

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5143420号
(P5143420)

(45) 発行日 平成25年2月13日 (2013. 2. 13)

(24) 登録日 平成24年11月30日 (2012. 11. 30)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 16/30 (2006. 01)	C O 7 K 16/30
C O 7 K 16/46 (2006. 01)	C O 7 K 16/46
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 9 (全 160 頁)

(21) 出願番号	特願2006-513069 (P2006-513069)	(73) 特許権者	509012625
(86) (22) 出願日	平成16年4月16日 (2004. 4. 16)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2007-525173 (P2007-525173A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
(43) 公表日	平成19年9月6日 (2007. 9. 6)		ス サンフランシスコ ディーエヌエー
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/011793		ウェイ 1
(87) 国際公開番号	W02004/094476	(74) 代理人	100109726
(87) 国際公開日	平成16年11月4日 (2004. 11. 4)		弁理士 園田 吉隆
審査請求日	平成19年4月13日 (2007. 4. 13)	(74) 代理人	100101199
(31) 優先権主張番号	60/463, 656		弁理士 小林 義教
(32) 優先日	平成15年4月16日 (2003. 4. 16)	(72) 発明者	アッカリー, ハイディ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
微生物の受託番号	ATCC PTA-5104		20, ラ ホンダ, スター ルート
微生物の受託番号	ATCC PTA-5086		2, ボックス 333
微生物の受託番号	ATCC PTA-5090		
微生物の受託番号	ATCC PTA-5087		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 S T O P - 1 に関する組成物と方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト S T O P - 1 のアミノ酸 3 3 - 5 2 に特異的に結合し、寄託番号 P T A - 5 1 0 4 として A T C C に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって生成されるモノクローナル抗体。

【請求項 2】

ヒト S T O P - 1 のアミノ酸 9 4 - 2 4 3 に特異的に結合し、寄託番号 P T A - 5 0 8 6 として A T C C に寄託された核酸分子によってコードされるモノクローナル抗体。

【請求項 3】

ヒト S T O P - 1 のアミノ酸 9 4 - 2 4 3 に特異的に結合し、寄託番号 P T A - 5 0 9 0 として A T C C に寄託された核酸分子によってコードされるモノクローナル抗体。

【請求項 4】

モノクローナル抗体の C D R のすべてが非ヒト抗体の対応する C D R と置換している、請求項 1 から 3 の何れかーに記載のモノクローナル抗体のヒト化型。

【請求項 5】

ヒト S T O P - 1 のアミノ酸 9 4 - 2 4 3 に特異的に結合し、細胞への S T O P - 1 結合を促進し、(a) アミノ酸配列 T I S G S D (配列番号：8) からなる V_H-C D R 1 と、(b) アミノ酸配列 G R I S P Y G G N T N (配列番号：9) からなる V_H-C D R 2 と、(c) アミノ酸配列 C A R V G G L K L L F D Y (配列番号：10) からなる V_H-C D R 3 と、(d) 配列番号：92 のアミノ酸 4 7 - 5 7 からなる V_L-C D R 1 と、

10

20

(e) 配列番号：92のアミノ酸73-79からなるV_L-CDR2と、(f) 配列番号：92のアミノ酸112-120又は配列番号：110のアミノ酸108-116からなるV_L-CDR3とを含んでなるモノクローナル抗体。

【請求項6】

ヒトSTOP-1のアミノ酸94-243に特異的に結合し、細胞へのSTOP-1結合を促進し、(a) アミノ酸配列TISGSW(配列番号：17)からなるV_H-CDR1と、(b) アミノ酸配列AWIAPYSGATD(配列番号：18)からなるV_H-CDR2と、(c) アミノ酸配列CAREGGGLYWVFDDY(配列番号：19)からなるV_H-CDR3と、(d) 配列番号：98のアミノ酸48-58からなるV_L-CDR1と、(e) 配列番号：98のアミノ酸74-80からなるV_L-CDR2と、(f) 配列番号：98のアミノ酸113-121からなるV_L-CDR3とを含んでなるモノクローナル抗体。

10

【請求項7】

抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体、抗体フラグメント又は二重特異性抗体である、請求項5又は6に記載の抗体。

【請求項8】

抗体が、増殖阻害剤、細胞障害性剤、検出試薬、抗体の生物学的利用能を改善する作用剤、及び抗体の半減期を改善する作用剤からなる群から選択される作用剤とコンジュゲートしている、請求項1に記載の抗体。

【請求項9】

20

前記細胞障害性剤が毒素、抗生物質および放射性同位元素からなる群から選択される、請求項8に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

本出願の請求の範囲は、2003年4月16日提出の米国仮出願第60/463656号より特権を得るものであり、その出願のすべては出典明記によりここに組み込まれる。

【0002】

発明の分野

本発明は、哺乳動物の腫瘍の診断及び治療の方法を含む、STOP-1ポリペプチド、抗体、核酸分子、アンタゴニスト、アゴニスト、増強物質及びSTOP-1関連の組成物、及びそれらの作成方法及び使用方法に関する。更に本発明は、血管形成及び脈管形成(例えば心血管だけでなく腫瘍学的な疾患)の診断及び治療に関する。

30

【0003】

発明の背景及び導入

制御されない細胞成長は、種々の細胞型の多くの疾患の原因である。例えば、増殖して腫瘍塊を形成する正常組織由来の異常又は腫瘍性細胞の数が増えたと癌が発生する。腫瘍細胞は、しばしば隣接組織に侵入して、血液又はリンパ系を経て領域リンパ節に、転移と呼ばれる過程を経て遠隔部位に広がりうる。癌性成長では、細胞は正常な細胞が成長しない条件下で増殖する。癌は多種多様な形に現れ、侵入及び攻撃性の程度が異なることに特徴がある。悪性腫瘍(癌)は、米国において心臓疾患に続き第2の主要な死亡原因である(Boring等, CA Cancel J. Clin. 43:7(1993))。

40

癌などの細胞増殖性疾患の新たな治療の開発のために多くの研究が行われている。近年の進歩に反して、細胞増殖を調整するための新しい細胞性標的の役割を同定及び理解して、代替の又はより効果的な治療方法及び治療用薬剤及び診断用薬剤を開発することに大きな需要がある。また、代替治療法及び特定の細胞型の治療方法及び異常な細胞増殖(例えば癌)と関連している又はそれによって生じる疾患の治療方法の開発が必要である。例えば、線維形成は、線維芽細胞の過形成及び線維性の結合組織、特に上皮癌の間質の不均衡な形成である。線維形成は、腫瘍浸潤及び悪性腫瘍の特質である。線維腫瘍及び腹部類線維腫は、線維芽細胞の活性化増殖により生じる異常に堅い瘢痕様結合組織の小結節または

50

相対的に大きな塊であり、子供を産んだ女性の腹筋に最も頻繁に起こる；線維芽細胞は周囲の筋肉及び筋膜に侵入する。

【0004】

出産後の生命において、脈管形成（原発性管状網状組織を形成している内皮細胞）及び血管形成（既存の血管からの血管の新生又は成長）は、腫瘍性疾患の病態生理学的に重要な役割を果たす(Semenza, G.L., (2003) Ann. Rev. Med. 54: 17-28)。脈管形成及び血管形成の差異は絶対的でなく、それらは重なり合う(Ribatti, D等., (2001) Mech.Dev. 100:157-163)。両方とも、内皮細胞増殖、移動、新しく形成された凝集塊の三次元的再編成及び細胞間マトリックス癒着機構(Ribatti, 上記)類似機構の効用が必要である。抗血管新生阻害治療法、例えばアバスタチン(Avastin)と呼ばれる脈管内皮増殖(VEGF)に対する抗体の使用が癌の治療に有用であることを示した。

10

ここでSTOP-1又はUNQ762として表す他の細胞性タンパク質がある種の腫瘍で過剰発現していることが示された(例として、W001/163318、W001/68848、W002/00690、W002/08284、W002/16602、W002/42487)。STOP-1に対するポリクローナル抗体が報告された(例として、W002/42487)。血管形成が関与する癌及び疾患の治療にSTOP-1を標的とすることに議論の余地があるが、(例として、W001/163318、W001/68848、W002/00690、W002/08284、W002/16602、W002/42487、W000/71581、W002/00690)、制御されていない細胞成長と、過剰及び不十分な血管形成が原因となる、関与する又はそれにより悪化した疾患の診断及び治療のための代替及びより効果的な治療的薬剤と方法を同定するために更にSTOP-1タンパク質の生物学的研究が必要である。

20

【0005】

本発明は、新規のSTOP-1ポリペプチド、抗体、核酸分子、組成物、及びSTOP-1タンパク質についての更なる知識を組み込んだ方法を提供することによってその需要などの解決に取り組んでいる。特に、STOP-1がさまざまな腫瘍型の間質で過剰発現していることを開示している。STOP-1単独の過剰発現が腫瘍形成性であり得ることを開示している。更に、本開示により、STOP-1タンパク質が分泌され、その分泌が腫瘍形成に必要なことを証明する。またさらに、本開示により、STOP-1のグリコシル化状態が分泌するかどうかに影響すること、及び例えば第186(Asn)でのアラニンへのアミノ酸置換などによるN-グリコシル化部位の除去が分泌の欠損に至ることをしめす。本開示により、STOP-1タンパク質間のジスルフィド結合がSTOP-1の三重らせん体領域に培養中にシステイン55で起こりうることを示す。さらに、本開示により、STOP-1タンパク質が二量体、三量体及び六量体としてそれ自身複合体形成することができること、及びタンパク質のC末端がオリゴマー化に必要である一方で、コラーゲンの三重らせん体領域に関連した領域は必要でないことを示す。また、本開示により、タンパク質のC末端領域及びN末端領域だけでなく核酸及びそれをコードするタンパク質配列を含むSTOP-1に特異的に結合する複数の作用物質を示す。更に、本開示により、STOP-1発現は、例えばWNTの過剰発現など、マウスでの乳癌の原因といわれているWNTシグナル伝達経路でのタンパク質の過剰発現によって制御されうることを示唆する。さらに、本開示により、STOP-1がSTOP-1(例えばMMP-9)として同じ腫瘍において過剰発現されているプロテアーゼによって切断されうることを示す。更に、本開示により、プロテオグリカン合成欠陥の細胞系でのポリペプチドの発現によりSTOP-1ポリペプチド生成方法を示す。本発明は、STOP-1が細胞、例えば癌細胞及び内皮細胞の表面に結合することを示す。本発明は、細胞表面とSTOP-1との相互作用を抑制することができる拮抗的分子を提供する。本発明は、細胞表面へのSTOP-1の結合を強化することができる分子を提供する。また、本発明は、治療が血管形成及び脈管形成を調整することによって改善される場合の、血管形成及び脈管形成のSTOP-1の役割及び疾患を治療するための方法及び組成物にも関する。本出願での他の開示と共にここで提供するデータなどは、STOP-1タンパク質又はそれに関する組成物を用い

30

40

50

た新しく、より良い及び／又は代替的方法を教示する。

【0006】

発明の概要

本発明は、STOP-1の活性、発現及び調節を標的とすることによって、癌を含む制御されない細胞増殖及び他の疾患の治療又は予防を目的とした新しい治療薬剤、診断用薬剤及び方法を提供する。本発明は、STOP-1の活性、発現及び調節を標的とすることによって、最適以下の、過剰な又は不適当な血管形成又は血管性症状を有する任意の病状の治療を目的とした新しい治療薬剤、診断用薬剤及び方法を提供する。

一実施態様によると、本発明はヒトSTOP-1のオリゴマー型に特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。他の実施態様によると、本発明は、ヒトSTOP-1のアミノ酸33-53又は33-52に特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。更なる他の実施態様では、本発明はヒトSTOP-1のアミノ酸94-243に特異的に結合するモノクローナル抗体を含む。更なる実施態様によると、ヒトSTOP-1の残基94-243又はヒトSTOP-1の残基33-53ないし33-52に特異的に結合するモノクローナル抗体は三量体などのヒトSTOP-1のオリゴマー型も認識する。本発明の抗体は単離することができる。前述のヒトSTOP-1の残基33-52又は33-53内の残基に特異的に結合する前述の抗体はSTOP-1又はその非ヒトの等価物内の残基にも結合しうる。

【0007】

更なる他の実施態様では、本発明は、アメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)(10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA)に、2003年3月25日にV0350-4-S7として委託された核酸分子によりコードされるS7、2003年3月25日に名称V0350-2b-S4、として委託された核酸分子によりコードされるS4、2003年3月25日に名称V0350-2b-S9、として委託された核酸分子によりコードされるS9、2003年3月25日に名称V0350-4-S16、として委託された核酸分子によりコードされるS16、2003年3月25日に名称V0350-5として委託された核酸分子によりコードされるF5、及び、名称6B12.1.7として2003年3月28日に寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生成される6B12からなる群から選択される抗体の生物学的特徴を有するモノクローナル抗体であり、委託された抗体、抗体及びその変異体の一部を含んでなる抗体を含むモノクローナル抗体を提供する。他の実施態様では、本発明は、STOP-1に特異的に結合する抗体であり、そのSTOP-1への抗体の結合が前述の委託された抗体のものから選択した第二のモノクローナル抗体によって阻害される(例えば、競合的ELISAアッセイ法で観察されるような)抗体を提供する。

【0008】

また、本発明は異化の配列を有する抗体に関する。

(a) 第一アミノ酸配列に以下を含む：

T-I-X1-X2-X3-X4

X1が、S、N又はTである；

X2がG、N、S又はAである；

X3がY、S又はTである；及び

X4がD又はWである。

(b) 第二アミノ酸配列に以下を含む：

X1-X2-I-X3-P-X4-X5-G-X6-T-X7 (配列番号：115)

X1がG又はA；

(1) X2がS、T、Aからなる群から選択されるアミノ酸であり、X3がR、W及びYからなる群から選択されるアミノ酸である；又は

(2) X3がS、T、Aからなる群から選択されるアミノ酸であり、X2がR、W及びYからなる群から選択されるアミノ酸である；

X4がY又はFである；

X 5 が G、S、T 又は A である；

X 6 が N、Y 又は A；

X 7 が N、Y 又は D；及び

(c) 第三アミノ酸配列が以下の配列を含む；

C-X 1-X 2-X 3-G-G-X 4-X 5-X 6-X 7-X 8-X 9-X 10-X
11 (配列番号：116)

X 1 が A、S 又は T である；

X 2 が塩基性アミノ酸である；

X 3 が任意のアミノ酸である；

X 4 が疎水性アミノ酸である；

X 5-X 8 の何れかーが、任意のアミノ酸又は欠損したものであり、X 5-X 8 の
少なくとも一が芳香族のアミノ酸又は疎水性アミノ酸である；

X 9 が芳香族又は疎水性アミノ酸である；

X 10 が D 又は A である；及び

X 11 が Y 又は V である

を含んでなるモノクローナル抗体。

【0009】

一実施態様によると、モノクローナル抗体は図 34 の軽鎖配列を含む。他の実施態様によ
ると、モノクローナル抗体は完全長 IgG である。

本発明の一実施態様によると、第一アミノ酸配列の X 1 は S である。本発明の他の実施
態様によると、第一アミノ酸配列の X 2 は G である。本発明のさらに他の実施態様によ
ると、第一アミノ酸配列の X 3 は S である。一実施態様によると、第一アミノ酸配列は T I
S G S D (配列番号：8)、T I T N S D (配列番号：11) 及び T I S G S W (配列番
号：17) からなる群から選択される配列である。

本発明の更なる他の実施態様によると、配列番号：115 の X 3 は S 又は A である。本
発明の更なる他の実施態様によると、配列番号：115 の X 4 は Y である。本発明の更な
る他の実施態様によると、配列番号：115 の X 5 は G 又は A である。本発明の更なる他
の実施態様によると、配列番号：115 の X 6 は N 又は A である。本発明の一実施態様によ
ると、配列番号：115 は G R I S P Y G G N T N (配列番号：9)、A T I Y P Y G
G Y T Y (配列番号：12) 及び A W I A P Y S G A T D (配列番号：18) からなる群
から選択される配列である。

本発明の一実施態様によると、配列番号：116 の X 1 は A である。本発明の他の実施
態様によると、配列番号：116 の X 2 は R である。本発明の更なる他の実施態様によ
ると、配列番号：116 の X 4 は L 又は M である。本発明の好ましい一実施態様によ
ると、X 5-X 8 にある芳香族アミノ酸はトリプトファン残基である。他の実施態様によ
ると、X 5-X 8 のうちの一アミノ酸は欠損している。本発明のさらに他の実施態様によ
ると、配列番号：116 の X 9 は F である。本発明の一実施態様によると、配列番号：116
の X 10 は D である。本発明の一実施態様によると、配列番号：116 の X 11 は Y である
。一実施態様によると、配列番号：116 は C A R V G G L K L L F D Y (配列番号：1
0)、C A R G G G M D G Y V M D Y (配列番号：13) 及び C A R E G G L Y W V F D
Y (配列番号：19) からなる群から選択される配列である。

【0010】

本発明の抗体は、(a) 配列 T I S G S D (配列番号：8) を含む第一アミノ酸配列；
(b) 配列 G R I S P Y G G N T N (配列番号：9) を含む第二アミノ酸配列；及び (c)
(c) 配列 C A R V G G L K L L F D Y (配列番号：10) を含む第三アミノ酸配列、又は該
抗体の変異型を含みうる。あるいは、本発明の抗体は、(a) 配列 T I T N S D (配列番
号：11) を含む第一アミノ酸配列；(b) 配列 A T I Y P Y G G Y T Y (配列番号：1
2) を含む第二アミノ酸配列；及び (c) 配列 C A R G G G M D G Y V M D Y (配列番号
：13) を含む第三アミノ酸配列、又は該抗体の変異型を含みうる。あるいは、本発明の
抗体は、(a) 配列 T I S G S W (配列番号：17) を含む第一アミノ酸配列；(b) 配

10

20

30

40

50

列AWIAPYSGATD（配列番号：18）を含む第二アミノ酸配列；及び（c）配列CAREGLYWVFDY（配列番号：19）を含む第三アミノ酸配列、又は該抗体の変異型を含む。あるいは、本発明の抗体は、（a）配列TISNYG（配列番号：20）を含む第一アミノ酸配列；（b）配列GRISPSTNGSTY（配列番号：21）を含む第二アミノ酸配列；及び（c）配列CAKCSVRFA Y（配列番号：22）を含む第三アミノ酸配列、又は該抗体の変異型を含む。あるいは、本発明の抗体は、（a）配列TINN YD（配列番号：14）を含む第一アミノ酸配列；（b）配列GYISP P SGATY（配列番号：15）を含む第二アミノ酸配列；及び（c）配列CARMVGM RRGVMDY（配列番号：16）を含む第三アミノ酸配列、又は該抗体の変異型を含む。

10

更なる実施態様では、上記の第一、第二及び第三アミノ酸配列はヒト重鎖に位置し、第一アミノ酸配列がカバットナンバリングシステムに従って、重鎖28－33残基内にあり、第二アミノ酸配列がカバットナンバリングシステムに従って重鎖49－58残基内にあり、第三アミノ酸配列がカバットナンバリングシステムに従って92－102残基内にあるものである。

【0011】

他の実施態様では、本発明は、（a）図27の重鎖配列；（b）図28の重鎖配列；（c）図29の重鎖配列；（d）図30の重鎖配列；（e）図31の重鎖配列；又は（f）図34の重鎖配列；又はそれらの変異型のアミノ酸配列を含んでなるモノクローナル抗体を提供する。更なる実施態様では、さらに本発明の抗体は（a）図27の軽鎖配列、（b）図34の軽鎖配列；又はそれらの変異型のアミノ酸配列を含む。

20

更なる実施態様では、本発明の抗体はキメラ又はヒト化抗体である。他の実施態様では、本発明の抗体は抗体断片である。本発明の更なる他の実施態様では、抗体は、間質性標的作用剤、成長阻害剤、細胞障害性剤、検出用試薬、生物学的利用能を改善する作用物質及び抗体の半減期を改善する作用物質からなる群から選択した作用物質を包含している。他の実施態様では、本発明の抗体はSTOP－1ポリペプチドへの結合特異性及び任意の他の抗原への一以上の結合特異性を有する多重特異性抗体である。一実施態様によると、他の抗原は細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットである。好ましい一実施態様によると、細胞表面タンパク質はナチュラルキラー（NK）細胞レセプターである。より好ましい実施態様によると、NKレセプターへの抗体の結合はナチュラルキラー細胞を活性化する。

30

本発明は、変異体及びSTOP－1ポリペプチド変異体の修飾を提供する。一実施態様では、STOP－1ポリペプチド変異型は細胞から分泌されない。他の実施態様では、当該変異体は残基186に変異を有するヒトSTOP－1ポリペプチドである。また、本発明は、他のSTOP－1とジスルフィド結合することができないSTOP－1を含むSTOP－1変異型ポリペプチドを提供する。一実施態様によると、変異型は残基55に変異を有するヒトSTOP－1ポリペプチドである。

【0012】

また、本発明は、抗体、ポリペプチド及びその変異体をコードする核酸分子、核酸分子を含むベクター、及び本発明の核酸分子を含む宿主細胞を提供する。

40

本発明は、本発明の抗体、ポリペプチド又は核酸分子を含む組成物を包含する。一実施態様によると、組成物は更に薬学的受容可能な担体を含む。更なる実施態様では、組成物は間質性標的作用物質を含む。更なる実施態様では、間質性標的作用物質はモノクローナル抗体又はポリペプチドと共有結合している。更に他の実施態様では、間質性標的作用物質は腫瘍の間質性細胞を認識する。

本発明は、本発明による核酸分子を含んでなる細胞を培養することによって本発明のSTOP－1ポリペプチド又は抗STOP－1抗体を生成するための方法を提供する。一実施態様によると、STOP－1ポリペプチド生成方法は、STOP－1ポリペプチドをコードする核酸分子を含み、プロテオグリカン合成を欠失している哺乳動物細胞を培養する工程を含む。他の実施態様によると、プロテオグリカン合成を欠失している細胞株はガラ

50

クトシルトランスフェラーゼ（ガラクトシル基転移酵素）I 活性を欠失している。一実施態様によると、細胞株はCHO-p s b g細胞である。

本発明は、STOP-1ポリペプチドを含むことが予測される試料を抗STOP-1抗体に曝し、該試料中の成分への該抗体の結合を定量することを含んでなる試料中に存在するSTOP-1ポリペプチドの同定方法を提供する。

【0013】

本発明は、患者からの正常組織でのSTOP-1の発現を試験すべきSTOP-1の量と比較する工程を含んでなる、患者の腫瘍などの細胞増殖性疾患の診断及びモニタリングの方法を提供する。一実施態様では、STOP-1タンパク質は本発明の抗体などの作用物質により検出することができる。他の実施態様では、STOP-1 mRNAはUNQ6762 mRNAに特異的にハイブリダイズする核酸分子などの作用物質により検出することができる。更なる実施態様では、試験すべき腫瘍は大きな間質性領域を有する。更なる実施態様では、STOP-1検出用試薬は、試験すべき組織の間質性領域へ又はその近くに投与する。更なる他の実施態様では、方法は更に、試験すべき組織及び正常組織の間質性領域におけるSTOP-1タンパク質又はmRNAを観察又はアッセイする工程を含む。他の実施態様では、抗体は本発明のモノクローナル抗体である。

本発明は、患者の細胞増殖を抑制するのに有効な量の本発明の組成物を患者に投与する工程を含んでなる、患者の増殖性疾患の予防又は治療方法を提供する。一実施態様では、増殖性疾患は線維形成である。また、本発明は、患者の腫瘍の成長を阻害するのに有効な量のSTOP-1アンタゴニストを患者に投与することを含む、STOP-1を過剰発現している腫瘍の成長の予防方法又は阻害方法を提供する。更なる実施態様では、治療する腫瘍は間質性領域を有する。また更なる実施態様では、間質性領域を有する腫瘍は、線維腫瘍、腭癌、肉腫（例えば血管肉腫、横紋筋肉腫）及び腺癌（乳房腺癌、大腸腺癌、胃腸腺癌及び卵巣腺癌）、肝臓癌、乳癌、大腸癌、肺癌、卵巣がん、神経膠腫、子宮体癌及び脈管癌からなる群から選択される。更なる実施態様では、アンタゴニストは腫瘍の間質に又はその近くに投与する。他の実施態様では、腫瘍は、黒色腫又は円形細胞腫瘍（例えば悪性線維性組織球腫）である。

【0014】

本発明のアンタゴニストは、天然のSTOP-1ポリペプチドに特異的に結合して、部分的に、又は完全に天然のSTOP-1ポリペプチドの生物学的活性を遮断、抑制又は、無活性化する任意の分子であり、その拮抗する分子の結合は、(1)オリゴマー型の天然STOP-1ポリペプチドに対するものである、(2)天然のヒトSTOP-1の残基94-243に対するものである、及び／又は(3)本発明のモノクローナル抗体（例えば本発明の寄託された抗体など）によって阻害される（例えば、STOP-1及び6B12を用いた競合的ELISAアッセイで観察されるような）ものである。一実施態様によれば、寄託された抗体は6B12抗体である。一実施態様によれば、アンタゴニストはポリペプチドである。他の実施態様によれば、アンタゴニストは本発明の抗体である。他の実施態様では、アンタゴニストが阻害するSTOP-1ポリペプチドは三量体複合体の一部である。

他の実施態様によれば、アンタゴニストによって阻害される生物学的活性は、STOP-1に特異的に結合する細胞とSTOP-1との相互作用である。一実施態様によれば、細胞は乳癌細胞である。他の実施態様によれば、細胞は内皮細胞である。さらに他の実施態様によって、アンタゴニストは、(1)6B12抗体が結合するヒトSTOP-1内のエピトープに結合することができる特性；(2)ヒトSTOP-1の少なくとも残基33-52内の残基に結合することができる特性；及び(3)6B12抗体にによるSTOP-1への結合を競合することができる（例えば、STOP-1、アンタゴニスト及び6B12抗体を用いた競合的ELISAアッセイで観察されるような）特性からなる群から選択した付加的特性を有する。

【0015】

本発明は、細胞からのSTOP-1分泌を阻害する工程を含む、STOP-1を過剰発現する細胞の成長を阻害する方法を提供する。一実施態様において、分泌は、STOP-1のグリコシル化を阻害することによって阻害される。他の実施態様では、分泌は、細胞で分泌されるこ

とができないSTOP-1タンパク質を過剰発現させることによって阻害される。さらなる実施態様において、分泌は、残基186で変異しているSTOP-1タンパク質によって阻害される。

本発明は、(1)STOP-1コード化DNA分子の第55システイン残基を変異する；(2)第55システイン残基に変異があるSTOP-1タンパク質を天然に生じるSTOP-1タンパク質存在下にて発現させる；そして(3)第55システイン残基に変異があるSTOP-1タンパク質を天然に生じるSTOP-1タンパク質と共にインキュベートすることからなる群から選択した工程を含む、STOP-1分子間のジスルフィド結合を阻害する方法を提供する。

本発明は、細胞外基質分解酵素-7(MMP-7)及び細胞外基質分解酵素-9(MMP-9)からなる群から選択したプロテアーゼと共にSTOP-1をインキュベートする工程を含む、STOP-1断片化方法を提供する。

【0016】

本発明の他の実施態様は、STOP-1ポリペプチドを過剰発現する細胞の成長を阻害する方法に関するものであり、該方法はSTOP-1のアンタゴニストを投与することを含み、該アンタゴニストはSTOP-1に特異的に結合するもので、場合によっては、間質性標的作用物質、成長阻害剤又は細胞障害性剤、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素、抗生物質、放射性同位体元素及び核酸分解酵素からなる群から選択した一又は組み合わせた作用剤を包含している。本発明の他の実施態様は、STOP-1ポリペプチドを過剰発現させる細胞の成長を阻害する方法に関するものであり、該方法は腫瘍の間質細胞に作用物質を投与することを含み、該作用物質はSTOP-1のアンタゴニスト又はSTOPポリペプチドをコードする核酸分子である。作用物質は、間質性細胞へ作用物質を導く間質性標的作用物質を使用することによって、患者又は医師により直接的に又は間接的に間質性細胞に投与することができる。本発明は、(a)修飾したSTOP-1ポリペプチド、STOP-1ポリペプチド変異体、STOP-1アンタゴニスト、STOP-1アゴニスト又は媒体(例えば、アンチセンス療法又はRNAi療法)を包含したSTOP-1ポリペプチドをコードする核酸分子を含む組成物；(b)該組成物を内包している容器；と(c)該容器に貼付したラベル、又は、該容器内に包含するパッケージ挿入物であって、増殖性疾患又は異常な血管形成又は脈管形成が関連する疾患の治療での該ポリペプチド変異体、修飾ポリペプチド又はアンタゴニストの使用を示しているもの(例えば、パッケージ挿入物)とを含んでなる製造品を提供する。一実施態様によると、STOP-1アンタゴニスト又は増強物質は本発明の抗体である。

【0017】

本発明は、STOP-1及びSTOP-1のアゴニスト又はアンタゴニストの活性を試験するための方法を提供する。一実施態様では、内皮細胞に該細胞の移動を誘導させるのに有効な量のSTOP-1ポリペプチドを投与することを含む、インビトロでの細胞移動誘導方法が提供される。他の実施態様によると、本発明は、第一の内皮細胞をSTOP-1で処理し、第二の内皮細胞を候補アンタゴニスト又はアゴニストで処理し、第一と第二の内皮細胞の移動を比較する工程を含む、STOP-1の候補アンタゴニスト又はアゴニストの活性を試験する方法を提供する。好ましい一実施態様では、そのような移動アッセイに用いる細胞はHUVEC細胞である。

また、本発明は、哺乳動物の対象体の過剰な、不適当な又は制御不能な血管形成が関連する疾患又は症状の治療方法を提供する。一実施態様では、当該方法は、疾患を治療するのに有効な量のSTOP-1アンタゴニストを対象体に投与する工程を含み、該STOP-1アンタゴニストは(1)6B12抗体が結合するヒトSTOP-1内の残基に結合する；(2)ヒトSTOP-1の少なくとも残基33-52内の残基に結合する；及び(3)6B12抗体のSTOP-1への結合を阻害することができる特性からなる群から選択した何れかの特性を有するものである。

【0018】

また、本発明は、治療的有效量のSTOP-1増強物質、細胞へのSTOP-1結合を

10

20

30

40

50

亢進する及び／又は細胞表面上にSTOP-1を凝集する分子を投与することによって、血管形成や脈管形成を増加することで得をする患者の治療も考慮する。そのような分子は、血管形成又は脈管形成を増加するのに効果的な量で投与するであろう。一実施態様では、アゴニストはSTOP-1細胞表面を凝集する抗STOP-1抗体である。

また、本発明は、3つ以上のSTOP-1ポリペプチドを含むSTOP-1ポリペプチドのオリゴマー型を含むアゴニストを提供する。一実施態様によると、アゴニストは6つのSTOP-1ポリペプチドを含む。他の実施態様によると、STOP-1ポリペプチドは該アゴニストを形成するのに用いられるイムノアドヘシンの一部である。

本発明は、アンタゴニスト、アゴニスト又は増強物質のある条件下及びない条件下での細胞へのSTOP-1の結合を定量又は観察する工程を含む、候補及び公知のSTOP-1アンタゴニスト、アゴニスト及び増強物質を同定及び評価する新しい方法を提供する。一実施態様によると、細胞は癌細胞である。更なる実施態様では、細胞は乳癌細胞である。他の実施態様によると、細胞は内皮細胞である。

【0019】

本発明の詳細な説明

本発明によるSTOP-1タンパク質をコードしている核酸配列は、例えば、配列番号：1及び図1に記載のポリペプチドをコードする核酸分子を含む。

配列番号：1

配列番号：1

```
GGAGAGAGGCGCGCGGGTGAAAGGCGCATTGATGCAGCCTGCGGCGGCCTCGGAGCGCGG
CGGAGCCAGACGCTGACCACGTTCTCTCGGTCTCTCTCCGCTCCAGCTCCGCGCTG
CCCGGCGAGCCGGGAGCCATGCGACCCAGGGCCCCGCGCCTCCCCGCAGCGGCTCCGCG
GCCTCCTGCTGCTCCTGCTGCTGCAGCTGCCCGCGCCGTGAGCGCCTCTGAGATCCCCA
AGGGGAAGCAAAAGGCGCAGCTCCGGCAGAGGGAGGTGGTGGACCTGTATAATGGAATGT
GCTTACAAGGGCCAGCAGGAGTGCCTGGTGCAGACGGGAGCCCTGGGGCCAATGTTATTC
CGGGTACACCTGGGATCCCAGGTCCGGATGGATTCAAAGGAGAAAAGGGGGAATGTCTGA
GGGAAAGCTTTGAGGAGTCTGGACACCCAACTACAAGCAGTGTTTATGGAGTTCATTGA
ATTATGGCATAGATCTTGGGAAAATTGCGGAGTGATACATTTACAAAGATGCGTTCAAATA
GTGCTCTAAGAGTTTTTGTTCAGTGGCTCACTTCGGCTAAAATGCAGAAATGCATGCTGTC
AGCGTTGGTATTTTCACTTCAATGGAGCTGAATGTTTCAAGACCTCTTCCCATTGAAGCTA
TAATTTATTTGACCAAGGAAGCCCTGAAATGAATTCAAACAATTAATATTCATCGCACTT
CTTCTGTGGAAGGACTTTTGTGAAGGAATTGGTGTGCTGGATTAGTGGATGTTGCTATCTGGG
TTGGCACTTGTTCAGATTACCCAAAAGGAGATGCTTCTACTGGATGGAATTCAGTTTCTC
GCATCATTATTGAAGAACTACCAAAATAAATGCTTTAATTTTTCATTGCTACCTCTTTTT
TTATTATGCCTTGGAAATGGTTCACTTAAATGACATTTTAAATAAGTTTATGTATACATCT
GAATGAAAAGCAAAGCTAAATATGTTTACAGACCAAAGTGATTTTACACTGTTTTTAA
ATCTAGCATTATTTCAATTTGCTTCAATCAAAAGTGGTTTCAATATTTTTTTTAGTTGGTT
AGAATACTTTCTTCATAGTCACATTTCTCTCAACCTATAATTTGGAATATTGTTGTGGTCT
TTTGTTTTTTCTCTTAGTATAGCATTTTTTAAAAAATATAAAAGCTACCAATCTTTGTAC
AATTTGTAAATGTTAAGAATTTTTTTTATATCTGTTAAATAAAAAATTATTTCCAACA
```

【0020】

ここで使用される「STOP-1」、「STOP-1タンパク質」、「STOP-1ポリペプチド」(UNQ762又は762)という用語は、特に明記しない限り、天然配列ポリペプチド、ポリペプチド変異体及び天然配列ポリペプチドとポリペプチド変異体の断片(ここでさらに定義する)を包含する。STOP-1タンパク質は、委託されている核酸分子を用いることを含み、本発明に従った抗体を使用して、又は組換え又は合成法によってヒトなどの様々な種から得ることができる。STOP-1のオリゴマー型は、残基94-243のみ又はその一部を有するヒトSTOP-1を含む。本発明のオリゴマー型はSTOP-1の二量体、三量体及び六量体を含む。好ましい一実施態様では、STOP-1のオリゴマー型は三量体である。

「天然配列」ポリペプチド又は「天然の」ポリペプチドとは、天然由来のポリペプチド(例えば抗体)と同じアミノ酸配列を有するものである。「天然配列」ポリペプチドとは

、天然由来のポリペプチド（例えば抗体）と同じアミノ酸配列を有するものである。そのような天然配列ポリペプチドは自然から単離することもできるし、組換え又は合成法により生成することもできる。したがって、天然配列ポリペプチドは天然に生じるヒトポリペプチド、マウスポリペプチド、又は他の任意の哺乳動物種からのポリペプチドのアミノ酸配列を有する。「天然配列」STOP-1ポリペプチド又は「天然の」STOP-1ポリペプチドは、天然由来の対応するSTOP-1ポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。例えば、好ましい一実施態様では、ヒトSTOP-1の天然配列をコードする核酸配列を配列番号：2及び図2に示す。

【0021】

配列番号：2

10

配列番号:2

MRPQGPAASPQRLRGLLLLLLLQLPAPSSASEIPKGKQKAQLRQREVVDLYNGMCLQ
GPAGVPGRDGSPGANVIPGTPGIPGRDGFKEGEGECLRESFEESWTPNYKQCSWSSL
NYGIDLGKIAECTFTKMRSNSALRVLFSGSLRLKCRNACCQRWYFTFNGAECGGLPI
EAIYLDQGSPEMNSTINIHRSSVEGLCEGIGAGLVDVAIWVGTCSDYPKGDASTGW
NSVSRIMEELPK

そのようなSTOP-1ポリペプチドは自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生成することもできる。特に、「天然配列」又は「天然の」STOP-1ポリペプチド又はタンパク質は、STOP-1タンパク質の天然に生じる切断型又は分泌型、天然に生じる変異型（例えば、選択的スプライシング型）、及びポリペプチドの天然に生じる対立変異型を包含する。本発明のある実施態様では、ここに開示した天然配列STOP-1ポリペプチドは、添付の図に示す完全長アミノ酸配列を含む成熟又は完全長天然配列ポリペプチドである。

20

【0022】

ここに開示する種々のSTOP-1ポリペプチドの「シグナルペプチド」のおおよその位置は、本明細書及び／又は添付図に示されうる。更に、幾つかの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナル配列の切断は完全に均一ではなく、一つ以上の分泌種をもたらすことも認められる。シグナルペプチドがここに同定されるシグナルペプチドのC末端境界の何れかの側の約5アミノ酸未満内で切断されるこれらの成熟ポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明で考慮される。

30

「STOP-1ポリペプチド変異体」とはSTOP-1ポリペプチド、好ましくは、ここに開示するような完全長天然配列STOP-1ポリペプチド配列、ここで開示するようなシグナルペプチド又は三重らせンドメインを欠くSTOP-1ポリペプチド配列、又はここに開示する完全長STOP-1ポリペプチド配列の任意の他の断片（例えば、完全長STOP-1ポリペプチドの完全なコード配列の一部のみを示す核酸によってコードされるもの）と少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有するここで定義するような活性なSTOP-1ポリペプチドを意味する。このようなSTOP-1ポリペプチド変異体には、例えば、完全長天然アミノ酸配列のN末端又はC末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたSTOP-1ポリペプチドが含まれる。通常、STOP-1ポリペプチド変異体は、ここに開示する完全長天然配列STOP-1ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くSTOP-1ポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するSTOP-1ポリペプチドの三重らせンドメイン、又はここに開示する完全長STOP-1ポリペプチド配列の任意の具体的に定義した他の断片に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有している。通常、STOP-1変異体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、あるいは少なくとも約20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、19

40

50

0、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600アミノ酸長、又はそれ以上である。場合によっては、STOP-1変異体ポリペプチドは、天然STOP-1ポリペプチド配列に比較して一つ以下の保存的アミノ酸置換、あるいは天然STOP-1ポリペプチド配列に比較して2、3、4、5、6、7、8、9、又は10以下の同類アミノ酸置換を有するにすぎない。

【0023】

ここで同定したSTOP-1ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定のSTOP-1ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表1に提供されている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表1に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントンD.C.、20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、下記の表1に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標)V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0024】

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bへの、それとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Bへの、それとの、又はそれに対する或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される：

分率 X/Y の100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なると認識されるであろう。%アミノ酸配列同一性の計算の例として、表2及び3は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「STOP-1」と称されるアミノ酸配列に対する%アミノ酸配列同一性の計算方法を示し、ここで「STOP-1」は対象の仮想STOP-1ポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」は対象の「STOP-1」ポリペプチドと比較したポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「X」、「Y」及び「Z」は、それぞれ異なる仮定アミノ酸残基を表す。特に断らない限りは、ここで使用される全ての%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを用いて直ぐ上の段落に記載されるようにして得られる。

【0025】

「STOP-1 変異体ポリヌクレオチド」又は「STOP-1 変異体核酸配列」とは、ここで定義されるように、STOP-1 ポリペプチド、好ましくは活性STOP-1 ポリペプチドをコードし、ここに開示する完全長天然配列STOP-1 ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた完全長天然配列STOP-1 ポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するSTOP-1 ポリペプチドの三重らせンドメイン、又はここに開示する完全長STOP-1 ポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列（完全長STOP-1 ポリペプチドの完全なコード化配列の一部分のみを表す核酸によってコードされた）と、少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する核酸分子を意味する。通常、STOP-1 変異体ポリヌクレオチドは、ここに開示する完全長天然配列STOP-1 ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠く完全長天然配列STOP-1 ポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するSTOP-1 ポリペプチドの三重らせンドメイン、又はここに開示する完全長STOP-1 ポリペプチド配列の任意の他の断片をコードする核酸配列と、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然ヌクレオチド配列を含まない。

【0026】

通常、STOP-1 変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約5ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、表示ヌクレオチド配列長にその表示長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。

【0027】

ここで同定されるSTOP-1 コード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、対象のSTOP-1 核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign (DNASTAR) ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、ALIGN-2 プログラム用の完全なソースコードが下記の表1に提供されている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2 配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表1に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントンD.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2 プログラムはジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、下記の表1に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2 プログラムは、UNIX（登録商標）オ

10

20

30

40

50

ペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX（登録商標）V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0028】

核酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられた核酸配列Cの、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する%核酸配列同一性（あるいは、与えられた核酸配列Dと、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Cと言うこともできる）は次のように計算される：

分率W/Zの100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムALIGN-2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチドである。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。%核酸配列同一性の計算の例として、「STOP-1-DNA」が対象となる仮説的STOP-1コード化核酸配列を表し、「比較DNA」が対象となる「STOP-1-DNA」核酸分子と比較している核酸分子のヌクレオチド配列を表し、そして「N」、「L」及び「V」の各々が異なった仮想ヌクレオチドを表して、表4及び5が「比較DNA」と称される核酸配列の「STOP-1-DNA」と称される核酸配列に対する%核酸配列同一性の計算方法を示す。特に断らない限りは、ここでの全ての%核酸配列同一性値は、直ぐ上のパラグラフに示したようにALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られる。

【0029】

他の実施態様では、STOP-1変異体ポリヌクレオチドとは、STOP-1ポリペプチドをコードする核酸分子であり、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、ここに記載の完全長STOP-1ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列とハイブリダイゼーションすることができる。STOP-1変異体ポリペプチドは、STOP-1変異体ポリヌクレオチドによってコードされているものであり得る。

STOP-1ポリペプチドをコードする核酸に関して使用される場合の「完全長コード領域」という用語は、（添付図において開始及び停止コドンの間でしばしば示される）本発明の完全長STOP-1ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を意味する。ATCC寄託核酸に関して使用される場合の「完全長コード領域」という用語は、（添付図において開始及び停止コドンの間でしばしば示される）ATCCに寄託されたベクター中に挿入されているcDNAのSTOP-1ポリペプチドコード部分を意味する。

【0030】

ここに開示される種々のSTOP-1ポリペプチドを記載するために使用される「単離」とは、自然環境の成分から同定され及び分離及び／又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様では、ポリペプチドは、(1)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でSDS-PAGEにより均一になるまで精製される。単離されたポリペプチドには、STOP-1ポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一つの精製工程により調製される。

【0031】

「単離された」STOP-1ポリペプチドをコードする核酸又は他のポリペプチドコード化核酸は、同定され、ポリペプチドをコードする核酸の天然源に通常付随している少なくとも一つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたポリペプチドをコードする核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。故に、単離

されたポリペプチドをコードする核酸分子は、天然の細胞中に存在する特異的なポリペプチドをコードする核酸分子とは区別される。しかし、ポリペプチドをコードする単離された核酸分子には、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるポリペプチドを通常は発現する細胞に含まれるポリペプチドをコードする核酸分子が含まれる。

「コントロール配列」という用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列と、リボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

【0032】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングに必要な温度が高くなり、プローブが短くなるとそれに必要な温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補鎖がその融点より低い環境に存在する場合に、変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイゼーション配列の間で所望される相同性の程度が高くなればなるほど、用いることができる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をよりストリンジェントにすることになり、低い温度はストリンジェントを低下させることになる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーの更なる詳細及び説明については、Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biology (Wiley Interscience Publishers, 1995) を参照のこと。

【0033】

ここで定義される「ストリンジェント条件」又は「高度のストリンジェンシー条件」は、(1) 洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50℃において0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2) ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42℃において50% (v/v) ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；又は(3) 42℃における50%ホルムアミド、5xSSC (0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム (pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5xデンハード液、超音波処理サケ精子DNA (50µg/ml)、0.1%SDS、及び42℃での10%の硫酸デキストランと、42℃における0.2xSSC (塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム) の10分間の洗浄、ついで55℃におけるEDTAを含む0.1xSSCからなる高ストリンジェンシー洗浄を用いるものによって同定される。

「中程度のストリンジェント条件」は、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989) に記載されているように同定さ

10

20

30

40

50

れ、上記のストリンジェントより低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、イオン強度及び% SDS）の使用を含む。中程度のストリンジェント条件は、20%ホルムアミド、5 x SSC（150 mMのNaCl、15 mMのクエン酸三ナトリウム）、50 mMリン酸ナトリウム（pH 7.6）、5 x デンハード液、10%硫酸デキストラン、及び20 mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中の37℃での終夜インキュベーション、次いで1 x SSC中37-50℃でのフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識する。

【0034】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」と融合したSTOP-1ポリペプチド又は抗STOP-1抗体を含んでなるキメラポリペプチドを意味する。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するのに十分な残基を有し、その長さは融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8-50のアミノ酸残基（好ましくは、約10-20の残基）を有する。エピトープタグを付加した本発明のポリペプチド及び抗体を包含する。

STOP-1に関して「生物学的活性」及び「生物学活性」及び「生物学的特徴」とは、特記しない限り、（1）インビボ又はエキスピボで少なくとも一の哺乳動物細胞型（例えば、3T3）の細胞増殖を増加する能力をもつ；（2）STOP-1に特異的に結合する能力を持つ；及び／又は（3）STOP-1シグナル伝達又はSTOP-1活性を調節する他の能力を持つことを意味する。

【0035】

修飾したSTOP-1ポリペプチド又はSTOP-1ポリペプチドに関して「生物学的活性」及び「生物学活性」及び「生物学的特徴」とは、特記しない限り、（1）天然のSTOP-1の生物学的活性を（拮抗的又は遮断的手段の何れかで）部分的に又は完全に遮断、阻害又は無活性化する能力をもつ；（2）STOP-1に特異的に結合する能力を持つ；及び／又は（3）STOP-1シグナル伝達又はSTOP-1活性を調節する他の能力を持つことを意味する。

本発明の抗STOP-1抗体に関して「生物学的活性」及び「生物学活性」及び「生物学的特徴」とは、特記しない限り、（1）天然のSTOP-1の生物学的活性を（拮抗的又は遮断的手段の何れかで）部分的に又は完全に遮断、阻害又は無活性化する能力をもつ；（2）STOP-1に特異的に結合する能力を持つ；及び／又は（3）STOP-1シグナル伝達又はSTOP-1活性を調節する他の能力を持つことを意味する。一実施態様では、本発明の抗体は、少なくとも1 uM以下、100 nm以下、50 nm以下、10 nm以下、5 nm以下、1 nm以下の親和性を持ってSTOP-1に結合する。ここで使われるように、「抗体可変ドメイン」は相補性決定領域（CDR；すなわち、CDR1、CDR2およびCDR3）ならびにフレームワーク領域（FR）のアミノ酸配列を含む、抗体分子の軽鎖および重鎖の部分を目指す。V_Hは重鎖の可変ドメインを指す。V_Lは軽鎖の可変ドメインを指す。本発明で使用されている方法によると、CDRとFRに割り当てられるアミノ酸位置はカバットに従って規定される（Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987年および1991年）。抗体または抗原結合断片のアミノ酸のナンバリングも、カバットのそれに準じる。

【0036】

本明細書で使われるように、「コドンセット」は所望の変異体アミノ酸をコードするのに用いられる、一組の異なるヌクレオチドトリプレット配列を指す。一組のオリゴヌクレオチドは、コドンセットによって提供されるヌクレオチドトリプレットの可能な組合せのすべてを表す配列であって所望のアミノ酸群をコードする配列を含み、例えば固相法によって合成することができる。標準的なコドン指定形式はIUBコードのそれであり、この

コードは当技術分野で公知であり本明細書に記載されている。このように、本明細書で使われるように、「非ランダムコドンセット」は、本明細書に記載されているアミノ酸選択のための基準を部分的に、好ましくは完全に満たす選択されたアミノ酸をコードするコドンセットを指す。ある位置の選択されたヌクレオチド「縮退」を有するオリゴヌクレオチドの合成は当技術分野で公知であり、例えば、TRIM手法が知られている（Knapp et al., J. Mol. Biol. (1999), 296: 57~86頁）；Garrard および Henner, Gene (1993), 128: 103頁）。そのようなある種のコドンセットを有しているヌクレオチドのセットは、市販の核酸シンセサイザー（Applied Biosystems, Foster City, CA などから入手可能）を使って合成することができ、または市販品を入手することができる（例えば、Life Technologies, Rockville, MD から）。したがって、特定のコードンセットを有する合成オリゴヌクレオチドセットは、一般的に異なる配列の複数のオリゴヌクレオチドを含み、この相違は配列全体の中のコドンセットによるものである。本発明で使用されるように、オリゴヌクレオチドは可変ドメイン核酸テンプレートへのハイブリダイゼーションを可能にする配列を有し、また、そうするとは限らないが、例えばクローニングに役立つ制限酵素部位を含むこともできる。

【0037】

「異種DNA」は宿主細胞に導入される任意のDNAである。DNAは、ゲノムDNA、cDNA、合成DNA およびこれらの融合または組合せを含む様々なソースに由来してもよい。DNAは、宿主または受容細胞と同じ細胞または細胞型からのDNA、あるいは異なる細胞型、例えば哺乳類または植物からのDNAを含むことができる。DNAは任意選択にマーカーまたは選択遺伝子、例えば抗生物質耐性遺伝子、耐熱性遺伝子、その他を含むことができる。本発明のUNQポリペプチド及び抗体を含む異種DNAをコードする宿主細胞はそれらの使用と共に考慮される。

本明細書で使われるように、「非常に多様な位置」は、公知のかつ／または天然抗体または抗原結合断片のアミノ酸配列を比較した場合に、その位置で提示されるいくつかの異なるアミノ酸を持つ軽鎖および重鎖可変領域上のアミノ酸位置を指す。非常に多様な位置は一般的にCDR領域にある。一態様では、公知のかつ／または天然抗体の非常に多様な位置を決定する際には、Kabats Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987年および1991年) が提供しているデータが有効である。インターネット上のデータベース (<http://immuno.bme.nwu.edu>) は収集された多数のヒト軽鎖および重鎖の配列とその配置を提供し、これらの配列の非常に多様な位置の決定に役立つ。本発明によると、アミノ酸がある位置で好ましくは約2から約11、好ましくは約4から約9、好ましくは約5から約7個の可能な異なるアミノ酸残基変異を有する場合は、その位置は非常に多様と言える。いくつかの実施形態では、あるアミノ酸位置は、好ましくは少なくとも約2、好ましくは少なくとも約4、好ましくは少なくとも約6、好ましくは少なくとも約8つの可能な異なるアミノ酸残基変異を有するならば非常に多様である。

【0038】

本明細書で使われるように、「ライブラリー」は複数の抗体もしくは抗体断片配列（例えば本発明のポリペプチド）またはこれらの配列をコードする核酸を指し、これらの配列は、本発明の方法によってこれらの配列に導入される変異体アミノ酸の組合せにおいて異なる。

「ファージディスプレイ」は、変異体ポリペプチドをファージ、例えば繊維状ファージの粒子表面でコートタンパク質と融合したタンパク質として提示する手法である。ファージディスプレイの有用さは、ランダム化タンパク質変異体の大きなライブラリーから対象抗原と高親和性で結合する配列を迅速に、効率的に選別できることにある。ファージ上のペプチドおよびタンパク質ライブラリーの提示は、何百万ものポリペプチドを特異的結合特性に関してスクリーニングするために利用されてきた。多価ファージディスプレイ方法

は、繊維状ファージの遺伝子 I I I または遺伝子 V I I I との融合を通して小さなランダムペプチドおよび小タンパク質を提示するために利用されてきた。W e l l s および L o w m a n、C u r r . O p i n . S t r u c t . B i o l .、3：355～362頁（1992）とその中の引用文献。一価のファージディスプレイでは、タンパク質またはペプチドのライブラリーが遺伝子 I I I またはその一部に融合され、ファージ粒子が融合タンパク質の1個または0個のコピーを提示するように野生型遺伝子 I I I タンパク質の存在下で低レベルで発現される。アビディティー効果は多価のファージと比較して低下しているので、選別は内在性のリガンド親和性に基づいておりファージミドベクターが使われるが、このベクターはDNA操作を単純化する。L o w m a n および W e l l s、M e t h o d s : A C o m p a n i o n t o M e t h o d s i n E n z y m o l o g y、3：205～216頁（1991）。

10

【0039】

「ファージミド」は、細菌の複製起点、例えば C o l E 1 およびバクテリオファージの遺伝子間領域のコピーを有するプラスミドベクターである。ファージミドはいかなる公知のバクテリオファージ、例えば繊維状バクテリオファージおよびラムドイドバクテリオファージでも使用できる。プラスミドは、通常、抗生物質耐性の選択マーカーも含む。これらのベクターにクローニングされたDNAセグメントは、プラスミドとして増殖することができる。これらのベクターを備える細胞がファージ粒子の生産のために必要なすべての遺伝子を備えているとき、プラスミドの複製様式はローリングサークル複製に変化し、プラスミドDNAの1つの鎖のコピーとパッケージファージ粒子を生成する。ファージミドは感染性または非感染性ファージ粒子を形成することができる。この用語は、異種ポリペプチドがファージ粒子の表面で提示されるように遺伝子融合としてこの異種ポリペプチドの遺伝子と結合したファージコートタンパク質遺伝子、またはその断片を含むファージミドを含む。

20

用語「ファージベクター」は、異種遺伝子を含んでいて複製ができるバクテリオファージの二本鎖複製型を意味する。ファージベクターは、ファージ複製およびファージ粒子形成を可能にするファージ複製起点を有する。ファージは好ましくは繊維状バクテリオファージ、例えば M 1 3、f 1、f d、P f 3 ファージもしくはその誘導体、またはラムドイドファージ、例えばラムダ、2 1、p h i 8 0、p h i 8 1、8 2、4 2 4、4 3 4、その他もしくはその誘導体である。

