

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2004/062693

発行日 平成18年5月18日(2006.5.18)

(43) 国際公開日 平成16年7月29日(2004.7.29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 D	4 H O 4 5
<b>C O 7 K 14/605 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/605	
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2004-566302 (P2004-566302)	(71) 出願人	802000019 株式会社新潟ティーエルオー 新潟県新潟市五十嵐2の町8050番地
(21) 国際出願番号	PCT/JP2003/016956	(74) 代理人	100088546 弁理士 谷川 英次郎
(22) 国際出願日	平成15年12月26日(2003.12.26)	(72) 発明者	埴 晴雄 新潟県新潟市西大畑町5214番地 西大 畑職員宿舎RA205号
(31) 優先権主張番号	特願2003-3967 (P2003-3967)	Fターム(参考)	4B024 AA01 AA11 CA02 EA04 HA17 4C084 AA13 BA44 DA01 DA12 DA21 DA45 DA46 DB52 NA20 4H045 AA30 BA17 BA18 CA40 EA34 EA50
(32) 優先日	平成15年1月10日(2003.1.10)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子治療用ベクター及び該遺伝子治療用ベクターを投与された哺乳動物中又は培養細胞中の目的タンパク質の定量方法

## (57) 【要約】

遺伝子治療を行った際の目的タンパク質の血中濃度をより高感度にモニターでき、かつ、標識ペプチドが生理作用を持たずに多くの動物で免疫原性がない、遺伝子治療用ベクターが開示されている。遺伝子治療用ベクターは、哺乳類細胞用発現ベクターに、グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチド領域と、体内で生産させるべき目的タンパク質領域との融合タンパク質をコードする核酸を組み込んだ構造を持つ。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

哺乳類細胞用発現ベクターに、グルカゴンのC端側19 - 29アミノ酸ペプチド領域と、体内で生産させるべき目的タンパク質領域との融合タンパク質をコードする核酸を組み込んだ構造を持ち、哺乳類細胞内で前記融合タンパク質を生産させることができる遺伝子治療用ベクター。

**【請求項 2】**

前記グルカゴンのC端側19 - 29アミノ酸ペプチド領域は、前記目的タンパク質領域のC末端に結合される請求項1記載のベクター。

**【請求項 3】**

前記目的タンパク質が、サイトカイン若しくはサイトカインに免疫グロブリンの定常領域を付加した融合タンパク質、成長因子、ホルモン若しくは細胞接着因子又はこれらのレセプターである請求項1又は2記載のベクター。

**【請求項 4】**

前記サイトカイン又はそのレセプターが、インターフェロン及びそのレセプター、CTL A 4、インターロイキン及びそのレセプターから成る群から選ばれる請求項3記載のベクター。

**【請求項 5】**

請求項1ないし4のいずれか1項に記載の遺伝子治療用ベクターの有効量を、前記目的タンパク質の体内又は培養哺乳動物細胞内発現が望まれる哺乳動物又は培養哺乳動物細胞に投与することを含む、遺伝子治療方法。

**【請求項 6】**

前記遺伝子治療用ベクターを、哺乳動物に投与する請求項5記載の方法。

**【請求項 7】**

請求項1ないし4のいずれか1項に記載の遺伝子治療用ベクターの、遺伝子治療用薬剤の製造のための使用。

**【請求項 8】**

請求項1ないし4のいずれか1項に記載の遺伝子治療用ベクターを投与された哺乳動物又は培養哺乳動物細胞から採取された被検試料中の、グルカゴンのC端側19 - 29アミノ酸ペプチド領域を免疫測定することを含む、前記遺伝子治療用ベクターの発現により体内又は培養細胞内で生産された前記目的タンパク質の定量方法。

**【請求項 9】**

前記被検試料が、前記遺伝子治療用ベクターを投与された哺乳動物から採取されたものである請求項8記載の方法。

**【請求項 10】**

前記被検試料が、血液試料である請求項9記載の方法。

**【請求項 11】**

グルカゴンのC端側19 - 29アミノ酸ペプチドから成る、哺乳動物体内又は培養哺乳動物細胞において、外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質の標識剤。

**【請求項 12】**

グルカゴンのC端側19 - 29アミノ酸ペプチドから成る、哺乳動物体内において、外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質の標識剤。

**【請求項 13】**

哺乳動物体内又は培養哺乳動物細胞内において、外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質を、標識剤としてのグルカゴンのC端側19 - 29アミノ酸ペプチドとの融合タンパク質として発現させることにより、体内又は培養細胞内で生産される目的ペプチドを、グルカゴンのC端側19 - 29アミノ酸ペプチドで標識することを含む、体内又は培養細胞内で生産されるタンパク質の標識方法。

**【請求項 14】**

10

20

30

40

50

哺乳動物体内において、外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質を、標識剤としてのグルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドとの融合タンパク質として発現させることにより、体内で生産される目的ペプチドを、グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドで標識することを含む、請求項13記載の方法。

【請求項15】

グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドの、哺乳動物体内又は培養哺乳動物細胞において外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質の標識剤としての使用。

【請求項16】

グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドの、哺乳動物体内において外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質の標識剤としての使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、生体内又は培養細胞内で生産された目的タンパク質を簡便に定量することができる、生体内で目的タンパク質を生産するための遺伝子治療用ベクターに関する。

【背景技術】

患者の体内で目的のタンパク質を生産させる遺伝子治療を行った際、目的のタンパク質の血中濃度はその蛋白のELISA法など、測定法が確立している場合は可能であるが、確立していない場合は濃度測定ができない。そこで、標識蛋白を用いて、その蛋白濃度を測定するアッセイ法が実用化され販売されている。しかし、この測定感度は低く、遺伝子治療における血中濃度測定として確立した方法はない。文献(Treatment of Murine Lupus with cDNA encoding IFN- $\gamma$ /Fc, The Journal of Clinical Investigation, July 2000, volume 106, Number 2 p207-215)では目的のタンパク質を測定せずに影響を受けるタンパク質を定量化して間接的に目的のタンパク質の発現を証明している。これは血中濃度測定の難しさを示していると考えられる。

【発明の開示】

本発明の目的は、遺伝子治療を行った際の目的タンパク質の血中濃度を高感度にモニターでき、標識に起因する不所望の生理作用や抗原抗体反応がほとんど引き起こされない、遺伝子治療用ベクターを提供することである。

本願発明者らは、鋭意研究の結果、遺伝子治療により体内で生産させるべき目的タンパク質と、グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドとの融合タンパク質をコードする核酸を組み込んだベクターで遺伝子治療を行うことにより、上記グルカゴンペプチドを標識として目的タンパク質の血中濃度を高感度に測定することができ、かつ、標識ペプチドに起因する不所望な生理作用の発現や免疫反応の誘起がほとんどないことを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、哺乳類細胞用発現ベクターに、グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチド領域と、体内で生産させるべき目的タンパク質領域との融合タンパク質をコードする核酸を組み込んだ構造を持ち、哺乳類細胞内で前記融合タンパク質を生産させることができる遺伝子治療用ベクターを提供する。また、本発明は、上記本発明の遺伝子治療用ベクターの有効量を、前記目的タンパク質の体内又は細胞内発現が望まれる哺乳動物又は培養哺乳動物細胞に投与することを含む、遺伝子治療方法を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の遺伝子治療用ベクターの、遺伝子治療用薬剤の製造のための使用を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の遺伝子治療用ベクターを投与された哺乳動物又は培養哺乳動物細胞から採取された被検試料中の、グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチド領域を免疫測定することを含む、前記遺伝子治療用ベクターの発現により体内又は培養哺乳動物細胞内で生産された前記目的タンパク質の定量方法を提供する。さらに、本発明は、グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドから成る、哺乳動物体内又は培養哺乳動物細胞内において、外部から投与された発現ベクターの発現により生産さ

10

20

30

40

50

れる目的タンパク質の標識剤を提供する。さらに、本発明は、哺乳動物体内又は培養哺乳動物細胞において、外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質を、標識剤としてのグルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドとの融合タンパク質として発現させることにより、体内又は培養細胞内で生産される目的ペプチドを、グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドで標識することを含む、体内又は培養細胞内で生産されるタンパク質の標識方法を提供する。さらに、本発明は、グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドの、哺乳動物体内又は培養哺乳動物細胞内において外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質の標識剤としての使用を提供する。

本発明により、標識ペプチドは生理作用を持つことなく、目的タンパク質の血中濃度を高感度に測定することを可能にする遺伝子治療用ベクターが初めて提供された。グルカゴンのC端側19-29は、それ自体生理作用を有さず、各種哺乳動物においてよく保存されているので、免疫反応を実質的に誘起せず、それでいて市販の免疫測定キットを用いて高感度に免疫測定することにより定量することが可能である。

#### 【図面の簡単な説明】

図1は、実施例1で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

図2は、図1の続きを示す図である。

図3は、図2の続きを示す図である。

図4は、実施例1～5で用いた哺乳動物用発現ベクターであるpCAGGSの遺伝子地図である。

図5は、実施例1における、遺伝子治療用ベクターの投与後の日数と、グルカゴン由来標識ペプチドを測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度との関係を示す図である。

図6は、実施例1において測定された、本発明のベクターを用いて遺伝子治療を行った場合の目的タンパク質の血中濃度並びに本発明のベクターを用いて遺伝子治療を行った場合及びグルカゴン由来標識ペプチドを融合していない目的タンパク質をコードする核酸を挿入したベクターを用いて遺伝子治療を行った場合の血糖値の経時変化を示す図である。

図7は、実施例2で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

図8は、図7の続きを示す図である。

図9は、図8の続きを示す図である。

図10は、実施例2における、遺伝子治療用ベクターの投与後の日数と、グルカゴン由来標識ペプチドを測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度との関係を示す図である。

図11は、実施例2及び比較例2における、ラットの移植心臓の生着日数を示す図である。

図12は、実施例3で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

図13は、図12の続きを示す図である。

図14は、図13の続きを示す図である。

図15は、比較例3で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

図16は、図15の続きを示す図である。

図17は、実施例3における、遺伝子治療用ベクターの投与後の日数と、グルカゴン由来標識ペプチドを測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度との関係を示す図である。

図18は、実施例3及び比較例3における、ラットの心筋炎病変部位の面積率を示す図である。

図19は、実施例4で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩

10

20

30

40

50

基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

図 20 は、図 19 の続きを示す図である。

図 21 は、図 20 の続きを示す図である。

図 22 は、実施例 4 における、遺伝子治療用ベクターの投与後の日数と、グルカゴン由来標識ペプチドを測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度との関係を示す図である。

図 23 は、実施例 4 及び比較例 4 における、ラットの心筋炎病変部位の面積率を示す図である。

図 24 は、実施例 5 で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

図 25 は、実施例 5 における、グルカゴン由来標識ペプチドを測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度と、ヒトインターロイキン 8 を測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度との相関関係を示す図である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

本発明のベクターにより、目的タンパク質と融合されて発現される、「グルカゴンの C 端側 19 - 29 アミノ酸ペプチド」とは、グルカゴンの C 末端から数えて 19 番目から 29 番目までの合計 11 個のアミノ酸から成るペプチドを意味する。すなわち、このペプチドは、配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有するペプチドである。この「グルカゴンの C 端側 19 - 29 アミノ酸ペプチド」は、目的タンパク質の標識として用いられるので、以下、便宜的に「グルカゴン由来標識ペプチド」と呼ぶことがある。

本発明のベクターには、グルカゴン由来標識ペプチド領域と、目的タンパク質領域との融合タンパク質をコードする核酸が組み込まれている。

本発明に用いられる哺乳類細胞用発現ベクターは、遺伝子治療の分野において周知であり、哺乳類細胞用発現ベクターであれば限定されない。本発明の特徴は、目的タンパク質の標識としてのグルカゴン由来標識ペプチド領域を、目的タンパク質と融合させて発現させる点にあり、哺乳類細胞用発現ベクターは、何ら限定されるものではなく、遺伝子治療の分野で用いられている公知のいずれの哺乳類細胞用発現ベクターをも用いることができる。プラスミドベクターでもウイルスベクターでもよいが、安全性の観点からプラスミドベクターが好ましい。種々の哺乳類細胞用発現ベクターが周知であり、また、市販されており、これらの周知又は市販のベクターを好ましく用いることができる。周知又は市販ベクターの例として、pCAGGS (Efficient selection for high expression transfectants with a novel eukaryotic vector, Gene 1991 Dec. 15, 108 (2) p193 - P199)、遺伝子地図を図 4 に、その塩基配列を配列表の配列番号 3 に示す)、プロメガ社の pCIベクター、pSIベクター及び pTARGETベクター並びにインビトロジェン社の pCDNA5/TO等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

