

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2006/075784

発行日 平成20年6月12日 (2008. 6. 12)

(43) 国際公開日 平成18年7月20日 (2006. 7. 20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	4B024
C12N 15/02 (2006.01)	C12N 15/00 C	4B064
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B065
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	4C085
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 N	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 68 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2006-553034 (P2006-553034)	(71) 出願人	501416243 株式会社ジーンテクノサイエンス 北海道札幌市豊平区月寒東2条17-2-1
(21) 国際出願番号	PCT/JP2006/300676	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(22) 国際出願日	平成18年1月12日 (2006. 1. 12)	(74) 代理人	100095360 弁理士 片山 英二
(31) 優先権主張番号	特願2005-6348 (P2005-6348)	(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(32) 優先日	平成17年1月13日 (2005. 1. 13)	(72) 発明者	黒滝 大翼 北海道札幌市東区北36条東27-2-1 -601
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 α 9インテグリン抗体とその用途

(57) 【要約】

本発明は、抗マウス α 9インテグリン抗体、抗ヒト α 9インテグリン抗体、前記抗体を産生するハイブリドーマ細胞、前記抗体およびハイブリドーマ細胞の製造方法、前記抗体を含有する医薬組成物などを提供する。本発明の抗 α 9インテグリン抗体は α 9インテグリン機能抑制により、癌、例えば癌細胞の増殖、転移、そして炎症性疾患、例えばリウマチ関節炎、変形性関節症、肝炎、気管支喘息、線維症、糖尿病、動脈硬化、多発性硬化症、肉芽腫、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）、さらには自己免疫疾患等に対する治療効果を奏する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト α 9 インテグリンおよびマウス α 9 インテグリンを特異的に認識するモノクローナル抗体。

【請求項 2】

α 9 インテグリンと α 9 インテグリンのリガンドとの結合を阻害する請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

α 9 インテグリンのリガンドがオステオポンチンである請求項 2 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

受託番号 FERM ABP - 10195、FERM ABP - 10196、FERM ABP - 10197、または FERM ABP - 10198 で標示されるハイブリドーマ細胞により産生される上記 (1) から (3) のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

【請求項 6】

請求項 1 から 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を含有する医薬組成物。

【請求項 7】

請求項 1 から 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体および抗 α 4 インテグリン抗体を含有する医薬組成物。

【請求項 8】

癌、炎症性疾患、自己免疫疾患の予防および/または治療剤である、請求項 6 または 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 1 から 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を含有する、癌、炎症性疾患、自己免疫疾患の診断剤。

【請求項 10】

α 9 インテグリンを過剰発現する細胞を抗原として用いることを特徴とする、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 11】

α 9 インテグリンを過剰発現する抗原として用いた細胞とは別の種の細胞を用いることを特徴とする、請求項 5 に記載のハイブリドーマ細胞の製造方法。

【請求項 12】

α 9 インテグリン結合性機能分子を有効成分として含有する、細胞および/または組織のリモデリングの抑制および/または促進剤。

【請求項 13】

α 9 インテグリン発現細胞および/または組織と α 9 インテグリン結合性機能分子とを接触させることを特徴とする細胞および/または組織のリモデリングの抑制および/または促進方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト α 9 インテグリンおよびマウス α 9 インテグリンを特異的に認識するモノクローナル抗体；前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞；前記モノクローナル抗体を含有する医薬組成物；前記モノクローナル抗体を含有する診断剤；前記モノクローナル抗体の製造方法；前記ハイブリドーマ細胞の製造方法などに関する。

【背景技術】

【0002】

細胞はインテグリンとよばれる一群の細胞表面受容体を介して細胞外マトリックス (e

10

20

30

40

50

xtracellular matrix; 以下、ECMと略称する)に結合する。インテグリンは鎖と鎖が1:1のヘテロ二量体を形成することによって機能する。現在までに少なくとも鎖18種類、鎖8種類およびヘテロ二量体24種類が同定確認されている。各インテグリンはそれぞれが特異的なリガンドを認識することが知られている。インテグリンはリガンドに対する特異性や機能からサブファミリーに分類され、コラーゲン受容体、ラミニン受容体、ファイブロネクチンやビトロネクチンなどに含まれるArg-Gly-Asp(RGD)配列を認識するRGD受容体、白血球にのみに存在する白血球特異的受容体に区別される(非特許文献1:Hynes RO. 2002. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. Cell 110: 673-87; 非特許文献2: Miyasaka M. 2000. New edition of Adhesion Molecule handbook. Shujunsha)。4と9インテグリンは、これらにどれにも属さないサブファミリーであり4インテグリンサブファミリーと呼ばれている(非特許文献3: Elise L. Palmer, Curzio Rfiegg, Ronald Ferrando, Robert Pytela, Sheppard D. 1993. Sequence and Tissue Distribution of the Integrin $\alpha 9$ Subunit, a Novel Partner of $\beta 1$ That Is Widely Distributed in Epithelia and Muscle. The Journal of Cell Biology 123: 1289-97)。一方、これまでECMは細胞間の単なる詰め物としてしか考えられていなかったが、インテグリンを介したECMと細胞との相互作用が細胞の増殖、接着、運動などの調節に深く関与し、癌の進展や炎症増悪などの疾患発症に関わることが明らかとなってきた。

ECMの一種であるオステオポンチン(osteopontin; 以下、OPNと略称する)は分子量約41kDaの分泌型酸性リン酸化糖タンパク質であり、乳汁、尿、腎尿管、破骨細胞、骨芽細胞、マクロファージ、活性化T細胞、腫瘍組織など広く発現が認められている分子である。分子中央部に細胞接着配列GRGDSとヒトOPNではSVVYGLR配列、マウスOPNではSLAYGLR配列、その直後にはトロンピン切断部位を有しており、GRGDS配列を介してRGDインテグリンと、SVVYGLR配列あるいはSLAYGLR配列を介して4(41)と9(91)インテグリンと接着する。

41はトロンピンで切断されていないOPN(非切断型OPN)とトロンピンで切断されたN末端フラグメント(切断型OPN)の両方に結合し、91は切断型OPNにのみ結合するという様式の差も見出されている(非特許文献4: Y. Yokosaki et al., (1999) The Journal of Biological Chemistry 274, 36328-36334; 非特許文献5: P. M. Green et al., (2001) FEBS Letters 503, 75-79; 非特許文献6: S. T. Barry et al., (2000) Experimental Cell Research 258, 342-351)。

4および9インテグリンは、OPN以外にも多くの共通するリガンドを有している。ファイブロネクチンのEDA部位、プロペプチド-フォンビルブラントファクター(pp-vWF)、組織型トランスグルタミナーゼ(tTG)、第XIII血液凝固因子そしてVascular Cell Adhesion Molecule-1(VCAM-1)などが知られている。また4インテグリンが特異的に認識するリガンドとしてファイibroネクチンのCS-1ドメイン、MadCAM-1(47)などが知られている。9インテグリンが特異的に認識するリガンドは、テネイシンC、プラスミンなどが知られている。

9、4および1のインテグリンサブユニットのアミノ酸配列は公知である。例えば、ヒト9はNM_002207、マウス9はNM_133721、ヒト4はNM_000885、マウス4はNM_010576、ヒト1はX07979、マウス

10

20

30

40

50

1はNM__010578としてGenBankに登録されている。また、これらのインテグリンは種間でアミノ酸配列間の類似性が高いことが知られている。

WO02/081522(特許文献1)には、OPN欠損マウスやOPNに対する中和抗体を用いたOPN機能抑制による、リウマチ様関節炎や肝炎の治癒効果について開示されている。また、この公報には、炎症性疾患発症には9インテグリン、4インテグリン認識配列であるSVVYGLR配列が重要であること、OPNに対する受容体が免疫担当細胞などにおいて発現し、炎症性疾患に関連していることが開示されている。

【発明の開示】

【0003】

現在、癌、炎症性疾患、自己免疫疾患の治療薬は種々知られているが、より改善された治療効果を有する癌、炎症性疾患、自己免疫疾患の予防薬および/または治療薬等を開発することが望まれていた。

そこで、本発明者らはインテグリンに着目し、種々の研究を行った結果、9インテグリンに対する特異的阻害抗体が癌抑制効果、抗炎症効果を有することを見出し、本発明を完成した。すなわち、具体的には、本発明は以下に記載のモノクローナル抗体、ハイブリドーマ細胞、医薬組成物等を提供する。

(1) ヒト9インテグリンおよびマウス9インテグリンを特異的に認識するモノクローナル抗体。

(2) ヒトおよび/またはマウス9インテグリンと9インテグリンのリガンドとの結合を阻害する上記(1)に記載のモノクローナル抗体。

(3) 9インテグリンのリガンドがオステオポンチンである上記(2)に記載のモノクローナル抗体。

(4) 受託番号FERM ABP-10195、FERM ABP-10196、FERM ABP-10197、またはFERM ABP-10198で標示されるハイブリドーマ細胞により産生される上記(1)から(3)のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

(5) 上記(1)から(4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

(6) 上記(1)から(4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を含有する医薬組成物。

(7) 請求項1から4のいずれかに記載のモノクローナル抗体および抗4インテグリン抗体の両者を含有する医薬組成物。

(8) 炎症性疾患の予防および/または治療剤である、上記(6)または(7)に記載の医薬組成物。

(9) 上記(1)から(4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を含有する、炎症性疾患の診断剤。

(10) 9インテグリンを過剰発現する細胞を抗原として用いることを特徴とする、上記(1)から(4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体の製造方法。

(11) 9インテグリンを過剰発現する抗原として用いた細胞とは別の種の細胞を用いることを特徴とする、上記(5)に記載のハイブリドーマ細胞の製造方法。

(12) 9インテグリン結合性機能分子(例えば、OPN、VCAM-1、テネイシンC、ファイブロネクチン、pp-vWF、tTGなど)を有効成分として含有する、細胞および/または組織のリモデリングの抑制および/または促進剤。

(13) 9インテグリン発現細胞および/または組織(例えば、腫瘍細胞、好中球、平滑筋など)と9インテグリン結合性機能分子(例えば、OPN、VCAM-1、テネイシンC、ファイブロネクチン、pp-vWF、tTGなど)とを接触させることを特徴とする細胞および/または組織のリモデリングの抑制および/または促進方法。

本発明の抗9インテグリン抗体は9インテグリン機能抑制により、癌、例えば癌細胞の増殖、転移、そして炎症性疾患、例えばリウマチ関節炎、変形性関節症、肝炎、気管支喘息、線維症、糖尿病、動脈硬化、多発性硬化症、肉芽腫、炎症性腸疾患(潰瘍性大腸

10

20

30

40

50

炎、クローン病)、さらには自己免疫疾患等に対する治療効果を奏する。

また、本発明の抗 9 インテグリン抗体と抗 4 インテグリン抗体の両者を含有する医薬組成物は、さらに改善された炎症性疾患の治療効果を奏する。本発明ではマウス 9 インテグリン、ヒト 9 インテグリンに対するそれぞれのモノクローナル抗体を作製した。抗マウス 9 インテグリン抗体では、動物実験に使用することができ、抗ヒト 9 インテグリン抗体では治療薬として使用することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0004】

図1はインテグリン遺伝子導入細胞におけるmRNA発現量の解析結果を示す図である。

10

図2は抗マウス 9 インテグリン抗体のFACS解析の結果を示す図である。

図3は抗マウス 9 インテグリン抗体による正常組織の染色像を示す図である。

図4は免疫染色の結果を一覧した図である。

図5は抗マウス 9 インテグリン抗体4クローンの細胞接着阻害効果を示す図である。

図6は抗マウス 9 インテグリン抗体クローンの細胞接着阻害効果を比較した図である。

図7は競合阻害試験による抗体のエピトープ解析の結果を示す図である。

図8はマウスメラノーマ細胞株における 4 および 9 インテグリンの発現解析の結果を示す図である。

図9は単球系細胞株における 9 インテグリンの発現解析の結果を示す図である。

20

図10はマウス好中球のFACS解析の結果を示す図である。

図11はマウス肝臓浸潤白血球のFACS解析の結果を示す図である。

図12は抗 4 インテグリン抗体および 9 インテグリン抗体によるB16-BL6の細胞接着阻害効果を示す図である。

図13は抗 4 インテグリン抗体および抗 9 インテグリン抗体による肝炎治療効果を示す図である。

図14は腱線維芽細胞の 9 インテグリン発現を示す図である。

図15はトロンピン切断型OPNにより腱線維芽細胞のMMP-13 mRNAの転写が増加することを示す図である。

図16は抗 9 インテグリン抗体により腱線維芽細胞からのMMP-13 mRNA転写が抑制されていることを示す図である。

30

図17はB16-BL6細胞の増殖を抗 9 インテグリン抗体で抑制したことを示す図である。

図18はVCAM-1刺激によるB16-BL6細胞の増殖を抗 9 インテグリン抗体と抗 4 インテグリン抗体との併用で抑制したことを示す図である。

図19は抗ヒト 9 インテグリン抗体のFACS解析の結果を示す図である。

図20は抗ヒト 9 インテグリン抗体4クローンとY9A2との細胞接着阻害効果を示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

40

抗インテグリン抗体として、4 インテグリンに対する中和抗体はすでに臨床試験に進んでいる。例えば、2004年7月には米食品医薬品局(FDA)が、バイオジェン・アイデック(Biogen Idec Inc.、米マサチューセッツ州)とエラン(Elan Corporation、アイルランド)による多発性硬化症治療薬Tysabri(登録商標)(natalizumab)の承認申請を受理し、Tysabri(登録商標)は優先審査の対象に指定されている。Tysabri(登録商標)はまた、クローン病、リウマチ様関節炎等の疾患を対象としている。また、P4C2という抗ヒト41 インテグリンモノクローナル抗体が実験室レベルで用いられている。

しかし、9 インテグリンに対する抗体はヒト 9 インテグリンを抗原とし、ヒトおよびモルモットの 9 インテグリンに特異性を示すY9A2と呼ばれる中和抗体(A.Wa

50

ng et al., (1996) Am. J. Respir., Cell. Mol. Biol. 15, 664-672) が実験室レベルで用いられてはいるものの、臨床的に用いられているわけではない。

一方、抗ヒト 9 インテグリン抗体をヒトに対する医薬として用いる場合、開発段階では直接ヒトへの投与はできず、その効果を確認できない。すなわち、効果を確認するための動物実験が必要となり、この効果が確認できれば、ヒト化抗体等を作製することとなる。マウスはその遺伝的背景が明らかとなっている系統が多く、また世代あたりの時間が短い特徴を有する。さらに、マウスはヒトの疾患とほぼ同一の疾患を観察することができることが知られているので、実験動物として好適であるが、マウス 9 インテグリンと交叉反応を示す中和抗体はこれまで報告されていない。

10

本発明では、以下の4工程を注意深く進めることにより、ヒト、マウスそれぞれに対する 9 インテグリンに特異的に反応する阻害抗体を得ることができた。

(1) 9 インテグリン過剰発現株の作製

遺伝子発現細胞のスクリーニングは通常であれば、タンパク質レベルや遺伝子レベルで行うが、今回は、9 インテグリンの機能である細胞接着能を用いたスクリーニングにより、ヒトまたはマウス 9 インテグリンをそれぞれ細胞膜上に過剰発現する細胞株を樹立した。

ヒトまたはマウス 9 インテグリン発現細胞は、マウスあるいはハムスターへそれぞれ免疫に使用することができた。

20

(2) 細胞の選択

マウス 9 インテグリンに対する抗体を作製するために、シリアンハムスターに免疫することを考えた。そのために、ハムスターの卵巣由来細胞である CHO-K1 細胞へマウス 9 インテグリンの遺伝子導入を行い、ハムスター内で主にマウス 9 インテグリンに対する抗体のみの抗体価を増加させる実験系を構築した。

ヒト 9 インテグリンに対する抗体は、CHO-K1 細胞へヒト 9 インテグリンの遺伝子導入を行い、マウス内でヒト 9 インテグリンに対する抗体を増加させる実験系を構築した。

(3) 抗マウス 9 インテグリン抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング

種々のハイブリドーマからマウス 9 インテグリンのみに反応するクローンを効率よく得るために、免疫した細胞の親細胞 (CHO-K1) とは異なる細胞 (NIH3T3) に 9 インテグリンを発現させた細胞をスクリーニングに使用した。さらに 9 インテグリンと同じインテグリンファミリーに属するマウス 4 インテグリンを NIH3T3 細胞に発現させた細胞を用いて、9 インテグリン以外のインテグリンとは交差反応性を示さないクローンを選抜することにより、効率的にマウス 9 インテグリンに特異的に反応する抗体を得た。

30

(4) 抗ヒト 9 インテグリン抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング

種々のハイブリドーマからヒト 9 インテグリンのみに反応するクローンを効率よく得るために、遺伝子導入 CHO-K1 に反応を示し、CHO-K1 細胞に反応しないクローンを選抜した。また、ヒト 4 インテグリン遺伝子導入 CHO-K1 細胞に反応しないことを確認することで、ヒト 9 インテグリンに特異的に反応する阻害抗体を得た。

40

[9 インテグリンに対するモノクローナル抗体]

本発明は 9 インテグリンに対するモノクローナル抗体を提供する。本発明において「抗体」とは、抗原である 9 インテグリンまたはその部分ペプチドに結合し得る抗体分子全体またはその断片 (例えば、Fab または $F(ab')_2$ 断片) を意味し、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。好ましくは、本発明においてはモノクローナル抗体を意味する。また、本発明において「抗体」は、ヒト抗体、ヒト型化抗体、キメラ抗体を包含する。

上記「ヒト型化抗体」とはマウス等のヒト以外の種に由来する抗体を改変して、H鎖とL鎖の相補性決定部以外の一次構造をヒトの抗体の対応する一次構造で置き換えた抗体を言う。また、「キメラ抗体」とは、異種抗体由来の Fab 領域と Fc 領域とを有する抗体

50

を意味する。

本発明において、「抗体断片」とは、全長抗体の一部を指し、一般に、抗原結合領域または可変領域のことである。例えば、抗体断片にはF a b、F a b'、F (a b')₂、およびF v断片が含まれる。抗体のパパイン消化により、F a b断片と呼ばれる、それぞれ1つの抗原結合部位を有する2つの同じ抗原結合断片、及び、残りの容易に結晶化するために「F c」と呼ばれる断片が生じる。また、ペプシン消化により2つの抗原結合部位を有し、抗原を交差結合し得るF (a b')₂断片、及び、残りの別な断片(p F c' と呼ばれる)が得られる。

ここで、「F v」断片は最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位を含む。この領域は1つの重鎖及び軽鎖の可変ドメインが非共有結合により強く連結された二量体である(V_H - V_L二量体)。各可変ドメインの3つのC D Rが相互作用し、V_H - V_L二量体の表面に抗原結合部位を形成する。6つのC D Rは、抗体に抗原結合部位を付与するものである。しかしながら、1つの可変ドメイン(または、抗原に特異的な3つのC D Rのみを含むF vの半分)であっても、全結合部位よりは低い親和性ではあるが、抗原を認識し結合する能力を有する。

また、F a b断片(F (a b)とも呼ばれる)はさらに、軽鎖の定常ドメイン、および、重鎖の細胞の定常ドメイン(C H 1)を含む。F a b'断片はF a b断片と、抗体のヒンジ領域からの1またはそれ以上のシステインを含む重鎖C H 1ドメインのカルボキシ末端由来する数個の残基を付加的に有する点で異なる。

本発明における「モノクローナル抗体」とは、実質的に均質な抗体の集団、即ち、集団を構成する個々の抗体が、天然において起こり得る少量で存在する変異体を除いては均一である抗体集団から得られた抗体を指す。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に対して作用するものである。さらに、異なるエピトープに対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一のエピトープに向けられる。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンが混在しないハイブリドーマ培養により合成される点で有利である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均質な抗体の集団より得られた抗体の特性を示唆するものであって、抗体が特定の方法により製造されることを限定するものではない。

以下、抗 9 インテグリンモノクローナル抗体の作製について詳述するが、該抗体の作製はこれに限定されることはない。

[9 インテグリン(抗原)]

本発明において抗原として使用する 9 インテグリンは、(1) ヒトやその他の哺乳動物の 9 インテグリンを発現するあらゆる細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織に由来するタンパク質、(2) 9 インテグリンをコードする遺伝子D N A、好ましくはc D N Aを細菌、酵母、動物細胞等の細胞株に導入、発現させた組換えタンパク質であってもよく、また(3) 合成タンパク質であってもよい。

また、本発明の 9 インテグリンには、各種哺乳動物の 9 インテグリンのアミノ酸配列、特に好ましくはヒト 9 インテグリンのアミノ酸配列(配列番号：1)と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドも包含される。

ここで「実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド」とは、天然型の 9 インテグリン、特に好ましくはヒト由来の 9 インテグリンと実質的に同等の生物学的性質を有する限り、該アミノ酸配列中の複数個のアミノ酸、好ましくは1ないし10個のアミノ酸、特に好ましくは1ないし数個(例えば、1ないし5個)のアミノ酸が置換、欠失および/または修飾されているアミノ酸配列を有する変異ポリペプチド、ならびに該天然型の

9 インテグリン、特に好ましくはヒト由来の 9 インテグリンのアミノ酸配列中に、複数個のアミノ酸、好ましくは1ないし10個のアミノ酸、特に好ましくは1ないし数個(例えば、1ないし5個)のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有する変異ポリペプチドを意味する。さらに、そのような置換、欠失、修飾及び付加の複数を有する変異ポリペプチドであってもよい。

本発明の 9 インテグリン、特にヒト由来の 9 インテグリンは、遺伝子組換え技術

のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術分野において公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

また、変異ポリペプチドの製造方法としては、例えば、合成オリゴヌクレオチド部位突然変異導入法 (gapped duplex 法)、亜硝酸あるいは亜硫酸処理によってランダムに点突然変異を導入する方法、Ba131 酵素等により欠失変異体を作製する方法、カセット変異法、リンカースキャニング法、ミスインコーポレーション法、ミスマッチプライマー法、DNAセグメント合成法などを挙げることができる。

また、本発明の 9 インテグリンには、該 9 インテグリンの「一部」も包含される。ここで「一部」とは、9 インテグリンのリガンド、例えば OPN や VCAM-1、Tenascin-C 等と結合するために必要な領域を含む部分であり、具体的には配列番号：1 で表されるアミノ酸配列の 14 番目から 980 番目、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列の 11 番目から 981 番目を含む部分をいう。該 9 インテグリンの「一部」は、後述する当該技術分野において公知の方法あるいはその修飾方法に従って、遺伝子組換え技術または化学的合成法により製造することもできるし、また細胞培養方法により単離した 9 インテグリン、特に好ましくはヒト由来の 9 インテグリンをタンパク分解酵素等により適切に切断することで製造することができる。

