(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5519287号
(P5519287)

(45)発行日　平成26年6月11日(2014.6.11)　(24)登録日　平成26年4月11日(2014.4.11)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18	ZNA
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46	
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	
C07K 1/22	(2006.01)	C07K	1/22	
C07K 1/06	(2006.01)	C07K	1/06	

請求項の数 11　(全 156 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-535349 (P2009-535349)
(86)(22)出願日　平成19年10月31日 (2007.10.31)
(65)公表番号　特表2010-509222 (P2010-509222A)
(43)公表日　平成22年3月25日 (2010.3.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2007/023298
(87)国際公開番号　WO2008/140477
(87)国際公開日　平成20年11月20日 (2008.11.20)
審査請求日　平成22年11月1日 (2010.11.1)
(31)優先権主張番号　60/856,864
(32)優先日　平成18年11月2日 (2006.11.2)
(33)優先権主張国　米国 (US)

前置審査

(73)特許権者　509125589
ダニエル・ジェイ・カポン
アメリカ合衆国カリフォルニア州９４０１０，ヒルズボロー，ウッドリッジ・ロード９０
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰
(74)代理人　100101373
弁理士　竹内　茂雄
(74)代理人　100118902
弁理士　山本　修
(74)代理人　100162455
弁理士　辻本　典子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】可動部を備えたハイブリッド免疫グロブリン

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
連続アミノ酸の区域を調製する方法であって、その連続アミノ酸の区域のＣ－末端側においてシステイン、ホモシステイン、セレノシステイン、またはホモセレノシステイン残基を含み、下記を含む方法：
（ａ）（ｉ）Ｎ－末端シグナル配列をコードする配列を有する第１部分、該Ｎ－末端シグナル配列と接した（ｉｉ）ＶＨ－ＣＨタンパク質またはＩｇＧ免疫グロブリンＦｃポリペプチドおよびＩｇＧ　Ｍ１エキソンポリペプチドを含む連続アミノ酸の区域をコードする配列を有する第２部分、該第２部分と接した（ｉｉｉ）Ｃ－末端インテイン含有結合ドメインをコードする配列を有する第３部分を含む、組換え核酸により、下記（ｉ）から（ｉｉｉ）を可能にする条件下で細胞をトランスフェクションし：
（ｉ）Ｎ－末端シグナル配列、該Ｎ－末端シグナル配列と接した連続アミノ酸の区域、該連続アミノ酸の区域と接したＣ－末端インテイン含有結合ドメインを含む、キメラポリペプチドが合成され、
（ｉｉ）Ｎ－末端シグナル配列がキメラポリペプチドから開裂し、これにより連続アミノ酸の区域がＣ－末端インテイン含有結合ドメインと接したものを含む、第２キメラポリペプチドが産生され、そして
（ｉｉｉ）第２キメラポリペプチドが分泌される；
（ｂ）工程（ａ）で産生された分泌された第２キメラポリペプチドを単離し；
（ｃ）第２キメラポリペプチドを、システイン、ホモシステイン、セレノシステイン、

またはホモセレノシステイン残基によって、連続アミノ酸の区域からＣ－末端インテイン含有結合ドメインのチオ仲介開裂が起き、これによりＣ－末端チオエステルが形成されるように処理し；

（ｄ）Ｃ－末端チオエステルを有している連続アミノ酸の区域である工程（ｃ）の生成物を、該システイン、ホモシステイン、セレノシステイン、またはホモセレノシステイン残基とライゲートさせ、これにより該システイン、ホモシステイン、セレノシステイン、またはホモセレノシステイン残基を含む連続アミノ酸の区域をそれのＣ－末端側において形成させ；そして

（ｅ）該システイン、ホモシステイン、セレノシステイン、またはホモセレノシステインをそれのＣ－末端側において含む連続アミノ酸の区域である工程（ｄ）の生成物を回収する。

【請求項２】

細胞が２９３ヒト胚細胞またはＣＨＯ－Ｋ１ハムスター卵巣細胞である、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

トランスフェクションが、配列番号１に示される配列のヌクレオチドを有するプラスミドを用いて実施される、請求項１または請求項２に記載の方法。

【請求項４】

Ｃ－末端インテイン含有結合ドメインがインテイン－キチン結合ドメインである、請求項１乃至請求項３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５】

Ｃ－末端インテイン含有結合ドメインがＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン結合ドメインである、請求項１乃至請求項４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６】

Ｃ－末端インテイン含有結合ドメインが自己スプライシングインテイン含有結合ドメインである、請求項１乃至請求項５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７】

細胞は培養培地中にあり、分泌された第２キメラポリペプチドをキチン誘導体化樹脂に曝露することにより、分泌された第２キメラポリペプチドを培養培地から単離する、請求項１乃至請求項６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項８】

細胞内でのキメラポリペプチドからのＮ－末端シグナル配列の開裂が細胞性シグナルペプチダーゼにより行なわれる、請求項１乃至請求項７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項９】

工程（ｃ）の生成物を該システイン残基とライゲートさせ、それにより該システインを含む連続アミノ酸の区域をそれのＣ－末端側において形成させる、請求項１乃至請求項８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１０】

工程（ｃ）の生成物を該セレノシステイン残基とライゲートさせ、それにより該セレノシステインを含む連続アミノ酸の区域をそれのＣ－末端側において形成させる、請求項１乃至請求項８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１１】

請求項１乃至請求項１０のいずれか１項に記載の方法により製造される、ホモシステイン、セレノシステイン、またはホモセレノシステイン残基をそれのＣ－末端側において含む連続アミノ酸の区域。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【０００１】

本明細書全体を通して種々の刊行物を参照する。本明細書および特許請求の範囲に記載する本発明の時点で当業者に既知である技術水準をより十分に記載するために、これらの

刊行物の開示内容全体を本明細書に援用する。

【０００２】

あらゆるマシーンおよびデバイスが可動部をもつ。可動部の機能は、有用なタスクを実行するためにエネルギー源を変換することにより作業を行なうことである。可動部は、ある範囲のサイズおよび形状に及ぶ。その範囲の一端には、機械的タスクを実行するマシーンに明らかな可視世界がある。その領域の他端には、電気的作業を実行するデバイスに用いられる電荷担体の不可視世界がある。

【０００３】

この範囲はきわめて広いので、その特定の領域は技術開発が始まったばかりである。これらには、数ナノメートルないし数百ナノメートルの可動部を備えたデバイスが含まれる。それは化学物質の基本単位である分子のサイズそのものに匹敵するので、このサイズ範囲は多くの科学者および技術者にかなりの関心が持たれている。ナノマシーンは、分子間結合または触媒作用など独特な分子特性を開拓する可能性をもつ。

【０００４】

想定しうるいかなるサイズおよび形状の分子も作製できる能力は、ナノマシーンの構築に際してきわめて重要なことのひとつである。

したがって、それは医薬、エレクトロニクス、光学、および他の多くの分野で広く期待されている。膨大な商業活動が化学的に異なるきわめて多数の分子の合成に注目している。しかし、分子コンフィギュレーション（分子形態）（結合の相異）は多様性を生み出す実際的手段のひとつにすぎない。分子コンホメーション（結合の回転の相異）は、連続したサイズおよび形状の領界を生み出すためのもうひとつの重要な手段を提供する。

【０００５】

分子コンホメーションは、可動部を備えた分子を作製するための方法において特定の独自の利点をもつ。原子および化学結合は線および角度において厳密な寸法をもつけれども、コンホメーション変化は分子のサイズおよび形状における無限の変動をもたらす可能性がある。共有結合および非共有化学結合は共に回転自由度をもたらす。分子の異なる部分（ドメイン）を接続する一連の結合それぞれの周りの二面体回転は、ナノマシーンの本質的な動的構成要素を提供することができる。

【０００６】

通常は、単結合（すなわち、単一の電子対）で相互に連結されたいずれか２つの特定の原子は、相互に、およびそれぞれが結合している他の原子に対して、完全に３６０度回転できる。一連の連続単結合は、一連の相互に連結された玉継手に類似する。回転運動に限定されるが、一連の連続単結合は、一連の連続した玉継手と同様に、他のタイプの相互連結された可動部（たとえば一連の連続ヒンジ）の運動を再現することができる。

【０００７】

有用なナノマシーン作製のひとつの難点は、可動部の個数と相互連結の個数のバランスをとることである。特定の閾値を超えると、いずれかのマシーン中の部品または接続の個数を増加させるのは逆効果である。よって自動車エンジンには、最適個数のピストン、バルブ、カム軸、プーリーなどを用いる。

【０００８】

化学分野における同様な難点は、関連するけれども著しく異なる２つのタイプの分子、すなわち有機ポリマーおよび生物学的ポリマーにより例示される。ポリエチレンとタンパク質が好適な比較となる。ポリエチレンは連続エチレンの区域（ｓｔｒｅｔｃｈ）（CH_2）$_n$が連続単結合（－Ｃ－）$_n$により相互連結したものであり、一方、タンパク質は連続アミノ酸の区域（ＮＨＣＨＲＣＯ）$_n$が連続ペプチド結合（＝Ｎ－Ｃ－Ｃ＝）$_n$により相互連結したものである。非分枝ポリエチレンは単結合の反復鎖であり、一方、タンパク質は１つの二重結合に２つの単結合が続く反復鎖である。これら２タイプの鎖の間の最も重要な相異は、ポリエチレンはほとんどいかなるコンホメーションも受け入れることができ、したがって明確なサイズまたは形状がなく（統計的に平均したものにすぎない）、一方、タンパク質はきわめて剛性であり、したがってきわめて明確な（かつ変化しない）サ

イズおよび形状をもつことである。

【０００９】

機械的デバイスとの単純ではあるが妥当な比較は、可動部と接続部の比率が高いマシーンとしてのポリエチレンと、可動部と接続部の比率が低いマシーンとしてのタンパク質であろう。それぞれが形成しうるさらに高次の構造を利用しない限り、いずれの分子もマシーン様タスクにきわめて好適というわけではない。たとえば、ポリエチレンは分子間繊維を形成するその能力を利用すれば有用である。興味深いことに、ポリエチレンがそのような三次元構造を示す能力はそれの固有のフレキシビリティーに依存する。あるタンパク質は商業的に価値のある繊維（たとえば絹、羊毛およびコラーゲン）を形成しうるが、大部分のタンパク質は小球状であり、繊維を形成しない。

【００１０】

小球状タンパク質は、ほとんどすべての実用的な目的にとって可動部をほとんど（たとえ含むとしても）含まないマシーンである；たとえば、それを操作するヒトとそれが押し込まれる物体など、他の物体との組合わせにおいてその効力を発揮しなければならない金てこと同様。それにもかかわらず、相対的ではあるがなおかつ協調した（ｃｏｏｒｄｉｎａｔｅｄ）運動が可能なある様式で互いに連結した明確な領域（たとえば結合ドメイン）をもつタンパク質様の分子に、大きな価値があると思われる多くの例がある。一例は、２以上の同一結合部位をもつ疾患ターゲットを協同的に（ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅｌｙ）結合しうるタンパク質様の分子であろう。これは小球状タンパク質結合ドメインの独特の特性、すなわちターゲット、特に疾患に関連する他のタンパク質に対するそれらの大きな特異性を十分に利用していると思われる。

【００１１】

疾患ターゲットを協同結合しうるタンパク質様の分子の潜在的な商業的価値を、定量的に推定することができる。出発点となる仮定は、現在用いられている大部分の療法薬は低分子または生物製剤のいずれであっても、一般にそれらのターゲットをナノモル濃度水準のアフィニティー定数（10^{-9}Ｍ）で非協同的に結合することである。注目すべきことに、協同作用療法薬は同一ターゲットをナノモル×ナノモル濃度（10^{-9}Ｍ×10^{-9}Ｍ）［すなわちアトモル濃度（10^{-18}Ｍ）］で結合することができると考えられる。

【００１２】

療法薬は一般にそれらのターゲットより大幅に過剰モル濃度（約１００万倍）で必要なので、協同作用療法薬は10^{-6}少ない用量で非協同作用療法薬と同等であろう。現在の多くの生物製剤（たとえば抗体およびイムノアドヘンシン（ｉｍｍｕｎｏａｄｈｅｓｉｎ）類）について、この差は１回量当たり１グラムの代わりに１回量当たり１マイクログラムになる。グラム当たり１，０００米ドルを超える患者コストに関して、この因数は新規薬物の知見および開発において、ならびに既存の生物製剤について、大きな重要性をもつ。

【００１３】

抗体およびイムノアドヘシン類に関連する１つのアイロニーは、それらは２つの同一結合ドメインをもつ対称タンパク質であるけれども通常は対称的ターゲットに対称的に結合するわけではないということである。２つの結合ドメイン間の連結がフレキシブルでないことにより、協同結合を可能にするマシーン様の動きが得られない。対称的に結合する抗体およびイムノアドヘシン類を工学的に作製する多数の試みは、結合部位とターゲット部位の間の相補的対称性に必要な厳密な幾何学的構造を達成するのが困難であるため失敗している。一般的なマシーンの作製に用いられる材料、たとえば木材、金属、プラスチック、セラミックなどと異なり、分子は厳密なサイズおよび形状に切断、工作、鋳造、機械加工または接合するのが容易ではない。

【００１４】

したがって、いずれか単一の固定されたサイズおよび形状では協同結合は容易には達成できないが、結合ドメイン間のコンホメーションのフレキシビリティーは有望な解決策を実際に提供する。“１サイズがすべてに適合する（ｏｎｅ　ｓｉｚｅ　ｆｉｔｓ　ａｌｌ

）”方策は、対称的に動く結合ドメインを備えたタンパク質様の分子は対称的に（すなわち協同的に）結合することもできるであろうという提案に基づく。これらの結合ドメインはコンホメーションにおいて両ターゲット部位の同時結合に最も適合する状態へ熱力学的に駆動される；それがコンホメーションにおいてエネルギー的に好ましい最低状態だからである。

【発明の概要】

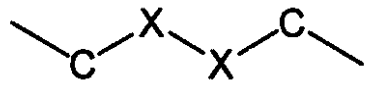
【課題を解決するための手段】

【００１５】

ある態様において、本発明は、下記を含む化合物を提供する：連続アミノ酸の第１区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その配列はあるターゲットに対する結合部位を含む；および連続アミノ酸の第２区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その配列は連続アミノ酸の第１区域の配列と同一であり、かつ前記ターゲットに対する同一結合部位を含む；その際、アミノ酸の第１区域およびアミノ酸の第２区域はそれぞれ、その予め定めた末端にシステイン残基またはセレノシステイン残基を有し、それらのシステイン残基またはそれらのセレノシステイン残基は下記の構造を有する結合で連結している：

【００１６】

【化１】



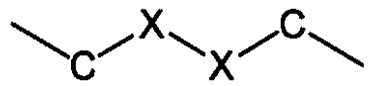
【００１７】

（各Ｘは同一であり、硫黄（Ｓ）またはセレン（Ｓｅ）を表わし、各Ｃは前記のシステイン残基またはセレノシステイン残基のうちの１つのベーター炭素を表わす）。

ある態様において、本発明は、下記を含む化合物をも提供する：連続アミノ酸の第１区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その配列はあるターゲットに対する結合部位を含む；および連続アミノ酸の第２区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その配列は連続アミノ酸の第１区域の配列と異なり、かつ異なる部分に対する結合部位を含む；その際、アミノ酸の第１区域およびアミノ酸の第２区域はそれぞれ、その予め定めた末端にシステイン残基またはセレノシステイン残基を有し、それらの残基は下記の構造を有する結合で連結している：

【００１８】

【化２】



【００１９】

（各Ｘは同一でも異なってもよく、硫黄（Ｓ）またはセレン（Ｓｅ）を表わし、各Ｃは前記のシステイン残基またはセレノシステイン残基のうちの１つのベーター炭素を表わす）。

【００２０】

本明細書に開示する遺伝子デバイスは、連続アミノ酸の２以上の区域を含み、これらは予め定めた末端において非ペプチド結合により連結している。そのような遺伝子デバイスは、対称的であり、かつ１以上の重要なターゲットに対して対称的に（すなわち協同的に）結合する。本発明の遺伝子デバイスはタンパク質様の分子であり、下記を含む多数の関連用語で記述することができる：シンメトロアドヘシン（ｓｙｍｍｅｔｒｏａｄｈｅｓｉｎ）類、イムノシンメトロアドヘシン（ｉｍｍｕｎｏ－ｓｙｍｍｅｔｒｏａｄｈｅｓｉｎｓ）類、ヘミ－シンメトロアドヘシン（ｈｅｍｉ－ｓｙｍｍｅｔｒｏａｄｈｅｓｉｎｓ）

類、ビーシンメトロアドヘシン（ｂｉ－ｓｙｍｍｅｔｒｏａｄｈｅｓｉｎ）類［“釣り合って付着する（ｓｔｉｃｋ　ｔｏ　ｐｒｏｐｏｒｔｉｏｎａｔｅｌｙ）”を意味する；ギリシャ語のｓｙｍｍｅｔｒｏｓ、“共通の尺度をもつ、さらには、釣り合っている”、およびラテン語のａｄｈａｅｒｅｎｔｅｍ、すなわちａｄｈａｅｒｅｒｅ、“付着する”の現在分詞に由来する］。

【００２１】

本明細書には、２以上の独立してフォールディングするタンパク質ドメインを含み、これらが互いに非ペプチド結合により連結しており、その（それらの）結合の周りで二面体回転が起きうる化合物を開示する。

【図面の簡単な説明】

【００２２】

【図１】図１は、１つのＸ－末端をもつ連続アミノ酸の区域を示し、Ｎ－、Ｃ－、Ｓ－、およびＳｅ－末端の位置を表わす。ニューマン様式の投影図として描いたＮ－末端およびＣ－末端アミノ酸残基をそれぞれ投影面の上および下に示す：（ｉ）遊離α－アミノ（NH_2）基をもつＮ－末端アミノ酸残基（側鎖＝Ｒ１）、および遊離α－カルボキシル（ＣＯＯＨ）基をもつＣ－末端アミノ酸残基（側鎖＝Ｒｎ）を含む、連続アミノ酸の区域（一般化した構造）。（ｉｉ）遊離α－アミノ（NH_2）基およびβ－スルフヒドリル（ＳＨ）基をもつＮ－末端システイン、ならびに遊離α－カルボキシル（ＣＯＯＨ）基をもつＣ－末端アミノ酸残基を含む、Ｎ－末端側Ｓ－末端を備えた連続アミノ酸の区域。（ｉｉｉ）遊離α－アミノ（NH_2）基をもつＮ－末端アミノ酸残基、ならびに遊離α－カルボキシル（ＣＯＯＨ）基およびβ－スルフヒドリル（ＳＨ）基をもつＣ－末端システインを含む、Ｃ－末端側Ｓ－末端を備えた連続アミノ酸の区域。（ｉｖ）遊離α－アミノ（NH_2）基およびβ－セレノヒドリル（ＳｅＨ）基をもつＮ－末端セレノシステイン、ならびに遊離α－カルボキシル（ＣＯＯＨ）基をもつＣ－末端アミノ酸残基を含む、Ｎ－末端側Ｓｅ－末端を備えた連続アミノ酸の区域。（ｖ）遊離α－アミノ（NH_2）基をもつＮ－末端アミノ酸残基、ならびに遊離α－カルボキシル（ＣＯＯＨ）基およびβ－セレノヒドリル（ＳｅＨ）基をもつＣ－末端セレノシステインを含む、Ｃ－末端側Ｓｅ－末端を備えた連続アミノ酸の区域。

【図２】図２は、２つのＸ－末端をもつ連続アミノ酸の区域を示し、Ｎ－、Ｃ－、Ｓ－、およびＳｅ－末端の位置を表わす。ニューマン様式の投影図として描いたＮ－末端およびＣ－末端アミノ酸残基をそれぞれ投影面の上および下に示す：（ｉ）遊離α－アミノ（NH_2）基をもつＮ－末端アミノ酸残基（側鎖＝Ｘ１）、および遊離α－カルボキシル（ＣＯＯＨ）基をもつＣ－末端アミノ酸残基（側鎖＝Ｘｎ）を含む、２つのＸ－末端を備えた連続アミノ酸の区域（一般化した構造）。（ｉｉ）遊離α－アミノ（NH_2）基およびβ－スルフヒドリル（ＳＨ）基をもつＮ－末端システイン、ならびに遊離α－カルボキシル（ＣＯＯＨ）基およびβ－スルフヒドリル（ＳＨ）基をもつＣ－末端システインを含む、Ｎ－末端側Ｓ－末端およびＣ－末端側Ｓ－末端を備えた連続アミノ酸の区域。（ｉｉｉ）遊離α－アミノ（NH_2）基およびβ－スルフヒドリル（ＳＨ）基をもつＮ－末端システイン、ならびに遊離α－カルボキシル（ＣＯＯＨ）基およびβ－セレノヒドリル（ＳｅＨ）基をもつＣ－末端セレノシステインを含む、Ｎ－末端側Ｓ－末端およびＣ－末端側Ｓｅ－末端を備えた連続アミノ酸の区域。（ｉｖ）遊離α－アミノ（NH_2）基およびβ－セレノヒドリル（ＳｅＨ）基をもつＮ－末端セレノシステイン、ならびに遊離α－カルボキシル（ＣＯＯＨ）基およびβ－スルフヒドリル（ＳＨ）基をもつＣ－末端システインを含む、Ｎ－末端側Ｓｅ－末端およびＣ－末端側Ｓ－末端を備えた連続アミノ酸の区域。（ｖ）遊離α－アミノ（NH_2）基およびβ－セレノヒドリル（ＳｅＨ）基をもつＮ－末端セレノシステイン、ならびに遊離α－カルボキシル（ＣＯＯＨ）基およびβ－セレノヒドリル（ＳｅＨ）基をもつＣ－末端セレノシステインを含む、Ｎ－末端側Ｓｅ－末端およびＣ－末端側Ｓｅ－末端を備えた連続アミノ酸の区域。

【図３】図３は、キメラポリペプチドの一般構造であって、連続アミノ酸の第１区域がそれのＣ－末端においてペプチド結合により連続アミノ酸の第２区域のＮ－末端に連結した

構造を示す。キメラポリペプチドは、自然界でみられるタンパク質と同様に、連続アミノ酸の連続的な区域がそれぞれ前のアミノ酸にペプチド結合により連結したものである。キメラポリペプチドは、他のタンパク質と同様にコンホメーションフレキシビリティーが制限されている；ペプチド結合自体が、ペプチド鎖の周りで二面体回転できる連続単結合を２より多く備えていないからである。図中のアミノ酸残基に下記に従って番号を付ける：連続アミノ酸の第１区域は長さ＝ｎ個の残基をもち、番号＝１、２、３、・・・、（ｎ－２）、（ｎ－１）、ｎ。連続アミノ酸の第２区域は長さ＝ｐ個の残基をもち、番号＝１’、２’、３’、・・・、（ｐ－２）、（ｐ－１）、ｐ。キメラポリペプチドは長さ＝（ｎ＋ｐ）個の残基をもち、番号＝１、２、３、・・・、（ｎ－２）、（ｎ－１）、ｎ、（ｎ＋１）、（ｎ＋２）、（ｎ＋３）、・・・、（ｎ＋ｐ－２）、（ｎ＋ｐ－１）、（ｎ＋ｐ）。主および副互変異性形ならびに共鳴構造を、それぞれ左、中央および右に示す。

【図４Ａ】図４Ａは、ヘッド－テイル（ｈｅａｄ－ｔｏ－ｔａｉｌ）コンフィギュレーションをもつ“シンメトロアドヘシン”の一般構造であって、連続アミノ酸の第１区域がそれのＣ－末端側－Ｘ－末端において連続アミノ酸の第２区域のＮ－末端側－Ｘ－末端に－Ｘ－Ｘ－結合により連結したものからなる構造を示す。－Ｘ－Ｘ－結合はペプチド結合ではない。本発明において考慮するこの結合の例には、限定ではないが各ＸがＳまたはＳｅ原子であるいずれかの組合わせが含まれる。ヘッド－テイルシンメトロアドヘシンの総極性はＮ－末端からＣ－末端へ向かう。シンメトロアドヘシンはタンパク質と同様に連続アミノ酸の区域であり、そのそれぞれが前のアミノ酸に連結しているが、ペプチド結合が１以上の－Ｘ－Ｘ－結合で置き換わっていることによりタンパク質と異なる。各－Ｘ－Ｘ－結合は二面体回転しうる７つの単結合を備えているので、シンメトロアドヘシンはポリペプチドより大きいコンホメーションフレキシビリティーをもつ。アミノ酸残基に下記に従って番号を付ける：連続アミノ酸の第１区域は長さ＝ｎ個の残基をもち、番号＝１、２、３、・・・、（ｎ－２）、（ｎ－１）、ｎ。連続アミノ酸の第２区域は長さ＝ｐ個の残基をもち、番号＝１’、２’、３’、・・・、（ｐ－２）、（ｐ－１）、ｐ。ヘッド－テイルシンメトロアドヘシンは長さ＝（ｎ＋ｐ）個の残基をもち、番号＝１、２、３、・・・、（ｎ－２）、（ｎ－１）、ｎ、（ｎ＋１）、（ｎ＋２）、（ｎ＋３）、・・・、（ｎ＋ｐ－２）、（ｎ＋ｐ－１）、（ｎ＋ｐ）。主および副互変異性形ならびに共鳴構造を、それぞれ左、中央および右に示す。

【図４Ｂ】図４Ｂは、図４Ａのシンメトロアドヘシン（左）と、連続アミノ酸の第１区域がそれのピナルト（ｐｅｎｕｌｔｉｍａｔｅ、末端の前）Ｃ－末端残基のＸ－末端において連続アミノ酸の第２区域のピナルトＮ－末端残基のＸ－末端に－Ｘ－Ｘ－結合により連結したもの（右）からなるシンメトロアドヘシンの比較を示す。各構造につき共鳴構造を示す。

【図４Ｃ】図４Ｃは、図４Ａのシンメトロアドヘシン（左）と、連続アミノ酸の第１区域がそれのアンテピナルト（ａｎｔｅｐｅｎｕｌｔｉｍａｔｅ）Ｃ－末端前残基のＸ－末端において連続アミノ酸の第２区域のアンテピナルトＮ－末端残基のＸ－末端に－Ｘ－Ｘ－結合により連結したもの（右）からなるシンメトロアドヘシンの比較を示す。各構造につき共鳴構造を示す。

【図４Ｄ】図４Ｄは、図４Ａのシンメトロアドヘシン（左）と、連続アミノ酸の第１区域がそれのプレアンテピナルト（ｐｒｅａｎｔｅｐｅｎｕｌｔｉｍａｔｅ）Ｃ－末端前残基のＸ－末端において連続アミノ酸の第２区域のプレアンテピナルトＮ－末端残基のＸ－末端に－Ｘ－Ｘ－結合により連結したもの（右）からなるシンメトロアドヘシンの比較を示す。各構造につき共鳴構造を示す。

【図５】図５は、ヘッド－ヘッド（ｈｅａｄ－ｔｏ－ｈｅａｄ）コンフィギュレーションをもつシンメトロアドヘシンの一般構造であって、連続アミノ酸の第１区域がそれのＮ－末端側－Ｘ－末端において連続アミノ酸の第２区域のＮ－末端側－Ｘ－末端に－Ｘ－Ｘ－結合により連結したものからなる構造を示す。ヘッド－ヘッドシンメトロアドヘシンの総極性は－Ｘ－Ｘ－結合の位置で変化し、Ｃ－からＮ－末端へ、Ｎ－からＣ－末端へと向かう。アミノ酸残基に下記に従って番号を付ける：連続アミノ酸の第１区域は長さ＝ｎ個の

残基をもち、番号＝１、２、３、・・・、（ｎ－２）、（ｎ－１）、ｎ。連続アミノ酸の第２区域は長さ＝ｐ個の残基をもち、番号＝１’、２’、３’、・・・、（ｐ－２）、（ｐ－１）、ｐ。ヘッド－ヘッドシンメトロアドヘシンは長さ＝（ｎ＋ｐ）個の残基をもち、番号＝ｎ、（ｎ－１）、（ｎ－２）、・・・、３、２、１、（逆転）、１’、２’、３’、・・・、（ｐ－２）、（ｐ－１）、ｐ。主および副互変異性形ならびに共鳴構造を、それぞれ左、中央および右に示す。

【図６】図６は、テイル－テイル（ｔａｉｌ－ｔｏ－ｔａｉｌ）コンフィギュレーションをもつシンメトロアドヘシンの一般構造であって、連続アミノ酸の第１区域がそれのＣ－末端側－Ｘ－末端において連続アミノ酸の第２区域のＣ－末端側－Ｘ－末端に－Ｘ－Ｘ－結合により連結したものからなる構造を示す。テイル－テイルシンメトロアドヘシンの総極性は－Ｘ－Ｘ－結合の位置で変化し、Ｎ－からＣ－末端へ、Ｃ－からＮ－末端へと向かう。アミノ酸残基に下記に従って番号を付ける：連続アミノ酸の第１区域は長さ＝ｎ個の残基をもち、番号＝１、２、３、・・・、（ｎ－２）、（ｎ－１）、ｎ。連続アミノ酸の第２区域は長さ＝ｐ個の残基をもち、番号＝１’、２’、３’、・・・、（ｐ－２）、（ｐ－１）、ｐ。テイル－テイルシンメトロアドヘシンは長さ＝（ｎ＋ｐ）個の残基をもち、番号＝１、２、３、・・・、（ｎ－２）、（ｎ－１）、ｎ、（逆転）、ｐ、（ｐ－１）、（ｐ－２）、・・・、３’、２’、１’。主および副互変異性形ならびに共鳴構造を、それぞれ左、中央および右に示す。

【図７】図７は、ヘッド－テイル型ヘミ－シンメトロアドヘシンの模式図であり、全トランスコンホメーションを示す。Ｃ－末端側－Ｘ－末端とＮ－末端側－Ｘ－末端を連結する７つの連続単結合がすべてトランスである（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｃ）。２つの結合ドメインがこのコンホメーションでは互いに反対方向を向いている；７つの連続単結合のいずれか１つの周りに１８０度回転させると、２つの結合ドメインは互いに向き合うであろう。ヘッド－テイルコンフィギュレーションをもつヘミ－シンメトロアドヘシンは、コンホメーションに関係なく非対称分子である（図７と８を比較）；しかし、２以上のヘッド－テイル型ヘミ－シンメトロアドヘシンが一緒になって対称分子を形成することができる。

【図８】図８は、ヘッド－テイル型ヘミ－シンメトロアドヘシンの模式図であり、Ｘ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションを示す。Ｃ－末端側－Ｘ－末端とＮ－末端側－Ｘ－末端を連結する７つのうち１つ以外のすべての連続単結合がトランスである（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－ｃｉｓ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｃ）。２つの結合ドメインがこのコンホメーションでは互いに向き合っている；さらに、７つの連続単結合のいずれか１つの周りに１８０度回転させると、２つの結合ドメインは互いに反対方向を向くであろう。ヘッド－テイルコンフィギュレーションをもつヘミ－シンメトロアドヘシンは、コンホメーションに関係なく非対称分子である（図７と８を比較）；しかし、２以上のヘッド－テイル型ヘミ－シンメトロアドヘシンが一緒になって対称分子を形成することができる。

【図９】図９は、ヘッド－ヘッド型ヘミ－シンメトロアドヘシンの模式図であり、全トランスコンホメーションを示す。第１Ｎ－末端側－Ｘ－末端と第２Ｎ－末端側－Ｘ－末端を連結する７つの連続単結合がすべてトランスである（Ｃ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｃ）。２つの結合ドメインがこのコンホメーションでは互いに反対方向を向いている；７つの連続単結合のいずれか１つの周りに１８０度回転させると、２つの結合ドメインは互いに向き合うであろう。ヘッド－ヘッドコンフィギュレーションをもつヘミ－シンメトロアドヘシンは、それらの可能なコンホメーションのうち２つだけが対称分子である：全トランスおよびＸ－ｃｉｓ－Ｘ（図９と１０を比較）；しかし、２以上のヘッド－ヘッド型ヘミ－シンメトロアドヘシンのサブユニットが無限数の対称コンホメーションをもつ分子を形成することができる。

【図１０】図１０は、ヘッド－ヘッド型ヘミ－シンメトロアドヘシンの模式図であり、Ｘ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションを示す。第１Ｎ－末端側－Ｘ－末端と第２Ｎ－末端側－Ｘ－末端を連結する７つのうち１つ以外のすべての連続単結合がトランスである（Ｃ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－ｃｉｓ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｃ）。２つの結合ドメインがこのコンホメーションでは互

いに向き合っている；さらに、７つの連続単結合のいずれか１つの周りに１８０度回転させると、２つの結合ドメインは互いに反対方向を向くであろう。ヘッド－ヘッドコンフィギュレーションをもつヘミ－シンメトロアドヘシンは、それらの可能なコンホメーションのうち２つだけが対称分子である：全トランスおよびＸ－ｃｉｓ－Ｘ（図９と１０を比較）；しかし、２以上のヘッド－ヘッド型ヘミ－シンメトロアドヘシンのサブユニットが無限数の対称コンホメーションをもつ分子を形成することができる。

【図１１】図１１は、テイル－テイル型ヘミ－シンメトロアドヘシンの模式図であり、全トランスコンホメーションを示す。第１Ｃ－末端側－Ｘ－末端と第２Ｃ－末端側－Ｘ－末端を連結する７つの連続単結合がすべてトランスである（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｎ）。２つの結合ドメインがこのコンホメーションでは互いに反対方向を向いている；７つの連続単結合のいずれか１つの周りに１８０度回転させると、２つの結合ドメインは互いに向き合うであろう。テイル－テイルコンフィギュレーションをもつヘミ－シンメトロアドヘシンは、それらの可能なコンホメーションのうち２つだけが対称分子である：全トランスおよびＸ－ｃｉｓ－Ｘ（図１１と１２を比較）；しかし、２以上のテイル－テイル型ヘミ－シンメトロアドヘシンのサブユニットが無限数の対称コンホメーションをもつ分子を形成することができる。

【図１２】図１２は、テイル－テイル型ヘミ－シンメトロアドヘシンの模式図であり、Ｘ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションを示す。第１－Ｃ末端側－Ｘ－末端と第２Ｃ－末端側－Ｘ－末端を連結する７つのうち１つ以外のすべての連続単結合がトランスである（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－ｃｉｓ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｎ）。２つの結合ドメインがこのコンホメーションでは互いに向き合っている；さらに、７つの連続単結合のいずれか１つの周りに１８０度回転させると、２つの結合ドメインは互いに反対方向を向くであろう。テイル－テイルコンフィギュレーションをもつヘミ－シンメトロアドヘシンは、それらの可能なコンホメーションのうち２つだけが対称分子である：全トランスおよびＸ－ｃｉｓ－Ｘ（図９と１０を比較）；しかし、２以上のテイル－テイル型ヘミ－シンメトロアドヘシンのサブユニットが無限数の対称コンホメーションをもつ分子を形成することができる。

【図１３】図１３は、２つの免疫グロブリンＦａｂ結合ドメインからなるテイル－テイル型ヘミ－シンメトロアドヘシンの模式図である。ここには全トランスコンホメーションを示す。第１Ｃ－末端側－Ｘ－末端と第２Ｃ－末端側－Ｘ－末端を連結する７つの連続単結合がすべてトランスである（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｎ）。２つのＦａｂ結合ドメインがこのコンホメーションでは互いに反対方向を向いている；７つの連続単結合のいずれか１つの周りに１８０度回転させると、これらのＦａｂ結合ドメインは互いに向き合うであろう（図１３と１４を比較）。重鎖領域はＸ－Ｘ結合により互いに連結している；軽鎖領域は内部ジルフィド結合により重鎖領域に連結している。略号：ＶＬ、軽鎖可変部；ＣＬ、軽鎖定常部；ＶＨ、重鎖可変部；ＣＨ１、重鎖定常部１。

【図１４】図１４は、２つの免疫グロブリンＦａｂ結合ドメインからなるテイル－テイル型ヘミ－シンメトロアドヘシンの模式図である。ここにはＸ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションを示す。第１－Ｃ末端側－Ｘ－末端と第２Ｃ－末端側－Ｘ－末端を連結する７つのうち１つ以外のすべての連続単結合がトランスである（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－ｃｉｓ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｎ）。２つのＦａｂ結合ドメインがこのコンホメーションでは互いに向き合っている；さらに、７つの連続単結合のいずれか１つの周りに１８０度回転させると、これらのＦａｂ結合ドメインは互いに反対方向を向くであろう（図１３と１４を比較）。重鎖領域はＸ－Ｘ結合により互いに連結している；軽鎖領域は内部ジルフィド結合により重鎖領域に連結している。略号：ＶＬ、軽鎖可変部；ＣＬ、軽鎖定常部；ＶＨ、重鎖可変部；ＣＨ１、重鎖定常部１。

【図１５】図１５は、イムノアドヘシン分子の模式図である(Capon et al. (1989) Nature 337, 525-530)。イムノアドヘシンは、ジルフィド結合した二量体を形成するキメラポリペプチドである。各キメラポリペプチドは、結合ドメインがそれのＣ－末端においてペプチド結合により免疫グロブリンＦｃドメインのＮ－末端に連結したものからなる。イムノアドヘシンは対称構造であるが、それらは通常は二量体または多量体ターゲット分子に

協同結合することはない。略号：ＣＨ２、重鎖定常部２；ＣＨ３、重鎖定常部３。
【図１６】図１６は、免疫グロブリン（抗体）分子の模式図である。免疫グロブリンは、２つの重鎖および２つの軽鎖からなるヘテロ四量体である。免疫グロブリンは対称構造であるが、それらは通常は二量体または多量体ターゲット分子に協同結合することはない。略号：ＶＬ、軽鎖可変部；ＣＬ、軽鎖定常部；ＶＨ、重鎖可変部；ＣＨ１、重鎖定常部１；ＣＨ２、重鎖定常部２；ＣＨ３、重鎖定常部３。
【図１７】図１７は、ヘッド－テイル型イムノシンメトロアドヘシンの模式図であり、全トランスコンホメーションを示す。ヘッド－テイル型イムノシンメトロアドヘシンは、ヘッド－テイル型ヘミ－シンメトロアドヘシンがジルフィド結合二量体を形成したものである。各ヘミ－シンメトロアドヘシンは、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつ免疫グロブリンＦａｂ結合ドメインがＮ－末端側－Ｘ－末端をもつ免疫グロブリンサブユニットに－Ｘ－Ｘ－結合により連結したものからなる。この二量体は２つの機能性Ｆａｂ結合ドメインおよび１つの機能性Ｆｃ結合ドメインを含む。各ＦａｂドメインをＦｃサブユニットに連結する７つの連続単結合がすべてトランスである（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｃ）。第１（Ｎ－Ｃ）、第３（Ｃ－Ｘ）、第５（Ｘ－Ｃ）または第７（Ｃ－Ｃ）対の連続単結合の周りに対称的に１８０度回転させると、２つのＦａｂドメインは第１の一般方向（ｇｅｎｅｒａｌ　ｄｉｒｅｃｔｉｏｎ）へ動くであろう（図１７と１８を比較）。第２（Ｃ－Ｃ）、第４（Ｘ－Ｘ）または第６（Ｃ－Ｃ）の単結合対の周りに対称的に１８０度回転させると、２つのＦａｂドメインは第２の一般方向へ動くであろう（図１７と１９を比較）。
【図１８】図１８は、ヘッド－テイル型イムノシンメトロアドヘシンの模式図であり、Ｘ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションを示す。このＸ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションは、全トランスコンホメーションから、７つの連続単結合のうち第５対の対称回転により得られる（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－ｃｉｓ－Ｃ－Ｃ－Ｃ）（図１７と１８を比較）。ここに示すＸ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションに類似する他のコンホメーションは、全トランスコンホメーションから、連続単結合のうちの第１対の対称回転（Ｎ－ｃｉｓ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｃ）、第３対の対称回転（Ｎ－Ｃ－Ｃ－ｃｉｓ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｃ）、または第７対（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－ｃｉｓ－Ｃ）の対称回転により得られる。
【図１９】図１９は、ヘッド－テイル型イムノシンメトロアドヘシンの模式図であり、Ｘ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションを示す。このＸ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションは、全トランスコンホメーションから、７つの連続単結合のうち第４対の対称回転により得られる（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－ｃｉｓ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｃ）（図１７と１９を比較）。ここに示すＸ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションに類似する他のコンホメーションは、全トランスコンホメーションから、連続単結合のうちの第２対の対称回転（Ｎ－Ｃ－ｃｉｓ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｃ）または第４対の対称回転（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－ｃｉｓ－Ｃ－Ｃ）の対称回転により得られる。
【図２０】図２０は、テイル－テイル型イムノシンメトロアドヘシンの模式図であり、全トランスコンホメーションを示す。テイル－テイル型イムノシンメトロアドヘシンは、テイル－テイル型ヘミ－シンメトロアドヘシンがジルフィド結合二量体を形成したものである。各ヘミ－シンメトロアドヘシンは、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつ免疫グロブリンＦａｂ結合ドメインがＣ－末端側－Ｘ－末端をもつ免疫グロブリンＦｃサブユニットに－Ｘ－Ｘ－結合により連結したものからなる。この二量体は２つの機能性Ｆａｂ結合ドメインおよび１つの機能性Ｆｃ結合ドメインを含む。各ＦａｂドメインをＦｃサブユニットに連結する７つの連続単結合がすべてトランスである（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｎ）。第１（Ｎ－Ｃ）、第３（Ｃ－Ｘ）、第５（Ｘ－Ｃ）または第７（Ｃ－Ｎ）対の連続単結合の周りに対称的に１８０度回転させると、２つのＦａｂドメインは第１の一般方向へ動くであろう（図２０と２１を比較）。第２（Ｃ－Ｃ）、第４（Ｘ－Ｘ）または第６（Ｃ－Ｃ）の単結合対の周りに対称的に１８０度回転させると、２つのＦａｂドメインは第２の一般方向へ動くであろう（図２０と２２を比較）。
【図２１】図２１は、テイル－テイル型イムノシンメトロアドヘシンの模式図であり、Ｘ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションを示す。このＸ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションは、全トラ

ンスコンホメーションから、７つの連続単結合のうち第５対の対称回転により得られる（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－ｃｉｓ－Ｃ－Ｃ－Ｎ）（図２０と２１を比較）。ここに示すＸ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションに類似する他のコンホメーションは、全トランスコンホメーションから、連続単結合のうちの第１対の対称回転（Ｎ－ｃｉｓ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｎ）、第３対の対称回転（Ｎ－Ｃ－Ｃ－ｃｉｓ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－ｎ）、または第７対（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－ｃｉｓ－Ｎ）の対称回転により得られる。

【図２２】図２２は、テイル－テイル型イムノシンメトロアドヘシンの模式図であり、Ｘ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションの模式図である。このＸ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションは、全トランスコンホメーションから、７つの連続単結合のうち第４対（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－ｃｉｓ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｎ）の対称回転により得られる（図２０と２２を比較）。ここに示すＸ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションに類似する他のコンホメーションは、全トランスコンホメーションから、連続単結合のうちの第２対の対称回転（Ｎ－Ｃ－ｃｉｓ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｎ）または第４対（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－ｃｉｓ－Ｃ－Ｎ）の対称回転により得られる。

【図２３】図２３は、４つのＦａｂ結合ドメインをもつビ－シンメトロアドヘシンの模式図であり、全トランスコンホメーションを示す。この分子は、それぞれ連続アミノ酸の区域３つからなる２つのヘミ－シンメトロアドヘシンの二量体である。ここに示すビ－シンメトロアドヘシンは、ヘッド－テイル、テイル－テイル型ヘミ－シンメトロアドヘシンがジルフィド結合二量体を形成したものである。各ヘミ－シンメトロアドヘシンは、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつ２つの免疫グロブリンＦａｂドメインが－Ｘ－Ｘ－結合により免疫グロブリンＦｃサブユニットに連結したものからなる；第１のＦａｂドメインはＦｃのＮ－末端側－Ｘ－末端に連結し、第２のＦａｂはＦｃのＣ－末端側－Ｘ－末端に連結している。この二量体は４つの機能性Ｆａｂ結合ドメインおよび１つの機能性Ｆｃ結合ドメインを含む。４つすべてのＦａｂドメインをＦｃサブユニットに連結する７つの連続単結合がすべてトランスである（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｃ／Ｎ）。第１（Ｎ－Ｃ）、第３（Ｃ－Ｘ）、第５（Ｘ－Ｃ）または第７（Ｃ－Ｃ／Ｎ）対の連続単結合の周りに対称的に１８０度回転させると、４つのＦａｂドメインは第１の一般方向へ動くであろう（図２３と２４を比較）。第２（Ｃ－Ｃ）、第４（Ｘ－Ｘ）または第６（Ｃ－Ｃ）の単結合対の周りに対称的に１８０度回転させると、４つのＦａｂドメインは第２の一般方向へ動くであろう（図２３と２５を比較）。

【図２４】図２４は、４つのＦａｂ結合ドメインおよび１つのＦｃドメインからなるビ－シンメトロアドヘシンのＸ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションの模式図である。この分子は、それぞれ連続アミノ酸の区域３つからなる２つのヘミ－シンメトロアドヘシンの二量体である。

【図２５】図２５は、４つのＦａｂ結合ドメインおよび１つのＦｃドメインからなるビ－シンメトロアドヘシンのＸ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションの模式図である。この分子は、それぞれ連続アミノ酸の区域３つからなる２つのヘミ－シンメトロアドヘシンの二量体である。

【図２６】図２６は、２つのＦａｂ結合ドメイン、１つのＦｃドメインおよび２つの非Ｆａｂ結合ドメインからなるビ－シンメトロアドヘシンの全トランスコンホメーションの模式図である。この分子は、それぞれ連続アミノ酸の区域３つからなる２つのヘミ－シンメトロアドヘシンの二量体である。ここに示すビ－シンメトロアドヘシンは、ジルフィド結合二量体を形成したヘッド－テイル、テイル－テイル型ヘミ－シンメトロアドヘシンである。各ヘミ－シンメトロアドヘシンは、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつ１つの免疫グロブリンＦａｂドメインが免疫グロブリンＦｃサブユニットのＮ－末端側－Ｘ－末端に－Ｘ－Ｘ－結合により連結し、かつＣ－末端側－Ｘ－末端をもつ１つの非免疫グロブリン結合ドメインが免疫グロブリンＦｃサブユニットのＣ－末端側－Ｘ－末端に－Ｘ－Ｘ－結合により連結したものからなる。この二量体は２つの機能性Ｆａｂ結合ドメイン、２つの機能性非免疫グロブリン結合ドメイン、および１つの機能性Ｆｃ結合ドメインを含む。４つすべての結合ドメインをＦｃサブユニットに連結する７つの連続単結合がすべてトランスである

（Ｎ－Ｃ－Ｃ－Ｘ－Ｘ－Ｃ－Ｃ－Ｃ／Ｎ）。第１（Ｎ－Ｃ）、第３（Ｃ－Ｘ）、第５（Ｘ－Ｃ）または第７（Ｃ－Ｃ／Ｎ）対の連続単結合の周りに対称的に１８０度回転させると、４つの結合ドメインは第１の一般方向へ動くであろう（図２６と２７を比較）。第２（Ｃ－Ｃ）、第４（Ｘ－Ｘ）または第６（Ｃ－Ｃ）の単結合対の周りに対称的に１８０度回転させると、４つの結合ドメインは第２の一般方向へ動くであろう（図２６と２８を比較）。

【図２７】図２７は、２つのＦａｂ結合ドメイン、１つのＦｃドメインおよび２つの非Ｆａｂ結合ドメインからなるビーシンメトロアドヘシンのＸ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションの模式図である。この分子は、それぞれ連続アミノ酸の区域３つからなる２つのヘミーシンメトロアドヘシンの二量体である。

【図２８】図２８は、２つのＦａｂ結合ドメイン、１つのＦｃドメインおよび２つの非Ｆａｂ結合ドメインからなるビーシンメトロアドヘシンのＸ－ｃｉｓ－Ｘコンホメーションの模式図である。この分子は、それぞれ連続アミノ酸の区域３つからなる２つのヘミーシンメトロアドヘシンの二量体である。

【図２９】図２９は、第１の対称的ターゲットへの免疫グロブリン結合の模式図である。この相互作用は対称的かつ協同的である。両方のターゲットに両方の免疫グロブリンが結合している。

【図３０】図３０は、第１の対称的ターゲットへのシンメトロアドヘシン結合の模式図である。この相互作用は対称的かつ協同的である。両方のターゲットに、第１コンホメーション（全トランス）にある両方のシンメトロアドヘシンが結合している。

【図３１】図３１は、第２の対称的ターゲットへの免疫グロブリン結合の模式図である。この相互作用は対称的でもなく、協同的でもない。１つのターゲットにのみ各免疫グロブリンが結合している。

【図３２】図３２は、第２の対称的ターゲットへのシンメトロアドヘシン結合の模式図である。この相互作用は対称的かつ協同的である。両方のターゲットに、第２コンホメーション（Ｘ－ｃｉｓ－Ｃ）にある両方のシンメトロアドヘシンが結合している。

【図３３】図３３は、第３の対称的ターゲットへの免疫グロブリン結合の模式図である。この相互作用は対称的でもなく、協同的でもない。１つのターゲットにのみ各免疫グロブリンが結合している。

【図３４】図３４は、第３の対称的ターゲットへのシンメトロアドヘシン結合の模式図である。この相互作用は対称的かつ協同的である。両方のターゲットに、第３コンホメーション（Ｘ－ｃｉｓ－Ｘ）にある両方のシンメトロアドヘシンが結合している。

【図３５Ａ】図３５Ａは、Ｎ－末端側－Ｓ－末端をもつヒトＩｇＧ１　Ｆｃシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド合成中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、下記のものを含む３つの異なるプレ－Ｆｃ（ＰＲＥ－ＦＣ）ポリペプチドを示す：ヒトソニックヘッジホッグ（ｓｏｎｉｃ　ｈｅｄｇｅｈｏｇ）（ＳＨＨ）、ヒトインターフェロンアルファ－２（ＩＦＮ）、またはヒトコレステロールエステルトランスフェラーゼ（ＣＥＴＰ）シグナル配列（それぞれ、残基－２３～－１、－２３～－１、または－１７～－１）のいずれか、およびヒトＩＧＨＧ１　Ｆｃドメイン（残基１～２２８）：ヒンジ部エキソンがコードする第５アミノ酸から開始、ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（Ellison et al. (1982) Nuc. Acids Res. 10, 4071-4079）。これら３つの異なるプレ－Ｆｃポリペプチドは、それぞれ２５１、２５１、および２４５残基の長さをもつ。パート（ｉｉ）は、Ｎ－末端側－Ｓ－末端をもつ成熟Ｆｃドメイン（長さ＝２２８）を示す。Ｎ－末端システイン残基に下線を施してある。（ＩＧＨＧ１、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ｅｎｔｒｙ　Ｐ０１８５７、Ｉｇガンマ－１鎖Ｃ領域、ホモ・サピエンス（Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓ））。

【図３５Ｂ】図３５Ｂは、Ｎ－末端側－Ｓ－末端をもつヒトＩｇＧ２　Ｆｃシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド合成中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、下記のものを含む３つの異なるプレ－Ｆｃポリペプチドを示す：ヒトソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）、ヒトインターフェロンアルファ－２（ＩＦＮ）、またはヒ

トコレステロールエステルトランスフェラーゼ（ＣＥＴＰ）シグナル配列（それぞれ、残基－２３～－１、－２３～－１、または－１７～－１）のいずれか、およびヒトＩＧＨＧ２　Ｆｃドメイン（残基１～２２５）：ヒンジ部エキソンがコードする第４アミノ酸から開始、ＣＣＶＥＣＰＰＣＰ（Ellison et al. (1982) Nuc. Acids Res. 10, 4071-4079)。これら３つの異なるプレ－Ｆｃポリペプチドは、それぞれ２４８、２４８、および２４２残基の長さをもつ。パート（ｉｉ）は、Ｎ－末端側－Ｓ－末端をもつ成熟Ｆｃドメイン（長さ＝２２５）を示す。Ｎ－末端システイン残基に下線を施してある。（ＩＧＨＧ２、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ｅｎｔｒｙ　Ｐ０１８５９、Ｉｇガンマ－２鎖Ｃ領域、ホモ・サピエンス）。

【図３５Ｃ】図３５Ｃは、Ｎ－末端側－Ｓ－末端をもつヒトＩｇＧ３　Ｆｃシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド合成中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、下記のものを含む３つの異なるプレ－Ｆｃポリペプチドを示す：ヒトソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）、ヒトインターフェロンアルファ－２（ＩＦＮ）、またはヒトコレステロールエステルトランスフェラーゼ（ＣＥＴＰ）シグナル配列（それぞれ、残基－２３～－１、－２３～－１、または－１７～－１）のいずれか、およびヒトＩＧＨＧ３　Ｆｃドメイン（残基１～２６７）：第１ヒンジ部エキソンがコードする第１３アミノ酸から開始、ＣＰＲＣＰ(Strausberg et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 16899-1690)。これら３つの異なるプレ－Ｆｃポリペプチドは、それぞれ２９０、２９０、および２８４残基の長さをもつ。パート（ｉｉ）は、Ｎ－末端側－Ｓ－末端をもつ成熟Ｆｃドメイン（長さ＝２６７）を示す。Ｎ－末端システイン残基に下線を施してある。（ＩＧＨＧ３、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ｅｎｔｒｙ　Ｑ８Ｎ４Ｙ９、Ｉｇガンマ－３鎖Ｃ領域、ホモ・サピエンス）。

【図３５Ｄ】図３５Ｄは、Ｎ－末端側－Ｓ－末端をもつヒトＩｇＧ４　Ｆｃシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド合成中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、下記のものを含む３つの異なるプレ－Ｆｃポリペプチドを示す：ヒトソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）、ヒトインターフェロンアルファ－２（ＩＦＮ）、またはヒトコレステロールエステルトランスフェラーゼ（ＣＥＴＰ）シグナル配列（それぞれ、残基－２３～－１、－２３～－１、または－１７～－１）のいずれか、およびヒトＩＧＨＧ４　Ｆｃドメイン（残基１～２２２）：第１ヒンジ部エキソンがコードする第８アミノ酸から開始、ＣＰＳＣＰ（Strausberg et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 16899-1690)。これら３つの異なるプレ－Ｆｃポリペプチドは、それぞれ２４５、２４５、および２３９残基の長さをもつ。パート（ｉｉ）は、Ｎ－末端側－Ｓ－末端をもつ成熟Ｆｃドメイン（長さ＝２２２）を示す。Ｎ－末端システイン残基に下線を施してある。（ＩＧＨＧ４、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ｅｎｔｒｙ　Ｑ８ＴＣ６３、Ｉｇガンマ－４鎖Ｃ領域、ホモ・サピエンス）。

【図３６Ａ】図３６Ａは、Ｎ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＦｃシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド合成中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、下記のものを含む３つの異なるプレ－Ｆｃポリペプチドを示す：ヒトソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）、ヒトインターフェロンアルファ－２（ＩＦＮ）、またはヒトコレステロールエステルトランスフェラーゼ（ＣＥＴＰ）シグナル配列（それぞれ、残基－２３～－１、－２３～－１、または－１７～－１）のいずれか、およびヒトＩＧＨＧ１　Ｆｃドメイン（残基１～２２２）：ヒンジ部エキソンがコードする第１１アミノ酸から開始、ＣＰＰＣＰ（Ellison et al. (1982) Nuc. Acids Res. 10, 4071-4079)。これら３つの異なるプレ－Ｆｃポリペプチドは、それぞれ２４５、２４５、および２３９残基の長さをもつ。パート（ｉｉ）は、Ｎ－末端側－Ｓ－末端をもつ成熟Ｆｃドメイン（長さ＝２２２）を示す。Ｎ－末端システイン残基に下線を施してある。パート（ｉｉｉ）は、Ｎ－末端側－Ｘ－末端をもつように天然化学ライゲーションにより延長した成熟Ｆｃドメイン（長さ＝２２６）を示す。Ｎ－末端Ｘアミノ酸（たとえばシステイン、セレノシステイン）に下線を施した；ヒンジ部エキソンがコードする第６アミノ酸がこれに続く、ＸＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ。（ＩＧＨＧ１、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ｅｎｔｒｙ　Ｐ０

１８５７、Ｉｇガンマ－１鎖Ｃ領域、ホモ・サピエンス）。
【図３６Ｂ】図３６Ｂは、Ｎ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＦｃシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド合成中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、下記のものを含む３つの異なるプレ－Ｆｃポリペプチドを示す：ヒトソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）、ヒトインターフェロンアルファ－２（ＩＦＮ）、またはヒトコレステロールエステルトランスフェラーゼ（ＣＥＴＰ）シグナル配列（それぞれ、残基－２３～－１、－２３～－１、または－１７～－１）のいずれか、およびヒトＩＧＨＧ１　Ｆｃドメイン（残基１～２１９）：ヒンジ部エキソンがコードする第１４アミノ酸から開始、ＣＰ（Ellison et al. (1982) Nuc. Acids Res. 10, 4071-4079)。これら３つの異なるプレ－Ｆｃポリペプチドは、それぞれ２４２、２４２、および２３６残基の長さをもつ。パート（ｉｉ）は、Ｎ－末端側－Ｓ－末端をもつ成熟Ｆｃドメイン（長さ＝２１９）を示す。Ｎ－末端システイン残基に下線を施してある。パート（ｉｉｉ）は、Ｎ－末端側－Ｘ－末端をもつように天然化学ライゲーションにより延長した成熟Ｆｃドメイン（長さ＝２２２）を示す。Ｎ－末端Ｘアミノ酸（たとえばシステイン、セレノシステイン）に下線を施した；ヒンジ部エキソンがコードする第１２アミノ酸がこれに続く、ＸＰＰＣＰ。（ＩＧＨＧ１、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ｅｎｔｒｙ　Ｐ０１８５７、Ｉｇガンマ－１鎖Ｃ領域、ホモ・サピエンス）。
【図３７Ａ】図３７Ａは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＦｃシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、下記のものを含む２つの異なるプレ－Ｆｃ－インテインポリペプチドを示す：ヒトＣＤ２またはＣＤ４シグナル配列（それぞれ、残基－２４～－１、または－２５～－１）のいずれか、ヒトＩＧＨＧ１　Ｆｃドメイン（残基１～２２４）：ヒンジ部エキソンがコードする第７アミノ酸から開始（ＫＴＨＴＣＰＰＣＰ）、ヒトＩＧＨＧ３　Ｍ１ドメイン（残基２２５～２４１）、およびＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメイン（残基２４２～４４１）。これら２つの異なるプレ－Ｆｃ－インテインキメラポリペプチドは、それぞれ４６５、および４６６残基の長さをもつ。パート（ｉｉ）は、ヒトＦｃ／Ｍ１ドメインおよびＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインを含む、成熟Ｆｃ－インテインキメラポリペプチド（長さ＝４４１）を示す。インテイン自動開裂（ａｕｔｏｃｌｅａｖａｇｅ）部位に下線を施してある。パート（ｉｉｉ）は、チオエステル末端付きヒトＦｃ／Ｍ１ドメイン（長さ＝２４２）を示す。Ｃ－末端チオ－グリシン残基（Ｚ）に下線を施してある。パート（ｉｖ）は、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＦｃ／Ｍ１ドメイン（長さ＝２４３）を示す。Ｃ－末端Ｘアミノ酸残基（たとえばシステイン、セレノシステイン）に下線を施した（ＩＧＨＧ１、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ｅｎｔｒｙ　Ｐ０１８５７、Ｉｇガンマ－１鎖Ｃ領域、ホモ・サピエンス；ＩＧＨＧ３、ＮＣＢＩ／ＧｅｎＢａｎｋ寄託ＢＡＡ１１３６３、膜結合型Ｉｇガンマ鎖、ホモ・サピエンス）。
【図３７Ｂ】図３７Ｂは、Ｃ－末端側－Ｓ－末端をもつヒトＦｃシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド合成中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、下記のものを含む２つの異なるプレ－Ｆｃポリペプチドを示す：ヒトＣＤ２またはＣＤ４シグナル配列（それぞれ、残基－２４～－１、または－２５～－１）のいずれか、ヒトＩＧＨＧ１　Ｆｃドメイン（残基１～２２４）：ヒンジ部エキソンがコードする第７アミノ酸から開始（ＫＴＨＴＣＰＰＣＰ）、およびヒトＩＧＨＧ３　Ｍ１ドメインの一部（残基２２５～２３２）。これら２つの異なるプレ－Ｆｃポリペプチドは、それぞれ２５６および２５７残基の長さをもつ。パート（ｉｉ）は、Ｎ－末端側－Ｓ－末端をもつ成熟Ｆｃドメイン（長さ＝２３２）を示す。Ｎ－末端システイン残基に下線を施してある。（ＩＧＨＧ１、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ｅｎｔｒｙ　Ｐ０１８５７、Ｉｇガンマ－１鎖Ｃ領域、ホモ・サピエンス）。
【図３８Ａ】図３８Ａは、インテイン－ベースの合成における、Ｎ－末端側－Ｓ－末端およびＣ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＦｃシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、下記のものを含む３つ

の異なるプレ－Ｆｃ－インテインポリペプチドを示す：ヒトソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）、ヒトインターフェロンアルファ－２（ＩＦＮ）、またはヒトコレステロールエステルトランスフェラーゼ（ＣＥＴＰ）シグナル配列（それぞれ、残基－２３～－１、－２３～－１、または－１７～－１）のいずれか、ヒトＩＧＨＧ１　Ｆｃドメイン（残基１～２２６）：ヒンジ部エキソンがコードする第５アミノ酸から開始（ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ）、ヒトＩＧＨＧ３　Ｍ１ドメイン（残基２２７～２４３）、およびＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメイン（残基２４４～４４３）。これら３つの異なるプレ－Ｆｃポリペプチドは、それぞれ４６６、４６６および４６０残基の長さをもつ。パート（ｉｉ）は、Ｎ－末端側－Ｓ－末端をもつヒトＦｃ／Ｍ１ドメインおよびＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインを含む、成熟Ｆｃ－インテインキメラポリペプチド（長さ＝４４３）を示す。Ｎ－末端システイン残基およびインテイン自動開裂部位に下線を施してある。

【図３８Ｂ】図３８Ｂは、インテイン－ベースの合成における、Ｎ－末端側－Ｓ－末端およびＣ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＦｃシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉｉｉ）は、チオエステル末端付きヒトＦｃ／Ｍ１ドメイン（長さ＝２４４）を示す。Ｎ－末端システイン残基およびＣ－末端チオ－グリシン残基（Ｚ）に下線を施してある。パート（ｉｖ）は、Ｎ－末端システイン残基およびＣ－末端側－Ｘ－末端をもつＦｃ／Ｍ１ドメイン（長さ＝２４５）を示す。Ｎ－末端システイン残基およびＣ－末端Ｘアミノ酸残基（たとえばシステイン、セレノシステイン）に下線を施してある。（ＩＧＨＧ１、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ｅｎｔｒｙ　Ｐ０１８５７、Ｉｇガンマ－１鎖Ｃ領域、ヒト；ＩＧＨＧ３、ＮＣＢＩ／ＧｅｎＢａｎｋ寄託ＢＡＡ１１３６３、膜結合型Ｉｇガンマ鎖、ホモ・サピエンス）。

【図３９Ａ】図３９Ａは、インテイン－ベースの合成における、Ｎ－末端側－Ｘ－末端およびＣ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＦｃシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、下記のものを含む３つの異なるプレ－Ｆｃ－インテインポリペプチドを示す：ヒトソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）、ヒトインターフェロンアルファ－２（ＩＦＮ）、またはヒトコレステロールエステルトランスフェラーゼ（ＣＥＴＰ）シグナル配列（それぞれ、残基－２３～－１、－２３～－１、または－１７～－１）のいずれか、ヒトＩＧＨＧ１　Ｆｃドメイン（残基１～２２０）：ヒンジ部エキソンがコードする第１１アミノ酸から開始（ＣＰＰＣＰ）、ヒトＩＧＨＧ３　Ｍ１ドメイン（残基２２１～２３７）、およびＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメイン（残基２３８～４３７）。これら３つの異なるプレ－Ｆｃポリペプチドは、それぞれ４６０、４６０および４５４残基の長さをもつ。パート（ｉｉ）は、Ｎ－末端側－Ｓ－末端をもつヒトＦｃ／Ｍ１ドメインおよびＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインを含む、成熟Ｆｃ－インテインキメラポリペプチド（長さ＝４３７）を示す。Ｎ－末端システイン残基およびインテイン自動開裂部位に下線を施してある。

【図３９Ｂ】図３９Ｂは、インテイン－ベースの合成における、Ｎ－末端側－Ｘ－末端およびＣ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＦｃシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉｉｉ）は、Ｎ－末端側－Ｘ－末端をもつように天然化学ライゲーションにより延長した成熟Ｆｃドメインキメラポリペプチド（長さ＝４４３）を示す。Ｎ－末端Ｘアミノ酸（たとえばシステイン、セレノシステイン）に下線を施してある。パート（ｉｖ）は、チオエステル末端付きヒトＦｃ／Ｍ１ドメイン（長さ＝２４４）を示す。Ｎ－末端Ｘアミノ酸残基およびＣ－末端チオ－グリシン残基（Ｚ）に下線を施してある。パート（ｖ）は、Ｎ－末端側－Ｘ－末端およびＣ－末端側－Ｘ－末端をもつＦｃ／Ｍ１ドメイン（長さ＝２４５）を示す。Ｎ－末端Ｘアミノ酸残基およびＣ－末端Ｘアミノ酸残基に下線を施してある。（ＩＧＨＧ１、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ｅｎｔｒｙ　Ｐ０１８５７、Ｉｇガンマ－１鎖Ｃ領域、ホモ・サピエンス；ＩＧＨＧ３、ＮＣＢＩ／ＧｅｎＢａｎｋ寄託ＢＡＡ１１３６３、膜結合型Ｉｇガンマ鎖、ホモ・サピエンス）。

【図４０Ａ】図４０Ａは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＣＤ４シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、ヒトＣＤ４シグナル配列（残基－２５～－１）および細胞外ドメイン（残基１～３７１）、ならびにＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメイン（残基３７２～５７１）を含む、プレ－ＣＤ４－インテインポリペプチド（長さ＝５９６）を示す。パート（ｉｉ）は、ヒトＣＤ４細胞外ドメインおよびＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインを含む、成熟ＣＤ４－インテインキメラポリペプチド（長さ＝５７１）を示す。インテイン自動開裂部位の位置に下線を施してある。

【図４０Ｂ】図４０Ｂは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＣＤ４シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉｉｉ）は、チオエステル末端付きヒトＣＤ４細胞外ドメイン（長さ＝３７２）を示す。Ｃ－末端チオ－グリシン残基（Ｚ）に下線を施してある。パート（ｉｖ）は、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＣＤ４細胞外ドメイン（長さ＝３７３）を示す。Ｃ－末端Ｘアミノ酸残基（たとえばシステイン、セレノシステイン）に下線を施してある。（ＣＤ４、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ｅｎｔｒｙ　Ｐ０１７３０、Ｔ－細胞表面糖タンパク質ＣＤ４）。

【図４１Ａ】図４１Ａは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつＤｉ６２－ＶＨシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、マウスＤｉ６２－ＶＨシグナル配列（残基－１９～－１）および可変ドメイン（残基１～１１７）、ヒトＣＨ１定常ドメイン（残基１１８～２２５）、ならびにＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメイン（残基２２６～４２５）を含む、プレ－Ｄｉ６２－ＶＨ－インテインポリペプチド（長さ＝４４４）を示す。パート（ｉｉ）は、マウスＤｉ６２－ＶＨ可変ドメイン、ヒトＣＨ１定常ドメイン、およびＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインを含む、成熟Ｄｉ６２－ＶＨ－インテインキメラポリペプチド（長さ＝４２５）を示す。インテイン自動開裂部位の位置に下線を施してある。

【図４１Ｂ】図４１Ｂは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつＤｉ６２－ＶＨシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉｉｉ）は、チオエステル末端付きマウスＤｉ６２－ＶＨ可変ドメイン／ヒトＣＨ１定常ドメイン（長さ＝２２６）を示す。Ｃ－末端チオ－グリシン残基（Ｚ）に下線を施してある。パート（ｉｖ）は、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつマウスＤｉ６２－ＶＨ可変ドメイン／ヒトＣＨ１定常ドメイン（長さ＝２２７）を示す。Ｃ－末端Ｘアミノ酸残基（たとえばシステイン、セレノシステイン）に下線を施してある。（Ｄｉ６２－ＶＨ、ＮＣＢＩ／ＧｅｎＢａｎｋ寄託ＣＡＡ０５４１６、ＩｇＧ重鎖、ヒトＴＮＦアルファ抗原結合サブユニット、ハツカネズミ（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ））。

【図４２】図４２は、Ｄｉ６２－Ｖｋシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド合成中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、マウスＤｉ６２－Ｖｋシグナル配列（残基－２０～－１）および可変ドメイン（残基１～１０７）、およびヒトＣｋ定常ドメイン（残基１０８～２１４）を含む、プレ－Ｄｉ６２－Ｖｋ－ポリペプチド（長さ＝２３４）を示す。パート（ｉｉ）は、マウスＤｉ６２－Ｖｋ可変ドメイン、およびヒトＣｋ定常ドメインを含む、成熟Ｄｉ６２－Ｖｋ－キメラポリペプチド（長さ＝２１４）を示す。（Ｄｉ６２－Ｖｋ、ＮＣＢＩ／ＧｅｎＢａｎｋ寄託ＣＡＡ０５４１７、ＩｇＧ軽鎖、ヒトＴＮＦアルファ抗原結合サブユニット、ハツカネズミ）。

【図４３】図４３は、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＴＮＲ１Ａシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、ヒトＴＮＲ１Ａシグナル配列（残基－２１～－１）および細胞外ドメイン（残基１～１９０）、ならびにＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメイン（残基１９１～３９０）を含む、プレ－ＴＮＲ１Ａ－インテインポリペプチド（長さ＝４１１）を示す。パート（ｉｉ）は、ヒトＴＮＲ１Ａ細胞外ドメインおよ

びＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインを含む、成熟ＴＮＲ１Ａ－インテインキメラポリペプチド（長さ＝３９０）を示す。インテイン自動開裂部位の位置に下線を施してある。パート（ｉｉｉ）は、チオエステル末端付きヒトＴＮＲ１Ａ細胞外ドメイン（長さ＝１９１）を示す。Ｃ－末端チオ－グリシン残基（Ｚ）に下線を施してある。パート（ｉｖ）は、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＴＮＲ１Ａ細胞外ドメイン（長さ＝１９２）を示す。Ｃ－末端Ｘアミノ酸残基（たとえばシステイン、セレノシステイン）に下線を施してある。（ＴＮＲ１Ａ、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ｅｎｔｒｙ　Ｐ１９４３８、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー１Ａ）。

【図４４Ａ】図４４Ａは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＴＮＲ１Ｂシンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、ヒトＴＮＲ１Ｂシグナル配列（残基－２２～－１）および細胞外ドメイン（残基１～２３５）、ならびにＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメイン（残基２３６～４３５）を含む、プレ－ＴＮＲ１Ｂ－インテインポリペプチド（長さ＝４５７）を示す。パート（ｉｉ）は、ヒトＴＮＲ１Ｂ細胞外ドメインおよびＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインを含む、成熟ＴＮＲ１Ｂ－インテインキメラポリペプチド（長さ＝４３５）を示す。インテイン自動開裂部位の位置に下線を施してある。パート（ｉｉｉ）は、チオエステル末端付きヒトＴＮＲ１Ｂ細胞外ドメイン（長さ＝２３６）を示す。Ｃ－末端チオ－グリシン残基（Ｚ）に下線を施してある。パート（ｉｖ）は、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＴＮＲ１Ｂ細胞外ドメイン（長さ＝２３７）を示す。Ｃ－末端Ｘアミノ酸残基（たとえばシステイン、セレノシステイン）に下線を施してある。（ＴＮＲ１Ｂ、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ｅｎｔｒｙ　２０３３３、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー１Ｂ）。

【図４４Ｂ】図４４Ｂは、ＴＮＲ１Ｂイムノアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド合成中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、ＴＮＲ１Ｂシグナル配列（残基－２２～－１）および細胞外ドメイン（残基１～２３５）、ならびにヒト重鎖定常ドメイン（残基２３６～４６７）を含む、プレ－ＴＮＲ１Ｂ－イムノアドヘシンポリペプチド（長さ＝４８９）を示す。パート（ｉｉ）は、成熟ＴＮＲ１Ｂ－イムノアドヘシン（長さ＝４６７）を示す。

【図４５Ａ】図４５Ａは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＶＧＦＲ１シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、ヒトＶＧＦＲ１シグナル配列（残基－２６～－１）および細胞外ドメイン（残基１～７３２）、ならびにＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメイン（残基７３３～９３２）を含む、プレ－ＶＧＦＲ１－インテインポリペプチド（長さ＝９５８）を示す。

【図４５Ｂ】図４５Ｂは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＶＧＦＲ１シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉｉ）は、ヒトＶＧＦＲ１細胞外ドメインおよびＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインを含む、成熟ＶＧＦＲ１－インテインキメラポリペプチド（長さ＝９３２）を示す。インテイン自動開裂部位の位置に下線を施してある。

【図４５Ｃ】図４５Ｃは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＶＧＦＲ１シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉｉｉ）は、チオエステル末端付きヒトＶＧＦＲ１細胞外ドメイン（長さ＝７３３）を示す。Ｃ－末端チオ－グリシン残基（Ｚ）に下線を施してある。パート（ｉｖ）は、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＶＧＦＲ１細胞外ドメイン（長さ＝７３４）を示す。Ｃ－末端Ｘアミノ酸残基（たとえばシステイン、セレノシステイン）に下線を施してある。（ＶＧＦＲ１、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ｅｎｔｒｙ　Ｐ１７９４８、血管内皮増殖因子受容体１）。

【図４６Ａ】図４６Ａは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＶＧＦＲ２シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間

体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、ヒトＶＧＦＲ２シグナル配列（残基－１９～－１）および細胞外ドメイン（残基１～７４５）、ならびにＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメイン（残基７４６～９４５）を含む、プレ－ＶＧＦＲ２－インテインポリペプチド（長さ＝９６４）を示す。

【図４６Ｂ】図４６Ｂは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＶＧＦＲ２シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉｉ）は、ヒトＶＧＦＲ２細胞外ドメインおよびＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインを含む、成熟ＶＧＦＲ２－インテインキメラポリペプチド（長さ＝９４５）を示す。インテイン自動開裂部位の位置に下線を施してある。

【図４６Ｃ】図４６Ｃは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＶＧＦＲ２シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉｉｉ）は、チオエステル末端付きヒトＶＧＦＲ２細胞外ドメイン（長さ＝７４６）を示す。Ｃ－末端チオ－グリシン残基（Ｚ）に下線を施してある。パート（ｉｖ）は、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＶＧＦＲ２細胞外ドメイン（長さ＝７４７）を示す。Ｃ－末端Ｘアミノ酸残基（たとえばシステイン、セレノシステイン）に下線を施してある。（ＶＧＦＲ２、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔｅｎｔｒｙ　Ｐ３５９６８、血管内皮増殖因子受容体２）。

【図４７Ａ】図４７Ａは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＶＧＦＲ３シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、ヒトＶＧＦＲ３シグナル配列（残基－２４～－１）および細胞外ドメイン（残基１～７５１）、ならびにＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメイン（残基７５２～９５１）を含む、プレ－ＶＧＦＲ３－インテインポリペプチド（長さ＝９７５）を示す。

【図４７Ｂ】図４７Ｂは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＶＧＦＲ３シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉｉ）は、ヒトＶＧＦＲ３細胞外ドメインおよびＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインを含む、成熟ＶＧＦＲ３－インテインキメラポリペプチド（長さ＝９５１）を示す。インテイン自動開裂部位の位置に下線を施してある。

【図４７Ｃ】図４７Ｃは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＶＧＦＲ３シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉｉｉ）は、チオエステル末端付きヒトＶＧＦＲ３細胞外ドメイン（長さ＝７５２）を示す。Ｃ－末端チオ－グリシン残基（Ｚ）に下線を施してある。パート（ｉｖ）は、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＶＧＦＲ３細胞外ドメイン（長さ＝７５３）を示す。Ｃ－末端Ｘアミノ酸残基（たとえばシステイン、セレノシステイン）に下線を施してある。（ＶＧＦＲ３、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔｅｎｔｒｙ　Ｐ３５９１６、血管内皮増殖因子受容体３）。

【図４８Ａ】図４８Ａは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＥＲＢＢ１シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、ヒトＥＲＢＢ１シグナル配列（残基－２４～－１）および細胞外ドメイン（残基１～６２１）、ならびにＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメイン（残基６２２～８２１）を含む、プレ－ＥＲＢＢ１－インテインポリペプチド（長さ＝８４５）を示す。パート（ｉｉ）は、ヒトＥＲＢＢ１細胞外ドメインおよびＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインを含む、成熟ＥＲＢＢ１－インテインキメラポリペプチド（長さ＝８２１）を示す。インテイン自動開裂部位の位置に下線を施してある。

【図４８Ｂ】図４８Ｂは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＥＲＢＢ１シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉｉｉ）は、チオエステル末端付きヒトＥＲＢＢ１細

胞外ドメイン（長さ＝６２２）を示す。Ｃ－末端チオ－グリシン残基（Ｚ）に下線を施してある。パート（ｉｖ）は、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＥＲＢＢ１細胞外ドメイン（長さ＝６２３）を示す。Ｃ－末端Ｘアミノ酸残基（たとえばシステイン、セレノシステイン）に下線を施してある。（ＥＲＢＢ１、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔｅｎｔｒｙ　Ｐ００５３３、上皮増殖因子受容体）。

【図４９Ａ】図４９Ａは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＥＲＢＢ２シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、ヒトＥＲＢＢ２シグナル配列（残基－２２～－１）および細胞外ドメイン（残基１～６３０）、ならびにＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメイン（残基６３１～８３０）を含む、プレ－ＥＲＢＢ２－インテインポリペプチド（長さ＝８５２）を示す。パート（ｉｉ）は、ヒトＥＲＢＢ２細胞外ドメインおよびＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインを含む、成熟ＥＲＢＢ２－インテインキメラポリペプチド（長さ＝８３０）を示す。インテイン自動開裂部位の位置に下線を施してある。

【図４９Ｂ】図４９Ｂは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＥＲＢＢ２シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉｉｉ）は、チオエステル末端付きヒトＥＲＢＢ２細胞外ドメイン（長さ＝６３１）を示す。Ｃ－末端チオ－グリシン残基（Ｚ）に下線を施してある。パート（ｉｖ）は、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＥＲＢＢ２細胞外ドメイン（長さ＝６３２）を示す。Ｃ－末端Ｘアミノ酸残基（たとえばシステイン、セレノシステイン）に下線を施してある。（ＥＲＢＢ２、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔｅｎｔｒｙ　Ｐ０４６２６、受容体型チロシンタンパク質キナーゼｅｒｂＢ－２）。

【図５０Ａ】図５０Ａは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＥＲＢＢ３シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、ヒトＥＲＢＢ３シグナル配列（残基－１９～－１）および細胞外ドメイン（残基１～６２４）、ならびにＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメイン（残基６２５～８２４）を含む、プレ－ＥＲＢＢ３－インテインポリペプチド（長さ＝８４３）を示す。パート（ｉｉ）は、ヒトＥＲＢＢ３細胞外ドメインおよびＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインを含む、成熟ＥＲＢＢ３－インテインキメラポリペプチド（長さ＝８２４）を示す。インテイン自動開裂部位の位置に下線を施してある。

【図５０Ｂ】図５０Ｂは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＥＲＢＢ３シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉｉｉ）は、チオエステル末端付きヒトＥＲＢＢ３細胞外ドメイン（長さ＝６２５）を示す。Ｃ－末端チオ－グリシン残基（Ｚ）に下線を施してある。パート（ｉｖ）は、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＥＲＢＢ３細胞外ドメイン（長さ＝６２６）を示す。Ｃ－末端Ｘアミノ酸残基（たとえばシステイン、セレノシステイン）に下線を施してある。（ＥＲＢＢ３、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔｅｎｔｒｙ　Ｐ２１８６０、受容体型チロシンタンパク質キナーゼｅｒｂＢ－３）。

【図５１Ａ】図５１Ａは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＥＲＢＢ４シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉ）は、ヒトＥＲＢＢ４シグナル配列（残基－２５～－１）および細胞外ドメイン（残基１～６２６）、ならびにＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメイン（残基６２７～８２６）を含む、プレ－ＥＲＢＢ４－インテインポリペプチド（長さ＝８５１）を示す。パート（ｉｉ）は、ヒトＥＲＢＢ４細胞外ドメインおよびＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインを含む、成熟ＥＲＢＢ４－インテインキメラポリペプチド（長さ＝８２６）を示す。インテイン自動開裂部位の位置に下線を施してある。

【図５１Ｂ】図５１Ｂは、インテイン－ベースの合成における、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＥＲＢＢ４シンメトロアドヘシン前駆体サブユニットの種々のポリペプチド中間

体のアミノ酸配列を示す。パート（ｉｉｉ）は、チオエステル末端付きヒトＥＲＢＢ４細胞外ドメイン（長さ＝６２７）を示す。Ｃ－末端チオ－グリシン残基（Ｚ）に下線を施してある。パート（ｉｖ）は、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつヒトＥＲＢＢ４細胞外ドメイン（長さ＝６２８）を示す。Ｃ－末端Ｘアミノ酸残基（たとえばシステイン、セレノシステイン）に下線を施してある。（ＥＲＢＢ４、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ｅｎｔｒｙ　Ｑ１５３０３、受容体型チロシンタンパク質キナーゼｅｒｂＢ－４）。

【図５２】図５２は、２９３腎細胞におけるＮ－末端側－Ｓ－末端をもつヒトＩｇＧ１　Ｆｃシンメトロアドヘシンサブユニットの発現を示す。列１～６および列７～１２は、それぞれ図３５Ａ（ｉｉ）および図３６Ａ（ｉｉ）のＩｇＧ１　Ｆｃポリペプチドを示す。細胞上清：列１、３、５、７、９および１１；細胞溶解物：列２、４、６、８、１０および１２。用いたシグナル配列：ＳＨＨ（列１、２、７および８）；ＩＦＮＡ（列３、４、９、１０）；ＣＥＴＰ（列５、６、１１および１２）。

【図５３】図５３は、２９３腎細胞におけるヒトＩｇＧ１　Ｆｃシンメトロアドヘシンサブユニットの発現を示す。列１～２、３～４および列５～６は、それぞれ図３５Ａ（ｉｉ）、図３６Ａ（ｉｉ）および図３７Ｂ（ｉｉ）のＩｇＧ１　Ｆｃポリペプチドを示す。細胞上清：列１～６。用いたシグナル配列：ＳＨＨ（列１～６）。

【図５４】図５４は、２９３腎細胞に発現したヒトＩｇＧ１　Ｆｃシンメトロアドヘシンサブユニットの精製を示す。列２および８は、それぞれ図３６Ａおよび図３５ＡのＩｇＧ１　Ｆｃポリペプチドを示す。列１～７：図３６ＡのＩｇＧ１　Ｆｃポリペプチドに関するプロテインＡ－セファロースカラム画分。

【図５５】図５５は、図５４に示したプロテインＡ－精製ヒトＩｇＧ１　Ｆｃシンメトロアドヘシンサブユニットのチオール－セファロース結合を示す。列１～３および列４～６は、それぞれ図３５Ａおよび図３６Ａのヒトｉｇｇ１　Ｆｃポリペプチドを示す。列１および４：出発材料；列２および５：チオール－セファロース通過画分；列３および６：チオール－セファロース結合画分。

【図５６】図５６は、ヒト２９３腎細胞におけるヒトＣＤ４－インテイン融合タンパク質の発現を示す。列１～４は、図４０Ａ（ｉｉ）のＣＤ４－インテイン融合ポリペプチドを示す。細胞上清：列１および３；細胞溶解物：列２および４。

【図５７】図５７は、ヒト２９３腎細胞におけるヒトＴＮＲ１Ｂ融合タンパク質の発現を示す。列２および５は、図４４Ａ（ｉｉ）のヒトＴＮＲ１Ｂ－インテイン融合タンパク質を示す。列１および３は、図４４Ｂ（ｉｉ）のヒトＴＮＲ１Ｂ－イムノアドヘシン融合タンパク質を示す。列３および６は、模擬トランスフェクション細胞からのタンパク質を示す。細胞上清：列１～３；細胞溶解物：列４～７。列７：対照ＴＮＲ１Ｂ－イムノアドヘシン（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）。

【図５８】図５８は、Ｃ－末端側－Ｓ－末端をもつＴＮＲ１Ｂシンメトロアドヘシンサブユニットを示す。列１～２は、キチンアフィニティークロマトグラフィーおよびＭＥＳＮＡによる開裂／溶離による精製後の図４４Ａ（ｉｉｉ）のＴＮＲ１Ｂポリペプチドを示す。列３は、図４４Ａ（ｉｉｉ）のＴＮＲ１Ｂポリペプチドと蛍光標識ペプチド（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）との自然ライゲーション生成物を示す。パネル（ｉ）：直接蛍光；パネル（ｉｉ）：抗－ＴＮＲ１Ｂ抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を用いたウェスタンブロット；（ｉｉｉ）：ＳＹＰＲＯ　Ｒｕｂｙ染色（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）。

【図５９】図５９は、Ｃ－末端側－Ｓ－末端をもつＴＮＲ１Ｂシンメトロアドヘシンサブユニットを示す。列５は、キチンアフィニティークロマトグラフィーおよびシステインによる開裂／溶離による精製後の図４４Ａ（ｉｖ）のＴＮＲ１Ｂポリペプチドを示す。列１～４は、ＴＮＲ１Ｂ－イムノアドヘシンを示す。

【図６０】図６０は、ＴＮＲ１Ｂシンメトロアドヘシンを示す。列１～４は、酸化前（列１および４）、および１０ｍＭ　ＣｕＳＯ４の存在下で酸化した後の図４４Ａ（ｉｖ）のＴＮＲ１Ｂシンメトロアドヘシンを示す。列３および６は、ＴＮＲ１Ｂ－イムノアドヘシン対照を示す。列１～３：還元条件下；列４～６：非還元条件下。ＴＮＲ１Ｂシンメトロ

アドヘシンモノマー（４２ｋｄ）および二量体（８４ｋｄ）を、それぞれ列２および５および列５に示す。

【図６１Ａ】図６１Ａは、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ－１００上の種々のＴＮＲ１Ｂポリペプチドによる ＴＮＦ－アルファ飽和結合分析を示す。図４４Ａ（ｉｖ）のＴＮＲ１Ｂシンメトロアドヘシンを、標準Ｂｉａｃｏｒｅアミン化学によりＢｉａｃｏｒｅ　ＣＭ－５チップに共有結合させた。結合後、ＴＮＦ－アルファ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を指示された濃度で用いて飽和結合分析を実施した。

【図６１Ｂ】図６１Ｂは、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ－１００上の種々のＴＮＲ１Ｂポリペプチドによる ＴＮＦ－アルファ飽和結合分析を示す。ＴＮＲ１Ｂイムノアドヘシン（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を、標準Ｂｉａｃｏｒｅアミン化学によりＢｉａｃｏｒｅ　ＣＭ－５チップに共有結合させた。結合後、ＴＮＦ－アルファ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を指示された濃度で用いて飽和結合分析を実施した。

【図６１Ｃ】図６１Ｃは、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ－１００上の種々のＴＮＲ１Ｂポリペプチドによる ＴＮＦ－アルファ飽和結合分析を示す。図４４Ａ（ｉｖ）のＴＮＲ１Ｂ－シンメトロアドヘシンを、標準Ｂｉａｃｏｒｅチオール化学によりＢｉａｃｏｒｅ　ＣＭ－５チップに共有結合させた。結合後、ＴＮＦ－アルファ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を指示された濃度で用いて飽和結合分析を実施した。

【図６２Ａ】図６２Ａは、図６１Ａに示したＴＮＦ－アルファ飽和結合分析のスカッチャード（Ｓｃａｔｃｈａｒｄ）分析を示す。図４４Ａ（ｉｖ）のＴＮＲ１Ｂシンメトロアドヘシンをアミン化学により共有結合させた；Ｋｄ＝Ｋｄ＝４．６９７ｘ１０$^{-9}$Ｍ。

【図６２Ｂ】図６２Ｂは、図６１Ｂに示したＴＮＦ－アルファ飽和結合分析のスカッチャード分析を示す。ＴＮＲ１Ｂ－イムノアドヘシン（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）をアミン化学により共有結合させた；Ｋｄ＝４．０８９ｘ１０$^{-9}$Ｍ。

【図６２Ｃ】図６２Ｃは、図６１Ｃに示したＴＮＦ－アルファ飽和結合分析のスカッチャード分析を示す。図４４Ａ（ｉｖ）のＴＮＲ１Ｂシンメトロアドヘシンをチオール化学により共有結合させた；Ｋｄ＝０．８４７６７ｘ１０$^{-9}$Ｍ。

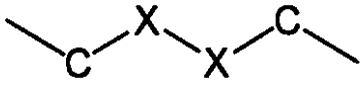
【発明を実施するための形態】

【００２３】

本発明は、下記を含む化合物を提供する：連続アミノ酸の第１区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その配列はあるターゲットに対する結合部位を含む；および連続アミノ酸の第２区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その配列は連続アミノ酸の第１区域の配列と同一であり、かつ前記ターゲットに対する同一結合部位を含む；その際、アミノ酸の第１区域およびアミノ酸の第２区域はそれぞれ、その予め定めた末端にシステイン残基またはセレノシステイン残基を有し、それらのシステイン残基またはそれらのセレノシステイン残基は下記の構造を有する結合で連結している：

【００２４】

【化３】



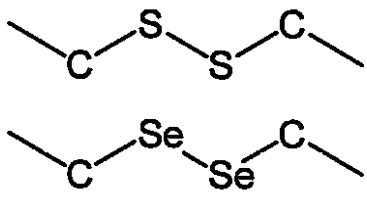
【００２５】

（各Ｘは同一であり、硫黄（Ｓ）またはセレン（Ｓｅ）を表わし、各Ｃは前記のシステイン残基またはセレノシステイン残基のうちの１つのベーター炭素を表わす）。

ある態様において、結合は下記の構造をもつ：

【００２６】

【化４】



【００２７】

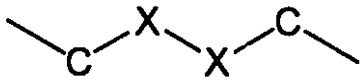
ある態様において、連続アミノ酸の第１区域および第２区域のそれぞれの予め定めた末端にある残基はシステイン残基である。１態様において、連続アミノ酸の第１区域および第２区域のそれぞれの予め定めた末端にある残基はセレノシステイン残基である。

【００２８】

本発明は、下記を含む化合物をも提供する：連続アミノ酸の第１区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その配列はあるターゲットに対する結合部位を含む；および連続アミノ酸の第２区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その配列は連続アミノ酸の第１区域の配列と異なり、かつ異なる部分に対する結合部位を含む；その際、アミノ酸の第１区域およびアミノ酸の第２区域はそれぞれ、その予め定めた末端にシステイン残基またはセレノシステイン残基を有し、それらの残基は下記の構造を有する結合で連結している：

【００２９】

【化５】



【００３０】

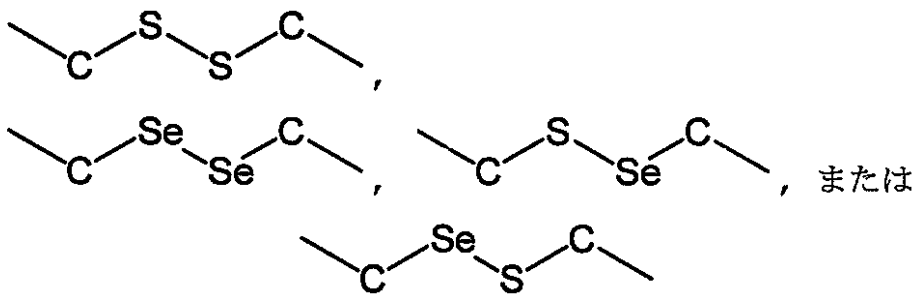
（各Ｘは同一でも異なってもよく、硫黄（Ｓ）またはセレン（Ｓｅ）を表わし、各Ｃは前記のシステイン残基またはセレノシステイン残基のうちの１つのベーター炭素を表わす）。

【００３１】

ある態様において、結合は下記の構造をもつ：

【００３２】

【化６】



【００３３】

ある態様において、アミノ酸の第１区域およびアミノ酸の第２区域のそれぞれの予め定めた末端にある残基は両方ともシステイン残基である。ある態様において、アミノ酸の第１区域およびアミノ酸の第２区域のそれぞれの予め定めた末端にある残基は両方ともセレノシステイン残基である。ある態様において、アミノ酸の第１区域またはアミノ酸の第２区域のうちの１つの予め定めた一方の末端にある残基はシステイン残基であり、予め定め

た他方の末端にある残基はセレノシステイン残基である。

【００３４】

本発明は、２以上の同一の本発明化合物が少なくとも１つの結合により互いに連結したものを含む多量体を提供する。ある態様において、多量体は二量体である。ある態様において、多量体は三量体である。ある態様において、多量体は四量体である。多量体のある態様においては、１以上の結合がジスルフィド結合を含む。

【００３５】

化合物のある態様において、アミノ酸の第１区域およびアミノ酸の第２区域の両方の予め定めた末端はそのＮ－末端である。ある態様において、アミノ酸の第１区域およびアミノ酸の第２区域の両方の予め定めた末端はそのＣ－末端である。ある態様においては、アミノ酸の第１区域およびアミノ酸の第２区域のうちの１つの予め定めた一方の末端がＣ末端であり、予め定めた他方の末端がＮ末端である。

【００３６】

化合物のある態様において、アミノ酸の第１区域はＬ－アミノ酸を含む。ある態様において、アミノ酸の第１区域はＤ－アミノ酸を含む。ある態様において、アミノ酸の第１区域はＬ－アミノ酸およびＤ－アミノ酸を含む。

【００３７】

ある態様において、アミノ酸の第２区域はＬ－アミノ酸を含む。ある態様において、アミノ酸の第２区域はＤ－アミノ酸を含む。ある態様において、アミノ酸の第２区域はＬ－アミノ酸およびＤ－アミノ酸を含む。

【００３８】

ある態様において、アミノ酸の第１区域は少なくとも５０個の連続アミノ酸を含む。ある態様において、アミノ酸の第２区域は少なくとも５０個の連続アミノ酸を含む。ある態様において、アミノ酸の第１区域および／または第２区域は、１～１００、１００～２００または２００～３００個のアミノ酸の長さである。ある態様において、アミノ酸の第１区域または第２区域は、少なくとも２０、２５、３０、３５、４０または４５個の連続アミノ酸を含む。

【００３９】

ある態様において、アミノ酸の第１区域は１種類より多いアミノ酸を含む。ある態様において、アミノ酸の第２区域は１種類より多いアミノ酸残基を含む。

本発明化合物のある態様において、アミノ酸の第１区域および／または第２区域は、免疫グロブリンの定常部の配列に相応する。ある態様において、免疫グロブリンはヒト免疫グロブリンである。ある態様において、免疫グロブリンの定常部は、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＤ、またはＩｇＭ免疫グロブリンの定常部である。ある態様において、免疫グロブリンの定常部は、ＩｇＧ－１、ＩｇＧ－２、ＩｇＧ－３、またはＩｇＧ－４免疫グロブリンの定常部である。ある態様において、ＩｇＧ－１、ＩｇＧ－２、ＩｇＧ－３、またはＩｇＧ－４免疫グロブリンの定常部である免疫グロブリン定常部は、本明細書に示す配列の１つを有する。ある態様において、免疫グロブリンの定常部はＩｇＧ免疫グロブリンの定常部であり、そして、ヒンジ部、ＣＨ６領域およびＣＨ３領域を含む。ある態様において、異なる部分はイムノエフェクターまたはイムノレギュレーターである。

【００４０】

ある態様において、ターゲットはタンパク質である。ある態様において、ターゲットは、ＥＧＦ受容体、ＨＥＲ２、ＶＥＧＦ受容体、ＣＤ２０抗原、ＣＤ１１ａ、ＩｇＥ免疫グロブリン、グリコプロテインＩＩａ受容体、グリコプロテインＩＩＩａ受容体、ＴＮＦアルファ、またはＴＮＦ受容体、ｇｐ１２０である。ある態様において、連続アミノ酸の第１区域および第２区域は、ＴＮＦＲＳＦ１ａ、ＴＮＦＲＳＦ１ｂ、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ６、ＶＥＧＦＲ３、ヒトＥｒｂ１、ヒトＥｒｂ２、ヒトＥｒｂ６、ヒトＥｒｂ３、またはヒトＥｒｂ４のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。ある態様において、連続アミノ酸の第１区域または第２区域は、ＴＮＦＲＳＦ１ａ、ＴＮＦＲＳＦ１ｂ、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ６、ＶＥＧＦＲ３、ヒトＥｒｂ１、ヒトＥｒｂ２、ヒトＥｒｂ６、ヒト

Ｅｒｂ３、またはヒトＥｒｂ４のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。

【００４１】

本発明は、ターゲットを結合するのに有効な量の本発明のいずれかの化合物、およびキャリヤーを含む、組成物を提供する。ある態様において、化合物はターゲットを結合するのに有効な量である、およびキャリヤー。ある態様において、化合物は多量体であってターゲットを結合するのに有効な量である、およびキャリヤー。ある態様において、多量体は異なる部分をも結合するのに有効な量で存在する。ある態様において、キャリヤーは医薬的に許容できるキャリヤーである。ある態様において、キャリヤーはリン酸緩衝化生理食塩水である。そのような組成物を凍結乾燥することができる。

【００４２】

本発明は、ターゲットの活性に影響を及ぼす方法であって、化合物がターゲットに結合してその活性に影響を及ぼす条件下で、ターゲットを１以上の本発明化合物の組成物と接触させることを含む方法を提供する。１態様においては、ターゲットへの組成物の結合によりターゲットの活性が増大する。１態様においては、ターゲットへの組成物の結合によりターゲットの活性が低下する。１態様において、ターゲットはＥＧＦ受容体、ＨＥＲ２タンパク質、ＶＥＧＦ受容体、ＣＤ２０抗原、ＣＤ１１ａ、ＩｇＥ免疫グロブリン、グリコプロテインＩＩａ受容体、グリコプロテインＩＩＩａ受容体、ｇｐ４０、ｇｐ１２０、ＴＮＦアルファ、またはＴＮＦ受容体である。

【００４３】

本発明は、本発明のいずれかの組成物、および連続アミノ酸の第３区域を含む複合体であって、連続アミノ酸の第３区域が連続アミノ酸の第１区域または第２区域のうち一方に１またはそれ以上の結合により結合している複合体を提供する。ある態様において、１またはそれ以上の結合はファンデルワールス力を含む。１態様において、１またはそれ以上の結合は水素結合を含む。１態様において、１または結合は共有結合を含む。ある態様において、１または結合はジスルフィド結合を含む。ある態様において、少なくとも１つの結合はジスルフィド結合である。ある態様において、ジスルフィド結合は２つの非末端アミノ酸残基の間にある。ある態様において、ジスルフィド結合は２つのアミノ酸残基の間にあり、それらのうち少なくとも一方は非末端アミノ酸残基である。

【００４４】

本発明は、本発明化合物の１つを調製する方法であって、下記を含む方法を提供する：

（ａ）（ｉ）その配列がＮ－末端シグナル配列である第１部分、これと接した（ｉｉ）その配列が連続アミノ酸の区域をコードする第２部分、これと接した（ｉｉｉ）その配列がＣ－末端インテイン含有結合ドメインをコードする第３部分を含む、組換え核酸により、連続アミノ酸の区域がＣ－末端インテイン含有結合ドメインと接したものを含むキメラポリペプチドの合成を可能にする条件下で、細胞をトランスフェクションし；

（ｂ）工程（ａ）で産生されたキメラポリペプチドを単離し；

（ｃ）キメラポリペプチドを、連続アミノ酸の区域からＣ－末端インテイン含有結合ドメインのチオ仲介開裂が起き、それがＣ－末端チオエステルで置換されるように処理し；

（ｄ）工程（ｃ）の生成物を、生成物へのシステイン残基の結合が可能となり、これによりＣ－末端システインを含む生成物が形成されるように処理し；そして

（ｅ）工程（ｅ）の生成物を工程（ｅ）の他の生成物の存在下において、前記化合物の形成が可能な条件下で酸化する。

【００４５】

１態様において、組換え核酸はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．１～８のいずれかの１つに示す配列を有する。１態様において、Ｃ－末端インテイン含有結合ドメインはインテイン－キチン結合ドメインである。１態様において、Ｃ－末端インテイン含有結合ドメインはＭｔｈＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインである。１態様においては、工程ｂ）においてアフィニティークロマトグラフィーによりキメラポリペプチドを単離する。１態様においては、工程ｂ）において生成物をキチン誘導体化樹脂に曝露することによりキメラポリペプチドを単離する。１態様において、酸化条件は生成物それぞれのＣ－末端システイン

間にジスルフィド結合の形成が可能となるものである。

【００４６】

本発明は、独立してフォールディングするタンパク質ドメインが第２の独立してフォールディングするタンパク質ドメインに非ペプチド結合により融合したものを含む化合物を提供する。本発明は、末端システイン残基を含む第１ポリペプチド鎖がそれのＳ－末端において末端システイン残基を含む第２ポリペプチド鎖のＳ－末端に融合したものを含む化合物を提供する。本発明は、末端セレノシステイン残基を含む第１ポリペプチド鎖がそれのＳｅ－末端において末端システイン残基を含む第２ポリペプチド鎖のＳ－末端に融合したものを含む化合物を提供する。本発明は、末端セレノシステイン残基を含む第１ポリペプチド鎖がそれのＳｅ－末端において末端セレノシステイン残基を含む第２ポリペプチド鎖のＳｅ－末端に融合したものを含む化合物を提供する。本発明は、請求項６６～６９のいずれかの１項に記載される２以上の同一化合物が少なくとも１つの結合により互いに連結したものを含む多量体を提供する。

【００４７】

本発明は、Ｎ－末端システインを含む連続アミノ酸の区域を調製する方法であって、下記を含む方法を提供する：

（ａ）（ｉ）その配列がＮ－末端シグナル配列をコードする第１部分、これと接した（ｉｉ）その配列がＮ－末端システイン残基を含む連続アミノ酸の区域をコードする第２部分を含む、組換え核酸により、下記を可能にする条件下で細胞をトランスフェクションし：（ｉ）Ｎ－末端シグナル配列がそれのＣ－末端においてペプチド結合により連続アミノ酸の区域のＮ－末端システインに連結したものを含む、キメラポリペプチドが合成され、そして（ｉｉ）Ｎ－末端シグナル配列が細胞内でキメラポリペプチドから開裂し、これによりＮ－末端システインを含む連続アミノ酸の区域が産生される；

（ｂ）工程（ａ）で産生された連続アミノ酸の区域を回収する。

【００４８】

本明細書に開示する１態様においては、連続アミノ酸の区域を工程（ｂ）において単離する。

１態様において、連続アミノ酸の区域は免疫グロブリンＦｃポリペプチドを含む。１態様において、免疫グロブリンＦｃポリペプチドはヒト免疫グロブリンＦｃポリペプチドである。１態様において、Ｎ－末端システイン残基はヒト免疫グロブリンＦｃポリペプチドのＣｙｓ－５残基である。１態様において、細胞は２９３ヒト胚細胞またはＣＨＯ－Ｋ１ハムスター卵巣細胞である。１態様において、トランスフェクションはプラスミドｐＳＡを用いて実施される。１態様において、Ｎ－末端シグナル配列はＮ－末端システインを有するタンパク質から選択される。１態様において、シグナルペプチドはソニックヘッジホッグ、インターフェロンアルファ－２またはコレステロールエステルトランスフェラーゼである。１態様においては、連続アミノ酸の区域をアフィニティークロマトグラフィーにより回収する。１態様において、細胞内でのキメラポリペプチドの開裂は細胞性シグナルペプチダーゼにより行なわれる。

【００４９】

本発明は、Ｎ－末端システインまたはセレノシステインを含む連続アミノ酸の区域を調製する方法であって、下記を含む方法を提供する：

（ａ）（ｉ）その配列がＮ－末端シグナル配列をコードする第１部分、これと接した（ｉｉ）その配列がＮ－末端システイン残基を含む連続アミノ酸の区域をコードする第２部分を含む、組換え核酸により、下記を可能にする条件下で細胞をトランスフェクションし：（ｉ）Ｎ－末端シグナル配列がそれのＣ－末端においてＦｃポリペプチドのＮ－末端システインに連結したものを含む、キメラポリペプチドが合成され、そして（ｉｉ）Ｎ－末端シグナル配列が細胞内でキメラポリペプチドから開裂し、これによりＮ－末端システインを含む連続アミノ酸の区域が産生される；

（ｂ）工程（ａ）で産生された連続アミノ酸の区域のＮ－末端を、アミノ酸配列ｃｙｓ－ａｓｐ－ｌｙｓ－ｔｈｒ－ｈｉｓ－ｔｈｒを含むペプチドのＣ－末端と、またはアミノ

酸配列ｓｅｃ－ａｓｐ－ｌｙｓ－ｔｈｒ－ｈｉｓ－ｔｈｒを含むペプチドとライゲートさせ、これによりＮ－末端システインまたはセレノシステインを含む連続アミノ酸の区域を生成させ；そして

（ｃ）工程（ｂ）で生成した連続アミノ酸の区域を回収する。

【００５０】

ある態様において、連続アミノ酸の区域は免疫グロブリンＦｃポリペプチドを含む。ある態様において、免疫グロブリンＦｃポリペプチドはヒト免疫グロブリンＦｃポリペプチドである。ある態様において、Ｎ－末端システイン残基はヒト免疫グロブリンＦｃポリペプチドのｃｙｓ－５残基である。１態様において、Ｎ－末端システイン残基はヒト免疫グロブリンＦｃポリペプチドのｃｙｓ－１１残基である。ある態様において、工程（ｂ）のペプチドはアミノ酸配列ｃｙｓ－ａｓｐ－ｌｙｓ－ｔｈｒ－ｈｉｓ－ｔｈｒを含み、生成した連続アミノ酸の区域はＮ－末端システインを含む。ある態様において、工程（ｂ）のペプチドはアミノ酸配列ｓｅｃ－ａｓｐ－ｌｙｓ－ｔｈｒ－ｈｉｓ－ｔｈｒを含み、生成した連続アミノ酸の区域はＮ－末端セレノシステインを含む。ある態様においては、工程（ｂ）のペプチドをライゲーションの前にＮ－末端Ｍｓｃ保護基で保護する。ある態様において、細胞は２９３ヒト胚細胞またはＣＨＯ－Ｋ１ハムスター卵巣細胞である。ある態様において、トランスフェクションはプラスミドｐＳＡを用いて実施される。ある態様において、Ｎ－末端シグナル配列はＮ－末端システインを有するタンパク質から選択される。ある態様において、シグナルペプチドはソニックヘッジホッグ、インターフェロンアルファ－２またはコレステロールエステルトランスフェラーゼである。ある態様においては、連続アミノ酸の区域をアフィニティークロマトグラフィーにより回収する。ある態様において、細胞内でのキメラポリペプチドの開裂は細胞性シグナルペプチダーゼにより行なわれる。ある態様において、Ｎ－末端システインまたはセレノシステインをもつ他の短いペプチド配列を前記配列の代わりに用いる。

【００５１】

本発明は、Ｃ－末端システインまたはＣ－末端セレノシステインを含む連続アミノ酸の区域を調製する方法であって、下記を含む方法を提供する：

（ａ）（ｉ）その配列がＮ－末端シグナル配列をコードする第１部分、これと接した（ｉｉ）その配列が連続アミノ酸の区域をコードする第２部分、これと接した（ｉｉｉ）その配列がＣ－末端インテイン含有結合ドメインをコードする第３部分を含む、組換え核酸により、下記を可能にする条件下で細胞をトランスフェクションし：（ｉ）Ｎ－末端シグナル配列、これと接した連続アミノ酸の区域、これと接したＣ－末端インテイン含有結合ドメインを含む、キメラポリペプチドが合成され、そして（ｉｉ）Ｎ－末端シグナル配列がキメラポリペプチドから開裂し、これによりＮ－末端リジン残基を有しかつ連続アミノ酸の区域がＣ－末端インテイン含有結合ドメインと接したものを含む、第２キメラポリペプチドが産生される；

（ｂ）工程（ａ）で産生された第２キメラポリペプチドを単離し；

（ｃ）第２キメラポリペプチドを、連続アミノ酸の区域からＣ－末端インテイン含有結合ドメインのチオ仲介開裂が起き、これによりＣ－末端チオエステルが形成されるように処理し；

（ｄ）工程（ｃ）の生成物をそれのＣ－末端においてシステイン残基またはセレノシステイン残基とライゲートさせ、これによりＣ－末端システインまたはＣ－末端セレノシステインを含む生成物を形成させ；そして

（ｅ）工程（ｄ）の生成物を回収する。

【００５２】

ある態様において、接した連続アミノ酸の区域はＩｇＧ免疫グロブリンＦｃポリペプチドおよびＩｇＧ　Ｍ１エキソンを含む。ある態様において、ＩｇＧ免疫グロブリンはヒトＩｇＧ免疫グロブリンである。ある態様において、接した連続アミノ酸の区域はＣＤ４細胞外ドメインを含む。ある態様において、Ｎ－末端シグナル配列はＮ－末端リジンを有するタンパク質から選択される。ある態様において、Ｎ－末端シグナル配列はＣＤ２　Ｔ細

胞表面糖タンパク質またはＣＤ４　Ｔ細胞表面糖タンパク質である。ある態様において、細胞は２９３ヒト胚細胞またはＣＨＯ－Ｋ１ハムスター卵巣細胞である。ある態様において、トランスフェクションはプラスミドｐＳＡを用いて実施される。ある態様において、Ｃ－末端インテイン含有結合ドメインはインテイン－キチン結合ドメインである。ある態様において、Ｃ－末端インテイン含有結合ドメインはＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインである。ある態様において、Ｃ－末端インテイン含有結合ドメインは自己スプライシングインテイン含有結合ドメインである。ある態様においては、工程ｂ）において生成物をキチン誘導体化樹脂に曝露することによりキメラポリペプチドを単離する。ある態様において、細胞内での第２キメラポリペプチドの開裂は細胞性シグナルペプチダーゼにより行なわれる。ある態様においては、工程（ｃ）の生成物をシステイン残基とライゲートさせる。ある態様においては、工程（ｃ）の生成物をセレノシステイン残基とライゲートさせる。

【００５３】

本発明は、Ｎ－末端システインおよびＣ－末端システインまたはセレノシステインを含む連続アミノ酸の区域を調製する方法であって、下記を含む方法を提供する：

（ａ）（ｉ）その配列がＮ－末端シグナル配列をコードする第１部分、これと接した（ｉｉ）その配列が連続アミノ酸の区域をコードする第２部分、これと接した（ｉｉｉ）その配列がＣ－末端インテイン含有結合ドメインをコードする第３部分を含む、組換え核酸により、下記を可能にする条件下で細胞をトランスフェクションし：（ｉ）Ｎ－末端シグナル配列、これと接した連続アミノ酸の区域、これと接したＣ－末端インテイン含有結合ドメインを含む、キメラポリペプチドが合成され、そして（ｉｉ）Ｎ－末端シグナル配列がキメラポリペプチドから開裂し、これによりＮ－末端システイン残基を有しかつ連続アミノ酸の区域がＣ－末端インテイン含有結合ドメインと接したものを含む、第２キメラポリペプチドが産生される；

（ｂ）工程（ａ）で産生された第２キメラポリペプチドを単離し；

（ｃ）第２キメラポリペプチドを、連続アミノ酸の区域からＣ－末端インテイン含有結合ドメインのチオ仲介開裂が起き、これによりＣ－末端チオエステルが形成されるように処理し；

（ｄ）工程（ｃ）の生成物をそれのＣ－末端においてシステイン残基またはセレノシステイン残基とライゲートさせ、これによりＣ－末端システインまたはＣ－末端セレノシステインを含む生成物を形成させ；そして

（ｅ）工程（ｄ）の生成物を回収する。

【００５４】

ある態様において、接した連続アミノ酸の区域はＩｇＧ免疫グロブリンＦｃポリペプチドおよびＩｇＧ　Ｍ１エキソンを含む。ある態様において、ＩｇＧ免疫グロブリンはヒトＩｇＧ免疫グロブリンである。ある態様において、Ｎ－末端シグナル配列はＮ－末端システインを有するタンパク質から選択される。ある態様において、Ｎ－末端システイン残基はヒト免疫グロブリンＦｃポリペプチドのｃｙｓ－５残基である。ある態様において、Ｎ－末端システイン残基はヒト免疫グロブリンＦｃポリペプチドのｃｙｓ－１１残基である。ある態様において、Ｎ－末端シグナルはソニックヘッジホッグ、インターフェロンアルファ－２またはコレステロールエステルトランスフェラーゼである。ある態様において、細胞は２９３ヒト胚細胞またはＣＨＯ－Ｋ１ハムスター卵巣細胞である。ある態様において、トランスフェクションはプラスミドｐＳＡを用いて実施される。ある態様において、Ｃ－末端インテイン含有結合ドメインはインテイン－キチン結合ドメインである。ある態様において、Ｃ－末端インテイン含有結合ドメインはＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインである。ある態様において、Ｃ－末端インテイン含有結合ドメインは自己スプライシングインテイン含有結合ドメインである。ある態様においては、工程ｂ）において生成物をキチン誘導体化樹脂に曝露することにより第２キメラポリペプチドを単離する。ある態様においては、工程ｅ）においてアフィニティークロマトグラフィーにより生成物を回収する。ある態様において、細胞内でのキメラポリペプチドの開裂は細胞性シグ

ナルペプチダーゼにより行なわれる。ある態様においては、工程（ｃ）の生成物をシステイン残基とライゲートさせる。ある態様においては、工程（ｃ）の生成物をセレノシステイン残基とライゲートさせる。

【００５５】

本発明は、Ｎ－末端システインまたはセレノシステインおよびＣ－末端システインまたはセレノシステインを含む連続アミノ酸の区域を調製する方法であって、下記を含む方法を提供する：

（ａ）（ｉ）その配列がＮ－末端シグナル配列をコードする第１部分、これと接した（ｉｉ）その配列が連続アミノ酸の区域をコードする第２部分、これと接した（ｉｉｉ）その配列がＣ－末端インテイン含有結合ドメインをコードする第３部分を含む、組換え核酸により、下記を可能にする条件下で細胞をトランスフェクションし：（ｉ）Ｎ－末端シグナル配列、これと接した連続アミノ酸の区域、これと接したＣ－末端インテイン含有結合ドメインを含む、キメラポリペプチドが合成され、そして（ｉｉ）Ｎ－末端シグナル配列がキメラポリペプチドから開裂し、これによりＮ－末端システイン残基を有しかつ連続アミノ酸の区域がＣ－末端インテイン含有結合ドメインと接したものを含む、第２キメラポリペプチドが産生される；

（ｂ）工程（ａ）で産生された第２キメラポリペプチドを単離し；

（ｃ）（ｉ）工程（ａ）で産生された連続アミノ酸の区域のＮ－末端を、ｃｙｓ－ａｓｐ－ｌｙｓ－ｔｈｒ－ｈｉｓ－ｔｈｒを含むペプチドのＣ－末端と、またはアミノ酸配列ｓｅｃ－ａｓｐ－ｌｙｓ－ｔｈｒ－ｈｉｓ－ｔｈｒを含むペプチドとライゲートさせ、これによりそれぞれＮ－末端システインまたはＮ－末端セレノシステインを含む連続アミノ酸の区域を形成させ；

（ｉｉ）キメラポリペプチドを、連続アミノ酸の区域からＣ－末端インテイン含有結合ドメインのチオ仲介開裂が起き、それがＣ－末端チオエステルで置換されるように処理し；

（ｉｉｉ）工程（ｃ）の生成物をそれのＣ－末端においてシステイン残基またはセレノシステイン残基とライゲートさせ、これによりＣ－末端システインまたはセレノシステインを含む生成物を形成させ；そして

（ｄ）工程（ｃ）（ｉｉｉ）の生成物を回収する。

【００５６】

ある態様において、接した連続アミノ酸の区域はＩｇＧ免疫グロブリンＦｃポリペプチドおよびＩｇＧ　Ｍ１エキソンを含む。ある態様において、ＩｇＧ免疫グロブリンはヒトＩｇＧ免疫グロブリンである。ある態様において、Ｎ－末端シグナル配列はＮ－末端システインを有するタンパク質から選択される。ある態様において、Ｎ－末端システイン残基はヒト免疫グロブリンＦｃポリペプチドのｃｙｓ－１１残基である。ある態様において、Ｎ－末端シグナル配列はＮ－末端システインを有するタンパク質から選択される。ある態様において、Ｎ－末端シグナルはソニックヘッジホッグ、インターフェロンアルファ－２またはコレステロールエステルトランスフェラーゼである。ある態様において、細胞は２９３ヒト胚細胞またはＣＨＯ－Ｋ１ハムスター卵巣細胞である。ある態様において、トランスフェクションはプラスミドｐＳＡを用いて実施される。ある態様において、Ｃ－末端インテイン含有結合ドメインはインテイン－キチン結合ドメインである。ある態様において、Ｃ－末端インテイン含有結合ドメインはＭｔｈ　ＲＩＲ１インテイン－キチン結合ドメインである。ある態様においては、工程ｂ）において生成物をキチン誘導体化樹脂に曝露することによりキメラポリペプチドを単離する。

【００５７】

ある態様において、免疫グロブリンＦｃポリペプチドはヒト免疫グロブリンＦｃポリペプチドである。ある態様において、ＦｃポリペプチドのＮ－末端システイン残基はｃｙｓ－１１残基である。ある態様において、工程（ｃ）（ｉ）のペプチドはアミノ酸配列ｃｙｓ－ａｓｐ－ｌｙｓ－ｔｈｒ－ｈｉｓ－ｔｈｒを含み、連続アミノ酸の区域。ある態様において、工程（ｃ）（ｉ）のペプチドはアミノ酸配列ｓｅｃ－ａｓｐ－ｌｙｓ－ｔｈｒ－

ｈｉｓ－ｔｈｒを含み、生成した連続アミノ酸の区域はＮ－末端セレノシステインを含む。ある態様においては、工程（ｃ）のペプチドをライゲーションの前にＮ－末端Ｍｓｃ保護基で保護する。ある態様において、細胞は２９３ヒト胚細胞またはＣＨＯ－Ｋ１ハムスター卵巣細胞である。ある態様において、トランスフェクションはプラスミドｐＳＡを用いて実施される。ある態様において、Ｎ－末端シグナル配列はＮ－末端システインを有するタンパク質から選択される。ある態様において、シグナルペプチドはソニックヘッジホッグ、インターフェロンアルファ－２またはコレステロールエステルトランスフェラーゼである。ある態様においては、連続アミノ酸の区域をアフィニティークロマトグラフィーにより回収する。

【００５８】

ある態様においては、工程（ｃ）を工程（ｃ）（ｉ）；工程（ｃ）（ｉｉ）；工程（ｃ）（ｉｉｉ）の順序で実施する。ある態様においては、工程（ｃ）を工程（ｃ）（ｉｉ）；工程（ｃ）（ｉｉｉ）；工程（ｃ）（ｉ）の順序で実施する。

【００５９】

本発明は、下記の連続アミノ酸の区域を還元条件下で接触させてこれにより化合物を製造すること含む、化合物の製造方法を提供する：連続アミノ酸の区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その配列はあるターゲットに対する結合部位を含む；および連続アミノ酸の第２区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その配列は連続アミノ酸の第１区域の配列と同一であり、かつ前記ターゲットに対する同一結合部位を含む；その際、アミノ酸の第１区域およびアミノ酸の第２区域はそれぞれ、その予め定めた末端にシステイン残基またはセレノシステイン残基を含む。

【００６０】

本発明は、下記の連続アミノ酸の区域を還元条件下で接触させてこれにより化合物を製造すること含む、化合物の製造方法を提供する：連続アミノ酸の区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その配列はあるターゲットに対する結合部位を含む；および連続アミノ酸の第２区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その配列は連続アミノ酸の第１区域の配列と異なり、かつ前記ターゲットに対する同一結合部位を含む；その際、アミノ酸の第１区域およびアミノ酸の第２区域はそれぞれ、その予め定めた末端にシステイン残基またはセレノシステイン残基を含む。

【００６１】

本発明の方法のある態様において、還元条件は連続アミノ酸の区域を変性させない。ある態様において、還元条件は、トリス－ＨＣＬおよびメルカプトエタノールを含む緩衝液に連続アミノ酸の区域を曝露することを含む。ある態様において、緩衝液はｐＨ７．６～８．４である。ある態様において、緩衝液はｐＨ８である。ある態様においては、さらに生成物を酸化用緩衝液中へ入れ替えることを含む。ある態様において、連続アミノ酸の区域はＣＤ４細胞外ドメインを含む。ある態様において、連続アミノ酸の区域は免疫グロブリンＦｃポリペプチドの配列を含む。ある態様において、免疫グロブリンはヒト免疫グロブリンである。

【００６２】

ある態様において、本発明のトランスフェクションした細胞を、前記ポリペプチドを発現させるのに適切な条件下で増殖させる。

ある態様においては、下記を含む化合物を提供する：

連続アミノ酸の第１区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その配列はあるターゲットに対する結合部位を含む；および

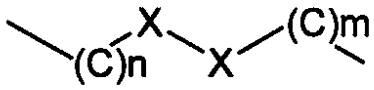
連続アミノ酸の第２区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その配列は連続アミノ酸の第１区域の配列と同一であり、かつ前記ターゲットに対する同一結合部位を含む；

その際、アミノ酸の第１区域およびアミノ酸の第２区域はそれぞれ独立して、その予め

定めた末端に、硫黄（Ｓ）またはセレン（Ｓｅ）を含む直鎖状脂肪族側鎖酸を有する天然アミノ酸または非天然アミノを有し、それらの硫黄（Ｓ）またはセレン（Ｓｅ）は下記の構造を有する結合で連結している：

【００６３】

【化７】



【００６４】

（各Ｘは硫黄（Ｓ）またはセレン（Ｓｅ）であり、各（Ｃ）は前記の天然または非天然アミノ酸のうちの１つの直鎖状脂肪族側鎖の炭素を表わし、ｎおよびｍは独立して２、３、４、５、６、７、８、９または１０である）。

【００６５】

ある態様において、天然アミノ酸はホモシステインまたはホモセレノシステインである。ある態様において、アミノ酸の第１区域および第２区域はその予め定めた末端にホモシステイン残基を有する。ある態様において、アミノ酸の第１区域および第２区域はその予め定めた末端にホモセレノシステイン残基を有する。ある態様において、アミノ酸の第１区域および第２区域はその予め定めた末端にホモシステイン残基を有する。ある態様において、予め定めた末端はＣ－末端である。

【００６６】

下記を含む化合物が提供される：

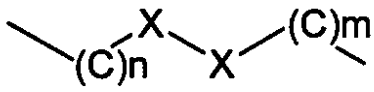
連続アミノ酸の第１区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その配列はあるターゲットに対する結合部位を含む；および

連続アミノ酸の第２区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その配列は連続アミノ酸の第１区域の配列と異なり、かつ異なる部分に対する結合部位を含む；

その際、アミノ酸の第１区域およびアミノ酸の第２区域はそれぞれ独立して、その予め定めた末端に、硫黄（Ｓ）またはセレン（Ｓｅ）を含む直鎖状脂肪族側鎖酸を有する天然アミノ酸または非天然アミノを有し、それらの硫黄（Ｓ）またはセレン（Ｓｅ）は下記の構造を有する結合で連結している：

【００６７】

【化８】



【００６８】

（各Ｘは同一でも異なってもよく、硫黄（Ｓ）またはセレン（Ｓｅ）を表わし、各（Ｃ）は前記の天然または非天然アミノ酸のうちの１つの直鎖状脂肪族側鎖の炭素を表わし、ｎおよびｍは独立して１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０である）。

【００６９】

ある態様において、天然アミノ酸はホモシステインまたはホモセレノシステインである。ある態様において、アミノ酸の第１区域および第２区域はその予め定めた末端にホモシステイン残基をもつ。ある態様において、アミノ酸の第１区域および第２区域はその予め定めた末端にホモセレノシステイン残基をもつ。ある態様において、アミノ酸の第１区域および第２区域はその予め定めた末端にホモシステイン残基をもつ。ある態様において、予め定めた末端はＣ－末端である。

【００７０】

インテインと接した第１ポリペプチドを含み、このインテインが結合ドメインを含む第

２ポリペプチドと接したタンパク質を製造する方法であって、動物細胞に動物細胞が該タンパク質を発現および分泌する条件下で核酸をトランスフェクションすることを含み、この核酸が（ｉ）該ポリペプチドをコードする第１部分、これと接した（ｉｉ）インテインをコードする第２部分、これと接した、結合ドメインをコードする第３部分を含む、前記方法が提供される。ある態様において、動物細胞は哺乳動物に由来する。ある態様において、結合ドメインはキチン結合ドメインである。

【００７１】

固体表面に末端ジスルフィド結合により結合したポリペプチドを含む組成物が提供される。ある態様において、固体表面はチップまたはビーズである。

下記を含む化合物が提供される：

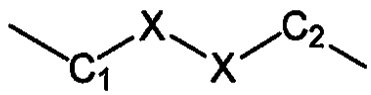
連続アミノ酸の第１区域：そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、その連続アミノ酸の第１区域はカルコゲン官能基を含む側鎖を有するアミノ酸残基を含む；および

連続アミノ酸の第２区域：少なくとも１００個のアミノ酸を含み、そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、連続アミノ酸の第２区域のうち少なくとも９０個の連続アミノ酸はヒト免疫グロブリン定常部ポリペプチドの一部と同一の配列を有し、かつ連続アミノ酸の第２区域はその予め定めた末端にカルコゲン官能基を含む側鎖を有するアミノ酸残基を含む；

その際、連続アミノ酸の第１区域のカルコゲン官能基を含む側鎖を有するアミノ酸残基と、連続アミノ酸の第２区域のカルコゲン官能基を含む側鎖を有するアミノ酸残基は下記の構造を有する結合で連結している：

【００７２】

【化９】



【００７３】

（各Ｘは独立してカルコゲンを表わし、C_1は連続アミノ酸の第１区域のカルコゲン官能基を含む側鎖を有するアミノ酸残基の側鎖炭素を表わし、C_2は連続アミノ酸の第２区域の側鎖炭素を表わす）。

【００７４】

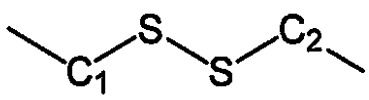
ある態様においては、連続アミノ酸の第２区域の少なくとも９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９または１００個の連続アミノ酸が、ヒト免疫グロブリン定常部ポリペプチドの一部と同一の配列をもつ。

【００７５】

ある態様において、C_1およびC_2のうち少なくとも１つはアミノ酸のベータ炭素である。ある化合物の態様において、結合は下記の構造をもつ：

【００７６】

【化１０】

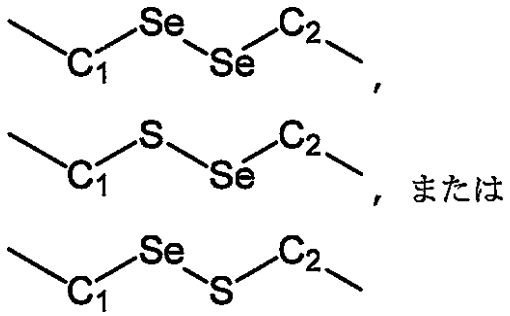


【００７７】

（Ｓは硫黄である）。ある態様において、結合は下記の構造をもつ：

【００７８】

【化１１】



【００７９】
（Ｓは硫黄であり、Ｓｅはセレンである）。
ある態様において、連続アミノ酸の第２区域の予め定めた末端にカルコゲン官能基を含む側鎖を有するアミノ酸残基はシステインである。ある態様において、連続アミノ酸の第２区域の予め定めた末端にカルコゲン官能基を含む側鎖を有するアミノ酸残基はセレノシステイン、ホモシステインまたはホモセレノシステインである。ある態様において、連続アミノ酸の第１区域のカルコゲン官能基を含む側鎖を有するアミノ酸残基はシステインである。ある態様において、連続アミノ酸の第１区域のカルコゲン官能基を含む側鎖を有するアミノ酸残基はセレノシステイン、ホモシステインまたはホモセレノシステインである。ある態様において、連続アミノ酸の第１区域のカルコゲン官能基を含む側鎖を有するアミノ酸残基は末端残基である。ある態様において、連続アミノ酸の第１区域のカルコゲン官能基を含む側鎖を有するアミノ酸残基はピナルト、アンテピナルトまたはプレアンテピナルト末端残基である。
【００８０】
ある態様において、連続アミノ酸の第２区域はヒト免疫グロブリン定常部と同一の配列をもつ。ある態様において、連続アミノ酸の第２区域はヒト免疫グロブリン定常部の一部である。ある態様において、連続アミノ酸の第１区域はヒト免疫グロブリン定常部と同一の配列をもつ。
【００８１】
ある態様において、ヒト免疫グロブリンの定常部ポリペプチドは、ヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ２、ヒトＩｇＧ３、またはヒトＩｇＧ４である。カルコゲン官能基を含む側鎖を有するアミノ酸残基のうち少なくとも１つの側鎖はＣ１－Ｃ１０アルキレンである化合物が提供される。
【００８２】
２つの本発明化合物がそれぞれの化合物の連続アミノ酸の第２区域間で少なくとも１つのジスルフィド結合により互いに結合したものを含む組成物が提供される。
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５～４６のうちの１つに示す配列を有する、またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５３～６７のうちの１つに示す配列を有する、またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７４～８２のうちの１つに示す配列を有する、またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８９～９７のうちの１つに示す配列を有する連続アミノ酸からなるポリペプチドを含む組成物が提供され、その際、ポリペプチドは天然免疫グロブリンポリペプチド（その酵素開裂フラグメントを含む）から構成されない。
【００８３】
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５～４６のうちの１つに示す配列を有する、またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５３～６７のうちの１つに示す配列を有する、またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７４～８２のうちの１つに示す配列を有する、またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８９～９７のうちの１つに示す配列を有する連続アミノ酸からなるポリペプチドを含む組成物が提供される。
【００８４】

本発明のポリペプチドおよびキャリヤーを含む組成物が提供される。化合物の態様において、キャリヤーはリン酸緩衝化生理食塩水である。

独立して選択される本発明の２つのポリペプチドが非ペプチド結合により結合したものを含む組成物が提供される。１態様において、結合はジ－カルコゲニド（ｄｉ－ｃｈａｌｃｏｇｅｎｉｄｅ）結合である。１態様において、結合はジスルフィド結合である。

【００８５】

本発明の２つのポリペプチドが２つのポリペプチド間で少なくとも１つのジスルフィド結合により互いに結合したものを含む組成物が提供される。

ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４４、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６４、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：８１またはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：９６に示す配列の一部と同一の配列を有する連続アミノ酸からなり、ポリペプチドの末端残基のうち少なくとも１つはカルコゲン官能基を含む側鎖をもつものを含む組成物が提供される。

【００８６】

化合物のある態様において、カルコゲン官能基を含む側鎖を有する末端残基はシステインまたはその類似体である。

前記に示した種々のＮ－末端シグナル配列、プラスミド、発現ベクター、組換え核酸、連続アミノ酸の区域、インテイン結合ドメイン、細胞タイプ、回収／単離法などは限定ではない例であり、それらをさらに後記の実施例に示す。

【００８７】

用語の定義

連続アミノ酸の区域（ｓｔｒｅｔｃｈ ｏｆ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄｓ）：鎖状に配列した複数のアミノ酸であって、そのそれぞれはその前のアミノ酸にペプチド結合により結合しており、ただし、その鎖の第１アミノ酸はその前のアミノ酸に結合していない。鎖のアミノ酸は自然界に存在するものまたは自然界に存在しないものであってもよく、あるいはその混合物を含むこともできる。別途指摘しない限り、アミノ酸は遺伝子によりコードされるもの、自然界に存在するけれども遺伝子によりコードされないもの、または自然界に存在しないもの、およびそのいずれの選択肢であってもよい。

【００８８】

ある態様において、連続アミノ酸の区域は生物活性をもつ；これにはターゲット結合活性またはイムノエフェクター活性が含まれるが、これらに限定されない；この生物活性は連続アミノ酸の区域が他の連続アミノ酸の区域に－Ｘ－Ｘ－結合（たとえば－Ｓ－Ｓ－、－Ｓ－Ｓｅ－、－Ｓｅ－Ｓｅ－、または－Ｓｅ－Ｓ－結合）により結合した際に保持される。“連続アミノ酸のセグメント”は“連続アミノ酸の区域”の別の記述である。

【００８９】

Ｎ－末端アミノ酸残基：２個以上の連続アミノ酸の区域の末端残基であって、遊離α－アミノ（NH_2）官能基、またはα－アミノ（NH_2）官能基の誘導体をもつもの。

Ｎ－末端：Ｎ－末端アミノ酸残基の遊離α－アミノ（NH_2）基（またはその誘導体）。

【００９０】

Ｃ－末端アミノ酸残基：２個以上の連続アミノ酸の区域の末端残基であって、遊離α－カルボキシル（ＣＯＯＨ）官能基、またはα－カルボキシル（ＣＯＯＨ）官能基の誘導体をもつもの。

【００９１】

Ｃ－末端：Ｃ－末端アミノ酸残基の遊離α－カルボキシル（ＣＯＯＨ）基（またはその誘導体）。

Ｓ－末端システイン残基：連続アミノ酸の区域のＮ－および／またはＣ－末端残基であるシステインであって、遊離β－スルフヒドリル（ＳＨ）官能基、またはβ－スルフヒドリル（ＳＨ）官能基の誘導体をもつもの。

【００９２】

Ｓ－末端：Ｓ－末端システイン残基の遊離β－スルフヒドリル（ＳＨ）基（またはその

誘導体）。
Ｓｅ－末端セレノシステイン残基：連続アミノ酸の区域のＮ－および／またはＣ－末端残基であるセレノシステインであって、遊離β－セレノヒドリル（ＳｅＨ）官能基、またはβ－セレノヒドリル（ＳｅＨ）官能基の誘導体をもつもの。
【００９３】
Ｓｅ－末端：Ｓｅ－末端セレノシステイン残基の遊離β－セレノヒドリル（ＳｅＨ）基（またはその誘導体）。
Ｘ－末端アミノ酸残基：連続アミノ酸の区域のＮ－および／またはＣ－末端残基であるシステイン（またはシステイン誘導体）またはホモシステイン（またはホモシステイン誘導体）またはセレノシステイン（またはセレノシステイン誘導体）またはホモセレノシステイン（またはホモセレノシステイン誘導体）であって、それぞれ遊離β－スルフヒドリル（ＳＨ）もしくはβ－セレノヒドリル（ＳｅＨ）官能基、またはその硫黄含有もしくはセレン含有誘導体をもつもの。
【００９４】
Ｘ－末端：それぞれ、Ｓ－末端システイン／システイン誘導体残基またはＳｅ－末端セレノシステイン／セレノシステイン誘導体残基の遊離β－スルフヒドリル（ＳＨ）またはβ－セレノヒドリル（ＳｅＨ）基。さらに、Ｘ－末端はＳ－末端ホモシステイン残基またはＳｅ－末端ホモセレノシステイン残基の遊離β－スルフヒドリル（ＳＨ）またはβ－セレノヒドリル（ＳｅＨ）基の可能性がある。
【００９５】
ターゲット：連続アミノ酸の区域またはその三次元構造体の一部の明確に区別される選択部位に結合するもの；受容体、輸送タンパク質、ホルモン、細胞接着タンパク質、組織特異的接着因子、増殖因子、および酵素が含まれるが、これらに限定されない。ターゲットの具体例には、ヒトＥＧＦ受容体、ＨＥＲ２タンパク質、ＶＥＧＦ受容体、ヒトＣＤ２０抗原、ヒトＣＤ１１ａ、ヒトＩｇＥ免疫グロブリン、ヒトグリコプロテインＩＩａ受容体、ヒトグリコプロテインＩＩＩａ受容体、ヒトＴＮＦアルファ、およびＴＮＦ受容体が含まれる。
【００９６】
“結合（ｂｏｎｄ）”は、別途特定しない限り、または状況に反しない限り、共有結合、双極子－双極子相互作用、たとえば水素結合、および分子間相互作用、たとえばファンデルワールス力を含むと理解される。
【００９７】
“シグナル配列”は、ポリペプチドの翻訳後輸送を導く短い（アミノ酸３～６０個の長さ）ペプチド鎖である。
本明細書中で用いる“アミノ酸”は、１態様において、遺伝子コードされるアミノ酸、すなわちイソロイシン、アラニン、ロイシン、アスパラギン、リジン、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、グルタミン酸、トレオニン、グルタミン、トリプトファン、グリシン、バリン、プロリン、アルギニン、セリン、ヒスチジン、チロシン、セレノシステイン、ピロリジンのＬまたはＤ異性体を意味し、ホモシステインおよびホモセレノシステインも含まれる。
【００９８】
アミノ酸の他の例には、タウリン、ギャバ（γ－アミノ酪酸、ｇａｂａ）、ドーパミン、ランチオニン、２－アミノイソ酪酸、デヒドロアラニン、オルニチンおよびシトルリン、ならびに非天然相同体およびその合成修飾形が含まれ、これには最高２個の炭素原子が短縮または延長されたアルキレン鎖をもつアミノ酸、場合により置換されたアリール基を含むアミノ酸、およびハロゲン化された基（ハロゲン化されたアルキル基およびアリール基を含む）を含むアミノ酸、ならびにベータまたはガンマアミノ酸、ならびに環状類似体が含まれる。
【００９９】
イオン化しうるアミノ基およびカルボキシル基が存在するため、これらの態様における

アミノ酸は酸塩または塩基塩の形のであってもよく、あるいは中性の形であってもよい。個々のアミノ酸残基を酸化または還元により修飾することもできる。考慮される他の修飾には、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリルまたはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、ならびにリジン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖のアルファ－アミノ基のメチル化が含まれる。

【０１００】

共有結合誘導体は、特定の官能基をアミノ酸側鎖またはＮ－もしくはＣ－末端に連結させることにより製造できる。

本明細書中で用いる“カルコゲン（ｃｈａｌｃｏｇｅｎ）”は、硫黄、セレン、テルルおよびポロニウムのみに限定される；すなわち、本明細書中で用いる“カルコゲン”には酸素およびウンウンヘキシウム（ｕｎｕｎｈｅｘｉｕｍ）は含まれない。

【０１０１】

本明細書中で用いる“カルコゲン官能基を含む側鎖”は、末端の反応性非酸素、非ウンウンヘキシウム原子を含むアミノ酸残基の側鎖である。限定ではない例として、カルコゲン官能基を含む側鎖をもつアミノ酸はシステイン、セレノシステイン、ホモシステインなどであるが、たとえばカルコゲン原子（Ｓ）を含むけれども末端の反応性カルコゲン原子を含まないメチオニンは含まれない。

【０１０２】

Ｒ－基置換をもつアミノ酸を含む化合物が本発明の範囲に含まれる。本発明化合物における置換基および置換パターンを当業者が選択して、容易に入手できる出発物質から化学的に安定な化合物を得ることができると理解される。

【０１０３】

本明細書中で用いる“天然アミノ酸”は、遺伝子コードされるアミノ酸、すなわちイソロイシン、アラニン、ロイシン、アスパラギン、リジン、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、グルタミン酸、トレオニン、グルタミン、トリプトファン、グリシン、バリン、プロリン、アルギニン、セリン、ヒスチジン、チロシン、セレノシステイン、ピロリジン、ならびにホモシステインおよびホモセレノシステインのＬまたはＤ異性体を意味する。

【０１０４】

本明細書中で用いる“非天然アミノ酸”は、化学修飾されたイソロイシン、アラニン、ロイシン、アスパラギン、リジン、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、グルタミン酸、トレオニン、グルタミン、トリプトファン、グリシン、バリン、プロリン、アルギニン、セリン、ヒスチジン、チロシン、セレノシステイン、ピロリジン、ホモシステイン、ホモセレノシステイン、タウリン、ギャバ、ドーパミン、ランチオニン、２－アミノイソ酪酸、デヒドロアラニン、オルニチンまたはシトルリンのＬまたはＤ異性体を意味し、これにはアルファ炭素とＳまたはＳｅとの間にC_3－C_{10}脂肪族側鎖をもつシステイン誘導体およびセレノシステイン誘導体が含まれる。１態様において、脂肪族側鎖はアルキレンである。他の態様において、脂肪族側鎖はアルケニレンまたはアルキニレンである。