30

【0040】

本明細書で使われる「対象アミノ酸」は、公知のかつ／または天然抗体または抗原結合断片の特定の位置で見られる最も普通のアミノ酸であるアミノ酸の群に属しているアミノ酸を指す。いくつかの実施形態では、「最も普通に見られるアミノ酸」は、公知のかつ／または天然の抗体または抗原結合断片の好ましくは少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約90%、好ましくはすべての配列において特定の位置で見られるアミノ酸である。いくつかの実施形態では、「最も普通に見られるアミノ酸」は、公知のかつ／または天然の抗体または抗原結合断片の好ましくは約50%から約100%、好ましくは約60%から約90%、好ましくは約70%から約85%、好ましくは約80%から約85%の配列において特定の位置で見られるアミノ酸である。公知の抗体または抗原結合断片とは、その配列が当技術分野で入手可能なもの、例えば一般に開放されているデータベース、例えば K a b a t (S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t、N a t i o n a l I n s t i t u t e o f H e a l t h、B e t h e s d a、M d .、1987年および1991年)のデータベースおよび／またはインターネットサイト <http://immunobme.nwu.edu> で得られるものである。前記アミノ酸位置は、好ましくはCDR領域内の位置である。アミノ酸の対象群は、特定の位置の対象アミノ酸の群を指す。好ましくは、対象アミノ酸はシステイン残基でない。軽鎖CDR1、CDR2、CDR3および重鎖CDR1とCDR2の位置に関しては、一般的に対象アミノ酸群は、ソース配列の非常に多様で溶媒に露出した特定位置に好まし

40

50

くは約2個から約11個、好ましくは約4個から約9個、好ましくは約5個から約7個、好ましくは約6個のアミノ酸を含むことができる。

【0041】

「プロテオグリカン」なる用語は、グリコサミノグリカンの少なくとも一の側鎖が分子のタンパク質コアに共有結合する分子を意味する。本発明によるプロテオグリカン合成欠乏細胞系統はガラクトシル基転移酵素Iが欠損している細胞系統を含む。好ましい一実施態様によると、細胞系統はCHO-pshg細胞系である。

「アンタゴニスト」なる用語は、天然のSTOP-1ポリペプチドの生物学的活性を部分的又は完全に遮断、阻害、又は無活性化するものであり、天然のSTOP-1ポリペプチドに特異的に結合する任意の分子であり、ここでアンタゴニストの結合は、(1)オリゴマー型の天然のSTOP-1ポリペプチドへのもの、(2)天然のヒトSTOP-1の残基94-243へのもの、及び／又は(3)本発明のモノクローナル抗体(例えば、本発明の委託された抗体など)により阻害されうる(例えば、STOP-1及び6B12を用いた競合的ELISAアッセイによって観察されるような)ものである。一実施態様によると、アンタゴニストはポリペプチドである。他の実施態様によると、6B12抗体はSTOP-1に対するアンタゴニストの結合を阻害することができる。他の実施態様によると、アンタゴニストはヒトSTOP-1の残基33-52又は33-53又は非ヒトSTOP-1等価物のそれら残基内の残基に結合する。

【0042】

「小分子アンタゴニスト」なる用語は、分子量1500ダルトン以下の任意の分子であり、本発明によるアンタゴニストである。一実施態様によると、小分子アンタゴニストは約500ダルトン未満である。

好ましい一実施態様によると、アンタゴニストは天然のSTOP-1を発現する細胞内で細胞増殖を遮断、阻害又は無活性化する。一実施態様では、アンタゴニスト又は小分子アンタゴニストはSTOP-1が結合する細胞の移動を阻止する。好ましい一実施態様では、アンタゴニスト又は小分子アンタゴニストはSTOP-1の三量体型に特異的に結合する。好適なアンタゴニストは本発明などの抗体、天然のSTOP-1ポリペプチドのアミノ酸配列変異型、ペプチドを含む。STOP-1ポリペプチドのアンタゴニストの同定方法は、STOP-1ポリペプチドを候補アンタゴニスト分子に作用させ、STOP-1ポリペプチドに関連する一以上の生物学的活性の検出可能な変化を測定することを含む。

【0043】

「増強物質」なる用語は、天然のSTOP-1ポリペプチドの生物学的活性を亢進する、及び天然のSTOP-1ポリペプチドに特異的に結合する任意の分子であり、ここでの増強物質は、天然のSTOP-1ポリペプチドのオリゴマー型に結合して、(1)天然のヒトSTOP-1の残基94-243内の残基に結合する能力、(2)細胞上にSTOP-1を凝集する能力；及び(3)本発明のモノクローナル抗体S7又はS4抗体により競合を受けうる(STOP-1、S7又はS4及び増強物質を用いた競合的ELISAアッセイで観察されるような)能力、からなる群から選択した少なくとも一以上の付加的活性を有するものを意味する。一実施態様によると、増強物質は細胞(例えば、HUVEC細胞、HeLa細胞、及びHT1080細胞)へのSTOP-1の結合を増強する。好ましい一実施態様では、アゴニストはSTOP-1の三量体型に結合する。STOP-1ポリペプチドのアゴニストの同定方法は、STOP-1ポリペプチド及び候補アゴニストとSTOP-1に結合する細胞とを作用させ、STOP-1ポリペプチドに関連する一以上の生物学的活性(例えば、増強したSTOP-1ポリペプチドの結合、細胞増殖又は細胞移動)の検出可能な変化を測定することを含む。

【0044】

「治療する」又は「治療」又は「緩和」とは、治療上の処置及び予防的療法又は防護的療法の双方を称し、その目的は、標的である病的症状又は疾患を防ぐか又は衰え(小さく)させることである。治療を必要とするものには、疾患に罹りやすいものと同時に疾患に既に罹っているもの、又は疾患が予防されるべきものを含む。疾患に関連する症状、合併

10

20

30

40

50

症又は他の問題が寛解、縮小、減少するとき、又は疾患が関連する症状、合併症又は他の問題の発症の機会や頻度が寛解、縮小、減少するとき、ここで言う治療的使用及び予防的使用が成功していることを、これらの用語は表す。

本発明の方法に従ってアンタゴニストの治療量を投与された後に、患者が次の一又は複数のものについて観察可能な及び／又は測定可能な減少又は消失を示したならば、被検体又は哺乳動物は、S T O P－1 ポリペプチド発現癌に関して成功裏に「治療された」ことになる：癌細胞の数の減少、又は癌細胞の消失；腫瘍の大きさの減少；軟部組織及び骨への癌の広がりを含む、末梢器官への癌細胞の浸潤の障害（すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止）；腫瘍転移の障害（すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止）；腫瘍成長のある程度の障害；及び／又は特定の癌に関連している一又は複数の症状のある程度の緩和；疾病率及び死亡率の減少、及び生命問題の質の改善。ある程度、抗S T O P－1 抗体又はS T O P－1 結合オリゴペプチドは、生存癌細胞の成長を防ぐ及び／又は死滅させることができ、それは、細胞増殖抑制及び／又は細胞障害性であり得る。これらの兆候又は症状の低減は、また、患者が感じることができる。

【0045】

本発明の方法に従ってアンタゴニスト又はアゴニストの治療量を投与された後に、患者が観察可能な及び／又は測定可能な[後で挿入]；及び／又は異常な血管形成に関連している一以上の症状のある程度の緩和；及び生命問題の質の改善を示したならば、被検体又は哺乳動物は、異常な血管形成に関して成功裏に「治療された」ことになる

疾患における成功裏の治療及び改善を評価することに関する上記のパラメーターは、医師にとってよく知られている手法によって容易に測定が可能である。癌治療では、有効性は、例えば、病気の進行までの時間（T T P）の算定及び／又は反応速度（R R）を確かめることによって測定できる。転移は、ステージング試験によって、骨のスキャン及び骨への広がりを確かめるためのカルシウムレベル及び他の酵素に関する試験によって確かめることができる。C Tスキャンは、また、領域の骨盤及びリンパ節への広がりを探索することで行うことができる。胸のX線、及び既知の方法による肝臓の酵素レベルの測定を、それぞれ肺及び肝臓への転移を探索するために用いる。疾患をモニタリングする他の方法には、経直腸の超音波断層法（T R U S）及び経直腸の針生検（T R N B）が含まれる。

【0046】

より局所的な癌である膀胱癌に関しては、疾患の進行を確かめる方法には、膀胱鏡検査による尿細胞評価、尿中に存在する血液のモニタリング、超音波断層撮影又は静脈性腎盂像、コンピュータ断層撮影法（C T）及び磁気共鳴映像法（M R I）による尿路上皮性路の視覚化が含まれる。遠隔転移の存在は、腹部のC T、胸x線、又は骨格の放射性核種イメージングによって評価することができる。

「慢性」投与とは、初期の治療効果（活性）を長期間にわたって維持するようにするために、急性態様とは異なり連続的な態様での薬剤の投与を意味する。「間欠」投与とは、中断無く連続的になされるのではなく、むしろ本質的に周期的になされる処理である。

癌の治療、症状の緩和又は診断のための「哺乳動物」とは、哺乳動物に分類される任意の動物を意味し（別名「患者」）、ヒト、家畜用及び農場用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどを含む。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

一又は複数の更なる治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時（同時期）及び任意の順序での連続した投与を含む。

【0047】

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる服用量及び濃度でそれらに曝露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性p H緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；疎水性ポリマー、例えばポリビ

ニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン；グルコース、マンノース又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び／又は非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICS（登録商標）を含む。

【0048】

「固相」又は「固体支持体」とは、本発明の抗体、アンタゴニスト又はポリペプチドが接着できる非水性マトリクスを意味する。ここに包含される固相の例は、部分的又は全体的にガラス（例えば、径の調整されたガラス）、ポリサッカリド（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンで形成されたものを含む。或る実施態様では、前後関係に応じて、固相はアッセイ用プレートのウェル；その他では精製用カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィーカラム）を含むことができる。また、この用語は、米国特許第4275149号に記載されたような別々の粒子の不連続な固相も含む。

ここで用いられているように、「イムノアドヘシン」という用語は、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能を持つ異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性を付与した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは抗体の抗原認識及び結合部位以外の所望の結合特異性を持つアミノ酸配列（即ち「異種」）と免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物である。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位—天然のSTOP-1タンパク質の一部などを含む近接アミノ酸配列を含む。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3、又はIgG-4サブタイプ、IgA（IgA-1及びIgA-2を含む）、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

【0049】

「リポソーム」は、哺乳動物への薬物（例えばSTOP-1ポリペプチド、それらに対する抗体又はSTOP-1結合オリゴペプチド）輸送に有用な、脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は細胞膜の脂質配向に類似した2層構造に配列される。

ここで定義されている「小」分子又は「小」有機分子とは、約500ダルトン未満の分子量である。

ここに開示するポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の「有効量」とは、特に述べた目的を実施するために十分な量のことである。「有効量」は、述べられた目的に関連して、公知の方法で経験的に決定することができる。

【0050】

「治療的有效量」という用語は、哺乳動物（別名患者）の疾患又は疾病を「治療」するのに効果的な本発明の抗体、ポリペプチド、又はアンタゴニストの量を指す。癌の場合、治療的に有効量の薬は癌細胞の数を減じ；腫瘍の大きさを減じ；末梢器官への癌細胞の浸潤を阻害（すなわち、ある程度まで減速、好ましくは停止）し；腫瘍転移を阻害（すなわち、ある程度まで減速及び好ましくは停止）し；腫瘍成長をある程度まで阻害し；及び／又は癌に関連する一又は複数の症状をある程度まで緩和する。「治療する」のここでの定義を参照せよ。薬が存在する癌細胞の成長を妨げ及び／又は死滅させる程度まで、それは、細胞分裂停止及び／又は細胞障害性であり得る。

本発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の「成長阻害量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の成長をインビトロ又はインビボで阻害できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のための本発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の「成長阻害量」は、公知の方法により又はここで提供する実施例により経験的に決定することができる。

【0051】

本発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の「細胞障害性量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞をインビトロ又はインビボで破壊できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のための本発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の「細胞障害性量」は、当分野で公知の方法で経験的に決定することができる。

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、例えば、単一の抗 S T O P - 1 モノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む)、多エピトープ(polyepitopic)特異性を持つ抗 S T O P - 1 抗体組成物、ポリクローナル抗体、一本鎖抗 S T O P - 1 抗体、及び天然の S T O P - 1 ポリペプチドに特異的に結合し、及び／又はこの発明の生物学的又は免疫学的活性を示す限りは抗 S T O P - 1 抗体の断片(下記を参照)を包含する。一実施態様によると、抗体は S T O P - 1 のオリゴマー型、例えば三量体10に結合する。更なる実施態様によると、抗体はヒト S T O P - 1 の残基 9 4 - 2 4 3 の間に特異的に結合する。他の実施態様によると、抗体は S T O P - 1 に特異的に結合し、その結合は本発明のモノクローナル抗体(例えば、本発明の委託された抗体など)により阻害されうるものである。抗体の「機能的断片又は類似体」なる句は、質的に抗体の意味するのと同じような生物学的活性を有する化合物である。例えば、抗 S T O P - 1 抗体の機能的断片又は類似体は S T O P - 1 分子に特異的に結合可能なものであり得る。一実施態様では、抗体は細胞増殖を引き起こす S T O P - 1 分子の能力を阻害又は実質的に減低させることができる。「免疫グロブリン」(I g)という用語は、ここでの「抗体」と相互に置き換え可能に用いられる。一実施態様によると、本発明の抗体はアミノ酸配列 G W N S V S R I I I E E L P K (配列番号: 1 1 7)を有するペプチドには結合しない。20

【0052】

「単離された抗体」とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様では、抗体は、(1)ローリー(Lowry)法によって定量して95重量%以上の、最も好ましくは99重量%以上の抗体まで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分な程度まで、あるいは(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件下での S D S - P A G E による均一性まで精製される。単離された抗体には、組換え体細胞内のインサイツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。30

【0053】

基本的な4-鎖抗体ユニットは2つの同一の軽(L)鎖と2つの同一の重(H)鎖から構成されるヘテロ四量体の糖タンパクである(I g M抗体は、基本的なヘテロ四量体ユニットとそれに付随するJ鎖と称される付加的なポリペプチドの5つからなり、よって10の抗原結合部位を有するが、分泌されたI g A抗体は重合して、基本的4-鎖ユニットとそれ付随するJ鎖のうち2-5つを含む多価集合を形成可能である)。I g Gの場合、4-鎖ユニットは一般的に約150000ダルトンである。それぞれのL鎖は1つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に結合するが、2つのH鎖はH鎖のアイソタイプに応じて一又は複数のジスルフィド結合により互いに結合している。それぞれのH及びL鎖はまた規則的な間隔を持った鎖内ジスルフィド結合を持つ。それぞれのH鎖は、 α 及び γ 鎖の各々に対しては3つの定常ドメイン(C_H)が、 μ 及び ϵ アイソタイプに対しては4つの C_H ドメインが続く可変ドメイン(V_H)をN末端に有する。それぞれのL鎖は、その他端に定常ドメイン(C_L)が続く可変ドメイン(V_L)をN末端に有する。 V_L は V_H と整列し、 C_L は重鎖の第一定常ドメイン(C_{H1})と整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。 V_L と V_H は共同して対になって、単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造及び特性は、例えばBasic and Clinical Immunology, 8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow(編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁及び6章を参照のこと。50

【0054】

任意の脊椎動物種からのL鎖には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、 kappa及びラムダと呼ばれる2つの明確に区別される型の一つを割り当てることができる。また、その重鎖の定常ドメイン(C_H)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンには異なったクラス又はアイソタイプを割り当てることができる。IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMという免疫グロブリンの5つの主要なクラスがあり、それぞれα、δ、ε、γ及びμと呼ばれる重鎖を有する。さらにγ及びαのクラスは、C_H配列及び機能等の比較的小さな差異に基づいてサブクラスに分割され、例えば、ヒトにおいては次のサブクラス：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2が発現する。

「可変」という用語は、可変ドメインのある部分が抗体の間で配列が広範囲に異なることを意味する。Vドメインは抗原結合性を媒介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定める。しかし、可変性は可変ドメインの110-アミノ酸スパンを通して均等には分布されていない。代わりに、V領域は、それぞれ9-12アミノ酸長である「高頻度可変領域」と称される極度の可変性を有するより短い領域によって分離された15-30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的不变の伸展からなる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメイン各々は、大きなβ-シート配置をとり、3つの高頻度可変領域により接続された4つのFR領域を含み、それはループ状の接続を形成し、β-シート構造の一部を形成することもある。各鎖の高頻度可変領域はFRにより他の鎖からの高頻度可変領域とともに極近傍に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ED. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは抗体の抗原への結合に直接は関係ないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害(ADCC)における抗体の寄与を示す。

【0055】

ここで使用される場合、「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合性の原因となる抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基(すなわち、V_Lにおいては、およそ残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)、及びV_Hにおいては、およそ1-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3)(一実施態様では、H1は31-35付近である))；Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))及び／又は「高度可変ループ」からの残基(例えば、V_Lにおいては、およそ残基26-32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)、及びV_Hにおいては、およそ26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3)；Chothia及びLesk J.Mol.Biol. 196:901-917 (1987))を含んでなる。

【0056】

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されずに合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、抗体を何か特定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、最初にKohler等, Nature 256, 495 (1975)により記載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えDNA法によって、細菌、真核細胞動物又は植物細胞から作ることができる(例えば、米国特許第4816567号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えばClackson等, Nature 352:624-628(1991)、Marks等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)、及び以下の実施例に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

【0057】

ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の種由来の抗体、あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同性があり、鎖の残りの部分が他の種由来の抗体、あるいは他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同である「キメラ」抗体、並びにそれが本発明の生物学的活性を有する限りこのような抗体の断片を特に含む(米国特許第4816567号;及びMorrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。ここで対象のキメラ抗体には、非ヒト霊長類(例えば旧世界ザル、類人猿等)から由来する可変ドメイン抗原-結合配列及びヒト定常領域配列を含む「プリマタイズ(primatized)」抗体を含む。

10

「無傷」の抗体は、抗原-結合部位、並びに C_L 及び少なくとも重鎖定常ドメイン、 C_{H1} 、 C_{H2} 及び C_{H3} を含むものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそれらのアミノ酸配列変異体であってよい。好ましくは、無傷の抗体は一又は複数のエフェクター機能を有する。

【0058】

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、 $(Fab')_2$ 、及びFv断片;ダイアボディ(diabodies);直鎖状抗体(米国特許第5641870号、実施例2;Zapata等, Protein Eng. 8(10):1057-1062 [1995]);単鎖抗体分子;及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

20

一般的に「線状抗体」との表現は、Zapata等., Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995)に記載の抗体を意味する。簡単に言えば、抗体は、相補的な軽鎖ポリペプチドと共に直列のFdセグメント($VH-CH1-VH-CH1$)を一对含み、一对の抗原結合領域を形成している。線状抗体は二重特異性又は単一特異性でありうる。

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片と、容易に結晶化する能力を反映して命名された残留「Fc」断片を産生する。Fab断片は全長L鎖とH鎖の可変領域ドメイン(V_H)、及び一つの重鎖の第一定常ドメイン(C_{H1})からなる。各Fab断片は抗原結合性に関して一価である、すなわち単一の抗原-結合部位を有する。抗体のペプシン処理により、単一の大きな $(Fab')_2$ 断片が生じ、これは2価の抗原結合部位を持つ2つのジスルフィド結合されたFab断片にほぼ対応し、抗原を交差結合させることができるものである。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む C_{H1} ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりFab断片と相違する。Fab'-SHは、ここでは定常ドメインのシステイン残基(類)が遊離のチオール基を持つFab'を表す。 $(Fab')_2$ 抗体断片は、通常はFab'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

30

【0059】

Fc断片はジスルフィドにより一緒に保持されている双方のH鎖のカルボキシ末端部位を含む。抗体のエフェクター機能は、Fc領域の配列により決定され、その領域は、所定の型の細胞に見出されるFcレセプター(FcR)によって認識される部位である。

40

「Fv」は、完全な抗原-認識及び結合部位を含む最小の抗体断片である。この断片は、密接に非共有結合した1本の重鎖と1本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。これら2つのドメインの折り畳みから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性を付与する6つの高頻度可変ループ(H及びL鎖から、それぞれ3つのループ)が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン(又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含んでなるFvの半分)でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

【0060】

「sFv」又は「scFv」とも略称される「単鎖Fv」は、単一のポリペプチド鎖内に結合した V_H 及び V_L 抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、sFvポリペ

50

プチドは V_H 及び V_L ドメイン間にポリペプチドリンカーをさらに含み、それはs F Vが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。s F vの概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, 以下を参照のこと。

「ダイアボディ(diabodies)」という用語は、鎖間ではなく鎖内でVドメインを対形成させ、結果として二価の断片、すなわち2つの抗原-結合部位を有する断片が得られるように、 V_H と V_L ドメインとの間に、短いリンカー(約5-10残基)を持つs F v断片(前の段落を参照)を構築することにより調製される小型の抗体断片を意味する。二重特異性ダイアボディは2つの「交差」s F v断片のヘテロダイマーであり、そこでは2つの抗体の V_H 及び V_L ドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404097号; 国際公開93/11161号; 及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により十分に記載されている。

【0061】

非ヒト(例えば齧歯類)抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト抗体から得られた最小配列を含むキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類のような所望の抗体特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのFRがヒト免疫グロブリン配列である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、状況に応じて免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。さらなる詳細は、Jones等, Nature 321, 522-525(1986); Riechmann等, Nature 332, 323-329(1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596(1992)を参照のこと。

【0062】

「種依存性抗体」、例えば哺乳動物抗-ヒトIgE抗体は、二番目の哺乳動物種からの抗原の相同体に対して有している結合親和性よりも、一番目の哺乳動物種からの抗原に対してより強力な結合親和性を有する抗体である。通常、種依存性抗体は、ヒト抗原(すなわち、約 1×10^{-7} M以下、好ましくは約 1×10^{-8} M以下、最も好ましくは約 1×10^{-9} M以下の結合親和性(Kd)値を有する)と「特異的に結合」するが、そのヒト抗原に対する結合親和性よりも、少なくとも約50倍、又は少なくとも約500倍、又は少なくとも約1000倍弱い、二番目の非ヒト哺乳動物種からの抗原の相同体に対する結合親和性を有する。種依存性抗体は、上に定義した種々の型の抗体のいずれでもあることが可能だが、好ましくはヒト化又はヒト抗体である。

【0063】

「STOP-1結合オリゴペプチド」はここで記載される様なSTOP-1ポリペプチドに好ましくは特異的に結合するオリゴペプチドである。STOP-1結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成方法論を用いて化学的に合成することができ、あるいは組み換え技術を用いて調製及び精製することができる。STOP-1結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約5のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90

、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様なSTOP-1ポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。一実施態様によると、STOP-1オリゴペプチドは、6B12抗体が結合する領域と同じ又は重なり合う領域に結合する。STOP-1結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えば、米国特許第5556762号、同第5750373号、同第4708871号、同第4833092号、同第5223409号、同第5403484号、同第5571689号、同第5663143号；PCT公開第WO84/03506号、及びWO84/03564号；Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984)；Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985)；Geysen等, in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)；Geysen等, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)；Schoofs等, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S.E.等(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378；Lowman, H.B.等 (1991) Biochemistry, 30:10832；Clackson, T.等 (1991) Nature, 352:624；Marks, J.D.等 (1991) J. Mol. Biol., 222:581；Kang, A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363、及びSmith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668参照）。

【0064】

対象の抗原、例えば腫瘍関連ポリペプチド抗原標的、例えばSTOP-1と「結合する」本発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物は、その抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子がその抗原を発現している細胞又は組織を標的とする診断及び／又は治療剤として有用であり、他のタンパク質と有意には交差反応しないように十分な親和性でその抗原と結合するものである。そのような実施態様では、ポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の「非標的」タンパク質との結合の程度は、蛍光標示細胞分取器（FACS）分析又は放射免疫沈降（RIA）によって定量して、その特定の標的タンパク質とのポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の結合の約10%よりも低い。標的分子へのポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の結合に関して、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープと「特異的に結合」又は「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、非特異的な相互作用とは測定して異なる結合を意味する。特異的な結合は、例えば、一般に結合活性を持たない類似した構造の分子であるコントロール分子の結合性と比較して、分子の結合性を定量することによって測定することができる。例えば、特異的な結合性は、標的、例えば過剰の非標識標的に類似したコントロール分子とも競合にとって定量することができる。この場合、プローブに対する標識標的の結合が過剰の非標識標的によって競合的に阻害されるならば、特異的結合が表示される。ここで使用される特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープと「特異的に結合」又は「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、例えば標的に対して少なくとも約 10^{-4} M、あるいは少なくとも約 10^{-5} M、あるいは少なくとも約 10^{-6} M、あるいは少なくとも約 10^{-7} M、あるいは少なくとも約 10^{-8} M、あるいは少なくとも約 10^{-9} M、あるいは少なくとも約 10^{-10} M、あるいは少なくとも約 10^{-11} M、あるいは少なくとも約 10^{-12} M、あるいはそれ以上のKdを持つ分子によって示されうる。一実施態様では、「特異的に結合する」という用語は、如何なる他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープ（例えば、非STOP-1タンパク質）へ実質的に結合することなく分子が特定のポリペプチド又は特定のポリペプチドのエピトープに結合する結合を意味する。また、ヒト天然のSTOP-1ポリペプチドに特異的に結合する抗体は非ヒト天然のSTOP-1ポリペプチドにも結合しうるということが理解される。

【0065】

STOP-1ポリペプチドを発現する腫瘍細胞の「成長を阻害する」ポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物、又は「成長阻害」ポリペプチド、抗体、アンタゴニスト

又は組成物は、適切なSTOP-1ポリペプチドを発現又は過剰発現する癌細胞の測定可能な程の成長阻害を引き起こすものである。好ましい成長阻害ポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物は、一般的には、試験されたポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物で処理されていない腫瘍細胞であるコントロールである、適切なコントロールと比較して、20%より多く、好ましくは約20%から約50%、そしてさらに好ましくは50%よりも多く（例えば、約50%から約100%）でSTOP-1発現腫瘍細胞の成長を阻害する。一実施態様では、成長阻害は、細胞培養で約0.1から30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 又は約0.5 nM から200 nM の抗体濃度で測定することができ、抗体への腫瘍細胞の曝露の後、成長阻害を1-10日で確かめる。インビボでの腫瘍細胞の成長阻害は、下記の実験実施例に記載しているような種々の方法で確かめることができる。約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ から約100 mg/kg 体重の抗STOP-1抗体の投与が、最初の抗体の投与から約5日から3ヶ月内、好ましくは約5から30日以内に腫瘍の大きさ又は腫瘍細胞増殖に減少を引き起こす場合、抗体はインビボで成長阻害性である。

【0066】

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域（天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体Fc領域）に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変わる。抗体のエフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞障害；Fcレセプター結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)；貪食作用；細胞表面レセプター（例えば、B細胞レセプター）のダウンレギュレーション；及びB細胞活性化が含まれる。

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」又は「ADCC」とは、ある種の細胞障害細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球及びマクロファージ）上に存在するFcレセプター(FcRs)と結合した分泌Igにより、これらの細胞障害エフェクター細胞が抗原-担持標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞障害性の形態を意味する。抗体は細胞障害細胞を「備えて」おり、これはこのような死滅には絶対に必要なものである。ADCCを媒介する主要な細胞NK細胞はFc γ RIIIのみを発現するのに対し、単球はFc γ RI、Fc γ RII及びFc γ RIIIを発現する。造血細胞でのFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象の分子のADCC活性をアッセイするために、米国特許第5500362号又は同第5821337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー細胞(NK細胞)が含まれる。代わりとして、もしくは付加的に、対象の分子のADCC活性は、例えば、Clynes等, (USA) 95:652-656 (1998)において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。

【0067】

「Fcレセプター」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記載するものである。好適なFcRは天然配列ヒトFcRである。さらに好適なFcRは、IgG抗体（ガンマレセプター）と結合するもので、Fc γ RI、Fc γ RII及びFc γ RIIIサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。Fc γ RIIIレセプターには、Fc γ RIIIA（「活性型レセプター」）及びFc γ RIIIB（「阻害型レセプター」）が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプターFc γ RIIIAは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM)を含んでいる。阻害型レセプターFc γ RIIIBは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; ITIM)を含んでいる(Daeron, Annu. Rev. immunol. 15:203-234 (1997)を参照)。FcRsに関しては、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及びde Haas等, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)に概説されている。将来的に同定されるものも含む他のFcRsはここでの「FcR」という言葉

によって包含される。また、該用語には、母性 I g G s が胎児に受け継がれる要因となっている新生児性レセプター F c R n (Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976) Kim等, J. Immunol. 24:249 (1994)) も含まれる。

【0068】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又は複数の F c R s を発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。その細胞が少なくとも F c γ R I I I を発現し、A D C C エフェクター機能を実行することが望ましい。A D C C を媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞 (P B M C)、ナチュラルキラー (N K) 細胞、単球、細胞障害性 T 細胞及び好中球が含まれるが、P B M C と N K 細胞が好適である。エフェクター細胞は天然源、例えば血液から単離してもよい。

10

「補体依存性細胞障害」もしくは「C D C」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。典型的な補体経路の活性化は補体系 (C l q) の第 1 補体が、同族抗原と結合した (適切なサブクラスの) 抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、C D C アッセイを、例えば Gazzano-Santoro 等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996) に記載されているように実施することができる。

【0069】

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病又はリンパ様悪性腫瘍が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平細胞癌 (squamous cell cancer) (例えば扁平上皮細胞癌)、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、及び肺の扁平癌腫 (squamous carcinoma) を含む肺癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌を含む胃 (gastric) 又は腹部 (stomach) 癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸管癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿道癌、肝癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓 (kidney) 又は腎 (renal) 癌、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝臓癌、肛門癌、陰茎癌、黒色腫、多発性骨髄腫及び B 細胞リンパ腫、脳、並びに頭部及び頸部の癌、及び関連した転移が含まれる。

20

「細胞増殖性疾患」及び「増殖性疾患」という用語は、ある程度の異常な細胞増殖を伴う疾患を意味する。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。一実施態様では、細胞増殖性疾患は線維形成である。

ここで用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての腫瘍形成細胞成長及び増殖、及び全ての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。

30

【0070】

病気にかかった状態のとき、新しい血管が過度に、不十分に、又は不適當に成長する (例えば医学見地からみて望まれない血管形成の位置、タイミング又は発生) 又はそれが病状の原因となるとき、本発明の用語である異常な血管形成は起こる。病状、例として、癌、特に血管化固形腫瘍及び転移性腫瘍 (大腸癌、肺癌 (特に小細胞肺癌) 又は前立腺癌を含む)、眼性新血管形成による疾患、特に糖尿病性盲目、網膜症、一次性糖尿病性網膜症又は年齢誘発性黄斑変性及びルベオシス; 乾癬、血管腫などの血管芽細胞腫; 炎症性腎疾患、例えば糸球体腎炎、特に糸球体間質性増殖性の糸球体腎炎、溶血性尿毒症性症候群、糖尿病性ネフロパシ又は高血圧の腎硬化症; 多様な炎症性疾患、例えば関節炎、特に慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、psoriasis、類肉腫症、移植後に生じる動脈の動脈硬化及び疾患、子宮内膜症又は慢性喘息、及び 70 以上の他の症状を悪化させることに寄与する新しい血管の発達があるような病状で、「過剰であるか、不適當であるか、制御されていない血管形成」が起こる。血管が患部組織に入り込み、新しい血は正常な組織を破壊する、そして、癌の場合、新しい血管によって腫瘍細胞は循環に逃げ出し、他の器官に留まる (腫瘍転移)。例えば、冠状動脈疾患、脳卒中および遅延創傷治癒などの病気にかかった状態を悪化させることに寄与する不適當な血管の発達があるときに、不十分な血管形成は起こる。更に、潰瘍、脳卒中および心臓発作は、自然治癒のために通常必要な血管形成の欠如から生じうる。本発明は、上述の疾患を発達させるリスクにある患者を治療することを意図する。

40

50

【0071】

本発明のSTOP-1アンタゴニストを投与する候補となる他の患者は、血管結合組織の異常増殖、赤瘡、後天性免疫不全症候群、動脈閉塞、アトピー角膜炎、細菌潰瘍、Bechets疾患、腫瘍を運ばれる血液、頸動脈閉塞性疾患、脈絡叢新血管形成、慢性的な炎症、慢性網膜剥離、慢性ブドウ膜炎、慢性的なvitritis、コンタクトレンズ疲労、角膜移植片拒否、角膜新血管形成、角膜移植片新血管形成、クローン病、イールズ病、流行性角結膜炎、菌類の潰瘍、単純ヘルペス感染症、ヘルペス帯状疱疹感染、過粘稠度症候群、カポジ肉腫、白血病、脂質変性症、ライム病、辺縁性角質溶解、蚕食性角膜潰瘍、ハンセン病以外の放線菌感染症、近視、眼新生血管疾患、視覚窩、オスラーウェーバー症候群（オスラー-ウェーバー-ランデュ）、骨関節症、パジェット病、pars planitis、類天ぼうそう、phlyctenulosis、多発動脈炎、レーザー後合併症、原虫感染症、弾性線維性偽性黄色腫、乾性翼状片角膜炎、放射状角膜切開、網膜新血管形成、未熟児の網膜症、水晶体後繊維増殖、肉芽腫性病変、強膜炎、鎌状赤血球性貧血、シェーグレン症候群、固形腫瘍、スターガート(Stargarts)疾患、スティーブンジョンソン病、上部辺縁角膜炎、梅毒、全身狼瘡、テリアン辺縁性変性症、トキソプラズマ症、外傷、ユーイング肉腫の腫瘍、神経芽細胞腫の腫瘍、骨肉腫の腫瘍、網膜芽腫の腫瘍、横紋筋肉腫の腫瘍、潰瘍性大腸炎、静脈閉塞、ビタミンA欠乏症及びウェーゲナー肉芽腫、糖尿病と関連する望まれない血管形成、寄生虫病、異常な創傷治癒、肥大に続く手術、損傷又は外傷、髪の毛の発達の抑制、排卵及び黄体形成の抑制、移植の抑制、及び子宮内胚発生の抑制を有する、又は発症リスクにある。

【0072】

抗血管形成治療は、例えば非常に心膜炎および胸水と関連している移植片拒否、肺炎症、ネフローゼ症候群、子癇前症、心嚢貯留液、望ましくない脈管透過性に特徴がある疾患及び疾患、例えば脳腫瘍と関連している浮腫、悪性腫瘍、メイグス症候群、肺炎症、ネフローゼ症候群、心嚢貯留液および胸水と関連している腹水などの一般的な治療において有効である。

本発明の組成物によって治療されうる他の血管形成依存性疾患には、血管線維腫（出血傾向がある異常な血管）、新生血管の緑内障（目の血管の異常な成長）、動静脈形成異常（動脈および静脈間の異常な連通）、不均一骨折（治癒しない骨折）、アテローム動脈硬化性斑（動脈硬化）、化膿性肉芽腫（血管から成る一般的な皮膚病変）、硬皮症（結合組織疾患の型）、血管腫（血管から成る腫瘍）、トラコーマ（第三世界の盲目を引き起こす原因）、血友病関節、脈管粘着力および肥大した瘢痕（異常な瘢痕形成）を含む。

血管は骨代謝や骨成長の調節に重要な役割があるので、本発明の増強物質及びアゴニストは、炎症過程に媒介される炎症化又は組織破壊の過程を遮断する（コラゲナーゼ活性、破骨細胞活性など）ことによって疾患又は外傷からの骨及び／又は軟骨修復を刺激する又は亢進しうる。本発明のSTOP-1増強物質又はアゴニストで治療される骨損傷又は疾患には、歯周病、他の歯修復過程、骨粗鬆症及び骨折が含まれる。

【0073】

本発明による「間質性標的作用剤」は、他の組織に比べて間質性組織を基本的に認識して結合する作用剤である。間質性組織は、器官又は一部の特異的機能を担う組織と区別される器官、腺又は他の構造の結合組織フレームワークである。間質性標的作用剤には、FAP、fascin、HSP47、メソテリン及び前立腺幹抗原に特異的に結合する抗体を含む。

「細胞死を誘導する」本発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物は、生細胞を生育不能にするものである。細胞は、STOP-1ポリペプチドを発現するもの、好ましくは、同じ組織型の正常細胞と比較してSTOP-1ポリペプチドを過剰発現する細胞である。好ましくは、その細胞は癌細胞、例えば、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸、甲状腺、膵臓又は膀胱細胞である。インビトロ細胞死は、抗体依存性細胞媒介細胞障害(ADCC)又は補体依存性障害(CDC)によって誘導される細胞死を識別するために、補体及び免疫エフェクター細胞の無い状態で確かめてもよい。従って、細胞死に関するアッセイは、熱不活性化血清（すなわち、補体の無い）を用いて、免

疫エフェクター細胞が無い状態で行ってもよい。本発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物が細胞死を誘導するか否かを確かめるために、ヨウ化プロピジウム (PI)、トリパンプルー (Moore等 Cytotechnology 17: 1-11(1995)) 又は7AADの取り込みによって評価した膜整合性の損失を、未処理細胞と関連して評価することができる。好ましい細胞死を誘導するポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物は、BT474細胞でのPI取り込みアッセイで、PI取り込みを誘導するものである。

【0074】

「STOP-1発現細胞」は、細胞の表面上に又は分泌形態で内因性又は形質移入されたSTOP-1ポリペプチドを発現する。「STOP-1発現癌」は、細胞表面上に存在するSTOP-1ポリペプチドを有する、又はSTOP-1ポリペプチドを生成し分泌する細胞を含む癌である。他の実施態様では、場合によって「STOP-1発現癌」は、本発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物が結合することができ、癌に対して治療的有効量を有するように十分なレベルのSTOP-1ポリペプチドを産生及び分泌する。STOP-1ポリペプチドを「過剰発現」する癌は、同じ組織型の非癌性細胞と比較して、その細胞表面に顕著により高いレベルのSTOP-1ポリペプチドを有する、或いは産生及び分泌するものである。そのような過剰発現は、遺伝子増幅又は増大した転写又は翻訳によって生じ得る。STOP-1ポリペプチド過剰発現は、診断又は予後アッセイにおいて、細胞の表面上に存在する、あるいは細胞により分泌されるSTOP-1タンパク質の増大したレベルを評価することによって定量されうる (例えば、STOP-1ポリペプチドをコードする単離された核酸から、組み換えDNA技術を用いて調製することができる単離されたSTOP-1ポリペプチドに対して調製した抗STOP-1抗体を用いた免疫組織化学アッセイを介して; FACS分析など)。あるいは、又は付加的に、例えば、STOP-1コード化核酸又はその相補鎖と一致する核酸ベースプローブを使用する蛍光インサイツハイブリダイゼーション; (FISH; 1998年10月公開の国際公開98/45479を参照せよ)、サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、又はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術、例えばリアルタイム定量PCR(RT-PCR)を介して、細胞のSTOP-1ポリペプチドコード化核酸又はmRNAのレベルを測定してもよい。また、例えば、抗体ベースアッセイを用いて、血清のような生物学的体液中に流れている抗原を測定することによって、STOP-1ポリペプチド過剰発現を研究してもよい (同じく、例えば、1990年6月12日に発行の米国特許第4933294号; 1991年4月18日に公開の国際公開91/05264; 1995年3月28日に発行の米国特許第5401638号; Sias等, J. Immunol. Methods 132: 73-80(1990)を参照せよ)。上記のアッセイとは別に、種々のインビボアッセイは、熟練技術者に入手可能である。例えば、哺乳動物の体の中にある細胞を、例えば、放射活性アイソトープのような検出可能な標識で場合によって標識した抗体に曝してもよく、哺乳動物の細胞への抗体の結合は、例えば、放射活性の外部スキニングによって、又は以前に抗体へ曝した哺乳動物から取り出した生検を分析することによって評価することができる。

【0075】

「標識」という語は、ここで用いられる場合、「標識化」ポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物を作製するために、ポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物に直接的又は間接的に結合させる検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識はそれ自身によって検出可能でもよく (例えば、放射性同位体標識又は蛍光標識)、あるいは、酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的変換を触媒してもよい。

ここで用いられる「細胞障害性剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び/又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体 (例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 及び Lu の放射性同位体)、化学治療薬、例えばメトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカルカロイド類 (ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド)、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシン又は他の挿入剤、酵素及びその断片、例えば核溶解性酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び/

又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、そして下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むように意図されている。他の細胞障害性薬が下記に記載されている。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

【0076】

「化学療法剤」は、癌などの状態の治療に有用な化学的化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びシクロスホスファミド(CYTOXAN(登録商標))のようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(ur edopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosph aoramide)及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類 10 及びメチラメラミン類；アセトゲニン(acetogenins) (特にブラタシン(bullatacin)及びブラタシノン(bullatacinone))；カンプトセシン(合成類似体トポテカン (topotecan) を含む)；プリオスタチン；カリスタチン(callystatin)；C C-1 0 6 5 (そのアドゼレシ(adozelesin)、カルゼレシ(carzelesin)及びバイゼレシ(bizelesin) 合成類似体を含む)；クリプトフィシン(cryptophycin) (特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン(dolastatin)；デュオカルマイシン(duocarmycin) (合成類似体、KW-2189及びCBI-TM1を含む)；エレトロビン(eleutherobin)；パンクラチスタチン(pancratistatin)；サルコディクチン(sarcodictyin)；スポンジスタチン(spongistati n)；クロランブシル、クロルナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholop hosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオ キシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン(novembichin)、フェネステリン(ph enesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタード等のナイトロジェンマスタード；ニトロスレアス(nitrosureas)、例 20 えばカルムスチン(carmustine)、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fote mustine)、ロムスチン(lomustine)、ニムスチン、ラニムスチン；エネジイン(enediynes) 抗生物質等の抗生物質 (例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイ シンガンマ1 I 及びカリケアマイシンオメガ1 I、例えば、Agnew Chem Intl. Ed. Engl ., 33:183-186(1994)を参照のこと；ダイネミシンA(dynemicinA)を含むダイネミシン (dynemicin)；クロドロネート(clodronate)などのビスホスホネート(bisphosphonates) 30 ；エスペラマイシン(esperamicin)；同様にネオカルチノスタチン発光団及び関連色素 蛋白エネジイン(enediynes) 抗生物質発光団)、アクラシノマイシン(aclacinomysins)、 アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン(bleo mycins)、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン (carminomycin)、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシ ン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイ シン、A D R I A M Y C I N (登録商標) ドキソルビシン (モルフォリノードキソルビシ ン、シアノモルフォリノ-ドキソルビシン、2-ピロリノ-ドキソルビシン及びデオキシド キソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン(esorubicin)、イダルビシン、マ セロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシンCなどのマイトマイシン(mitomycins) 40 、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイ シン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマ イシン、クエラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、ストレプトニグリ ン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zino statin)、ゾルビシン(zorubicin)；メトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU) のような抗-代謝産物；デノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトトレキセート(trimetrexate)のような葉酸類似体；フルダラビン(f ludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンのようなプリン類似体 ；アンシタビン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフ ール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン(enocitabine 50

)、フロキシウリジン(floxuridine)のようなピリミジン類似体；カルステロン(calustero-
 ne)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラ-
 クトン(testolactone)のようなアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロ-
 スタンのような抗副腎剤；フロリン酸(frolinic acid)のような葉酸リプレニッシャー(re-
 plenisher)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニル-
 ウラシル(eniluracil)；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ビス-
 アントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；
 デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(elfornithine)
)；酢酸エリプチニウム(elliptinium acetate)；エポチロン(epothilone)；エトグルシド
 (etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；
 メイタンシン(maytansine)及びアンサマイトシン(ansamitocin)のようなメイタンシノイ-
 ド(maytansinoid)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopi-
 damol)；ニトラクリン(nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラル-
 ビシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン
 ；P S K (登録商標)多糖類複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン(raz-
 oxane)；リゾキシシン(rhizoxin)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；
 テニウアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziquone)；2,2',2''-トリクロ-
 ロトリエチルアミン；トリコテセン(trichothecenes)(特に、T-2トキシシン、ベラキュリ-
 ンA(verracurin A)、ロリデンA(roridin A)及びアングイデン(anguidine))；ウレタン
 ；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトブロニトール；ミト-
 ラクトール(mitolactol)；ピポブロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；アラビ-
 ノシド(「Ara-C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えばタキソール(
 登録商標)パクリタキセル、(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、A B
 R A X A N E^{T M} クレモフォール(Cremophor)を含まない、アルブミン設計のナノ粒子形-
 状のパクリタキセル(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)及び
 タキソテア(登録商標)ドキセタキセル、(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；ク-
 ロランブシル；G E M Z A R (登録商標)ゲンシタビン(gemcitabine)；6-チオグアニン
 ；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチン及びカルボプラチンのようなプラ-
 チナ類似体；ビンブラスチン；プラチナ；エトボシド(V P - 1 6)；ミトキサントン；ビ-
 ンクリスチン；N A V E L B I N E (登録商標)ビノレルビン；ナベルビン(Navelbine)
 ；ノバントロン(novantrone)；テニボシド；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノ-
 プテリン；キシローダ(xeloda)；イバンドロナート(ibandronate)；C P T - 1 1；トポイ-
 ソメラゼインヒビターR F S 2 0 0 0；ジフルオロメチロールニチン(D M F O)；レチ-
 ノイン酸などのレチノイド類；カペシタビン(capecitabine)；並びに上述したものの製薬-
 的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【0077】

また、この定義には、腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように働く抗ホル-
 モン剤、抗エストロゲン及び選択的エストロゲンレセプターモジュレーター(S E R M)
 など、例えばタモキシフェン(NOLVADEX(登録商標)タモキシフェンを含む)、ラロキシフ-
 ェン(raloxifene)、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェ-
 ン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストーン(on-
 apristone)、及びFARESTON*トレミフェン(Fareston)；アロマターゼ酵素を阻害するアロ-
 マターゼ阻害物質、それらは副腎でのエストロゲン産生を調節するものであり、例えば4
 (5)-イミダゾール類、アミノグルテチミド、M E G A S E (登録商標)メゲストロール
 アセテート、A R O M A S I N (登録商標)エキセメスタン、ホルメスタイン(formestan-
 ie)、ファドロゾール、R I V I S O R (登録商標)ゾロゾール(vorozole)、F E M A R
 A (登録商標)レトロゾールおよびA R I M I D E X (登録商標)アナストロゾール；
 及び抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ピカル-
 タミド、ロイプロリド、及びゴセレリン；並びにトロキサシタビン(troxacitabine)(1,3-
 -ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体)；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に

10

20

30

40

50

不粘着性細胞増殖に係るシグナル伝達経路の遺伝子の発現を抑制するもの、例えばP K C- α 、ラルフおよびH-Ras；リボザイム、例えばVEGF発現インヒビター（例えばANGIOZYME（登録商標）リボザイム）およびHER2発現インヒビター；遺伝子治療ワクチン、例えばALLOVECTIN（登録商標）ワクチン、LEUVECTIN（登録商標）ワクチン及びVAXID（登録商標）ワクチンなどのワクチン；PROLEUKIN（登録商標）rIL-2；LURTOTECAN（登録商標）トポイソメラーゼIインヒビター；ABARELIX（登録商標）rmRH並びに上記のものの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【0078】

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、細胞、特にSTOP-1発現癌細胞の成長をインビトロ又はインビボの何れかで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、成長阻害剤は、S期でSTOP-1発現細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期の進行を（S期以外の位置で）阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ビンカス（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキサン類、及びトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びアラ-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。タキサン類（パクリタキセル及びドセタキセル）は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル（TAXOTERE（登録商標））、ローン・プーラン ローラー）は、パクリタキセル（TAXOL（登録商標））、ブリストル-マイヤー スクウィブ）の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。

「ドキソルビシン」はアントラサイクリン抗生物質である。ドキソルビシンの完全な化学名は、(8S-シス)-10-[(3-アミノ-2, 3, 6-トリデオキシ- α -L-リキソ-ヘキサピラノシル)オキシ]-7, 8, 9, 10-テトラヒドロ-6, 8, 11-トリヒドロキシ-8-(ヒドロキシアセチル)-1-メトキシ-5, 12-ナフタセンジオンである。

【0079】

「パッケージ挿入物」という用語は、効能、用途、服用量、投与、配合禁忌及び／又はその治療薬の用途に関する警告についての情報を含む、治療薬の商業的包装を慣習的に含めた指示書を指す。

【0080】

表1

```

/*
*
* C-C increased from 12 to 15
* Z is average of EQ
* B is average of ND
* match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
*/

#define      _M      -8      /* value of a match with a stop */

int  _day[26][26] = {
/*    A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},

```

10

20

```

/* G */ { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0,_M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5, 0},
/* H */ {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */ {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */ {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */ { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */ {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,
0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */ { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */ { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */ {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */ { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */ {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */ { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};
/*
*/

```

```
#include <stdio.h>
```

```
#include <ctype.h>
```

```

#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024 /* max jmps in an path */
#define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */

```

```

#define      DINS0      8      /* penalty for a gap */
#define      DINS1      1      /* penalty per base */
#define      PINS0      8      /* penalty for a gap */
#define      PINS1      4      /* penalty per residue */

struct jmp {
    short      n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short  x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int      score; /* score at last jmp */
    long     offset; /* offset of prev block */
    short    ijmp; /* current jmp index */
    struct jmp  jp; /* list of jmps */
};

struct path {
    int      spc; /* number of leading spaces */
    short    n[JMPs]; /* size of jmp (gap) */
    int      x[JMPs]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char      *ofile; /* output file name */
char      *namex[2]; /* seq names: getseqs( ) */
char      *prog; /* prog name for err msgs */
char      *seqx[2]; /* seqs: getseqs( ) */
int      dmax; /* best diag: nw( ) */
int      dmax0; /* final diag */
int      dna; /* set if dna: main( ) */
int      endgaps; /* set if penalizing end gaps */
int      gapx, gapy; /* total gaps in seqs */
int      len0, len1; /* seq lens */
int      ngapx, ngapy; /* total size of gaps */

```

```

int          smax;          /* max score: nw( ) */
int          *xbm;          /* bitmap for matching */
long         offset;        /* current offset in jmp file */
struct diag   *dx;          /* holds diagonals */
struct path   pp[2];        /* holds path for seqs */

```

```

char         *calloc( ), *malloc( ), *index( ), *strcpy( );
char         *getseq( ), *g_calloc( );

```

10

```

/* Needleman-Wunsch alignment program

```

```

*

```

```

* usage: progs file1 file2

```

```

* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.

```

```

* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity

```

20

```

* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored

```

```

* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)

```

```

* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA

```

```

* Output is in the file "align.out"

```

```

*

```

```

* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.

```

```

* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650

```

30

```

*/

```

```

#include "nw.h"

```

```

#include "day.h"

```

```

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

```

40

```

static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))

```

};

main(ac, av)

main

int ac;

char *av[];

{

prog = av[0];

10

if (ac != 3) {

fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);

fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");

fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");

fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");

fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");

exit(1);

}

20

namex[0] = av[1];

namex[1] = av[2];

seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);

seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);

xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

endgaps = 0; /* 1 to penalize endgaps */

ofile = "align.out"; /* output file */

30

nw(); /* fill in the matrix, get the possible jumps */

readjumps(); /* get the actual jumps */

print(); /* print stats, alignment */

cleanup(0); /* unlink any tmp files */

}

40

/* do the alignment, return best score: main()

```

* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/

```

```

nw()

```

nw

10

```

{

```

```

    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int        *ndely, *dely; /* keep track of dely */
    int        ndelx, delx; /* keep track of delx */
    int        *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
    int        mis;            /* score for each type */
    int        ins0, ins1;     /* insertion penalties */
    register    id;             /* diagonal index */
    register    ij;             /* jmp index */
    register    *col0, *col1; /* score for curr, last row */
    register    xx, yy;         /* index into seqs */

```

20

```

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

```

```

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));

```

```

    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));

```

30

```

    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));

```

```

    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));

```

```

    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;

```

```

    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

```

```

    smax = -10000;

```

```

    if (endgaps) {

```

40

```

        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {

```

```

            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;

```

```

            ndely[yy] = yy;

```

```

        }

```

```

    col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
}
else
    for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
        dely[yy] = -ins0;

/* fill in match matrix
*/
for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
    /* initialize first entry in col
    */
    if (endgaps) {
        if (xx == 1)
            col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
        else
            col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
        ndelx = xx;
    }
    else {
        col1[0] = 0;
        delx = -ins0;
        ndelx = 0;
    }

    ...nw

    for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
        mis = col0[yy-1];
        if (dna)
            mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
        else
            mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

        /* update penalty for del in x seq;
        * favor new del over ongong del
        * ignore MAXGAP if weighting endgaps

```

```

*/
if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
    if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
        ndely[yy] = 1;
    } else {
        dely[yy] -= ins1;
        ndely[yy]++;
    }
} else {
    if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
        ndely[yy] = 1;
    } else
        ndely[yy]++;
}

/* update penalty for del in y seq;
 * favor new del over ongoing del
 */
if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else {
        delx -= ins1;
        ndelx++;
    }
} else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else
        ndelx++;
}

```

```

}

/* pick the maximum score; we're favoring
 * mis over any del and delx over dely
 */

...nw

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    coll[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    coll[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
else {
    coll[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);

```

```

        ij = dx[id].ijmp = 0;
        dx[id].offset = offset;
        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
    }

}

dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
dx[id].jp.x[ij] = xx;
dx[id].score = dely[yy];
}

if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (col1[yy] > smax) {
        smax = col1[yy];
        dmax = id;
    }
}

}

if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}

tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}

(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

/*
*
```

10

20

30

40

```

* print( ) -- only routine visible outside this module
*
* static:
* getmat( ) -- trace back best path, count matches: print( )
* pr_align( ) -- print alignment of described in array p[]: print( )
* dumpblock( ) -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align( )
* nums( ) -- put out a number line: dumpblock( )
* putline( ) -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock( )
* stars( ) -- put a line of stars: dumpblock( )
* stripname( ) -- strip any path and prefix from a seqname
*/

#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print( )
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }

    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", nameex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", nameex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;

```

10

20

print 30

40

```

    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}
/*
* trace back the best path, count matches
*/
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
    int    lx, ly;          /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap; /* leading trailing overlap */
{
    int    nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char    outx[32];
    double    pct;
    register    n0, n1;
    register char *p0, *p1;

```

10

20

30

getmat

40

```
/* get total matches, score
```

```
*/
```

```
i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
```

```
p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
```

```
p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
```

```
n0 = pp[1].spc + 1;
```

```
n1 = pp[0].spc + 1;
```

10

```
nm = 0;
```

```
while ( *p0 && *p1 ) {
```

```
    if (siz0) {
```

```
        p1++;
```

```
        n1++;
```

```
        siz0--;
```

20

```
    }
```

```
    else if (siz1) {
```

```
        p0++;
```

```
        n0++;
```

```
        siz1--;
```

```
    }
```

```
    else {
```

```
        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
```

```
            nm++;
```

```
        if (n0++ == pp[0].x[i0])
```

```
            siz0 = pp[0].n[i0++];
```

```
        if (n1++ == pp[1].x[i1])
```

```
            siz1 = pp[1].n[i1++];
```

```
        p0++;
```

```
        p1++;
```

40

```
    }
```

```
}
```

```
/* pct homology:
```

```

* if penalizing endgaps, base is the shorter seq
* else, knock off overhangs and take shorter core
*/
if (endgaps)
    lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
else
    lx = (lx < ly)? lx : ly;
pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
fprintf(fx, "\n");
fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
    nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per
base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per
residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);

```

...getmat

10

20

30

40

```

    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

```

10

```

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */
static      nc[2];       /* number at start of current line */
static      ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char  *ps[2];      /* ptr to current element */
static char  *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char  out[2][P_LINE]; /* output line */
static char  star[P_LINE]; /* set by stars( ) */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align( )
{
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register      i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(nameex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;
    }
}

```

20

30

40

pr_align

```

nc[i] = 1;
ni[i] = 1;
siz[i] = ij[i] = 0;
ps[i] = seqx[i];
po[i] = out[i];      }
for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?