抗原としてはまた、9 インテグリンを組換え技術により細胞膜上に過剰発現する細胞自体、あるいはその膜画分等を用いることができる。

本発明の 9 インテグリンには、ヒト 9 インテグリンのアミノ酸配列 (配列番号：1) と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドも包含される。配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドとして、具体的には、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を有する、マウス 9 インテグリンがあげられる。本発明では、疾患モデル動物としてマウスを考慮しているので、本発明の抗原としてマウス由来の 9 インテグリンが好適に用いられる。また、特に本発明では 9 インテグリンを組換え技術により細胞膜上に過剰発現する細胞自体が好適に用いられる。したがって、後述するような、9 インテグリンをコードする遺伝子 (例えば、cDNA) を公知の遺伝子工学技術を用いてクローニングし、9 インテグリンを細胞膜上に過剰発現する細胞自体、またはその細胞膜画分を抗原として調製する場合もある。

[抗体産生細胞の調製]

抗原は、免疫される動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常 1 ~ 6 週毎に 1 回ずつ、計 2 ~ 10 回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、マウス、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、ラット、ハムスター、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等が挙げられるが、本発明ではハムスターが好適に用いられる。

治療の対象がヒトであり、OPN 阻害抗体産生動物がマウスの場合には、ヒトマウスキメラ抗体やヒト化抗体を用いるのが望ましく、さらには、抗体産生に関与するヒト遺伝子を導入したマウス等のトランスジェニック動物を用いてヒト型モノクローナル抗体を作成して用いるのが望ましい。

[抗体産生細胞とミエローム細胞との細胞融合]

ミエローム細胞としては、マウス、ラット、ヒト等に由来する細胞が用いられる。例えばマウスミエローム P3U1、P3X63-Ag8、P3X63-Ag8-U1、P3NS1-Ag4、SP2/0-Ag14、P3X63-Ag8-653 等があげられるが、抗体産生細胞とミエローム細胞とは同種動物、特に同系統の動物由来であることが好ましい。ミエローム細胞は凍結保存するか、ウマ、ウサギまたはウシ胎児血清を添加した一般的な培地で継代して維持することができる。細胞融合には対数増殖期の細胞を用いるのが好ましい。本発明では P3X63-Ag8-653 が好適に用いられる。

抗体産生細胞とミエローム細胞とを融合させてハイブリドームを形成させる方法としては、ポリエチレングリコール (PEG) を用いる方法、センダイウイルスを用いる方法、電気融合装置を用いる方法などがあげられる。例えば PEG 法の場合、約 30 ~ 60 % の

PEG (平均分子量1000~6000)を含む適当な培地または緩衝液中に脾細胞とミエローマ細胞を1~10:1、好ましくは5~10:1の混合比で懸濁し、温度約25~37、pH6~8の条件下で、約30秒~3分間程度反応させればよい。反応終了後、PEG溶液を除いて培地に再懸濁し、セルウェルプレート中に播種して培養を続ける。

[ハイブリドーマ細胞の選別]

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマ細胞が生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工業(株))あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、日水製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20~40、好ましくは約37である。培養時間は、通常、5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%CO₂下で行なうことができる。

10

本発明のモノクローナル抗体の産生は、新臨床免疫実験操作法(part3)、科学評論社、1997に記載される細胞ELISA法を用いて確認およびスクリーニングできる。免疫に用いた細胞をスクリーニングに使用するとバックグラウンドが高くなることや偽陽性が多くなることが予想される場合、免疫に用いた細胞とは別の細胞で過剰発現する9インテグリンに反応し、かつ、4インテグリンを過剰発現する細胞に反応しないクローンを抗9インテグリン抗体とすることができる。このようなクローンから限界希釈法を1から5回、好適には2から4回繰り返すことによりモノクローナル抗体を調製できる。

20

[抗体の分離精製]

得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばアフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができるAntibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)が、これらに限定されるものではない。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えばプロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F.F. (Amersham Biosciences)等が挙げられる。

30

[抗体の標識化]

得られた抗体を、公知の方法または市販のキットを用いて各種標識化(例えば、ビオチン標識、FITC標識、APC標識)できる。本発明では、Biotin Labeling Kit(同仁化学)を用いたビオチン標識が好適に用いられる。

[本発明のモノクローナル抗体を含有する医薬組成物]

40

本発明は上記のモノクローナル抗体を含有する医薬組成物を提供する。本発明のモノクローナル抗体を有効成分として含有してなる医薬組成物は、癌、例えば癌細胞の増殖、転移、そして炎症性疾患、例えば関節リウマチ、変形性関節症、肝炎、気管支喘息、線維症、糖尿病、動脈硬化、多発性硬化症、肉芽腫、炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎、クローン病)および自己免疫疾患等の予防および/または治療剤として用いることができる。

本発明のモノクローナル抗体を含有してなる医薬組成物はまた、臓器移植後の慢性拒絶反応抑制、全身性自己免疫疾患・エリテマトーデス・ぶどう膜炎・ベーチェット病・多発性筋炎・糸状体増殖性腎炎・サルコイドーシス等の自己免疫疾患の治療にも用いることができる。

本発明の抗体を含有する上記疾病の予防および/または治療剤は低毒性であり、適当な

50

溶媒に配合して液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の関節リウマチ患者の予防および/または治療のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。このような組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。このような組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。このような注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50（polyoxyethylene（50mol）adduct of hydrogenated castor oil）〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好適である。このような投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5~500mg、とりわけ注射剤では5~100mg、その他の剤形では10~250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。

前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

なお、本発明は、 α インテグリン結合性機能分子（例えば、OPN、VCAM-1、テネシシンC、ファイブロネクチン、pp-vWF、tTGなど）を有効成分として含有する、細胞および/または組織のリモデリングの抑制および/または促進剤；並びに、 α インテグリン発現細胞および/または組織（例えば、腫瘍細胞、好中球、平滑筋など）と α インテグリン結合性機能分子とを接触させることを特徴とする細胞および/または組織のリモデリングの抑制および/または促進方法にも関する。このような治療剤の有効成分の投与量、投与方法、製剤化などについては上記抗体含有医薬の記載を参照して適宜決定することができる。

[本発明のモノクローナル抗体を含有する診断剤]

本発明のモノクローナル抗体を含有してなる医薬組成物は、癌、例えば癌細胞の増殖、転移、そして炎症性疾患、例えばリウマチ関節炎、変形性関節症、肝炎、気管支喘息、線

10

20

30

40

50

維症、糖尿病、癌転移、動脈硬化、多発性硬化症、肉芽腫等の診断剤、また臓器移植後の慢性拒絶反応抑制、全身性自己免疫疾患・エリテマトーデス・ぶどう膜炎・ベーチェト病・多発性筋炎・糸状体増殖性腎炎・サルコイドーシス等の自己免疫疾患の診断剤として用いることができる。本発明のモノクローナル抗体は、 $\alpha 9$ インテグリンを特異的に認識することができるので、被検液中の $\alpha 9$ インテグリンの定量、特にサンドイッチ免疫測定法、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどによる定量、免疫染色などに使用することができる。これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要としない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

10

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、 $\alpha 9$ インテグリンを感度良く定量することができる。さらに、本発明の抗体を用いる、生体内での $\alpha 9$ インテグリンの定量法を利用することにより、 $\alpha 9$ インテグリンが関連する各種疾患の診断をすることができる。例えば、 $\alpha 9$ インテグリンの発現量の増減が検出された場合は、 $\alpha 9$ インテグリンが関連する疾患、例えば癌や炎症性疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、本発明のモノクローナル抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する $\alpha 9$ インテグリンを特異的に検出するために使用することができる。また、 $\alpha 9$ インテグリンを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画に含まれる $\alpha 9$ インテグリンの検出、被検細胞内における $\alpha 9$ インテグリンの挙動の分析等に使用することができる。

20

【実施例】

【0006】

以下に実施例を示して本発明をより詳細に説明するが、これは本発明の範囲を限定するものではない。

[実施例1]

[マウス $\alpha 9$ 、 $\alpha 4$ インテグリン cDNA のクローニング]

$\alpha 4$ インテグリン遺伝子はマウス 12.5 日胚、 $\alpha 9$ インテグリンは B16-BL6 細胞(マウスメラノーマ細胞)の全 RNA からランダムプライマーを用いて逆転写し、得られた cDNA を鋳型として PCR 法によりクローニングを行った。クローニングに用いたプライマーを以下に示す。

30

m $\alpha 4$ Integlin - 5' : - 5' CGTGGATCCGAGCGCATGGCTGC
GGAAGCGAGGTGC - 3' (配列番号: 3)

m $\alpha 4$ Integlin - 3' : 5' - CAGCTCGAGTCAGTCATCATTTGC
TTTTGCTGTTGAC - 3' (配列番号: 4)

m $\alpha 9$ Integlin - 5' : 5' - GTC AAGCTTCTGGGGATGGGCGG
CCCGGCTGGGCTG - 3' (配列番号: 5)

m $\alpha 9$ Integlin - 3' : 5' - CGGTCTAGACACGGTGGGTCACT
GGTTTTTCTGGAC - 3' (配列番号: 6)

PCR は以下の組成: 鋳型 cDNA 5 μ l、GC バッファー I 25 μ l、dNTP mix 5 μ l、10 μ M primer 1 1 μ l、10 μ M primer 2 1 μ l、DW 10.5 μ l、LA Taq (TaKaRa LA Taq (登録商標)) 0.5 μ l の反応系を作製し、94 2分 (94 30秒 68 3分、30サイクル) 4 の反応条件で、サーマルサイクラー (GeneAmp (登録商標) PCR System 2700 (アプライドバイオシステムズ)) により反応を行った。反応後、1% アガロースゲル電気泳動により、 $\alpha 4$ インテグリンの場合は 3 kb 付近のバンドを、 $\alpha 9$ インテグリンの場合は 3 kb 付近のバンドを分離後、ゲルより切り出し、QIAquick (登録商標) Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて PCR 増幅産物を精製した。

40

[ヒト $\alpha 9$ 、 $\alpha 4$ インテグリン cDNA のクローニング]

$\alpha 4$ インテグリン遺伝子はヒト好中球、 $\alpha 9$ インテグリンはヒト末梢単核球から抽出

50

した全RNAからランダムプライマーを用いて逆転写し、得られたcDNAを鋳型としてPCR法によりクローニングを行った。クローニングに用いたプライマーを以下に示す。

h 4 Integrin - 5' : 5' - A C G C T C G A G T G T A C C A T G T T C C C C A C C G A G A G C G C A - 3' (配列番号 : 11)

h 4 Integrin - 3' : 5' - T C A T C T A G A T T A A T C A T C A T T G C T T T T A C T - 3' (配列番号 : 12)

h 9 Integrin - 5' : 5' - T C G A A G C T T C T G G G G A T G G G C G G C C C G G C T - 3' (配列番号 : 13)

h 9 Integrin - 3' : 5' - A C C T C T A G A T C A C T G G T T T T T C T G G A C C C A - 3' (配列番号 : 14)

上記のように、PCR法により増幅した4インテグリンおよび9インテグリンそれぞれのcDNAをpCRII-TOPO(登録商標)ベクター(Invitrogen)に組み込み、ABI PRISM(登録商標)310(アプライドバイオシステムズ)によりそれぞれの塩基配列を確認した。得られたcDNAの塩基配列は配列番号:7(マウス9)および配列番号:8(マウス4)、配列番号:9(ヒト9)および配列番号:10(ヒト4)の塩基配列とそれぞれ一致した。これらのcDNAを動物細胞へ導入するために、pcDNATM3.1(+)(Invitrogen)に組み込んだ。その結果得られたベクターをそれぞれマウス9インテグリン/pcDNA3.1、マウス4インテグリン/pcDNA3.1、ヒト9インテグリン/pcDNA3.1、ヒト4インテグリン/pcDNA3.1と命名した。

[実施例2]

[9インテグリン、4インテグリン恒常発現細胞株の樹立]

ハムスターに免疫するために、ハムスター卵巣由来細胞株であるCHO-K1細胞に4インテグリンcDNAを含むマウス4インテグリン/pcDNA3.1、またはマウス9インテグリンcDNAを含む9インテグリン/pcDNA3.1を導入し、OPNのSVVYGLRペプチドとの接着効果能によるスクリーニングで、マウス9インテグリンを恒常的に発現するCHO-K1細胞(マウス9/CHO-K1細胞)を3クローン(6F1、12C3、4N2)、NIH3T3細胞(マウス9/NIH3T3細胞)を4クローン(21H、7A3、11C3、21D3)樹立した。

マウス9インテグリンのコントロールとして同じインテグリンサブファミリーである4インテグリンをマウス胎児12.5日胚からクローニングし、マウス4インテグリンを恒常的に発現するNIH3T3細胞(マウス4/NIH3T3細胞)を3クローン(3G1、4A10、19F2)樹立した。

樹立したマウス9インテグリン発現細胞の9インテグリン発現量を定量的に解析するために9/NIH3T3細胞、9/CHO-K1細胞から抽出したcDNAを用いてリアルタイムPCRを行った。その結果、図1Aおよび図1Bに示すように、9/NIH3T3細胞では21D3が、9/CHO-K1細胞では12C3が最も高い9インテグリンの発現を示した。また、4/NIH3T3細胞はFACSにてタンパク質発現量の解析を行った結果を図1Cに示す。4A10で最も高いマウス4インテグリン発現上昇が見られた。

同様な方法で、ヒト9インテグリンを恒常的に発現するCHO-K1細胞(ヒト9/CHO-K1細胞)を1クローン(20J1)、ヒト4インテグリンを恒常的に発現するCHO-K1細胞(ヒト4/CHO-K1細胞)を1クローン(9A5)を樹立した。

[実施例3]

[抗9インテグリン抗体を用いたFACS解析]

マウス9/CHO-K1細胞自体を抗原として用い、シリアンハムスター(7-8週齢、雌)3匹に 1×10^7 細胞/回/匹を合計5回免疫した。脾細胞を取り出し、マウスミエローマ細胞であるX63-Ag8-653とPEG法にて細胞融合し、HAT培地で選択した。モノクローナル抗体の産生は、細胞ELISA法にてスクリーニングを行った

。免疫に使用した細胞をスクリーニングに使用するとバックグラウンドが高くなることや偽陽性が多くなることが予想されたので、マウス 9 / N I H 3 T 3 細胞に反応し、且つ、マウス 4 / N I H 3 T 3 細胞に反応しないクローンを抗 9 インテグリン抗体とした。限界希釈法を2回繰り返すことによりモノクローナル抗体を樹立した。その結果、抗マウス 9 インテグリン抗体を産生するハイブリドーマ細胞4クローン(11L2B、12C4'58、18R18D、55A2C)を樹立した。

ヒト 9 インテグリンに対する抗体作製は、subtrac t i v e i m m u n i z a t i o n 法(Williams CV, Stechmann CL, McLoon SC. Biotechniques. (1992) 12:842-7.)を参考にしてBALB/cマウス3匹に対して免疫を行った。まず、CHO-K1細胞を 4×10^6 細胞/匹腹腔内投与し、次の日とその次の日、シクロホスファミドを4mg/匹、腹腔内投与した。シクロホスファミド投与2週間後、ヒト 9 / CHO-K1細胞を 2×10^6 細胞/匹を腹腔内投与し、さらにその2週間後、ヒト 9 / CHO-K1細胞を 3×10^6 細胞/匹を腹腔内投与した。ヒト 9 / CHO-K1細胞に反応し、且つ、ヒト 4 / CHO-K1細胞に反応しないクローンを抗 9 インテグリン抗体とした。その結果、抗ヒト 9 インテグリン抗体を産生するハイブリドーマ細胞4クローン(1K11、21C5、24I11、25B6)を樹立した。

ここで得られた抗マウス 9 インテグリン抗体を産生するハイブリドーマ細胞11L2Bは、2004年12月28日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受領番号FERM ABP-10197として寄託されている。

ここで得られたハイブリドーマ細胞12C4'58は、2004年12月28日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受領番号FERM ABP-10196として寄託されている。

ここで得られたハイブリドーマ細胞18R18Dは、2004年12月28日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受領番号FERM ABP-10195として寄託されている。

ここで得られたハイブリドーマ細胞55A2Cは、2004年12月28日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受領番号FERM ABP-10198として寄託されている。

抗マウス 9 インテグリン抗体がFACSにて使用可能かをマウス 9 / N I H 3 T 3 細胞、マウス 4 / N I H 3 T 3 細胞を用いて検討した。全て、細胞数は 1.0×10^5 個にて行い、抗体との反応は氷上にて行った。また、Fc受容体との非特異反応をブロックするために、抗FcRII抗体(2.4G2)を添加した後に、一次抗体を添加した。2.4G2処理をした9/NIH3T3細胞、4/NIH3T3細胞あるいは、内在性の9インテグリンが発現するマウスメラノーマ細胞株であるB16-BL6細胞に、作製した抗体($5 \mu\text{g/ml}$)を一次抗体として $50 \mu\text{l}$ として添加し30分反応させた。次にFITCラベルした抗ハムスターIgG抗体 $50 \mu\text{l}$ を添加し30分反応後、ナイロンメッシュを通した後、FACS解析をFACSCaliburTM(ベクトンアン ドディッキンソン)にて行った。ピオチン化抗体を使用する際は、Fc受容体をブロックするために2.4G2処理をした細胞に、ピオチン化抗体($5 \mu\text{g/ml}$) $50 \mu\text{l}$ を添加、30分反応後、APCラベル、あるいはFITCラベルしたストレプトアビジンを $50 \mu\text{l}$ 添加しFACS解析を行った。

その結果、図2に示すようにすべての抗マウス 9 インテグリン抗体でマウス 9 / N I H 3 T 3 細胞とB16-BL6細胞上の9インテグリンを検出することができた。またすべての抗体は、マウス 4 / N I H 3 T 3 細胞には反応しなかった。これらの結果から、全ての抗マウス 9 インテグリン抗体が細胞上に発現するマウス 9 インテグリンタ

ンパク質をFACSにて検出できることがわかった。

[実施例4]

[細胞染色の検討]

免疫組織化学を行うためにマウスより種々の生体組織を摘出し、O.C.T.コンパウンド(ティシューテック)にて包埋し、液体窒素にて凍結後、コールドトーム(サクラ)にて5 μ m厚に薄切した。薄切した組織を一昼夜風乾した後、-20 $^{\circ}$ Cのアセトンにて固定し、正常ヤギ血清にて非特異反応のブロックを行った。次に抗 α 9インテグリン抗体クローン12C4'58をそれぞれ一次抗体として2 μ g/mlの濃度で室温1時間反応させ、PBSで500倍希釈したビオチン化ヤギ抗シリアンハムスターIgG抗体(ジャクソン)を二次抗体として添加し、室温で30分反応させた。ベクターステインABCキット(ベクターラボラトリー)を用いて室温で30分間反応後、DAB+基質キット(ダコ)を室温で1から5分間程度反応させ検出を行った。組織はその後、ヘマトキシリン(和光)による核染色を行いカバーガラスと包埋剤でマウントした。マウス脳、肝臓、肺、筋肉の染色像を図3に示す。染色像一覧(図4)に示したように、脳の脈絡叢、肺の血管内皮・平滑筋・肺泡マクロファージ、肝臓の類洞細胞、腎臓の血管内皮・平滑筋・糸球体、胃の平滑筋・粘膜筋板、筋肉の血管内皮・筋繊維芽細胞・リンパ管そして子宮の血管内皮・平滑筋・動脈平滑筋等の細胞で α 9インテグリンの発現が見られた。本結果より本発明で見出された抗 α 9インテグリン抗体は、免疫染色に使用できることが分かり、診断薬としての有用性が期待できる。

10

20

[実施例5]

[細胞接着阻害効果の検討]

樹立した4種類の抗マウス α 9インテグリン抗体が細胞接着阻害活性を有するか調べるために、GRGDS、テネイシンC、SVVYGLRペプチドとマウス9/NIH3T3細胞を用いて細胞接着阻害試験を行った。GRGDSペプチドに含まれるRGD配列は多くのECMに共通して存在する細胞接着部位である。テネイシンCの細胞接着部位であるAEIDGIELペプチドは、 α 9インテグリンは接着することができるが、 α 4インテグリンは接着することができない。ヒトOPNのSVVYGLRペプチドは、 α 4、 α 9インテグリンと接着することができる。これら3種類のペプチド固相によるマウス9/NIH3T3細胞に対する細胞接着におけるそれぞれの抗 α 9インテグリン抗体の接着阻害能を検討した。

30

OPN細胞接着領域SVVYGLR配列(配列番号:15)、GRGDS配列(配列番号:16)、テネイシンCのAEIDGIEL配列(配列番号:17)を固相化し(10 μ g/ml、50 μ l/ウェル)、ブロッキング液(0.5%BSA/PBS)でブロッキングしたELISAプレートに、DMEM/0.25%BSA培地中の予め抗体と反応させた9/NIH3T3細胞(1.0 \times 10⁵個/ml)を添加した。37 $^{\circ}$ Cで1時間培養し、非接着細胞をPBSで洗浄し、接着細胞は、0.5%クリスタルバイオレット/20%メタノールで固定、染色し、室温30分放置、20%酢酸溶液を添加することにより転溶し、接着活性は波長590nmにおけるODを測定することにより定量化した。

その結果、図5に示すように、GRGDSペプチドの固相においては、 α 9インテグリンはRGD非依存性の接着であるので、全ての抗 α 9インテグリン抗体では阻害できなかった。Tenasin-C機能部位であるAEIDGIELペプチドとOPN機能部位であるSVVYGLRペプチドを固相した場合には11L2B、12C4'58、55A2Cの3種類で顕著な細胞接着の阻害が見られた。18R18Dはほとんど阻害能を示さなかった。

40

次に図5で阻害効果の見られた11L2B、12C4'58、55A2Cの3種類の阻害効果の比較を行った。AEIDGIELペプチドとSVVYGLRペプチドの固相を5 μ g/mlで固定し、阻害抗体の濃度を細胞接着阻害試験にて比較検討した。図6に示すように55A2Cが最も阻害能が高いことが分かった。50%阻害濃度(IC50)をも図6に示す。

50

[実施例 6]

[競合阻害試験によるエピトープ解析]

実施例 5 の細胞接着阻害試験により、各抗 9 インテグリン抗体の阻害活性に差がある結果が得られている。このことは、これらの抗体は 9 インテグリン上のそれぞれ異なるエピトープを認識していることを示唆している。そこで、抗体のビオチン化を行い、競合阻害試験によるエピトープ解析を行った。ビオチン化抗体として 1 2 C 4 ' 5 8 と 1 8 R 1 8 D を用いて、当該 2 クローンと全クローンとのエピトープの差異を検討した。図 7 に示したように、両抗体とも、同一クローンによる競合では完全にビオチン化抗体の結合は阻害された。ビオチン化 1 8 R 1 8 D を用いた際には、全クローンで阻害することができなかつた。一方で 1 2 C 4 ' 5 8 では 5 5 A 2 C より一部、結合が阻害されることが分かり、1 2 C 4 ' 5 8 と 5 5 A 2 C では一部エピトープが重複していることが示唆された。

10

[実施例 7]

[培養細胞株における 9 インテグリンの発現解析]

