

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4642035号
(P4642035)

(45) 発行日 平成23年3月2日(2011.3.2)

(24) 登録日 平成22年12月10日(2010.12.10)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 P 31/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 31/18 (2006.01)

A 6 1 P 31/00

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/18

請求項の数 28 (全 127 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-12057 (P2007-12057)
 (22) 出願日 平成19年1月22日(2007.1.22)
 (62) 分割の表示 特願2004-61381 (P2004-61381)
 の分割
 原出願日 平成3年11月27日(1991.11.27)
 (65) 公開番号 特開2007-175055 (P2007-175055A)
 (43) 公開日 平成19年7月12日(2007.7.12)
 審査請求日 平成19年1月22日(2007.1.22)
 審判番号 不服2010-4331 (P2010-4331/J1)
 審判請求日 平成22年2月26日(2010.2.26)
 (31) 優先権主張番号 618,542
 (32) 優先日 平成2年11月27日(1990.11.27)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 592221528
 バイオジェン・アイデック・エムエイ・イ
 ンコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 142, ケンブリッジ, ケンブリッジ セ
 ンター 14
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A I D S、A R CおよびH I V感染の予防および治療に有用な抗C D 4抗体ホモログ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体ホモログであって、

(a) ヒトC D 4 に結合し；

(b) H I V g p 1 2 0 のヒトC D 4 への結合を有意にブロックせず；そして

(c) C D 4 + 細胞間のH I V 誘導のシンシチウム形成を少なくともO K T 4 A と同程度にブロックし、

該抗体は、免疫原として全長のヒトC D 4 をコードするD N A でC D 4 + 哺乳類組織培養細胞を形質転換する工程を包含する方法によって産生され、該抗体は、ヒトC D 4 の残基83 ~ 105 および105 ~ 131 に結合し、

該抗体ホモログは、受託番号A T C C H B 1 0 8 8 1 (5 A 8) のハイブリドーマによって産生されるものであることを特徴とする、抗体ホモログ。

【請求項2】

抗体ホモログであって、

(a) ヒトC D 4 に結合し；

(b) H I V g p 1 2 0 のヒトC D 4 への結合を有意にブロックせず；

(c) C D 4 + 細胞間のH I V 誘導のシンシチウム形成をO K T 4 と少なくとも同程度にブロックし；そして

(d) インビトロでの破傷風トキソイドに特異的な増殖アッセイにおいて、O K T 4 A よりも免疫抑制性に劣り、

該抗体は、免疫原として全長のヒトCD4をコードするDNAでCD4⁺哺乳類組織培養細胞を形質転換する工程を包含する方法によって産生され、該抗体は、ヒトCD4の残基83～105および105～131に結合し、

該抗体ホモログは、受託番号ATCC HB 10881 (5A8)のハイブリドーマによって産生されるものであることを特徴とする、抗体ホモログ。

【請求項3】

抗体ホモログであって、

(a) ヒトCD4に結合し；

(b) HIV gp120のヒトCD4への結合を有意にブロックせず；

(c) CD4⁺細胞間のHIV誘導のシンシチウム形成を少なくともOKT4Aと同程度にブロックし；そして

(d) インビトロでの破傷風トキソイドに特異的な増殖アッセイにおいて、OKT4Aよりも免疫抑制性に劣り、

該抗体は、免疫原として全長のヒトCD4をコードするDNAでCD4⁺哺乳類組織培養細胞を形質転換する工程を包含する方法によって産生され、該抗体は、ヒトCD4の残基83～105および105～131に結合し、

該抗体ホモログは、受託番号ATCC HB 10881 (5A8)のハイブリドーマによって産生されるものであることを特徴とする、抗体ホモログ。

【請求項4】

前記抗体ホモログは、ヒトCD4 V1からなるポリペプチドに結合しない、請求項1から3のいずれか1項に記載の抗体ホモログ。

【請求項5】

前記抗体ホモログが、ヒトCD4 V1V2からなるポリペプチドに結合する、請求項4に記載の抗体ホモログ。

【請求項6】

前記抗体ホモログが、CD4 V1に特異的な抗体のヒトCD4への結合を有意にブロックしない、請求項1から3のいずれかに記載の抗体ホモログ。

【請求項7】

前記抗体ホモログが、CD4⁺細胞のHIV感染を阻害する、請求項1から3のいずれかに記載の抗体ホモログ。

【請求項8】

前記抗体ホモログが、以下の(a)、(b)、(c)および(d)から選択される1つ以上の特性を示す、請求項1から3のいずれかに記載の抗体ホモログ：

(a) インビボでの循環CD4⁺細胞数の有意な減少を生じない；

(b) インビボでのCD4⁺細胞表面からの有意なCD4調節を生じない；

(c) インビボでの循環末梢白血球の数の有意な減少を生じない；および

(d) インビボでの外来抗原に対する応答において誘発される、抗体力価の有意な減少を生じない。

【請求項9】

前記抗体ホモログが、完全なモノクローナル抗体である、請求項1から3のいずれか1項に記載の抗体ホモログ。

【請求項10】

前記抗体ホモログが、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメントおよびF(v)フラグメントからなる群から選択される、請求項1から3のいずれか1項に記載の抗体ホモログ。

【請求項11】

CDRのアミノ酸配列が、

(a) L鎖CDR1が、SEQ ID NO: 15のAA₂₄-AA₄₀である；

(b) L鎖CDR2が、SEQ ID NO: 15のAA₅₆-AA₆₂である；

(c) L鎖CDR3が、SEQ ID NO: 15のAA₉₅-AA₁₀₂である；

(d) H鎖CDR1が、SEQ ID NO: 10のAA₃₁ - AA₃₅である；
 (e) H鎖CDR2が、SEQ ID NO: 10のAA₅₀ ~ AA₆₆である；
 (f) H鎖CDR3が、SEQ ID NO: 10のAA₉₉ - AA₁₁₁である、ヒト型組み換え抗体ホモログ。

【請求項12】

請求項11に記載のヒト型組み換え抗体ホモログであって、

(a) 前記L鎖の可変領域のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 56のAA₁ - AA₁₁₂であり、そして
 (b) 前記H鎖の可変領域のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 45のAA₁ - AA₁₂₂である、ヒト型組み換え抗体ホモログ。

10

【請求項13】

請求項12に記載のヒト型組み換え抗体ホモログであって、

(a) 前記L鎖のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 56のAA₁ - AA₂₁₉であり、そして
 (b) 前記H鎖のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 45のAA₁ ~ AA₄₄₈である、ヒト型組み換え抗体ホモログ。

【請求項14】

キメラ型組み換え抗体ホモログであって、

(a) L鎖の可変領域のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 15であり、そして
 (b) H鎖の可変領域のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 10である、キメラ型組み換え抗体ホモログ。

20

【請求項15】

請求項1から3のいずれかに記載の抗体ホモログを含む誘導体化抗体ホモログであって、請求項1から3に記載の抗体ホモログ、検出可能物質、細胞毒性物質および薬剤物質からなる群から独立して選択される1つ以上のメンバーに結合されている、誘導体化抗体ホモログ。

【請求項16】

前記薬剤物質が、ヒトのペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質に結合する免疫グロブリンおよびその一部からなる群から選択される、請求項15に記載の誘導体化抗体ホモログ。

30

【請求項17】

一次標的物がCD4⁺細胞であるHIVによって生じるヒトの疾病を予防あるいは治療するための組成物であって、請求項1から14に記載の抗体ホモログ、請求項15から16に記載の誘導体化抗体ホモログからなる群から選択される1つ以上のメンバーの免疫治療的に有効な量、および薬学的に受容可能なキャリアーを含有する、組成物。

【請求項18】

HIV gp120のCD4への結合を有意にブロックする、1種以上の物質をさらに含有する、請求項17に記載の組成物。

【請求項19】

前記物質が、CD4 V1に特異的な抗体ホモログ、CD4 V1ポリペプチド、および抗HIV gp120抗体ホモログから選択される、請求項18に記載の組成物。

40

【請求項20】

一次標的物がCD4⁺リンパ球であるHIVによって生じるヒトの疾病を予防あるいは治療するための医薬の製造における使用のための薬学的組成物であって、請求項1から14に記載の抗体ホモログ、請求項15から16に記載の誘導体化抗体ホモログからなる群から選択される1つ以上のメンバーの免疫治療的に有効な量、および薬学的に受容可能なキャリアーを含有する、薬学的組成物。

【請求項21】

以下；

SEQ ID NO: 14 (5A8 L鎖可変領域)、SEQ ID NO: 9 (5A 50

8 H鎖可変領域)、SEQ ID NO: 55 (pre-5A8ヒト型L鎖)およびSEQ ID NO: 44 (pre-5A8ヒト型H鎖);

請求項1から3に記載の抗体ホモログをコードする、SEQ ID NO: 55およびSEQ ID NO: 44からなる群から選択される配列の一部分; ならびに、

SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 55およびSEQ ID NO: 44からなる群から選択される配列によってコードされるアミノ酸配列をコードするDNA配列、

からなる群から選択される、DNA配列。

【請求項22】

請求項21に記載の1つ以上のDNA配列、および機能するようにそれに結合する1つ以上の発現制御配列を含む、組み換えDNA分子。

【請求項23】

pMDR1007 (ATCC 68846) および pMDR1002 (ATCC 68847) から選択される、請求項22に記載の組み換えDNA分子。

【請求項24】

請求項1から14に記載の抗体ホモログから選択される抗体ホモログを産生する、細胞。

【請求項25】

ハイブリドーマ細胞である、請求項24に記載の細胞。

【請求項26】

受託番号ATCC HB 10881 (5A8) を有する、請求項25に記載の細胞。

【請求項27】

請求項22あるいは23に記載の1つ以上の組み換えDNA分子で形質転換された宿主細胞である、請求項24に記載の細胞。

【請求項28】

請求項1から14に記載の抗体ホモログから選択される抗体ホモログを生産する方法であって、請求項24から27のいずれか1項に記載の細胞から選択される細胞を培養する工程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の属する技術分野)

本発明は、抗CD4抗体ホモログ、それらのホモログをコードするDNA配列、それらのホモログを含有する、予防用、免疫治療用および診断用の組成物、ならびに一次標的物がCD4+リンパ球である感染因子によって生じる、ヒトを含む哺乳動物の疾病を予防あるいは治療する方法に関する。このような疾病には、後天性免疫不全症候群(「AIDS」)、AIDS関連の合併症、およびヒト免疫不全ウイルス感染症が含まれる。

【背景技術】

【0002】

(従来の技術)

HIV感染では、CD4+リンパ球は非機能性になり、枯渇する。このT細胞の枯渇は、感染細胞の溶解により生じる感染の再循環サイクル、およびCD4+の感染細胞と非感染細胞との融合(シンシチウム形成)の両者に原因してきた(J.Sodroskiら、「Role Of The HTLV-III/LAV Envelope In Syncytium Formation And Cytopathicity」、Nature, 322, PP.470-74(1986))。CD4+リンパ球の消滅は、免疫抑制を導き、患者は、広範囲の日和味感染症および悪性腫瘍に罹患しやすくなる。このような免疫抑制は、後天性免疫不全症候群(「AIDS」)にかかっている患者に認められる。いくつかの場合では、AIDSは、CD4+脳細胞のHIV感染に直接に原因すると考えられている、中枢神経系異常を伴う。AIDSの完全な臨床上的症状発現には、通常、慢性のリンパ腺症、発熱、および体重減少などの症状に特徴のある症候群、すなわちAIDS関連の合併症(「ARC」)が先行する。HIVは、AIDSおよびその前駆体であるARCの病因学的因子と考えられている(M.G.Sangadharanら、「Detection,

10

20

30

40

50

Isolation And Continuous Production Of Cytopathic Retroviruses(HTLV - III) From Patients With AIDS And Pre - AIDS」、Science,224,PP.497 - 508(1984))

。

【 0 0 0 3 】

HIVの主要な表面(エンベロープ)タンパク質は、前駆体ポリペプチド(gp160)として生産される。これは、成熟型で、約481アミノ酸の大きなグリコシル化外膜タンパク質gp120、およびグリコシル化され得る約345アミノ酸の比較的小さな貫膜タンパク質gp41に開裂される(L.Ratnerら、「Complete Nucleotide Sequence Of The AIDS Virus,HTLV - III」、Nature、313,PP.277 - 84(1985))。

【 0 0 0 4 】

HIV gp120は、CD4エピトープに選択的に結合し、従って、HIVはCD4+細胞を標的すると考えられている(A.G.Dalgleishら、「The CD4(T4)Antigen Is An Essential Component Of The Receptor For The AIDS Retrovirus」、Nature、312,pp.763 - 67(1984);D.Klatzmannら、「T - Lymphocyte T4 Molecule Behaves As The Receptor For Human Retrovirus LAV」、Nature,312,pp.767 - 68(1984))。HIV gp120の細胞表面CD4への結合は、CD4+細胞の感染を起こすと考えられている。さらに、感染CD4+細胞の非感染CD4+細胞との膜融合(すなわち、シンシチウム形成)を起こすと考えられている。これにより、ウイルスの細胞から細胞への伝染、そしてその細胞変性効果に寄与する(J.A.HabeshowおよびA.G.Dalgleish、「The Relevance Of HIV env/CD4 Interactions To The Pathogenesis Of Acquired Immune Deficiency Syndrome」、J.AIDS,2,pp.457 - 68(1989);J.D.LifsonおよびE.G.Engleman、「Role Of CD4 In Normal Immunity And HIV Infection」、Immunol.Rev.,109,PP.93 - 117(1989))。

【 0 0 0 5 】

成熟CD4(T4としても知られている)は、分子の大きさが55,000から62,000ダルトンであり、細胞外ドメイン(ほぼAA1 - AA375)、膜間ドメイン(ほぼAA376 - AA395)、および細胞質側末端(ほぼAA396 - AA433)を有する433アミノ酸の糖タンパク質である。CD4は、25アミノ酸のシグナル配列を有するpre - タンパク質として合成される。そのヒトCD4の全長をコードするcDNAのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列は、報告されている(非特許文献1;D.R.Littmanら、)Corrected CD4 Sequence)、Cell,55,P.541(1988))。CD4の細胞外ドメインは、免疫グロブリンV領域、すなわちV1(ほぼAA1 - AA100の広がり)、V2(ほぼAA101 - AA180の広がり)、V3(AA181 - AA290の広がり)およびV4(ほぼAA291 - AA375の広がり)に相同性を有する4つの縦並の領域からなる(非特許文献1;J.Wangら、「Atomic Structure Of A Fragment Of Human CD4 Containing Two Immunoglobulin - Like Domains」、Nature,348,PP.411 - 18(1990))。

【 0 0 0 6 】

CD4のV1領域は、HIVgp120の結合部位として同定されている(J.Arthosら、「Identification Of The Residues In Human CD4 Critical For The Binding Of HIV」、Cell,57,pp.469 - 81(1989);T.Mizukamiら、「Binding Region For Human Immunodeficiency Virus(HIV) And Epitopes For HIV - B locking Monoclonal Antibodies Of The CD4 Molecule Defined By Site - Directed Mutagenesis」、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85,PP.9273 - 77(1988);A.PetersonandB.Seed、「Genetic Analysis Of Monoclonal Antibody And HIV Binding Sites On The Human Lymphocyte Antigen CD4」、Cell,54,pp.65 - 72(1988);N.R.Landauら、「The Envelope Glycoprotein Of The Human Immunodeficiency Virus Binds To The Immunoglobulin - Like Domain Of CD4」、Nature,334,pp.159 - 62(1988);L.K.Claytonら、「Substitution Of Murine For Human CD4 Residues Identifies Amino Acids Critical For HIV - gp120 Binding」、Nature,335,pp.363 - 66(1988))。

【 0 0 0 7 】

HIVgp120のCD4への結合をブロックすることによりHIV感染を予防あるいは治療するための抗CD4抗体の可能な能力は、多くの研究者を、ある種の抗CD4抗体がCD4+細胞間のHIV誘

10

20

30

40

50

導のシンシチウム形成をブロックする能力、およびこれらのいくつかの抗体の免疫抑制性の研究に導いた。

【 0 0 0 8 】

例えば、CD4 VIに特異的な抗体Leu3AおよびOKT4Aは、HIV誘導のシンシチウム形成の効果的なブロッカーであることが報告されている（非特許文献2；B.A.Jamesonら、「Location And Chemical Synthesis Of A Binding Site For HIV - I On The CD4 Protein」,Science,240,pp.1335 - 39(1988);PetersonおよびSeed,Cell,前述）。しかし、これらの抗体は、HIV感染の治療のための薬学的な使用には深刻な欠点を有している。例えば、OKT4AおよびLeu3Aは、gp120結合部位と重複するCD4エピトープを認識するので、すでにHIVgp120に結合しているCD4分子に結合あるいは作用し得ない（例えば、P.A.Batesら、「A Predicted Three - Dimensional Structure For The Human Immunodeficiency Virus Binding Domains Of CD4 Antigen」,Prot.Engng,3,pp.13 - 21(1989);J.S.McDougalら、「Binding Of The Human Retrovirus HTLV - III/LAV/ARV/HIV To The CD4(T4)Molecule:Conformation Dependence,Epitope Mapping,Antibody Inhibition,And Potential For Idiotypic Mimicry」,J.Immunol.,137,pp.2937 - 44(1986);Landauら、Nature,前述;A.G.Dalglishら、「Neutralisation Of HIV Isolates By Anti - Idiotypic Antibodies Which Mimic The T4(CD4)Epitope:A Potential AIDS Vaccine」,Lancet,2,PP.1047 - 50(1987)」。

【 0 0 0 9 】

さらに、OKT4Aは、完全に免疫抑制性であることが報告されていて、これは考えられるAIDS治療にとっては望ましくない特性である（D.Lamarreら、「Class II MHC Molecules And The HIV gp120 Envelope Protein Interact With Functionally Distinct Regions Of The CD4 Molecule」,EMBO J.,8,pp.3271 - 77(1989);W.E.Biddisonら、「Possible Involvement Of The OKT4 Molecule In T Cell Recognition Of Class II HLA Antigens」,J.Ex.Med.,156,pp.1065 - 76(1982)）。

【 0 0 1 0 】

CD4の他のエピトープあるいはドメインに特異的な抗CD4モノクローナル抗体が研究されているが、これらの抗体に関してAIDS治療用としての使用には明かな欠点も報告されている。このような抗体の1つであるOKT4Bは、CD4のV2ドメインに特異的であることが報告されている（T.Kieber - Emmonsら、「The gp120 - CD4 Interface:Structural,Immunological And Pathological Considerations」,Biochim.Biohs.Acta,989,pp.281 - 300(1989)）。OKT4Bが、HIVgp120のCD4への結合を有意に障害するかどうかについての相反する報告がある（McDougalら、J.Immunol.,前述;K.Lundinら、「A Specific Assay Measuring Binding Of ¹²⁵I - Gp120 From HIV To T4+/CD4+ 細胞」,J.Immunol.Methods,97,PP.93 - 100(1987);Lamarreら、EMBOJ.,前述）。そして、OKT4Bが、OKT4Aよりも有意に免疫抑制性にまることが報告されている（Lamarreら、EMBO J.,前述）。さらに、OKT4Bは、OKT4Aに比較してHIV誘導のシンシチウム形成に対して相対的に弱いブロッカーである（非特許文献2）。

【 0 0 1 1 】

HIV誘導のシンシチウム形成になんらかの効果を有することが報告されていて、そしてさらに、OKT4AおよびLeu3Aに結合されるエピトープとは別のCD4エピトープに結合することが報告されている他の抗CD4抗体には、MT151、VIT4、およびMT321が含まれる（非特許文献2）。しかし、最近の数個の個別の研究では、これらに密接に関連する抗体は、gp120結合に含まれるCD4エピトープと重複するコンフォメーションに依存のCD4エピトープを認識することが示されている（Q.J.Sattentauら、「Structural Analysis Of The Human Immunodeficiency Virus - Binding Domain Of CD4」,J.Exp.Med.,170,pp.1319 - 34(1989);Batesら、Prot.Engng.,前述;Landauら、Nature,前述;M.Merkenschlagerら、「Functional Epitope Analysis Of The Human CD4 Molecule」,J.Immunol.,9,pp.2839 - 45(1990)）。

【 0 0 1 2 】

研究されているもう1つの抗CD4抗体は、OKT4である。これは、CD4のV3V4ドメインに特異的である(E.A.Bergerら、「A Soluble Recombinant Polypeptide Comprising The Amino-Terminal Half Of The Extracellular Region Of The CD4 Molecule Contains An Active Binding Site For Human Immunodeficiency Virus」,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85,PP.2357 - 61(1988)]。OKT4は、OKT4A、Leu3A、OKT4Bおよび他の公知の抗CD4抗体よりもHIV感染に対する治療剤として大きな欠点を有する。例えば、OKT4は、HIV誘導のシンシチウム形成に対しては「ブロッカーではない」ことが報告されている(非特許文献2)。

【非特許文献1】P.J.Maddonら、「The Isolation And Nucleotide Sequence Of A cDNA Encoding The T cell Surface Protein T4: A New Member Of The Immunoglobulin Gene Family」,Cell, (1985)42,pp.93 - 104

10

【非特許文献2】Q.J.Sattentau,「Epitopes Of The CD4 Antigen And HIV Infection」,Science, (1986)234,PP.1120 - 23

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

我々の発明以前に、HIVgp120のヒトCD4への結合を有意にブロックすることなく、そして効果的にHIV誘導のシンシチウム形成をブロックすることの両方ともをなし得ることが報告されている抗CD4抗体はない。このような抗体は、HIVのCD4への結合後、介入するために、あるいはHIVgp120 - CD4結合事象をブロックする薬剤と組み合わせて使用されれば、AIDS、ARCおよびHIV感染への治療介入に明かな利点を提供する。従って、AIDS、ARCおよびHIV感染の治療および予防のための使用に、高度に必要とされる特性の組み合わせを有する、抗CD4抗体の必要性が存在する。