【０１０５】

本明細書に記載する連続アミノ酸の区域のほか、適切なヌクレオチド変化をエンコーディングＤＮＡに導入することにより、および／または目的とする連続アミノ酸配列を合成することにより、そのバリアントを製造できることを考慮する。選択した合成法が発現である（たとえば化学合成ではなく）場合、アミノ酸の変更が本明細書に記載する連続アミノ酸の区域の翻訳後プロセスを変化させる可能性があることは当業者には認識されるであろう；たとえばグリコシレーション部位の個数もしくは位置の変更、または膜付着特性の変化。

【０１０６】

本明細書に記載する配列の変更は、たとえば保存的および非保存的変異のためのいずれかの技術および指針、たとえばＵ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．５，３６４，９３４に示されたも

のを用いて行なうことができる。変更は、目的とする連続アミノ酸配列をコードする１以上のコドンの置換、欠失または挿入であって、天然配列と比較してアミノ酸配列の変化をもたらすものであってもよい。場合により、変更は１以上のドメインにおいて少なくとも１個のアミノ酸を他のいずれかのアミノ酸で置換するものであってもよい。目的活性に有害な影響を与えることなく挿入、置換または欠失するアミノ酸残基を決定する際の指針は、その配列を既知の相同タンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域において行なうアミノ酸配列変化の個数を最小限に抑えることにより見いだすことができる。アミノ酸置換は、１つのアミノ酸を、類似の構造特性および／または化学的特性をもつ他のアミノ酸で置換した結果であってもよい；たとえば、ロイシンをセリンと交換、すなわち類似（保存的）アミノ酸置換。挿入または欠失は、場合により約１～５個のアミノ酸の範囲であってもよい。許容される変更は、系統的に配列中のアミノ酸の挿入、欠失または置換を行ない、得られたバリアントを全長または成熟天然配列が示す活性について試験することにより決定できる。末端の変更はいずれも本明細書に開示する概念の範囲内で行なわれると理解される。

【０１０７】

結合パートナーのアミノ酸配列バリアントは多様な目的を考慮して製造でき、これにはリガンドに対する結合パートナーのアフィニティーの増大、結合パートナーの安定性、精製および製造の促進、それの血漿半減期の改変、療法効果の改善、ならびに結合パートナーを療法に使用する際の副作用の重症度および発生率の低下が含まれる。

【０１０８】

本明細書においては、挿入、置換または欠失バリアントを含めたこれらの配列のアミノ酸配列バリアントも考慮される。それらのバリアントは、通常はターゲット結合モノマーをコードするＤＮＡ中のヌクレオチドを部位特異的変異誘発し、これによりバリアントをコードするＤＮＡを得た後、そのＤＮＡを組換え細胞培養で発現させることにより製造できる。最高で約１００～１５０個のアミノ酸残基をもつフラグメントは、インビトロ合成で好都合に製造することもできる。そのようなアミノ酸配列バリアントは予め定めたバリアントであり、自然界ではみられない。バリアントは、必ずしも量的に同一値ではないが非バリアント型の質的生物活性（ターゲット結合性を含む）を示す。アミノ酸配列変更を導入する部位は予め定められるが、変異自体は必ずしも予め定められている必要はない。たとえば、特定部位における変異の性能を最適化するために、ランダムまたは飽和変異誘発（この場合は可能な残基２０個すべてを導入する）をターゲットコドンにおいて実施し、発現したバリアントをスクリーニングして最適組合わせの目的活性を求める。そのようなスクリーニングは当業者が容易になしうる範囲のものである。

【０１０９】

アミノ酸の挿入は、通常はアミノ酸残基１～１０個の水準であろう；置換は、一般に単一残基に導入される；欠失は約１～３０残基の範囲であろう。欠失または挿入は、好ましくは隣接対において行なわれる；すなわち、２個の残基の欠失または２個の残基の挿入。置換、欠失、挿入またはそのいずれかの組合わせを導入または組み合わせて最終構築体が得られることは、以下の考察から十分に明らかになるであろう。

【０１１０】

１観点において、本発明は、本発明の明細書、図面、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．または配列表に開示するアミノ酸配列に対して、少なくとも８０％の配列同一性、好ましくは少なくとも８１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも８２％の配列同一性、よりさらに好ましくは少なくとも８３％の配列同一性、よりさらに好ましくは少なくとも８４％の配列同一性、よりさらに好ましくは少なくとも８５％の配列同一性、よりさらに好ましくは少なくとも８６％の配列同一性、よりさらに好ましくは少なくとも８７％の配列同一性、よりさらに好ましくは少なくとも８８％の配列同一性、よりさらに好ましくは少なくとも８９％の配列同一性、よりさらに好ましくは少なくとも９０％の配列同一性、よりさらに好ましくは少なくとも９１％の配列同一性、よりさらに好ましくは少なくとも９２％の配列同一性、よりさらに好ましくは少なくとも９３％の配列同一性、よりさらに好ましくは少

なくとも９４％の配列同一性、よりさらに好ましくは少なくとも９５％の配列同一性、よりさらに好ましくは少なくとも９６％の配列同一性、よりさらに好ましくは少なくとも９７％の配列同一性、よりさらに好ましくは少なくとも９８％の配列同一性、よりさらに好ましくは少なくとも９９％の配列同一をもつ連続アミノ酸の区域を含む化合物に関する。

【０１１１】

アミノ酸配列同一性％値は、たとえばＷＵ－ＢＬＡＳＴ－２コンピュータープログラム(Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996))を用いて容易に求めることができる。

【０１１２】

天然配列のフラグメントを本明細書に示す。それらのフラグメントは、全長天然タンパク質と比較した場合にＮ－末端またはＣ－末端がトランケートしていてもよく、あるいは内部残基が欠如していてもよい。この場合も、末端変更はいずれも本明細書に開示する発明の範囲内で行なわれると理解される。特定のフラグメントは、その配列の目的とする生物活性に必須ではないアミノ酸残基を欠如する。

【０１１３】

多数の一般的な方法をいずれも使用できる。目的とするペプチドフラグメントまたは連続アミノ酸の区域のフラグメントを化学的に合成することができる。他の方法は、酵素消化により、たとえばタンパク質を特定のアミノ酸残基が規定する部位において開裂させる酵素でタンパク質を処理し、または適切な制限酵素でＤＮＡを消化し、目的フラグメントを単離することにより、フラグメントを調製することを伴う。さらに他の適切な方法は、目的とするポリペプチド／配列フラグメントをコードするＤＮＡフラグメントを単離し、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により増幅することを伴う。ＤＮＡフラグメントの目的末端を規定するオリゴヌクレオチドをＰＣＲの５’および３’プライマーに使用する。

【０１１４】

特定の態様において、目的とする同類置換は好ましい置換という項目の下に表１に示される。そのような置換により生物活性の変化を生じさせる場合、表１に例示置換と表示した、または後記にアミノ酸クラスに関して記載する、より実質的な変化を導入し、生成物をスクリーニングする。

【０１１５】

【表１】

表１

元	例示	好ましい
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

【０１１６】

配列の機能または免疫学的同一性の実質的な改変は、下記に対するそれらの作用が有意に異なる置換を選択することにより達成される（ａ）置換領域におけるポリペプチド主鎖の構造、たとえばシートまたはらせんコンホメーションの維持、（ｂ）ターゲット部位における分子の電荷もしくは疎水性の維持、または（ｃ）側鎖の嵩の維持。自然界に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいてグループ分けすることができる：

（１）疎水性：ノルロイシン、ｍｅｔ、ａｌａ、ｖａｌ、ｌｅｕ、ｉｌｅ；

（２）中性親水性：ｃｙｓ、ｓｅｒ、ｔｈｒ；

（３）酸性：ａｓｐ、ｇｌｕ；

（４）塩基性：ａｓｎ、ｇｌｎ、ｈｉｓ、ｌｙｓ、ａｒｇ；

（５）鎖の配向に影響を及ぼす残基：ｇｌｙ、ｐｒｏ；

（６）芳香族：ｔｒｐ、ｔｙｒ、ｐｈｅ。

【０１１７】

非同類置換は、これらのクラスのうちのひとつのメンバーで他のクラスを交換することを伴うであろう。それらの置換残基を同類置換部位に、またはより好ましくは残りの（非同類）部位に導入することもできる。

【０１１８】

これらの変異は当技術分野で既知の方法、たとえばオリゴヌクレオチド仲介（部位特異的）変異誘発、アラニンスキャン、およびＰＣＲ変異誘発を用いて行なうことができる。

部位特異的変異誘発(Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987))、カセット変異誘発(Wells et al., Gene, 34:315 (1985))、制限選択変異誘発(Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986))、または他の既知の技術をクローン化ＤＮＡについて実施して、バリアントＤＮＡを製造することができる。

【０１１９】

スキャンニングアミノ酸分析は、連続アミノ酸配列に沿って１以上のアミノ酸を同定するためにも採用できる。好ましいスキャンニングアミノ酸には、比較的小さい中性アミノ酸が含まれる。そのようなアミノ酸には、アラニン、グリシン、セリンおよびシステインが含まれる。このグループのうちアラニンが一般に好ましいスキャンニングアミノ酸である；アラニンでは側鎖がベーター炭素より遠ざかっており、バリアントの主鎖コンホメーションを変化させる可能性がより低いからである(Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085 (1989))。アラニンは最も一般的なアミノ酸であるという理由からも好ましい。さらに、それは埋め込まれた位置および露出した位置の両方にしばしばみられる(Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976))。アラニン置換によって適切な量のバリアントが得られない場合、アイソテリック（ｉｓｏｔｅｒｉｃ）アミノ酸を使用できる。

【０１２０】

共有結合修飾：連続アミノ酸の区域を共有結合修飾することができる。１タイプの共有結合修飾には、標的アミノ酸残基を、選択した側鎖または－ｘ－ｘ－結合に関与しないＮ－もしくはＣ－末端残基と反応しうる有機誘導体化剤と反応させることが含まれる。目的とする抗体のアンチ配列を精製する方法およびその逆の方法に使用するために水不溶性支持体マトリックスまたは表面に架橋させるには、二官能性試薬による誘導体化が有用である。一般に用いられる架橋剤には、たとえば下記のものが含まれる：１，１－ビス（ジアゾアセチル）－２－フェニルエタン、グルタルアルデヒド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、たとえば４－アジドサリチル酸とのエステル、ホモ二官能性イミドエステル：ジスクシンイミジルエステル、たとえば３，３’－ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）を含む；二官能性マレイミド、たとえばビス－Ｎ－マレイミド－１，８－オクタン、およびメチル－３－（（ｐ－アジドフェニル）ジチオ）プロピオイミデートのような剤。

【０１２１】

他の修飾には下記のものが含まれる：グルタミニルおよびアスパラギニル残基からそれぞれ対応するグルタミルおよびアスパルチル残基へのアミド分解、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリルまたはトレオニル残基のヒドロキシ基のリン酸化、リジン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖のアルファ－アミノ基のメチル化(T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co.,サンフランシスコ, pp. 79-86 (1983))、Ｎ－末端アミンのアセチル化、ならびにいずれかのＣ－末端カルボキシル基のアミド化。

【０１２２】

他のタイプの共有結合修飾は、連続アミノ酸の区域またはポリペプチドの天然グリコシレーションパターンの変更を含む。“天然グリコシレーションパターンの変更”は、本発明の目的について、アミノ酸配列中にみられる１以上の炭水化物部分を欠失させること（基礎となるグリコシレーション部位を除去することによるか、あるいは化学的手段および／または酵素手段でグリコシレーションを欠失させることによる）、および／または天然配列中に存在しない１以上のグリコシレーション部位を付加することを意味するものとする。さらにこの句は、天然タンパク質のグリコシレーションにおける質的変化であって、存在する種々の炭水化物部分の性質および割合の変化を伴うものを含む。

【０１２３】

アミノ酸配列へのグリコシレーション部位の付加は、アミノ酸配列を変更することにより達成できる。この変更は、たとえば天然配列への１個以上のセリンまたはトレオニン残

基の付加、またはそれらによる置換によって行なうことができる（Ｏ－連結グリコシレーション部位について）。アミノ酸配列は、場合によりＤＮＡレベルでの変化により、特にそのアミノ酸配列をコードするＤＮＡを予め選択した塩基において変異させて、これにより目的アミノ酸に翻訳されるであろうコドンを形成することにより変更できる。

【０１２４】

アミノ酸配列上の炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、化学的に、または酵素によりグリコシドをポリペプチドに結合させるものである。そのような方法は当技術分野で記載されている；たとえばＷＯ　８７／０５３３０、１９８７年９月１１日公開、およびAplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)。

【０１２５】

アミノ酸配列上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的に、もしくは酵素により、またはグリコシレーションの標的となるアミノ酸残基をコードするコドンの変異置換により達成できる。化学的デグリコシレーション技術は当技術分野で既知であり、たとえばHakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)、およびEdge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981)に記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素開裂は、種々のエンド－およびエキソ－グリコシダーゼを用いて達成できる；Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987)に記載。

【０１２６】

他のタイプの共有結合修飾は、アミノ酸配列を下記のものに連結させることを含む：種々の非タンパク質ポリマーのひとつ、たとえばポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリプロピレングリコールもしくはポリオキシアルキレンに、たとえばＵ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏｓ．４，６４０，８３５；４，４９６，６８９；４，３０１，１４４；４，６７０，４１７；４，７９１，１９２もしくは４，１７９，３３７に示された方法で；またはタグポリペプチドに連結させ、これによりアンチタグ抗体がこれに選択的に結合しうるエピトープを得る。種々のタグポリペプチドおよびそれらの各抗体は当技術分野で周知である。例には下記のものが含まれる：ポリヒスチジン（ポリ－ｈｉｓ）またはポリ－ヒスチジン－グリシン（ポリ－ｈｉｓ－ｇｌｙ）タグ；ｆｌｕ　ＨＡタグポリペプチドおよびその抗体１２ＣＡ５(Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988))；ｃ－ｍｙｃタグならびにそれに対する８Ｆ９、３Ｃ７、６Ｅ１０、Ｇ４、Ｂ７および９Ｅ１０抗体(Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)；ならびに単純ヘルペスウイルスグリコプロテインＤ（ｇＤ）タグおよびそれの抗体(Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990))。他のタグポリペプチドには、Ｆｌａｇ－ペプチド(Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988))；ＫＴ３エピトープペプチド(Martin et al., Science, 255:192-194 (1992));アルファ-チューブリンエピトープペプチド(Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991))；ならびにＴ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ(Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990))が含まれる。

【０１２７】

塩類

本明細書に開示する化合物の塩類は本発明の範囲に含まれる。本明細書中で用いる“塩類”は、本発明化合物の酸塩または塩基塩を調製することにより修飾した本発明化合物の塩である。

【０１２８】

医薬

前記の塩類は医薬的に許容できる。医薬的に許容できる塩類の例には、塩基性残基、たとえばアミンの鉱酸塩または有機酸塩；酸性残基、たとえばカルボン酸残基のアルカリ塩または有機塩が含まれるが、これらに限定されない。これらの塩類は、有機酸または無機酸を用いて調製できる。そのような酸性塩は、クロリド、ブロミド、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、スルホン酸塩、ギ酸塩、酒石酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、クエン酸塩、安息香酸塩、サリチル酸塩、アスコルビン酸塩などである。カルボン酸塩は、アルカリ土類

金属塩、ナトリウム塩、カリウム塩またはリチウム塩である。

【０１２９】

本明細書に開示する医薬的に許容できる塩類は、いずれか好都合な方法で、たとえば対応する遊離塩基または遊離酸の溶液または懸濁液を１化学当量の医薬的に許容できる酸または塩基で処理することにより調製できる。好都合な濃縮法または結晶化法を用いて塩類を単離できる。適切な酸の具体例は、酢酸、乳酸、コハク酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、グルコン酸、アスコルビン酸、安息香酸、ケイ皮酸、フマル酸、硫酸、リン酸、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、スルファミン酸、スルホン酸、たとえばメタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸および関連の酸である。具体的な塩基は、ナトリウム、カリウムおよびカルシウムである。

【０１３０】

用語“医薬的に許容できるキャリヤー”は、賦形剤、キャリヤーまたは希釈剤を含むと理解される。用いられる特定のキャリヤー、希釈剤または賦形剤は、有効成分を適用する手段および目的に依存するであろう。

【０１３１】

本発明化合物は単独で、または１種類以上の医薬的に許容できるキャリヤーと組み合わせて、１回量または多数回量で投与できる。適切な医薬的に許容できるキャリヤーには、不活性固体希釈剤または充填剤、無菌の水性溶液および種々の有機溶剤が含まれる。本明細書に開示する医薬組成物は、種々の剤形、たとえば注射用液剤、錠剤、散剤、トローチ剤、シロップ剤などで容易に投与できる。これらの医薬組成物は、所望により他の成分、たとえば着香剤、結合剤、賦形剤などを含有することができる。さらに、滑沢剤、たとえばステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルクを錠剤製造のために使用できる。同様なタイプの固体組成物を、充填済み軟および硬ゼラチンカプセル剤中の充填剤として使用することもできる。これに好ましい物質には、乳糖（ｌａｃｔｏｓｅまたはｍｉｌｋ　ｓｕｇａｒ）および高分子量ポリエチレングリコールが含まれる。経口投与のために水性懸濁液剤またはエリキシル剤が望ましい場合、それに含まれる必須有効成分を種々の甘味剤または着香剤、着色剤または色素、および所望により乳化剤または懸濁化剤、ならびに希釈剤、たとえば水、エタノール、プロピレングリコールおよびその組合わせと組み合わせることができる。

【０１３２】

非経口投与のためには、本発明化合物またはその医薬的に許容できる塩を無菌水溶液中に含有する液剤を使用できる。それらの水性液剤は必要に応じて適切に緩衝化すべきであり、液体希釈剤は十分な生理食塩水またはグルコースでまず等張にすべきである。これらの特定の水性液剤は、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に特に適切である。用いる無菌媒質はすべて、当業者に既知の標準法によって容易に入手できる。

【０１３３】

最終的な医薬組成物を単位剤形に加工し（たとえばバイアル中の散剤もしくは凍結乾燥製剤、バイアル中の液剤、錠剤、カプセル剤またはサッシェ）、次いで販売のために包装することができる。加工工程は個々の単位剤形に応じて異なるであろう。たとえば、錠剤は通常は加圧下で圧縮して目的形状にされ、カプセル剤またはサッシェには単純な充填操作を用いる。種々の単位剤形を製造するために用いられる手法は当業者には自明である。

【０１３４】

本発明組成物は多様な形態をとることができる。これらには、たとえば液体、半固体および固体剤形、たとえば液剤（たとえば注射用および注入用液剤）、分散液剤または懸濁液剤、錠剤、丸剤、散剤、リポソームおよび坐剤が含まれる。好ましい形態は意図する投与様式および療法用途に依存する。ある組成物は注射用または注入用液剤の形態である。ある投与様式は非経口（たとえば静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。ある態様においては、本発明化合物を静脈内注入または注射により投与する。他の態様においては、本発明化合物を筋肉内または皮下注射により投与する。

【０１３５】

本発明において意図する療法用組成物は、一般に無菌でありかつ製造および貯蔵の条件下で安定でなければならない。本発明組成物は、高い薬物濃度に適切な液剤、マイクロエマルション、分散液剤、リポソーム、または他の特注構造として配合することができる。無菌の注射用液剤は、必要量の本発明化合物を、必要に応じて１種類または組み合わせた成分と共に、適切な溶剤に含有させ、続いて濾過滅菌することにより調製できる。一般に分散液剤は、基本的な分散媒質および前記に挙げたもののうち必要な他の成分を含有する無菌ビヒクルに有効化合物を取り込ませることにより調製される。無菌注射液剤を調製するための無菌散剤の場合、好ましい調製法は真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより有効成分といずれかの希望する追加成分を合わせた散剤が、予め無菌濾過したその溶液から得られる。液剤の適正な流動性は、たとえばレシチンなどのコーティングの採用により、分散液剤の場合は必要な粒径の維持により、および界面活性剤の使用により、維持することができる。注射用組成物の持続的な吸収は、吸収を遅延させる物質、たとえばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物に含有させることによってもたらすことができる。

【０１３６】

ある態様において、有効化合物は化合物が急速に放出されるのを防ぐキャリヤーと共に調製することができる；たとえば埋込み剤、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達系を含む、制御放出配合物。生分解性、生体適合性ポリマー、たとえばエチレンビニルアセテート、ポリアンヒドリド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸を使用できる。それらの配合物を調製するための多数の方法が特許査定されており、または当業者に一般的に知られている。たとえばSustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク, 1978を参照。特定の態様において、本発明化合物は、たとえば不活性希釈剤または同化しうる食用キャリヤーと共に経口投与することができる。本発明化合物（および、所望により他の成分）を硬殻もしくは軟殻ゼラチンカプセルに内包するか、圧縮して錠剤にするか、または対象の食事に直接取り込ませることもできる。経口療法投与のためには、本発明化合物を賦形剤と共に含有させ、摂取可能な錠剤、口腔錠、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁液剤、シロップ剤、カシェ剤などの形で使用できる。本発明化合物を非経口投与以外で投与する場合、化合物の不活性化を阻止する物質で化合物をコーティングし、またはそれと共に投与することができる。

【０１３７】

補助有効成分、たとえば化学療法薬、抗新生物薬または抗腫瘍薬を組成物に取り込ませることもできる。さらに、本発明化合物を１種類以上の追加の療法薬と共配合および／または共投与することができる。これらの薬剤には、限定ではないが、他のターゲットに結合する抗体（たとえば１種類以上の増殖因子またはサイトカイン、それらの細胞表面受容体に結合する抗体）、結合タンパク質、抗新生物薬、化学療法薬、抗腫瘍薬、アンチセンスオリゴヌクレオチド、増殖因子が含まれる。１態様において、本明細書に開示する化合物の医薬組成物は１種類以上の追加療法薬を含むことができる。

【０１３８】

療法用として、本明細書に開示する組成物を多様な様式で投与でき、これには可溶性形態のボーラス注射、連続注入、埋込み剤からの持続放出、経口摂取、局所注射（たとえば心臓内、筋肉内）、全身注射、または医薬技術分野で周知の他の適切な方法によるものが含まれる。医薬投与のための他の方法には経口、皮下、経皮、静脈内、筋肉内および非経口投与法が含まれるが、これらに限定されない。典型的には、可溶性組成物は精製した化合物を生理的に許容できるキャリヤー、賦形剤または希釈剤と共に含むであろう。それらのキャリヤーは、使用する用量および濃度でレシピエントに対して無毒性であろう。それらの組成物の調製は、化合物と、緩衝剤、酸化防止剤、炭水化物（グルコース、ショ糖またはデキストリンを含む）、キレート化剤、たとえばＥＤＴＡ、グルタチオン、ならびに他の安定剤および賦形剤との混和を伴うことができる。中性緩衝化生理食塩水または同種血清アルブミンと混合した生理食塩水は、適切な希釈剤の例である。適切な賦形剤溶液（たとえばショ糖）を希釈剤として用いて、製品を凍結乾燥品として配合することができる

。

【０１３９】

他の誘導体は、非タンパク質ポリマーに共有結合した本発明化合物／組成物を含む。ポリマーへの結合は、通常は、化合物の好ましい生物活性、たとえば化合物がターゲットに結合する活性を妨げないように行なわれる。非タンパク質ポリマーは普通は親水性合成ポリマー、すなわち合成しなければ自然界にみられないポリマーである。しかし、自然界に存在し、組換えまたはインビトロ法で製造されるポリマーも、自然界から単離したポリマーと同様に有用である。親水性ポリビニルポリマー、たとえばポリビニルアルコールおよびポリビニルピロリドンが本発明の範囲に含まれる。特に有用なものは以下のものである：ポリアルキレンエーテル、たとえばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチレンエステルまたはメトキシポリエチレングリコール；ポリオキシアルキレン、たとえばポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン、およびポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンのブロックコポリマー（プルロニック（Ｐｌｕｒｏｎｉｃ））；ポリメタクリレート；カルボマー（ｃａｒｂｏｍｅｒ）；下記を含む分枝または非分枝多糖類：糖モノマーであるＤ－マンノース、Ｄ－およびＬ－ガラクトース、フコース、フルクトース、Ｄ－キシロース、Ｌ－アラビノース、Ｄ－グルクロン酸、シアル酸、Ｄ－ガラクツロン酸、Ｄ－マンヌロン酸（たとえばポリマンヌロン酸またはアルギン酸）、Ｄ－グルコサミン、Ｄ－ガラクトサミン、Ｄ－グルコースならびにノイラミン酸：ホモ多糖類およびヘテロ多糖類、たとえば乳糖、アミロペクチン、デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、アミロース、デキストラン硫酸、デキストラン、デキストリン、グリコーゲン、または酸性ムコ多糖類の多糖サブユニット、たとえばヒアルロン酸を含む；糖アルコールのポリマー、たとえばポリソルビトールおよびポリマンニトール；ならびにヘパリンまたはヘパロン。

【０１４０】

本発明の医薬組成物は、“治療有効量”または“予防有効量”の本発明化合物を含有することができる。“治療有効量”は、必要な用量または期間で目的とする治療結果を達成するのに有効な量を表わす。本発明化合物の治療有効量は、個体の疾病状態、年齢、性別および体重などの要因に従って異なる可能性がある。治療有効量は、その治療上有益な効果の方が化合物の毒性または有害作用を上回る量でもある。“予防有効量”は、必要な用量または期間で目的とする予防結果を達成するのに有効な量を表わす。典型的には、予防量は疾病の前または初期段階の対象に用いられるので、予防有効量は治療有効量より少ないであろう。

【０１４１】

医薬組成物の例

限定ではないが、そのような組成物および用量の例を以下に示す：

ベバシズマブ（ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）（たとえばＡｖａｓｔｉｎ）の配列をもつ連続アミノ酸を含む連続アミノ酸の区域を含む化合物を含有する組成物は、トレハロース２水和物、リン酸ナトリウム（一塩基性、１水和物）、リン酸ナトリウム（二塩基性、無水物）、ポリソルベート２０（ｐｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ　２０）、およびＵＳＰ注射用水を含有することができる。この組成物を凍結乾燥することもでき、これに再構成のために水を添加することができる。ある態様において、組成物は６．２または約６．２のｐＨをもつ。１態様においては、本発明化合物を化学療法薬、たとえば静脈内５－フルオロウラシルと組み合わせて、結腸または直腸の転移性癌を伴う患者の処置のために投与することができる。１態様においては、本発明化合物を０．１～１０ｍｇ／ｋｇの用量で１４日毎に１回、静脈内注入として投与する。他の態様において、用量は５ｍｇ／ｋｇであり、１４日毎に１回投与される。ある態様において、用量は１．０～２．０ｍｇ／ｋｇであり、１４日毎に１回投与される。ある態様において、用量は０．０１～１．５ｍｇ／ｋｇであり、１４日毎に１回投与される。ある態様において、用量は０．００１～１０ｍｇ／ｋｇであり、１～２１日毎に１回投与される。

【０１４２】

トラスツヅマブ（ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ）（たとえばＨｅｒｃｅｐｔｉｎ）の配列をもつ連続アミノ酸を含む連続アミノ酸の区域を含む化合物を含有する組成物は、トレハロース２水和物、塩酸Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－ヒスチジンおよびポリソルベート２０、ＵＳＰを含有することができる。これは、保存剤として１．１％のベンジルアルコールまたはその均等物を含有する静菌注射用水（Ｂａｃｔｅｒｉｏｓｔａｔｉｃ Ｗａｔｅｒ ｆｏｒ Ｉｎｊｅｃｔｉｏｎ）（ＢＷＦＩ）ＵＳＰまたはその均等物を用いて再構成することができる。ある態様において、組成物は約６．０のｐＨをもつ。この組成物を凍結乾燥することもでき、これに再構成のために水を添加することができる。１態様においては、転移性乳癌を伴う対象であってその腫瘍がＨＥＲ２タンパク質を過剰発現している対象に、本発明化合物を投与することができる。ある態様において、対象は化学療法を受けた／受けている。他の態様においては、本発明化合物をパクリタキセル（ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ）と組み合わせて、転移性乳癌を伴う対象であってその腫瘍がＨＥＲ２タンパク質を過剰発現しておりかつそれらの転移性疾患に対する化学療法を受けていない対象に投与する。１態様においては、本発明化合物を０．１～１０ｍｇ／ｋｇの初回量で連続４５～１２０分間注入の静脈注入により投与する。他の態様においては、本発明化合物を４ｍｇ／ｋｇの用量で９０分間の注入により投与する。ある態様においては、１週間の維持量を対象に２ｍｇ／ｋｇの用量で３０分間の注入により投与する。ある態様においては、０．５～１．５ｍｇ／ｋｇの用量で９０分間の注入により投与する。ある態様においては、１週間の維持量を対象に０．５～１．０ｍｇ／ｋｇの用量で３０分間の注入により投与する。ある態様においては、本発明化合物を０．０４～０．５ｍｇ／ｋｇの用量で９０分間の注入により投与する。ある態様においては、本発明化合物を０．００１～１０ｍｇ／ｋｇの用量で９０分間の注入により投与する。

【０１４３】

リツキシマブ（ｒｉｔｕｘｉｍａｂ）（たとえばＲｉｔｕｘｉｎ）の配列をもつ連続アミノ酸を含む連続アミノ酸の区域を含む化合物を含有する組成物は、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム２水和物、ポリソルベート８０、および注射用水（ＵＳＰ）またはその均等物を含有することができる。ある態様においては、組成物のｐＨを６．５に調整する。この組成物を凍結乾燥することもでき、これに再構成のために水を添加することができる。１態様においては、本発明化合物を再発性または難治性、軽度または濾胞性、ＣＤ２０陽性、Ｂ細胞性非ホジキンリンパ腫の処置のために対象に投与する。１態様においては、本発明化合物を２５０～５００ｍｇ／ｍ２の用量で週１回、４または８用量、静脈内注入投与する。他の態様においては、本発明化合物を３７５ｍｇ／ｍ２の用量で週１回、４または８用量、静脈内注入投与する。１態様においては、本発明化合物を１５０～２５０ｍｇ／ｍ２の用量で週１回、４または８用量、静脈内注入投与する。１態様においては、本発明化合物を１．５～５ｍｇ／ｍ２の用量で週１回、４または８用量、静脈内注入投与する。１態様においては、本発明化合物を１．０～５００ｍｇ／ｍ２の用量で週１回、４または８用量、静脈内注入投与する。

【０１４４】

エファリズマブ（ｅｆａｌｉｚｕｍａｂ）（たとえばＲａｐｔｉｖａ）の配列をもつ連続アミノ酸を含む連続アミノ酸の区域を含む化合物を含有する組成物は、ショ糖、塩酸Ｌ－ヒスチジン１水和物、Ｌ－ヒスチジンおよびポリソルベート２０を含有することができる。そのような組成物を無菌の非ＵＳＰ水もしくは無菌注射用水ＵＳＰまたはその均等物で希釈して適切な剤形にすることができる。この組成物を凍結乾燥することもでき、これに再構成のために水を添加することができる。１態様においては、本発明化合物を慢性の中等度ないし重篤な斑状乾癬の処置のために対象に投与する。そのような対象は全身療法または光線療法の候補であってもよい。ある態様においては、本発明化合物を０．１～１．１ｍｇ／ｋｇ皮下（ＳＣ）コンディショニング量で１回投与し、続いて０．８～１．５ｍｇ／ｋｇ（最大１回量は合計２５０ｍｇを超えない）を週１回、皮下投与する。他の態様においては、本発明化合物を０．７ｍｇ／ｋｇ皮下コンディショニング量で１回投与し、続いて１ｍｇ／ｋｇ（最大１回量は合計２００ｍｇを超えない）を週１回、皮下投与す

る。ある態様においては、本発明化合物を０．００１～１．０ｍｇ／ｋｇ皮下コンディショニング量で１回投与し、続いて０．００８～０．０１５ｍｇ／ｋｇを週１回、皮下投与する。

【０１４５】

オマリズマブ（ｏｍａｌｉｚｕｍａｂ）（たとえばＸｏｌａｉｒ）の配列をもつ連続アミノ酸を含む連続アミノ酸の区域を含む化合物を含有する組成物は、ショ糖、塩酸Ｌ－ヒスチジン１水和物、Ｌ－ヒスチジンおよびポリソルベート２０を含有することができる。そのような組成物を凍結乾燥することができる。ある態様においては、この組成物を無菌注射用水ＵＳＰまたはその均等物で希釈して適切な剤形にする。１態様においては、本発明化合物を中等度ないし重篤な持続性喘息の処置のために対象に投与する。他の態様においては、本発明化合物を、多年草空中アレルゲンに対して陽性皮膚検査またはインビトロ反応性を示す対象、および喘息増悪の発生率を低下させるための吸入コルチコステロイドによって適切に症状制御されない対象に投与する。ある態様においては、本発明化合物を１００～４００ｍｇの用量で２または４週毎に皮下投与する。ある態様においては、本発明化合物を１５０～３７５ｍｇの用量で２または４週毎に皮下投与する。ある態様においては、本発明化合物を２５～１５０ｍｇの用量で２または４週毎に皮下投与する。ある態様においては、本発明化合物を１～４ｍｇの用量で２または４週毎に皮下投与する。

【０１４６】

エタネルセプト（ｅｔａｎｅｒｃｅｐｔ）（たとえばＥｎｂｒｅｌ）の配列をもつ連続アミノ酸を含む連続アミノ酸の区域を含む化合物を含有する組成物は、マンニトール、ショ糖およびトロメタミンを含有することができる。ある態様において、組成物は凍結乾燥品の形態である。ある態様においては、この組成物をたとえば無菌の静菌注射用水（ＢＷＦＩ）ＵＳＰ（０．９％ベンジルアルコールを含有）またはその均等物で再構成することができる。ある態様においては、本発明化合物を、中等度ないし重篤な活動性リウマチ性関節炎を伴う対象における徴候および症状の軽減、主臨床応答の誘導、構造損傷の進行抑制、ならびに身体機能の改善のために対象に投与する。本発明化合物をメトトレキセート（ｍｅｔｈｏｔｒｅｘａｔｅ）（ＭＴＸ）と組み合わせて、または単独で初回投与することができる。ある態様においては、本発明化合物を、１種類以上のＤＭＡＲＤに対して適切な応答が得られない対象における中等度ないし重篤な活動性多関節型若年性リウマチ性関節炎の徴候および症状を軽減するために対象に投与する。ある態様においては、本発明化合物を、乾癬性関節炎を伴う対象における徴候および症状の軽減、活動性関節炎の構造損傷の進行抑制、ならびに身体機能の改善のために対象に投与する。ある態様においては、本発明化合物を、強直性脊椎炎を伴う対象における徴候および症状の軽減のために対象に投与する。ある態様においては、本発明化合物を、慢性の中等度ないし重篤な斑状乾癬の処置のために対象に投与する。対象がリウマチ性関節炎、乾癬性関節炎または強直性脊椎炎を伴う態様においては、本発明化合物を２５～７５ｍｇ／週で、１回以上の皮下（ＳＣ）注射として投与する。他の態様においては、本発明化合物を５０ｍｇ／週で、１回の皮下注射として投与する。対象が斑状乾癬を伴う態様においては、本発明化合物を２５～７５ｍｇで週２回または４日間空けて３カ月間投与し、続いて２５～７５ｍｇ／週の維持量に減らす。他の態様においては、本発明化合物を５０ｍｇの用量で週２回または４日間空けて３カ月間投与し、続いて５０ｍｇ／週の維持量に減らす。ある態様において、用量は上記用量より２～１００倍少ない。対象が活動性多関節型若年性リウマチ性関節炎を伴う態様においては、本発明化合物を０．２～１．２ｍｇ／ｋｇ／週の用量（最大７５ｍｇ／週まで）で投与することができる。他の態様においては、本発明化合物を０．８ｍｇ／ｋｇ／週の用量（最大５０ｍｇ／週まで）で投与する。ある態様において、用量は上記用量より２～１００倍少ない。

【０１４７】

インフリキシマブ（ｉｎｆｌｉｘｉｍａｂ）（たとえばＲｅｍｉｃａｄｅ）の配列をもつ連続アミノ酸を含む連続アミノ酸の区域を含む化合物を含有する組成物は、ショ糖、ポリソルベート８０、一塩基性リン酸ナトリウム１水和物、および二塩基性リン酸ナトリウ

ム２水和物を含有することができる。保存剤は１態様においては存在しない。ある態様において、組成物は凍結乾燥品の形態である。ある態様においては、この組成物をたとえば注射用水（ＢＷＦＩ）ＵＳＰで再構成する。ある態様において、組成物のｐＨは７．２または約７．２である。１態様においては、本発明化合物を、リウマチ性関節炎を伴う対象に、２～４ｍｇ／ｋｇの用量で静脈内注入として投与し、続いて同様な追加量を第１回注入の２および６週後、次いでその後８週毎に投与する。他の態様においては、本発明化合物を、３ｍｇ／ｋｇの用量で静脈内注入として投与し、続いて同様な追加量を第１回注入の２および６週後、次いでその後８週毎に投与する。さらなる態様においては、用量を最大１０ｍｇ／ｋｇに調整し、または４週毎の頻度で処置する。ある態様においては、本発明化合物をメトトレキセートと組み合わせて投与する。１態様においては、本発明化合物を、クローン病または瘻孔形成クローン病を伴う対象に、中等度ないし重篤な活動性クローン病または瘻孔形成疾患の処置のために、２～７ｍｇ／ｋｇの用量で誘導レジメンとして０、２および６週目に投与し、続いてその後８週毎に４～６ｍｇ／ｋｇの維持レジメンを施す。さらなる態様においては、本発明化合物を、中等度ないし重篤な活動性クローン病または瘻孔形成疾患の処置のために、５ｍｇ／ｋｇの用量で誘導レジメンとして０、２および６週目に投与し、続いてその後８週毎に５ｍｇ／ｋｇの維持レジメンを施す。ある態様においては、用量を最大１０ｍｇ／ｋｇに調整する。１態様においては、本発明化合物を、強直性脊椎炎を伴う対象に、２～７ｍｇ／ｋｇの用量で静脈内注入として投与し、続いて第１回注入の２および６週後、次いでその後６週毎に、同様な追加量を投与する。他の態様においては、本発明化合物を、５ｍｇ／ｋｇの用量で静脈内注入として投与し、続いて第１回注入の２および６週後、次いでその後６週毎に、同様な追加量を投与する。１態様においては、本発明化合物を、乾癬性関節炎を伴う対象に、２～７ｍｇ／ｋｇの用量で静脈内注入として投与し、続いて第１回注入の２および６週後、次いでその後８週毎に、同様な追加量を投与する。さらなる態様においては、本発明化合物を、５ｍｇ／ｋｇの用量で静脈内注入として投与し、続いて第１回注入の２および６週後、次いでその後８週毎に、同様な追加量を投与する。ある態様においては、本発明化合物をメトトレキセートと共に投与する。１態様においては、本発明化合物を、潰瘍性大腸炎を伴う対象に中等度ないし重篤な活動性潰瘍性大腸炎の処置のために、２～７ｍｇ／ｋｇの用量で誘導レジメンとして０、２および６週目に投与し、続いてその後８週毎に２～７ｍｇ／ｋｇの維持レジメンを施す。他の態様においては、本発明化合物を、潰瘍性大腸炎を伴う対象に、５ｍｇ／ｋｇの用量で誘導レジメンとして０、２および６週目に投与し、続いてその後８週毎に５ｍｇ／ｋｇの維持レジメンを施す。ある態様において、個々の疾患の処置につき用量は上記用量より２～１００倍少ない。

【０１４８】

セツキシマブ（ｃｅｔｕｘｉｍａｂ）（たとえばＥｒｂｉｔｕｘ）の配列をもつ連続アミノ酸を含む連続アミノ酸の区域を含む化合物を含有する組成物は、塩化ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム７水和物、一塩基性リン酸ナトリウム１水和物を含有し、保存剤を含有しない組成物を含むことができる。ある態様において、組成物は凍結乾燥品の形態である。ある態様においては、この組成物をたとえば注射用水ＵＳＰで再構成する。ある態様において、組成物のｐＨは約７．０～約７．４の範囲である。１態様においては、本発明化合物を、ＥＧＦＲ発現性の転移性結腸直腸癌の処置のために対象に投与する。他の態様においては、本発明化合物を、イリノテカン（ｉｒｉｎｏｔｅｃａｎ）ベースの化学療法に対して治療抵抗性である患者の処置のためにイリノテカンと併用する。ある態様においては、本発明化合物を、３００～５００ｍｇ／ｍ２の用量で１２０分間の静脈内注入（最大注入速度５ｍＬ／分）で投与する初回負荷量（初回注入）として投与する。さらなる態様においては、本発明化合物を、４００ｍｇ／ｍ２の用量で１２０分間の静脈内注入（最大注入速度５ｍＬ／分）で投与する初回負荷量（初回注入）として投与する。ある態様において、週間維持量（他のすべての注入）は２００～３００ｍｇ／ｍ２であり、６０分間かけて注入される（最大注入速度５ｍＬ／分）。ある態様において、週間維持量（他のすべての注入）は２５０ｍｇ／ｍ２であり、６０分間かけて注入される（最大注入速度

５ｍＬ／分）。ある態様において、個々の疾患の処置につき用量は上記用量より２～１００倍少ない。

【０１４９】

アブシキシマブ（ａｂｃｉｘｉｍａｂ）（たとえばＲｅｃｏｐｒｏ）の配列をもつ連続アミノ酸を含む連続アミノ酸の区域を含む化合物を含有する組成物は、リン酸ナトリウム、塩化ナトリウムおよびポリソルベート８０を含有し、保存剤を含有しない組成物を含むことができる。ある態様において、組成物は凍結乾燥品の形態である。ある態様においては、この組成物をたとえば注射用水ＵＳＰで希釈または再構成する。ある態様において、組成物のｐＨは７．２または約７．２である。ある態様においては、本発明化合物を経皮冠状動脈介入（ＰＣＩ）に対する補助として用いる。そのような用途においては、本発明組成物を０．１５～０．３５ｍｇ／ｋｇの静脈内ボーラスとしてＰＣＩ開始の１０～６０分前に投与することができる。他の態様において、用量は０．２ｍｇ／ｋｇである。ある態様においては、ボーラス投与に続いて０．１～０．１５ｇ／ｋｇ／分を最高１２時間、静脈内連続注入する。他の態様において、用量は０．１２５ｇ／ｋｇ／分で最高１２時間である。１態様においては、本発明組成物を、不安定狭心症に罹患している対象に経皮冠状動脈介入（ＰＣＩ）に対する補助として用いる。そのような用途の１態様においては、本発明組成物を０．１～０．４ｍｇ／ｋｇの静脈内ボーラスとしてＰＣＩ開始前に投与し、続いて５～１５ｇ／分を最高２４時間、静脈内連続注入し、ＰＣＩ後１時間で終了する。他の態様においては、本発明組成物を０．２５ｍｇ／ｋｇの静脈内ボーラスとしてＰＣＩ開始前に投与し、続いて１０ｇ／分を最高２４時間、静脈内連続注入し、ＰＣＩ後１時間で終了する。ある態様において、個々の疾患の処置につき用量は上記用量より２～１００倍少ない。

【０１５０】

本明細書に記載する組成物の各態様において、凍結乾燥品の形態である場合、組成物をたとえば無菌水溶液、無菌水、無菌注射用水（ＵＳＰ）、無菌の静菌注射用水（ＵＳＰ）、および当業者に既知であるその均等物で再構成することができる。

【０１５１】

本発明化合物のいずれかを投与する際、化合物を単独で、キャリヤー中において、医薬組成物の一部として、またはいずれか適切なビヒクル中において、投与することができると理解される。

【０１５２】

用量

本明細書中に用量範囲、たとえば１～１０ｍｇ／ｋｇ／週と記載した場合、本発明は上限～下限のそれぞれの整数、およびその１０分の１をも含むと理解される。したがって、上記のに挙げた例の場合、本発明は１．０、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、・・・・ｍｇ／ｋｇ、最大１０ｍｇ／ｋｇまでを意図する。

【０１５３】

各態様において、本発明化合物は１回量として投与でき、あるいは多数回量として投与できる。

一般に、前記の方法により障害または状態を処置するための１日量は、通常は約０．０１から約１０．０ｍｇ／ｋｇ（処置される対象の体重）までの範囲である。

【０１５４】

通常の技術をもつ医師が、処置される者の体重、年齢および状態、疾患の重症度、ならびに選択した特定の投与経路など既知の事項を考慮して、前記用量範囲に基づく変更を行なうことができる。

【０１５５】

本明細書に開示する化合物が、付随する予後との相互関係で、必要な有効量に影響を及ぼすことも予想される。

キット

本発明の他の観点は、本明細書に開示する化合物およびこれらの化合物を含む医薬組成物を含むキットを提供する。キットは、本発明の化合物または医薬組成物のほかに、診断薬または療法薬を含むことができる。キットは、診断法または療法に使用するための指示も含むことができる。診断態様において、キットは本発明の化合物または医薬組成物および診断薬を含む。療法態様において、キットは抗体またはその医薬組成物、および１種類以上の療法薬、たとえば追加の抗新生物薬、抗腫瘍薬または化学療法薬を含む。

【０１５６】

対象

ある態様において、対象はヒトである。ある態様において、対象は１８歳以上である。他の態様において、対象は１８歳未満である。

【０１５７】

本明細書に開示する種々の要素の組合わせはすべて本発明の範囲に含まれる。

本発明は以下の実験の詳細を参照することによってより良く理解されるであろう。ただし、詳述した具体例は特許請求の範囲にさらに十分に記載した本発明の説明にすぎないことは当業者に自明であろう。

【０１５８】

シンメトロアドヘシン

本明細書には、遺伝子デバイスであって、連続アミノ酸の機能性区域が新規な様式で連結したものを含むデバイスを記載する。現在まで、タンパク質を遺伝子工学的に操作して、それらが新たな固定された構造またはコンホメーションをとることにより新たな機能が作り出されてきた。遺伝子工学的に作製されたそのようなこれまでのタンパク質と対照的に、本明細書に開示する遺伝子デバイスは２以上の識別可能なタンパク質ドメインを含み、それらが新規な化学結合により、それらのドメイン間での相対的な運動が可能な様式で連結している。タンパク質ドメイン間の相対的な運動によりこの遺伝子デバイスの可動部分が構成され、これによりそれらは有用な作業を行なうことができる。この作業のための入力エネルギーは、これらのタンパク質ドメイン自体に固有の運動および回転エネルギー、ならびにこれらのタンパク質ドメインと溶剤分子の間の機械的相互作用のエネルギーなどにより供給される。

【０１５９】

ここには、遺伝子デバイスの特定クラスである“シンメトロアドヘシン”について開示する。シンメトロアドヘシンは化学結合した２以上のアドヘシン（独立してフォールディングするポリペプチド結合ドメインまたは連続アミノ酸の区域）を含む。これらの化学結合したアドヘシンは互いに相対的に動くことができ、その結果、二量体リガンド、三量体リガンド、四量体リガンドなどを結合するのに有用な２以上の対称的に配向した結合ドメインを形成し、アフィニティーが大幅に増大する。シンメトロアドヘシン－Ｆｃハイブリッドタンパク質は、特に有用な遺伝子デバイスの態様である。

【０１６０】

療法用タンパク質の有効性における対称性の重要さは、大部分のタンパク質疾患ターゲット自体がそのような高次対称構造を示すという事実による。たとえば疾患ターゲットが２つのタンパク質からなる場合、それは二量体であると言われ、それが３つのタンパク質からなる場合、それは三量体であるなどと言われる。タンパク質療法薬がタンパク質疾患ターゲットに一度に１つの基準で（ｏｎｅ－ａｔ－ａ－ｔｉｍｅ　ｂａｓｉｓ）結合するにすぎない場合、その結合の強度は一般にナノモル濃度範囲（ｎａｎｏ－ｍｏｌａｒ　ｒａｎｇｅ）の水準である。今日の療法タンパク質に一般的なこの通常レベルの結合では、タンパク質疾患ターゲットに対比して著しくかつ無駄に過剰な療法タンパク質を身体に大量供給することが必要になる（１００万対１の基準）。

【０１６１】

各シンメトロアドヘシンは、タンパク質をより対称的にすることによってより有用な療法薬にする簡単な一連の規則を用いて工学的に作製される。タンパク質疾患ターゲットに一度に２つの基準で（ｔｗｏ－ａｔ－ａ－ｔｉｍｅ　ｂａｓｉｓ）結合するように設計さ

れたシンメトロアドヘシンについては、結合強度はナノHナノモル範囲（ｎａｎｏ　Ｈｎａｎｏ－ｍｏｌａｒ　ｒａｎｇｅ）の水準であろう。協同結合によりそのような異例のレベルの結合が可能になる。この異例のレベルの結合では、タンパク質疾患ターゲットに対比してはるかに少ない療法タンパク質を投与する必要があるにすぎない（１対１の基準）。

【０１６２】

ペプチド結合化学

すべてのタンパク質は１以上のペプチド鎖、すなわち連続アミノ酸の区域からなり、それぞれがその前のアミノ酸にペプチド結合により連結している。アミド結合に起きる単結合形態（－Ｃ－Ｎ－）と二重結合形態（－Ｃ＝Ｎ－）の間の共鳴のため、ペプチド結合は有意程度の二重結合性をもつ（－Ｃ＝Ｎ－$Ｃ_{\alpha}$－Ｃ＝Ｎ－）。その結果、タンパク質中のペプチド結合はほぼ平面である。隣接するＮ－$Ｃ_{\alpha}$と$Ｃ_{\alpha}$－Ｃ結合は比較的自由に回転するが、ペプチド結合の剛性により、フォールディングしたポリペプチド鎖の自由度はそれが単一の静的物体のような挙動を示す点まで低下する。

【０１６３】

１に示すペプチド結合をもつＮ個の連続アミノ酸の第１区域およびＰ個の連続アミノ酸の第２区域、$ＡＡ_{1}$－［］－$ＡＡ_{n}$および$ＡＡ_{1}$－［］－$ＡＡ_{p}$について考える：

【０１６４】

【化１２】

$$C_{\alpha(1)}\text{-C=N-[]-C=N-}C_{\alpha(N)} \quad \& \quad C_{\alpha(1)}\text{-C=N-[]-C=N-}C_{\alpha(P)} \qquad 1$$

【０１６５】

連続アミノ酸の第１区域がそのＮ－末端において新たなペプチド結合により連続アミノ酸の第２区域のＣ－末端に連結すると、２に示すペプチド結合をもつキメラポリペプチド$ＡＡ_{1}$－［］－$ＡＡ_{n}$－$ＡＡ_{n+1}$－［］－$ＡＡ_{n+p}$が形成されるであろう：

【０１６６】

【化１３】

$$C_{\alpha(1)}\text{-C=N-[]-C=N-}C_{\alpha(N)}\text{-C=N-}C_{\alpha(N+1)}\text{-C=N-[]-C=N-}C_{\alpha(N+P)} \qquad 2$$

【０１６７】

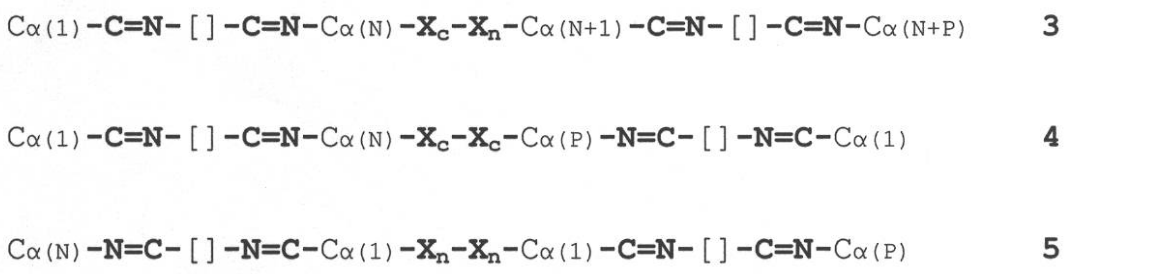
このキメラポリペプチドは、それの前駆体と同様に連続アミノ酸の単一区域であり、そのそれぞれが同様にがその前のアミノ酸にペプチド結合により連結している。したがって、フォールディングしたキメラポリペプチド鎖も通常は単一の静的物体のように挙動するであろう。

【０１６８】

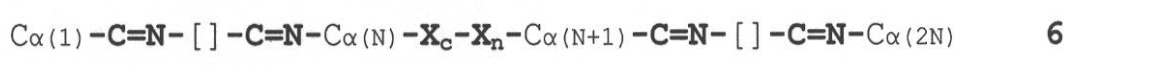
本発明は、本明細書中で遺伝子デバイスと呼ぶ新規なタンパク質様の分子を提供する；これは機械的デバイスと同様に動的物体であり、相対的な動きが可能な様式で相互に連結した２以上の可動部分をもつ。遺伝子デバイスにおけるそれぞれの部分、またはドメインは、連続アミノ酸の区域であり、それぞれの相互連結はそれぞれの連続アミノ酸の区域の予め定めた末端を連結する非ペプチド結合により行なわれる。好ましくは、遺伝子デバイス中のドメインは結合ドメインである。それらの相互連結のトポロジーにより、３、４および５に示す３つの異なるタイプの遺伝子デバイスが区別される：

【０１６９】

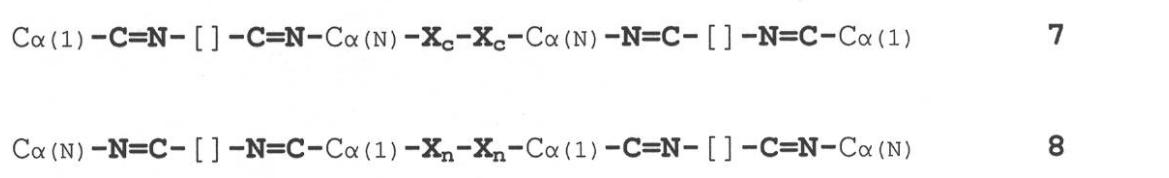
【化１４】



【０１７０】
異なる末端において連結した２つの同一結合ドメインを備えた遺伝子デバイス（６）は非対称的なコンフィギュレーションをもつ：
【０１７１】
【化１５】



【０１７２】
同一末端において連結した２つの同一結合ドメインを備えた遺伝子デバイス（７および８）は点対称性を備えたコンフィギュレーションをもつ：
【０１７３】
【化１６】



【０１７４】
７および８に示す遺伝子デバイスを、本明細書中でヘミ－シンメトロアドヘシンと呼ぶ。ヘミ－シンメトロアドヘシンは点対称性を備えたコンフィギュレーションをもつが、それらはそれらの両方の結合ドメインを独立して回転させることはできず、したがってそれらは通常は対称的ターゲット中の１より多い結合部位に結合することはできない。
【０１７５】
本発明は、対称的ターゲット中の２以上の結合部位に対称的に（すなわち協同的に）結合できるタンパク質様の分子をも提供する。対称的ターゲットを対称的に結合できる遺伝子デバイスを、本明細書中でシンメトロアドヘシンと呼ぶ。過大サイズではあるが対称的な物体（たとえば医療用体操ボール）を片手ではなく両手で掴むことができる人体のように、シンメトロアドヘシンが対称的ターゲットを結合する能力は通常はタンパク質よりはるかに大きい。
【０１７６】
シンメトロアドヘシンサブタイプ
限定ではないが、表２～１１に種々のシンメトロアドヘシンの多様な態様を示す。たとえばＣＤ４－シンメトロアドヘシンを記載した表２の最上列に、ＣＤ４ヘミ－シンメトロアドヘシンのコンフィギュレーションを示す；すなわち、Ｃ－末端側Ｘ－末端を備えたＣＤ４ドメイン、たとえば連続アミノ酸の区域［Ｃ－末端システインまたはセレノシステイン残基をもつＣＤ４ドメイン］が、非ペプチド結合（たとえばシステイン－システインジスルフィド結合またはセレノシステイン－セレノシステインジセレニド結合）により、連続アミノ酸の第２区域［Ｃ－末端システインまたはセレノシステイン残基をもつＣＤ４ド

メイン］に非ペプチド結合により結合したものを、一般的に［ＣＤ４－Ｘｃ－Ｘｃ－ＣＤ４］と記載する。ＣＤ４ヘミ－シンメトロアドヘシンとＦｃヘミ－シンメトロアドヘシンの二量体がイムノ－シンメトロアドヘシンを形成したものを、表２の第２列に示す；たとえば［ＣＤ４－Ｘｃ－Ｓｎ－Ｆｃ］$_2$と記載。各表において、ＸｃはＣ－末端側Ｘ－末端、ＸｎはＮ－末端側Ｘ－末端、ＳｎはＮ－末端システイン残基を表わす。

【０１７７】

【表２】

表２

CD4シンメトロアドヘシン

クラス	シンメトロアドヘシンのコンフィギュレーション	連続アミノ酸の区域
ヘミ-	[CD4-X_c-X_c-CD4]	CD4-X_c
イムノ	[CD4-X_c-S_n-Fc]$_2$	CD4-X_c + S_n-Fc
イムノ	[CD4-X_c-X_n-Fc]$_2$	CD4-X_c + X_n-Fc
イムノ	[Fc-X_c-X_c-CD4]$_2$	CD4-X_c + Fc-X_c
ビ-	[CD4-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-CD4]$_2$	CD4-X_c + S_n-Fc-X_c
ビ-	[CD4-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-CD4]$_2$	CD4-X_c + X_n-Fc-X_c

【０１７８】

【表３】

表3

TNRヘミ-シンメトロアドヘシン

連続アミノ酸の区域	#	シンメトロアドヘシンのコンフィギュレーション
TNR_1-X_c	1	$[TNR_1-X_c-X_c-TNR_1]$
TNR_2-X_c	1	$[TNR_2-X_c-X_c-TNR_2]$
$TNR_{fab}-X_c$	1	$[TNR_{fab}-X_c-X_c-TNR_{fab}]$
$TNR_1-X_c + TNR_2-X_c$	3	$[(TNR_{1/2})-X_c-X_c-(TNR_{1/2})]$
$TNR_1-X_c + TNR_{fab}-X_c$	3	$[(TNR_{1/fab})-X_c-X_c-(TNR_{1/fab})]$
$TNR_2-X_c + TNR_{fab}-X_c$	3	$[(TNR_{2/fab})-X_c-X_c-(TNR_{2/fab})]$
$TNR_1-X_c + TNR_2-X_c + TNR_{fab}-X_c$	6	$[(TNR_{1/2/fab})-X_c-X_c-(TNR_{1/2/fab})]$

【０１７９】

【表４－１】

表4

TNRイムノシンメトロアドヘシン

連続アミノ酸の区域	#	シンメトロアドヘシンのコンフィギュレーション
TNR_1-X_c + S_n-Fc	1	$[TNR_1-X_c-S_n-Fc]_2$
TNR_1-X_c + X_n-Fc	1	$[TNR_1-X_c-X_n-Fc]_2$
TNR_1-X_c + Fc-X_c	1	$[Fc-X_c-X_c-TNR_1]_2$
TNR_2-X_c + S_n-Fc	1	$[TNR_2-X_c-S_n-Fc]_2$
TNR_2-X_c + X_n-Fc	1	$[TNR_2-X_c-X_n-Fc]_2$
TNR_2-X_c + Fc-X_c	1	$[Fc-X_c-X_c-TNR_2]_2$
TNR_{Fab}-X_c + S_n-Fc	1	$[TNR_{Fab}-X_c-S_n-Fc]_2$
TNR_{Fab}-X_c + X_n-Fc	1	$[TNR_{Fab}-X_c-X_n-Fc]_2$
TNR_{Fab}-X_c + Fc-X_c	1	$[Fc-X_c-X_c-TNR_{Fab}]_2$

【０１８０】

【表４－２】

表４（続）

TNRイムノシンメトロアドヘシン

連続アミノ酸の区域	#	シンメトロアドヘシンのコンフィギュレーション
$TNR_1-X_c + TNR_2-X_c + S_n-Fc$	3	$[(TNR_{1/2})-X_c-S_n-Fc]_2$
$TNR_1-X_c + TNR_2-X_c + X_n-Fc$	3	$[(TNR_{1/2})-X_c-X_n-Fc]_2$
$TNR_1-X_c + TNR_2-X_c + Fc-X_c$	3	$[Fc-X_c-X_c-(TNR_{1/2})]_2$
$TNR_1-X_c + TNR_{Fab}-X_c + S_n-Fc$	3	$[(TNR_{1/Fab})-X_c-S_n-Fc]_2$
$TNR_1-X_c + TNR_{Fab}-X_c + X_n-Fc$	3	$[(TNR_{1/Fab})-X_c-X_n-Fc]_2$
$TNR_1-X_c + TNR_{Fab}-X_c + Fc-X_c$	3	$[Fc-X_c-X_c-(TNR_{1/Fab})]_2$
$TNR_2-X_c + TNR_{Fab}-X_c + S_n-Fc$	3	$[(TNR_{2/Fab})-X_c-S_n-Fc]_2$
$TNR_2-X_c + TNR_{Fab}-X_c + X_n-Fc$	3	$[(TNR_{2/Fab})-X_c-X_n-Fc]_2$
$TNR_2-X_c + TNR_{Fab}-X_c + Fc-X_c$	3	$[Fc-X_c-X_c-(TNR_{2/Fab})]_2$
$TNR_1-X_c + TNR_2-X_c + TNR_{Fab}-X_c + S_n-Fc$	6	$[(TNR_{1/2/Fab})-X_c-S_n-Fc]_2$
$TNR_1-X_c + TNR_2-X_c + TNR_{Fab}-X_c + X_n-Fc$	6	$[(TNR_{1/2/Fab})-X_c-X_n-Fc]_2$
$TNR_1-X_c + TNR_2-X_c + TNR_{Fab}-X_c + Fc-X_c$	6	$[Fc-X_c-X_c-(TNR_{1/2/Fab})]_2$

【０１８１】

表５
TNR ビ-シンメトロアドヘシン

【０１８２】

連続アミノ酸の区域	#	シンメトロアドヘシンのコンフィギュレーション
TNR_1-X_c + S_n-Fc-X_c	1	[TNR_1-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-TNR_1]$_2$
TNR_1-X_c + X_n-Fc-X_c	1	[TNR_1-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-TNR_1]$_2$
TNR_2-X_c + S_n-Fc-X_c	1	[TNR_2-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-TNR_2]$_2$
TNR_2-X_c + X_n-Fc-X_c	1	[TNR_2-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-TNR_2]$_2$
TNR_{Fab}-X_c + S_n-Fc-X_c	1	[TNR_{Fab}-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-TNR_{Fab}]$_2$
TNR_{Fab}-X_c + X_n-Fc-X_c	1	[TNR_{Fab}-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-TNR_{Fab}]$_2$
TNR_1-X_c + TNR_2-X_c + S_n-Fc-X_c	12	[($TNR_{1/2}$)-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-($TNR_{1/2}$)]$_2$
TNR_1-X_c + TNR_2-X_c + X_n-Fc-X_c	12	[($TNR_{1/2}$)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-($TNR_{1/2}$)]$_2$
TNR_1-X_c + TNR_{Fab}-X_c + S_n-Fc-X_c	12	[($TNR_{1/Fab}$)-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-($TNR_{1/Fab}$)]$_2$
TNR_1-X_c + TNR_{Fab}-X_c + X_n-Fc-X_c	12	[($TNR_{1/Fab}$)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-($TNR_{1/Fab}$)]$_2$
TNR_2-X_c + TNR_{Fab}-X_c + S_n-Fc-X_c	12	[($TNR_{2/Fab}$)-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-($TNR_{2/Fab}$)]$_2$
TNR_2-X_c + TNR_{Fab}-X_c + X_n-Fc-X_c	12	[($TNR_{2/Fab}$)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-($TNR_{2/Fab}$)]$_2$
TNR_1-X_c + TNR_2-X_c + TNR_{Fab}-X_c + S_n-Fc-X_c	63	[($TNR_{1/2/Fab}$)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-($TNR_{1/2/Fab}$)]$_2$
TNR_1-X_c + TNR_2-X_c + TNR_{Fab}-X_c + S_n-Fc-X_c	63	[($TNR_{1/2/Fab}$)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-($TNR_{1/2/Fab}$)]$_2$

【表６】

表6

VGFRヘミ-シンメトロアドヘシン

連続アミノ酸の区域	#	シンメトロアドヘシンのコンフィギュレーション
$VGFR_1-X_c$	1	$[VGFR_1-X_c-X_c-VGFR_1]$
$VGFR_2-X_c$	1	$[VGFR_2-X_c-X_c-VGFR_2]$
$VGFR_3-X_c$	1	$[VGFR_3-X_c-X_c-VGFR_3]$
$VGFR_1-X_c$ + $VGFR_2-X_c$	3	$[(VGFR_{1/2})-X_c-X_c-(VGFR_{1/2})]$
$VGFR_1-X_c$ + $VGFR_3-X_c$	3	$[(VGFR_{1/3})-X_c-X_c-(VGFR_{1/3})]$
$VGFR_2-X_c$ + $VGFR_3-X_c$	3	$[(VGFR_{2/3})-X_c-X_c-(VGFR_{2/3})]$
$VGFR_1-X_c$ + $VGFR_2-X_c$ + $VGFR_3-X_c$	6	$[(VGFR_{1/2/3})-X_c-X_c-(VGFR_{1/2/3})]$

【０１８３】

【表７－１】

表7

VGFRイムノシンメトロアドヘシン

連続アミノ酸の区域	#	シンメトロアドヘシンのコンフィギュレーション
$VGFR_1$-X_c + S_n-Fc	1	[$VGFR_1$-X_c-S_n-Fc]$_2$
$VGFR_1$-X_c + X_n-Fc	1	[$VGFR_1$-X_c-X_n-Fc]$_2$
$VGFR_1$-X_c + Fc-X_c	1	[Fc-X_c-X_c-$VGFR_1$]$_2$
$VGFR_2$-X_c + S_n-Fc	1	[$VGFR_2$-X_c-S_n-Fc]$_2$
$VGFR_2$-X_c + X_n-Fc	1	[$VGFR_2$-X_c-X_n-Fc]$_2$
$VGFR_2$-X_c + Fc-X_c	1	[Fc-X_c-X_c-$VGFR_2$]$_2$
$VGFR_3$-X_c + S_n-Fc	1	[$VGFR_3$-X_c-S_n-Fc]$_2$
$VGFR_3$-X_c + X_n-Fc	1	[$VGFR_3$-X_c-X_n-Fc]$_2$
$VGFR_3$-X_c + Fc-X_c	1	[Fc-X_c-$VGFR_3$]$_2$

【０１８４】

【表７－２】

表７（続）

VGFRイムノシンメトロアドヘシン

連続アミノ酸の区域	#	シンメトロアドヘシンのコンフィギュレーション
$VGFR_1$-X_c + $VGFR_2$-X_c + S_n-Fc	3	[($VGFR_{1/2}$)-X_c-S_n-Fc]$_2$
$VGFR_1$-X_c + $VGFR_2$-X_c + X_n-Fc	3	[($VGFR_{1/2}$)-X_c-X_n-Fc]$_2$
$VGFR_1$-X_c + $VGFR_2$-X_c + Fc-X_c	3	[Fc-X_c-X_c-($VGFR_{1/2}$)]$_2$
$VGFR_1$-X_c + $VGFR_3$-X_c + S_n-Fc	3	[($VGFR_{1/3}$)-X_c-S_n-Fc]$_2$
$VGFR_1$-X_c + $VGFR_3$-X_c + X_n-Fc	3	[($VGFR_{1/3}$)-X_c-X_n-Fc]$_2$
$VGFR_1$-X_c + $VGFR_3$-X_c + Fc-X_c	3	[Fc-X_c-X_c-($VGFR_{1/3}$)]$_2$
$VGFR_2$-X_c + $VGFR_3$-X_c + S_n-Fc	3	[($VGFR_{2/3}$)-X_c-S_n-Fc]$_2$
$VGFR_2$-X_c + $VGFR_3$-X_c + X_n-Fc	3	[($VGFR_{2/3}$)-X_c-X_n-Fc]$_2$
$VGFR_2$-X_c + $VGFR_3$-X_c + Fc-X_c	3	[Fc-X_c-X_c-($VGFR_{2/3}$)]$_2$
$VGFR_1$-X_c + $VGFR_2$-X_c + $VGFR_3$-X_c + S_n-Fc	6	[($VGFR_{1/2/3}$)-X_c-S_n-Fc]$_2$
$VGFR_1$-X_c + $VGFR_2$-X_c + $VGFR_3$-X_c + X_n-Fc	6	[($VGFR_{1/2/3}$)-X_c-X_n-Fc]$_2$
$VGFR_1$-X_c + $VGFR_2$-X_c + $VGFR_3$-X_c + Fc-X_c	6	[Fc-X_c-X_c-($VGFR_{1/2/3}$)]$_2$

【０１８５】

【表８】

表8

VGFR ビ-シンメトロアドヘシン

連続アミノ酸の区域	#	シンメトロアドヘシンのコンフィギュレーション
$VGFR_1$-X_c + S_n-Fc-X_c	1	[$VGFR_1$-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-$VGFR_1$]$_2$
$VGFR_1$-X_c + X_n-Fc-X_c	1	[$VGFR_1$-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-$VGFR_1$]$_2$
$VGFR_2$-X_c + S_n-Fc-X_c	1	[$VGFR_2$-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-$VGFR_2$]$_2$
$VGFR_2$-X_c + X_n-Fc-X_c	1	[$VGFR_2$-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-$VGFR_2$]$_2$
$VGFR_3$-X_c + S_n-Fc-X_c	1	[$VGFR_3$-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-$VGFR_3$]$_2$
$VGFR_3$-X_c + X_n-Fc-X_c	1	[$VGFR_3$-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-$VGFR_3$]$_2$
$VGFR_1$-X_c + $VGFR_2$-X_c + S_n-Fc-X_c	12	[($VGFR_{1/2}$)-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-($VGFR_{1/2}$)]$_2$
$VGFR_1$-X_c + $VGFR_2$-X_c + X_n-Fc-X_c	12	[($VGFR_{1/2}$)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-($VGFR_{1/2}$)]$_2$
$VGFR_1$-X_c + $VGFR_3$-X_c + S_n-Fc-X_c	12	[($VGFR_{1/3}$)-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-($VGFR_{1/3}$)]$_2$
$VGFR_1$-X_c + $VGFR_3$-X_c + X_n-Fc-X_c	12	[($VGFR_{1/3}$)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-($VGFR_{1/3}$)]$_2$
$VGFR_2$-X_c + $VGFR_3$-X_c + S_n-Fc-X_c	12	[($VGFR_{2/3}$)-X_c-S_n-Fc-X_c-X_c-($VGFR_{2/3}$)]$_2$
$VGFR_2$-X_c + $VGFR_3$-X_c + X_n-Fc-X_c	12	[($VGFR_{2/3}$)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-($VGFR_{2/3}$)]$_2$
$VGFR_1$-X_c + $VGFR_2$-X_c + $VGFR_3$-X_c + S_n-Fc-X_c	63	[($VGFR_{1/2/3}$)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-($VGFR_{1/2/3}$)]$_2$
$VGFR_1$-X_c + $VGFR_2$-X_c + $VGFR_3$-X_c + S_n-Fc-X_c	63	[($VGFR_{1/2/3}$)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-($VGFR_{1/2/3}$)]$_2$