培養細胞上での 9 インテグリン発現を調べるために、マウスメラノーマ培養細胞である B 1 6 - F 1 と B 1 6 - F 1 0、B 1 6 - B L 6 で F A C S 解析を行った。その結果、図 8 に示すように、B 1 6 - F 1、B 1 6 - F 1 0、B 1 6 - B L 6 全ての細胞において 9 インテグリンの発現を確認することができた。

またヒトの末梢血単核球において低いレベルで発現が確認されていたことから、マウス骨髄単球性白血病細胞である W E H I - 3 B 細胞とマクロファージ様細胞である R A W 2 6 4 . 7 細胞において F A C S 解析を行った。図 9 に示すように、W E H I - 3 B 細胞では発現を検出できなかったが、R A W 2 6 4 . 7 細胞では強い発現を確認できた。

20

[実施例 8]

[好中球における 9 インテグリンの発現解析]

9 インテグリンはヒト好中球において高発現していることが既に報告されている。そこで、マウス好中球上における 9 インテグリン発現を解析するために、チオグチコレート誘導腹腔細胞を回収しマウス好中球の発現解析に使用した。M a c - 1⁺G r - 1⁺の細胞を好中球とし、その細胞群における 9 インテグリンの発現を F A C S 解析した。図 1 0 に示すように、C 5 7 B L / 6、B A L B / c、C B A、C 3 H 全系統マウスで 9 インテグリン発現を確認することはできなかった。この結果からマウス好中球上には通常では 9 インテグリンが発現していないことが明らかとなった。

30

[実施例 9]

[4 インテグリンと 9 インテグリンの発現様式の解析]

4 インテグリンと 9 インテグリンは同じインテグリンサブファミリーに属し、多くのリガンドを共有していることから、類似する機能を発揮することが示唆されている。また、マウス肝内白血球中に存在する N K T 細胞が、4 と 9 インテグリンを同時に発現する事が mRNA レベルの解析によって既に報告されている (D i a o H , K o n S , I w a b u c h i K , K i m u r a C , M o r i m o t o J , I t o D , S e g a w a T , M a e d a M , H a m u r o J , N a k a y a m a T , T a n i g u c h i M , Y a g i t a H , V a n K a e r L , O n o e K , D e n h a r d t D , R i t t l i n g S , T . U . 2 0 0 4 . O s t e o p o n t i n a s a m e d i a t o r o f N K T c e l l f u n c t i o n i n T c e l l - m e d i a t e d l i v e r d i s e a s e s . I m m u n i t y 2 1 : 5 3 9 - 5 0)) 。そこで、4 インテグリンと 9 インテグリンは同一細胞上に実際に発現しているのかを確認するために、マウス肝浸潤白血球を分離し両インテグリン抗体による二重染色を行った。その結果、図 1 1 に示すように、4 インテグリンは全肝内白血球の約 3 9 % 程度が発現しており、9 インテグリンは全肝浸潤白血球の約 1 2 % 程度が発現していた。9 インテグリンは 4 インテグリン発現細胞の約 7 4 % に発現していることが分かった。

40

[実施例 1 0]

[O P N の B 1 6 - B L 6 細胞との接着様式の検討]

50

B16-BL6細胞をはじめ多くの細胞が4インテグリンと9インテグリンを同時に発現している。また4インテグリンと9インテグリンはOPNやVCAM-1等リガンドを共有していることから、現在臨床応用されつつある4インテグリン機能抑制だけでは、その機能が9インテグリンによりレスキューされてしまうことが予想される。そこで、抗4インテグリン抗体と抗9インテグリン抗体の併用によるSVVYGLRペプチドとB16-BL6細胞との接着阻害効果の相乗効果を検討した。

具体的には抗4、9インテグリン抗体によるB16-BL6細胞に対する接着阻害効果は、SVVYGLR配列固相(5 μ g/ml)の細胞接着試験で検討した。接着の際に、培地に1mM MnCl₂を添加し反応させた。抗体は抗4インテグリン抗体(クローンR1-2)(Pharmingen)と抗9インテグリン抗体(クローン11L2B)を用いて行った。抗4インテグリン抗体のコントロール抗体として正常ラット抗体(NRG)、抗9インテグリン抗体のコントロール抗体として正常ハムスター抗体(NHG)を使用した。阻害活性は抗体50 μ g/ml、2種併用の際は抗体それぞれ25 μ g/mlで検討を行った。

その結果、図12に示すように、抗4インテグリン抗体と抗9インテグリン抗体それぞれ単独では、阻害効果をほとんど見出すことができなかった。一方、抗4インテグリン抗体と抗9インテグリン抗体を併用した際には阻害効果を見出した。この結果は、

4インテグリン、9インテグリンは片方のみでもSVVYGLR配列に対してほぼ完全なる細胞接着能を有することを示唆している。生体内では、4と9の両インテグリンを発現している細胞(好中球やNK細胞等)が疾患発症に関わっていることが示されており、さらに、これら両インテグリンは多くのリガンドを共有することから考えると、抗9インテグリン抗体と抗4インテグリン抗体とを併用することにより、より効率的に疾患治療効果を得ることができると推察され、新たな治療法となりうる可能性を示すことができた。

[実施例11]

[抗9インテグリン抗体による肝炎治療効果]

これまで我々は、OPN機能阻害により肝炎が治療できることを示している(特許文献1)。そこで、抗9インテグリン抗体クローン11L2Bおよび抗4インテグリン抗体R1-2(Pharmingen)を用いた治療実験を行った。肝炎はコンカナバリンA(ConA)(Vector社)を200 μ g静脈内投与し、12時間後の血中AST値、ALT値をGPT/ALT-PIIIとGOT/AST-PIII(富士フィルム)を用いて測定した。抗体は、ConAを投与する3時間前に200 μ gを静脈内投与した。図13に示すように、抗9インテグリン抗体によりAST値、ALT値の減少が見られ、治療効果を見出すことができた。さらに、その治療効果は抗4インテグリン抗体との併用により亢進させることができた。抗9インテグリン抗体により肝炎治療ができることが分かった。

[実施例12]

[腱線維芽細胞を用いた抗9インテグリン抗体によるMMP-13の変化]

マウス膝蓋腱から、腱線維芽細胞を回収し9インテグリンの発現をFACSと細胞染色により検討した。抗9インテグリン抗体はクローン18R18D、抗4インテグリン抗体はR1-2を用いた。図14に示すように腱線維芽細胞には9インテグリンが発現していることが分かった。4インテグリンは発現していなかった。

リコンビナント全長型OPNとトロンピン切断型OPN(それぞれ10 μ g/ml)を固相し、腱線維芽細胞を48時間培養し、MMP-13 mRNA量をリアルタイムPCRを用いて定量化した。トロンピン切断型OPNで腱線維芽細胞を刺激した際に、MMP-13の転写が促進されることが分かった(図15)。次に抗9インテグリン抗体55A2Cを30 μ g/mlになるように培養液中に添加して、MMP-13 mRNA量変化を調べた。図16に示すように、抗9インテグリン抗体(クローン55A2C)によりMMP-13転写量を抑制することが分かった。コントロール抗体としては、ハムスターIgGを用いた。

MMP - 13はコラゲナーゼとも呼ばれ、マウスにおけるコラゲナーゼはMMP - 13が代表的なMMPであるが、ヒトにおいてはMMP - 1やMMP - 8, MMP - 13が関係している。MMP - 13は関節炎(特に関節リウマチ(RA)や変形性関節症(OA))の増悪化に強く関与することが示されている(Skotnicki JS, DiGrandi MJ, Levin JI. Design strategies for the identification of MMP - 13 and Tace inhibitors. Curr Opin Drug Discov Devel. (2003) 6:742-59. Review.)。抗 9インテグリン抗体によりMMP - 13の転写が抑制できるという本知見から、抗 9インテグリン抗体を用いることにより、関節炎が治療できることが強く示唆できる。

10

[実施例13]

[癌細胞株の増殖における抗 9インテグリン抗体の機能]

図2で示すように、B16-BL6は 9インテグリンが強く発現している。また、MMP - 13は癌の増悪に関与している(Ala-aho R, Kahari VM. Collagenases in cancer. Biochimie. (2005) 87:273-86. Review.)という報告もある。そこで、樹立した4種類の抗マウス 9インテグリン抗体の癌細胞の細胞増殖阻害活性をを検討した。細胞培養用の96ウェルプレート(ベクトンアンドディッキンソン)にB16-BL6細胞を10% FCS/DMEMで 5×10^4 cells/mLに調製し、抗マウス 9インテグリン抗体、抗マウス 4インテグリン抗体を10 µg/mLで添加後、細胞-抗体懸濁液を100 µLずつウェルに添加した。37、5% CO₂存在下で24時間培養し、各ウェルに10 µLずつセルカウンティングキット8(同仁化学研究所)を添加し、さらに37、5% CO₂存在下で1時間培養し、O.D. 450の吸光度を計測し細胞数を定量的に解析した。図17に示すように、12C4'58が最も阻害活性が高く、35%程度B16-BL6細胞の増殖を抑制した。55A2CとR1-2も20%程度、増殖を抑制することができた。

20

次に、より生体の条件に近い条件における細胞増殖の抑制効果を解析するために、VCAM - 1を固相化し同様の検討を行った。VCAM - 1は 9インテグリンのリガンドであり、VCAM - 1の可溶性リコンビナントタンパクであるrhVCAM - 1-Fc chimera(ロシュ)を使用した。rhVCAM - 1-Fc chimeraを10 µg/mLで固相して使用し、0.5% BSA/PBSで非特異的反応のブロックを行った。抗体単独の場合は10 µg/mLで、併用の場合はそれぞれ5 µg/mLの濃度を添加した。その後は、図17と同じ方法で行った。その結果、図18に示すように12C4'58抗体単独及び 4阻害抗体であるクローンR1-2単独投与では全く効果は得られないかあるいは微弱な効果しか得られなかったのに対し、12C4'58とR1-2の同時投与においては、約20%程度の顕明な細胞増殖抑制効果を示した。

30

[実施例14]

[抗ヒト 9インテグリン抗体の機能解析]

抗ヒト 9インテグリン抗体がFACSにて使用可能かをヒト 9/CHO-K1細胞、CHO-K1細胞、内在的に 9インテグリンを発現するヒト好中球を用いて検討した。ヒト好中球はFACSの方法は図2と同様な方法で行ったが、Fc受容体との非特異反応のブロックは、50%ヤギ血清を用いて行った。二次抗体はFITCラベルした抗マウスIgG抗体を使用した。その結果、図19に示すようにすべての抗ヒト 9インテグリン抗体はヒト 9/CHO-K1細胞とヒト好中球上の 9インテグリンを検出することができた。またすべての抗体は、ヒト 4/CHO-K1細胞には反応しなかった。これらの結果から、全ての抗ヒト 9インテグリン抗体が細胞上に発現するヒト 9インテグリンタンパク質をFACSにて検出することがわかった。

40

[実施例15]

9インテグリンのリガンドである、OPNとTenascin-C機能ペプチドを用いて、細胞接着試験を行った。細胞は、ヒト 9/CHO-K1細胞を用いて、各種抗 9

50

インテグリン抗体の阻害能の検討を行った。ペプチドは5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で固相し、抗体は5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で阻害を行った。図20に示すようにOPNに対する接着阻害試験では、クローン21C5が最も効果的な阻害活性を示した。1K11, 24I11の阻害効果は低かった。一方で、Tenascin-Cに対する接着阻害能は、Y9A2が最も効果的に阻害活性を示した。今回作製した抗 α 9インテグリン抗体4クローンはTenascin-Cに対してはあまり阻害活性を示さなかった。

既にヒト α 9インテグリンに対する中和抗体Y9A2は報告され、Chemicon社から製品化されているが、Y9A2は、ヒト α 9インテグリンを遺伝子導入したマウス線維芽細胞株L cellを通常の免疫法(腹腔内投与)で作製している。本発明の抗ヒト α 9インテグリン抗体はsubtractive immunization法で作製しており、免疫方法が異なっている。さらに図19で示すように、クローン21C5は、ヒト α 9/CHO-K1細胞のFACS図の検出パターンが異なっており、また、図20で示すように、細胞接着試験の阻害効果様式も異なっていることから、今回作製した抗 α 9インテグリン抗体4クローンはY9A2とはエピトープが異なっていると考えられる。

まとめ

マウス α 9インテグリンの機能を阻害する抗体の作製と疾患・病態における α 9インテグリンの機能を解明する目的で、マウス α 9インテグリンに対する4種のモノクローナル抗体と抗ヒト α 9インテグリン抗体を4種類作製した。これらの抗体を用いた研究で以下のことを明らかにすることができた。

(1) 作製した4種の抗マウス α 9インテグリン抗体は、全てFACS解析に利用可能であり、それぞれ異なる細胞接着阻害能を有した。

(2) 抗マウス α 9インテグリン抗体クローン12C4'58が免疫染色に利用できることが分かった。

(3) マクロファージ様細胞であるRAW264.7細胞、メラノーマ細胞であるB16-F1、B16-F10、B16-BL6細胞で α 9インテグリンは発現していた。マウス好中球では α 9インテグリン発現が観察されず、ヒトで発現が確認できたことから、好中球上の α 9インテグリンの発現には種間で差があることが示された。脾細胞のB220⁺CD3⁺細胞群やB220⁺CD3⁺細胞群において、一部 α 9インテグリンを発現する細胞群が存在した。また肝臓浸潤白血球の α 9インテグリン発現は、 α 4インテグリン発現細胞上に多く見られた。

(4) α 9と α 4インテグリンが同時に存在し、両者が認識するリガンドが存在する場合、その接着能は相補的であった。

(5) 抗マウス α 9インテグリン抗体により、肝炎治療効果を見出すことができ、その効果は抗マウス α 4インテグリン抗体により亢進した。

(6) 腱線維芽細胞上に α 9インテグリンの発現していることが分かり、腱線維芽細胞をトロンピン切断型OPNで刺激すると、MMP-13発現が亢進することが分かった。そのMMP-13亢進は、抗 α 9インテグリン抗体で阻害がかかることが分かった。

(7) B16-BL6細胞の増殖を抗 α 9インテグリン抗体で抑制できることが分かった。また、VCAM-1刺激による細胞増殖は、抗 α 9インテグリン抗体と抗 α 4インテグリン抗体を同時に併用投与することにより、単独投与を比べ、増殖抑制効果が亢進した。

(8) 作製した4種の抗ヒト α 9インテグリン抗体は、全てFACS解析に利用可能であり、それぞれ異なる細胞接着阻害能を有した。また、FACSや接着阻害試験により、既存の抗ヒト α 9インテグリン抗体Y9A2と異なる反応性を示したことから、エピトープが異なることが考えられた。

【産業上の利用可能性】

【0007】

本発明のモノクローナル抗体は、 α 9インテグリン機能抑制により、癌、例えば癌細胞の増殖、転移、そして炎症性疾患、例えば関節リウマチ、変形性関節症、肝炎、気管支喘息、線維症、糖尿病、癌転移、動脈硬化、多発性硬化症、肉芽腫、炎症性腸疾患(潰瘍性

10

20

30

40

50

大腸炎、クローン病)、自己免疫疾患等に対する治療効果を奏する。また、本発明の抗 9 インテグリン抗体と抗 4 インテグリン抗体の両者を含有する医薬組成物は、さらに改善された癌、炎症性疾患の治療効果を奏する。本発明のモノクローナル抗体は、マウス 9 インテグリンをも認識するので、マウスを用いた動物実験に利用できる。

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> Gene Techno Science Co., Ltd

