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

特許第6018079号
(P6018079)

(45)発行日　平成28年11月2日(2016.11.2)　(24)登録日　平成28年10月7日(2016.10.7)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 14/705	(2006.01)	C07K	14/705	
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	
A61P 31/12	(2006.01)	A61P	31/12	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	

請求項の数 7　(全 39 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2013-547455 (P2013-547455)
(86)(22)出願日	平成23年7月5日(2011.7.5)
(65)公表番号	特表2014-504861 (P2014-504861A)
(43)公表日	平成26年2月27日(2014.2.27)
(86)国際出願番号	PCT/US2011/042955
(87)国際公開番号	WO2012/091756
(87)国際公開日	平成24年7月5日(2012.7.5)
審査請求日	平成26年7月2日(2014.7.2)
(31)優先権主張番号	12/982,827
(32)優先日	平成22年12月30日(2010.12.30)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　513164048
アビッドバイオティクス　コーポレイション
アメリカ合衆国，カリフォルニア　９４０８０，サウスサンフランシスコ，ユタ　アベニュ　３００，スイート　１５０
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次

最終頁に続く

(54)【発明の名称】非天然ＭＩＣタンパク質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

標的モチーフに結合したα１－α２プラットフォームドメインを含む、非天然、単量体、及び可溶性の哺乳類ＭＨＣクラスＩ鎖関連（ＭＩＣ）分子であって、

前記α１－α２プラットフォームドメインは、配列番号１～６、および１３からなる群から選択されたものであるＭＩＣＡタンパク質、又は配列番号７～１２からなる群から選択されたものであるＭＩＣＢタンパク質であるＭＩＣタンパク質の野生型α１－α２プラットフォームドメインと少なくとも９０％同一であり、前記α１－α２プラットフォームドメインは、ＮＫＧ２Ｄ受容体に結合し、

前記標的モチーフは、ＭＩＣのα３ドメインおよび１つ以上の異種ペプチドを含み、前記異種ペプチドは、１つ以上の溶媒に暴露されたループ内でＭＩＣのα３ドメイン中に存在し、かつ、前記異種ペプチドは、前記標的モチーフの、１つ以上の標的細胞上の１つ以上の標的分子への結合を誘導し、それによって前記結合したα１－α２プラットフォームドメインを前記標的細胞に送達する、前記分子。

【請求項２】

前記α３ドメインは、前記挿入部位とは異なる部位に、欠失、挿入、アミノ酸置換、突然変異、またはそれらの組み合わせを含む、請求項１に記載の分子。

【請求項３】

前記溶媒に暴露されたループは、配列番号１～１３からなる群から選択されたものであるＭＩＣＡまたはＭＩＣＢタンパク質の前記α３ドメインのアミノ酸位置番号１９０～１

９９、２０８～２１１、２２１～２２８、２３１～２４０、２５０～２５８及び２６４～２６６に対応する、請求項１に記載の分子。

【請求項４】

前記溶媒に暴露されたループの１つ以上の全て又は部分が前記異種ペプチドからなる、請求項１～３のいずれかに記載の分子。

【請求項５】

前記標的細胞は悪性であり、前記標的分子は、インテグリン、ＥｒｂＢ２、ＦＧＦ１受容体、ＦＧＦ２受容体、ＦＧＦ３受容体、ＩＧＦ１受容体、ＩＧＦ２受容体、ＶＥＧＦ受容体１、ＶＥＧＦ受容体２、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ１１３、ＣＤ２７１、もしくは癌遺伝子によってコードされているタンパク質生成物、またはそれらの断片であり、又は前記標的細胞は、ウイルスに感染し、前記標的細胞上の前記標的分子は、ホスファチジルセリン、もしくはアクセサリータンパク質を含むホスファチジルセリン；またはウイルス、アデノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、フラビウイルス、フィロウイルス、肝炎ウイルス、パピローマウイルス、サイトメガロウイルス、ワクシニア、ロタウイルス、インフルエンザ、パルボウイルス、西ナイルウイルス、狂犬病、ポリオーマ、風疹、ジステンパー、もしくは日本脳炎ウイルスによってコードされている表面糖タンパク質である、請求項１に記載の分子。

【請求項６】

前記異種ペプチドは、抗体の１つ以上の相補性決定領域である、請求項１に記載の分子。

【請求項７】

請求項１～６のいずれか１項に記載の哺乳類ＭＨＣクラスＩ鎖関連（ＭＩＣ）分子をコードする核酸分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願

本出願は、２００９年１２月３１日に出願された米国特許仮出願６１／２９１，７４９号の優先権を主張する２０１０年１２月３０日に出願された米国特許出願１２／９８２，８２７号の一部継続出願であり、参照により、それらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０００２】

政府支援の説明

本発明は、米国立アレルギー感染症研究所によって付与されたアメリカ国立衛生研究所（ＮＩＨ）中小企業技術革新制度（ＳＢＩＲ）認可番号１Ｒ４３０８８９７９の下、一部、政府の支援によって実施された。政府は本発明において特定の権利を有する。

【０００３】

本発明は、概して、ＮＫ細胞を動員および活性化することができる非天然タンパク質分子に関し、より具体的には、標的細胞上の標的分子に結合する異種ペプチドを含むようにα３ドメイン内で修飾される、非天然、単量体、可溶性の哺乳類ＭＨＣクラスＩ鎖関連（ＭＩＣ）分子に関する。

【背景技術】

【０００４】

免疫系のナチュラルキラー（ＮＫ）細胞および特定の（ＣＤ８＋αβおよびγδ）Ｔ細胞は、ヒトおよび他の哺乳動物において、新生細胞およびウイルス感染細胞に対する最前線の先天性防御としての重要な役割を有する（Ｃｅｒｗｅｎｋａ，Ａ．，ａｎｄ Ｌ．Ｌ．Ｌａｎｉｅｒ．２００１．ＮＫ ｃｅｌｌｓ，ｖｉｒｕｓｅｓ ａｎｄ ｃａｎｃｅｒ．Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１：４１－４９）。ＮＫ細胞および特定のＴ細胞は、それらの表面上に、標的細胞を認識して病的細胞に対する先天性防御を活性化させることに寄与する、優れたホモ二量体の表面免疫受容体であるＮＫＧ２Ｄを示す（Ｌａｎｉｅｒ，ＬＬ，１９９８．ＮＫ ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ．Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕ

nol. 16：359－393；Houchins JP et al. 1991. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human NK cells. J. Exp. Med. 173：1017－1020；Bauer, S et al., 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress－inducible MICA. Science 285：727－730）。ヒトNKG2D分子は、配列が84％同一または相同な同族リガンドである単量体MICA［配列番号1～6、および13に記載のMICAの可溶性形態］およびMICB［配列番号7～12に記載のMICBの全タンパク質］（主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスI鎖関連糖タンパク質（MIC）の多形類似体）に結合するC型レクチン様細胞外ドメインを有する（Weis et al. 1998. The C－type lectin superfamily of the immune system. Immunol. Rev. 163：19－34；Bahram et al. 1994. A second lineage of mammalian MHC class I genes. PNAS 91：6259－6263；Bahram et al. 1996a. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. Immunogentics 44：80－81；Bahram and Spies TA. 1996. Nucleotide sequence of human MHC class I MICB cDNA. Immunogenetics 43：230－233）。MICAおよびMICBの非病的発現は、腸上皮、ケラチノサイト、内皮細胞、および単球に限定されているが、増殖、酸化、および心ショック等の多くの種類の細胞ストレスに応答して、これらのMICタンパク質の異常な表面発現が起こり、その細胞を病的であると特徴付ける（Groh et al. 1996. Cell stress－regulated human MHC class I gene expressed in GI epithelium. PNAS 93：12445－12450；Groh et al. 1998. Recognition of stress－induced MHC molecules by intestinal γδT cells. Science 279：1737－1740；Zwirner et al. 1999. Differential expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes and monocytes. Human Immunol. 60：323－330）。また、MICタンパク質の病的発現も、いくつかの自己免疫疾患に関与していると考えられる（Ravetch, JV and Lanier LL. 2000. Immune Inhibitory Receptors. Science 290：84－89；Burgess, SJ. 2008. Immunol. Res. 40：18－34）。不要な攻撃から健康な細胞を保護する一方で、様々な緊急の合図を同定してそれに応答するための手段を免疫系に提供するために、NKG2Dリガンド、多形MICA（＞50対立遺伝子、例えば、図6の配列番号1～6、および13を参照）およびMICB（＞13対立遺伝子、例えば、図6の配列番号7～12を参照）の特異的制御は重要である（Stephens HA, （2001）MICA and MICB genes：can the enigma of their polymorphism be resolved? Trends Immunol. 22：378－85；Spies, T. 2008. Regulation of NKG2D ligands：a purposeful but delicate affair. Nature Immunol. 9：1013－1015）。

【0005】

ウイルス感染は、MICタンパク質の発現の一般的な誘導因子であり、NK細胞またはT細胞の攻撃のためにウイルスに感染した細胞を同定する（Groh et al. 19

98；Groh et al. 2001. Co-stimulation of CD8+αβT-cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. Nat. Immunol. 2：255-260；Cerwenka, A., and L. L. Lanier. 2001）。実際、宿主細胞に対するそのような攻撃を回避するために、サイトメガロウイルスおよび他のウイルスは、先天性免疫系の逆襲から逃れるために、それらが感染する細胞の表面上のMICタンパク質の発現を防止する機構を発達させた（Lodoen, M., K. Ogasawara, J. A. Hamerman, H. Arase, J. P. Houchins, E. S. Mocarski, and L. L. Lanier. 2003. NKG2D-mediated NK cell protection against cytomegalovirus is impaired by gp40 modulation of RAE-1 molecules. J. Exp. Med. 197：1245-1253；Stern-Ginossar et al, (2007) Host immune system gene targeting by viral miRNA. Science 317：376-381；Stern-Ginossar et al, (2008) Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. Nature Immunology 9：1065-73；Slavuljica, I A Busche, M Babic, M Mitrovic, I Gasparovic, D Cekinovic, E Markova Car, EP Pugel, A Cikovic, VJ Lisnic, WJ Britt, U Koszinowski, M Messerle, A Krmpotic and S Jonjic. 2010. Recombinant mouse cytomegalovirus expressing a ligand for the NKG2D receptor is attenuated and has improved vaccine properties. J. Clin. Invest. 120：4532-4545）。

【0006】

肺癌および神経膠芽腫脳腫瘍等の悪性細胞等の多くの悪性細胞も、それらのストレスにもかかわらず、MICタンパク質の発現を回避し、その結果、それらも先天性免疫系を逃れるため、ことさら悪性度が高くなり得る（Busche, A et al. 2006, NK cell mediated rejection of experimental human lung cancer by genetic over expression of MHC class I chain-related gene A. Human Gene Therapy 17：135-146；Doubrovina, ES, MM Doubrovin, E Vider, RB Sisson, RJ O'Reilly, B Dupont, and YM Vyas, 2003. Evasion from NK Cell Immunity by MHC Class I Chain-Related Molecules Expressing Colon Adenocarcinoma（2003）J. Immunology 6891-99；Friese, M. et al. 2003. MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. Cancer Research 63：8996-9006；Fuertes, MB, MV Girart, LL Molinero, CI Domaica, LE Rossi, MM Barrio, J Mordoh, GA Rabinovich and NW Zwirner.（2008）Intracellular Retention of the NKG2D Ligand MHC Class I Chain-Related Gene A in Human Melanomas Confers Immune Privilege and Prevents NK Cell-Mediated Cytotoxicity. J. Immunology

，１８０：４６０６－４６１４）。
【発明の概要】
【０００７】
本発明は、哺乳動物に投与した後、ＭＩＣＡまたはＭＩＣＢタンパク質のＮＫＧ２Ｄ結合部分、すなわち、それらのα１－α２プラットフォームドメインを、本発明の非天然タンパク質分子の分子標的モチーフを介して意図する標的分子または細胞標的上の分子に特異的に付着させることによって、特異的な細胞の標的細胞を攻撃するためにＮＫ細胞および特定のＴ細胞を動員および活性化することができる、可溶性、単量体、非天然のタンパク質分子について記載する。
【０００８】
したがって、本発明の一態様において、標的モチーフに付着したα１－α２プラットフォームドメインを含む、非天然、単量体、可溶性の哺乳類ＭＨＣクラスＩ鎖関連（ＭＩＣ）分子であって、標的モチーフは、ＭＩＣのα３ドメインおよび１つ以上の異種ペプチドを含み、異種ペプチド（複数可）は、非カルボキシ末端部位でＭＩＣのα３ドメインの１つ以上のループに挿入され、異種ペプチドは、標的モチーフの、標的細胞上の標的分子への結合を誘導し、それによって、付着したα１－α２プラットフォームドメインを標的細胞に送達する、分子が提供される。好ましい実施形態において、異種ペプチド（一つまたは複数）は、ループ１、ループ２、およびループ３から選択される１つ以上の部位内でＭＩＣのα３ドメインに挿入される。具体的な実施形態において、ループ１は、配列番号１～１３からなる群から選択されるＭＩＣタンパク質のα３ドメインのアミノ酸数１９０～１９９に対応し、ループ２は、アミノ酸残基２２１～２２８に対応し、ループ３は、アミノ酸残基２５０～２５８に対応する。特定の実施形態において、ＭＩＣ分子はグリコシル化される。
【０００９】
本発明のいくつかの実施形態において、非天然ＭＩＣタンパク質であるα１－α２プラットフォームドメインおよびα３ドメインは、ヒトＭＩＣタンパク質に由来する。具体的な実施形態において、α１－α２プラットフォームドメインおよびα３ドメインは、配列番号１～６、および１３からなる群から選択されるヒトＭＩＣＡタンパク質に由来する。他の実施形態において、α１－α２プラットフォームドメインおよびα３ドメインは、配列番号７～１２からなる群から選択されるヒトＭＩＣＢタンパク質に由来する。好ましい実施形態において、ＭＩＣＡまたはＭＩＣＢタンパク質は、その膜貫通ドメインを欠損している。
【００１０】
特定の実施形態において、非天然ＭＩＣ分子のα３ドメインは、欠失のない完全な野生型α３ドメインである。他の実施形態において、α３ドメインは、野生型α３ドメインであり、ドメインの一部が欠失されている。いくつかの実施形態において、α３ドメインから欠失した部分は、異種ペプチドの挿入部位に隣接している。具体的な実施形態において、欠失した部分は、挿入部位の１０アミノ酸残基内にある。他の実施形態において、欠失した部分は、挿入部位の９、８、７、６、５、４、３、２、または１アミノ酸残基内にある。他の実施形態において、α３ドメインは、挿入部位とは異なる部位に、欠失、挿入、アミノ酸置換、突然変異、またはそれらの組み合わせを含む。
【００１１】
非天然ＭＩＣ分子の具体的な実施形態において、異種ペプチドの挿入は、α３ドメインの１つ以上の溶媒に暴露されたループ内である。特定の実施形態において、溶媒に暴露されたループは、配列番号１～１３からなる群から選択されるＭＩＣタンパク質内のα３ドメインのアミノ酸数１９０～１９９、２０８～２１１、２２１～２２８、２３１～２４０、２５０～２５８、または２６４～２６６に対応する。好ましい実施形態において、挿入は、配列番号１～１３からなる群から選択されるＭＩＣタンパク質内のα３ドメインのアミノ酸数１９０～１９９、２２１～２２８、または２５０～２５８に対応する溶媒に暴露されたループ内である。具体的な実施形態において、ループ１、ループ２、またはループ

３のうちの１つ以上の全体または一部が欠失し、異種ペプチドで置換される。好ましい実施形態において、ループ１、ループ２、またはループ３のうちの１つ以上の全体が欠失し、欠失したループの片側または両側に隣接するα３ドメインのさらに１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの追加のアミノ酸が欠失している。より好ましい実施形態において、ループ１、ループ２、またはループ３のうちの１つ以上の全体が欠失し、欠失したループの片側または両側に隣接するα３ドメインのさらに１つ、２つ、または３つの追加のアミノ酸が欠失している。いくつかの実施形態において、ループと、欠失したループの両側の２つの追加のアミノ酸とが欠失し、その結果、配列番号１～１３からなる群から選択されるＭＩＣタンパク質のα３ドメインのアミノ酸残基１８８～２０１、２１９～２３０、または２４８から２６０に対応する欠失がもたらされる。具体的な態様において、ループ１が欠失し、欠失したループの両側の２つの追加のアミノ酸が欠失しており、配列番号１～１３からなる群から選択されるＭＩＣタンパク質のα３ドメインのアミノ酸数１８８～２０１に対応する。

【００１２】

いくつかの実施形態において、ＭＩＣ分子のループ１、ループ２、またはループ３のうちの１つより多くが異種ペプチドを含む。いくつかの実施形態において、異種ペプチドは、同じ標的分子に結合する。一態様において、異種ペプチドは、同じアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、異種ペプチドは、異なる標的分子に結合する。

【００１３】

本発明のいくつかの実施形態において、標的分子は、細胞表面分子である。具体的な実施形態において、細胞表面分子は、悪性細胞またはウイルス感染細胞の表面上にある。標的細胞が悪性である具体的な実施形態において、標的分子は、ヒト上皮増殖因子受容体２（ＨＥＲ２）、ＮＫ－１Ｒ、上皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）、Ｅｒｂ２、もしくはメラノーマ抗原；ＬＮｃａＰおよびＰＣ－３癌細胞の抗原；増殖因子受容体、血管新生因子受容体、インテグリン、ＣＤ３、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ１１３、ＣＤ２７１、もしくは癌遺伝子によってコードされるタンパク質生成物、またはそれらの断片である。好ましい実施形態において、標的分子は、インテグリン、ＥｒｂＢ２、ＦＧＦ１受容体、ＦＧＦ２受容体、ＦＧＦ３受容体、ＩＧＦ１受容体、ＩＧＦ２受容体、ＶＥＧＦ１受容体、ＶＥＧＦ２受容体、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ１１３、ＣＤ２７１、もしくは癌遺伝子によってコードされるタンパク質生成物、またはそれらの断片からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、標的分子はインテグリンである。少なくとも２４個の別個のインテグリンヘテロ二量体を形成する１８個の既知のα鎖および８個の既知のβ鎖が存在し、それらの多くは癌細胞等の病原性細胞に関与する（Ｋｏｉｓｔｉｎｅｎ ａｎｄ Ｈｅｉｎｏ，２０１１．Ｉｎｔｅｇｒｉｎｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ Ｉｎｖａｓｉｏｎ．Ｌａｎｄｅｓ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ ＮＣＢＩ Ｂｏｏｋｓｈｅｌｆ ＩＤ ＮＢＫ６０７０）。そのようなインテグリンは、α１β１、α２β１、α３β１、α４β１、α４β７、α５β１、α６β１、α６β４、α７β１、α８β１、α９β１、α１０β１、αＩＩｂβ１、αＩＩｂβ３、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、およびαＶβ８を含む。好ましい実施形態において、インテグリンは、αＶβ３、αＶβ５、およびα５β１からなる群から選択される。他の実施形態において、標的分子は、増殖因子受容体または細胞決定基（ＣＤ）タンパク質である。好ましい実施形態において、増殖因子受容体またはＣＤタンパク質は、ＥｒｂＢ２、ＦＧＦ１～３受容体、ＩＧＦ１受容体、ＩＧＦ２受容体、ＶＥＧＦ１受容体、ＶＥＧＦ２受容体、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ１１３、およびＣＤ２７１からなる群から選択される。

【００１４】

標的細胞がウイルスに感染している実施形態において、標的細胞上の標的分子は、ホスファチジルセリン、もしくはアクセサリータンパク質を含むホスファチジルセリン；またはウイルス、アデノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、フラビウイルス、フィロウイルス、肝炎ウイルス、パピローマウイルス、サイトメガロウイルス、ワクシニア、ロタウイルス、インフルエンザ、パルボウイルス、西ナイル