【０１８６】

【表９－１】

表9

ErbBヘミ-シンメトロアドヘシン

連続アミノ酸の区域	#	シンメトロアドヘシンのコンフィギュレーション
$ErbB_1$-X_c	1	[$ErbB_1$-X_c-X_c-$ErbB_1$]
$ErbB_2$-X_c	1	[$ErbB_2$-X_c-X_c-$ErbB_2$]
$ErbB_3$-X_c	1	[$ErbB_3$-X_c-X_c-$ErbB_3$]
$ErbB_4$-X_c	1	[$ErbB_4$-X_c-X_c-$ErbB_4$]
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_2$-X_c	3	[($ErbB_{1/2}$)-X_c-X_c-($ErbB_{1/2}$)]
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_3$-X_c	3	[($ErbB_{1/3}$)-X_c-X_c-($ErbB_{1/3}$)]
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_4$-X_c	3	[($ErbB_{1/4}$)-X_c-X_c-($ErbB_{1/4}$)]
$ErbB_2$-X_c + $ErbB_3$-X_c	3	[($ErbB_{2/3}$)-X_c-X_c-($ErbB_{2/3}$)]
$ErbB_2$-X_c + $ErbB_4$-X_c	3	[($ErbB_{2/4}$)-X_c-X_c-($ErbB_{2/4}$)]
$ErbB_3$-X_c + $ErbB_4$-X_c	3	[($ErbB_{3/4}$)-X_c-X_c-($ErbB_{3/4}$)]

【０１８７】

【表９－２】

表９（続）

ErbBヘミ-シンメトロアドヘシン

連続アミノ酸の区域	#	シンメトロアドヘシンのコンフイギュレーション
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_2$-X_c + $ErbB_3$-X_c	6	[($ErbB_{1/2/3}$)-X_c-X_c-($ErbB_{1/2/3}$)]
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_2$-X_c + $ErbB_4$-X_c	6	[($ErbB_{1/2/4}$)-X_c-X_c-($ErbB_{1/2/4}$)]
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_3$-X_c + $ErbB_4$-X_c	6	[($ErbB_{1/3/4}$)-X_c-X_c-($ErbB_{1/3/4}$)]
$ErbB_2$-X_c + $ErbB_3$-X_c + $ErbB_4$-X_c	6	[($ErbB_{2/3/4}$)-X_c-X_c-($ErbB_{2/3/4}$)]
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_2$-X_c + $ErbB_3$-X_c + $ErbB_4$-X_c	10	[($ErbB_{1/2/3/4}$)-X_c-X_c-($ErbB_{1/2/3/4}$)]

【０１８８】

【表１０－１】

表10

ErbBイムノシンメトロアドヘシン

連続アミノ酸の区域	#	シンメトロアドヘシンのコンフィギュレーション
$ErbB_1$-X_c + X_n-Fc	1	[$ErbB_1$-X_c-X_n-Fc]$_2$
$ErbB_1$-X_c + Fc-X_c	1	[Fc-X_c-X_c-$ErbB_1$]$_2$
$ErbB_2$-X_c + X_n-Fc	1	[$ErbB_2$-X_c-X_n-Fc]$_2$
$ErbB_2$-X_c + Fc-X_c	1	[Fc-X_c-X_c-$ErbB_2$]$_2$
$ErbB_3$-X_c + X_n-Fc	1	[$ErbB_3$-X_c-X_n-Fc]$_2$
$ErbB_3$-X_c + Fc-X_c	1	[Fc-X_c-X_c-$ErbB_3$]$_2$
$ErbB_4$-X_c + X_n-Fc	1	[$ErbB_4$-X_c-X_n-Fc]$_2$
$ErbB_4$-X_c + Fc-X_c	1	[Fc-X_c-X_c-$ErbB_4$]$_2$

【０１８９】

【表１０－２】

表 10 (続)

ErbBイムノシンメトロアドヘシン

連続アミノ酸の区域	#	シンメトロアドヘシンのコンフィギュレーション
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_2$-X_c + X_n-Fc	3	[($ErbB_{1/2}$)-X_c-X_n-Fc]$_2$
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_2$-X_c + Fc-X_c	3	[Fc-X_c-X_c-($ErbB_{1/2}$)]$_2$
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_3$-X_c + X_n-Fc	3	[($ErbB_{1/3}$)-X_c-X_n-Fc]$_2$
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_3$-X_c + Fc-X_c	3	[Fc-X_c-X_c-($ErbB_{1/3}$)]$_2$
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_4$-X_c + X_n-Fc	3	[($ErbB_{1/4}$)-X_c-X_n-Fc]$_2$
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_4$-X_c + Fc-X_c	3	[Fc-X_c-X_c-($ErbB_{1/4}$)]$_2$
$ErbB_2$-X_c + $ErbB_3$-X_c + X_n-Fc	3	[($ErbB_{2/3}$)-X_c-X_n-Fc]$_2$
$ErbB_2$-X_c + $ErbB_3$-X_c + Fc-X_c	3	[Fc-X_c-X_c-($ErbB_{2/3}$)]$_2$
$ErbB_2$-X_c + $ErbB_4$-X_c + X_n-Fc	3	[($ErbB_{2/4}$)-X_c-X_n-Fc]$_2$
$ErbB_2$-X_c + $ErbB_4$-X_c + Fc-X_c	3	[Fc-X_c-X_c-($ErbB_{2/4}$)]$_2$
$ErbB_3$-X_c + $ErbB_4$-X_c + X_n-Fc	3	[($ErbB_{3/4}$)-X_c-X_n-Fc]$_2$
$ErbB_3$-X_c + $ErbB_4$-X_c + Fc-X_c	3	[Fc-X_c-X_c-($ErbB_{3/4}$)]$_2$

【０１９０】

【表１０－３】

表 10 (続)

ErbBイムノシンメトロアドヘシン

連続アミノ酸の区域	#	シンメトロアドヘシンのコンフィギュレーション
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_2$-X_c + $ErbB_3$-X_c + X_n-Fc	6	[($ErbB_{1/2/3}$)-X_c-X_n-Fc]$_2$
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_2$-X_c + $ErbB_3$-X_c + Fc-X_c	6	[Fc-X_c-X_c-($ErbB_{1/2/3}$)]$_2$
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_2$-X_c + $ErbB_4$-X_c + X_n-Fc	6	[($ErbB_{1/2/4}$)-X_c-X_n-Fc]$_2$
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_2$-X_c + $ErbB_4$-X_c + Fc-X_c	6	[Fc-X_c-X_c-($ErbB_{1/2/4}$)]$_2$
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_3$-X_c + $ErbB_4$-X_c + X_n-Fc	6	[($ErbB_{1/3/4}$)-X_c-X_n-Fc]$_2$
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_3$-X_c + $ErbB_4$-X_c + Fc-X_c	6	[Fc-X_c-X_c-($ErbB_{1/3/4}$)]$_2$
$ErbB_2$-X_c + $ErbB_3$-X_c + $ErbB_4$-X_c + X_n-Fc	6	[($ErbB_{2/3/4}$)-X_c-X_n-Fc]$_2$
$ErbB_2$-X_c + $ErbB_3$-X_c + $ErbB_4$-X_c + Fc-X_c	6	[Fc-X_c-X_c-($ErbB_{2/3/4}$)]$_2$
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_2$-X_c + $ErbB_3$-X_c + $ErbB_4$-X_c + X_n-Fc	10	[($ErbB_{1/2/3/4}$)-X_c-X_n-Fc]$_2$
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_2$-X_c + $ErbB_3$-X_c + $ErbB_4$-X_c + Fc-X_c	10	[Fc-X_c-X_c-($ErbB_{1/2/3/4}$)]$_2$

【０１９１】

【表１１－１】

表11

ErbB ヒ-シンメトロアドヘシン

連続アミノ酸の区域	#	シンメトロアドヘシンのコンフィギュレーション
$ErbB_1-X_c + X_n-Fc-X_c$	1	$[ErbB_1-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-ErbB_1]_2$
$ErbB_2-X_c + X_n-Fc-X_c$	1	$[ErbB_2-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-ErbB_2]_2$
$ErbB_3-X_c + X_n-Fc-X_c$	1	$[ErbB_3-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-ErbB_3]_2$
$ErbB_4-X_c + X_n-Fc-X_c$	1	$[ErbB_4-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-ErbB_4]_2$
$ErbB_1-X_c + ErbB_2-X_c + X_n-Fc-X_c$	12	$[(ErbB_{1/2})-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-(ErbB_{1/2})]_2$
$ErbB_1-X_c + ErbB_3-X_c + X_n-Fc-X_c$	12	$[(ErbB_{1/3})-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-(ErbB_{1/3})]_2$
$ErbB_1-X_c + ErbB_4-X_c + X_n-Fc-X_c$	12	$[(ErbB_{1/4})-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-(ErbB_{1/4})]_2$
$ErbB_2-X_c + ErbB_3-X_c + X_n-Fc-X_c$	12	$[(ErbB_{2/3})-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-(ErbB_{2/3})]_2$
$ErbB_2-X_c + ErbB_4-X_c + X_n-Fc-X_c$	12	$[(ErbB_{2/4})-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-(ErbB_{2/4})]_2$
$ErbB_3-X_c + ErbB_4-X_c + X_n-Fc-X_c$	12	$[(ErbB_{3/4})-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-(ErbB_{3/4})]_2$

【０１９２】

【表１１－２】

表11（続）

ErbBヒ-シンメトロアドヘシン

連続アミノ酸の区域	#	シンメトロアドヘシンのコンフィギュレーション
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_2$-X_c + $ErbB_3$-X_c + X_n-Fc-X_c	63	[($ErbB_{1/2/3}$)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-($ErbB_{1/2/3}$)]2
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_2$-X_c + $ErbB_4$-X_c + X_n-Fc-X_c	63	[($ErbB_{1/2/4}$)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-($ErbB_{1/2/4}$)]2
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_3$-X_c + $ErbB_4$-X_c + X_n-Fc-X_c	63	[($ErbB_{1/3/4}$)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-($ErbB_{1/3/4}$)]2
$ErbB_2$-X_c + $ErbB_3$-X_c + $ErbB_4$-X_c + X_n-Fc-X_c	63	[($ErbB_{2/3/4}$)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-($ErbB_{2/3/4}$)]2
$ErbB_1$-X_c + $ErbB_2$-X_c + $ErbB_3$-X_c + $ErbB_4$-X_c + X_n-Fc-X_c		[($ErbB_{1/2/3/4}$)-X_c-X_n-Fc-X_c-X_c-($ErbB_{1/2/3/4}$)]2

【０１９３】

連続アミノ酸の区域

本明細書中で述べる連続アミノ酸の区域の例には、結合ドメインを含む連続アミノ酸、

たとえば分泌型または膜貫通タンパク質、細胞内結合ドメインおよび抗体（全体またはその一部）ならびにその修飾形が含まれるが、これらに限定されない。下記は限定ではない若干例である：

１）免疫グロブリン

免疫グロブリンは、鎖内ジスルフィド結合により互いに保持されたポリペプチド鎖を含む分子であり、その際、結合したアミノ酸のうち少なくとも１個は末端残基でなく、一般に２つの軽鎖および２つの重鎖をもつ。各鎖において、１つのドメイン（Ｖ）は分子の抗体特異性に応じた可変アミノ酸配列をもつ。他のドメイン（Ｃ）は、同一クラスの分子間に共通のかなり一定の配列をもつ。これらのドメインはアミノ末端から順に番号が付けられる。

【０１９４】

免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーは、免疫グロブリン様のドメインをもつ分子からなる。このファミリーのメンバーには下記のものが含まれる：クラスＩおよびＩＩ主要組織適合性抗原、免疫グロブリン、Ｔ細胞受容体アルファ、ベータ、ガンマおよびデルタ鎖、ＣＤ１、ＣＤ２、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２８、ＣＤ３のガンマ、デルタおよびイプシロン鎖、ＯＸ－２、Ｔｈｙ－１、細胞間または神経細胞接着分子（Ｉ－ＣＡＭまたはＮ－ＣＡＭ）、リンパ球機能関連抗原－３（ＬＦＡ－３）、神経細胞質タンパク質（ＮＣＰ－３）、ポリ－Ｉｇ受容体、ミエリン結合糖タンパク質（ＭＡＧ）、高アフィニティーＩｇＥ受容体、末梢ミエリンの主要糖タンパク質（Ｐｏ）、血小板由来増殖因子受容体、コロニー刺激因子－１受容体、マクロファージＦｃ受容体、Ｆｃガンマ受容体、ならびに癌胎児性抗原。

【０１９５】

ある免疫グロブリンの可変ドメイン（超可変部を含む）で他を置換し、またある種から他の種に置換できることは知られている。たとえばＥＰ　０　１７３　４９４；ＥＰ　０　１２５　０２３； Munro, Nature 312 (13 Dec. 1984); Neuberger et al., Nature 312: (13 Dec. 1984); Sharon et al., Nature 309 (May 24, 1984); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984); Morrison et al. Science 229:1202-1207 (1985); and Boulianne et al., Nature 312:643-646 (Dec. 13, 1984)を参照。

【０１９６】

Morrison et al., Science 229:1202-1207 (1985)は、ある種に由来する可変部を他の種に由来する免疫グロブリン定常部に融合させた免疫グロブリンキメラの調製を教示している。

【０１９７】

免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーの２つのメンバー－－ＣＤ４およびＴ細胞受容体－－に由来する免疫グロブリン可変部様のドメインで、免疫グロブリンの可変部を置換しうることも示されている；たとえばCapon et al., Nature 337:525-531, 1989, Traunecker et al., Nature 339:68-70, 1989, Gascoigne et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 84:2936-2940, 1987、および公開された欧州特許出願ＥＰＯ　０　３２５　２２４　Ａ２を参照。

【０１９８】

Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　５，１１６，９６４（Ｃａｐｏｎら、１９９２年５月２６日）（本明細書に援用する）には、一般にイムノアドヘシンと呼ばれるハイブリッド免疫グロブリンが記載されている；これは、たとえばリガンド結合パートナーの接着性およびターゲティング特性と免疫グロブリンのエフェクター機能を組み合わせたものである。Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ．５，３３６，６０３（Ｃａｐｏｎら、１９９４年８月９日）（本明細書に援用する）には、ヘテロ機能性イムノアドヘソンが記載されている；これは、ヒトＣＤ４抗原可変部（Ｖ）を含むポリペプチドをそれのＣ－末端において、免疫グロブリン鎖の定常部を含むポリペプチドのＮ－末端に融合させた融合タンパク質が、予め定めた抗原を結合しうる抗体の結合部位を保有するコンパニオン免疫グロブリン重鎖－軽鎖対にジスルフィド結合したものを含む。

【０１９９】
免疫グロブリンの“構成要素”には、無傷抗体の一部を含む抗体フラグメント、好ましくは無傷抗体の抗原結合領域または可変部が含まれる。抗体フラグメントの例には、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、およびＦｖフラグメント；ディアボディー（ｄｉａｂｏｄｉｅｓ）；直鎖状抗体(Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995));一本鎖抗体分子；ならびに抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体（ｍｕｌｔｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ）が含まれる。
【０２００】
抗体をパパイン消化すると、それぞれ１つの抗原結合部位をもつ“Ｆａｂ”フラグメントと呼ばれる２つの同一の抗原結合フラグメント、および“Ｆｃ”フラグメント（容易に結晶化しうることを反映した表記）が生成する。ペプシン処理ではＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントが得られ、これは２つの抗原結合部位をもち、なお抗原を架橋することができる。
【０２０１】
“Ｆｖ”は、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小抗体フラグメントである。この領域は、緊密に非共有会合した１つの重鎖可変ドメインと１つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。各可変ドメインの３つのＣＤＲが相互作用してV_H－V_L二量体の表面の抗原結合部位を規定するのは、このコンフィギュレーションにおいてである。６つのＣＤＲが合わせて抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、結合部位全体より低いアフィニティーではあるが、単一の可変ドメイン（すなわち抗原に特異的な３つのＣＤＲのみを含むＦｖの半分）が抗原を認識して結合する能力をもつ。
【０２０２】
Ｆａｂフラグメントは軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第１定常ドメイン（ＣＨ１）をも含む。Ｆａｂフラグメントは、重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端に、抗体ヒンジ部に由来する１個以上のシステインを含む数個の残基が付加されていることにより、Ｆａｂ’フラグメントと異なる。Ｆａｂ’－ＳＨは本明細書においてＦａｂ’に代わる表記であり、その際、定常ドメインのシステイン残基（１以上）は遊離チオール基を保有する。Ｆ（ａｂ’）$_2$抗体フラグメントは本来、それらの間にヒンジシステインをもつＦａｂ’フラグメントの対として生成したものである。抗体フラグメントの他の化学結合も知られている。
【０２０３】
いずれかの脊椎動物種に由来する抗体（免疫グロブリン）の“軽鎖”は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパおよびラムダと呼ばれる明らかに異なる２タイプのひとつに配属させることができる。
【０２０４】
免疫グロブリンは、それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて異なるクラスに配属させることができる。５つの主要なクラスの免疫グロブリン：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭがあり、これらのうち幾つかはさらにサブクラス（イソ型）、たとえばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡおよびＩｇＡ２に分類できる。
【０２０５】
“一本鎖Ｆｖ”または“ｓＦｖ”抗体フラグメントは抗体のV_HおよびV_Lドメインを含み、その際、これらのドメインは単一ポリペプチド鎖中に存在する。好ましくは、ＦｖポリペプチドはさらにV_HドメインとV_Lドメインの間にポリペプチドリンカーを含み、これによりｓＦｖは抗原結合のために望ましい構造を形成できる。ｓＦｖの概説については、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, ニューヨーク, pp. 269-315 (1994)を参照されたい。
【０２０６】
このように、免疫グロブリンおよび他の生物活性分子の種々の構成要素を結合させることにより、個々の構成要素の機能性を保持したハイブリッド分子を調製できる。
ある態様において、本明細書に記載する発明は、１以上の免疫グロブリン構成要素を含

む新規なハイブリッド分子を提供する。

【０２０７】

２）細胞外タンパク質

細胞外タンパク質は、特に多細胞生物の形成、分化および維持に重要な役割を果たす。関連する種々の細胞内タンパク質はＵ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ．６，７２３，５３５、Ａｓｈｋｅｎａｚｉら、２００４年４月２０日発行に示されており、これを本明細書に援用する。

【０２０８】

多くの個々の細胞の運命、たとえば増殖、移動、分化、または他の細胞との相互作用は、一般に他の細胞および／または近辺の環境から受ける情報により支配される。この情報はしばしば分泌ポリペプチド（たとえばマイトジェン因子、生存因子、細胞傷害性因子、分化因子、神経ペプチド、およびホルモン）により伝達され、これらは多様な細胞受容体または膜結合型タンパク質により受容および解釈される。これらの分泌ポリペプチドまたはシグナル伝達分子は、普通は細胞の分泌経路を通過して細胞外環境にあるそれらの作用部位に到達する。

【０２０９】

分泌タンパク質は、医薬、診断薬、バイオセンサーおよびバイオリアクターとしての用途を含めた、多様な産業用途をもつ。現在利用されている大部分のタンパク質薬物、たとえば血栓溶解薬、インターフェロン、インターロイキン、エリスロポエチン、コロニー刺激因子、および他の種々のサイトカインは、分泌タンパク質である。膜タンパク質であるそれらの受容体も、療法薬または診断薬としての可能性をもつ。企業および研究の両方により、新規な自然分泌タンパク質を同定する試みがなされている。多くの試みは哺乳動物組換えＤＮＡライブラリーをスクリーニングして新規な分泌タンパク質をコードする配列を同定することに注目している。スクリーニングのための方法および技術の例は文献に記載されている（たとえばKlein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:7108-7113 (1996)；Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ．５，５３６，６３７を参照）。

【０２１０】

膜結合型のタンパク質および受容体は、特に多細胞生物の形成、分化および維持に重要な役割を果たすことができる。多くの個々の細胞の運命、たとえば増殖、移動、分化、または他の細胞との相互作用は、一般に他の細胞および／または近辺の環境から受ける情報により支配される。この情報はしばしば分泌ポリペプチド（たとえばマイトジェン因子、生存因子、細胞傷害性因子、分化因子、神経ペプチド、およびホルモン）により伝達され、これらは多様な細胞受容体または膜結合型タンパク質により受容および解釈される。そのような膜結合型タンパク質および細胞受容体には、サイトカイン受容体、受容体型キナーゼ、受容体型ホスファターゼ、細胞－細胞相互作用に関与する受容体、および細胞アドヘシン分子、たとえばセレクチンおよびインテグリンが含まれるが、これらに限定されない。たとえば細胞の増殖および分化を調節するシグナルの伝達は、一部は種々の細胞タンパク質のリン酸化により調節される。そのプロセスを触媒する酵素であるタンパク質チロシンキナーゼも、増殖因子受容体として機能することができる。例には、線維芽細胞増殖因子受容体および神経増殖因子受容体が含まれる。

【０２１１】

膜結合型のタンパク質および受容体分子は、医薬および診断薬としての用途を含む多様な産業用途をもつ。たとえば受容体イムノアドヘシンは、受容体－リガンド相互作用を遮断するための療法薬として利用できる。膜結合型タンパク質は、関連する受容体／リガンド相互作用の有望なペプチド阻害薬または低分子阻害薬のスクリーニングにも利用できる。

【０２１２】

それらのタンパク質の例には、ＥＧＦおよび増殖因子が含まれる。

上皮増殖因子（ＥＧＦ）は、上皮細胞および線維芽細胞を含めた種々のタイプの細胞の増殖を刺激する一般的なマイトジェン因子である。ＥＧＦはＥＧＦ受容体（ＥＧＦＲ）に

結合して活性化し、これにより細胞内シグナル伝達、およびこれに続く作用を開始する。ＥＧＦＲは、中枢神経系（ＣＮＳ）の他の領域のニューロンのほか、大脳皮質、小脳および海馬に発現する。さらに、ＥＧＦもＣＮＳ中の種々の領域に発現する。したがって、ＥＧＦは分裂細胞に対してだけでなく、分裂後のニューロンにも作用する。事実、多数の研究が、ＥＧＦはＣＮＳ中の種々のタイプのニューロンに対して神経栄養作用または神経調節作用をもつことを指摘している。たとえば、ＥＧＦは培養した大脳皮質および小脳のニューロンに直接的に作用し、神経突起の伸展および生存を高める。他方、ＥＧＦは、中隔コリン作動性および中脳ドーパミン作動性ニューロンを含めた他の細胞タイプに対しても、グリア細胞を介して間接的に作用する。ＥＧＦがＣＮＳ中のニューロンに作用することの証拠が蓄積されつつあるが、作用機序は依然として本質的に未知である。分裂細胞におけるＥＧＦ誘導によるシグナル伝達は、分裂後ニューロンの場合より良く理解されている。クローン化されたクロム親和性細胞腫ＰＣ１２細胞および培養された大脳皮質ニューロンの研究により、ＥＧＦ誘導による神経栄養作用は、ＥＧＦに応答したＥＧＦＲおよびマイトジェン活性化プロテインキナーゼ（ＭＡＰＫ）の持続的な活性化により仲介されることが示唆された。持続的な細胞内シグナル伝達はＥＧＦＲのダウンレギュレーション速度の低下と相関し、これがＥＧＦに対する神経細胞の応答を決定すると思われる。ＥＧＦは、分裂細胞および分裂後ニューロンを含めた種々のタイプの細胞に作用する多能性増殖因子であり得る。

【０２１３】

ＥＧＦは唾液腺および胃腸系のブルンナー腺、腎臓、膵臓、甲状腺、下垂体、ならびに神経系により産生され、唾液、血液、脳脊髄液（ＣＦＳ）、尿、羊水、前立腺液、膵液および乳汁などの体液中にみられる；Plata-Salaman, Peptides 12:653-663 (1991)。

【０２１４】

ＥＧＦはそれの膜特異性受容体により仲介され、これは内因性チロシンキナーゼを含有する。Stoscheck et al., J. Cell Biochem. 31:135-152 (1986)。ＥＧＦはそれの受容体の細胞外部分に結合することにより機能すると考えられ、これにより内因性チロシンキナーゼを活性化する膜貫通シグナルが誘導される。

【０２１５】

ＥＧＦ様ドメインの精製および配列分析により、架橋して３つのペプチドループを形成する６つの保存されたシステイン残基の存在が明らかになった；Savage et al., J. Biol. Chem. 248:7669-7672 (1979)。他の幾つかのペプチドがＥＧＦ受容体と反応しうることが現在では一般に知られている；これらは普遍化したモチーフ$X_nCX_7CX_{4/5}CX_{10}CXCX_5GX_2CX_n$を共有し、これらにおいてＸはいずれかの非システインアミノ酸を表わし、ｎは反復変数である。このモチーフをもつ単離されていないペプチドには下記のものが含まれる：ＴＧＦ－アルファ、アンフィレギュリン（ａｍｐｈｉｒｅｇｕｌｉｎ）、シュヴァン鞘腫由来増殖因子（ＳＤＧＦ）、ヘパリン結合ＥＧＦ様増殖因子、およびあるウイルスコードペプチド（たとえばワクシニアウイルス、Reisner, Nature 313:801-803 (1985)、ショープ線維腫（Ｓｈｏｐｅ　ｆｉｂｒｏｍａ）ウイルス、Chang et al., Mol Cell Biol. 7:535-540 (1987)、伝染性軟属腫（Ｍｏｌｌｕｓｃｕｍ　ｃｏｎｔａｇｉｏｓｕｍ）、Porter and Archard, J. Gen. Virol. 68:673-682 (1987)、および粘液腫ウイルス、Upton et al., J. Virol. 61:1271-1275 (1987)、Prigent and Lemoine, Prog. Growth Factor Res. 4:1-24 (1992)。

【０２１６】

ＥＧＦ様ドメインは増殖因子に限定されず、種々の細胞表面タンパク質および細胞外タンパク質中に見いだされており、それらは細胞接着、タンパク質－タンパク質相互作用、および発生において重要な特性をもつ；Laurence and Gusterson, Tumor Biol. 11:229-261 (1990)。これらのタンパク質には、血液凝固因子（ＶＩ、ＩＸ、Ｘ、ＸＩＩ因子、プロテインＣ、プロテインＳ、プロテインＺ、組織プラスミノーゲンアクチベーター、ウロキナーゼ）、細胞外マトリックス成分（ラミニン、サイトタクチン（ｃｙｔｏｔａｃｔｉｎ）、エンタクチン（ｅｎｔａｃｔｉｎ））、細胞表面受容体（ＬＤＬ受容体、トロンボ

モジュリン受容体）、および免疫関連タンパク質（補体Ｃ１ｒ、ウロモジュリン（ｕｒｏｍｏｄｕｌｉｎ））が含まれる。

【０２１７】

さらに興味深いことに、ＥＧＦ様前駆物質の一般構造パターンは哺乳動物細胞の場合と同様に下等生物全体においても保存されている。ＥＧＦ様反復配列をもつ、発生上重要な多数の遺伝子が無脊椎動物において同定された。たとえばショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ）のｎｏｔｃｈ遺伝子は、ＥＧＦに対して相同性を示す４０アミノ酸の反復配列３６個が縦列配列したものをコードする；Wharton et al., Cell 43:557-581 (1985)。ハイドロパシー（疎水性親水性指標）プロットは推定膜貫通ドメインを示し、ＥＧＦ関連配列は膜の細胞外側に位置する。ＥＧＦ様反復配列を含む他のホメオティック遺伝子には、Ｎｏｔｃｈに基づくプローブを用いて同定されたＤｅｌｔａ、９５Ｆおよび５ＺＤ、ならびに２つの特定の細胞間で伝達される発生シグナルに対する推定受容体をコードする線虫遺伝子Ｌｉｎ－１２が含まれる。

【０２１８】

詳細には、ＥＧＦは胃腸粘膜を保持および維持し、かつ急性および慢性粘膜病変を修復すの能力をもつことが示された；Konturek et al., Eur. J. Gastroenterol Hepatol. 7 (10), 933-37 (1995)；これには壊死性小腸大腸炎、ゾリンジャー-エリソン症候群、胃腸潰瘍胃腸潰瘍および先天性微絨毛萎縮の処置が含まれる；Guglietta and Sullivan, Eur. J. Gastroenterol Hepatol, 7(10), 945-50 (1995)。さらに、ＥＧＦは下記に関連することが示されている：毛嚢の分化、du Cros, J. Invest. Dermatol. 101 (1 Suppl.), 106S-113S (1993)、Hillier, Clin. Endocrinol. 33(4), 427-28 (1990)；腎機能、Hamm et al., Semin. Nephrol. 13(1): 109-15 (1993)、Harris, Am. J. Kidney Dis. 17(6): 627-30 (1991)；涙液、van Setten et al., Int. Ophthalmol 15(6); 359-62(1991)；ビタミンＫ仲介血液凝固、Stenflo et al., Blood 78(7): 1637-51(1991)。ＥＧＦは、異常な角化細胞分化を特徴とする種々の皮膚疾患、たとえば乾癬、上皮癌、たとえば肺の扁平上皮癌、外陰部の類表皮癌、および神経膠腫に関連することも示されている。King et al., Am. J. Med. Sci. 296:154-158 (1988)。

【０２１９】

重要なことは、増殖因子シグナル伝達経路の遺伝子変異が発生異常および癌を含めた慢性疾患に密接に関連するという証拠の蓄積である。Aaronson, Science 254: 1146-1153 (1991)。たとえば、ＥＧＦ受容体タンパク質に近似する構造類似体をもつ癌原遺伝子であるｃ－ｅｒｂ－２（ＨＥＲ－２としても知られる）は、ヒト乳癌に過剰発現する。King et al., Science 229:974-976 (1985); Gullick, Hormones and their actions, Cooke et al., eds, Amsterdam, Elsevier, pp 349-360 (1986)。

【０２２０】

増殖因子は、特異的な細胞表面受容体に結合することにより、単独でまたは協調して細胞の生育または増殖を高める分化シグナルまたはメディエーターである。しかし、増殖因子に対しては、発現時の増殖だけでなく、他の細胞反応もある。その結果、増殖因子は多機能かつ有効な細胞レギュレーターと特徴づける方が良い。それらの生物作用には、増殖、走化性、および細胞外マトリックス産生刺激が含まれる。増殖因子は刺激作用および阻害作用の両方をもつ可能性がある。たとえばトランスフォーミング増殖因子（ＴＧＦ－ベータ）は多面性が高く、ある細胞、特に結合組織においては増殖を刺激し、一方、他の細胞、たとえばリンパ球および上皮細胞においては有効な増殖インヒビターである。

【０２２１】

増殖因子による増殖刺激または阻害の生理作用は、ターゲット組織の発生および分化の状態に依存する。関与する古典的なエンドクリン分子の局所細胞調節の機序は、オートクリン（同一細胞）、ジュクスタクリン（隣接細胞）、およびパラクリン（近傍細胞）経路を含む。ペプチド増殖因子は複雑な生物学的言語の要素であり、細胞間コミュニケーションの基礎を提供する。それらは細胞が相互に情報を伝達し、細胞間の相互作用を仲介し、遺伝子発現を変化させるのを可能にする。これらの多機能かつ多能性因子の作用は、他の

ペプチドの存否に依存する。

【０２２２】

ＦＧＦ－８は、正常な２倍体線維芽細胞および樹立された細胞系の両方に対して有効なヘパリン結合性マイトジェンのファミリーである線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）のメンバーである；Gospodarowicz et al. (1984), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81:6963。ＦＧＦファミリーには、特に酸性ＦＧＦ（ＦＧＦ－１）、塩基性ＦＧＦ（ＦＧＦ－２）、ＩＮＴ－２（ＦＧＦ－３）、Ｋ－ＦＧＦ／ＨＳＴ（ＦＧＦ－４）、ＦＧＦ－５、ＦＧＦ－６、ＫＧＦ（ＦＧＦ－７）、ＡＩＧＦ（ＦＧＦ－８）が含まれる。すべてのＦＧＦが２個の保存されたシステイン残基をもち、アミノ酸レベルで３０～５０％の配列相同性をもつ。これらの因子は、下記を含めた広範な正常２倍体中胚葉由来細胞および神経冠由来細胞に対してマイトジェン性である：顆粒膜層（ｇｒａｎｕｌｏｓａ）細胞、副腎皮質細胞、軟骨細胞、筋芽細胞、角膜内皮細胞および血管内皮細胞（ウシまたはヒト）、血管平滑筋細胞、水晶体、網膜および前立腺上皮細胞、乏突起神経膠細胞、星状神経膠細胞、クロンドサイト、筋原細胞および骨芽細胞。

【０２２３】

線維芽細胞増殖因子は、多数の細胞タイプを非マイトジェン様式で刺激することもできる。これらの活性には下記のものが含まれる：創傷領域への細胞移動の促進（走化性）、新たな血管形成の開始（血管新生）、神経の再生および生存の調節（神経栄養作用）、エンドクリン機能の調節、および特異的細胞タンパク質発現の刺激または抑制、細胞外マトリックス産生、ならびに細胞生存。Baird & Bohlen, Handbook of Exp. Pharmacol. 95(1): 369418, Springer, (1990)。これらの特性は、創傷治癒、神経修復、側副血管形成などを促進するための療法に線維芽細胞増殖因子を使用するための基礎を提供する。たとえば、線維芽細胞増殖因子は心臓の疾患および手術における心筋損傷を最小限に抑えることが示唆された（Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．４，３７８，３４７）。

【０２２４】

アンドロゲン誘導増殖因子（ＡＩＧＦ）としても知られるＦＧＦ－８は、アミノ酸２１５個のタンパク質であり、ＦＧＦファミリーの他のメンバーと３０～４０％の配列相同性をもつ。ＦＧＦ－８は、マウス乳癌細胞系ＳＣ３において、アンドロゲンによる調節および誘導の下にあると提唱された。Tanaka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8928-8932 (1992); Sato et al., J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 47:91-98 (1993)。その結果、ＦＧＦ－８はアンドロゲン応答臓器であることが知られている前立腺において局所的役割をもつ可能性がある。ＦＧＦ－８は、ＮＩＨ－３Ｔ３線維芽細胞中へトランスフェクションされた場合にトランスフォーミング活性を示すので、癌原性の可能性もある。Kouhara et al., Oncogene 9 455462 (1994)。ＦＧＦ－８は心臓、脳、肺、腎臓、精巣、前立腺および卵巣に検出されているが、外因性アンドロゲンの不存在下でも発現が検出された。Schmitt et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 57 (34): 173-78 (1996)。

【０２２５】

ＦＧＦ－８はネズミ胚形成の様々な段階で発現する点で他の幾つかのＦＧＦと共通の特性をもち、これは種々のＦＧＦが分化および胚形成において多重の、おそらく協調した役割をもつという学説を支持する。さらに、ＦＧＦ－８は乳腺腫瘍形成の過程でＷｎｔ－１と協同作用する癌原遺伝子としても同定された(Shackleford et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 740-744 (1993); Heikinheimo et al., Mech. Dev. 48:129-138 (1994))。

【０２２６】

他のＦＧＦと異なり、ＦＧＦ－８は一次転写体のオータナティブスプライシングの結果、３つのタンパク質イソ型として存在する。Tanaka et al., 前掲。成体における正常なＦＧＦ－８発現は弱く、性腺組織に限定されるが、ノーザンブロット分析によりＦＧＦ－８　ｍＲＮＡはネズミの妊娠１０日から１２日目まで存在することが示された；これは、ＦＧＦ－８が正常な発生に重要であることを示唆する。Heikinheimo et al., Mech Dev. 48(2): 129-38 (1994)。さらに、妊娠８～１６日目のインサイチュハイブリダイゼーショ

ンアッセイにより、第１気管支アーチ、前頭鼻突起、前脳および中脳－後脳接合部の表面外胚葉に初期発現が示された。１０～１２日目に、ＦＧＦ－８は前肢芽および後肢芽、鼻itsおよび鼻咽頭、漏斗部（ｉｎｆｕｎｄｉｂｕｌｕｍ）の表面外胚葉、ならびに終脳、間脳および後脳に発現した。発生中の後肢では妊娠１３日目まで発現が続くが、その後は検出できなくなる。この結果は、ＦＧＦ－８が胚形成において時間的および空間的に独特のパターンをもつことを示唆し、原腸形成後の胚において外胚葉分化の多数の領域でこの増殖因子が役割をもつことを示唆する。

【０２２７】

分泌タンパク質の１グループであるＴＧＦ－ベータ超遺伝子ファミリー、または簡単にＴＧＦ－ベータスーパーファミリーには、事実上すべての系統に発現する多数の関連する増殖因子および分化因子が含まれる。スーパーファミリーのメンバーは特異的な細胞表面受容体に結合し、これがそれらの多機能性サイトカイン作用を誘導するシグナル伝達機序を活性化する。Kolodziejczyk and Hall, Biochem. Cell. Biol., 74:299-314 (1996); Attisano and Wrana, Cytokine Growth Factor Rev., 7:327-339 (1996); and Hill, Cellular Signaling, 8:533-544 (1996)。

【０２２８】

このファミリーのメンバーには下記のものが含まれる：５つの異なる形態のＴＧＦ－ベータ(Sporn and Roberts, in Peptide Growth Factors and Their Receptors, Sporn and Roberts, eds. (Springer-Verlag: Berlin, 1990) pp. 419-472)、ならびに分化因子ｖｇ１(Weeks and Melton, Cell, 51:861-867 (1987))およびＤＰＰ－Ｃポリペプチド(Padgett et al., Nature, 325:81-84 (1987))、ホルモンであるアクチビンおよびインヒビン(Mason et al., Nature 318-659-663 (1985); Mason et al., Growth Factors, 1:77-88 (1987))、ミュラー管抑制物質（ＭＩＳ）(Cate et al., Cell, 45: 685-698 (1986))、骨形態発生タンパク質（ＢＭＰ）(Wozney et al., Science, 242:1528-1534 (1988);ＰＣＴＷＯ　８８／００２０５、１９８８年1月１４日公開；Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．４，８７７，８６４、１９８９年１０月３１日発行）、発生において調節されるタンパク質Ｖｇｒ－１(Lyons et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:45544558 (1989))およびＶｇｒ－２(Jones et al., Molec. Endocrinol., 6:1961-1968 (1992))、マウス増殖分化因子（ＧＤＦ）、たとえばＧＤＦ－３およびＧＤＦ－９(Kingsley, Genes Dev., 8:133-146 (1994); McPherron and Lee, J. Biol. Chem., 268:3444-3449 (1993))、マウスｌｅｆｔｙ／Ｓｔｒａ１(Meno et al., Nature, 381:151-155 (1996); Bouillet et al., Dev. Biol., 170: 420-433 (1995))、グリア細胞系由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）(Lin et al., Science, 260:1130-1132 (1993))、ノイルツリン（ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ）(Kotzbauer et al., Nature, 384:467-470 (1996))、ならびに子宮内膜出血関連因子（ＥＢＡＦ）(Kothapalli et al., J. Clin. Invest., 99:2342-2350 (1997))。サブセットＢＭＰ－２ＡおよびＢＭＰ－２Ｂは、ＤＰＰ－Ｃに対して配列が約７５％相同であり、そのタンパク質の哺乳動物均等物である。

【０２２９】

ＴＧＦ－ベータスーパーファミリーのタンパク質はジスルフィド結合したホモ－またはヘテロ二量体であって、疎水性シグナル配列、数百個のアミノ酸の長くかつ保存度が比較的乏しいＮ－末端プロ領域、開裂部位（通常は多塩基型）、ならびにより短くかつ保存度がより高いＣ－末端領域を含む、より大きな前駆ポリペプチド鎖によりエンコードされる。このＣ－末端領域はプロセシングされた成熟タンパク質に相応し、特徴的なシステインモチーフをもつ、すなわち既知のすべてのファミリーメンバーに含まれるＴＧＦ－ベータの９個のシステイン残基のうち７個を保存した、約１００個のアミノ酸を含む。成熟領域とプロ領域の間の開裂部位の位置はファミリーメンバー間で異なるが、これらのすべてのタンパク質のＣ－末端は同一位置にあり、配列Ｃｙｓ－Ｘ－Ｃｙｓ－Ｘで終わる；ただし、いずれの場合も、Ｃｙｓ－Ｌｙｓ－Ｃｙｓ－ＳｅｒのＴＧＦ－ベータコンセンサスＣ－末端とは異なる。Sporn and Roberts, 1990, 前掲。

【０２３０】

少なくとも５つの形態のＴＧＦ－ベータが現在同定されている：ＴＧＦ－ベータ１、ＴＧＦ－ベータ２、ＴＧＦ－ベータ３、ＴＧＦ－ベータ４、およびＴＧＦ－ベータ５。活性形のＴＧＦ－ベータ１はホモ二量体であり、アミノ酸３９０個の前駆体のカルボキシ末端１１２個のアミノ酸の二量体化により形成される。組換えＴＧＦ－ベータ１がクローン化され(Derynck et al., Nature, 316:701-705 (1985))、チャイニーズハムスター卵巣細胞において発現された(Gentry et al., Mol. Cell. Biol. 7:3418-3427 (1987))。さらに、組換えヒトＴＧＦ－ベータ２(deMartin et al., EMBO J., 6:3673 (1987))、ならびにヒトおよびブタＴＧＦ－ベータ３(Derynck et al., EMBO J., 7:3737-3743 (1988); ten Dijke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:4715 (1988))がクローン化された。ＴＧＦ－ベータ２はアミノ酸４１４個の前駆体の形態であり、同様にプロセシングされて活性形ＴＧＦ－ベータ１と約７０％の相同性をもつカルボキシ末端１１２個のアミノ酸からなるホモ二量体となる(Marquardt et al., J. Biol. Chem., 262:12127 (1987))。ＥＰ　２００，３４１；１６９，０１６；２６８，５６１；および２６７，４６３；Ｕ．Ｓ　Ｐａｔ　Ｎｏ．４，７７４，３２２；Cheifetz et al., Cell, 48:409-415 (1987); Jakowlew et al., Molecular Endocrin., 2:747-755 (1988); Derynck et al., J. Biol. Chem., 261:4377-4379 (1986); Sharples et al., DNA, 6:239-244 (1987); Derynck et al., Nucl. Acids. Res., 15:3188-3189 (1987); Derynck et al., Nucl. Acids. Res. 15:3187 (1987); Seyedin et al., J. Biol. Chem., 261:5693-5695 (1986); Madisen et al., DNA 7:1-8 (1988); and Hanks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 85:79-82 (1988も)も参照されたい。

【０２３１】

ＴＧＦ－ベータ４およびＴＧＦ－ベータ５は、ニワトリ軟骨細胞ｃＤＮＡライブラリーから(Jakowlew et al., Molec. Endocrinol., 2:1186-1195 (1988))、およびカエル卵母細胞ｃＤＮＡから、それぞれクローン化された。

【０２３２】

ＴＧＦ－ベータのプロ領域は、成熟ＴＧＦ－ベータ二量体と非共有結合により会合しており(Wakefield et al., J. Biol. Chem., 263:7646-7654 (1988); Wakefield et al., Growth Factors, 1:203-218 (1989))、このプロ領域はＴＧＦ－ベータおよびアクチビンの両方の適正なフォールディングおよび活性成熟二量体の分泌に必要であることが認められている (Gray and Mason, Science, 247:1328-1330 (1990))。ＴＧＦ－ベータの成熟領域とプロ領域の間の会合は成熟二量体の生物活性を遮蔽し、その結果、不活性な潜在形態が形成される。潜在性はＴＧＦ－ベータスーパーファミリーに一定のものではない；プロ領域の存在はアクチビンまたはインヒビンの生物活性には影響を及ぼさないからである。

【０２３３】

ＴＧＦ－ベータスーパーファミリーに属するタンパク質の生物学的特性を統合する特徴は、発生プロセスを調節するそれらの能力である。ＴＧＦ－ベータは種々の正常細胞および新生細胞の両方に対して多数の調節作用をもつことが示された。ＴＧＦ－ベータは細胞の増殖、分化、および細胞機能における他の重要なプロセスを刺激または阻害することができるので、多機能性である(Sporn and Roberts, 前掲)。

【０２３４】

ＴＧＦ－ベータスーパーファミリーの１メンバーであるＥＢＡＦは、子宮内膜に、異常な子宮内膜出血の分泌後期および途中にのみ発現する。Kothapalli et al., J. Clin. Invest., 99:2342-2350 (1997)。ヒトの子宮内膜は、規則的な間隔で出血する唯一の身体組織であるという点で独特である。さらに、異常な子宮内膜出血は婦人科疾患の最も一般的な症状発現のひとつであり、子宮切除の主指標となる。インサイチュハイブリダイゼーションにより、ＥＢＡＦのｍＲＮＡは間質に発現し、子宮内膜腺または子宮内膜細胞に有意のｍＲＮＡ発現はないことが示された。

【０２３５】

ＥＢＡＦの推定タンパク質配列は、ＴＧＦ－ベータスーパーファミリーのマウスｌｅｆｔｙ／ｓｔｒａ３によりコードされるタンパク質と強い相同性を示した。モチーフ探査に

より、推定ＥＢＡＦは、ＴＧＦ－ベータ関連タンパク質間で保存されている、システイン結び目（ｋｎｏｔ）構造形成に必要なシステイン残基の大部分を含むことが明らかになった。ＥＢＡＦ配列は、追加システイン残基を第１保存システイン残基からアミノ酸１２個上流に含む。追加システイン残基を含むことが知られている他の唯一のファミリーメンバーは、ＴＧＦ－ベータ類、インヒビン類およびＧＤＦ－３である。ＬＥＦＴＹ、ＧＤＦ－３／Ｖｇｒ２、およびＧＤＦ－９と同様に、ＥＢＡＦは、分子間ジスルフィド結合を形成することが知られているシステイン残基を欠如する。したがってＥＢＡＦは、非対合システイン残基をもつ、二量体として存在しない可能性のあるＴＧＦ－ベータスーパーファミリーの追加メンバーであると思われる。しかし、２つのモノマーサブユニット間の疎水性接触が二量体形成を促進する可能性がある。蛍光インサイチュハイブリダイゼーションにより、ヒト染色体１のバンドｑ４２．１にｅｂａｆ遺伝子があることが示された。

【０２３６】

そのような細胞外タンパク質の他の例は、当技術分野で周知である；たとえばＵ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ．６，７２３，５３５を参照。

コンジュゲート

本発明は、シンメトロアドヘシン／イムノシンメトロアドヘシンのコンジュゲートにも関する。よって、本発明組成物は下記のものにコンジュゲートさせることができる：細胞傷害性物質、たとえば化学療法薬、毒素（たとえば、細菌、真菌、植物もしくは動物由来の酵素活性毒素、またはそのフラグメント）、または放射性同位体（すなわち放射性コンジュゲート）。

【０２３７】

そのようなイムノコンジュゲートの形成に有用な化学療法薬は当技術分野で周知である。使用できる酵素活性毒素およびそのフラグメントには、下記のものが含まれる：ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、エキソトキシンＡ鎖（緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）由来）、リシン（ｒｉｃｉｎ）Ａ鎖、アブリン（ａｂｒｉｎ）Ａ鎖、モデシン（ｍｏｄｅｃｃｉｎ）Ａ鎖、アルファ－サルシン（ａｌｐｈａ－ｓａｒｃｉｎ）、シナアブラギリ（Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ　ｆｏｒｄｉｉ）タンパク質、ダイアンチン（ｄｉａｎｔｈｉｎ）タンパク質、ヨウシュヤマゴボウ（Ｐｈｙｔｏｌａｃａ　ａｍｅｒｉｃａｎａ）タンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＨおよびＰＡＰ－Ｓ）、ニガウリ（ｍｏｍｏｒｄｉｃａ　ｃｈａｒａｎｔｉａ）インヒビター、クルシン（ｃｕｒｃｉｎ）、クロチン（ｃｒｏｔｉｎ）、サパオナリア・オフィシナリス（ｓａｐａｏｎａｒｉａ　ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ）インヒビター、ゲロニン（ｇｅｌｏｎｉｎ）、ミトゲリン（ｍｉｔｏｇｅｌｌｉｎ）、レストリクトシン（ｒｅｓｔｒｉｃｔｏｃｉｎ）、フェノマイシン（ｐｈｅｎｏｍｙｃｉｎ）、エノマイシン（ｅｎｏｍｙｃｉｎ）およびトリコテセン類（ｔｒｉｃｏｔｈｅｃｅｎｅ）。種々の放射性核種を放射性コンジュゲート抗体の調製に使用できる。例には、^{212}Ｂｉ、^{131}Ｉ、^{113}Ｉｎ、^{90}Ｙおよび^{186}Ｒｅが含まれる。

【０２３８】

細胞傷害性物質を含有する本発明組成物のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質結合剤、たとえば下記のものを用いて調製できる：Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオール）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（たとえばジメチルアジピミデート塩酸塩）、活性エステル（たとえばスベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド類（たとえばグルタルアルデヒド）、ビス－アジド化合物（たとえばビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（たとえばビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート類（たとえばトリエン２，６－ジイソシアネート）、およびビス－活性フッ素化合物（たとえば１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン）。たとえばリシンイムノトキシンは、Vitetta et al., Science, 238:1098 (1987)の記載に従って調製できる。カーボン－１４標識１－イソチオシアナトベンジル－３－メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）は、放射性核種を抗体にコンジュゲート

させるためのキレート化剤の一例である。ＷＯ　９４１１１０２６を参照。

【０２３９】

遺伝子デバイスの合成

本明細書に開示する遺伝子デバイスは、多様な経路で合成できる。特定の１経路は、化合物をインビボで組換えＤＮＡ技術により合成し、次いで分泌または入手された生成物を本発明化合物が形成される条件下で化学修飾するものである。別経路には固体状態合成が含まれる。

【０２４０】

一般法

以下の記載は主に、エンコーディング核酸を含むベクターで形質転換またはトランスフェクションした細胞を培養することによる、目的とする連続アミノ酸の区域またはポリペプチドの調製に関する。当技術分野で周知の別法を採用しうることももちろん考慮される。たとえば、固相法を用いる直接ペプチド合成により、アミノ酸配列またはその一部を製造することができる(たとえばStewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., カリフォルニア州サンフランシスコ(1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)を参照)。インビトロタンパク質合成は、手動法を用いて、または自動法により実施できる。自動合成は、たとえばApplied Biosystemsペプチド合成装置(カリフォルニア州フォスターシティー)により、製造業者の指示を用いて達成できる。目的とする連続アミノ酸の区域またはポリペプチドの種々の部分を個別に化学合成し、化学的方法または酵素法を用いて組み合わせて、目的とする連続アミノ酸の区域またはポリペプチドの全長を製造することができる。

【０２４１】

１．目的とする連続アミノ酸の区域またはポリペプチドをコードするＤＮＡの単離

目的とするｍＲＮＡを保有すると考えられる組織から作成したｃＤＮＡライブラリーからエンコーディングＤＮＡを入手し、それを検出可能なレベルで発現させることができる。したがってヒトＤＮＡはヒト組織から作成したｃＤＮＡライブラリーから簡便に入手できる、など。エンコーディング遺伝子はゲノムライブラリーから、または既知の合成法により入手することもできる（たとえば自動核酸合成）。

【０２４２】

目的遺伝子またはそれによりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ（たとえば、連続アミノ酸の区域に対する抗体、または少なくとも２０～８０塩基のオリゴヌクレオチド）で、ライブラリーをスクリーニングすることができる。選択したプローブによるｃＤＮＡまたはゲノムライブラリーのスクリーニングは、標準法を用いて実施できる；たとえばSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (ニューヨーク: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載。エンコーディング遺伝子を単離するための別法は、ＰＣＲ法を用いるものである(Sambrook et al., 前掲; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995))。

【０２４３】

プローブとして選択したオリゴヌクレオチド配列は、偽陽性配列を最小限に抑えるのに十分な長さおよび十分に確実なものでなければならない。スクリーニングするライブラリー中のＤＮＡにハイブリダイズした際に検出できるように、オリゴヌクレオチドを標識することが好ましい。標識法は当技術分野で周知であり、放射性標識、たとえば^{32}Ｐ－標識ＡＴＰ、ビオチニル化または酵素標識の使用を含む。中等度の緊縮および高度の緊縮を含むハイブリダイゼーション条件は、Sambrook et al.,前掲に示されている。

【０２４４】

そのようなライブラリースクリーニング法により同定した配列を、寄託された他の既知配列、および公開データベース、たとえばＧｅｎＢａｎｋデータベース、または他の私的配列データベース中に入手できる配列と、比較およびアラインさせることができる。分子の特定領域内または全長配列全体の配列同一性（アミノ酸またはヌクレオチドのいずれか

のレベルでの）は、当技術分野で既知の、本明細書に記載する方法を用いて決定できる。

【０２４５】

タンパク質コード配列をもつ核酸は、下記により入手できる：選択したｃＤＮＡまたはゲノムライブラリーを、まず本明細書に開示する演繹アミノ酸配列を用いて、かつ必要ならばSambrook et al.,前掲に記載された一般的なプライマー延長法を用いてスクリーニングして前駆体を検出し、そしてｃＤＮＡに逆転写されていない可能性のあるｍＲＮＡの中間体を処理する。

【０２４６】

２．宿主細胞の選択および形質転換

本明細書に記載する調製用の発現ベクターまたはクローニングベクターで宿主細胞をトランスフェクションまたは形質転換し、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または目的配列をコードする遺伝子の増幅のために適宜改変した、一般的な栄養培地で培養する。培養条件、たとえば培地、温度、ｐＨなどは、多大な実験なしに当業者が選択できる。全般的に、細胞培養を最大にするための原理、プロトコルおよび実際の技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991)およびSambrook et al.,前掲中にある。

【０２４７】

真核細胞のトランスフェクション法および原核細胞の形質転換法は当業者に既知である；たとえば$CaCl_2$、$CaPO_4$、リポソーム仲介法およびエレクトロポレーション。使用する宿主細胞に応じて、それらの細胞に適切な標準法を用いて形質転換を実施する。塩化カルシウムを用いるカルシウム処理（Sambrook et al.,前掲に記載）またはエレクトロポレーションは、通常は原核細胞に用いられる。アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）の感染は、特定の植物細胞の形質転換に用いられる；Shaw et al., Gene, 23:315 (1983)およびＷＯ　８９／０５８５９，１９８９年６月２９日公開に記載。そのような細胞壁をもたない哺乳動物細胞には、Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈殿法を採用できる。哺乳動物宿主細胞系トランスフェクションの全般的観点は、Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ．４，３９９，２１６に記載されている。酵母内への形質転換は、一般にVan Solingen et al., J. Bact., 130:946(1977)およびHsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかし、ＤＮＡを細胞に導入するための他の方法、たとえば核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷細胞との細菌プロトプラスト融合、またはポリカチオン、たとえばポリブレン、ポリオルニチンによる方法も使用できる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)、およびMansour et al., Nature, 336:348-352 (1988)を参照。

【０２４８】

本発明におけるベクター中のＤＮＡをクローニングまたは発現させるのに適切な宿主細胞には、原核細胞、酵母、またはより高等な真核細胞が含まれる。適切な原核細胞には真性細菌、たとえばグラム陰性またはグラム陽性生物、たとえば腸内細菌科（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ）、たとえば大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）が含まれるが、これらに限定されない。種々の大腸菌株が公開利用可能である：たとえば大腸菌Ｋ１２株ＭＭ２９４（ＡＴＣＣ　３１，４４６）；大腸菌Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ　３１，５３７）；大腸菌株Ｗ３１１０（ＡＴＣＣ　２７，３２５）およびＫ５７７２（ＡＴＣＣ　５３，６３５）。他の適切な原核宿主細胞には下記のものが含まれる：腸内細菌科、たとえばエシェリキア属（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）、たとえば大腸菌、エンテロバクター属（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ）、エルウイニア属（Ｅｒｗｉｎｉａ）、クレブシエラ属（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）、変形菌属（Ｐｒｏｔｅｕｓ）、サルモネラ属（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、たとえばネズミチフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）、セラチア属（Ｓｅｒｒａｔｉａ）、たとえば霊菌（Ｓｅｒｒａｔｉａ　ｍａｒｃｅｓｃａｎｓ）、および赤痢菌属（Ｓｈｉｇｅｌｌａ）、ならびに桿菌属（Ｂａｃｉｌｌｉ）、たとえば枯草菌

（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）およびバチルス・リケニフォルミス（Ｂ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）（たとえばバチルス・リケニフォルミス４１Ｐ、ＤＤ　２６６，７１０に開示、１９８９年４月１２日公開）、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）、たとえば緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、ならびに放線菌属（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）。これらの例は例示であって、限定ではない。菌株Ｗ３１１０は組換えＤＮＡ生成物発酵に慣用される宿主株であるので、特に好ましい宿主または親宿主である。宿主細胞が分泌するタンパク質分解酵素は最少量であることが好ましい。たとえば株Ｗ３１１０を、この宿主の内因性タンパク質をコードする遺伝子に遺伝子変異を起こすように改変することができる；そのような宿主の例には下記のものが含まれる：大腸菌Ｗ３１１０株１Ａ２、これは完全遺伝子型ｔｏｎＡをもつ；大腸菌Ｗ３１１０株９Ｅ４、これは完全遺伝子型ｔｏｎＡ　ｐｔｒ３をもつ；大腸菌Ｗ３１１０株２７Ｃ７（ＡＴＣＣ　５５，２４４）、これは完全遺伝子型ｔｏｎＡｐｔｒ３ｐｈｏＡ　Ｅ１５（ａｒｇＦ－ｌａｃ）１６９　ｄｅｇＰ　ｏｍｐＴ　ｋａｎ．ｓｕｐ．ｒをもつ；大腸菌Ｗ３１１０株３７Ｄ６、これは完全遺伝子型ｔｏｎＡ　ｐｔｒ３　ｐｈｏＡ　Ｅ１５（ａｒｇＦ－ｌａｃ）１６９　ｄｅｇＰ　ｏｍｐＴ　ｒｂｓ７　ｉｌｖＧ　ｋａｎ．ｓｕｐ．ｒをもつ；大腸菌Ｗ３１１０株４０Ｂ４、これは非カナマイシン耐性ｄｅｇＰ欠失変異をもつ株３７Ｄ６である；および変異ペリプラズムプロテアーゼをもつ大腸菌株：Ｕ．Ｓ　Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ．４，９４６，７８３，１９９０年８月７日発行に開示。あるいは、インビトロクローニング法、たとえばＰＣＲまたは他の核酸ポリメラーゼ反応が適切である。

【０２４９】

原核細胞のほか、真核細胞微生物、たとえば糸状菌または酵母も、エンコーディングベクターのための適切なクローニング宿主または発現宿主である。サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）は慣用される下等真核細胞宿主微生物である。他には下記のものが含まれる：シゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ）(Beach and Nurse, Nature, 290:140 (1981)；ＥＰ　１３９，３８３，１９８５年５月２日公開）；クライベラ属（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）宿主（Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．４，９４３，５２９；Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991))、たとえばクライベラ・ラクティス（Ｋ．ｌａｃｔｉｓ）（ＭＷ９８－８Ｃ，ＣＢＳ６８３，ＣＢＳ４５７４ Louvencourt et al., J. Bacteriol., 737 (1983))、クライベラ・フラギリス（Ｋ．ｆｒａｇｉｌｉｓ）（ＡＴＣＣ　１２，４２４）、クライベラ・ブルガリカス（Ｋ．ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓ）（ＡＴＣＣ　１６，０４５）、クライベラ・ウィッケラミイ（Ｋ．ｗｉｃｋｅｒａｍｉｉ）（ＡＴＣＣ　２４，１７８）、クライベラ・ワルティイ（Ｋ．ｗａｌｔｉｉ）（ＡＴＣＣ　５６，５００）、クライベラ・ドロソフィララム（Ｋ．ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａｒｕｍ）（ＡＴＣＣ　３６，９０６；Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135 (1990))、クライベラ・サーモトレランス（Ｋ．ｔｈｅｒｍｏｔｏｌｅｒａｎｓ）、およびクライベラ・マルキシアヌス（Ｋ．ｍａｒｘｉａｎｕｓ）；ヤロウィア属（ｙａｒｒｏｗｉａ）（ＥＰ　４０２，２２６）；ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）（ＥＰ　１８３，０７０；Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28:265-278 (1988))；カンジダ属（Ｃａｎｄｉｄａ）；トリコデルマ・リーシア（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ　ｒｅｅｓｉａ）（ＥＰ　２４４，２３４）；ニューロスポラ・クラッサ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ　ｃｒａｓｓａ）（Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 (1979)）；シュバンニオミセス属（Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ）、たとえばシュバンニオミセス・オッシデンタリス（Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ　ｏｃｃｉｄｅｎｔａｌｉｓ）（ＥＰ　３９４，５３８，１９９０年１０月３１日公開）；ならびに糸状菌、たとえばニューロスポラ属（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ）、ペニシリウム属（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）、トリポクラジウム属（Ｔｏｌｙｐｏｃｌａｄｉｕｍ）（ＷＯ　９１／００３５７，１９９１年１月１０日公開）、およびアスペルギルス属（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）宿主、たとえばアスペルギルス・ニデュランス（Ａ．ｎｉｄｕｌａｎｓ）（Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 (1983); Tilburn et al., Gene, 26:205-221 (1983)

; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 (1984))およびアスペルギルス・ニガー（Ａ．ｎｉｇｅｒ）(Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475479 (1985))。メチロトロピック酵母は本発明に適切であり、メタノール上で生育しうる下記よりなる属から選択される酵母が含まれるが、これらに限定されない：ハンゼヌラ属（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）、カンジダ属（Ｃａｎｄｉｄａ）、クレッケラ属（Ｋｌｏｅｃｋｅｒａ）、ピキア属（Ｐｉｃｈｉａ）、サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、トルロプシス属（Ｔｏｒｕｌｏｐｓｉｓ）およびロドトルラ属（Ｒｈｏｄｏｔｏｒｕｌａ）。このクラスの酵母の例示である具体的な種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982)中にある。

【０２５０】

グリコシレーションされた目的とする連続アミノ酸の区域またはポリペプチドの発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例には、昆虫細胞、たとえばショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ）Ｓ２およびヨトウ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ）Ｓｆ９、ならびに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物細胞系の例には、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞およびＣＯＳ細胞が含まれる。より具体的な例には、下記のものが含まれる：ＳＶ４０で形質転換したサル腎ＣＶ１細胞系（ＣＯＳ－７，ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６５１）；ヒト胚性腎系（２９３細胞、または懸濁培養用にサブクローニングした２９３，Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／－ＤＨＦＲ（ＣＨＯ，Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980));マウスセルトリ細胞（ｓｅｒｔｏｌｉ　ｃｅｌｌ）（ＴＭ４、Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７５）；ヒト肝細胞（Ｈｅｐ　Ｇ２、ＨＢ　８０６５）；およびマウス乳腺腫（ＭＭＴ　０６０５６２、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ５１）。適切な宿主細胞の選択は当業者が容易になしうる範囲のものであると考えられる。

【０２５１】

３．複製可能なベクターの選択および使用

目的とする連続アミノ酸の区域またはポリペプチドをコードする核酸（たとえばｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ）を、複製可能なベクターにクローニング（ＤＮＡの増幅）または発現のために挿入することができる。多様なベクターが公開されている。ベクターは、たとえばプラスミド、コスミド、ウイルス粒子またはファージの形であってもよい。適切な核酸配列を多様な方法でベクターに挿入することができる。一般に、当技術分野で既知の技術を用いてＤＮＡを適切な制限エンドヌクレアーゼ部位（１以上）に挿入する。ベクター構成要素には通常は、１以上のシグナル配列、複製起点、１以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終止配列が含まれるが、これらに限定されない。これらの構成要素のうち１以上を含む適切なベクターの構築には、当業者に既知の標準ライゲーション法を用いる。

【０２５２】

目的とする連続アミノ酸の区域またはポリペプチドを組換えにより、そのものとしてだけではなく、ヘテロロガスポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても製造できる；ヘテロロガスポリペプチドは、シグナル配列であるか、または成熟タンパク質もしくはポリペプチドのＮ－末端に特異的開裂部位をもつ他のポリペプチドであってもよい。通常は、シグナル配列はベクターの構成要素であってもよく、あるいはそれはベクターに挿入されるエンコーディングＤＮＡの一部であってもよい。シグナル配列は、アルカリ性ホスファターゼ、ペニシリナーゼ、１ｐｐ、または耐熱性エンテロトキシンＩＩリーダーの群から選択される原核細胞シグナル配列であってもよい。酵母の分泌のためには、シグナル配列はたとえば酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（サッカロミセス属およびクライベラミセス属のアルファ因子リーダーを含む；後者はＵ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．５，０１０，１８２に記載されている）、または酸性ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス（Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓ）グルコアミラーゼリーダー（ＥＰ　３６２，１７９，１９９０年４月４日公開）、またはＷＯ　９０／１３６４６，１９９０年１１月１５日

公開に記載されたシグナルであってもよい。哺乳動物細胞発現の場合、タンパク質の分泌を指令するために哺乳動物シグナル配列、たとえば同一種または関連種の分泌ポリペプチドに由来するシグナル配列、およびウイルス分泌リーダーを使用できる。

【０２５３】

発現ベクターおよびクローニングベクターは共に、１以上の選択した宿主細胞においてベクターが複製するのを可能にする核酸配列を含む。そのような配列は種々の細菌、酵母およびウイルスについて周知である。プラスミドｐＢＲ３２２からの複製起点は大部分のグラム陰性菌に適切であり、２ｍｕプラスミドの起点は酵母に適切であり、種々のウイルス起点（ＳＶ４０、ポリオーマ、アデノウイルス、ＶＳＶまたはＢＰＶ）は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

【０２５４】

発現ベクターおよびクローニングベクターは一般に選択遺伝子（選択マーカーとも呼ばれる）を含むであろう。一般的な選択遺伝子は、（ａ）抗生物質もしくは他の毒素、たとえばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートもしくはテトラサイクリンに対する耐性を付与するタンパク質、（ｂ）栄養要求欠乏を補うタンパク質、または（ｃ）複合培地から得られない必須栄養素を供給するタンパク質をコードする；たとえば桿菌（Ｂａｃｉｌｌｉ）についてＤ－アラニンラセマーゼをコードする遺伝子である。

【０２５５】

哺乳動物細胞に適切な選択マーカーの例は、エンコーディング核酸の取込みに対して受容能をもつ細胞を同定しうるもの、たとえばＤＨＦＲまたはチミジンキナーゼである。野生型ＤＨＦＲを用いる場合に適切な宿主細胞は、ＤＨＦＲ活性を欠如するＣＨＯ細胞系であり、Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)の記載に従って調製および増殖される。酵母に用いるのに適切な選択遺伝子は、酵母プラスミドＹＲｐ７中に存在するｔｒｐ１遺伝子である(Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980))。ｔｒｐ１遺伝子は、トリプトファン中で増殖する能力を欠如する酵母変異株、たとえばＡＴＣＣ　Ｎｏ．４４０７６またはＰＥＰ４－１に対する選択マーカーを提供する(Jones, Genetics, 85:12 (1977))。

【０２５６】

発現ベクターおよびクローニングベクターは通常は、エンコーディング核酸配列に作動可能な状態で連結してｍＲＮＡ合成を指令するプロモーターを含む。有望な種々の宿主細胞が認識するプロモーターは周知である。原核細胞宿主に使用するのに適切なプロモーターには、ベーターラクタマーゼおよび乳糖プロモーター系(Chang et al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979))、アルカリ性ホスファターゼ、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーター系(Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980)；ＥＰ　３６，７７６）、およびハイブリッドプロモーター、たとえばｔａｃプロモーター(deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983))が含まれる。細菌系に用いるプロモーターは、エンコーディングＤＮＡに作動可能な状態で連結したシャイン・ダルガーノ（Ｓ．Ｄ．）配列をも含むであろう。

【０２５７】

酵母宿主に使用するのに適切なプロモーター配列の例には、下記のものに対するプロモーターが含まれる：３－ホスホグリセリン酸キナーゼ(Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980))、または他のグリコール溶解酵素(Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978))、たとえばエノラーゼ、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース－６－リン酸イソメラーゼ、３－ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼ。

【０２５８】

増殖条件により転写が制御されるという追加利点をもつ誘導プロモーターである他の酵

母プロモーターは、下記のものに対するプロモーター領域である：アルコールデヒドロゲナーゼ２、イソシトクロムＣ、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ、ならびにマルトースおよびガラクトース利用に関与する酵素。酵母発現に使用するのに適切なベクターおよびプロモーターは、さらにＥＰ　７３，６５７に記載されている。

【０２５９】

哺乳動物宿主におけるベクターからの転写は、たとえばウイルス、たとえばポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス（ＵＫ　２，２１１，５０４，１９８９年７月５日公開）、アデノウイルス（たとえばアデノウイルス２）、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルスおよびシミアンウイルス４０（ＳＶ４０）のゲノムから得られるプロモーター、ヘテロロガス哺乳動物プロモーター、たとえばアクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーター、ならびに熱ショックプロモーターにより制御される；ただし、それらのプロモーターは宿主細胞系と適合性である。

【０２６０】

高等真核細胞による、目的とする連続アミノ酸の区域またはポリペプチドをコードするＤＮＡの転写は、エンハンサー配列をベクターに挿入することによって増強される。エンハンサーはＤＮＡのシス作用エレメントであり、通常は１０～３００ｂｐであって、プロモーターに作用してそれの転写を増強する。哺乳動物遺伝子（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、アルファ－フェトプロテインおよびインスリン）に由来する多数のエンハンサー配列が現在知られている。しかし、一般に真核細胞性ウイルスに由来するエンハンサーが用いられるであろう。例には、複製起点の末端側（ｌａｔｅ　ｓｉｄｅ）のＳＶ４０エンハンサー（ｂｐ　１００～２７０）、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の末端側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、ベクターにコード配列の５’側または３’側でスプライス挿入できるが、好ましくはプロモーターから５’側の部位に配置される。