遺伝子治療により体内で生産させようとする目的タンパク質は、何ら限定されるものではなく、インターフェロン、インターロイキン及び CTLA 4 のような種々のサイトカイン、成長因子、インスリン等のホルモン及び細胞接着因子等並びにこれらのレセプターを例示することができる。また、任意の抗原タンパク質を体内で生産させ、遺伝子ワクチンとすることもできる。また、目的タンパク質自体が融合タンパク質であってもよい。例えば、Fcレセプターとの結合が求められる所望のサイトカインの一端に、免疫グロブリン、好ましくは IgG、特に IgG1 の定常領域 (Fc) を融合し、Fcレセプターとの結合性を高めたものを目的タンパク質とすることもできる (下記実施例 1 ~ 4 参照)。IgG の Fc 領域をコードする核酸の塩基配列は、周知であり、例えば、ヒトの IgG Fc 領域をコードする核酸の塩基配列は例えば GenBank Accession No. BC020823 等に記載されており、ラットの IgG Fc 領域をコードする核酸の塩基配列は本願の図 1 ないし図 3 等に示されている。

本発明のベクターは、目的タンパク質と、上記標識ペプチドとの融合タンパク質をコー

10

20

30

40

50

ドする核酸を、哺乳類細胞用発現ベクターのクローニングサイトに挿入することにより得られる。なお、標識ペプチドは、目的タンパク質の一端、特にC末端に融合させることが好ましい。

遺伝子治療は、本発明の遺伝子治療用ベクターを、哺乳動物に投与することにより行うことができる。投与経路は、静脈注射や筋肉内注射のような非経口投与が好ましい。ベクターの投与量は、目的タンパク質の性質や治療すべき疾患の種類及び程度等に応じて適宜設定することができるが、体重1kg当りのベクターの投与量は、通常、1mg～10mg程度、好ましくは2mg～4mg程度である。製剤としては、例えば、遺伝子治療用ベクターをリンゲル液に溶解した溶液を注射液として用いることができる。これに医薬製剤の分野で周知の注射剤用添加剤を添加することも可能である。あるいは、本発明の遺伝子治療用ベクターは、インビトロで培養されている哺乳動物細胞に投与することもできる。すなわち、患者のリンパ球や骨髄細胞等の細胞を体外に取り出して培養し、培養細胞に遺伝子ベクターを投与し、目的タンパク質の生産能を獲得した細胞を再び患者に戻す遺伝子治療があるが、本発明の遺伝子治療用ベクターは、このような培養哺乳動物細胞に投与することもできる。あるいは、遺伝子治療用ベクターの治療効果をインビトロで調べるため等の実験において培養される哺乳動物細胞に投与することもできる。

10

遺伝子治療において、体内に導入されたベクターにより上記目的タンパク質とグルカゴン由来標識ペプチドとの融合タンパク質が生産される。あるいは、インビトロで培養されている哺乳動物細胞に遺伝子治療用ベクターを投与する場合には、該培養細胞内で上記目的タンパク質とグルカゴン由来標識ペプチドとの融合タンパク質が生産される。目的タンパク質は、標識ペプチドと融合しているため、目的タンパク質の濃度は、グルカゴン由来標識ペプチドの濃度を測定することにより測定することができる。なお、本発明で用いられるグルカゴン由来標識ペプチドを免疫測定するキット（グルカゴン由来標識ペプチドを抗原として得られる抗体を含む）が市販されている（第一ラジオアイソトープ研究所製膵グルカゴンRIAキット等）ので、このような市販の免疫測定用キットを用いて容易に測定することができる。

20

グルカゴン由来標識ペプチドを定量する被検試料は、本発明の遺伝子治療用ベクターを投与された個体由来の各種体液や組織等又はそれらの希釈物であり、好ましくは、全血、血清若しくは血漿又はそれらの希釈物のような血液試料である。あるいは、インビトロで培養されている哺乳動物細胞に遺伝子治療用ベクターを投与する場合には、培養細胞のホモジネートや培養上清等である。

30

#### 実施例1、比較例1

ラットのレクチンで刺激した培養脾細胞のcDNAを鋳型として用い、5'-gagaaattcatttaaatgagagcggcccgccgtgcccagaaactgtg-3'と5'-tcaaccactgcacaaaatcttgggctttaccggagagtgggagagact-3'をプライマーとして用いてPCRを行い、さらにそのPCR産物を300倍希釈したものを鋳型として、5'-gagaaattcatttaaatgagagcggcccgccgtgcccagaaactgtg-3'と5'-gagagagagagaaattctcagggtattcatcaaccactgcacaaaatcttgggc-3'をプライマーとして用いてPCRを行い、増幅産物を、EcoRIを用いて上記した哺乳類細胞用発現ベクターpCAGGSのクローニングサイトに組み込んだ。これにより、SwaIとNotIの制限酵素部位の入ったpCAGGS-IgG-glu19-29（免疫グロブリンG1（IgG1）のFc領域をコードする領域の下流に、グルカゴン由来標識ペプチドをコードする領域が結合された核酸断片がpCAGGSのEcoRI部位に挿入されたもの）が得られた。

40

次に、ラット心筋炎の心臓のcDNAを鋳型として用い、5'-gagaaattcatttaaatgattctgctgggtggtcctgatg-3'と5'-gcagcattcggcggccgcttcttctctgtcatcatggagaaa-3'をプライマーとして用いてPCRを行い、そのPCR産物を、先に作成したpCAGGS-IgG-glu19-29にSwaIとNotIを用いて組み込んだ。

50

これにより、上記した哺乳類細胞用発現ベクター pCAGGS の EcoRI 部位に、配列表の配列番号 2 に示す塩基配列（制限酵素部位も含めて示す）を有する DNA 断片が挿入された、本発明のベクターを作製した（実施例 1）。なお、配列番号 2 を他の情報と共に図 1 ないし図 3 に示す。図 1 ないし図 3 に示されるように、挿入した核酸断片は、両端に EcoRI 部位を有し、インターフェロン レセプター（IFN R）タンパク質と、免疫グロブリン G1（IgG1）の Fc 領域の融合タンパク質をコードする領域の下流に、グルカゴン由来標識ペプチドをコードする領域が結合されたもの（INF R - IgG - グルカゴン<sup>19-29</sup>）である。

グルカゴン由来標識ペプチドを含まないプラスミドベクター（比較例 1）と、上記のように作成したグルカゴン由来標識ペプチドを含む本発明のプラスミドベクター（実施例 1）を、それぞれ 7 匹のラットの尾静脈から急速静脈注射し、遺伝子治療を行った。注射液の組成は、一匹あたり 800 μg のプラスミドを 20 ml のリンゲル液に溶解したものであった。注射後、経時的に血液を採取し、採血して得た 1 ~ 10 μl の血漿を 100 ~ 1000 倍希釈し、市販の RIA キット（第一ラジオアイソトープ研究所製グルカゴン RIA キット等）を用いて、該キットの添付文書に従ってグルカゴン由来標識ペプチドの濃度、ひいては、目的タンパク質（本実施例では、IFN R / IgG1 Fc 融合タンパク質）の濃度を測定した。すなわち、RIA は、具体的には次のようにして行なった。アッセイ用緩衝液 400 μl に標準グルカゴン溶液あるいは希釈した被検血漿を 200 μl 加え、さらにグルカゴン - <sup>125</sup>I 溶液を 100 μl、グルカゴン抗血清溶液を 100 μl 加え、4、48 時間放置した。その後、第二抗体を 100 μl、グルカゴン RIA 用沈殿安定剤 400 μl を加え 4、30 分間放置し、遠心分離（2000 x g 30 分間、4）後、上清除去後計数率を測定し濃度を求めた。

図 5 は血中濃度の測定結果である。実施例 1 では、静脈注射後 1 日目 2870 ± 1062 ng/ml（平均 ± 標準偏差）、3 日目 1440 ± 334 ng/ml、7 日目 1120 ± 433 ng/ml、16 日目 281 ± 162 ng/ml、との結果が得られ、全例で測定可能であった。一方、グルカゴンペプチドを含まないプラスミドベクターでの遺伝子治療（比較例 1）では同様な検査ですべて感度以下であった。

図 6 はプラスミド静脈注射 4、8、12 時間後の血糖値及び上記と同様に RIA 測定法で検査した蛋白血中濃度の値である。実施例 1 では、血中濃度は 4 時間後 2815 ± 2318 ng/ml、8 時間後 6061 ± 2789 ng/ml、12 時間後 5752 ± 2270 ng/ml を示し、最大血中濃度を示した 8 - 12 時間後の血糖は、8 時間後 89.3 ± 15.1 mg/dl（実施例 1）vs 81.8 ± 7.5 mg/dl（比較例 1）、12 時間後 63.5 ± 5.7 mg/dl（実施例 1）vs 71.4 ± 6.9 mg/dl（比較例 1）と差はなかった。

以上の結果から、本発明のベクターを用いることにより、ベクター投与の数十日後まで、極少量の血漿サンプルから、目的タンパク質の血中濃度を十分測定することが可能であることが明らかになった。

#### 実施例 2、比較例 2

ラットのレクチンで刺激した培養脾細胞の cDNA を鋳型として用い、5' - g a g a a t t c a t t t a a a t g g c t t g t c t t g g a c t c c a g a g g - 3' と 5' - g c a g c a t c g c g g c c g c g t c t g a a t c t g g g c a t g g t t c t g g - 3' をプライマーとして用いて PCR を行い、その PCR 産物を、実施例 1 記載の方法で作製した pCAGGS - IgG - glu19 - 29 に SwaI と NotI を用いて組み込んだ。

これにより、図 7 ないし 9 及び配列番号 4 に示す塩基配列（制限酵素部位も含めて示す）を有するラット CTLA4 - IgG - グルカゴン<sup>19-29</sup>（ラット CTLA4 コード領域の下流にラット IgG Fc コード領域、その下流にグルカゴン由来標識ペプチドコード領域を結合した核酸断片）が上記した哺乳類細胞用発現ベクター pCAGGS の EcoRI 部位に挿入された、ラット細胞内で CTLA4 - IgG - グルカゴン<sup>19-29</sup> を発現する組換えベクターが作製された（実施例 2）。比較のため、CTLA4 コード領域

10

20

30

40

50

を含まない I g G - グルカゴン<sup>19-29</sup>コード領域のみを挿入した組換えベクターも作製した(比較例2)。

心臓移植後のラットに、実施例1と同様にして組換えベクターを投与し、血中濃度を測定した。また、移植心臓の生着日数も調べた。

結果を図10及び図11に示す。図10に示されるように、実施例2では、CTLA4 - I g G - グルカゴン<sup>19-29</sup>蛋白が図7のように推移した。つまり前値は100倍希釈ではグルカゴンが測定不能であったが、1日目に急激に上昇し、5000 ng/mlを越えるような蛋白濃度を示し、その後徐々に低下したが、評価のため屠殺した105日後まで、1000 ng/mlを越えるような蛋白濃度を示した。また、図11に示されるように、実施例2では、10匹中1匹が14日目に拒絶されたが、残りの9匹はすべて評価した105日まで生着していた。CTLA4を含まないpCAGGS - SP - I g G - グルカゴン<sup>19-29</sup>で治療した群(比較例2)では、5匹中1匹が5日目に、1匹が6日目に、3匹が7日目に拒絶された。これは有意にpCAGGS - CTLA4 - I g G - グルカゴン<sup>19-29</sup>治療の有効性を示している。

#### 実施例3、比較例3

ラットのレクチンで刺激した培養脾細胞のcDNAを鋳型として用い、5' - g a g a a t t c a t t t a a a t g g c a c t c t g g g t g a c t g c a g t c - 3' と 5' - g c a g c a t c g c g g c c g c g t g g c c a t a g c g g a a a a g t t g c t t - 3' をプライマーとして用いてPCRを行い、そのPCR産物を実施例1記載の方法で作製したpCAGGS - I g G - g l u 1 9 - 2 9 にSwaIとNotIを用いて組み込んだ。

これにより、図12ないし14及び配列番号5に示す塩基配列(制限酵素部位も含めて示す)を有するラットIL13 - I g G - グルカゴン<sup>19-29</sup>(ラットインターロイキン13(IL13)コード領域の下流にラットI g G F cコード領域、その下流にグルカゴン由来標識ペプチドコード領域を結合した核酸断片)が上記した哺乳類細胞用発現ベクターpCAGGSのEcoRI部位に挿入された、ラット細胞内でIL13 - I g G - グルカゴン<sup>19-29</sup>を発現する組換えベクターが作製された(実施例3)。比較のため、IL13コード領域を含まないSP - I g G - グルカゴン<sup>19-29</sup>コード領域(配列番号6並びに図15及び図16)のみを挿入した組換えベクターも作製した(比較例3)。