ウイルス、狂犬病、ポリオーマ、風疹、ジステンパー、もしくは日本脳炎ウイルスによってコードされる表面糖タンパク質である。

【００１５】

本発明の別の態様において、本発明の非天然ＭＩＣ分子と、担体または賦形剤とを含む組成物が提供される。

【００１６】

本発明のさらなる態様において、本発明の非天然、可溶性の単量体ＭＩＣ分子をコードする核酸分子が提供される。具体的な実施形態において、標的モチーフに付着したα１－α２プラットフォームドメインを含む、非天然、単量体、可溶性の哺乳類ＭＨＣクラスＩ鎖関連（ＭＩＣ）分子であって、標的モチーフは、ＭＩＣのα３ドメインおよび１つ以上の異種ペプチドを含み、異種ペプチド（複数可）は、非カルボキシ末端部位でＭＩＣのα３ドメインの１つ以上のループに挿入され、異種ペプチドは、標的モチーフの、標的細胞上の標的分子への結合を誘導し、それによって、付着したα１－α２プラットフォームドメインを標的細胞に送達する分子をコードする核酸が提供される。非天然ＭＩＣ分子をコードする核酸分子の具体的な実施形態において、異種ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号１～１３からなる群から選択されるＭＩＣタンパク質内のα３ドメインのアミノ酸数１９０～１９９、２０８～２１１、２２１～２２８、２３１～２４０、２５０～２５８、または２６４～２６６に対応するα３ドメインの溶媒に暴露されたループをコードする核酸配列内に挿入される。非天然ＭＩＣ分子をコードする核酸分子の好ましい実施形態において、異種ペプチド（一つまたは複数）は、ループ１、ループ２、およびループ３から選択される１つ以上の部位内でＭＩＣのα３ドメインに挿入される。具体的な実施形態において、ループ１は、配列番号１～１３からなる群から選択されるＭＩＣタンパク質のα３ドメインのアミノ酸数１９０～１９９に対応し、ループ２は、アミノ酸残基２２１～２２８に対応し、ループ３は、アミノ酸残基２５０～２５８に対応する。

【００１７】

本発明の別の態様において、本発明の非天然ＭＩＣ分子を含むライブラリーが提供され、ライブラリーのメンバーは多様な個々の標的結合特性を有する。

【００１８】

本発明のさらに別の態様において、本発明の非天然ＭＩＣ分子をコードする遺伝子を含むライブラリーが提供され、ライブラリーのメンバーは多様な個々の標的結合特性を有する。

【００１９】

本発明のさらに別の態様において、有効量の本発明の非天然ＭＩＣ分子を哺乳動物に投与することによって、悪性腫瘍またはウイルス感染を有することが疑われる哺乳動物を治療する方法であって、異種ペプチドが、標的モチーフの、悪性細胞またはウイルス感染細胞上の標的分子への結合を誘導する方法が提供される。特定の実施形態において、非天然ＭＩＣ分子は、ＮＫＧ２Ｄ保有細胞と悪性細胞、またはＮＫＧ２Ｄ保有細胞とウイルス感染細胞を結合し、その結果、ＮＫＧ２Ｄ保有細胞の、悪性細胞またはウイルス感染細胞への接着がもたらされる。具体的な実施形態において、ＮＫＧ２Ｄ保有細胞を接着することにより、悪性細胞またはウイルス感染細胞の生存能が破壊される。

【図面の簡単な説明】

【００２０】

【図１】ヒトＭＩＣＡの可溶性形態の構造を示す。ヒトＭＩＣＡの構造は、Ｐｉｎｇｗｅｉ Ｌｉ，ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２，４４３－４５１，２００１）によって解決されたようにリボンとして表される。α１およびα２ドメインは、ＮＫＧ２Ｄホモ二量体のための結合部位を提供する。α３ドメインは、Ｉｇスーパーファミリーのメンバーであり、この可溶性形態においてＣ末端を含む大腸菌において発現される。

【図２】クマシーブルー染色またはヒトＭＩＣＡに対する抗体を用いたウエスタンブロット法によって検出された、ｐＫＫ２９を内部に持つ大腸菌の誘導（「Ｂ」と表示されたレ

ーン）または非誘導（「Ａ」と表示されたレーン）培養からの細胞質ゾル（「サイトゾル」）、細胞膜（「細胞膜」）、および外膜（「外膜」）タンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の写真を示す。分子量が示されている。ＭＩＣＡのα３ドメインのインチミン（ＥａｅＡ）との融合は、アラビノースを用いて誘導した大腸菌細胞の外膜上に発現される。

【図３】哺乳類発現ベクターｐｃ５ＤＮＡ／ＦＲＴにおいて可溶性ＭＩＣＡアミノ酸１～２７６をコードするＤＮＡの構造の図である。ＣＭＶプロモーター、分泌シグナル、Ｈｉｓ－六量体タグ（「Ｈｉｓ６」、配列番号１２７）、α３の「緊密な」ループ１（アミノ酸１８８～２０１）およびループ３（アミノ酸２５０～２５８）、ならびにｂｇｈのｐｏｌｙＡテールの位置を示す。

【図４】Ｍ１３ファージｐＩＩＩの一部をコードするＤＮＡに融合されたＭＩＣＡのα３をコードするＤＮＡの構成。ｌａｃプロモーター、P_{lac}、ｐＩＩＩ分泌シグナル、ＦＬＡＧタグ、ならびにα３の「緊密な」ループ１（アミノ酸１８８～２０１）およびループ３（アミノ酸２５０～２５８）の位置を示す。

【図５】ヒトＭＩＣＡのα３ドメインを多様化するためのＤＧＲに基づくアプローチの略図を示す。

【図６】大腸菌の表面上に表示されたＥａｅＡおよびＥａｅＡ－α３融合タンパク質の構造の略図を示す。ＯＭは外膜、Ｄ１～Ｄ３はＩｇスーパーファミリーモチーフ、Ｘａは第Ｘ因子の切断部位、そしてＨ６はヘキサヒスチジンである。

【図７－１】配列番号１～１２６のアミノ酸または核酸配列を提供する。

【図７－２】配列番号１～１２６のアミノ酸または核酸配列を提供する。

【図７－３】配列番号１～１２６のアミノ酸または核酸配列を提供する。

【図７－４】配列番号１～１２６のアミノ酸または核酸配列を提供する。

【図７－５】配列番号１～１２６のアミノ酸または核酸配列を提供する。

【図７－６】配列番号１～１２６のアミノ酸または核酸配列を提供する。

【図７－７】配列番号１～１２６のアミノ酸または核酸配列を提供する。

【図７－８】配列番号１～１２６のアミノ酸または核酸配列を提供する。

【図７－９】配列番号１～１２６のアミノ酸または核酸配列を提供する。

【図７－１０】配列番号１～１２６のアミノ酸または核酸配列を提供する。

【発明を実施するための形態】

【００２１】

本発明は、哺乳動物に投与した後、ＭＩＣＡまたはＭＩＣＢタンパク質のＮＫＧ２Ｄ結合部分、すなわち、それらのα１－α２プラットフォームドメイン（α１ドメインおよびα２ドメインそれぞれにつき、アミノ酸１～８５および８６～１７８）を、α１－α２プラットフォームに付着した標的モチーフを介して意図する標的分子または細胞標的上の分子に特異的に結合させることによって、特異的な細胞の標的細胞を攻撃するためにＮＫ細胞および特定のＴ細胞を動員および活性化することができる可溶性、単量体、非天然のタンパク質分子について記載する。標的モチーフは、ＭＩＣＡまたはＭＩＣＢタンパク質のα３ドメインを含み、挿入された異種ペプチド（一つまたは複数）が標的分子に結合する。

【００２２】

「異種ペプチド」は、天然にはまたは通常はα３ドメイン内に存在しないペプチドである。いくつかの実施形態において、異種ペプチドは、可溶性ＭＩＣＡまたはＭＩＣＢのα３ドメインの溶媒に暴露されたループのうちの１つに統合される。統合された異種ペプチドは、ＭＩＣのα３ドメインの非末端構成要素であってもよく、ＭＩＣα３ドメインの標的分子への結合を誘導する。異種ペプチドは、既存のループのいずれも欠失させることなく、ループの２つの隣接する残基の間でα３ドメインのループに挿入されてもよい。代替として、ループの全体または一部が欠失し、異種ペプチドで置換されてもよい。好ましい実施形態において、ループの全体が欠失し、インサートで置換される。さらなる実施形態において、ループの全体が欠失し、欠失部位の片側または両側に隣接するα３ドメインの１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの追加のアミノ酸もまた欠失している。好ましい実

施形態において、欠失部位の片側または両側の１つ、２つ、または３つの残基が欠失している。特定の態様において、配列番号１～１３の１８８～２０１に対応する残基および／または残基２５０～２５８が欠失している。いくつかの実施形態において、１つ以上の残基を含むループの一部が欠失し、異種ペプチドで置換される。特定の実施形態において、欠失した部分は、ループの１つ～３つの残基であるか、またはループの１つ～５つのアミノ酸残基であるか、またはさらにはループの１つ～７つの残基である。具体的な実施形態において、欠失した部分は、挿入部位の１０アミノ酸残基内にある。他の実施形態において、欠失した部分は、挿入部位の９、８、７、６、５、４、３、２、または１アミノ酸残基内にある。

【００２３】

いくつかの実施形態において、異種ペプチドは、スペーサーおよび結合モチーフを含んでもよい。そのようなスペーサーは、その標的分子に結合できるように、または標的分子に結合する能力を向上させることができるように、異種ペプチドの結合モチーフを位置付けるために使用される、短い可撓性のリンカーペプチドであってもよい。

【００２４】

具体的な実施形態において、異種ペプチドは、天然もしくは組換え抗体、別のタンパク質もしくはペプチド分子、または結合モチーフの補体決定領域の一部を含んでもよい。特定の実施形態において、異種ペプチドは、抗体の補体決定領域である。他の実施形態において、異種ペプチドは、付着した多糖または他の炭水化物、核酸分子のアプタマーまたは合成類似体等の核酸分子をさらに含む。異種ペプチド（一つまたは複数）を組み入れることによって、ＭＩＣＡまたはＭＩＣＢタンパク質の非自然（または非天然）の、修飾または変換されたα３ドメインが生じ、それは、異種ペプチド（一つまたは複数）の結合特性（例えば、同族の結合パートナー）に基づいて、α１－α２プラットフォームの標的化を誘導する有用な機能を獲得する。本発明の非天然の一価分子は、一般的な提示表面に結合されないまたは限定されないという明確な利点を有し、それによって、修飾すること、製剤化すること、および従来の生物製剤として哺乳動物に投与することができる。

【００２５】

好ましい実施形態において、本発明の非天然、可溶性の単量体ＭＩＣタンパク質のループ１、ループ２、またはループ３のうちの１つより多くが異種ペプチドを含む。いくつかの実施形態において、異種ペプチドは、同じ標的分子に結合する。一態様において、異種ペプチドは、結合モチーフ内に同じアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、標的分子は、同じ細胞または同じ細胞型上にあってもよい。他の態様において、標的分子は、異なる細胞または細胞型上にあってもよい。他の実施形態において、異種ペプチドは、異なる標的分子に結合する。いくつかの態様において、標的分子は、同じ細胞または同じ細胞型上にあってもよい。他の態様において、標的分子は、異なる細胞または細胞型上にあってもよい。

【００２６】

所望されるα３ドメインに対する修飾は、標的細胞（例えば、悪性細胞またはウイルス感染細胞）の表面上の分子等の標的分子に対するα３ドメインの結合の特異性または感受性を加えるかまたは増加させるものを含む。α１－α２プラットフォームドメインは、修飾された標的α３ドメインに繋ぎ止められ、哺乳動物の細胞間または血管内の空間において拡散性である。好ましくは、本発明の非天然ＭＩＣタンパク質のα１－α２プラットフォームドメインは、ヒトＭＩＣＡまたはＭＩＣＢタンパク質の野生型または天然のα１－α２ドメインと少なくとも８０％同一または相同であり、ＮＫＧ２Ｄ受容体に結合する。いくつかの実施形態において、α１－α２プラットフォームドメインは、ヒトＭＩＣＡまたはＭＩＣＢタンパク質の野生型または天然のα１－α２プラットフォームドメインと８０％同一であり、ＮＫＧ２Ｄ受容体に結合する。他の実施形態において、α１－α２プラットフォームドメインは、ヒトＭＩＣＡまたはＭＩＣＢタンパク質の野生型または天然のα１－α２プラットフォームドメインと９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一であり、ＮＫＧ２Ｄ受容体に結合する。いくつかの実施形態において、α３

ドメインは、ヒトＭＩＣＡまたはＭＩＣＢタンパク質の野生型または天然のα３ドメインと８５％同一（いずれの修飾されたループも含まずに）である。他の実施形態において、α３ドメインは、ヒトＭＩＣＡまたはＭＩＣＢタンパク質の野生型または天然のα３ドメインと９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一（いずれの修飾されたループも含まずに）である。例示的なヒトＭＩＣＡタンパク質（可溶性形態）は、配列番号１～６、および１３を含む。例示的なヒトＭＩＣＢタンパク質（全タンパク質）は、配列番号７～１２を含む。

【００２７】

他の実施形態において、異種ペプチドタグは、可溶性ＭＩＣタンパク質の精製を補助するために、可溶性ＭＩＣタンパク質のＮ末端またはＣ末端に融合されてもよい。タグ配列は、ポリヒスチジン、ｍｙｃ－ペプチド、またはＦＬＡＧタグ等のペプチドを含む。そのようなタグは、当業者に既知の方法によってＭＩＣ分子の単離後に除去されてもよい。

【００２８】

本明細書で使用される場合、「可溶性ＭＩＣタンパク質」、「可溶性ＭＩＣＡ」、および「可溶性ＭＩＣＢ」は、ＭＩＣタンパク質のα１、α２、およびα３ドメインを含むが、貫通膜または細胞内ドメインを含まないＭＩＣタンパク質を指す。例示的な可溶性ＭＩＣタンパク質は、配列番号１～１３のアミノ酸残基１～２７４または１～２７６を含む。

【００２９】

本明細書で使用される場合、「完全なＭＩＣタンパク質」は、α１、α２、およびα３ドメイン、膜貫通ドメイン、ならびに細胞内ドメインを含むＭＩＣタンパク質を指す。完全なＭＩＣタンパク質の例は、配列番号７～１２に記載される。

【００３０】

本発明は、ＭＩＣ遺伝子のライブラリーまたはその結果生じる可溶性ＭＩＣタンパク質をさらに提供し、ライブラリーの各メンバーは、標的細胞に対するその結合特性等の異なる特性を有するかまたは示すため、多様な分子のライブラリーが生じる。例えば、ライブラリーは、１０以上の異なる結合特異性を表す多様な個々の標的結合特性を含むことができる。本明細書で使用される場合、「多様な個々の標的結合特性」とは、ライブラリーの個々のメンバーが、異なる標的分子に結合するか、または同じ標的分子に対して異なる親和性もしくは結合力を有する、ＭＩＣタンパク質のライブラリーを指す。いくつかのＭＩＣタンパク質のライブラリーにおいて、２つ以上のメンバーが同じ標的に結合してもよいが、異なる結合親和性または結合力を有してもよい。

【００３１】

本発明のさらなる実施形態において、悪性腫瘍またはウイルス感染を有する哺乳動物は、悪性またはウイルス性の状態に影響を与えるように有効量の可溶性ＭＩＣタンパク質を投与することによって治療することができる。哺乳動物への分子の投与は、ＮＫＧ２Ｄ保有ＮＫ細胞またはＴ細胞の標的悪性細胞またはウイルス感染細胞への接着をもたらし得、ＮＫ細胞またはＴ細胞が、標的悪性細胞またはウイルス感染細胞を破壊的に攻撃するかまたは破壊する。本発明の方法に照らして本明細書で使用される場合の「破壊する」という用語は、標的細胞の生存能を破壊することを意味する。

【００３２】

本明細書で使用される場合、「悪性」または「悪性の状態」は、癌、一群の細胞が制御されない増殖を示す疾患のクラス、隣接する組織に侵入して破壊する浸潤、および場合によっては転移（すなわち、リンパまたは血液を介して体内の他の場所に広がること）を指す。いくつかの実施形態において、悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、または骨髄腫である。具体的な実施形態において、白血病は、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、有毛細胞白血病、または急性単球性白血病（ＡＭＯＬ）であり、リンパ腫は、ホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫であり、骨髄腫は多発性骨髄腫である。他の実施形態において、悪性腫瘍は、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、膵臓癌、脳癌、神経膠芽腫、頭頸部癌、結腸癌、食道癌、肝臓癌、胃癌、子宮癌、内分泌癌、腎癌、膀胱癌、または子宮頸癌を含

む悪性固形腫瘍である。好ましい実施形態において、悪性腫瘍は、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、膵臓癌、脳癌、神経膠芽腫、頭頸部癌、または結腸癌である。より好ましい実施形態において、悪性腫瘍は乳癌である。

【００３３】

また、本発明は、ＭＩＣタンパク質のα３ドメイン（たとえば、配列番号１～１３のアミノ酸１８２～２７４）を、ＮＫＧ２Ｄ保有ＮＫ細胞またはＴ細胞を誘引するか、動員するか、またはそれらに結合するために、その繋ぎ止められたα１－α２ドメインを細胞間空間から標的細胞表面に直接送達することができる特異的な標的ドメインに変換する手段も含む。

【００３４】

これらの「受動ワクチン」の用途は、病的であるにもかかわらず、ＮＫ細胞または特定のＴ細胞を攻撃するために必要な適切なレベルのＭＩＣＡまたはＭＩＣＢ等のリガンドを発現しない病的細胞を破壊することである。例えば、ヒト肺癌のわずか３０％がＭＩＣＡを発現する（Ｂｕｓｃｈｅ，　Ａ　ｅｔ　ａｌ．２００６）。神経膠芽腫細胞は、先天性の免疫攻撃を防止するＮＫ細胞阻害シグナルを過剰発現するが、実験動物の肺癌または神経膠芽腫細胞における天然ＭＩＣＡ遺伝子産物の過剰発現は、ＮＫ細胞の癌に対する効果的な攻撃を回復する（Ｆｒｉｅｓｅ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．２００３）。

【００３５】

ＮＫＧ２Ｄ受容体に結合したヒトＭＩＣＡの高分解能構造が解明されており、ＭＩＣＡのα３ドメインは、ＮＫＧ２Ｄ受容体と直接的には相互作用しないことが示されている（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．２００１．Ｃｏｍｐｌｅｘ　ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ｏｆ　ｔｈｅ　ａｃｔｉｖａｔｉｎｇ　ｉｍｍｕｎｏｒｅｃｅｐｔｏｒ　ＮＫＧ２Ｄ　ａｎｄ　ｉｔｓ　ＭＨＣ　ｃｌａｓｓ　Ｉ－ｌｉｋｅ　ｌｉｇａｎｄ　ＭＩＣＡ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．２：４４３－４５１；Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋ　ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　ｃｏｄｅ　１ＨＹＲ）。ＭＩＣＡのα３ドメインは、ＭＩＣＢのα３ドメインと同様に、短い可撓性のリンカーペプチド、アミノ酸１７５～１８２［配列番号１～１３］によってα１－α２プラットフォームドメインに接続され、それ自体がプラットフォームと、ＭＩＣを発現する細胞の表面との間の「スペーサー」として天然に位置する。ヒトＭＩＣＡおよびＭＩＣＢのα３ドメインの三次元構造は、ほぼ同一であり（９４Ｃ－αα’ｓ上で平均二乗距離の平方根＜１Å）、機能的に交換可能である（Ｈｏｌｍｅｓ　ｅｔ　ａｌ．２００１．Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ　Ｓｔｕｄｉｅｓ　ｏｆ　Ａｌｌｅｌｉｃ　Ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　ｔｈｅ　ＭＨＣ　Ｃｌａｓｓ　Ｉ　Ｈｏｍｏｌｏｇ　ＭＩＣＢ，　ａ　Ｓｔｒｅｓｓ－Ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ　Ｌｉｇａｎｄ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　Ａｃｔｉｖａｔｉｎｇ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｃｅｐｔｏｒ　ＮＫＧ２Ｄ．Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６９：１３９５－１４００）。