```

...pr_align

10

20

30

40

```

        */
        if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
            /*
             * we need to merge all gaps
             * at this location
             */
            siz[i] = pp[i].n[ij[i]]++;
            while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                siz[i] += pp[i].n[ij[i]]++;
        }
        ni[i]++;
    }
}

if (++nn == olen || !more && nn) {
    dumpblock();
    for (i = 0; i < 2; i++)
        po[i] = out[i];
    nn = 0;
}
}

}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align( )
 */
static
dumpblock( )
{
    register    i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';

    (void) putc('\n', fx);
}

```

【 0 0 8 1 】

```

    for (i = 0; i < 2; i++) {
        if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
            if (i == 0)
                nums(i);
            if (i == 0 && *out[1])
                stars( );
            putline(i);
            if (i == 0 && *out[1])
                fprintf(fx, star);
            if (i == 1)
                nums(i);
        }
    }
}
}

/*
 * put out a number line: dumpblock( )
 */
static
nums(ix)
    int    ix;    /* index in out[] holding seq line */
{
    char    nline[P_LINE];
    register    i, j;
    register char *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;

```

```

        for (px = pn; j; j /= 10, px--)
            *px = j%10 + '0';
        if (i < 0)
            *px = '-';
    }
    else
        *pn = ' ';
    i++;
}
}
*pn = '\0';
nc[ix] = i;
for (pn = nline; *pn; pn++)
    (void) putc(*pn, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock( )
 */
static
putline(ix)
    int    ix;
{
    int    i;
    register char *px;

    for (px = name[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
        (void) putc(*px, fx);
    for (; i < lmax+P_SPC; i++)
        (void) putc(' ', fx);

    /* these count from 1:

```

10

20

putline

30

...putline

40

```

    * ni[] is current element (from 1)
    * nc[] is number at start of current line
    */
    for (px = out[ix]; *px; px++)
        (void) putc(*px&0x7F, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

```

10

```

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock( )
 */
static
stars( )
{

```

stars
20

```

    int i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

```

```

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;

```

```

    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

```

30

```

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

```

```

            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {

```

```

                cx = '*';

```

```

                nm++;

```

```

            }

```

```

            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)

```

```

                cx = ':';

```

40

```

        else
            cx = ' ';
    }
    else
        cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align( )
 */
static
stripname(pn)                                stripname    20
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

/*
 * cleanup( ) -- cleanup any tmp file
 * getseq( ) -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc( ) -- calloc( ) with error checkin

```

10

30

40

```

* readjumps( ) -- get the good jumps, from tmp file if necessary
* writejumps( ) -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw( )
*/
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

int cleanup( );                            /* cleanup tmp file */
long lseek( );

/*
* remove any tmp file if we blow
*/
cleanup(i)                                cleanup
    int i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
* read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
* skip lines starting with ';', '<', or '>'
* seq in upper or lower case
*/
char *
getseq(file, len)                        getseq
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */
{
    char line[1024], *pseq;

```

```

register char *px, *py;
int          natgc, tlen;
FILE        *fp;

if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
    fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
    exit(1);
}
tlen = natgc = 0;
while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++)
        if (isupper(*px) || islower(*px))
            tlen++;
}
if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
    fprintf(stderr, "%s: malloc( ) failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6,
file);
    exit(1);
}
pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

...getseq

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;

```

```

        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU",*(py-1)))
            natgc++;
    }
}
*py++ = '\0';
*py = '\0';
(void) fclose(fp);
dna = natgc > (tlen/3);
return(pseq+4);
}

char *
g_calloc(msg, nx, sz)
char *msg;          /* program, calling routine */
int nx, sz;         /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc( ) failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg,
nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
* get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main( )
*/
readjmps( )

```

10

g_calloc 20

30

40

readjmps

```

{
    int          fd = -1;
    int          siz, i0, i1;
    register     i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open( ) %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;
            ...readjumps
            if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
                (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset,
sizeof(dx[dmax].offset));
                dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
            }
            else
                break;
        }
        if (i >= JMPS) {
            fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
            cleanup(1);
        }
        if (j >= 0) {
            siz = dx[dmax].jp.n[j];
            xx = dx[dmax].jp.x[j];

```

```

    dmax += siz;
    if (siz < 0) {          /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) {     /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {

```

```

        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
    }
    if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
    if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;    }
}

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw( )
 */
writejumps(ix)
    int    ix;
{
    char    *mktemp( );

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp( ) %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

10

writejumps

20

30

40

表 2

STOP-1 XXXXXXXXXXXXXXXX (長さ = 15 アミノ酸)

比較タンパク質 XXXXXYYYYYYY (長さ = 12 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数) ÷ (STOP-1 ポリペプチドの全アミノ酸残基の数) =

$$5 \div 15 = 33.3\%$$

10

表 3

STOP-1 XXXXXXXXXX (長さ = 10 アミノ酸)

比較タンパク質 XXXXXYYYYYYZZYZ (長さ = 15 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数) ÷ (STOP-1 ポリペプチドの全アミノ酸残基の数) =

$$5 \div 10 = 50\%$$

20

表 4

STOP-1-DNA NNNNNNNNNNNNNN (長さ = 14 ヌクレオチド)

比較 DNA NNNNNLLLLLLLLLLL (長さ = 16 ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数) ÷ (PRO-DNA 核酸配列の全ヌクレオチドの数) =

$$6 \div 14 = 42.9\%$$

30

40

表5

STOP-1-DNA	NNNNNNNNNNNN	(長さ = 12 ヌクレオチド)
比較 DNA	NNNNLLLTV	(長さ = 9 ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数) ÷ (PRO-DNA 核酸配列の全ヌクレオチドの数) =

4 ÷ 12 = 33.3%

10

【0082】

本発明の組成物及び方法

STOP-1 ポリペプチド変異体

ここに記載した完全長天然配列 STOP-1 ポリペプチドに加えて、STOP-1 ポリペプチド変異体も調製できると考えられる。STOP-1 ポリペプチド変異体は、コード化 DNA に適当なヌクレオチド変化を導入することによって、及び／又は所望の抗体又はポリペプチドを合成することによって調製できる。当業者は、アミノ酸変化がグリコシル化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などの抗 TAT 抗体の翻訳後プロセス又は TAT ポリペプチドの翻訳後プロセスを変え得るのを理解するであろう。

20

【0083】

ここに記載した完全長天然配列 STOP-1 ポリペプチド又は STOP-1 ポリペプチドの種類のドメインの変異は、例えば、米国特許第 5364934 号に示す保存的及び非保存的変異に関する技術及び指針のいずれかを用いて作成することができる。変異は、結果として天然配列 STOP-1 ポリペプチドと比較して STOP-1 ポリペプチドアミノ酸配列の変化を生じる、STOP-1 ポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってもよい。場合によっては、変異は、STOP-1 ポリペプチドの一つ又は複数のドメインにおける、少なくとも一つのアミノ酸の他の任意のアミノ酸との置換による。どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失され得るかを確かめる指針は、STOP-1 ポリペプチドの配列を既知の相同タンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内で生じたアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸を類似した構造及び／又は化学特性を持つ他のアミノ酸で置換すること、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果であるとして行うことができる。挿入及び欠失は、場合によっては1から5のアミノ酸の範囲内であり得る。許容され得る変異は、配列にアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、生じた変異体を完全長又は成熟天然配列によって示される活性に関して試験することによって確かめられる。

30

特定の実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換の項目で表6に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表6に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類でさらに記載するように、より実質的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

40

【0084】

表6

表 6

<u>元の残基</u>	<u>例示的置換</u>	<u>好ましい置換</u>	
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	10
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; ノルロイシン	leu	
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile	20
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	30
Trp (W)	tyr; phe	tyr	
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe	
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu	

【0085】

S T O P-1 ポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の実質的修飾は、（a）置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、（b）標的部位の電荷又は分子疎水性、又は（c）側鎖の高を維持しながら、それらの効果において有意に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

- （1）疎水性：ノルロイシン, met, ala, val, leu, ile;
- （2）中性の親水性：cys, ser, thr;
- （3）酸性：asp, glu;
- （4）塩基性：asn, gln, his, lys, arg;
- （5）鎖配向に影響する残基：gly, pro; 及び
- （6）芳香族：trp, tyr, phe。

非保存的置換は、これらの分類の1つのメンバーを他の分類に交換することを必要とす

10

20

30

40

50

るであろう。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、又はより好ましくは、残された（非保存）部位に導入されうる。

変異は、オリゴヌクレオチド媒介（部位特異的）突然変異誘発、アラニンスキanning、及びPCR突然変異誘発等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができる。部位特異的突然変異誘発 [Carter等, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発 [Wells等, Gene, 34: 315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発 [Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)] 又は他の知られた技術をクローニングしたDNAに実施して、STOP-1変異体DNAを作成することもできる。

【0086】

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキanningアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキanningアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキanningアミノ酸である [Cunningham及びWells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

【0087】

STOP-1ポリペプチドの修飾

STOP-1ポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一型には、STOP-1ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、STOP-1ポリペプチドの選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることが含まれる。二官能性試薬による誘導体化は、例えばSTOP-1ポリペプチドを、抗STOP-1抗体の精製方法で用いる水不溶性支持体マトリクス又は表面と架橋させるために有用であり、その逆も同じである。通常用いられる架橋剤には、例えば、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、例えば4-アジドサリチル酸を有するエステル、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬が含まれる。

他の修飾には、グルタミル及びアスパラギン残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化[T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【0088】

本発明の範囲内に含まれるSTOP-1ポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、抗体又はポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。ここで意図される「天然グリコシル化パターンの変更」とは、天然配列STOP-1ポリペプチドに見られる一又は複数の炭水化物部分を欠失させること（内在するグリコシル化部位を取り除くことによって、又は化学及び/又は酵素的手法でグリコシル化を欠失させることのいずれか）、及び/又は天然配列STOP-1ポリペプチドに存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。更には、この語句には、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的な変化が含まれる。

STOP-1ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を改変するこ

とによって完遂できる。この改変は、また、天然配列 S T O P - 1 ポリペプチドへ一つ又は複数のセリン又はスレオニン残基を付加、又は置換することによって生成される（O-結合グリコシル化部位について）。S T O P - 1 アミノ酸配列は、D N A レベルでの変化を通して、特に、コドンが所望するアミノ酸へ翻訳される、あらかじめ選択した塩基での S T O P - 1 ポリペプチドをコードする D N A を変異させることによって、場合によっては改変され得る。

【0089】

S T O P - 1 ポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。そのような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に発行された国際公開87/05330、及びApli 10
n及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

S T O P - 1 ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddin等, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)によって、そしてEdge等, Anal. Biochem., 118: 131 (1981)によって記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等, Meth. Enzymol. 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

【0090】

S T O P - 1 ポリペプチド共有結合的修飾の他の型は、S T O P - 1 ポリペプチドを種 20
々の非タンパク質様ポリマーの1つ、例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、又はポリオキシアルキレンへ、米国特許第4640835号；第4496689号；第4301144号；第4670417号；第4791192号又は第4179337号に記載された方法で結合させることを含む。

また、本発明のS T O P - 1 ポリペプチドは、その他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列と融合したS T O P - 1 ポリペプチドを含むキメラ分子が形成される方法で修飾されてもよい。

一実施態様では、そのようなキメラ分子はS T O P - 1 ポリペプチドと、タンパク質伝達ドメインとの融合を含むものであり、このタンパク質伝達ドメインは種々の組織へ及び特に血液脳関門を越えて運搬するためにS T O P - 1 ポリペプチドを標的とするものであり、例えば、ヒト免疫不全ウイルスT A T タンパク質のタンパク質伝達ドメインである(S 30
chwarze等., 1999, Science 285: 1569-72)。

【0091】

他の実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとS T O P - 1 ポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的にはS T O P - 1 ポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このようなS T O P - 1 ポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってS T O P - 1 ポリペプチドを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペ 40
プチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン（ポリ-His）又はポリ-ヒスチジン-グリシン（poly-his-gly）タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Field等, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D（gD）タグ及びその抗体 [Paborsky等, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド [Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]；K T 3エピトープペプチド [Martin等, Science, 255:192-194 (1992)]；α-チューブリンエピトープペプチド [Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-F 50

reyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)] を含む。

【0092】

それに換わる実施態様では、キメラ分子はSTOP-1ポリペプチドの免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態（「イムノアドヘシン」とも呼ばれる）については、そのような融合体はIgG分子のFc領域であり得る。本発明のIg融合体は、Ig分子内の少なくとも一の可変領域に位置するヒトSTOP-1のおよそ又は唯一の残基94-243、残基33-53又は残基33-52を含むポリペプチドを含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、IgG分子のヒンジ、CH₂及びCH₃、又はヒンジ、CH₁、CH₂及びCH₃領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5428130号を参照のこと。

10

【0093】

STOP-1ポリペプチドの調製

以下の説明は、主として、STOP-1ポリペプチドコード化核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することによりSTOP-1ポリペプチドを産生させる方法に関する。勿論、当該分野においてよく知られている他の方法を用いてSTOP-1ポリペプチドを調製することができると考えられている。例えば、STOP-1ポリペプチド配列、又はその一部分を、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生成してもよい[例えば、Stewart等, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., サンフランシスコ, カリフォルニア(1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)参照]。手動技術又は自動を使用することによってインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機（フォスター シティー, カリフォルニア）を用いて、製造者の指示によって実施してもよい。STOP-1ポリペプチドの種々の部分を別々に化学的に合成し、化学的又は酵素的 method を用いて結合させて完全長STOP-1ポリペプチドを生成させてもよい。

20

【0094】

宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載したSTOP-1ポリペプチド生成のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pH等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler編 (IRL Press, 1991)及び上掲のSambrook等に見出すことができる。

30

細胞形質転換の方法、例えば、CaPO₄処理及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物又は実質的な細胞壁障害を有する他の細胞に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shaw等, Gene, 23:315(1983)及び1989年6月29日公開の国際公開89/05859に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が用いられる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingen等, J. Bact., 130:946 (1977)及びHsiao等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン又はポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。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等, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)及び Manso

40

50

ur等, Nature, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

【0095】

ここに記載のベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物には、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性微生物、例えば大腸菌のような腸内細菌科が含まれる。種々の大腸菌株が公に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294 (ATCC31446)；大腸菌X1776 (ATCC31537)；大腸菌株W3110 (ATCC27325)及びK5772 (ATCC53635)である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌属、例えば大腸菌 (*E. coli*)、エンテロバクター、エルビニア (*Erwinia*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、プロテウス (*Proteus*)、サルモネラ、例えばネズミチフス菌 (*Salmonella Typhimurium*)、セラチア、例えばセラチア・マルセサンス (*Serratia marcescens*)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバチルス・スプチルス (*B. subtilis*)及びバチルス・リチェニフォルミス (*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日発行のDD266710に記載されたバチルス・リチェニフォルミス41P)、シュードモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA生成物発酵のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株W3110を、宿主にとって内因性のタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子変異をもたらしように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型 *tonA ptr3* を有する大腸菌W3110株1A2；完全な遺伝子型 *tonA ptr3* を有する大腸菌W3110株9E4；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r* を有する大腸菌W3110株27C7 (ATCC 55, 244)；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r* を有する大腸菌W3110株37D6；非カナマイシン耐性 *degP* 欠失変異を持つ37D6株である大腸菌W3110株40B4；及び1990年8月7日発行の米国特許第4946783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

【0096】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、STOP-1ポリペプチドコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, Nature, 290: 140 [1981]；1985年5月2日公開の欧州特許第139383号)；クリュイペロミセス宿主 (*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4943529号；Fleer等, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991))、例えばクリュイペロミセスラクチス (*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574；Louvencourt等, J. Bacteriol., 737[1983])、クリュイペロミセス・フラギリス (*K. fragilis*) (ATCC12424)、クリュイペロミセス・ブルガリクス (*K. bulgaricus*) (ATCC16045)、クリュイペロミセス・ウィケラミイ (*K. wickerhamii*) (ATCC24178)、クリュイペロミセス・ワルチイ (*K. waltii*) (ATCC56500)、クリュイペロミセス・ドロソフィラルム (*K. drosophilum*) (ATCC36906；Van den Berg等, Bio/Technology, 8: 135 (1990))、クリュイペロミセス・テモトレランス (*K. thermotolerans*)及びクリュイペロミセス・マルキシアナス (*K. marxianus*)；ヤロウイア (*Yarrowia*) (欧州特許第402226号)；ピシア・パストリス (*Pichia pastoris*) (欧州特許第183070号；Sreekrishna等, J. Basic Microbiol, 28: 265-278 [1988])；カンジダ；トリコデルマ・レーシア (*Trichoderma reesia*) (欧州特許第244234号)；アカパンカビ (Case等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979])；シュワニオマイセス (*Schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセス・オクシデンタリス (*Schwanniomyces occidentalis*) (1990年10月31日公開の欧州特許第39453

8号) ; 及び糸状真菌、例えば、ニューロスボラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(*Tolypocladium*) (1991年1月10日公開の国際公開91/00357) ; 及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルス・ニダランス (Ballance等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tilburn等, *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yelton等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) 及びアスペルギルス・ニガー (Kelly及びHynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985]) が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(C1化合物資化性、Methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(*Hansenula*)、カンジダ、クロエケラ(*Kloeckera*)、ピシア(*Pichia*)、サッカロミセス、トルロプシス(*Torulopsis*)、及びロドトルラ(*Rhodotorula*)からなる属から選択されたメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982)に記載されている。

10

【0097】

グリコシル化STOP-1ポリペプチドをコードする核酸の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物から由来のものである。非脊椎動物細胞の例には、植物細胞と同様に、ショウジョウバエS2及びヨトウ(*spodoptera*) Sf9等の昆虫細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)及びCOS細胞が含まれる。より特定の例には、SV40(COS-7, ATCC CRL1651)で形質転換させたサル腎CV1細胞株; ヒト胚芽腎細胞株(293又は懸濁培養で成長するようにサブクロン化された293細胞, Graham等, *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); チャイニーズハムスター卵巣細胞/DHFR(CHO, Urlaub及びChasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); マウスセルトリ細胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1980)); ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL75); ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065); 及びマウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL51)が含まれる。好適な宿主細胞の選択は当分野の技術内で判断される。

20

【0098】

複製可能なベクターの選択及び使用

本発明のポリペプチド又は抗体をコードする核酸(例えば、cDNA又はゲノムDNA)は、クローニング(DNAの増幅)又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一又は複数のシグナル配列(分泌される配列の場合)、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

30

本発明のポリペプチド又は抗体は直接的に組換え手法によって生成されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生成される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるポリペプチド又は抗体のコード化DNAの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppあるいは熱安定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生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インペルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(*Saccharomyces*)及びクリュイベロミセス(*Kluyveromyces*) α 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスホターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(*C. albicans*)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行の欧州特許第362179号)、又は1990年11月15日に公開された国際公開90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リ

40

50

ーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【0099】

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスについてよく知られている。プラスミド p B R 3 2 2 に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 μ プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点 (S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V 又は B P V) 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。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a) アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b) 栄養要求性欠陥を補い、又は (c) 複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードしており、例えばバシリの D-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子がある。

【0100】

哺乳動物細胞に適切な選べるマーカーの例は、D H F R あるいはチミジンキナーゼのように、ポリペプチド又は抗体のコード化核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型 D H F R を用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub 等により、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980) に記載されているようにして調製され増殖された D H F R 活性に欠陥のある C H O 株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミド Y R p 7 に存在する t r p 1 遺伝子である [Stinchcomb 等, Nature, 282:39(1979); Kingsman 等, Gene, 7:141(1979); Tschemper 等, Gene, 10:157(1980)]。t r p 1 遺伝子は、例えば、A T C C 番号 4 4 0 7 6 あるいは P E P 4 - 1 のようなトリプトファンで成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する [Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

発現及びクローニングベクターは、通常、本発明のポリペプチド又は抗体のコード化核酸配列に作用可能に結合し、m R N A 合成を方向付けるプロモーターを含む。種々の有能な宿主細胞により認識されるプロモーターが知られている。原核生物宿主との使用に適したプロモーターは β -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 [Chang 等, Nature, 275:615 (1978); Goeddel 等, Nature, 281:544 (1979)]、アルカリフォスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーター系 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); 欧州特許第 3 6, 7 7 6 号]、及びハイブリッドプロモーター、例えば t a c プロモーター [deBoer 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)] を含む。細菌系で使用するプロモーターもまた本発明のポリペプチド又は抗体をコードする D N A と作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ (S.D.) 配列を有する。

【0101】

酵母宿主との使用に適したプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ [Hitzeman 等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 又は他の糖分解酵素 [Hess 等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900(1978)]、例えばエノラーゼ、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、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソチトクロム C、酸フォスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、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、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターは欧州特許第 7 3 6 5 7 号に更に記載されている。

【0102】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの核酸の転写は、例えば、ポリオーマウィル

10

20

30

40

50

ス、伝染性上皮腫ウィルス(1989年7月5日公開の英国特許第2211504号)、アデノウィルス(例えばアデノウィルス2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及びサルウィルス40(SV40)のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター；異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

より高等の真核生物による本発明のポリペプチド又は抗体をコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するDNAのシス作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製開始点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、本発明のポリペプチド又は抗体のコード化配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

【0103】

また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、ポリペプチド又は抗体をコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養での本発明のポリペプチド又は抗体の合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981); Mantel等, Nature, 281:40-46 (1979); 欧州特許第117060号；及び欧州特許第117058号に記載されている。

【0104】

遺伝子増幅／発現の検出

遺伝子の増幅及び／又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンブロット法、mRNAの転写を定量化する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)、又はインサイツハイブリダイゼーションによって、直接的に試料中で測定することができる。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖、及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。ついで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果、表面での二本鎖の形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量化する免疫学的方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び／又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製する又は合成する(例えば、本発明のモノクローナル抗体)ことができる。簡便には、抗体は、天然配列STOP-1ポリペプチドに対して、又はここで提供されるDNA配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はSTOP-1ポリペプチドコード化DNA及び特異的抗体エピトープをコードするDNAに融合した外因性配列に対して調製され得る。

【0105】

STOP-1ポリペプチドの精製

S T O P-1 ポリペプチドの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-X 1 0 0)を用いて又は酵素的切断により膜から引き離すことができる。S T O P-1 ポリペプチドコード化核酸の発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。一実施態様によると、S T O P-1 ポリペプチドは、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相H P L C；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばD E A Eによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；S D S-P A G E；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過；I g Gのような汚染物を除くプロテインAセファロースカラム；及びS T O P-1 ポリペプチドのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生成方法及び特に生成される特定のS T O P-1 ポリペプチドの性質に依存する。一実施態様によると、S T O P-1 ポリペプチドは本発明の抗体を用いて親和性クロマトグラフィーにより精製される。

10

【0106】

細胞増殖の阻害アッセイ

20

本発明のアンタゴニストの阻害活性は以下の実施例13-14及び当分野で公知の他のアッセイ法を用いて測定できる。

腫瘍及び癌(例えば、乳癌、大腸癌、前立腺癌、肺癌など)の動物モデルには、非組み換え動物及び組み換え(トランスジェニック)動物の両方を含む。非組み換え動物モデルには、例えばマウスなどの齧歯類のモデルを含む。このようなモデルは、腫瘍細胞を標準の技術、例えば皮下注入、尾部静脈注入、脾臓移植、腹膜内移植、腎臓莢膜下への移植)又はオルソピン(orthopin)移植、例えば結腸組織へ移植した大腸癌細胞を用いて同系のマウスに導入することによって作製することができる。例として、1997年9月18日公開のPCT公開公報WO 97/33551を参照。おそらく、腫瘍学的な研究において最も頻繁に用いられた動物種は、免疫不全マウスおよび、特に、ヌードマウスである。胸腺低/形成不全をもつヌードマウスがヒト腫瘍異種移植片のための宿主としてうまく作用することができたという所見により、この目的のために広範囲に使用するに至った。常染色体劣性のn u遺伝子をヌードマウスのとても多くの数の異なるコンジェニック系統(例えば、A S W、A/H e、A K R、B A L B/c、B 1 0. L P、C 1 7、C 3 H、C 5 7 B L、C 5 7、C B A、D B A、D D D、I/s t、N C、N F R、N F S、N F S/N、N Z B、N Z C、N Z W、P、R I I I及びS J Lを含む)に導入した。さらに、遺伝的な免疫不全を持つヌードマウス以外の広範な他の動物が生育され、腫瘍異種移植のレシピエントとして用いられた。さらなる詳細については、The Nude Mouse in Oncology Research, E. Bo ven 及び B. Winograd 編, CRC Press, Inc., 1991を参照。

30

【0107】

40

そのような動物に導入された細胞は、上述の腫瘍細胞系のいずれか、及び例えばB 1 0 4-1-1細胞系(n e uプロトオンコジーンを用いて形質移入された安定N I H-3 T 3細胞系)；r a s形質移入N I H-3 T 3細胞；C a c o-2(A T C C H T B-3 7)；又は中程度に分化したグレードI Iのヒト大腸癌細胞系であるH T-2 9(A T C C H T B-3 8)；等の既知の腫瘍/癌細胞系、あるいは腫瘍及び癌から採取することができる。腫瘍又は癌細胞の試料は、液体窒素中での冷凍及び保存を用いる標準的条件を用いて手術を受けている患者から、採取することができる。Karmali等, Br. J. Cancer 4 8:689-696 (1983)。

腫瘍細胞は様々な方法によりヌードマウスなどの動物に導入することができる。マウスの皮下(s. c.)スペースは腫瘍の移植に非常に適している。腫瘍は、固形ブロック、

50

トロッカル (trochar) を用いた針生検、又は細胞浮遊として皮下移植可能である。固形ブロックまたはトロッカル移植の場合、適切な大きさの腫瘍組織断片を皮下スペースに導入する。細胞浮遊は、原発腫瘍又は適切な腫瘍細胞系から新鮮なものを準備し、皮下注射する。腫瘍細胞はまた皮下植え込みとして注入することもできる。この位置における注入では、接種材料を皮下結合組織の下部と皮下組織の間に配置する。

乳癌の動物モデルは、基本的にDrebin等 Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83:9129-9133(1986)に記載されているように、例えば、(始めにneuオンコジーンを単離した) ラットの神経芽腫細胞、又はneu形質変換NIH-3T3細胞をヌードマウスに移植することにより生産することができる。

【0108】

同様に、大腸癌の動物モデルは、動物、例えばヌードマウスの大腸癌細胞の継代を行って、これら動物に腫瘍を発生させることにより生産できる。ヌードマウスへのヒト大腸癌の同所性移植は、例えばWang等のCancer Research, 54:4726-4728 (1994)及びToo等, Cancer Research, 55:681-684 (1995)に記載されている。このモデルは、Anticancer社(カリフォルニア州サンディエゴ)から市販されている所謂「METAMOUSE(登録商標)」をベースにしている。

動物に発生する腫瘍は、インビトロで除去及び培養できる。ついでインビトロ培地から回収した細胞を動物に継代することができる。このような腫瘍は更なる実験又は薬物スクリーニングの標的となり得る。あるいは、継代の結果得られた腫瘍を単離し、継代前の細胞由来のRNAと、1回以上の継代を行った後で単離した細胞由来のRNAとを、対象とする遺伝子の差別的な発現について分析することができる。このような継代技術を任意の既知の腫瘍又は癌細胞系に実行することができる。

【0109】

例えば、Meth A, CMS 4, CMS 5, CMS 21, 及びWEHI-164はBALB/c雌マウスの化学的に誘発した繊維肉腫であり(DeLeo等, J. Exp. Med., 146:720 (1977))、腫瘍の薬剤の抗腫瘍活性の研究にとって高度に制御されたモデルシステムを提供する。Palladino等, J. Immunol., 138:4023-4032 (1987)。簡単には、腫瘍細胞は細胞培地中においてインビトロで増殖する。動物への注入に先立ち、この細胞系を洗浄し、約 $10 \times 10^6 \sim 10 \times 10^7$ の細胞密度で緩衝液に懸濁する。次に動物に $10 \sim 100 \mu\text{l}$ の細胞懸濁液を皮下感染させ、1～3週間掛けて腫瘍を発生させる。

加えて、最も深く研究されている実験腫瘍の1つであるマウスのルイス肺(3LL)癌を調査用腫瘍モデルとして使用することができる。この腫瘍モデルの有効性は、肺の小細胞癌(SCCL)と診断されたヒト患者の治療における薬効と相関する。この腫瘍は、感染したマウス由来の腫瘍断片、又は培養で維持した細胞を注射することにより正常マウスに導入することができる。Zupi等, Br. J. Cancer, 41: suppl. 4, 30 (1980)。単一の細胞を注入しただけでも腫瘍が起こり得ること、及び感染した腫瘍細胞は非常に高い割合で生存することが証明されている。この腫瘍モデルに関する更なる情報は、Zacharski, Haemostasis, 16:300-320 (1986)を参照のこと。

【0110】

腫瘍を移植した動物モデルにおける試験化合物の有効性を評価する1つの方法は、治療の前と後で腫瘍の大きさを測定することである。常套的には、移植された腫瘍の大きさの測定は、2次元又は3次元のノギスを用いて行われる。2次元に限定された測定は腫瘍の大きさを正確に反映しないので、通常数式を用いて対応する容積に変換する。しかしながら、このように測定した腫瘍の大きさは非常に不正確である。候補薬剤の治療的効果は、治療による成長の鈍化、及び特定の成長遅延として説明される。腫瘍成長における別の重要な変数は、腫瘍容積の倍加時間である。腫瘍成長の計算及び表示のためのコンピュータプログラムも、Rygaard及びSpang-Thomsen, Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals, Wu and Shengeds. (Basel, 1989), p. 301に報告されているプログラム等が入手可能である。しかしながら、治療後のネクロシス及び炎症反応は、実際には、少なくとも初期の腫瘍の増大に繋がる場合があることに注意されたい。従って、形態測定法

とフローサイトメトリー分析の組合せにより、これらの変化を注意深くモニターする必要がある。

さらに、組換え（トランスジェニック）動物モデルは、トランスジェニック動物を生産するための標準的な技術を用いて、本発明で同定される S T O P - 1 遺伝子のコード化部分を対象とする動物のゲノムへと導入することにより設計することができる。トランスジェニック操作の標的として機能し得る動物には、限定しないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、及び非ヒト霊長類、例えばヒヒ、チンパンジー及びサルが含まれる。導入遺伝子をこのような動物に導入するための従来技術に既知の技術には、前核マイクロインジェクション（米国特許第4,873,191号）；生殖系へのレトロウイルス媒介遺伝子転移（例えば、Van der Putten等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:614 8-615 (1985)）；胚幹細胞における遺伝子ターゲティング（Thompson等, Cell, 56:313-321 (1989)）；胚のエレクトロポレーション（Lo, Mol. Cell. Biol., 3:1803-1814 (1983)）；及び精子媒介遺伝子転移が含まれる。Lavitrano等, Cell, 57:717-73 (1989)。概略については例えば米国特許第4,736,866号を参照されたい。

【0111】

本発明の目的のために、トランスジェニック動物は、それらの細胞の一部にのみ導入遺伝子を持つもの（「モザイク動物」）を含む。導入遺伝子は、単一の導入遺伝子、又はコンカテマー、例えばヘッドトゥヘッド（head-to-head）又はヘッドトゥテイル（head-to-tail）タンデムで統合することができる。特定の細胞型への導入遺伝子の選択的導入も、例えばLasko等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6232-636 (1992) の技術に従って行うことができる。トランスジェニック動物における導入遺伝子の発現は、標準的技術によりモニター可能である。例えば、サザンブロット分析又は P C R 増幅を使用して導入遺伝子の統合を検証することができる。m R N A 発現のレベルは、インサイツハイブリダイゼーション、ノーザンブロット分析、P C R、又は免疫細胞化学等の技術を用いて分析することができる。さらに、腫瘍又は癌の発達の徴候について動物を試験することができる。

【0112】

あるいは、動物の胚性細胞に導入された S T O P - 1 ポリペプチドをコードする変更ゲノム D N A と、同じポリペプチドをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、本明細書で同定される S T O P - 1 ポリペプチドをコードする欠陥又は変更遺伝子を有する「ノックアウト」動物を作成することができる。例えば、特定の S T O P - 1 ポリペプチドをコードする c D N A は、確立された技術に従い、該ポリペプチドをコードするゲノム D N A のクローニングに使用できる。特定の S T O P - 1 ポリペプチドをコードするゲノム D N A の一部を、欠失させるか、又は組み込みをモニターするために使用することが可能な選択性マーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキング D N A (5 ' と 3 ' 末端の両方) を数キロベース含む [例えば、相同的組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, Cell, 51:503 (1987)を参照のこと]。ベクターを胚幹細胞株に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入された D N A が内在性 D N A と相同的に組換えられた細胞を選択する [例えば、Li等, Cell, 69:915(1992)参照]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する [例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照のこと]。その後、キメラ胚を適切な偽妊娠の雌性乳母動物に移植し、期間をおいて「ノックアウト」動物を作り出す。胚細胞に相同的に組換えられた D N A を有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられた D N A を含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、S T O P - 1 ポリペプチドの欠乏によるある種の病理的状态及びその病理的状态の進行に対する防御能力によって特徴付けることができる。

【0113】

本明細書で同定される S T O P - 1 ポリペプチドに特異的に結合する抗体、及び他の候補薬の効果もまた、自然発症性動物腫瘍の治療において試験することができる。そのよう

な研究のための適切な標的は、ネコ科の口扁平上皮癌（ＳＣＣ）である。ネコ科の口ＳＣＣは、この種に報告される口の腫瘍の６０％以上に上るネコに最も多い悪性の口腫瘍であり、高度に侵略的で、悪性の腫瘍である。これは離れた部位に転移することは殆どないが、転移の可能性が小さいことは、単にこの腫瘍を持つネコの生存期間が短いということであり得る。これらの腫瘍は、主にネコの口腔の構造により、通常外科的処置で処理することができない。現在、この腫瘍の効果的な治療法はない。本研究に先立ち、ネコの各々について完全な臨床検査及び生検を行い、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）によりスキャンした。舌下腺口扁平上皮腫瘍と診断されたネコは本研究から除外した。そのような腫瘍の結果、舌が麻痺することがあり、処置によって腫瘍が死滅しても、そのような動物は自分で食餌を採ることができなくなる。長期間に亘りネコの各々に繰り返し処置を行う。治療期間の間毎日と、その後の再チェックの際に腫瘍を撮影する。治療後、各ネコをもう一度ＣＴスキャンする。ＣＴスキャンと胸部Ｘ線写真をその後８週毎に評価する。対照群と比較した場合の生存、応答、及び毒性の差異についてデータの評価を行う。ポジティブな応答には、腫瘍の退化と、好ましくは生命力の向上及び／又は余命の延長が証明されることが必要である。

10

加えて、イヌ、ネコおよびヒヒの他の自然動物の腫瘍、例えば線維肉腫、腺癌、リンパ腫、軟骨腫又は平滑筋肉腫も試験されうる。これらのうちで、その外観および行動がヒトのそれと非常に類似しているので、イヌおよびネコの乳房腺癌は好適なモデルである。しかしながら、このモデルの使用は、動物のこの種の腫瘍がまれであるため制限される。

20

【０１１４】

血管形成又は血管性活性を評価するためのアッセイ

本発明のアゴニスト、プロジェニター、アンタゴニストの血管形成促進、抗血管形成、血管促進性又は血管阻害性の活性を測定するのに有用なアッセイ法は、実施例１４及び２６のアッセイ及び以下に示すような当分野に公知の他の好適なアッセイを含む。

創傷治癒活性のアッセイには、例として、論文Eaglstain及びMertz, J. Invest. Dermatol., 71: 382-384 (1978)に変更されたWinter, Epidermal Wound Healing, Maibach, HI and Rovee, DT, eds. (Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago), pp. 71-112に記載のものを含む。

内皮細胞増殖のアッセイには、例として、WO 02/00690又はUnited States Patent Publication No. 20010036955A1に記載のものを含む。

30

血管形成の阻害を評価するためのアッセイには、例として、United States Patent Publication No. 20010036955A1に記載のアッセイを含む。

内皮管形成の阻害を測定するためのアッセイには、例として、United States Patent Publication No. 20010036955A1に記載のアッセイを含む。

【０１１５】

抗体結合の研究

抗体結合の研究は、競合的結合アッセイ、直接及び間接サンドウィッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイなどの既知のアッセイ法で実施してよい。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987)。

競合的結合アッセイは、標識標準物の、限られた量の抗体との結合について試験分析物と競合する能力による。試験試料中の（腫瘍細胞で増幅された遺伝子にコードされる）標的タンパク質の量は、抗体に結合し始める標準物の量に逆比例する。結合し始める標準物の量の測定を促進するために、抗体は好ましくは競合の前又は後に固定化し、抗体に結合した標準品及び分析物が未結合で残っている標準物及び分析物から容易に分離できるようにする。

40

サンドウィッチアッセイは二つの抗体の使用を含み、各々が検出すべきタンパク質の異なる免疫原部分、又はエピトープに結合できる。サンドウィッチアッセイにおいて試験試料分析物は固体支持体上に固定化された第一の抗体に結合し、その後第二の抗体が分析物に結合し、よって不溶性の３成分複合体が形成される。例えば米国特許第4,376,110号参照。第二の抗体は検出可能部分で標識され（直接サンドウィッチアッセイ）、或いは検出

50

可能部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい（間接サンドウィッチアッセイ）。例えば、サンドウィッチアッセイの一形態はELISAアッセイであり、この場合の検出可能部分は酵素である。

【0116】

STOP-1に特異的に結合し、その結合が本発明のモノクローナル抗体により阻害することができるポリペプチド、抗体又はアンタゴニストをスクリーニングするために競合的ELISAアッセイを行う。

一実施例では、実施例（例えば、実施例22）に記載の方法に従って競合的ELISAアッセイを行う。完全長又は単型の天然STOP-1タンパク質（PBS中 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ）をマイクロタイタープレート上で 4°C で一昼夜、又は室温で2時間にてコートする。ウェルに $65\mu\text{l}$ 1% BSAを加えて30分間の後、 $40\mu\text{l}$ 1% Tween20を加えてさらに30分間により反応を遮断する。続いて、ウェルをPBS - 0.05% Tween20にて5回洗浄する。異なる濃度のS7、S16、S4、F15又はS9抗体を（ELISA緩衝液中）ウェル中で30分間、室温にてインキュベートする。そうして、試験するべきポリペプチド又は抗体を、S7、S16、S4、F15又はS9抗体の無い条件下で通常90%結合能を有する濃度で異なるウェルに10分間加える。次に、ウェルをPBS - 0.05% Tween20にて5回洗浄する。結合を当分野で公知の方法により定量する。

免疫組織学のためには、腫瘍試料は新鮮でも凍結したものでもよく、パラフィンに包埋して、例えばホルマリン等の保存剤で固定してもよい。

【0117】

細胞ベースの腫瘍アッセイ

細胞ベースのアッセイ及び腫瘍などの増殖性疾患の動物モデルを用いて本発明のアンタゴニストの阻害的活性を確認する。有用な細胞ベースアッセイ、動物モデル及び方法には、例として以下の実施例に挙げるものを含む。

例えば、増殖性疾患に伴うことが公知の細胞型の細胞にここで言うSTOP-1 cDNAを形質移入して、アンタゴニストのある条件下又はない条件下で、cDNAが持つ過剰な成長を引き起こす又は成長を阻害する能力を分析する。増殖性疾患が癌の場合、好適な腫瘍細胞には、例としてB104-1-1細胞株（neuプロトオンコジーンを形質移入した安定なNIH-3T3細胞株）、及びras形質移入NIH-3T3細胞などの安定な腫瘍細胞株が含まれ、STOP-1配列を形質移入して腫瘍化成長をモニターする。そして、そのような形質移入細胞株を用いて、形質移入細胞の成長に細胞分裂防止又は細胞傷害性活性を及ぼすことにより、又は抗体依存性細胞性細胞障害性を媒介することにより腫瘍化細胞の成長を阻害するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体又は抗体構成成分の能力を試験する。

更には、安定な株化細胞が好ましいが、トランスジェニック動物から誘導された一次培地を（下記のような）、ここでの細胞ベースアッセイに使用することができる。トランスジェニック動物から連続株化細胞を誘導する技術は、この分野で良く知られている（Small等, Mol. Cell. Biol. 5, 642-648 [1985]参照）。

【0118】

遺伝子治療

疾患症状が寛解する方法及び組成物を以下に記載する。ここに記載のSTOP-1ポリペプチド（STOP-1ポリペプチド変異体を含む）、本発明のアンタゴニスト及び抗体をそれぞれインビボでの発現により本発明に従って用いてもよく、しばしば遺伝子治療と呼ばれる。例えば、これらの方法を用いてSTOP-1ポリペプチド変異体を細胞内で発現させることができる。一実施態様によると、STOP-1ポリペプチド（変異体を含む）発現に用いる方法又はベクターには、UNQポリペプチド又は抗体を内包する媒体を所望の間質性領域に方向付けるために間質性標的作用剤の使用を含む。

核酸（場合によってはベクター内に含まれたもの）を患者の細胞に入れるために：インビボ及びエキソビボという2つの主要な方法がある。インビボ送達では、核酸は、通常はSTOP-1ポリペプチドが必要とされている部位、すなわちSTOP-1ポリペプチド

の合成部位、もし知られているならばSTOP-1ポリペプチドの生物学的活性が必要とされる部位(例えば傷)に、患者に直接注入される。エキソビボ処理では、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離された細胞に導入し、修飾された細胞を患者に、直接、又は例えば患者に埋め込まれる多孔性膜にカプセル化して投与する(米国特許第4,892,538号及び第5,283,187号参照)。核酸を生細胞に導入するために利用可能な種々の技術がある。これらの技術は、核酸が培養された細胞にインビトロで移入されるか、又は対象とする宿主にインビボで移入されるかに依る。哺乳動物細胞にインビトロで核酸を移入するのに適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈降法などを含む。形質導入は、複製欠陥、組換えウイルス(好ましくはレトロウイルス)粒子の細胞レセプターとの結合、次いで粒子に含まれる核酸の細胞への導入を含む。遺伝子のエキソビボ送達に通常用いられるベクターはレトロウイルスである。

10

【0119】

現在インビボ核酸移入技術で好ましいのは、ウイルス又は非ウイルスベクター(アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスIウイルス、又はアデノ関連ウイルス(AAV))、及び脂質ベースの系(遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、例えば、DOTMA、DOPE、及びDC-Cholである;例えば、Tonkinson等, Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996) 参照)での形質移入を含む。そのようなベクターを用いて、本発明のアンタゴニスト及び核酸分子などの作用物質を運搬するための媒体として用いることができるウイルスを合成する。遺伝子治療で使用するために最も好ましいベクターはウイルス、最も好ましくはアデノウイルス、AAV、レンチウイルス、又はレトロウイルスである。レトロウイルスベクター等のウイルスベクターは、少なくとも1つの転写プロモーター/エンハンサー又は位置決定因子、あるいは選択的スプライシング、核RNA輸出、又はメッセンジャーの翻訳後修飾などの他の手段により遺伝子発現を制御する他の因子を含む。さらに、レトロウイルスベクター等のウイルスベクターは、STOP-1ポリペプチドをコードする遺伝子の存在下で転写されたとき、それに作用可能に結合し、翻訳開始配列として機能する核酸分子を含む。このようなベクターコンストラクトはまた、用いるウイルスに適したパッケージングシグナル、末端反復配列(LTR)又はその一部、及びポジティブ及びネガティブストランドプライマー結合部位を含む(これらがウイルスベクターに既に存在しない場合)。さらに、これらのベクターは、典型的には、それらが配置される宿主細胞からSTOP-1ポリペプチドを分泌させるシグナル配列を含む。好ましくは、この目的のためのシグナル配列は哺乳動物シグナル配列、最も好ましくはSTOP-1ポリペプチドのための天然シグナル配列である。場合によっては、ベクターコンストラクトは、ポリアデニル化並びに一又は複数の制限部位を指向するシグナル及び翻訳終結配列も含む。例として、このようなベクターは典型的には5'LTR、tRNA結合部位、パッケージングシグナル、第二鎖DNA合成の開始点、及び3'LTR又はその一部を含む。非ウイルスの他のベクター、例えばカチオン性脂質、ポリリジン、及びデンドリマーを用いることもできる。一実施態様によると、媒体は間質性標的作用剤を有する。

20

30

【0120】

幾つかの状況では、核酸供給源を標的細胞をターゲティングする試薬、例えば細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターのリガンドなどとともに提供するのが望ましい。リポソームが用いられる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質が、ターゲティング及び/又は取り込みの促進のために用いられ、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクリングにおいて内部移行を受けるタンパク質の抗体、及び細胞内局在化をターゲティングし細胞内半減期を向上させるタンパク質である。レセプター媒介エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wu等, J. Biol. Chem., 262:4429-4432 (1987)及びWagner等, Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 3410-3414 (1990)に記載されている。現在知られている遺伝子標識化及び遺伝子治療プロトコルの概説については、Anderson等, Science, 256:808-813 (1992)を参照のこと。また、WO 93/25673及びそこに引用された参考文献も参照。

40

50

好適な遺伝子治療及びレトロウイルス粒子及び構造タンパク質の作成方法は、米国特許第5,681,746号に見出される。

【0121】

STOP-1 変異体の検出

また本発明は、診断法としてのSTOP-1ポリペプチドをコードする遺伝子の用途に関する。変異した形態のSTOP-1ポリペプチドの検出は、増殖性疾患の発生の傾向を示唆する。ある哺乳動物の組織中のSTOP-1ポリペプチドのレベルが正常哺乳動物の同じ組織中のレベルを上回って検出されても、増殖性疾患の発生の傾向を示唆する（以下）。

ヒトSTOP-1ポリペプチドをコードする遺伝子に変異体を担持する個人は、種々の技術でDNAレベルが検出される。診断用の核酸は患者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織バイオプシー、及び検屍物質から得ることができる。ゲノムDNAは、分析の前にPCRを使用して酵素的に増幅させる(Saiki等, Nature, 324:163-166(1986))か、又は直接検出に使用することができる。RNA又はcDNAは同じ目的のために使用することができる。例として、STOP-1ポリペプチドをコードする核酸に相補的なPCRプライマーを、STOP-1ポリペプチド変異体の同定及び分析に使用することができる。例えば、欠失及び挿入は正常な遺伝子型と比較した増幅産物の大きさの変化により検出することができる。点変異(point mutations)は、STOP-1ポリペプチドをコードする放射能標識されたRNA、又はSTOP-1ポリペプチドをコードする放射能標識されたアンチセンスDNA配列に対し、増幅DNAをハイブリダイゼーションさせることにより同定することができる。好ましい適合配列はRNアーゼA消化又は溶解温度の相違により非適合二重鎖と区別することができる。

【0122】

DNA配列の相違に基づく遺伝子試験は、変性剤有又は無のゲル中でのDNA断片の電気泳動移動度の変化を検出することにより達成される。小配列の欠失及び挿入は高解像度のゲル電気泳動により可視化することができる。異なる配列のDNA断片は、変性ホルムアミジン勾配ゲルにおいて区別され、異なるDNA断片の移動は、特定の溶解又は部分的な溶解温度により、ゲルの異なる位置で阻害される。例えば、Myers等, Science, 230:1242(1985)。

また特定の位置における配列変化はヌクレアーゼ保護アッセイ、例えばRNアーゼ及びSI保護、又は化学的切断方法、例えばCotton等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:4397-4401(1985)により明らかになる。

よって、特定のDNA配列の欠失はハイブリダイゼーション、RNアーゼ保護、化学的切断、直接DNA配列化、又は制限酵素、例えば制限断片長のポリモルフィズム(RFLP)の使用、及びゲノムDNAのサザンブロット等の方法により達成することができる。

また、より一般的なゲル電気泳動法及びDNAシーケンスに加えて、STOP-1ポリペプチド中の変異はインサイツ分析により検出することができる。

【0123】

STOP-1ポリペプチド又は核酸レベルの検出

例えば、ここに記載の試薬を、インサイツハイブリダイゼーション、RT-PCR、ノーザンブロット法等の当分野で公知の方法により、又はここに提供する実施例及び試薬を用いることによってSTOP-1ポリペプチド又は核酸分子のレベルを検出することができる。

STOP-1ポリペプチドに特異的な抗体を固体支持体に固定し、標識したSTOP-1ポリペプチド及び宿主由来の試料を固体支持体に通過させ、固体支持体に接着した検出標識の量が試料中のSTOP-1ポリペプチドの量と相関しているという、競合的アッセイを行う。

一実施態様では、ここに記載のSTOP-1に特異的に結合する抗体を用いてSTOP-1タンパク質レベルをモニターする。

【0124】

候補薬のスクリーニングアッセイ

本発明は、STOP-1ポリペプチドを模倣する（アゴニスト）又はSTOP-1ポリペプチドの効果を阻害する（アンタゴニスト）ものを同定するための化合物のスクリーニング方法も包含する。一般に、STOP-1ポリペプチドを様々な条件下にてインキュベーション又は接触させることによって薬剤候補に曝す。アンタゴニスト候補薬のスクリーニングアッセイは、天然のSTOP-1ポリペプチドに特異的に結合する又は複合体を形成する化合物を同定するように設計される。このようなスクリーニングアッセイは、それを特に小分子候補薬の同定に適したものにすると、化学的ライブラリのハイスループットスクリーニングに適用可能なアッセイを含む。

このアッセイは、STOP-1ポリペプチド、それらの断片、又はSTOP-1ポリペプチド又はそれらの断片を発現する細胞と組み合わせて、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ、及び細胞ベースのアッセイを含む方式で行われうる。

アンタゴニストについての全てのアッセイは、それらが候補薬をここで同定された核酸にコードされるSTOP-1ポリペプチドと、これら2つの成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間で接触させることを必要とすることにおいて共通する。

【0125】

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。例えば、以下の実施例に記載のアッセイでは候補アンタゴニストのある条件下又はない条件下で癌細胞又は内皮細胞に対するSTOP-1ポリペプチドの結合が行われ、アンタゴニストが細胞へのSTOP-1の結合を遮断したかどうかを評価することができる。他の実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるSTOP-1ポリペプチド又は候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をSTOP-1ポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化されるSTOP-1ポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、それを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体によって検出できる。

【0126】

候補化合物が相互作用するがここに同定した遺伝子にコードされる特定のSTOP-1ポリペプチドに結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Chevray及びNathans [Proc.Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)] に開示されているようにして、Fields及び共同研究者等 [Fields及びSong, Nature(London) 340, 245-246 (1989); Chien等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991)] に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより監視することができる。酵母菌GAL4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「ツーハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-lacZリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依

存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、 β -ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定のタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット (MATCHMAKER(商品名)) は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

【0127】

S T O P-1 ポリペプチドと他のS T O P-1 ポリペプチドを含む他のタンパク質との結合を阻害する化合物は、次のように試験できる：通常は反応混合物は、S T O P-1 ポリペプチドと他のタンパク質を、それら2つのタンパク質が相互作用及び結合する条件下及び時間で含むように調製される。候補化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在及び存在下で実施される。さらに、プラシーボを第3の反応混合物に添加してポジティブ対照を提供してもよい。混合物中に存在する試験化合物と他のポリペプチドとの結合(複合体形成)は上記のように監視される。試験化合物を含有する反応混合物ではなく対照反応における複合体の形成は、試験化合物がS T O P-1 ポリペプチドと他のポリペプチドとの相互作用を阻害することを示す。

増殖アッセイにおいて、S T O P-1 ポリペプチドが同時有糸分裂促進物質C o n Aの存在下で内皮細胞の増殖を刺激する能力を有している。特に、ヒト臍帯静脈内皮細胞を得、96-ウェル平底培養皿(Costar, Cambridge, MA)で培養し、細胞の増殖を容易にするのに適切な反応混合物を補い、該混合物はC o n -A (Calbiochem, La Jolla, CA)を含有している。C o n -A及びスクリーニングされる化合物を添加し、37°Cでインキュベートした後、培養物を³-Hチミジンで標識し、ガラス繊維フィルター上に収集する(p h D ; Cambridge Technology, Watertown, MA)。3媒体の平均³-Hチミジン取り込み(cpm)を、液体シンチレーション計測器を使用して測定する(Beckman Instruments. Irvine. CA)。有意な³-(H)チミジン混入率が内皮細胞の刺激において示された。

【0128】

一実施態様によると、上記に記載のアッセイ又は以下の実施例に記載のようなアッセイを行って、本発明のアンタゴニストを試験する。あるいは、競合的阻害アッセイに好適な条件下にてS T O P-1 ポリペプチド及び潜在的アンタゴニストを非標識の(cold) S T O P-1 ポリペプチドに結合させることによって検出することができる。放射性活性法又は比色分析法などによりS T O P-1 ポリペプチドを標識して、結合したS T O P-1 ポリペプチドの数により潜在的アンタゴニストの有効性を判定することができる。S T O P-1 ポリペプチドは、部位特異的プロテインキナーゼの認識部位のヨード化又は包含を含む様々な手段によって標識することができる。その後固定及びインキュベーション、スライドをオートラジオグラフィ分析のために行う。

薬剤候補には、制限するものではないが、ヒト抗体ないし抗体断片だけでなくポリー及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗イディオタイプの抗体、及びそのような抗体又は断片のキメラ又はヒト化型を含む抗S T O P-1 抗体を含む。あるいは、薬剤候補は、非常に関連したタンパク質、例えばS T O P-1 ポリペプチドの作用を競合的に阻害するS T O P-1 ポリペプチドの変異型でありうる。

【0129】

投与プロトコール、スケジュール、用量及び製剤

ここに記載された分子及びそれらのアンタゴニストは、上述した種々の疾患及び病気の予防及び治療薬として製薬的に有用である。

本発明のポリペプチド、抗体又はアンタゴニストの治療用組成物は、適当な純度を持つ所望の分子を任意の製薬的に許容可能な担体、賦形剤、又は安定化剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A.編, (1980)) と、凍結乾燥した製剤又は水溶液の形態で混合することにより調製することができる。許容可能な担体、賦形剤、又は安定化剤は、好ましくは用いられる投与量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む

酸化防止剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンザルコニウムクロライド；ベンゼトニウムクロライド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び／又はTWEENTM、PLURONICSTM又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。

10

【0130】

このような担体の更なる例は、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清アルブミン、例えばヒト血清アルブミン、緩衝物質、例えばリン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、塩、又は電解質、例えば硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイダルシリカ、マグネシウムトリシリケート、ポリビニルピロリドン、セルロースベースの物質、及びプロピレングリコールである。局所用又はゲルベースの形態の担体は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース又はメチルセルロース等の多糖類、ポリビニルピロリドン、ポリアクリレート、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレンブロックコポリマー、ポリエチレングリコール、及びモクロウアルコールを含む。あらゆる投与について、従来のデポー形態が好適に用いられる。このような形態は、例えば、マイクロカプセル、ナノ-カプセル、リポソーム、硬膏剤、吸入形態、鼻スプレー、舌下錠剤、及び除放性製剤を含む。STOP-1ポリペプチド又はアゴニスト又はアンタゴニストは、典型的にはそのような媒体中に約0.1mg/mlから100mg/mlの濃度で処方される。

20

【0131】

他の調製物は、形成された製品中に、STOP-1ポリペプチド又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニストを導入して含有される。このような製品は内皮細胞の成長及び血管形成の調節に使用することができる。加えて、腫瘍侵入及び転移をこれらの製品で調節できる。

30

インビボ投与に用いられるSTOP-1ポリペプチド又はアゴニスト又はアンタゴニストは無菌でなければならない。これは、凍結乾燥及び再形成の前又は後の滅菌濾過膜を通した濾過によって容易に達成される。STOP-1ポリペプチドは通常は凍結乾燥形態又は全身投与される場合には溶液中に貯蔵される。凍結乾燥形態にある場合、STOP-1ポリペプチド又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニストは典型的には使用時の適当な希釈剤を含む他の成分と組み合わせて処方される。STOP-1ポリペプチド又はアゴニスト又はアンタゴニストの液体製剤の例は、無菌の、透明な、無色の生鮮溶液で、皮下注射用の1回投与バイアルに充填されている。繰り返し使用に適切な防腐製薬組成物は、例えばポリペプチドの種類及び指示に主として依存し、