【０２６１】

真核宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、または他の多細胞生物に由来する成核細胞）に用いられる発現ベクターは、転写の終止およびｍＲＮＡの安定化に必要な配列をも含むであろう。それらの配列は一般に、真核細胞またはウイルスのＤＮＡまたはｃＤＮＡの５’側、および場合により３’側非翻訳領域から得られる。これらの領域は、目的とする連続アミノ酸の区域またはポリペプチドをコードするｍＲＮＡの非翻訳部分にポリアデニル化フラグメントとして転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

【０２６２】

連続アミノ酸の区域またはポリペプチドを組換え脊椎動物細胞培養における合成に適合させるのに適切なさらに他の方法、ベクターおよび宿主細胞は、Gething et al., Nature 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:4046 (1979)；ＥＰ　１１７，０６０；およびＥＰ　１１７，０５８に記載されている。

【０２６３】

４．遺伝子増幅／発現の検出

遺伝子の増幅および／または発現は、試料において直接に、たとえば一般的なサザンブロット法、ｍＲＮＡの転写を定量するためのノーザンブロット法(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980))、ドットブロット法（ＤＮＡ分析）、またはインサイチューハイブリダイゼーション法により、適宜標識されたプローブを用い、本明細書に提示する配列に基づいて測定できる。あるいは、ＤＮＡデュプレックス、ＲＮＡデュプレックスおよびＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッドデュプレックス、またはＤＮＡ－タンパク質デュプレックスを含めた特異的デュプレックスを認識しうる抗体を使用できる。これらの抗体を標識し、デュプレックスが表面に結合した状態でアッセイを実施することができ、これにより、表面にデュプレックスが形成された状態でデュプレックスに結合した抗体の存在を検出できる。

【０２６４】
あるいは、遺伝子発現は免疫学的方法により、たとえば細胞または組織切片を免疫組織化学的に染色し、また細胞培養物または体液をアッセイして、遺伝子生成物の発現を直接に定量することにより測定できる。試料流体の免疫組織化学的な染色および／またはアッセイに有用な抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であってもよく、いずれかの哺乳動物において産生させることができる。抗体は、目的とする連続アミノ酸の区域もしくはポリペプチドの天然配列に対して、または本明細書に提示するＤＮＡ配列に基づく合成ペプチドに対して、または目的とする連続アミノ酸の区域もしくはポリペプチドをコードするＤＮＡに融合した、特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して産生させるのが好都合である。

【０２６５】
５．ポリペプチドの精製
目的とする連続アミノ酸の区域またはポリペプチドの形態は、培養培地から、または細胞溶解物から回収できる。膜結合している場合、適切な界面活性剤溶液（たとえばＴｒｉｔｏｎ－Ｘ　１００）を用いて、または酵素開裂により、それを膜から開放することができる。目的とする連続アミノ酸の区域またはポリペプチドの発現に用いた細胞は、種々の物理的または化学的手段、たとえば凍結融解サイクル、音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤により破壊することができる。

【０２６６】
目的とする連続アミノ酸の区域またはポリペプチドを組換え細胞のタンパク質またはポリペプチドから精製することが望ましい可能性がある。以下の方法は適切な精製法の例示である：イオン交換カラム上での分画；エタノール沈殿法；逆相ＨＰＬＣ；シリカまたはカチオン交換樹脂、たとえばＤＥＡＥ上でのクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；ＳＤＳ－ＰＡＧＥ；硫酸アンモニウム沈殿法；たとえばＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－７５を用いるゲル濾過；ＩｇＧなどの混在物を除去するためのプロテインＡセファロース（Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ）カラム；およびエピトープ－タグ形態を結合するための金属キレートカラム。種々のタンパク質精製法を使用でき、それらの方法は当技術分野で既知であり、たとえばDeutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, ニューヨーク(1982)に記載されている。選択する精製工程（１以上）は、たとえば使用する製造方法の性質、および製造される特定の目的とする連続アミノ酸の区域またはポリペプチドに依存するであろう。

【０２６７】
大腸菌における目的とする連続アミノ酸の区域またはポリペプチドの発現例
目的とする連続アミノ酸の区域またはポリペプチドをコードするＤＮＡ配列を、選択したＰＣＲプライマーによりまず増幅させる。プライマーは、選択した発現ベクター上の制限酵素部位に相応する制限酵素部位を含むべきである。種々の発現ベクターを使用できる。適切なベクターの例はｐＢＲ３２２（大腸菌由来;参照：Bolivar et al., Gene, 2:95 (1977))であり、これはアンピシリン耐性およびテトラサイクリン耐性に対する遺伝子を含む。このベクターを制限酵素で消化し、脱リン酸する。次いでＰＣＲ増幅した配列をベクターにライゲートさせる。ベクターは、好ましくは下記を含むであろう：抗生物質耐性遺伝子をコードする配列、ｔｒｐプロモーター、ポリｈｉｓリーダー（最初の６つのＳＴＩＩコドン、ポリｈｉｓ配列、およびエンテロキナーゼ開裂部位を含む）、目的とする特定のアミノ酸配列／ポリペプチドをコードする領域、ラムダ転写ターミネーター、およびａｒｇＵ遺伝子。

【０２６８】
次いでライゲーション混合物を用いて、Sambrook et al.,前掲に記載された方法により、選択した大腸菌株を形質転換する。形質転換体をそれらがＬＢプレート上で生育する能力により同定し、次いで抗生物質耐性コロニーを選択する。プラスミドＤＮＡを単離し、制限分析およびＤＮＡ配列決定により確認することができる。

【０２６９】

選択したクローンを液体培養培地、たとえば抗生物質を補充したＬＢブロス中で、一夜増殖させることができる。続いて、一夜培養物を大規模培養に使用できる。次いで細胞を目的とする光学濃度まで増殖させる；その間に発現プロモーターが始動する。

【０２７０】

細胞をさらに数時間培養した後、細胞を遠心分離により回収することができる。遠心分離により得られた細胞ペレットを当技術分野で既知の各種試薬で可溶化し、可溶化した目的とするアミノ酸配列またはポリペプチドを、次いで金属キレートカラムにより、前記タンパク質を緊密に結合させる条件下で精製することができる。

【０２７１】

プライマーは、選択した発現ベクター上の制限酵素に相応する制限酵素部位、ならびに効率的かつ信頼性のある転写開始、金属キレートカラム上での迅速精製、およびエンテロキナーゼによるタンパク質分解分離をもたらす他の有用な配列を含むことができる。ＰＣＲ増幅したポリ－Ｈｉｓタグ付き配列を発現ベクターにライゲートさせ、たとえば株５２に基づく大腸菌宿主（Ｗ３１１０　ｆｕｈＡ（ｔｏｎＡ）　Ｉｏｎ　ｇａｌＥ　ｒｐｏＨ　ｔｓ（ｈｔｐＲｔｓ）　ｃｌｐＰ（ｌａｃＩｑ）の形質転換に使用できる。形質転換体をまず、５０ｍｇ／ｍｌのカルベニシリンを含有するＬＢ中、３０℃で振とうしながら、Ｏ．Ｄ．６００が３～５に達するまで増幅させることができる。次いで培養物をＣ　ＲＡＰ培地（下記を混合することにより調製：３．５７ｇの$(NH_4)_2SO_4$、０．７１ｇのクエン酸ナトリウム－$2H_2O$、１．０７ｇのＫＣｌ、５．３６ｇのＤｉｆｃｏ酵母エキス、５．３６ｇのＳｈｅｆｆｉｅｌｄ　ｈｙｃａｓｅ　ＳＦ、水５００ｍＬ中、ならびに１１０ｍＭのＭＰＯＳ、ｐＨ７．３、０．５５％（ｗ／ｖ）グルコースおよび７ｍＭの$MgSO_4$）中へ５０～１００倍希釈し、３０℃で約２０～３０時間、振とうしながら増殖させる。試料を分離し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析により発現を証明し、バルク細胞を遠心分離して細胞をペレット化する。細胞ペレットを精製およびリフォールディングまで凍結しておいた。

【０２７２】

０．５～１Ｌの発酵物からの大腸菌ペースト（６～１０ｇのペレット）を、１０容量（ｗ／ｖ）の７Ｍグアニジン、２０ｍＭトリス（Ｔｒｉｓ）、ｐＨ８緩衝液中に再懸濁した。固体亜硫酸ナトリウムおよびナトリウムテトラチオネートを添加して、それぞれ０．１Ｍおよび０．０２Ｍの最終濃度にし、溶液を４℃で一夜撹拌する。この工程により、すべてのシステイン残基がスルフィトライゼーション（ｓｕｌｆｉｔｏｌｉｚａｔｉｏｎ）で遮断された変性タンパク質が得られる。この溶液をＢｅｃｋｍａｎ超遠心機により４０，０００ｒｐｍで３０分間遠心分離した。上清を３～５容量の金属キレートカラム用緩衝液（６Ｍのグアニジン、２０ｍＭのトリス、ｐＨ７．４）で希釈し、０．２２ミクロンのフィルターで濾過して澄明にした。それに応じて、澄明にした抽出液を、金属キレートカラム用緩衝液中で平衡化した５ｍｉｌ　Ｑｉａｇｅｎ　Ｎｉ－ＮＴＡ金属キレートカラムに装填した。５０ｍＭのイミダゾール（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ，　Ｕｔｒｏｌグレード）を含有する他の緩衝液（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ，Ｕｔｒｏｌグレード）、ｐＨ７．４でカラムを洗浄した。２５０ｍＭのイミダゾールを含有する緩衝液で前記タンパク質を溶離した。目的タンパク質を含有する画分をプールし、４℃に保存した。２８０ｎｍにおけるその吸光度により、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いてタンパク質濃度を推定した。

【０２７３】

哺乳動物細胞における連続アミノ酸区域の発現

この一般例は、グリコシレーションされた形の目的とするアミノ酸配列またはポリペプチド構成要素を哺乳動物細胞において組換え発現により調製することを説明する。

【０２７４】

ベクターｐＲＫ５（参照：ＥＰ　３０７，２４７，１９８９年３月１５日公開）を発現ベクターとして使用できる。場合により、Sambrook et al.,前掲に記載されたライゲーション法により、選択した制限酵素を用いてエンコーディングＤＮＡをｐＲＫ５中へライゲ

ートさせて、ＤＮＡを挿入することができる。

【０２７５】

１態様において、選択した宿主細胞は２９３細胞であってもよい。ヒト２９３細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１５７３）を、組織培養プレート内で、ウシ胎仔血清ならびに場合により栄養成分および／または抗生物質を補充したＤＭＥＭなどの培地中において、周密状態まで増殖させる。約１０μｇのライゲートしたベクターＤＮＡを、ＶＡ　ＲＮＡ遺伝子をコードするＤＮＡ[Thimmappaya et al., Cell 31:543 (1982)]約１μｇと混合し、５００μｌの1mMトリス－ＨＣｌ、０．１mM　ＥＤＴＡ、０．２２７M　$CaCl_2$に溶解する。この混合物に、５００μｌの５０mM　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．３５）、２８０mM　ＮａＣｌ、１．５mM　$NaPO_4$を滴加し、２５℃で１０分間、沈殿を生成させる。沈殿を懸濁し、２９３細胞に添加し、３７℃で約４時間、沈降させる。培養培地を吸引除去し、ＰＢＳ中の２０％グリセロール２ｍｌを３０秒間添加する。次いで２９３細胞を無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約５日間インキュベートする。

【０２７６】

トランスフェクションの約２４時間後、培養培地を除去し、培養培地（単独）、または２００μＣｉ／ｍｌの^{35}Ｓ－システインおよび２００μＣｉ／ｍｌの^{35}Ｓ－メチオニンを含有する培養培地と交換する。１２時間のインキュベーション後、コンディショニングされた培地を採集し、スピンフィルターで濃縮し、１５％　ＳＤＳゲルに装填する。処理したゲルを乾燥させ、選択した期間、フィルムに露光して、目的とするアミノ酸配列またはポリペプチド構成要素の存在を解明することができる。トランスフェクションされた細胞を含有する培養物をさらにインキュベートし（無血清培地中で）、選択したバイオアッセイ法で培地を検査することができる。

【０２７７】

別法においては、目的とするアミノ酸配列またはポリペプチド構成要素の核酸を２９３細胞に、Somparyrac et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法により一過性導入することができる。２９３細胞をスピンナーフラスコ内で最大密度にまで増殖させ、ライゲートしたベクター７００μｇを添加する。細胞をまずスピンナーフラスコから遠心分離により濃縮し、ＰＢＳで洗浄する。ＤＮＡ－デキストラン沈殿を細胞ペレット上で４時間インキュベートする。細胞を２０％グリセロールで９０分間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、５μｇ／ｍｌのウシインスリンおよび０．１μｇ／ｍｌのウシトランスフェリンを入れたスピンナーフラスコ内へ再導入する。約４日後、コンディショニングされた培地を遠心分離し、濾過して細胞および細胞屑を除去する。次いで、発現した目的とするアミノ酸配列またはポリペプチド構成要素を含有する試料を濃縮し、いずれかの選択した方法、たとえば透析および／またはカラムクロマトグラフィーにより精製する。

【０２７８】

他の態様においては、目的とするアミノ酸配列またはポリペプチド構成要素をＣＨＯ細胞において発現させることができる。目的とするアミノ酸配列またはポリペプチド構成要素は、既知の試薬、たとえば$CaPO_4$またはＤＥＡＥ－デキストランを用いてＣＨＯ細胞中へトランスフェクションすることができる。前記のように、細胞培養物をインキュベートし、培地を培養培地（単独）、または^{35}Ｓ－メチオニンなどの放射性標識を含有する培地と交換することができる。目的とするアミノ酸配列またはポリペプチド構成要素の存在を判定した後、培養培地を無血清培地と交換することができる。好ましくは、培養物を約６日間インキュベートし、コンディショニングされた培地を次いで採集する。発現した目的とするアミノ酸配列またはポリペプチド構成要素を含有する培地を、次いで濃縮し、選択したいずれかの方法で精製することができる。

【０２７９】

エピトープタグ付きの目的とするアミノ酸配列またはポリペプチド構成要素を、宿主ＣＨＯ細胞において発現させることもできる。目的とするアミノ酸配列またはポリペプチド構成要素をｐＲＫ５ベクターからサブクローニングすることができる。サブクローン挿入

配列をＰＣＲ処理して、選択したエピトープタグ、たとえばポリ－ｈｉｓタグと読み枠を一致させてバキュロウイルス発現ベクター中へ融合させることができる。このポリ－ｈｉｓタグ付きの目的とするアミノ酸配列またはポリペプチド構成要素の挿入配列を、次いで安定クローンの選択のためのＤＨＦＲなどの選択マーカーを含むＳＶ４０駆動ベクター中へサブクローニングすることができる。最後に、ＣＨＯ細胞を（前記に従って）ＳＶ４０駆動ベクターでトランスフェクションすることができる。標識化を前記に従って実施して、発現を確証することができる。発現したポリ－ｈｉｓタグ付きの目的とするアミノ酸配列またはポリペプチド構成要素を含有する培養培地を、次いで濃縮し、選択したいずれかの方法、たとえばNi^{2+}－キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

【０２８０】

ある態様においては、目的とするアミノ酸配列またはポリペプチド構成要素をＩｇＧ構築体（イムノアドヘシン）として発現させることができる；その際、各タンパク質の可溶性形態のためのコード配列（たとえば細胞外ドメイン）は、ヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ２ドメインを含むＩｇＧ１構築体定常部配列に融合され、および／またはポリ－Ｈｉｓタグ付き形態である。

【０２８１】

ＰＣＲ増幅に続いて、各ＤＮＡをＣＨＯ発現ベクター中へ、Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997)に記載された標準法によりサブクローニングする。ＣＨＯ発現ベクターは、ｃＤＮＡの好都合なシャトリングを可能にするために、適合する制限部位を目的ＤＮＡの５’側および３’側にもつように構築される。ＣＨＯ細胞における発現に用いられるベクターは、Lucas et al., Nucl. Acids Res. 24:9 (1774-1779 (1996)に記載されたものであり、目的ｃＤＮＡおよびジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）の発現を駆動するためにＳＶ４０初期プロモーター／エンハンサーを用いる。ＤＨＦＲ発現により、トランスフェクション後に安定に維持されたプラスミドを選択することができる。

【０２８２】

酵母における連続アミノ酸の区域の発現

以下の方法は、希望する目的アミノ酸配列またはポリペプチド構成要素を酵母において組換え発現させることを記載する。

【０２８３】

まず、連続アミノ酸の区域をＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーターから細胞内産生または分泌させるための酵母発現ベクターを構築する。希望する目的アミノ酸配列またはポリペプチド構成要素をコードするＤＮＡ、選択したシグナルペプチドおよび前記プロモーターを、選択したプラスミド内の適切な制限酵素部位へ挿入して、目的とするアミノ酸配列またはポリペプチド構成要素の発現を指令する。分泌のためには、連続アミノ酸の区域をコードするＤＮＡを、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーターをコードするＤＮＡ、酵母アルファ－因子分泌シグナル／リーダー配列、およびリンカー配列（必要であれば）と共に、連続アミノ酸の区域を発現させるために、選択したプラスミド中へクローニングすることができる。

【０２８４】

酵母細胞、たとえば酵母株ＡＢ１１０を、次いで前記の発現プラスミドで形質転換し、選択した発酵培地中で培養することができる。形質転換酵母の上清を１０％トリクロロ酢酸で沈殿させ、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分離し、続いてゲルをクーマシーブルー染色で染色することにより分析できる。

【０２８５】

目的とする組換えアミノ酸配列またはポリペプチド構成要素は、次いで酵母細胞を発酵培地から遠心分離により除去し、選択したカートリッジフィルターで培地を濃縮することにより、単離および精製できる。目的とするアミノ酸配列またはポリペプチド構成要素を含有する濃縮物は、選択したカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製できる。

【０２８６】
バキュロウイルス感染させた昆虫細胞における連続アミノ酸の区域の発現
以下の方法は、バキュロウイルス感染させた昆虫細胞において連続アミノ酸の区域を組換え発現させることを記載する。
【０２８７】
連続アミノ酸の区域をコードする目的核酸を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させる。そのようなエピトープタグには、ポリ－ｈｉｓタグおよび免疫グロブリンタグ（たとえばＩｇＧのＦｃ領域）が含まれる。種々のプラスミドを使用でき、これには市販のプラスミド、たとえばｐＶＬ１３９３（Ｎｏｖａｇｅｎ）から誘導されたものが含まれる。要約すると、目的とするアミノ酸配列もしくはポリペプチド構成要素、または目的とするアミノ酸配列もしくはポリペプチド構成要素の希望する部分（たとえば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列）を、５’および３’領域に相補的なプライマーを用いるＰＣＲにより増幅させる。５’プライマーはフランキングする（選択した）制限酵素部位を含むことができる。次いで、選択した制限酵素で生成物を消化し、発現ベクター中へサブクローニングする。
【０２８８】
組換えバキュロウイルスは、前記プラスミドおよびＢａｃｕｌｏＧｏｌｄ（商標）ウイルスＤＮＡ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）をツマジロクサヨトウ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）（“Ｓｆ９”）細胞（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １７１１）内へ、リポフェクチン（ＧＩＢＣＯ－ＢＲＬから市販）により共トランスフェクションすることによって作製できる。２８℃で４～５日間インキュベートした後、放出されたウイルスを収穫し、以後の増幅に用いる。ウイルス感染およびタンパク質発現は、O’Reilley et al., Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)の記載に従って実施される。
【０２８９】
ポリ－ｈｉｓタグ付きの目的とするアミノ酸配列もしくはポリペプチド構成要素を、次いで下記に従って、たとえばNi^{2+}－キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。抽出物を組換えウイルス感染させたＳｆ９細胞から、Rupert et al., Nature, 362:175-179 (1993)に従って調製する。要約すると、Ｓｆ９細胞を超音波処理緩衝液（２５ｍＬ Ｈｅｐｅｓ，ｐＨ７．９；１２．５ｍＭ $MgCl_2$；０．１ｍＭ ＥＤＴＡ；１０％グリセロール；０．１％ ＮＰ４０；０．４Ｍ ＫＣｌ）で洗浄および再懸濁し、氷上で２０秒間、２回、超音波処理する。超音波処理物を遠心分離で澄明にし、上清を装填用緩衝液（５０ｍＭリン酸塩，３００ｍＭ ＮａＣｌ，１０％グリセロール，ｐＨ７．８）で５０倍希釈し、０．４５μｍフィルターにより濾過する。Ni^{2+}－ＮＴＡアガロースカラム（Ｑｉａｇｅｎから市販）をベッド容量５ｍＬで調製し、２５ｍＬの水で洗浄し、２５ｍＬの装填用緩衝液で平衡化する。濾過した細胞抽出物をカラムに０．５ｍＬ／分で装填する。カラムをベースラインA_{280}まで装填用緩衝液で洗浄し、この時点で画分採集を開始する。次いでカラムを二次洗浄用緩衝液（５０ｍＭリン酸塩；３００ｍＭ ＮａＣｌ，１０％グリセロール，ｐＨ６．０）で洗浄すると、非特異的に結合していたタンパク質が溶出する。再びA_{280}ベースラインに達した後、カラムを二次洗浄用緩衝液中の０－５００ｍＭイミダゾール勾配で展開する。１ｍＬ画分を採集し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよび銀染色、またはアルカリ性ホスファターゼにコンジュゲートしたNi^{2+}－ＮＴＡ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いるウスタンブロットにより分析する。溶出したHis_{10}－タグ付き配列をプールし、装填用緩衝液に対して透析する。
【０２９０】
あるいは、ＩｇＧタグ付き（またはＦｃタグ付き）アミノ酸配列の精製は、たとえばプロテインＡまたはプロテインＧカラムクロマトグラフィーを含む既知のクロマトグラフィー法により実施できる。
【０２９１】
タンパク質のイムノアドヘシン（Ｆｃを含む）構築体は、コンディショニングされた培

地から下記に従って精製できる。コンディショニングされた培地を、２０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液、ｐＨ６．８中で平衡化した５ｍｌのプロテインＡカラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）に送入する。装填後、カラムを平衡用緩衝液で十分に洗浄した後に１００ｍＭクエン酸、ｐＨ３．５で溶離する。２７５ｍＬの１Ｍトリス緩衝液、ｐＨ９を入れた試験管中へ１ｍｌ画分を採集することにより、溶離したタンパク質を直ちに中和する。この高度に精製されたタンパク質を、次いで脱塩して、ポリ－Ｈｉｓタグ付きタンパク質について前記に述べた保存用緩衝液に入れる。タンパク質の均質性を、ＳＤＳポリアクリルアミドゲル（ＰＥＧ）電気泳動およびエドマン分解による末端アミノ酸配列決定により証明する。

【０２９２】

インテインベースのＣ－末端合成

たとえばU．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ　６，８４９，４２８、２００５年2月1日発行に記載されるように、インテインは自己スプライシングＲＮＡイントロンのタンパク質均等物であり（参照：Perler et al., Nucleic Acids Res. 22:1125-1127 (1994))、前駆タンパク質からのそれら自身の切除を触媒し、同時に、エクステイン（ｅｘｔｅｉｎ）として知られるフランキングタンパク質配列を融合させる(Perler et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 1:292-299 (1997); Perler, F. B. Cell 92(1):1-4 (1998); Xu et al., EMBO J. 15(19):5146-5153 (1996)に概説)。

【０２９３】

インテインスプライシングの機序の研究により、Ｓｃｅ　ＶＭＡインテインのＮ－末端におけるペプチド結合のチオール誘導開裂を利用するタンパク質精製系が開発された(Chong et al., Gene 192(2):271-281 (1997))。このインテイン仲介系を用いる精製により、Ｃ－末端チオエステルをもつ細菌発現タンパク質が生成する(Chong et al., (1997))。細胞傷害性タンパク質を単離するためと記載されている１用途においては、このＣ－末端チオエステルをもつ細菌発現タンパク質を、次いでＮ－末端システインをもつ化学合成ペプチドに、“自然化学ライゲーション（ｎａｔｉｖｅ　ｃｈｅｍｉｃａｌ　ｌｉｇａｔｉｏｎ）”について記載された化学的方法で融合させる(Evans et al., Protein Sci. 7:2256-2264 (1998); Muir et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6705-6710 (1998))。

【０２９４】

“インテイン仲介タンパク質ライゲーション”（ＩＰＬ）と呼ばれるこの技術は、タンパク質の半合成技術における重要な進歩である。しかし、ライゲーションパートナーとして化学合成ペプチドが要求されることにより、約１００残基より大きな化学合成ペプチドは入手が困難であるため、全般的なＩＰＬ利用が制限されていた。

【０２９５】

予め定めたＮ－末端、たとえばシステインをもつ発現タンパク質が調製された時点で、ＩＰＬ技術は著しく拡張された；たとえばU．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ．６，８４９，４２８に記載。これにより、細菌、酵母または哺乳動物細胞などの宿主細胞から発現させた１以上のタンパク質を融合させることが可能になる。限定ではないが、インテインの一例においては、Ｃ－末端またはＮ－末端のいずれかで開裂する改変ＲＩＲ１メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカム（Ｍｅｔｈａｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｈｅｒｍｏａｕｔｏｔｒｏｐｈｉｃｕｍ）を使用する；これにより１カラム精製中に細菌発現タンパク質の放出が可能となり、こうしてプロテアーゼの必要性が完全に除かれる。

【０２９６】

インテイン技術は、構成要素を得るための１経路の一例である。１態様において、本発明化合物のサブユニットは、成熟キメラポリペプチドを発現および分泌しうる適切な細胞をトランスフェクションすることにより得られる；その際、それらのポリペプチドは、たとえば単離しうるＣ－末端インテインドメインに接したアドヘシンドメインを含む（参照：U．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ．６，８４９，４２８，Ｅｖａｎｓら，２００５年2月1日発行、本明細書に援用する）。哺乳動物細胞または細菌細胞などの細胞を既知の組換えＤＮＡ技術によりトランスフェクションする。次いで、分泌されたキメラポリペプチドを、インテイン－キチン結合ドメインの場合はたとえばキチン誘導体化樹脂を用いて単離す

ることができ（参照：Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ．６，８９７，２８５，Ｘｕら，２００５年５月２４日発行、本明細書に援用する)、次いでチオール仲介による開裂およびこの時点ではＣ－末端側チオエステル末端付きであるアドヘシンサブユニットの放出が可能な条件下で処理する。チオエステル末端付きアドヘシンサブユニットは容易にＣ－末端側システイン末端付きサブユニットに変換される。

【０２９７】

これらのサブユニットを酸化条件下で処理して、たとえば２つの末端システイン残基間にジスルフィド結合を形成することができ、こうしてシンメトロアドヘシンが形成される。さらにこの技術を利用して、個々のアドヘシン－Ｆｃヘテロ二量体をヘテロ二量体のＦｃ部分間で結合を形成しうる条件下で処理することにより、シンメトロアドヘシン－Ｆｃハイブリッドサブユニットを作製することができる。

【実施例】

【０２９８】

実施例１

Ｎ－末端側－Ｓ－末端をもつ免疫グロブリンＦｃ（Ｓ－Ｆｃ）の調製

免疫グロブリン（ＩｇＧ）をパパインで消化すると、２つのＦａｂフラグメントと１つのＦｃフラグメントが得られる(Porter (1959) Biochem. 73, 119-126)。ヒトＩｇＧのタンパク質分解部位は重鎖ヒンジ部のｃｙｓ－５残基とｃｙｓ－１１残基の間である；ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（Fleischman et al., Biochem J. (1963) 88, 220-227; Edelman et al. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. 63, 78-85)。ｃｙｓ－５残基は普通はヒトＩｇＧ軽鎖とジスルフィド結合を形成し、これは緩和な還元条件下で容易に開裂し、このためＮ－末端側－Ｓ－末端をもつＦｃ様分子（Ｓ－Ｆｃ）の理想的な候補となる。

【０２９９】

したがって、シグナルペプチドがそれのＣ－末端においてペプチド結合によりｃｙｓ－５で始まるＦｃドメインのＮ－末端、ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ、に連結したものからなるＩｇＧ１プレ－Ｆｃキメラポリペプチド（図３５Ａ）をコードする発現ベクターで、宿主細胞をトランスフェクションした。用いたヘテロロガスシグナルペプチドは、Ｎ－末端システインをもつタンパク質から選択される（パートｉ）。したがって、細胞性シグナルペプチダーゼにより開裂すると、Ｎ－末端にｃｙｓ－５をもつ成熟Ｓ－Ｆｃタンパク質が生成するであろう（パートｉｉ）。

【０３００】

図３５ＡのＩｇＧ１前駆体ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３２、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３３およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４に示す。図３５Ａの成熟ＩｇＧ１ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５に示す。実施例１～５に記載した方法により調製した他の成熟ＩｇＧ１ポリペプチドをＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６～ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６に示す。

【０３０１】

シグナルペプチドがそれのＣ－末端においてペプチド結合によりｃｙｓ－４で始まるＦｃドメインのＮ－末端、ＣＣＶＥＣＰＰＣＰ、に連結したものからなるＩｇＧ２プレ－Ｆｃキメラポリペプチド（図３５Ｂ）をコードする発現ベクターで、宿主細胞をトランスフェクションした。用いたヘテロロガスシグナルペプチドは、Ｎ－末端システインをもつタンパク質から選択される（パートｉ）。したがって、細胞性シグナルペプチダーゼにより開裂すると、Ｎ－末端にｃｙｓ－４をもつ成熟Ｓ－Ｆｃタンパク質が生成するであろう（パートｉｉ）。

【０３０２】

図３５ＢのＩｇＧ２前駆体ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５０、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５１およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５２に示す。図３５Ｂの成熟ＩｇＧ２ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５３に示す。実施例１～５に記載した方法により調製した他の成熟ＩｇＧ２ポリペプチドをＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５４～ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６７に示す。

【０３０３】
シグナルペプチドがそれのＣ－末端においてペプチド結合によりｃｙｓ－１３で始まるＦｃドメインのＮ－末端、ＣＰＲＣＰ、に連結したものからなるＩｇＧ３プレ－Ｆｃキメラポリペプチド（図３５Ｃ）をコードする発現ベクターで、宿主細胞をトランスフェクションした。用いたヘテロロガスシグナルペプチドは、Ｎ－末端システインをもつタンパク質から選択される（パートｉ）。したがって、細胞性シグナルペプチダーゼにより開裂すると、Ｎ－末端にｃｙｓ－１３をもつ成熟Ｓ－Ｆｃタンパク質が生成するであろう（パートｉｉ）。
【０３０４】
図３５ＣのＩｇＧ３前駆体ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７１、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７２およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７３に示す。図３５Ｃの成熟ＩｇＧ２ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７４に示す。実施例１～５に記載した方法により調製した他の成熟ＩｇＧ２ポリペプチドをＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７５～ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８２に示す。
【０３０５】
シグナルペプチドがそれのＣ－末端においてペプチド結合によりｃｙｓ－８で始まるＦｃドメインのＮ－末端、ＣＰＳＣＰ、に連結したものからなるＩｇＧ４プレ－Ｆｃキメラポリペプチド（図３５Ｄ）をコードする発現ベクターで、宿主細胞をトランスフェクションした。用いたヘテロロガスシグナルペプチドは、Ｎ－末端システインをもつタンパク質から選択される（パートｉ）。したがって、細胞性シグナルペプチダーゼにより開裂すると、Ｎ－末端にｃｙｓ－８をもつ成熟Ｓ－Ｆｃタンパク質が生成するであろう（パートｉｉ）。
【０３０６】
図３５ＤのＩｇＧ４前駆体ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８６、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８７およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８８に示す。図３５Ｃの成熟ＩｇＧ２ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８９に示す。実施例１～５に記載した方法により調製した他の成熟ＩｇＧ４ポリペプチドをＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９０～ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９７に示す。
【０３０７】
適切な宿主細胞には、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（メリーランド州ロックビル）から入手した２９３ヒト胚細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５７３）およびＣＨＯ－Ｋ１ハムスター卵巣細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－６１）が含まれる。細胞を３７℃で、空気９５％：二酸化炭素５％の雰囲気において増殖させる。２９３細胞は、最小必須培地（イーグル）中に維持される：２ｍＭのＬ－グルタミンおよびＥａｒｌｅのＢＳＳを含み、１．５ｇ／Ｌの炭酸水素ナトリウム、０．１ｍＭの非必須アミノ酸、および１．０ｍＭのピルビン酸ナトリウム、９０％；ウシ胎仔血清１０％を含有するように調整。ＣＨＯ－Ｋ１細胞は、ＨａｍのＦ１２Ｋ培地中に維持される：２ｍＭのＬ－グルタミンを含み、１．５ｇ／Ｌの炭酸水素ナトリウム、９０％；ウシ胎仔血清１０％を含有するように調整。他の適切な宿主細胞には、下記のものが含まれる：ＣＶ１サル腎細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－７０）、ＣＯＳ－７サル腎細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１６５１）、ＶＥＲＯ－７６サル腎細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５８７）、ＨＥＬＡヒト子宮頚細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－２）、Ｗ１３８ヒト肺細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－７５）、ＭＤＣＫイヌ腎細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－３４）、ＢＲＬ３Ａラット肝細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１４４２）、ＢＨＫハムスター腎細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－１０）、ＭＭＴ０６０５６２マウス乳腺細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－５１）、およびヒトＣＤ８$^{+}$　Ｔリンパ球（Ｕ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０８／２５８，１５２に記載、その全体を本明細書に援用する）。
【０３０８】
適切な発現ベクターの例は、プラスミドｐＳＡ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）である。プラスミドｐＳＡは下記のＤＮＡ配列エレメントを含む：１）ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩＫＳ（＋）（ヌクレオチド９１２－２９４１／１－６１９，ＧｅｎＢａｎｋ寄託Ｎｏ．Ｘ

５２３２７）、２）ヒトサイトメガロウイルスプロモーター、エンハンサー、および第１エキソンスプライスドナー（ヌクレオチド６３－９１２，ＧｅｎＢａｎｋ寄託Ｎｏ．Ｋ０３１０４）、３）ヒトアルファ１－グロビン第２エキソンスプライスアクセプター（ヌクレオチド６８０８－６９１９，ＧｅｎＢａｎｋ寄託Ｎｏ．Ｊ００１５３）、４）ＳＶ４０Ｔ抗原ポリアデニル化部位（ヌクレオチド２７７０－２５３３，Reddy et al. (1978) Science 200, 494-502)、および５）ＳＶ４０複製起点（ヌクレオチド５７２５－５５７８，Reddy et al., 同書)。目的ポリペプチドの発現のために、そのポリペプチドをコードするＥｃｏＲＩ－ＢｇｌＩＩ　ＤＮＡフラグメントを、プラスミドｐＳＡのそれぞれ１，６０８および１，６３２に位置するＥｃｏＲＩ制限部位とＢｇｌＩＩ制限部位の間に挿入する。他の適切な発現ベクターには、下記のものが含まれる：プラスミドｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲおよびｐＲＫＣＤ４（Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．５，３３６，６０３）、プラスミドｐＩＫ．１．１（Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．５，３５９，０４６）、プラスミドｐＶＬ－２（Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．５，８３８，４６４）、プラスミドｐＲＴ４３．２Ｆ３（Ｕ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０８／２５８，１５２に記載、その全体を本明細書に援用する）、ならびにプラスミドｐＣＤＮＡ３．１（＋）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｉｎｃ．）。

【０３０９】

適切な選択マーカーには、Ｔｎ５トランスポゾンネオマイシンホスホトランスフォラーゼ（ＮＥＯ）遺伝子(Southern and Berg (1982) J. Mol. Appl. Gen. 1, 327-341)、およびジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）ｃＤＮＡ（Lucas et al. (1996) Nucl. Acids Res. 24, 1774-1779)が含まれる。ＮＥＯ遺伝子を含む適切な発現ベクターの一例はプラスミドｐＳＡ－ＮＥＯであり、これはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２をＥｃｏＲＩおよびＢｇｌＩＩで消化することにより調製した第１ＤＮＡフラグメントと、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１をＥｃｏＲＩおよびＢｇｌＩＩで消化することにより調製した第２ＤＮＡフラグメントとをライゲートさせることにより構築される。ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２はＮＥＯ遺伝子（ヌクレオチド１５５１－２３４５，Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．Ｕ００００４）を含み、その前に転写開始配列を含む(Kozak (1991) J. Biol. Chem, 266, 19867-19870)。ＮＥＯ遺伝子およびＤＨＦＲ　ｃＤＮＡを含む適切な他の発現ベクターの例は、プラスミドｐＳＶｅ－ＮＥＯ－ＤＨＦＲであり、これはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２をＥｃｏＲＩおよびＢｇｌＩＩで消化することにより調製した第１ＤＮＡフラグメントと、ｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲをＥｃｏＲＩおよびＢｇｌＩＩで消化することにより調製した第２ＤＮＡフラグメントとをライゲートさせることにより構築される。プラスミドｐＳＶｅ－ＮＥＯ－ＤＨＦＲには、ＮＥＯ遺伝子およびＤＨＦＲ　ｃＤＮＡの発現を誘導するためにＳＶ４０初期プロモーター／エンハンサーが用いられる。他の適切な選択マーカーには、ＸＰＧＴ遺伝子(Mulligan and Berg (1980) Science 209, 1422-1427)およびハイグロマイシン耐性遺伝子(Sugden et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5, 410-413)が含まれる。

【０３１０】

ヒトＩｇＧ１のＤＮＡ配列は、Ellison et al. (1982) Nuc. Acids Res. 10, 4071-4079)（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．Ｚ１７３７０）に記載されている。

シグナルペプチドの適切な例は、ソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）（ＧｅｎＢａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿０００１９３）、インターフェロンα－２（ＩＦＮ）（ＧｅｎＢａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＰ＿０００５９６）、およびコレステロールエステルトランスフェラーゼ（ＣＥＴＰ）（ＧｅｎＢａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿０００００７８）である。他の適切な例には、下記のものが含まれる：インディアンヘッジホッグ（Ｉｎｄｉａｎ　ｈｅｄｇｅｈｏｇ）（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００２１８１）、デザートヘッジホッグ（ｄｅｓｅｒｔ　ｈｅｄｇｅｈｏｇ）（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿０２１０４４）、ＩＦＮα－１（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＰ＿０７６９１８）、ＩＦＮα－４（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿０２１０６８）、ＩＦＮα－５（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００２１６９）、ＩＦＮα－６（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿０２１００２）、ＩＦＮα－７（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿０２１０５７）、ＩＦＮα－８（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００２１７０）、ＩＦＮα－１０（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００

２１７１）、ＩＦＮα－１３（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００６９００）、ＩＦＮα－１４（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００２１７２）、ＩＦＮα－１６（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００２１７３）、ＩＦＮα－１７（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿０２１２６８）およびＩＦＮα－２１（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００２１７５）。

【０３１１】

適切な発現ベクターは、ＥｃｏＲＩおよびＢｇｌＩＩで消化することにより調製した挿入フラグメントおよびベクターフラグメントのライゲーションにより構築される。非増幅発現のために、プラスミドｐＳＨＨ－Ｆｃ５（ＳＨＨシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築され、プラスミドｐＩＦＮ－Ｆｃ５（ＩＦＮシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築され、プラスミドｐＣＥＴＰ－Ｆｃ５（ＣＥＴＰシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築される。増幅発現のために、プラスミドｐＳＨＨ－Ｆｃ５－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲ（Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ．５，３３６，６０３）を用いて構築され、ｐＩＦＮ－Ｆｃ５－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築され、ｐＣＥＴＰ－Ｆｃ５－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築される。

【０３１２】

ヒトＩｇＧ１　Ｆｃポリペプチドに適切な発現ベクターは、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩおよびＥａｇＩで消化することにより調製した挿入フラグメントとＨｉｎｄ　ＩＩＩおよびＰｓｐＯＭ１で消化することにより調製したベクターフラグメントのライゲーションにより構築された。プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＳＨＨ－ＩｇＧ１－Ｆｃ（ＳＨＨシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２９およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築され、プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＩＦＮ－ＩｇＧ１－Ｆｃ（ＩＦＮシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築され、プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＩｇＧ１－Ｆｃ（ＣＥＴＰシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３１およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築された。

【０３１３】

ヒトＩｇＧ２　Ｆｃポリペプチドに適切な発現ベクターは、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩおよびＥａｇＩで消化することにより調製した挿入フラグメントとＨｉｎｄ　ＩＩＩおよびＰｓｐＯＭ１で消化することにより調製したベクターフラグメントのライゲーションにより構築される。プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＳＨＨ－ＩｇＧ２－Ｆｃ（ＳＨＨシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築され、プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＩＦＮ－ＩｇＧ２－Ｆｃ（ＩＦＮシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４８およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築され、プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＩｇＧ２－Ｆｃ（ＣＥＴＰシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。

【０３１４】

ヒトＩｇＧ３　Ｆｃポリペプチドに適切な発現ベクターは、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩおよびＥａｇＩで消化することにより調製した挿入フラグメントとＨｉｎｄ　ＩＩＩおよびＰｓｐＯＭ１で消化することにより調製したベクターフラグメントのライゲーションにより構築される。プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＳＨＨ－ＩｇＧ３－Ｆｃ（ＳＨＨシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６８およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築され、プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＩＦＮ－ＩｇＧ３－Ｆｃ（ＩＦＮシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６９およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築され、プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＩｇＧ３－Ｆｃ（ＣＥＴＰシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７０およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。

【０３１５】

ヒトＩｇＧ４　Ｆｃポリペプチドに適切な発現ベクターは、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩおよびＥ

ａｇＩで消化することにより調製した挿入フラグメントとＨｉｎｄ　ＩＩＩおよびＰｓｐＯＭ１で消化することにより調製したベクターフラグメントのライゲーションにより構築される。プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＳＨＨ－ＩｇＧ４－Ｆｃ（ＳＨＨシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８３およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築され、プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＩＦＮ－ＩｇＧ４－Ｆｃ（ＩＦＮシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８４およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築され、プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＩｇＧ４－Ｆｃ（ＣＥＴＰシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。

【０３１６】

１態様においては、Graham et al. (1977) J. Gen. Virol. 36, 59-74のリン酸カルシウム法により細胞をトランスフェクションする。ＤＮＡ混合物（１０マイクログラム）を、０．５ｍｌの１ｍＭトリス－ＨＣｌ、０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ、および２２７ｍＭ　$CaCl_2$に溶解する。このＤＮＡ混合物は、発現ベクターＤＮＡ、選択マーカーＤＮＡ、およびＶＡ　ＲＮＡ遺伝子をコードするＤＮＡ(Thimmappaya et al. (1982) Cell 31, 543-551)を含有する（１０：１：１の比率で）。この混合物に、０．５ｍＬの５０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ（ｐＨ７．３５）、２８０ｍＭ　ＮａＣｌ、および１．５ｍＭ　$NaPO_4$を滴加する。ＤＮＡ沈殿を２５℃で１０分間生成させ、次いで懸濁し、１００ｍｍのプラスチック培養皿上で周密状態まで増殖させた細胞に添加する。３７℃で４時間後、培養培地を吸引し、ＰＢＳ中の２０％グリセロール２ｍｌを０．５分間添加する。次いで細胞を無血清培地で洗浄し、新鮮な培養培地を添加し、細胞を５日間インキュベートする。

【０３１７】

他の態様においては、Somparyrac et al. (1981) Proc. Nat. Acad. Sci. 12, 7575-7579のデキストラン硫酸法により細胞を一過性トランスフェクションする。細胞をスピンナーフラスコ内で最大密度にまで増殖させ、遠心分離により濃縮し、ＰＢＳで洗浄する。ＤＮＡ－デキストラン沈殿を細胞ペレット上でインキュベートする。３７℃で４時間後、ＤＮＡ－デキストランを吸引し、ＰＢＳ中の２０％グリセロールを１．５分間添加する。次いで細胞を無血清培地で洗浄し、５マイクログラム／ｍｌのウシインスリンおよび０．１マイクログラム／ｍｌのウシトランスフェリングを含む新鮮な培養培地を入れたスピンナーフラスコ内へ再導入し、細胞を４日間インキュベートする。いずれかの方法でトランスフェクションした後、コンディショニングされた培地を遠心分離し、濾過して宿主細胞および細胞屑を除去する。次いで、Ｓ－Ｆｃドメインを含む試料を濃縮し、いずれかの選択した方法、たとえば透析および／またはカラムクロマトグラフィーにより精製する（下記を参照）。

【０３１８】

細胞培養上清中のＳ－Ｆｃを同定するために、トランスフェクションの２４時間後に培養培地を分離し、それぞれ２００マイクロＣｉ／ｍｌの^{35}Ｓ－メチオニンおよび^{35}Ｓ－システインを含有する培養培地と交換する。１２時間のインキュベーション後、遠心分離して宿主細胞および細胞屑を除去することにより、コンディショニングされた培地を採集し、スピン透析フィルターで濃縮する。標識された上清を、添加抗体の不存在下でプロテインＡセファロースビーズを用いる免疫沈降法により分析する。沈降したタンパク質を、β-メルカプトエタノールにより還元して、または還元せずに、７．５％ポリアクリルアミド－ＳＤＳゲル上で分析する。処理したゲルを乾燥させ、ｘ線フィルムに露光して、Ｓ－Ｆｃドメインの存在を明らかにする。

【０３１９】

非増幅発現のために、プラスミドｐＳＨＨ－Ｆｃ－５、ｐＩＦＮ－Ｆｃ－５およびｐＣＥＴＰ－Ｆｃ－５をヒト２９３細胞内へ(Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 74 (1977))、効率の高い方法(Gorman et al., DNA Prot. Eng. Tech. 2:3 10 (1990))によりトランスフェクションする。培地を無血清のものに交換し、５日目まで毎日収穫する。Ｓ－Ｆｃタンパク質を、細胞曝露した上清からプロテインＡ－セファロースＣＬ－４Ｂ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）により精製する。溶出したＳ－Ｆｃタンパク質をＣｅｎｔｒｉｃｏｎ－３

０（Ａｍｉｃｏｎ）によりＰＢＳ中へ緩衝液交換し、０．５ｍｌに濃縮し、Ｍｉｌｌｅｘ－ＧＶ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を用いて無菌濾過し、４℃に保存する。

【０３２０】

非増幅発現のために、プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＳＨＨ－ＩｇＧ１－Ｆｃ、ｐＣＤＡ３－ＩＦＮ－ＩｇＧ１－ＦｃおよびｐＣＤＡ－３－ＣＥＴＰ－ＩｇＧ１－Ｆｃをヒト２９３細胞内へ（Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 74 (1977))、効率の高い方法(Gorman et al., DNA Prot. Eng. Tech. 2:3 10 (1990))によりトランスフェクションする。培地を無血清のものに交換し、５日目まで毎日収穫する。Ｓ－Ｆｃタンパク質を、細胞曝露上清からプロテインＡ－セファロースＣＬ－４Ｂ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）により精製する。溶出したＳ－Ｆｃタンパク質をＣｅｎｔｒｉｃｏｎ－３０（Ａｍｉｃｏｎ）により、ＰＢＳ中へ緩衝液交換し、０．５ｍｌに濃縮し、Ｍｉｌｌｅｘ－ＧＶ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を用いて無菌濾過し、４℃に保存する。

【０３２１】

図５２は、２９３腎細胞におけるＮ－末端側－Ｓ－末端をもつヒトＩｇＧ１　Ｆｃシンメトロアドヘシンサブユニットの発現を示す。列１～６および列７～１２は、それぞれ図３５Ａ（ｉｉ）および図３６Ａ（ｉｉ）のＩｇＧ１　Ｆｃポリペプチドを示す。細胞上清：列１、３、５、７、９および１１；細胞溶解物：列２、４、６、８、１０および１２。用いたシグナル配列：ＳＨＨ（列１、２、７および８）；ＩＦＮＡ（列３、４、９、１０）；ＣＥＴＰ（列５、６、１１および１２）。

【０３２２】

図５３は、２９３腎細胞におけるヒトＩｇＧ１　Ｆｃシンメトロアドヘシンサブユニットの発現を示す。列１～２、３～４および列５～６は、それぞれ図３５Ａ（ｉｉ）、図３６Ａ（ｉｉ）および図３７Ｂ（ｉｉ）のＩｇＧ１　Ｆｃポリペプチドを示す。細胞上清：列１～６。用いたシグナル配列：ＳＨＨ（列１～６）。

【０３２３】

図５４は、２９３腎細胞に発現したヒトＩｇＧ１　Ｆｃシンメトロアドヘシンサブユニットの精製を示す。列２および８は、それぞれ図３６Ａおよび図３５ＡのＩｇＧ１　Ｆｃポリペプチドを示す。列１～７：図３６ＡのＩｇＧ１　Ｆｃポリペプチドに関するプロテインＡ－セファロースカラム画分。

【０３２４】

図５５は、図５４に示したプロテインＡ－精製ヒトＩｇＧ１　Ｆｃシンメトロアドヘシンサブユニットのチオール－セファロース結合を示す。列１～３および列４～６は、それぞれ図３５Ａおよび図３６ＡのヒトＩｇＧ１　Ｆｃポリペプチドを示す。列１および４：出発材料；列２および５：チオール－セファロース通過画分；列３および６：チオール－セファロース結合画分。

【０３２５】

図３５Ａおよび図３６Ａの２つのＩｇＧ１　Ｆｃポリペプチドの質量分析（ＭＡＬＤＩ）による分析により、それぞれ５４，５５２．８５および５３，１７３．４３ダルトンの平均分子質量が明らかである。それらの分子質量それぞれがＦｃ二量体に相応すると推定して、２つのポリペプチド間の見掛けの分子質量差（１，３７９．４ダルトン）は分子質量の推定差（１，３７１．５）と良好に一致する（０．６％の偏差）。

【０３２６】

増幅発現のために、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞を、ＤＨＦＲ　ｃＤＮＡを共発現するジシストロンベクターｐＳＨＨ－Ｆｃ５－ＤＨＦＲ、ｐＩＦＮ－Ｆｃ－５－ＤＨＦＲおよびｐＣＥＴＰ－Ｆｃ－５－ＤＨＦＲでトランスフェクションする。L. Chasin（Ｃｏｌｕｍｂｉａ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ）が開発したＣＨＯ－Ｋ１　ＤＵＸ　Ｂ１１細胞にプラスミドをリポフェクションにより導入し、無ＧＨＴ培地中での増殖について選択する(Chisholm (1996), 哺乳動物細胞における高効率の遺伝子伝達: Glover, D M, Hames, B D. DNA Cloning vol 4. Mammalian systems. Oxford Univ. Press, pp 1-41)。約２０の未増幅クローンをランダムに選択し、９６ウェルプレートに再播種する。３日

後に各ウェルに蓄積したＳ－Ｆｃタンパク質の定量のためのＥＬＩＳＡ、およびウェル当たりの可視細胞数の代理マーカーとしての蛍光色素Ｃａｌｃｉｅｎ　ＡＭを用いて、各コロニーの比生産性をモニターする。これらのデータに基づいて、漸増濃度のメトトレキセートの存在下でさらに増幅させるために、幾つかの未増幅クローンを選択する。１０、５０および１００ｎＭのメトトレキセートで生存した個々のクローンを選択し、生産性スクリーニングのために９６ウェルプレートへ移す。再現性をもって高い比生産性を示す適切なクローンをＴ－フラスコ内で増殖させ、スピンナー培養に播種するために使用する。数代の継代後、懸濁適合した細胞を、各種ホルモンおよびタンパク質水解物を補充したＧＨＴ含有－無血清培地での生産培養に播種する。収穫したＳ－Ｆｃタンパク質を含有する細胞培養液を、プロテインＡ－セファロースＣＬ－４Ｂにより精製する。

【０３２７】

実施例２

Ｎ－末端側－Ｘ－末端をもつ免疫グロブリンＦｃ（Ｘ－Ｆｃ）の調製

セレノシステイン（ｓｅｃ）は、リボソーム仲介タンパク質合成に際して２１番目に取り込まれるアミノ酸である(Zinoni et al. (1986) Proc. Natl Acad. Sci. 83, 4650-4654; Chambers et al. (1986) EMBO J. 5, 1221-1227)。このプロセスは複雑であり、システイン取込みとは異なり、ＵＧＡ停止コドンを解読するためのｍＲＮＡセレノシステイン挿入エレメントを必要とする。タンパク質半合成により、システイン（ｃｙｓ）および／またはセレノシステイン（ｓｅｃ）で始まるＮ－末端側－Ｘ－末端をもつＦｃ様の分子（Ｘ－Ｆｃ）を調製する手段が得られる。

【０３２８】

したがって、シグナルペプチドがそれのＣ－末端においてペプチド結合によりｃｙｓ－１１で始まるＦｃドメインのＮ－末端、ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（図３６Ａ）、およびｃｙｓ－１４で始まるＦｃドメインのＮ－末端、ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（図３６Ｂ）、に連結したものからなるプレ－Ｆｃキメラポリペプチドをコードする構築体で、宿主細胞をトランスフェクションする。用いられるヘテロロガスシグナルペプチドは、Ｎ－末端システインをもつタンパク質から選択される（パートｉ）。したがって、細胞性シグナルペプチダーゼにより開裂されると、Ｎ－末端にｃｙｓ－１１をもつ成熟Ｓ－Ｆｃが生成するであろう（パートｉｉ）。次いで、自然化学ライゲーションを利用して、Ｎ－末端にｃｙｓ－５またはｓｅｃ－５をもつ、ＸＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ、成熟Ｘ－Ｆｃタンパク質を調製する（パートｉｉｉ）。

【０３２９】

図３６ＡのＩｇＧ１前駆ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０１、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０２、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０３に示す。図３６Ａの成熟ＩｇＧ１ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０４に示す。図３６ＢのＩｇＧ１前駆ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０９、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１０、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１１に示す。図３６Ｂの成熟ＩｇＧ１ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１２に示す。

【０３３０】

したがって、シグナルペプチドがそれのＣ－末端においてペプチド結合によりｃｙｓ－１４で始まるＦｃドメインのＮ－末端、ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ、に連結したものからなるプレ－Ｆｃキメラポリペプチド（図３６Ｂ）をコードする構築体で、宿主細胞をトランスフェクションする。用いられるヘテロロガスシグナルペプチドは、Ｎ－末端システインをもつタンパク質から選択される（パートｉ）。したがって、細胞性シグナルペプチダーゼにより開裂されると、Ｎ－末端にｃｙｓ－１１をもつ成熟Ｓ－Ｆｃが生成するであろう（パートｉｉ）。次いで、自然化学ライゲーションを用いて、Ｎ－末端にｃｙｓ－１１またはｓｅｃ－１１、ＸＰＰＣＰをもつ成熟Ｘ－Ｆｃタンパク質を調製する（パートｉｉｉ）。

【０３３１】

実施例１に記載した方法を用いて、Ｎ－末端にｃｙｓ－１１およびｃｙｓ－１４をもつ

Ｓ－Ｆｃタンパク質をまず調製する。Ｓ－Ｆｃタンパク質とペプチドＦｃ－Ａ（５－１１：ｃｙｓ－ａｓｐ－ｌｙｓ－ｔｈｒ－ｈｉｓ－ｔｈｒ）またはＳ－Ｆｃタンパク質とペプチドＦｃ－Ｂ（５－１１：ｓｅｃ－ａｓｐ－ｌｙｓ－ｔｈｒ－ｈｉｓ－ｔｈｒ）の自然化学ライゲーションを行なう。挿入配列とＥｃｏＲＩおよびＢｇｌＩＩで消化することにより調製したベクターフラグメントのライゲーションにより、適切な発現ベクターを構築する。非増幅発現のために、プラスミドｐＳＨＨ－Ｆｃ１１（ＳＨＨシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築され、プラスミドｐＩＦＮ－Ｆｃ１１（ＩＦＮシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ　７およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築され、プラスミドｐＣＥＴＰ－Ｆｃ１１（ＣＥＴＰシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築される。増幅発現のために、プラスミドｐＳＨＨ－Ｆｃ１１－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築され、プラスミドｐＩＦＮ－Ｆｃ１１－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築され、プラスミドｐＣＥＴＰ－Ｆｃ１１－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築される。

【０３３２】

ヒトＩｇＧ１　Ｆｃに適切な発現ベクターは、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩおよびＥａｇＩで消化した挿入フラグメントとＩＩＩおよびＰｓｐＯＭ１で消化したベクターフラグメントのライゲーションにより構築される。プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＳＨＨ－ＩｇＧ１－Ｆｃ１１（ＳＨＨシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９８およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築され、プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＩＦＮ－ＩｇＧ１－Ｆｃ１１（ＩＦＮシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９９およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築され、プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＩｇＧ１－Ｆｃ１１（ＣＥＴＰシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１００およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。プラスミド　ｐＣＤＮＡ３－ＳＨＨ－ＩｇＧ１－Ｆｃ１４（ＳＨＨシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０６およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築され、プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＩＦＮ－ＩｇＧ１－Ｆｃ１４（ＩＦＮシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０７およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築され、プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＩｇＧ１－Ｆｃ１４（ＣＥＴＰシグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０８およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。

【０３３３】

自然化学ライゲーションの一般原理はＵ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．６，１８４，３４４に記載されており、その全体を本明細書に援用する。ペプチドＦｃ－ＡおよびＦｃ－ＢはＴＡＭＰＡＬ樹脂を用いて合成でき、これから目的チオエステルを容易に得ることができる。側鎖保護基を脱保護した後、得られたＣ－末端活性化ペプチドをさらに修飾せずに自然化学ライゲーションに用いる。二官能性ペプチドの環化または重合を阻止するために、スルフヒドリル部分（ペプチドＦｃ－Ａ）およびセレノヒドリル部分（ペプチドＦｃ－Ｂ）を可逆的にＭｓｃで遮断する。

【０３３４】

ペプチド合成を手動で固相法により、Ｂｏｃ化学のためのインサイチュー中和／ＨＢＴＵ活性化法を用いて実施する(Schnolzer et al. (1992) Int. J. Pept. Protein Res. 40, 180-193)。各結合工程の後、残存する遊離アミンを定量ニンヒドリンアッセイ法で測定することにより収率を判定する(Sarin et al. (1981) Anal. Biochem. 117, 147-157)。側鎖保護されたアミノ酸は、Ｂｏｃ－Ａｓｐ（Ｏ－シクロヘキシル）－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｃｙｓ（４－メチルベンジル）－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｌｙｓ（２－Ｃｌ－Ｚ）－ＯＨ、およびＢｏｃ－Ｔｈｒ（ベンジル）－ＯＨである。鎖の組立てが完了した後、ペプチドを脱保護し、無水ＨＦにより０℃で１時間、スカベンジャーとして４％アニソールを用いて処理することにより、樹脂から開裂させる。

【０３３５】

ペプチドＦｃ－ＡおよびＦｃ－Ｂをトリチル－会合メルカプトプロピオン酸ロイシン（ｔｒｉｔｙｌ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｍｅｒｃａｐｔｏｐｒｏｐｉｏｎｉｃ　ａｃｉｄ

ｌｅｕｃｉｎｅ）（ＴＡＭＰＡＬ）樹脂上で合成して、Ｃ－末端ＭＰＡＬ－活性チオエステルを得る(Hackeng et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 10068-10073)。このチオエステルペプチドのＮ－末端ｃｙｓ／ｓｅｃ残基を、２－（メチルスルホニル）エチルカーボネート（Ｍｓｃ）基により、最小容量のジメチルホルムアミド／５％ジイソプロピルエチルアミンに溶解した活性Ｍｓｃニトロフェノールエステルの２時間反応（１０倍過剰）で保護する。チオエステル活性ペプチドを脱保護し、ＴＡＭＰＡＬ樹脂から開裂させ、ＨＰＬＣ精製し、凍結乾燥させ、使用時まで－２０℃に保存する。分離用逆相ＨＰＬＣは、Ｖｙｄａｃ　Ｃ－１８カラム（１０マイクロメートル，１．０ｃｍｘ２５ｃｍ）を用いて実施される。結合したペプチドを、H_2O／１０％トリフルオロ酢酸中のアセトニトリル直線勾配により溶離する。

【０３３６】

この精製Ｃ－末端Ｓ－Ｆｃタンパク質から出発して、Ｍｓｃ－ＮＨ－ｃｙｓ^{5}－ｔｈｒ^{10}－α－チオエステルペプチド（Ｆｃ－Ａ）またはＭｓｃ－ＮＨ－ｓｅｃ^{5}－ｔｈｒ^{10}－α－チオエステルペプチド（Ｆｃ－Ｂ）との自然化学ライゲーションを、先に記載された非変性条件下で実施する(Evans et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 3923-3926)。これらのチオエステル活性化ペプチドを過剰モルで、調製したばかりのＳ－Ｆｃタンパク質（出発濃度１～２００マイクロモル濃度）と混合する。この溶液をＣｅｎｔｒｉｐｒｅｐ　３／３０装置（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，マサチュセッツ州）により濃縮し、次いでＳ－ＦｃタンパクについてはＣｅｎｔｒｉｃｏｎ　３／１０装置により最終濃度０．１５～１．２ｍＭに濃度する。ライゲーション物を４℃で一夜インキュベートし、ＳＤＳ－ｐａｇｅ電気泳動により視覚化する。自然化学ライゲーションの後、Ｎ－末端Ｍｓｃ保護基をｐＨ１３で短時間のインキュベーション（＜５分）により除去する。Ｘ－Ｆｃ生成物を精製して、実施例１の方法を用いてプロテインＡセファロースによるアフィニティークロマトグラフィーにより未反応ペプチドを除去する。

【０３３７】

図３６Ａの自然ライゲーション生成物の配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０５に示す。図３６Ｂの自然ライゲーション生成物の配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１３に示す。

実施例３

Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつ免疫グロブリンＦｃ（Ｆｃ－Ｘ）の調製

ＩｇＧは２つの存在形態で発現する：可溶性抗体分子および細胞結合－Ｂ細胞受容体。両形態とも単一メッセンジャーＲＮＡから、オータナティブスプライシングにより２つの追加エキソンがＩｇＧ重鎖コード領域に付加された結果として生成する(Tyler et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 2008-2012; Yamawaki-Kataoka et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 2623-2627)。付加された第１エキソン（Ｍ１エキソン）は１８個のアミノ酸の区域ＥＬＱＬＥＥＳＣＡＥＡＱＤＧＥＬＤＧをコードする；これはＩｇＧを細胞表面にフレキシブルに繋ぎ留め、このためこれはＣ－末端側－Ｘ－末端をもつ新規なＦｃ様分子（Ｆｃ－Ｘ）について良好な選択肢となる。Ｍ１ドメインの Ｃ－末端ｇｌｙ－１８残基も、Ｃ－末端活性チオエステルの調製に用いるＦｃ－インテイン融合タンパク質の調製に好適である。インテイン自動開裂反応に伴ってチオエステル中間体が生成し、これに自然化学ライゲーションによりＣ－末端にシステインまたはセレノシステインが容易に付加できる。

【０３３８】

したがって、Ｍ１ドメインがそれのＣ－末端ＥＬＱＬＥＥＳＣＡＥＡＱＤＧＥＬＤＧにおいてペプチド結合により自己スプライシングインテインのＮ－末端の自動開裂部位に連結したプレ－Ｆｃ－インテインキメラポリペプチド（図３７Ａ）またはＭ１ドメインの一部ＥＬＱＬＥＥＳＣ（図３７Ｂ）を含むＦｃタンパク質をコードする発現ベクターで、宿主細胞をトランスフェクションする。Ｆｃ－Ｘタンパク質がＮ－末端側－Ｘ－末端をもたないことを確実にするために、細胞性シグナルペプチダーゼによりリジン残基の前で開裂するヘテロロガスシグナルペプチドを用いる（パートｉ）。こうして、細胞性シグナルペプチダーゼによる開裂により、Ｎ－末端にｌｙｓ－７をもつ、ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰ

ＰＣＰ、Ｆｃ－インテイン融合タンパク質が得られるであろう（パートｉｉ）。タンパク質スプライシングによりインテインドメインが切除されると、Ｆｃ－チオエステル中間体が得られる（パートｉｉｉ）。最後に、このＦｃ－チオエステルと遊離システインおよび／またはセレノシステインとの自然化学ライゲーションを利用して、Ｃ－末端側－Ｘ－末端ＥＬＱＬＥＥＳＣＡＥＡＱＤＧＥＬＤＧＸをもつＦｃ－Ｘタンパク質を調製する（パートｉｖ）。

【０３３９】

図３７ＡのＩｇＧ１前駆体ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１６およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１７に示す。図３７Ａの成熟および修飾ＩｇＧ１ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１８～ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２０に示す。図３７ＢのＩｇＧ１前駆体ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２３およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２４に示す。図３７Ｂの成熟ＩｇＧ１ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２５に示す。

【０３４０】

ｌｙｓ－７をＮ－末端にもつＦｃ－インテイン融合タンパク質を実施例１に記載した方法により調製する。最初の精製工程は、プロテインＡセファロースの代わりにキチン樹脂を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより実施される。樹脂から開裂させた後、活性Ｆｃ－チオエステル中間体をそのままシステインおよび／またはセレノシステインとの自然ライゲーションに用いる。

【０３４１】

ヒトＩｇＧ１のＭ１膜ドメインに適切なＤＮＡ配列は、Strausberg et. al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 16899-16903に記載されている（ＧｅｎＢａｎｋ寄託Ｎｏ．ＢＣ０１９０４６）。

【０３４２】

シグナルペプチドの適切な例は、ＣＤ２　Ｔ細胞表面糖タンパク質（ＣＤ２）（ＧｅｎＢａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００１７６７）、およびＣＤ４　Ｔ細胞表面糖タンパク質（ＣＤ４）（ＧｅｎＢａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＰ＿０００６１６）である。

【０３４３】

自己スプライシングインテインの適切な例は、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカム（Ｍｅｔｈａｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｈｅｒｍｏａｕｔｏｔｒｏｐｈｉｃｕｍ）リボヌクレオチドレダクターゼラージサブユニット（ＭｔｈＲＩＲ１）（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＡＥ０００８４５）である。インテイン自動開裂反応をＦｃ－インテイン融合ジャンクションに限定するために、位置－１のｐｒｏをｇｌｙに交換し、かつ位置１３４のａｓｎをａｌａに交換することにより、Ｎ－末端開裂活性のみをもつＭｔｈＲＲ１インテインバリアントを調製する（Evans et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 3923-3926）。さらに、アフィニティークロマトグラフィーによるＦｃ－インテインキメラポリペプチドの精製を促進するために、バシラス・サーキュランス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｃｉｒｃｕｌａｎｓ）キチン結合ドメインに融合したＭｔｈ　ＲＲＩインテイン配列を用いる。この修飾ＭｔｈＲＩＲ１インテインに適切な配列はプラスミドｐＴＷＩＮ－２中にある（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ，マサチュセッツ州）。

【０３４４】

他の適切な例は、マイコバクテリウム・ゼノピ（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｘｅｎｏｐｉ）ジャイレースサブユニットＡ（Ｍｘｅ　ＧｙｒＡ）（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＭＸＵ６７８７６）、およびサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）液胞型ＡＴＰアーゼ（Ｓｃｅ　ＶＭＡ１）（ＧｅｎＢａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＣ＿００１１３６）中にある。他の適切な自己スプライシングインテインの例は、Ｉｎｂａｓｅ：インテインデータベース（Perler(2002)Nucl. Acids Res. 30, 383-384）に記載されている。

【０３４５】

適切な発現ベクターは、挿入配列と、ＥｃｏＲＩおよびＢｇｌＩＩで消化することによ

り調製したベクターフラグメントとのライゲーションにより構築される。非増幅発現のために、プラスミドｐＣＤ２－Ｆｃ７－Ｍｔｈ（ＣＤ２シグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築され、プラスミドｐＣＤ４－Ｆｃ７－Ｍｔｈ（ＣＤ４シグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築される。増幅発現のために、プラスミドｐＣＤ２－Ｆｃ７－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築され、プラスミドｐＣＤ４－Ｆｃ７－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築される。

【０３４６】

適切な発現ベクターは、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩおよびＥａｇＩで消化した挿入配列と、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩおよびＰｓｐＯＭ１で消化することにより調製したベクターフラグメントとのライゲーションにより構築される。プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＣＤ２－Ｆｃ７－Ｍｔｈ（ＣＤ２シグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１４およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築され、プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＣＤ４－Ｆｃ７－Ｍｔｈ（ＣＤ４シグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１５およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築され、プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＣＤ２－Ｆｃ７－ＥＬＱＬＥＥＳＣ（ＣＤ２シグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２１およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築され、プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＣＤ４－Ｆｃ７－ＥＬＱＬＥＥＳＣ（ＣＤ４シグナル）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２２およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。

【０３４７】

キチンアフィニティー精製および自己スプライシングインテイン自動開裂反応の一般原理は、Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ．５，８３４，２４７に記載されており、その全体を本明細書に援用する。

【０３４８】

宿主細胞トランスフェクションの後、緩衝液Ａ（２０ｍＭトリス－ＨＣｌ，ｐＨ７．５；５００ｍＭのＮａＣｌを含有）で平衡化したキチン樹脂（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ，マサチュセッツ州）にカラムに細胞培養上清を装入する。結合しなかったタンパク質を１０カラム容量の緩衝液Ａでカラムから洗い流す。キチン樹脂を緩衝液Ｂ（２０ｍＭトリス－ＨＣｌ，ｐＨ８；０．５ＭのＮａＣｌおよび０．１Ｍの２－メルカプトエタン－スルホン酸（ＭＥＳＮＡ）を含有）中で急速に平衡化することにより、チオール試薬誘導による開裂を開始する。ターゲットタンパク質上にＣ－末端チオエステルを同時生成するこの開裂を４℃で一夜実施した後、タンパク質をカラムから溶離した。

【０３４９】

精製したＦｃ－チオエステル中間体から出発して、実施例２の方法を用いてシステインまたはセレノシステインとの自然化学ライゲーションを実施する。最終Ｆｃ－Ｘ生成物をプロテインＡセファロースによるアフィニティークロマトグラフィーにより精製して、未反応のシステインおよびセレノシステインを除去する。