【００３６】

さらに、ＭＩＣタンパク質のＩｇ様α３ドメインの三次元構造は、テンダミスタットの構造に類似し、また配列反転形態においては、１０番目のヒトフィブロネクチンドメインＩＩＩ型の構造に類似している：どちらの構造も、タンパク質結合モチーフを操作するための足場としての役割を果たしてきた（Ｐｆｌｕｇｒａｔｈ，ＪＷ，Ｇ　Ｗｉｅｇａｎｄ，Ｒ　Ｈｕｂｅｒ，Ｌ　Ｖｅｒｔｅｓｙ（１９８６）Ｃｒｙｓｔａｌ　ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ，ｒｅｆｉｎｅｍｅｎｔ　ａｎｄ　ｔｈｅ　ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｍｏｄｅｌ　ｏｆ　ｔｈｅ　α－ａｍｙｌａｓｅ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ　Ｈｏｅ－４６７Ａ．Ｊ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．１８９：３８３－３８６；Ｋｏｉｄｅ　Ａ，Ｂａｉｌｅｙ　ＣＷ，Ｈｕａｎｇ　Ｘ，Ｋｏｉｄｅ　Ｓ．１９９８．Ｔｈｅ　ｆｉｂｒｏｎｅｃｔｉｎ　ｔｙｐｅ　ＩＩＩ　ｄｏｍａｉｎ　ａｓ　ａ　ｓｃａｆｆｏｌｄ　ｆｏｒ　ｎｏｖｅｌ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２８４：１１４１－１１５１；Ｌｉ，Ｒ，ＲＨ　Ｈｏｅｓｓ，ＪＳ　Ｂｅｎｎｅｔｔ　ａｎｄ　ＷＦ　ＤｅＧｒａｄｏ（２００３）Ｕｓｅ　ｏｆ　ｐｈａｇｅ　ｄｉｓｐｌａｙ　ｔｏ　ｐｒｏｂｅ　ｔｈｅ　ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ　ｏｆ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ

and affinity in integrins. Protein Engineering 16：65－72；Lipovsek, D. et al.（2007）Evolution of an inter－loop disulfide bond in high－affinity antibody mimics based on fibronectin type III domain and selected by yeast surface display: molecular convergence with single－domain camelid and shark antibodies. J. Mol Biol 368：1024－1041；米国特許第７１５３６６１号；Protein Data Bank accession code １ＴＴＧ）。

【００３７】

本発明の一態様は、ＭＩＣＡまたはＭＩＣＢのα３ドメインの溶媒に暴露された６つのループのうちの１つ以上に、遺伝子操作によって特異的結合特性を持たせることを企図し、哺乳動物への投与後、血管内または細胞間空間内に拡散し、続いて、意図する標的細胞上の標的分子に高い感受性および特異性で付着することができ、それによって、結合ならびにそれに続くＮＫＧ２Ｄ保有ＮＫおよび／またはＴ細胞による特定の標的細胞の破壊的攻撃を促進することができる、可溶性の非天然ＭＩＣ分子が形成される。標的悪性細胞上の表面接近性分子の例は、インテグリン、癌遺伝子産物またはそれらの断片、例えば、ＮＫ－１Ｒ、ヒト上皮増殖因子２（Ｈｅｒ２またはＥｒｂＢ２）、増殖因子受容体、例えば、上皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）、ＦＧＦ受容体３、ＣＤ３０、ＣＤ１９、ＣＤ２０、血管新生因子受容体（血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）受容体およびＶＥＧＦ関連分子のため等）、メラノーマ抗原、ならびにＬＮｃａＰおよびＰＣ－３前立腺癌細胞の抗原を含む。標的ウイルス感染細胞上の表面接近性分子は、アポリポタンパク質Ｈ、Ｇａｓ６、ＭＦＧ－Ｅ８等のアクセサリータンパク質を有するかまたは有しない「裏表が反転した」ホスファチジルセリン；ウイルスによってコードされる抗原、ウイルスによってコードされる肝炎ウイルスの抗原；アデノウイルス；サイトメガロウイルス；他のヘルペスウイルス；ＨＩＶ（特にｐＩ７）；ワクシニア；ポックスウイルス；ロタウイルス；インフルエンザ；パルボウイルス；西ナイルウイルス；狂犬病；ポリオーマ；パピローマウイルス；風疹；ジステンパー；および日本脳炎ウイルスを含む（Balasubramanian, K and Schroit, AJ. 2003. Ann. Rev. Physiol. 65：701－734；Soares, MM, SW King&PE Thorpe.（2008）Targeting inside－out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases. Nature Medicine 14：1358－62；Slavul jica et al, 2010）。本発明の組成物は、合成ＤＮＡ、バクテリオファージディスプレイ、または酵母表面ディスプレイもしくは細菌表面ディスプレイ技術（これらのうちのいくつかは、テンダミスタットおよび１０番目のヒトフィブロネクチンドメインＩＩＩに特異的結合特性を形成するために展開されている）を展開して、ＭＩＣＡまたはＭＩＣＢのα３ドメインに特異的な結合モチーフを導入することによって生成することができる（McConnell, SJ and RH Hoess,（１９９５）Tendamistat as a Scaffold for Conformationally Constrained Phage Peptide Libraries. J. Molec. Biol ２５０：４６０－４７０；Li et al.（２００３）；Sidhu, S. S. &S. Koide（２００７）Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. Current Opinion in Struct. Biol. １７：４８１－４８７；Lipovsek, D. et al. ２００７）。これらの方法は、溶媒に暴露されたループ内で高度に多様化され、選択、スクリーニング、またはパニング（全て当業者に既知である）によって、所望の表現型の結合特性を示すこれらのα３ドメインをコードする遺伝子型をそこから単離するための、α３

ドメイン構造のライブラリーを作製することを伴う。

【００３８】

Ｍｉｌｌｅｒらの多様性を生成するレトロエレメント（ＤＧＲ）は、ループ内の多様なアミノ酸位置に多様性を生成する方法の一例である（Ｍｅｄｈｅｋａｒ，Ｂ．＆Ｊ．Ｆ．Ｍｉｌｌｅｒ．２００７．Ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ－Ｇｅｎｅｒａｔｉｎｇ Ｒｅｔｒｏｅｌｅｍｅｎｔｓ．Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１０：３８８－３９５、および米国特許第７，５８５，９５７号）。ヒトＭＩＣＡおよびＭＩＣＢのα３ドメインは、２７６個のアミノ酸の水溶性形態うちの９５個のアミノ酸（１８２～２７６）からなっているため、全ての溶媒に暴露されたループ、たとえば、配列番号１～１３のアミノ酸１９０～１９９、２０８～２１１、２２１～２２８、２３１～２４０、２５０～２５８、または２６４～２６６が多様化されてもよく、またさらには、操作可能であることが分かっている長さである２００ヌクレオチドを超えない長さの合成鋳型反復配列（Ｔｅｍｐｌａｔｅ Ｒｅｐｅａｔ：ＴＲ）を展開して突然変異誘発をホーミングすることにより、挿入したアミノ酸によって伸長されてもよい（Ｇｕｏ，Ｈ ｅｔ ａｌ．２００８．Ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ－Ｇｅｎｅｒａｔｉｎｇ Ｒｅｔｒｏｅｌｅｍｅｎｔ Ｈｏｍｉｎｇ Ｒｅｇｅｎｅｒａｔｅｓ Ｔａｒｇｅｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｆｏｒ Ｒｅｐｅａｔｅｄ Ｒｏｕｎｄｓ ｏｆ Ｃｏｄｏｎ Ｒｅｗｒｉｔｉｎｇ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｉｖｅｒｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ ３１，８１３－８２３）。

【００３９】

いくつかの要因によって、α３ドメインの、多様化された、溶媒に暴露されたループのＤＧＲベースのライブラリの作成が誘導される。第１に、ＤＧＲは、可変反復配列（ｖａｒｉａｂｌｅ ｒｅｐｅａｔ：ＶＲ）と称される、タンパク質をコードするＤＮＡ配列の所定のセグメントに多様性を生成する。いくつかの異種配列は、ＶＲとして機能するために、それらの末端で変異原性ホーミングの開始（ｉｎｉｔｉａｔｉｏｎ ｏｆ ｍｕｔａｇｅｎｉｃ ｈｏｍｉｎｇ：ＩＭＨ）配列と隣接する。ＩＭＨ配列は、変異原性ホーミングを誘導し、配列の多様化の３’境界を決定する、シス作用部位としての役割を果たす。第２に、ＶＲの多様化の５’境界は、ＶＲとその同族ＴＲとの間の相同性の程度によって決定され得る。部分的な相同性のみが必要とされ、ミスマッチも許容される。第３に、多様化に供されるＶＲの特異的部位は、ＴＲにおけるアデニン残基の位置によって決定され得る。「合成」ＴＲの適切な位置にアデニン残基を挿入することによって、特異的なＶＲによってコードされるアミノ酸残基を多様化することができる。第４に、ａｔｄタンパク質、ＴＲによってコードされるＲＮＡ中間体、およびＲＴ逆転写酵素は、異種プロモーター、例えば、P_{tetA}またはP_{bad}の制御下でプラスミドベクターｐＤＧＲ上に発現されたときに効率的にトランスで機能する。このことは、細菌細胞内の多様化を切り換えるための便利な手段、および多様化される正確な部位をプログラムするための合成ＴＲ配列への便利なアクセスを提供する。さらに、トランス作用構成要素の高レベルの発現は、高効率の多様化をもたらす。

【００４０】

α３ドメインを多様化するためのＤＧＲベースのアプローチの一般的な概要を図５に示す。多様化される配列は、α３ドメインのループに対応する。ＩＭＨ配列は、α３ドメインをコードする遺伝子の停止コドン（約ＡＶ２７７）のすぐ下流に位置し、多様化に供される「合成ＶＲ」を作製する

【００４１】

α３ドメインをコードする合成ＶＲは、プラスミドｐＤＧＲ上の合成ＴＲによって多様化される（図５）。このＴＲ要素は、ＩＭＨ＊と、ＶＲに相同な上流配列とを含む。突然変異誘発に供される特異的なＶＲ残基は、ＴＲにおけるアデニンの置換によって正確にプログラムされ、高密度のアデニン残基がシステムによって許容され得る。また、ｐＤＧＲは、ＡｔｄおよびＲＴ逆転写酵素をコードする座位も含む。Ａｔｄ、ＴＲ、およびｒｔは、厳重に抑制されたｔｅｔＡプロモーター／オペレーター（P_{tetA}）から発現され、

アンヒドロテトラサイクリンの添加または除去により、多様化プロセスの正確な制御を可能にする。

【００４２】

標準的なファージディスプレイ形式において、ＤＧＲ機構を介してα３ドメインを多様化することを検討することは有益である。この場合、α３ドメインは、大腸菌においてファージミドベクター上でコードされる繊維状ファージコートタンパク質に融合される。ＶＲは、α３ドメインの溶媒に暴露されたループを含み、ｐＤＧＲは、それらのループ内の指定された場所で効率的にＶＲを多様化するように設計される（Ｇｕｏ　ｅｔ　ａｌ．２００８）。ａｔｄ、ＴＲ、およびｒｔの発現を活性化することにより、ファージミドゲノム上に存在するＶＲ配列の突然変異が誘発される。この結果、ファージのライブラリーが作製され、それらの各々が、その表面上で多様化された結合タンパク質を表し、コード化ＤＮＡパッケージングする。所望の特異性は、固定化された標的分子、例えば、癌遺伝子Ｈｅｒ２の表面露出タンパク質生成物にファージを結合させ、非結合ファージを除去するために洗浄し、再増幅および濃縮することによって選択される。選択された表現型のさらなる最適化のラウンドは、単純に、ｐＤＧＲを含む大腸菌を選択またはパニングされたファージに感染させ、上述のステップを繰り返すことによって効率的に達成することができる。このシステムは、従来のアプローチによって達成されるものよりも数桁大きいライブラリーサイズを生成することができる。α３ドメイン骨格の完全性を犠牲にすることなく、累積的な改善を伴って連続ラウンドの最適化が達成され得る容易さも、等しく有利である。

【００４３】

大腸菌等の細菌の表面上に多様化したタンパク質を表示することは、ファージディスプレイに優る潜在的な利点を提供する代替のアプローチである。例えば、いずれのファージも作製する必要なく、または選択されたファージの複数ラウンドの感染を繰り返す必要もなく、連続ラウンドの最適化を達成することができる。また、α３ドメインは、直接的な生化学的または物理的分析のために細菌の表面から切断されるように設計することができる。ＤＧＲは、４０を超える細菌種のゲノム内に天然に見られるが、いずれも大腸菌において同定されていない。しかしながら、最近、レジオネラ・ニューモフィラ由来のＤＧＲのシスおよびトランス作用構成要素が大腸菌において効率的に機能することがＭｉｌｌｅｒらによって示された。ＭＩＣＡまたはＭＩＣＢの多様化されたα３ドメインは、非限定的な例として、腸管病原性大腸菌によってコードされたＥａｅＡインチミンタンパク質の外膜局在化およびアンカードメインから構成される融合タンパク質として、大腸菌の表面上で発現される（Ｌｕｏ　Ｙ，Ｆｒｅｙ　ＥＡ，Ｐｆｕｅｔｚｎｅｒ　ＲＡ，Ｃｒｅａｇｈ　ＡＬ，Ｋｎｏｅｃｈｅｌ　ＤＧ，Ｈａｙｎｅｓ　ＣＡ，Ｆｉｎｌａｙ　ＢＢ，Ｓｔｒｙｎａｄｋａ　ＮＣ．（２０００）Ｃｒｙｓｔａｌ　ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ｏｆ　ｅｎｔｅｒｏｐａｔｈｏｇｅｎｉｃ　Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｉｎｔｉｍｉｎ－ｒｅｃｅｐｔｏｒ　ｃｏｍｐｌｅｘ．Ｎａｔｕｒｅ．４０５：１０７３－７）。ＥａｅＡは、タンパク質を外膜にアンカリングする約５００アミノ酸のＮ末端セグメントからなり、転位を促進するポリン様構造を有する逆平行βバレルを形成すると考えられる（Ｔｏｕｚｅ　Ｔ，Ｈａｙｗａｒｄ　ＲＤ，Ｅｓｗａｒａｎ　Ｊ，Ｌｅｏｎｇ　ＪＭ，Ｋｏｒｏｎａｋｉｓ　Ｖ．（２００４）Ｓｅｌｆ－ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　ｏｆ　ＥＰＥＣ　ｉｎｔｉｍｉｎ　ｍｅｄｉａｔｅｄ　ｂｙ　ｔｈｅ　ｂｅｔａ－ｂａｒｒｅｌ－ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ　ａｎｃｈｏｒ　ｄｏｍａｉｎ：ａ　ｒｏｌｅ　ｉｎ　ｃｌｕｓｔｅｒｉｎｇ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｔｉｒ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ．Ｍｏｌ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．５１：７３－８７）。この転位ドメインの後には、一連のＩｇ様モチーフと、腸上皮表面への結合に寄与するＣ末端Ｃ型レクチンドメインとが続く（図６）。インチミンの細長い構造と、異種タンパク質ドメインを大腸菌外膜の外面に輸出してアンカリングするその能力は、それが、多様化されたα３タンパク質の表面ディスプレイのための理想的かつ用途の広い融合パートナーであることを示唆している（Ｗｅｎｔｚｅｌ　Ａ，Ｃｈｒｉｓｔｍａｎｎ　Ａ，Ａｄａｍｓ　Ｔ，Ｋｏｌｍａｒ　Ｈ．（２００１）．Ｄｉｓｐｌａｙ　ｏｆ　ｐａｓｓｅｎ

ger proteins on the surface of Escherichia coli K−12 by the enterohemorrhagic E. coli intimin EaeA. J Bacteriol. 183：7273−84；AdamsTM, A Wentzel, and H Kolmar（2005）Intimin−Mediated Export of Passenger Proteins Requires Maintenance of a Translocation−Competent Conformation. J. of Bacteriology, 187：522−533）。

【００４４】

ＭＩＣＡおよびＭＩＣＢの天然の配向では、Ｃ末端が細胞膜にアンカリングされる（Ｉ型膜タンパク質）。α３ドメインは、Ｎ末端のα１−α２プラットフォームと細胞膜との間に存在する。しかしながら、これらのα３ドメインのループをα１−α２プラットフォームから離れて突出するように多様化するために、反対の配向（例えば、ＩＩ型膜タンパク質）が所望される、すなわち、配列番号１～１３のアミノ酸位置１９０～１９９、２２１～２２８、２５０～２５８に位置するループ等のループが標的分子の結合に容易に利用可能となるように、Ｎ末端で図１のα３ドメインのリンカー部分をＥａｅＡに付着させる。そのようなＩＩ型膜タンパク質の配向は、正に図６のＥａｅＡの配向である。さらに、α３ドメインは、ＥａｅＡと同様にＩｇ様モチーフを有するため、ＥａｅＡはα３ドメインを大腸菌表面に転位させる（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．１９９９．Ｃｒｙｓｔａｌ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ ｔｈｅ ＭＨＣ ｃｌａｓｓ Ｉ ｈｏｍｏｌｏｇ ＭＩＣＡ, ａ γδＴ ｃｅｌｌ ｌｉｇａｎｄ. Ｉｍｍｕｎｉｔｙ １０：５７７−５８４）。実際、ＥａｅＡが異種パッセンジャーポリペプチドを転位させる能力は文献に記述されている（Ｗｅｎｔｚｅｌ ｅｔ ａｌ．２００１；Ａｄａｍｓ ｅｔ ａｌ，２００５）。

【００４５】

ＥａｅＡ−α３融合タンパク質は、ａｒａＢＡＤプロモーター（P_{bad}）から発現され、増殖培地に加えられたアラビノースの濃度に用量依存性の様式で応答する。これにより、細菌細胞の表面上でα３ドメインの密度を正確に制御することができる。多様化システム、例えば、レジオネラ・ニューモフィラａｔｄ ＴＲ ｒｔ配列（ｐＤＧＲ、図２）は、マルチコピープラスミド上で厳重に制御されたｔｅｔＡプロモーター／オペレーターの制御下に置くことができる。ａｔｄ ＴＲ ｒｔ配列の発現は、増殖培地にアンヒドロテトラサイクリンを添加することによって誘発され、α３ ＶＲ配列の高頻度な多様化をもたらす。一旦、多様化が達成されると、増殖培地から誘発物質を除去することによりシステム（α３−ＶＲ）が安定状態に「ロック」される。

【００４６】

多様化は、α３−ＶＲの多様化を誘発するために、ＥａｅＡ−α３融合タンパク質およびアンヒドロテトラサイクリンの発現を誘導するようにアラビノースの存在下で表面ディスプレイ大腸菌を増殖することによって最初に達成される。該当する結合特性を示す細菌細胞は、蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）または磁気ビーズ分離法等の標準的な方法を使用して濃縮することができる。選択された細菌細胞は、アラビノースの存在下およびアンヒドロテトラサイクリンの非存在下で成長させることによって増幅される。さらなる濃縮ステップが含まれてもよく、単純にプロトコルを繰り返すことによって追加ラウンドの最適化を達成することができる。重要なのは、ＮＫ細胞またはＴ細胞の攻撃のために望ましくない標的に結合するα３ドメインは、所望の結合特性の選択前に、例えば正常な組織に対してパニングすることによって、多様化ライブラリーから枯渇させることができるということである。選択されたα３タンパク質は、Ｆａｃｔｏｒ Ｘａプロテアーゼの添加によって細菌細胞の表面から切断することができ、次いで、さらなる特徴付けおよび使用のために６ｘＨｉｓタグ化Ｃ末端ドメインの親和性精製によって精製される。これにより、選択されたα３ドメインの構造および機能に関する簡便な生化学的または物理的分析が可能となる。所望の非天然α３ドメインをコードする単離されたＤＮＡを、α１−α２プラットフォームドメインをコードするＭＩＣ遺伝子の一部に融合することにより、

いずれの場合においても、リンカーまたはテザー（アミノ酸１７７－１８２）を介して所望の非天然α３ドメインを残りの可溶性ＭＩＣタンパク質に再導入し、単離されたα３ドメインの特異性および感受性を有する所望の受動的ＮＫ細胞ワクチンを作製することができる。