40

- a) STOP-1ポリペプチド又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニスト；
- b) 溶液中のポリペプチド又は他の分子の安定性を最大にする範囲内のpH、好ましくは約4-8のpHを維持可能なバッファー；
- c) 主として、攪拌誘発性集合体に対しポリペプチド又は分子を安定化させる洗浄剤／界面活性剤；
- d) 等張剤；
- e) フェノール、ベンジルアルコール及びベンゼトニウムハロゲン化物、例えば塩化物の群から選択される防腐剤；及び
- f) 水；

50

を含有し得る。

【0132】

使用される洗浄剤が非イオン性であるならば、それは、例えばポリソルベート(例えば、POLYSORBATETM (TWEENTM) 20、80等)、又はポロキサマー(例えば、POLOXAMERTM 188等)であってよい。非イオン性界面活性剤を使用することにより、タンパク質の変性を引き起こすことなく、表面応力の剪断に調製物をさらすことができる。さらに、このような界面活性剤含有調製物は、エアゾール装置、例えば呼吸器投与、及びニードレスジェット注入ガンに使用されるものにおいて、使用され得る(例えば、EP257,956を参照)。

等張剤は、STOP-1ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの液体組成物を確実に等浸透圧とするために存在し、多価糖アルコール、好ましくは3価又は高級糖アルコール、例えばグリセリン、エリトリール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール及びマンニトールが含まれる。これらの糖アルコールは、単独で、又は組合せて使用することもできる。また、塩化ナトリウム又は他の適切な無機塩を、溶液を等にするために使用してもよい。

バッファは、所望するpHに応じて、アセタート、クエン酸、スクシナート又はホスファートバッファであってよい。本発明の液状調製物の一種類のpHは、約4から8、好ましくはほぼ生理学的pHの範囲に緩衝される。

防腐剤、フェノール、ベンジルアルコール及びベンゼトニウムハロゲン化物、例えば塩化物は、使用可能な周知の抗菌薬である。

【0133】

治療用STOP-1ポリペプチド又は抗体組成物は、一般的に無菌のアクセスポートを具備する容器、例えば、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針で穿孔可能なストッパーを具備するバイアルに配される。製剤は、好ましくは静脈内(i.v.)、皮下(s.c.)、又は筋肉内(i.m.)の繰り返し注射として、あるいは鼻内又は肺内送達に適したエアロゾル製剤として投与される(肺内送達については、例えばEP 257,956参照)。

また、STOP-1ポリペプチド又は抗体は持続放出製剤の形態で投与することもできる。持続放出製剤の好適な例は、タンパク質を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、当該マトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、Langer等, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981)及びLanger, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)に記載されたようなポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール)、ポリアクチド(米国特許第3,773,919号、EP 58,481)、L-グルタミン酸及びガンマエチル-L-グルタメートのコポリマー(Sidman等, Biopolymers, 22: 547-556 (1983))、非分解性エチレン-酢酸ビニル(Langer等, 上掲)、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLupron Depot TM(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能な微小球)、及びポリ-D-(−)-3-ヒドロキシブチル酸(EP 133,988)を含む。

【0134】

エチレン-酢酸ビニルや乳酸-グリコール酸等の重合体は100日以上分子を放出できるが、特定のヒドロゲルはより短い時間タンパク質を放出する。カプセル化タンパク質は、長時間体内に残存すると、37℃で水分に曝されることで、変性又は凝集し、生理活性の喪失や免疫原生の変化のおそれがある。かかる機構によって安定性を得るための合理的な処置が考えられる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合であることが分かったら、スルフヒドリル残基を変更し、酸性溶液から凍結乾燥し、水分量を調整し、適当な添加物を使用し、特定の重合体マトリクス化合物を開発することで安定性を保証することができる。

STOP-1ポリペプチド及び抗体の持続放出組成物は、リポソーム的に包括されたSTOP-1ポリペプチドを含む。STOP-1ポリペプチドを含有するリポソームは、それ自体周知である方法、例えば、DE 3,218,121、Epstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. US

10

20

30

40

50

A, 82:3688-3692 (1985); Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 特願昭83-118008; 米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号; 及びEP 102,324等による方法によって調製する。通常、リポソームは、脂質含有量が約30モル%以上コレステロールであり、選択される割合が最適な治療法に対して調整された微小(約200-800オングストローム)な単ラメラ状のものである。

【0135】

STOP-1ポリペプチド又はそのアンタゴニストの治療的有効量は、当然のことながら、治療(予防を含む)すべき増殖性疾患、投与方法、治療に用いられる化合物の型、包含される任意の同時治療、患者の年齢、体重、一般的な医学的状態、病歴などの要因によって変化し、それは担当する医師の技量の範囲内で良好に決定される。従って、治療者は、最大の治療効果が得られるように、投与量を滴定し投与経路を修正する必要がある。臨床医は投与量が当該病状の治療において所望する効果が得られるまで、STOP-1ポリペプチド又はアンタゴニストを投与するであろう。例えば、目的が癌の治療である場合、癌の成長を阻害する量とされる。

上記の指針では、有効投与量は、一般的に約0.001から約1.0mg/kg、好ましくは約0.01-1.0mg/kg、最も好ましくは約0.01-0.1mg/kgの範囲内である。

【0136】

増殖性疾患の治療における非経口用途では、注射の形態で、体重1kg当たり約0.01から50mg、好ましくは約0.05から20mg、最も好ましくは1から20mgのSTOP-1ポリペプチド又はそのアンタゴニストを、静脈内注射により1日に1から3回投与するのが有利である。経口投与では、STOP-1ポリペプチドをベースとする分子を、好ましくは体重1kg当たり約5mgから1g、好ましくは約10から100mg、1日に1から3回投与する。内毒素汚染物質、安全レベルの最小量、例えば0.5ng/mgタンパク質未満に保持すべきである。さらにヒト投与では、調製物は好ましくは滅菌され、発熱性であり、一般的に安全で、FDA Office and Biologics standardsで要求されるようにして精製される。

組織再生に使用されるSTOP-1ポリペプチドを含有する製薬組成物の用量計画は、ポリペプチドの作用を変える種々の要因、例えば、形成が望まれる組織の重量、障害の部位、障害を受けた組織の状態、傷の大きさ、障害を受けた組織のタイプ(例えば骨)、患者の年齢、性別、食餌、感染症の重傷度、投与時間、及び他の臨床的要因を考慮して、担当する医師により決定されるであろう。用量は、再構成に使用されるマトリックスの種類、製薬組成物の他のタンパク質含有物により変わり得る。例えば、他の周知の成長因子、例えばIGF-Iを最終組成物に添加すると、さらに用量に影響を与える。進行状況は組織/骨の成長及び/又は修復を、例えばX線、組織形態測定(histomorphometric determinations)及びテトラサイクリン標識化により、定期的に評価することにより監視可能である。

【0137】

STOP-1ポリペプチド又はアンタゴニスト又はアゴニスト投与の経路は周知の方法に従い、例えば静脈内、筋肉内、脳内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、眼内、関節内、滑膜内、包膜内、経口、局所又は吸入経路による注射又は注入、あるいは以下に記載する持続放出系による。またSTOP-1ポリペプチド又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニストは腫瘍内、腫瘍周辺、病巣内、又は病巣周辺経路で好適に投与され、局所的並びに全身に治療効果を発揮する。腹腔内経路は、例えば卵巣腫瘍の治療に特に有用であることが预期されている。

ペプチド又は小分子がアンタゴニスト又はアゴニストとして使用される場合、好ましくは、液体又は固体の形態で経口的又は非経口的に哺乳動物に投与される。

塩を形成し下記において有用な分子の薬理学的に許容可能な塩類の例には、アルカリ金属塩(例えばナトリウム塩、カリウム塩)、アルカリ土類金属塩(例えばカルシウム塩、マグネシウム塩)、アンモニウム塩、有機塩基塩(例えばピリジン塩、トリエチルアミン塩)

、無機酸塩(例えば塩酸、硫酸塩、硝酸塩)及び有機酸塩(例えば酢酸塩、シュウ酸塩、p-トルエンスルホン酸塩)が含まれる。

ここで記載され、骨、軟骨、腱、又は靱帯再生に有用な組成物における治療方法には、移植又は装置としての、局所的(topically)、全身的又は局部的(locally)な組成物の投与が含まれる。投与した場合、有用な治療用組成物は、発熱物質を含有しない生理学的に許容可能形態である。さらに組成物は、骨、軟骨又は組織のダメージ部位に送達される粘性のある形態で注射されるかカプセル化されることが望ましい。局所的投与は傷の治癒及び組織の修復に適している。好ましくは、骨及び／又は軟骨の形成のためには、組成物は、骨及び／又は軟骨のダメージ部位にタンパク質含有組成物を送達せしめ、好ましくは体内に再吸収可能な骨及び軟骨を発育する構造体を提供することのできるマトリクスを含む。このようなマトリクスは他の移植医療用途に使用される材料で作成される。

10

【0138】

マトリクス材料の選択は、生物学的融和性、生物分解性能、機械的特性、美容的外観、及び界面活性に基づく。組成物の特定の用途は、適切な処方により定義される。組成物の潜在的マトリクスは生物分解性であり、化学的に定義される硫酸カルシウム、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、及びポリ無水物であってよい。他の潜在的マトリクスは生物分解性で生物学的に明確に定義された、例えば骨又は真皮コラーゲンである。さらなるマトリクスは純粋タンパク質又は細胞外マトリクス成分からなる。他の潜在的マトリクスは、非生物分解性であり、化学的に定義された、例えば焼結ヒドロキシアパタイト、生体ガラス、アルミナート、又は他のセラミックスである。マトリクスは上述した任意の種類の材料、例えばポリ乳酸とヒドロキシアパタイト又はコラーゲンとリン酸三カルシウムの組合せからなるものであってもよい。生物セラミックは組成において、例えばカルシウム-アルミナート-ホスファートに変えてもよく、孔サイズ、粒子サイズ、粒子形状及び生物分解性能を変更するためのプロセスが施されていてもよい。

20

特定の一実施態様では、乳酸とグリコール酸が50：50(モル重量)のコポリマーであり、150から800ミクロンの範囲の直径を有する多孔質粒子の形態である。いくつかの用途において、金属イオン封鎖剤、例えばカルボキシメチルセルロース、又は自己移植血塊を利用し、マトリクスからの分離からポリペプチド組成物を保護するのに有用である。

30

【0139】

一好適なファミリーの金属イオン封鎖剤は、セルロース材料、例えばメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース及びカルボキシメチルセルロースを含むアルキルセルロース(ヒドロキシアルキルセルロースを含む)であり、好ましくはカルボキシメチルセルロース(CMC)のカチオン塩である。他の好ましい金属イオン封鎖剤には、ヒアルロン酸、アルギニン酸ナトリウム、ポリ(エチレングリコール)、ポリオキシエチレンオキシド、カルボキシビニルポリマー、及びポリ(ビニルアルコール)が含まれる。ここで有用な金属イオン封鎖剤の量は、調製物の全量に基づき、0.5-20重量%、好ましくは1-10重量%であり、ポリマーマトリクスからのポリペプチド(又はそのアンタゴニスト)の脱着を防止し、組成物に適切な操作性を付与し、さらに原細胞のマトリクスへの浸透を防止し、よって、ポリペプチドに原細胞の骨形成活性を助長する機会を付与するのに必要な量である。

40

【0140】

組合せ治療

当問題となる疾患の防止又は治療におけるSTOP-1ポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニストの効力は、同じ組成物又は別個の組成物において、これらの目的のために有効な他の薬剤と組合せるか、又は活性剤を連続して投与することにより改善される。

例えば、細胞増殖性疾患の治療にはSTOP-1ポリペプチドアンタゴニスト療法を細

50

胞障害性剤などの細胞増殖の他のインヒビターの投与と組み合わせる。

加えて、癌の治療に用いる S T O P - 1 ポリペプチドアンタゴニストは、上記に同定したような細胞障害性剤、化学療法剤又は成長阻害性剤と組み合わせる。また、癌治療のために、S T O P - 1 ポリペプチドアンタゴニストは好適に連続して、又は照射ないし放射性物質の投与何れかの放射線療法と組み合わせ投与する。

また、抗体を癌の治療に使用する場合、他の腫瘍関連抗原に対する抗体、例えば一又は複数の E r b B 2、E G F R、E r b B 3、E r b B 4、又は V E G F レセプターに結合する抗体を投与することも好ましい。あるいは、又はそれに加えて、ここで開示されており、同じか、又は二又はそれ以上の異なる抗原に対して結合する二又はそれ以上の抗体を、患者に同時投与してもよい。ときどきは、患者に一又は複数のサイトカインを投与することも有利である。好ましい一実施態様では、このアンタゴニスト抗体は、成長阻害剤と同時投与される。例えば、まず成長阻害剤を投与し、続いて本発明のアンタゴニスト抗体を投与する。しかしながら、同時投与、又は本発明のアンタゴニスト抗体を最初に投与することも考えられる。成長阻害剤についての適切な用量は現在用いられている量であるが、成長阻害剤とこの抗体との組み合わせ（相乗）効果により減少させ得る。

【0141】

一実施態様において、腫瘍の血管新生は、組合せ治療において攻撃される。本発明のアンタゴニスト抗体及び他の抗体(例えば抗-V E G F)は、例えば腫瘍又は転移病巣の壊死がみられるように決定された治療的有効量で、腫瘍を有する患者に投与される。この治療は、好ましい効果が観察されるか、又は腫瘍又は任意の転移病巣の痕跡がなくなるまで続けられる。ついで、T N Fを、単独又は、補助剤、例えばアルファ-、ベータ-又はガンマ-インターフェロン、抗-H E R 2 抗体、ヘレグリン(heregulin)、抗ヘレグリン抗体、D-因子、インターロイキン-1(I L - 1)、インターロイキン-2(I L - 2)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(G M - C S F)、又は腫瘍中の微細血管凝固促進剤、例えば抗-プロテインC抗体、抗-プロテインS抗体、又はC 4 b結合プロテイン(1991年2月21日公開のW091/01753)と組み合わせ投与する。

S T O P - 1 ポリペプチド又はそのアンタゴニストと組合せて投与される治療薬の有効量は、医師又は獣医の裁量による。投与量とその調節は治療される病状に最大の治療効果が達成されるようになされる。用量は、治療される特定の患者及び使用される治療薬の種類等の因子に依存する。典型的には、使用される量は、治療薬を S T O P - 1 ポリペプチドと共に投与しない場合と同じ用量である。

【0142】

製造品

上述した疾患の診断又は治療に有用な S T O P - 1 ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを含むキットのような製造品は、少なくとも1つの容器及びラベルを具備する。適切な容器には、例えばボトル、バイアル、シリンジ及び試験管が含まれる。容器はガラス又はプラスチックのような種々の物質から形成できる。容器は、症状の診断又は治療に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る(例えば、容器は皮下注射針で穿孔可能なストッパーを具備する静脈内バッグ又はバイアルであってよい)。組成物中の活性剤は S T O P - 1 ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストである。容器上又は添付されるラベルには、組成物が選択した症状の診断又は治療に使用されることが示されている。この製造品は、製薬的に許容可能なバッファー、例えばリン酸緩衝塩水、リンガー液、及びデキストロース溶液を収容した第2の容器をさらに具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用説明書を備えた包装挿入物を含む、商業的及び使用者の立場から望ましい他の材料を具備してもよい。また、この製造品は、上述の他の活性剤を収容した第2又は第3の容器を具備してもよい。

【0143】

ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクロー

10

20

30

40

50

ナル抗体は、例えば免疫剤、及び所望するのであればアジュバントを、一又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫剤及び／又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。免疫剤は、S T O P-1 ポリペプチド又はその融合タンパク質を含みうる。免疫剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質に抱合させるのが有用である。このような免疫原タンパク質の例は、これらに限られないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターが含まれる。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びM P L-T D Mアジュバント（モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコラート）が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

10

【0144】

モノクローナル抗体

抗S T O P-1抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、Koehler及びMilstein, Nature, 256:495 (1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を用いるなどして調製する、又は組み換えDNA法（米国特許第4,816,567号）により作製する、又は実施例の項目に記載の方法によって生成することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫剤により免疫化することで、免疫剤に特異的に結合する抗体を生成するか或いは生成可能なリンパ球を誘発する。或いは、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。

免疫剤は、典型的には対象とするS T O P-1ポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球（「P B L」）が使用され、或いは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, New York, Academic Press, (1986) pp. 59-103]。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髓腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髓腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(H G P R T又はH P R T)を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプチリン及びチミジンを含み（「H A T培地」）、この物質がH G P R T欠乏性細胞の増殖を阻止する。

20

30

【0145】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、H A T培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髓腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやメリーランド州ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓腫株化細胞も開示されている [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]。

40

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、S T O P-1ポリペプチドに対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(R I A)や酵素結合免疫測定法(E L I S A)等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスクヤッチャード解析法によって測定することができる。

【0146】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈法によりサブクローニ

50

ングし、標準的な方法で成長させることができる [Goding, 上掲]。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの改変イーグル培地及び R P M I - 1 6 4 0 培地が含まれる。或いは、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビボで腹水として成長させることもできる。

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテイン A - セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製方法によって培養培地又は腹水液から単離又は精製される。

【0147】

また、モノクローナル抗体は、組換え D N A 法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作製することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードする D N A は、常套的な方法を用いて（例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して）、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのような D N A の好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、D N A は発現ベクター内に配することができ、これが宿主細胞、例えばサル C O S 細胞、チャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞、或いは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髓腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、D N A は、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより [米国特許第4,816,567号；Morrison等, 上掲]、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、或いは本発明の抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られている。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防止するように F c 領域の任意の点で切断される。或いは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。

一価抗体の調製には、同じくインビトロ法が適している。抗体の消化による、その断片、特に F a b 断片の生成は、当該分野において知られている慣用的技術を使用して達成が可能である。

【0148】

ヒト及びヒト化抗体

抗 S T O P - 1 抗体は、更にヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト（例えばマウス）抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖或いはその断片（例えば F v、F a b、F a b'、F（a b'）₂ 或いは抗体の他の抗原結合サブ配列）であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域（C D R）の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）の C D R の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンの F v フレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入された C D R もしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全て或いはほとんど全ての C D R 領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全て或いはほとんど全ての F R 領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの実質的に全てを含む。好ましくは、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（F c）、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる [Jones等, Nature, 321:522-525 (1986)；Riechmann等, Nature, 332:323-329 (1988)；及び Presta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]。

【0149】

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一つ又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に齧歯動物のCDR又はCDR配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりウィンター(Winter)及び共同研究者〔Jonesら, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmannら, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyenら, *Science*, 239:1534-1536 (1988)〕の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、原型のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

10

【0150】

ヒト化の別法として、ヒト抗体を生成することができる。例えば、現在では、免疫化することで、内因性免疫グロブリンの産生がなく、ヒト抗体の全レパートリーを産生することのできるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(JH)遺伝子のホモ接合体欠失によって、結果として内因性抗体産生の完全な阻害が起こることが説明されてきた。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列の、このような生殖細胞系突然変異体マウスへの転移によって、結果として抗原投与時にヒト抗体の産生が起こる。Jakobovits等, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits等, *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggeman等, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); 米国特許第5545806号、同5569825号、同5591669号(全てジェンファーム(GenPharm)); 同5545807号; 及び国際公開第97/17852号を参照。あるいは、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 同第5,661,016号、及び次の科学文献: Marks等, *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg等, *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-813 (1994); Fishwild等, *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995)に記載されている。

20

30

【0151】

別法として、ファージディスプレイ技術(McCafferty等, *Nature* 348:552-553[1990])を使用して、非免疫化ドナーの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させることができる。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、フレーム単位で、繊維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdの大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子のどちらかでクローンし、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として表示させる。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択により、結果としてこれらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択が成される。よって、このファージはB細胞のいくつかの特性を模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる; 例えばJohnson, Kevin S. 及びChiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571(1993)を参照。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイのために使用できる。Clackson等, *Nature*, 352:624-628(1991)は、免疫化したマウス脾臓由来のV遺伝子の小さいランダムなコンビナトリアルライブラリーから、多様で多くの抗-オキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナーのV遺伝子のレパートリーが構成可能であり、多様で多くの抗原(自己抗原を含む)に対する抗体は、Marks等, J. Mo

40

50

l. Biol. 222:581-597(1991)、又はGriffith等, EMBO J. 12:725-734(1993)に記載の技術にそのまま従うことで単離することができる。また、米国特許第5565332号及び同5573905号を参照のこと。

【0152】

上述したように、ヒト抗体はインビトロで活性化したB細胞により産生することができる(米国特許第5567610号及び同5229275号)。

また、ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリを含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作製することもできる。Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381(1991); Marks等, J. Mol. Biol., 222:381 (1991)。また、Cole等及びBoerner等の方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる。Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss. p.77 (1985)及びBoerner等, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)。

【0153】

二重特異性抗STOP-1抗体

二重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本発明の場合においては、結合特異性の一方はSTOP-1ポリペプチドに対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。例えば、細胞表面タンパク質はナチュラルキラー(NK)細胞レセプターでありうる。そして、一実施態様によると、本発明の二重特異性抗体はSTOP-1に結合する、及びNK細胞、場合によっては活性なNK細胞に結合することができる。他の実施態様によると、本発明の二重特異性抗体はSTOP-1に結合する、及び他の組織と比較して間質性組織に結合することができる(例えば、間質性標的作用剤)。

二重特異性抗体を作製する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現に基づく[Milstein及びCuello, Nature, 305:537-539 (1983)]。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内の一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のW093/08829、及びTraunecker等, EMBO J., 10:3655-3656 (1991)に開示されている。

【0154】

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、CH2及びCH3領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするDNA、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作製するための更なる詳細については、例えばSuresh等, Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。

【0155】

また、組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作製し分離する様々な方法が記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelny等, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のFab'部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作製する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の二つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリン

カーによりV_LにV_Hを結合してなる。従って、一つの断片のV_H及びV_Lドメインは他の断片の相補的V_L及びV_Hドメインと強制的に対形成させられ、二つの抗原結合部位を形成する。単鎖F_v (s F_v) ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruber等, J. Immunol. 152:5368 (1994)を参照されたい。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等, J. Immunol. 147:60 (1991)。

【0156】

ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体は、二つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため [米国特許第4,676,980号] 及びH I V感染の治療のために [W091/00360; W092/200373; EP03089] 提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作製することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4,676,980号に開示されたものが含まれる。

【0157】

エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌治療における抗体の有効性を向上させることが望ましい。例えば、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上した内部移行能力及び／又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存性細胞性細胞障害性 (ADCC) を有する可能性がある。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff等, Cancer research 53: 2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。或いは、抗体は、二つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。

【0158】

免疫コンジュゲート

また、本発明は、化学治療薬、毒素 (例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片) などの細胞障害性薬、或いは放射性同位体 (即ち、放射性コンジュゲート) と抱合している抗体を含む免疫複合体に関する。

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬を上に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの) 外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン(modeccin) A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ (Aleurites fordii) タンパク質、ジアンチン(dianthin) タンパク質、フィトラカ・アメリカナ (Phytolaca americana) タンパク質 (PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア (momordica charantia) インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crocin)、サパオナリア・オフィシナリス (saponaria 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) 及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y、及び¹⁸⁶Reが含まれる。

【0159】

抗体及び細胞障害性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、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

10

20

30

40

50

ノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル (ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド (グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物 (ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジオソシアネート (トリエン2, 6-ジオソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物 (1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン等) を用いて作製できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら, Science 238:1098 (1987) に記載されているように調製することができる。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五酢酸 (MX-DTPA) は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。W094/11026参照。

10

他の実施態様では、腫瘍の予備標的化で使用するために、抗体は「レセプター」 (ストレプトアビジン等) に抱合されてもよく、抗体-レセプター複合体は患者に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合複合体を循環から除去し、次に細胞障害性薬 (例えば、放射性ヌクレオチド等) に抱合された「リガンド」 (アビジン等) を投与する。

【0160】

免疫リポソーム

また、ここに開示する抗体は、免疫リポソームとして調製してもよい。抗体を含むリポソームは、Epsteinら, Proc. Natl. acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang等, Proc. natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); 及び米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号に記載されたような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

20

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導ホスファチジルエタノールアミン (PEG-PE) を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、所定サイズのフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。本発明の抗体のFab'断片は、Martin等, J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームに抱合され得る。化学治療薬 (ドキソルビシン等) は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizon等, J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989) 参照。

【0161】

製薬的組成物

ここに記載のSTOP-1ポリペプチドに特異的に結合する抗体、並びに上記に開示したスクリーニングアッセイで同定された他の分子は、上記及び下記に記載のような様々な疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

30

また、リポフェクション又はリポソームを、本発明のポリペプチド、核酸分子、抗体、アンタゴニスト又は組成物を細胞に導入するために利用することができる。抗体断片が用いられる場合には、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するペプチド分子を設計することができる。このようなペプチドは、化学的に合成でき及び/又は組換えDNA技術によって生成できる。例えば、Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993) 参照。

40

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に一つ以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。或いは、又はそれに加えて、組成物は、例えば細胞障害性剤、化学療法剤又は成長阻害剤などのその機能を亢進する薬剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

【0162】

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系 (例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル

50

)中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science、上掲に開示されている。

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

【0163】

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸と γ -エチル-L-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT（商品名）（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リユープロリドからなる注射可能なマイクロスフェア）等の分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に亘って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは37℃の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を通した分子間S-S結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

【0164】

抗STOP-1抗体を用いた治療方法

STOP-1ポリペプチドに対する抗体を上述したような血管形成を悪化させる又は血管形成に関連した様々な増殖性の疾病又は疾患の治療に用いることができる。

抗体は、哺乳動物、好ましくはヒトに、周知の方法、例えば、ボーラスとして又は所定時間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入経路などにより投与される。抗体の静脈内投与が好ましい。

他の治療的処方計画を上述の本発明の抗体の投与と組み合わせてもよい。例えば、抗体で癌の治療をする場合は、このような抗体で治療される患者は放射線治療を受けてもよい。あるいは、又はそれに加えて、患者に化学治療剤を投与してもよい。このような化学治療剤の調製法及び用量スケジュールは、製造者の指示に従って使用されるか、熟練した実務者により経験的に決定される。そのような化学治療に対する調製法及び用量スケジュールはまたChemotherapy Service M.C. Perry編, (Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992)にも記載されている。化学治療剤は、抗体の投与に先立って、又は続いて投与してもよく、あるいはそれらと同時に投与してもよい。抗体は、タモキシフェン又はEVISTTM等の抗エストロゲン化合物又はオナプリストンなどの抗プロゲステロン（EP 616812参照）の、それらの分子について知られた用量で組み合わせてもよい。

【0165】

また、抗体を癌の治療に使用する場合、他の腫瘍関連抗原に対する抗体、例えば一又は複数のErbb2、EGFR、Erbb3、Erbb4、又はVEGFレセプターに結合する抗体を投与することも好ましい。また、上述した薬剤も含む。抗体は適切に連続投与されるか、又は、放射活性物質の照射又は投与を含んでも含まなくても、放射線学的治療と組合せられる。あるいは、又はそれに加えて、ここで開示されており、同じか、又は二又はそれ以上の異なる抗原に対して結合する二又はそれ以上の抗体を、患者に同時投与してもよい。ときどきは、患者に一又は複数のサイトカインを投与することも有利である。好ましい実施態様では、この抗体は、成長阻害剤と同時に投与される。例えば、まず成長阻害剤を投与し、続いて本発明の抗体を投与する。しかしながら、同時投与、又は本発明

の抗体を最初に投与することも考えられる。成長阻害剤についての適切な用量は現在用いられている量であるが、成長阻害剤とこの抗体との組み合わせ（相乗）効果により減少させ得る。

【0166】

一実施態様において、腫瘍の血管新生は、組合せ治療において攻撃される。抗-S T O P-1 ポリペプチド抗体及び他の抗体(例えば抗-V E G F)は、例えば腫瘍又は転移病巣の壊死がみられるように決定された治療的有効量で、腫瘍を有する患者に投与される。この治療は、好ましい効果が観察されるか、又は腫瘍又は任意の転移病巣の痕跡がなくなるまで続けられる。ついで、T N Fを、単独で、又は補助剤、例えばアルファ-、ベータ-又はガンマ-インターフェロン、抗-H E R 2 抗体、ヘレグリン(heregulin)、抗ヘレグリン抗体、D-因子、インターロイキン-1 (I L-1)、インターロイキン-2 (I L-2)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(G M-C S F)、又は腫瘍中の微細血管凝固促進剤、例えば抗-プロテインC抗体、抗-プロテインS抗体、又はC 4 b 結合プロテイン(1991年2月21日公開のW091/01753)、又は熱ないし照射と組み合わせて投与する。

補助剤はその有効性に応じて変わり、便宜的な方式でスクリーニングされるマトリクスにより、腫瘍における影響力と比較することが望ましい。抗-S T O P-1 ポリペプチド抗体及びT N Fの投与は、所望する臨床効果が達成されるまで繰り返される。また、抗-S T O P-1 ポリペプチド抗体は、T N F、場合によっては補助剤と共に投与される。固形腫瘍が、四肢又は一般的な循環器からの単離が可能な他の位置で見出される例では、ここに記載される治療薬は単離された腫瘍又は器官に投与される。他の実施態様において、F G F又はP D G F アンタゴニスト、例えば抗-F G F又は抗-P D G F 中和剤は、抗-S T O P-1 ポリペプチド抗体と共に患者に投与される。抗-S T O P-1 ポリペプチド抗体を用いた治療は、好ましくは傷の治療又は所望する新血管新生の期間中は中止する。

【0167】

増殖性疾患の予防又は治療のための、ここでの抗体の適切な用量は、上記で定義したような治療される疾患の型、疾患の重篤さ及び経過、防止又は治療目的で薬剤が投与されるか否か、従前の治療、患者の病歴及び抗体に対する反応、及び主治医の裁量による。抗体は、適切には患者に一回又は一連の治療に渡って適切に投与される。

例えば、疾患の型及び重篤さに応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $50\text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1-20\text{mg}/\text{kg}$ ）の抗体が、例えば、1又はそれ以上の別々の投与あるいは連続注入のいずれにしても、患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な1日の用量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ 又はそれ以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に応じて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が繰り返し替えされる又は維持される。しかしながら、他の用量計画が有用であることもある。この治療の進行は、従来の技術及びアッセイ、例えばX線腫瘍イメージングによって容易に監視される。

【0168】

製造品

また、抗体を収容する容器とラベルをも具備する製造品も提供される。このような製造品は上述しており、ここで活性剤は抗-S T O P-1 抗体である。

抗体を用いた腫瘍の診断及び予知

抗体が使用される徴候が癌である場合、或る種の腫瘍で過剰発現される成長レセプター等の細胞表面タンパク質は候補薬剤又は腫瘍（例えば、癌）治療の優れた標的であるが、S T O P-1 ポリペプチドと同じタンパク質は腫瘍の診断及び予知におけるさらなる用途が見出されている。例えば、S T O P-1 ポリペプチドに対して向けられる抗体は腫瘍の診断及び予知に使用することができる。

例えば、抗体断片を含む抗体は、S T O P-1 ポリペプチドをコードする遺伝子を含む遺伝子の発現の定性的又は定量的検出に用いることができる。抗体は、好ましくは検出可能な、例えば蛍光標識を備え、結合は光学顕微鏡、フローサイトメトリー、フルオロメトリー、又はこの分野で知られた他の技術によって監視できる。このような結合アッセイは

、実質的に上述のように実施される。

マーカー遺伝子産物に結合する抗体のインサイツ検出は、例えば、免疫蛍光又は免疫電子顕微鏡によって実施できる。この目的のために、組織学的試料を患者から取り出し、好ましくは生物学的試料に抗体を被せることにより、標識抗体をそれに適用する。この手法はまた、試験される組織におけるマーカー遺伝子産物の分布も決定できるようにする。当業者には、インサイツ検出のために広範な組織学的方法が容易に利用できることは明らかであろう。

【0169】

本明細書で引用した全ての印刷物（特許及び特許文献を含む）を、出典明示によりここに取り込む。

10

ここでの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、どれが最初であろうとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則(特に参照番号886OG638の37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

本出願の譲受人は、寄託した培養物が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと即座に取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

20

【0170】

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC登録番号により以下の実施例及び明細書全体を通して特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、VAである。特に記さない限り、本発明は上記及び以下の教科書に記載されたもののような組換えDNA技術の標準的な手法を用いた：上掲のSambrook等；Ausubel等，Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989)；Innis等，PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Inc.; N.Y., 1990)；Harlow等，Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor 1988)；Gait, Oligonucleotide synthesis (IRL Press, Oxford, 1984)；Freshney, Animal Cell Culture, 1987；Coligan等，Current Protocols in Immunology, 1991。

30

本明細書及び特許請求の範囲全体を通して、「含む」なる語彙、又は「含む」ないし「含んでいる」の変形型は、定めた完全体又は完全体の群を包含するもので、任意の他の完全体又は完全体の群を除外するものではない。

前記の明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。以下の実施例は例示的目的のためのみに示すのであり、本発明の範囲が多少なりとも限定されるものではない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に改変することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の特許請求の範囲内に入るものである。

40

【0171】

実施例

実施例1 STOP-1は進化の過程で保存される。

ヒト、マウス及びゼブラフィッシュのSTOP-1を含む核酸分子をPCRにより得た。ヒト、マウス及びゼブラフィッシュのSTOP-1に相同な配列はGenebankデータベース マウスEST: AK003674；ニワトリESTs: AL585129、AL585130；メダカESTs: BJ490431、BJ498080、BJ51

50

0203、BJ504730；及びゼブラフィッシュESTs：AL727874、AW595388；及びHGT AL844521で見つけることができる。ヒト、マウス、メダカ、ゼブラフィッシュ及びニワトリのSTOP-1のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：3、4、5、6及び7と図1に記載する。ヒトSTOP-1のcDNAは以下に示すように、ブダペスト条約の規約のもとにアメリカ培養細胞系統保存機関（ATCC），10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USAに委託した。

種	材料	委託番号	委託日
ヒト	76393-1664	203323	1998年10月6日
ヒト	h762HIP	PTA-5019	2003年2月21日

多種の高等脊椎動物種（ヒト、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュ及びメダカ）の間でのアミノ酸配列は、特に三重らせんドメインを含むC末端ドメインに高く保存される部位を示す（図1）。コンセンサス配列中のアステリスクがすべての種で保存されている残基を示す。黒丸はほとんどの種で保存されている残基を示す。

図2はヒトSTOP-1タンパク質を示す。囲みの配列はシグナル切断部位を示す。三重らせん体領域を下線で示す。

【0172】

実施例2 STOP-1は腫瘍で過剰に発現される

マイクロアレイ(GeneExpress, GeneLogic Inc., Gaithersburg, MD)から得た遺伝子発現情報を含む適切なデータベースを、多種の腫瘍でのSTOP-1 mRNAの発現について解析した(BLISST分析、GeneExpressと共に使用するためにGenentech, Inc.で開発して登録商標権を得たソフトウェア)。分析した組織のタイプには、脂肪、副腎、血管は、胸部、頸部、CNS、結腸直腸子宮内膜、食道、胆嚢、頭部及び首、心臓、造血、腎臓、肝臓、肺、リンパ系、筋肉、子宮筋層、内分泌系(euroendocrine)、卵巣、膵臓、前立腺、皮膚、小腸、軟部組織、胃、精巣、胸腺、甲状腺、及び泌尿器と、正常組織（胸部、大腸、肺、卵巣及び腎臓）が含まれる。STOP-1 mRNAレベルは、骨、胸部、頸部、結腸直腸、子宮内膜、食道、神経膠腫、頭部及び首、腎臓、肺、内分泌系(euroendocrine)、卵巣、膵臓、皮膚、軟部組織、胃、甲状腺、及び、泌尿器の腫瘍で特に高く観察された。

また、多種の腫瘍及び正常組織（胸部、大腸、肺、卵巣及び腎臓）から得た全RNAにおいて逆転写(RT)及びポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による特定の標的であるSTOP-1（配列番号：1）を増幅させることによってRNA発現を確認した。組織はGenentech病理部門から入手し、RNAは塩化セシウム遠心分離法にて調製した。

【0173】

一工程のRT-PCR反応液は、10×バッファーA(Applied Biosystems)、10単位 RNアーゼインヒビター、200 µM dATP、dCTP、dGTP、dTTP、5 mM MgCl₂、1.25単位 Taq Goldポリメラーゼ、25単位 MULV逆転写酵素(PE Biosystems)、50 ng全量RNA、200 nM 遺伝子特異的ハイブリダイゼーションプローブ(FAM-CATCCAGTAGAAGCATCTCCTTTGGGTAA-TAMRA)（配列番号：23）、300 nM 遺伝子特異的フォワードプライマー(GGGTTGGCACTTGTTTCAGA)（配列番号：24）及び300 nM 遺伝子特異的リバースプライマー(CAATAATGATGCGAGAACTGAAT)（配列番号：25）を最終体積50 µlに水で調製した。熱サイクル条件は以下の通り：1) 48 °C、30分；2) 95 °C、10分；及び3) 95 °Cで15秒及び60 °Cで1分を40サイクル、ABI 7700 配列検出システムを使用。転写レベルはハウスキーピング遺伝子GAPDH又はRPL19で標準化した。

タックマン分析によりこれら腫瘍、特に膵臓、腎臓、胸部、肺、卵巣、結腸直腸腫瘍、軟部組織、胃甲状腺および泌尿器腫瘍においてSTOP-1 mRNAの過剰発現が確認された。胸部腫瘍及び大腸腫瘍試料の18のうち14に正常試料と比較して5～27倍の過剰発現がみられた。また、他の腫瘍タイプは程度は小さいが増加がみられた。この腫瘍タイプには、副腎、骨、頸部、子宮内膜、食道、頭部及び頸部、腎臓、肝臓、及び内分泌(euroendocrine)が含まれた。

10

20

30

40

50

【0174】

実施例3 インサйтハイブリダイゼーション研究

(a) プローブ合成

12.0 μ l (125 mCi) の [α - ^{32} P] UTP (NEN/Perkin-Elmer NEG307H) をシリコン処理した1.5 μ l マイクロチューブ (Eppendorf) 中で急速吸引乾燥した。乾燥した ^{32} P-UTPを含む各チューブに、以下の試薬を加え、37°Cのウォーターバス中で1時間インキュベートした：

2.0 μ l 転写最適化5×バッファー (Promega, P1181)

2.0 μ l SQ H₂O

1.0 μ l DTT, 100 mM (Promega, P1171)

2.0 μ l rNTP混合液, 2.5 mM [10 mM rATP (Promega, P113B)、rCTP (Promega, P114B) 及びGTP (Promega, P115B) をそれぞれ10 μ l + 10 μ lヌクレアーゼフリー H₂O (Promega, P1193)]

1.0 μ l RNasin リボヌクレアーゼインヒビター (Promega, N2511)

1.0 μ l 鋳型DNA (センス鎖コントロールプローブ転写上流にあるバクテリオファージT7、及びアンチセンス鎖プローブ転写下流にあるバクテリオファージT3のRNAポリメラーゼプロモータに隣接しているヒトSTOP-1コード化配列の一部をコードしている線状PCR増幅DNA鋳型1 μ g)

転写反応液中のセンス及びアンチセンスプローブの配列：

5'-GGGAGCCATG CGACCCAGG GCCCGCCGC CTCCCCGCAG CGGCTCCGCG
GCCTCCTGCT GCTCCTGCTG CTGCAGCTGC CCGCGCCGTC GAGCGCCTCT
GAGATCCCCA AGGGGAAGCA AAAGGCGCAG CTCCGGCAGA GGGAGGTGGT
GGACCTGTAT AATGGAATGT GCTTACAAGG GCCAGCAGGA GTGCCTGGTC
GAGACGGGAG CCCTGGGGCC AATGTTATTC CGGGTACACC TGGGATCCCCA
GGTCGGGATG GATTCA -3' (配列番号:26)

1.0 μ l RNAポリメラーゼT3 (Promega, P2083)、アンチセンスプローブ用

1.0 μ l RNAポリメラーゼT7 (Promega, P2075)、センスプローブ用

【0175】

次に、1 μ l のRQ1 RNAアーゼフリーDNAアーゼ (Promega, M6101) を放射線活性標識したRNAプローブを含むエッペンドルフチューブに添加し、更に反応液を37°Cで15分間インキュベートした。この工程で鋳型DNAを分解した。分解反応を止めるために、90 μ l TE (10 mM トリス pH7.6 / 1 mM EDTA pH8.0) をエッペンドルフチューブに添加した。組み込まれなかったヌクレオチドをRNAアーゼミニキット (Qiagen 74104, Germantown, MD) を用いて除去した。

DE81イオン交換紙 (Whatman, 3658 325) の異なる円上に1 μ l のプレフィルタープローブと1 μ l の濾過を行うプローブをピペッティングすることによってプローブの回収率を決定した。試料をシンチレーションガラス瓶 (Wheaton Scientific, 986701) 中の6 ml のBiofluor (Packard, 6NEF-961) に浸し、Beckman LS 6500で数を数えた。

次に、転写産物の特有の長さを確認するために、プローブを6%ポリアクリルアミドTBE/尿素ゲル (Novex EC6865, Invitrogen, Carlsbad, CA) でプローブを分析した。1 × 10⁶ cpmのプローブ又は2 μ l の Novagen Perfect RNAマーカー 0.1 – 1 kb (Novagen 69924-1) を3 μ l TBE/尿素試料バッファー (Novex, LC6876) に添加した。RNAを95°C 3分間で熱変性させ、すぐに氷上で冷ました。試料に180 – 250ボルトの電極を45分間与えた。ゲルを増感遮蔽板と共にBiomax MSフィルム (Kodak, 829 4985) に-70°Cの冷凍室で1時間露光させた。

【0176】

(b) インサйтハイブリダイゼーション

初めに、正常及び腫瘍組織の切片についてインサイツハイブリダイゼーションを行った。以下に記載の技術を用いて、ヒトSTOP-1センス及び抗センスRNAプローブをスライドにハイブリダイゼーションさせた。更に、多くの正常及び腫瘍組織標本を含む組織マイクロアレイ (TMA) の切片について分析を行った。TMA切片をアンチセンスRNAプローブ単独でハイブリダイゼーションを行った。

37℃で一昼夜の後65℃で30分間スライドをオーブンで焼き、組織をガラスに接着させた。切片をキシレン(Richard Allen, Kalamazoo, MI)に5分ずつ3回インキュベートした後等級エタノールから蒸留水で再水和することによってLeica Autostainer XL(Leica, Deerfield, IL)で脱パラフィンした。そして、スライドを2×SSC (0.3M NaCl, 0.030M クエン酸ナトリウム, pH7.0) にて5分間ずつ2回洗浄した。スライドを20 µg/ml プロテナーゼK(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)を含む10mM トリスpH8.0/0.5M NaCl溶液にて37℃で15分間処理し、0.5×SSC (0.075M NaCl, 0.007M クエン酸ナトリウム, pH7.0) にて10分間洗浄した。スライドをエタノール勾配法(70%—95%—100%)にて再水和し、乾燥させた。スライドを100 µlのハイブリダイゼーションバッファー(50%ホルムアミド、10%デキストラン硫酸、及び2×SSC)で覆い、42℃で1—4時間プレハイブリを行った。2×10⁶ cpmの濃度の上記した[³³P]—標識一本鎖STOP-1プローブ(アンチセンス起源)を1mg/ml tRNAを含む100 µlのハイブリダイゼーションバッファーに溶解し、一スライド上にプレハイブリダイゼーションバッファーを添加し、よく混ぜて、カバーガラスで覆い、密閉した加湿容器中にて55℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

【0177】

同様に[³³P]—標識したセンス鎖起源の一本鎖STOP-1プローブを用いて同じ組織片由来のもう一つのスライドで前述のハイブリダイゼーション法を行った。

ハイブリダイゼーション後、スライドを1mM EDTAを含む2×SSCにて室温で10分間2回洗浄し、20 µg/mL RNアーゼAを含む10mM トリスpH8.0.5M NaClにて37℃で30分間インキュベートした。スライドを1mM EDTAを含む2×SSCにて室温で10分間洗浄した後、1mM EDTAを含む0.1×SSCにて55℃で30分間4回洗浄し、さらに0.5×SSCにて室温で10分間洗浄した。0.3M 酢酸アンモニウムを含む90%、70%及び50%エタノールでそれぞれ2分間ずつ再水和し、乾燥させた。

実験の成功を前評価するためにスライドをX線フィルム(Biomax MR Film, Kodak, 8701302)に16時間露光させた。ついでスライドをNTB2エマルジョン(Kodak, 1654433)[1:1に水で希釈]に浸し、暗室で一晩乾燥させ、乾燥剤と共に光密着ボックス(light tight box)内に移し、4週間露光させた。4週間後、D-19展開液[1:1に水で希釈]にて15℃で3分間展開し、すすいで、GBX固定液にて15℃で6分間固定した。病理学者による評価に先立って、スライドをヘマトキシリン及びエオジンで対比染色した。

表7にインサイツハイブリダイゼーション実験の結果を示す。

【0178】

表7

10

20

30

40

組織タイプ	正常組織 (# ポジティブ/全体)	腫瘍組織 (# ポジティブ/全体)
肺	2/16 成人	41/49 腺癌 27/30 扁平上皮癌 1/1 大細胞上皮癌 2/5 肺神経内分泌腫瘍 <u>細胞株 – 試験したすべてがネガティブ</u> Calu-6 (未分化肺上皮癌) SK-MES 細胞 (肺の扁平上皮細胞) H322 A549 (肺癌) H522
胸部	0/6 成人	2/14 成人
大腸	0/5 成人	4/8 成人
小腸	1/5 成人	-
脾臓	0/2 成人	3/5 成人
心臓	0/2 胎児 0/4 成人	- -
胎盤	0/5 成人	-
大動脈	0/1 成人	-
血管	0/1 成人	-
胸腺	0/1 成人	-
気管	0/1 成人	-
肝臓	0/3 成人	2/4 成人 肝細胞癌
甲状腺	1/3 成人	-
皮膚	1/1 成人 小胞及び真皮	4/4 成人 黒色腫
胃	0/3 成人	-
脳	0/4 成人	-

10

20

30

脾臓	0/4 成人	-
リンパ腺	0/3 成人	0/4 リンパ腫 成人
前立腺	0/3 成人	0/1 リンパ腫 成人
卵巣	1/1 成人	2/2 成人
膀胱	0/1 成人	3/3 移行上皮癌
胆嚢	0/1 成人	-
腎臓	0/2 成人	0/4 成人
副腎	0/1 成人	-
子宮内膜	-	2/3 成人
軟骨	-	0/1 軟骨性肉腫
脂肪	-	0/1 脂肪肉腫
胎児組織	0/1 大動脈、血管、胸腺、気管、肝臓、肺	-

10

インサイツハイブリダイゼーションでは、試験した正常試料のほとんどはSTOP-1 mRNAについてネガティブであることを示した。一方、驚くほど多い数の肺腫瘍、大腸腫瘍、膵臓腫瘍、肝臓癌、黒色腫、卵巣がん、子宮体癌及び膀胱移行上皮癌は、有意なSTOP-1 mRNA発現を示した。さらに、STOP-1 mRNAは、主に間質（例えば肺扁平上皮癌、腺癌、乳癌）で発現され、腫瘍性細胞でSTOP-1 mRNAを発現する黒色腫を除き大部分の腫瘍の上皮領域には発現されなかった。上皮細胞にSTOP-1 mRNA発現がある甲状腺組織を除き、STOP-1 mRNAポジティブを試験した少しの正常組織は、間質性組織に発現を示した。「-」は、組織が調べられなかったことを示す。

20

【0179】

実施例4—正常組織のSTOP-1 mRNAのノーザン分析

30

ヒト及びマウスSTOP-1 cDNAプローブ（完全長コード化配列）をランダムプライムキット(Perkin-Elmer)により放射性標識し、製造者の指示に従ってヒト多組織及びマウス胚のプロット(Clontech)解析に用いた。結果を図3A及びBに示す。

正常な成人組織のうち、胎盤、心臓及び骨格筋で最もSTOP-1 mRNAの発現が高かった（図3A）。図3Bに示すノーザンプロットでは発生中のマウス7、11、15及び17日胚でSTOP-1 mRNAの強い発現が示される。

【0180】

実施例5 STOP-1 DNAコンストラクト

(a) 哺乳動物発現

すべての野生型及び変異型ヒト、マウス及びゼブラフィッシュSTOP-1 cDNA配列はPCRにより作製し、哺乳動物細胞での発現のための合成8×HISタグコード配列(HIP)を有するpIRES pu r o 2ベクター(BD Biosciences)又はpIRES pu r o 2で発現させた。ヒトFAP cDNAはN末端pFLAG-CMVベクター(Sigma)にて発現させた。

40

【0181】

表8

コンストラクト	フォワード プライマー, 5'-3'	リバース プライマー, 5'-3'	5'/3' クローニング部位	クローニングベクター/ 注釈
<u>HIP</u>	GATCGCGGCCG CACACCACCAT CACCATCACCA TCACTAAGTGA (配列番号:27)	GGCCTCACTTAGT GATGGTGATGGT GATGGTGGTGTG CGGCCGC (配列番号:28)	BamHI/NotI	pIRESpuro2; C 末端に H I S を有する H I P 修飾起源 ベクター、2 つのアダプタ ーオリゴを有 する
zf762HIP zebrafish コンストラクト	CTGCGCTAGCA CCATGATGGGT ACTAAACTGAC TCAACTTT (配列 番号:29)	GGAAGCGGCCGC TTTTGGAAGCTCT TCAATGATCA (配列番号:30)	NheI/NotI	
m762pIRESpuro2	GAAGCTAGCAC CATGCACCCCC AAGGCCGCGCG GCCCCCGCA GCTGCTGCTCG (配列番号:31)	GAAGCGGCCGCT TATTTTCGGTAGTT CTTCAATGATGAT (配列番号:32)	NheI/NotI	pIRESpuro2
h762pIRESpuro2	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番 号:33)	CAAGCGGCCGCT TATTTTGGTAGTT CTTCAATAATGAT (配列番号:34)	NheI/NotI	pIRESpuro2
h762HIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番 号:33)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配 列番号:35)	NheI/NotI	HIP

10

20

30

40

コンストラクト	フォワード プライマー, 5'-3'	リバース プライマー, 5'-3'	5'/3' クローニング部位	クローニングベクター/注釈
ΔTHDh762HIP (1-54, 94-243, plus His)	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	TCAAAGCTTTCCC TCAGCATTCCATT ATACAGGTCCAC CACCT (配列番号:36)	NheI/HindIII	h762HIP
ΔΔTHDh762HIP (1-51, 94-243, plus His)	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	CTCAAAGCTTTCC CTCAGATACAGG TCCACCACCTCCC TCTG (配列番号:37)	NheI/HindIII	h762HIP
del-N-ter-HIP (1-32, 54-243, plus His)	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	GGGGAGCTCAGA GGCGCTCGACGG CGCGGGCA (配列番号:38)	NheI/SacI	HIP
	GAAGAGCTCAG GGAAAGCTTTG AGGAGTCCTGG A (配列番号:40)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	SacI/NotI	
h762G53AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	ACAGGTCGACCA CCTCCCTCTGCCG GAGCT (配列番号:39)	NheI/SalI	HIP
	GTGGTCGACCT GTATAATGCAA TGTGCTTACAA GGGCCAGCAGG A (配列番号:41)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	SalI/NotI	

10

20

30

40

コンストラクト	フォワード プライマー, 5'-3'	リバーズ プライマー, 5'-3'	5'/3' クローニング部位	クローニングベクター/注釈
h762N186AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	AATTGTCGACGC CATTTTCAGGGCTT CCTTGGTCCAA (配列番号:42)	NheI/SalI	HIP
	TGGCGTCGACA ATTAATATTCAT CGCACTT (配列番号:43)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	SalI/NotI	
h762C55AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	ACAGGTCGACCA CCTCCCTCTGCCG GAGCT (配列番号:39)	NheI/SalI	HIP
	GTGGTCGACCT GTATAATGGAA TGGCCTTACAA GGGCCAGCAGG AGTGCCT (配列番号:44)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	SalI/NotI	
h762C93AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	CTCAAAGCTTTCC CTCAGAGCTTCCC CCTTTTCTCCTTT GAAT (配列番号:45)	NheI/HindIII	h762HIP
h762C109AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	CCATGAGGCCTG CTTGTAGTTGGGT GTC (配列番号:46)	NheI/StuI	HIP

10

20

30

40

コンストラクト	フォワード プライマー, 5'-3'	リバーズ プライマー, 5'-3'	5'/3' クローニング部位	クローニングベクター/ 注釈
	AGCAGGCCTCA TGGAGTTCATT GAATTAT (配列番号:47)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	StuI/NotIs	
h762C126AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	TAAACGTTGCCTC CGCAATTTTCCCA AG (配列番号:48)	NheI/AclI	HIP
	GGCAACGTTTA CAAAGATGCGT TCAAA (配列番号:49)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	AclI/NotI	
h762C149AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	GCATGCATTTCTG GCTTTTAGCCGAA GTGAGCCA (配列番号:50)	NheI/NsiI	h762HIP
h762C153AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	CTGGCATGCTGC ATTTCTGCATTTT A (配列番号:51)	NheI/SphI	HIP
	GCAGCATGCCA GCGTTGGTATTT CACATTCAA (配列番号:52)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	SphI/NotI	
h762C154AHIP	AATGCATGCGC TCAGCGTTGGT ATTTCACA (配列番号:53)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	NsiI/NotI	h762HIP

10

20

30

40

コンストラクト	フォワード プライマー, 5'-3'	リバーズ プライマー, 5'-3'	5'/3' クローニング部位	クローニングベクター/ 注釈
h762C166AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	CCTGAGGCCTCA GCTCCATTGAATG TGAAA (配列番号:54)	NheI/StuI	HIP
	CTGAGGCCTCA GGACCTCTTCCC ATTGAA (配列番号:55)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	StuI/NotI	
h762C201AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	TCCGGCGCCAATT CCTTCAGCAAGTC CTCCACAGAAG AAGTGCATGAA (配列番号:56)	NheI/KasI	HIP
	ATTGGCGCCGG ATTAGTGGATG TTGCTATCT (配列番号:57)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	KasI /NotI	
h762C218AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	TGAAGCGGTACC AACCCAGATAGC AACATC (配列番号:58)	NheI/KpnI	HIP
	GGCGGTACCGC TTCAGATTACCC AAAAGGAGA (配列番号:59)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	KpnI /NotI	