【０３５０】

実施例４

Ｎ－末端側－Ｓ－末端およびＣ－末端側－Ｘ－末端をもつ免疫グロブリンＦｃ（Ｓ－Ｆｃ－Ｘ）の調製

Ｓ－ＦｃおよびＦｃ－Ｘタンパク質は、２つの結合ドメインが単一のＦｃドメインに連結したものをもつイムノシンメトロアドヘシンの調製に有用である（下記を参照）。結合ドメインをＮ－末端側－Ｓ－末端（Ｓ－Ｆｃ）またはＣ－末端側－Ｘ－末端（Ｆｃ－Ｘ）に付加する。４つの結合ドメインが単一のＦｃドメインに連結したものをもつビ－シンメトロアドヘシンの調製に有用なＳ－Ｆｃ－Ｘドメインを、実施例１および実施例３に記載した方法により調製する。

【０３５１】

したがって、Ｍ１ドメインがそれのＣ－末端ＥＬＱＬＥＥＳＣＡＥＡＱＤＧＥＬＤＧにおいてペプチド結合により自己スプライシングインテインのＮ－末端の自動開裂部位に連

結したものを含むプレ－Ｆｃ－インテインキメラポリペプチド（図３８）をコードする発現ベクターで、宿主細胞をトランスフェクションする。Ｎ－末端システインをもつタンパク質からヘテロロガスシグナルペプチドを選択する（パートｉ）。こうして、細胞性シグナルペプチダーゼによる開裂により、Ｎ－末端にｃｙｓ－５をもつ、ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ、成熟Ｓ－Ｆｃ－インテイン融合タンパク質が得られるであろう（パートｉｉ）。タンパク質スプライシングによりインテインが切除されると、Ｆｃ－チオエステル中間体が得られる（パートｉｉｉ）。最後に、このＦｃ－チオエステルと遊離システインおよび／またはセレノシステインとの自然ライゲーションを利用して、Ｃ－末端側－Ｘ－末端ＥＬＱＬＥＥＳＣＡＥＡＱＤＧＥＬＤＧＸをもつＳ－Ｆｃ－Ｘタンパク質を調製する（パートｉｖ）。

【０３５２】

図３８Ａ～３８ＢのＩｇＧ１前駆体ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２６、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２７、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２８に示す。図３８Ａ～３８Ｂの成熟および修飾ＩｇＧ１ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２９～ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３１に示す。

【０３５３】

適切な発現ベクターは、挿入配列と、ＥｃｏＲＩおよびＢｇｌＩＩで消化することにより調製したベクターフラグメントとのライゲーションにより構築される。非増幅発現のために、ｐＳＨＨ－Ｆｃ５－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築され、ｐＩＦＮ－Ｆｃ５－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築され、ｐＣＥＴＰ－Ｆｃ５－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築される。増幅発現のために、ｐＳＨＨ－Ｆｃ５－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築され、ｐＩＦＮ－Ｆｃ５－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築され、ｐＣＥＴＰ－Ｆｃ５－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲ　はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築される。

【０３５４】

Ｓ－Ｆｃ－インテイン融合タンパク質をまず、トランスフェクションした宿主細胞の培養上清からキチンアフィニティークロマトグラフィーにより精製する。キチン樹脂から開裂させた後、側鎖の環化または重合反応を防ぐためにＦｃ－チオエステル中間体をそのままプロテインＡセファロースカラムに装入する。活性Ｓ－Ｆｃ－チオエステルが結合したカラムをそのまま、システインおよび／またはセレノシステインとの自然ライゲーションに用いる。次いでカラムを洗浄して過剰のアミノ酸を除去し、Ｓ－Ｆｃ－Ｘをプロテインセファロースから溶離する。

【０３５５】

実施例５

Ｎ－末端側－Ｘ－末端およびＣ－末端側－Ｘ－末端をもつ免疫グロブリンＦｃ（Ｘ－Ｆｃ－Ｘ）の調製

Ｘ－ＦｃおよびＦｃ－Ｘタンパク質は、２つの結合ドメインが単一のＦｃドメインに連結したものをもつイムノシンメトロアドヘシンの調製に有用である（下記を参照）。結合ドメインをＮ－末端側－Ｘ－末端（Ｘ－Ｆｃ）またはＣ－末端側－Ｘ－末端（Ｆｃ－Ｘ）に付加する。４つの結合ドメインが単一のＦｃドメインに連結したものをもつビ－シンメトロアドヘシンの調製に有用なＸ－Ｆｃ－Ｘドメインを、実施例２および実施例３に記載した方法により調製する。

【０３５６】

したがって、Ｍ１ドメインがそれのＣ－末端ＥＬＱＬＥＥＳＣＡＥＡＱＤＧＥＬＤＧにおいてペプチド結合により自己スプライシングインテインのＮ－末端の自動開裂部位に連結したものを含むプレ－Ｆｃ－インテインキメラポリペプチド（図３９）をコードする発現ベクターで、宿主細胞をトランスフェクションする。Ｎ－末端システインをもつタンパク質からヘテロロガスシグナルペプチドを選択する（パートｉ）。こうして、細胞性シグ

ナルペプチダーゼによる開裂により、Ｎ－末端にｃｙｓ－１１をもつ成熟Ｓ－Ｆｃ－インテイン融合タンパク質が得られるであろう（パートｉｉ）。自然ライゲーションを利用して、Ｎ－末端にｃｙｓ－５またはｓｅｃ－５をもつ、ＸＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ、Ｘ－Ｆｃ－インテイン融合タンパク質を調製する（パートｉｉｉ）。タンパク質スプライシングによりインテインが切除されると、Ｆｃ－チオエステル中間体が得られる（パートｉｖ）。最後に、このＦｃ－チオエステルと遊離システインおよび／またはセレノシステインとの２回目の自然化学ライゲーションを実施して、Ｃ－末端側－Ｘ－末端ＥＬＱＬＥＥＳＣＡＥＡＱＤＧＥＬＤＧＸをもつＸ－Ｆｃ－Ｘタンパク質を調製する（パートｖ）。あるいは、パートｉｉｉをパートｉｖおよびｖの後に実施する。

【０３５７】

図３９Ａ～３９ＢのＩｇＧ１前駆体ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３２、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３３、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３４に示す。図３９Ａ～３９Ｂの成熟および修飾ＩｇＧ１ポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３５～ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３８に示す。

【０３５８】

適切な発現ベクターは、挿入配列と、ＥｃｏＲＩおよびＢｇｌＩＩで消化することにより調製したベクターフラグメントとのライゲーションにより構築される。非増幅発現のために、プラスミドｐＳＨＨ－Ｆｃ１１－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築され、ｐＩＦＮ－Ｆｃ１１－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築され、ｐＣＥＴＰ－Ｆｃ１１－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築される。増幅発現のために、ｐＳＨＨ－Ｆｃ１１－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築され、ｐＩＦＮ－Ｆｃ１１－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築され、ｐＣＥＴＰ－Ｆｃ１１－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築される。

【０３５９】

Ｓ－Ｆｃ－インテイン融合タンパク質をまず、トランスフェクションした宿主細胞の培養上清からキチンアフィニティークロマトグラフィーにより精製する。前記に従って（実施例２）、キチンカラム上で、Ｍｓｃ－ＮＨ－ｃｙｓ^{5}－ｔｈｒ^{10}－α－チオエステルペプチド（Ｆｃ－Ａ）またはＭｓｃ－ＮＨ－ｓｅｃ^{5}－ｔｈｒ^{10}－α－チオエステルペプチド（Ｆｃ－Ｂ）との自然ライゲーションを実施する。次いでキチンカラムを十分に洗浄して未反応ペプチドを除去する。次いでインテイン自動開裂反応を実施する。開裂させた後、Ｘ－Ｆｃ－チオエステルをそのまま、プロテインＡセファロースカラムに装入する。活性Ｘ－Ｆｃ－チオエステルが結合したカラムをそのまま、システインおよび／またはセレノシステインとの自然ライゲーションに用いる。次いでカラムを洗浄して過剰のアミノ酸を除去する。Ｍｓｃ－遮断したＸ－Ｆｃ－Ｘをカラムから溶離し、Ｍｓｃ保護基を除去する処理を行ない、プロテインＡセファロースにより再精製して最終Ｘ－Ｆｃ－Ｘ生成物を得る。

【０３６０】

実施例６

ＣＤ４シンメトロアドヘシン

ＨＩＶ－１感染症を処置するための療法計画は、ＨＩＶ－１受容体の構成要素であるヒトＣＤ４に基づく。ＣＤ４イムノアドヘシン(Capon et al. (1989) Nature 337, 525-531)は、ｇｐ１２０エンベロープタンパク質に結合することによって効果的にＨＩＶ－１を阻害する。その阻害活性はＣＤ４細胞外ドメイン（残基１－３７１）にある。

【０３６１】

したがって、ＣＤ４－Ｘを用いて種々のＣＤ４シンメトロアドヘシンを調製し、それらがｇｐ１２０を結合してＨＩＶ－１感染性を阻害する能力を分析する。ＣＤ４シンメトロアドヘシンの活性を、記載に従って調製したＣＤ４イムノアドヘシン(Capon et al., 同

書)と比較する。

【０３６２】

ＣＤ４－Ｘタンパク質を実施例３の方法により調製する。ＣＤ４細胞外ドメインがそれのＣ－末端においてペプチド結合により自己スプライシングインテインのＮ－末端の自動開裂部位に連結したものを含むプレ－ＣＤ４キメラポリペプチド（図４０Ａ～４０Ｂ）をコードする発現ベクターで宿主細胞をトランスフェクションする。

【０３６３】

細胞性シグナルペプチダーゼによるＣＤ４シグナル配列（パートｉ）の開裂により、成熟ＣＤ４－インテイン融合タンパク質（パートｉｉ）が得られる。インテインドメインの切除により、ＣＤ４－チオエステル中間体が得られる（パートｉｉｉ）。最後に、このＣＤ４－チオエステルと遊離システインおよび／またはセレノシステインとの自然化学ライゲーションを利用して、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつＣＤ４ドメインを調製する（パートｖ）。

【０３６４】

これらのポリペプチドの配列をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４０、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４１、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４２、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４３に示す。

適切な発現ベクターは、挿入配列と、ＥｃｏＲＩおよびＢｇｌＩＩで消化することにより調製したベクターフラグメントとのライゲーションにより構築される。非増幅発現のために、プラスミドｐＣＤ４－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築される。増幅発現のために、プラスミドｐＣＤ４－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築される。

【０３６５】

適切な発現ベクターは、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩおよびＥａｇＩで消化した挿入フラグメントと、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩおよびＰｓｐＯＭ１で消化したベクターフラグメントとのライゲーションにより構築された。プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＣＤ４－Ｍｔｈを、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３９およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築した。

【０３６６】

図５６は、ヒト２９３腎細胞におけるヒトＣＤ４－インテイン融合タンパク質の発現を示す。列１～４は、図４０Ａ（ｉｉ）のＣＤ４－インテイン融合ポリペプチドを示す。細胞上清：列１および３；細胞溶解物：列２および４。

【０３６７】

ＣＤ４－Ｘを用いて種々のＣＤ４シンメトロアドヘシンを調製する（表２）。ヘミ－シンメトロアドヘシンは、ＣＤ４－Ｘタンパク質を単独で用いて調製され、イムノシンメトロアドヘシンはＣＤ４－Ｘタンパク質をＳ－Ｆｃ、Ｘ－ＦｃまたはＦｃ－Ｘと共に用いて調製され、ビ－シンメトロアドヘシンはＣＤ４－ＸタンパクをＳ－Ｆｃ－ＸまたはＸ－Ｆｃ－Ｘと共に用いて調製される。

【０３６８】

ＣＤ４ヘミ－シンメトロアドヘシンは、ＣＤ４－Ｘを用い、Ｘ－末端を活性化するけれどもタンパク質を変性させない緩和な還元条件下において調製される(Fleischman et al. (1962) Arch. Biochem. Biophys. 1 (Suppl.), 174-180; Edelman et al. (1963) Proc. Nat. Acad. Sci. (1963) 50, 753-761)。ＣＤ４－Ｘタンパク質（０．５～２．０ｍｇ／ｍｌ）を還元用緩衝液（０．０５Ｍトリス－ＨＣｌ緩衝液，ｐＨ８．０；２－メルカプトエタノール中に０．１Ｍで調製）に溶解し、室温で１時間インキュベートする。次いでタンパク質をＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－１００クロマトグラフィーにより酸化用緩衝液（０．１Ｍ　K_2HPO_4）中へ入れ換え、ゆるく詰めた綿栓で封じた丸底ガラス試験管内で穏やかに撹拌し、室温で２０時間進行させる(Haber and Anfinsen (1961) J. Biol. Chem. 236, 422-424)。

【０３６９】

ＣＤ４イムノシンメトロアドヘシンおよびＣＤ４ビ－シンメトロアドヘシンは、プロテインＡセファロースビーズ上で、指示したＳ－Ｆｃ、Ｘ－Ｆｃ、Ｆｃ－Ｘ、Ｓ－Ｆｃ－Ｘ

またはＸ－Ｆｃ－Ｘタンパク質を用いて調製される（表２）。結合したタンパク質を還元用緩衝液中において、室温で１時間、穏やかに撹拌し、次いで酸化用緩衝液で洗浄する。ＣＤ４－Ｘを還元用緩衝液で処理し、ビーズに添加し、室温で２０時間、反応を進行させる。

【０３７０】

ＣＤ４－ｇｐ１２０飽和結合分析を、記載に従い(Smith et al. (1987) Science 238, 1704-1707)、記載に従って調製した放射性ヨウ素化ｇｐ１２０(Lasky et al. (1987) Cell 50, 975-985)を用いて実施する。反応物（０．２）は、０．２５％のＮＰ－４０、０．１％のデオキシコール酸ナトリウム、０．０６ＭのＮａＣｌ、０．０１Ｍのトリス－ＨＣｌ、ｐＨ８．０（１ｘ緩衝液Ａ）を、^{125}Ｉ－ｇｐ１２０（３ｎｇ～６７０ｎｇ，２．９ｎＣｉ／ｎｇ）と共に含有する。５０マイクログラムの非標識精製ｇｐ１２０の存在下または不存在下に０℃で１時間、結合を実施する。結合した^{125}Ｉ－ｇｐ１２０を、次いで免疫沈降法により測定する。結合反応物に５マイクロリットルの正常ウサギ血清を０℃で１時間、予め吸収させ、４０マイクロリットルの１０％ｗ／ｖ　Ｐａｎｓｏｒｂｉｎ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）により０℃で３０分間澄明化し、２マイクロリットルの正常血清または５マイクロリットル（０．２５マイクログラム）のＯＫＴ４モノクローナル抗体（Ｏｒｔｈｏ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）と共に０℃で一夜インキュベートする。免疫沈降物を１０マイクロリットルのＰａｎｓｏｒｂｉｎで採集し、２ｘ緩衝液中で２回、水中で１回、洗浄し、次いで１００℃で２分間、０．１２Ｍ　トリス－ＨＣｌ　ｐＨ６．８、４％　ＳＤＳ、０．７Ｍメルカプトエタノール中に溶離する。結合した^{125}Ｉ－ｇｐ１２０の画分をガンマ計数計で測定し、スカッチャード分析を用いて見掛け溶解定数を判定する。

【０３７１】

ＨＩＶ－１阻害試験を記載に従って実施する(Robert-Guroff et al. (1985) Nature 316, 72-74)。等容量の阻害薬およびＨＩＶ－１（６０マイクロリットル）を４℃で１時間インキュベートし、次いで同容量のＨ９細胞(Gallo et al. (1984) Science 224, 500-503) ５ｘ１０^{6}／ｍｌを添加し、３７℃で１時間インキュベーションを続ける。ウイルスの吸着後、１５０マイクロリットル中の細胞２．５ｘ１０^{5}個を２ｍｌのインキュベーション培地へ移す。３７℃で４日後、培養物を新鮮な培地で１：２に分け、さらに３日間インキュベートする。培養物を回収し、逆転写活性を測定し(Groopman et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses (1987) 3, 71-85)、ＨＩＶ－１陽性血清による免疫蛍光を記載に従って測定する(Poiesz et al. (1980) Proc. Acad. Nat. Sci. 77, 7415-7419)。攻撃量のウイルスは、Ｈ９細胞内で増殖させた１００　ＴＣＩＤ$_{50}$のＨＩＶ－１株ＨＴＬＶ－ＩＩＩＢであり、同一系においてアッセイされる。インキュベーション培地は、２ｍＭのＬ－グルタミン、１００単位／ｍｌのペニシリン、１００マイクログラム／ｍｌのストレプトマイシン、２マイクログラム／ｍｌのポリブレンおよび２０％のウシ胎仔血清を含有する、ＲＰＭＩ　１６４０培地である。

【０３７２】

実施例７

腫瘍壊死因子受容体シンメトロアドヘシン

自己免疫疾患を処置するための療法計画は、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）、ならびにそれとＴＮＦ－α抗体および受容体（ＴＮＲ）の結合特性に基づく。両方とも成人性リウマチ性関節炎、若年性リウマチ性関節炎、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、クローン病、および潰瘍性大腸炎における重要な療法選択肢である。

【０３７３】

したがって、ＴＮＲ－Ｘタンパク質を用いて種々のＴＮＲシンメトロアドヘシンを調製し、それらがＴＮＦ－αを結合してＴＮＦ－αの生物活性を阻害する能力を分析する。ＴＮＲシンメトロアドヘシンの活性をＴＮＲイムノアドヘシンのものと比較する(Ashkenazi et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 10535-10539)。

【０３７４】

ヒトＴＮＲには、ＴＮＲ１Ａ（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００１０６５）；およ

びＴＮＲ１Ｂ（ＧｅｎＢａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００１０６６）が含まれる。ＴＮＦ－α抗体Ｄｉ６２は、Ｄｉ６２重鎖（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＡＪ００２４３３）；およびＤｉ６２軽鎖（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＡＪ００２４３４）を含む（以下、ＴＮＲ１Ａ＝TNR_1；ＴＮＲ１Ｂ＝TNR_2；およびＤｉ６２－ＶＨ－ＣＨ＋Ｄｉ６２－ＶｋＣｋ＝TNR_{Fab}）。

【０３７５】

Ｄｉ６２－Ｖｋを実施例１の方法に従って調製する。Ｄｉ６２－ＶＨ－Ｘ、ＴＮＲ１Ａ－Ｘ、およびＴＮＲ１Ｂ－Ｘを実施例３の方法に従って調製する。

Ｄｉ６２－ＶＨ－ＣＨ－インテインキメラポリペプチドおよびＤｉ６２－ＶｋＣｋタンパク質をコードする２種類の発現ベクターで宿主細胞をトランスフェクションすると、Ｄｉ６２－ＶＨ－ＣＨ－インテイン：Ｄｉ６２－Ｖｋ－Ｃｋタンパク質が共発現し、これを用いてTNF_{Fab}－Ｘタンパク質を調製する：

１）Ｄｉ６２－ＶＨ－ＣＨ１ドメインがそれのＣ－末端においてペプチド結合により自己スプライシングインテインのＮ－末端の自動開裂部位に連結したものを含む、プレ－Ｄｉ６２－ＶＨ－インテインキメラポリペプチド（図４１Ａ～４１Ｂ）；および

２）Ｄｉ６２－Ｖｋ－ＣｋドメインをＮ含むプレ－Ｄｉ６２－Ｖｋポリペプチド（図４２）。

【０３７６】

相同Ｄｉ６２－ＶＨ－ＣＨシグナル配列（パートｉ）が細胞性シグナルペプチダーゼにより開裂すると、成熟Ｄｉ６２－ＶＨ－ＣＨ－インテイン融合タンパク質（パートｉｉ）が得られる。タンパク質スプライシングによりインテインが切除されると、Ｄｉ６２－ＶＨ－ＣＨ－チオエステル中間体が得られる（パートｉｉｉ）。最後に、このＤｉ６２－ＶＨ－ＣＨ－チオエステルと遊離システインおよび／またはセレノシステインとの自然化学ライゲーションを利用して、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつＤｉ６２－ＶＨ－ＣＨ－Ｘタンパク質を調製する（パートｉｖ）（図４１Ａ～４１Ｂを参照）。

【０３７７】

相同Ｄｉ６２－Ｖｋ－Ｃｋシグナルペプチダーゼによりシグナル配列（パートｉ）が細胞性開裂すると、成熟Ｄｉ６２－Ｖｋ－Ｃｋタンパク質（パートｉｉ）が得られる（図４２を参照）。

【０３７８】

ＴＮＲ１Ａ－インテインキメラポリペプチドおよびＴＮＲ１Ｂ－インテインポリペプチドをコードする発現ベクターで宿主細胞をトランスフェクションして、それぞれTNF_1－ＸおよびTNF_2－Ｘタンパク質を調製する：

１）ＴＮＲ１Ａ細胞外ドメインがそれのＣ－末端においてペプチド結合により自己スプライシングインテインのＮ－末端の自動開裂部位に連結したものを含む、プレ－ＴＮＲ１Ａ－インテインキメラポリペプチド（図４３）；および

２）ＴＮＲ１Ｂ細胞外ドメインがそれのＣ－末端においてペプチド結合により自己スプライシングインテインのＮ－末端の自動開裂部位に連結したものを含む、プレ－ＴＮＲ１Ｂ－インテインキメラポリペプチド（図４４Ａ）。

【０３７９】

相同ＴＮＲシグナル配列（パートｉ）が細胞性シグナルペプチダーゼにより開裂すると、成熟ＴＮＲ－インテイン融合タンパク質（パートｉｉ）が得られる。タンパク質スプライシングによりインテインが切除されると、ＴＮＲ－チオエステル中間体が得られる（パートｉｉｉ）。最後に、このＴＮＲ－チオエステルと遊離システインおよび／またはセレノシステインとの自然化学ライゲーションを利用して、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつＴＮＲ－Ｘタンパク質を調製する（パートｉｖ）（図４３、４４Ａを参照）。

【０３８０】

これらのポリペプチドの配列を下記に示す：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４５、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４６、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４７、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４８（Ｄｉ６２－ＶＨＣＨ）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５０、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５

１（Ｄｉ６２－ＶｋＣｋ）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５３、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５４、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５５、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５６（ＴＮＲ１Ａ）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５８、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５９、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６０、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６１（ＴＮＲ１Ｂ）；ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６３、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６４（ＴＮＲ１Ｂイムノアドヘシン）。

【０３８１】

適切な発現ベクターは、挿入配列と、ＥｃｏＲＩおよびＢｇｌＩＩで消化することにより調製したベクターフラグメントとのライゲーションにより構築される。非増幅発現のために、プラスミドｐＤｉ６２－ＶＨＣＨ－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築され、プラスミドｐＤｉ６２－ＶｋＣｋはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築され、プラスミドｐＴＮＲ１Ａ－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築され、プラスミドｐＴＮＲ１Ａ－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築される。増幅発現のために、プラスミドｐＤｉ６２－ＶＨＣＨ－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築され、プラスミドｐＤｉ６２－ＶｋＣｋ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築され、プラスミドｐＴＮＲ１Ａ－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築され、プラスミドｐＴＮＲ１Ａ－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築される。

【０３８２】

適切な発現ベクターは、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩおよびＥａｇＩで消化することにより調製した挿入配列と、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩおよびＰｓｐＯＭ１で消化することにより調製したベクターフラグメントとのライゲーションにより構築される。プラスミドｐＣＤＡ３－Ｄｉ６２－ＶＨＣＨ－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４４およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。プラスミドｐＣＤＡ３－Ｄｉ６２－ＶｋＣｋはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４９およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。プラスミドｐＣＤＮＡ－３－ＴＮＲ１Ａ－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５２およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。プラスミドｐＣＤＮＡ－３－ＴＮＲ１Ｂ－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５７およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。プラスミドｐＣＤＮＡ－３－ＴＮＲ１Ｂ－イムノアドヘシンはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６２およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築された。

【０３８３】

図５７は、ヒト２９３腎細胞におけるヒトＴＮＲ１Ｂ融合タンパク質の発現を示す。列２および５は、図４４Ａ（ｉｉ）のヒトＴＮＲ１Ｂ－インテイン融合タンパク質を示す。列１および３は、図４４Ｂ（ｉｉ）のヒトＴＮＲ１Ｂ－イムノアドヘシン融合タンパク質を示す。列３および６は、模擬トランスフェクション細胞からのタンパク質を示す。細胞上清：列１～３；細胞溶解物：列４～７。列７：対照ＴＮＲ１Ｂ－イムノアドヘシン（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）。

【０３８４】

図５８は、Ｃ－末端側－Ｓ－末端をもつＴＮＲ１Ｂシンメトロアドヘシンサブユニットを示す。列１～２は、キチンアフィニティークロマトグラフィーおよびＭＥＳＮＡによる開裂／溶離による精製後の図４４Ａ（ｉｉｉ）のＴＮＲ１Ｂポリペプチドを示す。列３は、図４４Ａ（ｉｉｉ）のＴＮＲ１Ｂポリペプチドと蛍光標識ペプチド（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）との自然ライゲーション生成物を示す。パネル（ｉ）：直接蛍光；パネル（ｉｉ）：抗－ＴＮＲ１Ｂ抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を用いたウェスタンブロット；（ｉｉｉ）：ＳＹＰＲＯ　Ｒｕｂｙ染色（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）。

【０３８５】

図５９は、Ｃ－末端側－Ｓ－末端をもつＴＮＲ１Ｂシンメトロアドヘシンサブユニットを示す。列５は、キチンアフィニティークロマトグラフィーおよびシステインによる開裂

／溶離による精製後の図４４Ａ（ｉｖ）のＴＮＲ１Ｂポリペプチドを示す。列１～４は、ＴＮＲ１Ｂ－イムノアドヘシンを示す。

【０３８６】

図６０は、ＴＮＲ１Ｂシンメトロアドヘシンを示す。列１～４は、酸化前（列１および４）、および１０ｍＭ　ＣｕＳＯ４の存在下で酸化した後の図４４Ａ（ｉｖ）のＴＮＲ１Ｂシンメトロアドヘシンを示す。列３および６は、ＴＮＲ１Ｂ－イムノアドヘシン対照を示す。列１～３：還元条件下；列４～６：非還元条件下。ＴＮＲ１Ｂシンメトロアドヘシンモノマー（４２ｋｄ）および二量体（８４ｋｄ）を、それぞれ列２および５および列５に示す。

【０３８７】

図６１Ａ～６１Ｃは、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ－１００上の種々のＴＮＲ１ＢポリペプチドによるＴＮＦ－アルファ飽和結合分析を示す。（Ａ）図４４Ａ（ｉｖ）のＴＮＲ１Ｂシンメトロアドヘシンを、標準Ｂｉａｃｏｒｅアミン化学によりＢｉａｃｏｒｅ　ＣＭ－５チップに共有結合させた。（Ｂ）ＴＮＲ１Ｂイムノアドヘシン（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を、標準Ｂｉａｃｏｒｅアミン化学によりＢｉａｃｏｒｅ　ＣＭ－５チップに共有結合させた。（Ｃ）図４４Ａ（ｉｖ）のＴＮＲ１Ｂ－シンメトロアドヘシンを、標準Ｂｉａｃｏｒｅチオール化学によりＢｉａｃｏｒｅ　ＣＭ－５チップに共有結合させた。結合後、ＴＮＦ－アルファ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を指示された濃度で用いて飽和結合分析を実施した。

【０３８８】

図６２Ａ～６２Ｃは、図６１Ａ～６１Ｃに示したＴＮＦ－アルファ飽和結合分析のスカッチャード分析を示す。（Ａ）図４４Ａ（ｉｖ）のＴＮＲ１Ｂシンメトロアドヘシンをアミン化学により共有結合させた；Ｋｄ＝Ｋｄ＝４．６９７ｘ１０$^{-9}$Ｍ。（Ｂ）ＴＮＲ１Ｂ－イムノアドヘシン（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）をアミン化学により共有結合させた；Ｋｄ＝４．０８９ｘ１０$^{-9}$Ｍ。（Ｃ）図４４Ａ（ｉｖ）のＴＮＲ１Ｂシンメトロアドヘシンをチオール化学により共有結合させた；Ｋｄ＝０．８４７６７ｘ１０$^{-9}$Ｍ。

【０３８９】

ＴＮＲ$_{1}$－Ｘ、ＴＮＲ$_{2}$－Ｘ、およびＴＮＲ$_{Fab}$－Ｘタンパク質を個別に、および種々の組合わせで用いて、種々のＶＧＦＲシンメトロアドヘシンを調製する（表３、４、および５）。各組合わせについて得られた異なるコンフィギュレーションの個数、およびそれぞれについての一般構造も示す。

【０３９０】

ヘミ－シンメトロアドヘシンは、ＴＮＲ－Ｘタンパク質を単独で用いて調製され、イムノシンメトロアドヘシンはＴＮＲ－Ｘタンパク質をＳ－Ｆｃ、Ｘ－ＦｃまたはＦｃ－Ｘと共に用いて調製され、ビーシンメトロアドヘシンはＴＮＲ－ＸタンパクをＳ－Ｆｃ－ＸまたはＸ－Ｆｃ－Ｘと共に用いて調製される。

【０３９１】

ＴＮＲ－ＸタンパクまたはＴＮＲシンメトロアドヘシンのそれぞれを、下記のものに対するサブタイプ特異的なアフィニティー精製ポリクローナル抗体を用いる定量イムノアッセイにより測定する：ＴＮＲ１Ａ、ＴＮＲ１ＢおよびＤｉ６２（ヤギ抗マウス）、ならびに参照標準品としてのイムノアドヘシン（ＴＮＲ１Ａ－ＩｇおよびＴＮＲ２Ａ－Ｉｇ）。ＴＮＲ抗体、ＴＮＲ－Ｉｇイムノアドヘシン、およびＴＮＦ－αタンパク質は、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（ミネソタ州）から入手される。

【０３９２】

ＴＮＦ－αへのＴＮＧＲシンメトロアドヘシンの結合を記載に従って試験する(Ashkenazi et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 10535-10539)。個々の試料（１マイクログラム／ｍｌ）を、ヤギ抗ヒトＩｇ　Ｆｃ抗体でコーティングしたマイクロタイターウェルに固定化する。組換えヒト^{125}Ｉ－ＴＮＦ－α（ラクトペルオキシダーゼを用いて１９．１マイクロＣｉ／マイクログラムの比放射能になるまで放射能標識した；１マイクロＣｉ＝３７ｋＢｑ）との反応を、１％のウシ血清アルブミンを含有するリン酸緩衝化生理

食塩水（ＰＢＳ）中、２４℃で１時間実施する。試料を除くことにより、非特異的結合を判定する。競合結合分析において、^{125}Ｉ－ＴＮＦ－αを固定化試料と共に漸増濃度の非標識ＴＮＦ－αの存在下でインキュベートする。競合IC_{50}値から次式に従ってK_dを決定する：$K_d = IC_{50} / (1 + [T] / K_{dT})$；式中、［Ｔ］はトレーサーの濃度（０．１ｎｍ）であり、K_{dT}は飽和結合により決定したトレーサーのK_d（８０ｐＭ）である。

【０３９３】

ＴＮＲの細胞傷害性を記載に従って試験する(Kawade and Watanabe (1984) J. Interferon Res. 4, 571-584)。マウスＬ－Ｍ細胞をマイクロタイター皿に播種し（ウェル当たり4×10^4個）、アクチノマイシンＤ（３マイクログラム／ｍｌ）およびＴＮＦ－αまたはＴＮＦ－β（１ナノグラム／ｍｌ）により、試料または他の阻害薬の存在下または不存在下で処理する。３９℃で２０時間のインキュベーション後、クリスタルバイオレット色素排除試験により細胞生存を判定する。

【０３９４】

６～８週齢ＢＡＬＢ／ｃマウスへのエンドトキシン注射により、敗血症性ショックのマウスモデルを試験する。LD_{100}用量の流産菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ａｂｏｒｔｕｓ）由来エンドトキシン（マウス当たり１７５マイクログラム）をリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）中において動物に静脈内（ｉ．ｖ．）注射し、少なくとも７８時間、生存を追跡する。ＴＮＲ１－イムノアドヘシンおよびＣＤ４－イムノアドヘシンを、それぞれ陽性および陰性対照として用いる。それぞれをＰＢＳ中に希釈し、エンドトキシン投与の前または後に静脈内注射する。

【０３９５】

実施例８

血管内皮増殖因子受容体シンメトロアドヘシン

血管新生疾患を処置するための療法計画は、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）およびそれらとＶＥＧＦ受容体（ＶＧＦＲ）の結合相互作用に基づく。ＶＥＧＦ－抗体およびＶＧＦＲ－イムノアドヘシンは、大腸癌、直腸癌、肺癌および乳癌を含めた多数の転移性癌ならびに加齢性黄斑変性症の処置のための有望な候補である。

【０３９６】

したがって、ＶＧＦＲ－Ｘを用いて種々のＶＧＦＲシンメトロアドヘシンを調製し、それらがＶＥＧＦを結合してＶＥＧＦの生物活性を阻害する能力を分析する。ＶＧＦＲシンメトロアドヘシンの活性をＶＧＲＥイムノアドヘシン(Park et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 25646-25654)のものと比較する。

【０３９７】

ヒトＶＧＦＲにはＶＧＦＲ１（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００２０１９）；ＶＧＦＲ２（ＧｅｎＢａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００２２５３）；およびＶＧＦＲ３（ＧｅｎＢａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００２０２０）が含まれる。ＶＧＦＲ１－Ｘ、ＶＧＦＲ２－Ｘ、およびＶＧＦＲ３－Ｘを実施例３の方法に従って調製する。下記のものをコードする発現ベクターで宿主細胞をトランスフェクションする：

１）ＶＧＦＲ１細胞外ドメインがそれのＣ－末端においてペプチド結合により自己スプライシングインテインのＮ－末端の自動開裂部位に連結したものを含む、プレ－ＶＧＦＲ１－インテインキメラポリペプチド（図４５Ａ～４５Ｃ）；

２）ＶＧＦＲ１細胞外ドメインがそれのＣ－末端においてペプチド結合により自己スプライシングインテインのＮ－末端の自動開裂部位に連結したものを含む、プレ－ＶＧＦＲ２－インテインキメラポリペプチド（図４６Ａ～４６Ｃ）；

３）ＶＧＦＲ１細胞外ドメインがそれのＣ－末端においてペプチド結合により自己スプライシングインテインのＮ－末端の自動開裂部位に連結したものを含む、プレ－ＶＧＦＲ１－インテインキメラポリペプチド（図４７Ａ～４７Ｃ）。

【０３９８】

ＶＧＦＲシグナル配列（パートｉ）が細胞性シグナルペプチダーゼにより開裂すると、

成熟ＶＧＦＲ－インテイン融合タンパク質（パートｉｉ）が得られる。インテインドメインが切除されると、ＶＧＦＲ－チオエステル中間体が得られる（パートｉｉｉ）。最後に、このＶＧＦＲ－チオエステルと遊離システインおよび／またはセレノシステインとの自然化学ライゲーションを利用して、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつＶＧＦＲドメインを調製する（パートｉｖ）。

【０３９９】

これらのポリペプチドの配列を下記に示す：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６６、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６７、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６８、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６９（ＶＧＦＲ１）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７１、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７２、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７３、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７４（ＶＧＦＲ２）；ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７６、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７７、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７８、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７９（ＶＧＦＲ３）。

【０４００】

適切な発現ベクターは、挿入配列と、ＥｃｏＲＩおよびＢｇｌＩＩで消化することにより調製したベクターフラグメントとのライゲーションにより構築される。非増幅発現について、プラスミドｐＶＧＦＲ１－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築され、プラスミドｐＶＧＲ１－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築され、プラスミドｐＶＧＲ１－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築される。非増幅発現について、プラスミドｐＶＧＦＲ１－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築され、プラスミドｐＶＧＲ１－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築され、プラスミドｐＶＧＲ１－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築される。

【０４０１】

適切な発現ベクターは、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩおよびＥａｇＩで消化することにより調製した挿入配列と、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩおよびＰｓｐＯＭ１で消化することにより調製したベクターフラグメントとのライゲーションにより構築される。プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＶＧＦＲ１－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６５およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＶＧＦＲ２－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７０およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＶＧＦＲ３－Ｍｔｈは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７５およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。

【０４０２】

ＶＧＦＲ１－Ｘ、ＶＧＦＲ２－ＸおよびＶＥＧＦＲ３－Ｘタンパク質を個別に、および種々の組合わせで用いて、種々のＶＧＦＲシンメトロアドヘシンを調製する（表６、７、および８）。各組合わせについて得られた異なるコンフィギュレーションの個数、およびそれぞれについての一般構造も示す。

【０４０３】

ヘミ－シンメトロアドヘシンは、ＶＧＦＲ－Ｘタンパク質を単独で用いて調製され、イムノシンメトロアドヘシンはＶＧＦＲ－Ｘタンパク質をＳ－Ｆｃ、Ｘ－ＦｃまたはＦｃ－Ｘと共に用いて調製され、ビ－シンメトロアドヘシンはＶＧＦＲ－Ｘタンパク質をＳ－Ｆｃ－ＸまたはＸ－Ｆｃ－Ｘと共に用いて調製される。

【０４０４】

ＶＧＦＲ－ＸタンパクまたはＶＧＦＲシンメトロアドヘシンのそれぞれを、下記のものに対するサブタイプ特異的なアフィニティー精製ポリクローナル抗体を用いる定量イムノアッセイにより測定する：ＶＧＦＲ１、ＶＧＦＲ２、およびＶＧＦＲ３、ならびに参照標準品としてのイムノアドヘシン（ＶＧＦＲ１－Ｉｇ、ＶＧＦＲ２－Ｉｇ、およびＶＧＦＲ３－Ｉｇ）。ＶＧＦＲ抗体、ＶＧＦＲ－Ｉｇイムノアドヘシン、およびＶＥＧＦ$_{165}$タンパク質は、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（ミネソタ州）から入手される。

【０４０５】
ＶＥＧＦへのＶＥＧＲシンメトロアドヘシンの結合を、ＶＥＧＦ飽和結合アッセイにより試験する。反応物（０．１ｍｌ）は、ＰＢＳ（緩衝液Ａ）中１０％ウシ胎仔血清を^{125}Ｉ－ＶＥＧＦ$_{165}$（＜９０００ｃｐｍ／ウェル，５．６９ｘ１０^{7}ｃｐｍ／マイクログラム）と共に含有する。クロラミンＴを用いてＶＥＧＦ$_{165}$を記載に従ってヨウ素化する(Keyt et al. (1996) J. Biol Chem. 271, 5638-5646)。４℃で一夜、５０ナノグラムの標識していない精製ＶＥＧＦ$_{165}$の存在下または不存在下で結合を実施する。結合した^{125}Ｉ－ＶＥＧＦ$_{165}$を、次いで９６ウェル－分解式（ｂｒｅａｋａｗａｙ）イムノソルベントアッセイプレート（Ｎｕｎｃ）内での捕獲により測定する。５０ｍＭ Ｎａ$_{2}$ＣＯ$_{3}$，ｐＨ９．６中、２マイクログラム／ｍｌのアフィニティー精製したヤギ抗ヒトＦｃ ＩｇＧ（Ｏｒｇａｎｏｎ－Ｔｅｋｎｉｋａ）により、４℃で一夜、プレートをコーティングし、緩衝液Ａ中で１時間、プレブロックする。次いで結合反応物を、コーティングしたウェル内で室温において１時間インキュベートし、続いて緩衝液Ａで４回洗浄する。結合した^{125}Ｉ－ＶＥＧＦ$_{165}$の画分をガンマ計数計で測定する。データを４パラメーター非線形曲線あてはめグプログラム（Ｋａｌｉｄａｇｒａｐｈ，Ａｂｅｌｂｅｃｋ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，ペンシルベニア州）により分析する。
【０４０６】
ＶＥＧＲシンメトロアドヘシンへのＶＥＧＦの結合を、競合結合アッセイによっても試験する。ＥＬＩＳＡプレートを、ヒトＩｇＧ Ｆｃに対するウサギＦ（ａｂ’）$_{2}$（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ，ペンシルベニア州）２マイクログラムでコーティングし、緩衝液Ａで遮断する。緩衝液Ａ中のＫＤＲ－ＩｇＧ（３ナノグラム／ｍｌ）をプレートに添加し、１時間インキュベートする。系列希釈した試料を、試験管内で２ｎＭのビオチニル化ＶＥＧＦと共に１時間インキュベートする。反応物を次いでＥＬＩＳＡプレートへ移し、１時間インキュベートする。洗浄後、ＫＤＲ－Ｉｇに結合したビオチニル化ＶＥＧＦの画分を、西洋わさびペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジン（Ｓｉｇｍａ，ミズーリ州）、続いて３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン基質により検出する。データを４パラメーター非線形回帰曲線あてはめ分析により分析する。
【０４０７】
内皮細胞増殖阻害試験を記載に従って実施する(Leung et al. (1989) Science 246, 1306-1309)。ウシ副腎皮質毛細管内皮細胞を、１０％のウシ血清および２ｍＭのグルタミンを補充した低グルコースダルベッコ改変イーグル培地（ＧＩＢＣＯ）（増殖培地）の存在下で培養する。細胞を６ウェルプレートに６ｘ１０^{3}個／ウェルの密度で播種する。系列希釈した試料を１～５０００ナノグラム／ｍｌの濃度で細胞に添加し、２～３時間インキュベートする。精製ＶＥＧＦ$_{165}$を３ナノグラム／ｍｌの最終濃度で添加する。細胞を次いで５～６日間インキュベートし、トリプシンでプレートから分離し、コールターカウンター（Ｃｏｕｌｔｅｒ Ｅｌｅｃｔｒｏｎｉｃｓ，フロリダ州）で細胞数を測定する。データを４パラメーター非線形回帰曲線あてはめ分析により分析する。
【０４０８】
インビボ腫瘍試験を記載に従って実施する(Kim et al. (1993) Nature 362, 841-844; Borgstrom et al. (1996) Cancer Res. 56, 4032-4039)。ヒトＡ６７３横紋筋肉腫細胞（ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１５９８）を、１０％のウシ胎仔血清および２ｍＭのグルタミンを補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中で培養する。６～１０週齢の雌ＢＡＬＢ／ｃヌードマウスの背面に、２ｘ１０^{6}個の腫瘍細胞を２００マイクロリットルの容量で皮下注射する。腫瘍細胞の接種後（２４時間）、動物（グループ当たり１０匹）を、用量０．０５ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、および５ｍｇ／ｋｇの系列希釈試料で処理する；０．１ｍｌの容量で週２回、腹腔内投与。腫瘍サイズを週１回の間隔で測定する。腫瘍細胞接種の４週間後、動物を安楽死させ、腫瘍を摘出し、秤量する。ＡＮＯＶＡにより統計分析を行なう。
【０４０９】
実施例９
ＥｒｂＢシンメトロアドヘシン

悪性疾患を処置するための療法計画は、上皮増殖因子様受容体（ＥｒｂＢ）およびそれらのリガンドに基く；これには、ノイレグリン（ｎｅｕｒｅｇｕｌｉｎ）類／ヘレグリン（ｈｅｒｅｇｕｌｉｎ）類（ＮＲＧ／ＨＲＧ）、およびＥＧＦ関連タンパク質リガンドのファミリーが含まれる。ＥｒｂＢ－抗体およびＥｒｂＢ－イムノアドヘシンは臨床試験中であり、ＥｒｂＢ２を過剰発現する転移性乳癌の処置において十分に立証されている。

【０４１０】

したがって、ＥｒｂＢ－Ｘタンパク質を用いて種々のＥｒｂＢシンメトロアドヘシンを調製し、それらがヘレグリン類を結合してヘレグリンの生物活性を阻害する能力を分析する。ＥｒｂＢシンメトロアドヘシンの活性をＥｒｂＢイムノアドヘシン（Sliwkowski et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 14661-14665)のものと比較する。

【０４１１】

ヒトＥｒｂＢには、ＥｒｂＢ１（Ｇｅｎｂａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００５２２８）；ＥｒｂＢ２（ＧｅｎＢａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００４４４８）；ＥｒｂＢ３（ＧｅｎＢａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００１９８２）；およびＥｒｂＢ４（ＧｅｎＢａｎｋ寄託Ｎｏ．ＮＭ＿００５２３５）が含まれる。ＥｒｂＢ１－Ｘ、ＥｒｂＢ２－Ｘ、ＥｒｂＢ３－Ｘ、およびＥｒｂＢ４－Ｘを実施例３の方法に従って調製する。下記のものをコードする発現ベクターで宿主細胞をトランスフェクションする：

１）ＥｒｂＢ１細胞外ドメインがそれのＣ－末端においてペプチド結合により自己スプライシングインテインのＮ－末端の自動開裂部位に連結したものをが有する、プレ－ＥｒｂＢ１－インテインキメラポリペプチド（図４８Ａ～４８Ｂ）；

２）ＥｒｂＢ２細胞外ドメインがそれのＣ－末端においてペプチド結合により自己スプライシングインテインのＮ－末端の自動開裂部位に連結したものを含有する、プレ－ＥｒｂＢ２－インテインキメラポリペプチド（図４９Ａ～４９Ｂ）；

３）ＥｒｂＢ３細胞外ドメインがそれのＣ－末端においてペプチド結合により自己スプライシングインテインのＮ－末端の自動開裂部位に連結したものを含有する、プレ－ＥｒｂＢ３－インテインキメラポリペプチド（図５０Ａ～５０Ｂ）；および

４）ＥｒｂＢ４細胞外ドメインがそれのＣ－末端においてペプチド結合により自己スプライシングインテインのＮ－末端の自動開裂部位に連結したものを含有する、プレ－ＥｒｂＢ４－インテインキメラポリペプチド（図５１Ａ～５１Ｂ）。

【０４１２】

相同ＥｒｂＢシグナル配列（パートｉ）が細胞性シグナルペプチダーゼにより開裂すると、成熟ＥｒｂＢ－インテイン融合タンパク質（パートｉｉ）が得られる。タンパク質スプライシングによりインテインが切除されると、ＥｒｂＢ－チオエステル中間体が得られる（パートｉｉｉ）。最後に、このＥｒｂＢ－チオエステルと遊離システインおよび／またはセレノシステインとの自然化学ライゲーションを利用して、Ｃ－末端側－Ｘ－末端をもつＶＥＧＲドメインを調製する（パートｉｖ）。

【０４１３】

これらのポリペプチドの配列を下記に示す：ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１８１，ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１８２，ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１８３、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１８４（ＥＲＢＢ１）；ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１８６，ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１８７，ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１８８、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１８９（ＥＲＢＢ２）；ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１９１，ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１９２，ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１９３、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１９４（ＥＲＢＢ３）；ならびにＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１９６，ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１９７，ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１９８、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１９９（ＥＲＢＢ４）。

【０４１４】

適切な発現ベクターは、挿入配列と、ＥｃｏＲＩおよびＢｇｌＩＩで消化することにより調製したベクターフラグメントとのライゲーションにより構築される。非増幅発現について、プラスミドｐＥｒｂＢ１－ＭｔｈはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２５およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１を用いて構築され、プラスミドｐＥｒｂＢ２－ＭｔｈはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：

２６およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築され、プラスミドｐＥｒｂＢ３－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築され、プラスミドｐＥｒｂＢ４－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を用いて構築される。増幅発現について、プラスミドｐＥｒｂＢ１－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築され、プラスミドｐＥｒｂＢ２－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築され、プラスミドｐＥｒｂＢ３－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築され、プラスミドｐＥｒｂＢ４－Ｍｔｈ－ＤＨＦＲはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８およびｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲを用いて構築される。

【０４１５】

適切な発現ベクターは、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩおよびＥａｇＩで消化することにより調製した挿入配列と、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩおよびＰｓｐＯＭ１で消化することにより調製したベクターフラグメントとのライゲーションにより構築される。プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＥＲＢＢ１－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８０およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＥＲＢＢ２－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８５およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＥＲＢＢ３－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９０およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。プラスミドｐＣＤＮＡ３－ＥＲＢＢ４－ＭｔｈはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９５およびｐＣＤＮＡ３．１（＋）を用いて構築される。

【０４１６】

ＥｒｂＢ１－Ｘ、ＥｒｂＢ２－Ｘ、ＥｒｂＢ３－ＸおよびＥｒｂＢ４－Ｘタンパク質を個別に、および種々の組合わせで用いて、種々のＶＧＦＲシンメトロアドヘシンを調製する（表９、１０、および１１）。各組合わせについて得られた異なるコンフィギュレーションの個数、およびそれぞれについての一般構造も示す。

【０４１７】

ヘミ－シンメトロアドヘシンは、ＥｒｂＢ－Ｘタンパク質を単独で用いて調製され、イムノシンメトロアドヘシンはＥｒｂＢ－Ｘタンパク質をＳ－Ｆｃ、Ｘ－ＦｃまたはＦｃ－Ｘと共に用いて調製され、ビ－シンメトロアドヘシンはＥｒｂＢ－Ｘタンパク質をＳ－Ｆｃ－ＸまたはＸ－Ｆｃ－Ｘと共に用いて調製される。

【０４１８】

ＥｒｂＢ－ＸタンパクまたはＥｒｂＢシンメトロアドヘシンのそれぞれを、下記のものに対するサブタイプ特異的なアフィニティー精製ポリクローナル抗体を用いる定量イムノアッセイにより測定する：ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、およびＥｒｂＢ４、ならびに参照標準品としてのイムノアドヘシン（ＥｒｂＢ１－Ｉｇ、ＥｒｂＢ２－Ｉｇ、ＥｒｂＢ３－Ｉｇ、およびＥｒｂＢ４－Ｉｇ）。ＥｒｂＢ抗体、ＥｒｂＢ－Ｉｇイムノアドヘシン、ＮＲＧ１－$\alpha_{177-241}$タンパク質、ＮＲＧ１－$\beta_{176-246}$タンパク質、ＮＲＧ１－β_{1-246}タンパク質、およびＮＲＧ１－ＳＭＤＦ$_{1-296}$タンパク質は、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（ミネソタ州）から入手される。

【０４１９】

ノイレグリン類へのＥｒｂＢシンメトロアドヘシンの結合を、ＨＲＧ飽和結合アッセイにより試験する(Sliwkowski et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 14661-14665)。反応をＮｕｎｃ分解式イムノモジュールプレート（ｂｒｅａｋａｐａｒｔ　ｉｍｍｕｎｏ－ｍｏｄｕｌｅ　ｐｌａｔｅ）内で実施する。プレートのウェルを４℃で一夜、５０ｍＭ炭酸緩衝液（ｐＨ９．６）中の５マイクログラム／ｍｌヤギ抗ヒト抗体（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）１００マイクロリットルでコーティングする。プレートを２００マイクロリットルの洗浄用緩衝液（ＰＢＳ／０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０（商標））で２回すすぎ、続いて１００マイクロリットルの１％　ＢＳＡ／ＰＢＳと共に室温で３０分間の短時間インキュベーションを行なう。緩衝液を除去し、各ウェルを１００マイクロリットルの試料と共に１％　ＢＳＡ／ＰＢＳ中で激しい横方向（ｓｉｄｅ－ｔｏ－ｓｉｄｅ）

回転下に１時間インキュベートする。プレートを洗浄用緩衝液で３回すすぎ、種々の量の非放射性競合ガンマ－ＨＲＧおよび^{125}Ｉ－ＨＲＧβ１を添加して室温で激しい横方向回転下に２～３時間インキュベートすることにより競合結合を実施する。ウェルを洗浄用緩衝液で速やかに３回すすぎ、排液し、各ウェルをガンマ計数計で計数する。改変Ｌｉｇａｎｄプログラム（Munson, P. and Robard, D. (1980) Analytical Biochemistry 107: 220-239）によりスカッチャード分析を行なう。

【０４２０】

ＥｒｂＢシンメトロアドヘシンがＨＲＧ依存性増殖を阻害する能力を、ＭＣＦ７乳癌細胞系において試験する(Lewis et al. (1996) Cancer Res. 56, 1457-1465)。^{3}Ｈ－チミジン取込みを９６ウェル方式で実施する。血清枯渇させたＭＣＦ７－７細胞を、５０：５０　Ｆ１２／ＤＭＥＭ（高グルコース）中、１０，０００個／ウェルでプレーティングする。種々の濃度の試料を１ｎＭ　ＨＲＧと共にインキュベートし、細胞に添加する。１５時間のインキュベーション後、細胞を^{3}Ｈ－チミジンで標識し、ＤＮＡ合成を測定する（２０ｍＬの１／２０希釈したトリチウム化チミジン原液：Ａｍｅｒｓｈａｍ　ＴＲＡ　１２０　Ｂ３６３，１ｍＣｉ／ｍｌ）。次いで、Ｐａｃｋａｒｄ　Ｆｉｌｔｅｒｍａｔｅ　１９６ハーベスターを用いてＧＦ／Ｃユニフィルター（９６ウェル方式）上に細胞を回収する。フィルターをＰａｃｋａｒｄ　Ｔｏｐｃｏｕｎｔ装置により計数する。

【０４２１】

スクリーニング

本発明は、連続アミノ酸配列／またはそれらを含む化合物を用いて、多様な薬物スクリーニング法のいずれかで化合物をスクリーニングするのに特に有用である。そのような試験に用いる化合物は、溶液中に遊離したもの、固体支持体に固定されたもの、細胞表面に生じたもの、または細胞内にあるもののいずれであってもよい。薬物スクリーニングの１方法は、本発明化合物を発現する組換え核酸で安定に形質転換した真核または原核宿主細胞を用いる。そのような形質転換細胞に対して競合結合アッセイにおいて薬物をスクリーニングする。そのような細胞は、生存形態または固定形態のいずれも、標準結合アッセイに使用できる。たとえば、化合物またはフラグメントと被験物質との複合体形成を測定できる。あるいは、被験物質による、化合物とそのターゲット細胞またはターゲット受容体との複合体形成の減少を調べることができる。

【０４２２】

したがって、本発明は、本発明化合物の連続アミノ酸の区域と関連する疾患または障害に影響を及ぼす可能性のある薬物または他のいずれかの物質をスクリーニングする方法を提供する。これらの方法は、それらの物質と本発明化合物またはそのフラグメントを接触させ、そして（Ｉ）その物質と本発明化合物もしくはそのフラグメントとの複合体の存在、または（ｉｉ）本発明化合物もしくはそのフラグメントと細胞の複合体の存在を、当技術分野で周知の方法によりアッセイすることを含む。そのような競合結合アッセイにおいて、前記化合物またはそのフラグメントは一般に標識される。適切なインキュベーションの後、遊離の化合物またはそのフラグメントを、結合形態中に存在するものから分離し、そして、遊離標識または複合体形成していない標識の量は、その特定の物質が本発明化合物もしくはそのフラグメントに結合する能力または本発明化合物／細胞複合体を妨害する能力の尺度である。

【０４２３】

薬物スクリーニングのための他の方法は、ポリペプチドに対する適切な結合アフィニティーをもつ化合物に関するハイスループットスクリーニングを提供し、ＷＯ　８４／０３５６４、１９８４年９月１３日公開に詳述されている。要約すると、多数の異なる低分子ペプチド被験化合物を、固体表面、たとえばプラスチックピンまたは他の何らかの表面で合成する。本発明の化合物またはそのフラグメントに適用する場合、ペプチド被験化合物を化合物またはそのフラグメントと反応させ、そして洗浄する。結合した化合物またはそのフラグメントを当技術分野で周知の方法により検出する。精製した化合物またはそのフラグメントを、前記の薬物スクリーニング法に用いるプレートに直接コーティングするこ

ともできる。さらに、非中和抗体を用いてペプチドを捕獲し、それを固体支持体に固定化することができる。

【０４２４】

本発明は、化合物またはそのフラグメントを結合しうる中和抗体が化合物またはそのフラグメントへの結合に対して被験化合物と特異的に競合する、競合薬物スクリーニングアッセイ法の使用をも意図する。この様式では、これらの抗体を用いて、本発明化合物の連続アミノ酸の区域（１以上）と１以上の抗原決定基を共有するいずれかのペプチドの存在を検出することができる。

【０４２５】

合理的な薬物設計

合理的な薬物設計の目標は、目的とする生物活性ポリペプチド（すなわち、本発明化合物、または本発明化合物のアミノ酸配列）の構造類似体、またはそれらが相互作用する低分子、すなわちアゴニスト、アンタゴニストもしくは阻害薬を提供することである。これらの例のいずれかを用いて、より活性もしくは安定な形態の本発明化合物もしくは本発明化合物のアミノ酸配列である薬物、または本発明化合物もしくは本発明化合物のアミノ酸配列の機能をインビボで増強もしくは妨害する薬物を、作製できる(参照：Hodgson, Bio/Technology, 9:19-21 (1991))。

【０４２６】

１方法において、本発明化合物もしくは本発明化合物のアミノ酸配列、または化合物－阻害薬複合体の三次元構造を、ｘ線結晶解析、コンピューターモデリング、または最も一般的にはこれら２方法の組合わせにより決定することができる。構造を解明し、活性部位（１以上）を決定するためには、本発明化合物または本発明化合物のアミノ酸配列の形状および電荷の両方を確認しなければならない。次いで、関連の構造情報を用いて類似分子を設計し、または有効な阻害薬を同定する。合理的な薬物設計の有用な例には、改善された活性もしくは安定性をもつ分子（Braxton and Wells, Biochemistry, 31:7796-7801 (1992)が提示）、または天然ペプチドの阻害薬、アゴニストもしくはアンタゴニストとして作用する分子（Athauda et al., J. Biochem., 113:742-746 (1993)に提示）を含めることができる。

【０４２７】

前記の機能アッセイにより選択したターゲット特異的抗体を単離し、次いでそれの結晶構造を解明することもできる。この方法では、原理的に、それに基づいてその後の薬物設計を行なうことができるファーマコア（ｐｈａｒｍａｃｏｒｅ）が得られる。機能性薬理活性抗体の抗イディオタイプ抗体（ａｎｔｉ－ｉｄ）を産生させることにより、タンパク質結晶解析をすべて回避できる。鏡像の鏡像として、ａｎｔｉ－ｉｄの結晶部位は元の受容体の類似体であると予想される。次いでこのａｎｔｉ－ｉｄを用いて、化学的または生物学的に製造したペプチドのバンクからペプチドを同定および単離することができる。単離したペプチドは、次いでファーマコアとして作用する。

【０４２８】

本発明により、Ｘ線結晶解析などの分析試験を実施するのに十分な量の本発明化合物または本発明化合物のアミノ酸配列を得ることができる。

生物活性のアッセイ

本明細書に開示する化合物は、化合物の連続アミノ酸の区域などその構成要素を含めて、当技術分野で既知である１以上の標準的な生物活性アッセイ法を用いて容易にアッセイできる。下記は限定ではないそのようなアッセイ法の例である：

血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）により刺激された内皮細胞増殖を本発明化合物が阻害する能力

ＶＥＧＦにより刺激された内皮細胞増殖を種々の本発明化合物が阻害する能力を試験した。このアッセイにおける陽性試験は、そのような作用が有益となるであろう哺乳動物においてその化合物が内皮細胞増殖を阻害する（たとえば腫瘍の増殖を阻害する）のに有用であることの指標となる。

【０４２９】
アッセイの具体例において、ウシ副腎皮質毛細管内皮細胞（ＡＣＥ）（初代培養から、最大１２～１４継代）を９６ウェルプレートに５００個／ウェル／１００マイクロリットルでプレーティングした。アッセイ培地は、低グルコースＤＭＥＭ、１０％のウシ血清、２mMのグルタミンおよび１ｘペニシリン／ストレプトマイシン／フンギゾン（ｆｕｎｇｉｚｏｎｅ）を含有する。対照ウェルには下記のものが含まれる：（１）ＡＣＥ細胞を添加しない；（２）ＡＣＥ細胞のみ；（３）ＡＣＥ細胞プラス５ｎｇ／ｍｌのＦＧＦ；（４）ＡＣＥ細胞プラス３ｎｇ／ｍｌのＶＥＧＦ；（５）ＡＣＥ細胞プラス３ｎｇ／ｍｌのＶＥＧＦプラス１ｎｇ／ｍｌのＴＧＦ－ベータ；および（６）ＡＣＥ細胞プラス３ｎｇ／ｍｌのＶＥＧＦプラス５ｎｇ／ｍｌのＬＩＦ。次いで、被験試料であるポリ－ｈｉｓタグ付き化合物（１００マイクロリットル容量で）をウェルに添加する（それぞれ１％、０．１％および０．０１％の希釈度）。細胞培養物を３７℃／５％ CO_2 で６～６日間インキュベートする。インキュベーション後、ウェル内の培地を吸引し、細胞をＰＢＳで１回洗浄する。次いで酸性ホスファターゼ反応混合物（１００マイクロリットル；０．１M酢酸ナトリウム，ｐＨ５．５，０．１％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００，１０mMリン酸ｐ－ニトロフェニル）を各ウェルに添加する。３７℃で２時間のインキュベーション後、１０マイクロリットルの１Ｍ ＮａＯＨの添加により反応を停止する。光学濃度（ＯＤ）をマイクロプレートリーダーにより４０５ｎｍで読み取る。

【０４３０】
アッセイした化合物の活性は、ＶＥＧＦ（３ｎｇ／ｍｌ）刺激した増殖を刺激しなかった細胞に対比した阻害率パーセントとして計算される（酸性ホスファターゼ活性をＯＤ４０５ｎｍで測定することにより決定）。ＴＧＦ－ベータはＶＥＧＦ刺激によるＡＣＥ細胞増殖を７０～９０％遮断するので、ＴＧＦ－ベータは１ｎｇ／ｍｌで活性基準として使用できる。結果は、癌療法、特に腫瘍血管新生の阻害における被験化合物の有用性の指標となる。数値（相対阻害率）は、刺激しなかった細胞に対比した被験化合物によるＶＥＧＦ刺激増殖の阻害率パーセントを計算し、次いでそのパーセントを、ＶＥＧＦ刺激による細胞増殖を７０～９０％遮断することが知られているＴＧＦ－ベータ（１ｎｇ／ｍｌ）により得られた阻害率パーセントで割ることにより決定される。被験化合物がＶＥＧＦ刺激による内皮細胞増殖の３０％以上の阻害を示した場合（相対阻害率３０％以上）、陽性とみなされる。

【０４３１】
網膜ニューロンの生存率
このアッセイは、被験化合物が網膜ニューロン細胞の生存性を高める効力をもち、したがってたとえば動物における網膜色素変性症（ｒｅｔｉｎｉｔｉｓ ｐｉｇｍｅｎｔｏｓｕｍ）、ＡＭＤなどによる視力喪失の処置を含めた、網膜の障害または傷害の療法処置に有用であるかを立証することができる。

【０４３２】
生後７日目のＳｐｒａｇｕｅ Ｄａｗｌｅｙ仔ラット（混合集団：グリアおよび網膜ニューロンタイプ）を CO_2 麻酔後に断頭屠殺し、無菌条件下で眼を摘出する。色素上皮および他の眼組織から神経性網膜を剥離し、次いで Ca^{2+}、Mg^{2+} を含まないＰＢＳ中の０．２５％トリプシンにより解離させて単細胞懸濁液にする。この網膜を３７℃で７～１０分間インキュベートした後、１ｍｌの大豆トリプシンインヒビターの添加によりトリプシンを不活性化する。９６ウェルプレートにおいて、N_2 を補充した、被験化合物を含むかまたは含まないＤＭＥＭ／Ｆ１２中、細胞１００，０００個／ウェルで細胞をプレーティングする。すべての実験について、細胞を３７℃で水飽和した５％ CO_2 雰囲気において増殖させる。２～３日間の培養後、細胞総数を決定するために細胞をカルセインＡＭ（ｃａｌｃｅｉｎ ＡＭ）で染色し、次いで４％パラホルムアルデヒドで固定し、ＤＡＰＩで染色する。細胞総数（蛍光性）を２０ｘ対物倍率でＣＣＤカメラおよびＭａｃＩｎｔｏｓｈ用ＮＩＨ画像ソフトウェアにより定量する。ウェル内の視野をランダムに選択する。

【０４３３】
種々の濃度の被験化合物の作用を本明細書に報告する；その際、生存率パーセントは、培養２～３日目のカルセインＡＭ陽性細胞の総数を培養２～３日目のＤＡＰＩ標識細胞の総数で割ることにより計算される。３０％を超える生存率をいずれも陽性とみなす。
【０４３４】
杆体光受容細胞の生存率
このアッセイは、本発明の特定の化合物が杆体光受容細胞の生存／増殖を高める作用をもち、したがってたとえば動物における色素性網膜炎、ＡＭＤなどによる視力喪失の処置を含めた、網膜の障害または傷害の療法処置に有用であるかどうかを示すために使用できる。生後７日目のＳｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙ仔ラット（混合集団：グリアおよび網膜神経細胞タイプ）をCO_2麻酔後に断頭屠殺し、無菌条件下で眼を摘出する。色素上皮および他の眼組織から神経性網膜を剥離し、次いでCa^{2+}、Mg^{2+}を含まないＰＢＳ中の０．２５％トリプシンにより解離させて単細胞懸濁液にする。この網膜を３７℃で７～１０分間インキュベートした後、１ｍｌの大豆トリプシンインヒビターの添加によりトリプシンを不活性化する。９６ウェルプレートにおいて、N_2を補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中、細胞１００，０００個／ウェルで細胞をプレーティングする。すべての実験について、細胞を３７℃で水飽和した５％　CO_2雰囲気において増殖させる。２～３日間の培養後、細胞を４％パラホルムアルデヒドで固定し、次いでＣｅｌｌＴｒａｃｋｅｒ　Ｇｒｅｅｎ　ＣＭＦＤＡにより染色する。視覚色素ロドプシンに対するモノクローナル抗体であるＲｈｏ　４Ｄ２（腹水またはＩｇＧ　１：１００）を用いて間接的免疫蛍光により杆体光受容細胞を検出する。結果を生存率％として示す：カルセイン総数－培養２～３日目のロドプシン陽性細胞を、培養２～３日目のロドプシン陽性細胞の総数で割る。細胞総数（蛍光性）を２０ｘ対物倍率でＣＣＤカメラおよびＭａｃＩｎｔｏｓｈ用ＮＩＨ　ｉｍａｇｅソフトウェアにより定量する。ウェル内の視野をランダムに選択する。
【０４３５】
内皮細胞アポトーシスの誘導
本明細書に開示する化合物が内皮細胞のアポトーシスを誘導する能力を、ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ，Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）において試験することができる。このアッセイにおける陽性試験は、内皮細胞のアポトーシス誘導が有益となるであろう腫瘍および血管障害の療法処置における、本発明化合物の有用性の指標となる。
【０４３６】
細胞を、９６ウェルマイクロタイタープレート（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，ｃｙｔｏｓｔａｒ－Ｔシンチレーション用マイクロプレート、ＲＰＮＱ１６０、無菌、組織培養処理済み、個別包装）に、１０％血清（ＣＳＧ－培地，　Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）中、$2x10^4$個／ウェルで、１００μｌの容量においてプレーティングする。２日目に、被験化合物を含有する被験試料を１％、０．３３％および０．１１％の希釈度で三重試験法により添加する。細胞を含まないウェルをブランクとして用い、細胞のみを含むウェルを陰性対照として用いる。陽性対照として、スタウロスポリン（ｓｔａｕｒｏｓｐｏｒｉｎｅ）の３ｘ原液５０μｌの１：３系列希釈液を用いた。本発明化合物がアポトーシスを誘導する能力は、カルシウムおよびリン脂質結合タンパク質のメンバーであるアネキシンＶ（Ａｎｎｅｘｉｎ　Ｖ）検出のために９６ウェルプレートを処理し、アポトーシスを検出することにより判定される。
【０４３７】
０．２ｍｌのアネキシンＶ－ビオチン原液（１００μｇ／ｍｌ）を、４．６ｍｌの２ｘCa^{2+}結合用緩衝液および２．５％　ＢＳＡ中に希釈した（１：２５の希釈度）。この希釈したアネキシンＶ－ビオチン溶液５０μｌを各ウェル（対照以外）に最終濃度１．０μｇ／ｍｌとなるように添加した。試料をアネキシン－ビオチンと共に１０～１５分間インキュベートした後、^{35}Ｓ－ストレプトアビジンを直接添加した。^{35}Ｓ－ストレプトアビジンを２倍のCa^{2+}結合用緩衝液、２．５％　ＢＳＡ中に希釈し、すべてのウェルに最終濃度$3x10^4$ｃｐｍ／ウェルとなるように添加した。次いでプレートをシールし

、１０００ｒｐｍで１５分間遠心分離し、オービタルシェーカー上に２時間おいた。１４５０　Ｍｉｃｒｏｂｅｔａ　Ｔｒｉｌｕｘ（Ｗａｌｌａｃ）により分析を実施した。バックグラウンドを超えるパーセントは、陰性対照を超えるカウント／分のパーセント量を表わす。バックグラウンドより３０％以上大きいパーセントを陽性とみなす。

【０４３８】

ＰＤＢ１２細胞の阻害

このアッセイは、本明細書に開示する化合物がＰＤＢ１２膵管細胞によるタンパク質産生を阻害する効力をもち、したがって、糖尿病などを含めた膵臓によるタンパク質分泌を伴う障害の療法処置に有用であるかを立証するであろう。

【０４３９】

ＰＤＢ１２膵管細胞を、フィブロネクチンコーティングした９６ウェルプレートに、１．５ｘ１０^{3}個／ウェル、１００μＬ／増殖培地１８０μＬでプレーティングする。化合物被験試料を含む増殖培地または化合物を含まない陰性対照１００μＬを次いでウェルに添加して、最終容量２００μＬにする。対照は、このアッセイにおいて不活性であることが示されたタンパク質を含有する増殖培地を含む。細胞を３７℃で４日間インキュベートする。次いで２０μＬのＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ色素（ＡＢ）を各ウェルに添加し、ＡＢ添加後４時間目に、マイクロタイタープレートリーダーにより５３０ｎｍの励起および５９０ｎｍの発光で蛍光の読みを測定する。使用する基準は、ウシ膵臓抽出物（ＢＰＥ）を含まない細胞、および種々の濃度のＢＰＥを含む細胞である。緩衝液または未知のものに由来するＣＭ対照を各９６ウェルプレート上で２回試験する。

【０４４０】

これらのアッセイにより、化合物処理細胞が産生したＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ色素算出タンパク質濃度と、陰性対照細胞が産生したＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ色素算出タンパク質濃度を比較することによって、タンパク質産生の低下率パーセントを計算することができる。陰性対照細胞と比較して２５％以上のタンパク質産生低下率パーセントを陽性とみなす。

【０４４１】

成体心臓栄養補給の刺激

このアッセイは、本明細書に開示する種々の化合物が成体心臓栄養補給（ｈｙｐｅｒｔｒｏｐｈｙ　ｏｆ　ａｄｕｌｔ　ｈｅａｒｔ）を刺激する能力を測定するために設計された。このアッセイにおける陽性試験は、その化合物が種々の心不全障害の療法処置に有用であると期待されることの指標となる。