【００４７】

選択された遺伝子型は、細菌、酵母、昆虫、または哺乳類細胞において非天然または非自然の、可溶性の同族ＭＩＣタンパク質を生成および単離するために使用することができる。生成されたＭＩＣＡは、要求される程度まで精製され、インビトロおよびインビボで安定化するための利用可能な方法によって製剤化され、ヒトまたは他の哺乳動物に非経口的にまたは他の経路によって投与されることができ、そこで、先天性免疫系の細胞構成要素による標的攻撃を促進することにより、悪性腫瘍またはウイルス性疾患を治療するために拡散することができる。

【００４８】

いくつかの実施形態において、非天然ＭＩＣ分子は、「薬学的に許容される」賦形剤または担体とともに製剤化される。そのような構成要素は、過度の有害な副作用なくヒトまたは動物に使用するために好適な構成要素である。有害な副作用の非限定的な例は、毒性、刺激、および／またはアレルギー反応を含む。賦形剤または担体は、通常、妥当な利益／リスク比に見合ったものである。多くの実施形態において、担体または賦形剤は、局所または全身投与に好適である。非限定的な薬学的な担体は、滅菌水溶液または非水溶液、懸濁液、およびエマルションを含む。その例は、限定されないが、リン酸緩衝生理食塩水、水、油／水エマルション等のエマルション、および種々の種類の湿潤剤等の標準的な薬学的賦形剤を含む。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油等の植物油、およびオレイン酸エチル等の注射可能な有機エステルである。水性担体は、食塩水および緩衝媒体を含む、水、アルコール／水溶液、エマルション、または懸濁液を含む。非経口ビヒクルは、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸化リンゲル、またはおよび固定油を含む。静脈内ビヒクルは、流体および栄養補充剤、電解質補充剤（リンゲルデキストロースなどに基づくもの等）を含む。

【００４９】

任意選択的に、本開示の非天然ＭＩＣ分子を含む組成物は、当該技術分野で周知の手段を使用して凍結乾燥または噴霧されてもよい。その後の再構成および使用は、当該技術分野で既知であるように実践することができる。

【００５０】

経口的および局所的使用に好適な薬学的グレードの有機または無機担体および／または希釈剤が、治療的に活性な化合物を含む組成物を作製するために使用されてもよい。安定化剤、湿潤剤および乳化剤、浸透圧を変化させるための塩、または適切なｐＨ値を確保するための緩衝液が含まれてもよい。

【００５１】

非天然ＭＩＣ分子は、通常、「安全かつ有効な」量または濃度で使用され、それは、上述のような過度の有害な副作用なく所望の治療応答をもたらすのに十分な量を意味する。非天然ＭＩＣ分子は、そのインビボでの薬物動態特性を変化させるために生化学的に修飾されてもよい。循環タンパク質分子の半減期を増加させるための周知の方法は、ＭＩＣタンパク質の結合機能に影響を及ぼすことなく、基本構造にポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を化学的に付着すること、または、遺伝子操作により、グリシンおよびセリン等の天然アミノ酸のポリマーをＮ末端、Ｃ末端、または内部（配列番号１～１３のアミノ酸１７９～１８２のα１－α２とα３ドメインとの間のテザー内等）に付加することである。非天然ＭＩＣ分子は、「治療的に有効な」量または濃度で使用されてもよく、それは、所望の治療応答を生じさせるための量を指し、例えば、限定されないが、標的細胞を死滅させるのに十分なＮＫ細胞またはＴ細胞を動員するために標的細胞に結合するために効果的な量である。安全かつ有効な量または治療的に有効な量は、種々の要因に伴って変化するが

、過度の実験を行うことなく、熟練した医師によって容易に決定され得る。要因の非限定的な例は、治療される具体的な状態、対象の物理的状態、治療される対象の種類、治療の期間、（ある場合は）併用療法の性質、および用いられる特定の製剤を含む。

【００５２】

「～を含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「～を含む（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」、または「～によって特徴付けられる」と交換可能に使用される「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という用語は、包括的または開放型言語であり、追加の列挙されていない要素または方法ステップを除外しない。「～からなる」という句は、特許請求の範囲に規定されていないあらゆる要素、ステップ、または成分を除外する。「～から本質的になる」という句は、特許請求の範囲の範囲を、規定される材料またはステップ、および請求される発明の基盤および新規特徴に大きな影響を及ぼすことのないものに限定する。本発明の開示は、これらの句の各々の範囲に対応する本発明の実施形態、組成物、および方法を企図する。よって、列挙される要素またはステップを含む組成物または方法は、組成物または方法が、これらの要素またはステップから本質的になるかまたはなる具体的な実施形態を企図する。

【００５３】

本明細書に列挙される全ての参考文献は、以前に明示的に組み込まれているかまはいないかにかかわらず、参照によって、それらの全体が本明細書に組み込まれる。本明細書で使用される場合、「ａ」、「ａｎ」、および「ａｎｙ」という用語は、各々、単数形および複数形の両方を含むことを意図する。

【００５４】

本発明について十分に説明してきたが、当業者は、本発明の主旨および範囲から逸脱することなく、また過度な実験を行うことなく、様々な同等のパラメータ、濃度、および条件においてそれを実施することができることを理解するであろう。本発明は、その特定の実施形態に関連して説明されてきたが、さらなる変更が可能であることを理解されたい。本出願は、一般に本発明の原理に従い、また本発明が関連する技術における既知のまたは一般的な慣行に属するような、本発明の開示からのそのような逸脱を含む、本発明のいかなる変形、使用、または改作も包含することを意図し、上文に記載される本質的な特徴に適用されてもよい。

【実施例】

【００５５】

本明細書において提供される場合、所望の表現型をコードするＤＮＡを単離するために選択、スクリーニング、またはパニングを可能にするために、どちらも当業者に周知である２つの技術を使用して、ＭＩＣＡのα３ドメインの遺伝子型をその（結合）表現型に物理的に付着した。第１の技術は、α３ドメインをコードするＤＮＡを内部に持つ細菌の表面にα３ドメインが表示される、細菌表面ディスプレイである。第２の技術は、コードするＤＮＡ、遺伝子型がファージゲノム内にある、キメラファージのカプシドタンパク質としてのα３ドメインのバクテリオファージディスプレイである。表示されたα３ドメインの表現型を反映する結合表現型を有する可溶性の修飾されたヒトＭＩＣＡ分子を作製するためにα３ドメインの遺伝子型を使用する能力も、本明細書において証明される。

【００５６】

１．大腸菌の表面上におけるＭＩＣ－α３ドメインタンパク質の表示

端的に述べると、α３ドメインをコードするＤＮＡを大腸菌ｅａｅＡ（インチミン）遺伝子の一部に融合し、その結果得られた融合タンパク質を、α３ドメインが細菌表面に遠位であるそのＣ末端部分と方向を合わせるような様式で、大腸菌の表面上で発現させた。

【００５７】

オリゴヌクレオチドのＡＶ１４０１（配列番号１５）およびＡＶ１４０２（配列番号１６）をキナーゼ化し、アニーリングし、ＮｄｅＩおよびＮｃｏＩで消化したプラスミドｐＥＴ３０ａ（Ｎｏｖａｇｅｎ）のアリコートに連結して、ｐｅｌＢ分泌シグナル配列を含むｐＳＷ２４９を作製した。

【００５８】
プラスミドｐＳＷ２４９をＮｃｏＩおよびＢｌｐＩで消化し、キナーゼ化およびアニーリングしたオリゴヌクレオチドＡＶ１４４５（配列番号１７）およびＡＶ１４４６（配列番号１８）に連結してｐＳＷ２６３を作製した。この構築物は、ｐｅｌＢ配列の次の６つのヒスチジン残基（配列番号１２７）をコードする配列を含んでいた。
【００５９】
５’非翻訳配列の一部、シグナル配列、および成熟コード配列のコドン１～２７６、続いて停止コドンを含むヒトＭＩＣＡのｃＤＮＡを、プライマーＡＶ１４６６（配列番号１９）およびＡＶ１４４８（配列番号２０）を使用して、ヒト脾臓一本鎖ｃＤＮＡ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎより調達）からＰＣＲにより増幅した。
【００６０】
ＰＣＲ断片をＮｈｅＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化し、同じくＮｈｅＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化したｐＣＤＮＡ５－ＦＲＴ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に連結してｐＳＷ２６５を作製した。定方向突然変異誘発により３つの突然変異Ｇ１４Ｗ、Ａ２４Ｔ、およびＥ１２５ＫのＭＩＣＡコード化領域を修正してｐＳＷ２７１を作製した。
【００６１】
プライマーＡＶ１４４７（配列番号２１）およびＡＶ１４４８（配列番号２０）を用いてｐＳＷ２７１の一部をＰＣＲ増幅した。ＰＣＲ断片は、ｔｅｖプロテアーゼ切断部位ＥＮＬＹＦＱＧ（配列番号１２８）、続いてヒトＭＩＣＡのコドン１～２７６からなっていた。このＰＣＲ断片をＸｈｏＩＩＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化し、同じくＸｈｏＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化したプラスミドｐＳＷ２６３のアリコートに連結してプラスミドｐＳＷ２８６を作製した。
【００６２】
ＡＶ１４０８（配列番号２２）およびＡＶ１４０９（配列番号２３）プライマーを使用して大腸菌ＥＤＬ９３３ゲノムＤＮＡからｅａｅＡ遺伝子を増幅した。
【００６３】
このＰＣＲ産物をＢａｍＨＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化し、同じくＢａｍＨＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化したＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ－ＳＫ＋ＤＮＡ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）に連結してｐＳＷ２８４を作製した。
【００６４】
プライマーＡＶ１６０２（配列番号２４）およびＡＶ１６０３（配列番号２５）を使用してプラスミドｐＳＷ２８４の一部をＰＣＲ増幅した。ＰＣＲ断片をＮｄｅＩおよびＸｈｏＩで消化し、同じくＮｄｅＩおよびＸｈｏＩで消化したｐＳＷ２８６のアリコートに連結してＳＷ２８９を作製した。
【００６５】
プライマーｋｋ４３（配列番号２６）およびｋｋ４４（配列番号２７）を用いてｐＳＷ２８９の一部をＰＣＲ増幅した。その結果得られた、ｔｅｖプロテアーゼ切断部位ＥＮＬＹＦＱＧ（配列番号１２８）、続いてＭＩＣＡの残基１８１～２７６をコードする配列（注：連続する６Ｃ’ｓを分割するために、Ｐ１８３のコドンをＣＣＣからＣＣＡに変更した）を含むＰＣＲ断片をＸｈｏＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化し、ＸｈｏＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化したｐＳＷ２８９の別のアリコートの消化物からアガロースゲル上で精製された約７１８５ｂｐの断片に連結してｐＫＫ５を作製した。７１８５ｂｐの断片で、ＥａｅＡ１～６５９、その後にＧＧ、次いでＦａｃｔｏｒ　Ｘａによる切断部位ＩＥＧＲ（配列番号１２９）、６つのＨｉｓ残基（配列番号１２７）、次いで、ＸｈｏＩ部位を提供することの他は機能のないＬＥをコードするＸｈｏＩ部位をコードした。
【００６６】
プライマーｋｋ５２（配列番号２８）およびｋｋ４５（配列番号２９）を用いてｐＫＫ５をＰＣＲ増幅した。ＮｃｏＩおよびＨｉｎｄＩＩＩでＰＣＲ断片を消化し、ＮｃｏＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化したｐＢＡＤ２４（ＡＴＣＣから）のアリコートに連結してｐＫＫ２９を作製した。製造業者の推奨に従って、クローン株である大腸菌「ＮＥＢ　１０

－β」（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓカタログ番号ＡＶ Ｃ３０１９Ｈ）にプラスミドｐＫＫ２９を形質転換し、１００μｇ／ｍｌカルベニシリンに対する耐性のために選択した。

【００６７】

ｐＫＫ２９で形質転換した大腸菌細胞のアラビノース誘導型および非誘導型の細胞質タンパク質、内膜タンパク質、および外膜タンパク質を各々単離し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルをクマシーブルーで染色するか、またはヒトＭＩＣＡタンパク質に対すル抗体を用いてウエスタンブロットした。

【００６８】

OD_{600}が０．９１５に等しくなるまでＬＢ／Ｃａｒｂ１００中で細胞を増殖させた。１０ｍｌの細胞のアリコートを２本の５０ｍｌ円錐管の各々に加えた。一方の管は０．００２％アラビノースで誘導し、他方は誘導しないままにした。３７℃で１時間振盪しながらサンプルをインキュベートした。

【００６９】

Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ ５８１０Ｒ卓上型遠心機にて１０分間４０００ｒｐｍで細胞を遠心分離した。上清を廃棄し、６ｍｌのＦＰ緩衝液（０．１Ｍリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．０）、０．１Ｍ ＫＣｌ、５ｍＭ ＥＤＴＡ、１ｍＭジチオスレイトール、１ｍＭフッ化フェニルメチルスルホニル）中に細胞ペレットを緩やかに再懸濁し、１５ｍｌ円錐管に移した。Ｂｉｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃの３００Ｖ／Ｔモデル超音波ホモジナイザーを使用して、６×１５秒のバーストで細胞を超音波処理した。バースト間に氷上でサンプルをインキュベートした。超音波処理後、Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ ５８１０Ｒ卓上型遠心機にて管を５分間４０００ｒｐｍで遠心分離にかけ、破損した細胞を全て除去した。

【００７０】

上清をＢｅｃｋｍａｎポリカーボネート遠心管（カタログ番号ＡＶ３５５６３１）に移し、Ｔｙｐｅ ６０Ｔｉローターを使用して、Ｂｅｃｋｍａｎ Ｌ８－８０Ｍ床置き型超遠心機にて１００，０００Ｘｇで１時間４℃で回転させた。細胞質タンパク質を含む上清を新しい管に移し、４℃で保存した。

【００７１】

２ｍｌのＭＥ緩衝液（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、３５ｍＭ $MgCl_2$、１％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００）中に細胞膜のペレットを再懸濁した。サンプルを２時間２５℃で緩やかに振盪し、次いで、Ｔｙｐｅ ６０Ｔｉローターを使用して、Ｂｅｃｋｍａｎ Ｌ８－８０Ｍ床置き型超遠心機にて１００，０００Ｘｇで３０分間４℃で再度遠心分離した。細胞膜のＴｒｉｔｏｎ可溶性タンパク質を含む上清を新しい管に移し、４℃で保存した。外膜タンパク質を含む最終的なペレット（Ｓｃｈｎａｉｔｍａｎ，ＣＡ．１９７１．Ｓｏｌｕｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｃｙｔｏｐｌａｓｍｉｃ Ｍｅｍｂｒａｎｅ ｏｆ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｂｙ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００．Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ １０８：５４５－５５２）を０．１ｍｌの水に再懸濁し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分析に供する前に同じく４℃で保存し、クマシーブルーで染色するか、またはヒトＭＩＣＡに対するヤギポリクローナル抗体を使用してウエスタンブロットした（図２）。

【００７２】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析では、サンプルを等量のＮｏｖｅｘ Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅ ＳＤＳ ２Ｘサンプル緩衝液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ＡＶＬＣ２６７６）と混合し、４～２０％Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅ Ｇｒａｄｉｅｎｔ Ｇｅｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ＡＶＥＣ６０２８５ＢＯＸ）上で電気泳動した。ウエスタンブロット法では、スラブゲル中で電気泳動したサンプルのレーンをＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ＸＣｅｌｌ ＩＩ Ｂｌｏｔ Ｍｏｄｕｌｅ（ＡＶＥＩ９０５１）を使用してニトロセルロース膜（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｎｉｔｒｏｃｅｌｌｕｌｏｓｅ Ｍｅｍｂｒａｎｅ Ｆｉｌｔｅｒ Ｐａｐｅｒ Ｓａｎｄｗｉｃｈ ＡＶＬＣ２００１）に移した。５％牛乳－リン酸緩衝生理食塩水、Ｔｗｅｅｎ－２０（ＰＢＳＴ）中、４℃で膜フィルターを一晩ブロックした。一次抗

体（抗ヒトＭＩＣＡ抗体－Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　ＡＶＡＦ１３００）を、５％牛乳－ＰＢＳＴ中、１：５００の希釈率で使用した。その結果得られたフィルターの「ブロット」を緩やかに振動させながら２時間２５℃でインキュベートした。続いて、フィルターの「ブロット」をＰＢＳＴで２０分間２５℃で洗浄し、その後、５％牛乳－ＰＢＳＴ中、１：１０００の希釈率で二次抗体（抗ヤギＩｇＧ－ＨＲＰ抗体－Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　ＡＶＨＡＦ０１７）を加えた。フィルターの「ブロット」を２時間２５℃で振動させ、次いで、再びＰＢＳＴで２０分間洗浄した。Ｎｏｖｅｘ　ＨＲＰ　Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎｉｃ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ－ＴＭＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＡＶＷＰ２０００４）を用いてフィルターの「ブロット」を展開した。

【００７３】

独立した方法によりα３ドメインの細菌表面ディスプレイを確認するために、インタクトな、アラビノース誘導型および非誘導型大腸菌の蛍光顕微鏡法により、誘導型培養由来のインタクトな細菌の表面にのみ、ＭＩＣＡのα３の染色を確認した。

【００７４】

２．内部標的ドメインを有する可溶性の非天然ヒトＭＩＣタンパク質の生成

ヒトＭＩＣＡは天然にグリコシル化されているが、その非グリコシル化形態は、その受容体であるＮＫＧ２Ｄにインビトロで結合する（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ，２００１）。しかしながら、インビトロで、そして最終的にはインビボでヒト様グリコシル化形態を評価できるように、我々は、培養したヒト細胞においてＭＩＣＡを発現させた。発現のために、ヒトＣＭＶプロモーターおよびウシ成長ホルモン（ｂｇｈ）ポリアデニル化シグナルを有する一過性発現ベクターｐｃＤＮＡ５／ＦＲＴに、２つの一般的なヒト対立遺伝子を挿入した（図３）。

【００７５】

機能的なプラスミド構築物

プライマーＡＶ１４６６（配列番号３０）およびＡＶ１４４８（配列番号３１）を使用して、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によりヒト脾臓一本鎖ｃＤＮＡ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎより入手可能）から適切なＤＮＡ配列を増幅することによって、成熟ＨＵＭＭＨＣＲＥＰ（ヒトＭＨＣクラスＩ関連タンパク質ｍＲＮＡ）の分泌シグナル配列およびコドン１～２７６を得た。

【００７６】

増幅ＤＮＡ産物をＮｈｅＩおよびＨｉｎｄＩＩＩ制限酵素で消化し、得られた産物をＮｈｅＩ／ＨｉｎｄＩＩＩで消化したｐＣＤＮＡ５／ＦＲＴ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に連結してｐＳＷ２６５を作製した。

【００７７】

ｐＳＷ２６５の挿入されたＰＣＲ産物のＤＮＡを配列決定し、ＮｈｅＩ部位の後にｂ５’非翻訳（ＵＴ）配列の２６塩基、その後に成熟ＨＵＭＭＨＣＲＥＰの分泌シグナル配列およびコドン１～２７６、その後に終止コドン、その後にＨｉｎｄＩＩＩ部位を含むことを確認した。コード化配列が、翻訳された場合にアミノ酸の違いを生じるように意図する配列から逸脱した場合、アミノ酸配列が、配列番号１３のように記載される配列の関連部分（アミノ酸１～２７６）と一致するように、部位特異的突然変異誘発によりコドンを変更した（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ　Ｐｈｕｓｉｏｎ（登録商標）部位特異的突然変異誘発キットおよび適切なプライマーを使用）。

【００７８】

修正されたプラスミドはｐＳＷ２７１と称され、５’ＵＴ配列の２６塩基をコードする修正されたＤＮＡ配列、その後に成熟ＨＵＭＭＨＣＲＥＰの分泌シグナル配列およびコドン１－２７６、その後に終止コドン、配列番号１４を含んでいた。