h762N52AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	ACAGGTCGACCA CCTCCCTCTGCCG GAGCT (配列番号:39)	NheI/SalI	HIP

10

20

30

40

コンストラクト	フォワード プライマー, 5'-3'	リバース プライマー, 5'-3'	5'/3' クローニング部位	クローニングベクター/ 注釈
	GTGGTCGACCT GTATGCTGGAA TGTGCTTACAA GGGCCAGCA (配列番号:60)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	SalI /NotI	
h762G53AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	ACAGGTCGACCA CCTCCCTCTGCCG GAGCT (配列番号:39) Same as for h762N52AHIP	NheI/SalI	HIP
	GTGGTCGACCT GTATAATGCAA TGTGCTTACAA GGGCCAGCAGG A (配列番号:41)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	SalI /NotI	
h762M54AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	ACAGGTCGACCA CCTCCCTCTGCCG GAGCT (配列番号:39) Same as for h762N52AHIP	NheI/ SalI	HIP
	GTGGTCGACCT GTATAATGGAG CGTGCTTACAA GGGCCAGCAGG AGT (配列番号:61)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	SalI /NotI	

10

20

30

40

コンストラクト	フォワード プライマー, 5'-3'	リバーズ プライマー, 5'-3'	5'/3' クローニング部位	クローニングベクター/ 注釈
h762P63A, P69AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	TCGGCCGGCCAC TCCTGCTGGCCCT TGTA (配列番号:62)	NheI/ NgoMIV	HIP
	GTGGCCGGCCG AGACGGGAGCG CTGGGGCCAAT GGCATTCCGGG TA (配列番号:63)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	NgoMIV/Not I	
h762P75A, P78A, P81AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	TGTGCCGCAAT GCCATTGGCCCC AGG (配列番号:64)	NheI/ NgoMIV	HIP
	ATTGCCGGCAC AGCTGGGATCG CAGGTCGGGAT GGATTCAAAGG AGAAAA (配列番号:65)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	NgoMIV/Not I	
h762K87A, K90AHIP	CCAGCTAGCAC CATGCGACCCC AGGGCCCCGCC GCCT (配列番号:33)	TTCGCCGGCGAA TCCATCCCGACCT GGGAT (配列番号:66)	NheI/ NgoMIV	HIP
	TTCGCCGGCGA AGCGGGGAAT GTCTGAGGGAA AGCTTT (配列番号:67)	CAAGCGGCCGCT TTTGGTAGTTCTT CAATAATGAT (配列番号:35)	NgoMIV/Not I	
M762HIP	GAAGCTAGCAC	GAAGCGGCCGCT	NheI/NotI	HIP

10

20

30

40

CTGAG) (配列番号: 79) 及び # 1 6 1 3 4 6 (CCGGGATCCTTAATGATGATGATGATGAT) (配列番号: 77) を用いて、DNA # 8 4 6 9 4 から生成した。完全長の挿入断片は (ついで p A c G P 6 7 B 内にサブクローニングするもの)、# 1 6 1 3 4 4 及び # 1 6 1 3 4 6 を用いて PCR 反応 5' 及び 3' 断片相当部位から生成した。

【0184】

実施例 6 STOP-1 DNA コンストラクトからの発現及びタンパク質の精製

DNA コード化 STOP-1 DNA コンストラクトを、製造者 (Roche) の指示に従ってリン酸カルシウム又は f u g e n e 6 形質移入試薬を用いて CHO-DP12 細胞、CHO-psg b 細胞 (ハムスターガラクトシルトランスフェラーゼ I 欠損上皮 p g s B-6 18 CHO 細胞) (ATCC # CRL-2241) 又は 293 細胞 (Roche) 内に形質移入した。成長培地には、1 mM NiCl₂、5 mM CaCl₂ 及び 50 mM トリス pH 7.6-8.0 を添加した。形質移入後 16 時間に、培地を含む血清を無血清培地に置き換え、4-6 日間タンパク質を集積した。分泌されたタンパク質は Ni-NTA アガロースビーズを用いて精製した。

細胞溶解物からのタンパク質は、50 mM HEPES (pH 7.5)、150 mM NaCl、1% トリトン X-100、5 mM EDTA、1×プロテアーゼインヒビターの混合液 (ROCHE, [溶解バッファー]) を含むバッファー中で、形質移入後 4 日の細胞を溶解することによって調製した。25 µl の固定したタンパク質 A/G アガロースビーズ (Pierce) で細胞溶解物を前除去 (4℃で 2 時間) した後、抗 HIS エピトープ抗体 (Qiagen) 及びタンパク質 A/G アガロースビーズと共に等量 (0.5 ml) の溶解物 (等量当たり 4×10⁵ 細胞) をインキュベーション (4℃で 4 時間) することによって免疫沈降を行った。免疫沈降物を溶解バッファーにて 3 回、リン酸緩衝生理水にて 1 回洗浄し、10% SDS PAGE により分画して、ニトロセルロースメンブラン (Invitrogen) に転写する。マウス抗 HIS 及び ECL キット (Amersham) を用いてウェスタンブロット解析を行った。

図 4 a に、組み換えタンパク質の発現に通常用いられる CHO-DP12 細胞が分泌型の STOP-1 をほとんど産生していないことが示される。対照的に、プロテオグリカン合成を欠損している CHO 変異型細胞である CHO-psg b がより多くの分泌型 STOP-1 を生成し、可溶性の分泌タンパク質の回収率がよい (図 4 b)。pRK5 はネガティブ対照として形質移入した。図 5 a 及び b では、His タグタンパク質が CHO-psg B 形質移入細胞の細胞溶解物中及び上清中のそれぞれで抗 His 抗体により検出されたことを示す。

バキュロウイルスからのタンパク質産生のために、増幅したバキュロウイルスを Hi5 細胞に感染させた。27℃で 3 日培養後、遠心分離によって培養液を回収した。上清に 50 mM トリス 8.0、1 mM NiCl₂、5 mM CaCl₂ を添加し、pH を 7.6 に調製した。培養液を濾過して、Ni-NTA アガロースカラム (Qiagen) に流した。カラムは 50 mM トリス 8.0、300 mM NaCl、2 mM ベンズアニリド、0.5 mM PMSF、及び 5 mM イミダゾールにて洗浄した。300 mM イミダゾールを含む同様なバッファーで溶出を行った。STOP-1 を含む分画を溜めて濃縮した。Superdex-75 カラムに 50 mM トリス 8.0、100 mM NaCl、0.5 mM PMSF、及び 2 mM ベンズアニリドを流してタンパク質を精製した。STOP-1 含有分画を溜めて、濃縮し、結晶学的試験及び多の研究に用いた。

【0185】

実施例 7 STOP-1 オリゴマー化

上記のように、完全長の STOP-1-HIS タンパク質又はその様々な切断型を SF9 バキュロウイルス感染細胞又は CHO 細胞で発現させた。上記のように、Ni-NTA アガロースビーズを用いて培養液からタンパク質を精製した。バキュロウイルスの発現タンパク質である S31-K243-His、E89-K243-His、又は L94-K243-His を 8 mm×300 mm Shodex KW802.5 サイズ排除カラムに流し、流速 1 ml/ml の 100 mM NH₄HCO₃、200 mM NH₄Cl p

H7. 8で溶出させた。CHO-psgb発現完全長タンパク質を8mm×300mm Shodex KW804サイズ排除カラムに流し、流速1ml/mlの25mM リン酸ナトリウム、500mM NaClで溶出させた。CHO-psgb発現タンパク質であるL94-K243-His融合M1-M54を8mm×300mm Shodex KW802. 5サイズ排除カラムに流し、流速1ml/mlの25mM リン酸ナトリウム、500mM NaClで溶出させた。

溶出したタンパク質は、Wyatt MiniDAWN レーザー光散乱(LS)装置及びWyatt Optilab 差次的屈折計(RI)に接続したAgilent多波長検出器(UV)を有するAgilent Model 1100 HPLCシステムにより分析した。各ピークでのタンパク質平均分子量及びその集積物を、ピークを選択して、Astraソフトウェアパッケージ(Wyatt, USA)有するZimmフィッティング法(Phillip J. Wyatt, (1993) Analytica Chimica Acta 272:1-40)を使用することによって測定した。集積物の割合は、214nmでのUVシグナルの明らかなピーク領域から算出した。結果として図6及び図7を参照。

【0186】

光分散分析は、バキュロウイルスS31-K243-Hisタンパク質が主に三量体分子を形成したことを示す(見かけの分子量は、74kD、集積したピーク領域合計の95%) (図6A)。バキュロウイルスE89-K243-Hisタンパク質は、およそ三量体36%及び六量体64%である複合体を形成した(すなわち、36%のピーク領域を表す見かけのMW126kD、64%のピーク領域を表す見かけのMW61kD) (図6B)。しかしながら、E89-K243-Hisによって形成される六量体複合体は奇数のシステインを有する異形であると思われる。三重らせん体ドメインを欠いているバキュロウイルスL94-243タンパク質は、三量体複合体を形成する(98%のピーク領域を表す見かけのMW59kD) (図6C)。これは、タンパク質のN末端ドメインおよび三重らせん体ドメインが三量体形成に必要なことを示す。L94-K243領域は十分である。THDは三量体を安定させるために作用する。

また、CHO-psgbで発現されるタンパク質は複合体を形成する(図7A-C)。光分散分析は、完全長発現タンパク質(M1K243-His)がおよそ58%の六量体と42%の三量体である複合体を形成することを示した(図7A)。デルターTHD発現によって形成される複合体(M1-M54及びL94-L243-His)は、おそらくCHO細胞のタンパク質が様々なグリコシル化されているために、一部三量体であり(61%のピーク領域を表す見かけのMW66kD)、質量において一部不均一であった(平均MW62.7kD) (図7B)。

SDSゲル上で、精製されたCHO-psgB細胞で発現された完全長STOP-1は、還元条件下では単量体として、非還元条件下(DTTなし)では二量体として移動する。図7Cを参照。結果として、ジスルフィド結合が2つの単量体の間で起こりうることを示す。

【0187】

実施例8 STOP-1の欠損及び点突然変異解析

完全長STOP-1(WT)-His、デルターTHD-His、デルターデルターTHD-His、デルターN末端及びいくつかの点突然変異変異体は、上記のようにCHO-psgb細胞において発現された。全細胞抽出物が調製された。全細胞抽出物又は培養液からの分量を還元条件又は非還元条件下にてSDSゲル上で流し、抗His抗体でウェスタンブロットを行った(ECL検出用キット, Amersham)。

図8A及びBは、ジスルフィド結合が上清及び溶解物それぞれの抽出物のTHD領域での2つの単量体の間で形成されたことを示す。THDを欠損しているそれぞれの欠損変異体は、非還元条件下で二量体を形成できないシステイン55を含む。ホモ二量体は、還元条件下でなく、非還元条件下で完全長タンパク質を発現する細胞の上清及び溶解物中にみられた。以下の表9に結果を要約する：

【0188】

表9

10

20

30

40

50

コンストラクト	分泌	二量体化
WT	+	+
デルタ-THD	+	-
デルタ-デルタ-THD	+	-
デルタ-N-ter	+	+

10

「+」は、分泌又は二量化のレベルが野生型 S T O P - 1 と同じであることを示す。「-」は、二量化が本アッセイにおいて検出可能でなかったことを示す。

ヒト S T O P - 1 の点突然変異体を、分泌して二量化する能力について試験した。図 9 A 及び B は、野生型 S T O P - 1 のタンパク質及び G 5 3 A 変異型が分泌されたこと、ホモ二量体が上清及び溶解物中で、観察されたことを示す。しかしながら、186での変異体（「A」に突然変異した「N」）、潜在的なグリコシル化部位は、培養物(culture media)中にみられ、二量体化されていなかった。多くの他の変異体もまた試験された。以下のように表 10 に結果を要約する：

【0189】

20

表 10

コンストラクト	分泌	二量体化
WT	+	+
N52A	+	+
G53A	++	+
M54A	+	+
P63A, P69A	+	+
P75A, P78A, P81A	+	+
K87A, K90A	+	+
N186A	-	-

30

「+」は、分泌又は二量化のレベルが野生型 S T O P - 1 と同じかより良好だった（「++」）ことを示す。「-」は、分泌又は二量化が本アッセイにおいて検出可能でなかったことを示す。N186A以外のこれら全ての変異体は、分泌されて、SDSゲル上でWTと同じように流れた。

40

図 10 A 及び B は、システイン残基 55、93 及び 109 で点突然変異を有するヒト S T O P - 1 タンパク質の状態を示す。また、点突然変異はタンパク質全体にわたる他のシステインにおいても起こった。以下のように表 11 に結果を要約する：

【0190】

表 11

コンストラクト	分泌	二量体化
WT	+	+
C55A	+	-
C93A	+	+
C109A	-	
C126A	-	
C153A	-	
C154A	-	
C153A, C154A	-/+	-/+
C166A	-	
C201A	-	
C218A	-	

10

20

「+」は、分泌又は二量化のレベルが野生型 S T O P - 1 と同じであることを示す。「-」は、二量化が本アッセイにおいて視覚的に検出可能でないことを示す。「-/+」は、分泌又は二量化が本アッセイにおいてわずかに検出可能であることを示す。

すべての変異体が発現されたが、2つ（C 5 5 A 及び C 9 3 A）だけは分泌された。C 9 3 A は分泌されて、C 5 5 A とは対照的に二量体を形成した。その分泌されたが二量体を形成しなかったことは、C 5 5 が内部サブユニットジスルフィド結合に必要であることが示唆された。

【 0 1 9 1 】

実施例 9 W n t 経路上方制御 S T O P - 1 m R N A

S T O P - 1 遺伝子は、ヒト染色体 8 の 8 q 2 2 と 8 q 2 3 の間に位置する。遺伝子は、F Z D 6 遺伝子（縮んだ(frizzled)相同物 8（ショウジョウバエ））、W I S P - 1 遺伝子（W N T 1 誘導分泌タンパク質 1）のような、W n t シグナル伝達経路で重要なタンパク質をコードしている遺伝子の近くに位置する。少なくとも 3 の調節遺伝子が、原発性のヒト癌及び他の種の実験的腫瘍で変異する W n t 経路にある。

30

MM T V - W n t - 1 トランスジェニックマウスは Genentech, Inc. によって調製された。これらのマウスは、MM T V プロモータ制御下で W n t - 1 タンパク質を過剰発現させる。C 5 7 M g 細胞は W n t - 1 を過剰発現しない。これらのマウスの胸部腫瘍を採取した。m R N A は、胸部腫瘍から、又は、C 5 7 M g 乳房上皮細胞から抽出された。製造業者の指示(Promega)に従ってオリゴ（d T）プライマー、トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素(Promega)及び抽出された mRNA を用いて逆転写反応を行った。m R L P 1 9 プライマー及びマウス S T O P - 1 のプライマーを用いて E x - t a q ポリメラーゼ(Takara)により逆転写産物を元に P C R を行った：

40

m R P L 1 9 :

5'-ATCGCCAATGCCAACTCCCGTCA-3' (配列番号：80)と

5'-GCTTGCGTGCTTCCTTGCTGCTTA-3' (配列番号：81)。

m R L P 1 9 は、マウスのミトコンドリアリボソームタンパク質 L 1 9（M R P L 1 9）であるハウスキーピングタンパク質である。m R L P 1 9 に対するプライマーを用いた P C R は、m R N A の抽出及び P C R のための対照として用いた。

m S T O P - 1 :

5-TGCTGCTGCAGCTGCCCGCGCCGTCGAG-3 (配列番号：82)と

50

5-TCCAGTAGAAGCATCTCCTTTTGGGTAA-3 (配列番号：83)

結果は、m S T O P - 1 m R N A は M M T V - W n t - 1 トランスジェニックマウスの胸部腫瘍において発現されるが (図 1 1、レーン T 1 - T 7)、C 5 7 M g 正常なマウスの乳房上皮細胞では発現しない (「N」) ことを示す。したがって、W n t シグナル伝達経路と S T O P - 1 発現との関係が考えられる。

【0192】

実施例 10 他の遺伝子と STOP-1 の同時発現

遺伝子発現情報を含む登録商標のデータベース (GeneExpress, GeneLogic Inc., Gaithersburg, MD) を、S T O P - 1 と同じ組織で発現している遺伝子について分析した (BLIS T 分析、GeneExpress データベース用として Genentech, Inc. で開発され商標権を得たソフトウェア)。この方法により、胸部及び大腸腫瘍に発現の有意な相互関係を有するいくつかの遺伝子が同定された。胸部及び大腸腫瘍で同時に発現された遺伝子には、W i s p - 1 (W N T 標的遺伝子)、S F R P 2 (可溶性の W N T レセプター)、線維芽細胞作動性タンパク質 (F A P)、イオン癌 (ion cancer) に関係した細胞表面セリンプロテアーゼ)、コラーゲン I 型アルファ 2 鎖、コラーゲン V 型アルファ 2 鎖、トロンボスポンジン 2 (T H B S 2) (E C M)、A D A M 1 2 (M M P 酵素)、O B - カドヘリン、及び、O S F - 2 (T C I タンパク質) が含まれた。後者の遺伝子は、細胞外マトリックスの形成及び/又は修飾への S T O P - 1 の関与が示唆される。

【0193】

実施例 11 S T O P - 1 は、生体外で M M P - 7 及び M M P - 9 によって切断される

材料：ヒト h i s - タグ付加 S T O P - 1 のタンパク質はバキュロウイルス発現系を用いて生成した。マトリックスメタロプロテアーゼ (M M P) - 1、- 2、- 3、- 7 及び - 9 は Enzyme Systems Products から購入した。トリプシンは Sigma から入手した。

S T O P - 1 のタンパク質分解消化：S T O P - 1 との反応の前に、M M P を、摂氏 37 度で 1 時間、1 m M の p - アミノ水銀アセテートによって活性化した。S T O P - 1 (3 m g) を、最終量 20 m l に調製したプロテアーゼ (50 又は 250 n M) によって摂氏 37 度で 4 時間で消化した。バッファー A (50 m M トリス、p H 8.5、10 m M C a C l 2、10 m M Z n C l 2 及び 100 m M N a C l) は、M M P 切断反応のために用いた。Z n C l 2 を欠いているバッファー A は、トリプシン切断反応のために用いた。M M P 反応は E D T A (15 m M) の添加によって終了させた。トリプシン反応は P M S F (1 m M) の添加によって終了させた。それから試料を S D S - P A G E およびクーマシー染色によって分析した。

図 2 3 は、インビトロでの様々なプロテアーゼによるバキュロウイルスの発現ヒト S T O P - 1 タンパク質の切断を示す。また、M M P - 7 もインビトロでヒト S T O P - 1 を切断するのに対して、M M P - 1、- 2 及び 3 はほとんど又は全く生成物を切断しない (データを示さない)。M M P - 7 は、約 23 及び 21 k D a の S T O P - 1 切断生成物を産生した。対照的に、M M P - 9 は、約 22 及び 18 k D a の S T O P - 1 切断生成物を産生した。トリプシンは、20 及び 22 k D a の断片を産生した (データを示さない)。これらのデータは、S T O P - 1 活性がタンパク質分解によって調整されうることを示唆する。これは、特に腫瘍間質性関連プロテアーゼ、例えば M M P - 7 及び M M P - 9 に関連する。

【0194】

実施例 12 S T O P - 1 発現は 3 T 3 増殖を促進する

(a) 細胞培養及び 3 T 3 S T O P - 1 安定な細胞株の生成

3 T 3 細胞は、10% の F C S を添加した D M E M で維持した。製造者の指示に従って、F u G E N E 6 形質移入試薬 (Roche) を用いて m 7 6 2 p I R E S p u r o 2 および h 7 6 2 p I R E S p u r o 2 ベクターを 3 T 3 細胞に形質移入して、マウス及びヒトの S T O P - 1 発現細胞株を確立した。S T O P - 1 クローンは、ピューロマイシン (4 g / m l) を用いて形質移入した細胞を選択することによって確認した。

(b) 生体外増殖アッセイ

上記の通り 3 T 3 細胞に、マウス S T O P - 1、ヒト S T O P - 1 又はベクター単独を

10

20

30

40

50

形質移入して、10%のFCSを有するDMEM中 1.5×10^3 細胞を、96ウェルプレートに置いた。12時間後に、培養液を、1.5%のFCS及び10uCi/mlの $[^3\text{H}]$ ーチミジンを含むDMEMに交換した。12時間、48時間及び96時間後に、細胞を、パックードの96-ウェル Filtermate 196を用いてGF/Cフィルタ上にて回収し、洗浄して、マイクロプレートシンチレーションカウンタ(Packard)の頂点の数値を計数した。結果は、ベクター単独形質移入クローン(puro2及びph1)と比較して、STOP-1を発現するクローンは増殖が増加したことを示す。図12A及びBを参照。

(c) 3T3細胞株でのレトロウイルス発現

ヒトの完全長STOP-1 cDNAを、pMSCV1(puro)ベクター(Clontech)内にH762pirespuro2からクローニングして、Maecker 等., (Maecker H.L., 等., Cancer Cell 2, 139-148, 2002)に記載されている方法を用いてレトロウイルスの感染によって、3T3線維芽細胞および293細胞に導入した。簡潔にいうと、5000細胞/ウェルを96ウェルプレートにおき、次日、低血清培養液(0.25%のウシ胎仔血清)へ切り替えた。レトロウイルスに感染した細胞をピューロマイシン(3ug/ml)にて選択した。24時間後に、Cell Titerキット(プロメガ)を用いて細胞増殖を測定した。図13Cは、STOP-1レトロウイルスでの感染は、対照として感染させた3T3又は293細胞と比較して、3T3及び293細胞それぞれの増殖を促進することを示す。

STOP-1タンパク質の検出のために、細胞ペレットの全細胞溶解物($\sim 2 \times 10^6$ 細胞)を調製して、後述の抗体S7-IgG(1ug)と共にインキュベートして、その後プロテインA/Gにて免疫沈降した。ついで、免疫沈降物を変性させ、ニトロセルロース膜に転写した。

ついで、ウサギポリクローナル抗STOP-1抗体を用いてSTOP-1を検出した。図13A及びBは、ベクター対照(Babe)と比較して、STOP-1レトロウイルスを感染させた3T3及び293の細胞の全細胞溶解物中での発現を示す。

【0195】

実施例13 STOP-1発現はマウスの腫瘍形成を引き起こす

胸腺欠損nu/nu雌マウス(Charles River Laboratory、[グループにつき5個体])に、マウス又はヒトのSTOP-1、RAS cDNA (Hudziak RM, Lewis GD, Shalaby MR, Eessalu TE, Aggarwal BB, Ullrich A, Shepard HM. (1988) Proc Natl Acad Sci. 85(14), pp.: 5102-6)又は空のpuro2ベクター(p2)を安定的に形質移入した 1×10^6 の3T3細胞を皮下接種した。腫瘍成長を1週に1回測定した。また、安定している3T3細胞株を、ペレット上の細胞及び全細胞溶解液を調製して、溶解物又は細胞培養液の分量でSDS-PAGEを行い、ウサギ抗STOP-1抗体によってそれらをプローブし、STOP-1発現のために評価した。RAS cDNAを形質移入した細胞は、ポジティブ対照とした図14A-Cを参照。

結果は、マウスSTOP-1はNIH 3T3クロンの全ての溶解物に存在したが、3つのNIH 3T3クロンのうちの2つの細胞培養液にしか存在しなかった(それぞれ図14B及びC)図14A-Cを参照。言い換えれば、クローン18は細胞内にタンパク質を発現するが、マウスSTOP-1タンパク質を分泌することは不完全だった。図14Bを参照。

更に、STOP-1を分泌した2つのクローンはヌードマウスの腫瘍を引き起こす一方で、分泌に欠陥のあったクローンは引き起こさなかった(図14A)。これらの結果は、分泌したマウスSTOP-1自体は腫瘍形成性である一方、細胞内に発現されるSTOP-1はそうでないことが示唆される。

また、結果は、ヒトSTOP-1がマウスの腫瘍形成を左右することを示す。図15を参照。腫瘍は、ヒトSTOP-1タンパク質を発現する様々なマウス及びRAS対照マウスで成長するが、ベクター単独を形質移入した細胞で処理したマウスでは成長しなかった。マウスSTOP-1のように、これらの結果は、分泌したヒトSTOP-1自体が腫瘍形成性でありうることを示唆する。

10

20

30

40

50

【0196】

実施例14 STOP-1は創傷治癒を促進する

悪性黒色腫SK-MEL-31細胞を10%FCSを含むDMEMにて維持した。SK-MEL-31細胞を、準集密になるまで6ウェルディッシュ(Corning)で培養し、ついで2%熱不活性型FCS含むDMEM中で8時間飢餓状態にした。ついで細胞を10 μ g/mlマイトマイシンC(Sigma)を含むFCS-free DMEM中で2時間処理して、以下のインビトロ創傷閉鎖(closure)アッセイの対象とした。

SK-MEL-31細胞単層を黄色のピペット先端部でかき集めることによって無細胞域を導入した。細胞を30ng/ml EGF(Roche)、1g/mlの完全長バキュロウイルス発現ヒトSTOP-1タンパク質の両方又はいずれも含むないしは含まない条件下で2%熱不活性化FCSを添加したDMEMで維持しながら、かき集めた後48時間無細胞域への細胞移動を評価した。図16A-Eは、かき集めの後48時間のかき集めた領域の位相-対照写真である。

結果は、EGF又はSTOP-1、特にCHO-psgB細胞から発現されたSTOP-1で処理した場合、かき集めた領域に細胞が移動したことを示す。結果はSTOP-1が細胞移動を促進することを示す。周囲組織に侵入するにつれて、腫瘍成長で細胞移動が生じる。更に、データはSTOP-1の腫瘍亢進特性を示唆する。

【0197】

実施例15 モノクローナル抗体開発

10匹のBALB/cマウス(Charles River Laboratories, Wilmington, DE)を、Ribi補助剤(Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO)に含まれる、PSGB チャイニーズハムスター卵巣細胞(Genentech, Inc., South San Francisco, CA)において一過性に発現される組換えポリヒスチジンタグ付加(HIS8)ヒトSTOP-1(a.k.a DNA 145960)にて過剰免疫化した。抗STOP-1抗体力価を示す5匹のマウス由来のB細胞を、以前記載された方法(Kohler, G. 及び Milstein, C. (1975) Nature 256: 495-497; Hongo, J.S., 等., (1995) Hybridoma 14:253-260)に類似した変更したプロトコルを用いて、マウス骨髓腫細胞(X63.Ag8.653; アメリカ培養細胞系統保存機関, Rockville, MD)に融合させた。

10-14日後に、上清を回収して、直接酵素結合抗体免疫吸着アッセイ法(ELISA)によって、抗体産生について試験した。律速希釈による2段階サブクロニングの後、最も高い免疫結合を示す一ポジティブクローン(6B12.1.7)を、MAbのインビボ産生のためにPristane初回刺激マウス(Freund YR 及び Blair PB (1982) J Immunol 129:2826-2830)に注入した。

【0198】

腹水液を溜め、既に記載のように(Hongo 等., 1995, 上掲)、プロテインA親和性クロマトグラフィー(Pharmacia 中圧(fast protein)液体クロマトグラフィー[FPLC]; Pharmacia, Uppsala, Sweden)によって精製した。精製した抗体調整物を滅菌濾過して(0.2 μ m孔径; Nalgene, Rochester NY)、リン酸緩衝食塩水(PBS)にて4 $^{\circ}$ Cで保存した。

6B12抗体を産生しているハイブリドマクローンは、ブダペスト条約の規約のもと、アメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)、10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA on March 28, 2003に「6B12.1.7」として委託した。

6B12抗体への結合部位は、ヒトSTOP-1のN末端領域にマップされた。ヒト完全長タンパク質、デルターTHDタンパク質、デルターデルターTHDタンパク質、デルターN末端タンパク質及びゼブラフィッシュ完全長タンパク質をコードするHisタグ付加コンストラクトをCHO-psgB細胞内で発現させた。形質移入した細胞抽出物の分量をSDS-PAGEに流し、抗His抗体又は6B12抗体いずれかを用いてプローブし、ウェスタンブロットを行った。

6B12モノクローナル抗体はウェスタン法でうまく働いた。図17Cを参照。デルターN末端タンパク質を除いて、上記の発現されたヒトタンパク質の全てに結合した。したがって、6B12抗体の結合エピトープは、ヒトSTOP-1のN末端アミノ酸#33

10

20

30

40

50

ー52に位置する。6B12抗体は、ウェスタンブロットでゼブラフィッシュSTOP-1タンパク質を認識しなかった。

【0199】

実施例16 STOP-1に対するファージ由来抗体

概要：STOP-1に対するファージ由来抗体を、2002年6月3日に出願された米国仮出願番号第60/385,338号（「338出願」）に記載されている材料及び方法を一部用いて作った。この研究において、ファジミドを更に修飾して、結果として生じる抗体をオリゴマー形成されたSTOP-1への結合に基づいてスクリーニングした。

抗-HER2 Fab及びF(ab)₂ファジミドの構築：ファジミドベクターpS0643 (phGHam-g3としても知られる、例えば米国特許5,688,666、実施例8) には、pBR322及び、複製のf1起源、アンピシリン耐性遺伝子、大腸菌アルカリホスファターゼ (phoA) プロモーター (Bass 等., (1990) Proteins 8:309-314)、及びヒト成長ホルモン (hGH) の残基1-191に融合したstII分泌シグナル配列をコードしている配列及びM13ファージ (以下、cP3) のタンパク質IIIのC末端残基267-421をコードしている配列が含まれる。pS0643ファジミドも、XbaI部位及びhGHの残基191に続くアンバー停止コドンを含む。stII分泌シグナル配列は、細菌細胞の周辺質にタンパク質を移送することができる (例えば抗体の軽鎖領域 (LC))。この研究において、ヒト成長ホルモン (hGH) をコードする配列はpS0643ベクターから取り除き、stII分泌シグナルを含むフレーム内に結合したヒト化抗HER2 Fab断片（「h4D5」配列）をコードしているNsiI/XbaI核酸断片と置き換えた (humAb4D5-8、配列について、米国特許第5,821,337号、又はCarter 等., (1992) PNAS 89:4285-4289、表1及び図1を参照)。

【0200】

h4D5抗体は、HER-2 (erbB2) として知られている癌関連抗原を特異的に認識するヒト化抗体である。この研究において、h4d5は、humAb4D5の8型（「humAb4D5-8」）配列及び、PCR産物に5' NsiI部位と3' XbaI部位を生じるように遺伝子操作したプライマー (Carter 等., (1992) PNAS 89:4285-4289) を用いてポリメラーゼ連鎖反応により得た。PCR産物はNsiIとXbaIによって切断して、pS0643ファジミドベクターに結合させた。h4D5核酸配列は、大部分はヒトのコンセンサス配列Fabフレームワーク内にあるHER-2特異的マウスモノクローナル抗体由来の修飾したCDR領域をコードしている。具体的には、配列は、VHおよびCH1ドメイン (HC領域) の、カップ軽鎖 (LC領域) 上流域を含む。抗HER-2抗体作製方法及び可変ドメイン配列の同定は、米国特許第5,821,337号及び第6,054,297号に示されている。

ヒト化4D5 (8型) を含むpS0643プラスミドは、また更に修飾した。例えば、単純ヘルペスウイルス1型グリコプロテインDエピトープタグ (gDタグ) を、部位特異的突然変異を用いてLCのC末端のフレーム内に付加した。LCの停止コドン下流に続き、リボソーム結合部位及びstIIシグナル配列をコードする核酸分子をHC配列のN末端に結合した。したがって、HC配列は、M13ファージのマイナーコートタンパク質、p3 (cP3) のC末端ドメインを有するフレーム内にある。ゆえに、ファージ上に表出 (ディスプレイ) するFabは一コンストラクトから産生される。当該Fabファジミドベクターは、pV0350-2b (図25A-H) と称して、図24Aに構成図を示す。

ファージ上に表出するF(ab)₂を生成するために、pV0350-2bベクターを、カセット突然変異生成法により、HC及びcP3配列間に二量体化可能なロイシンジッパーGCN4配列 (GRMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGERG) (配列番号: 84) を挿入することによって、更に修飾した。GCN4ロイシンジッパーは、大腸菌周辺質で2セットのLC/HC-cP3融合ポリペプチドをまとめて、ファージ表面上で二量体を示す。当該F(ab)₂ファジミドベクターは、pV0350-4 (図26A-H) と称して、図24Bに構成図を示す。

【0201】

S T O P - 1 選択に使用のための H 1 / H 2 / H 3 多様性を有する F (a b) ライブラリーの生成：抗 S T O P - 1 抗体を見つけるための多様化ライブラリーを、キュンケル(Kunkel)突然変異生成法により p V 0 3 5 0 - 2 b 及び p V 0 3 5 0 - 4 ベクターの H C 可変領域をコードする配列に変異を加えて、E L I S A アッセイ法によりヒト S T O P - 1 への結合に基づいてそれらを含むファージをスクリーニングすることによって作製した。スクリーニング方法は後で更に詳細に記載する。

S T O P - 1 に対して非常に特性又は親和性を有する他の抗体は、例えば L C C D R 領域の F a b 及び F (a b) ' 2 配列に更に突然変異を起こし（例として、キュンケル突然変異生成法（(Kunkel 等., (1987) Methods Enzymol. 154:367-382)）、STOP- 1 への結合によってそれらをスクリーニングすることによって得る。

10

ファージの発現：大腸菌株 S S 3 2 0 は、電気穿孔法によって上記の突然変異を起こした D N A を形質移入した。ライブラリーのサイズはおよそ 10^9 であった。

他の細菌細胞に更に感染できる表出（ディスプレイ）ファージを生成するために、ヘルパーファージ K O 7 の存在下にて一晚、形質移入細菌細胞を育成した。次に、大腸菌株 XL - 1 Blue (Stratagene, San Diego, CA) に F (a b) 又は F (a b) ' 2 ファージを感染させ、ついで K O 7 ヘルパーファージ (Stratagene, San Diego, CA) を 2 Y T 培養液にて 3 7 ° C で 2 0 時間育成し、記載されているように (Sidhu 等., Methods Enzymol. (2000), 328 : 333-363) ファージを回収した。簡単に言うと、ファージは、ポリエチレングリコールを用いて終夜培養液からまず沈殿させることによって精製し、P B S に再懸濁した。ファージは、 268 nm ($1 \text{ OD} = 1.13 \times 10^{13} / \text{ml}$) での分光光度計によって定量化した。

20

【 0 2 0 2 】

ファージ選別：ファージライブラリーは 4 ラウンドの選別を行った。96 ウェル Nunc Maxisorp プレート を、4 ° C で一晚又は室温で 2 時間、 $100 \mu\text{l}$ / ウェルの標的抗原 (C H O - p s g b - 発現ヒト h i s タグ付加 S T O P - 1 完全長又は、バスキュロウイルスで発現されたヒト h i s タグ付加 # 9 4 - 2 4 3 アミノ酸 (「短型」)) ($5 \text{ ug} / \text{ml}$) を含む P B S にてコートした。プレートは、 $65 \mu\text{l}$ の 1 % 遮断タンパク質に 30 分間にて、更に $40 \mu\text{l}$ 1 % の T w e e n 2 0 に 30 分間にて遮断した (遮断タンパク質：第一ラウンドーウシ血清アルブミン (B S A) 、第 2 ラウンドーオバルブミン、第 3 ラウンドーカゼイン、第 4 ラウンドーオバルブミン)。次に、ライブラリーファージは、0.1 % T w e e n 2 0 を有する 1 % B S A にて 3 ~ 5 O . D / m l に希釈した ($1 \text{ O . D} = 1.13 \times 10^{13}$ ファージ / m l) 。一般に、ファージインプットは、第 1 ラウンド 3 ~ 5 O . D / m l 、第 2 ラウンド 3 O . D / m l 、第 3 ラウンド 0.5 ~ 1 O . D / m l 、及び第 4 ラウンドインプット 0.1 ~ 0.5 O . D / m l であった。希釈されたファージを室温で 30 分間インキュベートした。ウェルを、少なくとも 5 回連続的に P B S 及び 0.05 % T w e e n 2 0 で洗浄した。標的抗原コートウェル 8 つ及びコートしていないウェル 2 つに遮断したライブラリーファージを $100 \mu\text{l}$ / ウェル加え、室温で 1 時間置いた。プレートを、少なくとも 10 回連続的に P B S 及び 0.05 % T w e e n 2 0 で洗浄した。ファージを、室温にて 20 分間、 $100 \mu\text{l}$ / ウェルの 100 mM H C l で溶出した。溶出したファージ (コートウェルから) 及びバックグラウンドファージ (コートしていないウェルから) は、別々のチューブに回収した。溶出した回収物を、両方のチューブに 1 / 10 量の 1 M トリス p H 11.0 を加えることによって中和した。溶出したファージのチューブに最終濃度 0.1 % となるように B S A を加える。溶出したファージを 62 ° C で 20 分間熱した。ファージを滴定するために、 $90 \mu\text{l}$ の対数期 X L - 1 ($\text{OD}_{600 \text{ nm}} 0.1 - 0.3$) を $10 \mu\text{l}$ の溶出したファージ又はバックグラウンドファージに、37 ° C で 30 分間感染させた。次に、感染した細胞を $90 \mu\text{l}$ の 2 Y T にて連続的に 10 倍数増加希釈を行った。1 カルベニシリンプレートあたり感染した細胞分量 $10 \mu\text{l}$ を播いた。

30

40

ファージを繁殖させるために、およそ $400 \mu\text{l}$ の溶出ファージを用いて、4 ml 未満の対数期 X L - 1 s o u p ($\text{OD}_{600 \text{ nm}} 0.1 - 0.3$) を 37 ° C で 30 ~ 45

50

分間感染させた。ヘルパーファージK O 7及びカルベニシリンを、最終濃度 1×10^{-10} のp f u / m l K O 7及び $50 \mu\text{g} / \text{m l}$ カルベニシリンとなるように、 37°C で更に1時間感染溶液に加えた。培養物を、最終量 $20 - 25 \text{ m l}$ になるように、カルベニシリン $50 \mu\text{g} / \text{m l}$ 及びカナマイシン $50 \mu\text{g} / \text{m l}$ を含む $50 : 50$ 2 Y T / C R A P培養液中にて 37°C で一晩（又は少なくとも17時間）成育させた。ファージ回収率を増やすために、翌日、培養をさらに 30°C で2時間成育させた。

【0203】

ファージは、 8000 r p m で10分間細胞を遠心沈殿することによって精製した。上清を回収した。上清の $1/5$ 量の $20\% \text{ P E G} / 2.5 \text{ M NaCl}$ を加え、混ぜて、5分間氷上に置いた。

ファージは、 12000 r p m で15分間遠心沈殿させてペレットにした。上清を回収して、再び 5000 r p m で5分間遠心した。ペレットを、 1 m l のP B Sに再懸濁して、透明になるように 12000 r p m で15分間遠心沈殿した。P E G / N a C l添加から始めた工程を、再懸濁したペレットで繰り返した。再懸濁ファージペレットのO Dを 270 n m で読んだ。ファージ選別の第2、第3及び第4のラウンドは、上記のファージ選別を繰り返して完了した。短型への結合に基づいて選択されたファージ抗体は、「S #」（例えばS 4、S 9、S 7及びS 16）と命名した。完全長型への結合に基づいて選択されたファージ抗体は、「F #」（例えばF 5、F 6、F 13及びF 47）と命名した。E L I S Aスクリーニングアッセイ：選別2～4で得たクローンは、E L I S Aアッセイによって特性及び親和性についてスクリーニングした。

ポジティブクローン（結合体(binders)）は、他の無関係なタンパク質、例えばウシ血清アルブミン及びインスリン様増殖因子-1（I G F - 1）には結合せず、標的抗原に対してバックグラウンド以上に結合するクローンである。

【0204】

最初に、 384 -ウェルマイクロタイタプレートのウェルを、1ウェルあたり $20 \mu\text{l}$ （ $2 \mu\text{g} / \text{m l}$ P B S）の完全長又は「短型」（# 9 3 a a - 2 4 3 a a）h i s タグ付加ヒトS T O P - 1、I G F - 1、H e r - 2又は抗g Dにて 4°C にて一晩又は室温にて2時間でコートした。

HER2	STOP-1
抗-gD	IGF-1

他の 96 ウェルプレートに、選別2～4で得たクローンを $50 \mu\text{g} / \text{m l}$ カルベニシリン及びヘルパーファージK O 7を含む $50 : 50$ 2 Y T / C R A P培養液 $150 \mu\text{l}$ にて 37°C で一晩成育した。プレートを 2500 r p m で20分間遠心沈殿した。 $50 \mu\text{l}$ の上清を $120 \mu\text{l}$ のE L I S Aバッファー（P B S - 0.5%BSA及び0.05%Tween20）と混ぜた。 $30 \mu\text{l}$ の混合液を4分の1の 384 ウェルコーティングプレートに加え、室温で1時間インキュベートした。結合は、0.5%BSA及び0.05%Tween20を含むP B S中の西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）結合抗M 13抗体 $75 \mu\text{l} / \text{ウェル}$ を加えて室温で30分間置いて定量した（Sidhu等、上掲）。P B S - 0.05%Tween20にて少なくとも5回ウェルを洗浄した。次に、 $3,3',5,5'$ -テトラメチルベンジジン（TMB）ペルオキシダーゼ基質及びペルオキシダーゼ溶液B（ H_2O_2 ）（Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)）を1:1の比率で含む溶液 $100 \mu\text{l} / \text{ウェル}$ をウェルに加えて、室温にて5分間インキュベートした。反応は、各ウェルに $100 \mu\text{l}$ の1 Mリン酸（ H_3PO_4 ）（Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)）を加えることによって止めた。各ウェルの黄色の 450 n m のO Dを、標準のE L I S Aプレート読み込み器を用いて定量した。コートプレートに対して約90%の最大結合を生じる

F (a b) 又は F (a b) ' ₂ ファージ濃度を、溶液結合競合的 E L I S A 法に用いた。B S A、I G F - 1、H e r 2 及び抗 g D より 3 - 4 倍大きな結合を有する F (a b) および F (a b) ' ₂ ファージを、より良好な特性を有すると判断した。それらの結合体をシーケンスした。

図 1 8 は、より高い親和性及び特性を示す様々な結合体（例えば S 7、S 1 6、F 5、S 4、F 1 3、F 4 7 及び S 9）の部分的なアミノ酸配列を示す。3 つのクローン - F 1 3、F 4 7 及び S 4 は同一の C D R 配列を有する。S 7 及び S 1 6 もいくらか配列相同性を示した。F 1 3、F 4 7、S 4、S 7、S 9 及び S 1 6 の V H - C D R 1、V H - C D R 2 及び V H - C D R 3 領域間の配列相同性に基づいて、共通に認識されるエピトープのコンセンサス配列を引き出した。ファージディスプレイ S 4 - F a b、ファージディスプレイ S 9 - F a b、ファージディスプレイ S 7 - F (a b) ' ₂、ファージディスプレイ S 1 6 - F (a b) ' ₂、ファージディスプレイ F 5 - F (a b) ' ₂ のアミノ酸及び核酸配列を、それぞれ図 2 7 A - C、図 2 8 A - C、図 2 9 A - C、図 3 0 A - C 及び図 3 1 A - C に示す。S 7 は配列番号：8 - 1 0 を有する。S 1 6 は配列番号：1 1 - 1 3 を有する。F 5 は配列番号：1 4 - 1 6 を有する。S 4、F 1 3 及び F 4 7 は配列番号：1 7 - 1 9 を有する。S 9 は配列番号：2 0 - 2 2 を有する。

【0205】

以下のベクターは、以下に示すようにブダベスト条約の規約のもと、アメリカ培養細胞系統保存機関 (ATCC)、10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA に寄託した：

材料	委託番号	委託日
V 0 3 5 0 - 4 - S 7	P T A - 5 0 9 0	2 0 0 3 年 3 月 2 5 日
V 0 3 5 0 - 4 - S 1 6	P T A - 5 0 8 9	2 0 0 3 年 3 月 2 5 日
V 0 3 5 0 - 2 b - S 4	P T A - 5 0 8 6	2 0 0 3 年 3 月 2 5 日
V 0 3 5 0 - 2 b - S 9	P T A - 5 0 8 7	2 0 0 3 年 3 月 2 5 日
V 0 3 5 0 - 4 - F 5	P T A - 5 0 8 8	2 0 0 3 年 3 月 2 5 日

【0206】

実施例 1 7 溶液結合競合的 E L I S A 法

選択された F (a b) 及び F (a b) ' ₂ ファージの結合親和性を測定するために、競合的 E L I S A 法を行った。

最初に、ファージを繁殖させ、精製した。3 7 ° C で 3 0 分間にて 1 つのクローンに感染させた 1 0 μ l の X L - 1 バクテリアをカルベニシリンプレートに播いた。コロニーをピックアップし、3 7 ° C で 3 - 4 時間、2 m l (2 Y T 及び 5 0 μ g / m l カルベニシリン) 中で育成させた。

ヘルパーファージ K O 7 を最終濃度 1 0 ¹⁰ p f u / m l で培養物に加えて 3 7 ° C でさらに 1 時間置いた。2 0 m l の培養液 (5 0 μ g / m l カルベニシリンを含む 2 Y T / C R A P 5 0 : 5 0) を培地に加えて、3 7 ° C で一晩育成させた。ファージは上記の通りに精製した。

第二に、以下の競合的 E L I S A アッセイの使用に最適となる精製したファージの濃度を決定した (すなわち、コートしたプレート上でのおよそ 9 0 % の最大結合能)。9 6 ウェル Nunc Maxisorp プレートを完全長又は短型のヒト S T O P - 1 (2 μ g / m l P B S) にて、4 ° C で一晩又は室温で 2 時間コートした。ウェルを、6 5 μ l の 1 % B S A を加えて 3 0 分間、その後 4 0 μ l の 1 % T w e e n 2 0 を加えて更に 3 0 分間によって遮断した。次に、P B S - 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 にてウェルを 5 回洗浄した。0 . 1 0 . D . / m l まで E L I S A バッファー (P B S - 0 . 1 % B S A 及び 0 . 0 5 % T w e e n 2 0) で様々な希釈した F (a b) 又は F (a b) ' ₂ ファージをウェルに加えて室温にて 1 5 分間置いた。ついで、ウェルを P B S - 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 にて少なくとも 3 回洗浄した。1 ウェルあたり 7 5 μ l の H R P 結合抗 M 1 3 抗体 (Amersham、E L I S A バッファにて 1 / 5 0 0 0 希釈) を加えて、室温にて 3 0 分間インキュベートした。再び、ウェルを P B S - 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 にて少なくとも 5 回洗浄した。3,3'

,5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) ペルオキシダーゼ基質及びペルオキシダーゼ溶液 B (H₂O₂) ((Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD))) を 1 : 1 の比率で含む溶液 100 μ l / ウェルをウェルに加えて、室温にて 5 分間インキュベートした。反応は、各ウェルに 100 μ l の 1 M リン酸 (H₃PO₄) ((Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD))) を加えることによって止めた。各ウェルの 450 nm の最適密度 OD を、標準の ELISA プレート読み込み器を用いて定量した。ファージの希釈を OD 値に対してプロットした。

【0207】

第三に、競合的 ELISA 法を行った。96 ウェル Nunc Maxisorp プレート を 完全長又は短型の ヒト STOP-1 (2 μ g / ml PBS) にて、4 $^{\circ}$ C で一晩又は室温で 2 時間コートした。ウェルを、65 μ l の 1 % BSA を加えて 30 分間、その後 40 μ l の 1 % Tween 20 を加えて更に 30 分間によって遮断した。次に、PBS-0.05 % Tween 20 にてウェルを 5 回洗浄した。上記の結合実験に基づいて、1 ウェルに、コートプレートに対して約 90 % の最大結合を生じるファージ希釈液 50 μ l を、ELISA バッファー溶液で様々な希釈した 50 μ l の完全長又は短型の ヒト STOP-1 (0.1 ~ 500 nM) と共に室温で 1 時間インキュベートした。結合していないファージは、75 μ l のウェル混合液を完全長又は短型の ヒト STOP-1 でプレコートした 2 つ目の 96 ウェルプレートに移し、室温にて 15 分間インキュベートすることによってアッセイを行った。2 つ目のプレートのウェルを PBS-0.05 % Tween 20 にて少なくとも 3 回洗浄した。1 ウェルあたり 75 μ l の HRP 結合抗 M13 抗体 (ELISA バッファにて 1 / 5000 希釈) を加えて、室温にて 30 分間インキュベートした。再び、ウェルを PBS-0.05 % Tween 20 にて少なくとも 5 回洗浄した。次に、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) ペルオキシダーゼ基質及びペルオキシダーゼ溶液 B (H₂O₂) ((Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD))) を 1 : 1 の比率で含む溶液 100 μ l / ウェルをウェルに加えて、室温にて 5 分間インキュベートした。反応は、各ウェルに 100 μ l の 1 M リン酸 (H₃PO₄) ((Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD))) を加えることによって止めた。各ウェルの 450 nm の最適密度 OD を、標準の ELISA プレート読み込み器を用いて定量した。競合した STOP-1 の濃度を OD 値に対してプロットした。F (ab) ファージ又は F (ab) ' ₂ -ファージを 50 % 阻害する STOP-1 の濃度である IC₅₀ は親和性を表す。表 12 を参照。

【0208】

表 12 は、F5 が短型でなく完全長の STOP-1 の N 末端に結合することを示す。S7、S16、S9 及び S4 (したがって、F13 及び F47) は、ヒト STOP-1 の短型 (#94-243) に結合する。表 2 において「762 S / S」の項目は、マイクロタイタプレートのウェルがヒト STOP-1 の短型でコートされたものであり、F (ab) ファージ又は F (ab) ' ₂ -ファージがヒト STOP-1 の短型と競合したことを表す。「762 S / F」の項目は、マイクロタイタプレートのウェルがヒト STOP-1 の短型でコートされたものであり、F (ab) ファージ又は F (ab) ' ₂ -ファージがヒト STOP-1 の完全長型と競合したことを表す。「762 F / F」の項目は、マイクロタイタプレートのウェルがヒト STOP-1 の完全長型でコートされたものであり、F (ab) ファージ又は F (ab) ' ₂ -ファージがヒト STOP-1 の完全長型と競合したことを表す。「ND」は結果が検出可能でなかったことを示す。「N / A」は、結果が有意でないことを示す。

表 12

F(ab)'₂	762 S/S	762 S/F	762 F/F	STOP-1 結合
S7	35nM	4.7nM	2.7nM	短型
S16	114nM	n/a	32nM	短型
F5	ND	1uM	N/A	完全長

Fab	762 S/S	762 S/F	762 F/F	STOP-1 結合
S4	3nM	719nM	0.9nM	短型
S9	>1uM	331nM	N/A	短型
F13	3.8nM	795nM	n/a	短型
F47	3.8nM	795nM	n/a	短型

10

20

また、これらの抗体は免疫沈降においてヒト S T O P - 1 を認識した。

【0209】

実施例 18 6 B 1 2 遮断 (ブロッキング) アッセイ

また、特定の F (a b) ' ₂ -ファージの結合位置を探索した。モノクローナル抗-ヒト S T O P - 1 抗体 6 B 1 2 はヒト S T O P - 1 タンパク質の N 末端領域に結合することが知られている。故に、6 B 1 2 が S T O P - 1 への特定の F (a b) ' ₂ -ファージの結合を遮断することができるかどうかを試験した。

6 B 1 2 遮断アッセイは以下の通りに行われた：96 ウェル Nunc Maxisorp プレートに完全長又は短型のヒト S T O P - 1 (2 μ g / m l P B S) にて、4 °C で一晚又は室温で 2 時間コートした。ウェルを、65 μ l の 1 % B S A を加えて 30 分間、その後 40 μ l の 1 % T w e e n 20 を加えて更に 30 分間によって遮断した。次に、P B S - 0 . 0 5 % T w e e n 20 にてウェルを 5 回洗浄した。様々な濃度の 6 B 1 2 抗体 (E L I S A バッファーにて) をウェル中で室温で 30 分間インキュベートした。そして、S 7 - F (a b) ' ₂ -ファージ、S 1 6 - F (a b) ' ₂ -ファージ又は F 5 - F (a b) ' ₂ -ファージを、通常 6 B 1 2 抗体がない条件下で 90 % の結合能がある濃度で各ウェルに加えて 10 分間置いた。P B S - 0 . 0 5 % T w e e n 20 にてウェルを 5 回洗浄した。

30

結合は、0 . 5 % B S A 及び 0 . 0 5 % T w e e n 20 を含む P B S 中の西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) 結合抗 M 1 3 抗体 75 μ l / ウェルを加えて室温で 30 分間置いて定量した (Sidhu 等、上掲) 。 P B S - 0 . 0 5 % T w e e n 20 にて少なくとも 5 回ウェルを洗浄した。

40

次に、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (T M B) ペルオキシダーゼ基質及びペルオキシダーゼ溶液 B (H ₂ O ₂) ((Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD))) を 1 : 1 の比率で含む溶液 100 μ l / ウェルをウェルに加えた。反応は、各ウェルに 100 μ l の 1 M リン酸 (H ₃ P O ₄) ((Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD))) を加えることによって止め、室温で 5 分間インキュベートした。各ウェルの黄色の 450 nm の O D を、標準の E L I S A プレート読み込み器を用いて定量した。

【0210】

表 13

F(ab) ₂ '	6B12 遮断
S7	-
S16	-
F5	+

表13は、6B12抗体はF(ab)₂'-F5ファージを遮断したが、F(ab)₂'-S7ファージ又はF(ab)₂'-S16ファージは遮断しなかったことを示す。したがって、F5は6B12と同じN末端領域のヒトSTOP-1に結合する一方で、S7及びS16は結合しない。

【0211】

実施例19 F(ab)及びIgGタンパク質コンストラクト及びタンパク質発現

細菌細胞の発現のためのF(ab)コンストラクト：V0350-2b-S4及びV0350-2b-S7ファージミドは、ウィルスCP3配列を取り除いて、それらを5'-GCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTATG-3' (配列番号：85)を含む終末配列と置き換えて、ロイシンジッパー及びgDタグをコードしている配列を取り除くことによって変更された(以下、それぞれpv0120-S4及びpV0120-S7)。図24Cは当該ベクターの概略図である。pv0120ベクターを大腸菌34B8細胞に形質移入した。単一コロニーをピックアップし、30℃で少なくとも22時間、25µg/mlカルベニシリンを含む完全なCRAP培地にて成育させた。発現タンパク質は、プロテインGハイトラップカラム(Amersham Pharmacia)にて精製した。

S4-Fabのアミノ酸及びコード化核酸配列を、図32A-Gに示す。

哺乳動物細胞での発現のためのIgGコンストラクト：一般に、IgG1コンストラクトは、LPG3ベクターにコードされる軽鎖をS4又はS7の軽鎖に交換することによって、及び、LPG4ベクターにコード化されるV_HおよびC_H1領域をS4又はS7のV_HおよびC_H1領域に交換することによって作製した。図24Dは、IgGタンパク質の軽鎖及び重鎖をそれぞれコードしているLPG3およびLPG4ベクターの概略図である。LPG3ベクターはヒト化MaE11 E27軽鎖をコードする。LPG4ベクターはヒト化MaE11 E27重鎖をコードする。ともに、それらは、ヒト化MaE11 E27 (抗IgE抗体)の完全長ヒトIgG1型をコードする。ヒト化MaE11 E27についての詳細は、米国特許6,172,213 (Lowman)を参照。LPG3およびLPG4ベクターは、とりわけ、ヒト化MaE11 E27の完全長軽鎖および重鎖それぞれを挿入することによって変更したpRKベクター(Gorman, CM等., (1990) DNA Protein Eng. Tech. 2:3)であった。LPG3およびLPG4ベクターは、Genentech, Inc., South San Francisco, CA.のYan Wuから入手した。

【0212】

LPG4ベクターは、ヒト化MaE11 E27抗体の重鎖可変領域を取り出すために、BsiwIおよびApaIによって消化した。取り除かれた配列を、pv0120-S4又はpv0120-S7ベクター由来のBsiwI-ApaI断片と交換した。LPG3ベクターは、ヒト化MaE11 E27抗体の軽鎖可変領域を取り出すために、EcoRVおよびKpnIによって消化した。取り除かれた配列を、S4およびS7の軽鎖可変領域をコードしているpv0120-S4又はpv0120-S7ベクター由来のEcoRV-KpnI断片と交換した。結果として生じるベクター、LPG3-humankappaG6およびLPG4-humanHC-S4は、図35および図36 (それぞれ配列番号：110および配列番号：112)に記載する。BsiwI-ApaI部位間の配列がpv0120-S7ベクターのBsiwI-ApaI部位間の配列と同様であることを除き、LPG4-humanHC-S7の配列はLPG4-humanHC-S4の配列と同様である。

LPG3-humankappaG6、LPG4-humanHC-S4およびLPG4-humanHC-S7 dsDNAを、形質移入のた

めに調製した。D P 1 2 D H F R + C H O 細胞 (A T C C) は、1 × トリス E D T A (T E)、2 m g の / L のインスリン、1 % の d F B S、0. 1 5 g / L ゲンタマイシン硫酸塩を含む組織培養液中に $1. 5 \times 10^6$ 細胞個 / m l の濃度で播いた。細胞を、形質移入前の 1 - 2 時間、3 7 ° C でインキュベートした。次に、3. 5 L の暖めた組織培養液を、2 0 m g の D N A、2 0 m l の D M R I E - C 試薬 (1,2-ジミリスチルオキシプロピル(dimyristyloxypropyl)- 3 -ジメチルヒドロキシエチルアンモニウム臭化物、Genentech, Inc.) を含む培地に加え、3 7 ° C で少なくとも 2 0 分以上インキュベートした。培養物をバイオリアクタに加え、2 5 0 m l / L の暖めた組織培養液を加えた。細胞培養温度は 3 3 ° C に変更した。7 - 1 2 日後に、細胞を 1 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離し、ついで、上清を 0. 2 μ m フィルタでろ過した。上清のタンパク質は、プロテイン G ハイトラップカラム (Amersham Pharmacia) で精製した。

10

S 4 I g G タンパク質のアミノ酸およびコードしている核酸配列を、図 3 3 A - F および図 2 4 A - G に示す。

【0213】

実施例 2 0 S 4 および S 7 F a b および I g G の親和性測定

E L I S A アッセイは、S 4 および S 7 F a b のヒト S T O P - 1 に対する親和性を測定するために行った。最初に、競合的 E L I S A アッセイの使用に最適な精製した F a b および I g G の濃度を測定した (すなわちコートしたプレート上でおよそ 9 0 % の最大結合能)。9 6 ウェル Nunc Maxisorp プレート を完全長又は短型のヒト S T O P - 1 (2 μ g / m l P B S) にて、4 ° C で一晩又は室温で 2 時間コートした。ウェルを、6 5 μ l の 1 % B S A を加えて 3 0 分間、その後 4 0 μ l の 1 % T w e e n 2 0 を加えて更に 3 0 分間によって遮断した。次に、P B S - 0. 0 5 % T w e e n 2 0 にてウェルを 5 回洗浄した。0. 1 n M - 1 0 0 n M まで E L I S A バッファー (P B S - 0. 5 % B S A 及び 0. 0 5 % T w e e n 2 0) で様々に希釈した F (a b) 又は I g G をウェルに加えて室温にて 1 5 分間置いた。ついで、ウェルを P B S - 0. 0 5 % T w e e n 2 0 にて少なくとも 3 回洗浄した。1 ウェルあたり 7 5 μ l の H R P 結合抗 M 1 3 抗体 (Amersham、E L I S A バッファにて 1 / 5 0 0 0 希釈) を加えて、室温にて 3 0 分間インキュベートした。再び、ウェルを P B S - 0. 0 5 % T w e e n 2 0 にて少なくとも 5 回洗浄した。次に、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (T M B) ペルオキシダーゼ基質及びペルオキシダーゼ溶液 B (H 2 O 2) ((Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) を 1 : 1 の比率で含む溶液 1 0 0 μ l / ウェルをウェルに加えた。反応は、各ウェルに 1 0 0 μ l の 1 M リン酸 (H 3 P O 4) ((Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) を加えることによって止め、室温にて 5 分間インキュベートした。各ウェルの 4 5 0 n m の最適密度 O D を、標準の E L I S A プレート読み込み器を用いて定量した。F a b 又は I g G の希釈を O. D. 値に対してプロットした。

20

30

【0214】

図 1 9 は、競争アッセイの F a b 又は I g G の最適濃度を決定するために用いられる E L I S A アッセイの実施例を示す。「S コート」は、マイクロタイタプレート上でコートされる S T O P - 1 の短型 (# 9 4 - 2 4 3) を指す。「F コート」は、マイクロタイタプレートにおおわれているヒト S T O P - 1 の完全長型を指す。およそ 9 0 % の最大結合は、競合的 E L I S A アッセイの使用に最適であると考えられた。

40

次に、上記のように決定した最適濃度の F a b 又は I g G を用いて競合的 E L I S A 法を行った。9 6 ウェル Nunc Maxisorp プレート を完全長又は短型のヒト S T O P - 1 (2 μ g / m l P B S) にて、4 ° C で一晩又は室温で 2 時間コートした。ウェルを、6 5 μ l の 1 % B S A を加えて 3 0 分間、その後 4 0 μ l の 1 % T w e e n 2 0 を加えて更に 3 0 分間によって遮断した。P B S - 0. 0 5 % T w e e n 2 0 にてウェルを 5 回洗浄した。上記の結合実験に基づいて、1 ウェルに、コートプレートに対して約 9 0 % の最大結合を生じる F a b 又は I g G 希釈液 5 0 μ l を、E L I S A バッファー溶液で様々に希釈した 5 0 μ l の完全長又は短型のヒト S T O P - 1 (0. 1 ~ 5 0 0 n M) と共に室温で 1 時間インキュベートした。結合していない F a b 又は I g G は、7 5 μ l のウェル混合液を

50

完全長又は短型のヒトSTOP-1でプレコートした2つ目の96ウェルプレートに移し、室温にて15分間インキュベートすることによってアッセイを行った。2つ目のプレートのウェルをPBS-0.5%Tween 20にて少なくとも3回洗浄した。1ウェルあたり75 μ lのHRP結合抗M13抗体(ELISAバッファにて1/5000希釈)を加えて、室温にて30分間インキュベートした。再び、ウェルをPBS-0.05%Tween 20にて少なくとも5回洗浄した。次に、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)ペルオキシダーゼ基質及びペルオキシダーゼ溶液B(H₂O₂)((Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)))を1:1の比率で含む溶液100 μ l/ウェルをウェルに加えた。反応は、各ウェルに100 μ lの1Mリン酸(H₃PO₄)((Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)))を加えることによって止め、室温にて5分間インキュベートした。各ウェルの450 nmの最適密度ODを、標準のELISAプレート読み込み器を用いて定量した。加えた競合物質STOP-1の濃度をO.D.値に対してプロットした。IC50はFab又はIgGの結合を50%阻害するSTOP-1の濃度であること表す。図20A及びBを参照。結合親和性は括弧内に示す。

【0215】

図21はSTOP-1に対する多種のファージ由来抗体の結合親和性の概要を示す。「S/S」は、マイクロタイタプレートがSTOP-1の短型でコートされ、STOP-1の短型と競合したELISAであることを指す。「F/S」は、マイクロタイタプレートがヒトSTOP-1の完全長型でコートされ、ヒトSTOP-1の短型と競合したELISAであることを指す。「F/F」は、マイクロタイタプレートがSTOP-1の完全長型でコートされ、STOP-1の完全長型と競合したELISAであることを指す。これらの研究で用いられるファージは、S4-Fabファージ及びS7-F(ab)₂ファージであった。

【0216】

実施例21 S4遮断(ブロッキング)アッセイ

S4 IgGを競合的ELISAアッセイに用いて、S4(Fab)-ファージ、S7(F(ab)₂)-ファージ、S9(Fab)-ファージ、S16(F(ab)₂)-ファージ又はF5(F(ab)₂)-ファージのヒトSTOP-1の短型又は完全長型への結合を遮断するか否かを確認した。

初めに、96ウェルNunc Maxisorpプレートを完全長のヒトSTOP-1(2 μ g/ml PBS)にて、4℃で一晩又は室温で2時間コートした。ウェルを、65 μ lの1%BSAを加えて30分間、その後40 μ lの1%Tween 20を加えて更に30分間によって遮断した。次に、PBS-0.05%Tween 20にてウェルを5回洗浄した。様々な濃度のS4 IgG(ELISAバッファにて)をウェル中で室温で30分間インキュベートした。そして、S4(Fab)-ファージ、S7(F(ab)₂)-ファージ、S9(Fab)-ファージ、S16(F(ab)₂)-ファージ又はF5(F(ab)₂)-ファージを、通常S4 IgG抗体がない条件下で90%の結合能がある濃度で各ウェルに加えて10分間置いた。PBS-0.05%Tween 20にてウェルを5回洗浄した。

結合は、0.5%BSA及び0.05%Tween 20を含むPBS中の西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合抗M13抗体75 μ l/ウェルを加えて室温で30分間置いて定量した(Sidhu等、上掲)。PBS-0.05%Tween 20にて少なくとも5回ウェルを洗浄した。次に、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)ペルオキシダーゼ基質及びペルオキシダーゼ溶液B(H₂O₂)((Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)))を1:1の比率で含む溶液100 μ l/ウェルをウェルに加えた。反応は、各ウェルに100 μ lの1Mリン酸(H₃PO₄)((Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)))を加えることによって止めた。各ウェルの黄色の450 nmのODを、標準のELISAプレート読み込み器を用いて定量した。

図22は、F5を除くほとんどのファージ由来の抗体がS4ファージ由来抗体と同じSTOP-1上の領域に結合したことを示す。Y軸は、S4 IgGのないウェルのOD45

10

20

30

40

50

0 nm値でS4 IgGを遮断したウェルのOD450 nm値を割ることによって算出される非遮断の割合を示す。試験したファージは、S4 (Fab) ファージ、S7 (Fab)₂ ファージ、S9 (Fab) ファージ、S16 (Fab)₂ ファージ、及びF5 (Fab)₂ ファージである。低い%は、S4 IgGによる遮断がより大きいことを意味する。

【0217】

実施例23 軽鎖配列を変更することによる結合の最適化

さらに、抗体の結合は、特に軽鎖の配列を変えることによって、最適化することができる。最適化は、ファージディスプレイ方法を含む当分野で公知の方法によって行うことができる。さらに、2002年6月3日に提出の米国特許仮出願第60/385,388号に記載のように、軽鎖可変領域において発生する多様性を除き、軽鎖CDRの配列は部位特異的突然変異によって変化させ、先の実施例16に記載の方法と類似のELISAアッセイによってスクリーニングすることができる。また、以下を参照。

一実施例によれば、抗体可変軽鎖ドメインのライブラリーを、抗体可変ドメインの構造的不安(perturbation)を最小化する一方、CDR領域の多様性を最大にするために最適化する。例えば、細菌細胞において産生させる場合、抗体可変ドメインの構造的不安は通常、低い回収率を生じる不適当に折りたたまれた抗体ドメインに関連している。低い回収率は、スクリーニングで検出される結合体の数を減少させる。CDR、L1、L2、L3の各CDR内で溶解力が利用可能な程度で非常に多様化している位置を同定し、少なくとも一CDR領域内にある溶解力が利用可能な程度で非常に多様化している少なくとも一つの位置に一致したアミノ酸位置に変異アミノ酸をコードする少なくとも一つのあつらえた(すなわちランダムでなく)コドンセットを含むオリゴヌクレオチドを設定することによって、軽鎖CDR領域の多様性を生じさせる。あつらえたコドンセットは、好ましくは公知の、天然の抗体の溶解力があり利用可能な残基に一致する位置で最も共通に生じるアミノ酸をコードする変性した核酸配列である。

CDRの溶解力があり利用可能な残基を、鋳型分子の結晶構造を分析することによって、抗体可変ドメイン鋳型分子内で同定することができる。ヒト化抗体4D5は効率的に生成され、細菌細胞培養を含む多種の宿主細胞で生成される際に適切に折りたたまれる。ヒト化抗体4D5可変領域の結晶構造は公知であり、公的に<http://www.rcsb.org> (登録コードIFVC)で利用できる。

【0218】

軽鎖のCDRの溶解力があり利用可能な位置は、インサイトIIプログラム(Accelrys, San Diego, CA)を用いて同定した。

CDR残基は、また、CDRのどの位置が非常に多様であるかについて決定するために分析した。重鎖および軽鎖のCDR領域の非常に多様な位置は、カバットデータベースで公知の、天然に生じる抗体の配列を調べることによって同定した(Kabat, E.A., 等, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication No. 91-3242)。また、カバットデータベースは、<http://www.bioinf.org.uk/abs/>を通して入手可能である。カバットデータベースでは、ヒト軽鎖の約1540の配列およびヒト重鎖の3600の配列があった。カバットによって解説されるように、CDRは整列配置して、番号をつけた(<http://www.bioinf.org.uk/abs/du>を参照)。非常に多様なアミノ酸位は、整列して、各CDRで最も使用頻度が高いものから低いものまでアミノ酸の使用を分類することによって同定した。例えば、L3-91(すなわち軽鎖CDR3の残基91)がカバットデータベースの1582のうち849の抗体配列においてY(チロシン)であるとわかり、それはこの位置で最も頻度が高いアミノ酸である。頻度リストにおいてセリン(196の配列に起こる)の次に、アルギニン(169の配列)、アラニン(118の配列)、グリシン(61の配列)、ヒスチジン(41の配列)が続き、残りの35の配列は残りのアミノ酸の何れかである。カバットデータベース(からのヒト抗体軽鎖配列のアミノ酸の頻度をアミノ酸の多様性リストに対応して図示する多様な部位を含む)、図35に示す。

公知の、天然の抗体配列の中で最も高い頻度で生じるアミノ酸をまとめて構成する特定の位置で見つかるアミノ酸残基を、ライブラリー設計の基礎として選択することができる。最も頻繁に生じるアミノ酸は、ほとんどが多様性アミノ酸リストの上90%にみられるようである（アミノ酸の群は、ここでは「アミノ酸の標的群」を意味する）。しかしながら、ここで記載するように、作製しようとする多様性ライブラリの状況および目的に従って、上記のアミノ酸の標的群についてパーセントカットオフ値を変化させる。

ヒト化抗体4D5の、溶解力があり利用可能な非常に多様化したものとして同定した位置は以下の通りである：

軽鎖

C D R 1 28, 29, 30, 31, 32

C D R 2 50, 53

C D R 3 91, 92, 93, 94, 96

重鎖

C D R 1 28, 30, 31, 32, 33

C D R 2 50, 52, 53, 54, 56, 58

【0219】

天然の多様性で（すなわち、公知の、天然の抗体配列の中で）高い頻度で生じるアミノ酸の例（図3の「標的グループ」又は「天然の多様性」と称する）と、各々のこれらの位置のDNAコドン（「多様性<DNAコドン>」）によるアミノ酸の設計された多様性とを、図36に示す。

特定のアミノ酸群をコードしているコドンセット（多様性）は、公知の、天然の配列内に少なくともアミノ酸の特定の割合で含むように設計した（図36に「% covering」として示す）。コドンセットによってコードされるアミノ酸の中で、少なくとも約40%のアミノ酸は、特定の溶解力のある利用可能な非常に多様化された位置として同定されたアミノ酸を標的とする（図36に「% good」として示す；標的アミノ酸であるコドンセットによってコードされるアミノ酸は、図36の3つめに太字で示す）。しかしながら、ここで記載のように、% good値は状況および目的によって変化しうる。それらが好ましくは特定位置で頻度が最も高いアミノ酸をコードするように、コドンセットを選択した。特定位置のコドンセットによってコードされる非標的のアミノ酸の数は、最小化した。コドンセット選択/設計の有効性は、「% good」値に基づいて部分的に評価した。高い割合は、非常に低い非標的のアミノ酸を意味した；「% good」の高い値は、特定のコードセットによってコードされるアミノ酸のうちより多くの標的アミノ酸を有することがより重要であると判断した。重複(Redundancy)は、「% good」値を算出する際に含めた。評価目的のために、「% covering」値を算出した。この値は、（特定のコードセットによってコードされるアミノ酸の中で）「good」であるアミノ酸によってカバーされる天然の多様性の割合を表す。例えば、L3-91について、コードセットKMTが用いられる場合、「good」なアミノ酸はYSAであり、コドンによってコードされるY S A Dアミノ酸の75%である。YSAは、このアミノ酸位で1580の公知の、天然の抗体配列のうち1190をカバーするアミノ酸である。1190/1580は75%に等しく、それは「% covering」値である。したがって、L3-91でKMTを用いたある設計では、ライブラリの75%は、位置91でCDRL3の天然の多様性の75%をカバーする。

【0220】

また、コードセットは、可能な場合、システイン及び停止コドンを除いて設計した。システイン残基により折りたたみの問題が生じる傾向があり、停止コドンは有効なライブラリサイズを減少させうる。また、コードセットの設計において、非標的のアミノ酸の数を最小化することが望ましいと判断した。

ヒト化抗体4D5の各々の溶解力があり利用可能な非常に多様な残基を設計するコードセットを、図36に示す。任意の特定の残基で、同定される標的アミノ酸に依存して一つ以上のコードセットを用いる。例えば、2つのL1オリゴヌクレオチドは、例えば、L3-96でコドンYKGを含むものとTWTを含むもの、又は、H2-50でコドンDGG

10

20

30

40

50

と含むものとDHTを含むものを併用する。

様々なコドンセットは、CDR L1、CDR L2、CDR L3を含む一つ以上のCDR領域に多様性を有する多様なライブラリを生成するために用いることができる。例えば、図37-40は、多様性を生じさせるために用いたコドンセットの設計のバージョンを示す。図36は、これら設計のアミノ酸範囲の概要を示す。一般に、必須ではないが、設計は、より多くの天然の多様性をカバーし、可能な限り「非標的」のアミノ酸を除外するように限定することが好ましい。いくつかの実施態様において、これらの基準に基づいて最もよいスコアを示さない設計を用いて、STOP-1に対する良好な結合体を得た。

【0221】

10

実施例24 細胞表面へのSTOP-1結合

HT1080細胞は、FACSバッファー（20mMのHEPES、pH7.5、140mMのNaCl、1mMのCaCl₂、1mMのMgCl₂、2%FBS）中で、100ug/mlのS7又は6b12モノクローナル抗体存在下にて、組み換え精製された完全長ヒトHisタグ付加STOP-1（10μg/ml、A；1試料につき500,000細胞個）と共に4℃で1時間インキュベートした。タンパク質結合は、抗Hisモノクローナル抗体（5mg/ml）又は抗Flag（5mg/ml、ネガティブな対照として）を用いたFACSにて細胞を処理し、その後FITC結合ヤギ抗マウス抗体にて処理することによって検出した。