<120> Anti alpha 9 integrin monoclonal antibody

<130> PCT05-0103

<150> 2005-6348

<151> 2005-01-13

<160> 17

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1035

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Gly Gly Pro Ala Ala Pro Arg Gly Ala Gly Arg Leu Arg Ala Leu
1           5           10           15
Leu Leu Ala Leu Val Val Ala Gly Ile Pro Ala Gly Ala Tyr Asn Leu
20           25           30
Asp Pro Gln Arg Pro Val His Phe Gln Gly Pro Ala Asp Ser Phe Phe
35           40           45
Gly Tyr Ala Val Leu Glu His Phe His Asp Asn Thr Arg Trp Val Leu
50           55           60
Val Gly Ala Pro Lys Ala Asp Ser Lys Tyr Ser Pro Ser Val Lys Ser
65           70           75           80
Pro Gly Ala Val Phe Lys Cys Arg Val His Thr Asn Pro Asp Arg Arg
85           90           95
Cys Thr Glu Leu Asp Met Ala Arg Gly Lys Asn Arg Gly Thr Ser Cys
100          105          110
Gly Lys Thr Cys Arg Glu Asp Arg Asp Asp Glu Trp Met Gly Val Ser

```


				405						410						415
Gln	Lys	Ile	Asn	Pro	Val	Leu	Arg	Met	Phe	Gly	Gln	Ser	Ile	Ser	Gly	
				420						425						430
Gly	Ile	Asp	Met	Asp	Gly	Asn	Gly	Tyr	Pro	Asp	Val	Thr	Val	Gly	Ala	
				435						440						445
Phe	Met	Ser	Asp	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Arg	Pro	Val	Ile	Thr	
				450												460
Val	Asp	Val	Ser	Ile	Phe	Leu	Pro	Gly	Ser	Ile	Asn	Ile	Thr	Ala	Pro	
				465												480
Gln	Cys	His	Asp	Gly	Gln	Gln	Pro	Val	Asn	Cys	Leu	Asn	Val	Thr	Thr	
				485												495
Cys	Phe	Ser	Phe	His	Gly	Lys	His	Val	Pro	Gly	Glu	Ile	Gly	Leu	Asn	
				500												510
Tyr	Val	Leu	Met	Ala	Asp	Val	Ala	Lys	Lys	Glu	Lys	Gly	Gln	Met	Pro	
				515												525
Arg	Val	Tyr	Phe	Val	Leu	Leu	Gly	Glu	Thr	Met	Gly	Gln	Val	Thr	Glu	
				530												540
Lys	Leu	Gln	Leu	Thr	Tyr	Met	Glu	Glu	Thr	Cys	Arg	His	Tyr	Val	Ala	
				545												560
His	Val	Lys	Arg	Arg	Val	Gln	Asp	Val	Ile	Ser	Pro	Ile	Val	Phe	Glu	
				565												575
Ala	Ala	Tyr	Ser	Leu	Ser	Glu	His	Val	Thr	Gly	Glu	Glu	Glu	Arg	Glu	
				580												590
Leu	Pro	Pro	Leu	Thr	Pro	Val	Leu	Arg	Trp	Lys	Lys	Gly	Gln	Lys	Ile	
				595												605
Ala	Gln	Lys	Asn	Gln	Thr	Val	Phe	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ser	Glu	Asp	
				610												620
Cys	Ala	Ala	Asp	Leu	Gln	Leu	Gln	Gly	Lys	Leu	Leu	Leu	Ser	Ser	Met	
				625												640
Asp	Glu	Lys	Thr	Leu	Tyr	Leu	Ala	Leu	Gly	Ala	Val	Lys	Asn	Ile	Ser	
				645												655
Leu	Asn	Ile	Ser	Ile	Ser	Asn	Leu	Gly	Asp	Asp	Ala	Tyr	Asp	Ala	Asn	
				660												670
Val	Ser	Phe	Asn	Val	Ser	Arg	Glu	Leu	Phe	Phe	Ile	Asn	Met	Trp	Gln	
				675												685
Lys	Glu	Glu	Met	Gly	Ile	Ser	Cys	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Phe	Leu	

690		695		700
Lys Cys Ser Val Gly Phe Pro Phe Met Arg Ser Lys Ser Lys Tyr Glu				
705		710		720
Phe Ser Val Ile Phe Asp Thr Ser His Leu Ser Gly Glu Glu Glu Val				
		725		735
Leu Ser Phe Ile Val Thr Ala Gln Ser Gly Asn Thr Glu Arg Ser Glu				
		740		750
Ser Leu His Asp Asn Thr Leu Val Leu Met Val Pro Leu Met His Glu				
		755		765
Val Asp Thr Ser Ile Thr Gly Ile Met Ser Pro Thr Ser Phe Val Tyr				
		770		780
Gly Glu Ser Val Asp Ala Ala Asn Phe Ile Gln Leu Asp Asp Leu Glu				
		785		800
Cys His Phe Gln Pro Ile Asn Ile Thr Leu Gln Val Tyr Asn Thr Gly				
		805		815
Pro Ser Thr Leu Pro Gly Ser Ser Val Ser Ile Ser Phe Pro Asn Arg				
		820		830
Leu Ser Ser Gly Gly Ala Glu Met Phe His Val Gln Glu Met Val Val				
		835		845
Gly Gln Glu Lys Gly Asn Cys Ser Phe Gln Lys Asn Pro Thr Pro Cys				
		850		860
Ile Ile Pro Gln Glu Gln Glu Asn Ile Phe His Thr Ile Phe Ala Phe				
		865		880
Phe Thr Lys Ser Gly Arg Lys Val Leu Asp Cys Glu Lys Pro Gly Ile				
		885		895
Ser Cys Leu Thr Ala His Cys Asn Phe Ser Ala Leu Ala Lys Glu Glu				
		900		910
Ser Arg Thr Ile Asp Ile Tyr Met Leu Leu Asn Thr Glu Ile Leu Lys				
		915		925
Lys Asp Ser Ser Ser Val Ile Gln Phe Met Ser Arg Ala Lys Val Lys				
		930		940
Val Asp Pro Ala Leu Arg Val Val Glu Ile Ala His Gly Asn Pro Glu				
		945		960
Glu Val Thr Val Val Phe Glu Ala Leu His Asn Leu Glu Pro Arg Gly				
		965		975
Tyr Val Val Gly Trp Ile Ile Ala Ile Ser Leu Leu Val Gly Ile Leu				

	980		985		990
Ile Phe Leu Leu Leu Ala Val Leu Leu Trp Lys Met Gly Phe Phe Arg					
	995		1000		1005
Arg Arg Tyr Lys Glu Ile Ile Glu Ala Glu Lys Asn Arg Lys Glu					
	1010		1015		1020
Asn Glu Asp Ser Trp Asp Trp Val Gln Lys Asn Gln					
	1025		1030		1035

<210> 2

<211> 1036

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Gly Gly Pro Ala Ala Ala Arg Thr Gly Ala Gly Gly Leu Arg Ala			
1	5	10	15
Leu Leu Leu Ala Leu Val Ala Ala Gly Val Pro Ala Gly Ala Tyr Asn			
	20	25	30
Leu Asp Ala Gln Arg Pro Val Arg Phe Gln Gly Pro Ser Gly Ser Phe			
	35	40	45
Phe Gly Tyr Ala Val Leu Glu His Phe His Asp Asn Thr Arg Trp Val			
	50	55	60
Leu Val Gly Ala Pro Lys Ala Asp Ser Lys Tyr Ser Thr Ser Val Lys			
65	70	75	80
Ser Pro Gly Ala Val Phe Lys Cys Arg Val His Thr Asn Pro Asp Arg			
	85	90	95
Arg Cys Thr Glu Leu Asp Met Ala Arg Gly Arg Thr Arg Gly Ala Pro			
	100	105	110
Cys Gly Lys Thr Cys Arg Gly Asp Arg Asp Asp Glu Trp Met Gly Val			
	115	120	125
Ser Leu Ala Arg Gln Pro Arg Ala Asp Gly Arg Val Leu Ala Cys Ala			
	130	135	140
His Arg Trp Lys Asn Ile Tyr Tyr Glu Ala Asp His Ile Leu Pro His			
145	150	155	160
Gly Phe Cys Tyr Leu Ile Pro Ser Asn Leu Gln Ala Lys Gly Lys Val			
	165	170	175

Leu Ile Pro Cys Tyr Glu Glu Tyr Lys Lys Lys Tyr Gly Glu Glu His
 180 185 190
 Gly Ser Cys Gln Ala Gly Ile Ala Gly Phe Phe Thr Glu Glu Leu Val
 195 200 205
 Val Met Gly Ala Pro Gly Ser Phe Tyr Trp Ala Gly Thr Leu Lys Val
 210 215 220
 Leu Asn Leu Thr Asp Asn Thr Tyr Phe Lys Leu Asn Asp Glu Ala Ile
 225 230 235 240
 Met Asn Arg Arg Tyr Thr Tyr Leu Gly Tyr Ala Val Thr Ala Gly His
 245 250 255
 Phe Ser His Pro Ser Ile Thr Asp Val Val Gly Gly Ala Pro Gln Asp
 260 265 270
 Glu Gly Ile Gly Lys Val Tyr Ile Phe Arg Ala Asp Arg Arg Ser Gly
 275 280 285
 Thr Leu Ile Lys Ile Phe Gln Ala Ser Gly Lys Lys Met Gly Ser Tyr
 290 295 300
 Phe Gly Ser Ser Leu Cys Ala Val Asp Leu Asn Met Asp Gly Leu Ser
 305 310 315 320
 Asp Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Phe Ser Glu Ile Arg Asp Glu Gly
 325 330 335
 Gln Val Thr Val Tyr Leu Asn Gln Gly His Gly Ala Leu Glu Glu Gln
 340 345 350
 Leu Thr Leu Thr Gly Asp Ala Ala Tyr Asn Ala His Phe Gly Glu Ser
 355 360 365
 Ile Ala Asn Leu Gly Asp Ile Asp Asp Asp Gly Phe Pro Asp Val Ala
 370 375 380
 Val Gly Ala Pro Lys Glu Glu Asp Phe Ala Gly Ala Val Tyr Ile Tyr
 385 390 395 400
 His Gly Asp Ala Asn Gly Ile Val Pro Lys Tyr Ser Met Lys Leu Ser
 405 410 415
 Gly Arg Arg Leu Asn Pro Thr Leu Arg Met Phe Gly Gln Ser Ile Ser
 420 425 430
 Gly Gly Ile Asp Met Asp Gly Asn Gly Tyr Pro Asp Val Thr Ile Gly
 435 440 445
 Ala Phe Leu Ser Asp Ser Val Val Leu Leu Arg Ala Arg Pro Val Ile
 450 455 460

Thr Val Asp Val Ser Ile Phe Leu Pro Gly Ser Ile Asn Ile Thr Ala
 465 470 475 480
 Pro Gln Cys His Asp Gly Gln Gln Pro Val Asn Cys Leu Asn Val Thr
 485 490 495
 Val Cys Phe Arg Phe His Gly Lys Asn Val Pro Gly Glu Ile Gly Leu
 500 505 510
 Asn Tyr Asn Leu Thr Ala Asp Val Ala Gln Lys Glu Lys Gly Gln Leu
 515 520 525
 Pro Arg Val Tyr Phe Val Leu Phe Gly Glu Thr Ala Gly Gln Val Ser
 530 535 540
 Glu Arg Leu Gln Leu Ser His Met Asp Glu Val Cys His His Tyr Val
 545 550 555 560
 Ala His Val Lys Arg Arg Val Gln Asp Val Ile Ser Pro Ile Val Phe
 565 570 575
 Glu Ala Ala Tyr Ser Leu Asp Glu His Val Met Gly Glu Glu Asp Arg
 580 585 590
 Glu Leu Pro Asp Leu Thr Pro Val Leu Arg Trp Lys Lys Gly Gln Arg
 595 600 605
 Ile Ser Gln Lys Asn Gln Thr Val Phe Glu Arg Asn Cys Gln Ser Glu
 610 615 620
 Asp Cys Ala Ala Asp Leu Gln Leu Arg Gly Lys Leu Leu Leu Ser Ser
 625 630 635 640
 Val Asp Glu Lys Thr Pro His Leu Ala Leu Gly Ala Val Lys Asn Ile
 645 650 655
 Ser Leu Asn Ile Ser Ile Ser Asn Leu Gly Asp Asp Ala Tyr Asp Ala
 660 665 670
 Asn Val Ser Phe Asn Val Ser Arg Glu Leu Phe Phe Ile Asn Met Trp
 675 680 685
 Gln Lys Glu Glu Met Gly Ile Ser Cys Glu Leu Leu Glu Ser Asp Phe
 690 695 700
 Leu Lys Cys Ser Val Gly Phe Pro Phe Met Arg Ser Lys Ser Lys Tyr
 705 710 715 720
 Glu Phe Ser Val Ile Phe Asp Thr Ser His Leu Ser Gly Glu Glu Glu
 725 730 735
 Ile Leu Ser Phe Ile Val Thr Ala Gln Ser Gly Asn Leu Glu Arg Ser
 740 745 750

Glu Ala Leu His Asp Asn Thr Leu Thr Leu Thr Val Pro Leu Val His
 755 760 765
 Glu Val Asp Thr Ser Ile Thr Gly Ile Val Ser Pro Thr Ser Phe Val
 770 775 780
 Tyr Gly Glu Ser Val Asp Ala Ser Asn Phe Ile Gln Leu Asp Asp Gln
 785 790 795 800
 Glu Cys His Phe Gln Pro Val Asn Ile Thr Leu Gln Val Tyr Asn Met
 805 810 815
 Gly Pro Ser Thr Leu Pro Gly Ser Ser Val Ser Ile Ser Phe Pro Ser
 820 825 830
 Arg Leu Ser Pro Gly Gly Ala Glu Met Phe Gln Val Gln Asp Met Val
 835 840 845
 Val Ser Gln Glu Lys Gly Asn Cys Ser Leu Gln Arg Asn Pro Thr Pro
 850 855 860
 Cys Ile Ile Pro Gln Glu Gln Glu Asn Ile Phe His Thr Ile Phe Ala
 865 870 875 880
 Phe Phe Ser Lys Ser Gly Arg Lys Val Leu Asp Cys Glu Lys Pro Gly
 885 890 895
 Ser Phe Cys Leu Thr Leu His Cys Asn Leu Ser Ala Leu Pro Lys Glu
 900 905 910
 Glu Ser Arg Thr Ile Asn Leu Tyr Met Leu Leu Asn Thr Glu Ile Leu
 915 920 925
 Lys Lys Asp Ser Ser Ser Val Ile Gln Phe Met Ala Arg Ala Lys Val
 930 935 940
 Lys Val Glu Pro Ala Leu Arg Val Val Glu Ile Ala Asn Gly Asn Pro
 945 950 955 960
 Glu Glu Thr Leu Val Val Phe Glu Ala Leu His Asn Leu Glu Pro Arg
 965 970 975
 Gly Tyr Val Val Gly Trp Ile Ile Ala Ile Ser Leu Leu Val Gly Ile
 980 985 990
 Leu Ile Phe Leu Leu Leu Ala Val Leu Leu Trp Lys Met Gly Phe Phe
 995 1000 1005
 Arg Arg Arg Tyr Lys Glu Ile Ile Glu Ala Glu Lys Asn Arg Lys
 1010 1015 1020
 Glu Asn Glu Asp Gly Trp Asp Trp Val Gln Lys Asn Gln
 1025 1030 1035

<210> 3