【００７９】

プライマーＡＶ１４９０（配列番号３２）およびＡＶ１４８９（配列番号３３）ならびにｐＳＷ２７１を使用してＰＣＲ産物を生成し、続いてＢａｍＨＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ｐＳＷ２７１の約５２５９ｂｐのＢａｍＨＩ／ＢｓｍＢＩ断片に連結した。その結

果得られた構築物ｐＳＷ２７５は、ＢｓｍＢＩ部位を欠損している。

【００８０】

Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ Ｐｈｕｓｉｏｎ（登録商標）の部位特異的突然変異誘発キットならびにプライマーＡＶ１４９３（配列番号３４）およびＡＶ１４９４（配列番号３５）を使用して、２つのＢｓｍＢＩ部位をｐＳＷ２７５のＭＩＣＡコード化領域に挿入してｐＳＷ２７６を作製した。

【００８１】

ＭＩＣＡコドン１２５がＡＡＧ（Ｌｙｓ）の代わりにＧＡＧ （Ｇｌｕ）であることを除いて、プラスミドｐＳＷ２６７はｐＳＷ２７１と同じである。これは、部位特異的突然変異誘発によりｐＳＷ２６５から得た（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ ＰｈｕｓｉｏｎキットをプライマーＡＶ１４７８（配列番号３９）およびＡＶ１４７９（配列番号４０とともに使用）。この突然変異誘発により、ＧＧＧ（Ｇｌｙ）～ＴＧＧ（Ｔｒｐ）のＭＩＣＡコドン１４およびＧＣＴ（Ａｌａ）～ＡＣＴ （Ｔｈｒ）のコドン２４を変更した。

【００８２】

プライマーＡＶ１４８６（配列番号４１）およびＡＶ１４８７（配列番号４２）を使用して、部位特異的突然変異誘発によりｐＳＷ２６７からプラスミドｐＳＷ２７３を作製した。ｐＳＷ２７３は、シグナルペプチドと成熟ペプチドの残基１との間に６つのヒスチジンコドンを含む。

【００８３】

部分的ｈｐｈ（ハイグロマイシン耐性）遺伝子からＢｓｍＢＩ部位が欠失されていることを除いて、プラスミドｐＫＫ３３はプラスミドｐＳＷ２７３と同一である。プライマーＡＶ１４９０（配列番号３２）および１４８９（配列番号３３）を用いて増幅することによりプラスミドｐＳＷ２７３からＰＣＲ断片を得た。この約７２７ｂｐの断片をＢａｍＨＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ｐＳＷ２７３の約５２７７ｂｐのＢａｍＨＩ／ＢｓｍＢＩ消化断片に連結した。これにより、ＢｓｍＢＩ部位が除去され、ｐＫＫ３４が作製された。

【００８４】

次に、ＭＩＣＡのα３ドメインのループ１に結合配列を挿入するためのｐＫＫ３４に由来する構築物について説明する。

【００８５】

以下のループ１の構築物は、ＭＩＣＡのＴ１８９とＶ２００との間に指定された異種ペプチド「インサート」を挿入し、位置１９０～１９９の残基を指定されたインサートで置換することによって生成した。

【００８６】

ＭＩＣＡのＴ１８９とＶ２００との間に挿入されたＳＲＧＤＨＰＲＴＱ（配列番号４３、ループ３．１と称される）をコードする配列を有するｐＫＫ３６を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８３０（上の鎖）（配列番号４４）およびＡＶ１８３１（下の鎖）（配列番号４５）をＢｓｍＢＩで消化したｐＫＫ３４に連結した。

【００８７】

ＭＩＣＡのＴ１８９とＶ２００との間に挿入されたＲＴＳＲＧＤＨＰＲＴＱ（配列番号４６、ループ３．２と称される）をコードする配列を有するｐＫＫ３７を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８３２（上の鎖）（配列番号４７）およびＡＶ１８３３（下の鎖）（配列番号４８）をＢｓｍＢＩで消化したｐＫＫ３４に連結した。

【００８８】

ＭＩＣＡのＴ１８９とＶ２００との間に挿入されたＲＶＰＲＧＤＳＤＬＴ（配列番号４９、ループ３．３と称される）をコードする配列を有するｐＫＫ３８を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８３４（上の鎖）（配列番号５０）およびＡＶ１８３５（下の鎖）（配列番号５１）をＢｓｍＢＩで消化したｐＫＫ３４に連結した。

【００８９】

ＭＩＣＡのＴ１８９とＶ２００との間に挿入されたＲＳＡＲＧＤＳＤＨＲ（配列番号５２、ループ３．４と称される）をコードする配列を有するｐＫＫ３９を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８３６（上の鎖）（配列番号５３）およびＡＶ１８３７（下の鎖）（配列番号５４）をＢｓｍＢＩで消化したｐＫＫ３４に連結した。

【００９０】

ＭＩＣＡのＴ１８９とＶ２００との間に挿入されたＶＴＲＧＤＴＦＴＱＳ（配列番号５５、ループ５．１と称される）をコードする配列を有するｐＫＫ４０を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８３８（上の鎖）（配列番号５６）およびＡＶ１８３９（下の鎖）（配列番号５７）をＢｓｍＢＩで消化したｐＫＫ３４に連結した。

【００９１】

ＭＩＣＡのＴ１８９とＶ２００との間に挿入されたＲＧＤＴＦＴＱＳ（配列番号５８、ループ５．２と称される）をコードする配列を有するｐＫＫ４１を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８４０（上の鎖）（配列番号５９）およびＡＶ１８４１（下の鎖）（配列番号６０）をＢｓｍＢＩで消化したｐＫＫ３４に連結した。

【００９２】

ＭＩＣＡのＴ１８９とＶ２００との間に挿入されたＨＬＡＲＧＤＤＬＴＹ（配列番号６１、ループ５．３と称される）をコードする配列を有するｐＫＫ４２を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８４２（上の鎖）（配列番号６２）およびＡＶ１８４３（下の鎖）（配列番号６３）をＢｓｍＢＩで消化したｐＫＫ３４に連結した。

【００９３】

ＭＩＣＡのＴ１８９とＶ２００との間に挿入されたＳＧＧＳＧＧＧＳＴＳＲＧＤＨＰＲＴＱＳＧＧＳＧＧＧ（配列番号６４、伸長ループ３．２ｓｐと称される）をコードする配列を有するｐＫＫ４４を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８５４（上の鎖）（配列番号６５）およびＡＶ１８５５（下の鎖）（配列番号６６）をＢｓｍＢＩで消化したｐＫＫ３４に連結した。

【００９４】

ＭＩＣＡのＴ１８９とＶ２００との間に挿入されたＳＧＧＳＧＧＧＳＲＶＰＲＧＤＳＤＬＴＳＧＧＳＧＧＧ（配列番号６７、伸長ループ３．３ｓｐと称される）をコードする配列を有するｐＫＫ４５を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８５６（上の鎖）（配列番号６８）およびＡＶ１８５７（下の鎖）（配列番号６９）をＢｓｍＢＩで消化したｐＫＫ３４に連結した。

【００９５】

ＭＩＣＡのＴ１８９とＶ２００との間に挿入されたＳＧＧＳＧＧＧＳＶＴＲＧＤＴＦＴＱＳＳＧＧＳＧＧＧ（配列番号７０、伸長ループ５．１ｓｐと称される）をコードする配列を有するｐＫＫ４６を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８５８（上の鎖）（配列番号７１）およびＡＶ１８５９（下の鎖）（配列番号７２）をＢｓｍＢＩで消化したｐＫＫ３４に連結した。

【００９６】

ＭＩＣＡのＴ１８９とＶ２００との間に挿入されたＳＧＧＳＧＧＧＳＨＬＡＲＧＤＤＬＴＹＳＧＧＳＧＧＧ（配列番号７３、伸長ループ５．３ｓｐと称される）をコードする配列を有するｐＫＫ４７を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８６０（上の鎖）（配列番号７４）およびＡＶ１８６１（下の鎖）（配列番号７５）をＢｓｍＢＩで消化したｐＫＫ３４に連結した。

【００９７】

次に、ループ３に結合配列を挿入するための構築物について説明する。

【００９８】

以下のループ３の構築物は、ＭＩＣＡ残基イソロイシン２４９とシステイン２５９との間に指定された異種ペプチド「インサート」を挿入し、位置２５０～２５８の残基を指定されたインサートで置換することによって生成した。

【００９９】

プラスミドｐＳＷ２７６をＢｓｍＢＩで消化し、キナーゼ化およびアニーリングしたオリゴヌクレオチドＡＶ１８２６（配列番号３６）およびＡＶ１８２７（配列番号３７）に連結してｐＫＫ３５を作製した。このプラスミドは、ＭＩＣＡ残基イソロイシン２４９とシステイン２５９との間のＳＧＧＳＧＧＧＳＨＨＨＨＨＨＨＨＨＳＧＧＳＧＧＧ（配列番号３８）をコードし、位置２５０～２５８の残基を置換する配列を含んでいた。

【０１００】

ＳＧＧＳＧＧＧＳＴＳＲＧＤＨＰＲＴＱＳＧＧＳＧＧＧ（配列番号７６、伸長ループ３．２ｓｐと称される）をコードする配列を有するｐＫＫ４８を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８６４（上の鎖）（配列番号７７）およびＡＶ１８６５（下の鎖）（配列番号７８）をＢｓｍＢＩで消化したｐＳＷ２７６に連結した。

【０１０１】

ＭＩＣＡのＩ２４９とＣ２５９との間に挿入されたＳＧＧＳＧＧＧＳＲＶＰＲＧＤＳＤＬＴＳＧＧＳＧＧＧ（配列番号７９、伸長ループ３．３ｓｐと称される）をコードする配列を有するｐＫＫ４９を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８６６（上の鎖）（配列番号８０）およびＡＶ１８６７（下の鎖）（配列番号８１）をＢｓｍＢＩで消化したｐＳＷ２７６に連結した。

【０１０２】

ＭＩＣＡのＩ２４９とＣ２５９との間に挿入されたＳＧＧＳＧＧＧＳＶＴＲＧＤＴＦＴＱＳＳＧＧＳＧＧＧ（配列番号８２、伸長ループ５．１ｓｐと称される）をコードする配列を有するｐＫＫ５０を作製するために、

【０１０３】

リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８６８（上の鎖）配列番号８３）およびＡＶ１８６９（下の鎖）（配列番号８４）をＢｓｍＢＩで消化したｐＳＷ２７６に連結した。

【０１０４】

ＭＩＣＡのＩ２４９とＣ２５９との間に挿入されたＳＧＧＳＧＧＧＳＨＬＡＲＧＤＤＬＴＹＳＧＧＳＧＧＧ（配列番号８５、伸長ループ５．３ｓｐと称される）をコードする配列を有するｐＫＫ５１を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８７０（上の鎖）（配列番号８６）およびＡＶ１８７１（下の鎖）（配列番号８７）をＢｓｍＢＩで消化したｐＳＷ２７６に挿入した。

【０１０５】

次に、「緊密な」ループ１に結合配列を挿入するための構築物について説明する。

【０１０６】

以下の「緊密な」（Ｔ）ループ１の構築物は、ＭＩＣＡのＮ１８７とＣ２０２の間に指定された異種ペプチドの「インサート」を挿入することによって生成した、すなわち、ＭＩＣＡの残基１８８～２０１を指定されたインサートで置換した。

【０１０７】

プラスミドｐＫＫ３４をプライマーＡＶ１８７３（配列番号８８）およびＡＶ１８７２（配列番号８９）で変異誘発し、ＭＩＣＡのＮ１８７とＣ２０２との間のインサートをクローン化するために好適である都合のよいＢｓｍＢＩ部位を含むｐＳＷ３２４を作製した。

【０１０８】

ＭＩＣＡのＮ１８７とＣ２０２との間に挿入されたＴＳＲＧＤＨＰＲＴＱ（配列番号９０、緊密Ｔ－３．１と称される）をコードする配列を有するｐＫＫ５２を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８７４（上の鎖）（配列番号９１）およびＡＶ１８７５（下の鎖）（配列番号９２）をＢｓｍＢＩで消化したｐＳＷ３２４に連結した。

【０１０９】

ＭＩＣＡのＮ１８７とＣ２０２との間に挿入されたＧＳＲＧＤＳＬＩＭＨ（配列番号９３、緊密Ｔ－３．５と称される）をコードする配列を有するｐＫＫ５３を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８７６（上の鎖）（配列番号９４）およびＡＶ１８７７（下の鎖）（配列番号９５）をＢｓｍＢＩで消化したｐＳＷ３２４に連結した。

【０１１０】
ＭＩＣＡのＮ１８７とＣ２０２との間に挿入されたＲＶＰＲＧＤＳＤＬＴ（配列番号９６、緊密Ｔ－３．３と称される）をコードする配列を有するｐＫＫ５４を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８７８（上の鎖）（配列番号９７）およびＡＶ１８７９（下の鎖）（配列番号９８）をＢｓｍＢＩで消化したｐＳＷ３２４に連結した。
【０１１１】
ＭＩＣＡのＮ１８７とＣ２０２との間に挿入されたＶＴＲＧＤＴＦＴＱＳ（配列番号９９、緊密Ｔ－５．１と称される）をコードする配列を有するｐＫＫ５５を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８８０（上の鎖）（配列番号１００）およびＡＶ１８８１（下の鎖）（配列番号１０１）をＢｓｍＢＩで消化したｐＳＷ３２４に連結した。
【０１１２】
ＭＩＣＡのＮ１８７とＣ２０２との間に挿入されたＨＬＡＲＧＤＤＬＴＹ（配列番号１０２、緊密Ｔ－５．３と称される）をコードする配列を有するｐＫＫ５６を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８８２（上の鎖）（配列番号１０３）およびＡＶ１８８３（下の鎖Ｘ、配列番号１０４）をＢｓｍＢＩで消化したｐＳＷ３２４に連結した。
【０１１３】
ＭＩＣＡのＮ１８７とＣ２０２との間に挿入されたＹＱＳＷＲＹＳＱ（配列番号１０５、テンダミスタット由来のループ１、緊密Ｔ－ＡＭＹと称される）をコードする配列を有するｐＫＫ８４を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１９０６（上の鎖）（配列番号１０６）およびＡＶ１９０７（下の鎖）（配列番号１０７）をＢｓｍＢＩで消化したｐＳＷ３２４に連結した。
【０１１４】
次に、同じ可溶性ＭＩＣＡ分子のループ１およびループ３の両方に結合配列を挿入するための構築物について説明する。
【０１１５】
ループ１およびループ３の両方に挿入された結合配列を有する可溶性ＭＩＣＡ分子をコードする構築物を作製するために、我々はｐＫＫ１１５を作製した。ベクターｐＫＫ１１５は、ループ１の伸長５．１ｓｐ（配列番号８２）と、他の配列をループ３にクローン化するのに好適である都合のよいＢｓｍＢＩ部位とを含む。ベクターｐＫＫ１１５は、プライマーＡＶ１４９３（配列番号１０８）およびＡＶ１４９４（配列番号１０９）を用いたｐＫＫ４６の部位特異的突然変異誘発によって作製した。
【０１１６】
ループ１の伸長５．１ｓｐと、ＭＩＣＡのＩ２４９とＣ２５９との間に挿入されたＳＧＧＳＧＧＧＳＴＳＲＧＤＨＰＲＴＱＳＧＧＳＧＧＧ（配列番号７６）、伸長ループ３．２ｓｐと称される）をコードする配列とを有するｐＫＫ１２８を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８６４（上の鎖）（配列番号７７）およびＡＶ１８６５（下の鎖）（配列番号７８）をＢｓｍＢＩで消化したｐＫＫ１１５に連結した。
【０１１７】
ループ１の伸長５．１ｓｐと、ＭＩＣＡのＩ２４９とＣ２５９との間に挿入されたＳＧＧＳＧＧＧＳＶＴＲＧＤＴＦＴＱＳＳＧＧＳＧＧＧ（配列番号８２、伸長ループ５．１ｓｐと称される）をコードする配列とを有するｐＫＫ１２９を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８６８（上の鎖Ｘ、配列番号８３）およびＡＶ１８６９（下の鎖）（配列番号８４）をＢｓｍＢＩで消化したｐＫＫ１１５に連結した。
【０１１８】
ループ１の伸長５．１ｓｐと、ＭＩＣＡのＩ２４９とＣ２５９との間に挿入されたＳＧＧＳＧＧＧＳＨＬＡＲＧＤＤＬＴＹＳＧＧＳＧＧＧ（配列番号８５、伸長ループ５．３ｓｐと称される）をコードする配列とを有するｐＫＫ１３０を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１８７０（上の鎖）（配列番号８６）およびＡＶ１８７１（下の鎖）（配列番号８７）をＢｓｍＢＩで消化したｐＫＫ１１５に連結した。

【０１１９】
ループ１の伸長５．１ｓｐと、ＭＩＣＡのＩ２４９とＣ２５９との間に挿入されたＳＧＧＳＧＧＧＳＶＴＲＧＤＴＦＴＱＳＳＧＧＳＧＧＧ（配列番号８２）、非相同伸長ループ５．１ｓｐＮＨと称される）をコードする配列とを有するｐＫＫ１３１を作製するために、リン酸化オリゴヌクレオチドＡＶ１９０８（上の鎖）（配列番号１１０）およびＡＶ１９０９（下の鎖）（配列番号１１１）をＢｓｍＢＩで消化したｐＫＫ１１５に連結した。
【０１２０】
次に、内部結合インサートを有する可溶性ＭＩＣＡ分子をコードする上述の作製した構築物の培養ヒト細胞発現と、それらの標的結合のＥＬＩＳＡに基づく分析について説明する。
【０１２１】
プラスミド構築物ｐＫＫ３５－４２、ｐＫＫ４４－５６、およびｐＫＫ１２８－１３１の場合、１０ｃｍ組織培養皿中の培養密度９０％の２９３Ｔ細胞（ＡＴＣＣ）の培養物に、Ｆｕｇｅｎｅ　ＨＤ遺伝子導入試薬（Ｒｏｃｈｅ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）を使用して、１０μｇの各プラスミドＤＮＡを遺伝子導入した。３日後、各培養物の培養培地を回収し、Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ　５８１０Ｒ卓上型遠心機にて４０００ｒｐｍで遠心分離することにより、浮遊している細胞を除去した。Ｐｉｅｒｃｅ濃縮機の７ｍｌ／９Ｋ（カタログ番号ＡＶ８９８８４Ａ）回転管を使用して、回収された約９．５ｍｌの各サンプルを濃縮した。回転機は、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で予め洗浄した。各サンプルを濃縮機に加え、次いで、Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ　５８１０Ｒ卓上型遠心機にて３０分間４０００ｒｐｍで遠心分離した。６ｍｌのＰＢＳで各サンプルを３回洗浄し、濃縮した：各回ともＥｐｐｅｎｄｏｒｆ　５８１０Ｒ卓上型遠心機にて３０分間４０００ｒｐｍ回転させた。可溶性ＭＩＣＡのためのＥＬＩＳＡによって、得られた各サンプル溶液中の可溶性ＭＩＣＡの濃度を推定した。捕捉剤は、マウス抗ヒトＭＩＣＡ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　部品番号８４１６１２）、検出抗体は、ストレプトアビジン－ＨＲＰおよびＵｌｔｒａ　ＴＭＢを用いて展開したビオチン化ヤギ抗ヒトＭＩＣＡ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　部品番号８４１６１３）であった。
【０１２２】
意図する標的タンパク質であるインテグリンαＶβ３またはαＶβ５をＥＬＩＳＡプレート上の捕捉剤として使用して、ＥＬＩＳＡより、濃縮した上清の各々において可溶性ＭＩＣＡ分子が標的分子に結合する能力を測定した。それぞれのインテグリンがＥＬＩＳＡプレートのウェルの底に接着した後、ウェルを洗浄し、本分野で周知のようにブロックした。２９３Ｔ細胞によって生成および分泌された可溶性ＭＩＣＡの各サンプル（１００μｌ）を、αＶβ３またはαＶβ５を含むウェルに加え、インキュベートし、洗浄した。Ｕｌｔｒａ　ＴＭＢ－ＥＬＩＳＡ基質を用いて展開したヒトＭＩＣＡに対するＨＲＰコンジュゲート抗体により、インテグリンによって捕捉された可溶性ＭＩＣＡ分子を検出し、光学密度を読み取った。ＭＩＣＡ特異的ＥＬＩＳＡにより、各サンプル中の可溶性ＭＩＣＡの量を決定した。結合した可溶性ＭＩＣＡ分子から特異的なインテグリンへのシグナル（全ＭＩＣＡのｎｇ当たり）が示される。非結合陰性対照ＭＩＣＡ（ｐＳＷ２７３によって生成した）からのＥＬＩＳＡシグナルを各インテグリン結合シグナルから差し引いた。対照とともに、ｐＫＫ３５～４２およびｐＫＫ４４～５６から生成された単一ペプチドインサートを有するＭＩＣＡ産物の結果を表１に示す。それらの特異的インサートのアミノ酸配列および配列番号を表２に表す。遺伝子操作によってそれらのループのうちの１つのみに挿入された結合ペプチドを有する可溶性ＭＩＣＡ分子は、インテグリン標的に結合する。
表１．可溶性ＭＩＣＡ中の単一インサートからのインテグリン結合ＥＬＩＳＡデータ