20

【課題を解決するための手段】

【0014】

上記課題を解決するために、本発明は、以下を提供する。

(項目1) 抗体ホモログであって、

(a) ヒトCD4に結合し；

(b) HIV gp120のヒトCD4への結合を有意にブロックしない；

そして

30

(c) CD4 + 細胞間のHIV誘導のシンシチウム形成を少なくともOKT4Aと同程度にブロックする、抗体ホモログ。

(項目2) 抗体ホモログであって、

(a) ヒトCD4に結合し；

(b) HIV gp120のヒトCD4への結合を有意にブロックしない；

(c) CD4 + 細胞間のHIV誘導のシンシチウム形成をOKT4よりは良好にブロックし；そして

(d) インビトロでの破傷風トキソイドに特異的な増殖アッセイにおいて、OKT4Aよりも免疫抑制性に劣る、

抗体ホモログ。

40

(項目3) 抗体ホモログであって、

(a) ヒトCD4に結合し；

(b) HIV gp120のヒトCD4への結合を有意にブロックしない；

(c) CD4 + 細胞間のHIV誘導のシンシチウム形成を少なくともOKT4Aと同程度にブロックし；そして

(d) インビトロでの破傷風トキソイドに特異的な増殖アッセイにおいて、OKT4Aよりも免疫抑制性に劣る、

抗体ホモログ。

(項目4) 上記抗体ホモログが、ヒトCD4 V1からなるポリペプチドに結合しない、項目1から3のいずれかに記載の抗体ホモログ。

50

(項目5) 上記抗体ホモログが、ヒトCD4 V1V2 からなるポリペプチドに結合する、項目4に記載の抗体ホモログ。

(項目6) 上記抗体ホモログが、CD4 V1に特異的な抗体のヒトCD4への結合を有意にブロックしない、項目1から3のいずれかに記載の抗体ホモログ。

(項目7) 上記抗体ホモログが、CD4⁺細胞のHIV感染を阻害する、項目1から3のいずれかに記載の抗体ホモログ。

(項目8) 上記抗体ホモログが、以下の(a)、(b)、(c)および(d)から選択される1つ以上の特性を示す、項目1から3のいずれかに記載の抗体ホモログ：

(a) インビボでの循環CD4⁺細胞数の有意な減少を生じない；

(b) インビボでのCD4⁺細胞表面からの有意なCD4調節を生じない；

(c) インビボでの循環末梢白血球の数の有意な減少を生じない；および

(d) インビボでの外来抗原に対する応答において誘発される、抗体力価の有意な減少を生じない。

(項目9) 受託番号HB 10881(5A8)、HB 10882(1F8)、およびHB 10883(5F2)のハイブリドーマの群から選択されるハイブリドーマ由来の抗体ホモログ。

(項目10) 受託番号HB 10881(5A8)のハイブリドーマ由来である、項目9に記載の抗体ホモログ。

(項目11) 上記抗体ホモログが、完全なモノクローナル抗体である、項目1から3、あるいは9から10のいずれかに記載の抗体ホモログ。

(項目12) 上記抗体ホモログが、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメントおよびF(v)フラグメントからなる群から選択される、項目1から3あるいは9のいずれかに記載の抗体ホモログ。

(項目13) 上記抗体ホモログが、ヒト型組み換え抗体ホモログである、項目1から3のいずれかに記載の抗体ホモログ。

(項目14) CDRsのアミノ酸配列が、

(a) L鎖CDR1が、SEQ ID NO: 15のAA₂₄-AA₄₀である；

(b) L鎖CDR2が、SEQ ID NO: 15のAA₅₆-AA₆₂である；

(c) L鎖CDR3が、SEQ ID NO: 15のAA₉₅-AA₁₀₂である；

(d) H鎖CDR1が、SEQ ID NO: 10のAA₃₁-AA₃₅である；

(e) H鎖CDR2が、SEQ ID NO: 10のAA₅₀~AA₆₆である；および

(f) H鎖CDR3が、SEQ ID NO: 10のAA₉₉-AA₁₁₁である、

項目13に記載のヒト型組み換え抗体ホモログ。

(項目15) 項目14に記載のヒト型組み換え抗体ホモログであって、

(a) 上記L鎖の可変領域のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 56のAA₁-AA₁₁₂であり、そして

(b) 上記H鎖の可変領域のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 45のAA₁-AA₁₂₂である、ヒト型組み換え抗体ホモログ。

(項目16) 項目15に記載のヒト型組み換え抗体ホモログであって、

(a) 上記L鎖のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 56のAA₁-AA₂₁₉であり、そして

(b) 上記H鎖のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 45のAA₁~AA₄₄₈である、ヒト型組み換え抗体ホモログ。

(項目17) キメラ型組み換え抗体ホモログである、項目1から3に記載の抗体ホモログ。

(項目18) 項目17に記載のキメラ型組み換え抗体ホモログであって、

(a) 上記L鎖の可変領域のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 15であり、そして

(b) 上記H鎖の可変領域のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 10である、キメラ型組み換え抗体ホモログ。

(項目19) 項目1から3および9から10のいずれかに記載の抗体ホモログを含む誘導

10

20

30

40

50

体化抗体ホモログであって、項目 1 から 3 および 9 から 10 に記載の抗体ホモログ、項目 37 から 39 に記載の 5A8 擬態物質、検出可能物質、細胞毒性物質および薬剤物質からなる群から独立して選択される、1 つ以上のメンバーに結合されている、誘導体化抗体ホモログ。

(項目 20) 上記薬剤物質が、ヒトのペプチド、ポリペプチドあるいはタンパク質に結合する免疫グロブリンおよびその一部からなる群から選択される、項目 19 に記載の誘導体化抗体ホモログ。

(項目 21) 一次標的物が CD4⁺ 細胞である感染因子によって生じる哺乳動物の疾病を予防あるいは治療するための組成物であって、項目 1 から 18 に記載の抗体ホモログ、項目 19 から 20 に記載の誘導体化抗体ホモログ、および項目 37 から 39 に記載の 5A8 擬態物質からなる群から選択される 1 つ以上のメンバーの免疫治療的に有効な量、および薬学的に受容可能なキャリアーを含有する、組成物。

10

(項目 22) 上記哺乳動物がヒトであり、そして上記感染因子が HIV である、項目 21 に記載の組成物。

(項目 23) HIV gp120 の CD4 への結合を有意にブロックする、1 種以上の物質をさらに含有する、項目 21 あるいは 22 に記載の組成物。

(項目 24) 上記物質が、CD4 V1 に特異的な抗体ホモログ、CD4 V1 ポリペプチド、および抗 HIV gp120 抗体ホモログから選択される、項目 23 に記載の組成物。

(項目 25) 一次標的物が CD4⁺ リンパ球である感染因子によって生じる哺乳動物の疾病を予防あるいは治療するための方法であって、項目 1 から 18 に記載の抗体ホモログ、項目 19 から 20 に記載の誘導体化抗体ホモログ、および項目 37 から 39 に記載の 5A8 擬態物質からなる群から選択される 1 つ以上のメンバーの免疫治療的に有効な量、および薬学的に受容可能なキャリアーを上記哺乳動物に投与することを包含する、方法。

20

(項目 26) 上記哺乳動物がヒトであり、そして上記感染因子が HIV である、項目 25 に記載の方法。

(項目 27) SEQ ID NO: 14 (5A8 L 鎖可変領域)、SEQ ID NO: 9 (5A8 H 鎖可変領域)、SEQ ID NO: 55 (pre-5A8 ヒト型 L 鎖) および SEQ ID NO: 44 (pre-5A8 ヒト型 H 鎖); 項目 1 から 3 に記載の抗体ホモログをコードする前述の任意の DNA 配列; および前述の任意の DNA 配列になる DNA 配列からなる群から選択される、DNA 配列。

30

(項目 28) 項目 27 に記載の 1 つ以上の DNA 配列、および機能するようにそれに結合する 1 つ以上の発現制御配列を含む、組み換え DNA 分子。

(項目 29) pMDR1007 (ATCC 68846) および pMDR1002 (ATCC 68847) から選択される、項目 28 に記載の組み換え DNA 分子。

(項目 30) 項目 1 から 18 に記載の抗体ホモログから選択される抗体ホモログを産生する、細胞。

(項目 31) ハイブリドーマ細胞である、項目 30 に記載の細胞。

(項目 32) 受託番号 HB 10881 (5A8)、HB 10882 (1F8)、および HB 10883 (5F2) の細胞群から選択される、項目 31 に記載の細胞。

40

(項目 33) 項目 28 あるいは 29 に記載の 1 つ以上の組み換え DNA 分子で形質転換された宿主細胞である、項目 30 に記載の細胞。

(項目 34) 項目 1 から 18 に記載の抗体ホモログから選択される抗体ホモログを生産する方法であって、項目 30 から 33 に記載のいずれかの細胞から選択される細胞を培養することを包含する、方法。

(項目 35) 項目 31 に記載の細胞を生産する方法であって、ヒト CD4 の全長をコードする DNA で、CD4⁺ 哺乳類組織培養細胞を形質転換することにより生産された、その表面で CD4 を発現する、CD4⁺ 細胞で、ヒト以外の哺乳動物を免疫する工程を包含する、方法。

50

(項目36) 上記CD4⁺細胞が、受託番号CRL 10884を有する、項目35に記載の方法。

(項目37) CD4⁺細胞間のHIVに誘導されるシンシチウム形成を阻害する、5A8擬態物質。

(項目38) CD4⁺細胞のHIV感染を阻害する、5A8擬態物質。

(項目39) 請求項1から8に記載の抗体ホモログから選択される抗体ホモログの特性を示す、5A8擬態物質。

【0015】

本発明において、CD4⁺細胞間のHIVに誘導されるシンシチウム形成を阻害する、5A8擬態ペプチドまたは半ペプチド化合物、ならびにCD4⁺細胞のHIV感染を阻害する、5A8擬態ペプチドまたは半ペプチド化合物が提供される。

【発明の効果】

【0016】

HIVgp120のヒトCD4への結合を有意にブロックすることなくヒトCD4に結合し、そして、以下の性質の1つを示す抗体ホモログ、5A8擬態ペプチドまたは半ペプチド化合物を提供する：(1)少なくともOKT4A(市販の、CD4 VIに特異的な抗CD4モノクローナル抗体)と同程度に、HIV誘導のCD4⁺細胞間のシンシチウム形成をブロックする；(2)OKT4(市販の、CD4 V3V4に特異的な抗CD4モノクローナル抗体)よりもHIV誘導のCD4⁺細胞間のシンシチウム形成をブロックし、そしてインビトロにおける破傷風トキソイドに特異的な増殖アッセイではOKT4Aよりも免疫抑制性に劣る；あるいは(3)少なくともほぼOKT4Aと同程度に、HIV誘導のCD4⁺細胞間のシンシチウム形成をブロックし、そしてインビトロにおける破傷風トキソイドに特異的な増殖アッセイではOKT4Aよりも免疫抑制性に劣る。

【0017】

(発明の実施の形態)

CD4は、CD4⁺Tリンパ球(ヘルパー/インデューサー細胞)の細胞表面の糖タンパク質である。CD4⁺リンパ球は、ヒト免疫系の重要な調節細胞である。それらは、T細胞の増殖、リンフォカインの放出、および免疫グロブリンの放出に影響を与えるヘルパー細胞の相互作用を媒介する。ヒト免疫不全ウイルス(「HIV」)を含むある種の感染因子の一次標的物は、CD4糖タンパク質を有する細胞である。*このような細胞には、CD4⁺リンパ球、マクロファージおよびある種の脳細胞が含まれる。

【0018】

本明細書および請求の範囲で用いられている一般的な用語「ヒト免疫不全ウイルス(HIV)」は、AIDS患者からの個別の単離物、およびそれらに由来する実験用の株を指す。用語「HIV」には、そのほか、ヒトT細胞リンパ栄養ウイルスIII型(「HTLV-III」)、リンパ腺症関連ウイルス(「LAV」)、およびAIDS関連レトロウイルス(「ARV」)が含まれる。専門用語HIVは、International Committee On Taxonomy Of Virusesのヒトレトロウイルス小委員会により採用された。

【0019】

(発明の要旨)

本発明は概して、まず、HIVgp120のヒトCD4への結合を有意にブロックすることなくヒトCD4に結合し、そして、以下の性質の1つを示す抗体ホモログ、好ましくはモノクローナル抗体を提供することにより、前記の多くの問題を解決する：(1)少なくともOKT4A(市販の、CD4 VIに特異的な抗CD4モノクローナル抗体)と同程度に、HIV誘導のCD4⁺細胞間のシンシチウム形成をブロックする；(2)OKT4(市販の、CD4 V3V4に特異的な抗CD4モノクローナル抗体)よりもHIV誘導のCD4⁺細胞間のシンシチウム形成をブロックし、そしてインビトロにおける破傷風トキソイドに特異的な増殖アッセイではOKT4Aよりも免疫抑制性に劣る；あるいは(3)少なくともほぼOKT4Aと同程度に、HIV誘導のCD4⁺細胞間のシンシチウム形成をブロックし、そしてインビトロにおける破傷風トキソイドに特異的な増殖アッセイではOKT4Aよりも免疫抑制性に劣る。

【0020】

本発明の抗CD4抗体ホモログのあるものは、CD4 AA1 - AA180(すなわち、それらはVIV2に特異的である)からなるヒトCD4フラグメントには結合するが、CD4 AA1 - AA113(すなわち、それらは単独ではV1に特異的ではない)からなるヒトCD4フラグメントには結合しない。同様に、本発明の抗体ホモログのあるものは、CD4 VIに特異的な抗体のヒトCD4への結合を有意には阻害しない。さらに、本発明の好ましい抗CD4抗体ホモログは、CD4+細胞のHIV感染を阻害する。

【0021】

本発明の他の好ましい抗体ホモログは、以下の(a)~(d)から選択される1つ以上を有意には生じない、特性を示す:(a)インビボでの循環CD4+細胞数の減少;(b)インビボでのCD4+細胞表面からのCD4調節;(c)インビボでの末梢白血球数の減少;および(d)インビボでの外来抗原に対する応答で誘発される抗体力価の減少。

10

【0022】

本発明は、数多くのタイプの抗CD4抗体ホモログを提供する。これらには、モノクローナル抗体、組み換え抗体、組み換えキメラ型抗体、および組み換えヒト型抗体が含まれる。提供される抗体ホモログは、好ましくは、H鎖およびL鎖の各々2つを有する完全な免疫グロブリン分子であるが、1つ以上のL鎖、1つ以上のH鎖あるいはその組み合わせからなり得る。さらに、本発明の抗CD4抗体ホモログは、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab)2フラグメント、F(v)フラグメント、あるいは前述の特性を有する任意の他の免疫グロブリンフラグメントの形態であり得る。

【0023】

20

本発明の好ましい抗CD4抗体ホモログとして提供されるものは、5A8、1F8、5F2と呼ばれるマウスモノクローナル抗体である。5A8が最も好ましい。

【0024】

本発明は、5A8H鎖の可変領域および5A8L鎖可変領域をコードするDNA配列を提供する。さらに、それらのDNA配列あるいはその一部を用いた5A8キメラ型および5A8ヒト型組み換え抗体、およびそれらのDNA配列によりコードされるポリペプチドが提供される。それらのDM配列、および機能するように連結された発現制御配列を含む組み換えDNA分子もまた提供される。

【0025】

本発明は、モノクローナル抗体5A8のヒトCD4への結合を有意にブロックする、ペプチド、セミペプチド化合物あるいは非ペプチド化合物である5A8擬態物質を提供する。本発明の5A8擬態物質は、HIV誘導のCD4+細胞間のシンシチウム形成を阻害するか、CD4+細胞のHIV感染を阻害するか、あるいはその両者を阻害する。好ましくは、5A8擬態物質は、本発明の抗体ホモログの特性を示す。

30

【0026】

本発明はまた、本発明の抗体ホモログおよび5A8擬態物質、検出物質、細胞毒性物質および薬剤物質から選択される、1つ以上の物質に連結されている抗CD4抗体ホモログを提供する。

【0027】

さらに、本発明の抗体ホモログを産生する細胞、それらの細胞を培養することにより抗体ホモログを生産する方法、およびヒト以外の哺乳動物を、その表面でCD4を発現するCD4+細胞で免疫することにより本発明のハイブリドーマ細胞を生産する方法を提供する。このCD4+細胞は、ヒトCD4全長をコードするDNAでCD4+組織培養細胞を形質転換することにより生産される。

40

【0028】

本発明の抗CD4ホモログおよび5A8擬態物質の特性は、一次標的物がCD4+細胞である感染因子により生じる疾病、例えば、HIV関連疾病であるARCおよびAIDSのヒトにおける、検出、予防および治療に有用である。従って、本発明は、一次標的物がCD4+細胞である感染因子により生じる疾病、例えば、HIV関連疾病であるARCおよびAIDSのヒトにおける、検出、予防および治療に有用な、上記の抗CD4抗体ホモログおよび5A8擬態物質を含有する、診断

50

、予防および治療用の組成物およびこれらの組成物の使用方法を提供する。

【0029】

(発明の詳細な説明)

(定義)

本明細書および請求の範囲で使用されている「CD4」は、天然に出現するCD4遺伝子によってコードされるあらゆるCD4タンパク質を意味する。

【0030】

本明細書および請求の範囲で使用されている「CD4+細胞」は、その表面にCD4糖タンパク質が存在する細胞である。そのような細胞には、CD4+Tリンパ球およびCD4+哺乳動物組織培養細胞、例えば、H9およびC8166細胞が含まれる。

10

【0031】

本明細書および請求の範囲で使用されている「CD4 V1」は、AA1 - AA113にわたるCD4の領域である。

【0032】

本明細書および請求の範囲で使用されている「CD4 VIV2」は、AA1 - AA180にわたるCD4の領域である。

【0033】

本明細書および請求の範囲で使用されている「CD4 V3V4」は、AA181 - AA375にわたるCD4の領域である。

【0034】

本明細書および請求の範囲で使用されている「組換え可溶性CD4」または「rsCD4」は、ヒトCD4のAA1 - AA375(すなわち、V1 - V4領域)からなるポリペプチドである。

20

【0035】

本明細書および請求の範囲で使用されている「CD4 V1に特異的な抗体」は、CD4のV1領域内のエピトープに結合する抗体である。

【0036】

本明細書および請求の範囲で使用されている「CD4 V3V4に特異的な抗体」は、CD4のV3V4領域内のエピトープに結合する抗体である。

【0037】

本明細書および請求の範囲で使用されている「抗体ホモログ」は、免疫グロブリンL鎖、免疫グロブリンH鎖、およびその抗原に結合するそれらのフラグメントから選択される1つ以上のポリペプチドを包含するタンパク質であり、それらは1つ以上の抗原と結合することができる。1つを越えるポリペプチドを包含する抗体ホモログの成分ポリペプチドは、必要に応じてジスルフィド結合か、または共有結合により架橋結合し得る。従って、抗体ホモログには、完全な免疫グロブリンであるIgA、IgG、IgE、IgD、IgM(およびそれらのサブタイプ)型が含まれ、ここでこの免疫グロブリンのL鎖はκまたはλの型であり得る。抗体ホモログはまた、抗原結合特異性、例えば、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、F(V)フラグメント、H鎖のモノマーまたはダイマー、L鎖のモノマーまたはダイマー、1本のH鎖および1本のL鎖からなるダイマー、およびそれらのようなものを保持する完全な免疫グロブリンを含む。

30

40

【0038】

本明細書および請求の範囲で使用されている「ヒト型の組換え抗体ホモログ」とは、もともとはヒト以外の哺乳動物由来の抗体ホモログであって、そこでCD4結合に必要とされないアミノ酸の幾つかまたは全てを、ヒト免疫グロブリンのL鎖またはH鎖の対応する領域のアミノ酸と置換するために組換えDNA技術が用いられた。

【0039】

本明細書および請求の範囲で使用されている「キメラ組換え抗体ホモログ」は、もともとはヒト以外の哺乳動物に由来する抗体ホモログであり、そこにおいて組換えDNA技術は、L鎖、H鎖またはその両方のヒンジ部および定常部の全てまたは一部を、哺乳動物の異なる種、好ましくはヒトの免疫グロブリンのL鎖またはH鎖からの対応する領域と置換するた

50

めに使用された。

【0040】

本明細書および請求の範囲で使用されている「CD4 V1に特異的な抗体がヒトCD4に結合するのを有意にブロックしない」抗体ホモログは、CD4 VIに特異的な抗体が、ヒトrsCD4 (CD4 V1 - V4)またはCD4+細胞上に表現されるヒトCD4のいずれかに結合するのを30%のみ減少させるに過ぎないものである。

【0041】

本明細書および請求の範囲で使用されている「HIVgp120がヒトCD4に結合するのを有意にブロックしない」抗体ホモログは、HIVgp120が、ヒトrsCD4 (CD4 V1 - V4)またはCD4+細胞上に表現されるヒトCD4のいずれかに結合するのを30%のみ減少させるに過ぎないものである。

10

【0042】

本明細書および請求の範囲で使用されている「OKT4」は、Ortho Diagnostic Systems社(ニュージャージー州ラリタン)からカタログ番号7042で入手し得る抗CD4マウスモノクローナル抗体である。

【0043】

本明細書および請求の範囲で使用されている「OKT4A」は、Ortho Diagnostic Systems社(ニュージャージー州ラリタン)からカタログ番号7142で入手し得る抗CD4マウスモノクローナル抗体である。

【0044】

本明細書および請求の範囲で使用されている「5A8擬態物質」は、モノクローナル抗体5A8が、ヒトrsCD4 (CD4 V1 - V4)またはCD4+細胞上に表現されているヒトCD4のいずれかに結合するのを少なくとも30%減少させる化合物である。

20

【0045】

本明細書および請求の範囲で使用されている「インビボでの循環CD4+細胞の数を有意に減少させない」抗体ホモログは、正常な免疫機能を有する哺乳動物に投与後24時間以内に、その循環CD4+細胞数が、その哺乳動物の投与前の数と比較して、または関連のない特異性を有するアイソタイプのあった抗体ホモログが本発明の抗体ホモログの代わりに投与されたコントロールの哺乳動物における数と比較して、50%未満減少させる抗体ホモログである。

30

【0046】

本明細書および請求の範囲で使用されている「インビボでCD4+細胞表面の有意なCD4調節を起こさない」抗体ホモログは、正常な免疫機能を有する哺乳動物に投与後24時間以内に、哺乳動物のCD4+細胞表面上のCD4分子の数を、その投与前の数と比較して、または関連のない特異性を有するアイソタイプのあった抗体ホモログが本発明の抗体ホモログの代わりに投与されたコントロールの哺乳動物における数と比較して、10倍未満減少させる抗体ホモログである。