自己免疫性心筋炎ラット(A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. Clinical Immunology and Immunopathology, November 1990, volume 57, p250-262.)のラットに、実施例1と同様にして組換えベクターを投与し、血中濃度を測定した。また、投与16日後に屠殺、解剖し、心筋炎病変部位の病変面積率も調べた。

結果を図17及び図18に示す。IL13 - I g G - グルカゴン<sup>19-29</sup>蛋白が図17のように推移した。つまり、1日目に2000 ng/mlを越えるような蛋白濃度を示し、その後徐々に低下したが、評価のため屠殺した16日後まで、約8 ng/mlの蛋白濃度を示した。また、図18に示すように、本発明の遺伝子治療用ベクターであるpCAGGS - IL13 - I g G - グルカゴン<sup>19-29</sup>(IL13 - I g G - グルカゴン<sup>19-29</sup>を挿入したベクターpCAGGS)を投与した群では、IL13を含まないpCAGGS - SP - I g G - グルカゴン<sup>19-29</sup>を投与した群に比べて、有意に心筋炎病変部位の面積が小さく、pCAGGS - IL13 - I g G - グルカゴン<sup>19-29</sup>治療の有効性が示された。

#### 実施例4、比較例4

マウスのレクチンで刺激した培養脾細胞のcDNAを鋳型として用い、5' - g a g a a t t c a t t t a a a t g g a a a t c t g c t g g g g a c c c t a c - 3' と 5' - g c a g c a t c g c g g c c g c t t g g t c t t c c t g g a a g t a g a a c t

t - 3 ' をプライマーとして用いてPCRを行い、そのPCR産物を実施例1記載の方法で作製したpCAGGS - IgG - glu19 - 29にSwaIとNotIを用いて組み込んだ。

これにより、図19ないし21及び配列番号7に示す塩基配列（制限酵素部位も含めて示す）を有するラットIL1RA - IgG - グルカゴン<sup>19-29</sup>（ラットインターロイキン1レセプターアンタゴニストコード領域の下流にラットIgG Fcコード領域、その下流にグルカゴン由来標識ペプチドコード領域を結合した核酸断片）が上記した哺乳類細胞用発現ベクターpCAGGSのEcoRI部位に挿入された、ラット細胞内でIL1RA - IgG - グルカゴン<sup>19-29</sup>を発現する組換えベクターが作製された（実施例4）。

自己免疫性心筋炎ラット（A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. *Clinical Immunology and Immunopathology*, November 1990, volume 57, p250 - 262.）のラットに、実施例1と同様にして組換えベクターを投与し、血中濃度を測定した。また、投与16日後に屠殺、解剖し、心筋炎病変部位の病変面積率も調べた。比較のため、上記比較例3のベクターも投与した（比較例4）。

結果を図22及び図23に示す。図22に示すように、実施例4では、IL1RA - IgG - グルカゴン<sup>19-29</sup>蛋白が図22のように推移した。つまり、1日目に2000 ng/mlを越えるような蛋白濃度を示し、その後徐々に低下したが、評価のため屠殺した16日後まで、約20 ng/mlの蛋白濃度を示した。また、図23に示すように、実施例4では比較例4に比べて、有意に心筋炎病変部位の面積が小さく、pCAGGS - IL1RA - IgG - グルカゴン<sup>19-29</sup>治療の有効性が示された。

#### 【実施例5】

SwaIとNotIの制限酵素部位の入ったpCAGGS - glu19 - 29を作るために、5' - g a g a a t t c a t t t a a a t g a g a g c g g c c g c c c c g g g t a a a g c c c a a g a t t t t g t g c a g t g g t t g - 3' と 5' - g a g a g a g a g a a t t c t c a g g t a t t c a t c a a c c a c t g c a c a a a a t c t t g g g c - 3' のプライマーのみでPCRを行い、EcoRIを用いて、pCAGGSのクローニングサイトに組み込んだ。

次にCos7細胞のcDNAを鋳型として用い、5' - g a g a a t t c a t t t a a a t g a c t t c c a a g c t g g c c g t g g c t - 3' と 5' - g c a g c a t c g c g g c c g c t g a a t t c t c a g c c c t c t t c a a a a a - 3' をプライマーとして用いてPCRを行い、そのPCR産物を、先に作成したpCAGGS - glu19 - 29にSwaIとNotIを用いて組み込んだ。

これにより、図24及び配列番号8に示す塩基配列を有するヒトIL8 - グルカゴン<sup>19-29</sup>（ヒトインターロイキン8コード領域の下流にグルカゴン由来標識ペプチドコード領域を結合した核酸断片）が上記した哺乳類細胞用発現ベクターpCAGGSのEcoRI部位に挿入された、ラット細胞内でIL8 - グルカゴン<sup>19-29</sup>を発現する組換えベクターが作製された（実施例5）。

ラットに、実施例1と同様にして組換えベクターを投与し、1日後に採血し、血中濃度を測定した。また、同じ試料中のヒトIL-8の濃度も定量した。ヒトIL-8の定量は、BIOSOURCE社製（Nivelles, Belgium）、IL-8 EASIAキットを用いてそのプロトコールに従って行った。

結果を図25に示す。図25に示すごとく、両者のモル濃度はほぼ一致し、グルカゴン<sup>19-29</sup>の標識ペプチドを用いた方法の正確性が証明された。

#### 【配列表】

10

20

30

40

## SEQUENCE LISTING

<110> NIIGATA TLO CORPORATION

<120> Vector for gene therapy and method for quantifying target protein in mammal or cultured cell to which the vector for gene therapy was administered

<130> 03PF275-PCT

<150> JP 2003-3967

<151> 2003-01-10

<160> 24

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligopeptide encoding G19-29 region of glucagon of human, mouse or rat

<400> 1

Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

1

5

10

<210> 2

<211> 1471

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(1461)

<223> DNA insert encoding rat IFN-r receptor, rat IgG Fc region and glucagon G19-29 region

&lt;400&gt; 2

gaattcattt aa atg att ctg ctg gtg gtc ctg atg ctg tct gcg gag atc 51  
 Met Ile Leu Leu Val Val Leu Met Leu Ser Ala Glu Ile  
 1 5 10

ggg agt gga got ttg atg agc acc gag gat cct aag ccg ccc tcg gtg 99  
 Gly Ser Gly Ala Leu Met Ser Thr Glu Asp Pro Lys Pro Pro Ser Val  
 15 20 25

cct gcg cca aca aat gtt cta att acg tcc tat gac ttg aac cct gtc 147  
 Pro Ala Pro Thr Asn Val Leu Ile Thr Ser Tyr Asp Leu Asn Pro Val  
 30 35 40 45

gta cat tgg aag cac cag aac gtg tog cag gct gcc gtc ttc act gta 195  
 Val His Trp Lys His Gln Asn Val Ser Gln Ala Ala Val Phe Thr Val  
 50 55 60

cag gta aag atg tat cca gaa tac tgg act gat gcc tgc acc aac att 243  
 Gln Val Lys Met Tyr Pro Glu Tyr Trp Thr Asp Ala Cys Thr Asn Ile  
 65 70 75

gcc cat cat tat tgt aat atc tac aaa cac att tcc tat cct gac tca 291  
 Ala His His Tyr Cys Asn Ile Tyr Lys His Ile Ser Tyr Pro Asp Ser  
 80 85 90

tct gcc tgg gcc aga gtt aag gcc aag gtt gga caa aga gaa tct gcc 339  
 Ser Ala Trp Ala Arg Val Lys Ala Lys Val Gly Gln Arg Glu Ser Ala  
 95 100 105

tat gcg cag tca gaa gag ttt att atg tgc cga aag ggg aag gtt gga 387  
 Tyr Ala Gln Ser Glu Glu Phe Ile Met Cys Arg Lys Gly Lys Val Gly  
 110 115 120 125

ccg cct ggc ctg gac atc gga agg aag gaa gat cag ctg att gtc cac 435  
 Pro Pro Gly Leu Asp Ile Gly Arg Lys Glu Asp Gln Leu Ile Val His

130	135	140	
ata ttt cac cct aag gtc aat gtg agt cag gaa acc atg ttt ggt gac			483
Ile Phe His Pro Lys Val Asn Val Ser Gln Glu Thr Met Phe Gly Asp			
145	150	155	
gga aat acc tgt tac aca ttc gac tac act gtg ttt gtg aaa cat tac			531
Gly Asn Thr Cys Tyr Thr Phe Asp Tyr Thr Val Phe Val Lys His Tyr			
160	165	170	
agg agt ggg gag atc cta cat aca gaa cat agc gtc cta aaa gaa gat			579
Arg Ser Gly Glu Ile Leu His Thr Glu His Ser Val Leu Lys Glu Asp			
175	180	185	
tgt agc gaa act ctg tgt gag tta aac atc tca gtg tcc acg ctg aat			627
Cys Ser Glu Thr Leu Cys Glu Leu Asn Ile Ser Val Ser Thr Leu Asn			
190	195	200	205
tcc aat tac tgt gtt tca gta gtt gga aag tcg tct ttc tgg caa gtt			675
Ser Asn Tyr Cys Val Ser Val Val Gly Lys Ser Ser Phe Trp Gln Val			
210	215	220	
aat aca gaa aca tca aaa gac gcc tgt atc ccc ttt ctc cat gat gac			723
Asn Thr Glu Thr Ser Lys Asp Ala Cys Ile Pro Phe Leu His Asp Asp			
225	230	235	
aga gaa gaa gcg gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt gat tgc aag			771
Arg Glu Glu Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp Cys Lys			
240	245	250	
cct tgt ata tgt aca ggc tca gaa gta tca tct gtc ttc atc ttc ccc			819
Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro			
255	260	265	
cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act atg act cct aag gtc acg			867
Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr			

270	275	280	285	
tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc cat ttc agc				915
Gys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val His Phe Ser				
	290	295	300	
tgg ttt gta gat gac gtg gaa gtc cac aca gct cag act oga cca cca				963
Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Pro				
	305	310	315	
gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa etc ccc atc				1011
Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile				
	320	325	330	
ctg cac cag gac tgg etc aat ggc agg acg ttc aga tgc aag gtc acc				1059
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys Val Thr				
	335	340	345	
agt goa got ttc cca tcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa ccc gaa				1107
Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Glu				
	350	355	360	365
ggc aga aca caa gtt ccg cat gta tac acc atg tca cct acc aag gaa				1155
Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr Lys Glu				
	370	375	380	
gag atg acc cag aat gaa gtc agt atc acc tgc atg gta aaa ggc ttc				1203
Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly Phe				
	385	390	395	
tat ccc cca gac att tat gtg gag tgg cag atg aac ggg cag cca cag				1251
Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro Gln				
	400	405	410	
gaa aac tac aag aac act cca cct acg atg gac aca gat ggg agt tac				1299
Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr				

415	420	425	
ttc ctc tac agc aag ctc aat gtg aag aag gaa aaa tgg cag cag gga			1347
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln Gly			
430	435	440	445
aac acg ttc acg tgt tot gtg ctg cat gaa ggc ctg cac aac cac cat			1395
Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His			
	450	455	460
act gag aag agt ctc tcc cac tot cgg ggt aaa gcc caa gat ttt gtg			1443
Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Ala Gln Asp Phe Val			
	465	470	475
cag tgg ttg atg aat acc tgagaattct			1471
Gln Trp Leu Met Asn Thr			
	480		

<210> 3

<211> 4790

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA sequence of artificial expression vector pCAGGS