【０４４２】

成体（２５０ｇ）Ｓｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙラットから単離したばかりの心室心筋細胞を２０００個／ウェルで１８０μｌ容量においてプレーティングする。細胞を単離して１日目にプレーティングし、２日目に化合物を含有する被験試料または増殖培地のみ（陰性対照）（２０μｌ容量）を添加し、次いで５日目に細胞を固定し、染色する。染色後、細胞のサイズを目視する；その際、対照細胞と比較して増殖増強を示さなかった細胞に０．０の数値を与え、対照細胞と比較してわずかないし中等度の増殖増強を示した細胞に１．０の数値を与え、対照細胞と比較して大幅な増殖増強を示した細胞に２．０の数値を与える。陰性対照細胞と比較していかなる程度の増殖増強でも、そのアッセイについて陽性とみなす。

【０４４３】

ＰＤＢ１２細胞増殖

このアッセイは、本明細書に開示する種々の化合物がＰＤＢ１２膵管細胞の増殖を誘導する効力をもち、したがって糖尿病などを含めた膵臓によるタンパク質分泌を伴う障害の療法処置に有用であるかどうかを立証する。

【０４４４】

ＰＤＢ１２膵管細胞を、フィブロネクチンコーティングした９６ウェルプレートに１．５ｘ１０^{3}個／ウェル、１００μＬ／増殖培地１８０μＬでプレーティングする。化合物

被験試料を含む増殖培地または被験化合物を含まない陰性対照１００μＬを次いでウェルに添加して、最終容量２００μＬにする。対照は、このアッセイにおいて不活性であることが示されたタンパク質を含有する増殖培地を含む。細胞を３７℃で４日間インキュベートする。次いで２０μＬのＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ色素（ＡＢ）を各ウェルに添加し、ＡＢ添加後４時間目に、マイクロタイタープレートリーダーにより５３０ｎｍの励起および５９０ｎｍの発光で蛍光の読みを測定する。使用する基準は、ウシ膵臓抽出物（ＢＰＥ）を含まない細胞、および種々の濃度のＢＰＥを含む細胞である。緩衝液または増殖培地のみの未知のものに由来する対照を各９６ウェルプレート上で２回試験する。

【０４４５】

被験化合物処理細胞が産生したＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ色素算出タンパク質濃度と、陰性対照細胞が産生したＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ色素算出タンパク質濃度を比較することによって、タンパク質産生の増加率パーセントを計算する。陰性対照細胞と比較して２５％以上のタンパク質産生増加率パーセントを陽性とみなす。

【０４４６】

新生児心臓栄養補給の増強

このアッセイは、本明細書に開示する種々の化合物が新生児心臓栄養補給を刺激する能力を測定するために設計された。このアッセイにおける陽性試験は、その化合物が種々の心不全障害の療法処置に有用であると期待されることの指標となる。

【０４４７】

１日齢Ｈａｒｌａｎ　Ｓｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙラットから心筋細胞を得る。細胞（１８０μｌ，７．５ｘ10^{4}／ｍｌ，血清＜０．１％，単離したばかり）を、１日目に、ＤＭＥＭ／Ｆ１２＋４％　ＦＣＳで予めコーティングした９６ウェルプレートに添加する。被験化合物を含有する被験試料または増殖培地のみ（陰性対照）（２０μｌ／ウェル）を、１日目にウェルに直接添加する。次いで２日目にＰＧＦ（２０μｌ／ウェル）を最終濃度10^{-6}Ｍで添加する。次いで４日目に細胞を染色し、５日目に目視採点する；その際、陰性対照と比較してサイズ増大を示さなかった細胞を０．０と採点し、陰性対照と比較してわずかないし中等度のサイズ増大を示した細胞を１．０と採点し、陰性対照と比較して大幅なサイズ増大を示した細胞を２．０と採点する。このアッセイにおける陽性結果は、１．０以上の評点である。

【０４４８】

混合リンパ球反応（ＭＬＲ）アッセイにおける刺激活性

このアッセイは、本明細書に開示する化合物が刺激されたＴリンパ球の増殖の刺激薬として活性であるかを判定するのに用いられる。リンパ球の増殖を刺激する化合物は、免疫応答の増強が有益である場合の療法に有用である。この療法薬は本発明化合物のアンタゴニスト、たとえば本発明化合物に対するネズミ－ヒトキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体の形をとることができる。

【０４４９】

このアッセイの基本プロトコルは、Current Protocols in Immunology, unit 3.12; eds., Ｊ Ｅ Coligan, Ａ Ｍ Kruisbeek, Ｄ Ｈ Marglies, Ｅ Ｍ Shevach, Ｗ Strober, 国立予防衛生研究所（National Insitutes of Health）, John Wiley & Sons, Inc.発行に記載されている。

【０４５０】

より詳細には、あるアッセイ変法において、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を哺乳動物個体、たとえばヒトボランティアから、白血球フェレーシスにより単離する（あるドナーはスティミュレーターＰＢＭＣを供給し、他のドナーはレスポンダーＰＢＭＣを供給するであろう）。所望により、細胞を単離した後にウシ胎仔血清およびＤＭＳＯ中で凍結する。凍結細胞をアッセイ培地中で一夜融解し（３７℃，５％　CO_2）、次いでアッセイ培地（ＲＰＭＩ；１０％ウシ胎仔血清，１％ペニシリン／ストレプトマイシン，１％グルタミン，１％　ＨＥＰＥＳ，１％非必須アミノ酸，１％ピルビン酸）に再懸濁して３ｘ10^{6}個／ｍｌにする。スティミュレーターＰＢＭＣは、細胞を照射することにより産生される

（約３０００ラド）。
【０４５１】
このアッセイは、三重試験ウェルに下記の混合物をプレーティングすることにより行なわれる：
１００：１の、１％または０．１％に希釈した被験試料、
５０：１の照射したスティミュレーター細胞、および
５０：１のレスポンダーＰＢＭＣ細胞。
【０４５２】
１００マイクロリットルの細胞培養培地または１００マイクロリットルのＣＤ４－ＩｇＧを対照として用いる。次いでウェルを３７℃、５％ CO_2 で４日間インキュベートする。５日目に各ウェルをトリチウム化チミジン（１．０ｍＣ／ウェル；Ａｍｅｒｓｈａｍ）でパルス処理する。６時間後、細胞を３回洗浄し、次いで標識の取込みを評価する。
【０４５３】
このアッセイの他の変法においては、ＰＢＭＣをＢａｌｂ／ｃマウスおよびＣ５７Ｂ６マウスの脾臓から単離する。採取したばかりの脾臓からアッセイ培地（ＲＰＭＩ；１０％ウシ胎仔血清，１％ペニシリン／ストレプトマイシン，１％グルタミン，１％ ＨＥＰＥＳ，１％非必須アミノ酸，１％ピルビン酸）中に細胞を掻き取り、これらの細胞をＬｙｍｐｈｏｌｙｔｅ Ｍ（Ｏｒｇａｎｏｎ Ｔｅｋｎｉｋａ）に重ね、２０００ｒｐｍで２０分間遠心分離し、単核細胞をアッセイ培地中で採集および洗浄し、細胞をアッセイ培地に $1x10^7$ 個／ｍｌで再懸濁することにより、ＰＢＭＣを単離する。次いで前記に従ってアッセイを実施する。
【０４５４】
対照よりプラスの増加を陽性とみなし、１８０％以上の増加が好ましい。しかし、対照より大きい数値はいずれも被験タンパク質に関する刺激作用の指標となる。
周皮細胞ｃ－Ｆｏｓ誘導
このアッセイは、本明細書に開示する本発明化合物が周皮細胞におけるｃ－Ｆｏｓ発現を誘導する能力を示し、したがって特定のタイプの周皮細胞関連腫瘍に対する診断マーカーとしてだけでなく、周皮細胞関連腫瘍の療法処置に用いるアンタゴニストを生成するためにも使用されることを示す。詳細には、１日目に周皮細胞をＶＥＣ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから受け取り、フラスコから５ｍｌ以外の培地を除去する。２日目に周皮細胞をトリプシン処理し、洗浄し、遠心分離し、次いで９６ウェルプレート上にプレーティングする。７日目に培地を除去し、周皮細胞を１００μｌの被験化合物試料および対照（陽性対照＝ＤＭＥ＋５％血清＋／－ＰＤＧＦ，５００ｎｇ／ｍｌ；陰性対照＝プロテイン３２）で処理する。二重測定を平均し、ＳＤ／ＣＶを判定する。化学発光単位（ＲＬＵ）ルミノメーター読みで示したプロテイン３２（緩衝液対照）値より増加した倍率を、周波数に対してヒストグラム上にプロットする。プロテイン３２値より２倍高いものを、このアッセイについて陽性とみなす。アッセイマトリックス：増殖培地＝低グルコースＤＭＥＭ＝２０％ ＦＢＳ＋１ｘペニシリン／ストレプトマイシン＋１ｘフンギゾン（ｆｕｎｇｉｚｏｎｅ）。アッセイ培地＝低グルコースＤＭＥＭ＋５％ ＦＢＳ。
【０４５５】
本発明化合物が軟骨からプロテオグリカンの放出を刺激する能力
本明細書に開示する化合物が軟骨組織からプロテオグリカンの放出を刺激する能力は、下記に従って試験できる。
【０４５６】
４～６日月齢のブタの中手指節関節を無菌的に切開し、その下にある骨を慎重に避けて関節軟骨を手動スライシングにより摘出した。軟骨をすりつぶし、９５％空気、５％ CO_2 の加湿雰囲気で、０．１％のＢＳＡならびに１００Ｕ／ｍｌのペニシリンおよび１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシンを含む無血清（ＳＦ）培地（ＤＭＥ／Ｆ１２ １：１）中において２４時間、バルク培養した。３回洗浄した後、約１００ｍｇの関節軟骨をミクロニクス（ｍｉｃｒｏｎｉｃｓ）試験管に分配し、前記のＳＦ培地中でさらに２４時間

培養する。次いで本発明化合物１％を単独で、または軟骨組織からのプロテオグリカン放出の刺激物質であることが知られているインターロイキン－１アルファ１８ｎｇ／ｍｌと組み合わせて添加する。次いで上清を採集し、１，９－ジメチル－メチレンブルー（ＤＭＢ）比色アッセイを用いてプロテオグリカンの量をアッセイする（Farndale and Buttle, Biochem. Biophys. Acta 883:173-177 (1985)）。このアッセイにおける陽性結果は、被験化合物をたとえばスポーツ関連の軟骨問題、関節軟骨欠損、骨関節炎またはリウマチ性関節炎の処置に使用できるであろうということの指標となる。

【０４５７】

皮膚血管透過性アッセイ

このアッセイは、本発明化合物が免疫応答を刺激し、動物の注射部位において単核細胞、好酸球およびＰＭＮ浸潤の誘導により炎症を誘発するかどうかを試験するために用いられる。免疫応答を刺激する化合物は、免疫応答の刺激が有益である療法に有用である。この皮膚血管透過性アッセイは下記に従って実施される。体重３５０グラム以上の無毛モルモットをケタミン（ｋｅｔａｍｉｎｅ）（７５～８０ｍｇ／Ｋｇ）およびキシラジン（ｘｙｌａｚｉｎｅ）５ｍｇ／Ｋｇで筋肉内（ＩＭ）麻酔する。被験試料である精製した本発明化合物の試料またはコンディショニングした媒質を被験動物の背に、注射部位当たり１００μｌで皮内注射する。動物当たり約１０～３０、好ましくは約１６～２４の注射部位が可能である。１μｌのエバンスブルー色素（緩衝化生理食塩水中１％）を心臓内注射する。次いで注射部位の斑点（直径ｍｍ）を注射の１時間後および６時間後に測定する。注射の６時間後に動物を屠殺した。皮膚注射部位それぞれを組織採取し、ホルマリン中に固定する。次いで皮膚を組織病理学的評価のために調製する。各部位を皮膚への炎症細胞浸潤について評価する。目視できる炎症細胞炎症を伴う部位を陽性と採点する。炎症細胞は、好中球、好酸球、単球またはリンパ球の可能性がある。注射部位に少なくともわずかな血管周囲浸潤があれば陽性と採点し、注射部位に浸潤がないものを陰性と採点する。

【０４５８】

Ｆ２ａにより誘導される新生児心臓栄養補給の増強

このアッセイは、本明細書に開示する化合物が新生児心臓の栄養補給を刺激する能力を測定するために設計された；陽性試験は種々の心不全障害の療法処置における有用性の指標となる。

【０４５９】

１日齢Ｈａｒｌａｎ　Ｓｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙラットから心筋細胞を得た。細胞（１８０μｌ，７．５ｘ１０^{4}／ｍｌ，血清＜０．１％，単離したばかり）を、１日目に、ＤＭＥＭ／Ｆ１２＋４％　ＦＣＳで予めコーティングした９６ウェルプレートに添加する。被験化合物を含有する被験試料（２０μｌ／ウェル）を、１日目にウェルに直接添加する。次いで２日目に、ＰＧＦ（２０μｌ／ウェル）を最終濃度１０$^{-6}$Ｍで添加する。次いで４日目に細胞を染色し、５日目に目視採点する。目視採点は細胞サイズに基づき、その際、陰性対照と比較してサイズ増大を示さなかった細胞を０．０と採点し、陰性対照と比較してわずかないし中等度のサイズ増大を示した細胞を１．０と採点し、陰性対照と比較して大幅なサイズ増大を示した細胞を２．０と採点する。１．０以上の評点を陽性とみなす。

【０４６０】

アッセイ応答についてカルシウム濃度が重要であるので、ＰＢＳを含有させない。プレートをＤＭＥＭ／Ｆ１２プラス４％　ＦＣＳ（２００μｌ／ウェル）でコーティングする。アッセイ培地は下記のものを含有していた：ＤＭＥＭ／Ｆ１２（２．４４ｇの炭酸水素塩を含む）、μｇ／ｍｌのトランスフェリン、１μｇ／ｍｌのインスリン、１μｇ／ｍｌのアプロチニン、２ｍｍｏｌ／Ｌのグルタミン、１００Ｕ／ｍｌのペニシリンＧ、１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン。マンニトール（４％）を含有するタンパク質緩衝液は、陽性信号（評点３．５）を１／１０（０．４％）および１／１００（０．０４％）で示したが、１／１０００（０．００４％）では示さなかった。したがって、マンニトールを含有する被験試料緩衝液を試験に使用しない。

【０４６１】
混合リンパ球反応（ＭＬＲ）アッセイにおける阻害活性
この例は、１以上の本発明化合物が、刺激されたＴ－リンパ球の増殖阻害薬として有効であることを示す。リンパ球の増殖を阻害する化合物は、免疫応答の抑制が有益な療法に有用である。
【０４６２】
このアッセイの基本プロトコルは、Current Protocols in Immunology, unit 3.12; eds., Ｊ Ｅ Coligan, Ａ Ｍ Kruisbeek, Ｄ Ｈ Marglies, Ｅ Ｍ Shevach, Ｗ Strober, 国立予防衛生研究所, John Wiley & Sons, Inc.発行に記載されている。
【０４６３】
より詳細には、あるアッセイ変法において、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を哺乳動物個体、たとえばヒトボランティアから、白血球フェレーシスにより単離する（あるドナーはスティミュレーターＰＢＭＣを供給し、他のドナーはレスポンダーＰＢＭＣを供給するであろう）。所望により、細胞を単離した後にウシ胎仔血清およびＤＭＳＯ中で凍結する。凍結細胞をアッセイ培地中で一夜融解し（３７℃，５％　CO_2）、次いでアッセイ培地（ＲＰＭＩ；１０％ウシ胎仔血清，１％ペニシリン／ストレプトマイシン，１％グルタミン，１％　ＨＥＰＥＳ，１％非必須アミノ酸，１％ピルビン酸）中で洗浄および再懸濁して3×10^6個／ｍｌにする。スティミュレーターＰＢＭＣは、細胞を照射することにより産生される（約３０００ラド）。
【０４６４】
このアッセイは、三重試験ウェルに下記の混合物をプレーティングすることにより行なわれる：
１００：１の、１％または０．１％に希釈した被験試料、
５０：１の照射したスティミュレーター細胞、および
５０：１のレスポンダーＰＢＭＣ細胞。
【０４６５】
１００マイクロリットルの細胞培養培地または１００マイクロリットルのＣＤ４－ＩｇＧを対照として用いる。次いでウェルを３７℃、５％　CO_2で４日間インキュベートする。５日目に各ウェルをトリチウム化チミジン（１．０ｍＣ／ウェル；Ａｍｅｒｓｈａｍ）でパルス処理する。６時間後、細胞を３回洗浄し、次いで標識の取込みを評価する。
【０４６６】
このアッセイの他の変法においては、ＰＢＭＣをＢａｌｂ／ｃマウスおよびＣ５７Ｂ６マウスの脾臓から単離する。採取したばかりの脾臓からアッセイ培地（ＲＰＭＩ；１０％ウシ胎仔血清，１％ペニシリン／ストレプトマイシン，１％グルタミン，１％　ＨＥＰＥＳ，１％非必須アミノ酸，１％ピルビン酸）中に細胞を掻き取り、これらの細胞をＬｙｍｐｈｏｌｙｔｅ　Ｍ（Ｏｒｇａｎｏｎ　Ｔｅｋｎｉｋａ）に重ね、２０００ｒｐｍで２０分間遠心分離し、単核細胞をアッセイ培地中で採集および洗浄し、細胞をアッセイ培地に1×10^7個／ｍｌで再懸濁することにより、ＰＢＭＣを単離する。次いで前記に従ってアッセイを実施する。
【０４６７】
対照を下回る低下をいずれも阻害化合物について陽性結果とみなし、８０％以下の低下が好ましい。しかし、対照より小さい数値はいずれも被験タンパク質に関する阻害作用の指標となる。
【０４６８】
内皮細胞アポトーシスの誘導（ＥＬＩＳＡ）
本明細書に開示する化合物が内皮細胞のアポトーシスを誘導する能力を、ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ，Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）において、９６ウェル方式により１００ｎｇ／ｍｌのＶＥＧＦ、０．１％のＢＳＡ、１ｘペニシリン／ストレプトマイシンを補充した０％血清培地中で試験することができる。
【０４６９】

このアッセイにおける陽性試験は、望ましくない内皮細胞増殖に関連する種々の状態のいずれかを療法処置すること、たとえば腫瘍増殖の阻害に対する、本発明化合物の有用性の指標となる。９６ウェルプレートのコーティングは、ＰＢＳ中の０．２％ゼラチン溶液１００μｌを＞３０分間、ゲル化させることにより調製できる。ゼラチンミックスを十分に吸引した後、ＨＵＶＥＣ細胞を、１０％血清含有培地１００μｌ／ウェル中、最終濃度２ｘ１０^{4}個／ｍｌでプレーティングする。細胞を２４時間増殖させた後、目的化合物を含有する被験試料を添加する。

【０４７０】

すべてのウェルに、１００ｎｇ／ｍｌのＶＥＧＦ、０．１％のＢＳＡ、１ｘペニシリン／ストレプトマイシンを補充した０％血清培地（Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）１００μｌを添加する。被験化合物を含有する被験試料を三重試験法により１％、０．３３％および０．１１％の希釈度で添加した。細胞を含まないウェルをブランクとして用い、細胞のみを含むウェルを陰性対照として用いる。陽性対照として、５０μｌの３ｘスタウロスポリン（ｓｔａｕｒｏｓｐｏｒｉｎｅ）原液の１：３系列希釈液を用いる。ＥＬＩＳＡの前に細胞を２４～３５時間インキュベートする。

【０４７１】

Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｕａｌ［Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ，Ｃｅｌｌ　Ｄｅａｔｈ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ＥＬＩＳＡ　ｐｌｕｓ，カタログＮｏ．１　９２０　６８５］に従って溶液を調製して、ＥＬＩＳＡによりアポトーシスのレベルを測定する。試料の調製：９６ウェルプレートを１　ｋｒｐｍで１０分間（２００ｇ）遠心分離し；速やかに反転して上清を除去し、プレートをペーパータオル上に裏返すことにより残留液体を除去する。各ウェルに２００μｌの１ｘ細胞溶解用緩衝液を添加し、室温で３０分間、振とうせずにインキュベーションを行なう。プレートを１　ｋｒｐｍで１０分間遠心沈殿させ、２０μｌの溶解物（細胞質画分）をストレプトアビジンコーティングしたＭＴＰ内へ移す。８０μｌの免疫試薬ミックスを、各ウェル内の２０μｌの溶解物に添加した。ＭＴＰを粘着性箔で覆い、室温で２時間、オービタルシェーカー（２００ｒｐｍ）に乗せることによりインキュベートした。２時間後、上清を吸引により除去し、ウェルをウェル当たり２５０μｌの１ｘインキュベーション用緩衝液で３回すすいだ（吸引により除去）。基質溶液（１００μｌ）を各ウェルに添加し、オービタルシェーカー上、室温、２５０ｒｐｍで、発色が測光分析に十分になるまでインキュベートした（約１０～２０分後）。９６ウェルリーダーを用いてプレートを４０５ｎｍ、基準波長４９２ｎｍで読み取った。ＰＩＮ　３２（対照緩衝液）について得たレベルを１００％に設定した。＞１３０％のレベルをもつ試料をアポトーシス誘導について陽性とみなした。

【０４７２】

ヒト静脈内皮細胞カルシウムフラックスアッセイ

このアッセイは、本発明化合物がヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ，Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）においてカルシウムフラックスを刺激する能力を示すかどうかを判定するために設計された。カルシウムフラックスは特定のリガンドがそれらの受容体に結合する際の応答であり、十分な記載がある。このカルシウムインフラックスアッセイで陽性応答を生じる被験化合物は、ヒト内皮細胞において特定の受容体に結合して生物シグナル伝達経路を活性化すると言うことができる。これにより、最終的にはたとえば内皮細胞分裂、内皮細胞増殖阻害、内皮管形成、細胞移動、アポトーシスなどをもたらす可能性がある。

【０４７３】

ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ，Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を、増殖培地（５０：５０，グリシンを含まない，１％グルタミン，１０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ，１０％　ＦＢＳ，１０ｎｇ／ｍｌ　ｂＦＧＦ）中において、９６ウェルマイクロタイターＶｉｅｗＰｌａｔｅｓ－９６（Ｐａｃｋａｒｄ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ　Ｃｏｍｐａｎｙ　Ｐａｒｔ　＃６００５１８２）マイクロタイタープレートに、細胞密度２ｘ１０^{4}個／ウェルでプレーティングする。プレーティングの翌日、細胞を緩衝液（ＨＢＳＳプラス１０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ）で３回洗浄し、１００μｌ／ウェルを残す。次いで１００μｌ／ウェルの８μＭ

Ｆｌｕｏ－３（２ｘ）を添加する。細胞を３７℃／５％ CO_2で１．５時間インキュベートする。インキュベーション後、次いで細胞を緩衝液（前記）で３回洗浄し、１００μｌ／ウェルを残す。化合物の被験試料を、異なる９６ウェルプレートに、緩衝液中５ｘ濃度で調製する。陽性対照は、５０μＭイオノマイシン（ｉｏｎｏｍｙｃｉｎ）（５ｘ）に相応する；陰性対照は、プロテイン３２に相応する。細胞プレートと試料プレートをＦＬＩＰＲ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）機器で操作する。ＦＬＩＰＲ機器により２５μｌの被験試料を細胞に添加し、１秒毎に１分間、次いで３秒毎に次の３分間、読取りを行なう。

【０４７４】

ベースラインから曲線の最大上昇までの蛍光変化（△変化）を計算し、二重測定値を平均する。蛍光増強率をモニターし、１０００より大きい△変化および６０秒以内での上昇をもつ試料のみを陽性とみなす。

【０４７５】

線維芽細胞（ＢＨＫ－２１）増殖

このアッセイは、本発明化合物が培養された哺乳動物線維芽細胞の増殖を誘導する作用をもち、したがって機能が哺乳動物系における有用な増殖因子であるかを示すであろう。

【０４７６】

このアッセイは下記に従って実施される。ＢＨＫ－２１線維芽細胞を標準増殖培地に２５００個／ウェルで全容量１００μｌにおいてプレーティングする。次いで化合物ベータ－ＦＧＦ（陽性対照）または化合物なし（陰性対照）を、１μｇ／ｍｌのヘパリンの存在下でウェルに添加し、全最終容量２００μｌにする。次いで細胞を３７℃で６～７日間インキュベートする。インキュベーション後、培地を除去し、細胞をＰＢＳで洗浄し、次いで酸性ホスファターゼ基質反応混合物（１００μｌ／ウェル）を添加する。次いで細胞を３７℃で２時間インキュベートする。次いで１０μＬ／ウェルの１Ｎ　ＮａＯＨを添加して、酸性ホスファターゼ反応を停止する。次いでプレートをＯＤ　４０５ｎｍで読み取る。このアッセイにおける陽性は、酸性ホスファターゼ活性が陰性対照より少なくとも５０％高いものである。

【０４７７】

成体心臓肥大の阻害

このアッセイは、本明細書に開示する種々の化合物が成体心臓肥大を阻害する能力を測定するために設計された。このアッセイにおいて陽性を示す化合物は、心臓肥大に関連する心障害の療法処置に有用な可能性がある。

【０４７８】

成体（２５０ｇ）Ｈａｒｌａｎ　Ｓｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙラットから新たに心室心筋細胞を単離し、細胞を２０００個／ウェルで１８０μｌ容量においてプレーティングする。２日後、被験化合物を含有する被験試料（２０μｌ）を添加する。５日目に細胞を固定し、次いで染色する。ＡＮＰメッセージの増大をＰＣＲにより数時間後に測定することもできる。結果は細胞サイズの目視採点に基づく：０＝阻害なし、－１＝わずかな阻害、－２＝大幅な阻害。０未満の評点を陽性とみなす。活性基準は０．１ｍＭのフェニルアラニン（ＰＥ）に相応し、これが陽性対照である。アッセイ培地には下記のものが含まれる：Ｍ１９９（改変）－グルタミンを含まない、$NaHCO_3$、フェノールレッド、下記を補充：１００ｎＭのインスリン、０．２％のＢＳＡ、５ｍＭのクレチン（ｃｒｅｔｉｎｅ）、２ｍＭのＬ－カルニチン、５ｍＭのタウリン、１００Ｕ／ｍｌのペニシリンＧ、１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（ＣＣＴ培地）。９６ウェルプレートの内側６０ウェルのみを用いる。これらのうち６ウェルを陰性および陽性（ＰＥ）対照用に確保する。

【０４７９】

内皮細胞におけるｃ－ｆｏｓの誘導

このアッセイは、本発明化合物が内皮細胞においてｃ－ｆｏｓを誘導する能力を示すかどうかを判定するために設定された。このアッセイにおいて陽性を示す化合物は、たとえば創傷治癒などを含めた、血管新生が有益である状態または障害の療法処置に有用である

と期待されるであろう（これらの化合物のアゴニスト）。このアッセイにおいて陽性を示す化合物のアンタゴニストは癌性腫瘍の療法処置に有用であると期待されるであろう。

【０４８０】

ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ，Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を増殖培地（５０％Ｈａｍ’ｓ　Ｆ１２　ｗ／ｏ　ＧＨＴ：低グルコース、および５０％　ＤＭＥＭ、グリシンなし；下記を含む：$NaHCO_3$、１％グルタミン、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１０％　ＦＢＳ、１０ｎｇ／ｍｌ　ｂＦＧＦ）中において、９６ウェルプレートに細胞密度1×10^4個／ウェルでプレーティングする。プレーティングの翌日、増殖培地を除去することにより細胞を飢餓状態にし、細胞を１００μｌ／ウェルの被験試料および対照（陽性対照＝増殖培地；陰性対照＝プロテイン３２、緩衝液＝１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１４ｍＭ　ＮａＣｌ、４％（ｗ／ｖ）マンニトール、ｐＨ６．８）で処理する。細胞を３７℃で３０分間、５％　CO_2中でインキュベートする。試料を取り出し、ｂＤＮＡキットプロトコル（Ｃｈｉｒｏｎ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，カタログ＃６００５－０３７）の第１部に従う；下記に挙げる大文字で始まる試薬／緩衝液はそれぞれキットから得られる。

【０４８１】

要約すると、試験に必要なＴＭ溶解緩衝液（ＴＭ　Ｌｙｓｉｓ　Ｂｕｆｆｅｒ）およびプローブ（Ｐｒｏｂｅ）の量を、製造業者が提供する情報に基づいて計算する。適切な量の融解したプローブをＴＭ溶解緩衝液に添加する。捕獲ハイブリダイゼーション緩衝液（Ｃａｐｔｕｒｅ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ）を室温に高める。ｂＤＮＡストリップを金属製ストリップホルダーに取り付け、１００μｌの捕獲ハイブリダイゼーション緩衝液を必要な各ｂ－ＤＮＡウェルに添加し、続いて少なくとも３０分間インキュベートする。細胞を含む試験プレートをインキュベーターから取り出し、真空マニホールドにより培地を静かに除去する。プローブを含む溶解ハイブリダイゼーション緩衝液（Ｌｙｓｉｓ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ）１００μｌを、マイクロタイタープレートの各ウェルにピペットで速やかに添加する。次いでプレートを５５℃で１５分間インキュベートする。プレートをインキュベーターから取り出して、マイクロタイターアダプターヘッド付きボルテックスミキサーに乗せ、＃２設定で１分間、ボルテックス撹拌する。８０μｌの溶解物を取り出して、捕獲ハイブリダイゼーション緩衝液を入れたｂＤＮＡウェルに添加し、ピペットで吸上げ、吸出しして混合する。プレートを５３℃で少なくとも１６時間インキュベートする。

【０４８２】

翌日、キットプロトコルの第２部を続ける。詳細には、プレートをインキュベーターから取り出し、台に乗せて10分間冷却させる。必要な添加容量を、製造業者が提供する情報に基づいて計算する。増幅器作動液（Ａｍｐｌｉｆｉｅｒ　Ｗｏｒｋｉｎｇ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ）は、ＡＬハイブリダイゼーション緩衝液（ＡＬ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ）中における増幅器濃縮液（Ａｍｐｌｉｆｉｅｒ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅ）（２０ｆｍ／μｌ）の１：１００希釈液を作成することにより調製される。ハイブリダイゼーション混合物をプレートから除去し、洗浄液Ａ（Ｗａｓｈ　Ａ）で２回洗浄する。５０μｌの増幅器作動液を各ウェルに添加し、ウェルを５３℃で３０分間インキュベートする。次いでプレートをインキュベーターから取り出し、１０分間放冷する。標識プローブ作動液（Ｌａｂｅｌ　Ｐｒｏｂｅ　Ｗｏｒｋｉｎｇ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ）は、ＡＬハイブリダイゼーション緩衝液中における標識濃縮液（Ｌａｂｅｌ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅ）（４０ｐｍｏｌｅ／μｌ）の１：１００希釈液を作成することにより調製される。１０分間の冷却期間の後、増幅器ハイブリダイゼーション混合物を除去し、プレートを洗浄液Ａで２回洗浄する。５０μｌの標識プローブ作動液を各ウェルに添加し、ウェルを５３℃で１５分間インキュベートする。１０分間冷却させた後、基質（Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ）を室温に高める。アッセイに必要な基質の各ｍｌに３μｌの基質増強剤（Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ　Ｅｎｈａｎｃｅｒ）を添加して、プレートを１０分間放冷し、標識ハイブリダイゼーション混合物を除去し、プレートを洗浄液Ａで２回、洗浄液Ｄ（Ｗａｓｈ　Ｄ）で３回洗浄する。増強剤を含む基質溶液５０μｌを各ウェルに添加する。プレートを３７℃で３０

分間インキュベートし、適切なルミノメーターでＲＬＵを読み取る。

【０４８３】

二重測定値を平均し、変動定数を決定する。陰性対照（前記のプロテイン３２（Ｐｒｏｔｅｉｎ　３２）／ＨＥＰＥＳ緩衝液）値を超える活性倍率の尺度は、化学発光単位（ＲＬＵ）により示される。化合物が陰性緩衝液対照より少なくとも２倍高い値を示した場合、それらの結果を陽性とみなす。陰性対照＝１．００ＲＬＵ、希釈度１．００％。陽性対照＝８．３９ＲＬＵ、希釈度１．００％。

【０４８４】

モルモット血管漏出

このアッセイは、本発明化合物が血管透過を誘導する能力を示すかどうかを判定するために設定された。このアッセイにおいて陽性を示す化合物は、たとえば局所免疫系細胞浸潤の増強が有益となる可能性のある状態を含めた、血管透過性増強が有益となる状態の療法処置に有用であると期待される。

【０４８５】

体重３５０グラム以上の無毛モルモットをケタミン（７５～８０ｍｇ／Ｋｇ）およびキシラジン５ｍｇ／Ｋｇで筋肉内麻酔する。被験化合物を含有する被験試料または被験化合物を含有しない生理食塩水を、被験動物の背に注射部位当たり１００μｌで皮内注射する。動物当たり約１６～２４の注射部位である。次いで１ｍｌのエバンスブルー色素（ＰＢＳ中１％）を心臓内注射する。被験物質投与の１時間後および６時間後に、化合物に対する皮膚血管透過性応答（すなわち注射の注射部位の斑点）を注射部位からの青色漏出の直径（ｍｍ）の測定により目視採点する。注射部位の青色の直径（ｍｍ）を測定して記録する；血管漏出の程度。精製タンパク質を試験した場合、少なくとも５ｍｍの直径をこのアッセイについて陽性とみなす；これは血管漏出または透過性を誘導する能力の指標となる。コンディショニングした媒質試料について、直径７ｍｍより大きい応答を陽性とみなす。０．１μｇ／１００μｌのヒトＶＥＧＦが陽性対照として用いられ、直径１５～２３ｍｍの応答を誘導する。

【０４８６】

内皮細胞アポトーシスの検出（ＦＡＣＳ）

本明細書に開示する化合物が内皮細胞のアポトーシスを誘導する能力を、ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ，Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）において、ゼラチン処理したＴ１７５フラスコ内で１０継代以内のＨＵＶＥＣを用いて試験する。このアッセイで陽性を示す化合物は、たとえば腫瘍の療法処置を含めて内皮細胞のアポトーシスが有益となるであろう状態の療法処置に有用であると期待される。

【０４８７】

１日目に細胞を分配し［ゼラチン処置した６ｃｍ　ディッシュ当たり細胞４２０，０００個（１１ｘ１０^{3}個／ｃｍ^{2}，Ｆａｌｃｏｎ，　Ｐｒｉｍａｒｉａ）］、血清含有培地（ＣＳ－Ｃ，Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍ）中で一夜または１６～２４時間培養する。

【０４８８】

２日目に、細胞を５ｍｌのＰＢＳで１回洗浄し；３ｍｌの０％血清培地をＶＥＧＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）と共に添加し；３０μｌのＰＲＯ被験化合物（最終希釈度１％）または０％血清培地（陰性対照）を添加する。収穫前に混合物を４８時間培養する。

【０４８９】

次いで細胞をＦＡＣＳ分析用に収穫する。培地を吸引し、細胞をＰＢＳで１回洗浄する。５ｍｌの１ｘトリプシンをＴ－１７５フラスコ内の細胞に添加し、細胞がプレートから離脱するまで細胞を放置する（約５～１０分間）。５ｍｌの増殖培地の添加によりトリプシン処理を停止する。細胞を１０００ｒｐｍ、４℃で５分間遠心分離する。培地を吸引し、１０ｍｌの１０％血清補充培地（Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）に再懸濁し、５μｌのＡｎｎｅｘｉｎ－ＦＩＴＣ（ＢｉｏＶｉｓｏｎ）を添加し、冷却した試験管をＦＡＣＳ分析する。陽性結果は、陰性対照と比較して化合物処理した試料においてアポトーシスが増大することと判定される。

【０４９０】
皮質ニューロンにおけるｃ－ｆｏｓの誘導
このアッセイは、被験化合物が皮質ニューロンにおいてｃ－ｆｏｓを誘導する能力を示すかどうかを判定するために設計された。このアッセイで陽性を示す化合物は、ニューロン増殖が有益となるであろう神経系障害および傷害の療法処置に有用であると期待されるであろう。
【０４９１】
皮質ニューロンを解離させ、９６ウェルプレートにおいて増殖培地に細胞１０，０００個／ウェルでプレーティングする。約２回の細胞分裂の後、細胞を化合物と共に、または化合物なしで（陰性対照）３０分間処理する。次いで細胞を冷メタノールで５分間固定し、リン酸化ＣＲＥＢに対する抗体で染色する。次いで化学発光を用いてｍＲＮＡレベルを計算する。このアッセイにおける陽性は、陰性対照と比較して少なくとも２倍のｃ－ｆｏｓメッセージ増大をもたらすいずれかの係数である。
【０４９２】
内皮管形成の刺激
このアッセイは、本発明化合物が内因性増殖因子の不存在下で内皮性の空胞（ｖａｃｕｏｌｅ）および内腔（ｌｕｍｅｎ）形成を促進する能力を示すかどうかを判定するために設計された。このアッセイで陽性を示す化合物は、たとえばピノサイトーシス、イオンポンプ作用、血管透過性および／またはジャンクション形成の刺激を含めた内皮空胞および／または内腔形成が有益となるであろう障害の療法処置に有用であると期待されるであろう。
【０４９３】
ＨＵＶＥＣ細胞（初代から＜８継代）を、Ｉ型ラット尾コラーゲン（最終濃度２．６ｍｇ／ｍｌ）と、細胞６ｘ１０^{5}個／ｍｌの密度で混合し、１％のＦＢＳおよび１μＭの６－ＦＡＭ－ＦＩＴＣ色素（空胞の形成中にそれらを染色するため）を補充したＭ１９９培養培地５０μｌ／ウェル中で、被験化合物の存在下にプレーティングする。次いで細胞を３７°Ｃ／５％　ＣＯ$_{2}$で４８時間インキュベートし、３．７％ホルマリンにより室温で１０分間固定し、Ｍ１９９培地で５分間洗浄し、次いでＲｈ－Ｐｈａｌｌｏｉｄｉｎにより４℃で一夜染色し、続いて４μＭ　ＤＡＰＩで核染色する。このアッセイにおける陽性結果は、５０％以上の細胞に空胞が存在する場合である。
【０４９４】
骨格筋におけるグルコースおよび／またはＦＦＡ取込みに影響を与える本発明化合物の検出
このアッセイは、本発明化合物が骨格筋によるグルコースまたはＦＦＡ取込みに影響を与える能力を示すかどうかを判定するために設計された。このアッセイで陽性を示す化合物は、たとえば糖尿病または高もしくは低インスリン血症を含めて骨格筋によるグルコース取込みの刺激または阻害が有益となるであろう障害の療法処置に有用であると期待されるであろう。
【０４９５】
９６ウェル方式で、アッセイすべき化合物を分化した初代ラット骨格筋に添加し、一夜インキュベートする。次いで本発明化合物（＋／－インスリン）を含む新鮮な培地をウェルに添加する。次いで試料培地をモニターして、骨格筋によるグルコースおよびＦＦＡ取込みを測定する。インスリンは骨格筋によるグルコースおよびＦＦＡ取込みを刺激し、本発明化合物を用いない培地中のインスリンは陽性対照として用いられ、採点の限界である。被験化合物はグルコースおよびＦＦＡ取込みを刺激または阻害する可能性があるので、このアッセイにおいてインスリン対照より１．５倍以上または０．５倍未満の場合には、結果は陽性と採点される。
【０４９６】
杆体光受容細胞生存アッセイ
このアッセイは、本発明化合物が杆体光受容細胞の生存／増殖を高める作用をする能力

をもち、したがってたとえば動物における色素性網膜炎、ＡＭＤなどによる視力喪失の処置を含めた、網膜の障害または傷害の療法処置に有用であることを調べる。

【０４９７】

Ｓｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙ仔ラット（生後７日目、混合集団：グリアおよび網膜神経細胞タイプ）をCO_2麻酔後に断頭屠殺し、無菌条件下で眼を摘出する。色素上皮および他の眼組織から神経性網膜を剥離し、次いでCa^{2+}、Mg^{2+}を含まないＰＢＳ中の０．２５％トリプシンにより解離させて単細胞懸濁液にする。網膜をこの溶液中において３７℃で７～１０分間インキュベートした後、１ｍｌの大豆トリプシンインヒビターの添加によりトリプシンを不活性化する。９６ウェルプレートに、N_2を補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中、約１００，０００個／ウェルで細胞をプレーティングする。すべての実験について、細胞を３７℃で水飽和した５％　CO_2雰囲気において増殖させる。７～１０日間の培養後、細胞をカルセインＡＭまたはＣｅｌｌＴｒａｃｋｅｒ　Ｇｒｅｅｎ　ＣＭＦＤＡにより染色し、次いで４％パラホルムアルデヒドで固定する。視覚色素ロドプシンに対するモノクローナル抗体であるＲｈｏ　４Ｄ２（腹水またはＩｇＧ　１：１００）を用いて間接的免疫蛍光により杆体光受容細胞を検出する。結果を生存率％として示す：カルセイン総数－培養７～１０日目のロドプシン陽性細胞を、培養７～１０日目のロドプシン陽性細胞の総数で割る。細胞総数（蛍光性）を２０ｘ対物倍率でＣＣＤカメラおよびＭａｃＩｎｔｏｓｈ用ＮＩＨ画像ソフトウェアにより定量する。ウェル内の視野をランダムに選択する。

【０４９８】

インビトロ抗腫瘍アッセイ

本明細書に開示する化合物の抗増殖活性は、国立癌研究所（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）（ＮＣＩ）の発明による疾患指向インビトロ抗癌薬探索アッセイ法で、スルホローダミンＢ（ＳＲＢ）色素結合アッセイ法を用いて判定できる；本質的にSkehan et al., J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-1112 (1990)に記載の方法。この試験に用いた６０の腫瘍細胞系（“ＮＣＩパネル”）、ならびにそれらのインビトロでの維持および培養のための条件は、Monks et al., J. Natl. Cancer Inst. 83:757-766 (1991)に記載されている。このスクリーニングの目的は、種々のタイプの腫瘍に対する被験化合物の細胞毒性および／または細胞増殖抑制活性をまず評価することである(Monks et al.,前掲; Boyd, Cancer: Princ. Pract. Oncol. Update 3(10):1-12 [1989])。

【０４９９】

約６０のヒト腫瘍細胞系に由来する細胞をトリプシン／ＥＤＴＡ（Ｇｉｂｃｏ）で収穫し、１回洗浄し、ＩＭＥＭに再懸濁し、それらの生存率を測定する。細胞懸濁液をピペットで（１００μＬ容量）別の９６ウェルマイクロタイタープレートに添加する。過剰増殖を防ぐために、６日間インキュベーションの細胞密度は、２日間インキュベーションのものより低い。播種物に安定化のために３７℃で２４時間のプレインキュベート期間をおく。意図する試験濃度の２倍希釈液を、ゼロ時点で１００μＬずつマイクロタイタープレートのウェルに添加する（１：２希釈）。被験化合物を５種類の半対数希釈（１０００～１００，０００倍）で評価する。インキュベーションを２日間および６日間、５％　CO_2雰囲気および湿度１００％で行なう。

【０５００】

インキュベーション後、培地を除去し、細胞を０．１ｍｌの１０％トリクロロ酢酸中、４０℃で固定する。プレートを脱イオン水で５回すすぎ、乾燥させ、１％酢酸に溶解した０．４％スルホローダミンＢ色素（Ｓｉｇｍａ）０．１ｍｌで３０分間染色し、１％酢酸で４回すすいで結合していない色素を除去し、乾燥させ、染色物を０．１ｍｌの１０ｍＭトリス塩基［トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン］、ｐＨ１０．５で５分間抽出する。４９２ｎｍにおけるスルホローダミンＢの吸光度（ＯＤ）をコンピューター連係９６ウェルマイクロタイタープレートリーダーにより測定する。

【０５０１】

被験試料が１種類以上の濃度で少なくとも５０％の増殖阻害作用を示した場合、それを

陽性とみなす。

初代ラット脂肪細胞によるグルコースまたはＦＦＡ取込みに影響を与える本発明化合物の判定

このアッセイは、本発明化合物が脂肪細胞によるグルコースまたはＦＦＡ取込みに影響を与える能力を示すかどうかを判定するために設計された。このアッセイで陽性を示す化合物は、たとえば肥満症、糖尿病または高もしくは低インスリン血症を含めて脂肪細胞によるグルコース取込みの刺激または阻害が有益となるであろう障害の療法処置に有用であると期待されるであろう。

【０５０２】

９６ウェル方式で、アッセイすべき化合物を初代ラット脂肪細胞に添加し、一夜インキュベートする。試料を４および１６時間目に採取し、グリセロール、グルコースおよびＦＦＡの取込みをアッセイする。１６時間のインキュベーション後、インスリンを培地に添加し、４時間インキュベートする。この時点で試料を採取し、グリセロール、グルコースおよびＦＦＡの取込みを測定する。インスリンを含有し、本発明化合物を含有しない培地を陽性基準対照として用いる。被験化合物はグルコースおよびＦＦＡ取込みを刺激または阻害する可能性があるので、このアッセイにおいてインスリン対照より１．５倍以上または０．５倍未満の場合、結果は陽性と採点される。

【０５０３】

軟骨細胞再分化アッセイ

このアッセイは、本発明化合物が軟骨細胞の再分化を誘導し、したがって種々の骨障害および／または軟骨障害、たとえばスポーツ傷害および関節炎の処置に有用であるかどうかを示す。このアッセイは下記に従って実施される。４～６カ月齢の雌ブタの中手指節関節の関節軟骨を一夜コラゲナーゼ消化することにより、ブタ軟骨細胞を単離する。単離した細胞を、次いで２５，０００個／ｃｍ^{2}で、１０％のＦＢＳおよび４μｇ／ｍｌのゲンタマイシンを含有するＨａｍ　Ｆ－１２中において播種する。培養培地を３日目毎に交換し、次いで細胞を９６ウェルプレートに５，０００個／ウェルで、血清を含まない同培地１００μｌ中において播種し、１００μｌの被験化合物、５ｎＭのスタウロスポリン（陽性対照）または培地のみ（陰性対照）を添加して、最終容量２００μｌ／ウェルにする。３７℃で５日間のインキュベーション後、各ウェルの写真をとり、軟骨細胞の分化状態を判定する。軟骨細胞の再分化が陰性対照より陽性対照の方に類似すると判定された場合、このアッセイにおいて陽性結果となる。

【０５０４】

赤芽細胞系における胎児性ヘモグロビン誘導

このアッセイは、赤芽細胞系において成体ヘモグロビンから胎児性ヘモグロビンへの移行を誘導する能力について化合物をスクリーニングするのに有用である。このアッセイで陽性を示す化合物は、種々の哺乳動物ヘモグロビン関連障害、たとえば種々のサラセミア（地中海貧血）の療法処置に有用であると期待される。このアッセイは下記に従って実施される。赤芽細胞を、９６ウェル方式で、標準増殖培地に１０００個／ウェルでプレーティングする。被験化合物を増殖培地に０．２％または２％の濃度で添加し、細胞を３７℃で５日間インキュベートする。陽性対照として細胞を１００μＭヘミンで処理し、陰性対照としては細胞を処理しない。５日後、細胞溶解物を調製し、ガンマグロビン（胎児マーカー）の発現を分析する。このアッセイにおける陽性は、陰性対照より少なくとも２倍高いレベルのガンマグロビンである。

【０５０５】

マウス腎メサンギウム細胞増殖アッセイ

このアッセイは、本発明化合物が哺乳動物腎メサンギウム細胞の増殖を誘導し、したがって、メサンギウム細胞機能低下に関連する腎障害、たとえばベルガー病、またはシェーンライン-ヘノッホ紫斑病、セリアック病、疱疹状皮膚炎もしくはクローン病に関連する他の腎障害の処置に有用であるかどうかを示す。このアッセイは下記に従って実施される。１日目に、マウス腎メサンギウム細胞を９６ウェルプレートにおいて、増殖培地（ダル

ベッコの改変イーグル培地とＨａｍのＦ１２培地との３：１混合物、９５％ウシ胎仔血清、５％の１４ｍＭ　ＨＥＰＥＳを補充）中で一夜増殖させる。２日目に、被験化合物を２種類の濃度（１％および０．１％）で無血清培地中に希釈し、細胞に添加する。対照試料は無血清培地のみである。４日目に、２０μｌのＣｅｌｌ　Ｔｉｔｅｒ　９６　Ａｑｕｅｏｕｓ　ｏｎｅ溶解試薬（Ｐｒｏｇｅｍａ）を各ウェルに添加し、比色反応を２時間進行させた。次いで４９０　ｎｍで吸光度（ＯＤ）を測定する。陽性対照は、対照の読みより少なくとも１５％高い吸光度の読みである。

【０５０６】

ラット卵形嚢支持細胞の増殖

このアッセイは、本発明化合物が、聴覚有毛細胞前駆体である内耳支持細胞に対して有効なマイトジェンとして作用し、したがって、哺乳動物において聴覚有毛細胞の再生を誘導して難聴を処置するのに有用であることを判定するために用いられる。このアッセイは下記に従って実施される。ラットＵＥＣ－４卵形嚢（ｕｔｒｉｃｕｌａｒ）上皮細胞を、９６ウェルプレートに３０００個／ウェルの密度で２００μｌの血清含有培地中において３３℃で分配する。細胞を一夜培養し、次いで無血清培地、３７℃に切り換える。本発明化合物の種々の希釈液（または対照については化合物なし）を次いで培養物に添加し、細胞を２４時間インキュベートする。２４時間のインキュベーション後、^{3}Ｈ－チミジン（１μＣｉ／ウェル）を添加し、次いで細胞をさらに２４時間培養する。次いで培養物を洗浄して、取り込まれていない放射性標識を除去し、細胞を回収し、Ｃｐｍ／ウェルを測定する。対照培養と比較して少なくとも３０％高いＣｐｍを、このアッセイにおける陽性とみなす。

【０５０７】

軟骨細胞増殖アッセイ

このアッセイは、本発明化合物が培養された軟骨細胞の増殖および／または再分化を誘導する能力を示すかどうかを判定するために設計された。このアッセイで陽性を示す化合物は、種々の骨障害および／または軟骨障害、たとえばスポーツ傷害および関節炎の療法処置に有用であると期待されるであろう。

【０５０８】

４～６カ月齢の雌ブタの中手指節関節の関節軟骨を一夜コラゲナーゼ消化することにより、ブタ軟骨細胞を単離する。単離した細胞を、次いで２５，０００個／ｃｍ^{2}で、１０％のＦＢＳおよび４μｇ／ｍｌのゲンタマイシンを含有するＨａｍ　Ｆ－１２中において播種する。培養培地を３日目毎に交換し、５日目毎に細胞を２５，０００個／ｃｍ^{2}で再播種する。１２日目に、細胞を９６ウェルプレートに５，０００個／ウェルで、血清を含まない同培地１００μｌ中において播種し、１００μｌの無血清培地（陰性対照）、スタウロスポリン（５ｎＭ；陽性対照）または被験化合物を添加して、最終容量２００μｌ／ウェルにする。３７℃で５日後、２０μｌのＡｌａｍａｒブルーを各ウェルに添加し、プレートを３７℃でさらに３時間インキュベートする。次いで各ウェルの蛍光を測定する（励起：５３０ｎｍ；発光：５９０ｎｍ）。２００μｌの無血清培地を含むプレートの蛍光を測定してバックグラウンドを求める。化合物処理試料の蛍光が陰性対照より陽性対照の方に類似する場合、このアッセイにおいて陽性結果が得られる。

【０５０９】

ＬＩＦ＋ＥＴ－１により誘発される新生児心臓肥大の抑制

このアッセイは、本発明化合物がＬＩＦおよびエンドセリン－１（ＥＴ－１）により誘発される新生児心臓肥大を抑制する能力を示すかどうかを判定するために設計された。このアッセイで陽性応答を与える被験化合物は、心筋の不都合な肥大を特徴とするかまたはそれに関連する心不全性の疾患または障害の療法処置に有用であろう。

【０５１０】

１日齢Ｈａｒｌａｎ　Ｓｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙラットに由来する心筋細胞（１８０μｌ、７．５ｘ１０^{4}個／ｍｌ、血清＜０．１、単離したばかり）を、１日目に、予めＤＭＥＭ／Ｆ１２＋４％　ＦＣＳでコーティングした９６ウェルプレートに導入する。次

いで２日目に、被験化合物試料または増殖培地のみ（陰性対照）を２０μｌ容量でウェルに直接添加する。次いで３日目に、ＬＩＦ＋ＥＴ－１をウェルに添加する。さらに２日間の培養後に細胞を染色し、次いで翌日に目視採点する。化合物処理した心筋細胞が非処理心筋細胞より平均して視覚的に小さい場合、または個数が少ない場合、このアッセイにおいて陽性となる。

【図１】

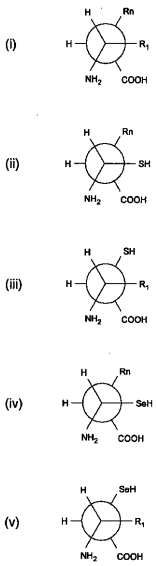


FIG. 1

【図２】

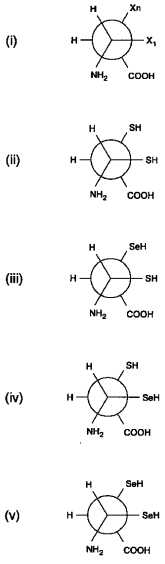


FIG. 2

【図３】

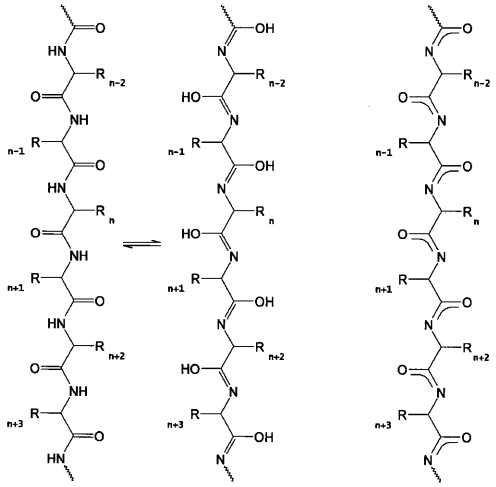


FIG. 3

【図４Ａ】

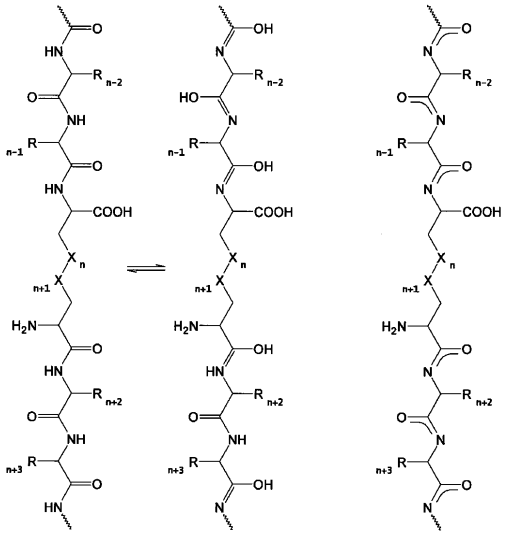


FIG. 4A

【図４Ｂ】

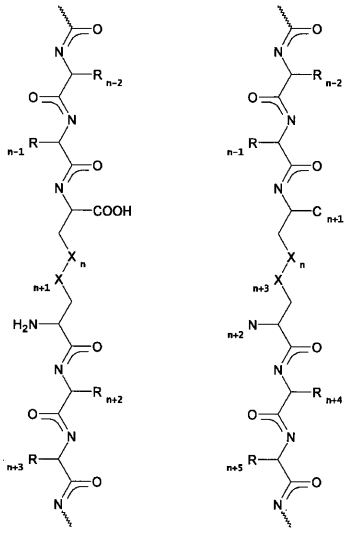


FIG. 4B

【図４Ｃ】

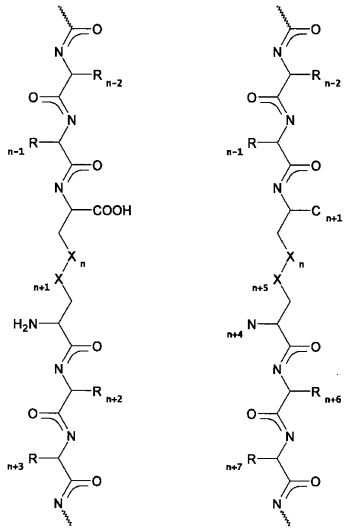


FIG. 4C

【図４Ｄ】

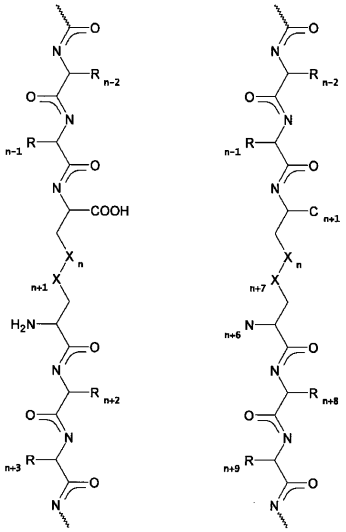


FIG. 4D

【図５】

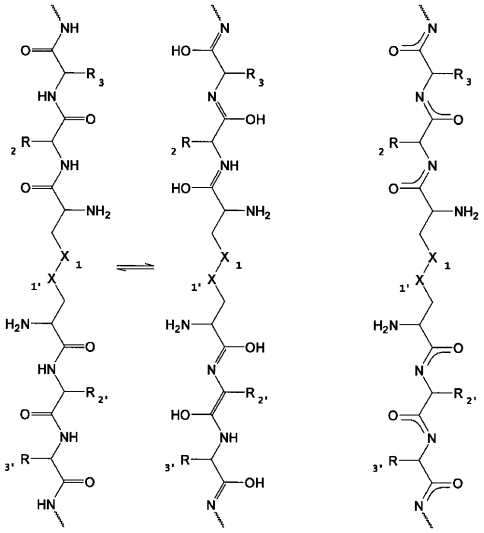


FIG. 5

【図６】

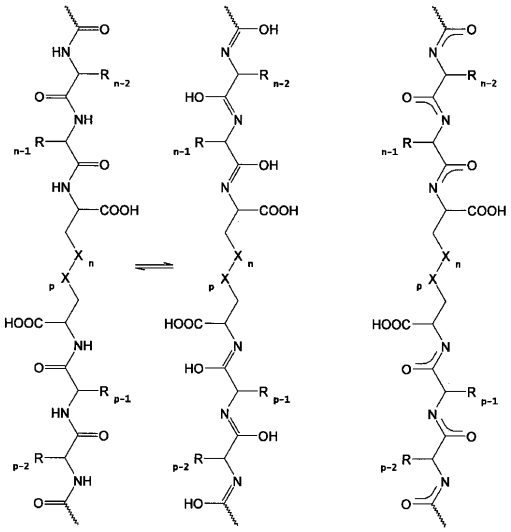


FIG. 6

【図７】

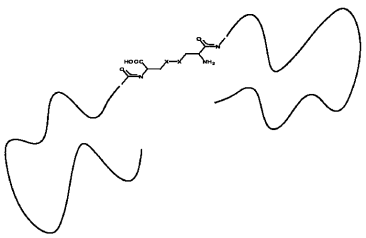


FIG. 7

【図８】

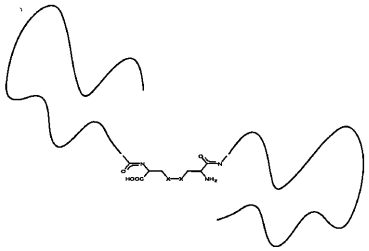


FIG. 8

【図９】

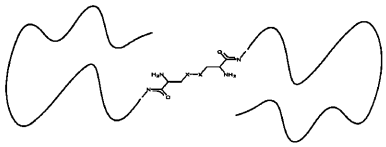


FIG. 9

【図１０】

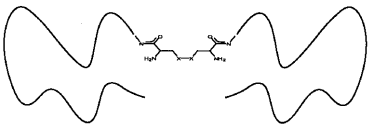


FIG. 10

【図１１】

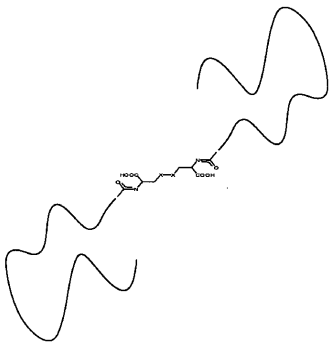


FIG. 11

【図１２】

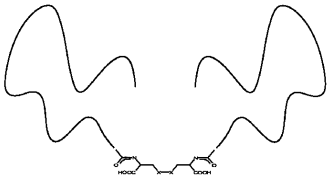


FIG. 12

【図１３】

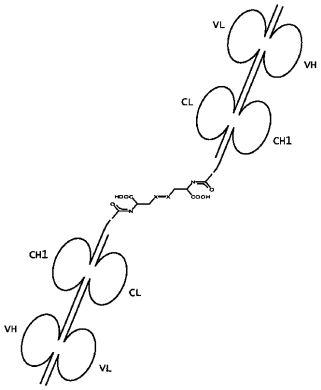


FIG. 13

【図１４】

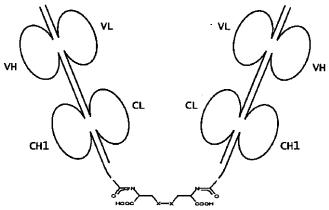


FIG. 14

【図１５】

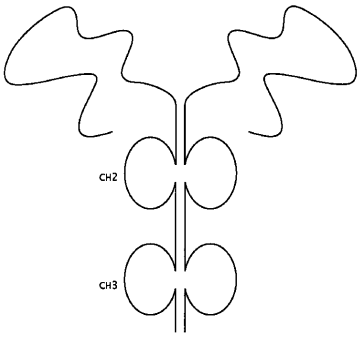


FIG. 15

【図１６】

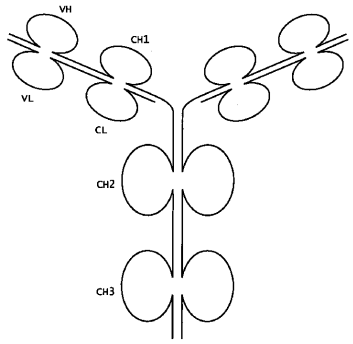


FIG. 16

【図１７】

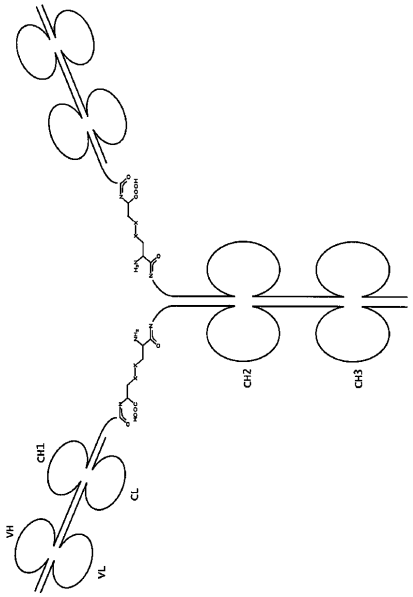


FIG. 17

【図１８】

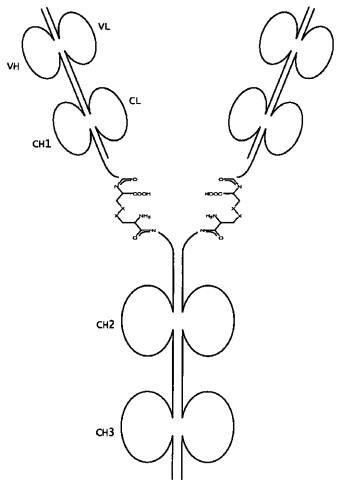


FIG. 18

【図１９】

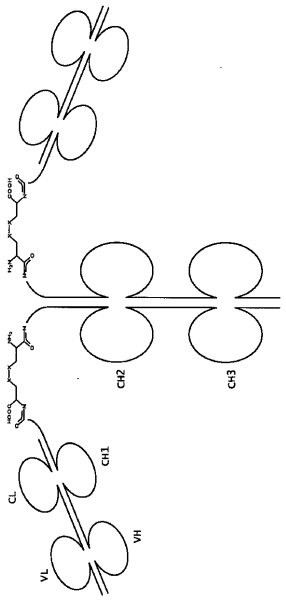


FIG. 19

【図２０】

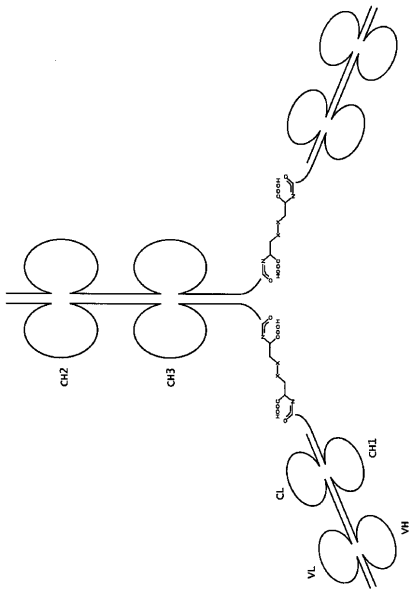


FIG.20

【図２１】

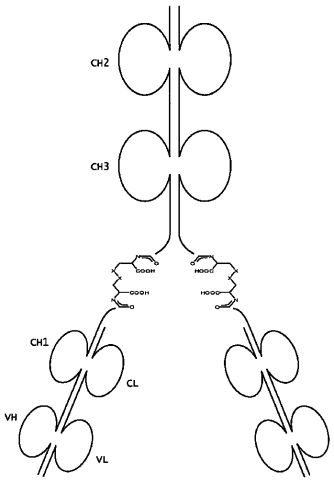


FIG. 21

【図２２】

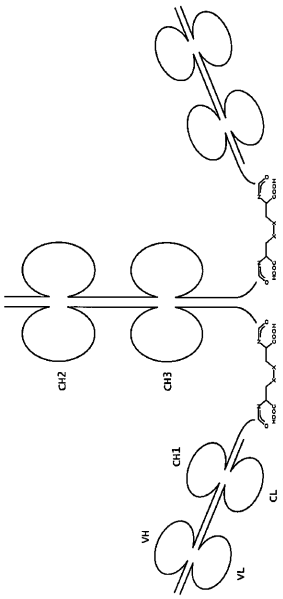


FIG. 22

【図２３】

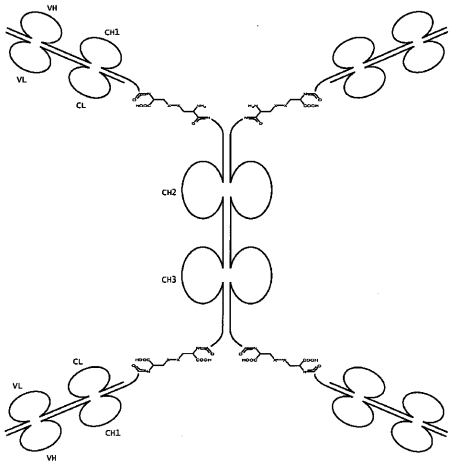


FIG. 23

【図２４】

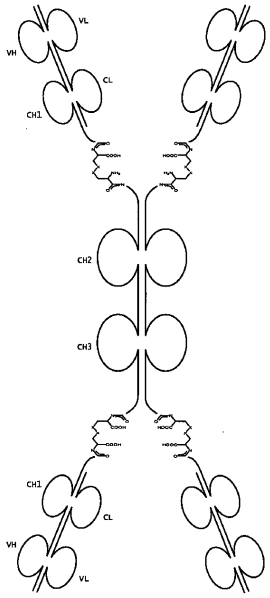


FIG. 24

【図２５】

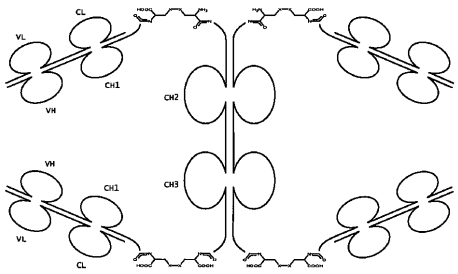


FIG. 25

【図２６】

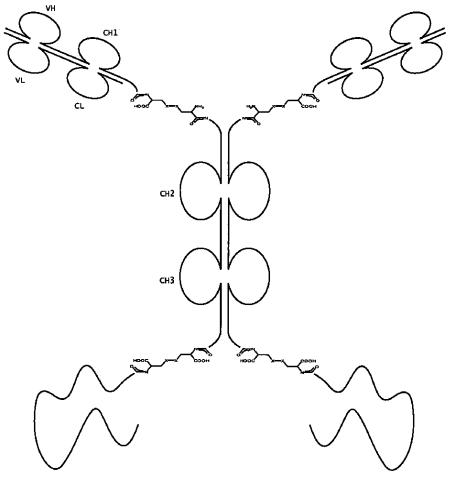


FIG. 26

【図２７】

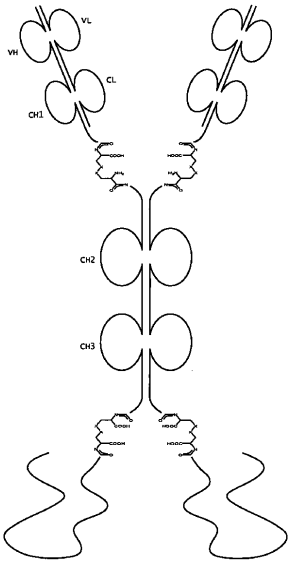


FIG. 27

【図２８】

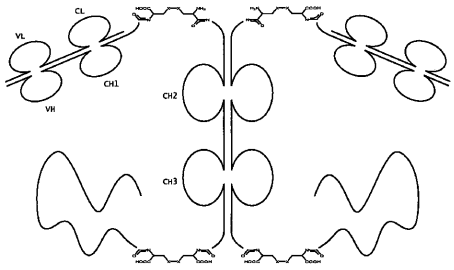


FIG. 28

【図２９】

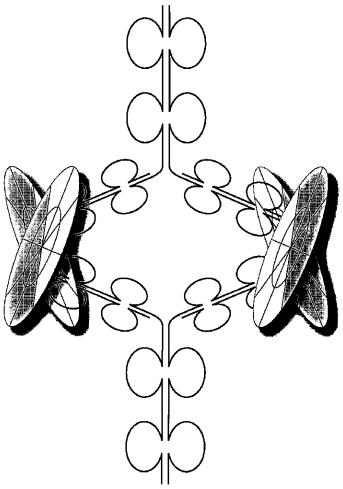


FIG. 29

【図３０】

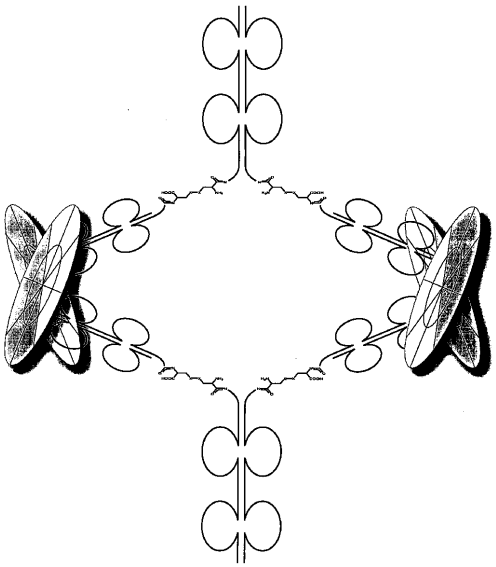


FIG. 30

【図３１】

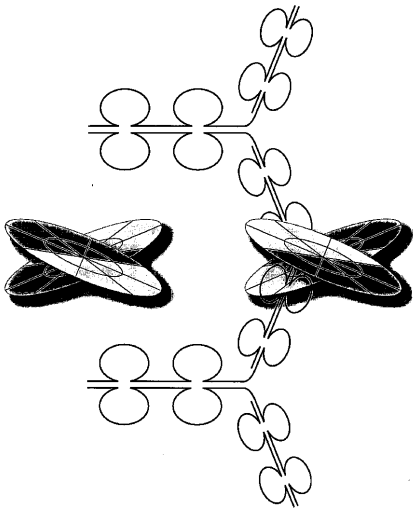


FIG. 31

【図３２】

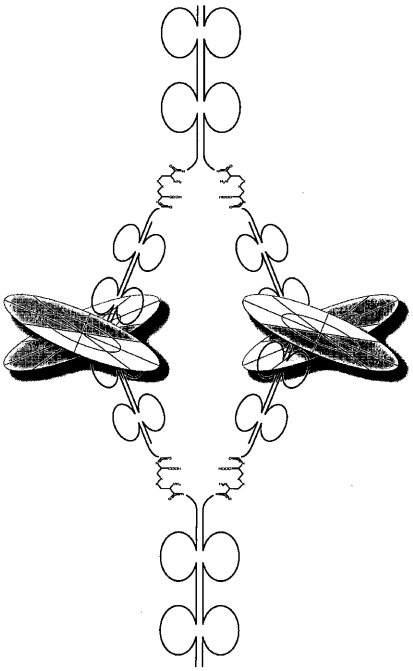


FIG. 32

【図３３】

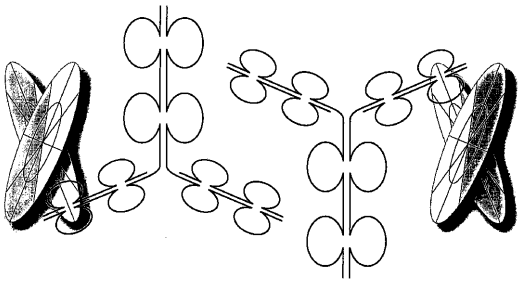


FIG. 33

【図３４】

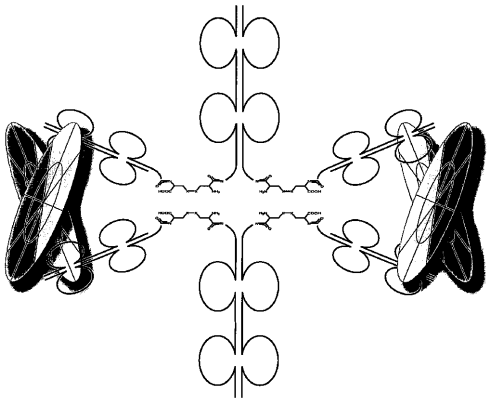


FIG. 34

【図３５Ａ】

IgG1 Fc N-末端側-S-末端

(i) PRE-Fc

SHH	MLLLARCLLLVLVSSLLVCSGLA	-23
IFN	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG	-23
CETP	MLAATVLTLALLGNAHA	-17
	CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV	60
	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA	120
	KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD	180
	SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	228