【0047】

本明細書および請求の範囲で使用されている「インビボで循環末梢白血球数を有意に減少させない」抗体ホモログは、正常な免疫機能を有する哺乳動物に投与後24時間以内に循環末梢白血球の数を、その投与前の数と比較して、または関連のない特異性を有するアイソタイプのあった抗体ホモログが本発明の抗体ホモログの代わりに投与されたコントロールの哺乳動物における数と比較して、50%未満減少させる抗体ホモログである。この文脈において、「末梢白血球」は、Bリンパ球、Tリンパ球 (CD4+またはCD8+)、および単球を含む。本明細書および請求の範囲で使用されている「外来抗原に応答して誘発される抗体の力価を有意に減少させない」抗体ホモログは、後続して投与される外来抗原に応答して誘発される抗体の力価を、関連のない特異性を有するアイソタイプのあった抗体ホモログが本発明の抗体ホモログの代わりに投与されたコントロールの哺乳動物における外来抗原によって誘発された抗体力価と比較して、10倍未満減少させる抗体ホモログである。この文脈において、「外来抗原」は、その哺乳動物のゲノムによってコードされない分子(例:ウ

40

50

ィルスまたは細菌のポリペプチド)である。

【 0 0 4 8 】

(本発明に従う抗体ホモログ)

本発明の1つの実施態様に従う抗体ホモログは、(a)ヒトCD4に結合し;(b)HIVgp120のヒトCD4への結合を有意にブロックせず;および(c)CD4+間のHIVによって誘発されるシンシチウム形成を少なくともOKT4Aと同程度にブロックする。

【 0 0 4 9 】

本発明の他の実施態様は、(a)ヒトCD4に結合し;(b)HIVgp120のヒトCD4への結合を有意にブロックせず;(c)CD4+間のHIVによって誘発されるシンシチウム形成をOKT4よりも良好にブロックし;(d)インビトロでの破傷風トキソイドに特異的な増殖アッセイにおいてOKT4Aよりも免疫抑制性に劣る、抗体ホモログに関する。

10

【 0 0 5 0 】

更に他の実施態様は、(a)ヒトCD4に結合し;(b)HIVgp120のヒトCD4への結合を有意にブロックしない;(c)CD4+間のHIVによって誘発されるシンシチウム形成を、少なくともOKT4Aと同程度にブロックし;そして(d)インビトロの破傷風トキソイド特異的な増殖アッセイでOKT4Aよりも免疫抑制性に劣る、抗体ホモログに関する。

【 0 0 5 1 】

本発明のある種の抗体ホモログは、ヒトCD4 VIV2(即ち、それらはVIV2に特異的である)からなるポリペプチドに結合するが、ヒトCD4 VI(即ち、それらは単独でV1に特異的ではない)からなるポリペプチドには結合しない。同様に、本発明のある種の抗体ホモログは、OKT4AおよびLeu3AのようなCD4 V1に特異的な抗体のヒトCD4への結合を有意にはブロックしない。

20

【 0 0 5 2 】

本発明のこの好ましい抗体ホモログは、HIVによるCD4+細胞への感染を抑制する。本発明の他の好ましい抗体ホモログは、(a)インビボで循環CD4+細胞数の有意な減少を生じない;(b)インビボでCD4+細胞の表面からの有意なCD4調節を生じない;(c)インビボでの末梢循環白血球数の有意な減少を生じない;(d)インビボでの外来抗原に対する応答が誘導される、抗体力価の有意な減少を生じない;(e)エクソビボ(ex vivo)での、マイトジェンまたは異種間細胞に対するT細胞の増殖反応を不変にまたは持続的に抑制しない、この中から選択される1つ以上の特性を発揮する。

30

【 0 0 5 3 】

本発明の最も好まれる抗体ホモログは、上述の特性の全てを発揮する。

【 0 0 5 4 】

本発明に従う特異的な抗体ホモログは、下記に示されるように、5A8(IgG1)、1F8(IgG1)、5F2(IgG1)と呼ばれるマウスモノクローナル抗体を含む。5A8が好ましい。

【 0 0 5 5 】

理論に拘束されるのは望まないが、我々は、本発明の抗体ホモログが、CD4+細胞間のHIVによって誘発されるシンシチウム形成を阻害し、その結果このウィルスが非感染細胞に伝染して行くのを遅らせるので、AIDS、ARC、およびHIV感染の予防または治療に役立つものと考えている。

40

【 0 0 5 6 】

我々は、本発明の抗体ホモログが、HIVgp120がCD4+リンパ球表面に示されるCD4に結合した後もシンシチウム形成を妨げるので、特に有効であると考えている。HIVによるCD4+感染もまた抑制する本発明の抗体ホモログは、特に有用である。さらに、本発明の抗体ホモログは、ウィルスの結合とは非競合的なブロkkerであるため、我々は、それらの治療的および予防的な効果は血漿ウィルスレベルに独自のものと考えている。

【 0 0 5 7 】

(本発明に従う抗体ホモログのスクリーニングアッセイ)

当業者は、既知の方法を使用することにより、特定の抗体ホモログ(または抗体ホモログを包含する調製物)が上述した特性を発揮するかどうか容易に決定し得、その結果、本

50

発明に従う抗体ホモログを同定し得る。

【 0 0 5 8 】

特定の抗体ホモログがヒトCD4に結合するかどうかを確かめるために、あらゆる慣用的な結合アッセイが使用され得る。有用なCD4結合アッセイは、FACS分析、ELISAアッセイ、ラジオイムノアッセイ、その他を含み、これらは抗体ホモログのヒトCD4への結合を検出する。そのようなアッセイに有用な十分な長さおよび可溶性形態のヒトCD4は、PCT特許出願PCT/US88/02940に開示されており、これは本明細書に参考として援用されている。D.R. Littmanら、Ce11、55、p.541(1988)もまた参照されるべきで、これはpreヒトCD4の正しいシグナル配列開裂部位を記述し、PCT/US88/02940の出願後に出版されたものである。CD4への抗体ホモログの結合、またはrsCD4のようなその可溶性フラグメントへの抗体ホモログの結合は、抗体ホモログが誘起された種の免疫グロブリンに特異的な二次抗体の使用を介して慣的に検出し得る。

10

【 0 0 5 9 】

特定の抗体ホモログが、HIVgp120のヒトCD4への結合を有意にブロックしないかどうかを測定するために、あらゆる適切なアッセイを使用し得る。有用なアッセイには、例えば、ELISAアッセイ、ラジオイムノアッセイなどのような、HIVgp120のヒトCD4への結合を交差ブロックする抗体ホモログの能力を定量するものが含まれる。好ましくは、過剰のHIVgp120が標識ヒトrsCD4が固定化抗体ホモログに結合するのをブロックする能力が測定される。

【 0 0 6 0 】

20

好ましくは、ヒトCD4に結合する抗体ホモログの能力は、ヒトCD4+細胞へ結合するその能力をテストすることによって、評価される。特定の抗体ホモログがヒトCD4に結合するかどうかを測定するために使用するための好ましいCD4+細胞は、全長のヒトCD4をコードするDNAで形質転換され、その表面にCD4を発現している哺乳動物の組織細胞である。そのような細胞には例えば、R.A.Fisherら、「HIV Infection Is Blocked In vitro By Recombinant Soluble CD4」,Nature,331,PP.76 - 78(1988)(「r - CD4 - CHO cells」)に記載されている、全長のCD4をコードするDNAで形質転換されたCHO細胞を含む。適切なトCD4 - CHO細胞は、メリーランド州リンチカムにあるIn Vitro International, Inc. culture collectionに寄託され、受託番号IVI - 10260が付けられていて、メリーランド州ロックビルにあるAmerican Type Culture Collectionに移送され、受託番号CRL10884が付けられた。

30

【 0 0 6 1 】

抗体ホモログのCD4+細胞への結合は、好ましくは、テストされた抗体ホモログが誘導された同じ種の免疫グロブリンに特異的な蛍光標識した二次抗体で細胞を染色することによって検出される。蛍光活性化細胞選別機(「FACS」)は、あらゆる結合を検出し定量するために使用される。一般的には、H.M.Shapiro,Practical Flow Cytometry,Alan R.Liss, Inc.,NewYork,NewYork(1985)を参照のこと。

【 0 0 6 2 】

最も好ましくは、HIVgp120のヒトCD4への結合をブロックする抗体ホモログの能力は、過剰HIVgp120をCD4+細胞で予めインキュベートし、抗体ホモログが細胞に結合するのを結合HIVgp120がブロックする度合いを定量することによって、決定される。抗体ホモログのCD4+細胞への結合は、テストされる抗体ホモログが誘導される同じ種の免疫グロブリンに特異的な蛍光標識した二次抗体を使うことによって、FACS分析により定量される。

40

【 0 0 6 3 】

上記アッセイで使用されるHIVgp120は、HIV感染細胞、HIVそれ自身、HIVgp120遺伝子で形質転換された宿主細胞、または分離されたgp120によって、提供し得る。好ましくは、HIVgp120をコードする切断型HIVgp160遺伝子で形質転換された単細胞宿主から分離される、精製された可溶性HIVgp120が使用される。精製された組換えHIVgp120は、例えばRepligen社(ケンブリッジ、マサチューセッツ州)およびCelltech社(パークシャー、英国)から市販されている。組換えgp120を産生する細胞は、例えば、Laskyら、「Neutralization Of

50

The AIDS Retrovirus By Antibodies To A Recombinant Envelope Glycoprotein, Science, 233, pp.209 - 12(1986)」に記載されている。適切な可溶性HIVgp120は、配列番号3で定義されるDNA配列を有する組換えバキュロウィルスで形質転換されたSodoptera frugiperdaによって産生される。

【 0 0 6 4 】

特定の抗体ホモログが、CD4+細胞間のHIV誘導のシンシチウム形成を、OKT4以上に、あるいは少なくともOKT4Aと同程度にブロックするかどうかを測定するために、あらゆる既知のシンシチウムアッセイが使用し得る。好ましくは、HIV実験室分離株、HIV感染CD4+組織培養細胞(例えば、H9)がC8166細胞の培養物に加えられ、そして様々な量の抗体ホモログがコントロールの培養を除く全てに加えられる。コントロールの培養には、同様な様々な量のOKT4またはOKT4Aが添加される。いくつかのコントロールの培養(陰性コントロール)は、何も補充されないか、あるいは、抗体ホモログと同じアイソタイプの関連する抗体で補充される。インキュベーションの後、全ての培養物は、シンシチウムの目視検査により点数化される。このようにして、シンシチウム形成をブロックする抗体ホモログの能力が、OKT4およびOKT4Aのシンシチウムブロック能力と比較される。

【 0 0 6 5 】

抗体ホモログのシンシチウムブロック能力と、OKT4およびOKT4Aの同じ能力とを比較する別の方法を下記に示す。表面に組換えHIVエンベロープ糖タンパク質(即ち、HIVgp160の翻訳後の開裂の後のHIVgp120/gp41)を発現する形質転換された組織培養細胞を、OKT4、OKT4A、テストされる抗体ホモログの存在、または抗体が全くない状況下で、検出可能な物質(例えば、 ^{51}Cr で標識したJurkat細胞)を含むヒトCD4+細胞とともにインキュベートする。インキュベーションの後、培養上清を検出可能な物質についてアッセイする(例えば、 ^{51}Cr の γ 照射測定)。細胞溶解は、HIV誘導のシンシチウム形成に避け難い事象である。それ故に、細胞溶解の結果としての培養上清中に遊離される検出可能な物質は、シンシチウム形成と正比例する。このようにして、OKT4、OKT4Aおよび特定の抗体ホモログがシンシチウム形成をブロックする度合いは、容易に定量し比較し得る。

【 0 0 6 6 】

上記アッセイのための最も好まれる形質転換組織培養細胞は、その表面に組換えHIVエンベロープ糖タンパク質を発現するCHO細胞(「r - gp160 - CHO細胞」)である。そのようなr - gp160 - CHO細胞は、メリーランド州リンチカムにあるIn Vitro International, Inc. culture collectionに寄託され、受託番号IVI - 10261が付けられ、メリーランド州ロックビルにあるAmerican Type Culture Collectionに移送され、受託番号CRL10885が付けられている。寄託細胞は、本明細書に配列番号1で定義されるDNA配列により形質転換されている。

【 0 0 6 7 】

特定の抗体ホモログが、インビトロの破傷風トキシソイドに特異的な増殖アッセイにおいてOKT4Aよりも免疫抑制性が低いかどうか決定するためには、E.G.Englemanら、「Activation of Human T Lymphocyte Subsets: Helper And Suppressor/Cytotoxic T Cells Recognize And Respond to Distinct Histocompatibility Antigens」, J. Immunol., 127, pp.2124 - 29(1981)に記載の一般的なプロトコールが好ましい。そのような破傷風トキシソイドアッセイでは、破傷風トキシソイド誘導のT細胞増殖を減少させる抗体ホモログおよびOKT4Aの能力が定量される。典型的には、増殖は、T細胞による3H - チミジン取り込みによって測定される。

【 0 0 6 8 】

特定の抗体ホモログが、ヒトCD4 VI領域を構成するポリペプチドに結合しないかどうか、あるいは、それがヒトCD4 VIV2領域を構成するポリペプチドに結合するかどうかを決定するには、ELISAアッセイ、ラジオイミュノアッセイ(RIAs)、FACS分析などが有用である。そのようなアッセイでは、抗体ホモログのこれらのポリペプチドのいずれかに結合する能力は、抗体ホモログが由来する種の免疫グロブリンに特異的な二次抗体の使用により検出し得る。

【 0 0 6 9 】

好ましくは、結合は、あらゆる阻害を定量するFACS分析を使用して、CD4+細胞の表面に示されるヒトCD4細胞に対する抗体ホモログの結合競合物として作用するCD4 V1およびCD4 V1V2ポリペプチドの、阻害の研究によって決定される。

【 0 0 7 0 】

あるいは、特定の抗体ホモログがCD4 V1またはCD4 V1V2のポリペプチドに結合するか、しないかの決定は、抗体ホモログがプレートに結合し、検出可能な標識されたrsCD4を用いて、CD4 V1またはCD4 V1V2が同時に抗体ホモログへの結合に競合するRIA競合アッセイを用いて達成される。結合rsCD4の量は、CD4 V1またはCD4 V1V2のポリペプチドが存在しない状況でのrsCD4の量と比較され、CD4 V1またはCD4 V1V2ポリペプチドによるrsCD4結合阻害のパーセントの計算が可能となる。

10

【 0 0 7 1 】

ヒトCD4 V1またはCD4 V1V2領域を構成している好ましいポリペプチドは、PCT特許出願番号PCT/US88/02940または上記Maddonら、Cellに記載されているCD4配列のそれぞれ、CD4 AA3 - AA115またはCD4 AA3 - AA182である。上記Littmanら、Cellの訂正番号システムにより、これらのポリペプチドはそれぞれ、ヒトCD4 AA1 - AA113およびヒトCD4 AA1 - AA180に対応する。適切なCD4 V1ポリペプチドは、B.H.Chaoら、「A113 - Amino Acid Fragment Of CD4 Produced In Escherichia coli Blocks Human Immunodeficiency Virus - Induced Cell Fusion」, J.Biol.Chem., 264, pp.5812 - 17(1989)に記載されている。適切なCD4 V1V2ポリペプチドは、R.L.Garlickら、「Escherichia coli Expression, Purification, And Biological Activity Of A Truncated Soluble CD4」, AID S Res.Hum.Retrovirus, 6, pp.465 - 79(1990)に記載されている。

20

【 0 0 7 2 】

特定の抗体ホモログが、HIVによるCD4+細胞の感染を阻害するかどうか決定するために、HIV感染のあらゆる指標をモニターし得た。HIV感染の有用な指標には、例えば、HIVで慢性的に感染された細胞によるHIVコア抗原p24の分泌およびHIV誘導のシンシチウム形成が含まれる。好ましくは、HIV感染の阻害は、HIV感染のCD4+細胞培養物中の抗体ホモログの存在かまたは存在しない条件でのHIVp24レベルを比較することによって測定される。

【 0 0 7 3 】

特定の抗体ホモログが、インビボでの循環CD4+細胞数の有意な減少を生じるかどうかを測定するために、抗体ホモログを正常免疫機能を有する哺乳動物に投与後24時間以内にその哺乳動物から分離される循環CD4+細胞の数を定量し、投与前の数または、本発明の抗体ホモログの代わりに特異性に関連のないアイソタイプのあった抗体ホモログを投与したコントロールの哺乳動物における数と比較した。CD4+細胞の定量は、例えば、抗体ホモログのCD4(例えば、OKT4)結合を交差ブロックしない蛍光標識した抗CD4抗体で細胞を染色することによって達成し得、その後FACS分析を行う。

30

【 0 0 7 4 】

特定の抗体ホモログがインビボでのCD4+細胞表面からの有意なCD4調節を起こさないかどうか測定するために、抗体ホモログを正常免疫機能を有する哺乳動物に投与後24時間以内にその哺乳動物から分離されるCD4+細胞上のCD4分子の数を定量し、投与前の数または、本発明の抗体ホモログの代わりに特異性に関連のないアイソタイプのあった抗体ホモログを投与したコントロールの哺乳動物における数と比較した。細胞表面CD4の定量は例えば、抗体ホモログのCD4(例えば、OKT4)結合を交差ブロックしない蛍光標識した抗CD4抗体で細胞を染色することによって達成し得、その後FACS分析を行う。

40

【 0 0 7 5 】

特定の抗体ホモログが、インビボで循環末梢白血球数における有意な減少を生じないかどうかを測定するために、正常な免疫機能を有する哺乳動物に抗体ホモログを投与後24時間以内に採取した血液を、慣用的な手段を用いて分画し、白血球数の計測を行う(例えば、染色血スミアにより)。その数は、その哺乳動物の投与前の数、または本発明の抗体ホモログの代わりに特異性に関連しないアイソタイプのあった抗体ホモログを投与したコン

50

トロールの哺乳動物の数と比較する。特定の抗体ホモログが、インビボで外来抗原に応答して誘発される抗体力価の有意な減少を生じるかどうかを測定するために、正常な免疫機能を有する哺乳動物で外来抗原により誘発された抗体力価を抗体ホモログの投与後に測定し、本発明の抗体ホモログの代わりに特異性に関連のないアイソタイプのあった抗体ホモログを投与したコントロールの哺乳動物で誘発された力価と比較する。外来抗原に対する抗体力価は例えば、外来抗原でコートしたマイクロタイタープレートを使用して都合よく、ELIZA法によって測定し得る。

【0076】

特定の抗体ホモログが、マイトジェンおよび異種細胞に対するインビトロでのT細胞の増殖反応を有意に阻害するかどうかを測定するために、抗体ホモログの投与前または投与後の様々な時点で分離されるT細胞の増殖反応が測定される。

10

【0077】

この目的のための有用なマイトジェンは、コンカナバリリンAおよびフィトヘマグルチンを含む。有用な異種細胞は、抗体ホモログが投与された哺乳動物の種以外の種から由来のあらゆる細胞(例えば、リンパ球)を含む。増殖反応は例えば、マイトジェンまたは放射線照射された異種細胞など増殖できないものと共にインビトロでインキュベーションしたあと、様々なT細胞試料への3H-チミジンの取り込みによって、測定し得る。

【0078】

(本発明に従うホモログのタイプおよびそれらの産生)

決定的な基準は上述の特性の組み合わせの1つを示すことであるので、本発明に従う抗体ホモログは多くのタイプが有り得る。例えば、本発明の抗体ホモログは、完全なモノクローナル抗体、完全な組換え抗体、完全なキメラ組換え抗体、完全なヒト型組換え抗体、または前記抗体の抗原結合部位であり得る。

20

【0079】

(A.モノクローナル抗体)

本発明の最も好ましい抗体ホモログは、ハイブリドーマ細胞によって産生された完全なモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体を産生するための技術は、公知である(一般に、E.A.Lerner、「How To Make A Hybridoma」,Yale J.Biol.Med.,54,pp.387-402(1981);M.L.Gefferら、「A Simple Method For Polyethylene Glycol - Promoted Hybridization Of Mouse Myeloma Cells」,Somatic Cell Genet.,3,pp.231-36(1977)を参照)。簡潔に言えば、永久細胞様(典型的には、ミエローマ細胞)はヒトCD4またはそのVIV2含有フラグメントを含む調製物で免疫された哺乳動物からのリンパ球(典型的には、脾臓細胞)に融合され、そして得られたハイブリドーマ細胞の培養上清は、上記のように、本発明に従う抗体ホモログについてスクリーニングされる。

30

【0080】

有用なCD4含有調製物には、ヒトCD4保持細胞(例えば、CD4+リンパ球)、CD4を含有するそのような細胞の分画、天然源から分離される未精製の、部分的に精製された、または実質的に純粋なヒトCD4、および部分的に精製されたまたは実質的に純粋なヒトCD4または組換え宿主細胞から得られるVIV2を含有するそれらのフラグメントが含まれる。CD4のVIV2含有フラグメントを発現する組換え宿主細胞は、例えば、PCT特許出願番号PCT/US88/02940に記載されている。

40

【0081】

好ましい免疫原は、CD4-哺乳動物組織培養細胞を、ヒトCD4の全長をコードするDNAで形質転換することによって産生されるCD4+細胞である。最も好ましくは、免疫原は、上記Maddonら、Cellに記載されているCD4のAA-23-AA435(即ち、上記Littmanら、Cellに記載の訂正番号システムでは、CD4のAA-25-AA433)である。そのような細胞は、本明細書では「r-CD4-CHO細胞」として示され、メリーランド州リンチカムのIn Vitro International, Inc. culture collectionに寄託され、受託番号IVI-10260が付けられ、メリーランド州ロックビルにあるAmerican Type Culture Collectionに移送され、受託番号CRL 10884が付けられた(上記Fisherら、Natureも参照)。

50

【 0 0 8 2 】

理論に束縛されることは望まないが、「天然の」CD4+細胞、分離CD4または切断型のCD4よりは、免疫原としてのr - CD4 - CHO細胞を使用することが、特定の融合物から本発明に従う抗CD4抗体ホモログを得る可能性を増大すると我々は考えている。r - CD4 - CHO細胞の表面に示されるCD4以外に天然のT細胞表面の分子はなく、あったとしてもCD4に関連し、その関連の故にある種のCD4エピトープを受け入れ難くさせるという事実のために、「天然」CD4+細胞に比較してこれは可能性を増大させたと、我々は考えている。単離されたCD4およびそのフラグメントによって想定される高次構造よりもr - CD4 - CHO細胞表面上のCD4によって想定されるより好ましい高次構造のために、単離されたCD4またはそのフラグメントと比較して、これは可能性を増大させたと、我々は考えている。