<400> 3

gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 60

gcccataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgctt ggctgaccgc 120

ccaacgacct ccgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180

ggactttoca ttgacgtcaa tgggtggact atttacggta aactgcccac ttggcagtac 240

atcaagtgtg tcatatgccg agtacgccc ctattgacgt caatgacggt aatggcccgc 300

cctggcatta tgoccagtac atgacottat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360  
tattagtoat cgctattacc atgggtogag gtgagoccca ogttctgctt caotctcccc 420  
atctccccc cctcccacc cccaattttg tatttatta tttttaatt attttgtgca 480  
gcgatggggg cggggggggg gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgagggggc 540  
gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagt 600  
tccttttatg gcgaggcggc ggcgggggog gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc 660  
gggagtogct gcgttgctt ogccocgtgc cccgotccgc gccgcctcgc gccgcccgcc 720  
ccgctctga ctgaccgct tactcccaca ggtgagcggg cgggacggcc cttctctcc 780  
gggctgtaat tagcgttgg tttaatgac gctogtttct tttctgtggc tgcgtgaaag 840  
ccttaaaggg ctccgggagg gccctttgtg cgggggggag cggctcgggg ggtgcgtgog 900  
tgtgtgtgtg cgtggggagc gccgcgtgc gccocgcgt gccggcggct gtgagcgtg 960  
cgggcgcggc gcggggcttt gtgcgctccg cgtgtgcgcg aggggagcgc gcccgggggc 1020  
ggtgccccgc ggtgcggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgogg ggtgtgtgcg 1080  
tgggggggtg agcaggggt gtgggcgcgg cggtcgggct gtaaccccc cctgcacccc 1140  
cctccccgag ttgctgagca cggcccggct tcgggtgcgg ggctccgtgc ggggcgtggc 1200  
gcggggctcg ccgtgcggg cgggggggtg cggcaggtg ggtgcggg cggggcgggg 1260  
ccgcctcggg ccggggagg ctcgggggag gggcgcggc gccccggag gccggcggct 1320  
gtcagggcgc gcgagccgc agccattgcc ttttatgta atcgtgcgag agggcgcagg 1380

gacttccttt gtcccaaatic tggcggagcc gaaatctggg aggcgcccgc gcaccccctc 1440  
tagcggggcgc gggcgaagcg gtgcccgcgc ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt 1500  
cgtcgtcgc cgcgccgcgc tccccttctc catctccagc ctccgggctg ccgcaggggg 1560  
acggctgcct tcggggggga cggggcaggg cggggttcgg ottctggcgt gtgaccggcg 1620  
gctctagagc ctctgctaac catgttcatg ccttctctt tttctacag ctctgggca 1680  
acgtcctggt tgttctgctg tctcatcatt ttggcaaaga attcctcag gaattcactc 1740  
ctcaggtgca ggctgcctat cagaaggtgg tgctcgtgt gccaatgcc ctggctcaca 1800  
aataccactg agatcttttt cctctgcca aaaattatgg ggacatcatg aagccccttg 1860  
agcatctgac ttctggctaa taaaggaaat ttatcttcat tgcaatagtg tgttgaatt 1920  
ttttgtgtct ctactcggga aggacatag ggagggcaaa tcatttaaaa catcagaatg 1980  
agtatttgggt ttagagtttg gcaacatag ccatatgctg gctgccatga acaaaggctg 2040  
ctataaagag gtcacagta tatgaaacag cccctgctg tccattcctt attccataga 2100  
aaagccttga cttgaggta gatttttttt atattttgtt ttgtgttatt tttttctta 2160  
acatccctaa aattttcctt acatgtttta ctagccagat ttttctctt ctctgacta 2220  
ctcccagtca tagctgtccc tcttctotta tgaagatccc tcgacctgca gcccaagctt 2280  
ggcgtaatca tggctatagc tgtttctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 2340  
caacatacga gcgggaagca taaagttaa agcctggggt goctaatgag tgagctaact 2400  
cacattaati gogttgcgt cactgccgcg tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagcg 2460

gatccgcata tcaattagtc agcaaccata gtcccgcccc taactccgcc catcccgccc 2520  
ctaactccgc ccagttccgc ccattctcog ccccatggct gactaatttt ttttatttat 2580  
gcagaggccg aggcgcgcctc ggctctctag ctattccaga agtagtgagg aggctttttt 2640  
ggaggcctag gcttttgcaa aaagctaact tgtttaattgc agcttataat ggttaciaat 2700  
aaagcaatag catcaciaat ttcaciaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg 2760  
gtttgtcaa actaatcaat gtatcttato atgtctggat ccgctgcatt aatgaatcgg 2820  
ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggogctct tccgcttctt ccctcactga 2880  
ctcgtcgcgc tcggctcgtc ggctgcggcg agcggatatca gctcactcaa aggcggtaat 2940  
acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca 3000  
aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcgctt gctggcgctt ttccatagcc tcgcccccc 3060  
tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggctg cgaaccgga caggactata 3120  
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtcgcg tctcctgttc ccaccctgcc 3180  
gcttaaccga taactgtcog cttttctccc ttccgggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc 3240  
acgctgtagg tatctcagtt oggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga 3300  
acccccgctt cagcccgacc gctgcgcctt atccgtaac tatcgtcttg agtccaacct 3360  
gtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccaactgg aacaggatta gcagagcgag 3420  
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggggcct aactacggct aactagaag 3480  
gacagtattt ggtatctcgc ctctgctgaa gccagttacc ttoggaaaa gagttggtag 3540

ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca 3600  
gattacgcgc agaaaaaaaa gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga 3660  
cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 3720  
cttcaoctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga 3780  
gtaaaacttg totgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg 3840  
tctatttctg tcatccatag ttgctgaact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga 3900  
ggccttacca totggcccca gtgctgcaat gatacgcga gaccacgct caccggctcc 3960  
agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggccgag cgcagaagtg gtcttgcaac 4020  
tttatccgoc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gotagagtaa gtagttogcc 4080  
agttaatagt ttgogcaacg ttgttgcoat tgctacaggc atcgttgtgt cacgctctc 4140  
gtttggtatg gcttcattca gctccggtc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 4200  
catgtttgtc aaaaaagcg tttagctcctt cggctcctcg atcgtttgtca gaagtaagtt 4260  
ggccgcagtg ttatcactea tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 4320  
atccgtaaga tgcctttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 4380  
tatgoggoga ccgagttgct cttgccggc gtcaatacgg gataataccg cgcacatag 4440  
cagaacttta aaagtgtca tcatiggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat 4500  
cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact gatcttcagc 4560  
atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa 4620

aaaggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 4680  
 ttgaagcatt tatcagggtt attgtotcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa 4740  
 aaataaacia atagggttc ogcgacatt tccccgaaa gtgccacctg 4790

<210> 4

<211> 1233

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> GDS

<222> (13).. (1224)

<223> DNA insert encoding rat CTLA4, rat IgG Fc region and glucagon C19-29 region

<400> 4

gaattcattt aa atg got tgt ctt gga ctc cag agg tac aaa act cac ctg 51  
 Met Ala Cys Leu Gly Leu Gln Arg Tyr Lys Thr His Leu  
 1 5 10

cag ctg cct tct agg act tgg cct ttt gga gtc ctg ctt tct ctt ctc 99  
 Gln Leu Pro Ser Arg Thr Trp Pro Phe Gly Val Leu Leu Ser Leu Leu  
 15 20 25

ttc atc cca atc ttc tct gaa gcc ata caa gtg acc caa cct tca gtg 147  
 Phe Ile Pro Ile Phe Ser Glu Ala Ile Gln Val Thr Gln Pro Ser Val  
 30 35 40 45

gtg ttg gcc agc agc cac ggt gtc gcc ago ttt cca tgt gaa tat gca 195  
 Val Leu Ala Ser Ser His Gly Val Ala Ser Phe Pro Cys Glu Tyr Ala  
 50 55 60

tct tca cac aac act gat gag gtc cgg gtg acg gtg ctg ogg cag aca 243  
 Ser Ser His Asn Thr Asp Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr

65	70	75	
aat gac caa gtg aca gag gtc tgt gcc acg aca ttc aca gtg aag aac			291
Asn Asp Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Thr Thr Phe Thr Val Lys Asn			
80	85	90	
acg ttg ggc ttc cta gat gac ccc ttc tgc agt ggt acc ttt aat gaa			339
Thr Leu Gly Phe Leu Asp Asp Pro Phe Cys Ser Gly Thr Phe Asn Glu			
95	100	105	
agc aga gtg aac ctc acc atc caa gga ctg agg gct gct gac acc gga			387
Ser Arg Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly			
110	115	120	125
ctg tac ttc tgc aag gtg gaa ctc atg tac cca ccg cca tac ttt gtg			435
Leu Tyr Phe Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val			
130	135	140	
ggc atg ggc aac ggg acc cag att tat gtc atc gat cca gaa cca tgc			483
Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys			
145	150	155	
cca gat tca gac gog gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt gat tgc			531
Pro Asp Ser Asp Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp Cys			
160	165	170	
aag cct tgt ata tgt aca ggc tca gaa gta tca tct gtc ttc atc ttc			579
Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe			
175	180	185	
ccc cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act ctg act cct aag gtc			627
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val			
190	195	200	205
acg tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc cat ttc			675
Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val His Phe			

210	215	220	
agc tgg ttt gta gat gac gtg gaa gtc cac aca got cag act cga cca			723
Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro			
225	230	235	
cca gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa ctc ccc			771
Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro			
240	245	250	
atc ctg cac cag gac tgg ctc aat ggc agg acg ttc aga tgc aag gtc			819
Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys Val			
255	260	265	
acc agt gca gct ttc cca tcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa ccc			867
Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro			
270	275	280	285
gaa ggc aga aca caa gtt ccg cat gta tac acc atg tca cct acc aag			915
Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr Lys			
290	295	300	
gaa gag atg acc cag aat gaa gtc agt atc acc tgc atg gta aaa ggc			963
Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly			
305	310	315	
ttc tat ccc cca gac att tat gtg gag tgg cag atg aac ggg cag cca			1011
Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro			
320	325	330	
cag gaa aac tac aag aac act cca cct acg atg gac aca gat ggg agt			1059
Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser			
335	340	345	
tac ttc ctc tac agc aag ctc aat gtg aag aag gaa aaa tgg cag cag			1107
Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln			

350	355	360	365	
gga aac acg ttc acg tgt tot gtg otg cat gaa ggc ctg cac aac cac				1155
Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His				
	370	375	380	
cat act gag aag agt ctc toc cac tot ccg ggt aaa gcc caa gat ttt				1203
His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Ala Gln Asp Phe				
	385	390	395	
gtg cag tgg ttg atg aat acc tgagaatto				1233
Val Gln Trp Leu Met Asn Thr				
	400			

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1143

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (13)..(1134)

&lt;223&gt; DNA insert encoding rat IL13, rat IgG Fc region and glucagon C19-29 region

&lt;400&gt; 5

gaattcattt aa atg gca ctc tgg gtg act gca gtc ctg gct ctc gct tgc	51
Met Ala Leu Trp Val Thr Ala Val Leu Ala Leu Ala Cys	
1 5 10	

ott ggt ggt ott gcc acc cca ggg cca gtg cgg aga tcc aca tct ccc	99
Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Gly Pro Val Arg Arg Ser Thr Ser Pro	
15 20 25	

cct gtg gcc ctc agg gag ott atc gag gag ctg agc aac atc aca caa	147
Pro Val Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu Ser Asn Ile Thr Gln	
30 35 40 45	

gac cag aag act tcc ctg tgc aac agc agc atg gta tgg agc gtg gac	195
Asp Gln Lys Thr Ser Leu Cys Asn Ser Ser Met Val Trp Ser Val Asp	
50 55 60	
ctg aca gct ggc ggg ttc tgt gca gcc ctg gaa tcc ctg acc aac atc	243
Leu Thr Ala Gly Gly Phe Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Thr Asn Ile	
65 70 75	
tcc agt tgc aat gcc atc cac agg acc cag agg ata ttg aat ggc ctc	291
Ser Ser Cys Asn Ala Ile His Arg Thr Gln Arg Ile Leu Asn Gly Leu	
80 85 90	
tgt aac caa aag gcc tcg gat gtg gct tcc agc ccc cca gat acc aaa	339
Cys Asn Gln Lys Ala Ser Asp Val Ala Ser Ser Pro Pro Asp Thr Lys	
95 100 105	
atc gaa gta gcc cag ttt ata tca aaa ctg ctc aat tac tcc aag caa	387
Ile Glu Val Ala Gln Phe Ile Ser Lys Leu Leu Asn Tyr Ser Lys Gln	
110 115 120 125	
ctt ttc cgc tat ggc cac gcg gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt	435
Leu Phe Arg Tyr Gly His Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly	
130 135 140	
gat tgc aag cct tgt ata tgt aca ggc tca gaa gta tca tct gtc ttc	483
Asp Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe	
145 150 155	
atc ttc ccc cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act ctg act cct	531
Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro	
160 165 170	
aag gtc acg tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc	579
Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val	
175 180 185	

cat ttc agc tgg ttt gta gat gac gtg gaa gtc cac aca gct cag act	627			
His Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr				
190	195	200	205	
cga cca cca gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa	675			
Arg Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu				
	210	215	220	
ctc ccc atc ctg cac cag gac tgg ctc aat ggc agg acg ttc aga tgc	723			
Leu Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys				
	225	230	235	
aag gtc acc agt gca gct ttc cca tcc ccc atc gag aaa acc atc tcc	771			
Lys Val Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser				
	240	245	250	
aaa ccc gaa ggc aga aca caa gtt cgc cat gta tac acc atg tca cct	819			
Lys Pro Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro				
	255	260	265	
acc aag gaa gag atg acc cag aat gaa gtc agt atc acc tgc atg gta	867			
Thr Lys Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val				
	270	275	280	285
aaa ggc ttc tat ccc cca gac att tat gtg gag tgg cag atg aac ggg	915			
Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly				
	290	295	300	
cag cca cag gaa aac tac aag aac act cca cct acg atg gac aca gat	963			
Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp				
	305	310	315	
ggg agt tac ttc ctc tac agc aag ctc aat gtg aag aag gaa aaa tgg	1011			
Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp				
	320	325	330	

cag cag gga aac acg ttc acg tgt tct gtg ctg cat gaa ggc ctg cac 1059  
 Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His  
 335 340 345

aac cac cat act gag aag agt ctc tcc cac tct ccg ggt aaa gcc caa 1107  
 Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Ala Gln  
 350 355 360 365

gat ttt gtg cag tgg ttg atg aat acc tgagaattc 1143  
 Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
 370