【表１】

プラスミド名称	インサートループ１	インサートループ３	MICA (pg/ウェル)	αvβ3シグナル	αvβ5シグナル	αvβ3シグナル/ng	αvβ5シグナル/ng
pKK35	野生型	His10sp	170.00	0.419	0.392	2.46	2.31
pKK36	3.1	野生型	29.00	0.550	0.526	18.97	18.14
pKK37	3.2	野生型	34.70	0.777	0.779	22.39	22.45
pKK38	3.3	野生型	9.48	0.291	0.291	30.70	30.70
pKK39	3.4	野生型	26.79	0.482	0.528	17.99	19.71
pKK40	5.1	野生型	24.87	0.485	0.675	19.50	27.14
pKK41	5.2	野生型	29.08	0.516	0.650	17.74	22.35
pKK42	5.3	野生型	24.77	0.526	0.565	21.24	22.81
pKK44	3.2sp	野生型	45.94	0.410	0.460	8.92	10.01
pKK45	3.3sp	野生型	41.32	0.393	0.410	9.51	9.92
pKK46	5.1sp	野生型	41.75	0.384	1.065	9.20	25.51
pKK47	5.3sp	野生型	29.44	0.294	0.276	9.99	9.38
pKK48	野生型	3.2sp	78.65	0.478	0.604	6.08	7.68
pKK49	野生型	3.3sp	86.75	0.508	0.478	5.86	5.51
pKK50	野生型	5.1sp	93.26	0.546	0.721	5.85	7.73
pKK51	野生型	5.3sp	96.34	0.694	1.048	7.20	10.88
pKK52	T-3.1	野生型	38.61	0.391	0.485	10.13	12.56
pKK53	T-3.5	野生型	35.16	0.659	0.800	18.74	22.75
pKK54	T-3.3	野生型	9.06	0.177	0.175	19.54	19.32
pKK55	T-5.1	野生型	33.83	0.475	0.588	14.04	17.38
pKK56	T-5.3	野生型	28.86	0.473	0.528	16.39	18.30

表２．２９３細胞において発現されたプラスミドとファージプラスミドの相関関係、それらの慣用名、ループ１、ループ３、またはループ１および３の両方に挿入されたアミノ酸配列、ならびに対応するインサートの配列番号

【表２】

プラスミド						
293 細胞	M13 ファージ	慣用名	ループ１	配列番号	ループ３	配列番号
SW273	KK106	WT	RSEASEGNIT	13（残基190～199）	CQGEEQRFT	13（残基250～258）
KK35	KK91	3-His10			SGGSGGGSHHHHHHHHHHSGGSGGG	38
KK36	KK92	1-3.1	SRGDHPRTQ	43		
KK37	KK93	1-3.2	RTSRGDHPRTQ	46		
KK38	KK94	1-3.3	RVPRGDSDLT	49		
KK39	KK95	1-3.4	RSARGDSDHR	52		
KK40	KK96	1-5.1	VTRGDTFTQS	55		
KK41	KK97	1-5.2	RGDTFTQS	58		
KK42	KK98	1-5.3	HLARGDDLTY	61		
KK44	KK100	1-3.2sp	SGGSGGGSTSRGDHPRTQSGGSGGG	64		
KK45	KK101	1-3.3sp	SGGSGGGSRVPRGDSDLTSGGSGGG	67		
KK46	KK102	1-5.1sp	SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG	70		
KK47	KK103	1-5.3sp	SGGSGGGSHLARGDDLTYSGGSGGG	73		
KK48	KK104	3-3.2sp			SGGSGGGSTSRGDHPRTQSGGSGGG	76
KK49	KK105	3-3.3sp			SGGSGGGSRVPRGDSDLTSGGSGGG	79
KK50		3-5.1sp			SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG	82
KK51		3-5.3sp			SGGSGGGSHLARGDDLTYSGGSGGG	85
KK52	KK107	1-T-3.1	TSRGDHPRTQ	90		
KK53	KK108	1-T-3.5	GSRGDSLIMH	93		
KK54	KK109	1-T-3.3	RVPRGDSDLT	96		
KK55	KK110	1-T-5.1	VTRGDTFTQS	99		
KK56	K111	1-T-5.3	HLARGDDLTY	102		
KK84	KK112	1-T-AMY	YQSWRYSQ	105		
KK128	KK136	1-5.1sp/3-3.2sp	SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG	70	SGGSGGGSTSRGDHPRTQSGGSGGG	76
KK129	KK137	1-5.1sp/3-5.1sp	SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG	70	SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG	82
KK130	KK138	1-5.1sp/3-5.3sp	SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG	70	SGGSGGGSHLARGDDLTYSGGSGGG	85
KK131	KK139	1-5.1sp/3-5.1spNH	SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG	70	SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG	82

【０１２３】

対照とともに、ｐＫＫ１２８～１３１から生成された１つより多くのループに挿入された結合ペプチドを有するＭＩＣＡの結果を表３に示す。ｐＫＫ１２８～１３１から生成された可溶性ＭＩＣＡ分子のインテグリン標的結合についてのＥＬＩＳＡアッセイを以下のように行った。それぞれのインテグリンがＥＬＩＳＡプレートのウェルの底に接着した後、ウェルを洗浄し、ブロックした。培養上清の各サンプル（１００μｌ）をαＶβ３またはαＶβ５を含むウェルに加え、インキュベートし、洗浄した。Ｕｌｔｒａ　ＴＭＢ－ＥＬＩＳＡ基質を用いて展開したヒトＭＩＣＡに対するＨＲＰコンジュゲート抗体により、インテグリンによって捕捉された可溶性ＭＩＣＡ分子を検出し、光学密度を読み取った。ＭＩＣＡ特異的ＥＬＩＳＡにより、各サンプル中の可溶性ＭＩＣＡの量を決定した。特異的インテグリンに結合した１つより多くのインサートを有する可溶性ＭＩＣＡ分子のシグナル（全ＭＩＣＡのｎｇ当たり）を表３に示す。それらの特異的インサートのアミノ酸配列および配列番号を表２に表す。１つより多くの内部ループに挿入された結合ペプチドを有するこれらの可溶性ＭＩＣＡ分子は、単一の内部結合ペプチドのみを有する分子よりも高い結合を示し、分子当たり１つより多くの結合モチーフの結合力効果が示唆された。さらに、可溶性ＭＩＣＡ分子がＭＩＣＡ分子当たり１つより多くのαＶβ５特異的な内部結合ペプチドを有する場合に、可溶性ＭＩＣＡ分子の意図する標的、例えば、αＶβ５への特異性が、密接に関連する標的であるαＶβ３よりも高かった。その標的に対する結合力を示すＭＩＣＡ分子には、そのような結合および結合特異性の増加が期待された。よって、複製結合剤および異なる結合剤の両方である二価のＭＩＣＡ結合剤を作製し、二重特異性ＭＩＣＡ分子およびその標的に対する親和性を超える結合力を有するＭＩＣＡ分子を生成することができた。

表３．可溶性ＭＩＣＡにおける２つのインサートからのインテグリン結合ＥＬＩＳＡデータ

【表３】

プラスミド名称	インサートループ1	インサートループ3	MICA (pg/ウェル)	αvβ3シグナル	αvβ5シグナル	αvβ3シグナル/ng	αvβ5シグナル/ng
pSW273	野生型	野生型	14.7	0.099	0.100	6.73	6.80
pKK46	5.1sp	野生型	49.6	0.467	0.660	9.42	13.31
pKK128	5.1sp	3.2sp	35.4	0.811	1.001	22.91	28.28
pKK129	5.1sp	5.1sp	33.9	0.787	1.008	23.22	29.73
pKK130	5.1sp	5.2sp	30.9	0.606	0.832	19.61	26.93
pKK131	5.1sp	5.1sp.nh	30.7	0.685	1.071	22.31	34.89

【０１２４】

３．Ｍ１３ファージ上のＭＩＣＡ－α３ドメインタンパク質の表示

所望の標的結合表現型を有する遺伝子操作したＭＩＣＡ分子をコードする新しい遺伝子の単離のためのシステムを開発するために、α３ドメインのアミノ酸１８１～２７６をコードするＤＮＡをコドン位置１９８でＭ１３ファージ（Ｍ１３ｍｐ１８、Ｓｍｉｔｈベクター型「３３」）のカプシド遺伝子ＩＩＩに融合し（図４）、混合された野生型（ｗｔ）およびα３－ｐＩＩＩキメラカプシドを用い、ヘルパーファージＭ１３ファージを用いずに生成した（Ｂａｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，１９９０）。大腸菌からＰＥＧ精製したファージ調製物のタンパク質染色ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析により、集団における融合タンパク質およびｗｔ　ｐＩＩＩタンパク質の両方の存在を確認した（データは示さず）。

【０１２５】

テンダミスタットは、ＭＩＣＡのα３ドメインの構造に類似した三次元構造を有する細菌タンパク質である（Ｐｆｌｕｇｒａｔｈ　ｅｔ　ａｌ．，１９８６）。ランダムペプチドをテンダミスタットに挿入し、ヒトインテグリンへの結合のためにＭ１３ファージディスプレイによって選択した（ＭｃＣｏｎｎｅｌｌ　ａｎｄ　Ｈｏｅｓｓ，１９９５；Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ，２００３）。ＥＬＩＳＡアッセイのための陽性対照として、テンダミスタットをＭ１３のｐＩＩＩに融合した。平行して、ここで、ＭＩＣＡのα３ドメインのループ１または３に挿入された同じデカペプチドのうちのいくつかが、カプシドｐＩＩＩに融合されたα３ドメインを表示するＭ１３ファージを、ＥＬＩＳＡフォーマットにおいてインテグリンに結合するように同様に誘導することができるかどうかを判定した。

【０１２６】

次に、ループ１、ループ３、またはループ１およびループ３の両方に異なる結合ペプチドを有するＭＩＣＡのα３ドメインを表示するＭ１３ファージの構築、発現、およびアッセイについて説明する。

【０１２７】

Ｍ１３ファージＭ１３ＫＥ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓから得た）を、プライマーＡＶ１８８７（配列番号１１２）およびＡＶ１８８８（配列番号１１３）を用いたＰＣＲ増幅反応における鋳型として使用した。

【０１２８】

Ｍ１３ＫＥ遺伝子ＩＩＩのＣ末端部分からなるＰＣＲ産物をＥｃｏＲＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化し、ＥｃｏＲＩ／ＨｉｎｄＩＩＩで消化したＭ１３ファージベクターＭ１３ｍｐ　１８（ＧｅｎＢａｎｋ　Ｘ０２５１３）に連結してファージベクターｐＳＷ３２６を作製した。

【０１２９】

ＥｃｏＲＩおよびＡｖｒＩＩで消化した合成配列ＴＥＮＤ（配列番号１１４）をＥｃｏＲＩ／ＡｖｒＩＩで消化したｐＳＷ３２６に挿入することにより、ファージベクターｐＫＫ５９を作製した。

【０１３０】
ＥｃｏＲＩおよびＡｖｒＩＩで消化した合成配列ＴＥＮＤ－３Ａ（配列番号　１１５）をＥｃｏＲＩ／ＡｖｒＩＩで消化したｐＳＷ３２６に挿入することにより、ファージベクターｐＫＫ６０を作製した。
【０１３１】
ＥｃｏＲＩおよびＡｖｒＩＩで消化した合成配列ＴＥＮＤ－３Ｂ（配列番号１１６）をＥｃｏＲＩ／ＡｖｒＩＩで消化したｐＳＷ３２６に挿入することにより、ファージベクターｐＫＫ６１を作製した。
【０１３２】
ＥｃｏＲＩおよびＡｖｒＩＩで消化した合成配列ＴＥＮＤ－５Ａ（配列番号１１７）をＥｃｏＲＩ／ＡｖｒＩＩで消化したｐＳＷ３２６に挿入することにより、ファージベクターｐＫＫ６３を作製した。
【０１３３】
ＥｃｏＲＩおよびＡｖｒＩＩで消化した合成配列ＴＥＮＤ－５Ｂ（配列番号１１８）をＥｃｏＲＩ／ＡｖｒＩＩで消化したｐＳＷ３２６に挿入することにより、ファージベクターｐＫＫ６４を作製した。
【０１３４】
ＥｃｏＲＩおよびＡｖｒＩＩで消化した合成配列ＴＥＮＤ－Ｈｉｓ８（配列番号１１９、Ｈｉｓ８は配列番号１３０）をＥｃｏＲＩ／ＡｖｒＩＩで消化したｐＳＷ３２６に挿入することにより、ファージベクターｐＫＫ６５を作製した。
【０１３５】
ファージベクターｐＫＫ１０６を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ２９から約３２０ｂｐの断片を増幅した。次いで、野生型ＭＩＣＡのα３配列（配列番号１～６、１３）を表すこの断片を、ＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１３６】
ファージベクターｐＫＫ９１を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ３５から約３５６ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１３７】
ファージベクターｐＫＫ９２を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ３６から約３０５ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１３８】
ファージベクターｐＫＫ９３を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ３７から約３１１の断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１３９】
ファージベクターｐＫＫ９４を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ３８から約３０８ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１４０】
ファージベクターｐＫＫ９５を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ３９から約３０８ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化

し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１４１】
ファージベクターｐＫＫ９６を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ４０から約３０８ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１４２】
ファージベクターｐＫＫ９７を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ４１から約３０２ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１４３】
ファージベクターｐＫＫ９８を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ４２から約３０８ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１４４】
ファージベクターｐＫＫ１００を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ４４から約３５３ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１４５】
ファージベクターｐＫＫ１０１を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ４５から約３５３ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１４６】
ファージベクターｐＫＫ１０２を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ４６から約３５３ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１４７】
ファージベクターｐＫＫ１０３を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ４７から約３５３ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１４８】
ファージベクターｐＫＫ１０４を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ４８から約３５６ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１４９】
ファージベクターｐＫＫ１０５を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ４９から約３５６ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１５０】
ファージベクターｐＫＫ１０７を作製するために、プライマーＫＫ６９（配列番号１２２）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ５２から約３４４ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し

、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１５１】
ファージベクターｐＫＫ１０８を作製するために、プライマーＫＫ７０（配列番号１２３）およびＡＶ１８９８配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ５３から約２８４ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１５２】
ファージベクターｐＫＫ１０９を作製するために、プライマーＫＫ７１（配列番号１２４）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ５４から約２８４ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１５３】
ファージベクターｐＫＫ１１０を作製するために、プライマーＫＫ７２（配列番号１２５）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ５５から約２８４ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１５４】
ファージベクターｐＫＫ１１１を作製するために、プライマーＫＫ７３（配列番号１２６）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ５６から約２８４ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１５５】
ファージベクターｐＫＫ１１２を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ８４から約２７８ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１５６】
ファージベクターｐＫＫ１３６を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ１２８から約４１３ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１５７】
ファージベクターｐＫＫ１３７を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ１２９から約４１３ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１５８】
ファージベクターｐＫＫ１３８を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ１３０から約４１３ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。
【０１５９】
ファージベクターｐＫＫ１３９を作製するために、プライマーＡＶ１８９７（配列番号１２０）およびＡＶ１８９８（配列番号１２１）を使用して、ＰＣＲによりｐＫＫ１３１から約４１３ｂｐの断片を増幅した。次いで、この断片をＥｃｏＲＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、ＭｆｅＩ／ＡｖｒＩＩで消化した約７９１１ｂｐのｐＫＫ５９の断片に連結した。

【０１６０】
ＮＥＢαＦ’ｔｅｔ形質転換受容性大腸菌細胞にファージベクターを独立して形質転換した。形質転換細胞によって生成されたファージを滴定し、それらの濃度を１ｍｌ当たり10^{13}に希釈して調製した。意図する標的タンパク質であるインテグリンαＶβ３またはαＶβ５をＥＬＩＳＡプレート上の捕捉剤として使用して、ＥＬＩＳＡによりファージ調製物の各々における可溶性ＭＩＣＡ分子の能力を測定した。それぞれのインテグリンがＥＬＩＳＡプレートのウェルの底に接着した後、ウェルを洗浄し、本分野で周知のようにブロックした。ファージ調製物の各サンプル（１００μｌ）を、αＶβ３またはαＶβ５を含むウェルに加え、インキュベートし、洗浄した。Ｕｌｔｒａ　ＴＭＢ－ＥＬＩＳＡ基質を用いて展開したＭ１３ファージコートに対するＨＲＰコンジュゲート抗体により、インテグリンによって捕捉されたファージを検出し、光学密度を読み取った。Ｍ１３ファージの力価は、$8X10^{12}$～$1.1X10^{13}$／ｍｌの範囲だった。ｐＫＫ９１～９８および１００～１１２から生成された単一ペプチドインサートを有するα３ドメインを表示するファージの結果を表４に示す。それらの特異的インサートのアミノ酸配列および配列番号を表２に表す。遺伝子操作によってそれらのループのうちの１つのみに挿入された結合ペプチドを有するα３ドメインを表示する、ｐＩＩＩカプシドタンパク質に融合されたファージは、インテグリン標的に結合する。

表４．ＭＩＣＡのα３－ＰＩＩＩバクテリオファージディスプレイにおける単一インサートからのインテグリン結合ＥＬＩＳＡデータ

【表４】

ファージ名称	インサートループ1	インサートループ3	αvβ3シグナル	αvβ5シグナル
pKK106	野生型	野生型	0.000	0.000
pKK91	野生型	His10sp	0.303	0.078
pKK92	3.1	野生型	0.858	1.318
pKK93	3.2	野生型	0.284	0.291
pKK94	3.3	野生型	1.066	2.841
pKK95	3.4	野生型	0.345	0.232
pKK96	5.1	野生型	1.642	2.418
pKK97	5.2	野生型	1.551	2.592
pKK98	5.3	野生型	1.217	1.480
pKK100	3.2sp	野生型	0.201	0.186
pKK101	3.3sp	野生型	1.492	1.231
pKK102	5.1sp	野生型	1.016	0.771
pKK103	5.3sp	野生型	0.688	0.491
pKK104	野生型	3.2sp	0.791	1.121
pKK105	野生型	3.3sp	1.335	1.115
pKK107	T-3.1	野生型	0.999	1.491
pKK108	T-3.5	野生型	-0.090	-0.204
pKK109	T-3.3	野生型	0.230	0.167
pKK110	T-5.1	野生型	1.492	2.556
pKK111	T-5.3	野生型	0.707	0.657
pKK112	T-AMY	野生型	0.460	0.515

【０１６１】
対照とともに、ｐＫＫ１３６、１３８、および１３９から生成された１つより多くのループに挿入された結合ペプチドを有するα３ドメインを表示するファージの結果を表５に