10

【 0 0 8 3 】

免疫化は、標準的手法を使って達成し得る。このユニット用量および免疫化統制法は、免疫される哺乳動物の種、その免疫状態、その哺乳動物の体重、および投与されるCD4調製物のCD4量に依存する。典型的には、CD4調製物は、フロイントの完全または不完全アジュバントのような、アジュバントと共に投与する。

【 0 0 8 4 】

好ましい実施態様においては、マウスの免疫化に使用される各用量のCD4の調製物は、少なくとも約 2×10^5 個の細胞、好ましくは約 3×10^6 から 2×10^7 個のr - CD4 - CHO細胞を含む。最も好ましくは、1ユニット用量は、約 5×10^6 個のr - CD4 - CHO細胞を含む。典型的には、マウスは第0日に、フロイント完全アジュバントと共にr - CD4 - CHO細胞を腹腔内投与して免疫される。最初の免疫から14日から6月後に、好ましくは第1回目の免疫から15日から20日後に、マウスは第1回目の追加免疫として、アジュバントなしでr - CD4 - CHOを腹腔内投与される。所望されるならば、追加の追加免疫が投与し得る。融合の3日前に、最後の追加免疫(アジュバントなしのr - CD4 - CHO細胞)が腹腔内投与される。典型的には、この最後の追加免疫が、最初の免疫より1から6か月後、好ましくは39から44日後に投与される。最後の追加免疫投与より3日後、この哺乳動物は殺されて、その脾臓が摘出され、脾臓細胞(リンパ球を含む)が永久細胞株との融合のために調製される。

20

【 0 0 8 5 】

この免疫された哺乳動物は追加免疫と追加免疫の間に採血され、各血液サンプルからの血清は本発明に従い、上記のスクリーニングアッセイを使用して、抗体ホモログについてアッセイされる。ハイブリドーマ細胞の産生に使用されるリンパ球は、典型的には、血清が本発明に従う抗体ホモログの存在について既に陽性を示す、免疫された哺乳動物から単離される。

30

【 0 0 8 6 】

リンパ球と永久細胞を融合させるあらゆる既知のプロトコールは、本発明の抗体ホモログを生み出す目的に有用である(例えば、G.Galfreら、「Antibodies To Major Histocompatibility Antigens Produced By Hybrid Cell Lines」,Nature,266,pp.550 - 52(1977);上記Geftterら、Somatic Cell Genet.;上記Lerner,YaleJ.Biol.Med.を参照)。さらに当業者には、有用でもあるそのような方法に多くの多様性があることは明らかである。

40

【 0 0 8 7 】

典型的には、永久細胞は、このリンパ球と同じ哺乳動物の種に由来する。有用な哺乳動物には、マウスおよびラットが含まれる。

【 0 0 8 8 】

最も好ましくは、永久細胞株およびリンパ球の両方ともがBALB/c(JacksonLabs、メイン州バーハーバー)の同系マウスから誘導された。好ましい永久細胞株は、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含む培養培地(「HAT培地」)に感受性を有するマウスミエローマ細胞株である。最も好ましいマウスミエローマ細胞系は、P3X63 - AG8.653(メリーランド州ロックビル、ATCC、カタログ番号CRL1580)である。典型的には、HAT感受性マウスミエローマ細胞は、ポリエチレングリコール(「PEG」)、好ましくはPEG - 3350

50

を使用して、マウス脾臓細胞に融合される。融合によって得られるハイブリドーマ細胞は次に、非融合ミエローマ細胞および非生産的融合ミエローマ細胞(非融合脾臓細胞は、形質転換しなかったために数日後に死滅する)を死滅させるHAT培地を使って選択する。

【0089】

本発明に従う、抗体ホモログ(モノクローナル抗体)を産生するハイブリドーマ細胞は、上記のスクリーニングアッセイを用いて、ハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることによって検出される。好ましくは、一次スクリーニングは、CD4+細胞表面上に示されるヒトCD4に結合する抗体を選択する。そのような結合は、マウス免疫グロブリンに特異的な蛍光標識した二次抗体を使用して検出される。

【0090】

完全なモノクローナル抗体である、本発明の抗体ホモログを産生するために、上記スクリーニングアッセイで陽性であったハイブリドーマ細胞を、このハイブリドーマ細胞にモノクローナル抗体を培養培地に分泌させるのに十分な時間と条件下で培養する。ハイブリドーマ細胞に適切な組織培養技術と培養培地は、公知である(例えば、上記、Lerner、Yale J Biol.Med.を参照)。抗体ホモログを含有する馴化されたハイブリドーマ培養が集められる。

【0091】

あるいは、所望の抗体ホモログは、ハイブリドーマ細胞を非免疫マウスの腹膜腔に注入することによって産生し得る。ハイブリドーマ細胞は、腹膜腔で増殖し、抗体ホモログを分泌し、それは腹水液として蓄積する(上記、Lerner、Yale J Bio1.Med.を参照)。この抗体ホモログは、腹膜腔から注射機を使って腹水液を取り出すことによって回収される。

【0092】

本発明に従う抗体ホモログであるモノクローナル抗体は、馴化されたハイブリドーマ培養上清または腹水から容易に精製されることは、当業者に理解される。

【0093】

(B. 組え抗体およびそれらをコードするDNA)

本発明に従う抗体ホモログは、本発明に従う免疫グロブリンのL鎖およびH鎖をコードするDNAで形質転換された宿主細胞で産生される組換えモノクローナル抗体であり得る。組換え抗体は、公知の遺伝子工学技術によって産生し得る。例えば、本明細書に援用されている米国特許第4,816,397号を参照。

【0094】

例えば、組換え抗体は、本発明の抗体ホモログを産生するハイブリドーマから、所望の抗体の免疫グロブリンのL鎖およびH鎖をコードするcDNAあるいはゲノムDNAをクローニングすることにより産生し得る。これらのポリペプチドをコードするcDNAまたはゲノムDNAは次に、両方の遺伝子がそれら自身の転写または翻訳発現制御配列に機能するように連結されるように、発現ベクターに挿入される。発現ベクターおよび発現制御配列が、使用される発現宿主細胞に適合するように選択される。典型的には、両方の遺伝子が同じ発現ベクターに挿入される。

【0095】

本発明は、5A8のL鎖の可変領域(配列番号14)および5A8のH鎖の可変領域(配列番号9)をコードするDNA配列、即ち本発明に従う抗体ホモログをコードするそれらの一部分、およびこれらのDNA配列を生じるあらゆるDNA配列を提供する。上記のDNA配列の1つ以上を含む組換えDNA分子および、それに機能するように連結する1つ以上の発現制御配列がまた、提供される。

【0096】

原核または真核細胞が、発現宿主として使用し得る。真核宿主細胞での発現は、そのような細胞が原核細胞よりも、適切に折り畳まれ、免疫学的に活性な抗体を集めて分泌するので、好ましい。しかし、産生された抗体で不適切な折り畳みのために不活性なものは、公知の方法(P.S.KimおよびR.L.Baldwin、「Specific Intermediates In The Folding Reactions Of Small Proteins And The Mechanism Of Protein Folding」,An

10

20

30

40

50

n.Rev.Biochem.,51,pp.459 - 89(1982))に従って復元し得る。宿主細胞が、L鎖ダイマーまたはH鎖ダイマーのような完全な抗体の一部分を産生することは可能である。これもまた本発明に従う抗体ホモログである。

【 0 0 9 7 】

上記方法の様々なものが、本発明の範囲内にあることは理解される。例えば、宿主細胞を本発明の抗体ホモログのL鎖またはH鎖のいずれか(両方ではない)をコードするDNAで形質転換することが望ましい。組換えDNA技術はまた、CD4結合に必要ではないL鎖およびH鎖のいずれか、または両方をコードするDNAのいくつか、または全てを除くために使用され得る。そのような切断型DNA分子により発現される分子は、本発明に従う抗体ホモログである。さらに、1つのH鎖と1つのL鎖が本発明の抗体ホモログであり、他のH鎖およびL鎖がCD4以外の抗原またはCD4の他のエピトープである、二機能性抗体ホモログを産生し得る。

【 0 0 9 8 】

(C.キメラ型およびヒト型組換え抗体およびそれらをコードするDNA)

上記の組換え抗体をコードするDNAは、キメラ型またはヒト型組換え抗体を産生するための開始点として使用され得る。キメラ型組換え抗体は、所望の免疫グロブリンのL鎖およびH鎖をコードするDNAを含む適切な発現ベクターで宿主を形質転換することによって産生され、その中ではヒンジ部およびH鎖および/またはL鎖の不変領域をコードするDNAの全てまたはいくらかは、異なる種の免疫グロブリンのL鎖またはH鎖に対応する領域からのDNAで置換された。初めの組換え抗体が非ヒト型の時は、対応するヒトの配列での置換が好ましい。適例となるキメラ型組換え抗体は、マウスの可変領域、およびヒトのヒンジ部および不変領域を有する。一般には、米国特許第4,816,397号、およびS.L.Morrisonら、「Chimeric Human Antibody Molecules:Mouse Antigen-Binding Domains With Human Constant Region Domains」,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81,pp.6851 - 55(1984)を参照のこと。

【 0 0 9 9 】

本発明の好ましい5A8キメラ型組換え抗体では、それぞれに、L鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列番号15、H鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列番号10である。

【 0 1 0 0 】

ヒト型組換え抗体は、所望の非ヒト型免疫グロブリンのL鎖およびH鎖をコードするDNAを含む適切な発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによって産生され、この中ではCD4結合に関わっていないアミノ酸をコードするDNAの全てまたはいくらかは、所望のヒト免疫グロブリンのL鎖またはH鎖の対応する領域からのDNAで置換された。一般には、P.T.Jonesら、「Replacing The Complementarity - Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse」,Nature,321,pp.522 - 25(1986)を参照のこと。

【 0 1 0 1 】

本発明の最も好ましいヒト型組換え抗体は、5A8の相補性決定領域(「CDRs」)を有している。これらは、ヒト型組換え抗体を含んでおり、その中では:

- (a)L鎖CDR1は、配列番号15のAA24 - AA40である。
- (b)L鎖CDR2は、配列番号15のAA56 - AA62である。
- (c)L鎖CDR3は、配列番号15のAA95 - AA102である。
- (d)H鎖CDR1は、配列番号10のAA31 - AA35である。
- (e)H鎖CDR2は、配列番号10のAA50 - AA66である。
- (f)H鎖CDR3は、配列番号10のAA99 - AA111である。

他の好ましい実施態様は、5A8のCDRsを有するヒト型組換え抗体を提供し、その中ではL鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号56のAA1 - AA112であり、H鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号45のAA1 - AA122である。

【 0 1 0 2 】

さらに好ましい実施態様は、5A8のCDRsを有するヒト型組換え抗体ホモログを提供し、その中ではL鎖のアミノ酸配列は配列番号56のAA1 - AA219であり、H鎖のアミノ酸配列は配列番号45のAA1 - AA449である。

【0103】

本発明は、pre - 5A8ヒト型L鎖(配列番号55)およびpre - 5A8ヒト型H鎖(配列番号44)をコードするDNA配列、本発明に従う抗体ホモログをコードする前記DNA配列の一部、および前記DNA配列を生じるDNA配列を提供する。1つ以上の前記DNA配列および、それに対して機能するように連結される1つ以上の発現制御配列を含む組換えDNA分子もまた提供される。好ましい組換えDNA分子には、pMDR1007(pre - 5A8ヒト型L鎖)pMDR1002(pre - 5A8ヒト型H鎖)が含まれ、これはメリーランド州ロックビルにあるAmerican Type Culture Collectionに寄託されていて、それぞれ受託番号ATCC68846およびATCC68847が付けられている。

【0104】

(D. 完全な抗体ではない本発明に従うホモログ)

10

本発明はまた、完全な抗体ではない抗体ホモログを提供する。そのようなホモログは、上記のあらゆる抗体ホモログから由来し得る。例えば、抗原結合フラグメントおよび上記抗体に由来する、全長を有するモノマー、ダイマー、トリマーのポリペプチドは、それ自身本発明に従う抗体ホモログである。このタイプの有用な抗体ホモログは、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、F(v)フラグメント、H鎖のモノマーまたはダイマー、L鎖のモノマーまたはダイマー、1本のH鎖および1本のL鎖からなるダイマー、などを含む。5A8のFabフラグメント以外の上記フラグメントは一般に、本発明に従う有用な抗体ホモログであると我々は考えている。

【0105】

抗体フラグメントは化学的方法、例えば、完全な抗体をペプシンまたはパパインのようなプロテアーゼで分解し、そしてこの分解産物を必要に応じて還元剤で処理することによって、産生し得る。あるいは、有用なフラグメントは、切断型のH鎖および/またはL鎖遺伝子で形質転換された宿主細胞を使って産生し得る。H鎖およびL鎖のモノマーは、完全な抗体をジチオスレイトールのような還元剤で処理することによって産生し得、その後この鎖を分離するための精製が行われる。H鎖およびL鎖のモノマーもまた、所望のH鎖またはL鎖の両方ではなくいずれかをコードするDNAで形質転換された宿主細胞により産生し得る。例えば、E.S.Wardら、「Binding Activities Of A Repertoire Of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted From Escherichia coli,Nature,341,pp.544 - 46(1989);L.Sastryら、「Cloning Of The Immunological Repertoire in Escherichia coli For Generation Of Monoclonal Catalytic Antibodies:Construction Of A Heavy Chain Variable Region - Specific cDNA Library」,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86,pp.5728 - 32(1989)を参照。

20

30

【0106】

(本発明に従う誘導体化された抗体ホモログ)

1つの実施態様において、本発明は、本発明のあらゆる抗体ホモログが、本発明の抗体ホモログ、本発明の5A8擬態物質、検出可能物質、細胞毒性物質、および薬剤からなる群がら独立に選択される1以上のメンバーと機能的に連結(化学的カップリング、遺伝子融合その他によって)されるように、誘導体化された抗体ホモログを提供する。誘導体化された1つのタイプの抗体ホモログは、2つ以上の(同じタイプまたは異なるタイプの)抗体ホモログを架橋結合させることによって、産生される。適切な架橋リンカーは、ヘテロ二官能性で適切なスペーサー(例えば、m - マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシニミドエステル)により分離される異なる反応基を有するものか、またはホモ二官能性であるもの(例えば、ジスクシニミジルスベリン酸)を含む。そのようなリンカーは、イリノイ州ロックフォードのPierce Chemical Companyから入手される。

40

【0107】

有用な検出可能物質は、蛍光化合物を含む。適例の蛍光検出可能物質は、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5 - ジメチルアミン - 1 - ナフタレンスルホンクロライド、フィコエリスリンなどを含む。

【0108】

本発明の抗体ホモログはまた、アルカリフォスファターゼ、ワサビダイコンペルオキシ

50

ダーゼ、グルコースオキシダーゼなどのような検出可能な酵素で誘導体化し得る。抗体ホモログが検出可能な酵素で誘導体化されるとき、酵素が検出可能な反応産物を産生するために使用する別の試薬を添加することによって検出される。例えば、検出物質であるワサビダイコンペルオキシダーゼが存在するとき、過酸化水素およびジアミノベンジジンの添加は、検出可能な発色反応産物を導く。抗体ホモログはまた、ビオチンとともに誘導体化し得、そして間接的なアビジン結合の測定によって検出し得る。

【0109】

本発明はまた、1つ以上の薬剤と連結する抗体ホモログを提供する。有用な薬剤は、CD4以外のヒトのポリペプチドに特異的な抗体ホモログのような、生物学的に活性なペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質を含む。他の有用な薬剤は、HIV逆転写酵素阻害剤(例えば、3'-アジド-2',3'-ジデオキシチミジン(「AZT」)および2',3'-ジデオキシイノシン(「DDI」))および他の抗ウィルス化合物のような非タンパク質性薬剤、または免疫抑制剤(例えば、サイクロスポリンまたはFK506)を含む。

10

【0110】

(本発明に従う抗体ホモログを産生する細胞)

本発明はまた、本発明の抗体ホモログを産生する細胞および細胞培養物を提供する。そのような細胞は、本発明の抗体ホモログであるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞および本発明の組換え抗体ホモログを産生する形質転換された宿主細胞を含む。

【0111】

本発明に従う好ましい細胞は、本明細書で「5A8」「1F8」および「5F2」として示されるモノクローナル抗体を産生するものを含む。この最も好ましい細胞系は、モノクローナル抗体5A8を産生する。5A8、1F8および5F2を産生するハイブリドーマ細胞系は、メリーランド州リンチカムにあるIn Vitro International, Inc. culture collectionに寄託され、それぞれ受託番号IVI-10257、IVI-10258およびIVI-10259が付けられ、メリーランド州ロックビルにあるAmerican Type Culture Collectionに移送され、それぞれ受託番号HB10881、HB10882およびHB10883が付けられている。

20

【0112】

他の好ましい細胞は、上記の5A8キメラ型およびヒト型組換え抗体を産生する宿主細胞である。pMDR1007(pre-5A8ヒト型L鎖)およびpMDR1002(pre-5A8ヒト型H鎖)で形質転換された真核宿主細胞は、5A8のヒト型抗体を産生するために最も好ましい。

30

【0113】

さらに、本発明は、抗体ホモログを産生する本発明の細胞を培養することによって、本発明の抗体ホモログを産生する方法を提供する。そのような細胞を培養し、それらが産生する抗体ホモログを単離する方法は、公知である。これらの方法は、組織培養技術および腹水の産生を含む。

【0114】

ハイブリドーマ細胞である本発明の細胞を産生する方法もまた提供される。この方法には、全長のヒトCD4をコードする一DNAでCD4-哺乳動物組織培養細胞を形質転換することによって産生される、細胞がその表面上にCD4を発現するCD4+細胞で、ヒト以外の哺乳動物を免疫する工程を包含する。このプロセスのための免疫原として使用される好ましい細胞は、上記のr-CD4-CHO細胞である。

40

【0115】

(5A8擬態物質)

本発明は5A8擬態物質を提供する。これはモノクローナル抗体5A8による、CD4+細胞表面上に発現されているヒトrsCD4またはヒトCD4への結合を少なくとも30%減少させる化合物である。5A8擬態物質は、ペプチド、半ペプチド化合物または非ペプチド化合物である。好ましい5A8擬態物質は、CD4+間のHIV誘導シンシチウム形成を阻害し、HIVによるCD4+細胞の感染を阻害するか、あるいはその両方である。最も好ましい5A8擬態物質は、本発明の1つ以上の抗体ホモログの特性を示す。

【0116】

50

本発明の5A8擬態物質は多数の、ペプチド(例えば、5 - 20個の長さのアミノ酸)、半ペプチド化合物または非ペプチド有機化合物を合成し、次にこれらの化合物を、その能力、即ち(1)5A8を用いてヒトCD4への結合を交差ブロックする、(2)CD4+間のHIV誘導シンシチウム形成を阻害する、および(3)HIVによるCD4+細胞感染を阻害する、能力によってスクリーニングし得る。一般には、本明細書に援用されている、米国特許第4,833,092号、J.K.ScottおよびG.P.Smith,「Searching For Peptide Ligands With An Epitope Library」,Science,249,pp.386 - 90(1990),およびJ.J.Devlinら、「Random Peptide Libraries :A Source Of Specific Protein Binding Molecules」,Science,249,pp.404 - 07(1990)を参照のこと。

【0117】

10

(本発明に従う薬剤組成物および薬学的方法)

本発明の抗体ホモログおよび5A8擬態物質は、その一次標的物がCD4+リンパ球である感染因子により起こる疾病を予防および治療するための予防用および治療用組成物に有用である。そのような疾病は、AIDS、ARCおよびHIV感染を含む。

【0118】

抗体ホモログとしてヒトに投与するための本発明の好ましい薬剤組成物は、マウスモノクローナル抗体5A8、1F8、または5F2、5A8マウス/ヒトキメラ型組換え抗体、5A8ヒト型組換え抗体、またはこれらの抗体の抗原結合部分の、1つ以上を含む。5A8マウス/ヒトキメラ型組換え抗体または5A8ヒト型組換え抗体を含む薬剤組成物が、最も好ましい。

【0119】

20

本発明の薬剤組成物はさらに、AIDS、ARC、およびHIV感染の予防または治療のための他の治療法を包含し得る。例えば、本発明の抗体ホモログは、AZT、DDI、HPA - 23、ホスホノホルメート、スラミン、リバビリン、およびジデオキシシチジンのような逆転写酵素をブロックする抗レトロウイルス剤、またはHIVプロテアーゼを阻害する物質と組み合わせて、使用し得る。さらに、本発明の薬剤組成物はさらに、 α 型インターフェロン、 β 型インターフェロン、 γ 型インターフェロンのようなインターフェロンまたはカスタノスベルミンのようなグルコシダーゼ阻害剤のような抗ウィルス剤、または副腎コルチコステロイド、アザチオプリン、サイクロスポリン、またはFK506のような免疫抑制物質を包含し得る。さらに、本発明の抗体ホモログは、HIVgp120のCD4に対する結合を有意にブロックする物質と組み合わせて好ましく投与し得る。そのような物質には、例えば、V1に特異的(例えば、Leu3A)である抗CD4抗体、CD4 VIポリペプチドおよびHIVgp120に特異的な抗体(抗イディオタイプまたはその他)を含む。

30

【0120】

さらに、抗体ホモログまたは5A8擬態物質の1つ以上が、前記治療物質の2つ以上と組み合わせて使用し得る。そのような組み合わせ療法は、投与される治療物質がより低い用量で好ましく活用し得、この結果、様々な単一療法に伴う毒性または合併症の可能性を回避する。

【0121】

本発明の薬剤組成物は、本発明に従う抗体ホモログまたは5A8擬態物質、またはそれらの誘導体化された形態(単数または複数)、および好ましくは薬学的に受容可能な担体の1つ以上の免疫治療学的な有効量を包含する。「免疫治療学的な有効量」とは、AIDS、ARC、HIV感染、あるいはその一次標的物がCD4+リンパ球である感染因子によって引き起こされる他の疾病の、蔓延、重篤度、または免疫不全を低減させるのに可能な量を意味する。「薬学的に受容可能な担体」とは、それが投与される患者にアレルギー反応または他の好ましくない効果を引き起こさない担体を意味する。