<210> 6

<211> 825

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(816)

<223> DNA insert encoding rat signal peptide, rat IgG Fc region and glucagon C19-29 region

<400> 6

gaattcattt aa atg aag tcc tgc ggc ctg ttc cct ctc atg gtg ctc ctt 51  
 Met Lys Ser Cys Gly Leu Phe Pro Leu Met Val Leu Leu  
 1 5 10

got ctg ggt gta ctg gca ccc tgg agt gtg gaa gga gcg gcc gcc gtg 99  
 Ala Leu Gly Val Leu Ala Pro Trp Ser Val Glu Gly Ala Ala Ala Val  
 15 20 25

ccc aga aac tgt gga ggt gat tgc aag cct tgt ata tgt aca gcc tca 147  
 Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser  
 30 35 40 45

gaa gta tca tct gtc ttc atc ttc ccc cca aag ccc aaa gat gtg ctc	195
Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu	
50 55 60	
acc atc act ctg act cct aag gtc acg tgt gtt gtg gta gac att agc	243
Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser	
65 70 75	
cag gac gat ccc gag gtc cat ttc agc tgg ttt gta gat gac gtg gaa	291
Gln Asp Asp Pro Glu Val His Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu	
80 85 90	
gtc cac aca gct cag act cga cca cca gag gag cag ttc aac agc act	339
Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr	
95 100 -105	
ttc cgc tca gtc agt gaa ctc ccc atc ctg cac cag gac tgg ctc aat	387
Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn	
110 115 120 125	
ggc agg acg ttc aga tgc aag gtc acc agt gca gct ttc cca tcc ccc	435
Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys Val Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro	
130 135 140	
atc gag aaa acc atc tcc aaa ccc gaa ggc aga aca caa gtt ccg cat	483
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His	
145 150 155	
gta tac acc atg tca cct acc aag gaa gag atg acc cag aat gaa gtc	531
Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr Lys Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val	
160 165 170	
agt atc acc tgc atg gta aaa ggc ttc tat ccc cca gac att tat gtg	579
Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val	
175 180 185	

gag tgg cag atg aac ggg cag cca cag gaa aac tac aag aac act oca 627  
 Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro  
 190 195 200 205

cct acg atg gac aca gat ggg agt tac ttc ctc tac agc aag ctc aat 675  
 Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn  
 210 215 220

gtg aag aag gaa aaa tgg cag cag gga aac acg ttc acg tgt tct gtg 723  
 Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val  
 225 230 235

ctg cat gaa ggc ctg cac aac cac cat act gag aag agt ctc tcc cac 771  
 Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His  
 240 245 250

tct ccg ggt aaa gcc caa gat ttt gtg cag tgg ttg atg aat acc 816  
 Ser Pro Gly Lys Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
 255 260 265

tgagaatto 825

<210> 7

<211> 1284

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> GDS

<222> (13).. (1275)

<223> DNA insert encoding rat IL1 receptor antagonist, rat IgG Fc region and glucagon  
 C19-29 region

<400> 7

gaattcattt aa atg gaa atc tgc tgg gga ccc tac agt cac cta atc tct 51

		Met	Glu	Ile	Cys	Trp	Gly	Pro	Tyr	Ser	His	Leu	Ile	Ser		
		1	5				10									
ctc	ott	ctc	atc	ott	ctg	ttt	cat	tca	gag	gca	gcc	tgc	cgc	cct	tct	99
Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	Phe	His	Ser	Glu	Ala	Ala	Cys	Arg	Pro	Ser	
15	20				25											
ggg	aaa	aga	ccc	tgc	aag	atg	caa	gcc	ttc	aga	atc	tgg	gat	act	aac	147
Gly	Lys	Arg	Pro	Cys	Lys	Met	Gln	Ala	Phe	Arg	Ile	Trp	Asp	Thr	Asn	
30	35				40						45					
cag	aag	acc	ttt	tac	ctg	aga	aac	aac	cag	ctc	att	gct	ggg	tac	tta	195
Gln	Lys	Thr	Phe	Tyr	Leu	Arg	Asn	Asn	Gln	Leu	Ile	Ala	Gly	Tyr	Leu	
50				55						60						
caa	gga	cca	aat	atc	aaa	cta	gaa	gaa	aag	ata	gac	atg	gtg	cct	att	243
Gln	Gly	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	Glu	Glu	Lys	Ile	Asp	Met	Val	Pro	Ile	
65				70						75						
gac	ott	cat	agt	gtg	ttc	ttg	ggc	atc	cac	ggg	ggc	aag	ctg	tgc	ctg	291
Asp	Leu	His	Ser	Val	Phe	Leu	Gly	Ile	His	Gly	Gly	Lys	Leu	Cys	Leu	
80				85						90						
tct	tgt	gcc	aag	tct	gga	gat	gat	atc	aag	ctc	cag	ctg	gag	gaa	ggt	339
Ser	Cys	Ala	Lys	Ser	Gly	Asp	Asp	Ile	Lys	Leu	Gln	Leu	Glu	Glu	Val	
95	100				105											
aac	atc	act	gat	ctg	agc	aag	aac	aaa	gaa	gaa	gac	aag	cgc	ttt	acc	387
Asn	Ile	Thr	Asp	Leu	Ser	Lys	Asn	Lys	Glu	Glu	Asp	Lys	Arg	Phe	Thr	
110	115				120						125					
ttc	atc	cgc	tct	gag	aaa	ggc	ccc	acc	acc	agc	ttt	gag	tca	gct	gcc	435
Phe	Ile	Arg	Ser	Glu	Lys	Gly	Pro	Thr	Thr	Ser	Phe	Glu	Ser	Ala	Ala	
130				135						140						
tgt	cca	gga	tgg	ttc	ctc	tgc	aca	aca	cta	gag	gct	gac	cgt	cct	gtg	483

Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Thr Leu Glu Ala Asp Arg Pro Val	
145	150
155	
agc ctc acc aac aca cgc gaa gag ccc ctt ata gtc acg aag ttc tac	531
Ser Leu Thr Asn Thr Pro Glu Glu Pro Leu Ile Val Thr Lys Phe Tyr	
160	165
170	
ttc cag gaa gac caa gcg gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt gat	579
Phe Gln Glu Asp Gln Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp	
175	180
185	
tgc aag cct tgt ata tgt aca gcc tca gaa gta tca tct gtc ttc atc	627
Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile	
190	195
200	205
ttc ccc cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act ctg act cct aag	675
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys	
210	215
220	
gtc acg tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc cat	723
Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val His	
225	230
235	
ttc agc tgg ttt gta gat gac gtg gaa gtc cac aca gct cag act cga	771
Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg	
240	245
250	
cca cca gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa ctc	819
Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu	
255	260
265	
ccc atc ctg cac cag gac tgg ctc aat gcc agg acg ttc aga tgc aag	867
Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys	
270	275
280	285
gtc acc agt gca gct ttc cca tcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa	915



<210> 8  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> GDS  
 <222> (13).. (360)  
 <223> DNA insert encoding human IL8 and glucagon C19-29 region

<400> 8  
 gaattcattt aa atg act tcc aag ctg gcc gtg gct ctc ttg gca gcc ttc 51  
                   Met Thr Ser Lys Leu Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Phe  
                   1                  5                  10

ctg att tct gca gct ctg tgt gaa ggt gca gtt ttg cca agg agt gct 99  
 Leu Ile Ser Ala Ala Leu Cys Glu Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala  
           15                  20                  25

aaa gaa ctt aga tgt cag tgc ata aag aca tac tcc aaa cct ttc cac 147  
 Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His  
   30                  35                  40                  45

ccc aaa ttt atc aaa gaa ctg aga gtg att gag agt gga cca cac tgc 195  
 Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys  
                   50                  55                  60

gcc aac aca gaa att att gta aag ctt tct gat gga aga gag ctc tgt 243  
 Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys  
           65                  70                  75

ctg gac ccc aag gaa aac tgg gtg cag agg gtt gtg gag aag ttt ttg 291  
 Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu  
           80                  85                  90

aag agg gct gag aat tca gcg gcc gcc ccg ggt aaa gcc caa gat ttt 339

Lys Arg Ala Glu Asn Ser Ala Ala Ala Pro Gly Lys Ala Gln Asp Phe  
 95 100 105

gtg cag tgg ttg atg aat acc tgagaatto 369  
 Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
 110 115

<210> 9

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IgG-glu19-29

<400> 9

gagaattcat ttaaatgaga gggcgccg tgcccagaaa ctgtg 45

<210> 10

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IgG-glu19-29

<400> 10

tcaaccactg cacaaaatct tgggotttac cgggagagtg ggagagact 49

<210> 11

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IgG-glu19-29

<400> 11

gagaattcat ttaaatgaga gggccgccc tgcccagaaa ctgtg

45

<210> 12

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IgG-glu19-29

<400> 12

gagagagaga atttcaggt attcatcaac cactgcacaa aatcttgggc

50

<210> 13

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
pCAGGS-IFN-rR-IgG-glu19-29

<400> 13

gagaattcat ttaaatgatt ctgotggtgg toctgatg

38

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
pCAGGS-IFN-rR-IgG-glu19-29

<400> 14

gcagcatcgc ggccgcttct tctctgtcat catggagaaa 40

<210> 15

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
pCAGGS-CTLA4-IgG-glu19-29

<400> 15

gagaattcat ttaaattggct tgtcttgac tccagagg 38

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
pCAGGS-CTLA4-IgG-glu19-29

<400> 16

gcagcatcgc ggccgctct gaatctgggc atggttctgg 40

<210> 17

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
pCAGGS-IL13-IgG-glu19-29

<400> 17

gagaattcat ttaaattggca ctotgggtga ctgcagtc

38

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
pCAGGS-IL13-IgG-glu19-29

<400> 18

gcagcatcgc ggccgcgtgg ccatagcgga aaagttgctt

40

<210> 19

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
pCAGGS-IL1RA-IgG-glu19-29

<400> 19

gagaattcat ttaaattgga atctgctggg gaccctac

38

<210> 20

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
pCAGGS-IL1RA-IgG-glu19-29

<400> 20

ggagcatogc ggccgcttgg tcttcctgga agtagaactt

40

<210> 21

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-glu19-29

<400> 21

gagaattcoat ttaaagaga gggccgccc cgggtaaago ccaagatttt gtgcagtggg 60

tg

62

<210> 22

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-glu19-29

<400> 22

gagagagaga attctcaggt attcatcaac cactgcacaa aatcttgggc

50

<210> 23

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IL8-glu19-29

<400> 23

gagaattcoat ttaaagact tocaagctgg ccgtggct

38

<210> 24

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IL8-glu19-29

<400> 24

gcagcatcgc ggccgctgaa ttctcagccc tottcaaaaa

40

【 図 1 】

File Name : IPN-rR-IgG-glu19-29  
Range : 1 - 1470 Mode : Normal  
Codon Table : Universal