図41は、STOP-1がヒトHeLa細胞、ヒトHT1080線維芽細胞細胞およびヒトの臍静脈内皮細胞（HUEC）細胞の表面に特異的に結合し、ヒト胚腎臓293細胞には結合しないことを示す。STOP-1のレセプターがHeLa、HT1080およびHUEC細胞に存在すると考えられる。

20

【0222】

実施例25 S7モノクローナル抗体は細胞へのSTOP-1結合を促進する

HT1080細胞は、FACSバッファー（20mMのHEPES、pH7.5、140mMのNaCl、1mMのCaCl₂、1mMのMgCl₂、2%FBS）中で、100ug/mlのS7又は6b12モノクローナル抗体存在下にて、組み換え精製された完全長ヒトHisタグ付加STOP-1（10μg/ml、A；1試料につき500,000細胞個）と共に4℃で1時間インキュベートした。タンパク質結合は、抗Hisモノクローナル抗体（5mg/ml）又は抗Flag（5mg/ml、対照として）を用いたFACS処理の後、FITC結合ヤギ抗マウス抗体にて処理することによって検出した。

30

図42はS7抗体がHT1080細胞の細胞表面へのSTOP-1結合を促進するのに対して、6B12促進しなかったことを示す。また、S4抗体を同じアッセイで試験したところ、HT1080細胞へのSTOP-1結合を促進することがわかった。S7抗体およびS4抗体が細胞に結合したSTOP-1に結合することができ、S7抗体又はS4抗体のSTOP-1への結合は、STOP-1へのSTOP-1レセプターの結合を阻害するようではない。したがって、S7抗体がSTOP-1に結合するエピトープは、そのレセプターへのSTOP-1結合のために必要ではないようである。

【0223】

40

実施例26 STOP-1は内皮細胞移動を促進する

方向性細胞移動は、変更されたボイデン走化性チャンバ(modified Boyden chemotaxis chamber)(TranswellsTM, Corning, Inc.)を用いて測定された。8ミクロン孔を有するポリカーボネートフィルターを、Collaborative Sciencesより入手のコラーゲンIの0.1%溶液にて4℃で一晩インキュベートした。本過程で、フィルタの下面をコラーゲン（細胞接着に必要な細胞外マトリクスタンパク質）でコートした。翌日、フィルタをPBSですすいで、1%ウシ血清アルブミン（BSA）を含む基本的内皮細胞培養液（Clonetics）から構成される遮断（ブロッキング）培養液（各々の下部チャンバ当たり200マイクロリットル）にて室温で1時間遮断したを有する室温で、1時間ブロックされた。

50

HUVEC細胞（Cloneticsより入手、完全培養液にて生育）を細胞解離溶液（0.25% EDTA）を用いて回収し、移動培地（0.1% BSAを含み、成長因子を含まない内皮細胞基本的培養液）に再懸濁した。再懸濁した細胞は、変更されたボイデンチャンバ（10,000細胞個/ml、150マイクロリットル/ウェル）の上部チャンバに置いた。bFGF（1ng/ml又は10ng/ml（最終濃度））又はSTOP-1（1ug/ml又は10ug/ml（最終濃度））を含む移動培地を、変更されたボイデンチャンバ（300マイクロリットル/ウェル）の下部チャンバに加えた。移動培地単独（bFGF又はSTOP-1なし）は、対照として下部チャンバに加えた。各々の条件は3通り行った。変更されたボイデン走化性チャンバを、37℃（5% CO₂）で3時間、インキュベータに置いた。

10

【0224】

その後、移動しなかった（上部チャンバに面したフィルタの上に位置する）細胞を、綿でやさしく取り除いた。フィルタを、4%パラホルムアルデヒド溶液（10分、RT）で固定して、0.2%クリスタルバイオレット溶液（5分、RT）で染色して、細胞を視覚化した。ついで、フィルタの下面にある細胞（すなわち、移動したものを、ニコン倒立顕微鏡を用いて計数した。フィルタはランダムにした（計測者には条件を「隠す」）。1条件当たり3フィルター、フィルタ当たりランダムな6フィールド（40×）にある細胞を計測した。図44のデータは、ある代表的な実験（3から）から得た細胞の平均数を表す。

図43は、STOP-1がHUVEC細胞への走化性がある（すなわち、方向移動を誘発する）ことを示す。本効果の大きさは、bFGF（HUVEC移動を誘発して、全体的にプロ血管形成性分子として作用することが既に示された成長因子）のものに相当する。bFGFおよびSTOP-1を用いた処置は付加効果を示さなかった。また、bFGF又はSTOP-1の何れを用いた処置でも互いの効果を促進しなかった。本予備データは、STOP-1がプロ血管形成性又はプロ脈管形成性分子として作用することを示唆する。更に本効果を確認するために、HUVEC細胞とSTOP-1との相互作用を遮断する抗体を用いて同じ又は類似の実験を繰り返し行う。

20

【0225】

実施例27 STOP-1はMDA435細胞に結合する

MDA-MB-435ヒト乳癌細胞を、10mM EDTAを含む培養フラスコから取り除き、2%胎仔ウシ血清を含む冷たいPBSに再懸濁した。細胞数は、1,000,000細胞個/mlに調製し、懸濁液0.5mlを、10mg/mlのflagタグ付加完全長ヒトSTOP-1及び100mg/mlの特定（6B12）又は対照（4B7）抗体を有するチューブに分配した。混合液を氷上にて1時間インキュベートして、冷えた懸濁液バッファで洗浄した。ついで混合液を、抗flag M2-FITCと共に氷上にて1時間インキュベートした。細胞は懸濁液バッファで洗浄し、蛍光色素をフローサイトメトリーにて測定した。

30

図44は、フローサイトメトリー分析をグラフで表す。検出抗体単独（STOP-1なしの抗flag M2-FITC抗体）で処理した細胞によって生成されるシグナル強度の幾何級数的平均値はおおよそ7.99であった。それぞれ、STOP-1単独、6B12とSTOP-1および4B7とSTOP-1によって処理した細胞によってできるシグナル強度の幾何級数的平均値は、おおよそ13.24、8.3および11.39であった。結果は、STOP-1がMDA-MB-435乳癌細胞に結合し、6B12（STOP-1特異的なモノクローナル抗体）がそれらの細胞へのSTOP-1結合を遮断することを示す。同基準標本対照（4B7抗体）は有意な活性を示さなかった。また、S4およびS7抗体も本アッセイに用いた。両方の抗体は、MDA-MB-435細胞へのSTOP-1の結合を遮断せず、アッセイで細胞へのSTOP-1結合が増加した。

40

【0226】

実施例28 STOP-1 mRNA発現はTNFα及び細胞性ストレスにより上方制御される

50

以前の研究では、低い酸素（低酸素）又は細胞性ストレスの条件が腫瘍形成および血管形成を促進することが示されている。TNF α は、ストレス関連の細胞性反応を刺激するためにしばしば用いられ、血管形成および腫瘍形成を促進することが示唆されている。STOP-1発現が腫瘍形成性で血管形成誘因によって影響を受けるかどうかを試験するために、HUVEC細胞をTNF α および低酸素条件での処理に用いた。

HUVEC細胞を、低酸素条件（95%空気、5%CO₂）又は正常酸素圧（およそ95%空気、5%CO₂）下で、ヒト組み換えTNF α （Genentech, Inc.）100 ng/mlと共に3、8又は24時間インキュベートした。処置した細胞からのmRNAを抽出し、プライマー及び実施例2に記載の条件を用いてTaqMan RT-PCR反応を行った。正常酸素圧条件（100 ng/mlのTNF α なし）下で3時間インキュベートした後の発現レベルと比較することによって、各時間の終わりでのSTOP-1 mRNAの発現の倍数変化を計測した。

図45Bは、正常酸素圧条件下にてTNF α で処理するとSTOP-1 mRNA発現が有意に上方制御されることを示す。発現レベルは、3、8および34時間の時点で実質的に変化するように見えなかった。一方、図45Aは、TNF α が低酸素条件下でインキュベートした細胞でのSTOP-1 mRNAレベルにほとんど又は全く影響を及ぼさないことを示す。面白いことに、TNF α がない条件でのSTOP-1発現は、低酸素条件下処置の34時間後に有意に上方制御され、処理3時間後にはされない。これらの結果は、HUVEC細胞のSTOP-1発現がTNF α および低酸素条件での処理に応答するが、その応答は付加的又は相乗作用的ではなく、おそらく示している類似の作用経路であることを示唆する。

【0227】

主要な配列リスト

10

20

配列番号	解説
1	DNA76393-1664
2	DNA76393-1664 のアミノ酸配列
3	代替的 STOP-1 アミノ酸配列
4	マウス STOP-1 アミノ酸配列
5	メダカ STOP-1 アミノ酸配列
6	ゼブラフィッシュ STOP-1 アミノ酸配列
7	ニワトリ STOP-1 アミノ酸配列
8	S7 - 第一 アミノ酸配列
9	S7 - 第二 アミノ酸配列
10	S7 - 第三 アミノ酸配列
11	S16 - 第一 アミノ酸配列
12	S16 - 第二 アミノ酸配列
13	S16 - 第三 アミノ酸配列
14	F5 - 第一 アミノ酸配列
15	F5 - 第二 アミノ酸配列
16	F5 - 第三 アミノ酸配列
17	S4 - 第一 アミノ酸配列
18	S4 - 第二 アミノ酸配列
19	S4 - 第三 アミノ酸配列
20	S9 - 第一 アミノ酸配列
21	S9 - 第二 アミノ酸配列
22	S9 - 第三 アミノ酸配列
23	RT-PCR ハイブリダイゼーションプローブ
24	RT-PCR フォワード プライマー
25	RT-PCR リバース プライマー
26	鋳型配列
27	プライマー 配列
28	プライマー 配列
29	プライマー 配列

10

20

30

40

30	プライマー 配列
31	プライマー 配列
32	プライマー 配列
33	プライマー 配列
34	プライマー 配列
35	プライマー 配列
36	プライマー 配列
37	プライマー 配列
38	プライマー 配列
39	プライマー 配列
40	プライマー 配列
41	プライマー 配列
42	プライマー 配列
43	プライマー 配列
44	プライマー 配列
45	プライマー 配列
46	プライマー 配列
47	プライマー 配列
48	プライマー 配列
49	プライマー 配列
50	プライマー 配列
51	プライマー 配列
52	プライマー 配列
53	プライマー 配列
54	プライマー 配列
55	プライマー 配列
56	プライマー 配列
57	プライマー 配列
58	プライマー 配列
59	プライマー 配列
60	プライマー 配列

10

20

30

40

61	プライマー 配列
62	プライマー 配列
63	プライマー 配列
64	プライマー 配列
65	プライマー 配列
66	プライマー 配列
67	プライマー 配列
68	プライマー 配列
69	プライマー 配列
70	プライマー 配列
71	プライマー 配列
72	プライマー 配列
73	プライマー 配列
74	プライマー 配列
75	プライマー 配列
76	プライマー 配列
77	プライマー 配列
78	プライマー 配列
79	プライマー 配列
80	プライマー 配列
81	プライマー 配列
82	プライマー 配列
83	プライマー 配列
84	GCN4 ロイシンジッパー
85	終末配列を含むオリゴ
86	抗 Her-2 Fab 軽鎖を含むアミノ酸配列
87	抗 Her-2 Fab 重鎖領域を含むアミノ酸配列
88	配列番号： 86 及び 87 (pv0350-2b)をコードするファジミドの核酸配列
89	抗 Her-2 F(ab) ₂ 軽鎖を含むアミノ酸配列
90	抗 Her-2 F(ab) ₂ 重鎖領域領域を含むアミノ酸配列

10

20

30

40

91	配列番号：89 及び 90 (pv0350-4) のアミノ酸配列をコードするファジミドの核酸配列	
92	S4-Fab 軽鎖を含むアミノ酸配列	
93	S4-Fab 重鎖領域を含むアミノ酸配列	
94	配列番号：92 及び 93 のアミノ酸をコードする核酸配列	
95	S9-Fab 軽鎖を含むアミノ酸配列	10
96	S9-Fab 重鎖領域を含むアミノ酸配列	
97	配列番号：95 及び 96 のアミノ酸配列をコードする核酸配列	
98	S7-F(ab) ₂ 軽鎖を含むアミノ酸配列	
99	S7-F(ab) ₂ 重鎖領域を含むアミノ酸配列	
100	配列番号：98 及び 99 のアミノ酸配列をコードする核酸配列	
101	S16-F(ab) ₂ 軽鎖を含むアミノ酸配列	
102	S16-F(ab) ₂ 重鎖領域を含むアミノ酸配列	20
103	配列番号：101 及び 102 のアミノ酸配列をコードする核酸配列	
104	F5-F(ab) ₂ 軽鎖を含むアミノ酸配列	
105	F5-F(ab) ₂ 重鎖領域を含むアミノ酸配列	
106	配列番号：104 及び 105 のアミノ酸配列をコードする核酸配列	
107	S4-Fab 軽鎖を含むアミノ酸配列	
108	S4-Fab 重鎖領域を含むアミノ酸配列	
109	配列番号：107 及び 108 (pv0120-S4) のアミノ酸配列をコードするベクターの核酸配列	30
110	S4 IgG 軽鎖を含むアミノ酸配列	
111	配列番号：110 のアミノ酸配列をコードするベクターの核酸配列 (LPG3.HumanKappaG6)	
112	S4 IgG 重鎖を含むアミノ酸配列	
113	配列番号：112 のアミノ酸配列をコードするベクターの核酸配列 (LPG4.HumanHC-S4)	
114	図 1 のコンセンサスアミノ酸配列	40
115	H2 コンセンサス配列	
116	H3 コンセンサス配列	
117	ポリペプチド配列	

ここに挙げたすべての特許、出願及び文献は出典明記によりここに組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0228】

【図 1】多種多様な種 — ヒト（配列番号：3）、マウス（配列番号：4）、メダカ（配

10

20

30

40

50

列番号：5）、ゼブラフィッシュ（配列番号：6）及びニワトリ（配列番号：7）一からのSTOP-1をコードするアミノ酸配列の整列を示す。また、コンセンサス配列を提供する。矢印はシグナル配列切断部位を示す。赤は全ての種において保存される残基を示す。コンセンサス配列中の大文字は、全ての種にわたって保存された残基を示す。コンセンサス配列中の小文字は、大部分の種において保存される残基を示す。それらの種に保存されていない残基を「ピリオド．」で示す。「！」はI又はVを示す。「\$」はL又はMを表す。「%」がF又はYを表す。「#」はB、D、E、N、Q又はZを示す。

【図2】ヒトSTOP-1のアミノ酸配列を示す（配列番号：3）。シグナル配列を囲みのアミノ酸で示す。三重らせん体領域を下線で示す。グリコシル化部位はアミノ酸186である。

10

【図3】（A）特定の組織型に存在するヒトSTOP-1のmRNA、及び（B）マウス発生の異なる段階から得たマウスSTOP-1のmRNAを示す。完全長ヒト又はマウスSTOP-1のDNAは、放射性同位元素で識別して、成人のヒト又は発生中のマウス胚の組織のノーザンブロットのプロブに用いた。

【図4】（A）CHO-DP12又は（B）CHO-psgb(ATCC)細胞によって生成され、nickel-NTA親和性クロマトグラフィーによって精製されたヒトSTOP-1タンパク質のクーマシー染色を示す。ベクター(pRK5)は対照として用いた。

【図5】一過性の形質移入CHO-psgb細胞の（A）上澄み及び（B）細胞溶解物中に存在するヒトヒスチジン標識STOP-1タンパク質のウェスタンブロットを示す。ウェスタンブロットは抗his抗体でプロブした。

20

【図6】SF9昆虫細胞のバキュロウイルス感染系を用いて発現させたヒトSTOP-1タンパク質のオリゴマー化を示す。STOP-1タンパク質及び多様な欠損突然変異型がSF9細胞で発現され、サイズ排除カラムで分離し、光分散分析の対象とした、例えば（A）S31-K243、（B）E89-K243及び（C）L94-K243。モノマーの予測される分子量を、各グラフの左角に示す。いくつかのピークの隣に示す数は、ピークにある複合体の平均分子量を意味する。

【図7】哺乳動物細胞から発現されたヒトSTOP-1タンパク質のオリゴマー化を示す。ヒトSTOP-1タンパク質及び多様な欠損突然変異型がCHO細胞で発現され、サイズ排除カラムで分離し、光分散分析の対象とした、例えば（A）M1-K243及び（B）デルターTHD（残基1-54、94-243、及びヒスチジントグ）。モノマーの予測される分子量を、各グラフの左角に示す。いくつかのピークの隣に示す数は、ピークにある複合体の平均分子量を意味する。非還元条件下で、CHO-psgb細胞で組み換えられて発現された分泌型のhis標識した完全長ヒトSTOP-1タンパク質のウェスタンブロットは、大部分がホモダイマー化した複合体であることを示した（C）。ウェスタンブロットは抗his抗体でプロブした。

30

【図8】ヒトのhis標識したSTOP-1WT、デルターTHD、及びデルターデルターTHD STOP-1（残基1-54、94-243、及びヒスチジントグ）を発現するCHO-psgb細胞の（A）細胞培養液及び（B）全細胞溶解物のウェスタンブロットを示し、還元及び非還元状態を対象とした。ウェスタンブロットは抗his抗体でプロブした。

40

【図9】his標識したWT、G53A、及びN186A STOP-1コンストラクトを発現するCHO-psgb細胞の（A）細胞培養液及び（B）全細胞溶解物のウェスタンブロットを示し、還元及び非還元状態を対象とした。ウェスタンブロットは抗his抗体でプロブした。

【図10】his標識したWT、C55A、C93A、及びC109A STOP-1コンストラクトを発現するCHO-psgb細胞の（A）細胞培養液及び（B）全細胞溶解物のウェスタンブロットを示し、還元及び非還元状態を対象とした。ウェスタンブロットは抗his抗体でプロブした。

【図11】マウスSTOP-1 mRNA (mSTOP-1 mRNA) がMMTV-WNT1トランスジェニックマウス由来の胸部腫瘍に発現し、正常な哺乳動物内皮細胞では発現

50

していないことを示す。RNA試料は、胸部腫瘍細胞（「T1」－「T7」で示す）又はC57Mgマウス正常哺乳動物内皮細胞（「N」で示す）から採取し、mSTOP-1プライマーとmRLP19プライマーでRT-PCRを行った。PCR産物はアガロースゲル上にて分離した。

【図12】（A）ヒトSTOP-1又は（B）マウスSTOP-1を形質移入した後の3T3細胞の増殖を示す。図12Aは³H-チミジン添加後12、28及び96時間時点での3T3細胞への³H-チミジン取り込みの量（1分当たりの数（cpm））を示す。図12Bは³H-チミジン添加後12、28及び96時間時点での3T3細胞への³H-チミジン取り込みの量（1分当たりの数（cpm））を示す。対照：ベクター（puro2及びph1）のみで形質移入したもの。

10

【図13】ヒトSTOP-1をコードするレトロウイルス感染後の3T3細胞又は293細胞の増殖を示す。図13A及びBは、対照ベクター（Babe）又はヒトSTOP-1をコードするレトロウイルスをそれぞれ感染した3T3細胞又は293細胞から発現したヒトSTOP-1タンパク質のウェスタンブロットである。S7-IgG抗体を用いて全細胞溶解物からSTOP-1を免疫沈降した。ウェスタンブロットはポリクローナル抗ヒトSTOP-1抗体でプローブした。図13Cは、比色分析のセルタイターアッセイにより検出されるように、感染した細胞集団にみられる細胞増殖のレベルを示す。

【図14】マウスSTOP-1が異種移植マウスモデルにおいて3T3線維芽細胞より腫瘍形成を誘導することを示す。図14Aは、ベクター単独（p2ベクター）又はマウスSTOP-1ないしRASタンパク質をコードするDNAを形質移入した3T3線維芽細胞を移植したマウスにおける腫瘍の平均体積を示す。形質移入細胞はヌードマウス内に移植して、あるいはタンパク質発現を試験した。図14B及びCは、形質移入細胞の等量の上清及び溶解物それぞれのウェスタンブロットを示す。ウェスタンブロットはウサギ抗STOP-1ポリクローナル抗体でプローブした。「TI」は腫瘍発生割合を意味する。

20

【図15】ヒトSTOP-1が異種移植マウスモデルにおいて3T3線維芽細胞より腫瘍形成を誘導することを示す。図15は、ベクター単独又はマウスSTOP-1、RASタンパク質ないしLP1をコードするDNAを形質移入した3T3線維芽細胞を移植したマウスにおける腫瘍の平均体積を示す。S7は配列番号：8-10を有する。S16は配列番号：11-13を有する。F5は配列番号：14-16を有する。S4、F13及びF47は配列番号：17-19を有する。S9は配列番号：20-22を有する。

30

【図16】組み換えSTOP-1タンパク質がSK-Mel-31細胞の創傷治癒及び運動性を亢進することを示す。SK-Mel-31細胞は、（A）NT-外来性リガンドのない処理、（B）b762-バキュロウイルス産生ヒトSTOP-1タンパク質、（C）hrEGF（50ng/ml）、（D）hrEGF及びb762、又は（E）CHO哺乳動物産生ヒトSTOP-1タンパク質で処理した。

【図17】抗ヒトSTOP-1抗体である6B12がシグナル配列と三重らせんドメインの間にあるヒトSTOP-1のN末端配列に結合することを示す。図17Aは、図18B及びCのエピトープ位置研究に用いたhisタグ化ヒト及び完全長ゼブラフィッシュSTOP-1タンパク質の構造図である。図17B及びCは、それぞれ抗his抗体及び6B12抗体をプローブとした、図17Aのタンパク質を組み換えして発現する細胞抽出物のウェスタンブロットを示す。

40

【図18】ヒトSTOP-1に対する親和性を持つ多種のファージ由来抗体のCDRのアミノ酸配列を示す。「H1」、「H2」及び「H3」はV_H-CDR1、V_H-CDR2及びV_H-CDR3を意味する。一般的に頭の数値は、カバットナンバリングシステムに従って、アミノ酸位置28-33、49-58及び92-102に一致する。列挙した配列の配列番号を以下に示す：Ab名称S7、（H1）配列番号：8、（H2）配列番号：9、（H3）配列番号：10。Ab名称S16、（H1）配列番号：11、（H2）配列番号：12、（H3）配列番号：13。Ab名称F5、F6、（H1）配列番号：14、（H2）配列番号：15、（H3）配列番号：16。Ab名称S4、F13、F37、（H1）配列番号：17、（H2）配列番号：18、（H3）配列番号：19。Ab名称S

50

9、(H1) 配列番号：20、(H2) 配列番号：21、(H3) 配列番号：22。

【図19】STOP-1に対する抗体の親和性を測定するための競合的ELISAに用いるための、S4及びS7Fab又はIgGの最適濃度を決定するためのELISAアッセイのグラフを示す。「Sコート」は、マイクロタイタプレート上でコートされるSTOP-1の短型(#94-243)を指す。「Fコート」は、マイクロタイタプレートにおおわれているヒトSTOP-1の完全長型を指す。およそ90%の最大結合は、競合的ELISAアッセイの使用に最適であると考えられた。西洋わさびペルオキシダーゼー複合タンパク質Gは、結合したFab及びIgG検出のために用いられた。

【図20】S4及びS7Fab又はIgGの結合親和性を測定するための競合的ELISAの結果をグラフに示す。プレートは、短い形又は完全長ヒトSTOP-1でコートされ、それぞれ短い形又は完全長STOP-1と競合させた(それぞれ図20A及びB)。算出した結合親和性は括弧内に示す。

【図21】STOP-1に対する多種のファージ由来抗体の結合親和性の概要を示す。「S/S」は、マイクロタイタプレートがSTOP-1の短型でコートされ、STOP-1の短型と競合したELISAであることを指す。「F/S」は、マイクロタイタプレートがヒトSTOP-1の完全長型でコートされ、ヒトSTOP-1の短型と競合したELISAであることを指す。「F/F」は、マイクロタイタプレートがSTOP-1の完全長型でコートされ、STOP-1の完全長型と競合したELISAであることを指す。これらの研究で用いられるファージは、S4-Fabファージ及びS7-F(ab)₂ファージであった。

【図22】プレートを、ヒトSTOP-1でコートし、S4 IgGを結合させ、そして、S4(Fab)ファージ、S7(F(ab)₂)ファージ(S9(Fab)ファージ)S16(F(ab)₂)ファージ、及びF5(F(ab)₂)ファージを競合させたELISAアッセイをグラフに示す。Y軸は、S4 IgGのないウェルのOD450nm値でS4 IgGを遮断したウェルのOD450nm値を割ることによって算出される非遮断の割合を示す。

【図23】インビトロでの多種のプロテアーゼによって切断されるバキュロウイルス発現ヒトSTOP-1タンパク質のクーマシーブルー染色ゲルを示す。「MMP」は細胞外基質分解酵素を指す。

【図24】F(ab)₂ファージディスプレイタンパク質のFabをコードするファジミド、又はFabないしIgGタンパク質をコードするベクターの構造図を示す。図24Aは、Fab-ファジミドコンストラクトの構造図である。コンストラクトは、アルカリホスファターゼプロモーター、STIIシグナル配列、V_L及びC_L軽鎖配列、gDタグ、他のSTIIシグナル配列、重鎖V_H及びCH₁領域と、M13バクテリオファージpI₁Iコートタンパク質(cP3)のC末端の一部を含む。図24Bは、F(ab)₂-ファジミドコンストラクトの構造図である。コンストラクトは一般に、それは付加的にロイシンジッパー配列(zip)を含む場合を除き、Fab-ファジミドと同じ配列を含む。図24Cは、Fabタンパク質をコードする核酸分子の構造図である。図24Dは、CH₂及びCH₃配列を含むIgGタンパク質をコードする核酸分子の構造図である。

【図25A】ファージディスプレイ抗Her-2 Fabのアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図25は、抗Her-2 Fab軽鎖を含むアミノ酸配列(配列番号：86)、抗Her-2 Fab重鎖領域を含むアミノ酸配列(配列番号：87)、及びアミノ酸配列をコードしているファジミドの核酸配列(配列番号：88)を示す。

【図25B】ファージディスプレイ抗Her-2 Fabのアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図25は、抗Her-2 Fab軽鎖を含むアミノ酸配列(配列番号：86)、抗Her-2 Fab重鎖領域を含むアミノ酸配列(配列番号：87)、及びアミノ酸配列をコードしているファジミドの核酸配列(配列番号：88)を示す。

【図25C】ファージディスプレイ抗Her-2 Fabのアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図25は、抗Her-2 Fab軽鎖を含むアミノ酸配列(配列番号：86)、抗Her-2 Fab重鎖領域を含むアミノ酸配列(配列番号：87)

10

20

30

40

50

【図 26 F】ファージディスプレイ抗 Her-2 F (ab) ' ₂ のアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図 26 は、抗 Her-2 F (ab) ' ₂ 軽鎖を含むアミノ酸配列 (配列番号: 89)、抗 Her-2 F (ab) ' ₂ 重鎖領域を含むアミノ酸配列 (配列番号: 90)、及びアミノ酸配列をコードしているファジミドの核酸配列 (配列番号: 91) を示す。

50

号：91)を示す。

【図26G】ファージディスプレイ抗Her-2F(ab)₂のアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図26は、抗Her-2F(ab)₂軽鎖を含むアミノ酸配列(配列番号：89)、抗Her-2F(ab)₂重鎖領域を含むアミノ酸配列(配列番号：90)、及びアミノ酸配列をコードしているファジミドの核酸配列(配列番号：91)を示す。

【図26H】ファージディスプレイ抗Her-2F(ab)₂のアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図26は、抗Her-2F(ab)₂軽鎖を含むアミノ酸配列(配列番号：89)、抗Her-2F(ab)₂重鎖領域を含むアミノ酸配列(配列番号：90)、及びアミノ酸配列をコードしているファジミドの核酸配列(配列番号：91)を示す。

10

【図27A】ファージディスプレイ抗S4-Fabのアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図27は、S4-Fab軽鎖を含むアミノ酸配列(配列番号：92)、S4-Fab重鎖領域を含むアミノ酸配列(配列番号：93)、及びアミノ酸配列をコードしている核酸配列(配列番号：94)を示す。

【図27B】ファージディスプレイ抗S4-Fabのアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図27は、S4-Fab軽鎖を含むアミノ酸配列(配列番号：92)、S4-Fab重鎖領域を含むアミノ酸配列(配列番号：93)、及びアミノ酸配列をコードしている核酸配列(配列番号：94)を示す。

【図27C】ファージディスプレイ抗S4-Fabのアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図27は、S4-Fab軽鎖を含むアミノ酸配列(配列番号：92)、S4-Fab重鎖領域を含むアミノ酸配列(配列番号：93)、及びアミノ酸配列をコードしている核酸配列(配列番号：94)を示す。

20

【図28A】ファージディスプレイ抗S9-Fabのアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図28は、S9-Fab軽鎖を含むアミノ酸配列(配列番号：95)、S9-Fab重鎖領域を含むアミノ酸配列(配列番号：96)、及びアミノ酸配列をコードしている核酸配列(配列番号：97)を示す。

【図28B】ファージディスプレイ抗S9-Fabのアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図28は、S9-Fab軽鎖を含むアミノ酸配列(配列番号：95)、S9-Fab重鎖領域を含むアミノ酸配列(配列番号：96)、及びアミノ酸配列をコードしている核酸配列(配列番号：97)を示す。

30

【図28C】ファージディスプレイ抗S9-Fabのアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図28は、S9-Fab軽鎖を含むアミノ酸配列(配列番号：95)、S9-Fab重鎖領域を含むアミノ酸配列(配列番号：96)、及びアミノ酸配列をコードしている核酸配列(配列番号：97)を示す。

【図29A】ファージディスプレイ抗S7-F(ab)₂のアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図29は、S7-F(ab)₂軽鎖を含むアミノ酸配列(配列番号：98)、S7-F(ab)₂重鎖領域を含むアミノ酸配列(配列番号：99)、及びアミノ酸配列をコードしている核酸配列(配列番号：100)を示す。

【図29B】ファージディスプレイ抗S7-F(ab)₂のアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図29は、S7-F(ab)₂軽鎖を含むアミノ酸配列(配列番号：98)、S7-F(ab)₂重鎖領域を含むアミノ酸配列(配列番号：99)、及びアミノ酸配列をコードしている核酸配列(配列番号：100)を示す。

40

【図29C】ファージディスプレイ抗S7-F(ab)₂のアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図29は、S7-F(ab)₂軽鎖を含むアミノ酸配列(配列番号：98)、S7-F(ab)₂重鎖領域を含むアミノ酸配列(配列番号：99)、及びアミノ酸配列をコードしている核酸配列(配列番号：100)を示す。

【図30A】ファージディスプレイ抗S16-F(ab)₂のアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図30は、S16-F(ab)₂軽鎖を含むアミノ酸配列(配列番号：101)、S16-F(ab)₂重鎖領域を含むアミノ酸配列(配列番号：102)、及びアミノ酸配列をコードしている核酸配列(配列番号：103)を示す。

50

号：102）、及びアミノ酸配列をコードしている核酸配列（配列番号：103）を示す。

【図30B】ファージディスプレイ抗S16-F(ab)₂のアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図30は、S16-F(ab)₂軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：101）、S16-F(ab)₂重鎖領域を含むアミノ酸配列（配列番号：102）、及びアミノ酸配列をコードしている核酸配列（配列番号：103）を示す。

【図30C】ファージディスプレイ抗S16-F(ab)₂のアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図30は、S16-F(ab)₂軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：101）、S16-F(ab)₂重鎖領域を含むアミノ酸配列（配列番号：102）、及びアミノ酸配列をコードしている核酸配列（配列番号：103）を示す。

10

【図31A】ファージディスプレイ抗F5F(ab)₂のアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。図31は、F5-F(ab)₂軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：104）、F5-F(ab)₂重鎖領域を含むアミノ酸配列（配列番号：105）、及び、アミノ酸配列をコードしている核酸配列（配列番号：106）を示す。

【図31B】ファージディスプレイ抗F5F(ab)₂のアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。図31は、F5-F(ab)₂軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：104）、F5-F(ab)₂重鎖領域を含むアミノ酸配列（配列番号：105）、及び、アミノ酸配列をコードしている核酸配列（配列番号：106）を示す。

20

【図31C】ファージディスプレイ抗F5F(ab)₂のアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。図31は、F5-F(ab)₂軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：104）、F5-F(ab)₂重鎖領域を含むアミノ酸配列（配列番号：105）、及び、アミノ酸配列をコードしている核酸配列（配列番号：106）を示す。

【図32A】S4-Fabのアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図32は、S4-Fab軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：107）、S4-Fab重鎖領域を含むアミノ酸配列（配列番号：108）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：109）を示す。

【図32B】S4-Fabのアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図32は、S4-Fab軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：107）、S4-Fab重鎖領域を含むアミノ酸配列（配列番号：108）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：109）を示す。

30

【図32C】S4-Fabのアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図32は、S4-Fab軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：107）、S4-Fab重鎖領域を含むアミノ酸配列（配列番号：108）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：109）を示す。

【図32D】S4-Fabのアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図32は、S4-Fab軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：107）、S4-Fab重鎖領域を含むアミノ酸配列（配列番号：108）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：109）を示す。

40

【図32E】S4-Fabのアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図32は、S4-Fab軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：107）、S4-Fab重鎖領域を含むアミノ酸配列（配列番号：108）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：109）を示す。

【図32F】S4-Fabのアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図32は、S4-Fab軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：107）、S4-Fab重鎖領域を含むアミノ酸配列（配列番号：108）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：109）を示す。

【図32G】S4-Fabのアミノ酸配列及び核酸配列を記載する。より詳しくは、図32は、S4-Fab軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：107）、S4-Fab重鎖領域

50

域を含むアミノ酸配列（配列番号：108）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：109）を示す。

【図33A】IgGタンパク質のS4軽鎖配列を記載する。より詳しくは、図33は、S4軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：110）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：111）を示す。

【図33B】IgGタンパク質のS4軽鎖配列を記載する。より詳しくは、図33は、S4軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：110）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：111）を示す。

【図33C】IgGタンパク質のS4軽鎖配列を記載する。より詳しくは、図33は、S4軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：110）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：111）を示す。

10

【図33D】IgGタンパク質のS4軽鎖配列を記載する。より詳しくは、図33は、S4軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：110）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：111）を示す。

【図33E】IgGタンパク質のS4軽鎖配列を記載する。より詳しくは、図33は、S4軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：110）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：111）を示す。

【図33F】IgGタンパク質のS4軽鎖配列を記載する。より詳しくは、図33は、S4軽鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：110）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：111）を示す。

20

【図34A】IgGタンパク質のS4重鎖配列を記載する。より詳しくは、図34は、S4重鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：112）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：113）を示す。

【図34B】IgGタンパク質のS4重鎖配列を記載する。より詳しくは、図34は、S4重鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：112）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：113）を示す。

【図34C】IgGタンパク質のS4重鎖配列を記載する。より詳しくは、図34は、S4重鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：112）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：113）を示す。

【図34D】IgGタンパク質のS4重鎖配列を記載する。より詳しくは、図34は、S4重鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：112）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：113）を示す。

30

【図34E】IgGタンパク質のS4重鎖配列を記載する。より詳しくは、図34は、S4重鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：112）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：113）を示す。

【図34F】IgGタンパク質のS4重鎖配列を記載する。より詳しくは、図34は、S4重鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：112）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：113）を示す。

【図34G】IgGタンパク質のS4重鎖配列を記載する。より詳しくは、図34は、S4重鎖を含むアミノ酸配列（配列番号：112）、及びアミノ酸配列をコードしているベクターの核酸配列（配列番号：113）を示す。

40

【図35】カバットデータベースからヒト抗体軽鎖配列のアミノ酸の頻度を示す。

【図36】適切なコドンセット設定の例示的一実施態様を示す。

【図37】CDRのL1、L2及びL3の多様化のための、制限酵素多様性変性（本明細書において、「ノンランダム（無作為でない）」とも称す）コドンセットの例示的实施態様である。

【図38】CDRのL1、L2及びL3の多様化のための、制限酵素多様性変性（本明細書において、「ノンランダム（無作為でない）」とも称す）コドンセットの例示的实施態様である。

【図39】CDRのL3の多様化のための、制限酵素多様性変性（本明細書において、「

50

ノンランダム（無作為でない）」とも称す）コドンセットの例示的实施態様である。

【図40】CDRのL1、L2及びL3の多様化のための、制限酵素多様性変性（本明細書において、「ノンランダム（無作為でない）」とも称す）コドンセットの例示的实施態様である。

【図41】（1）抗HIS抗体、（2）抗HIS抗体とSTOP-1タンパク質、又は（3）抗flag抗体とSTOP-1タンパク質で処置した後に、フルオレッセイニンイソチオシアネート（FITC）抱合-ヤギ抗マウス抗体で処理した293、HeLa、HT1080又はHUVEC細胞の個体群のフローサイトメトリー解析を示す。抗flag抗体に結合した細胞は少なく、有意差がなかった（すなわち293、HeLa及びHT1080グラフのx軸のはなれた左角のピーク）。x軸は、細胞の数（ログフルオレセインシグナル強度）を示す。y軸は、標識した細胞によって発される蛍光のレベル（現象）を示す。

10

【図42】（1）抗HIS抗体、（2）抗HIS抗体とSTOP-1タンパク質、（3）抗flag抗体とSTOP-1タンパク質、（3）STOP-1タンパク質、（4）STOP-1タンパク質とS7抗体、又は（5）STOP-1と6b12抗体で処理した後に、FITC抱合-ヤギ抗マウス抗体で処理したHT1080細胞集団のFACS分析を示す。

【図43】bFGF又はSTOP-1（「762」）又はネガティブな対照で処理した後、変更されたボイデン走化性チャンバでのHT1080細胞の移動（細胞の数）を示す。

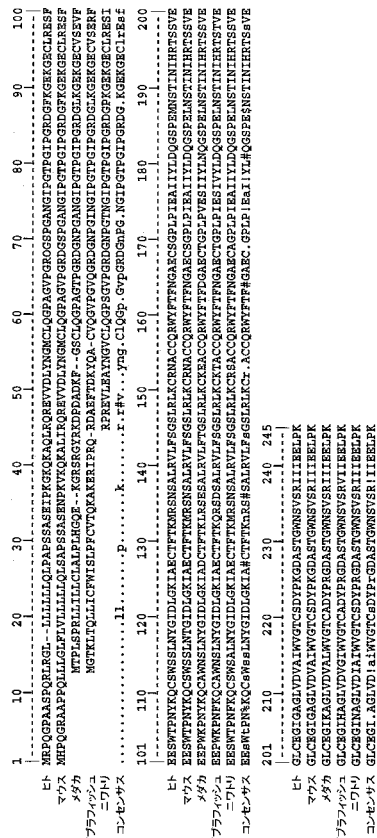
【図44】抗STOP-1抗体（6B12）又は抗体対照（4B7）がある条件及びない条件下でのMDA435細胞へのSTOP-1結合のFACS分析を示す。検出抗体である抗flagM2FITC抗体は、STOP-1結合に影響を与えなかった。

20

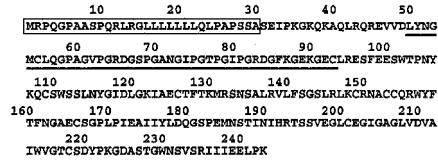
【図45A】組み換えヒトTNF α のある条件下及びない条件下にて、（A）8及び34時間の低酸素条件下で処理した後のSTOP-1mRNA発現の倍変化を示すグラフである。

【図45B】組み換えヒトTNF α のある条件下及びない条件下にて、（B）3、8及び34時間の正常酸素条件下で処理した後のSTOP-1mRNA発現の倍変化を示すグラフである。

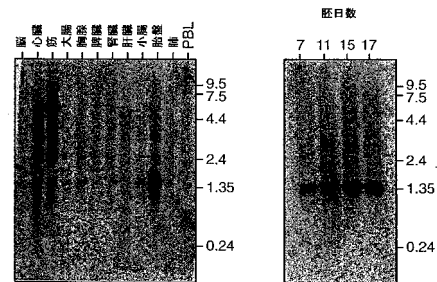
【図 1】



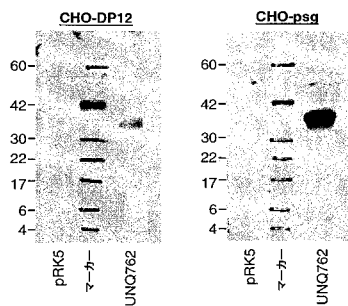
【図 2】



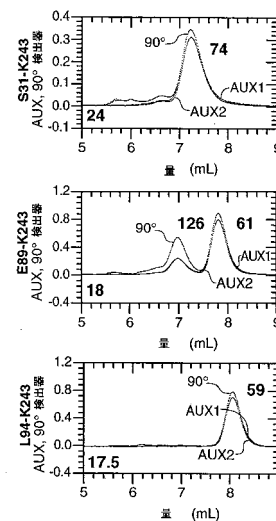
【図 3】



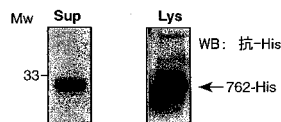
【図 4】



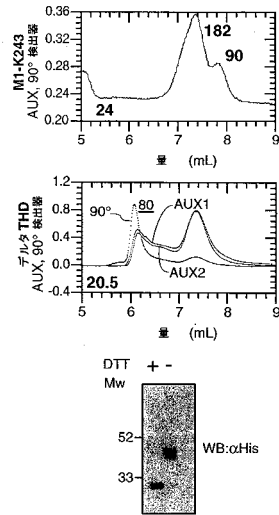
【図 6】



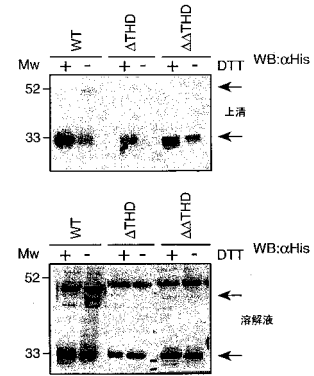
【図 5】



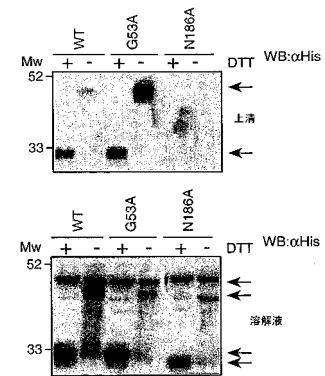
【図 7】



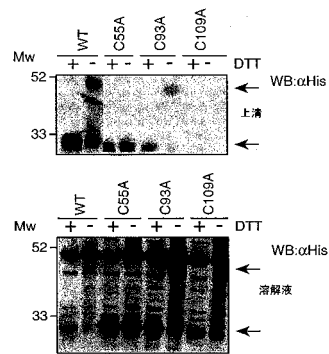
【図 8】



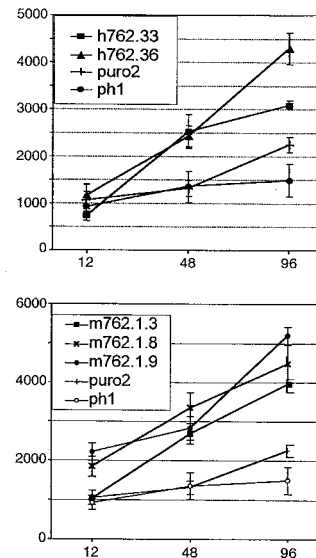
【図 9】



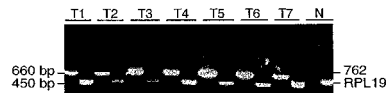
【図 10】



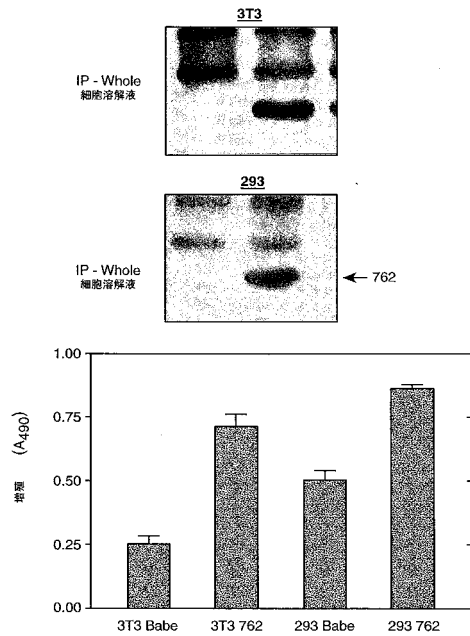
【図 12】



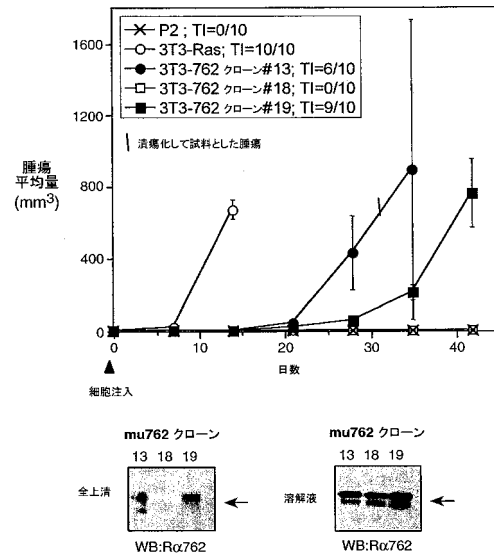
【図 11】



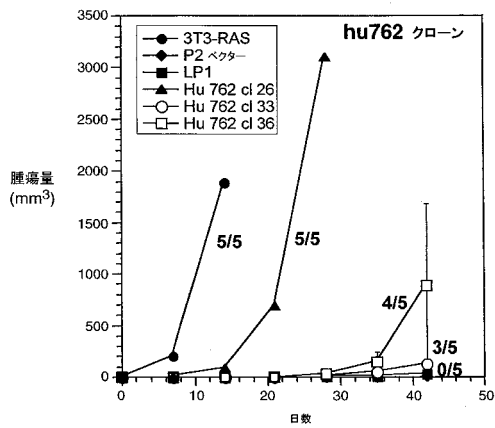
【図 13】



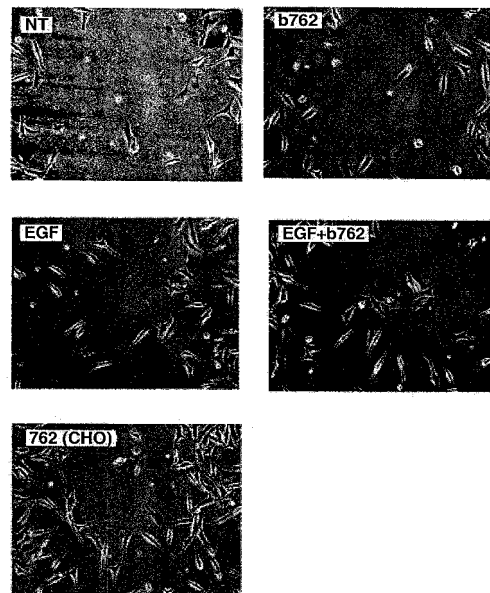
【図 14】



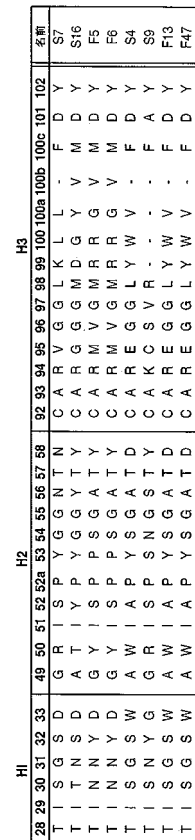
【図 15】



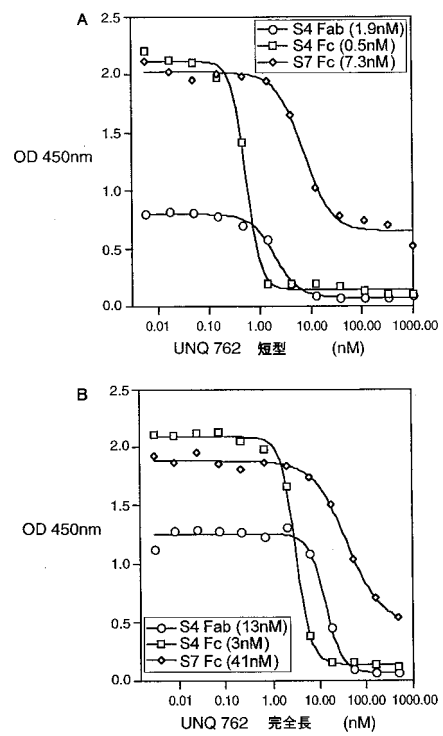
【図 16】



【図 18】



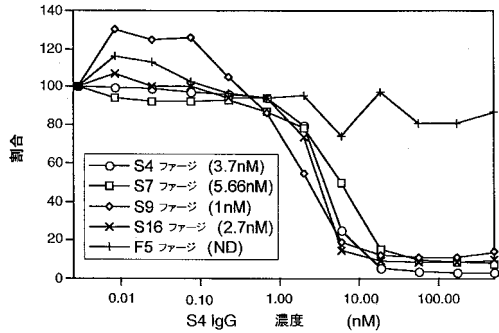
【图 20】



【図 2 1】

	Fab				IgG			
	762 S/S	762 S/S	762 F/S	762 F/F	762 S/S	762 S/S	762 F/F	762 F/F
S4	3nM	3.6nM (1.9nM)	32nM	13.4nM	0.5nM	3.1nM	n/a	41nM
S7	35nM	113nM	57nM	n/a	7.3nM	41nM		

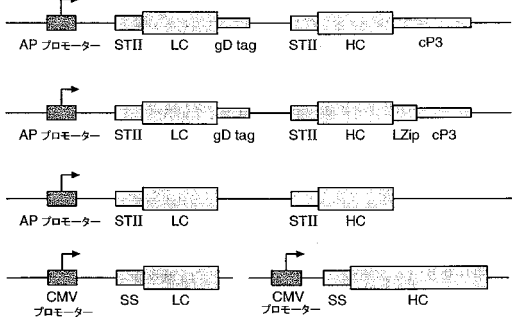
【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5 A】

1 GATTCAACT TCTCCATCT TGGATTAAG AATACAGAC AGCAAAATC TCTCTCTCA GTCTTAATT AGCTTGCCG AATAAGAGA AGAGCCAT
CTTAACTCA AAGATTAAG AACTATTCCT TTATCTCTG AATAGAGCT CACAAATAA TCGAGAGGG TTCTCTCTCT TCTCACTTA
101 GAATCTCTG GCGAGTGA AGCTTGGAG AATATCTCA CTCALAGCT TCGAATAG GCGAATAG ACCAGAGG GTCTATGCT CAGTGAAG
CTTCAAGAC GGTCTCACT TCGAATCTC TCGAATCTC GAGTCTGAG AGCTTATC AGCTTATC AGCTTATC AGCTTATC AGCTTATC
201 GCGCTCTCA GAGTGAAG CCGATGCGA GATCTCTCA GAGTCTGAG AGCTTATC AGCTTATC AGCTTATC AGCTTATC AGCTTATC
CCGCTCACT GGTCTCACT GGTCTCACT GGTCTCACT GGTCTCACT GGTCTCACT GGTCTCACT GGTCTCACT GGTCTCACT
301 AATATTAAT GTTCTCACT GGTCTCACT GGTCTCACT GGTCTCACT GGTCTCACT GGTCTCACT GGTCTCACT GGTCTCACT
TTTCACTA GAGATCTT CAGATCTT TCGATCTC TCGATCTC TCGATCTC TCGATCTC TCGATCTC TCGATCTC TCGATCTC
401 TCGATCTC GAGTGAAG GAGTGAAG GAGTGAAG GAGTGAAG GAGTGAAG GAGTGAAG GAGTGAAG GAGTGAAG
AGTCACTT TCGATCTC TCGATCTC TCGATCTC TCGATCTC TCGATCTC TCGATCTC TCGATCTC TCGATCTC
1 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N A
*start
*met
501 TATGATGAT TCGATCTC CCGATCTC AGCTCTCTT CCGATCTC GGTCTCACT GGTCTCACT GGTCTCACT GGTCTCACT GGTCTCACT
ATATCTCTT AGTCTCTG GGTCTCTG TCGATCTC GGTCTCTG GGTCTCTG GGTCTCTG GGTCTCTG GGTCTCTG
22 Y A D I Q M T Q S P S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A
*CDR-L1
*軽鎖の終り
601 GTTCTCTG GTATCAAG AATCTCTG GGTCTCTG GGTCTCTG GGTCTCTG GGTCTCTG GGTCTCTG GGTCTCTG
GATCTCTG CATATCTG GTTCTCTG GTTCTCTG GTTCTCTG GTTCTCTG GTTCTCTG GTTCTCTG GTTCTCTG
56 V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S
*CDR-L2
701 GGTCTCTG AGGATCTA GTTCTCTA CAGTCTG CAGTCTG CAGTCTG CAGTCTG CAGTCTG CAGTCTG CAGTCTG
GCCAGGCTC TGTCTCTA GTTCTCTA GTTCTCTA GTTCTCTA GTTCTCTA GTTCTCTA GTTCTCTA GTTCTCTA
89 G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y T T P P T F
*CDR-L3

【図 2 5 B】

801 GAGAGAGGTA CGAAGGTGTA GTTACAGAGA ACTGAGGTG GAGAGAGGT GTTACATCTT CCGAGATCTG ATGAGAGGTT GAAATGTGTA AGTCTGCTGG
CTCTGATCT GTCTGATCT CTGTTTCTCT TACAGAGTA GAGTAAAGAG GAGGTGAGAC TATCTGTGTA CTGATGATCT TACAGAGAC
122 G Q G T A K V E I K R T V A P S V F I F P S D E Q L K S G T A S V
901 TTGTGTGCTT GTGTATGAC TTCTATGCTA GAGAGGTGTA AGTGAAGTGA AGGCTCTGTA ATGCGGTGAC TCCAGAGATA GTGTACAGAA
AACAGAGATA GAGTATGAGT AGATATGAGT CTGTGTGCTC TTACAGATAT TACCGAGGT TACCGATCTT AGGATCTCT CAGAGATCT
156 V C L L H N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E
1001 GAGAGAGAG AGAGAGACA CTACAGATCT CAGAGAGAC CTGAGGTGTA GAAAGAGTA CTACAGAGAA CAGAGATCT AGGCTGCTGA AGTCAATCT
CTGCTGCTG TTCTGTGCTT GAGAGGTGTA GTTCGCTGAG GAGTGTGCTT GTTGTGTGTA GTTGTGTGTA TACGAGATCT TACGAGGTGTA
189 Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H
1101 GAGAGAGAG GTTCGCTCT CAGAGAGAG GTTACAGAGT TCCAGAGTGG TGTAGTGTG GTTGTGTGAGT ATTCGCTGAG TTTCGCTGAGT AGGATCTGAG
CTTCGCTGAT CAGAGAGAG GTTGTGTGAG AGTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG
222 Q G L S P V T K S F N R G E C A S S G M A D P N R F R G K D L A
* 縦線の後から、60%の残まり
1201 CTAATGCTGA GGTGATCTCT CTAGAGCTGA GAGAGAGAG GAGAGAGAG GAGAGAGAG GAGAGAGAG GAGAGAGAG GAGAGAGAG GAGAGAGAG
GATGATGAT GATGATGAT GATGATGAT GATGATGAT GATGATGAT GATGATGAT GATGATGAT GATGATGAT GATGATGAT GATGATGAT
256 O
-23
1301 GAAATGCTGA TTCTGCTCTG CAGTATGATCT GTTGTGTGAG AGGCTGTGAG AGGCTGTGAG AGGCTGTGAG AGGCTGTGAG AGGCTGTGAG AGGCTGTGAG
CTTGTGTGAG AGGCTGTGAG AGGCTGTGAG AGGCTGTGAG AGGCTGTGAG AGGCTGTGAG AGGCTGTGAG AGGCTGTGAG AGGCTGTGAG AGGCTGTGAG
-20 N I A F L L A S H F V F S I A T N A F A E V Q L V E S G G G L V Q
* 縦線の後から
1401 CAGAGAGGT CTAGAGCTCT GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG
GTTCGCTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG
14 P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R Q A P G K G L E W
* CUR-H1

【図 2 5 C】

1501 GGTGTGAG GATTTGCTCT AGAGAGGT ATATGATGTA TGTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG
CTAGAGCT CTAATGATGTA TGTGTGTGTA TGTGTGTGTA TGTGTGTGTA TGTGTGTGTA TGTGTGTGTA TGTGTGTGTA TGTGTGTGTA TGTGTGTGTA
48 V A X I Y P T N G Y T R Y A D S V X G R F T I S A D T S K N T A Y
* CUR-H2
1601 CTAATGAGT AAGCTGTGTA GAGTGTGAG GATGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG
GATGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG
81 L Q M N S L R A E D T A V Y C S R W G D G F Y A N D Y W G Q G
* CUR-H3
1701 AACTAGTGA GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT
TGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT
114 T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A L G C
1801 GCTGTGCTGA GGTGTGTGCT CCGAGAGAGT TGTGTGTGCT TGTGTGTGCT TGTGTGTGCT TGTGTGTGCT TGTGTGTGCT TGTGTGTGCT TGTGTGTGCT
CGAGAGATCT CTAATGAGT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT
148 L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
1901 AGGATGTGAC TTCTGTGAG GGTGTGTGAG GTTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT
TGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT GGTGTGTGCT
181 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K
2001 GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG
GATGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG
214 V D K K V E P K S C D K T H L S G G G S G S D F D Y E K M A N A N
* 縦線の後から
2101 ATAGAGGTG TATAGAGTA AATGAGGTG AATAGAGGT AATAGAGGT AATAGAGGT AATAGAGGT AATAGAGGT AATAGAGGT AATAGAGGT
TATAGAGGT AATAGAGGT AATAGAGGT AATAGAGGT AATAGAGGT AATAGAGGT AATAGAGGT AATAGAGGT AATAGAGGT AATAGAGGT
248 X G A N T E N A D E N A L Q S D A K G K L D S V A T D Y G A A I D

【図 2 5 D】

2201 TGTGTGTGAT GTGTGTGAT CCGGTGTGCT TGTGTGTGCT TGTGTGTGCT TGTGTGTGCT TGTGTGTGCT TGTGTGTGCT TGTGTGTGCT TGTGTGTGCT
AGGATGTGTA CAGTGTGTA GGTGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT
281 G I G D V S G L A N G N G A T G D F A G S N S Q M A Q V G D G D
2301 AATGTGTGAT TATAGATGA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA
TATAGATGTA AATGTGTGAT TATAGATGTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA
314 N S P L M N N F R Q Y L P S L P Q S V E C R P F V F S A G K P Y E F
2401 TTGTGTGTA TTGTGTGTA AATGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT
AATGTGTGAT AATGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT
348 S I D C D K I N L F R G V F A F L L Y V A T F N Y V F S T F A N I
2501 ACTGTGTGAT AGGATGTGAT AATGTGTGAT GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG GTTGTGTGAG
TGTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT TTGTGTGAT
381 L R N K E S O
2601 CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT
GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT
2701 AACAGCTCT GGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT
TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT
2801 TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT
AGGATGTGAT AGGATGTGAT AGGATGTGAT AGGATGTGAT AGGATGTGAT AGGATGTGAT AGGATGTGAT AGGATGTGAT AGGATGTGAT AGGATGTGAT
2901 CAGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT
GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT
3001 TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT
AGGATGTGAT AGGATGTGAT AGGATGTGAT AGGATGTGAT AGGATGTGAT AGGATGTGAT AGGATGTGAT AGGATGTGAT AGGATGTGAT AGGATGTGAT

【図 2 5 E】

3101 CCGGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT
GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT
3201 CAGTGTGAT TATAGATGA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA
TATAGATGTA AATGTGTGAT TATAGATGTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA
3301 GAGTGTGAT TATAGATGA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA
TATAGATGTA AATGTGTGAT TATAGATGTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA
3401 CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT
GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT
3501 AATGTGTGAT TATAGATGA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA
TATAGATGTA AATGTGTGAT TATAGATGTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA TTGTGTGCTA
3601 AGGATGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT
TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT
3701 CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT
GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT
3801 GATGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT
TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT TGTGTGTGAT
3901 CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT
GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT GATGTGTGAT
4001 GTTGTGTGAT GTTGTGTGAT GTTGTGTGAT GTTGTGTGAT GTTGTGTGAT GTTGTGTGAT GTTGTGTGAT GTTGTGTGAT GTTGTGTGAT GTTGTGTGAT
CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT CAGTGTGAT

【図 2 5 F】

4101 GGACCAATG CGGTGTGAA TACCOCACAG ATGCGTAAAG AGAAATATAC GGTATGAGG GTTCTCGCT TCTGTGCTA CTGACTGCT GCGCTGTGC
 CTGGGTATC GCACACATTT ATGGGTGTG TAGCATCTC TCTTTATAG CGTATGCC GAGAAAGCCA AGAGCGGCT GACTGAGGA CGGAGCCAG
 4201 GTTCGGCTC GCGAGGCGT ATACAGCTAC TCMAAGGCG TATATGGCTT ATCCACAGA TACAGGGATA ACGAGGAA GACATGTGA CMAAAGGCC
 CAGCGCCAG CCGCTGCCA TAGTCAGTG AGTTTCCGC ATATGCCA TAGGTGTCT AGTCCCTAT TGTGTCTTT CTGTACTCT GTTTTCCG
 4301 ACMAAAGCG CAGAAACCT AAAGAGCGG GTTCTGCG GTTTTTCAT AGGTCTGCC CCGCTACGA GCATACAA ATCGACCT CAATCAGAG
 TCGTTTCCG GTCTTGCA TTTTTCGCG GCACAGCG CMAAAGTA TCGGAGCGG GGGACTGCT CTGATGTT TTAGTGTGA GTTACGTC
 4401 GCGAGGAAC CGACACGAG TATATAGTA CAGAGGTT CCGCTGGA GTGCTGCT GTTCTGAGG GGTGTGCT GTTCTGAGG GCGATGCT
 CAGCGCTTC GGTCTGCTG ATATTCTAT TCGTGCAG CAGGACTT CGGACAGA CCGAGAGA CAGGTGCG GCGCGATG GCGTATGAC
 4501 TCGAGCTTC TCGCTGCG GTTCTGCG GTTCTGTA GTTCTGCT TAGTGTCT TAGTGTCT TAGTGTCT TAGTGTCT TAGTGTCT TAGTGTCT
 AGCGGAGAG AGGAAAGCC TTGACGCG GAAAGTAT GAAAGTAT ATCCATAG TCMAAGCA TCMAAGCG GAGTGTGAG GAGTGTGAG
 4601 AGAGAGGCC GGTACGCG GCGCTGCG GTTATGCG TACTATGCT ATCCAGTGA ACCGCTGAG ACAGCTTA TCGCAGTGA CAGAGGCG
 TCGTGTGCG GAAATGCG GTTCTGCG GAAATGCG ATATAGCA GAACTGAGT TGGGCTAT TGTGTGAT AGGTGTGAG GTTGTGCG
 4701 TGTATACAG ATTAGCAGG CAGAGTAT AGCGCTGCT ACAGTGTCT TGAAGTGT TGAAGTGT TGAAGTGT TGAAGTGT TGAAGTGT TGAAGTGT
 ACATGTGCT TAGTGTCT GTTCTGCG TCGGACGA TGTCTGAGA ACTTACAG CCGATGAT GTTCTGCT TGAAGTGT TGAAGTGT
 4801 TGTGTGCT TGAAGTGT TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG
 ACGGAGAG ACTTGTGCT TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG
 4901 AGCAGTAT GCGCTGCT TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG
 5001 GGTATGAG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG
 CAGTGTCT ATATTGCT TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG TGTCTGCG

【図 2 5 G】

5101 AGTATACAT GTTATATAG TACGAGCT ATCTGAGG TGTCTGCT TGTCTGCT TGTCTGCT TGTCTGCT TGTCTGCT TGTCTGCT TGTCTGCT
 TCAAGCTTA CGATATATC ACTGCTGGA TAGTGTCT AGCAGTGA AGCAGTGA AGCAGTGA AGCAGTGA AGCAGTGA AGCAGTGA AGCAGTGA
 5201 GCGAGGCTT ACATCTGCG CCGAGTGT CCGAGTGT CCGAGTGT CCGAGTGT CCGAGTGT CCGAGTGT CCGAGTGT CCGAGTGT CCGAGTGT
 CCGTCTGGA TGTGTGAGG GGTGTGAG GGTGTGAG GGTGTGAG GGTGTGAG GGTGTGAG GGTGTGAG GGTGTGAG GGTGTGAG GGTGTGAG
 5301 GCGAGCAGA AGTGTGCT CACTTATC GCGTGTAT CAGTCTAT ATGTGTGCG GGAAGTGA GGAAGTGA GGAAGTGA GGAAGTGA GGAAGTGA
 GGTGTGCT TCAAGCAG GGTGTGAG GGTGTGAG GGTGTGAG GGTGTGAG GGTGTGAG GGTGTGAG GGTGTGAG GGTGTGAG GGTGTGAG
 5401 AGCTGTGCT CAGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT
 TTGCAATAC GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT
 5501 CCGCTGCT GTCTGAGA CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT
 GGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT
 5601 GGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT
 CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT CAGTGTGCT
 5701 TGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT
 AGCAGTGA GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT GGTGTGCT
 5801 GGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT
 CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT
 5901 GGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT
 TGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT
 6001 GGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT
 CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT

【図 2 5 H】

6101 AGAGAGAG TATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 TGTGTGCT ATATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG
 6201 ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 TGTGTGCT ATATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG
 6301 TATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 6401 AGAGAGAG TATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 TGTGTGCT ATATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG
 6501 CCGAGAGAT ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 GGTGTGCT ATATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG
 6601 AGAGAGAG TATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 TGTGTGCT ATATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG
 6701 CAGAGAGAT ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 GTTGTGCT ATATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG
 6801 CAGAGAGAT ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 GGTGTGCT ATATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG
 6901 TGTGTGCT ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 AAATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 7001 AGAGAGAG TATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 TGTGTGCT ATATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG TATATAG

【図 2 6 A】

1 GATATATAG TATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 CTATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 101 GATATATAG TATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 CTATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 201 GGTGTGCT ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 CCGAGAGAT ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 301 AAATATAG TATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 TTATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 401 TATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 1 AGTGTGCT TATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 N K N I A F L L A S M F V F S I A T N A
 * 配列の長さ
 501 TATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 22 Y A S D I Q M T Q S P S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T
 * 配列の長さ
 601 TGTGTGCT ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 GAGAGAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 56 A V A W Y Q Q K P K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G
 * 配列の長さ
 701 TGTGTGCT ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG ATATATAG
 89 S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q S Y T T P P T
 * 配列の長さ

【図 2 6 C】

4301 TAAATATC GATATCTTC TACATCAT GTTGCTGT TCATATCTA CAAAGCTA CGTGAGCT CAGTGCTAGS ACTGACGGS TGCCTCTCG
TTGCTTTC CGATTAAGAG CAGCTGAT CAGACAAA AATAGATAT TGTTCCTCA AGCTGACCA TCAGACAA CCGCC AGCCAGCAG
-21 K N I A F L A L A S M F V F S I A T N A Y A V L S E S S G G L V
* 葉部の塩基より

4401 CCAATACG GCTATATCG TTATGTGCG CAGCTGCG GCTTACACT TAAGACAG TATATGCT GCGTGCTCA GCGCGCGCT AAGCGCTCG
CCTACCG CCGTATACG TAATGAGT CAGCTGCT CAGTATGCT CAGTATGCT CAGTATGCT CAGTATGCT CAGTATGCT AAGCGCTCG
130 P G G S L R L S C A A S F N I K D T Y I H W V R Q A P G K G L E
*CDS-1

[illegible]

1701 GGACACATG TACCGTCTC ACCAAGGCC CACGCTCTT CCGCTCTCA AGACGACTC TGGGGGACA GGGGCTCTG
CTTTCGATC ATGGGAGGAC GAGCGGAGC TGGTGGCGG GTACGGTGA GGGGGACAT GGGAGGAGT TGTGGGAGC ACCGCTGT CAGGAGCG
113 G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G T G T A A L G

1801 GGCGCTGGT CAGAGTATC TTCCCGGAC CCGGCTGGT CTTGCTGAG TGGAGGCC TGGACGAG GCGGACAGC TTCCCGGTS TGTACGATC
CGTACGACCA GTTCTCATG AGGGCGCTG GCGACGCTA CAGCATATG ATGCGGCG ATGCTGGT CAGCTGGG AAGGAGGAC AGAGATGAG
147 C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S

1901 CTGACGACT TACTGCTCA CAGCGCTGT GACGTGGCC TCGAGAGT TGGGACCA GACTCATC TGGACGCTA ATCAGAGC CAGCAGACG
GAGTCTGAG ATAGAGGAGT GCGGACATC CTGGGAGC AGGCTGCA ACCGCTGT CAGCTCTT GCTGCTGT CAGGAGAG TTGTGATG
180 S G L I S L S V V T V P S S L G T G T Y I C N V N H K P S N T

2001 AAGGCTGCA AGAAGTGA CCCCAAGCT TGGACAA CTGACGGCG CATGAGACA ATGTCGAGA GCTACTCTT CAGACTTCC AGAAGTACC
TTGAGAT TCTTCTACT GCGGTGGTA AGCAGCTT GAGTGGCG TCACTTCTT GACTCTCTT TCGACTTCT CAGGAGAG TTGTGATG
213 K V D K V E P K S C D K T H G R M K Q L E D K V E E L S K N Y H
* 重箱の読み方、ロインジッパーの読み方)

2101 ACTGAGAA TGAATGCA AGACTGAAA AACTGTGCG GAGGCGGGA AAGCTATG GCGGTGGCT TGGTTCGGT GTTGTGAT ATGAAAGT
TGACTCTT ACTTCGGT TGTGAGTTT TGGACGCG CCGCGCGT TTGATCAT CCGACAGA ACCGAGCA CTAAATCA TACTTCTTA
247 L E N E V A R L K K L V E R G K K L S G G S G D F D Y E K M

