GCC AAA GTA CGG TGG AGG GTG GAT AAC GGC CTC CAA CGG GGT AAC TCC CAG AGC AGT  
504 513 522 531 540 549 558  
V T E O D S K D S T Y S L S S T L T L S K  
GTC ACA GAG CGG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTC AGC CGT AGC AAA  
557 566 576 585 594 603 612  
A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P  
GCA GAC TAC GAG AAA CTC AAA GTG TAC GGC TGC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC  
630 639 648 657 666 675 684  
V T K S F N R G E C  
GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TGA  
693 702 711 720

FIG. 9a

[ FIG. 9 b - 1 ]

フレーム 1 M G W S L I L L F L V A V A T R V Q C  
ATG GGT TGG AGC CTC ATC TGT CTC CCT GTC CCT GAT GTC GAT GTC GAG TGT  
9 18 27 36 45 54 59 63 72 81 90 99 108 117  
E V Q L V E S G G G L V O P G G S L R V S  
GAG GTC CAA CTG GTG GAG TGT GGG GGA GGC TTT GTC CGG CCT GGC GGG S L R V S  
1008 1017 1026 1035 1044 1053 1062  
S V L T V L H Q D W L N G K E Y L K C K X V S  
AGA GTT CCT ACC GTC CGC GAC GTC TGT GTC ATC AGG AGG TAC AAC GTC TCC  
1134 1143 1152 1161 1170 1179 1188  
C A V S Q F T Y S D H Y M Y W F R Q A P G  
TGT GCA GTC TCT GGA TTC ACC TCC AGT GAC CAC TAC ATC TGT TGG TTC CGG CAG GCT CCA CGA  
1197 1206 1215 1224 1233 1242 1251  
N K A L P A F I E K T I S K A K G Q P R E  
AAC AAA GGC CCT CCA GGC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA AGG CGG CCC CGG GAA  
1260 1269 1278 1287 1296 1305 1314  
K G P E W V G F I R N K P N G G T T E Y A  
AAG GGG CGG GAA TGG GTG TCT ATT AGA AAC AAA CGG AAC AGC AGA ACA GAA TAC GGC  
1323 1332 1341 1350 1359 1368 1377  
P Q V Y T L P D R E E L T K N Q V S L T  
CCA CGG GTG TAC CGC CCC GCA TCC UGG GAT GAG CGT ACC AAC AGC CAG GTT AGC CGT ACC  
1378 1387 1396 1405 1414 1423 1432  
A S V K D R F T I S R D D S K S I A Y L Q  
GGC TGT GTG AAA GAC AGA TCA TCC ACC AGT GAT GAT TCC AAA AGC ATC AGC TGT GTC  
252 261 270 279 288 297 306  
C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P  
TCC CTG GTG AAA GGC TTO TAT AGC AGC AAC GTC ATC GAG TGG GAG AGC AAT GGG CGG CGG  
1197 1206 1215 1224 1233 1242 1251  
M S S L K I E T A V Y Y C T S Y I S H E N N Y K T T  
ATG AGC AGG CGT AAA ATC GAG GAC AGC GGC GTC TAT TAC TGT ACT ACA TCC TAC ATT TCA CGT  
315 324 333 342 351 360 369  
C R G G V C Y G G Y F E F W G Q G A L V T  
TGT CGC GGT GGT GTC TGC TAT GGA GGT TAC GTC GAA TTC TGG GGC CGG CGC CCT CGT ACC AGG  
378 387 396 405 414 423 432  
K L T V D K S R W Q O G N V F S C S V M H  
K L T V D K S R W Q O G N V F S C S V M H  
1260 1269 1278 1287 1296 1305 1314  
V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T  
GTC TCA GGT ACC ACC AAG CGG CGC CGA CGG CGC TCC CGT CCT CGG CGC CCT CGT CCT CGT CCT CGT  
441 450 459 468 477 486 495  
S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V  
TCT GGG GGC ACA CGG CGC CCT CGT CGC TCC CGT CGC TAC TCC CGT CGG CGA CGG CGT CGT  
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 S  
TGT TGG AAC TCA TCC CGT ACC AGC GGC CGC ACC CGC ACC CGG ACC ACC TAC  
567 576 585 594 603 612 621  
G L Y S S V S V T V P S S S L G T Q T Y  
GGA CTC TAC TCC CGT ACC AGC GGC CGC ACC CGC ACC CGG ACC ACC TAC  
630 639 648 657 666 675 684  
I C N V P S N T K V D K K A E P K S  
ATC TCC AAC GTG AMT AAC AGG CCC ACC AGC AAC AGG AGC AAC GAG CCC AAA TCT  
693 702 711 720 729 738 747  
C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V  
TGT GAC AAA ACT AAC CAC ACA TAC CGA CGG CGC CCT CGT CCT CGT CCT CGT CCT CGT  
756 765 774 783 792 801 810  
F L P P K P K P K D T L H I S R T F E V T C  
TTC CCT TGT CCT CCA AAA CCC AGG GAC CCT CGT CCT CGT CCT CGT CCT CGT CCT CGT  
819 828 837 846 855 864 873  
V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V  
GTC GTC GAC CGC ACC CGC CGA GAC CCT GAG GTC AAC TGT TAC CGT CGT CGC GTC  
882 891 900 909 918 927 936