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 3
cgtggatccg agcgcattggc tgcggaagcg aggtgc 36

<210> 4
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 4
cagctcgagt cagtcattcat tgccttttgct gttgac 36

<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 5
gtcaagcttc tgggatggg cggccccggct gggctg 36

<210> 6
<211> 36

<212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 6
 cggctctagac acggtgggctc actggttttt ctggac

36

<210> 7
 <211> 4941
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 7
 cgggcccggg accgctcctt cegagagegc agacctctcg gcgggcatcg agaggacgcg 60
 gggcgctggc ggccgtccct ggcccttgcct cggctctcga ctgtagccca tcgccgcgct 120
 cggggcttag actcgtgagc gtacggctcc cgccccgggc agcggcggtg cccgggagcc 180
 ccgactcgcg gggcagggcg cagggcggct ggccggctgg ggatgggcgg cccggctgcg 240
 gcgcggaccg gcgccggagg gctccgcgcg ctgctgctgg cgctggctggc cgcgggggct 300
 ccggccggcg cctacaacct ggacgcgcag cgccccgtac gcttccaggc cccctcaggc 360
 tcttctctcg gctacgcggt gctggagcac tttccagaca acacgcgctg ggtcctctgt 420
 ggtgcaccga aggcagattc taaatatagc acttcagtaa agtctccctg agctgtgttt 480
 aagtgctgtg tccataccaa cctgaccgg agatgcaccg agctggacat ggctcgaggg 540
 aggactcgtg gtgcgccctg tgggaagacc tgcaggggag accgggatga cgagtggatg 600
 ggggtgagcc tggcccggca gccagagca gatggccgtg ttttggcctg tgcccatcgt 660
 tggaaaaaca tctactacga agcagaccac atcttgcctc atggattctg ctacctcctc 720
 ccttccaacc tccagccaa aggcaaggct ctgattccct gctacgaaga gtataagaag 780
 aagtatgggg aagaacatgg ctcttgcctg gccggaatag caggcttctt cacagaggaa 840
 ctggtggctc tgggtgcccc aggcctgctt tatttggctg ggacactcaa ggtgctgaac 900
 ctcaaggaca acacatattt taagttgaac gatgaagcga ttatgaacag acggtatact 960
 tatctgggct atgcagtac ggttggccac ttctctcctc catccatcac tgaigtggta 1020
 gggggtgccc cacaggatga aggcattgga aaggtttata tatttagagc tgaccgaaga 1080
 tcagggacct taataaagat ctctcaggea tcaggaaaaa agatgggctc ttacttccggc 1140
 tctctcttgt gtgcagctga cctgaacaig gacggcctct ctgacttctc cgtgggggct 1200

cccatgtttt cigagatcag agatgagggg caggtcaccg tctacctcaa ccaaggacat 1260
 ggagccctcg aggaacagct gacctgact ggagatgccg cctacaacgc gcactttggg 1320
 gagagcatcg ccaacctggg cgacattgat gatgacgggt tcccagatgt ggctgtcggg 1380
 gcacctaaagg aggaggactt tgcctggcga gctacatct atcatggtga tgccaatggg 1440
 attgtcccca agtactcaat gaagctgctt gggaggaggc taaaccgcac cctgcggatg 1500
 tttgggcagt ccataatcagg gggcattgat atggatggaa atggctatcc tgatgtcacc 1560
 atcggagcct tccctgcccga cagcgtgggt ctctcaggg ccagaccggt catcacgggtg 1620
 gatgtctcca tcttccigcc aggcctccat aacatcacag cacctcagtg tcacgatgga 1680
 caacagcctg tgaactgcct gaalgtcacc gtgtgcttcc ggttccatgg caagaatgta 1740
 ccaggagaaa tgggtctgaa ctacaatctg acggctgatg tggcacagaa ggagaagggc 1800
 cagctgcccc gagtctatct tgtgtgttt ggagagacgg cagggcaggt ctcagaaagg 1860
 ctgcagctgt cccacatgga cgaagtggt catcactac tggcccacgt caagcggaga 1920
 gtccaggatg tcatcagccc cattgtgttt gaagccgctt acagcctgga tgagcatgtg 1980
 atgggtgagg aagaccggga gctgccagac ctgacaccag tgcttcgctg gaagaaggga 2040
 caaaggatct cccagaagaa tcagacagtt ttgaaagga attgccaatc tgaggactgt 2100
 gctgccgacc tgcagcttcg ggggaaactc ctgcttcca gtgttgacga gaaaaccca 2160
 cacctggctt tgggggctgt gaaaaatctc tctetaaaca tctccatctc caaccttgga 2220
 gacgaagcct atgatgcaa cgigtcttt aatgtctcca gggaacttct tcttcatcaa 2280
 catgtggcag aaggaggaga tgggcatttc ctgtgagctg ctggaatcag acttctctca 2340
 gtgcagtggt ggatttctt tcaigaggic aaagictaag tatgaattca gtgtcatctt 2400
 tgatacaagc cacctgtctg gggaaagagga aatctcagc ttcactctga ctgctcagag 2460
 tggcaacttg gagcgtctg aagccctaca tgacaacact ctcaactga cagtgcctt 2520
 ggtgcatgaa gtggacacgt ccatcactgg aatgtgtcc ccaacctct tctgtatgg 2580
 cgagtctgtg gacgcatcca acttcatca gctggatgac caggagtgtc atttccaacc 2640
 agtcaacatt actctccagg tctacaacat gggctcccagc accttctctg ggtcatctgt 2700
 cagcatctcc ttecccagcc ggctgtcacc tggiggcga gagatgtttc aggtccagga 2760
 catgggtggtg agccaagaga agggtaactg ctctctacaa agaaaccga cccctgcat 2820
 catectcaa gaacaagaga acatcttcca caccatattt gttttctct ccaagtctgg 2880
 aagaaaagtg ttggactgtg aaaagccagg gagcttctgc ctaacgttgc actgcaacct 2940
 tagtgctctt ccgaaagagg agagccgcac catcaacctc tacatgtctc tgaacacaga 3000
 gatactgaag aaggacagct cctctgtcat ccagttcatg gctcgagcca aggtgaaggt 3060
 ggagcctgcc ctgagagtgg tggagatagc taacgggaac ccagaagaga ctctgggtgt 3120
 ctctgaggcc ttgcacaatc tggaaacccc tggctacgtt gtgggggtgga tcatgccc 3180
 cagtttgctg gtggggatcc tcatcttctt gctgctggct gtgctctgt ggaagatggg 3240
 ctcttccgc agaaggtaca aagagatcat tgaagctgag aaaaaccgga aagagaatga 3300
 agatggttgg gactgggtcc agaaaaacca gtgaccacc gtgccagica tgtgatgccc 3360

tcatgtcccc atcaccagcc tgtggtcctt gatctttgta tctttcatat ttggaagaaa 3420
 gaaatcttct ccagatitit cggaggcccc actgatgctg ttctcttctt catccccgtca 3480
 agcccgggtgc cgacctgaga tggccacccc tccagccagg tcacatgact ggggccacca 3540
 ccactcccc tctcaagatg aacttagaac ttggaaagg caagctacag agcaaagcaa 3600
 tatttatgga tgcaacatig cgtgggtcaac cctcagggga aaactgttac ctaaaagtat 3660
 tttttataaa tgtaagcctt ttatatigat catgtcttta taittgiatc aatgttttat 3720
 tattctatt aaatagtctt ataattcact caagcactga aatcttggaa atacatgtcc 3780
 ctgcatacaa atttttaaag agaaggaact tattctactt tggaacttgi tgttagggaa 3840
 gaaaaaaaa acttgcagat aaaacaaact gaagaaacct catgaaatga atccaccaag 3900
 ctggaggcac tgggaaagca caaaggacat ggcaaggccg cctaagacat ttatccccca 3960
 ttgttaccac ccggagttaa gttcagagag ctigaagtat cgggtgtttc tcttaaggac 4020
 ctctcactgg gagattctca gcaggaactg ggaatggaaag ctgtgtttcc tctcagcagt 4080
 tgcctgttac cacactgata catgcagcag gcaactaaacc ctctcttggga gtcagcaagt 4140
 gctggatgga caactggta acctcagaat agcatctcat cctaaacaac atgtgtcaga 4200
 gttcagagcc caggaccgaa gctgtgctct ctcagcaag gctgttttc tctgtgtgta 4260
 agctgttacc ttgttgtata algttaaac aagactctcc atttctctg tcaactcttc 4320
 tgtcccaaac tgggtgtgt gcagataact ccccagagag gatcacecca catggtttgt 4380
 gtttatgtct taggtggaat tctcaagagt cgaacctga aataggactt gggigttaat 4440
 aatttatgga ggaagtctc ccagaaggta acagttagga agttgagaat acaagacagg 4500
 agagtacagg gagccaggea acagtgtctt ttcaggggac aaccacagag gtggcttcaa 4560
 accagttgga tctaatgagc aagtcagact caggaacctg gacttttgtg atgccacgcc 4620
 tgcaggggat ataaacttc tgccttagg tcttgcctgac aagatgactc tgtctctag 4680
 aggagaactt tggggggcac cctcaagtaa ggagatccac aaatcatgca aagaactctg 4740
 agccaagagc tttagtctc cctccccca cacaagtga tgcctacctc agcttttgtgt 4800
 agccaaaaaa gccatgagtc taagctggtc ctaggagtea aacattacat ctgacctatg 4860
 accaagtcaa actcaacta aggaaggggc agcccccca aaaaaaaaa acagtgcaca 4920
 cccagctctt ttaagttat c 4941

<210> 8

<211> 7272

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 8

ctccaccaag agcgcattggc tgcggaagcg aggtgcagac cgaggctccc agggatcgcc 60

ctccgggaag cggatgatgct gtigtgttac ttccgggtgc caaccgggca ctctacaac 120
 ctggacccegg agaatgcaact gctgtaccag ggcccccccg gcacgctgtt tggtactctg 180
 gtgggtgctgc acagccacgg gtcgaagcgc tggtctatcg tgggggctcc cactgccagc 240
 tggctctcta atgcctcagt ggtcaatcct ggggcgattt acagatgcgg gatcagaaag 300
 aatccaaacc agacctgcga acagctccag ctgggtagcc ccagtggaga gccttgtggg 360
 aagacatgcc tggaggagag ggataaccag tggctggggg tcacccttc cagacagcct 420
 ggagaaaatg gctctatcgt gacttgtggg cacaggtgga aaaatatttt ttacatgaag 480
 agcdataaca aactccccac tggcatttgc tacgtcatgc ctctgattt gcggacagaa 540
 ctgagtaaaa ggatggcccc gtgttacaaa gattatacga gaaaatttgg agaaaatttt 600
 gcatcatgct aagctggaat atctagtttt tacacacagg atttaattgt gatgggggcc 660
 ccgggatcat cgtactggac tggcaccgtc ttigtctaca atataactac aaaccaatac 720
 aaagcatttg tagacagaca gaaccaagta aaatttggaa gctacttagg ctactcagtt 780
 ggagctggac attttcgaag tccacatact accgaagtcg tgggaggagc cctcaacac 840
 gaacagatag gaaaagcata tatatttagc attgatgaaa acgaactgaa catcgtatat 900
 gaaatgaaag gtaaaaagct tggctcatac ttggagctt ctgtctgcgc tgtggacctc 960
 aatgcagatg gcttctcaga tctcttgtt ggagctccca tgcagagcac catcaggagg 1020
 gaaggaagag tattcgtgta catcaactct ggcatgggag ctgtgatggt tgaatggaa 1080
 agggctcttg tcggaagtga caaatatgct gcaagatttg gggagtctat agcgaatctt 1140
 ggcgacattg acaatgacgg ctttgaagat attgctattg gtgcaccaca agaagacgac 1200
 ttgcgaggtg ctgtctacat ttacaatggc cgagtcgatg gaatctctc cacctactca 1260
 cagagaattg aaggacagca aatcagcaa tcattaagga tgtttggaca atctatctca 1320
 ggacaaattg atgcagacaa caatggatat gttgatgtag ccattgggtgc atttcaactct 1380
 gattctgcag tgttgctaag gacaaggcct gtagtgattg ttgaagcacc tttaaagccat 1440
 cctgagctg taaataggac aaagtttgac tgtactgaaa atggacttcc atctgtgtgc 1500
 atgcactta cactgtgttt ctcatataaa ggcaaagagg tcccaggcta catcgttttg 1560
 ttttacaatg tgagcttggg tgtgcacagg aaggcagagt ctccgtcaag attttatttc 1620
 ttctctaatg ggacttctga cgtgattaca ggaagcatal gagtttcaag cagtggagag 1680
 aatgtagga cacaccagc atctatgcgg aaagatgtgc gagacatct taccctcatt 1740
 catgtagagg ccacatacca ccttgggcat catgtgatca ccaaacgaaa cactgaggaa 1800
 ttccaccac tccagccgat ccttcagcag aagaaagaaa aagacgttat tagaaaaatg 1860
 ataaactttg caaggttttg tgctatgaa aattgctctg ctgatctcca agtttctgca 1920
 aaagttggat ttttgaagcc atatgaaaat aaaacctatc ttgctgttgg gagcatgaag 1980
 accataatgc taacgtgtc ctgttcaac gctggcgatg atgcttacga aaccactctg 2040
 aatgccaac tccccacagg cttttatttc attaagatct tagacctgga agagaaacaa 2100
 ataaactgcg aagtgactga gagctcagc atagtgaagc ttgctgtcag cctaggttac 2160
 atataiggg atgcctctc aaggatagac attagcttcc tcttgatgt gagctcactc 2220

agcagggcac atgaggacct cagcatcagt gtcgatgcct cctgtgaaaa cgagggtgaa 2280
 ttggaccaag tgagggacaa cagagtaacc ttaacgatac ctctaaggta tgaggttatg 2340
 ctgactgttc atgggcctgt gaacccaact tcatttgtgt atggatctag cgaagaaaac 2400
 gagccagaaa catgcatggc cgagaagcig aacctcactt tccatgttat aaactctggg 2460
 attagcatgg ctccaaatgt tagtgtgaaa ataatggtac caaattcttt tctccctcaa 2520
 gatgataagt gtctcaacgt ttggatgtc cagacaacta cagggcaatg ccattttaaa 2580
 cactatggaa gagagtgtac atttgcacag caaaaaggca tagcggggac gttgaccgat 2640