EcoRI      SmaI ←      IPN Y R

```

          9      18      27      36      45      54
5' GAA TTC ATT TAA ATG ATT CTG CTG GTC CTG ATG CIG TCT GCG GAG ATC GGG
-----
      M T L L V V L M L S A E I G

          63      72      81      90      99      108
AGT GGA GCT TTG ATG AGC ACC GAG GAT CCT AAG CCG CCC TCG GTG CCT GCG CCA
-----
S G A L M S T E D P K P P S V P A P

          117     126     135     144     153     162
ACA AAT GPT CTA ATT ACG TCC TAT GAC TTG AAC CCT GTC GTA CMT TGG ARG CAC
-----
T N V L I T S Y D L N P V V R W K H

          171     180     189     198     207     216
CAG AAC GTG TCG CAG GCT GCC GTC TTC ACT GTA CAG GTA AAG ATG TAT CCA GAA
-----
Q N V S Q A A V F T V Q V K K Y P E

          225     234     243     252     261     270
TAC TGG ACT GAT GCC TGC ACC AAC AIT GCC CMT CMT TAT TGT AAT ATC TAC AAA
-----
Y W T D A C T N I A H B Y C N I Y K

          279     288     297     306     315     324
CAC AIT TCC TAT CCT GAC TCA TCT GCC TGG GCC AGA GTT AAG GCC AAG GAT GGA
-----
H I S Y F D S S A W A R V K A K V G

          333     342     351     360     369     378
CAA AGR GAA TCF GCC TAT GCG CAG TCA GAA GAG TTT AIT ATG TGC CGA AAG GGG
-----
Q R E S A Y A Q S E E F I N C R K G

          387     396     405     414     423     432
AAG GAT GGA CCG CCT GGC CTG GAC ATC GGA AGG AAG GAA GAT CAG CTG AIT GTC
-----
K V G P P G L D I G R K E D Q L I V

          441     450     459     468     477     486
CAC ATA TTT CAC CCT AAG GTC AAT GTG AGT CAG GAA ACC AIG TTT GGT GAC GGA
-----
H I F H P K V N V S Q E T M F G D G

          495     504     513     522     531     540
AAT ACC TGT TAC ACA TTC GAC TAC ACT GTG TTT GTG AAA CAY TAC AGG AGT GGG
-----
N T C Y T F D Y T V P V K H Y R S G

```

図 1

【 図 2 】

```

          549     556     567     576     585     594
GAG ATC CEA CRT ACA GNA CRT AGC GTC CTA AAA GAA GAT TGT AGC GAA ACT CTG
-----
E I L H T E H S V L K E D C S E T L

          603     612     621     630     639     648
TGT GAG TTA AAC ATC TCA GTG TCC ACG CTG AAT TCC AAT TAC TGT GTT TCA GTA
-----
C E L N I S V S T L N S N Y C V S V

          657     666     675     684     693     702
GTT GGA AAG TCG TCT TTC TGG CAA GTT AAT ACA GAA ACA TCA AAA GAC GCC TGT
-----
V G K S S F W Q V N T S T S K D A C

          IPN Y R →      NotI ←      IgG

          711     720     729     738     747     756
ATC CCC TTT CTC CRT GRT GAC AGA GAA GAA GCG GCC GCC GTS CCC AGA AAC TGT
-----
I P F L H D D R R E A A A V P R N C

          765     774     783     792     801     810
GGA GGT GAT TGC AAG CCT TGT ATA TGT ACA GGC TCA GAA GTA TCA TCT GTC TTC
-----
G G D C K P C I C T G S E V S S V F

          819     828     837     846     855     864
ATC TTC CXC CCA AAG CCC AAA GAT GTG CTC ACC ATC ACT CTG ACT CCT AAG GTC
-----
I P P P K P K D V L T I T L T P K V

          873     882     891     900     909     918
ACG TGT GAT GTG GTA GAC AIT AGC CAG GAC GAT CCC GAG GTC CMT TTC AGC TGG
-----
T C V V V D I S Q D D P E V H P S W

          927     936     945     954     963     972
TGT GTA GAT GAC GTG GAA GTC CAC ACA GCT CAG ACT CGA CCA CCA GAG GAG CAG
-----
F V D D V E V H T A Q T R P P E E Q

          981     990     999     1008     1017     1026
TTC AAC AGC ACT TTC CSC TCA GTC AGT GAA CTC CCC ATC CTG CAC CAG GAC TGG
-----
F N S T F R S V S E L P I L H Q D W

          1035     1044     1053     1062     1071     1080
CTC AAT GGC AGG ACG TTC AGA TGC AAG GTC ACC AGT GCA GCT TTC CCA TCC CCC
-----
L N G R T F R C K V T S A A F P S P

```

図 2

【 図 3 】

```

1089      1098      1107      1116      1125      1134
ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA CCC GAA GGC AGA ACA CAA GTT CCG CAT GTA TAC
I   E   K   T   I   S   K   P   E   R   T   Q   V   P   H   V   Y

1143      1152      1161      1170      1179      1188
ACC ATG TCA CCT ACC AAG GAA GAG ATG ACC CAG AAT GAA GTC AGT ATC ACC TGC
T   M   S   P   T   K   E   E   M   T   Q   N   E   V   S   I   T   C

1197      1206      1215      1224      1233      1242
ATG GTA AAA GGC TTC TAT CCC CCA GAC ATT TAT GTG GAG TGG CAG ATG AAC GGG
M   V   K   G   F   Y   P   P   D   I   Y   V   E   W   Q   M   N   G

1251      1260      1269      1278      1287      1296
CAG CCA CAG GAA AAC TAC AAG AAC ACT CCA CCT ACG ATG GAC ACA GAT GCG AGT
Q   F   Q   R   N   Y   K   N   T   P   P   T   M   D   T   D   G   S

1305      1314      1323      1332      1341      1350
TAC TTC CXC TAC AGC AAG CTC AAT GTG AAG AAG GAA AAA TGG CAG CAG GGA AAC
T   A   C   T   Y   S   K   L   N   V   K   K   E   K   W   Q   Q   G   N

1359      1368      1377      1386      1395      1404
ACG TTC ACG TGT TCT GTG CTG CRT GAA GGC CTG CAC AAC CAC CAT ACT GAG AAG
T   F   T   C   S   V   L   H   E   G   L   H   N   H   H   T   E   K

Igg  → ← glucagon 19-29

1413      1422      1431      1440      1449      1458
AGT CTC TCC CAC TCT CCG GGT AAA GCC CAA GAT TTT GTG CAG TGG TIG ATG AAT
S   L   S   H   S   P   G   K   A   Q   D   F   V   Q   W   L   M   N

→ EcoRI
1467
ACC TGA GAA TTC 3'
2 *

```

図 3

【 図 5 】

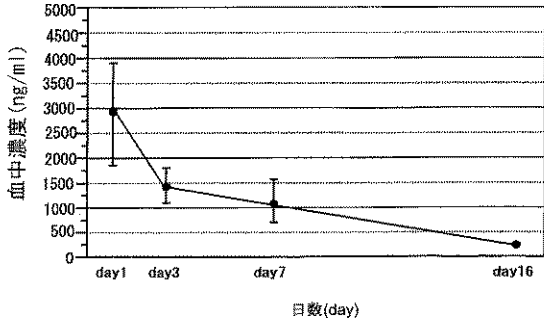


図 5

【 図 4 】

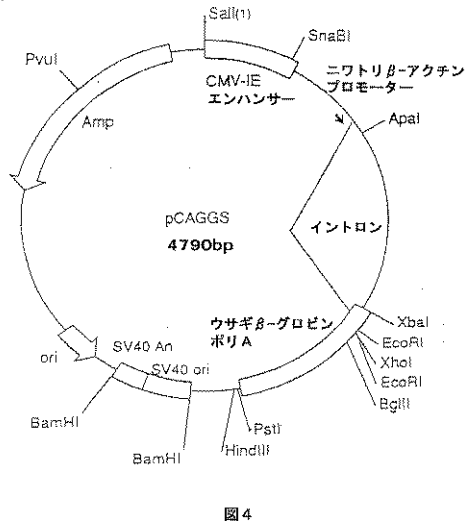


図 4

【 図 6 】

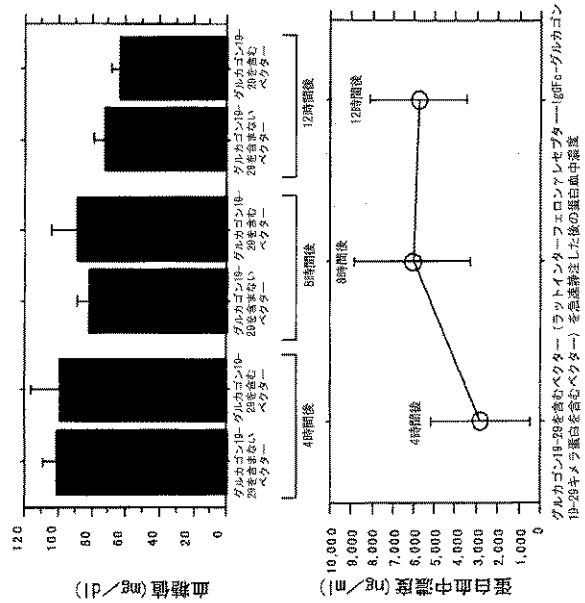


図 6

【 図 7 】

File Name : C11A4-IgG- glui9-29  
Range : 1 - 1233 Mode : Normal  
Codon Table : Universal

EcoRI SwaI ← CTIA4  
5' GAA TTC ATT TAA ATG GCT TGT CTT GGA CTC CAG AGG TAC AAA ACT CAC CTG CAG  
M A C L G L Q R Y K T H L Q  
CTG CCT TCT AGG ACT TGG CCT TTT GGA GTC CTG CTT TCT CTT CTC TTC ATC CCA  
L P S R T W P F G V L L S L L F I P  
ATC TTC TCT GAA GCC ATA CMA CTG ACC CMA CCI TCA GAG GTG TTG GCC AGC AGC  
I F S E A I Q V T Q P S V V L A S S  
CAC GGT GTC GCC AGC TTT CCA TGT GAA TAT GCA TCT TCA CAC AAC ACT GAT GAG  
H G V A S F P C E Y A S S H N T D E  
GTC CGG CTG ACG GTC CTG CCG CAG ACA AAT GAC CAA GTC ACA GAG GTC TGT GGC  
V R V T V L R Q T N D Q V T E V C A  
AGC ACA TTC ACA GTC AAG AAC ACG TTG GGC TTC CTA GAT GAC CCC TTC TGC AGT  
T T F T V K N T L G P L D D P F C S  
GGT ACC TTT AAT GAA AGC AGA GTG AAC CTC ACC ATC CAA GGA CTG AGG GCT GCT  
G T F N E S R V N L T I Q G L R A A  
GAC ACC GGA CTG TAC TTC TGC AAG GTC GAA CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TTT  
D T G L Y F C K V E L M Y P P E Y F  
GTG GGC ATG GGC AAC GGG ACC CAG ATT TAT GTC ATC GAT CCA GAA CCA TCC CCA  
V G M G N G T Q I Y V I D P E F C P

図7

【 図 9 】

1035 1044 1053 1063 1071 1080  
AAC ACT CCA CCT ACG ATG GAC ACA GAT GGG AGT TAC TTC CTC TAC AGC ARG CTC  
N T P P P T M D T D G S Y F L Y S K L  
1089 1098 1107 1116 1125 1134  
AAT GTG AAG AAG GAA AAA TGG CAG CAG GGA AAC ACG TTC ACG TGT TGT GTG CTG  
N V K K E K W Q Q G N T F T C S V L  
IgG  
1143 1152 1161 1170 1179 1188  
CAT GAA GGC CTG CAC AAC CAC CAT ACT GAG AAG AAT CTC TCC CAC TCT CCG GGT  
H E G L H N H H T E K S L S H S P G  
← glucagon 19-29 → EcoRI  
AAA GCC CAA GAT TTT GTG CAG TGG TTG ATG AAT ACC TGA GAA TTC 3'  
K A Q D F V Q W L M N T \*