FIG. 9b-2

FIG. 9b-1

【図 10a】

フレーム1 M R V P A Q O L L G L L L W F F L L V A A P R H V L S  
 ATG AGC GTC CCC GCT CGT CTC CTG CGG CGG CGA GCA GCA GCA GCA  
 9 18 27 36 45 54

C E S V L T Q P F S V S G A P G Q K V T I  
 TGT GAG TCT GTC CTG CGA CGA CGG CCT TCA GTC GTC GTC GCA GCA GCA GCA  
 63 72 81 90 99 108 117

S C T G S T S N I G G Y D L H W Y Q O L P  
 TCG TGC ACT GGG AGC ACC TCC AAC ATT GCA GGT TAT GAT CTA CAT TGG TAC CAG CAG CTC CGA  
 126 135 144 153 162 171 180

G T A P K L L I Y D I N K R P S G I S D R  
 GGA AGC CCC AAA CTC CTC ATC TAT GAC ATT AAC AAG CGA CCC TCA GGA ATT TCT GAC CGA  
 189 198 207 216 225 234 243

F S G S K S G T A A S L A I T G L Q T E D  
 TTC TCT GGC TCC AGG TCT GGT ACC CGG GCC TCC CTG GCC ATC ACT GGG CTC CAG ACT GAG GAT  
 252 261 279 288 297 306

E A D Y Y C Q S Y D S S L N A Q V F G G G  
 GAG GCT GAT TAT TAC TGC CAG TCC TAT GAC AGC AGC CTG ATT GCT CAG GTC TAC GGA GGA GGA  
 315 324 333 342 351 360 369

T R L T V L G Q P K A A P S V T L F P P S  
 ACC CGG CTG ACC CTC GGT CGA CCC AGG GCT CCC TCG GTC ACT CTG TTC CGG CGG CGA  
 378 387 405 414 423 432

S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G  
 TCT GAG GAG CTT CAA GCC AAC AGC ACA GTG CGT TGT CTC ATA ACT GAC TTC TAC CGG CGA  
 441 450 459 468 477 486 495

A V T V A W K A A D S S P V K A G V E T T  
 GCC GTG ACA GTG GGC TCG AAG GCA GAT AGC CCC GTC AGG GGA GTG GNG ACC ACC ACA  
 504 513 522 531 540 549 558

P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q  
 CCC TCC AAA CAA AGC AAC AGC TAC GCG GGC ACC AGC TAC CTG AGC CTG AGC CCT GAG AAC  
 567 576 585 594 603 612 621

W K S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T  
 TGG AAG TCC CAC AGA AGC TAC AGC TGC CAG TAC GAA GGG AGC ACC GTG GAG AAC AGC  
 630 639 648 657 666 675 684

V A P T E C S  
 GTG CCC CCT ACA GAA TGT TCA TGA  
 693 702 711

FIG. 10a

【図 10 b - 1】

フレーム1 M K H L W F F L L V A A P R H V L S  
 ATG AAA CAC CTG TGG TAC TTC CTC CTC CTG CTG GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA  
 9 18 27 36 45 54

Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T  
 CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG AGC CCT TCG GAG ACC CCT TCG TAC CTC ACC CTC ACC  
 63 72 81 90 99 108 117

C A V S G G S I S G Y G W I R Q P P  
 TGC GCT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC GGT CCT TAT GGC TCG GGC TCG ATC CGC CGA CCC  
 126 135 144 153 162 171 180

G K G L E W I G S F Y S S S G N T Y Y N P  
 GGG AGG GGG CTG GAG TGG ATT GGG AGT TTC TAT AGT AGT AGT GGG AAC ACC TAC TAC AAC  
 189 198 207 216 225 234 243