 atagtcaaat tcciatcaaa gacigataag agactccigt attgcatgaa agctgatcaa 2700
 cactgttttag atttcttatg caattctgga aaaatggaaa gtgggaagga agccagcgtt 2760
 catactcagc tggagggcag gccatccatc ttggaaatgg atgagaccic atcactcaag 2820
 ttgaaataa aagcaacagc tttccagag ccacacccaa aagtattga actaaataa 2880
 gatgagaacg tggcccatgt ttctttggaa gggctccatc atcaaagacc caaacgacat 2940
 ttccacatca ttattattac catcagcttg ctacttggac ttattgtact ttatttaatt 3000
 tcatgtgita tgtggaaggc tggattcttt aaaagacagt acaaacttat cctacaagaa 3060
 gaaaacagga gagacagctg gagttaigt aacagcaaaa gcaatgatga ctgaagactt 3120
 ctacactgag agaactgaaa aacacaggtt aggaaaaaga aatccctgtc agaagaccgc 3180
 tcagaatttc tctttttttt ccatgtgctt atgatttgt gacatactct tagtgcaggg 3240
 gaaatcttca agaaagaagc tacccaaagg tggcttgtca gcttcgggtgg atgagtgaag 3300
 caaaacacta aagctctgga tglaccggag aggtgaccig ttaagacaa cttaaagcta 3360
 gagagaatcc agactcagca gggccgactt aaagggaatg atttttcaac atcactgatg 3420
 aagtggctca tctcagtga atggatgcca tgalgtggaa acttgttggc ttcaaatact 3480
 ttatcttca aactatgac atgatctttg aatcactga gactcttca aatggctgtt 3540
 ccaagattgt ctaatggata agtcattttt tattagatat ttctttatt tacatttcaa 3600
 atgttatccc ctctctctagt tccactcca aaaatcccc atcctctccc ctgtccccig 3660
 ctccccaatc gaccactcc cgcttccctgg ccaagggctt cccctatct ggggaataga 3720
 accctcacag gaccaagggc ctctctctct attgacagag cacagggctc ccaatgaagg 3780
 agttagagaa aatacccaag gagctgaagg ggtttgcagc cccataggag gaacaacaat 3840
 atgaactaac cagtacccc agagctctt gggactaac caccaacca agaaaacaca 3900
 cggagagacg catggctcta gciggaatca tcatllttaa gcagaggacc tgaagactgc 3960
 tcttgggtgt gctgcatccc tggcctgtgt cctctacagc cttttactct gcagatagga 4020
 actgtaaaaat cctaaagaac aaaatccgtt tgcagcagga tggcttctgg ggaaaatggc 4080
 agctgcccagc tcttgtgtgt atgtacatat actllllttaa aggataaaaa tctcaatcta 4140
 ctcttttatt aagaacaccc aggaatagtt tgcactctct aagcttcacc tttaatacca 4200
 attcttaaga attttatect catagcagat tataaatac gcactttagc tgatacacac 4260
 tgatacaaca tgaactgcag ctactgatg atcgaaaatt gtgtgaagag agatttagga 4320
 accaatattt cataaaacat tcactgcatc aaattaigca aacatgagta tctgtctagga 4380

tattgttgtt tctcttggtc tggttgaata tacataaact aggactctaa aacaccacat 4440
tctgcatag aatggagac acaaaaatca tagttggaac tgcaaatcac tgatcaagtt 4500
tgigigcagt ggcacaaaaa tcccatgcg ataatgcatg ctgatgttg ttgaacaaga 4560
tactatttta aatgaaata gcttctacct gggtttcaca taatttgtct gtaattacaa 4620
tcattttigt agtatttatt tcatatatgt agtttgataa atgtaagttt tcatttgaat 4680
ctgtaatgig taagcaagct aaggccagac ttgaaacatg tgcctgggtaa aaggggcagc 4740
cttcagtggtt gtgaagaaag atcgctttac aggaagggtt tgatgccagc tggecccttc 4800
tcagatttcc tgacttgiga ggatggcttg ttcaaacgac tctggctgga gccgtggagg 4860
gaggttttga gtgctgaaac ttgagcatag agcatcagat ctgggtgagc agaaaccata 4920
tttaattaga tgcattatatt ttaagggat gcttttttgt gtaaaagggtt taagttagatg 4980
gttttcttat aaaaattcaa gtagttatit catgaggatg ccaaagttaa tagatgagaa 5040
atcaataatca ttttagacct accgtttcaa ggaatggctc ctgaggagag ttaaagtgtg 5100
atcatgcaac tgaaaaccga ctctgacctt tcaggtacaa aagaacgtag ctacctctg 5160
ggccacattt tgcaccaata gaaagaaata tttttatatt tattaataaa acttagaatt 5220
ttatataagc tttaaaatgt agttatttca aaagatgctg ttatgggatg ggttagtagaa 5280
tagtagccta agaggaaaga atgtttttta agtgggtgtt cgtggttatg ttactatctc 5340
actgtgaagt ctgagatttt acagaagttt tgttttacta ggttacagga gatactaaag 5400
aattatcttc aacaglatig agagagcaca atgttgtaa aattagatct aacaacacc 5460
ttccaaaaat caaaactttg attttttca ttaatttcat atttttgat tttcaaatc 5520
ctggctacta ttttaattat attaaaatatt ttaattgca ttaaagtaga tactttaatt 5580
atattaaaata gatagcttca ttaaaaatgt ttgcagtaa tctctccaac ccaaatatgc 5640
cttggcaatg aaaacacaac acagttaata tgattgcatg ctgtgcgctt agattgggca 5700
gatctactgc tacactactg tcttccacag cttatgagac ccttagaac ttgcggtttc 5760
tccaggccat gtgcttctgc tctgcttcaac tteacttcc tccccctctg cactctctc 5820
ctcttccatt tctctctctt tttctctccc taecttggc tccgcttcc cttttatctg 5880
cccaatcacc agctctctct tattttacaa attaagggtg gaatcaggtt tacaggaaat 5940
cacctgagtg ctgactcatt cctgttcaac aaccgctcat gggagaacag aattaacatc 6000
aaatataatt agccccaggg ctatcttcaa catttaccct cttctgtcca attaaaagac 6060
tattttatct cagatataat tgaacataac aattattatt ttgtaattta taaagtacag 6120
gagacctaac acccagttca tcatcttigt taattaaata aaaatctctg tcatctatcc 6180
ttacttaaaa gactatagtt ctgcaccctg ctagtctctg atctgaaaac cactctctca 6240
aatctattcc tctcaaagtg aaaagccctg gctcgccctga gactatgtag tttttcaacc 6300
tcaacataaaa tccaagaatg actgatatta actgaaaata tataggaagc ctaacatagc 6360
ttccaaaatt tagataattt gtgagacca ctggctactt ggacagtccc ttacttcaac 6420
agggtggagc ttgtalette aggcctactg ccttagtcat ctgacaagac ttagagaaac 6480
aagaatattt aggactagcc tactgtctct gcagaatcaa gctgtcctaa cctgtagttg 6540

tgtectttct ttggacagta ctatatctgt agatgaaatg agccaattct tgcctagtga 6600
 ctttcaccac aactagagta actcaaagat gctcagtttc ttctttgaat ccaagacagg 6660
 gaaagctgtc aggagcagac tagtctcaac aacaagtga taaataacat caaacttcac 6720
 attctgtgga ctctctgatgt ttttggaaaa ccaattatct atatgaagta atcigaactg 6780
 ttctctgaac ctctctcagc ctttctgat taaaataact gaaaacacce taacaataaa 6840
 ctacagacca agaatttctt atctgacct taactcacag gcttaaacat ctacagctctg 6900
 tttatcataa cagcaattga aggactgggt ctaagccttg tacttcaaaa tttttagtat 6960
 caaagacaac ctataataac caccctcagc cgcaaagctt agggaaactgg gatgatgat 7020
 ctacataact tcttcaagct gatatgggctg ttgagatatt ttigaaggaa gggggaagaa 7080
 tagggaaagg gggagttagt tggccttagg aaggccccac catgattgta ttagtttctg 7140
 atgtctctgt ctgactgga tccggatgaa aaaccaagat atcagttcag gcaagtcagt 7200
 tcagcatgtc tgaatgaa attcaccaag gctgtatatt ctgtaataa taaatctcaa 7260
 aaaaaaaaaa aa 7272

<210> 9
 <211> 3588
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 ccgcctcgg cgccctgtc gccgggcaga ggggaaggcg gccggctggg gatgggcggc 60
 ccggctgcgc cgaggggcgc cgggaggctc cgcgcctgc tgcctggcct ggtggctcgc 120
 gggatccccg cgggcgccta caacctcgac ccgcagcgc ccgtgcactt ccagggcccc 180
 gctgactcgt tcttcggcta cgcagttctg gagcatttc acgacaacac gccttgggtc 240
 ctgttgggcg caccaaagge agattccaaa tacagccctt cagtgaagtc tcttggggct 300
 gtgtttaagt gccgtgtca caccaccct gaccggagat gcaccgaact ggacatggct 360
 cgagggaaga atcggggcac gtcttgcgga aagacctgc ggggaagaccg cgatgatgag 420
 tggatggggg tgagcctgce ccgacagccc aaggetgat gccgtgtgtt ggcttctgtc 480
 catcctgga agaacatcia ctatgaagcc gaccacatc taccccatgg ctctctctac 540
 atcctccct ccaacctca ggccaaagge aggacactga tcccttgcct tgaagagtat 600
 aagaagaagt acggagagga acacggctcc tgcaggtc ggatagcggg ctctctcact 660
 gaggagctgg tggatgatgg tgcctcaggg tcatcttatt gggctggaac catcaaagtg 720
 ctgaacctta cggacaacac ctatttaaaa ctgaacgac aagtgatcat gaacaggcgg 780
 tacacctacc tgggctacgc agtgaccgtt ggcacttct ctaccctgc caccattgat 840
 gtggtaggag gtgccccaca ggacaaagge atcggaagg tttatatatt cagagctgac 900
 cgaagatcag gcaccttaat taagatcttt caagcatcag gtaaaaagat gggctcttac 960

ttcggctcct ccttgtgcgc agttgacctg aatggggacg gcctctctga cctgctggtg	1020
ggggcccca tgtttctga gatcaggat gagggacagg tcactgtcta cataacaga	1080
ggaaatggag cctcagagga gcagctggct ctgactgggg atggtgcta caatgcgcac	1140
tttgagaga gcattgccag cctggacgat ctggacaatg atgggttccc agatgiggcc	1200
attggtgcac ccaaggagga tgacttcgca ggggcggict atactatca tgggatgcc	1260
ggtgggatag tccctcagta ctcaatgaaa ctgtctgggc agaagataaa tccagtgcct	1320
cggatgtttg gtcagtcct atcgggaggc attgatatgg atggaaatgg ctatcctgat	1380
gtcactgttg gagecttcat gtccgacagc gtggttcttc tcagagcaag gcctgtcatt	1440
acggtggatg tctccatctt cctcccgggc tccatcaaca tcacagcgc tcagtgtcac	1500
gacggacagc agcctgtgaa ctgctgaac gtcaccacct gcttcagctt ccatggcaaa	1560
cacgttccag aagagattgg cctgaattat gttctgatgg ctgacgtggc caaaaaggag	1620
aaggccaga tgcccagggt ctactttgtg ctgctgggag agaccatggg tcaggtcaca	1680
gagaagctgc agctgactta catggaggag acgtgtctgc actatgtggc ccatgtgaag	1740
cggaggggtgc aggacgtcat cagcccgatc gtgtttgaag cagctacag cctcagtgag	1800
catgtgactg gagaggagga gaggaactg ccgctctga caccagttct ccgctggaaa	1860
aagggacaaa agatlgccca aaagaatcag actgtttttg aaaggaattg ccgttcagag	1920
gactgtgccg cagacctgca gcttcagggt aaactgtctgc tctccagtat ggalgagaaa	1980
acctgtatc tagctttggg ggctgtgaag aacatctccc taacatctc tateccaac	2040
cteggagatg atgctatga tgccaacgtg tcttcaatg tttcccggga gctctcttc	2100
ataacatgt ggcagaagga ggagatgggc atctctgtg agctgtctgga atcggacttc	2160
ctcaaatgca gcgtgggatt tctttcatg aggtcaaagt caaagtatga attcagcgtg	2220
atctttgata caagccacct gcttggggaa gaggaagttc tcagcttcat tgttactgt	2280
cagagtggca acagggagcg ctctgaaatc ctgcatgaca acacctcgt gctgatggtg	2340
ccactgatgc acgaggtgga cacgtccate accggaatca tglctccaac ctctttgta	2400
tatggcgagt ccgtggacgc agccaacttc attcagctgg atgacctgga gtgtcacttt	2460
cagcccatca atatccctc tcaggctctac aacactggcc caagcacct tccagggtca	2520
ctgtcagca tctcttccc taatcgactc tcactgggtg glgcagagat gtttcatgtc	2580
caggaaatgg tgggtggcca agagaaggga aactgtcttt tccagaaaa cccaactccc	2640
tgcateatc ctcaagaaca agaaaatate tccacacaa tatttcttt tttcacaag	2700
tctggaagaa aagctttgga ctgtgaaaaa ccaggaattt ctgctaac agcacactgt	2760
aactttagtg ctcttgctaa agaagaaagt cgtactatag acatttcat gctgtgaac	2820
acagaaatac tgaaaaagga cagttcgtct gtcatecagt tcatgtcccg cgccaagggtg	2880
aagggtgatc ctgcccctaa ggtgggtggaa atagctcatg ggaaccaga agaggtagc	2940
gtggtcttcg aggcctgca caatctggag ccccggtgct acgtctggg gtggatcctc	3000
gccatcagtt tgttgggtgg aatctcctc tctctgtctg tggcctgtct gctctggaag	3060
atggcttct ttcgccgaag gtacaaagaa attatcgaag ctgagaagaa ccggaagag	3120

aatgaagaca gttgggactg ggteccagaaa aaccagttag ctgccacacc agtcacatga	3180
ccigatcact agccigicat ccitggctct tgtatcttcc atatttggaa aaaaaaaaaatc	3240
ttctccagat ttctcggagg ccccacigat gcigtctctt tcttcattct atcaagccca	3300
ggtgccagcc tgaggcagcc acttcggcca ggtcacacga ccgggggcag caccacttcg	3360
ctttaagac tctgaacttt ggagagttag agagccgagc aataattagg atgcaacacg	3420