(ii) S-Fc

CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV	60
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA	120
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD	180
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	228

【図３５Ｂ】

IgG2 Fc N-末端側-S-末端

(i) PRE-Fc

SHH	MLLLARCLLLVLVSSLLVCSGLA	-23
IFN	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG	-23
CETP	MLAATVLTLALLGNAHA	-17
	CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV	60
	EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ	120
	PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDG	180
	SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	225

(ii) S-Fc

	CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV 60
	EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ 120
	PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDG 180
	SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 225

【図３５Ｃ】

IgG3 Fc N-末端側-S-末端

(i) PRE-Fc

SHH	MLLLARCLLLVLVSSLLVCSGLA	-23
IFN	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG	-23
CETP	MLAATVLTLALLGNAHA	-17
	CPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSV	60
	FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF	120
	RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK	180
	NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG	240
	NIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	267

(ii) S-Fc

	CPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSV 60
	FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF 120
	RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK 180
	NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG 240
	NIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK 267

【図３５Ｄ】

IgG4 Fc N-末端側-S-末端

(i) PRE-Fc

SHH	MLLLARCLLLVLVSSLLVCSGLA	-23
IFN	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG	-23
CETP	MLAATVLTLALLGNAHA	-17
	CPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH	60
	NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE	120
	PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF	180
	LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	222

(ii) S-Fc

	CPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH 60
	NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE 120
	PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF 180
	LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK 222

【図３６Ａ】

Fc N-末端側-X-末端

(i) PRE-Fc

SHH	MLLLARCLLLVLVSSLLVCSGLA	-23
IFNA	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG	-23
CETP	MLAATVLTLALLGNAHA	-17
	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH	60
	NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE	120
	PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF	180
	LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	222

(ii) S-Fc

	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH 60
	NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE 120
	PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF 180
	LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 222

(iii) X-Fc

	XDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV 60
	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA 120
	KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD 180
	SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 228

【図３６Ｂ】

Fc N-末端側-X-末端

(i) PRE-Fc

```
SHH                                  MLLLARCLLLVLVSSLLVCSGLA   -23
IFNA                                 MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG   -23
CETP                                       MLAATVLTLALLGNAHA   -17

CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK    60
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV   120
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS   180
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                       219
```

(ii) S-Fc

```
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK    60
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV   120
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS   180
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                       219
```

(iii) X-Fc

```
XPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH    60
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE   120
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF   180
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                    222
```

【図３７Ａ】

Fc C-末端側-X-末端

(i) PRE-Fc-自動開裂

```
CD2                                  MSFPCKFVASFLLIFNVSSKGAVS   -24
CD4                                MNRGVPFRHLLLVLQLALLPAATQG   -25
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG    60
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG   120
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD   180
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPELQLEESCAEAQDGEL   240
DGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERDVYDLRTREGHC   300
LRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDAT   360
VYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCL   420
QPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                                         441
```

(ii) Fc-自動開裂

```
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG    60
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG   120
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD   180
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPELQLEESCAEAQDGEL   240
DGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERDVYDLRTREGHC   300
LRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDAT   360
VYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCL   420
QPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                                         441
```

(iii) Fc-チオエステル

```
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG    60
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG   120
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD   180
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPELQLEESCAEAQDGEL   240
DX                                                            242
```

(iv) Fc-X

```
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG    60
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG   120
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD   180
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPELQLEESCAEAQDGEL   240
DGX                                                           243
```

【図３７Ｂ】

Fc C-末端側-S-末端

(i) PRE-Fc

```
CD2                                  MSFPCKFVASFLLIFNVSSKGAVS   -24
CD4                                MNRGVPFRHLLLVLQLALLPAATQG   -25
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG    60
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG   120
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD   180
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPELQLEESC          232
```

(ii) Fc-S

```
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG    60
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG   120
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD   180
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPELQLEESC          232
```

【図３８Ａ】

Fc N-末端側-S-末端 および C-末端側-X-末端

(i) PRE-Fc-自動開裂

```
SHH                                  MLLLARCLLLVLVSSLLVCSGLA   -23
IFN                                  MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG   -23
CETP                                       MLAATVLTLALLGNAHA   -17
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV    60
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA   120
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD   180
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPELQLEESCAEAQDG   240
ELDGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERDVYDLRTREG   300
HCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYD   360
ATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYK   420
CLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                                       443
```

(ii) S-Fc-自動開裂

```
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV    60
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA   120
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD   180
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPELQLEESCAEAQDG   240
ELDGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERDVYDLRTREG   300
HCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYD   360
ATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYK   420
CLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                                       443
```

【図３８Ｂ】

Fc N-末端側-S-末端 および C-末端側-X-末端（続）

(iii) S-Fc-チオエステル

```
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  60
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA 120
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD 180
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPELQLEESCAEAQDG 240
ELDX                                                           244
```

(iv) S-Fc-X

```
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  60
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA 120
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD 180
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPELQLEESCAEAQDG 240
ELDGX                                                          245
```

【図３９Ａ】

Fc N-末端側-X-末端 および C-末端側-X-末端

(i) PRE-Fc-自動開裂

```
SHH                                MLLLARCLLLVLVSSLLVCSGLA  -23
IFN                                MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG  -23
CETP                                 MLAATVLTLALLGNAHA      -17

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  60
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE 120
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF 180
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPELQLEESCAEAQDGELDGCV 240
SGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLT 300
HDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGA 360
SAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHT 420
SLAGWEPSNVPALWQLQ                                              437
```

(ii) S-Fc-自動開裂

```
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  60
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE 120
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF 180
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPELQLEESCAEAQDGELDGCV 240
SGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLT 300
HDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGA 360
SAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHT 420
SLAGWEPSNVPALWQLQ                                              437
```

【図３９Ｂ】

Fc N-末端側-X-末端 および C-末端側-X-末端（続）

(iii) X-Fc-自動開裂

```
XDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  60
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA 120
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD 180
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPELQLEESCAEAQDG 240
ELDGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERDVYDLRTREG 300
HCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYD 360
ATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYK 420
CLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                                        443
```

(iv) X-Fc-チオエステル

```
XDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  60
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA 120
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD 180
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPELQLEESCAEAQDG 240
ELDX                                                           244
```

(v) X-Fc-X

```
XDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  60
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA 120
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD 180
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPELQLEESCAEAQDG 240
ELDGX                                                          245
```

【図４０Ａ】

CD4 C-末端側-X-末端

(i) PRE-CD4-自動開裂

```
                                   MNRGVPFRHLLLVLQLALLPAATQG  -25
KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTKGPSKLNDRADSRRS   60
LWDQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGQSLTLTLES  120
PPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLSVSQLELQDSGTWTCTVLQNQKKVEFKIDIVVLAFQ  180
KASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWWQAERASSSKSWITFDLKNKEVSVKR  240
VTQDPKLQMGKKLPLHLTLPQALPQYAGSGNLTLALEAKTGKLHQEVNLVVMRATQLQKN  300
LTCEVWGPTSPKLMLSLKLENKEAKVSKREKAVWVLNPEAGMWQCLLSDSGQVLLESNIK  360
VLPTWSTPVQPGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERDV  420
YDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRG  480
AGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLV  540
TYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                               571
```

(ii) CD4-自動開裂

```
KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTKGPSKLNDRADSRRS   60
LWDQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGQSLTLTLES  120
PPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLSVSQLELQDSGTWTCTVLQNQKKVEFKIDIVVLAFQ  180
KASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWWQAERASSSKSWITFDLKNKEVSVKR  240
VTQDPKLQMGKKLPLHLTLPQALPQYAGSGNLTLALEAKTGKLHQEVNLVVMRATQLQKN  300
LTCEVWGPTSPKLMLSLKLENKEAKVSKREKAVWVLNPEAGMWQCLLSDSGQVLLESNIK  360
VLPTWSTPVQPGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERDV  420
YDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRG  480
AGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLV  540
TYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                               571
```

【図４０Ｂ】

CD4 C-末端側-X-末端（続）

(iii) CD4-チオエステル

```
KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTKGPSKLNDRADSRRS     60
LWDQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGQSLTLTLES    120
PPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLSVSQLELQDSGTWTCTVLQNQKKVEFKIDIVVLAFQ    180
KASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWWQAERASSSKSWITFDLKNKEVSVKR    240
VTQDPKLQMGKKLPLHLTLPQALPQYAGSGNLTLALEAKTGKLHQEVNLVVMRATQLQKN    300
LTCEVWGPTSPKLMLSLKLENKEAKVSKREKAVWVLNPEAGMWQCLLSDSGQVLLESNIK    360
VLPTWSTPVQPX                                                    372
```

(iv) CD4-X

```
KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTKGPSKLNDRADSRRS     60
LWDQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGQSLTLTLES    120
PPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLSVSQLELQDSGTWTCTVLQNQKKVEFKIDIVVLAFQ    180
KASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWWQAERASSSKSWITFDLKNKEVSVKR    240
VTQDPKLQMGKKLPLHLTLPQALPQYAGSGNLTLALEAKTGKLHQEVNLVVMRATQLQKN    300
LTCEVWGPTSPKLMLSLKLENKEAKVSKREKAVWVLNPEAGMWQCLLSDSGQVLLESNIK    360
VLPTWSTPVQPGX                                                   373
```

【図４１Ａ】

VH-CH1 C-末端側-X-末端

(i) PRE-Di62-VH-CH1-自動開裂

```
                                                MAWVWTLLFLMAAAQSIQA    -19
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTHYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTY      60
ADDFKEHFAFSLETSASTVFLQINNLKNEDTATYFCARERGDAMDYWGQGTSVTVSSAST     120
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY     180
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGCVSGDTIVMTSGGP     240
RTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGL     300
EWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHA     360
CGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPA     420
LWQLQ                                                           425
```

(ii) Di62-VH-CH1-自動開裂

```
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTHYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTY      60
ADDFKEHFAFSLETSASTVFLQINNLKNEDTATYFCARERGDAMDYWGQGTSVTVSSAST     120
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY     180
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGCVSGDTIVMTSGGP     240
RTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGL     300
EWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHA     360
CGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPA     420
LWQLQ                                                           425
```

【図４２】

Vk-Ck

(i) PRE-Di62-Vk-Ck

```
                                                MKSQTQVFVFLLLCVSGAHG    -20
SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCTASQSVSNDVVWYQQKPGQSPKMLMYSAFNRYTGVPD      60
RFTGRGYGTDFTFTISSVQAEDLAVYFCQQDYNSPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP     120
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT     180
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                              214
```

(ii) Di62-Vk-Ck

```
SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCTASQSVSNDVVWYQQKPGQSPKMLMYSAFNRYTGVPD      60
RFTGRGYGTDFTFTISSVQAEDLAVYFCQQDYNSPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP     120
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT     180
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                              214
```

【図４１Ｂ】

VH-CH1 C-末端側-X-末端（続）

(iii) Di62-VH-CH1-チオエステル

```
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTHYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTY      60
ADDFKEHFAFSLETSASTVFLQINNLKNEDTATYFCARERGDAMDYWGQGTSVTVSSAST     120
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY     180
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTX                  226
```

(iv) Di62-VH-CH1-X

```
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTHYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTY      60
ADDFKEHFAFSLETSASTVFLQINNLKNEDTATYFCARERGDAMDYWGQGTSVTVSSAST     120
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY     180
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGX                 227
```

【図４３】

TNR1A C-末端側-X-末端

(i) PRE-TNR1A-自動開裂

```
                                                    MGLSTVPDLLLPLVLLELLVG  -21
IYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTYLYNDCPGPGQDTDC           60
RECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRHYWSENLF          120
QCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECVSCSNCKKSLECTKLCLPQIEN          180
VKGTEDSGTTGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERDVY          240
DLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGA          300
GRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVT          360
YNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                                        390
```

(ii) TNR1A-自動開裂

```
IYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTYLYNDCPGPGQDTDC    60
RECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRHYWSENLF   120
QCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECVSCSNCKKSLECTKLCLPQIEN   180
VKGTEDSGTTGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERDVY   240
DLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGA   300
GRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVT   360
YNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                                 390
```

(iii) TNR1A-チオエステル

```
IYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTYLYNDCPGPGQDTDC    60
RECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRHYWSENLF   120
QCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECVSCSNCKKSLECTKLCLPQIEN   180
VKGTEDSGTTX                                                     191
```

(iv) TNR1A-X

```
IYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTYLYNDCPGPGQDTDC    60
RECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRHYWSENLF   120
QCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECVSCSNCKKSLECTKLCLPQIEN   180
VKGTEDSGTTGX                                                    192
```

【図４４Ａ】

TNR1B C-末端側-X-末端

(i) PRE-TNR1B-自動開裂

```
                                                    MAPVAVWAALAVGLELWAAAHA  -22
LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDST           60
YTQLWNWVPECLSCGSRCSSDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRK          120
CRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTS          180
TSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPMGPSPPAEGSTGDEPKSC          240
DTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERDVY                         300
HRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASA          360
FTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSL          420
AGWEPSNVPALWQLQ                                                       435
```

(ii) TNR1B-自動開裂

```
LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDST    60
YTQLWNWVPECLSCGSRCSSDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRK   120
CRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTS   180
TSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPMGPSPPAEGSTGDGCVSG   240
DTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHD   300
HRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASA   360
FTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSL   420
AGWEPSNVPALWQLQ                                                435
```

(iii) TNR1B-チオエステル

```
LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDST    60
YTQLWNWVPECLSCGSRCSSDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRK   120
CRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTS   180
TSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPMGPSPPAEGSTGDX      236
```

(iv) TNR1B-X

```
LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDST    60
YTQLWNWVPECLSCGSRCSSDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRK   120
CRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTS   180
TSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPMGPSPPAEGSTGDGX     237
```

【図４４Ｂ】

TNR1B-イムノアドヘシン

(i) PRE-TNR1B-イムノアドヘシン

```
                                                    MAPVAVWAALAVGLELWAAAHA  -22
LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDST           60
YTQLWNWVPECLSCGSRCSSDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRK          120
CRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTS          180
TSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPMGPSPPAEGSTGDEPKSC          240
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD          300
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK          360
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS          420
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                       467
```

(ii) TNR1B-イムノアドヘシン

```
LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDST    60
YTQLWNWVPECLSCGSRCSSDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRK   120
CRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTS   180
TSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPMGPSPPAEGSTGDEPKSC   240
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD   300
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK   360
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS   420
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                467
```

【図４５Ａ】

VGFR1 C-末端側-X-末端

(i) PRE-VGFR1-自動開裂

```
                                                    MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSG  -26
SKLKDPELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGK           60
QFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEII          120
HMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLT          180
CEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTW          240
SYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSV          300
HIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTR          360
GYSLIIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFKNLTATLIVNVKPQIYEKAVSSFPDPALYPL          420
GSRQILTCTAYGIPQPTIKWFWHPCNHNHSEARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESIT          480
QRMAIIEGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASNKVGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLEKM          540
PTEGEDLKLSCTVNKFLYRDVTWILLRTVNNRTMHYSISKQKMAITKEHSITLNLTIMNV          600
SLQDSGTYACRARNVYTGEEILQKKEITIRDQEAPYLLRNLSDHTVAISSSTTLDCHANG          660
VPEPQITWFKNNHKIQQEPGIILGPGSSTLFIERVTEEDEGVYHCKATNQKGSVESSAYL          720
TVQGTSDKSNLEGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERD          780
VYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLR          840
GAGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQL          900
VTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                                      932
```

【図４５Ｂ】

VGFR1 C-末端側-X-末端（続）

(ii) VGFR1-自動開裂

```
SKLKDPELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGK   60
QFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEII  120
HMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLT  180
CEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTW  240
SYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSV  300
HIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTR  360
GYSLIIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFKNLTATLIVNVKPQIYEKAVSSFPDPALYPL  420
GSRQILTCTAYGIPQPTIKWFWHPCNHNHSEARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESIT  480
QRMAIIEGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASNKVGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLEKM  540
PTEGEDLKLSCTVNKFLYRDVTWILLRTVNNRTMHYSISKQKMAITKEHSITLNLTIMNV  600
SLQDSGTYACRARNVYTGEEILQKKEITIRDQEAPYLLRNLSDHTVAISSSTTLDCHANG  660
VPEPQITWFKNNHKIQQEPGIILGPGSSTLFIERVTEEDEGVYHCKATNQKGSVESSAYL  720
TVQGTSDKSNLEGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPSGFFRTCERD  780
VYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFPALATFRGLR  840
GAGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQL  900
VTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                               932
```

【図４５Ｃ】

VGFR1 C-末端側-X-末端（続）

(iii) VGFR1-チオエステル

```
SKLKDPELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGK   60
QFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEII  120
HMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLT  180
CEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTW  240
SYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSV  300
HIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTR  360
GYSLIIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFKNLTATLIVNVKPQIYEKAVSSFPDPALYPL  420
GSRQILTCTAYGIPQPTIKWFWHPCNHNHSEARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESIT  480
QRMAIIEGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASNKVGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLEKM  540
PTEGEDLKLSCTVNKFLYRDVTWILLRTVNNRTMHYSISKQKMAITKEHSITLNLTIMNV  600
SLQDSGTYACRARNVYTGEEILQKKEITIRDQEAPYLLRNLSDHTVAISSSTTLDCHANG  660
VPEPQITWFKNNHKIQQEPGIILGPGSSTLFIERVTEEDEGVYHCKATNQKGSVESSAYL  720
TVQGTSDKSNLEX                                                  733
```

(iv) VGFR1-X

```
SKLKDPELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGK   60
QFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEII  120
HMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLT  180
CEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTW  240
SYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSV  300
HIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTR  360
GYSLIIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFKNLTATLIVNVKPQIYEKAVSSFPDPALYPL  420
GSRQILTCTAYGIPQPTIKWFWHPCNHNHSEARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESIT  480
QRMAIIEGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASNKVGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLEKM  540
PTEGEDLKLSCTVNKFLYRDVTWILLRTVNNRTMHYSISKQKMAITKEHSITLNLTIMNV  600
SLQDSGTYACRARNVYTGEEILQKKEITIRDQEAPYLLRNLSDHTVAISSSTTLDCHANG  660
VPEPQITWFKNNHKIQQEPGIILGPGSSTLFIERVTEEDEGVYHCKATNQKGSVESSAYL  720
TVQGTSDKSNLEGX                                                 734
```

【図４６Ａ】

VGFR2 C-末端側-X-末端

(i) PRE-VGFR2-自動開裂

```
                                                MQSKVLLAVALWLCVETRA  -19
ASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLDWLWPNNQSGSEQRVEVTEC    60
SDGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYIT   120
ENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVF   180
CEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFN   240
WEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNS   300
TFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPPEIKWYKNGIPLESNHTIKA   360
GHVLTIMEVSERDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGT   420
TQTLTCTVYAIPPPHHIHWYWQLEEECANEPSQAVSVTNPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEV   480
NKNQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITLQPDM   540
QPTEQESVSLWCTADRSTFENLTWYKLGPQPLPIHVGELPTPVCKNLDTLWKLNATMFSN   600
STNDILIMELKNASLQDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTS   660
IGESIEVSCTASGNPPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLTIRRVRKEDEGLYTCQA   720
CSVLGCAKVEAFFIIEGAQEKTNLEGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGY   780
PCPSGFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAA   840
GEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVS   900
AWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                 945
```

【図４６Ｂ】

VGFR2 C-末端側-X-末端（続）

(ii) VGFR2-自動開裂

```
ASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLDWLWPNNQSGSEQRVEVTEC    60
SDGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYIT   120
ENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVF   180
CEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFN   240
WEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNS   300
TFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPPEIKWYKNGIPLESNHTIKA   360
GHVLTIMEVSERDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGT   420
TQTLTCTVYAIPPPHHIHWYWQLEEECANEPSQAVSVTNPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEV   480
NKNQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITLQPDM   540
QPTEQESVSLWCTADRSTFENLTWYKLGPQPLPIHVGELPTPVCKNLDTLWKLNATMFSN   600
STNDILIMELKNASLQDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTS   660
IGESIEVSCTASGNPPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLTIRRVRKEDEGLYTCQA   720
CSVLGCAKVEAFFIIEGAQEKTNLEGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGY   780
PCPSGFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAA   840
GEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVS   900
AWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                 945
```

【図４６Ｃ】

VGFR2 C-末端側-X-末端（続）

(iii) VGFR2-チオエステル

```
                                                                    60
ASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLDWLWPNNQSGSEQRVEVTEC      120
SDGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYIT      180
ENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVF      240
CEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFN      300
WEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNS      360
TFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPPEIKWYKNGIPLESNHTIKA      420
GHVLTIMEVSERDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGT      480
TQTLTCTVYAIPPPHHIHWYWQLEEECANEPSQAVSVTNPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEV      540
NKNQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITLQPDM      600
QPTEQESVSLWCTADRSTFENLTWYKLGPQPLPIHVGELPTPVCKNLDTLWKLNATMFSN      660
STNDILIMELKNASLQDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTS      720
IGESIEVSCTASGNPPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLTIRRVRKEDEGLYTCQA      746
CSVLGCAKVEAFFIIEGAQEKTNLEX
```

(iv) VGFR2-X

```
                                                                    60
ASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLDWLWPNNQSGSEQRVEVTEC      120
SDGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYIT      180
ENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVF      240
CEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFN      300
WEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNS      360
TFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPPEIKWYKNGIPLESNHTIKA      420
GHVLTIMEVSERDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGT      480
TQTLTCTVYAIPPPHHIHWYWQLEEECANEPSQAVSVTNPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEV      540
NKNQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITLQPDM      600
QPTEQESVSLWCTADRSTFENLTWYKLGPQPLPIHVGELPTPVCKNLDTLWKLNATMFSN      660
STNDILIMELKNASLQDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTS      720
IGESIEVSCTASGNPPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLTIRRVRKEDEGLYTCQA      747
CSVLGCAKVEAFFIIEGAQEKTNLEGX
```

【図４７Ａ】

VGFR3 C-末端側-X-末端

(i) PRE-VGFR3-自動開裂

```
                                                                   -24
                                                MQRGAALCLRLWLCLGLLDGLVSG      -6
YSWTPPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHPLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDTGVVRDC      120
EGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPD      180
TLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYL      240
QCETTWGDQDFLSNPFLVHITGNELYDIQLLPRKSLELLVGEKLVLNCTVWAEFNSGVTF      300
DWDYPGKQAERGKWVPERRSQQTHTELSSILTIHNVSQHDLGSYVCKANNGIQRFRESTE      360
VIVHENPFISVEWLKGPILEATAGDELVKLPVKLAAYPPPEFQWYKDGKALSGRHSPHAL      420
VLKEVTEASTGTYTLALWNSAAGLRRNISLELVVNVPPQIHEKEASSPSIYSRHSRQALT      480
CTAYGVPLPLSIQWHWRPWTPCKMFAQRSLRRRQQQDLMPQCRDWRAVTTQDAVNPIESL      540
DTWTEFVEGKNKTVSKLVIQNANVSAMYKCVVSNKVGQDERLIYFYVTTIPDGFTIESKP      600
SEELLEGQPVLLSCQADSYKYEHLRWYRLNLSTLHDAHGNPLLLDCKNVHLFATPLAASL      660
EEVAPGARHATLSLSIPRVAPEHEGHYVCEVQDRRSHDKHCHKKYLSVQALEAPRLTQNL      720
TDLLVNVSDSLEMQCLVAGAHAPSIVWYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAG      780
RYLCSVCNAKGCVNSSASVAVEGSEDKGSMEQX                                  840
                                                                    900
VMDDAAGEFFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPQTGTGLNSGLT      951
TNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ
```

【図４７Ｂ】

VGFR3 C-末端側-X-末端（続）

(ii) VGFR3-チオエステル

```
                                                                    60
YSWTPPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHPLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDTGVVRDC      120
EGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPD      180
TLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYL      240
QCETTWGDQDFLSNPFLVHITGNELYDIQLLPRKSLELLVGEKLVLNCTVWAEFNSGVTF      300
DWDYPGKQAERGKWVPERRSQQTHTELSSILTIHNVSQHDLGSYVCKANNGIQRFRESTE      360
VIVHENPFISVEWLKGPILEATAGDELVKLPVKLAAYPPPEFQWYKDGKALSGRHSPHAL      420
VLKEVTEASTGTYTLALWNSAAGLRRNISLELVVNVPPQIHEKEASSPSIYSRHSRQALT      480
CTAYGVPLPLSIQWHWRPWTPCKMFAQRSLRRRQQQDLMPQCRDWRAVTTQDAVNPIESL      540
DTWTEFVEGKNKTVSKLVIQNANVSAMYKCVVSNKVGQDERLIYFYVTTIPDGFTIESKP      600
SEELLEGQPVLLSCQADSYKYEHLRWYRLNLSTLHDAHGNPLLLDCKNVHLFATPLAASL      660
EEVAPGARHATLSLSIPRVAPEHEGHYVCEVQDRRSHDKHCHKKYLSVQALEAPRLTQNL      720
TDLLVNVSDSLEMQCLVAGAHAPSIVWYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAG      752
RYLCSVCNAKGCVNSSASVAVEGSEDKGSMEX
```

(iv) VGFR3-X

```
                                                                    60
YSWTPPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHPLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDTGVVRDC      120
EGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPD      180
TLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYL      240
QCETTWGDQDFLSNPFLVHITGNELYDIQLLPRKSLELLVGEKLVLNCTVWAEFNSGVTF      300
DWDYPGKQAERGKWVPERRSQQTHTELSSILTIHNVSQHDLGSYVCKANNGIQRFRESTE      360
VIVHENPFISVEWLKGPILEATAGDELVKLPVKLAAYPPPEFQWYKDGKALSGRHSPHAL      420
VLKEVTEASTGTYTLALWNSAAGLRRNISLELVVNVPPQIHEKEASSPSIYSRHSRQALT      480
CTAYGVPLPLSIQWHWRPWTPCKMFAQRSLRRRQQQDLMPQCRDWRAVTTQDAVNPIESL      540
DTWTEFVEGKNKTVSKLVIQNANVSAMYKCVVSNKVGQDERLIYFYVTTIPDGFTIESKP      600
SEELLEGQPVLLSCQADSYKYEHLRWYRLNLSTLHDAHGNPLLLDCKNVHLFATPLAASL      660
EEVAPGARHATLSLSIPRVAPEHEGHYVCEVQDRRSHDKHCHKKYLSVQALEAPRLTQNL      720
TDLLVNVSDSLEMQCLVAGAHAPSIVWYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAG      753
RYLCSVCNAKGCVNSSASVAVEGSEDKGSMEQX
```

【図４７Ｃ】

VGFR3 C-末端側-X-末端（続）

(iii) VGFR3-チオエステル

```
                                                                    60
YSWTPPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHPLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDTGVVRDC      120
EGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPD      180
TLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYL      240
QCETTWGDQDFLSNPFLVHITGNELYDIQLLPRKSLELLVGEKLVLNCTVWAEFNSGVTF      300
DWDYPGKQAERGKWVPERRSQQTHTELSSILTIHNVSQHDLGSYVCKANNGIQRFRESTE      360
VIVHENPFISVEWLKGPILEATAGDELVKLPVKLAAYPPPEFQWYKDGKALSGRHSPHAL      420
VLKEVTEASTGTYTLALWNSAAGLRRNISLELVVNVPPQIHEKEASSPSIYSRHSRQALT      480
CTAYGVPLPLSIQWHWRPWTPCKMFAQRSLRRRQQQDLMPQCRDWRAVTTQDAVNPIESL      540
DTWTEFVEGKNKTVSKLVIQNANVSAMYKCVVSNKVGQDERLIYFYVTTIPDGFTIESKP      600
SEELLEGQPVLLSCQADSYKYEHLRWYRLNLSTLHDAHGNPLLLDCKNVHLFATPLAASL      660
EEVAPGARHATLSLSIPRVAPEHEGHYVCEVQDRRSHDKHCHKKYLSVQALEAPRLTQNL      720
TDLLVNVSDSLEMQCLVAGAHAPSIVWYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAG      752
RYLCSVCNAKGCVNSSASVAVEGSEDKGSMEX
```

(iv) VGFR3-X

```
                                                                    60
YSWTPPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHPLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDTGVVRDC      120
EGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPD      180
TLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYL      240
QCETTWGDQDFLSNPFLVHITGNELYDIQLLPRKSLELLVGEKLVLNCTVWAEFNSGVTF      300
DWDYPGKQAERGKWVPERRSQQTHTELSSILTIHNVSQHDLGSYVCKANNGIQRFRESTE      360
VIVHENPFISVEWLKGPILEATAGDELVKLPVKLAAYPPPEFQWYKDGKALSGRHSPHAL      420
VLKEVTEASTGTYTLALWNSAAGLRRNISLELVVNVPPQIHEKEASSPSIYSRHSRQALT      480
CTAYGVPLPLSIQWHWRPWTPCKMFAQRSLRRRQQQDLMPQCRDWRAVTTQDAVNPIESL      540
DTWTEFVEGKNKTVSKLVIQNANVSAMYKCVVSNKVGQDERLIYFYVTTIPDGFTIESKP      600
SEELLEGQPVLLSCQADSYKYEHLRWYRLNLSTLHDAHGNPLLLDCKNVHLFATPLAASL      660
EEVAPGARHATLSLSIPRVAPEHEGHYVCEVQDRRSHDKHCHKKYLSVQALEAPRLTQNL      720
TDLLVNVSDSLEMQCLVAGAHAPSIVWYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAG      753
RYLCSVCNAKGCVNSSASVAVEGSEDKGSMEQX
```

【図４８Ａ】

ERBB1 C-末端側-X-末端

(i) PRE-ERBB1-自動開裂

```
                                                MRPSGTAGAALLALLAALCPASRA   -24
LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQE     60
VAGYVLIALNTVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEIL    120
HGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGE    180
ENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTC    240
PPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVR    300
KCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHT    360
PPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLN    420
ITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQ    480
VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLP    540
QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC    600
TYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPS    660
GFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFP    720
ALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQV    780
NTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                       821
```

(ii) ERBB1-自動開裂

```
LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQE     60
VAGYVLIALNTVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEIL    120
HGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGE    180
ENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTC    240
PPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVR    300
KCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHT    360
PPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLN    420
ITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQ    480
VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLP    540
QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC    600
TYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYPCPS    660
GFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAGEFP    720
ALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSAWQV    780
NTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                       821
```

【図４８Ｂ】

ERBB1 C-末端側-X-末端（続）

(iii) ERBB1-チオエステル

```
LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQE     60
VAGYVLIALNTVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEIL    120
HGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGE    180
ENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTC    240
PPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVR    300
KCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHT    360
PPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLN    420
ITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQ    480
VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLP    540
QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC    600
TYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSX                                          622
```

(iv) ERBB1-X

```
LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQE     60
VAGYVLIALNTVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEIL    120
HGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGE    180
ENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTC    240
PPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVR    300
KCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHT    360
PPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLN    420
ITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQ    480
VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLP    540
QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC    600
TYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSGX                                         623
```

【図４９Ａ】

ERBB2 C-末端側-X-末端

(i) PRE-ERBB2-自動開裂

```
                                                MELAALCRWGLLLALLPPGAAS   -22
TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQG     60
YVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQL    120
RSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGS    180
RCWGESSEDCQSLTRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSG    240
ICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEV    300
TAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFD    360
GDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYS    420
LTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPED    480
ECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLP    540
CHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGA    600
CQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALI    660
RGSGYPCPSGFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLV    720
MDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTT    780
NPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ              830
```

(ii) ERBB2-自動開裂

```
TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQG     60
YVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQL    120
RSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGS    180
RCWGESSEDCQSLTRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSG    240
ICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEV    300
TAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFD    360
GDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYS    420
LTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPED    480
ECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLP    540
CHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGA    600
CQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALI    660
RGSGYPCPSGFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLV    720
MDDAAGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTT    780
NPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ              830
```

【図４９Ｂ】

ERBB2 C-末端側-X-末端（続）

(iii) ERBB2-チオエステル

```
TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQG     60
YVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQL    120
RSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGS    180
RCWGESSEDCQSLTRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSG    240
ICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEV    300
TAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFD    360
GDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYS    420
LTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPED    480
ECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLP    540
CHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGA    600
CQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTX                                 631
```

(iv) ERBB2-X

```
TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQG     60
YVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQL    120
RSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGS    180
RCWGESSEDCQSLTRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSG    240
ICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEV    300
TAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFD    360
GDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYS    420
LTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPED    480
ECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLP    540
CHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGA    600
CQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTGX                                632
```

【図５０Ａ】

ERBB3 C-末端側-X-末端

(i) PRE-ERBB3-自動開裂

```
                                                MRANDALQVLGLLFSLARG   -19
SEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLYKLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQW      60
IREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQL     120
TEILSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPGS     180
EDCQTLTKTICAPQCNGHCFGPNPNQCCHDECAGGCSGPQDTDCFACRHFNDSGACVPRC     240
PQPLVYNKLTFQLEPNPHTKYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGLKM     300
CEPCGGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPAL     360
DPEKLNVFRTVREITGYLNIQSWPPHMHNFSVFSNLTTIGGRSLYNRGFSLLIMKNLNVT     420
SLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSLNWTKVLRGPTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKV     480
CDPLCSSGGCWGPGPGQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGEPREFAHEAECFSCHPECQPM     540
EGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPHCVSSCPHGVLGAKGPIYKYPDVQNECRPCHENCTQ     600
GCKGPELQDCLGQTLVLIGKTHLTGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYP     660
CPSGFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAG     720
EFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSA     780
WQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                     824
```

(ii) ERBB3-自動開裂

```
SEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLYKLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQW      60
IREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQL     120
TEILSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPGS     180
EDCQTLTKTICAPQCNGHCFGPNPNQCCHDECAGGCSGPQDTDCFACRHFNDSGACVPRC     240
PQPLVYNKLTFQLEPNPHTKYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGLKM     300
CEPCGGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPAL     360
DPEKLNVFRTVREITGYLNIQSWPPHMHNFSVFSNLTTIGGRSLYNRGFSLLIMKNLNVT     420
SLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSLNWTKVLRGPTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKV     480
CDPLCSSGGCWGPGPGQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGEPREFAHEAECFSCHPECQPM     540
EGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPHCVSSCPHGVLGAKGPIYKYPDVQNECRPCHENCTQ     600
GCKGPELQDCLGQTLVLIGKTHLTGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSGYP     660
CPSGFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDAAG     720
EFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGVSA     780
WQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                     824
```

【図５０Ｂ】

ERBB3 C-末端側-X-末端（続）

(iii) ERBB3-チオエステル

```
SEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLYKLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQW      60
IREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQL     120
TEILSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPGS     180
EDCQTLTKTICAPQCNGHCFGPNPNQCCHDECAGGCSGPQDTDCFACRHFNDSGACVPRC     240
PQPLVYNKLTFQLEPNPHTKYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGLKM     300
CEPCGGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPAL     360
DPEKLNVFRTVREITGYLNIQSWPPHMHNFSVFSNLTTIGGRSLYNRGFSLLIMKNLNVT     420
SLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSLNWTKVLRGPTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKV     480
CDPLCSSGGCWGPGPGQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGEPREFAHEAECFSCHPECQPM     540
EGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPHCVSSCPHGVLGAKGPIYKYPDVQNECRPCHENCTQ     600
GCKGPELQDCLGQTLVLIGKTHLTX                                        625
```

(iv) ERBB3-X

```
SEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLYKLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQW      60
IREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQL     120
TEILSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPGS     180
EDCQTLTKTICAPQCNGHCFGPNPNQCCHDECAGGCSGPQDTDCFACRHFNDSGACVPRC     240
PQPLVYNKLTFQLEPNPHTKYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGLKM     300
CEPCGGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPAL     360
DPEKLNVFRTVREITGYLNIQSWPPHMHNFSVFSNLTTIGGRSLYNRGFSLLIMKNLNVT     420
SLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSLNWTKVLRGPTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKV     480
CDPLCSSGGCWGPGPGQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGEPREFAHEAECFSCHPECQPM     540
EGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPHCVSSCPHGVLGAKGPIYKYPDVQNECRPCHENCTQ     600
GCKGPELQDCLGQTLVLIGKTHLTGX                                       626
```

【図５１Ａ】

ERBB4 C-末端側-X-末端

(i) PRE-ERBB4-自動開裂

```
                                                MKPATGLWVWVSLLVAAGTVQPSDS   -25
QSVCAGTENKLSSLSDLEQQYRALRKYYENCEVVMGNLEITSIEHNRDLSFLRSVREVTG      60
YVLVALNQFRYLPLENLRIIRGTKLYEDRYALAIFLNYRKDGNFGLQELGLKNLTEILNG     120
GVYVDQNKFLCYADTIHWQDIVRNPWPSNLTLVSTNGSSGCGRCHKSCTGRCWGPTENHC     180
QTLTRTVCAEQCDGRCYGPYVSDCCHRECAGGCSGPKDTDCFACMNFNDSGACVTQCPQT     240
FVYNPTTFQLEHNFNAKYTYGAFCVKKCPHNFVVDSSSCVRACPSSKMEVEENGIKMCKP     300
CTDICPKACDGIGTGSLMSAQTVDSSNIDKFINCTKINGNLIFLVTGIHGDPYNAIEAID     360
PEKLNVFRTVREITGFLNIQSWPPNMTDFSVFSNLVTIGGRVLYSGLSLLILKQQGITSL     420
QFQSLKEISAGNIYITDNSNLCYYHTINWTTLFSTINQRIVIRDNRKAENCTAEGMVCNH     480
LCSSDGCWGPGPDQCLSCRRFSRGRICIESCNLYDGEFREFENGSICVECDPQCEKMEDG     540
LLTCHGPGPDNCTKCSHFKDGPNCVEKCPDGLQGANSFIFKYADPDRECHPCHPNCTQGC     600
NGPTSHDCIYYPWTGHSTLPQHARTPGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSG     660
YPCPSGFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDA     720
AGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGV     780
SAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                   826
```

(ii) ERBB4-自動開裂

```
QSVCAGTENKLSSLSDLEQQYRALRKYYENCEVVMGNLEITSIEHNRDLSFLRSVREVTG      60
YVLVALNQFRYLPLENLRIIRGTKLYEDRYALAIFLNYRKDGNFGLQELGLKNLTEILNG     120
GVYVDQNKFLCYADTIHWQDIVRNPWPSNLTLVSTNGSSGCGRCHKSCTGRCWGPTENHC     180
QTLTRTVCAEQCDGRCYGPYVSDCCHRECAGGCSGPKDTDCFACMNFNDSGACVTQCPQT     240
FVYNPTTFQLEHNFNAKYTYGAFCVKKCPHNFVVDSSSCVRACPSSKMEVEENGIKMCKP     300
CTDICPKACDGIGTGSLMSAQTVDSSNIDKFINCTKINGNLIFLVTGIHGDPYNAIEAID     360
PEKLNVFRTVREITGFLNIQSWPPNMTDFSVFSNLVTIGGRVLYSGLSLLILKQQGITSL     420
QFQSLKEISAGNIYITDNSNLCYYHTINWTTLFSTINQRIVIRDNRKAENCTAEGMVCNH     480
LCSSDGCWGPGPDQCLSCRRFSRGRICIESCNLYDGEFREFENGSICVECDPQCEKMEDG     540
LLTCHGPGPDNCTKCSHFKDGPNCVEKCPDGLQGANSFIFKYADPDRECHPCHPNCTQGC     600
NGPTSHDCIYYPWTGHSTLPQHARTPGCVSGDTIVMTSGGPRTVAELEGKPFTALIRGSG     660
YPCPSGFFRTCERDVYDLRTREGHCLRLTHDHRVLVMDGGLEWRAAGELERGDRLVMDDA     720
AGEFPALATFRGLRGAGRQDVYDATVYGASAFTANGFIVHACGEQPGTGLNSGLTTNPGV     780
SAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ                   826
```

【図５１Ｂ】

ERBB4 C-末端側-X-末端（続）

(iii) ERBB4-チオエステル

```
QSVCAGTENKLSSLSDLEQQYRALRKYYENCEVVMGNLEITSIEHNRDLSFLRSVREVTG      60
YVLVALNQFRYLPLENLRIIRGTKLYEDRYALAIFLNYRKDGNFGLQELGLKNLTEILNG     120
GVYVDQNKFLCYADTIHWQDIVRNPWPSNLTLVSTNGSSGCGRCHKSCTGRCWGPTENHC     180
QTLTRTVCAEQCDGRCYGPYVSDCCHRECAGGCSGPKDTDCFACMNFNDSGACVTQCPQT     240
FVYNPTTFQLEHNFNAKYTYGAFCVKKCPHNFVVDSSSCVRACPSSKMEVEENGIKMCKP     300
CTDICPKACDGIGTGSLMSAQTVDSSNIDKFINCTKINGNLIFLVTGIHGDPYNAIEAID     360
PEKLNVFRTVREITGFLNIQSWPPNMTDFSVFSNLVTIGGRVLYSGLSLLILKQQGITSL     420
QFQSLKEISAGNIYITDNSNLCYYHTINWTTLFSTINQRIVIRDNRKAENCTAEGMVCNH     480
LCSSDGCWGPGPDQCLSCRRFSRGRICIESCNLYDGEFREFENGSICVECDPQCEKMEDG     540
LLTCHGPGPDNCTKCSHFKDGPNCVEKCPDGLQGANSFIFKYADPDRECHPCHPNCTQGC     600
NGPTSHDCIYYPWTGHSTLPQHARTPGX                                     627
```

(iv) ERBB4-X

```
QSVCAGTENKLSSLSDLEQQYRALRKYYENCEVVMGNLEITSIEHNRDLSFLRSVREVTG      60
YVLVALNQFRYLPLENLRIIRGTKLYEDRYALAIFLNYRKDGNFGLQELGLKNLTEILNG     120
GVYVDQNKFLCYADTIHWQDIVRNPWPSNLTLVSTNGSSGCGRCHKSCTGRCWGPTENHC     180
QTLTRTVCAEQCDGRCYGPYVSDCCHRECAGGCSGPKDTDCFACMNFNDSGACVTQCPQT     240
FVYNPTTFQLEHNFNAKYTYGAFCVKKCPHNFVVDSSSCVRACPSSKMEVEENGIKMCKP     300
CTDICPKACDGIGTGSLMSAQTVDSSNIDKFINCTKINGNLIFLVTGIHGDPYNAIEAID     360
PEKLNVFRTVREITGFLNIQSWPPNMTDFSVFSNLVTIGGRVLYSGLSLLILKQQGITSL     420
QFQSLKEISAGNIYITDNSNLCYYHTINWTTLFSTINQRIVIRDNRKAENCTAEGMVCNH     480
LCSSDGCWGPGPDQCLSCRRFSRGRICIESCNLYDGEFREFENGSICVECDPQCEKMEDG     540
LLTCHGPGPDNCTKCSHFKDGPNCVEKCPDGLQGANSFIFKYADPDRECHPCHPNCTQGC     600
NGPTSHDCIYYPWTGHSTLPQHARTPGX                                     628
```

【図５２】

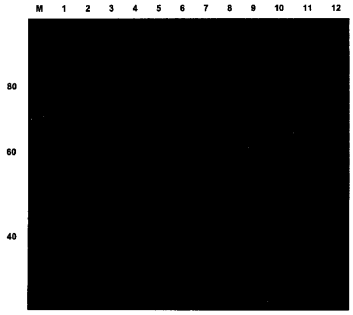


FIG. 52

【図５３】

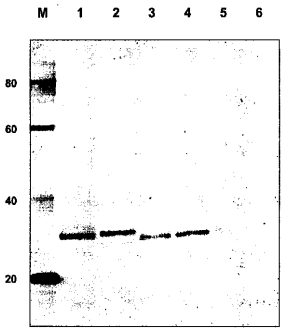


FIG. 53

【図５４】

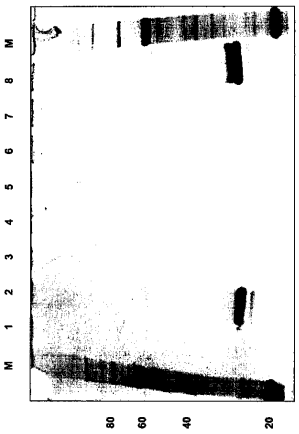
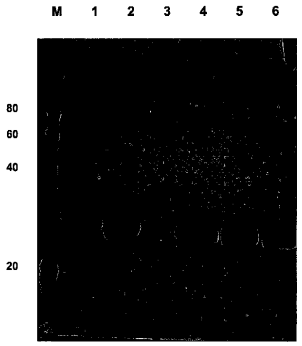


FIG. 54

【図５５】



Fg55

【図５６】

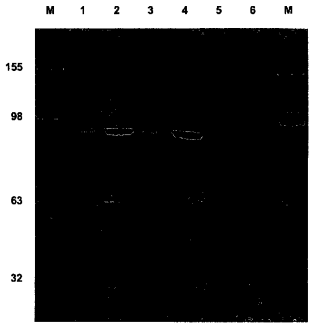


FIG. 56

【図５７】

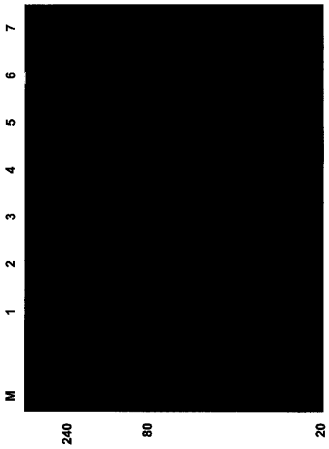
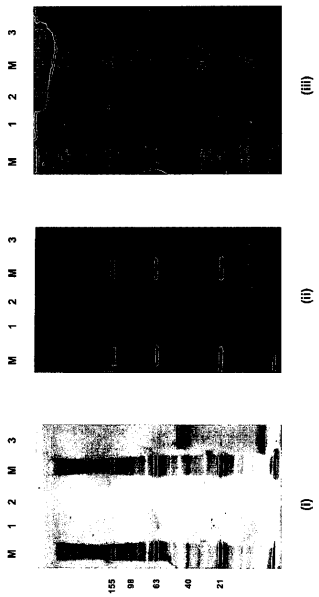


FIG. 57

【図５８】



Fg58

【図５９】

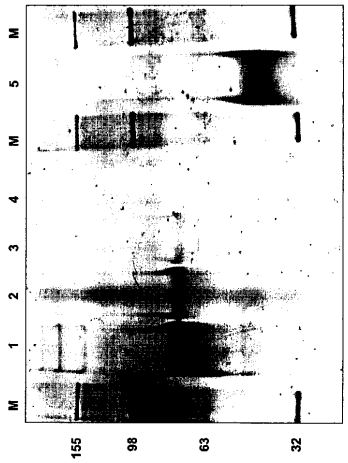


FIG. 59

【図６０】

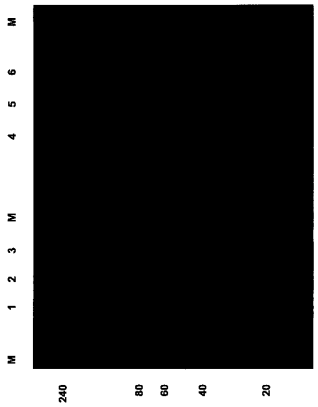
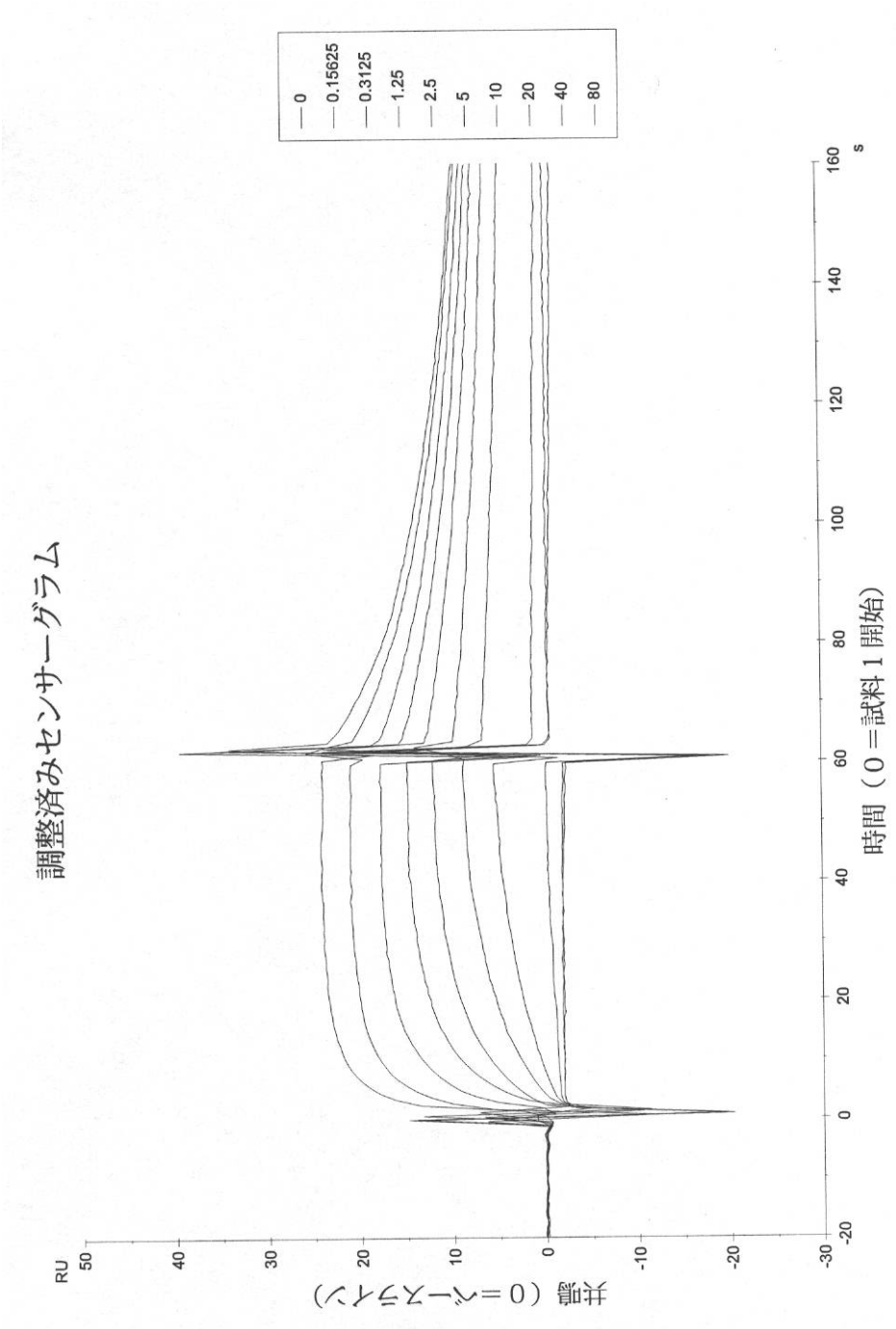
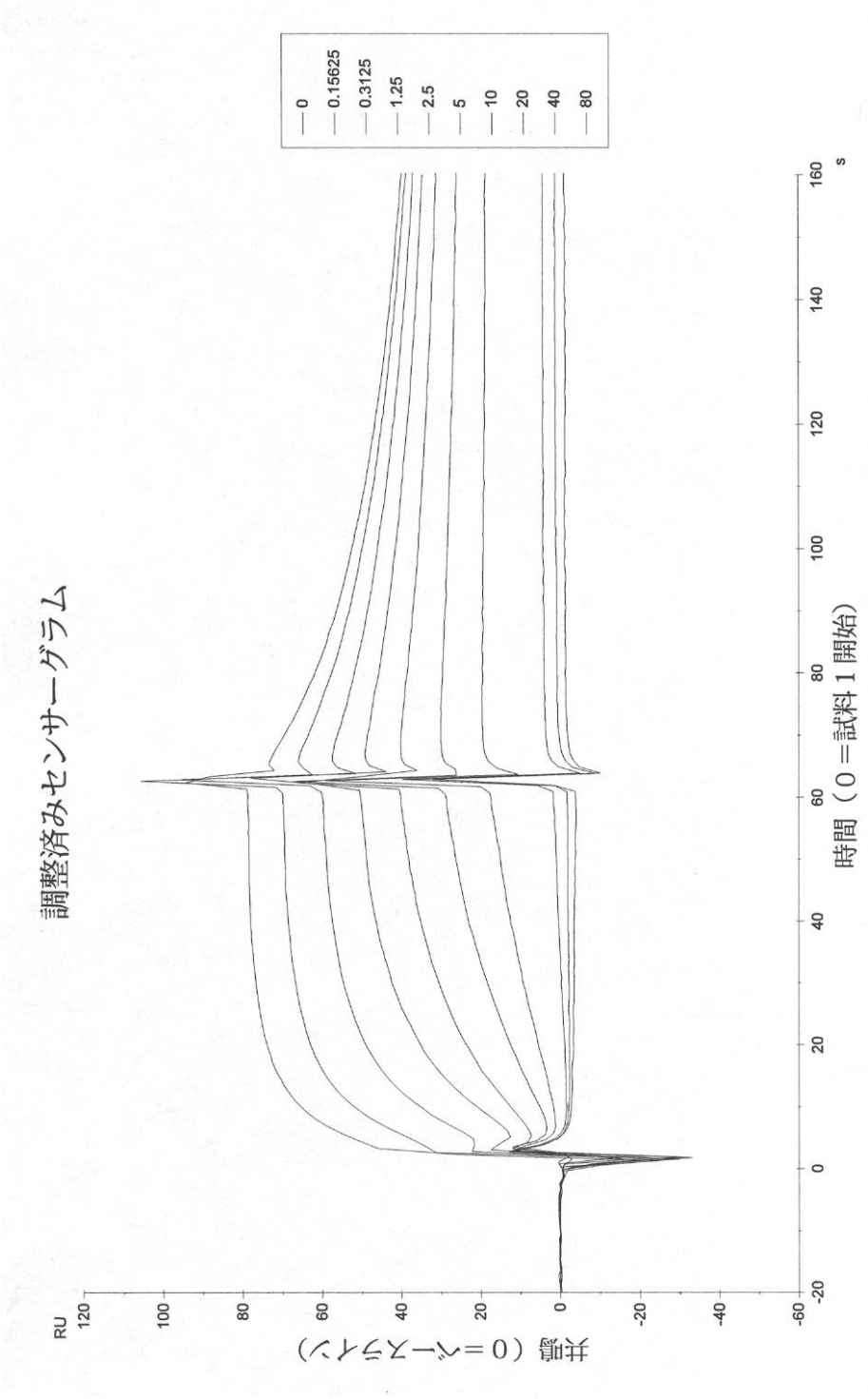


FIG.60

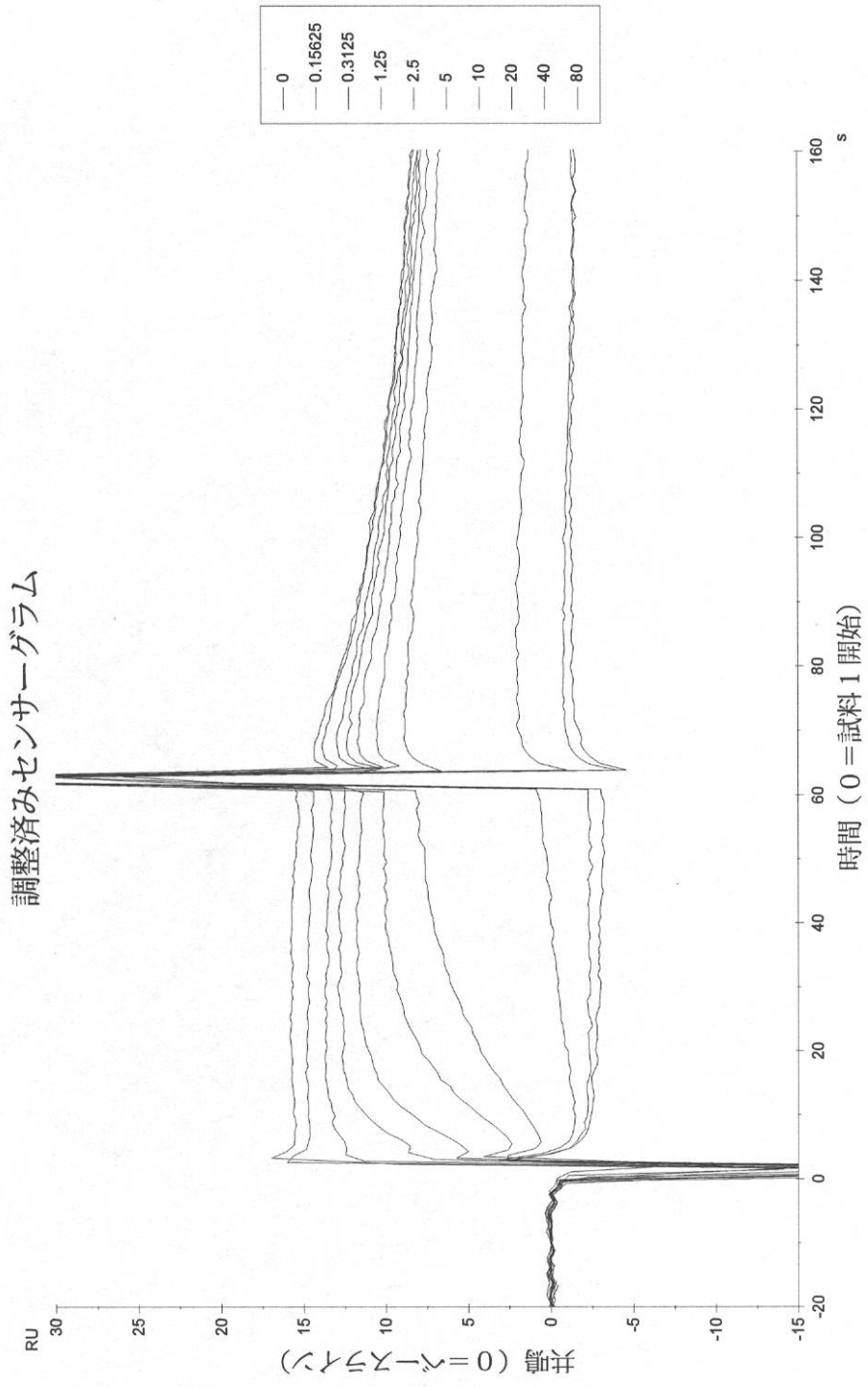
【図６１Ａ】


調整済みセンサーグラム
共鳴（０＝ベースライン）
RU
50
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
s
時間（０＝試料１開始）
0
0.15625
0.3125
1.25
2.5
5
10
20
40
80

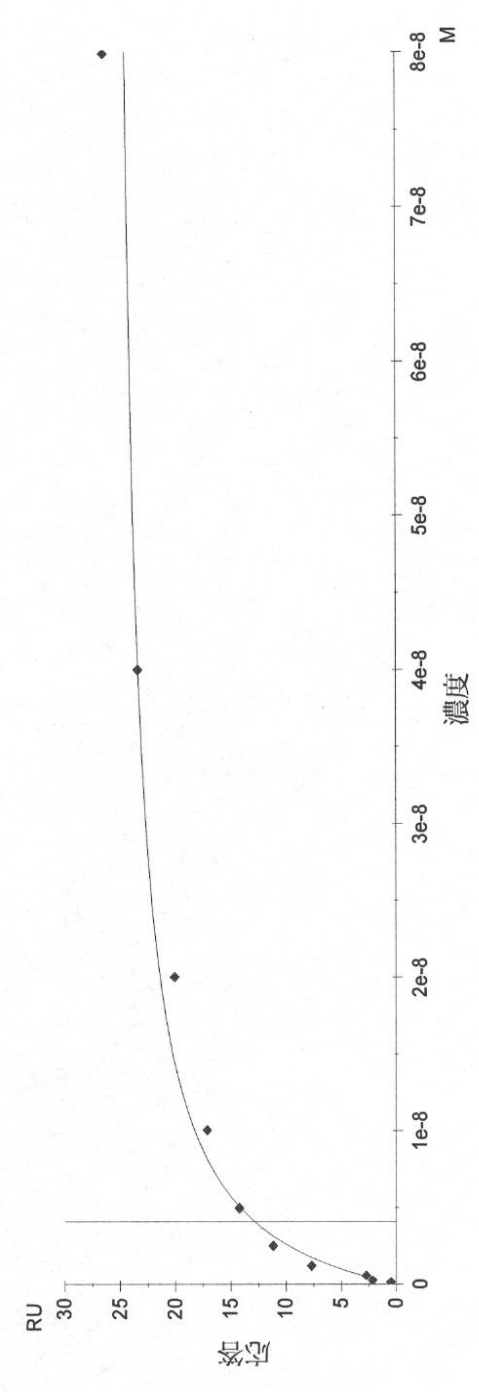
【図６１Ｂ】


調整済みセンサーグラム
0
0.15625
0.3125
1.25
2.5
5
10
20
40
80
RU
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
共鳴（0＝ベースライン）
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
s
時間（0＝試料１開始）

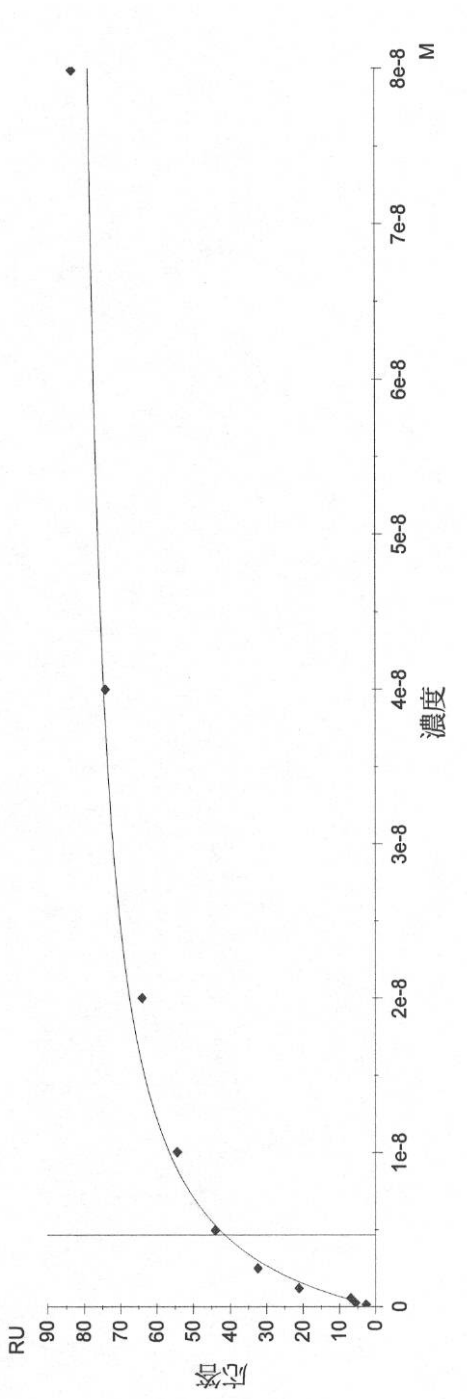
【図６１Ｃ】


調整済みセンサーグラム
0
0.15625
0.3125
1.25
2.5
5
10
20
40
80
RU
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
共鳴（0＝ベースライン）
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
s
時間（0＝試料１開始）

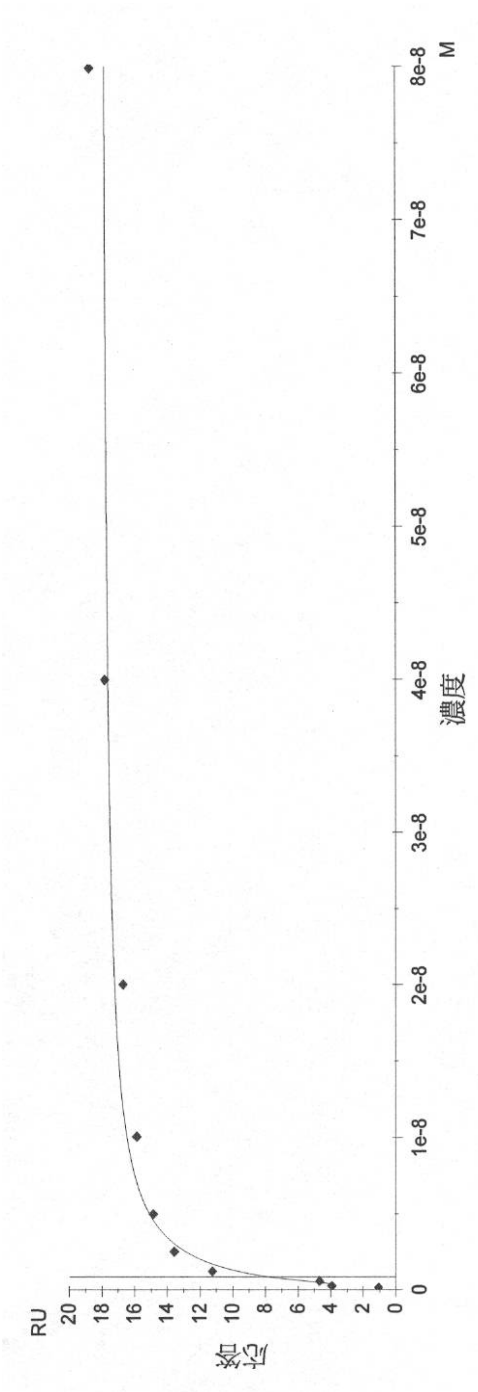
【図６２Ａ】



【図６２Ｂ】


RU
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
結合
0
1e-8
2e-8
3e-8
4e-8
5e-8
6e-8
7e-8
8e-8
M
濃度

【図６２Ｃ】



【配列表】

0005519287000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
C12P 21/08	***(2006.01)***	C12P	21/08	
C12N 15/09	***(2006.01)***	C12N	15/00	A

(72)発明者 ダニエル・ジェイ・カポン
アメリカ合衆国カリフォルニア州９４０１０，ヒルズボロー，クレイグ・ロード ５５５

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 国際公開第００／０００６２５（WO，Ａ１）
米国特許第０５８３４２４７（ＵＳ，Ａ）
Analytical chemistry. 2005, Vol.77, No.3, p.797-805
Annual review of biochemistry. 2003, Vol.72, p.249-289
Gene. 1997, Vol.192, No.2, p.271-281
European journal of biochemistry. 1989, Vol.180, No.1, p.123-131
Journal of the American Chemical Society. 2001, Vol.123, No.21, p.5140-5141

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ １／００－１９／００
ＰｕｂＭｅｄ
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