40

【0122】

適切な薬学的に受容可能な担体には、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、ブドウ糖、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組み合わせの1つ以上を含む。薬学的に受容可能な担体はさらに、抗体ホモログまたは5A8擬態物質の貯蔵寿命または有効性を高める、浸潤剤または乳化剤、保存料、または緩衝液のような二次的物質の少

50

量を含有し得る。

【0123】

本発明の組成物は、様々な形態であり得る。これらには例えば、錠剤、カプセル、粉末、液状溶液、コロイド状溶液、懸濁液のような固体、半固体、液体の投与形態、リボソーム、座薬、注射可能な注入用溶液を含む。好ましい形態は、投与および治療的利用の意図された状態に依存する。

【0124】

本発明の好ましい薬剤組成物は、ヒトを他の抗体で受動免疫するのに使用されるものと類似している。投与の好ましい状態は、非経口的投与である。

【0125】

本発明の免疫治療学的に有効な量の抗体ホモログまたは5A8擬態物質は、なかんずく、投与スケジュール、投与される抗体ホモログまたは5A8擬態物質のユニット投与量、抗体ホモログまたは5A8擬態物質が他の治療剤と組み合わせて投与されるかどうか、患者の免疫状態および健康状態、および投与される特定の抗体ホモログまたは5A8擬態物質の治療状態の活性に依存することは、当業者には明らかである。

【0126】

HIV感染、ARC、またはAIDSの治療または予防の単独療法として、完全な抗体である抗体ホモログのユニット投与量毎の免疫治療学的な有効量は、0.1から10mg/kg患者体重、好ましくは2mg/kg患者体重である。ユニット投与量は、抗ウィルス効果が観察されるまで、1日2回から2週間毎に1回の範囲で投与され、好ましくは2週間に1回である。抗ウィルス効果は、ウィルス負荷量、リンパ球数および臨床上の兆候と症候群を含む様々な方法で測定し得る。しかし、より低いまたはより高い投与量および他の投与スケジュールが使用し得ることは認識される。

【0127】

完全な抗体ではない抗体ホモログに対する、および5A8擬態物質に対する治療統制法は、それらのサイズおよび薬学的な特性に依存して異なり得る。

【0128】

本発明がより理解され得るように、下記の実施例が記述される。これらの実施例は、例示のみを目的としており、いかなる意味でも本発明の範囲が制限されるものではない。

【実施例】

【0129】

(本発明の抗体ホモログの産生および最初のスクリーニング)

モノクローナル抗体1F8、5A8、および5F2を産生するために使用される免疫原は、細胞表面に発現される全長のヒトCD4をコードするDNAで形質転換されるCHO細胞(「r-CD4-CHO細胞」)であった。このCHO細胞を形質転換させるために使用されるCD4配列は、上記Maddonら、Cellに記載されている。これらの細胞は、R.A.Fisherら、「HIV Infection Is Blocked In Vitro By Recombinant Soluble CD4」,Nature,331,PP.76-78 (1988)に記載されており、そしてメリーランド州リンチカムにあるIn Vitro International Inc. culture collectionに寄託され、受託番号IVI-10260が付けられていて、メリーランド州ロックビルにあるAmerican Type Culture Collectionに移送されて受託番号CRL 10884が付けられた。

【0130】

r-CD4-CHO細胞は、10%の透析された胎児ウシ血清(「FCS」)(フロリダ州マイアミ、North American Biologics、カタログ番号33189)が補足された α -MEM培地(ニューヨーク州グランドアイランド、Gibco)で、5% CO₂、37℃、そして30nMメトトレキサートで維持した。細胞は、5mMEDTA補足のリン酸緩衝液(Ca⁺およびMg⁺が遊離)生理食塩水(「PBS」)を含む上記培養培地で置換され、その緩衝液で細胞を回収することによって、注入用に調製した。回収された細胞は、500×g_{av}で5分間遠心してペレット化し、PBS中でこのペレットを再懸濁し、前回と同様に遠心することによって洗浄し、計数し、PBS中でこの細胞ペレットを再懸濁することによって注入用の適切な体積に調整した。

【 0 1 3 1 】

約4から6週齢の2匹のメスのBALB/cJマウス(メイン州バーハーバー、JacksonLabs)を、r - CD4 - CHO細胞で下記のように免疫した。1匹目のマウスは、第0日にフロイント完全アジュバント(「CFA」)(コロラド州デーパー、Colorado Serum Co.、カタログ番号C51450)とPBS中のr - CD4 - CHO細胞との1:1乳濁液で、腹腔内投与により(i.p.)初回抗原刺激を受け、第20日目にアジュバントなしのPBS中のr - CD4 - CHO細胞でi.p.により追加免疫され、そして最後に第44日目にアジュバントなしのPBS中のr - CD4 - CHO細胞で静脈内に追加免疫された。もう1匹のマウスは、第0日にi.p.により初回抗原刺激を受け、第15日目にi.p.により追加免疫され、そして最後に第39日目に静脈内に追加免疫された(全ての注入に、アジュバントなしのPBS中のr - CD4 - CHOを用いる)。両方のマウスとも、各注入物は、約250 μ lの体積中に約 3×10^6 から 2×10^7 個のr - CD4 - CHO細胞を含んでいた。

10

【 0 1 3 2 】

最後の注入より3日後に、両方のマウスを殺して脾臓をそれぞれ摘出し、ペトリ皿中の、血清を含まない約5mlのDMEM(Gibco、カタログ番号430 - 2100)の中に置いた。脾臓の被膜を切り開き、脾臓細胞を培地中で細片にした。この脾臓細胞懸濁液を、1本の15mlコニカルチューブに移して、約5分間静置した。上清を新しい15mlのコニカルチューブに取り除き、そして融合させるときまでインキュベーター(37℃、5%CO₂)中に置いた。両方のマウスからの、この脾臓細胞をプールした。

【 0 1 3 3 】

コントロールの脾臓供給細胞の単一化細胞による5mlの懸濁液を、基本的には、上述の免疫された脾臓細胞のように免疫されていないマウスから調製し、必要とされるまでインキュベーター(37℃、5%CO₂)中に置いた。

20

【 0 1 3 4 】

この免疫された脾臓細胞と融合される相手は、ヒポキサンチン/アミノプテリン/チミジン(「HAT」)感受性の、非分泌型マウスミエローマ細胞系 - P3 $\times$ 63 - AG8.653(メリーランド州ロックビル、ATCC、カタログ番号CRL1580)であった。融合される前に、P3 $\times$ 63 - AG8.653細胞はDMEM/10%FCS(37℃、5%CO₂)中に維持され、融合される日には対数増殖期に保持された。

【 0 1 3 5 】

使用される融合のプロトコールは、上記Lerner、Yale J.Biol.Med.,および上記Gefferら、Somatic Cell Genet.,に記載されているプロトコールのハイブリッドであった。特に、融合の直前に、上記のように調製したプールしていた脾臓細胞は、PBSで3回洗浄し、約10mlのPBSで再懸濁し、そして計数した。また、融合の直前に、対数的フェーズにあるP3 $\times$ 63 - AG8.653細胞は、PBSで3回洗浄し、そして計数した。このミエローマ細胞は、PBS中に 1×10^7 細胞/mlになるまで再懸濁した。各融合について、 1.5×10^8 個の脾臓細胞が、50mlのポリエチレン製コニカルチューブ中の 3×10^7 個のミエローマ細胞と混合し、そしてこの細胞はPBSで1回洗浄した。脾臓細胞のミエローマ細胞に対する割合は、5:1である。これらのチューブは $500 \times g_{av}$ で5分間遠心して、細胞をペレットにする。上清の吸引の後、このペレットはチューブの底をたたくことによって穏やかに再懸濁した。これらのチューブは次に、37℃の水の入ったビーカー中に置いた。後に続く全ての融合工程は、このビーカー中で遂行した。

30

40

【 0 1 3 6 】

次に、ゆっくりとチューブを揺らしながら、血清の入っていないDMEM中の0.8mlの37℃融合培地(50w/v%ポリエチレングリコール3350(ニュージャージー州フィリップスバーグJ.T.BakerCo.からの「Baker」等級))を、各ペレットに約1分間かけてゆっくりと添加した。血清の入っていないDMEM 1mlを各ペレットに、少しずつ、もう1分間かけて添加し、続いて血清の入っていないDMEM 20mlを各ペレットに次の5分間にわたり添加した。両方のチューブとも室温で $600 \times g_{av}$ で10分間遠心し、そして上清を吸引した。コントロールの脾臓供給細胞の5ml懸濁液の400 μ lを含む「HAT選択培地」50mlを段階的に各ペレットに、ときどき混合しながら、添加した。「HAT選択培地」は、DMEM/10%FCS(最終濃度:10 μ Mヒ

50

ポキサンチン、0.4 μ M アミノプテリン、16 μ M チミジン)で50 $\times$ HAT stock(ミズーリ州セントルイスSigma Chemical Co.、カタログ番号H-0262)を50倍に希釈することによって、調製した。

【0137】

50ml細胞懸濁液のそれぞれを、約100 μ l/ウェルで、5個の96ウェルの平底マイクロタイタープレートに入れた。このプレートは、37 $^{\circ}$ C 5%CO₂のインキュベーター中に静置した。第2日目に、この細胞に、ウェル毎に100 μ lのHAT選択培地の添加により栄養を供給した。第10日目に、この培地を吸引し、200 μ lのHAT選択培地を各ウェルに添加した。上清を、クローンを含むウェルから、一次スクリーニングのために、融合より12、14、16、そして19日後に回収した。この融合効率34%(960の適切なウェルのうち、327がスクリーニングされるクローンを生み出していた)であった。

10

【0138】

使用された一次スクリーニングは、ヒトrsCD4に結合する抗体を検出するために設計されたラジオイミュノアッセイ(RIA)であった。

【0139】

このRIAを遂行するために、アフィニティー精製されたPBS中のヤギ抗マウスIgG(Fcフラグメントに特異的)(ペンシルベニア州コ克蘭ビル、CappelI、カタログ番号22950)を96ウェルPVCマイクロタイタープレート(50 μ l/ウェル)に添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。ヤギ抗マウスIgGをプレートから取り除き、そしてそのウェルを5%FCS/PBSの100 μ l/ウェルで、1時間室温でブロックした。ブロッキング溶液を除去した後、混合物のないハイブリドーマ培養上清をウェルに加えて(50 μ l/ウェル)、室温で1時間インキュベートした。このプレートをPBS/0.05% Tween-20で3回洗浄した。次に、PBS/5%FCS中の50 μ lの¹²⁵I-rsCD4(約20,000cpm)を各ウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした。最後に、ウェルをPBS/0.05%Tween-20で3回洗浄した。全ての洗浄液緩衝液を振り落とした後、ウェルはプレートをカットすることにより分離し、ガンマカウンターで分析した。培養上清の代わりに5%FCS/PBSを添加したウェルを、バックグラウンドのウェルとした。

20

【0140】

一次のスクリーニングアッセイに使用された¹²⁵I-rsCD4は、上記Maddonら、Cellに記述されている、CD4配列の精製された¹²⁵I標識ヒトCD4のAA3-AA377(即ち、上記LittmanらCellの訂正番号に従うとヒトCD4のAA1-AA375)を含んでいた。このrsCD4は、上記Fisherら、Natureに基本的には記載されているCHO細胞で形質転換することにより産生した。これらの細胞によって産生されたこのrsCD4は、上記Fisherら、Natureに記載のように精製し得る。

30

【0141】

この精製されたrsCD4は、Bolton-Hunter法に従って、実質的にはBolton-Hunter試薬(マサチューセッツ州ボストン、New England Nuclear)の供給者によって記載されているように、¹²⁵Iで標識した。¹²⁵I-rsCD4の質を、標識化手順が市販されているCD4 V1に特異的なモノクローナル抗体であるLeu3A(カリフォルニア州、マウンテンビュー、Becton Dickinson、カタログ番号7326)およびOKT4A(ニュージャージー州ラリタン、Ortho Diagnostic Systems、カタログ番号7124)、およびCD4 V3V4に特異的なモノクローナル抗体であるOKT4(Ortho Diagnostic Systems、カタログ番号7024)により認識されるエピトープを破壊しないことを確認することによって、モニターする。

40

【0142】

クローンは、それらがRIAでのバックグラウンドに対して約10倍であれば、一次スクリーニングで陽性であると考えられた。この基準によると、クローン(21)の約6%が陽性だった。この21の陽性クローンが引き出され、拡大が試みられた;13のクローンが拡大を生き延び、凍結保存された。これら13のクローンのうちの多くが成功裏にサブクローニングされ、それらには1F8、5A8および5F2を含んでいた。拡大、サブクローニング、および細胞の凍結は、基本的には、上記Lerner、Yale J.BiolMed.に記載されているように行った。

【0143】

50

一次スクリーニングの後単離したこの13の陽性クローンは、下記の一連のテストに従った。それらのアッセイに基づいて、本発明に従う抗体ホモログを産生した3つのハイブリドーマ細胞系 - 1F8、5F8および5F2を同定した。クローン1F8、5A8および5F2のスクリーニングアッセイの結果を、下記に示す。他の10の抗体のデータは、示していない。

【0144】

我々が行った最初の二次スクリーニングは、この抗体が天然のCD4エピトープを認識するかどうかを測定するために設計した。これは実質的に下記に示すように、CD4+Jurkat細胞に発現される細胞表面CD4および、モノクローナル抗体染色のr-CD4-CHOを蛍光標識したヤギ抗マウス二次抗体との結合を視覚化して、FACS分析することによって完了した。13の抗体全てが細胞表面CD4を認識した。次に、我々の抗体により結合しているCD4エピトープの位置を決めるために、下記のように、CD4 V1ポリペプチドおよびCD4 VIV2ポリペプチド、市販のCD4 V1に特異的およびCD4 V3V4に特異的な抗体およびHIVgp120とともに競合アッセイを行った。多くの抗体はまた次に、CD4細胞間のHIV誘導のシンシチウム形成およびHIVによるCD4+細胞の感染を抑制する能力について、およびインビトロの破傷風トキソイド特異的な増殖アッセイにおけるそれらの免疫抑制活性を、評価した。

10

【0145】

競合アッセイに基づいて、我々は13の陽性のクローンの中から3つがCD4 VIに特異的な抗体を、5つがCD4 V3V4に特異的な抗体を、そして5つがCD4 VIV2に特異的な抗体を分泌したことを確認した。CD4 VIV2に特異的な抗体の中で、3つのみ - 1F2、5A8および5F2 - が、HIVgp120のCD4への結合を有意にブロックした。

20

【0146】

マウスをヒトrsCD4で免疫した後で行われた単一の融合において、他の抗CD4モノクローナル抗体は産生されたが、どのハイブリドーマも本発明の抗体ホモログである抗体の産生は見出されなかった。我々は、本発明に従う抗CD4抗体ホモログはrsCD4での免疫によって生み出される；しかし、r-CD4-CHO細胞を免疫原として使用すると、そのような抗体を得る可能性を増大する、と考える。

【0147】

(CD4 VIおよびCD4 VIV2ポリペプチドに対する特異性)

本発明の抗体ホモログにより認識されるCD4エピトープを特徴づけるために、我々は、いくつかの抗体ホモログがヒトCD4のVIV2領域のエピトープ、またはCD4 VIのみにより確定されるエピトープを認識するかどうか測定した。特に、ヒトCD4のAA1-AA113および/またはAA1-AA111(「CD4-V1」)およびヒトCD4のAA1-AA180(「CD4-VIV2」)からなるポリペプチドが、本発明の3つの抗CD4抗体ホモログ(モノクローナル抗体1F8、5A8、および5F2)、2つのCD4 VIに特異的なモノクローナル抗体(Leu3AおよびOKT4A)および1つのCD4 V3V4に特異的なモノクローナル抗体(OKT4)へのヒトrsCD4による結合を阻害する能力を研究した。

30

【0148】

簡潔に言うと、各マイクロタイタープレートのウェルを抗マウス免疫グロブリンでコートしてRIAを行い、ブロックし、そして次にテストされるべきハイブリドーマ培養上清の1つでインキュベートした。次に、CD4 VIまたはCD4 VIV2および¹²⁵I-rsCD4の混合物を添加した。インキュベートの後、ウェルを洗浄し、そして結合した¹²⁵I-rsCD4をガンマカウンター中で検出した。

40

【0149】

特に、マイクロタイタープレート(96ウェル)を、50 μl/ウェルのアフィニティー精製されたヤギ抗マウスIgG(Fcフラグメントに特異的)(Cappel)で、4 で一晩コートした。ウェルを、PBS/0.05% Tween-20で3回洗浄し、そして次に5%FCS/PBSの100 μl/ウェルとともに1時間インキュベートすることによって、ブロックした。ブロック用緩衝液を取り除いた後、ウェルを、50 μl/ウェルの混合物のないハイブリドーマ培養上清(5-20 μg/mlのIg)とともに室温で1時間インキュベートした。コントロールのウェルは、50 μl/ウェルのOKT4(PBS/5% FCS中の10 μg/ml)、OKT4A(PBS/5%FCS中の500ng/ml免疫グロブリン)またはL

50

eu3A(PBS/5%FCS中の500ng/ml)とともにインキュベートした。このプレートを、PBS/0.05% Tween - 20で3回洗浄した。CD4 - V1およびCD4 - VIV2(最終濃度5 µg/ml)を別々に、約20,000cpm ¹²⁵I - rsCD4(上記のように調製された)で、約35 ~ 45分間室温で、予めインキュベートした。これらの予めインキュベートした混合物を次に、ウェル中で室温で1 - 2時間インキュベートした。インキュベートに続いて、ウェルをPBS/0.05% Tween - 20で3回洗浄し、続いて放射能活性をカウントした。

【 0 1 5 0 】

この実験に使用されるCD4 - V1は、PCT特許出願PCT/US88/02940の図16に記載されているCD4配列のAA3 - AA115および/またはAA3 - AA113から構成されていたもので、それらの各々は、上記Littmanら、Cellの訂正番号システムに従ってCD4のAA1 - AA113およびAA1 - AA1H 10
に対応する。これらのCD4 VIポリペプチドを、B.H.Chaoら、「A 113 - Amino Acid Fragment Of CD4 produced In Escherichia coli Blocks Human Immunodeficiency Virus - Induced Cell Fusion」、J.Biol.Chem.,264,pp.5812 - 17(1989)に記載のように産生し、精製した。

【 0 1 5 1 】

この実験で使用されたこのCD4 - VIV2は、PCT特許出願PCT/US88/02940の図16に記載されているCD4配列のAA3 - AA182から構成されていたもので、これは上記Littmanら、Cellの訂正番号システムに従うと、CD4AA1 - AA180に対応する。

【 0 1 5 2 】

このCD4 VIV2ポリペプチドを、上記Chaoら、J.Biol.Chem.に記載のCD4 VIポリペプチドの産生のために使用されるプロトコールに類似する様式で、標準的な分子生物学の技術を用いて、細菌により産生した。CD4 VIV2ポリペプチドをコードするDNAを有するプラスミドを、E.coli株A89にトランスフェクトした(S.A.Goffら、「Heat Shock Regulatory Gene htpR Influences Rates of Protein Degradation And Expression Of The Ion Gene In Escherichia coli」、Proc.NatlAcad.Sci.USA、81、pp.6647 - 51(1984))。この細胞を、10リットルの発酵槽中で標準的な条件下で発酵し、Pelikon濃度システムを使用して回収し、その後BeckmanJ - 6M遠心機中で3000rpmで遠心した。この細胞ペレットは、使用するまで、- 20 に冷凍した。

【 0 1 5 3 】

このCD4 - VIV2を精製するために、この細胞を融解し、細胞湿重量グラム当たり8mlの緩衝液(20mMトリス - HCl、pH7.7/1mM Na₂EDTA)中で懸濁した。この細胞を、フレンチプレスに3回通して壊した。CD4 - VIV2を含む不溶性物質を遠心によってペレットにした。このペレットを1M尿素/15mM酢酸ナトリウム、pH5.5(細胞湿重量グラム当たり15 - 20m1)で3回洗浄し、続いて20mMトリス - HCl、pH7.7/1mMNa₂EDTAで2回洗浄した。得られた洗浄ペレットは、6Mグアニジン-HCl/10mMDTT/20mMトリス - HClpH7.7を用いて、細胞湿重量グラム当たり25m1で、室温で一晩抽出した。この抽出物を、48,000xg、で45分間遠心して透明に分離した。

【 0 1 5 4 】

このCD4 - VIV2を復元するために、この分離した抽出物を、冷やした(4)20mMトリス - HCl、pH7.7で1:60v/vに希釈し、そしてウシ血清アルブミン(「BSA」)を最終濃度0.5mg/ml 40
になるまで添加した。全てのこれに続く工程は、4で行った。このpHを6N HClで7.0まで低下させ、そしてこの懸濁液を5ミクロンのMillidiskフィルター(マサチューセッツ州ベッドフォード、Millipore、カタログ番号MCSC40S01)に通して分離し、続いてDurapore0.2ミクロンフィルター(Millipore、カタログ番号CVGL01TP3)に通した。この分離した調製物をS - Sepharose Fast Flowカラム(ニュージャージー州ピスカタウェイ、Pharmacia LKB Biotechnology)に負荷し、100体積の負荷毎に1体積のS - Sepharose Fast Flowゲルの率で、20mMトリス - HCl、pH7.0で予め平衡化した。このカラムを20mMトリス - HCl、pH7.0で洗浄し、そしてこの結合したタンパク質を20mMトリス - HCl、pH7.7/300mM NaClで溶出した。

【 0 1 5 5 】

CD4 - VIV2を含むこの溶出プールを等体積の20mMトリス - HCl、pH7.7で希釈し、そして抗CD4モノクローナル抗体アフィニティークラム(下記)に負荷し、20mMトリス - HCl、pH7.7/150mMNaClで予め平衡化した。このカラムを20mMトリス - HCl、pH7.7/150mMNaClで、続いて20mMトリス - HCl、pH7.7/1MNaClで洗浄した。この結合したタンパク質を50mMグリシン/250mMNaCl、pH3.0で溶出した。この溶出した物質を20mMHEPES、pH6.8に透析し、そしてAmiconの限外ろ過セルのPM10膜で凝縮した。この精製、凝縮したCD4 VIV2(約0.5 - 3.0 mg/ml)を使用するまで、- 70 °Cで保存した。