示す。結合ペプチドインサートが１つより多くのループに移植されたα３ドメインを表示するＭ１３ファージのインテグリン標的結合に関するＥＬＩＳＡアッセイを以下のように行った。それぞれのインテグリンがＥＬＩＳＡプレートのウェルの底に接着した後、ウェルを洗浄し、ブロックした。ファージ調製物の各サンプル（１００μｌ）をαＶβ３またはαＶβ５を含むウェルに加え、Ｕｌｔｒａ　ＴＭＢ－ＥＬＩＳＡ基質を用いて展開したＭ１３ファージコートに対するＨＲＰコンジュゲート抗体により、インテグリンによって捕捉されたファージを検出し、光学密度を読み取った。Ｍ１３ファージの力価は、８Ｘ１０^{12}～１．１Ｘ１０^{13}／ｍｌの範囲だった。ｐＫＫ１３６、１３８、および１３９から生成された１つより多くのペプチドインサートを有するα３ドメインを表示するファージ、ならびにｐＫＫ９３、１０２、もしくは１０３から生成された１つのインサートを有するか、またはインサートを含まない（ｐＫＫ１０６）α３ドメインを表示する対照の結果を示す。それらの特異的インサート（複数可）のアミノ酸配列および配列番号を表２に表す。１つより多くの内部ループに挿入された結合ペプチドを有するこれらのα３ドメインは、単一の内部結合ペプチドのみを有するドメインよりも高いファージの標的結合を伝達し、分子当たり１つより多くの結合モチーフの結合力効果が裏付けられた。さらに、α３ドメインが１つより多くのαＶβ５特異的な内部結合ペプチドを有する場合に、α３ドメインのその意図する標的、例えば、αＶβ５への特異性が、この場合も、密接に関連する標的であるαＶβ３よりも高かった（結合力効果）。

表５．ＭＩＣＡのα３－ＰＩＩＩバクテリオファージディスプレイにおける移植された２つのインサートからのインテグリン結合ＥＬＩＳＡデータ

【表５】

ファージ名称	インサートループ１	インサートループ３	αvβ3シグナル	αvβ5シグナル
pKK106	野生型	野生型	0.000	0.000
pKK93	3.2	野生型	0.616	0.774
pKK102	5.1sp	野生型	1.454	1.500
pKK103	5.3sp	野生型	0.587	0.814
pKK136	5.1sp	3.2sp	2.462	4.280
pKK138	5.1sp	5.3sp	0.886	2.748
pKK139	5.1sp	5.1sp.nh	2.481	5.355

【０１６２】

４．可溶性の標的ＭＩＣＡは、標的細胞を死滅させるためにＮＫ細胞を動員するための特異的なアダプター分子として作用した。

ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）細胞生存率アッセイを、Ｃｈｒｏｍｙ　ｅｔ　ａｌ，２０００によって本質的に記載されるように、また、製造業者のプロトコル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）従って行った。端的に述べると、９６ウェル平底培養プレートに、１ｘ１０^{4}細胞／ウェルの密度でヒト標的細胞（ＭＣＦ７およびＨｅＬａ）を播種したところ、２日で８０％の培養密度に達した。ｐＫＫ１３１を一過性に遺伝子導入した２９３Ｔ細胞の培養上清を、Ｐｉｅｒｃｅ　９Ｋ　ＭＷＣＯ　回転機により約１００倍に濃縮し、ＭＩＣＡ特異的ＥＬＩＳＡによってＭＩＣＡの濃度を決定した。可溶性の標的ＭＩＣＡ分子が標的細胞を死滅させるためにヒトＮＫ細胞を動員する能力を証明するために、標的細胞を含む異なるウェルにおいて、異なる濃度の濃縮した可溶性ＭＩＣＡタンパク質を１６時間インキュベートした。次いで、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）を用いてウェルを２回洗浄することにより、非結合タンパク質を除去した。次いで、可溶性ＭＩＣＡに暴露した標的細胞をカルセイン－ＡＭ（２μＭ）を用いて３０分間３７℃で

処理し、全ての生存細胞において緑色蛍光を得た。インキュベーション後、再びＰＢＳを用いて細胞を２回洗浄し、次いで、標的細胞に対して１０：１および５：１の比率で生存ＮＫ－９２ＭＩ細胞に暴露した。ＮＫ－９２ＭＩ細胞を標的細胞とともに４時間インキュベートし、次いで、非結合ＮＫ－９２ＭＩ細胞を除去し、ＰＢＳを用いて標的細胞を２回洗浄した。次に、３０分間３７℃でエチジウムホモ二量体（２μＭ）を加え、ＮＫ細胞死滅の程度を判定した。細胞を洗浄し、蛍光プレートリーダー（ＳｏｆｔＭａｘＰｒｏ）上で分析した。ＮＫ細胞の非存在下において、また５：１および１０：１の比率ならびに０，６４ｐｇおよび１２８ｐｇで可溶性の標的ＭＩＣＡを加えたウェルからの赤色（エチジウム）および緑色（カルセイン－ＡＭ）の蛍光シグナルの平均を使用して、生存細胞および死滅細胞を定量した。

【０１６３】

標的ＭＩＣＡの非存在下において０、５：１、１０：１の比率でＮＫ細胞を加えたところ、（死滅した）ＭＣＦ細胞からの赤色蛍光シグナルは、１２．６±１．１から１２．９±２．９、そして１２．０±１．０へと変化した。６４ｐｇの標的ＭＩＣＡの存在下において、０、５：１、１０：１の比率でＮＫ細胞を加えたところ、（死滅した）ＭＣＦ細胞からの赤色蛍光シグナルは、１９．９±２．４から２７．０±１．０、そして３１．０±１．６へと変化した。標的ＭＩＣＡを１２８ｐｇで加えた場合、５：１、１０：１の比率でＮＫ細胞を加えたところ、（死滅した）ＭＣＦ細胞からの赤色蛍光シグナルは、２５．６±２．２から４１．０±６．７へと変化した。標的ＭＩＣＡの非存在下で、０、５：１、１０：１の比率でＮＫ細胞を加えたところ、同じウェル内の生存細胞からの対応する蛍光（緑色）シグナルは、５６２１±３７２、５５３５±２０５および５７２１±３３５であった。６４ｐｇの標的ＭＩＣＡの存在下において、０、５：１、１０：１の比率でＮＫ細胞を加えたところ、生存ＭＣＦ細胞からの緑色蛍光シグナルは、５０２８±１７７から５１８１±１０２、そして３６９７±５９１へと変化した。標的ＭＩＣＡを１２８ｐｇで加えた場合、５：１、１０：１の比率でＮＫ細胞を加えたところ、生存ＭＣＦ細胞からの緑色蛍光シグナルは、３４５９±３９４から２１９１±３３１へと変化した。

【０１６４】

徐々に増加する量の標的ＭＩＣＡをウェルに加えたところ、標的インテグリンを発現しないＨｅＬａ細胞からの蛍光シグナルは、ＮＫ－９２ＭＩ細胞による死滅の増加を示唆しなかった。

【図１】

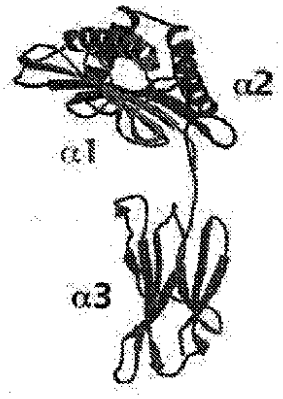


Figure 1.

【図２】

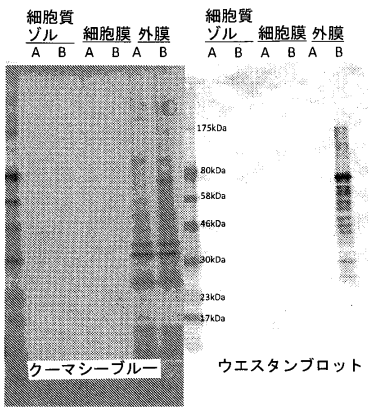


Figure 2.

【図３】



Figure 3.

【図４】

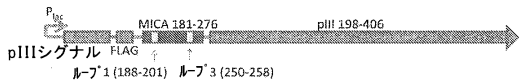


Figure 4.

【図５】

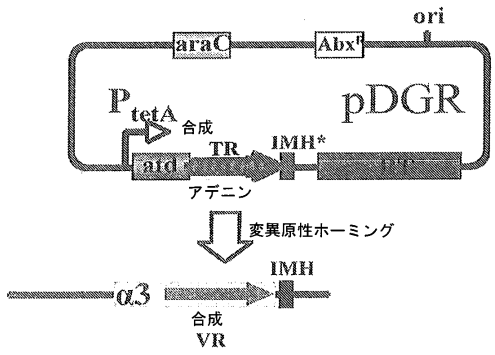


Figure 5.

【図６】

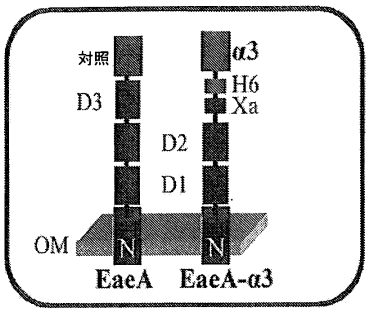


Figure 6.

【図７－１】

Figure 7.

配列番号：1 MICA
```
  1 EPHSLRYNLT VLSWDGSVQS GFLTEVHLDG QPFLRCDRQK CRAKPQGQWA EDVLGNKTWD
 61 RETRDLTGNG KDLRMTLAHI KDQKEGLHSL QEIRVCEIHE DNSTRSSQHF YYDGELFLSQ
121 NLETEEWTMP QSSRAQTLAM NVRNFLKEDA MKTKTLYHAM HADCLQELRR YLKSGVVLRR
181 TVPPMVNVTR SEASEGNITV TCRASGFYPW NITLSWRQDG VSLSHDTQQW GDVLPDGNGT
241 YQTWVATRIC QGEEQRFTCY MEHSGNHSTH PVPS
```

配列番号：2 MICA
```
  1 EPHSLRYNLT VLSWDGSVQS GFLAEVHLDG QPFLRCDRQK CRAKPQGQWA EDVLGNKTWD
 61 RETRDLTGNG KDLRMTLAHI KDQKEGLHSL QEIRVCEIHE DNSTRSSQHF YYDGELFLSQ
121 NLETEEWTMP QSSRAQTLAM NIRNFLKEDA MKTKTHYHAM HADCLQELRR YLKSGVVLRR
181 TVPPMVNVTR SEASEGNITV TCRASGFYPW NITLSWRQDG VSLSHDTQQW GDVLPDGNGT
241 YQTWVATRIC QGEEQRFTCY MEHSGNHSTH PVPS
```

配列番号：3 MICA
```
  1 EPHSLPYNLT VLSWDGSVQS GFLAEVHLDG QPFLRYDRQK CRAKPQGQWA EDVLGNKTWD
 61 RETRDLTGNG KDLRMTLAHI KDQKEGLHSL QEIRVCEIHE DNSTRSSQHF YYDGELFLSQ
121 NLETEEWTMP QSSRAQTLAM NVRNFLKEDA MKTKTHYHAM HADCLQELRR YLKSGVVLRR
181 TVPPMVNVTR SEASEGNITV TCRASGFYPW NITLSWRQDG VSLSHDTQQW GDVLPDGNGT
241 YQTWVATRIC QGEEQRFTCY MEHSGNHSTH PVPS
```

配列番号：4 MICA
```
  1 EPHSLRYNLT VLSWDGSVQS GFLAEVHLDG QPFLRYDRQK CRAKPQGQWA EDVLGNKTWD
 61 RETRDLTGNG KDLRMTLAHI KDQKEGLHSL QEIRVCEIHE DNSTRSSQHF YYDGELFLSQ
121 NLETEEWTVP QSSRAQTLAM NVRNFLKEDA MKTKTHYHAM HADCLQELRR YLESGVVLRR
181 TVPPMVNVTR SEASEGNITV TCRASGFYPR NITLTWRQDG VSLSHDTQQW GDVLPDGNGT
241 YQTWVATRIC QGEEQRFTCY MEHSGNHSTH PVPS
```

配列番号：5 MICA
```
  1 EPHSLRYNLT VLSWDGSVQS GFLTEVHLDG QPFLRCDRQK CRAKPQGQWA EDVLGNKTWD
 61 RETRDLTGNG KDLRMTLAHI KDQKEGLHSL QEIRVCEIHE DNSTRSSQHF YYDGELFLSQ
121 NLETEEWTMP QSSRAQTLAM NVRNFLKEDA MKTKTHYHAM HADCLQELRR YLKSGVVLRR
181 TVPPMVNVTR SEASEGNITV TCRASGFYPW NITLSWRQDG VSLSHDTQQW GDVLPDGNGT
241 YQTWVATRIC QGEEQRFTCY MEHSGNHSTH PVPS
```

配列番号：6 MICA
```
  1 EPHSLRYNLT VLSWDGSVQS GFLAEVHLDG QPFLRCDRQK CRAKPQGQWA EDVLGNKTWD
 61 RETRDLTGNG KDLRMTLAHI KDQKEGLHSL QEIRVCEIHE DNSTRSSQHF YYDGELFLSQ
121 NLETEEWTMP QSSRAQTLAM NVRNFLKEDA MKTKTHYHAM HADCLQELRR YLKSGVVLRR
181 TVPPMVNVTR SEASEGNITV TCRASGFYPW NITLSWRQDG VSLSHDTQQW GDVLPDGNGT
241 YQTWVATRIC QGEEQRFTCY MEHSGNHSTH PVPS
```

配列番号：7 MICB
```
  1 PHSLRYNLMV LSQDGSVQSG FLAEGHLDGQ PFLRYDRQKR RAKPQGQWAE DVLGAKTWDT
 61 ETEDLTENGQ DLRRTLTHIK DQKGGLHSLQ EIRVCEIHED SSTRGSRHFY YDGELFLSQN
121 LETQESTVPQ SSRAQTLAMN VTNFWKEDAM KTKTHYRAMQ ADCLQKLQLP PMVNVICSEV
181 SEGNITVTCR ASSFYPRNIT LTWRQDGVSL SHNTQQWGDV LPDGNGIYQT WVATRIRQGE
241 EQRFTCYMEH SGNHGTHPVP SGKALVLQSQ RTDFPYVSAA MPCFVIIIIL CVPCCKKKTS
301 AAEGP
```

【図７－２】

配列番号：8 MICB
```
  1 PHSLRYNLMV LSQDGSVQSG FLAEGHLDGQ PFLRYDRQKR RAKPQGQWAE DVLGAETWDT
 61 ETEDLTENGQ DLRRTLTHIK DQKGGLHSLQ EIRVCEMHED SSTRGSRHFY YNGELFLSQN
121 LETQESTVPQ SSRAQTLAMN VTNFWKEDAM KTKTHYRAMQ ADCLQKLQRY LKSGVAIRRT
181 VPPMVNVTCS EVSEGNITVT CRASSFYPRN ITLTWRQDGV SLSHNTQQWG DVLPDGNGTY
241 QTWVATRIRQ GEEQRFTCYM EHSGNHGTHP VPSGKALVLQ SQRTDFPYVS AAMPCFVIII
301 ILCVPCCKKK TSAAEGP
```

配列番号：9 MICB
```
  1 PHSLRYNLMV LSQDGSVQSG FLAEGHLDGQ PFLRYDRQKR RAKPQGQWAE DVLGAKTWDT
 61 ETEDLTENGQ DLRRTLTHIK DQKGGLHSLQ EIRVCEIHED SSTRGSRHFY YDGELFLSQN
121 LETQESTVPQ SSRAQTLAMN VTNFWKEDAM KTKTHYRAMQ ADCLQKLQRY LKSGVAIRRT
181 VPPMVNVTCS EVSEGNITVT CRASSFYPRN ITLTWRQDGV SLSHNTQQWG DVLPDGNGTY
241 QTWVATRIRQ GEEQRFTCYM EHSGNHGTHP VPSGKALVLQ SQRTDFPYVS AAMPCFVIII
301 ILCVPCCKKK TSAAEGP
```

配列番号：10 MICB
```
  1 PHSLRYNLMV LSQDGSVQSG FLAEGHLDGQ PFLRYDRQKR RAKPQGQWAE NVLGAKTWDT
 61 ETEDLTENGQ DLRRTLTHIK DQKGGLHSLQ EIRVCEIHED SSTRGSRHFY YDGELFLSQN
121 LETQESTVPQ SSRAQTLAMN VTNFWKEDAM KTKTHYRAMQ ADCLQKLQRY LKSGVAIRRT
181 VPPMVNVTCS EVSEGNITVT CRASSFYPRN ITLTWRQDGV SLSHNTQQWG DVLPDGNGTY
241 QTWVATRIRQ GEEQRFTCYM EHSGNHGTHP VPSGKALVLQ SQRTDFPYVS AAMPCFVIII
301 ILCVPCCKKK TSAAEGP
```

配列番号：11 MICB
```
  1 PHSLRYNLMV LSQDGSVQSG FLAEGHLDGQ PFLRYDRQKR RAKPQGQWAE DVLGAETWDT
 61 ETEDLTENGQ DLRRTLTHIK DQKGGLHSLQ EIRVCEIHED SSTRGSRHFY YNGELFLSQN
121 LETQESTVPQ SSRAQTLAMN VTNFWKEDAM KTKTHYRAMQ ADCLQKLQRY LKSGVAIRRT
181 VPPMVNVTCS EVSEGNITVT CRASSFYPRN ITLTWRQDGV SLSHNTQQWG DVLPDGNGTY
241 QTWVATRIRQ GEEQKFTCYM EHSGNHGTHP VPSGKALVLQ SQRTDFPYVS AAMPCFVIII
301 ILCVPCCKKK TSAAEGP
```

配列番号：12 MICB
```
  1 PHSLRYNLMV LSQDGSVQSG FLAEGHLDGQ PFLRYDRQKR RAKPQGQWAE DVLGAETWDT
 61 ETEDLTENGQ DLRRTLTHIK DQKGGLHSLQ EIRVCEIHED SSTRGSRHFY YNGELFLSQN
121 LETQESTVPQ SSRAQTLAMN VTNFWKEDAM KTKTHYRAMQ ADCLQKLQRY LKSGVAIRRT
181 VPPMVNVTCS EVSEGNITVT CRASSFYPRN ITLTWRQDGV SLSHNTQQWG DVLPDGNGTY
241 QTWVATRIRQ GEEQRFTCYM EHSGNHGTHP VPSGKALVLQ SQRTDFPYVS AAMPCFVIII
301 ILCVPCCKKK TSAAEGP
```

配列番号：13 MICA
```
EPHSLRYNLT VLSWDGSVQS GFLTEVHLDG QPFLRCDRQK CRAKPQGQWA EDVLGNKTWD
RETRDLTGNG KDLRMTLAHI KDQKEGLHSL QEIRVCEIHE DNSTRSSQHF YYDGELFLSQ
NLETKEWTMP QSSRAQTLAM NVRNFLKEDA MKTKTHYHAM HADCLQELRR YLKSGVVLRR
TVPPMVNVTR SEASEGNITV TCRASGFYPW NITLSWRQDG VSLSHDTQQW GDVLPDGNGI
YQTWVATRIC QGEEQRFTCY MEHSGNHSTH PVPSGK
```

【図７－３】

配列番号：14 配列番号13 MICAのDNA
```
GCTAGCGCTG AGAGGGTGGC GACGTCGGGG CCATGGGGCT GGGCCCGGTC TTCCTGCTTC
TGGCTGGCAT CTTCCCTTTT GCACCTCCGG GAGCTGCTGC TGAGCCCCAC AGTCTTCGTT
ATAACCTCAC GGTGCTGTCC TGGGATGGAT CTGTGCAGTC AGGGTTTCTC ACTGAGGTAC
ATCTGGATGG TCAGCCCTTC CTGCGCTGTG ACAGGCAGAA ATGCAGGGCA AAGCCCCAGG
GACAGTGGGC AGAAGATGTC CTGGGAAATA AGACATGGGA CAGAGAGACC AGGGACTTGA
CAGGGAACGG AAAGGACCTC AGGATGACCC TGGCTCATAT CAAGGACCAG AAAGAAGGCT
TGCATTCCCT CCAGGAGATT AGGGTCTGTG AGATCCATGA AGACAACAGC ACCAGGAGCT
CCCAGCATTT CTACTACGAT GGGGAGCTCT TCCTCTCCCA AACCTGGAGA CTAAGGAATG
GACAATGCCC CAGTCCTCCA GAGCTCAGAC CTTGGCCATG AACGTCAGGA ATTTCTTGAA
GGAAGATGCC ATGAAGACCA AGACACACTA TCACGCTATG CATGCAGACT GCCTGCAGGA
ACTACGGCGA TATCTAAAAT CCGGCGTAGT CCTGAGGAGA ACAGTGCCCC CCATGGTGAA
TGTCACCCGC AGCGAGGCCT CAGAGGGCAA CATTACCGTG ACATGCAGGG CTTCTGGCTT
CTATCCCTGG AATATCACAC TGAGCTGGCG TCAGGATGGG GTATCTTTGA GCCACGACAC
CCAGCAGTGG GGGGATGTCC TGCCTGATGG GAATGGAACC TACCAGACCT GGGTGGCCAC
CAGGATTTGC CAAGGAGAGG AGCAGAGGTT CACCTGCTAC ATGGAACACA GCGGGAATCA
CAGCACTCAC CCTGTGCCCT CTGGGAAATA AAAGCTT
```