ロインジッパーの読み方、連江巾着口ランパン質の読み方 (267-終り)

【図 2 6 E】

2201 GCGAAGGCT ATAAAGGCG GATACGACG AATGCGAAT CBAACCGCG TACAGCTCG GCGTAAMAGG AACCTTGCTT CTGCGCTACG TGAATACGCT
CGCTGGTGA TATTAACCGG GATACGACG TTAAGGCTGA CTTTGCGCG AQCAGGCTG GCGTTCGTC TTAGACGAG CAGACGAGC ACATACGCA
280 A N A N K G A H T E N A D E N A L Q D A G K L D S V A T D Y G

2301 GGTGCTGAC AGGTGTCAT TGTGACTT TCGCGCTCG TTAGAGCTA TGTGACTAT GGTGATTTG TGTGCTCTTA TTCCCAAAAG GTCACAGCTG
CAGACGAC TACAGACGA ACCTGCGA AGGCGACG GATACGAT ACAGATGA CACTTAAGC CAGCAGGAT AAGGTTTAT AGGTTTATC GAGTACGTC
313 A A I D G I F I G V S G L A N G N G A T G C T A A G A G S N S Q M A Q V G

2401 GTACAGCTGA TAACTCACT TTAAGATGA ATTCCGCTA ATATTAAGT TCCCTCCCT AATGCTGGA ATGTGCGCT TTGTCTTTA GCGCTGCTTA
CACTTCGCT ATTAAGTGA ACCTGCTT TTAAGAGCT TAAAGAGGA AGGGAGG TAAAGCTG TAAAGCTG TAAAGCTG TAAAGCTG TAAAGCTG
347 D G D N S P L H N N F R Q Y L L P S L P Q S V C E C R F F A V F S A G K

2501 AACATAGAA ATTCTATG ATTTGAGCA AATAACTA TCCGCTGGT TCTTGCGCT TCTTTATAT GTTGCACTT TTAATGAT ATTCTACG
TGTCACTA AAGATACAC TAACTCTTT TTAATGAT AAGCAGACA AGAACAATA CAAGGTGGA ATATACATA TAAAGATG TAAAGATG
380 P Y E F S I D C D K I N L F R G V A F A L Y V A T F M Y V F S T

2601 TTGTCTACA TACTGCTGA TAAAGACTT TAACTAGCG AGCTTTTG GTACGCGCG CCGTAACCT TGTCTGCTC TCCGCTTGC GTGCGGTG
AAGAGCTT ATGACGAT ATTCTGCTGA ATTATAGCG TGTGAAGAC CAGTCGCGC GGGATATGA ACAGAGGAG GGGCGAGCG CAGCGCCACG
413 F A N I L R N K E S O

2701 ATGAGAGCGG GCGACATCGA CTGATGAGGA AGCGGCGCG ACCCTGCTTA CGGATTCACG ATCCGACGGA TTGAGAGCGA TCAATCTG TGCGAGAACTG
TACGATGGCG CCGCGGAGCT GAGCTACTTT TCGGCGCGG TGGAGAGCTT GCTATGATGG TGGAGTGTGT AACCTCGGT AGTTAGACAG GCTCTTTGAC

2801 TGAATGCGCT AGCGACCTT TCGCAGACCA TTATCGTGG GTGCGCGCTC CATCTGGGAG CAGTCTGGAG CAGCTGGAGT TCGGAGCGGA GAGCGGCGAC
ACTTACCGCT TTGTTGTGGA AGGCTTTGT ATTTATGAGG CAGGCGTAGT AGGCTGTGG AGTGTGCGCG GTATGACCGG TGGCAGAA TGCGCGGCTG

2901 GGTGCGGNG ATGTGCTCC TTGTGTGAG GACCGCGCTA GCGTGGCGGG GTTGCTTTAC TTGTTAGAG AATGATACAG GATATCGGA GCGAACTGGA
CGCGCTAC TACGCGAAG AGCAGCATAT CTGGGCGAAT CGGACCGCGC CAGCGAGAT ACATATCTCT TTACTTAGTG CATTATGCGT GCGTTGCACT

3001 AGCGAGTGT GTGCGAACAC GTCTGCGACG TAGCGACCA CATGATGCT GTGTGTTCT TAAGTCTGGA TATGCGGCTA TACGCGGCTT ATCGCGGGA
TGCAGACGA CAGCTTTTG AGCGGAGG AGCTGTGTT GTATCTATG GAGCGACCTA GAGCTTACAG TTCTAGCACT TATGCGGCTT TATGCGGGA

[illegible]

【図 2 6 G】

[illegible][illegible]

【図 2 7 A】

6401. AAGTGTCTCAG TTGACAGCTT GATCCGCTAG GGGAGAGCGA TATCTCGGAA CAGTGTGAGG GGGCTGTCCA TATCAATATG AGCTGATACG GAATATAGGG
TCTGAGAGGT ACTGTGTTAA CTGAGAGTAA CTCTTGGTGT ATTAGAGCCT GATGCTTTC CCGAGTAGAT AAGTGTATAG TGTGATGTTT CTATATCCG

6501. GATGCTGAGG TCGAGAGTGG ATTGTGTTTA CAGTACATTA GAGTATGATG CAGTATCTAT GTATGATCTG CTGATCTATG CTGATGATCTG CTGATGATCTG
AGAGCTGGAC ACTGTGTGT CAGTATCTG TAAKATATTA GAGTATGATG CAGTATCTAT GTATGATCTG CTGATCTATG CTGATGATCTG CTGATGATCTG

6601. TACAGTGGAA TCCCGCAATF TATACAGTAC AGCAGAGGAA GGGAGCTGCT GATCTCTGCG GGGGTAGCTG GAGTATCTAT CAGTATCTAT TTTAAAAAGT
ATGCTATCTT AGGGCTCTTA ATATGTATG TAC TACTCTCT CTCTGAGCA GTAGGAGAG CCGCAATCA TGGATATTA GTGATACAA ATATTCTTCA

6701. TACAGTGGAA CAGTATGATC CCGTATGAA AAGCATATF CTGAGAGT AGAAGAGCT TAAATATCA TATCATATC AATATGACAG TACAGAGAA TAGGGCTTGA
AAGCTATCTA GATATCTATG CAGTATCTAT TTTGGTATTA GAGCTCTCTA TTTTTCGAA ATGATATAG TTATGCTAG ATGTCTCTT ATTCGCGAAT

6801. GAGCTGTGAA GCGACATCTA ATGGAGATTT GTATAGAGCA AACTATCTA CAGCTGBCAA AAGCATATCA ATCTACAGCT AGAGCTTTC TAGAGATGTA
CTGAGATCTT CATTGTATGT TACCGTAA CAATATCTT TTATAGAT GGTGAGCTT TTGGTATGT TAGATGTCTA TGTGAGAGAC ACTCTCAT

6901. CAGTATCTG CCGCAATTA ATGTGATGAC TGAAGAGGAG GAGCTCTCTA TTTCTTCTCG GGTATGCTA CAGTATCTA CTGTATCTA TTTAAAAAGT
GTACTATTAG GCGGATATTA ATGTGATGAT ACTCTCTCTC CTGAGAGCT AGAGGAGCGC CGAATGAGCT GAGATGTAGT GAGCATATTA TTTTCTTCAA

7001. CAGCTGACCA CTGTATGCC TATGATGAAA CCGATATCT GGGAGATCTT AAGAGCTTTC ATCATATCA ATGCAATCTA CAAGAGATA GGGCTCTGTA
GGTGAAGCTT GAAATATAGG ACTACTCTTT CCGTATATGA CCGTCTCAT TTTCCCGAG TACATATGT TACGTGTCAT GTTCTTATAT CCGAGAGACT

7101. CTGTGAGGAC TATGATGTAAT GGGCATTTGT ATATAGCAAA CTATCTTACA CAGTACAGAA CAGTATCTAT CAGTATCTAT CAGTATCTAT CAGTATCTAT
CTGTGAGGCT TATGATGTAAT GGGCATTTGT ATATAGCAAA CTATCTTACA CAGTACAGAA TATTTCTGTT GATAGCTTTT GATAGCTTTT GATAGCTTTT

1. ACGAAAGAGCA ATGACCCCTT TCTTCTGCA TGATGTGCG TTTTTTCTAT TGCTACAAAT GCTCTATGAG ATATCATAGAT GACCACTGTC CGAGCTCTCC
TACTCTTCT TATGATGCA AGAGAGATCT ATGACAGGCT AAAGAGATCA ACAGATGTTA CGAGATCTAT TATAGTCTAT CTGAGTCAGAG GCTCTGAGAG
1 M K L I A T A F L L A S M F V P S I A T N A Y A D I Q M T Q S P S S L
*Met
*edit (3'ナリ転位の拘束)

201. TTGCGCTGCT TTGAGGAGCT AGGCTCAACA TCACATGCGC TGCGATGACG GATGCTCTCA CTGCTGACGC CTGCTATCAA CAGAACACG GAAGACGCTCC
ACAGAGGAG ACACAGCCCTA TCCAGATGCT ATGAGGAGCT AGGCTGACGC CTGACAGGCT GACACAGTGC GACCAATCT CTGTTGTGCT CTTTTGAGGAG
35 S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A F P
*CDR-1
*Met

301. GACCTCTGCG ATTATCTGCG CAAGCTCTCT CTACTGTGCA GTCTCTCTTC GCTCTCTGCG GGAGAGGATT TCACCTCTGAC CATACAGCAT
CTCTGACATC TATATGCT GTAGAGAGCA GATGAGCAT CTAGGAGAGC GAGAGAGACC CCCTGCTCTAA ATGAGATCTG GTATGCTCTCA
48 K L L I A S A S F L Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S
*CDR-12

401. CTGACGACGC AGAGCTCTGC ACTCATATAC TCATGACATC TCTCTCCAGC TGGCGAGCC GTACCAAGCT CTAGATCTGCA CGATCTGCA CGATCTGCA
GACTCTGAGC TTCTGAGCG TTGAGATGAG AGGCTGTTG TATATGATG AGAGAGGTC AGAGCTGCTC CTAGATCTGCA CTGCTATTT CTCTGACAC
101 L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F C Q G T K V E I K R T V A
*CDR-13

401. CTGACGACGC TGCTCTCTGC TTCCGCGCAT CTGAGAGCT GTGAATCTCT GGAATCTGCT CTGTGTGTG CTGTGTGAT AACTCTATC CGACGAGGCG
GAGCTGTGAG ACAGAGATGAG AGAGGCGGTA GACTACTGCT CACTCTATGCA CTGTGAGCA GACACATAC GAGACATTA TTGAGATGAT GGTCTCTGCG
135 A P S V T I F P P S D E Q L X S G T A S V V C L L N N F Y P R E A

501. CAAGATGATG TGAGAGTGTG ATAGCGCCCT CGAATCGGGT AACTCTCGGT AGAGTGTGAC AGCAAGACCA AGCAAGACCA CTGATCTGAC CGTACGAGCG
GTTCATATCT ACCTCTCTGC TTATGCGGCA CTAGAGGCTC TCATACAGCT TGCTGCTGCT CTGCTGCTCT GGATGCTGCT GGATGCTGCT
168 K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S

601. ACCTCTGAGC GTACACAGG AGCTACAGG AAKACAGAG TTATGAGCTC CGAGTCTAC CTTAGAGGCT TGAGCTGCC CTCTACAGG AGCTCTACCA
TGAGGAGCTG ATGCTGTCTG TTGATGATCT TTAGAGAGAG GCTCTAGTGC ATCTGAGTGC ATCTGAGTGC CGAGTGTCT TGAGGATCT
201 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P F K S F N R

【図 28 C】

1301 CCTGTGCACC GTTCTTCGAC AGCACTCTG GGGGCAAGC GGCCTGTGCG TGCCTGTCTA AGCACTATT CCGCAAGCC GTGAGCTGT CTTGGAAGTTC
GGGAGCTGTG GAGAGATTT TGTGTGAGAC CCGCTGTGCG GCGGAGCCG AGGAGCAAT TCCCTGATGA GAGAGCTGTG CAGTGTGACA GCACTGTGAG
127 L A P S S K S S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S
1401 AGGCGCTGTG ACAGCGGCG TGCAACATTT CCGCTGTGCG GTACAGCTCT CAGCACTCTA GTCTCTGAC AGCTGTGACA CCGTGTGCTC CAGCAGCTTG
TCCCTGGGAC TGTGTGCGCG ACCTGTGTGA GGGCTGACG GATTCGAGA GTCTGTGAGT GAGGAGATG TCCCAACTT GCGAGGAG GTGCTGTGAC
150 G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S L
1501 GCGACCCAGA CTTACTATCT CAGCTGAT CAGAGCCCA CAGGACCCA GGTGACAG MAGTGTGAG CGAATCTG TGCAATGAT CAGCTGTG
CGTGTGCTT GAGTGTGAC GTTGTGCTT CTTGTGTGCT GTTGTGTGCT GTTGTGTGCT GTTGTGTGCT GTTGTGTGCT GTTGTGTGCT GTTGTGTGCT
193 T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D X K V E P K S C D X T H L S G
* 重鎖の終わり

1601 GGGTGTGCT TGTGTGCTT GATTGTGAT TGTGTGAT GCGAAGCT ATTAGGCGG GTTGTGACG MANGCGAT GAGAGCGC TACAGTGTG
GCGACGAGC CAGAGGCGA CTAAAGCTA TACTGTGTA CCGTGTGTA TATCTCTG GATCTGTG TTTGTGTGTA CTTTGTGCG ATGTGTGAT
227 G G S G S G D P D Y E K H A N A N K G A H T E N A D E N A L Q S D
1701 GCTTAGGCG TACTGTGAT CTTGTGCTAC TGTGTGCTT GTGTGTGCT GTGTGTGCT GTGTGTGCT TGTGTGCTT TGTGTGCTT TGTGTGCTT
GCGATGTG TTTAGCTA GAGGAGTG ACATGTGCA GAGGAGTG TACAGATGA ACCTGTGCA AGGCGGAG GATTCANTT ACAGATGA
240 A K G K L D S V A T D Y G A I D G F I G D V S G L A N G N G A T
1801 GGTGATTTG CTTGTGCTA TTCCAGATG GTGAGCTG GTGAGCTG TACTGTCT TATGTGATA ATTCTGTCTA ATATTACTT TCCCTGCTTC
CGCTTAAGC GAGCGAGAT AGGGTTTAC GAGTGTGAG CAGTGTGAT ATTAGTGTG ATTAGTGTG ATTAGTGTG ATTAGTGTG ATTAGTGTG
293 G D F A G S N S Q M A Q V G D G D N S P L M N N F R Q Y L P S L P Q
1901 AATGCTGTGA ATGTGCTCT TTTGTGCTA GCGTGTGTA ACATGTGTA TTTGTGTG ATGTGTGTA ATTAGTGTG TCCGTGTG TCTGTGCTT
TTAGCTGCT TACAGCGGA AACAGAAAT CCGCACTT TGTGTGAT TAAAGATAC TAAAGATAC TAAAGATAC TAAAGATAC TAAAGATAC
327 S V E C R P F V F S A G K P Y E F S I D C D K I N L F R G V F A F
2001 TCTTGTAT GTTGTGCTT TATGTGT TTTGTGTG TTTGTGTG TACTGTGTA TACTGTGTA TACTGTGTA TACTGTGTA TACTGTGTA
AGAAATATA GACTAATGA GCGATGTGA TAAAGATGA TAAAGATGA AACAGTGT ATTAGTGTG ATTTCTGTGA ATT
340 L L Y V A T F M Y V F S T F A N I L R N K E S O

【図 29 A】

1 AGCAAGAG ATGTGCTAT TCTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG
TACTGTGT TATGTGTG AGAGAGCT AGATGTGAG AAGATGTGA ACGATGTGA CCGATGTGA GCGATGTGA GCGATGTGA GCGATGTGA
1 M K N I A F L A S M F V F S I A T N A Y A S D I Q M T Q S P S S
* met
* edit/シリアル配列の終わり

101 CCGTGTGCG CTTGTGTGCG GATGTGTGCG CCGTGTGCG CCGTGTGCG CCGTGTGCG CCGTGTGCG CCGTGTGCG CCGTGTGCG CCGTGTGCG
GGAGAGCG GAGAGAGCG CCGTGTGCG CCGTGTGCG CCGTGTGCG CCGTGTGCG CCGTGTGCG CCGTGTGCG CCGTGTGCG CCGTGTGCG
35 L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A N Y Q K P G K A
* CDP-L1

201 TCGGAGCTT CCGATGTG CCGATGTG CCGATGTG CCGATGTG CCGATGTG CCGATGTG CCGATGTG CCGATGTG CCGATGTG
AGCTGTGCA GACTAATGA GCGATGTGA TAAAGATGA CCGTGTGCA CCGTGTGCA CCGTGTGCA CCGTGTGCA CCGTGTGCA CCGTGTGCA
68 P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S I D F T L T S
* CDP-L2

301 AGTGTGAC CCGAGCTT CCGAGCTT TACTGTGAG AGTGTGAG AGTGTGAG AGTGTGAG AGTGTGAG AGTGTGAG AGTGTGAG AGTGTGAG
TCAAGCTG CCGTGTGA CCGTGTGA AGTGTGA AGTGTGA AGTGTGA AGTGTGA AGTGTGA AGTGTGA AGTGTGA AGTGTGA
101 S L Q P E D F A T I C Q Q S Y T T P T F G Q G T K V E I K R T V
* CDP-L3

401 TCGTGTGAC ATGTGTGCT ATGTGTGCT ATGTGTGCT ATGTGTGCT ATGTGTGCT ATGTGTGCT ATGTGTGCT ATGTGTGCT ATGTGTGCT
ACCGGTGAG TACAGAGAG TACAGAGAG TACAGAGAG TACAGAGAG TACAGAGAG TACAGAGAG TACAGAGAG TACAGAGAG TACAGAGAG
135 A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E
501 GCGCAAGTA CAGTGTGAG TGTGTGAG CCGTGTGAG CCGTGTGAG CCGTGTGAG CCGTGTGAG CCGTGTGAG CCGTGTGAG CCGTGTGAG
CGGTTTAT GTACCTTTC ACTATGTGAG GAGTGTGAG CCGTGTGAG CCGTGTGAG CCGTGTGAG CCGTGTGAG CCGTGTGAG CCGTGTGAG
168 A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S
601 AGCACTGTA CCGTGTGCA AGCACTGCA AGCACTGCA AGCACTGCA AGCACTGCA AGCACTGCA AGCACTGCA AGCACTGCA AGCACTGCA
TGTGTGAGT CCGATGTG TCTGTGTG CTTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG
201 S T L T S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N

【図 29 B】

701 ACAGGAGAG GTGTGTGTC AGCTGTGTC GAGCTGTG CCGTGTGAG ACCTGTGATA ATCTGAGCT GATCTGTGAC GCGGACCGA
TGTGTGTG CACAGAGG TGTGTGTG ACCGATGTG CTTGTGTGAG GCGCTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG
235 R E C G A S S G A D P N R F R G K D L A O
* 重鎖の終わり, edit/シリアル配列の終わり

801 TGTGTGCTT AGTGTGAG TTAAGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG
AGCAGCGGA TCGTGTGCT AAGTGTGTT TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG
-23 M K N I A F L L A S H F V
* edit/シリアル配列の終わり

901 TTTGTGTC CTAAGAGC GTTGTGTG GTTGTGTG GTTGTGTG GTTGTGTG GTTGTGTG GTTGTGTG GTTGTGTG GTTGTGTG
AAAGATAC GATGTGTG CAGTGTGAC CAGTGTGAC CAGTGTGAC CAGTGTGAC CAGTGTGAC CAGTGTGAC CAGTGTGAC CAGTGTGAC
-9 F S I A T N A Y A E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A S
* 重鎖の終わり

1001 TGTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG
GAGGAGTG CTAAGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG
26 G F T I S G S D I H W V R Q A P G K G L E W V G R I S P Y G G N T
* CDP-H2

1101 TACTGTGCG GTTGTGTG AGGCTGTG CACTGTGAG GCGAGATC CCGAAGATC AGCTGTGTA CCGAAGATC GCTGTGTG TGTGTGTG
ATGTGTG CTTGTGTG TTTGTGTG GTTGTGTG GTTGTGTG GTTGTGTG GTTGTGTG GTTGTGTG GTTGTGTG GTTGTGTG
59 N Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T
1201 GCGCTGTAT ATGTGTGAG AGTGTGTG CTAAGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG
CGGAGATTA TTAAGTGTG TGTGTGTG GAGTGTGAG CAGTGTGAT GAGTGTGAT CCGTGTGAT CCGTGTGAT CCGTGTGAT CCGTGTGAT
92 A V Y C A R V G G L K L F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P
* CDP-H3

1301 CAGTGTGTT CCGTGTGCA AGCACTGCA TGTGTGTG GCGTGTGCG GTTGTGTG CTAAGTGTG CTAAGTGTG CTAAGTGTG CTAAGTGTG
GTAGCAGTA GGGAGCTT GGGAGCTT TGTGTGTG AGCGTGTG CCGGAGC GAGGAGTA GTTGTGTG AGGAGCTT GCGTGTGCA
126 S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V

【図 29 C】

1401 GTGTGTGAC TTAGGCGCC TTAGGCGCC TTAGGCGCC TTAGGCGCC TTAGGCGCC TTAGGCGCC TTAGGCGCC TTAGGCGCC TTAGGCGCC
CAGCACTTG AGTGTGTG AGTGTGTG AGTGTGTG AGTGTGTG AGTGTGTG AGTGTGTG AGTGTGTG AGTGTGTG AGTGTGTG
159 S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P
1501 TCGAGCTG TGTGTGTG GACTGTGAT TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG
AGTGTGTG ACCGTGTG CCGTGTGTG AGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG
192 S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D X T
1601 CTTGTGTG CTAAGAGAG CTAAGAGAG AGTGTGTG GCTGTGTG AGCACTGAG CTAAGAGAG CTAAGAGAG CTAAGAGAG CTAAGAGAG
GAGTGTGCG GTATGTGTC GTATGTGTC GTATGTGTC GTATGTGTC GTATGTGTC GTATGTGTC GTATGTGTC GTATGTGTC GTATGTGTC
226 H G R M K O L E D K V E L L S K N Y H L E N E V A R L K K L V G
* 重鎖の終わり, edit/シリアル配列の終わり

1701 GAGGCGCGA AGCTGTGCT GCGTGTGCT TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG
CTGTGTGCT TGTGTGTG CCGAGCGG ACCAGCGCA CTAAAGCTA TACTGTGTA CCGTGTGTA TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG
259 E R G K L S G G S G S G D P D Y E K M A N A N A N K G A M T E N A D
* edit/シリアル配列の終わり, 重鎖の終わり (267-終わり)

1801 GAGAGCGC TTAGTGTG CCGTGTGAG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG
CTTGTGTG AGTGTGAG CCGTGTGAG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG
292 E N A L Q S D A X G K L D S V A T D Y G A I D G F I G D V S G L A
1901 CTAAGTGA TGTGTGTG CCGTGTGAG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG
GATGTGTG CCGAGTGTG CCGAGTGTG GAGTGTGAG AGGTTGTG AGGTTGTG AGGTTGTG AGGTTGTG AGGTTGTG AGGTTGTG
326 N G N G A T G D F A G S N S Q M A Q V G D G D N S P L M N N F R Q
2001 TTTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG
TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG
359 Y L P S L P Q S V E C R P F V S A G K P Y E F S I D C D K I N L
2101 TGTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG TTTGTGTG
AGGAGCAG AGAGAGAG AGAGAGAG CAGGAGTA CAGGAGTA TAAAGATG AACAGTGT ATGTGTGTA ATT
392 F R G V F A F L L Y V A T F M Y V F S T F A N I L R N K E S O

【図 3 1 B】

701 AGAGGGAGA GTGTGTGCC AGCTTCGGTA TGGCTGATCC GAGCTGTC CCAGGTAAAG ACCTGGATA ACTGAGGCT GATCTCTAC GCGAGGCA
TTCTCCCTCT CACACACAG TGAAGGACAT AGGATCACTG CTTCGCAAG GCGCATCC TGAAGCTAT TGACTTCCA CTAGAGATG GCGCTGGT
235 R G C G A S G N A D P N R F R G K D L A O
* 経路の終わり、802の始まり

801 TGTGGGCTT AGTACGAA TTACGTGAA AAGGTAACT AAGGATGAG GATATTTAT GAAMAAGAT ATCGATTTT TTCTTGATC TATGTGCTT
AGACCGGGA TACGCTTC AAGTCGATT TTCCATGTA TCTCACTC CTCTAATA TTCTTTCTTA TACGTAAAG AGAAGCTAG ATACAGAA
223 M K K N I A F L L A S M F V
* 801の始まり

* CDR-H1

901 TTTTCTATT CTACAAACC GTACCTGAG GTTCAGCTG TGGATCTG CAGTGGCG GTGAGGAC GGGGTCACT CGCTTCCG TGTGACTT
AAAGATTAAC GATGTTTGG CATGCACTC CAGTGGACC AAGCTAGAC GCAAGGAC CAGCTGGGC CCGAGTGA GCAAAAG AGACTGAA
-9 F S I A T N A Y A E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S
* 重鎖の始まり

* CDR-H2

1001 CTGGCTCAC CATATATAT TATGATATAC ATGTGGTGG TGAAGGCG GTTAAGGCG TGGATGCT TGGTATAT TTCTTCTTA GCGCGCTAC
GACCGAATG GTATATATA ATATATATG TGAACACAG ATCTGGGCG CATCTCCG ACCTTACCA ACAAATATA AAGAGGAT GCGCGGATG
26 G F T I N N I D I H W V R Q A P G K G L E W V G Y I S P P S G A T
* CDR-H2

* CDR-H3

1101 TTAATGCG GATAGCTTA AAGCGCTTT CATATAGG CAGACACAT CAAATACAC AGCTACTTA CAAATGACA GCTTAAGAC TGAAGACT
ATGATAGG CATGCGAT TCCGCAAA CATAATTC GATATATG CAGTCTGA GTTTTGTG TGGATGAT GTTACTGT CAGATCTG ACTCTCTGA
59 Y Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T

1201 GCGCTATAT ATTTGCAAG AATGTTGCG ATCGGAGCG GGGTATGCA CTACTGGGT CAGAGACAC TATGACGT CTCTGCGC TCCACAGG
CGGAGATTA TACAGCTTC TTACAGCG TACGCTGCC CCAATACT GATACCCA GTTCTGTG ATCATGTCCA GAGAGCGG AGGTGTTC
92 A V Y Y C A R M V G M R R G V M D Y W G Q G T L V T V S S A S T X G
* CDR-H3

1301 GCGCATGCT GTTCCCTCG GACCTCTT CAGAGAC CTTGCGCG AGAGCGCC TGGCTGCT GTGAGAC TACTTCCCG AAGCGTAC
CGGTAGCA GAGAGGCG GGTCTGCG GTTCTGCG GAGACCGG TGTGCGCG ACCGAGGA CAGTGTG ATGAGGCG TTGCGATG
126 P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F F E P V T

【図 3 1 C】

1401 GTGTGTG AGCTAGCG CCTGACAG CCGCTGAC GCGCTGAC ACTTCCGCG CTCTCTACA CTCTACTC TCAAGAGT GTGAGCTG
CAGACAC TTGATGCG GGAATGCT TGAAGGCG GAGAGAT CAGAGCTT GAGATGAG AGTCTGCA CAGTCTGAC
159 V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V
1501 CCGTACGA GTTGGGAC CAGACCTAC ATCTCAAG TGAATACA GCGACAC ACCAGCTG CCAAGAGT TGAAGGCT TGAAGGCT
GAGAGCTGT GAGAGCTG GTTGTGAG TGAAGTGC ACTTATGT GGTGTGCT TGTCTGAC TTTCTTCA ACTGCGTT AGACACTG
192 P S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K
1601 AATCTACG CCGATGAA CAGTACAG AAGAGTGA AAGACTCT TCAAGAT ACACCTAG GATGAGTG CAGAGTCA AAGATCTGT
TTTGTGCG GGGTATTT GTGATCTC TGTCTACT TTCTGATG AGTCTTGA TGGTGAAT CTACTTCA CGTCTGCT TTCTGACA
226 T H G R M K Q L E D K V E E L L S K N Y H L E N E V A R L K K L V
* 重鎖の終わり、ロインジナルの始まり

1701 CCGGAGGCG GAAAGCTTA GTTGGGTG CTCTGTTC GGTATTTG ATATGAAA GATGCAAC GATTAAGG GGGTATGAC GAAATGCG
GCGCTGCG CTTTGGAT CAGCGCAC CAGTCTGCG CCAATTAAC TATCTTTT CTACGTTT GATATTC CCGATCTG GCTTATCG
259 G E R G K L S G G G S G S G D F Y E K M A N A N K G A M T E N A
* ロインジナルの始まり

重鎖の手印ロートンハイの始まり (267-終わり)

1801 GATGAAGCG GGTATGCT TGAAGTAA GCGAGCTG ATTTCTCG TACTGATC GGTCTGCT TCGATGTT CATTTGAC GTTCCGCG
CTACTTTC CCGATGCG AGCTGATTT CCGTGTGAC TGAAGAGC ATGATAG CAGAGAT AGCTTACA GTACACTG CAGAGCGG
292 D E N A L Q S D A K G K L D S V A T D Y G A I D G F I G D V S G L
1901 TGTGATG TATGCTGT ATGTGAT TTCTGCTC TATTTCCA ATGCTGAC TGGTACG TGAATATTA CTTTATGA ATATTTGCG
ACGATATC ATACAGTA TGAACAGG ATTAAGGT TACGATTC AGCTGCG GATATAGT GAAATATC ATTAAGCG
326 A N G T A G T D F A G S N Q M A Q V D G D N S P L M N N F R

2001 TCAATATTA CTTCTGCC CTGATGCT TGAATGCG CTTTCTCT TACGCTG TAAACATAT GATTTTCA TGTATGTA GAAATTAAC
AGTATAT GAAAGAG GATTTACA ACTTACG GAAAGACA AATGAGAC ATTTGATA CTTAAGAT ACTTACAT GTTTATTTG
359 Q Y L P S L P Q S V E C R F V F S A G K P Y E F S I D C D K I N
2101 TTAATCTG GTTCTTTC TATGAGCA CTTTATGA TGTATTTT AGTTGCTA AGTATGCG TATTAAGG TCTTAA
AATGAGCA CAGAGAG CAGAGAT ATACAGAT ACATAGAG TATTAAGC ATTAAGCT ATTAAGCT AGAAT
392 L F R G V F A F L L Y V A T F M Y V P S T F A N I L R N K E S O

【図 3 2 A】

1 GATCTCACT TTCTATAT TTGATAGG AATGAGAC ATGAATAT TATGTGTA TGTATTTT AAGTGTGCC AAAAAAGA AGAGTGAT
CTTAATGTA AGAGTATG AACTATTT TTTATTTG ATGATAGT CAAATAAA TTGACAGG TTTTCTCT TTCTAGCTTA
101 GACTGTGT CAGAGTGA AGTTTGGAG ATTAATGTA CTCAATCT TCGATATG GCGAATAG ACAACAGG GTTATGAT CAGTATCC
CTTACAGC GGTCTCTCT TATAGACT GACTTACA AGCTTATC GGGTTTAT TGGTGTGCG CCACTACTA GTCACTTCC
201 GGGGTGTA CAGGTAAAG CCGATGCA GCATTTCTA CAGATAGG GAGTGTGC CGATATCT AAGAGATTA TGAAGTAC CTGTGCTA
CCGCGACT GTCTCAAT GGGTACCT GTTATGAT CTCTATGC CTGACAGG CGTAAACA TTCTTCAAT AACTGTGAG GAGCATAT
301 AAAATGAT CTTTTACA GTTGTGTA AGTTGCAAG GCGAGCTT ATAGTGCT TGTATTTT TTATATTA TTGATGTA GTAGGATG
TTTCACTTA GAAATCTT CAGATATTT TCAAGATG CCGATGTA AATAGATA AATATATTA AATATATTA AATATATTA
401 TCACTAAA AGGTATTA GAGTATG TATATGAG TATGATCT TCGATCTT TCGATCTT AGTGTGTT TTCTATGCG TACAATGCC
0 AACTGATTT TCCATATC CTTCACTCC ACTAATAT TTCTTAT AGATGTA ATAGCTGA ATAGTACA AATGATAG AGTTATGCG
M K N I A F L L A S M F V P S I A T N A
* 801の始まり

* EcoRV

501 TATGATATA TCGATATC CCAATGCG AGCTGCTCT CCGCTCTG GTACATCA CTCTGCTG CAGTACAT GTTCTGCTG
ATAGCTTAT AGCTTATG GTGAGGCG TGAAGACA GGGGAGCA CCGCTATCC CAGTGTAT GAGCGGCG GTTATGCTA CAGAGTAC
21 Y A D I Q M T Q S P S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A
* EcoRV

* CDR-L1

* CDR-L2

601 CTGATGCT GTATCAG AATCGAG AAGTCTGAA GTTCTGAT TACTGCGAT CTTCTCTA CTCTGATC CTTCTGCT TCTGCTGAG
GACATGAC CATATGCT TTGTGCT TTGAGCTT CAGAGCTA ATAGCTTA GAGAGAT GAGCTGAG GAGCTGAG AAGACATC
55 V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S
* CDR-L2

701 GGTTCGCG AGCATTTA CTATACAT CAGAGCTG CAGCGGAG ATCTGCAAC TATATCTT GAGATCTT ATATCTCT TCCAGCTC
GCGAGGCG TGTATAT GAGATGTA GTTCTGAC GTTCTGCT TGAAGTGT ATATGACA GTCTGTA TATATGAG AGGCTGAG
88 G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y T T P P T F
* CDR-L3

801 GAGAGCTA CAGAGTGA GATACAGA AATGAGCT CAGCTGCT CCGCATAT AGTACATG ATGAGATG GAAATGTA AGCTGCTG
CTCTCTCT GTTCACTT CTATTTCT TACACGAG GTGTGACA GAGTATGAG GCGGTGAG TACTGTGTA CTTTATGCT TGAAGGAG
121 G G T K V E I K R T V A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V
* KpnI

* KpnI

901 TGTGTGCT GTGATAC TTATTTCCA GAGAGGCA AGGTGATA AGCTTCCA ATCGGTAC ATCGGTAC GTTCTGAG
AAGACAG GACTATG ATATAGCT CTCTGCTT TATGTAC TTCACTAT TGGGAGT TACCGAT AGGCTCTT CAGATCTG
155 V C L L N N F Y P R E A V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E
1001 GAGAGGAG AAGAGACA CTTAGACT CAGAGGAG CAGAGCTA CAGAGGAA CAGAGCTT AGCTGCTG ATCAAGCT
GTCTGTGCT GTTCTGCT GATGTGTA GTCTGTGCT GATGTGCT GTTCTGCT GATGTCTT GTTCTGCT TGAAGCT TGAAGCT
188 Q D S K D S T Y S L S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H

* KpnI

1101 CAGGCTGCT GTTCTGCT CAGAGGAG GTTCTGCT GTTCTGCT GTTCTGCT GTTCTGCT GTTCTGCT GTTCTGCT GTTCTGCT
GTCTGCTG CAGAGGAG GTTCTGCT GTTCTGCT GTTCTGCT GTTCTGCT GTTCTGCT GTTCTGCT GTTCTGCT GTTCTGCT
221 Q L S S P V T K S F N R G E C G A S G M A D P N R F R G K D L A
* 重鎖の終わり、802の始まり

1201 CATATGTA GGTATCTT CAGAGGCA CCGATGCG CAGTATG CAGTATG AATAGGAT AATAGGAT AATAGGAT AATAGGAT
CTTATGCT CAGTATG GGTGCTT GGTATGCT GGTATGCT GGTATGCT GGTATGCT GGTATGCT GGTATGCT GGTATGCT
255 0
-23 M K K
* 801の始まり

* KpnI

1301 GATATGTA TTCTCTG CATCTAT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT
CTTATGCT AAGAGAG GTATGATA GMAAAGA TACATGTT TCGATGCG ACTCAATG CAGAGCTA GAGCGGAG GAGCGGAG
-20 N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A E V Q L V E S G G G L V Q
* 重鎖の終わり

* KpnI

1401 CATATGTA TTCTCTG CATCTAT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT
CTTATGCT AAGAGAG GTATGATA GMAAAGA TACATGTT TCGATGCG ACTCAATG CAGAGCTA GAGCGGAG GAGCGGAG
-20 N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A E V Q L V E S G G G L V Q
* 重鎖の終わり

* KpnI

1501 CATATGTA TTCTCTG CATCTAT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT
CTTATGCT AAGAGAG GTATGATA GMAAAGA TACATGTT TCGATGCG ACTCAATG CAGAGCTA GAGCGGAG GAGCGGAG
-20 N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A E V Q L V E S G G G L V Q
* 重鎖の終わり

* KpnI

1601 CATATGTA TTCTCTG CATCTAT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT
CTTATGCT AAGAGAG GTATGATA GMAAAGA TACATGTT TCGATGCG ACTCAATG CAGAGCTA GAGCGGAG GAGCGGAG
-20 N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A E V Q L V E S G G G L V Q
* 重鎖の終わり

* KpnI

1701 CATATGTA TTCTCTG CATCTAT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT
CTTATGCT AAGAGAG GTATGATA GMAAAGA TACATGTT TCGATGCG ACTCAATG CAGAGCTA GAGCGGAG GAGCGGAG
-20 N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A E V Q L V E S G G G L V Q
* 重鎖の終わり

* KpnI

1801 CATATGTA TTCTCTG CATCTAT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT
CTTATGCT AAGAGAG GTATGATA GMAAAGA TACATGTT TCGATGCG ACTCAATG CAGAGCTA GAGCGGAG GAGCGGAG
-20 N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A E V Q L V E S G G G L V Q
* 重鎖の終わり

* KpnI

1901 CATATGTA TTCTCTG CATCTAT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT ATTCTTCT
CTTATGCT AAGAGAG GTATGATA GMAAAGA TACATGTT TCGATGCG ACTCAATG CAGAGCTA GAGCGGAG GAGCGGAG
-20 N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A E V Q L V E S G G G L V Q
* 重鎖の終わり

* KpnI

【 3 2 C 】

1401 CAGAGGAGCT CACTCGGTTT GTCTCTGCA GCTCTTGCTT TACACNTAG TGGTCTTGG ATACATGCG TGGCTCAGC CCAGCGTAC GGGCTGGAA
GCTCCGCGA GTAGAGGAA CAGAGCACT CAGAGGCTA AGTGTATC ACAGAGAC TATGTACCC AGCAGTCC GGGCTCTAC CCGAGCTTA
14 P G S L R L S C A S G F T I S G W I H V R Q A P G K G L E W
1501 GGGTCTTGT GATTCCTCT TATAGCGCG CTATCTACTA TGGCAGAG CTAAGCGC GTTCACTH AGCGCAGAC AGTCTGAAA ACACAGCTTA
CCACAGAAC CTATAGGAGA ATAGAGCGE GATCTAGT AGCTCTAGC GATCTCTCG CAGAGGATA TCGCTCTCG TGTAGTTT TGTCTGAT
48 V A W I A P Y S G A T D Y A D S V K E R F T I S A D T S K N T A Y
1601 CTTACAAAG ACACATTHA GAGCTGAGA CACTCTGCTT TATATATG CAGAGAGG GGGCTCTAC TGGCTTGG ATACTGCGG ACATCTGCGG TACAGAGACA
GAGTCTTAT TGTCTGAT CTTCAGCTT CTGACCTCT GTAGCGGAG ATATATAC GTTCTCTG CCGAGAGC TATGAGAGT ACTCTCTT
81 L Q M N S L R A E D T A V Y I C A R E G L Y W V F D Y W G Q T
1701 CTATCTACG TCTCTGCG CTCCACAGC GGCCATCG TTCTCCCTT GGCACCTC TCCAGAGCA CTTCTGGGG CAGACGCG CTGAGCTCC
GATCATCG AGAGCGCG GAGTCTCG CCGAGTAC AGAGGGGGA COTTGGAGG AGTCTCTGT GAGACGCC GGTGCGCG GAGCAGCG
114 L V T V S S A S T K G P S V P P L A P S S K S T S G G T A A L G C L
1801 TGGTCAAGA CTACTCTCC GAGCGGTGA CCGTCTCTG GACTCAGCG CCGTACACA GGCGCTGCA CACTCTCG CAGTCTCTAC AGTCTCAG
ACCACTCTT GATGAGGGG CTTCGCACT CCACAGCAC CTATGCTCG CCGACTCT CCGAGCTCT GTAGAGCG GAGAGGCG TACAGCTC
148 V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G
1901 ACTTACTCT CTACAGCG TGGTACCGT GCGCTCAGC AGTCTGGCA CCGACCTA CACTCTGAC GTATACACA AGCCAGCA CACAGCTC
TGTATAGG GAGTCTCG ACACCTGCA CCGAGCTCG TCGAACCGT GGGCTGAT GTAGCTGT CACTTATGT TGGTCTGT TGGTCTCG
181 L Y S L S V V T V P S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V
2001 GAGCAAGA TTAGCGCAA ATCTGTGAC AATCTCAC CTTAGATGG CCGTCTCT GTTCTGCT GTCTCTGT CCGCGCGG GTTTTTAT
CTCTCTTCT AACTCTGT TATAGACT TTTTACTG TTTTACTG AGTCTCAC CCGAGTAC CCGAGTAC TACAGCAA CCGCGCGG CAAAATAC
214 D K K V E P K S C D K T H L O
2101 CTAGCGCG GATATGAA CAGAGGAG GCGCGTGG CCGCTGCG TGGCTGCA TGGAGCGCG CAGCTGAC CTAGTGA CCGCGCGCA CCGCTTAC
GATCGCGG GATATGAA CAGAGGAG GCGCGTGG CCGCTGCG TGGCTGCA TGGAGCGCG CAGCTGAC CTAGTGA CCGCGCGCA CCGCTTAC

【 3 2 D 】

2201 GATATACCA CTCACGAT TCGAGGCT CACTCTTGC GAGAGCTGT GATGCGCA ACACCTTT GCGAGCAT ATCATCGG TCGCTCAT
CTTAAGTGT GAGTCTTA ACTCTGTTA GTTAAAGG CTTCTGACA CTACCGTT TGTCTGGA CCGTCTGTA TATGTAGC AGCGGTGA
2301 CAGAGCGG CAGCGCGG ATCTCGCG CTGCGCAGG GTGCGCTGA TGGTCTCT GTCTTGGG ACCCGCTAG CCGCTCTG
GCTCTGCG CAGCGCGG TAGAGCGCT GCGAACCG GAGCGTCC CAGCGTACT AGCAGAGA CAGAACTCC TGGCGCAT CAGCGCGG
2401 TTGCTTACT GTTAGCAG ATGAATCAC GATAGCGG CAGAGCTGA GCGAGCTG CTGCAAGG TCTCGACT GAGCAGAC ATGATGTC
AAGGATGA CCAATCTCT TACTTAGTG CTATGCTCT CCGTCTACT GCTTACAG CAGCTTTC AGAGCTGA CTGCTGTG TACTTACG
2501 TTGCTTCT GTTCTGTA ATGCTGGA CAGCGAGT CAGCGCTG CAGCTATG TCGGATCT GATGCGAG ATCTGCTG CTACCTGT
AAGCGAAG CACAAGCAT TTACAGCTT TCGCGTTCA GTGCGGAG CTGCTTAC AGGCTTGA CCGAGCTC TACAGCAC GATGCGAC
2601 GAGACTTAC ATCTGTTA ACAGAGCT GCGTCTAC CTAGTGT TTTCTGCT CCGCGCAT CCGAGCTG AGTCTTAC CTTCTGAG
CTTGTGAG TAGCATAT TGTCTGCA CCGTACTG GATCTACTA MAGAGCA GGGCGCTA GGTGTGCG TCMCHATG GAGTCTGT
2701 TTGCTTAC GCGCTGT CAGCTGT ACCGCTAT CTAGAGCT TCTCTGT CATGCTAT CTATCGCTA TGGCTTAC TACAGCAA TTCTCTTA
AGCTCTG CCGCTTACA GTAGTGA TTGCTTAC TGGCTTAC GAGAGCAA GTAGCTAT TATGCGGT ACTTCTCT TATGCGGT
2801 CAGAGCGT TATGCTAC TACAGGAA AAGCGCTT TACATGCG CCGTCTAC GAGCAGAC ATTAGCTT CTGAGGAA TACAGGAT
GCGCTCTT AGTCTGT TTGCTCTT TTGCGGGA TATGCTCT CCGCTCTG TATGCGAA GAGCTTGT TACTCTGA
2901 GAGCGCAT GAGAGGAG ACATCTGTA ATGCTTAC GAGCAGCT ATGATTTA CCGAGAT CCGAACTT AACCTAT ATTTGTAA
CTGCGCTA CTGCTCTG TGTAGACT TACAGAGT CTGCTGAC TACTGAT GCGCTCTG CCGTCTAC TTGCTTAC TACAGAT
3001 ATCTGCTT TATATGCT TATATGTA CATTCTTA CAGAGCT GAGTCTGA TATCTCTA TATCTTAA GATGAGCG AGTCTGT
TATGCGCA ATTAAGCA ATTATGTA CAGAGCT CCGTCTG CTGAGCT TTAGGAT ATTAGTT CTCTCTG TCTCTTAA
3101 GAGCTGT GAGTCTGA ACAGCTT ACTATGAG CAGTCTGT CAGCTCT CAGCTCTA AGCGGAAA ACCTCTAT AGGCTTGG CCGCTTAC
CTACAGCA GCTCAAGT TGTCTGAG TATATTT TCTCTCTA GCTCTCT TGGCAGTG TCGCTTAC GCGTCTG

【 3 2 E 】

3201 GAGCATCAC CTATATCAG TTTTGTGG TGGAGTCC GTAAAGCAT AATCGGAC CTTAAGGA CCGCCGAT TATAGCTGA CCGAGAAC
CTTGTATG GATATGAT AAAAAGCC AGCTCCAGC CATTCTGA TTTAGCTTG GATTTCTT CCGCGCTA ATCTGACT CCGCTTTC
3301 GCGAGAGT GCGAGAGG GAGAGAGA AAGGAGCG AGGCGCTG CAGTATAG CCGTACGCT GCGTACGA CAGACCGG
GCGCTTGA CCGCTTTC GTTCTCTT TCGCGCGA TCGCGGAC CTGCTATG CCGATGAG GCGATGAG CCGATGAG CAGAGCTG
3401 CCGCTTAT AGCGCTAC AGCGCTCG CAGATCTC CTGCGGTT TGTGTAT CAGTGAAC CTCTGACA TCGAGCTC GAGAGCTG
GCGCTTGA CCGCGGAT TCGCGGAG CCGTAGAG GAGCGGAA AGCAGCT GCGCTTTC GAGCTGT AGCTGAG CTTCTG
3501 AGAGCTCT TATAGAGG TCGCGGAG AGAGAGCC GTACAGCG GTTGGCGGT GTGCGGCG AGCATGAC CAGTACATA
TGTGAGAG AGTTGCTT AGCGCTCG TGTGTGG CAGTCTCG CAGTCTGA CAGCTCTG TGTGTGAG GTGAGTGT
3601 GCGTAGCG AGTATAT TCGCTACTA TCGCGATA GAGCAGAT TATGAGAT CCGTATGA TACGCGAG ATGCGTAG
CCTACTCC TACAGATA CCGATAT AGCGTAT CTGTCTAC ATGATCTA GGTGTAT CCGCTACT TATGCTCT TATGCTCT
3701 AGAAGTAC GATAGGCG CTCTCGCT TCTCTGCTA CTGACTGT CCGCTGCT GTTCTGCT GCGAGCGT ATGATCTA TCAAGCGG
TCTTTATG CAGTCTCG GAGAGGCA AGAGCGAT GACTAGGCA CCGAGCAG CCGTCTGCA TATGAGTG AGTCTGCG
3801 TATAGCTT ATCAGAGA CAGGAGTA AGCAGGAA GACATGTA CCGAAGCG CAGAGCTC AAGAGCGG CCGTCTGCT
ATTATGCA TATGCTT ATCTCTAT TCTCTCTT CTGTACT CTGTTTTCG GTTCTGCG TATGCTGCT TATGCTGCT
3901 GTTTTTCAT AGCTCTCG CCGTACGA GATACAAA ATCGAGCT CAGTCTAG CTGCGAAC AGAGCGCG TATGCTGCT
CAAAAGTA TCGAGGCG GAGCTCT CTGATCT TATGCTGA GTGCTCT CAGCTCTG CAGCTCTG TATGCTGA CAGCTCTG
4001 CCGCTTGA CCGAGAGA CCGAGAGA CAGCTGAG AGCTGCTG CAGCTCTG TCGCTCTG AGCTGCTG CTTCTCTA
GCGAGCT CAGAGAGA CCGAGAGA CAGCTGAG AGCTGCTG CAGCTCTG TCGCTCTG AGCTGCTG CTTCTCTA
4101 CAGCTCTG TATGCTCT AGTCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG
CAGCTCTG TATGCTCT AGTCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG
4201 TATCTAT CTGCTTCA ACCGCTAG ACAGCTTA TCGCAGTG CAGCTCTG TATGCTGA ATTAGAGG CAGCTCTG AGCTGCT
ATTATGCA GAGCTCTG TGTCTGAT AGCTGCTG CAGCTCTG TATGCTGA ATTAGAGG CAGCTCTG AGCTGCT

【 3 2 F 】

4301 AGAGCTCT TATGCTGAG CAGCTCTG TATGCTGA TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG
TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG
4401 GTAGCTCT ATCTGCGA CAGAGAGG CAGCTCTG TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG
CAGCTCTG TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG TATGCTGAG
4501 TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT
TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT
4601 TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT
TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT
4701 TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT
TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT
4801 GAGAGGCA CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG
CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG
4901 CAGCTCTG TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT
TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT
5001 CAGCTCTG TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT
TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT
5101 TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT
TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT
5201 TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT
TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT TATGCTCT

T. G.

2000

STC

Index

【図 3 4 F】

4601 TACGACGAA CGAGCTGAC ACCAGCAGC CAGCAGCAGT GCGACAGAT TACGACGAA TATTAATCTG GCACTACTT ACTCTAGCTT CCGGCAACA
 ATGGTCTCTT GCTGCACTG TGGTCTAGC GTCTGCTTA CCGTGTCTC AAGCGTTTG ATTAATGAC GCTTATGAA TGAATGCAA GGGCGCTTG
 4701 ATTAATGAC TGAATGAGC CGATTAAGT TGAAGACCA CTTCGCGCT CCGCTCTCC GCGTGGCTG TTAATGCTG TTAATGCTG TTAATGCTG TGAAGCTGAG
 TAAATATCTG ACTTACTCTC GCTTAATTA AGTCTCTGT GAAGACGCA CGCGGAGG CGACAGGAG AAUADAGAC TATTAAGAC TGGCCACTC
 4801 CTTGGCTCT GCGTATCAT TGAAGACTG GGGCAGATG GTTAGCCTC CCGTATGTA GTTAATGTA CAGAGGAG TGAAGCTAT ATGAGTAC
 GCACCCAGAG CCGCATATA AGTCTGAC CCGCTCTAC CATTCGGAG GCAATACAT GATAGATGT GTCTGCTCT AGTCTCTA TACTCTCTG
 4901 GAAATAGCA GATGCTGAG ATAGCTGCT CACTGATTA GATGCTGAA CTTCGACAC AGTTTACTC AATATACTT TAAATCTT TAAATCTT
 CTTCATCTT CTAGCATCT TATCAGCA GTACTTAT GACTCTGT TACTCTGAG CCAATATCC CTAAATGAG TATTAATGTA ATTAATGAT
 5001 TTTTAAATTT AAAAGATCT AGTGTGAG CTCTCTGAT TACTCTGAG CCAATATCC CTAAATGAG TATTAATGTA ATTAATGAT
 AAAATATTA TTTTCTGAA TCACTCTTA GAAATATTA TTAGATCT GTTTTAGG AATGATCT AHAAGAGG TGAATGAG TCTGGGCTA
 5101 GAAAGATCA AAGATCTG TGAATCTT TTTTCTGCT GGTATCTG CTCTCTGCA AAAAAAAG CAGCTGAC AGCGTGTG TTTTCTGAG
 CTTTCTGAT TTTCTAGAG AACTCTGAG AAAAGAGG CGATATGAG GAGATCTT TTTTCTGCT GTTCTCTG TGGCAGAA ACNAAGGCT
 5201 ATCAGACTT ACTACTCT TTTCTAGAG TACTGCTT CAGCAGAGC CAGATACCA AATCTGCT TATGATGAG CCGATATG GCACTACTT
 TATCTCTGA TGTGAGAA AAGGCTCT ATTAGCAG GTGCTCTG GCTATGCT TATGATGAG AGATCATCT GCACTACTT CCGTCTGAA
 5301 CAGAACTCT GTACACCG CTACTACTT CACTCTCTA ATCTGTAT CAGTGTGCT TGGCAGAG CAGTGTGCT GTCTCTGCT GTCTCTGCT
 GTTCTGAG CATGCTGAG GATGATGAG GAGAGAT TGAAGATG GTACAGAG AGCTCTGCT GTCTCTGCT CAGATGCT CAGCTGCT
 5401 AGAGATGAT TACGATTA GCGCAGAG TGGGCTGA CCGGCTCT GTACAGAG CCGCTGCT GCGTCTGCT GTCTCTGCT CAGCTGCT
 TCTCTATCA ATGCTCTAT CCGCTCTG AGCTCTGCT GCGCTCTG CAGCTGCT GCGTCTGCT GTCTCTGCT CAGCTGCT CAGCTGCT
 5501 TACAGCTGA GATGATGA AGCTCTGCT TTTCTAGAG GAGAGAGG CAGATGCT CAGTGTGCT GTCTCTGCT GTCTCTGCT CAGCTGCT
 ATCTCTGCT CACTACTT TGGGCTGAG AAGGCTCT CTCTCTGCT GTCTCTGCT GTCTCTGCT GTCTCTGCT GTCTCTGCT GTCTCTGCT
 5601 GTTCTGAG GAGATCTT GATCTCTA TACTCTGCT GGTCTCTG CAGTGTGCT GTCTCTGCT GTCTCTGCT GTCTCTGCT GTCTCTGCT
 CAGAGCTCT CTTTCTGAG CAGATGAT ATAGAGAG CCAAGAGG TGAATGAG AATGATCT AAAAGATTA CAGCTCTG CCGCTCTG

【図 3 4 G】

5701 CTATGAGAA AGCCAGCA GCGCTCTT TTAGCTCT CAGCTCTG GTGCTCTT GTGCTCTT GTGCTCTT GTGCTCTT GTGCTCTT
 GATCTCTT TCGCTCTT GCGCTGAA ATCTCTAG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG
 5801 ATACAGCTAT TACGCTCTT GATGATCT ATACGCTG CCGACGCA AGCAGAGG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG
 TATGCTAT ATGCTGAA CTACTCTG TATGCTGAG GCGCTCTG TCGCTCTG TCGCTCTG TCGCTCTG TCGCTCTG TCGCTCTG
 5901 AGCAGAGC CTTCTCTG CCGCTCTG GATCTCTA TCGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG
 TCGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG
 6001 GTGATGAT TACTCTAT GCGCTCTG CAGCTCTG TATGCTCT GCGCTCTG TCGCTCTG TCGCTCTG TCGCTCTG TCGCTCTG
 CACTCTAT AGTCTCTT CCGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG
 6101 ACAGCTAT CAGCTCTG GATTA
 TCGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG

【図 3 5】

LC 順度	S	N	V	D	G	I	T	L	X	
28	511	262	258	186	178	44	39	16	35	
29	I	S	V	G	N	X				
30	612	272	254	192	147	70				
31	849	176	169	86	81	63	29	28	17	45
32	676	496	170	47	29	28	25	18	53	
	Y	N	W	F	S	D	R	X		
	1055	128	97	77	61	40	25	69		
50	G	A	D	W	K	L	E	S	X	
53	386	341	294	151	116	91	39	30	82	
	S	N	T	K	I	R	X			
	545	438	407	41	23	23	58			
91	Y	S	R	A	G	H	X			
92	849	196	169	118	61	41	148			
	Y	G	N	S	D	L	T			
93	362	356	248	193	114	94	64	43	91	
	S	N	Q	T	H	G	D	R		
94	738	346	117	101	66	51	47	35	112	
	S	T	W	Y	L	F	A	P	V	
96	386	365	288	172	114	79	46	43	33	
	L	Y	W	F	I	R	P	X		
	264	205	176	140	117	115	46	121		

【図 3 6】

残基	天然の多様性	多様性<DNAコド>	% good	% covering
L1-28	SNVDGI	SNVDGI<RDT>	100%	94%
L1-29	ISVGN	ISVG<RKT>	100%	86%
L1-29		IV<RTT>	100%	56%
L1-30	SNKGRYTD	SNKGGRTTDAAE<RWV>	92%	93%
L1-31	SNTRIDKG	SNTRIDKGGAAE<RVW>	75%	95%
L1-31		SNTRIRIK<ANW>	100%	94%
L1-32	YNWFSR	YNFSDATIV<DHT>	55%	88%
L1-32		YFS<THT>	100%	77%
L2-50	GADWKLES	GAWLSV<KBG>	83%	67%
L2-53	SNTKIR	SNT<AVC>	100%	90%
L3-91	YSRAGH	YSAD<KMT>	75%	74%
		YS<TMT>	100%	66%
L3-92	YGNLSDLTH	YNSDTIFAV<DHT>	67%	64%
		YNSDTA<DMC>	83%	62%
L3-93	SNQTHGDR	SNTGDA<RVT>	83%	80%
		SNTDYAFIV<DHT>	44%	76%
L3-94	STWYLFAPVI	STYLFAPVINDH<NHT>	75%	78%
		STYFIN<WHT>	83%	43%
L3-96	LYWFIRP	LYFPHS<YHT>	67%	52%
		LYFIHN<HWT>	67%	58%
		LFI<HTT>	100%	42%
		LLWR<YKG>	100%	47%
		YF<TWT>	100%	29%

【図 37】

多様性をもたらす軽鎖
多様性: $\sim 2.9 \times 10^9$

CDR-L1: 多様性 $\sim 7 \times 10^3$

28	29	30	31	32
RDT	RTT	RVW	RVW	DHT
D	I	D	D	A
G	V	E	E	D
I		G	G	F
N		K	K	I
S		N	N	N
V		S	S	T
		T	T	T
		R	R	V
				Y

CDR-L2: 多様性 = 18

50	53
KBG	AVC
A	N
G	S
L	T
S	
V	
W	

CDR-L3: 多様性 $\sim 2.3 \times 10^4$

91	92	93	94	96
KMT	DHT	DHT	NHT	YHT
A	A	A	A	F
D	D	D	D	H
S	F	F	F	L
Y	I	I	H	P
	N	N	I	S
	S	S	L	Y
	T	T	N	
	V	V	P	
	Y	Y	S	
			T	
			V	
			Y	

【図 38】

多様性をもたらす軽鎖
多様性: $\sim 6.1 \times 10^8$

CDR-L1: 多様性 $\sim 3.4 \times 10^3$

28	29	30	31	32
RDT	RTT	RVW	ANW	THT
D	I	D	I	F
G	V	E	K	S
I		G	N	Y
N		K	R	
S		N	S	
V		S	T	
		T		
		V		

CDR-L2: 多様性 = 18

50	53
KBG	AVC
A	N
G	S
L	T
S	
V	
W	

CDR-L3: 多様性 $\sim 1.0 \times 10^4$

91	92	93	94	96
KMT	DMC	RVT	NHT	YHT
A	A	A	A	F
D	D	D	D	H
S	N	G	F	L
Y	S	N	H	P
	T	S	I	S
	Y	T	L	Y
			N	
			P	
			S	
			T	
			V	
			Y	

【図 39】

多様性をもたらす軽鎖
多様性: $\sim 1.3 \times 10^3$

CDR-L3: 多様性 $\sim 1.3 \times 10^3$

91	92	93	94	96
TMT	DMC	RVT	WHT	HIT
S	A	A	F	F
Y	D	D	I	I
	N	G	N	L
	S	N	S	
	T	S	T	
	Y	T	Y	

【図 40】

CDR-L1

28	29	30	31	32
RDT	RTT	RVW	RVW	DHT
D	I	D	D	A
G	V	E	E	D
I		G	G	F
N		K	K	I
S		N	N	N
V		S	S	S
		T	T	T
		V	V	Y

CDR-L2

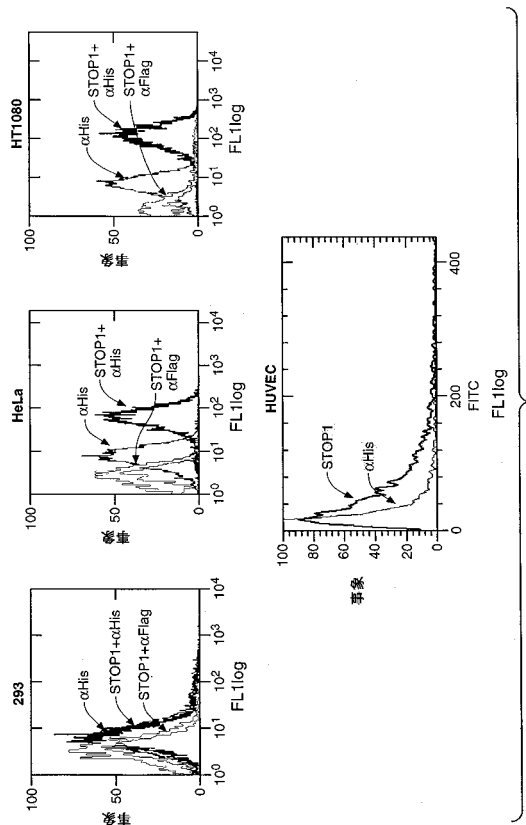
50	53
DVK	AVM
A	N
G	K
L	R
S	S
V	T2
W	

CDR-L3

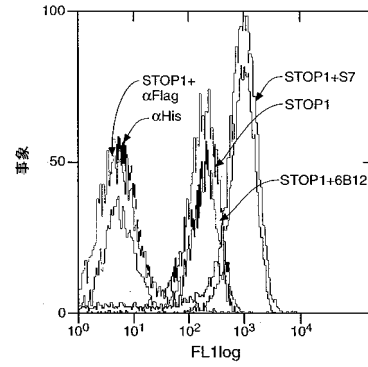
91	92	93	94	96
NRT	NRT	RVM	NNK	TDK
C	C	A2	A	C
D	D	D	C	F
G	G	E	D	L
H	H	G2	E	W
N	N	K	F	Y
R	R	N	G	*
S	S	R	H	
Y	Y	S	I	
		T2	L	
			M	
			N	
			P	
			Q	
			R	
			etc	
			*	

* アンバー終止コドンに変性したコドンによりコードされている。

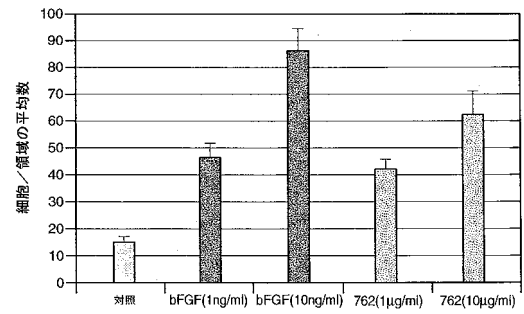
【図 4 1】



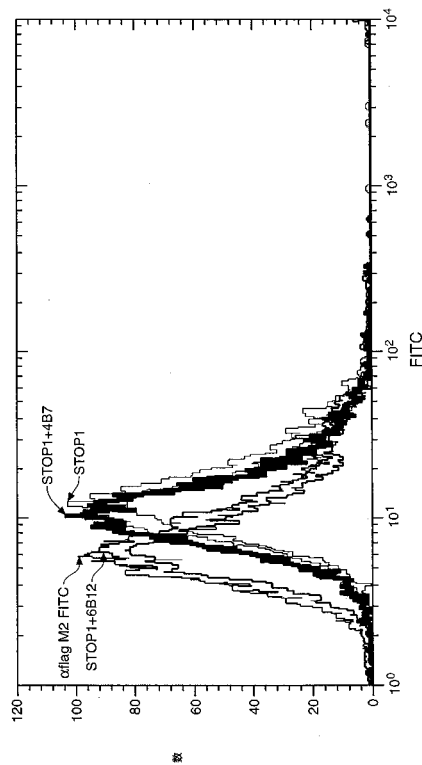
【図 4 2】



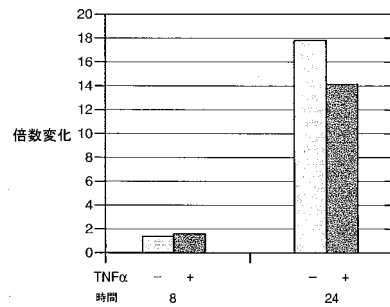
【図 4 3】



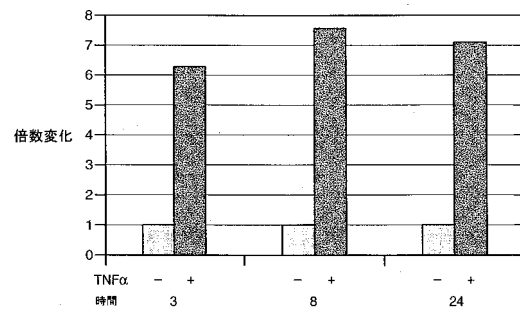
【図 4 4】



【図 4 5 A】



【図 4 5 B】



フロントページの続き

微生物の受託番号 ATCC PTA-5088
微生物の受託番号 ATCC PTA-5089
微生物の受託番号 ATCC 203321
微生物の受託番号 ATCC 203322
微生物の受託番号 ATCC 203323
微生物の受託番号 ATCC 203324
微生物の受託番号 ATCC 203325

前置審査

- (72)発明者 アシュケナジ, アヴィ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94402, サン マテオ, テリータウン ストリート
1456
- (72)発明者 エバーハード, デイヴィット
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94103, サンフランシスコ, ゲレロ ストリート 3
60 212号
- (72)発明者 フランツ, グレッチェン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94127, サン フランシスコ, サン ベニート ウェ
イ 135
- (72)発明者 フレンチ, ドロシー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94065, レッドウッド シティ, ビーコン ショアー
ズ ドライブ 318
- (72)発明者 フー, ジャーメイン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94044, パシフィカ, アマポーラ アベニュー 14
9
- (72)発明者 ホンゴー, ジョーアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94061, レッドウッド シティ, ショー コート 3
1
- (72)発明者 リー, チンウェイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94132, サン フランシスコ, バッキンガム ウェイ
165, アパート 102
- (72)発明者 マースターズ, スコット
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, チェリー ストリート 9
90
- (72)発明者 ピティ, ロバート
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94530, エル セリト, リバティ ストリート 11
10
- (72)発明者 ラーブ, ヘルガ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94132, サン フランシスコ, シールズ ストリート
715
- (72)発明者 ソロセアヌ, リリアナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94115, サン フランシスコ, サクラメント ストリ
ート 3042, アパート 6
- (72)発明者 ヴァーフォロミーヴ, エヴジェニー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94066, サン ブルーノ, シェルター クリーク レ
ーン 7102
- (72)発明者 ウルフ, ベニ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94065, レッドウッド シティ, シーズンズ レーン

607

審査官 高山 敏充

- (56)参考文献 国際公開第02/016602 (WO, A1)
国際公開第02/071928 (WO, A1)
特開2001-029090 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)