【 0 1 5 6 】

この抗CD4モノクローナル抗体のアフィニティークラムを上記の融合から産生されたCD4 VIに特異的なモノクローナル抗体の1つを使用して、調製した。このモノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム分画と陰イオン交換クロマトグラフィによって腹水から精製し、限外ろ過によって凝縮し、0.1Mホウ酸ナトリウム(pH8.0)/0.5M塩化ナトリウム中に透析し、そして再び約5mg/mlの濃度まで、限外ろ過によって凝縮した。この精製した抗CD4モノクローナル抗体(約50mgタンパク質を含む10ml)を手順書(SigmaChemicalCo.、カタログ番号C9142)の指示に従って、4gのCNBr - Sepharoseと結合し、12mlの誘導体化樹脂を回収した。

【 0 1 5 7 】

これらの実験の結果を表1および表IIに概略する。

【 0 1 5 8 】

表I

【 0 1 5 9 】

【表 1】

表 I

CD4 - V1によるrsCD4結合阻害：
同時競合

抗CD4 モノクローナル 抗体	CD4-V1による rsCD4結合 阻害%	複製数
1F8	- 4.9*	1
5A8	4.3 ± 8.8*	3
5F2	- 2.3*	1
OKT4	- 5.5 ± 6.0*	4
OKT4A	.87.3 ± 9.1	4
Leu3A	88.2 ± 8.7	3

この種のアッセイにおいて見られる標準偏差のため、この数字は、CD4 - V1が、rsCD4の抗CD4モノクローナル抗体への結合を本当に阻害したわけではないことを示していると、我々は考える。

【 0 1 6 0 】

表II

【 0 1 6 1 】

【表 2】

表 I I

CD4-V1V2によるrsCD4結合阻害：
同時競合

抗CD4 モノクローナル 抗体	CD4-V1V2による rsCD4結合 阻害%	複製数
1F8	94.0 ± 1.8	3
5A8	96.4 ± 0.5	3
5F2	93.5 ± 0.9	3
OKT4	14.4 ± 15.1*	2
OKT4A	95.5 ± 1.7	2
Leu3A	94.0 ± 3.4	2

10

20

この種のアッセイにおいて見られる標準偏差のため、この数字は、CD4-V1V2が、rsCD4抗体の抗CD4モノクローナル抗体への結合を本当に阻害したわけではないことを示していると、我々は考える。

【0162】

表1およびIIに示したデータから、モノクローナル抗体1F8、5A8、および5F2は、ヒトCD4-VIからなるポリペプチドとは結合せず、ヒトCD4-V1V2からなるポリペプチドと結合することがわかる。

【0163】

(5A8と、CD4-VIに、特異的な抗体ならびにCD4-V3V4に、特異的な抗体である抗体とによる交差ブロック)

30

本発明の抗体ホモログによって認識されるCD4エピトープをさらに特徴づけるために、抗体ホモログである5A8、2つのCD4-V1に特異的な抗体(OKT4AおよびLeu3A)、およびCD4-V3V4に特異的な抗体(OKT4)とrsCD4との交差ブロック実験を行った。また、5A8と、本発明の他の抗体ホモログとの間の同様の交差ブロック実験も行った。さらに、Leu3Aおよび5A8による、ヒト末梢血リンパ球の表面に示された天然CD4との交差ブロック実験も行った。これらの交差ブロック実験の結果を表IIIおよびIV、ならびに図1に示す。

【0164】

表IIIに示されたrsCD4交差ブロック実験に関しては、CD4-V1およびCD4-V1V2の交差ブロック実験について上述したものと本質的に同様に、RIAを行った。すなわち、各マイクロタイタープレートウェルを抗マウスIgでコートし、ブロックし、その後5A8培養上清(5~20 µg/ml)、OKT4A(500ng/ml)、OKT4(10 µg/ml)またはLeu3A(500ng/ml)とともにインキュベートした。その後、ウェルを洗浄し、PBS中の100 µl/ウェルのマウスIg(50 µg/ml)によって室温で30分から1時間ブロックした。競合抗体(すなわち、上記濃度の2倍のOKT4A、OKT4またはLeu3A)を、¹²⁵I-rsCD4とともに予めインキュベートし、そしてそれぞれの混合物を、50 µl/ウェルずつ加えた。室温で1時間インキュベートした後、ウェルを洗浄し、結合した¹²⁵I-rsCD4をガンマカウンターによって定量した。

40

【0165】

表IIIは、可溶性抗CD4抗体であるLeu3A、OKT4AおよびOKT4による、固定化された抗CD4抗体である5A8、OKT4、OKT4AおよびLeu3Aに対する¹²⁵I-rsCD4の結合の阻害をパーセントで示している。

50

【 0 1 6 6 】

表III

【 0 1 6 7 】

【表 3】

表 III

Leu3A、OKT4AおよびOKT4による交差ブロック：
rsCD4含有溶液中ですみインキュベートした
抗CD4モノクローナル抗体

固定化された 抗CD4 モノクロー ナル抗体	rsCD4結合阻害パーセント						複製数
	Leu3Aによる	OKT4Aによる	OKT4による				
5A8	16.1 ± 5.7	5.3 ± 8.3*	-15.6 ± 25.4*				3
OKT4	8.4 ± 3.3	3.6 ± 7.7*	91.3 ± 2.1				3
OKT4A	62.0 ± 3.1	68.5 ± 2.6	-26.8 ± 18.3*				3
Leu3A	85.8 ± 0.5	73.9 ± 1.9	-10.3 ± 8.9*				3

この種のアッセイに見られる標準偏差により、この数字は、行の先頭部に示した抗CD4モノクローナル抗体が、その列の抗CD4モノクローナル抗体に対するrsCD4の結合を本当には阻害していないことを示していると考ええる。

【 0 1 6 8 】

表IIIに示されたデータは、Leu3A、OKT4AおよびOKT4が、rsCD4の5A8への結合を有意に阻害していないことを示している。

【 0 1 6 9 】

これらの結果は、5A8が、Leu3A、OKT4AおよびOKT4によって認識されるものとは異なるCD4エピトープ(1つまたは複数)を認識することを示している。

【 0 1 7 0 】

表IVに示したrsCD4の交差ブロック実験に関しては、5A8のみを固定化したことを除けば、表IIIに示した実験について上述したものと本質的に同様にRIAを行い、そして可溶性競合抗体は、1F8(5~20 µg/ml)、5A8(5~20 µg/ml)、5F2(約5 µg/ml)、OKT4(10 µg/ml)およびLeu3A(500ng/ml)であった。さらに、この実験で用いられた¹²⁵I - rsCD4は、(MaddonらCell、上記に述べられた配列よりむしろ)PCT特許出願PCT/US88/02940の図16に示されたCD4配列の、精製された¹²⁵I 標識化ヒトCD4AA3 - AA377からなっており、これは、LittmanらCell、上記の訂正番号システムによるCD4AA1 - AA375に一致する。

【 0 1 7 1 】

表IVは、可溶性抗CD4抗体である1F8、5F2、5A8、OKT4およびLeu3Aによる固定化された5A8への、¹²⁵I - rsCD4の結合阻害をパーセントで示している。

【 0 1 7 2 】

表IV

【 0 1 7 3 】

【表 4】

表 IV

5A8による交差ブロック：
rsCD4含有溶液中で予めインキュベートした
抗CD4モノクローナル抗体

可溶性抗CD4 モノクローナル抗体	rsCD4結合 阻害パーセント%
1F8	97
5A8	98
5F2	89
OKT4	4
Leu3A	0

表IVに示されたデータは、1F8および5F2がrsCD4の5A8への結合をブロックすることを表わしており、5A8、1F8および5F2が同一の、重複する、または近位のCD4エピトープ(1つまたは複数)を認識することを暗示している。

【0174】

図1は、細胞表面CD4の交差ブロック実験の結果を示している。ヒト末梢血リンパ球(「PBL」)を、緩衝液(図1A)、Leu3A(図1B)、OKT4A(図1C)、OKT4(図1D)あるいは5A8(図1E)とともにインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、フルオレセインイソチオシアネートで標識したLeu3A(「Leu3A-FITC」)とともにインキュベートした。再洗浄の後、FACStar蛍光活性化細胞選別機を用いて細胞を分析した。このFACS分析の結果を図1に示す。データから、5A8は、V1に特異的な抗体Leu3Aの細胞表面CD4に対する結合を有意にブロックしないことがわかる。この実験のプロトコルを以下に述べる。

【0175】

つまり、10mlの血液を、非補足RPMI-1640培地で2倍に希釈し、室温で、混合物を50mlチューブ内で10mlのリンパ球選別培地(Lymphocyte Separation Media)(Organon Teknika, Durham, NC, カタログ番号36427)上に積層することによって、ヒトPBLを単離した。このチューブを室温で30分間、400xgで遠心した。PBLを界面から収集し、非補足RPMI-1640培地で2回洗浄し、計数した。各サンプルに対して、 3×10^5 のPBLをチューブあたり50 μ lの染色緩衝液(PBS/1%BSA/0.02%アジ化ナトリウム)に懸濁し、染色緩衝液で1回洗浄した。染色緩衝液をペレット状の細胞から吸引し、抗体試薬を各ペレットに加えた。5A8に関しては、抗体試薬は、約5~20 μ g/mlの5A8を含有する、馴化ハイブリドーマ細胞培養上清50 μ lであった。コントロール抗体の抗体試薬は、Leu3Aには60 μ l/チューブ；OKT4Aには30 μ l/チューブ；OKT4には30 μ l/チューブの、染色緩衝液中の2.5 μ g/mlの溶液であった。

【0176】

もう1つのコントロールとして、1つの細胞サンプルに、抗体を含まない染色緩衝液50 μ lを添加した。

【0177】

サンプルを氷上で30分間インキュベートし、1mlの染色緩衝液中で3回洗浄した。次に、66 μ lのFITC結合Leu3A(Becton Dickinson, カタログ番号7323)を1:10の希釈度で染色緩衝液に加え；その後、サンプルを氷上で20分間インキュベートし、2回洗浄し、FACStar蛍光活性化細胞選別機(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, マウンテンビュー。カリフォルニア州)で分析した。

【0178】

(HIVgp120による交差ブロック)

本発明の抗体ホモログがHIVgp120のヒトCD4への結合をブロックするかどうかを判断するために、われわれは、ヒトrsCD4を用いたRIAと、ヒトCD4+組織培養細胞を用いたFACS分析という、2つの方法を用いた。

【0179】

これらのアッセイで用いた可溶性組み換えHIVgp120(「r-gp120」)は、バキュロウイルスベクター/昆虫細胞培地システムを用いて産生した。切断型のHIV-1gp120遺伝子を、Autographa californica核多角体病ウイルス(バキュロウイルス)へ形質転換するのに用いたベクターは、ベクターpAc373(G.E.Smithら、「Modification And Secretion of Human Interleukin 2 Produced In Insect Cells By A Baculovirus Expression Vector」、Proc.Natl.Acad.Sci.USA82,PP.8404-08(1985))の誘導体であった。

10

【0180】

シグナルペプチドおよびヒト組織プラスミノーゲン活性化因子のプロペプチドおよびC末端メチオニンをコードするDNA配列を、pAc373ベクター内で、gp160のAA13-AA471をコードするHIV-1DNA配列にフレームに合うように連結し(配列番号1および配列番号2参照)、続いてロイシンおよびセリンをコードするDNA(配列番号3)で同様に行った。得られたベクターおよび野生型バキュロウイルスを、Spodoptera frugiperda(sf9)細胞に同時トランスフェクションし、そして2つのHIV r-gp120ポリペプチドを発現する組み換えバキュロウイルスを、M.D.SummersとG.E.SmithがA Manual Of Methods For Baculovirus Vectors And Insect Cell Culture Procedures、Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No.1555に記載している方法に従って分離した。組み換えウイルスは、HIV-1抗血清によって特異的に免疫沈降され、一得るタンパク質を産生する能力によって識別される。Spodoptera frugiperda細胞における配列番号3の発現によって、2つの異なったr-gp120ポリペプチドが産生された:配列番号4のAA33からAA498の範囲のポリペプチドの70%および、配列番号4のAA23からAA498の範囲のポリペプチドの30%である。

20

【0181】

精製工程はすべて4で行われた。馴化昆虫細胞培養上清を、ミリポアデュラポア(Millipore Durapore)の親水性の2ミクロンフィルターカートリッジを用いた濾過によって分離した。分離した濾過物を等量の40mMのMES、pH5.5で希釈し、S-Sepharose Fast Flowカラム(20mMのMES、pH5.5で前もって平衡化したもの)に、馴化培養上清100mlにつき1mlの樹脂の割合で充填した。カラムを20mMのMES、pH5.5で、引き続いて20mMのトリス-HCl、pH7.0で洗浄した。結合タンパク質を20mMのトリス-HCl、pH7.0/300mMのNaClで溶出した。HIVr-gp120を含有する溶出物プールを等量の20mMのトリス-HCl、pH7.0で希釈し、ヒトrsCD4アフィニティカラムにかけた。アフィニティカラムは、基本的には樹脂製造業者の指示(Bio-Rad Laboratories, リッチモンド, カリフォルニア州, カタログ番号153-6046)に従って、樹脂1mlあたり5mgのrsCD4の割合でアフィニティゲル(Affi-Gel)10樹脂に固定化された、精製ヒトrsCD4(上述)を含有していた。カラムを、カラム体積分の5倍のPBSで、その後、カラム体積分の5倍のPBS/500mMのNaClで、そしてカラム体積分の5倍のPBSで洗浄した。結合HIVr-gp120ポリペプチドを、50mMのクエン酸ナトリウム、pH3.0/250mM NaClで溶出した。溶出された分画を、1Mのトリス-HCl、pH7の10分の1を加えることによって、直ちに中和した。

30

40

【0182】

精製HIVr-gp120ポリペプチド(約0.2~0.3mg/ml)は、使用するまで-70で保存した。

【0183】

CD4-V1およびCD4-V1V2競合実験に関して上述したものと本質的に同様に、RIA競合実験を行った。つまり、各マイクロタイタープレートウェルを抗マウスIgでコートし、ブロックし、次に上述のように、ハイブリドーマ培養上清(1F8、5A8または5F2)、OKT4、OKT4AまたはLeu3Aとインキュベートした。

【0184】

精製されたバキュロウイルスr-gp120(最終濃度2.5 µg/ml)および¹²⁵I-rsCD4とを共

50

に0.5時間、予めインキュベートし、そしてこの混合物を各ウェルに加えた。インキュベーションの後、ウェルを洗浄し、結合¹²⁵I - rsCD4をガンマカウンターを用いて検出した。

【0185】

ELISA交差ブロック実験の結果を表Vに示すが、この表は、本発明の3つの抗体ホモログ(1F8、5A8および5F2)、2つのCD4 VIに特異的なモノクローナル抗体(Leu3AおよびOKT4A)およびCD4 V3V4に特異的なモノクローナル抗体(OKT4)に対する、精製HIVr - gp120によるヒトrsCD4の結合の阻害パーセントを示している。

【0186】

表V

10

【0187】

【表5】

表 V

HIV r-gp120による交差ブロック： rsCD4含有溶液中で予めインキュベートした 抗CD4モノクローナル抗体		
固定化され た抗CD4 モノクローナル 抗体	HIV r-gp120による rsCD4結合 阻害パーセント	複製数
1F8	11.9	1
5A8	25.0 ± 0.9	2
5F2	8.6	1
OKT4	-8.2 ± 11.8	3
Leu3A	85.1 ± 0.0	2
OKT4A	66.1 ± 17.9	3

20

30

表Vに示されたデータは、HIVgp120とヒトrsCD4とを予めインキュベートすることにより、モノクローナル抗体1F8、5A8または5F2のr - gp120/rsCD4複合体に対する結合が、有意にブロックされないことを示している。反対に、r - gp120は、CD4 V1に特異的な抗体OKT4AおよびLeu3AのヒトrsCD4に対する結合をほとんどなくしてしまった。

【0188】

第二の方法において、精製HIVr - gp120が、CD4+ヒト細胞系(H9)への結合に関して、5A8、2つのCD4 VIに特異的な抗体(Leu3AおよびOKT4A)およびCD4 V3V4に特異的な抗体(OKT4)に競合するかどうかを測定するために、免疫蛍光染色法を用いた。2組の細胞サンプルを並行して染色した。1組は、抗CD4モノクローナル抗体によってのみ染色した。もう1組は、抗CD4モノクローナル抗体で染色する前に飽和HIVr - gp120で予めインキュベートした。

40

【0189】

つまり、各サンプルに関して、2x10⁵のH9細胞(Dr.RobertT.Schooley,University of Colorado Medical School,デンバー,コロラド州により提供)を、50μlの染色緩衝液PBS/2%FCS/0.02%アジ化ナトリウム内に懸濁し、そして50μlの抗体試薬を加えた。5A8に関しては、抗体試薬は、約5~20μg/mlの5A8を含有する馴化ハイブリドーマ細胞培養上清であった。コントロール抗体の抗体試薬は、染色緩衝液中の、Leu3A、OKT4AまたはOKT4の10μl/ml溶液であった。陰性コントロールとしては、MOPC21細胞から精製されたマウスミエローマタンパク質(IgG1)(Litton Bionetics,Inc.,チャルストン,サウスカロライナ州,カ

50

タログ番号8402 - 03)、またはUPC - 10細胞から精製したマウスミエローマタンパク質(IgG 2a)(Litton Bionetics, Inc., カタログ番号8402 - 24)という、特異性に関連のない抗体を染色緩衝液中に10 µg/ml含有する抗体試薬を、2つの細胞サンプルに添加した。

【0190】

サンプルを氷上で30分間インキュベートし、その後1mlの染色緩衝液内で3回洗浄した。次に、2 µlのFITC結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン(Jackson Immunoresearch, ウェストグローブ, ペンシルベニア州, カタログ番号115 - 006 - 062)を1:50の最終希釈度で染色緩衝液(30 µg/ml)に加え、そしてサンプルを氷上で20分間インキュベートし、2回洗浄し、FACStar蛍光活性化細胞選別機で分析した。

【0191】

(同様に1つのチューブにつき2x10⁵のH9細胞を用いた)並行実験において、細胞サンプルを、抗CD4モノクローナル抗体で上記のように染色する前に、(細胞表面CD4分子を飽和する)過剰r - gp120とともにインキュベートした。つまり、10 µgのr - gp120を含有する染色緩衝液50 µlを各細胞サンプルに加えた。氷上でr - gp120とともに30分間、予めインキュベートした後、上記の抗体試薬を加え、上記のような染色工程を続けた。細胞は、上記のように、FACStarで分析した。

【0192】

図2にこの実験の結果を示す。各プロファイルは、H9細胞の対数蛍光強度に対する相対細胞数(等分目盛り、x軸)を示している。対数蛍光強度は、細胞1個あたりの染色された分子の密度に正比例している。左側のプロファイルは、抗CD4抗体をH9細胞に直接加えた組の実験に関するものである。右側のプロファイルは、抗CD4抗体を加える前に、細胞を過剰HIVr - gp120で予めインキュベートした組の実験に関するものである。点線は、抗CD4モノクローナル抗体による染色を示す。

【0193】

実線は、関連のない陰性コントロールのマウスIgG抗体による染色を示す。UPC - 10免疫グロブリン(IgG2)はOKT4A(IgG2a)およびOKT4(IgG2b)のコントロールとしての役割を果たし、MOPC - 21免疫グロブリン(IgG1)は5A8(IgG1)のコントロールとしての役割を果たした。

【0194】

この結果は、CD4+H9細胞に対する5A8の結合が、過剰HIVr - gp120による細胞の予めのインキュベーションに影響されないことを示している。反対に、CD4 V1に特異的な抗体Leu 3AおよびOKT4Aの結合は、過剰HIVr - gp120による予めのインキュベーションによって完全にブロックされた。予想通り、CD4 V3V4に特異的なモノクローナル抗体OKT4は、HIVr - gp120による予めのインキュベーションに影響されなかった。

【0195】

(HIV誘導のシンシチウム形成のブロック我々)

我々は、AIDS、ARCおよびHIV感染の予防および治療における、潜在的な治療上の利点を評価するために、本発明の抗体ホモログの、HIV誘導のCD4+細胞間のシンシチウム形成をブロックする能力を研究した。

【0196】

第一の方法において、我々は、B.D.Walkerら、「Inhibition Of Human Immunodeficiency Virus Syncytium Formation And Virus Replication By Castanospermine」,Proc.Natl.Acad.Sci.USA、84,PP.8120 - 24(1984)に示されたように、本発明のいくつかの抗体ホモログの、HIV感染H9細胞と非感染C8166細胞との間のシンシチウム形成をブロックする能力をテストした。HIV感染H9細胞とC8166細胞(Walkerら,ProcNatl.Acad.Sci.USA上記参照)は、CD4+ヒトT細胞系である。C8166は、J.Sodroskiら、「Role Of The HTLV - III/LAV Envelope In Syncytium Formation And Cytopathicity」,Nature,322,pp.470 - 74(1986)に述べられているように、CD4+形質転換ヒト臍帯血リンパ球細胞系である。双方の細胞株は、Dr.Robert T.Schooley,University of Colorado Medical School,デンバー,コロラド州,から提供され、また、AIDS Reference Reagent Program,Na

10

20

30

40

50

tional Institutes of Health,ベセスダ,メリーランド州,からも入手可能である。

【0197】

つまり、各サンプルにつき、 5×10^3 の慢性HIV感染H9細胞を、 $100 \mu\text{l}$ の「R-20培地」(10mM のHEPES(pH6.8)と 2mM のグルタミンを含有し、20%FCSを補足した、RPMI1640培養培地)中、5%の CO_2 雰囲気下で37℃で30分間、約 $5 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ の本発明の抗体ホモログを含有する $50 \mu\text{l}$ のハイブリドーマ細胞培養上清とともに、インキュベートした。培養上清は、1:2から1:256の割で、R-20培地での一連の2倍希釈度でテストした。そして、 $100 \mu\text{l}$ のR-20培地に、 15×10^3 の非感染C8166細胞を加え、各ウェルの最終体積を $200 \mu\text{l}$ にした。サンプルにC8166細胞を加えた後、37℃で、5% CO_2 雰囲気下でインキュベートし、次に各ウェルのシンシチウムの数を、光学顕微鏡で視覚的検査によって計数した。