配列番号：15 AV1401 5′-
TATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCCAGCC-3′

配列番号：16 AV1402 5′-
CATGGGCTGGGCAGCGAGGAGCAGCAGACCAGCAGCAGCGGTCGGCAGCAGGTATTTCA-3′

配列番号：17 AV1445 5′-
CATGCATCATCACCATCACCACCTCGAGGAATTCAAGCTTGGATCCGC-3′

配列番号：18 AV1446 5′-
TCAGCGGATCCAAGCTTGAATTCCTCGAGGTGGTGATGGTGATGATG-3′

配列番号：19 AV1466 5′-
TTTTTTGCTAGCGCTGAGAGGGTGGCGACGTC-3′

配列番号：20 AV1448 5′-
CTTTCCAAGCTTTTATTTCCCAGAGGGCACAGGGTG-3′

配列番号：21 AV1447 5′-
TCCCTCCTCGAGGAAAACTTGTACTTTCAAGGCGAGCCCCACAGTCTTCGTTATAACC-3′

配列番号：22 AV1408 5′-
CCCCCCGGATCCATGATTACTCATGGTTGTTATACCCG-3′

配列番号：23 AV1409 5′-
CCCCCCAAGCTTATTCTACACAAACCGCATAGAC-3′

配列番号：24 AV1602 5′-
TTTTTTCTCGAGGTGGTGATGGTGATGATGTCGGCCTTCAATACCGCCGCTGGCCTTGGTTTGATC-3′

配列番号：25 AV1603 5′-
CCCCCCCATATGATTACTCATGGTTGTTATACCCGG-3′

配列番号：26 KK43 5′-
AAAAAACTCGAGGAAAACTTGTACTTTCAAGGCACAGTGCCACCCATGGTGAATGTCACCCGCAG-3′

【図７－４】

配列番号：27 KK44 5′-
ATATATAAGCTTTTATTTCCCAGAGGGCAC-3′

配列番号：28 KK52 5′-
TTTTTTCGTCTCTCATGATTACTCATGGT-3′

配列番号：29 KK45 5′-
ATATACATACAGTCGACCAGGTTGGGGGCGGTATTGAAGGCCGACATC-3′

配列番号：30 AV1466 5′-
TTTTTTGCTAGCGCTGAGAGGGTGGCGACGTC-3′

配列番号：31 AV1448 5′-
CTTTCCAAGCTTTTATTTCCCAGAGGGCACAGGGTG-3′

配列番号：32 AV1490 5′-
AATCACAGCACTCACCCTGTGCCC-3′

配列番号：33 AV1489 5′-
TCCCTTCGTCTCTGGTCGGATACGCTGTCGAACTTTTCGATC-3′

配列番号：34 AV1493 5′-
P-GAATCCTGGTGGCCACCCAGGTCTGG-3′

配列番号：35 AV1494 5′-
P-GAGACGACAAACGTCTCTTGCTACATGGAACACAGCGGGAATC-3′

配列番号：36 AV1826
5′-
GATTAGTGGTGGCAGTGGCGGCGGTAGTCATCATCACCACCATCACCACCATCACCACAGCGGCGGCAGCG
GTGGCGGT-3′

配列番号：37 AV1827 5′-
AGCAACCGCCACCGCTGCCGCCGCTGTGGTGATGGTGGTGATGGTGGTGATGATGACTACCGCCGCCACTG
CCACCACT-3′

配列番号：38 pKK35
SGGSGGGSHHHHHHHHHSGGSGGG

配列番号：39 AV1478
5′-P-AGTCAGGGTTTCTCACTGAGGTACATCTGG-3′

配列番号：40 AV1479
5′-P-GCACAGATCCATCCCAGGACAGCACCGTGAG-3

配列番号：41 AV1486
5′-P-CATCATCATGAGCCCCACAGTCTTCGTTATAACC-3′

配列番号：42 AV1487
5′-P-GTGGTGGTGAGCAGCAGCTCCCGGAGGTGCAAAAGGG-3′

配列番号：43 pKK36
SRGDHPRTQ

【図７－５】

配列番号：44 AV1830
5′- CACCTCTCGGGGCGATCACCCTCGCACCCAG-3′

配列番号：45 AV1831
5′- TCACCTGGGTGCGAGGGTGATCGCCCCGAGA-3′

配列番号：46 pKK37
RTSRGDHPRTQ

配列番号：47 AV1832
5′-CACCAGGACATCTCGGGGCGATCACCCTCGCACCCAG-3′

配列番号：48 AV1833
5′-TCACCTGGGTGCGAGGGTGATCGCCCCGAGATGTCCT-3′

配列番号：49 pKK38
RVPRGDSDLT

配列番号：50 AV1834
5′-CACCAGGGTGCCTCGGGGCGATAGCGATCTGACC-3′

配列番号：51 AV1835
5′- TCACGGTCAGATCGCTATCGCCCCGAGGCACCCT-3′

配列番号：52 pKK39
RSARGDSDHR

配列番号：53 AV1836
5′-CACCAGGAGCGCCCGGGGCGATAGCGATCACCGG-3′

配列番号：54 AV1837
5′- TCACCCGGTGATCGCTATCGCCCCGGGCGCTCCT-3′

配列番号：55 pKK40
VTRGDTFTQS

配列番号：56 AV1838
5′- CACCGTGACACGGGGCGATACTTTCACACAGTCC-3′

配列番号：57 AV1839
5′- TCACGGACTGTGTGAAAGTATCGCCCCGTGTCAC-3′

配列番号：58 pKK41
RGDTFTQS

配列番号：59 AV1840
5′- CACCCGGGGCGATACTTTCACACAGTCC-3′

配列番号：60 AV1841
5′- TCACGGACTGTGTGAAAGTATCGCCCCG-3′

配列番号：61 pKK42
HLARGDDLTY

【図７－６】

配列番号：62 AV1842
5′- CACCCACCTGGCACGGGGCGATGACCTGACATAC-3′

配列番号：63 AV1843
5′- TCACGTATGTCAGGTCATCGCCCCGTGCCAGGTG-3′

配列番号：64 pKK44
SGGSGGGSTSRGDHPRTQSGGSGGG

配列番号：65 AV1854
5′-CACCAGTGGTGGCAGTGGCGGCGGTAGTACATCTCGGGGCGATCACC
CTCGCACCCAGAGCGGCGGCAGCGGTGGCGGT-3′

配列番号：66 AV1855
5′TCACACCGCCACCGCTGCCGCCGCTCTGGGTGCGAGGGTGATCGCCCCGA
GATGTACTACCGCCGCCACTGCCACCACT-3′

配列番号：67 pKK45
SGGSGGGSRVPRGDSDLTSGGSGGG

配列番号：68 AV1856
5′-
CACCAGTGGTGGCAGTGGCGGCGGTAGTAGGGTGCCTCGGGGCGATAGCGATCTGACCAGCGGCGGCAGCG
GTGGCGGT-3′

配列番号：69 AV1857
5′-
TCACACCGCCACCGCTGCCGCCGCTGGTCAGATCGCTATCGCCCCGAGGCACCCTACTACCGCCGCCACTG
CCACCACT-3′

配列番号：70 pKK46
SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG

配列番号：71 AV1858
5′-
CACCAGTGGTGGCAGTGGCGGCGGTAGTGTGACACGGGGCGATACTTTCACACAGTCCAGCGGCGGCAGCG
GTGGCGGT-3′

配列番号：72 AV1859
5′-
TCACACCGCCACCGCTGCCGCCGCTGGACTGTGTGAAAGTATCGCCCCGTGTCACACTACCGCCGCCACTG
CCACCACT-3′

配列番号：73 pKK47
SGGSGGGSHLARGDDLTYSGGSGGG

配列番号：74 AV1860
5′-
CACCAGTGGTGGCAGTGGCGGCGGTAGTCACCTGGCACGGGGCGATGACCTGACATACAGCGGCGGCAGCG
GTGGCGGT-3′

配列番号：75 AV1861
5′-
TCACACCGCCACCGCTGCCGCCGCTGTATGTCAGGTCATCGCCCCGTGCCAGGTGACTACCGCCGCCACTG
CCACCACT-3′

【図７－７】

配列番号：76 pKK48 pKK128
SGGSGGGSTSRGDHPRTQSGGSGGG

配列番号：77 AV1864
5′-
GATTAGTGGTGGCAGTGGCGGCGGTAGTACATCTCGGGGCGATCACCCTCGCACCCAGAGCGGCGGCAGCG
GTGGCGGT-3′

配列番号：78 AV1865
5′-
AGCAACCGCCACCGCTGCCGCCGCTCTGGGTGCGAGGGTGATCGCCCCGAGATGTACTACCGCCGCCACTG
CCACCACT-3′

配列番号：79 pKK49
SGGSGGGSRVPRGDSDLTSGGSGGG

配列番号：80 AV1866
5′-
GATTAGTGGTGGCAGTGGCGGCGGTAGTAGGGTGCCTCGGGGCGATAGCGATCTGACCAGCGGCGGCAGCG
GTGGCGGT-3′

配列番号：81 AV1867
5′-
AGCAACCGCCACCGCTGCCGCCGCTGGTCAGATCGCTATCGCCCCGAGGCACCCTACTACCGCCGCCACTG
CCACCACT-3′

配列番号：82 pKK50 pKK129 pKK131
SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG

配列番号：83 AV1868
5′-
GATTAGTGGTGGCAGTGGCGGCGGTAGTGTGACACGGGGCGATACTTTCACACAGTCCAGCGGCGGCAGCG
GTGGCGGT-3′

配列番号：84 AV1869
5′-
AGCAACCGCCACCGCTGCCGCCGCTGGACTGTGTGAAAGTATCGCCCCGTGTCACACTACCGCCGCCACTG
CCACCACT-3′

配列番号：85 pKK51 pKK130
SGGSGGGSHLARGDDLTYSGGSGGG

配列番号：86 AV1870
5′-
GATTAGTGGTGGCAGTGGCGGCGGTAGTCACCTGGCACGGGGCGATGACCTGACATACAGCGGCGGCAGCG
GTGGCGGT-3′

配列番号：87 AV1871
5′-
AGCAACCGCCACCGCTGCCGCCGCTGTATGTCAGGTCATCGCCCCGTGCCAGGTGACTACCGCCGCCACTG
CCACCACT-3′

配列番号：88 AV1873
5′-P- TTAATTAACGTCTCATGCAGGGCTTCTGGCTTCTATCCCTG-3′

【図７－８】

配列番号：89 AV1872
5′-P- ACGTCTCGATTCACCATGGGGGGCACTGTTCTCCTC-3′

配列番号：90 pKK52
TSRGDHPRTQ

配列番号：91 AV1874
5′- GAATACAAGCCGAGGTGACCACCCACGTACACAA-3′

配列番号：92 AV1875
5′- TGCATTGTGTACGTGGGTGGTCACCTCGGCTTGT-3′

配列番号：93 pKK53
GSRGDSLIMH

配列番号：94 AV1876
5′- GAATGGTTCACGAGGTGACTCATTGATTATGCAC-3′

配列番号：95 AV1877
5′- TGCAGTGCATAATCAATGAGTCACCTCGTGAACC-3′

配列番号：96 pKK54
RVPRGDSDLT

配列番号：97 AV1878
5′- GAATCGAGTACCACGAGGTGACTCAGATTTGACT-3′

配列番号：98 AV1879
5′- TGCAAGTCAAATCTGAGTCACCTCGTGGTACTCG-3′

配列番号：99 pKK55
VTRGDTFTQS

配列番号：100 AV1880
5′- GAATGTAACACGAGGTGACACATTCACTCAGAGC-3′

配列番号：101 AV1881
5′- TGCAGCTCTGAGTGAATGTGTCACCTCGTGTTAC-3′

配列番号：102 pKK56
HLARGDDLTY

配列番号：103 AV1882
5′- GAATCACTTGGCACGAGGTGACGATCTCACATAC-3′

配列番号：104 AV1883
5′- TGCAGTATGTGAGATCGTCACCTCGTGCCAAGTG-3′

配列番号：105 pKK84
YQSWRYSQ

配列番号：106 AV1906
5′- GAATTACCAGTCTTGGCGTTACTCTCAG-3′

【図７－９】

配列番号：107 AV1907
5′- TGCACTGAGAGTAACGCCAAGACTGGTA-3′

配列番号：108 AV1493
5′-P-GAATCCTGGTGGCCACCCAGGTCTGG-3′

配列番号：109 AV1494
5′-P-GAGACGACAAACGTCTCTTGCTACATGGAACACAGCGGGAATC-3′

配列番号：110 AV1908
5′-
GATTTCCGGAGGTTCTGGAGGTGGCTCGGTAACCCGAGGAGACACCTTTACCCAAAGTTCAGGAGGTTCAG
GAGGTGGA-3′

配列番号：111 AV1909
5′-
AGCATCCACCTCCTGAACCTCCTGAACTTTGGGTAAAGGTGTCTCCTCGGGTTACCGAGCCACCTCCAGAA
CCTCCGGA-3′

配列番号：112 AV1887
5′-CCTCCGAATTCGGATCCTAGGCGGCTCCTTATTTGTTTGTGAATATCAAGGCC-3′

配列番号：113 AV1888
5′-CCCTCCAAGCTTAAGACTCCTTATTACGCAGTATG-3′

配列番号：114 TEND
GAATTCATGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTGGTACCTTTCTATTCTCACTCGGACTACAAGGA
TGACGACGATAAGCAATTGGAACCAGCGCCATCTTGCGTTACCCTGTACCAGTCTTGGCGTTACTCTCAGG
CTGACAACGGTTGCGCAGAAACGGTTACCGTAAAAGTGGTATACGAAGACGACACCGAGGGCCTGTGCTAC
GCAGTTGCCCCGGGTCAGATCACCACTGTTGGTGACGGCTACATCGGCTCTCACGGTCACGCTCGGTATCT
GGCTCGTTGCCTAGG

配列番号：115 TEND-3A
GAATTCATGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTGGTACCTTTCTATTCTCACTCGGACTACAAGGA
TGACGACGATAAGCAATTGGAACCAGCGCCATCTTGCGTTACCCTGACATCACGAGGCGACCACCCACGCA
CCCAGGCTGACAACGGTTGCGCAGAAACGGTTACCGTAAAAGTGGTATACGAAGACGACACCGAGGGCCTG
TGCTACGCAGTTGCCCCGGGTCAGATCACCACTGTTGGTGACGGCTACATCGGCTCTCACGGTCACGCTCG
GTATCTGGCTCGTTGCCTAGG

配列番号：116 TEND-3B
GAATTCATGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTGGTACCTTTCTATTCTCACTCGGACTACAAGGA
TGACGACGATAAGCAATTGGAACCAGCGCCATCTTGCGTTACCCTGGGCTCACGAGGCGACTCCCTCATCA
TGCACGCTGACAACGGTTGCGCAGAAACGGTTACCGTAAAAGTGGTATACGAAGACGACACCGAGGGCCTG
TGCTACGCAGTTGCCCCGGGTCAGATCACCACTGTTGGTGACGGCTACATCGGCTCTCACGGTCACGCTCG
GTATCTGGCTCGTTGCCTAGG

配列番号：117 TEND-5A
GAATTCATGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTGGTACCTTTCTATTCTCACTCGGACTACAAGGA
TGACGACGATAAGCAATTGGAACCAGCGCCATCTTGCGTTACCCTGGTAACACGAGGCGACACCTTCACGC
AGTCCGCTGACAACGGTTGCGCAGAAACGGTTACCGTAAAAGTGGTATACGAAGACGACACCGAGGGCCTG
TGCTACGCAGTTGCCCCGGGTCAGATCACCACTGTTGGTGACGGCTACATCGGCTCTCACGGTCACGCTCG
GTATCTGGCTCGTTGCCTAGG

【図７－１０】

配列番号：118 TEND-5B
GAATTCATGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTGGTACCTTTCTATTCTCACTCGGACTACAAGGA
TGACGACGATAAGCAATTGGAACCAGCGCCATCTTGCGTTACCCTGCACCTGGCACGAGGCGACGATCTTA
CCTACGCTGACAACGGTTGCGCAGAAACGGTTACCGTAAAAGTGGTATACGAAGACGACACCGAGGGCCTG
TGCTACGCAGTTGCCCCGGGTCAGATCACCACTGTTGGTGACGGCTACATCGGCTCTCACGGTCACGCTCG
GTATCTGGCTCGTTGCCTAGG

配列番号：119 TEND-HIS8
GAATTCATGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTGGTACCTTTCTATTCTCACTCGGACTACAAGGA
TGACGACGATAAGCAATTGGAACCAGCGCCATCTTGCGTTACCCTGCACCACCACCATCACCATCATCATT
CACAAGCTGACAACGGTTGCGCAGAAACGGTTACCGTAAAAGTGGTATACGAAGACGACACCGAGGGCCTG
TGCTACGCAGTTGCCCCGGGTCAGATCACCACTGTTGGTGACGGCTACATCGGCTCTCACGGTCACGCTCG
GTATCTGGCTCGTTGCCTAGG

配列番号：120 AV1897
5′-CTTCCCGAATTCATGACAGTGCCACCCATGGTGAATGTCAC-3′

配列番号：121 AV1898
5′-TTTCTTCGTCTCACTAGTTTCCCAGAGGGCACAGGGTGAGTG-3′

配列番号：122 KK69
5′-CTTCCCGAATTCATGACAGTGCCCCCCATGGTGAATACAAG-3′

配列番号：123 KK70
5′-CTTCCCGAATTCATGACAGTGCCCCCCATGGTGAATGGTTCA-3′

配列番号：124 KK71
5′-CTTCCCGAATTCATGACAGTGCCCCCCATGGTGAATCGAGTA-3′

配列番号：125 KK72 =
5′- CTTCCCGAATTCATGACAGTGCCCCCCATGGTGAATGTAACA-3′

配列番号：126 KK73
5′-CTTCCCGAATTCATGACAGTGCCCCCCATGGTGAATCACTTG-3′

【配列表】
0006018079000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
Ｃ４０Ｂ 40/10 (2006.01) Ｃ４０Ｂ 40/10

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
(74)代理人 100182730
弁理士 大島 浩明
(72)発明者 デイビッド ダブリュ．マーティン
アメリカ合衆国，カリフォルニア ９４９４１，ミル バレー，マギー アベニュ ３４８
(72)発明者 スティーブン アール．ウィリアムズ
アメリカ合衆国，カリフォルニア ９４１１４，サンフランシスコ，マーケット ストリート ３０９４

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 米国特許出願公開第２０１１／０１８３８９３（ＵＳ，Ａ１）
Immunity, １９９９年, Vol.10, p.577-584
Targeted soluble MICA molecules to recruit innate immunity cells to kill specific, SBIR, [online],掲載日不明, [retrived on 2015-07-09].Retrived from the Internet:<https://www.sbir.gov/sbirsearch/detail/2301>.
nature immunology, ２００１年, Vol.2,No.5, p.443-451

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
Ｃ０７Ｋ
ＣＡｐｌｕｓ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）