catggtcacc ctacggggaa aactgttaaa gtatttttat aaatataagc cttttatact	3480
gattattctt ttataattgt atcgatatta ttctattaa atagtataa ttactcaag	3540
cactgattct ggctaaaaat ctgggaagtc catgaataca aattttaa	3588

<210> 10

<211> 4932

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ggcagggcac acctggattg cattagaatg agactcacta cccagttcag gtgtgttgcg	60
ttgtgggtct ceggeacatt tcagaggctg attaggacc tgaccccaca ctggggttta	120
caccctaaa agcagggtgtg tcccgtagca actgagtggg tgcgtgaaaa ggggggatca	180
tcaattacca gctggagcaa tcgaatcggg taaatgtgaa tcaagtcaca gtgcttctt	240
aaccaacct ctctgttggg gtcagccaca gcctaaaccg cctgccgttc agcctgagag	300
gctgctgcta gctgctcac gcatgcagcc cgggctgcag aggaagtgtg gggaggaagg	360
aagtgggtat agaaggggtg tgagatgtgg gtcttgaaga gaatagccat aacgtcttg	420
tcactaaaat gttecccagg ggcttcggc gactctttt gtttggttt ttgtttttaa	480
tcgtggctc ttgataattt atctagtgtt gcctacacc tgaaaaaaa gacacaggt	540
ttactatca acgaaagaac tggacggctc cccgccgag tcccactccc cgagtttgtg	600
gctggcattt gggccacgcc gggctgggcg gctcacagcg aggggcgcgc agtttgggt	660
cacacagctc cgttcttagg cccaaccac cgttaaaagg ggaagccctg gcccacag	720
gtccgctctt gctgagccca gagccatccc gcgctctgcg ggcctgggagg cccgggcccag	780
acgcgagtcc tgcgcagccg aggttccca gcgccccctg cagccgcgcg taggcagaga	840
cggagcccgg ccttgcctt cgcaccacg cccgggacce caccagcgg cccgtaccg	900
gagaagcagc gcgagcacc gaagctcccg gctcggcggc agaaaccggg agtggggccg	960
ggcgagtgcg cggcaccaca ggccggcccg aacgtccgct cgcgggtgggc cgacttccc	1020
tcctctccc tetctctt ctttagcccg ctggcggcg acacgtgcg cctcatctt	1080
tggggcgtt tcccctgtt gccaacgtg gcatcccgt caactttggg gtagtgccg	1140
cttagtgtt aatgttccc accgagagcg catggcttgg gaagcagagc gcgaaccgg	1200

gccccgaagc cgccgtccgg gagacggiga tgcgtgtgct gtgccitggg gtccccgaccg 1260
gccgccccta caacgtggac acigagagcg cgtgcttta ccagggcccc cacaacacgc 1320
tgtteggcta cteggtegtg ctgcacagcc acggggcgaa ccgatggctc ctatgtgggtg 1380
cgcccactgc caactggctc gccaacgctt cagtgateaa tcccggggcg atttacagat 1440
gcaggatcgg aaagaatccc gcccagacgt gegaacagct ccagctgggt agccctaag 1500
gagaaccttg tggaaagact tgtttggaag agagagaaa tcagtggttg ggggtcacac 1560
tttccagaca gccaggagaa aatggatcca tctgtacttg tgggcataga tggaaaaata 1620
tattitacat aaagaatgaa aataagctcc ccaactgggtg ttgctatgga gtgccccctg 1680
atttacgaac agaactgagt aaaagaatag ctecggttta tcaagattat gtgaaaaat 1740
ttggagaaaa ttttgcata tgtcaagctg gaataaccag tttttacaca aaggattiaa 1800
ttgtgatggg ggccccagga tcatcttact ggactggctc tctttttgtc tacaataaa 1860
ctacaaataa atacaaggct tttttagaca acaaaaatca agtaaaattt ggaagtatt 1920
taggatattc agtcggagct ggtcattttc ggagccagca tactaccgaa gtagtcggag 1980
gagctcctca acatgagcag attggtaagg catatatatt cagcattgat gaaaaagaac 2040
taaatacttt acatgaaatg aaaggtaaaa agcttggatc gtactttgga gcttctgct 2100
gtgctgtgga cctcaatgca gatggcttct cagatcigt cgtgggagca cccatgcaga 2160
gcaccatcag agaggaagga agagtgtttg tgtacatcaa ctctggctcg ggagcaglaa 2220
tgaatgcaat ggaacaaaac ctctgtggaa gtgacaaata tgcctgcaaga ttgggggaat 2280
ctatagttaa tcttggcgac attgacaatg atggcttga agatgttgct atcggagctc 2340
cacaagaaga tgaactgcaa ggtgctatft atattitaaa tggccgtgca gatgggatct 2400
cgtcaacctt ctacagaga attgaaggac ttcagatcag caaatcgtta agtatgtttg 2460
gacagctiat atcaggacaa attgatgcag ataataatgg ctatgtatgat glagcagttg 2520
gtgcttttctg gctgtatct gctgtcttgc taaggacaag acctgtagta atigttagc 2580
cttctttaag ccacctgag tcaagtaata gaacgaaatt tgaactgtgtt gaaaaatgat 2640
ggccttctgt gtgcatagat ctaacacttt gtcttcata taaggcaag gaagttccag 2700
gttacattgt tttgtttat aacatgagtt tggatgtgaa cagaaaggca gagctccac 2760
caagattcta tttctctct aatggaactt ctgacgtgat tacaggaagc atacaggtgt 2820
ccagcagaga agctaactgt agaacacatc aagcatttat gcgaaagat gtgcgggaca 2880
tctcaccctc aattcagatt gaagctgctt accaccttgg tctcatgtc atcagtaaac 2940
gaagtacaga ggaattccca ccaactcagc caattcttca gcagaagaaa gaaaaagaca 3000
taatgaaaaa aacaataaac tttgcaaggt ttigtgcccc tgaaaattgt tctgctgatt 3060
tacaggttct tgc aaagatt gggtttttga agccccatga aaataaaaca tctctgtctg 3120
ttgggagtat gaagacattg atgttgaatg tgccttgtt taatgctgga gatgatgat 3180
atgaaacgac tctacatgtc aaactaccg tgggtcttta tttcattaag attttagagc 3240
tggagagaa gcaataaac tgtgaagta cagataactc tggcgtggtc caacttgact 3300
gcagtattgg ctatataat gtagatcact tctcaaggat agatattagc tttctctgg 3360

atgtgagctc actcagcaga gcggaagagg acctcagiat cacagtgcac gctacctgtg 3420
 aaaatgaaga ggaaatggac aatctaaagc acagcagagt gactgtagca atacctitaa 3480
 aatatgaggt taagctgact gticcatgggt ttgtaaacce aacttcattt gtgtatggat 3540
 caaatgatga aaatgagcct gaaacgtgca tgggtggagaa aatgaactta actttccatg 3600
 ttatcaacac tggcaatagt atggctccca atgttagtgt ggaaataatg gtaccaaaat 3660
 cttttagccc ccaaactgat aagctgttca acattttgga tgcacagact actactggag 3720
 aatgccactt tgaanaattat caaagagtgt gtgcattaga gcagcaaaag agtgcfaatgc 3780
 agaccttgaa aggcatagtc cggttcttgt ccaagactga taagaggcta ttgtactgca 3840
 taaaagctga tccacattgt ttaaatttct tgtgtaattt tgggaaaatg gaaagtggaa 3900
 aagaagccag tgttcatac caactggaag gccggccatc cattttagaa atggatgaga 3960
 cticagcact caagttttaa ataagagcaa caggttttcc agagccaaat ccaagagtaa 4020
 ttgaactaaa caaggatgag aatgttgcgc atgttctact ggaaggacta catcatcaaa 4080
 gacccaaacg ttatttcacc atagigatta ttccaagtag ctgtctactt ggacttatig 4140
 tacttctgtt gatctcatal gttatgtgga aggcctggctt ctttaaaaga caatacaaat 4200
 ctatctaca agaagaaaac agaagagaca gtggagatta tatcaacagt aaaagcaatg 4260
 atgattaagg acttctttca aattgagaga atggaaaaca gactcagggt gtagtaaaga 4320
 aatttaaaag acactgttta caagaaaaaa tgaattttgt ttggacttct ttactcattg 4380
 atcttgtgac atattatgtc ttcatgcaag gggaaaatct cagcaatgat tactctttga 4440
 gatagaagaa ctgcaaaggt aataatacag ccaaagataa tctctcagct tttaaatggg 4500
 tagagaaca ctaaagcatt caatttattc aagaaaagta agcccttgaa gatactttga 4560
 aatgaaagta taactgagtt aaattatact ggagaagctt tagacttgaa atactactta 4620
 ccataatgtc ttgctcagc aaaatgaacc cactgggtg ggcagaggtt catttcaaat 4680
 acatctttga tacttgttca aaatatgttc tttaaaaata taatttttta gagagctgtt 4740
 cccaaatfff ctaacgagtg gaccattatc actttaaage ccittatitaa taatacattt 4800
 cctacgggct gtgttccaac aaccattttt tticagcaga ctatgaatat tatagiatta 4860
 taggcaaac tggcaaacct cagactgaac atgtacactg gtttgagctt agtgaaatga 4920
 cticcggaat ct 4932

<210> 11
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 11
acgctcgagt gtacctggtt ccccaccgag agcgca 36

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 12
tcactagat taatcatcat tgcttttact 30

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 13
tcgaagcttc tggggatggg cggcccggct 30

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 14
acctctagat cactggtttt tctggacceca 30

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
5

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Gly Arg Gly Asp Ser
5

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Ala Glu Ile Asp Gly Ile Glu Leu
5

【 図 2 - 2 】

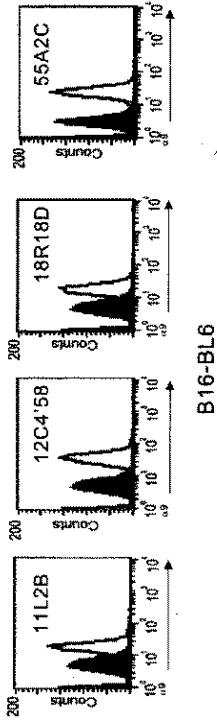


図 2 (その 2.)

【 図 5 】

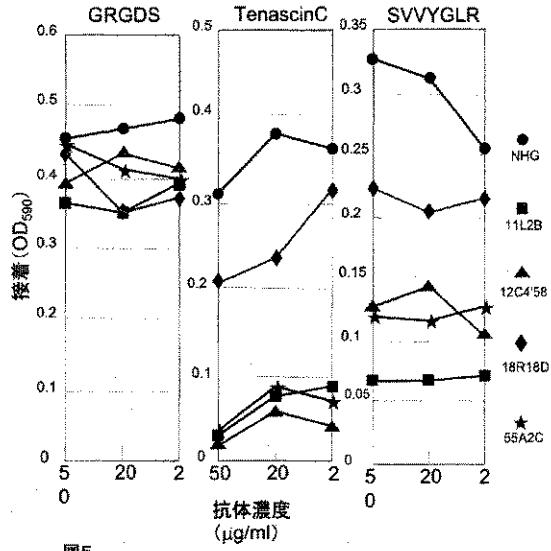


図 5

【 図 7 】

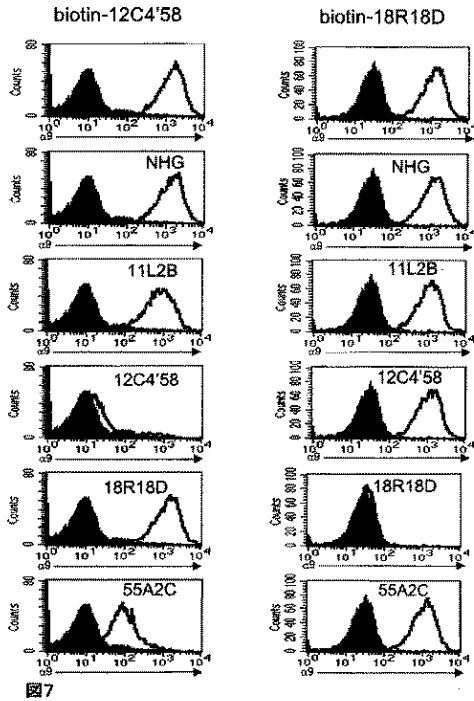


図 7

【 図 15 】

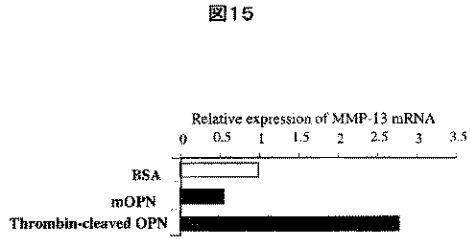


図 15

【 図 20 】

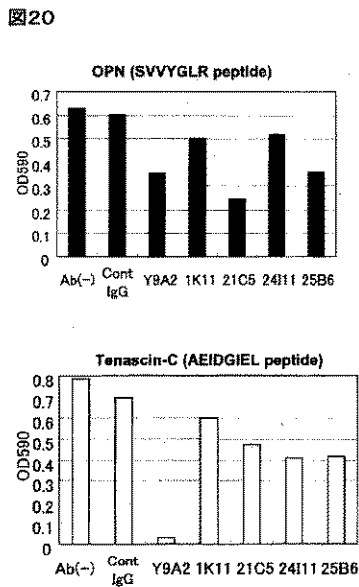


図 20

【 図 1 】

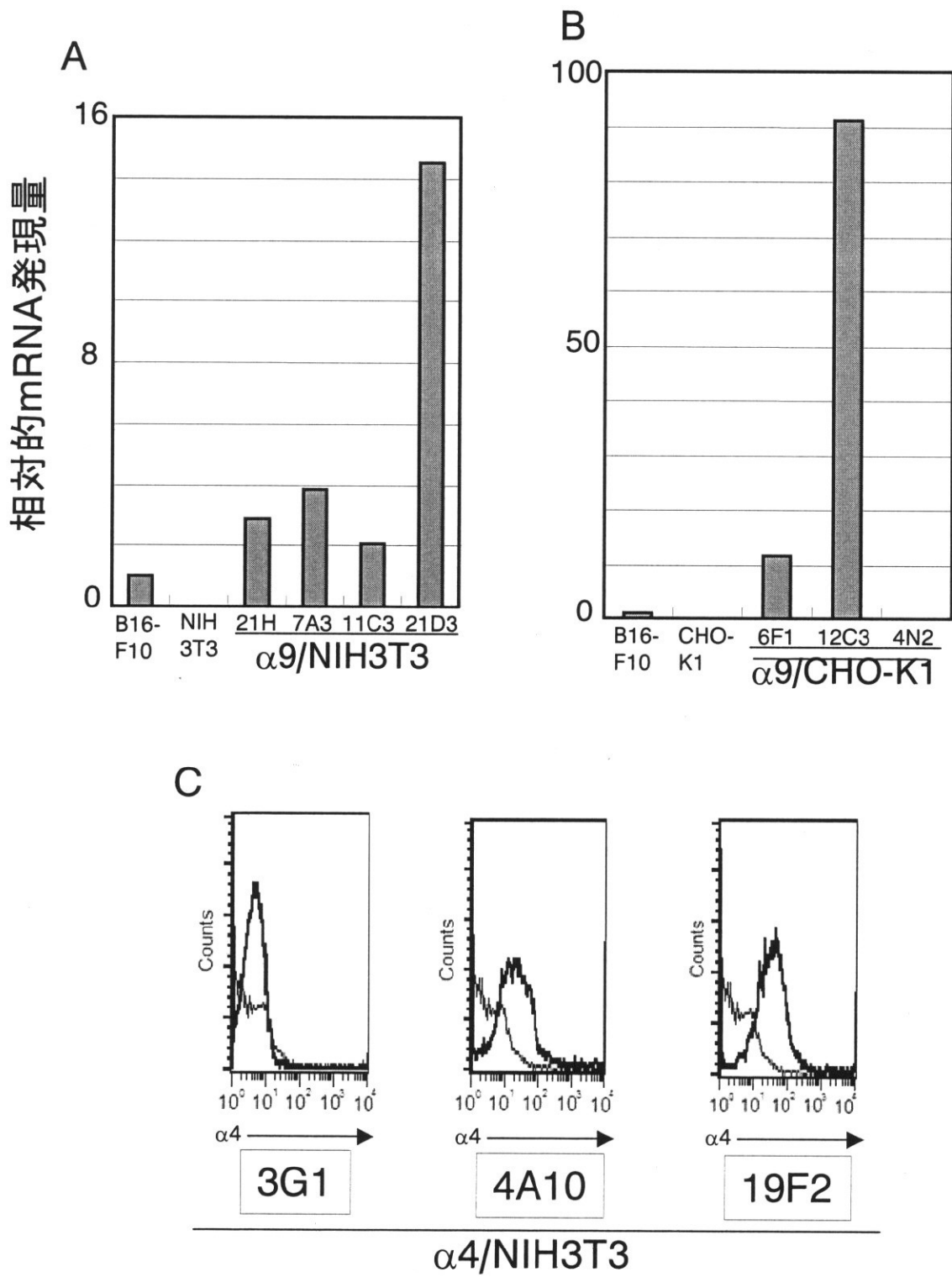
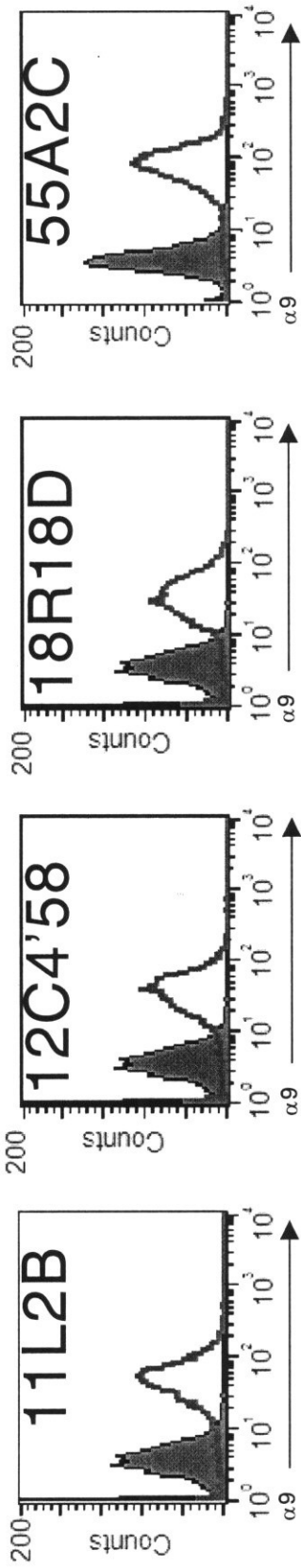


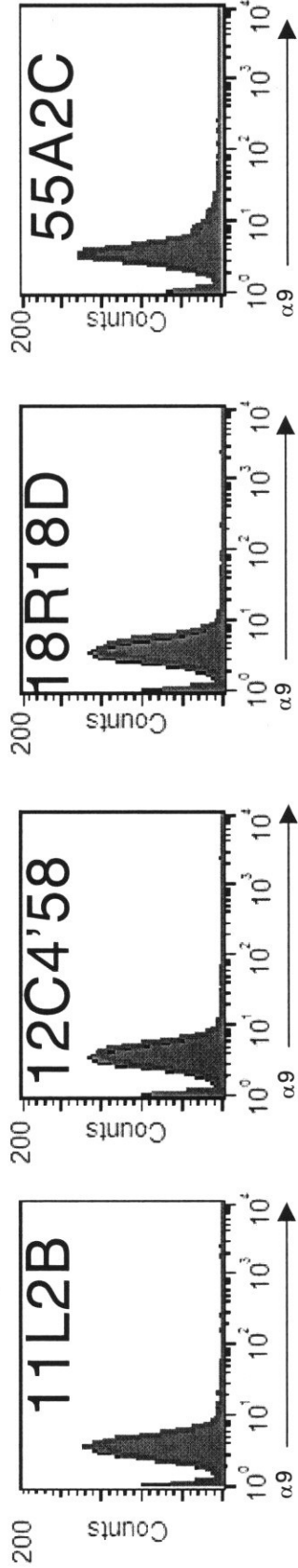
図1

【 図 2 - 1 】

図 2 (その 1)



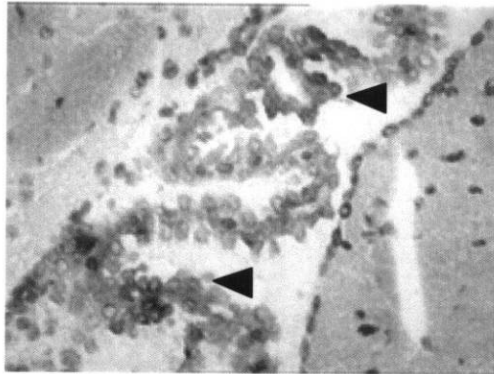
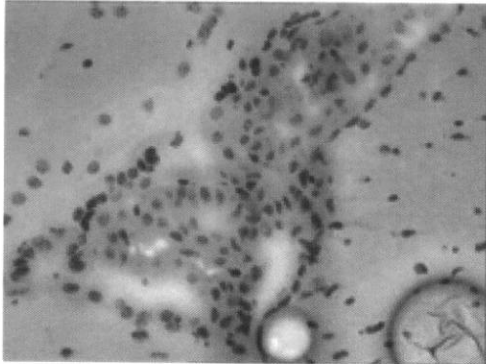
$\alpha 9 / \text{NIH}3\text{T}3$



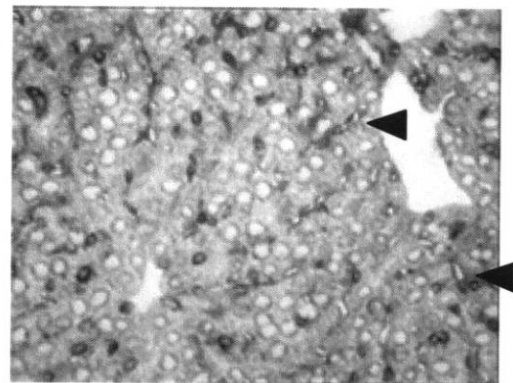
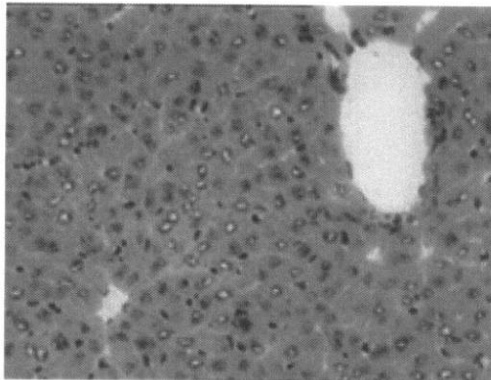
$\alpha 4 / \text{NIH}3\text{T}3$

【図3】

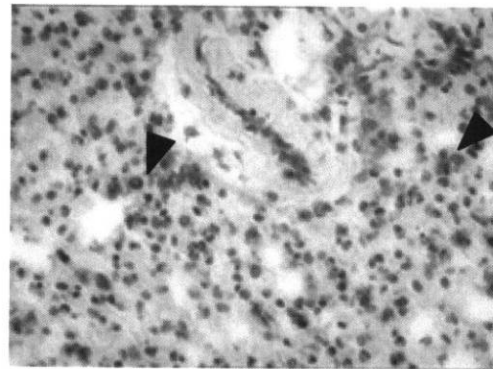
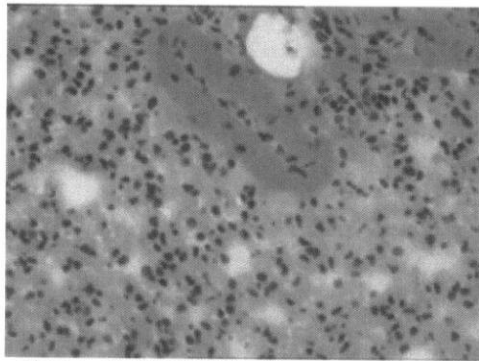
脳室 脈絡叢



肝臓 類洞細胞



肺胞 マクロファージ



筋肉 筋繊維芽細胞

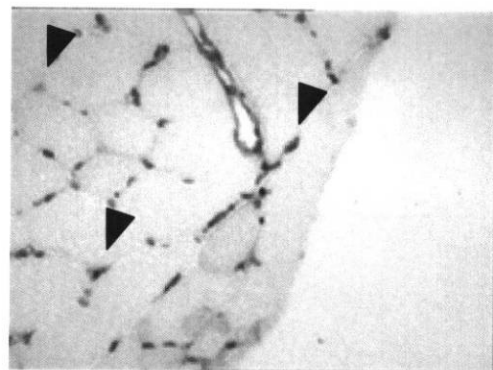
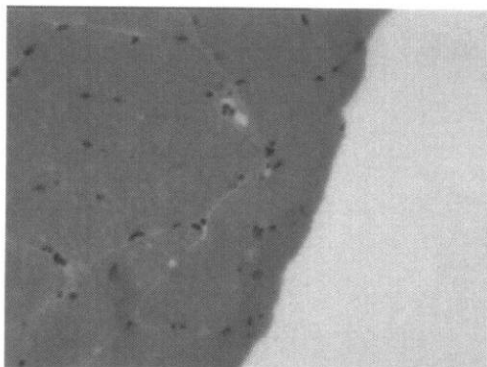


図3

【図4】

組織	α 9染色性
脳	脈絡叢
眼球	—
肺	＋、血管内皮・平滑筋・肺胞マクロファージ
肝臓	＋、類洞細胞
心臓	－、(血管内皮)
腎臓	＋、血管内皮・平滑筋・糸球体
胃	＋、平滑筋・粘膜筋板
筋肉	＋、血管内皮・筋芽細胞・リンパ管
子宮	＋、血管内皮・平滑筋・動脈平滑筋

図4

【 図 6 】

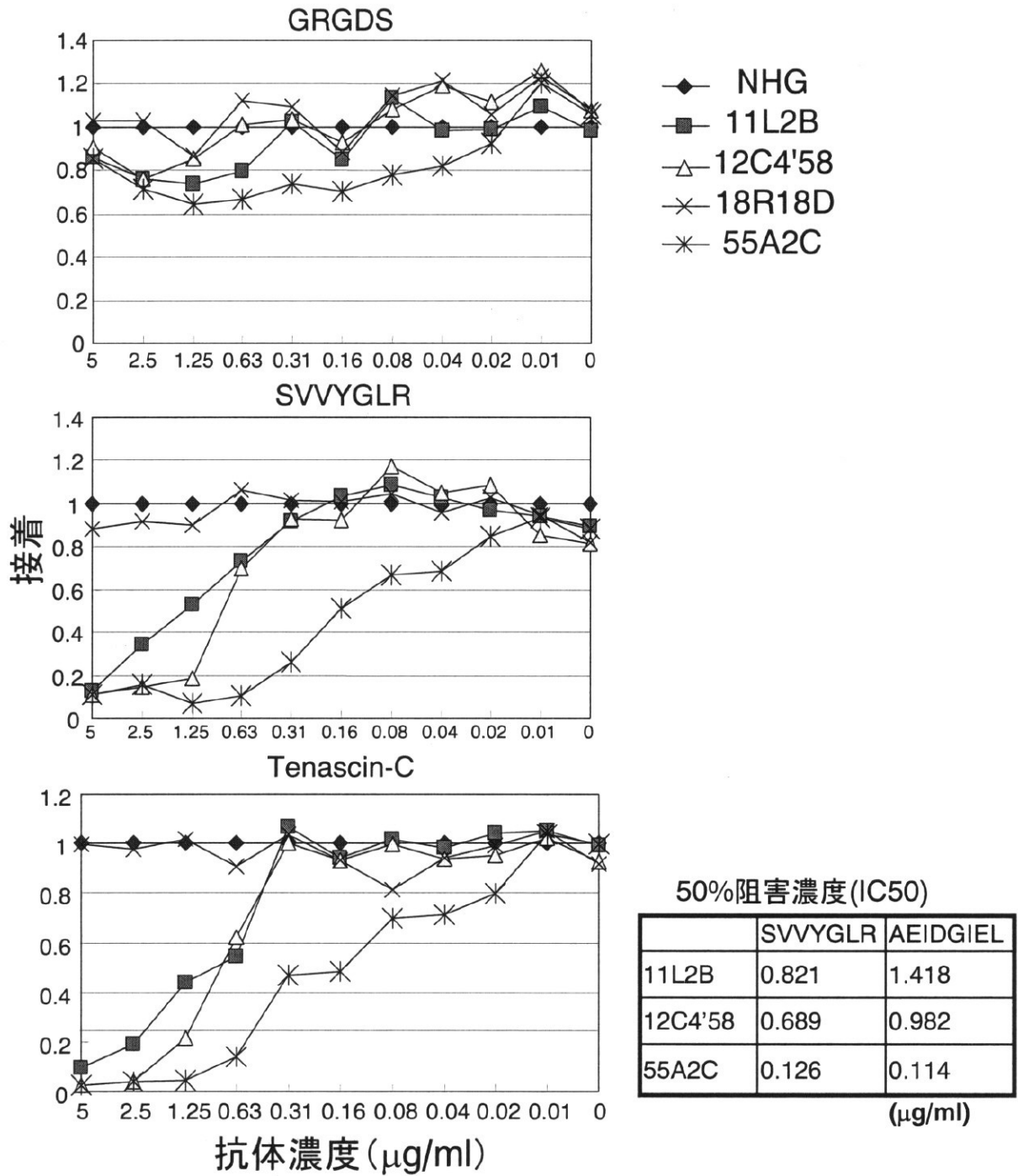


図6

【 図 8 】

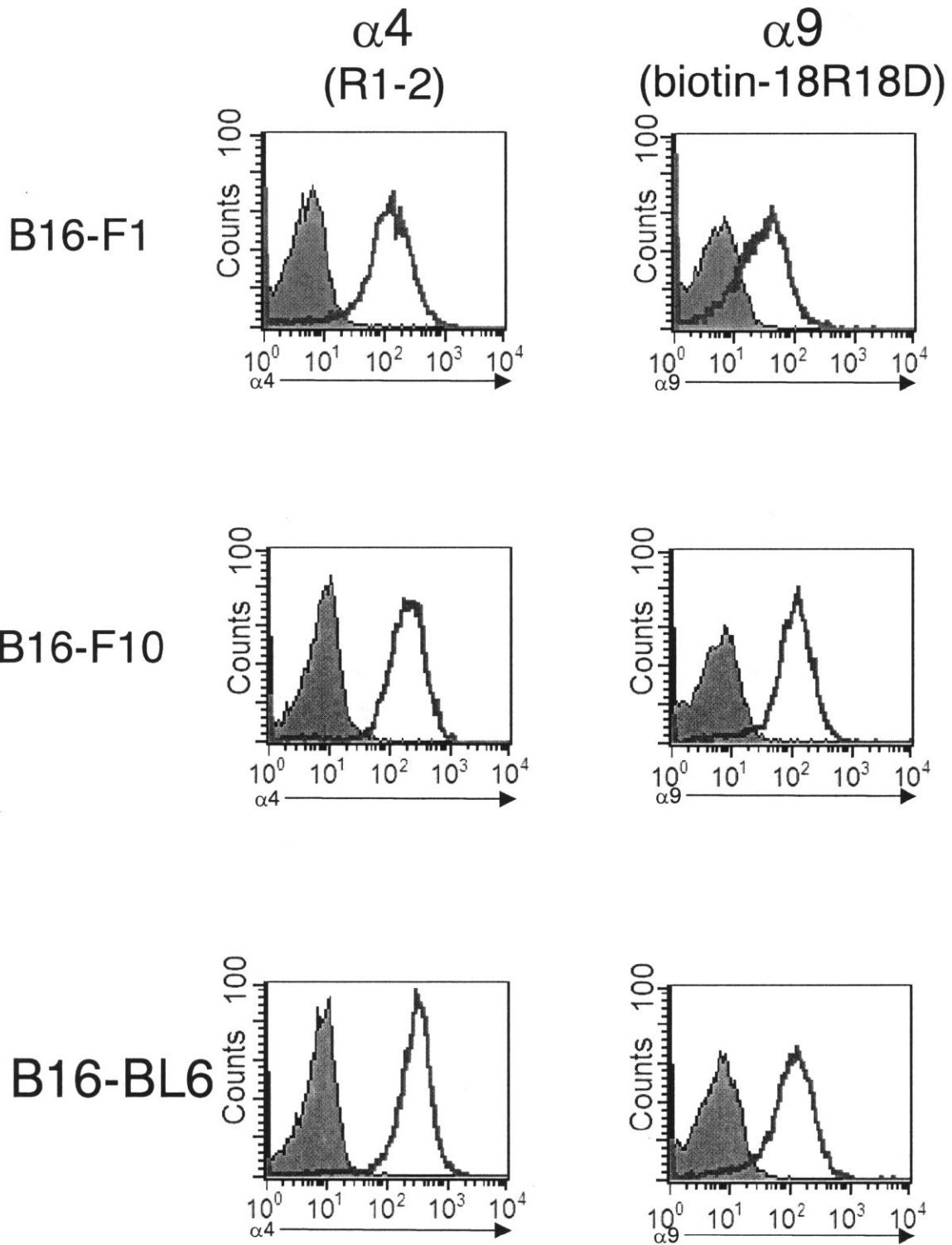


図8

【 図 9 】

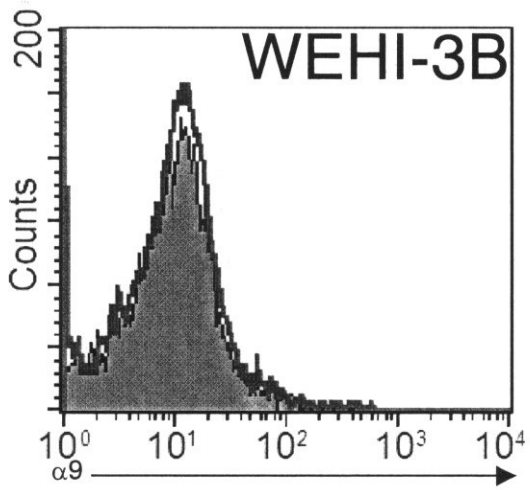
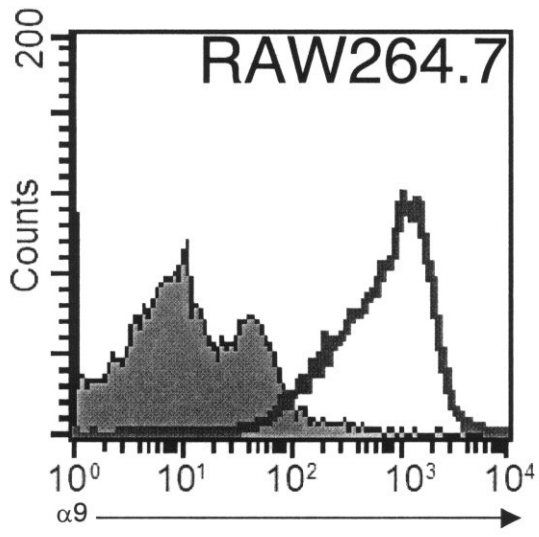


図9

【 図 10 】

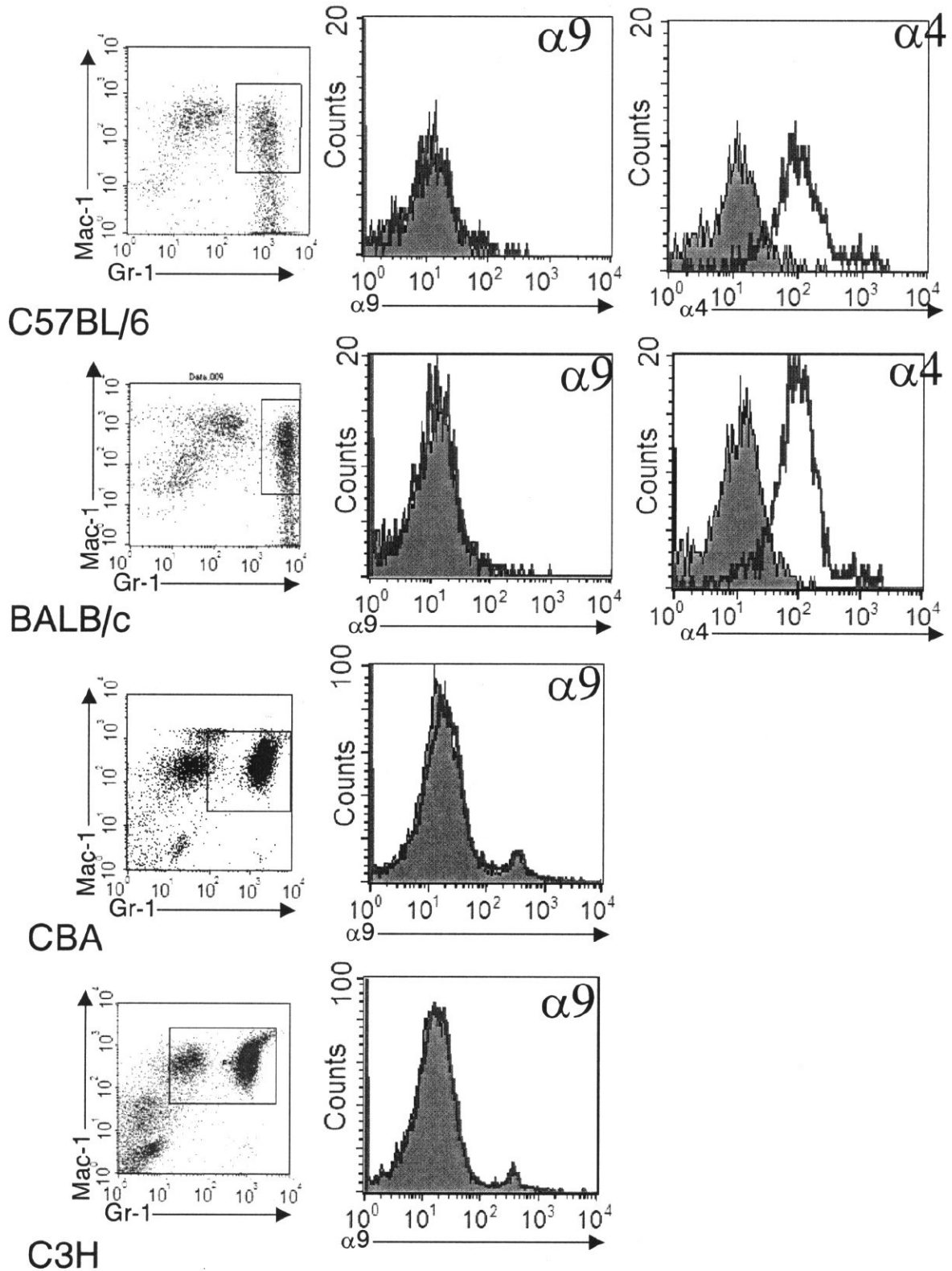
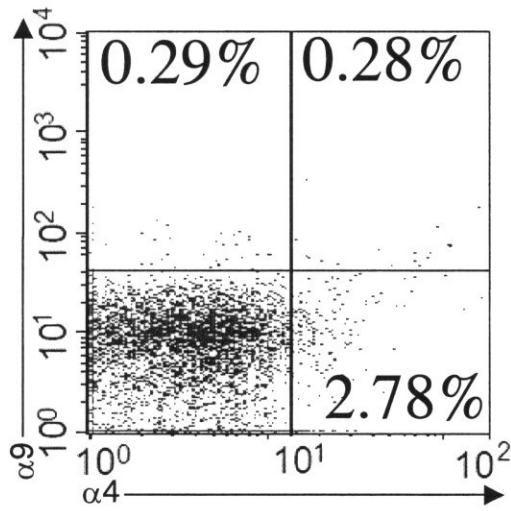


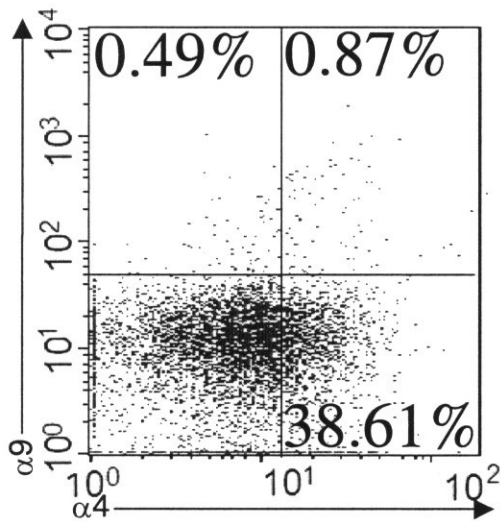
図10

【 図 1 1 】

A
 $\alpha 9$ Ab(-)
 $\alpha 4$ Ab(-)



B
 $\alpha 9$ Ab(-)
 $\alpha 4$ Ab(+)



C
 $\alpha 9$ Ab(+)
 $\alpha 4$ Ab(+)

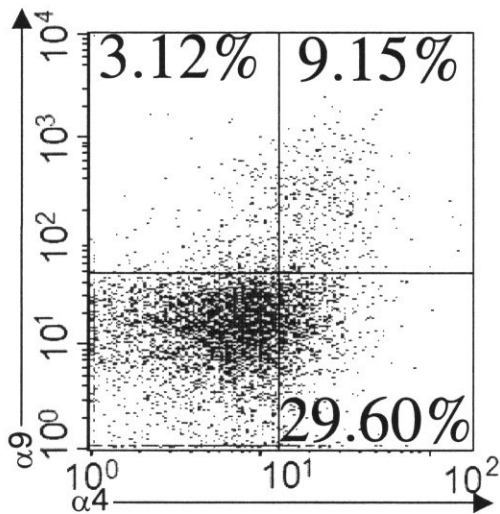
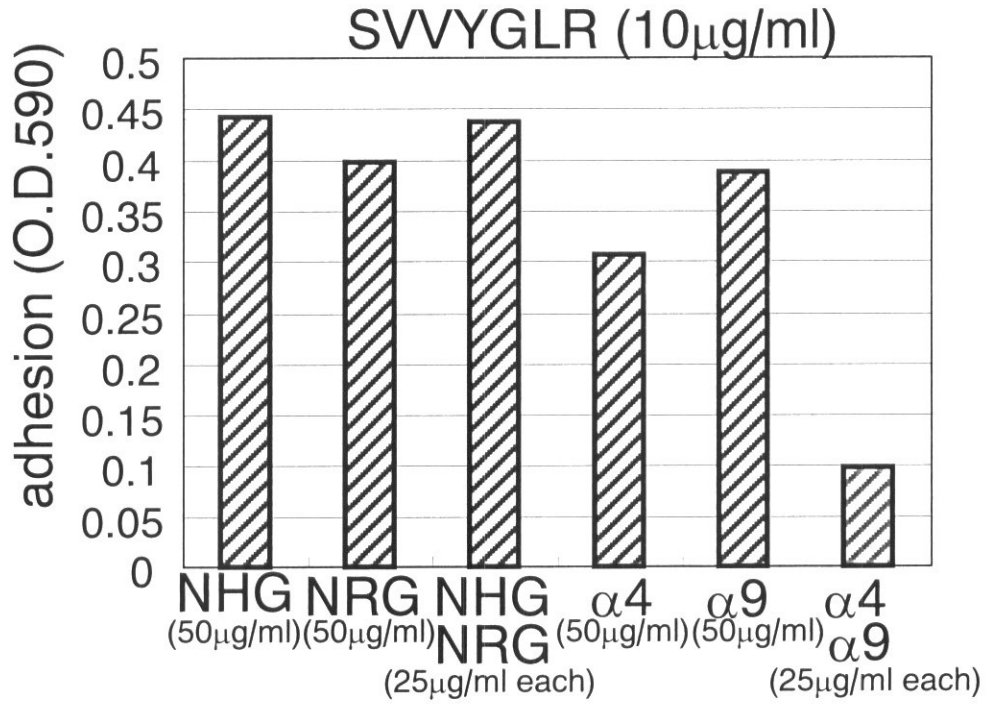


図 1 1

【図 1 2】

実験 1



実験 2

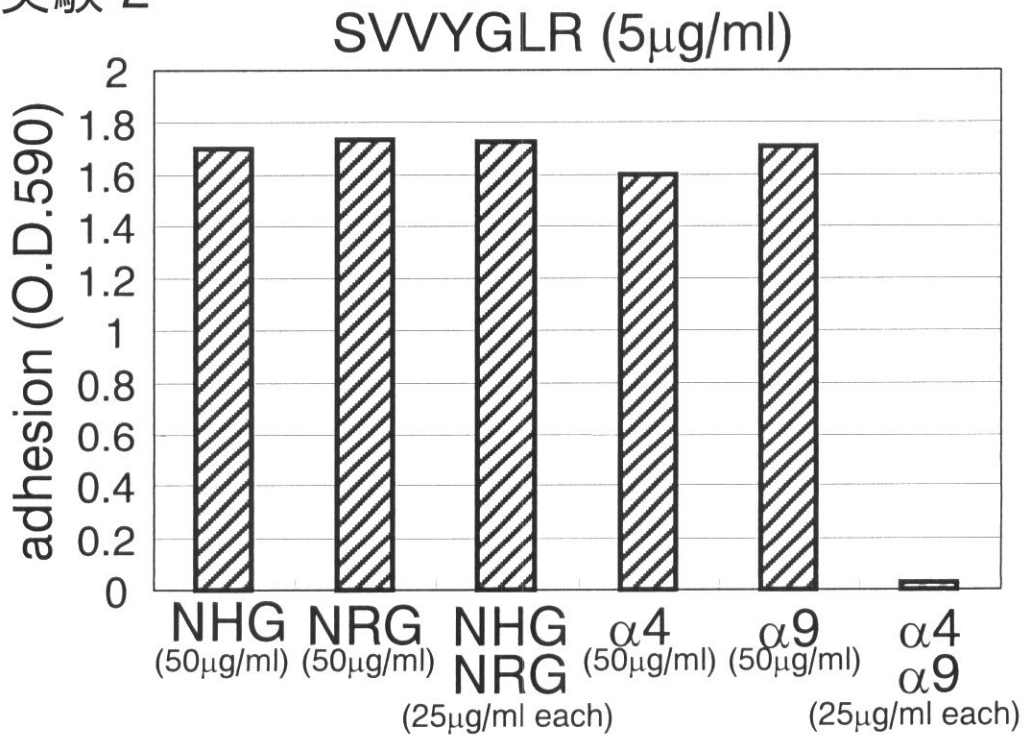


図12

【 図 1 3 】

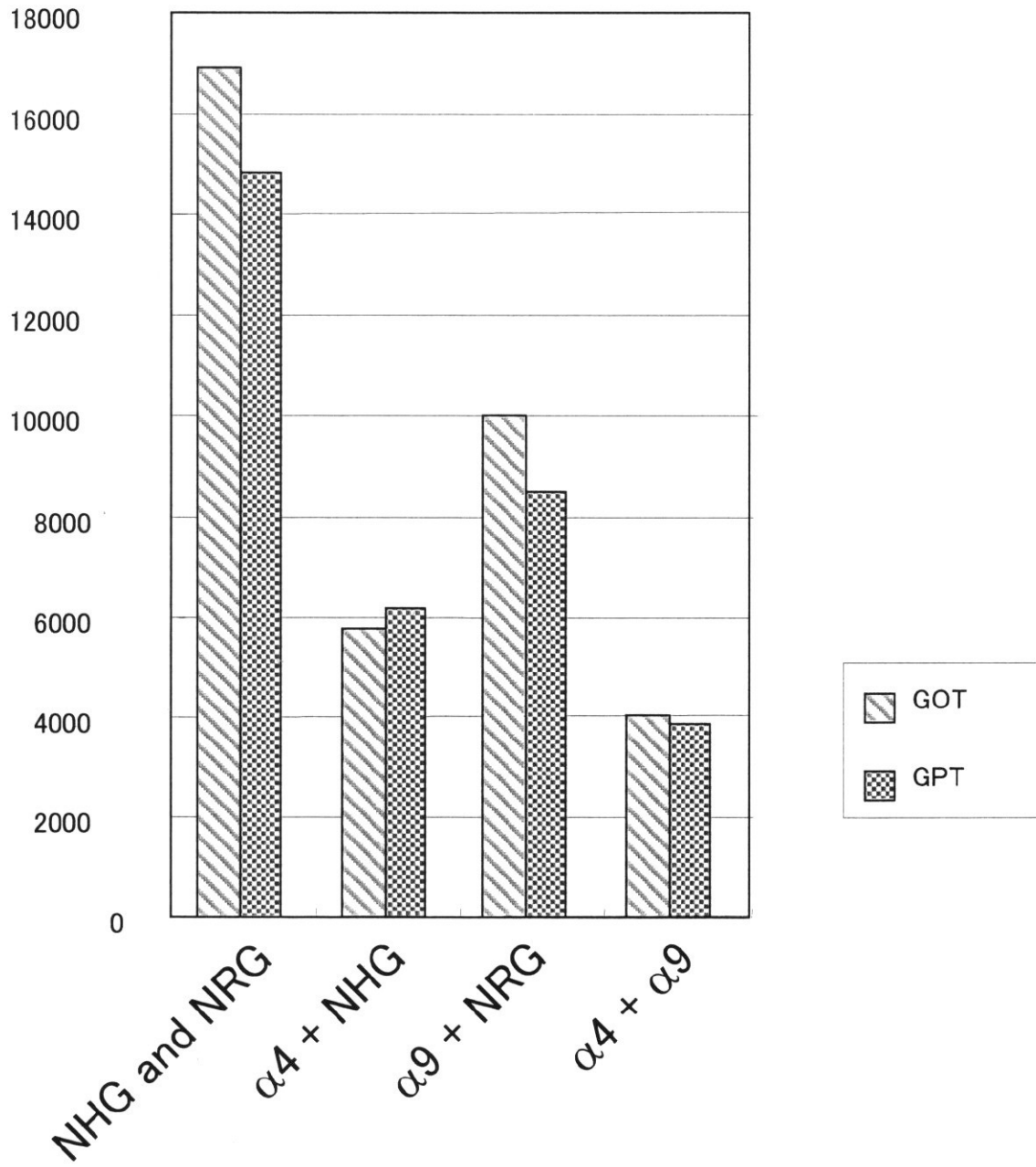
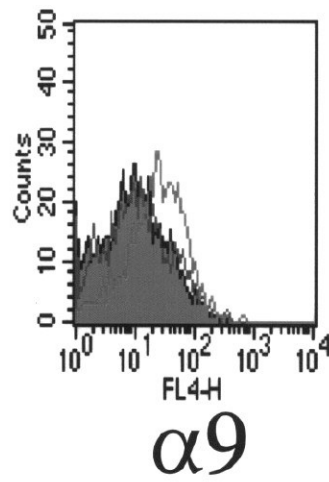
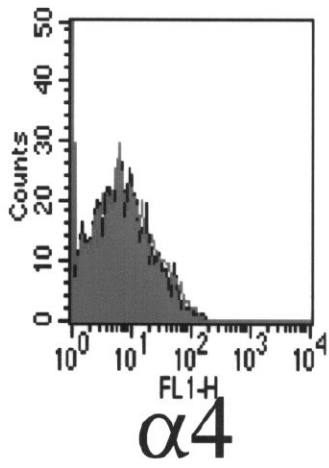


図13

【 図 1 4 】



phalloidin + DAPI

$\alpha 9$ + DAPI

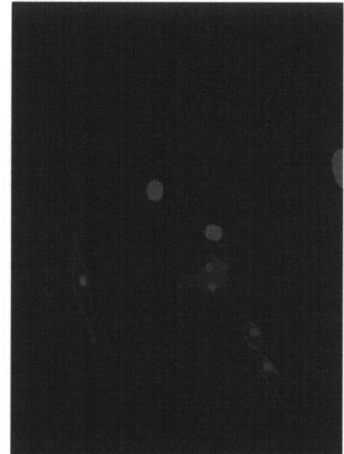
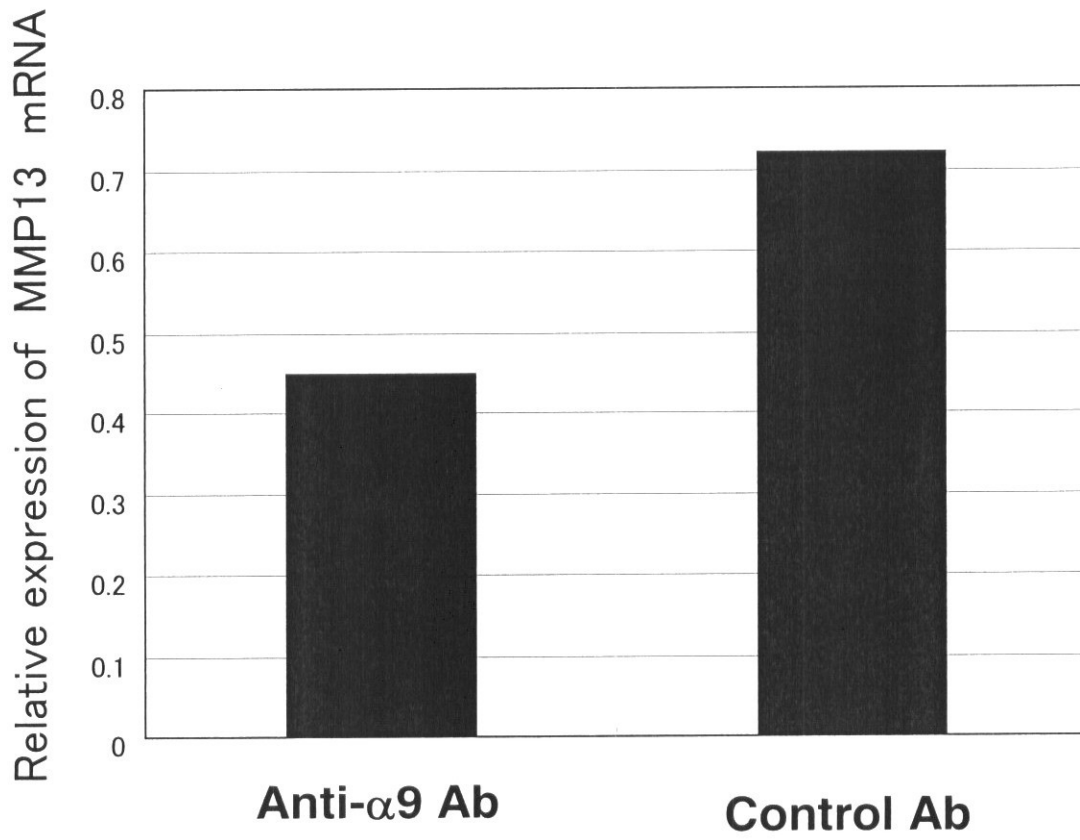


図 14

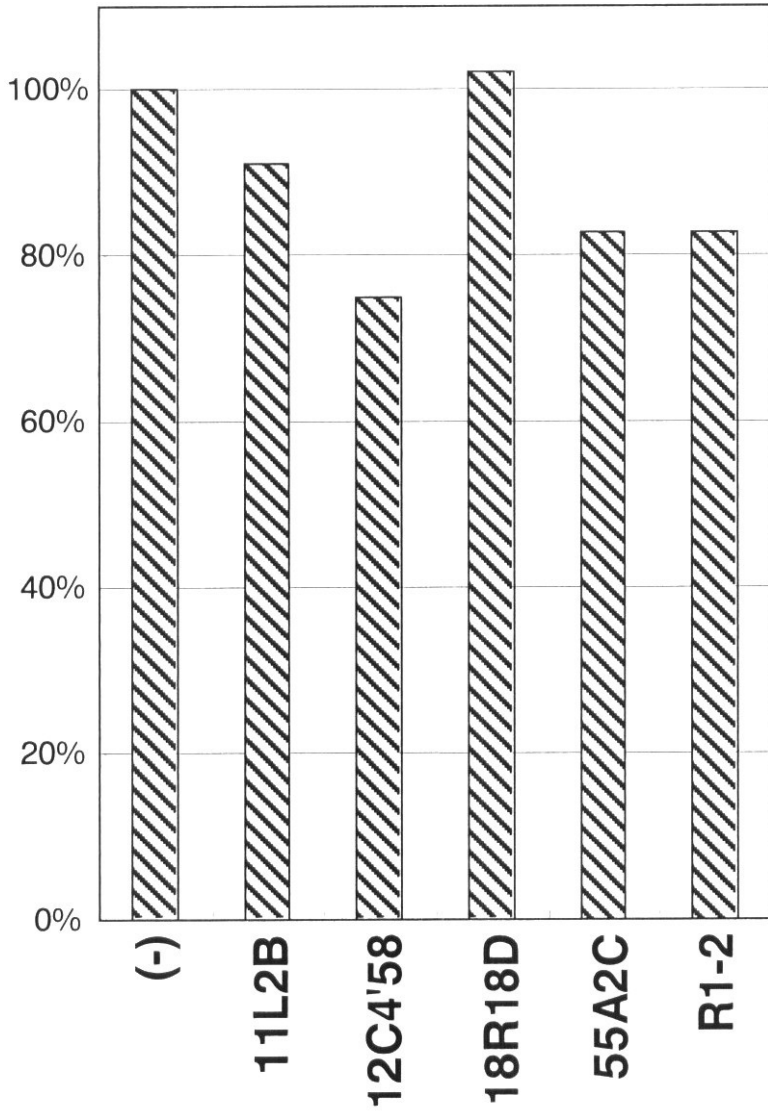
【 図 16 】

図 16

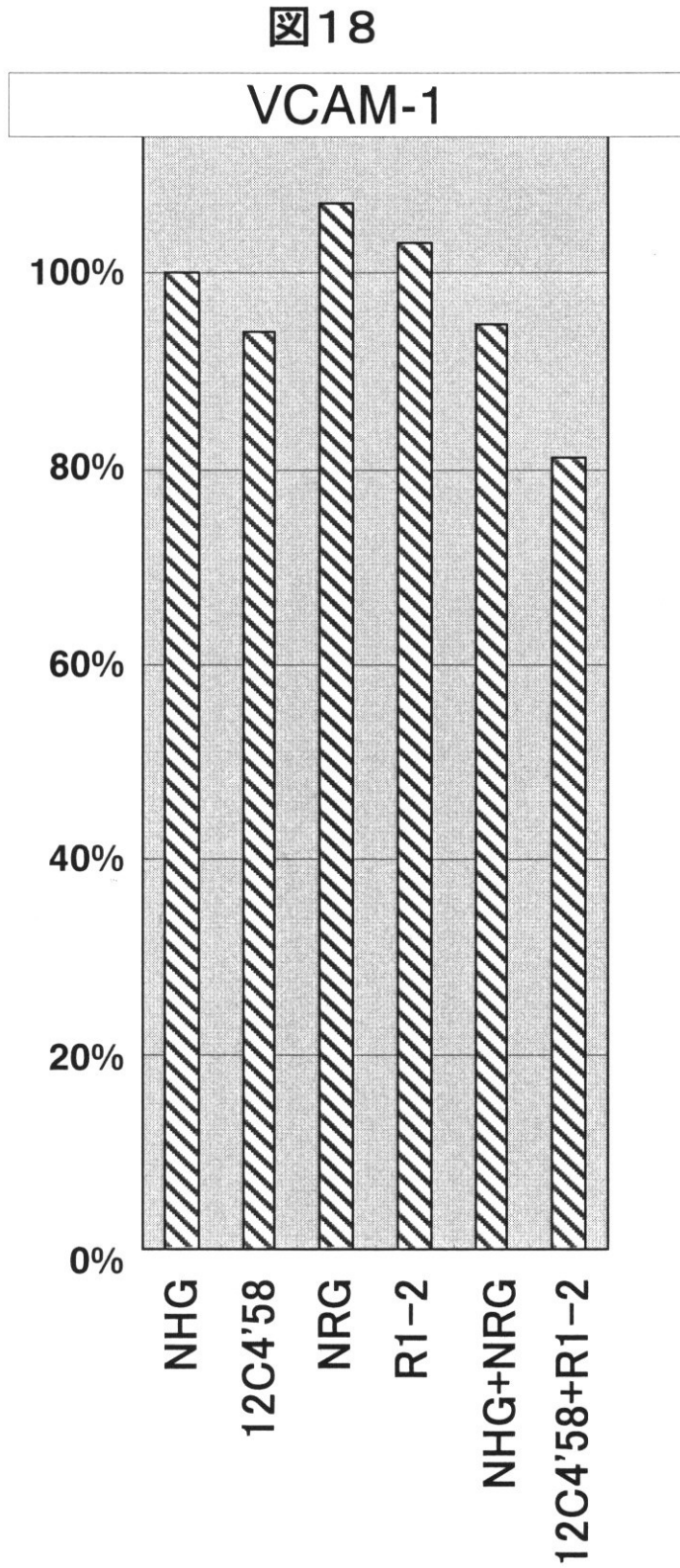


【 図 17 】

図17



【 図 18 】



【 図 1 9 - 1 】

図 1 9 (その 1)

ヒト α 9/CHO-K1

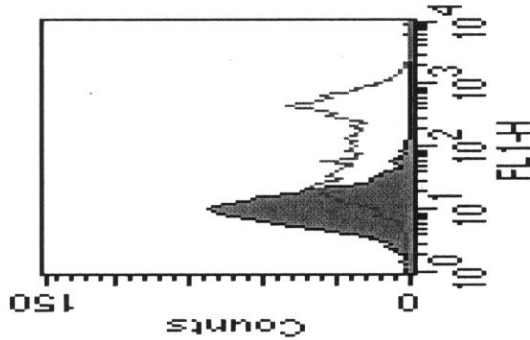
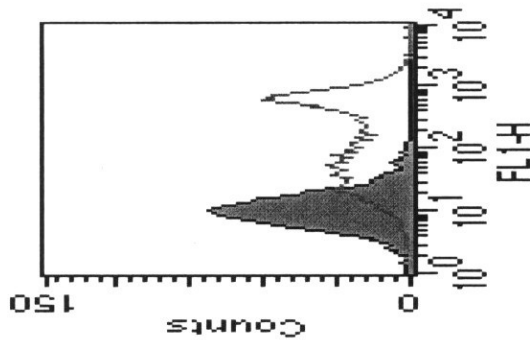
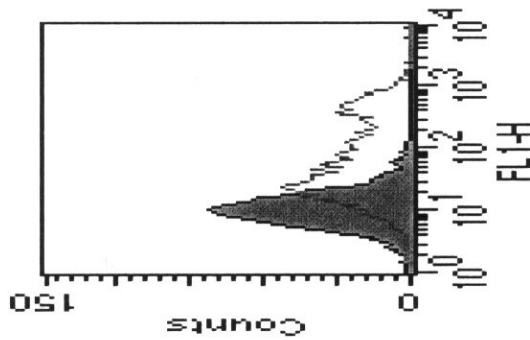
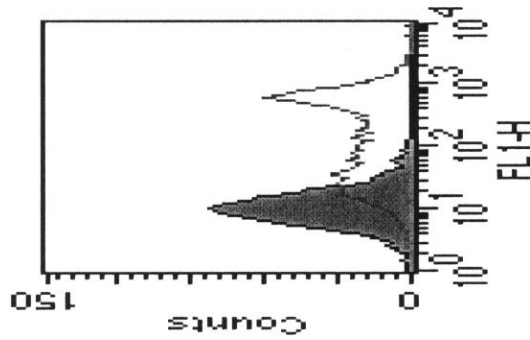
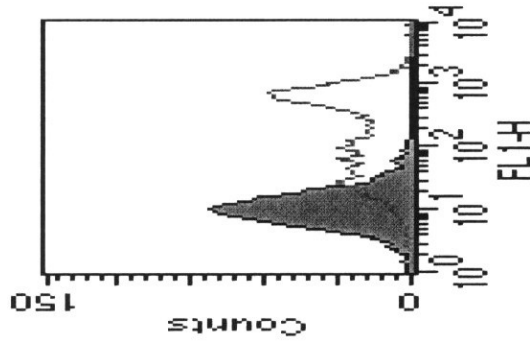
Y9A2

1K11

21C5

24I11

25B6



【 図 1 9 - 2 】

図 1 9 (その 2)

ヒト $\alpha 4 / \text{CHO-K1}$

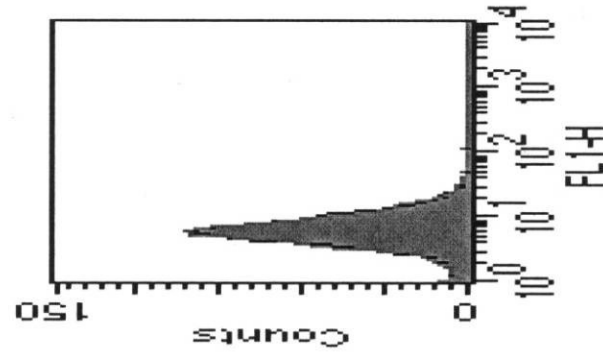
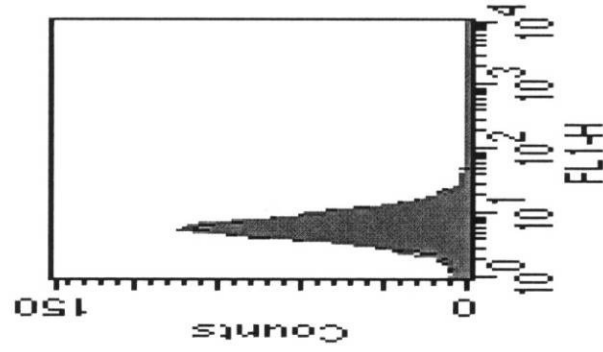
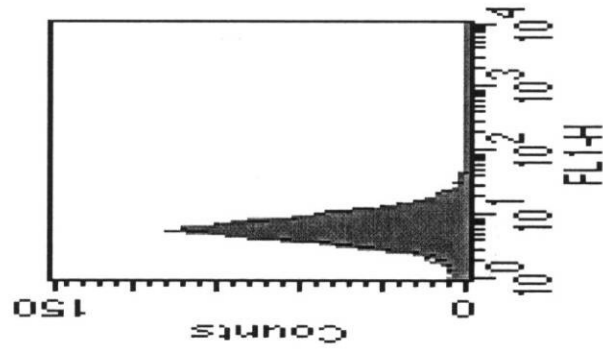
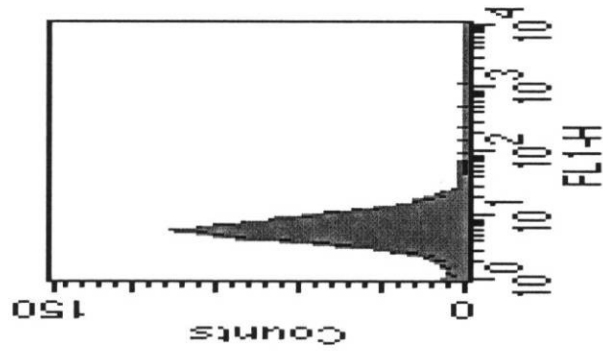
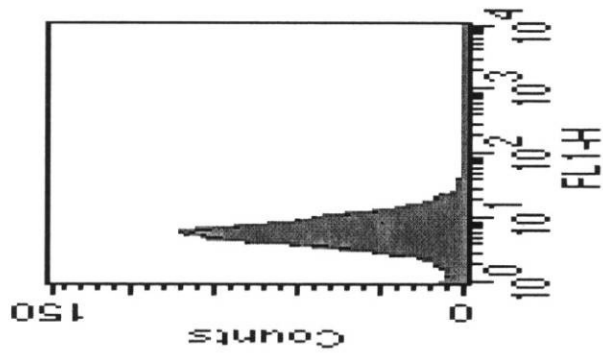
Y9A2

1K11

21C5

24I11

25B6

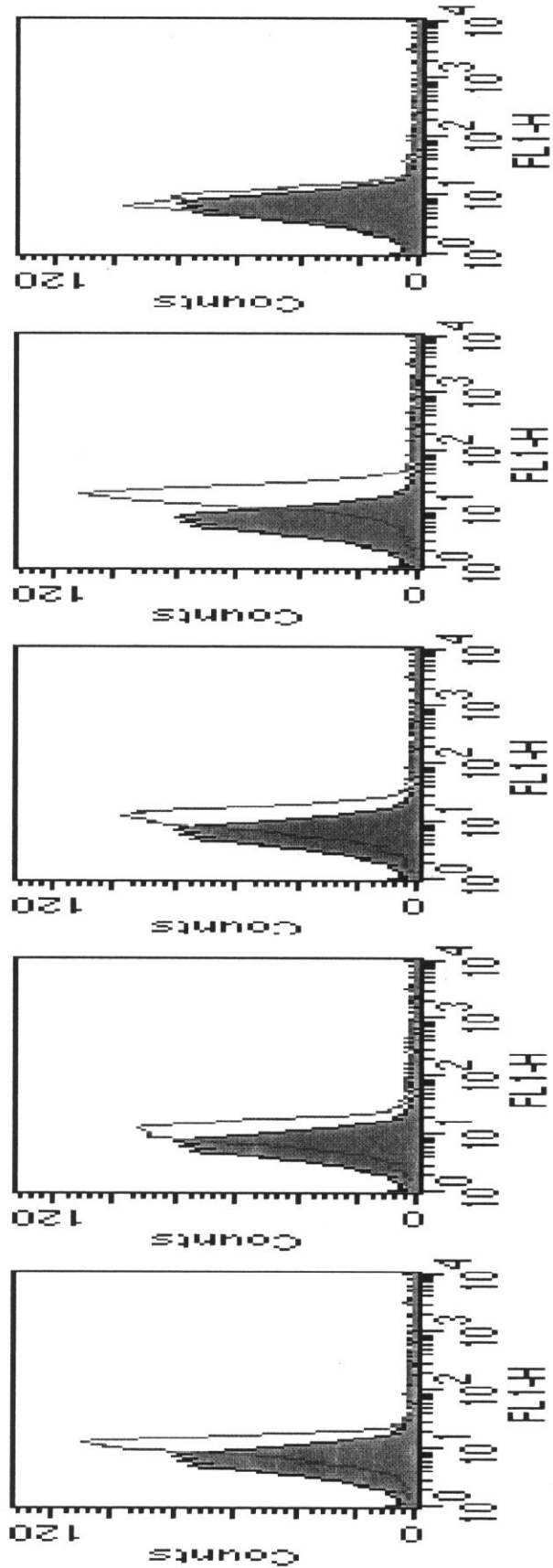


【 図 1 9 - 3 】

図 1 9 (その 3)

Neutrophils

Y9A2 1K11 21C5 24I11 25B6



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/300676