図9

【 図 8 】

CTIA4 → NotI ← IgG  
495 504 513 522 531 540  
GAT TCA GAC GCG GCC OCC GTG CCC AGA AAC TAT GGA GGT GAT TGC ARG CCT TGT  
D S D A A A V P R N C G G D C K P C  
549 558 567 576 585 594  
ATA TGT ACA GGC TCA GAA GTA TCA TCT GTC TTC ATC TTC CCC CCA ARG CCC AAA  
I C T G S E V S S V F I F P P K P K  
603 612 621 630 639 648  
GAT GTG CTC ACC ATC ACT CTG ACT CCT AAG GTC ACG TGT GTT GTC GTA GAC AAT  
D V L T I T L T P K V T C V V V D I  
657 666 675 684 693 702  
AGC CAG GAC GAT CCC GAG GTC CAT TTC AGC TGG TTT GTA GAT GAC GTG GAA GTC  
S Q D D P E V H F S W F V D D V E V  
711 720 729 738 747 756  
CAC ACA GCT CAG ACT CCA CCA CCA GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACT TTC CCG TCA  
H T A Q T R P P E E Q F N S T F R S  
765 774 783 792 801 810  
GTC AGT GAA CTC CCC ATC CTG CAC CAG GAC TGG CTC AAT GGC AAG AGS TTC AGA  
V S E L P I L H Q D W L N G R T F R  
819 828 837 846 855 864  
TGC AAG GTC ACC AGT CCA GCT TTC CCA TCC CCC ATC GAG ABA ACC ATC TCC AAA  
C K V T S A A F P S P I E K T I S K  
873 882 891 900 909 918  
CCC GAA GGC AGA ACA CAA GTT CCG CAT GTA TAC ACC ATG TCA CCT ACC AAG GAA  
P E G R T Q V P H V Y T M S P T K S  
927 936 945 954 963 972  
GAG ATG ACC CAG AAT GAA GTC AGT ATC ACC TGC ATG GTA AAA GGC TTC TAT CCC  
E M T Q N E V S I T C H V K G F Y P  
981 990 999 1008 1017 1026  
CCA GAC ATT TAT GTG GAG TGG CAG ATG AAC GGG CAG CCA CAG GAA AAC TGC AAG  
P D I Y V E R Q M N G Q P Q E N Y K

図8

【 図 10 】

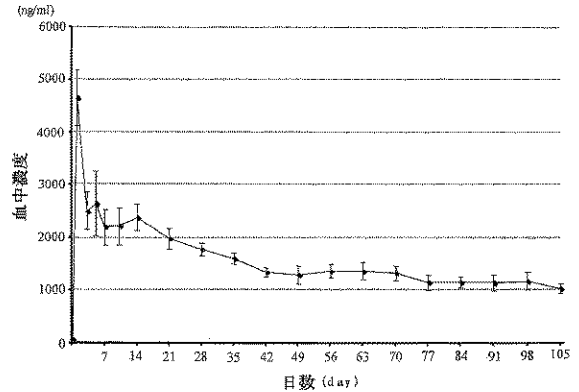


図10

【 図 1 1 】

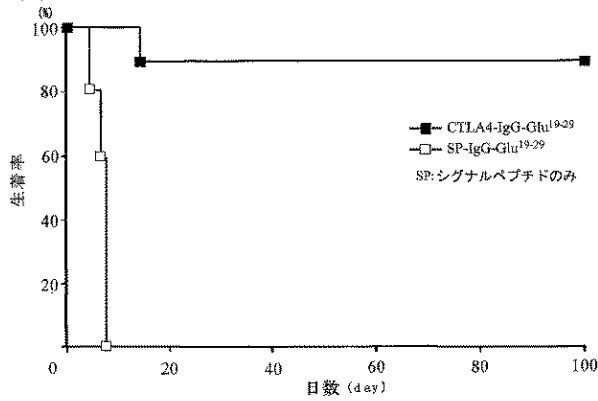


図 11

【 図 1 2 】

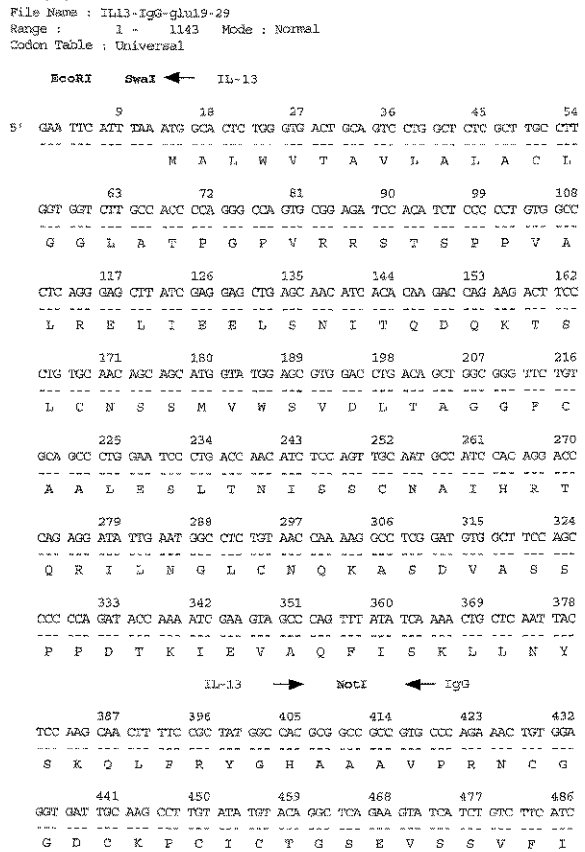


図 12

【 図 1 3 】

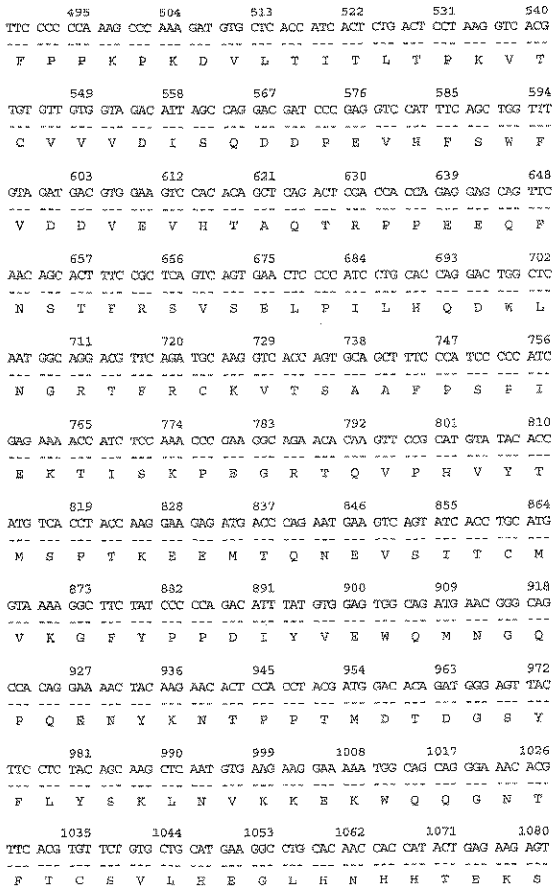


図 13

【 図 1 4 】

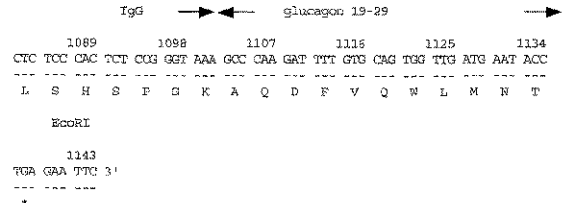


図 14

【 15 】

File Name : SP-IgG-glu-19-29  
Range : 1 - 825 Mode : Normal  
Codon Table : Universal

RcoRI SmaI ← Signal peptide of SLPI  
5' GAA TTC ATT TAA ATG AAG TCC TGC GGC CTG TTC CCT CTC ATG GTG CTC CTT GCT  
M K S C G L P P L M V L L A  
Signal peptide of SLPI → NotI ← IgG  
63 72 81 90 99 108  
CTG GGT GTA CTG GCA CCC TGG AGT CTG GAA GGA GGG GGC GCC GTG CCC AGA AAC  
L G V L A P W S V E G A A A V P R N  
117 126 135 144 153 162  
TGT GGA GGT GAT TGC AAG CCT TGT ATA TGT ACA GGC TCA GAA GTA TCA TCT GTC  
C G G D C K P C I C T G S E V S S V  
171 180 189 198 207 216  
TTC ATC TTC CCC CCA AAG CCC AAA GAT GTS CTC ACC ATC ACT CTG ACT CCT AAG  
F I F P P K E K D V L T I T L T P K  
225 234 243 252 261 270  
GTC ACG TGT GAT GTG GTA GAC AAT AGC CAG GAC GAT CCG GAG GTC CAT TTC AGC  
V T C V V V D I S Q D D P E V H F S  
279 288 297 306 315 324  
TGG TTT GTA GGT GAC GTS GAA GTC CAC ACA GCT CAG ACT CCA CCA CCA GAG GAG  
W F V D D V E V H T A Q T R P P E E  
333 342 351 360 369 378  
CAG TTC AAC AGC ACT TAC GGC TCA GTC AAT GAA CTC CCG ATC CTG CAC CAG GAC  
Q F N S T F R S V S E L P I L H Q D  
387 396 405 414 423 432  
TGG CTC AAT GGC GGG ACG TTC AGA TGC AAG CTC ACC AGT CCA GCT TTC CCA TTC  
W L N G R T F R C K V T S A A F P S  
441 450 459 468 477 486  
CCC ATC GAG AAA ACC AIC TCC AAA CCC GAA GGC AGA ACA CAA GAT CCG CAT GTA  
P I E K T I S K P E G R T Q V P H V

图 15

【 17 】

(ng/ml)

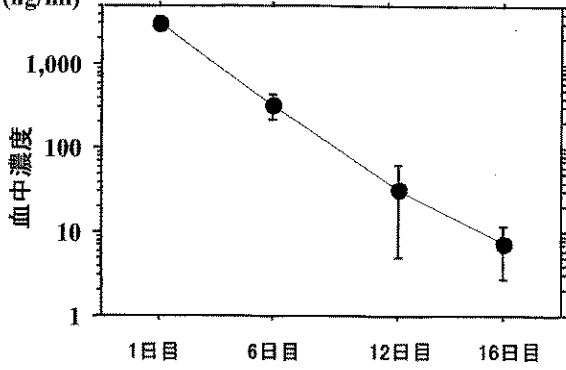


图 17

【 16 】

495 504 513 522 531 540  
TAC ACC ATG TCA CCT ACC AAG GAA GAG ATG ACC CAG AAT GAA GTC AGT ATC ACC  
Y T M S P T K E E M T Q N E V S I T  
549 558 567 576 585 594  
TGC ATG GTA ABA GGC TTC TAT CCC CCA GAC ATT TAT GTG GAG TGG CAG ATG AAC  
C M V K G F Y P P D I Y V E W Q M N  
603 612 621 630 639 648  
GGG CAG CCA CAG GAA AAC TAC AAG AAC ACT CCA CCT ACC ATG GAC ACA GAT GGG  
G Q P Q E N Y K N T P P T M D T D G  
657 666 675 684 693 702  
AGT TAC TTC CTC TAC AGC AAG CTC AAT GTG AAG AAG GAA AAA TGG CAG CAG GGA  
S Y F L Y S K L N V K K E K W Q Q G  
711 720 729 738 747 756  
AAC ACG TTC ACG TGT TCT GTG CTG GAT GAA GGC CTG CAC AAC CAC CAT ACT GAG  
N T P T C S V L R E G L H N H H T E  
IgG → ← glucagon 19-29  
765 774 783 792 801 810  
AAG AGT CTC TCC CAC TCT CCG GGT AAA GCC CAA GAT TTT GTG CAG TGG TTG ATG  
K S L S H S P G K A Q D F V Q W L M  
819  
AAT ACC TGA GAA TTC 3'  
N T \*

图 16

【 18 】

(%)

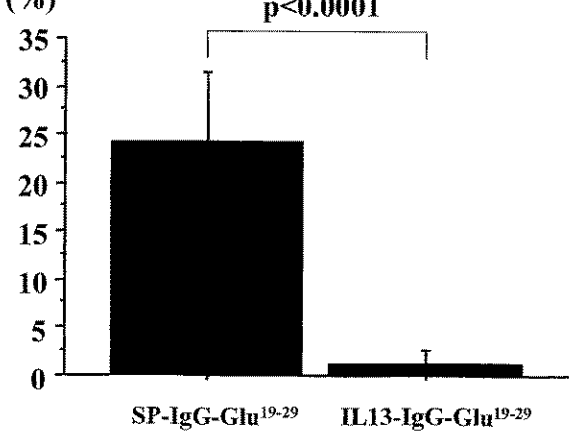


图 18

【 図 19 】

File Name : IL1RA-IgG-glu19-29  
Range : 1 - 1284 Mode : Normal  
Codon Table : Universal