10

【0198】

ウェルごとのシンシチウムの数は、添加された抗CD4抗体含有培養上清がない場合に最高であった。1つのサンプルでは、約 $5 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ のアイソタイプのあった関連のないマウス免疫グロブリン(ハイブリドーマ培養上清)を含有する、 $100 \mu\text{l}$ の培養上清を、すべての非特異的ブロック効果の陰性コントロールとして加えた。陽性コントロールとしては、CD4VIに特異的なモノクローナル抗体であるLeu3Aを、 $2.5 \mu\text{g/ml}$ から $0.04 \mu\text{g/ml}$ の範囲でのさまざまな濃度でテストした。

【0199】

この実験の結果を、表VIに示す。データは、シンシチウム形成の50%をブロックする結果を出した、ハイブリドーマ培養上清希釈度の逆数として示されている。

20

【0200】

表VI

【0201】

【表6】

表 VI

ハイブリドーマ 培養上清	本発明の抗体ホモログによる シンシチウム形成のブロック
	50%ブロックの 希釈度の逆数
5A8	>256
1F8	(アッセイせず)
5F2	8
<u>コントロール</u>	
無関連IgG	ブロックせず
Leu3A	ブロック*

30

$0.04 \mu\text{g/ml}$ まで、80%以上のブロック。

【0202】

上記のアッセイを用いたいくつかの独立した実験において、シンシチウム形成の50%をブロックするために必要とされたOKT4(CD4 V3V4に特異的な抗体)の濃度は、 $1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ の範囲であった。

【0203】

上記のアッセイは、精製5A8、精製Leu3A、および精製Leu3Aと精製5A8とをともに用いても数回行われた。Leu3Aと5A8を共に用いた場合には、相乗阻害が観察された。例えば、1つの実験では、単独で用いた場合にはLeu3Aも5A8も、 $0.02 \mu\text{g/ml}$ の濃度においてシンシチウム形成を50%阻害した。 $0.008 \mu\text{g/ml}$ のLeu3Aまたは5A8単独では、それぞれ、30%および2

50

0%のシンシチウムブロックが観察された。しかし、Leu3Aおよび5A8を共に用いた場合には、50%阻害には、それぞれ0.004 μ g/mlが必要なだけであった。4つの追加的実験の中で3つにおいて同様の相乗効果が観察された。

【0204】

もう1つのシンシチウムアッセイにおいて、我々は、精製5A8が、ヒトCD4+ジャーカット(Jurkat)細胞と、表面上に組み換えgp160を発現する形質転換されたCHO細胞(「r - gp160 - CHO細胞」)との間の、HIV誘導によるシンシチウム形成をブロックする能力を正確に計測した。ジャーカット細胞は、Dr Timothy Springer, Dana Farber Cancer Institute, ボストン, マサチューセッツ州, により提供され、またAmerican Type Culture Collection, ロックビル, メリーランド州, カタログ番号TIB152からも入手可能である。r - gp160 - CHO細胞を、In Vitro International Inc. culture collection リンチカム, メリーランド州, に寄託し、受託番号IVI - 10261が付けられて、そしてAmerican Type Culture Collection, ロックビル, メリーランド州, に移送して受託番号CRL10885が付けられた。これらの細胞を形質転換するために用いられたHIVgp160遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号1に記されており、それがコードするgp120/gp41ポリペプチドのアミノ酸配列も配列番号1に、さらに配列番号2にも記されている。比較のために、2つのCD4 VIに特異的なモノクローナル抗体(OKT4AおよびLeu3A)および1つのCD4 V3V4に特異的なモノクローナル抗体(2 - 103 - D11、作用はOKT4に類似)のシンシチウムブロック能力をテストするために、このアッセイを用いた。

【0205】

このアッセイに用いた精製5A8抗体は、以下のように調製した。5A8ハイブリドーマ細胞(1×10^6)を(プリスタンで感作した)Balb/cマウスの腹腔内に注射し、腹水を産生させた。5A8腹水は、使用するまで - 20 で凍結して保存した。解凍後、5A8腹水を、約500 $\times$ g_{av}で20分間、室温で遠心した。上清を0.45 μ Mミリポアフィルターで濾過し、そして6倍に希釈し、そしてアフィニティゲルプロテインA(Affi - Gel Protein A) MAPSHカラム(Bio - Rad Laboratories, カタログ番号1536159)を用いて製造者の指示に従って精製した。そして、サンプルを、リン酸緩衝生理食塩水によって4 で徹底的に透析した。透析された5A8調製物を、一定部分に分割し、使用するまで - 70 で保存した。

【0206】

つまり、r - gp160 - CHO細胞を、100 μ l培地(10%透析FCS、4mMのLグルタミンおよび500nMのメトトレキサートを補足した α - MEM)において、各ウェル 1.5×10^4 細胞ずつ、96ウェルの(平底)マイクロタイタープレートにプレートし、5%のCO2雰囲気下、37 で一晩インキュベートした。インキュベーション後、プレートを吸い取り紙上で裏返し、ウェルから培地を取り除き、100 μ lの抗体試薬を各ウェルに加えた(各抗体濃度は3倍でテストした);これらのサンプルで「テストcpm」を得た。抗体試薬としては、精製5A8、Leu3A、OKT4または2 - 103 - D11(5A8について上述したように精製したもの)を、0.026から10,000ng/mlの範囲の濃度で加えた。その後、10%加熱不活化FCS、2mMのグルタミンおよび100U/mlのペニシリンGおよびストレプトマイシンを補足した100 μ l RPMI培地内の 6×10^4 51 Cr標識CD4+ジャーカット細胞(下記と同様に調製)を、加えた。ジャーカット細胞からの非特異的な 51 Cr放出を制御するために、 6×10^4 51 Cr標識ジャーカット細胞を200 μ lの体積でウェルに加えた;このサンプルで「バックグラウンドのcpm」を得た。

【0207】

マイクロタイタープレートを5%のCO2雰囲気下、37 で17~19時間インキュベートした。インキュベーション後、光学顕微鏡によって陽性コントロールのウェル内のシンシチウム溶解と、シンシチウム形成をブロックすると考えられる抗CD4抗体を含有するウェル内の細胞溶解阻害とを視覚的に検査した。プレートを、約400 $\times$ g_{av}で、3から4分遠心した。上清(100 μ l)を、底にふれないようにして各ウェルから吸引し、タイターチューブマイクロチューブ(Titertube Microtubes)(Bio - Rad Laboratories, カタログ番号223 - 9390)に入れた。

【0208】

10

20

30

40

50

その後、マイクロチューブを個別に計数バイアルに移し、各バイアルから放射されたcpmをガンマカウンター(Beckman)で計測した。

【0209】

各アッセイに加えられた合計数(「総cpm数」)を測定するために、 6×10^4 の ^{51}Cr 標識化ジャーカット細胞をシンチレーションバイアルに加え、その後、0.2NNaOHおよびPBS内の1%ドデシル硫酸ナトリウムを加えることによって、バイアル内で溶解させた。このコントロールバイアルから放出されたcpmをガンマカウンターで計測した。

【0210】

^{51}Cr 標識化ジャーカット細胞を以下のように調製した。フラスコから取り出したジャーカット細胞をスピンドウンし、新鮮な増殖培地(10%の加熱不活化FCS、2mMのLグルタミンおよび100U/mlのペニシリンGおよびストレプトマイシンで補足したRPMI培地)に再懸濁し、計数した。新鮮な ^{51}Cr を以下の割合で50mlのコニカルボトム無菌チューブに加えた:(1) $100 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ (100 μl)を 5×10^6 までの細胞を含有する900 μl の培地に加える;(2) 200 ~ 250 $\mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ (200 ~ 250 μl)を 5×10^6 から 10×10^6 までの細胞を含有する800 ~ 750 μl の培地に加える。細胞は5%CO₂雰囲気下で37℃で、ゆるくキャップをしめて、時々ゆっくりと振りながら、45分間インキューベートした。インキュベーション後、細胞を増殖培地で3回(1回につき30ml)洗浄した。洗浄した細胞を、1mlの増殖培地内で再懸濁し、計数し、シンシチウムアッセイに加えた。

【0211】

細胞は、調製後30分以内でアッセイに用いた。

【0212】

阻害パーセントは以下のように計算した。

(テストcpm - バックグラウンドcpm) / (合計cpm - バックグラウンドcpm) × 100 = シンシチウム溶解%

阻害% = (1 - (抗CD4MAb存在下のシンシチウム溶解%) / (抗CD4MAb非存在下のシンシチウム溶解%)) × 100。

【0213】

図3および4は、抗体濃度(ng/ml)に対するシンシチウム阻害パーセント(上述のように計算)を図示して、これらの実験の結果を示している。図3は、0.026 ~ 2,000ng/mlの5A8、Leu3AおよびOKT4Aのシンシチウム形成への効果を示している。

【0214】

予想とは異なり、図3によると、5A8の効力は、約10ng/mlで50%のシンシチウムブロックを達成し、Leu3AおよびOKT4Aに匹敵する。図4は、3.2から10,000ng/mlの5A8、Leu3A、OKT4Aおよび「OKT4様」モノクローナル抗体である2-103-D11のシンシチウム形成への効果を示している。図4は、CD4 V3V4に特異的な抗体(2-103-D11)が、5A8に必要な濃度より数桁高い濃度でのみ、シンシチウム形成をブロックしたことを示す。

【0215】

(CD4+のHIV感染のブロック)

我々は、AIDS、ARCおよびHIV感染の予防および治療における、潜在的治療上の利点を評価するために、本発明の抗体ホモログが、CD4+細胞のHIVによる感染をブロックする能力を研究した。これらの計測のために、我々は、M.Robert - Guroffら、「HTLV - III - Neutralizing Antibodies In Patients With AIDS And AIDS - Related Complex」、Nature, 316, PP. 72 - 74(1985)に示されたプロトコールに基づいたマイクロアッセイを用いた。

【0216】

最初の実験において、R - 20培地内のHIV分離物HTLV - III_B (Robert - Guroffら, Nature, 上記)の200TCID₅₀(接種された培養物の半分に再現的に感染するウイルスの最低希釈度の200倍)を、抗CD4モノクローナル抗体を含有する20 μl の希釈していないハイブリドーマ培養上清、または10 μl のR - 20培地内の 4×10^4 のC8166細胞および関連のないマウスIgG₁含有培養上清20 μl に加えた。HTLV - IHBは、Dr. Robert T. Schooley, University of Colora

10

20

30

40

50

do Medical School, デンバー, コロラド州, から提供されたが、AIDS Reference Reagent Program, National Institutes of Health, ベセスダ, メリーランド州, から入手可能である。各混合物を分割して、3つのウェル(各ウェル15 μ l)に加え、各ウェルをR-20培地で総体積200 μ lにした。第二の実験において、HIVの100TCID₅₀を加える前に、細胞を、ハイブリドーマ培養上清とともに30分間、37℃で予めインキュベートした。予めのインキュベーションは、5A8の感染ブロックに明白な効果を及ぼさなかった。

【0217】

双方の実験から得たウェルについて、感染開始から4から8日間、シンシチウムの存在によって証明されるものとして視覚的に計測した。5つ以上のシンシチウムを含有し、各シンシチウムが3細胞直径以上の直径を有するウェルを感染陽性に見なした。

【0218】

我々は、2から3の陽性ウェルがあれば完全な感染とみなし、陽性ウェルが0または1の場合には効果的なブロックが行われたと考えた。

【0219】

表VIIは、細胞と抗体を予めインキュベートしなかった場合の、CD4+C8166細胞のHIVの200TCID₅₀による感染に対する、5A8(5~20 μ g/ml)、1F8(5~20 μ g/ml)、5F2(約5 μ g/ml)、CD4 V3V4に特異的なマウスモノクローナルIgG₁である2-103-D11(約5 μ g/ml)および関連のないマウスIgG₁培養上清(5~20 μ g/ml)の効果を示している。表VIIIは、細胞および抗体を予めインキュベートした場合の、同上の抗体の同上濃度での、HIVの100TCID₅₀による感染に対する効果を示している。

【0220】

表VII

【0221】

【表7】

表 VII

本発明の抗体ホモログ存在下での
200 TCID₅₀ HIVによる感染：
予めのインキュベーションなし

モノクローナル 抗体	感染したウェルの数 (3つのウェル中)	
	5日	7日
5A8	0	0
1F8	0	1
5F2	3	2
<u>コントロール</u>		
2-103-D11	1	3
関連のないIgG ₁	1	2
抗体なし	3	3

表VIII

【0222】

【表 8】

表 VIII

本発明の抗体ホモログ存在下での
100 TCID₅₀HIVによる感染：
予めのインキュベーションあり

モノクローナル 抗体	感染したウェルの数 (3つのウェル中)	
	4日	8日
5A8	0	1
1F8	0	2
5F2	2	1
<u>コントロール</u>		
2-103-D11	1	3
関連のないIgG ₁	1	3
抗体なし	0	2
抗体なし	3	3
抗体なし	3	3

10

20

表VIIおよびVIIIから、5A8が、CD4+細胞における、HIVの感染を再現的にブロックし得ることがわかる。1F8および5F2も、HIV感染をブロックし得る証拠を示した。

30

【0223】

我々は、上記の実験に用いた実験株(HTLV- IIIB)の代わりに、1人の最近の患者からのHIV分離物(分離物0108E、Massachusetts General Hospital Phase I Reception Clinical Trial: R.T.Schooleyら, 「A Phase I/II Escalating Dose Trial Of Recombinant Soluble CD4 Therapy In Patients With AIDS or AIDS-Related Complex」, Ann. Int. Med., 112, pp.247 - 53(1989))を用いて、さらに感染実験を行った。

【0224】

この実験において、500 μ lの抗体試薬を、5~10TCID₅₀のHIV分離物0108Eと 1×10^6 のフィットヘマグルチニン(「PHA」)活性化ヒト末梢血リンパ球(「PBL」)(下記のように調製)を含有する250 μ lのR-3培地とを含有する、250 μ lの「R-3培地」(Biogen, Inc., ケンブリッジ, マサチューセッツ州, により製造の、25U/mlの組み換えT細胞増殖因子(「r-IL2」または「r-TCGF」)により捕足されたR-20培地)に加えた。表IXに示した実験で用いた抗体試薬は、双方ともがR-20培地で希釈された、5A8含有ハイブリドーマ培養上清(5~20 μ g/ml)、および陰性コントロールとしてのアイソタイプのあったIgG含有培養上清(5~20 μ g/ml)であった。表Xに示される実験に用いられた抗体試薬は、すべてR-20培地で希釈した、精製5A8(上記)、陽性コントロールとしての精製Leu3A、および陰性コントロールとしてのアイソタイプのあった精製マウス19G1MOPC-21(Litton Bionetics, カタログ番号8402-031)であった。

40

【0225】

PHAで活性化したヒトPBLは、以下のように調製された。全血(赤十字)をHistopaque(Sig

50

maChemical Co., カタログ番号1077 - 1) 上に積層し、 $400 \times g_{av}$ で、40分間、室温で遠心した。界面からPBLを採集し、非捕足RPMI - 1640培地で3回洗浄し、計数した。その後、PBLを、 $1 \mu g/ml$ PHA - P (Difco, スプリングフィールド, ニュージャージー州, カタログ番号DF3110 564) で捕足されたR - 3培地において、 4×10^6 細胞 / ml で再懸濁し、3日間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を凍結し (R - 20培地内の10%DMSO)、そして使用するまで - 80 で保存した。使用する前に、活性化したPBLを解凍し、R - 3培地で5日間培養した。

【 0 2 2 6 】

精製5A8を用いた実験 (表X) において、PHAにより活性化したPBLは、ウイルスを加える前に、抗体試薬とともに37 で1時間予めインキュベートした。5A8ハイブリドーマ培養上清を用いた、もう一方の実験 (表IX) においては、このような予めのインキュベーションは行わなかった。いずれの実験においても、細胞を、抗体試薬とウイルスとともに、5%CO₂ 雰囲気下、37 で24時間インキュベートした。細胞の各サンプルを、R - 20培地とともに3回洗浄し、2つのウェルに分割し、R - 3培地において5%CO₂ 雰囲気下、37 でインキュベートした。3~4日ごとに、 $450 \mu l$ の細胞上清を回収して、HIV核抗原p24 (HIV感染の指標) の存在をアッセイした。このような各回収の後、 $500 \mu l$ のR - 3培地を各ウェルに加えた。

【 0 2 2 7 】

我々は、サンプル中に存在するp24核抗原を捕えるためにマイクロタイタープレートウェルに固定化された抗p24モノクローナル抗体を活用する市販のキット (NEN Research Products, E. I. DuPont de Nemours and Co., Inc., ボストン, マサチューセッツ州, 「HIV Core Profile ELISA」, カタログ番号 .NEK - 060, NEK - 060A, NEK - 060B) を用いた、固相ELISAによって、HIVp24をアッセイした。このキットは、キットに添付された使用説明書の付録Cに示された標準曲線の範囲で、製造者によって指示された通りに用いた。

【 0 2 2 8 】

$0.1 ng/ml$ 以上のHIVp24を含有するウェルは、「感染」と分類した。

【 0 2 2 9 】

これらの実験の結果を表IXおよびXに示す。

【 0 2 3 0 】

表IX

【 0 2 3 1 】

10

20

30

【表 9】

表 IX

5A8培養上清の存在下における
ある患者からのHIV分離物の5～10TCID₅₀による感染

5A8上清 の希釈比	感染ウェル数 (2つのウェル中)		
	7 日	1 5 日	2 5 日
1 : 4	0	0	0
1 : 8	1	1	1
1 : 1 6	0	0	0
1 : 3 2	1	1	1

10

IgG₁コントロール
上清の希釈比

20

1 : 4	0	1	1
1 : 8	1	2	2
1 : 1 6	2	2	2
1 : 3 2	2	2	2

表X

30

【 0 2 3 2 】

【表 10】

表 X

精製 5A8、Leu3A および IgG₁ コントロール 抗体
存在下のある患者からの HIV 分離物の
5 ~ 10 TCID₅₀ による感染

適用量 (μ g/ml)	1 2 日目の感染したウェル数 (2 ウェル中)			
	5A8	Leu3A	IgG ₁ コントロール	
2 . 5	0	0	2	10
1 . 2 5	1	1	1	
0 . 6 2	0	0	2	
0 . 3 1	0	0	2	
0 . 1 6	0	0	2	20
0 . 0 8	0	0	1	

表 IX および X から、5A8 が、ある HIV 患者の分離物による感染を非常に効果的にブロックすることがわかる。5A8 含有培養上清は、1:16 の希釈度でも感染をブロックした。精製 5A8 は、テストした中で最も低い濃度である、0.08 μ g/ml という低い濃度で、この患者のウイルス分離物による感染をブロックしたが、これは Leu3A に匹敵するものであった。

【0233】

(免疫抑制性)

我々は、E.G. Engleman ら, 「Activation Of Human T Lymphocyte Subsets: Helper and Suppressor/Cytotoxic T Cells Recognize And Respond To Distinct Histocompatibility Antigens」, J. Immunol., 127, pp. 2124 - 29 (1981) (「破傷風トキソイド」または「TT」アッセイ) に示されたプロトコールに従って修正された、T 細胞増殖アッセイを用いて、本発明の抗体ホモログ (5A8) の免疫抑制性を、2 つの CD4 VI に特異的な抗 CD4 抗体 (Leu3A および OKT4A) の免疫抑制性と比較した。このアッセイでは、ヒト PBL を破傷風トキソイドで処理するが、これはヒト PBL の増殖を刺激する。免疫抑制物質が存在する場合には、破傷風トキソイドを加えると、増殖は妨げられる。増殖は、細胞による 3H チミジンの取り込みによって定量される。

【0234】

非捕足 RPMI - 1640 培地によって 10ml の血液を 2 倍に希釈し、この混合物を室温で 50ml のチューブ内の 10ml のリンパ球選別培地に積層することによって、ヒト PBL を単離した。このチューブを室温で 30 分間、400xg_{av} で遠心した。PBL を界面から採集し、非捕足 RPMI - 1640 培地で 2 回洗浄し、計数し、そして以下のように破傷風トキソイドアッセイに用いた。

【0235】

破傷風トキソイドアッセイは、各ウェルがヒト PBL と破傷風トキソイドを含有する、96 ウェルの平底マイクロタイタープレートで行われた。各ウェル内での合計体積が 200 μ l になるように、抗体試薬をいくつかのウェルに加えた。細胞のみを含有する (抗体試薬も破傷風トキソイドも有さない) ウェルは、このアッセイの「バックグラウンド」となる。

【0236】

アッセイは 3 回行われた。アッセイの成分は以下の順番で加えられた: (1) 50 μ l の「アッ

10

20

30

40

50

セイ培地」(10%の加熱不活化ウシ胎児血清(Hazelton Biologics, Inc., レネキサ, カンサス州, カタログ番号12 - 10378P)、2mMのLグルタミンおよび100単位/mlペニシリンGおよびストレプトマイシンで捕足したRPMI - 1640); (2) 50 μ lのアッセイ培地(「バックグラウンド」のウェル用)または抗体試薬(最終TTアッセイの濃度が10から0.1 μ g/mlの範囲の、精製した5A8、Leu3A、OKT4A、MOPC21またはUPC10); (3) 40 μ g/ml破傷風トキソイドをアッセイ培地で希釈したもの50 μ l(最終TTアッセイ濃度は10 μ g/mlであった); および(4) 上述のように調製した 1.5×10^5 のPHAにより活性化したPBL。

【0237】

破傷風トキソイドを、Massachusetts Public Health Biologic Laboratory, ジャマイカプレイン, マサチューセッツ州, から濃縮物として入手し、使用前に、4 で4LのPBSに48時間透析した。CD4 VIに特異的な抗体OKT4A(アイソタイプIgG2a)およびLeu3A(アイソタイプIgG1)を、それぞれOrtho Diagnostic SystemsおよびBecton Dickinsonから得た。精製5A8(アイソタイプIgG1)を上記のように産生した。精製したMOPC21コントロール抗体(Litton Bionetics)は、5A8およびLeu3Aにアイソタイプが一致する。精製UPC10抗体はOKT4Aにアイソタイプが一致する。

10

【0238】

すべての試薬をアッセイに加えた後、プレートに5%CO₂雰囲気下、37 で4日および5日間インキュベートした。4日目と5日目に、プレートを5%CO₂雰囲気下、6~18時間37 で1 μ Ciの3Hチミジン(NEN Research Products, カタログ番号NET - 027)に露出した。標識とともにインキュベートした後、プレートをPHD細胞回収機(Cambridge Technologies, Inc., ケンブリッジ, マサチューセッツ州)で回収し、そして放射性DNAを含有するフィルターをシンチレーションバイアルに移し、そこにシンチレーション液を加えた(各バイアルに3ml)(Scintiverse, Fisher Scientific Co., カタログ番号SK12 - 4)。バイアルの放射性を β カウンター(Beckman Model LS3801)で計測した。