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C07K16/28</i> (2006.01), <i>A61K39/395</i> (2006.01), <i>A61P29/00</i> (2006.01), <i>A61P35/00</i> (2006.01), <i>A61P37/06</i> (2006.01), <i>C12N5/10</i> (2006.01), <i>C12P21/08</i> (2006.01), <i>G01N33/53</i> (2006.01), <i>G01N33/577</i> (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C07K16/28, A61K39/395, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577</i>		
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) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, JSTPlus (JOIS), Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Data Base, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WANG, Angela et al., Differential regulation of airway epithelial integrins by growth factors., AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY. 1996, Vol.15, No.5, pages 664 to 672	1-3, 5-11
$\frac{X}{Y}$	STRAUSBERG, R. L. et al., integrin alpha 9 [Mus musculus]. [online]. 27-OCT-2004. NCBI Entrez PROTEIN, ACCESSION NP_598482 [Retrieved on 2006-2-16]. Retrieved from the internet : <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?19526904:NCBI:7445434>	$\frac{4}{1-3, 5-11}$
<input checked="" 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 application or patent 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 combined 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 21 February, 2006 (21.02.06)		Date of mailing of the international search report 28 February, 2006 (28.02.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/300676

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<p>X Y</p>	<p>TAOOKA, Yasuyuki et al., The integrin alpha9beta1 mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1., THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY. 1999, Vol.145, No.2, pages 413 to 420</p>	<p><u>12-13</u> 1-3,5-11</p>
<p>X Y</p>	<p>SMITH, Laura L. et al., Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 1996, Vol.271, No.45, pages 28485-91</p>	<p><u>12-13</u> 1-3,5-11</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/300676

Box No. II 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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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 No. III 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:

The inventions of claims 12 and 13 were publicly known (e.g., documents 3 and 4) at the time of priority of this international application.

Accordingly, seeing the claims, the common matter to the inventions of claims 1, 12 and 13 resides in "α9 integrin antibody".

However, because "α9 integrin antibody" was publicly known (e.g., documents 1 to 4) at the time of priority of this international application, the matter common to the inventions of claims 1, 12 and 13 cannot be considered
(Continued to extra sheet)

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

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/300676

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

as a "special technical feature" in the meaning within PCT Rule 13.2. Consequently, the inventions of claims 1, 12 and 13 are not considered as one invention only or a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept, and it is recognized to be a group of inventions comprising the inventions described in claims 1 to 11, 12 and 13, respectively.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2006/300676	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28(2006.01), A61K39/395(2006.01), A61P29/00(2006.01), A61P35/00(2006.01), A61P37/06(2006.01), C12N5/10(2006.01), C12P21/08(2006.01), G01N33/53(2006.01), G01N33/577(2006.01)			
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. C07K16/28, A61K39/395, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577			
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) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, JSTPlus(JOIS), 医学・薬学予稿集全文データベース, PubMed			
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	
Y	WANG, Angela, et al., Differential regulation of airway epithelial integrins by growth factors., AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY. 1996, Vol.15, No.5, pages 664-672.	1-3, 5-11	
X	STRAUSBERG, R. L. et al., integrin alpha 9 [Mus musculus].	4	
Y	[online]. 27-OCT-2004. NCBI Entrez PROTEIN, ACCESSION NP_598482 [Retrieved on 2006-2-16]. Retrieved from the internet:<URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?19526904:NCBI:7445434>	1-3, 5-11	
<input checked="" 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		の日の後に公表された文献	
「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		「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	
「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		「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	
「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)		「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	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 21.02.2006		国際調査報告の発送日 28.02.2006	
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) 上條 肇 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2006/300676

C (続き) . 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
X Y	TAOOKA, Yasuyuki, et al., The integrin alpha9beta1 mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1., THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY. 1999, Vol.145, No.2, pages 413-420.	<u>12-13</u> 1-3, 5-11
X Y	SMITH, Laura L., et al., Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 1996, Vol.271, No.45, pages 28485-91	<u>12-13</u> 1-3, 5-11

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2006/300676

第II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 _____ 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、
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III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。

請求の範囲12, 13に記載された発明は、本国際出願の優先時には公知 (例えば、文献3-4) であった。

そこで、請求の範囲をみると、請求の範囲1, 12, 13に記載された発明に共通する事項は「 α 9インテグリン」である。

しかしながら、「 α 9インテグリン」は、本国際出願の優先時には公知 (例えば、文献1-4) であったから、請求の範囲1, 12, 13に記載された発明に共通する事項である「 α 9インテグリン」は、PCT規則13.2における「特別な技術的特徴」であるとはいえない。

よって、請求の範囲1, 12, 13に記載された発明は、一の発明又は単一の一般的発明概念を形成するように関連している一群の発明であるとはいえず、請求の範囲1-11, 12, 13にそれぞれ記載された発明からなる発明群であると認める。

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

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立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あったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う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 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00		
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02		
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04		
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 19/02		
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/16		
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/06		
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 11/00		
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10		
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/00		
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/04		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 37/06		
	G 0 1 N 33/53	D	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,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,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,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,BW,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,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,L R,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY ,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 金山 剛士

北海道札幌市北区北19条西6-1-12 シャルムあをき北 202号

(72)発明者 今 重之

北海道札幌市北区北17条西6-1-1-803

(72)発明者 上出 利光

北海道札幌市清田区真栄5-3-8-2

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA43 BA46 CA04 CA12 CA20 DA02 EA04 GA03 GA11
 HA15
 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA90X AA92X AA92Y AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA08 CA25
 CA44
 4C085 AA14 CC05 CC23 DD62
 4H045 AA11 BA10 DA76 EA20 FA74

(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)	抗 α 9整合素抗体及其用途		
公开(公告)号	JPWO2006075784A1	公开(公告)日	2008-06-12
申请号	JP2006553034	申请日	2006-01-12
申请(专利权)人(译)	有限公司基因技术和科学		
[标]发明人	黒滝大翼 金山剛士 今重之 上出利光		
发明人	黒滝 大翼 金山 剛士 今 重之 上出 利光		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/02 C12P21/08 C12N5/10 A61K39/395 A61P35/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P35/04 A61P19/02 A61P1/16 A61P11/06 A61P11/00 A61P3/10 A61P9/10 A61P25/00 A61P1/04 A61P37/06 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/395 A61K2039/505 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 C07K16/2839 C07K2317/73 G01N33/564 G01N33/574 G01N33/6893 G01N33/74 G01N2333/70546 G01N2800/065 G01N2800/32		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N15/00.C C12P21/08 C12N5/00.B A61K39/395.N A61P35/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P35/04 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P1/16 A61P11/06 A61P11/00 A61P3/10 A61P9/10.101 A61P25/00 A61P1/04 A61P37/06 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA43 4B024/BA46 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AA92X 4B065/AA92Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA14 4C085/CC05 4C085/CC23 4C085/DD62 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 浩 片山英二 铃木康仁		
优先权	2005006348 2005-01-13 JP		
其他公开文献	JP4871740B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了抗小鼠 α 9整联蛋白抗体，抗人 α 9整联蛋白抗体，产生任何抗体的杂交瘤，产生任何抗体和杂交瘤的方法，以及包含抗体。本发明的抗 α 9整联蛋白抗体抑制 α 9整联蛋白功能，从而表现出对癌症（例如癌细胞的生长和转移）和炎性疾病（例如类风湿性关节炎，骨关节炎，肝炎，支气管哮喘，纤维化，糖尿病，动脉硬化，多发性硬化症，肉芽肿，炎性肠病（溃疡性结肠炎和克罗恩氏病），自身免疫性疾病等。