S L K S Q V T I S T D T S K N Q F S L K L  
 TCC CTC AMG AGT CAA GTC ACC ATT TCA ACA GAC AGC TCC AGC AAC CAG TTC TCC AGG CTG  
 252 261 279 288 297 306

N S M T A A D T A V Y Y C V R D R L F S V  
 AAC TCT ATG ACC GGC GOG GAC AGC GGC GTC TAT TAC TGT GTG AGA GAT GCT CTT TTT TCA GTT  
 315 324 333 342 351 360 369

V G M V Y N N W F D V W G P G V L V T V S  
 GTT GGA ATG GTT TAC AAC AAC TGG TTC GAT GTC TGG GGC CGG GGA GTC CTC GTC ACC GTC TCC  
 378 387 396 405 414 423 432

S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G  
 TCA GCT AGC ACC AGG GGC CCA CGC TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC ATC AGG ACC ACC TCT GGG  
 441 450 459 468 477 486 495

G T A A L G C L V K D F P E P V T V S W  
 GGC AGA CGG CGC CTG GGC TCG CTC GTC AGC GAC TAC TTC CCC GAA CGG GTG TCG TGG  
 504 513 522 531 540 549 558

N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S S G L  
 AAC TCA GGC CCC CTG ACC AGC GGC GTC GAC ACC TTC CCC GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC  
 567 576 585 594 603 612 621

Y S L S S V V T V P S S L G T T Q T Y I C  
 TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TAC TGT GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC  
 630 639 648 657 666 675 684

N V N H K P S N T K V D K K A E P K S C D  
 AAC GTG ATC AAC AGG CCC AGC AAC ACC AGG GTG GAC AAC AAA GCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC  
 693 702 720 729 738 747

K T H T C P P C F P A P E L L G G P S V F L  
 AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCC TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCC TCA GTC TCC CTC  
 756 765 774 783 792 801

F P P K D T L M I S R T P E V T C V V  
 TTC CCC CCA AAA CCC AGG GAC ACC CTC ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG  
 819 828 837 846 855 864 873

V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V  
 GTG GAC GTG ACC AAC GAA GAC CCT GAG GTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG

FIG. 10b-1

【図 10 b - 2】

882 891 900 909 918 927 936

H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V  
 CAT ATG GCG ACA AGA CGG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC TAC CGT GTG GTC AGC GTC  
 945 954 963 972 981 990 999

L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K  
 CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTC ATG GGC AGG GAG TAC AAC AGG TGC AAC TAC AAA  
 1008 1017 1026 1035 1044 1053 1062

A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q  
 GCC CGC CCA QCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GGC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CGA CGA  
 1071 1080 1089 1098 1107 1116 1125

V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C G L  
 GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTC ACC AGG AAC CAG GTC ACC CTG ACC TGC CTG  
 1134 1143 1152 1161 1170 1179 1188

V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N  
 GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GGC GTG GAG TGG GAG AGC AAC AGG GGG CAG CGG GAG AAC  
 1197 1206 1215 1224 1233 1242 1251

N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L  
 AAC TAC AAC ACC AGC CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TCC CTC TAC AGC AAC CTC  
 1260 1269 1278 1287 1296 1305 1314

T V D K S R W Q G N V F S C S V H E A  
 ACC GTC GAC AAC AGC AGG TGG CAG CGA GGC AAC GTC TTC TCA TGC TCC CTG ATG CAT GAG GCT  
 1323 1332 1341 1350 1359 1368 1377

L H N H Y T Q K S L S L S P G K  
 CTC AAC AAC AAC TAC AGC CGA AAC ACC CTC TCC CTG TGT COG GGT AAA TGA  
 1386 1395 1404 1413 1422 1431

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92029カリフォルニア州 エスコンディド、ナバホ・プレイス1851番
- (72)発明者 ブラムズ , ピーター  
アメリカ合衆国92116カリフォルニア州 サンディエゴ、プロクター・プレイス4303番
- (72)発明者 ハンナ , ナビル  
アメリカ合衆国92024カリフォルニア州 オリブンヘイン、フォートウナ・ランチ・ロード  
3255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92109カリフォルニア州 サンディエゴ、トーマス・アベニュー1155番

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 特表平06-509708 (JP, A)  
Biotechnology, 1992年, Vol.10, p.1455-1460  
Cell, 1995年 3月, Vol.80, p.707-718

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

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