IL-1RA  
EcoRI SmaI  
5' GAA TTC ATT TAA ATG GAA ATC TGG GGA CCC TAC AGT CAC CTA ATC TCT CTC  
M E I C W G P Y S H L I S L  
CTT CTC ATC CTT CTG TTT CAT TCA GAG GCA GCC TGC CCG CCT TCT GGG AAA AGA  
L L I L L L F H S E A A C R P S G K R  
CCX TCC AAG ATG CAA GCC TTC AGA ATC TGG GAT ACT AAC CAG AAG ACC TTT TAC  
P C K M Q A F R I W D T N Q K T P Y  
CTG AGA AAC AAC CAG CTC ATT GCT GGG TAC TTA CAA GGA CCA AAT ATC AAA CTA  
L R N N Q L I A G Y L Q G P N I K L  
GAA GAA AAG ATA GAC ATG GAG CCT ATT GAC CTT CAT AGT GIG TTC TTG GGC ATC  
E R K I D M V P I D L H S V F L G I  
CAC GGG GGC AAG CTG TGC CTG TCT TGT GCC AAG TCT GGA GAT GAT ATC AAG CTC  
H G G K L C L S C A K S G D D I K L  
CAG CTG GAG GAA GTT AAC ATC ACT GAT CTG AGC AAG AAC AAA GAA GAA GAC AAG  
Q L E R V N I T D L S K N K E E D K  
CCG TTT ACC TTC ATC CCG TCT GAG AAG GGC CCC ACC ACC AGC ATT GAG TCA GCT  
R P T P I R S E K G P T T S F E S A  
GCC TGT CCA GGA TGG TTC CTC TCC ACA ACA CTA GAG GCT GAC CGT CCT GTG AGC  
A C F G W F L C T T L E A D R F V S

図 19

【 図 21 】

1035 1044 1053 1062 1071 1080  
GAC ATT TAT GIG GAG TGG CAG ATG AAC GGG CAG CCA CAG GAA AAC TAC AAG AAC  
D I Y V E W Q M N G Q P Q E N Y K N  
1089 1098 1107 1116 1125 1134  
ACT CCA CCT ACC ATG GAC ACA GAT GGG AGT TAC TTC CTC TAC AGC AAG CTC AAT  
T P P T M D T D G S Y F L Y S K L N  
1143 1152 1161 1170 1179 1188  
GTG AAG AAG GAA AAA TGG CAG CAG GGA AAC ACC TTC ACG TGT TCT GTG CTD CAT  
V K K E K W Q Q G N T P T C S V L H  
IgG  
1197 1206 1215 1224 1233 1242  
GAA GGC CTG CAC AAC CAC CAT ACT GAG AAG AGT CTC TCC CAC TCT CCG GGT AAA  
E G L R N R R T E K S L S R S F G K  
glucagon 19-29  
1251 1260 1269 1278  
GCC CAA GAT TTT GTC CAG TGG TTG ATG AAT ACC TGA GAA TTC 3'  
A Q D F V Q W L M N T \*

図 21

【 図 20 】

IL-1RA

495 504 513 522 531 540  
CTC ACC AAC ACA CCG GAA GAG CCC CTT ATA GTC ACG AAG TTC TAC CTC CAG GAA  
L T N T P E E P L I V T K F Y P Q E  
NotI IgG  
549 558 567 576 585 594  
GAC CAA GCG GCC GCC GTC CCC AGA AAC TGT GGA GGT GAT TGC AAG CCT TGT ATA  
D Q A A A V P R N C G G D C K P C I  
603 612 621 630 639 648  
TGT ACA GGC TCA GAA GTA TCA TCT GTC TTC ATC TTC CCC CCA AAG CCC AAA GAT  
C T G S E V S S V F I F P P K P K D  
657 666 675 684 693 702  
GIG CTC ACC ATC ACT CIG ACT CCT AAG GTC ACE TGT GTT GAG GTA GAC AIT AGC  
V L T I T L T P K V T C V V V D I S  
711 720 729 738 747 756  
CAG GAC GAT CCC GAG GTC CAT TTC AGC TGG TTT GTA GAT GAC GYG GAA GTC CAC  
Q D D P E V H F S W F V D D V E V H  
765 774 783 792 801 810  
ACA GCT CAG ACT CCA CCA CCA GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACT TTC CAG TCA GTC  
T A Q T R P P E E Q P N S T F R S V  
819 828 837 846 855 864  
AGT GAA CTC CCC ATC CTC CAC CAG GAC TGG CTC AAT GGC AGG ACC TTC AGA TGC  
S E L P I L H Q D W L N G K T F R C  
873 882 891 900 909 918  
AAG GTC ACC AGT GCA GCT TTC CCA TCC CCC ATC GAG AAA ACC AAT TTC TCC AAA CCC  
K V T S A A P P S P I E K T I S K P  
927 936 945 954 963 972  
GAA GGC AGA ACA CAA GTT CCG CAT GTA TAC ACC ATG TCA CCA ACC ACC AAG GAA GAG  
S G R T Q V P H V Y T M S P T E E E  
981 990 999 1008 1017 1025  
ATG ACC CAG AAT GAA GTC AGT ATC ACC TGC ATG GTA AAA GGC TTC TAT CCC CCA  
M T Q N B V S I T C M V K G P Y P P

図 20

【 図 22 】  
(ng/ml)

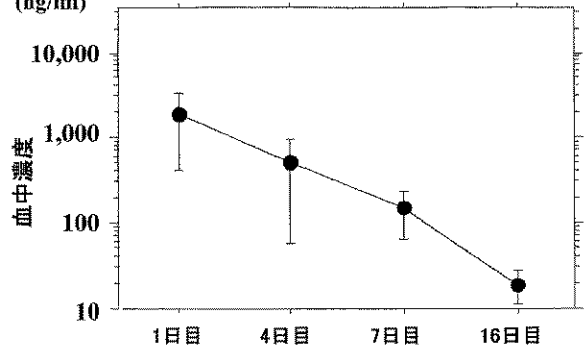


図 22

【 図 23 】  
(%)

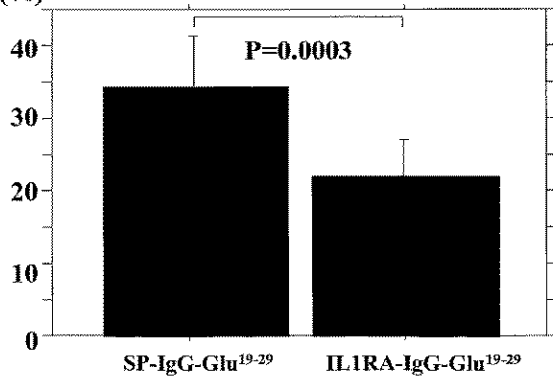


図 23

【 図 2 4 】

File Name : IL8-glu 19-29  
Range : 1 - 369 Mode : Normal  
Codon Table : Universal

```

EcoRI   SmaI   ← IL-8
9       10      27       36       45       54
5' GAA TTC ATT TAA ATG ACT TTC AAG CTG GCC GTG GCT CTC TTG GCA GCC TTC CTG
-----
      M T S K L A V A L L A A F L

63      72      81      90      99      108
ATT TCT GCA GCT CTG TST GAA GGT GCA GTT TTG CCA AGG AGT GCT AAA GAA CTT
-----
I S A A L C E G A V L P R S A K E L

117     126     135     144     153     162
AGA TGT CAG TGC ATA AAG ACA TAC TCC AAA CCT TTC CAC CCC AAA TTT ATC AAA
-----
R C Q C I K T Y S K P F H P K F I K

171     180     189     198     207     216
GPA CTG AGA GTG ATT GAG AGT GGA CGA CAC TGC GCC AAC ACA GAA ATT ATT GTA
-----
E L R V I E S G P H C A N T E I I V

225     234     243     252     261     270
AAG CTT TCT GAT GGA AGA GAG CTC TGT CTG GAC CCC AAG GAA AAC TGG GTG CAG
-----
K L S D G R E L C L D P K E N W V Q

IL-8   → NotI

279     288     297     306     315     324
AGG GTT GTG GAG AAG TTT TTG AAG AGG GCT GAG AAT TCA GCG GCC GCC CCG GGT
-----
R V V E K F L K R A E N S A A A P G

← glucagon 19-29   → HcoRI

333     342     351     360     369
AAA GCC CRA GAT TTT GAG CAG TGG TTG ATG AAT ACC TGA GAA TTC 3'
-----
K A Q D F V Q W L M N T *

```

図 2 4

【 図 2 5 】

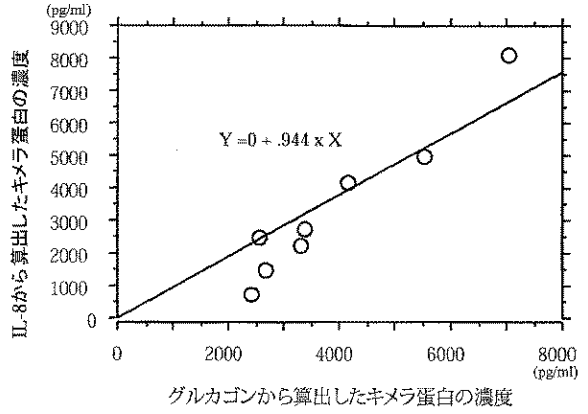


図 2 5

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16956

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> A61K48/00, 38/02, 31/7088, A61P43/00, G01N33/53, C12N15/16  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> A61K48/00, 38/02, 31/7088, A61P43/00, G01N33/53, C12N15/16  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, CAPLUS, EMBASE, BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Naylor LH. 'Reporter gene technology: the future looks bright.', Biochem.Pharmacol., 01 September, 1999 (01.09.99), 58(5), 749-57	1-12,15,16
A	EP 0009147 A2 (Takeda Yakuhin Kogyo Kabushiki Kaisha), 02 April, 1980 (02.04.80), Full text & JP 55-39702 A	1-12,15,16
A	GB 2002387 A (Takeda Chemical Industries Ltd.), 21 February, 1978 (21.02.78), Full text & US 4206199 A                      & JP 54-24868 A	1-12,15,16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 05 March, 2004 (05.03.04)		Date of mailing of the international search report 23 March, 2004 (23.03.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/16956

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.
- 
- Claims Nos.: 13, 14

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 13, 14 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

- 2.
- 
- Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3.
- 
- Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP03/16956
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> A61K48/00, 38/02, 31/7088, A61P43/00, G01N33/53, C12N15/16		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> A61K48/00, 38/02, 31/7088, A61P43/00, G01N33/53, C12N15/16		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
MEDLINE CAPLUS EMBASE BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Naylor LH. 'Reporter gene technology: the future looks bright.' Biochem Pharmacol. 1999 Sep 1, 58(5), 749-57.	1-12, 15, 16
A	EP 0009147 A2 (Takeda Yakuhin Kogyo Kabushiki Kaisha) 1980.04.02, 全文 & JP 55-39702 A	1-12, 15, 16
A	GB 2002387 A (Takeda Chemical Industries Ltd.) 1978.02.21, 全文 & US 4206199 A & JP 54-24868 A	1-12, 15, 16
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	05.03.2004	国際調査報告の発送日
		23.3.2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 川口 裕美子
		4C 9829
		電話番号 03-3581-1101 内線 3452

国際調査報告

国際出願番号PCT/JPO3/16956

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 13, 14 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲13, 14は、人体の診断方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/21 (2006.01)	A 6 1 K 37/66		H
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	用于基因治疗的载体和用于测定具有基因治疗载体的哺乳动物或细胞中靶蛋白的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2004062693A1</a>	公开(公告)日	2006-05-18
申请号	JP2004566302	申请日	2003-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	有限公司新泻TLO		
申请(专利权)人(译)	有限公司新泻TLO		
[标]发明人	埜晴雄		
发明人	埜 晴雄		
IPC分类号	C12N15/09 A61K48/00 G01N33/53 C07K14/605 A61K38/00 A61K38/21 A61K38/22 A61K31/7088 A61K47/48 A61P43/00 C12N15/16 C12N15/85		
CPC分类号	A61K31/7088 A61K47/64 A61K48/00 A61K48/005 A61P43/00 C12N15/85 C12N2800/108 C12N2830/42 G01N2333/605		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K48/00 G01N33/53.D C07K14/605 A61K37/02 A61K37/66.H A61K37/24		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA02 4B024/EA04 4B024/HA17 4C084/AA13 4C084/BA44 4C084/DA01 4C084/DA12 4C084/DA21 4C084/DA45 4C084/DA46 4C084/DB52 4C084/NA20 4H045/AA30 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/CA40 4H045/EA34 4H045/EA50		
代理人(译)	谷川荣次郎		
优先权	2003003967 2003-01-10 JP		
其他公开文献	JP3974619B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

公开了一种用于基因治疗的载体，通过该载体可以在进行基因治疗时以高灵敏度监测所需蛋白质的血液水平，其中标记肽在许多哺乳动物中不具有生理活性并且不具有免疫原性。用于基因治疗的载体包括编码胰高血糖素C末端侧19-29氨基酸肽区和应在体内产生的所需蛋白区的融合蛋白的核酸，该核酸被掺入到用于表达的载体中。哺乳动物细胞。