20

【0239】

TTアッセイの結果を図5(4日)および図6(5日)に示す。図5および図6は、5A8および様々なコントロール抗体の、増殖に対する効果(cpm $\times 10^3$ で表示)を示している。「TTコントロール」と記された棒は、TT刺激なしの細胞の基線となる細胞増殖(白抜き棒)および抗体がない場合のTTの反応(黒棒)を示している。TT刺激なしの、抗体のみによる増殖の効果は、大きな点のついた棒で表している。また、これらの図は、10 μ g/ml(斑点をつけた棒)(MOPC21および5A8のみ)、1 μ g/ml(水平の線をつけた棒)(各抗体)および0.1 μ g/ml(斜線をつけた棒)(各抗体)の様々な濃度の抗体の、TT刺激後の増殖に対する効果(つまりTTに対する応答抑制)も示している。

30

【0240】

図5および図6のデータは、5A8の免疫抑制性が、4日および5日のいずれのアッセイにおいても、OKT4Aに劣ったことを示している。5A8の免疫抑制性は、これらのアッセイではLeu3Aに匹敵した。

【0241】

(5A8エピトープのマッピング)

5A8の作用メカニズムを特徴づけるために、5A8に結合したCD4エピトープをマップするための研究をいくつか行った。これらの研究の結果を、以下のようにまとめる。

40

【0242】

5A8は、ウエスタンブロットでの非還元、SDS変性CD4を認識することができた。しかし、5A8は、還元CD4またはCD4のタンパク質分解フラグメントには結合しなかった(5つの異なるプロテアーゼを使用した)。従って、5A8は、CD4のエピトープの高次構造を認識するようである。この結果は、5A8が、変性CD4またはCD4フラグメントに対してではなく、その天然の高次構造を有するCD4を示すであろう、r - CD4+ - CHO細胞に対して誘起されたという事実に合致している。

【0243】

マウス/ヒトキメラCD4分子のパネルに対する、5A8の結合を研究した。5A8は、マウスCD

50

4を認識しない。従って、様々なマウス/ヒトキメラCD4分子に対する、5A8の結合を研究することによって、5A8結合に必要なヒトCD4残基を同定することを期待できた。

【0244】

マウス/ヒトCD4キメラをコードする遺伝子構築物は、Howard Hughes Medical Institute, University of California, San Francisco, CAのDaniel R. Littmanによって提供され、N.R. Landauら、「The Envelope Glycoprotein Of The Human Immunodeficiency Virus Binds To The Immunoglobulin-Like Domain Of CD4」、Nature、334、pp.159 - 62(1988)によって記載されている。COS-7細胞を、これらの構築物を含む発現ベクターで、一時的に形質転換し、FACS分析を用いて、様々な発現されたキメラへの5A8の結合能力を評価した。コントロールとして、抗ヒトCD4モノクローナル抗体Leu3aおよびOKT4、ならびに抗マウスCD4モノクローナル抗体GK1.5を使用した。各キメラ型に対して、飽和濃度以下で、5A8またはコントロール抗体を滴定することによって、抗体結合を評価した。

10

【0245】

5A8/キメラCD4結合を研究した結果を以下に示す：(1)ヒトCD4 V1V2残基は、両方とも、5A8結合に必要なかつ十分である；(2)ヒトV1残基(アミノ酸83まで)は、有効な5A8結合には必要でない；(3)V1とV2(AA83 - AA105)とを結合するロッド様βストランドのヒト残基は、5A8結合に著しい影響を与える(J. Wangら、Nature、348、pp.411 - 18(1990) for human CD4 crystal structure)；および(4)ヒトCD4V2残基AA105 - AA131(V2のストランドBおよびC)は、5A8結合に絶対的に必要である。

20

【0246】

さらに、rsCD4のマウス/ヒト置換変異体の様々な部位およびクラスターへの、5A8の結合も研究した。変異体の置換されたアミノ酸部分は、以下の通りである：AA60(V1)、AA121 - AA124(V2)、AA127 - AA134(V2)、AA165(V2)、AA220 - AA226(V3)およびAA240 - AA252(V3)。特に、CD4 V3V4に特異的な抗体OKT4のCD4+細胞への結合をブロックする能力と比較して、5A8のCD4+細胞への結合をブロックするこれらの変異体の能力を評価した。

【0247】

1μg/mlの濃度では、すべての変異型が、OKT4結合に匹敵してブロックした(約60%に匹敵する)。これに対して、AA121 - AA124(V2のストランドBとストランドCとの間の結合ループ)およびAA127 - AA134(V2のストランドC)は、5A8のCD4+細胞への結合をブロックしなかった。これらのデータにより、5A8結合に重要な残基がV2内に存在することが発見され、マウス/ヒトキメラを使用して同定された残基と一致していることが分かった。さらに、5A8がCD4を認識するのに、残基165が寄与していることを同定した。しかし、残基165は、AA121 - AA124およびAA127 - AA134よりはあまり重要ではなかった。

30

【0248】

(アカゲザルにおける、5A8の免疫システムの効果)

インビボにおける、通常の免疫機能に対する5A8の影響を評価するために、モノクローナル抗体5A8またはコントロールのアイソタイプのあったモノクローナル抗体(MOPC21)をアカゲザルに投与した。5A8またはMOPC21の注射前、および注射後に様々な時間間隔において、免疫機能の変化を調べた。特に、(a)インビボにおいて循環CD4+細胞の数の減少、(b)CD4+細胞表面からのCD4の調節、(c)インビボでの循環末梢白血球数の減少、または(d)インビボにおける外来抗原に反応して誘発された抗体力価の減少を、5A8が引き起こしたか否かを評価した。

40

【0249】

5A8は、インビボにおける免疫抑制の指標にはなんらかの重要な影響を与えないと判断した。従って、5A8は、インビボにおける免疫システムに悪影響を与えないようである。

【0250】

(1. 注射およびサンプリングのプロトコール)

2匹の成体アカゲザル(Mn261 - 85およびMn251 - 87)に、上記のように、精製した3mg/kgの5A8またはコントロールのMOPC21(Mn265 - 85およびMn265 - 87)(全部で4匹のサル)を、0

50

日目、2日目および4日目に静脈内注射により注射した。3日目および21日目には、0.5mlのミョウバンに吸着した破傷風トキソイド(Squibb - Connaught)(標準的なヒト投与量)を、筋肉内注射により投与した。最初の5A8を注射する前と、0 - 4日目、6日目、9日目、14日目、21日目または24日目、28日目、35日目および42日目に、各サルから血液を採取し、以下のように分析した。

【0251】

(2.末梢白血球)

血液スミアの標準的な染色を使用して、白血球細胞の数を調べるために、両グループのサル(5A8を注射したおよびMOPC21を注射した)からの血液サンプルをアッセイした。その結果を図7に示す。

10

【0252】

図7に示すように、5A8を注射したものと、コントロールのグループとの間には、モノクローナル抗体の注射前または注射後において、白血球の数にあまり差異はなかった。

【0253】

(3.循環CD4+細胞数および細胞表面CD4の調節)

CD4+細胞数を調べるために、両グループのサル(5A8を注射したおよびMOPC21を注射した)からの血液サンプルをアッセイした。FITC - OKT4で直接的に染色した後、および5A8で間接的に染色(すなわち、過剰の5A8、次いで、FITCヤギ抗マウスIgでインビトロでインキュベーション)した後、FACS分析によってCD4+細胞数を決定した。使用したプロトコールは、上記のFACSのプロトコールに類似したものであった。これらの実験の結果を図8に示す。

20

【0254】

図8に示すように、5A8を注射した動物およびコントロールの動物中で循環するCD4+細胞の数は、抗体注射後、あまり変化しなかった。さらに、CD4の染色強度は、5A8を注射したサルとコントロールのサルとの間ではあまり違いはなかった。

【0255】

CD2、CD8およびCD20染色を含む、その他のすべての血液細胞パラメーターは、5A8を注射した動物と、コントロールの動物との間で同様であった(データは示していない)。

【0256】

これらの結果は、5A8が、CD4+細胞を有意に枯渇せず、循環CD4+細胞の表面からのCD4を有意に調節しなかったことを示している。

30

【0257】

(4.インビボにおける、5A8のアカゲザルCD4+細胞への結合)

サルのCD4+末梢T細胞におけるCD4結合部位の飽和を、(1)FITCヤギ抗マウスIgで染色した後のFACS分析、(2)さらに5A8およびFITCヤギ抗マウスIgを加えた後のFACS分析(染色強度は増加せず)、および(3)5A8を注射したサルから回収した細胞の、FITC - 5A8の測定可能量への結合不能によって、測定した。

【0258】

5A8を注射したアカゲザルのすべての循環CD4+細胞上でのCD4結合部位の飽和を、1日に一回、少なくとも9日間観察した。さらに、4日目には、5A8を注射したサルのリンパ節バ

イオプシーによって、リンパ節CD4+細胞の5A8による完全な浸透およびコーティングが示された。FITCヤギ抗マウスIgでの間接的な染色によって測定されるように、5A8によるCD4+細胞コーティングは、14日目以降には、検出されなかった。

40

【0259】

(5.5A8および抗5A8の血清レベル)

抗マウスIgサンドイッチELISAを使用して、5A8のレベルが、9日目までは高く(約10 - 100 µg/ml)、9日目と14日目の間に著しく減少しているのが分かった。逆に、サル抗マウスIg力価(5A8をコートしたプレートでのELISAによって検出した)は、9日目と14日目の間に現れた。結合5A8が、9日目以降に存在した否かは明確ではない。なぜなら、抗マウスIgトラップは、それを検出しなかったと思われるからである。

50

【 0 2 6 0 】

(6. 破傷風トキソイドに対する抗体応答)

外来抗原である破傷風トキソイドを注射した際の、サルが抗体を生産する能力に対する5A8の効力を評価した。5A8を注射した動物において、CD4+細胞のコーティングが完全に成し遂げられた後3日目、および21日目に、ミョウバンに(i.m.)吸着した破傷風トキソイドを用いて、5A8を注射した動物およびコントロールの動物を免疫した。この期間に誘発されたサルの抗破傷風トキソイド力価を図9に示す。

【 0 2 6 1 】

図9に示すように、すべてのサルにおいて、抗破傷風トキソイド血清抗体が、匹敵する反応速度および力価を示すことが観察された。抗破傷風トキソイド力価を、破傷風トキソイドでコートしたプレートを使用したELISAで測定し、次いで、酵素を結合したヤギ抗ヒト/サルIgM+Gで検出した。従って、5A8は、B細胞およびヘルパーT細胞の機能には影響を与えなかった。

【 0 2 6 2 】

(5A8のH鎖可変領域をコードするDNA)

実質的に、J.Sambrookら、Molecular Cloning, ch.9(Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989)に記載されるように、ネズミハイブリドーマ細胞系5A8(ATCC受託番号第HB10881号)からゲノムDNAを調製した。5A8免疫グロブリンH鎖(5A8VH)の可変領域をコードするDNAを、以下に記載するように、このゲノムDNAライブラリーから単離した。

【 0 2 6 3 】

5A8のH鎖可変領域をコードするDNAを、プライマーとしてVH01(配列番号5)およびVH02(配列番号6)を使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、ゲノムDNAから増幅した。これらのプライマーは、Orlandiら、「Cloning Immunoglobulin Variable Domains For Expression By The Polymerase Chain Reaction」、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 86, pp.3833 - 37(1989)に記載されているように、VH02が、VHIFORの2つの3'ヌクレオチドを欠いていること以外は、VHIBACKおよびVHIFORプライマーとそれぞれ同一である。

【 0 2 6 4 】

VH01およびVH02(各400pmoles)を乾燥し、次いで、50 μ lの1 $\times$ キナーゼ緩衝液(10 $\times$ キナーゼ緩衝液は、0.66Mトリス - HCl、pH7.6、10mMATP、10mMスベルミジン、100mMMgCl₂、150mMジチオスレイトール、2mg/mlゼラチンである)中に再懸濁した。T4ポリヌクレオチドキナーゼ(1 μ l)(New England Biolabs、10U/ μ l)を加え、反応物を37 $^{\circ}$ Cで30分間、次いで70 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートした。

【 0 2 6 5 】

PCR反応混合物は、1 $\times$ PCR緩衝液(10 $\times$ PCR緩衝液は、100mMトリス - HCl、pH8.3、500mM KCl、15mM MgCl₂、0.01%ゼラチンである)中に、各キナーゼ処理したプライマー(VH01およびVH02)を50pmoles、1 μ gのゲノム5A8DNA、および各dXTPを1.25mM含んでいた。初期のインキュベーションサイクルの72 $^{\circ}$ Cでのインキュベーション中に、Taqポリメラーゼ(0.5 μ l)(perkinElmer - Cetus、5U/ μ l)を加えた。PCR反応条件は、94 $^{\circ}$ Cで2分間、65 $^{\circ}$ Cで2分間、および72 $^{\circ}$ Cで2分間のインキュベーションを30サイクルであった。

【 0 2 6 6 】

PCR反応産物を、標準の方法を用いて、1%アガロースゲル上で分画し、免疫グロブリン可変領域(330bp)の予想サイズに対応するバンドを切り出した。このバンド中のDNAを、GENECLEAN II (登録商標)方法(BiolOI Inc., LaJolla, CA)によって溶出し、エタノールで沈澱させ、次いで10 μ lのTE緩衝液(10mMのトリス - HCl、1mMのNa₂EDTA)中に再懸濁した。

【 0 2 6 7 】

精製したPCRフラグメントを、DNAポリメラーゼ1(1 μ l)のクレノウフラグメント(New England Biolabs、5U/ μ l)および各dXTPを0.125mM用いて、1 $\times$ 連結用緩衝液(10 $\times$ 連結用緩衝液は、0.5Mトリス - HCl、pH7.6、100mMMgCl₂、100mMジチオスレイトール、500 μ g/mlゼラチンである)中で、室温で20分間インキュベートし、最終反応容積を15 μ lとした。この反応を、65 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートすることによって停止した。

【 0 2 6 8 】

次に、PCRフラグメントをベクターpNN03に連結した。エンドヌクレアーゼ開裂によって、pUC8(Pharmacia Piscataway,NJ)の合成ポリリンカー配列を除去し、それを新規の合成ポリリンカーと置換することによって、ベクターpNN03を構築した。pNN03のDNA配列を配列番号7として示す。EcoR5で直線化し、仔ウシのアルカリホスファターゼで5'末端を脱リン酸化し、低融点アガロースゲル上で分画し、直線化したpNN03(2.7kb)に対応するバンドを切り出すことによって、ベクターpNN03を連結用に調製した。次いで、直線化し、脱リン酸化したpNN03を、T4DNAリガーゼを用いて、クレノウで処理したPCR5A8VHフラグメントに連結した。

【 0 2 6 9 】

10

連結混合物を使用して、E.coliJA221(ATcc33875)をアンピシリン耐性に形質転換した。コロニーを増殖させ、ミニプレップDNAを調製した。組換えプラスミドをスクリーニングして、約450bpのSac2挿入物の存在を調べた。さらに、PCRフラグメントによってコードされたアミノ酸配列を、実験的に決定した、5A8H鎖のアミノ末端アミノ酸配列と比較した。これらの手段によって、ベクターpMDR904挿入物が、5A8H鎖可変領域のAA2 - AA122をコードするDNA配列を含んでいることを確認した。pMDR904を有するE.coliを、アメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville, MDに、受託番号第ATCC68848号で寄託した。

【 0 2 7 0 】

配列番号8は、pMDR904挿入物のDNA配列を示す。配列番号8のヌクレオチド3から365までは、5A8VH配列のAA2 - AA122をコードする。ベクターpMDR904は、5A8VHのAA1のコードを含まない。5A8VH発現ベクターを形成したときに、このコドン、オリゴヌクレオチドを使用して、「再構築」(built back)する。

20

【 0 2 7 1 】

pMDR904は、5A8VHのAA1のコドンを欠いているが、アミノ酸配列結果から、このアミノ酸が判明する。5A8VH(AA1 - AA122)の完全なアミノ酸配列を、配列番号10として示す。5A8VHアミノ酸配列をコードするDNA配列(AA1については仮定)を、配列番号9に示す。

【 0 2 7 2 】

既知の相補性決定部位(CDR)配列および枠組み構造領域(FR)配列を比較することによって、以下を、5A8H鎖のCDRとして同定した:CDR1は、AA31 - AA35、CDR2は、AA50 - AA66、CDR3は、AA99 - AA111で、これらはすべて配列番号10に対応する。

30

【 0 2 7 3 】

(5A8のL鎖可変領域をコードするDNA)

従来のグアニジニウムイソチシアネートプロトコールに従って、全RNAを、ネズミハイブリドーマ細胞系5A8(ATCC受託番号第HB1088号)から調製した。また、従来の手法に従って、オリゴ-d(T)カラム(Clontech)を使用して、全RNAからポリ(A)+を調製した。

【 0 2 7 4 】

cDNAを以下のように、ポリ(A)+RNAから調製した。オリゴヌクレオチドACE149(配列番号11)およびACE150(配列番号12)(各200pmoles)を、100 μ lの1xキナーゼ緩衝液中で、1 μ lのT4ポリヌクレオチドキナーゼ(New England Biolabs, 10U/ μ l)を用いて、別々にインキュベートした。5A8ポリ(A)+RNA(25 μ g)を乾燥させ、次いで、5 μ lの各キナーゼ処理したオリゴヌクレオチド、2 μ lの25mM水酸化メチル水銀、および10 μ lの水の混合物で、室温で10分間インキュベートした。10分間インキュベートした後、2 μ lの50mMジチオスレイトールを加え、この混合物を室温でさらに5分間インキュベートした。次いで、以下を加えた:10 μ lのM - MLV逆転写酵素(BRL80255B, 200U/ μ l)、20 μ lの2.5mM dXTP、26 μ lの水、および20 μ lの5x逆転写酵素緩衝液(250mMのトリス - HCl, pH8.3、375mMKCl、50mMジチオスレイトール、15mMMgCl₂)。37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした後、逆転写酵素反応を、凍結によって停止した。

40

【 0 2 7 5 】

プライマーとしてACE149(配列番号11)およびACE150(配列番号12)を使用するPCRによって、5A8のL鎖可変領域をコードするDNAを、5A8cDNAから増幅した。PCR反応混合物は、各

50

キナーゼ処理したプライマーを50pmoles、5 μ lの5A8cDNA、8 μ lの2.5mMdXTP、0.5 μ lのTaqポリメラーゼ(5U/ μ l)、および10 μ lの10xPCR緩衝液を含んでいた。PCR反応条件は、94 で1分間、37 で1分間、および72 で2分間のインキュベーションを30サイクルであった。

【0276】

完成したPCR反応混合物を、エーテルで一度抽出し、TE緩衝液飽和のフェノール:クロロホルム(1:1)で一度抽出し、次いで、エタノールで沈澱させた。エタノール沈澱物を、0.5 mMのdXTP、100mMのNaCl、10mMのトリス - HCl、pH8.0、1mMのNa₂EDTA、100 μ g/mlのゼラチン、および10mMのジチオスレイトールを含む100 μ lの緩衝液に再懸濁した。DNAポリメラーゼ1(1 μ l、5U/ μ l)のクレノウフラグメントを加え、その混合物を室温で10分間インキュベートした。反応混合物を、標準の方法によって2%のアガロースゲル上で分画し、免疫グロブリン可変領域(350bp)の予想サイズに対応するバンドを切り出した。そのバンド中のDNAを、GENECLEAN II (登録商標)方法によって溶出した。

【0277】

次に、PCRフラグメントをベクターpUC19(New England Biolabs)に連結した。SmaIで直線化し、5'末端を、仔ウシのアルカリホスファターゼで脱リン酸化し、低融点アガロースゲル上で分画し、直線化したpUC19(2.7kb)に対応するバンドを切り出すことによって、連結用のベクターpUC19を調製した。次いで、直線化し脱リン酸化したpUC19を、T4DNAリガーゼを用いて、クレノウで処理したPCR 5A8VLフラグメントに連結した。

【0278】

連結混合物を使用して、E.coli JA221をアンピシリン耐性に形質転換した。コロニーを増殖させ、ミニプレップDNAを調製した。組換えプラスミドをスクリーニングし、約400 bpのEcoRI/Hind3フラグメントの存在を調べた。さらに、PCRフラグメントによってコードされたアミノ酸配列を、実験的に決定した、5A8L鎖のアミノ末端アミノ酸配列と比較した。これらの手段によって、ベクターpMDR927挿入物が、5A8のL鎖可変領域のAA1 - AA111をコードするDNA配列を含んでいることを確認した。pMDR927を有するE.coliを、アメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville, MDに、受託番号第ATCC68849号で、寄託した。

【0279】

配列番号13は、pMDR927挿入物のDNA配列を示す。配列番号13のヌクレオチド4から336までは、5A8VL配列のAA1 - AA111をコードする。ベクターpMDR927は、5A8VLのAA112のコードを含んでいない。5A8VL発現ベクターを形成するとき、このコードを、オリゴヌクレオチドを使用して「再構築」する。

【0280】

pMDR927は、5A8VLのAAH2のコードを欠いているが、アミノ酸配列結果から、このアミノ酸が判明する。5A8V鎖の完全なアミノ酸配列を、配列番号15に示す。5A8VLアミノ酸配列をコードするDNA配列(AA112については仮定)を、配列番号14として示す。

【0281】

既知のCDRおよびFR配列と比較することによって、以下を、5A8のL鎖のCDRとして同定した: CDR1は、AA24 - AA40、CDR2は、AA56 - AA62、CDR3は、AA95 - AA102であり、これらはすべて配列番号15に対応している。

【0282】

(5A8のHおよびL鎖のヒト型化)

5A8 V_HおよびV_L領域のアミノ酸配列を、既知のヒト免疫グロブリン配列と比較し、ネズミ5A8枠組み配列と最も適合するヒト枠組み配列を発見した。次いで、5A8VHおよびV_LのCDRをヒト枠組みに移すことによって、5A8HおよびL鎖可変領域のヒト型を設計した。これらのヒト型可変領域を、次いで、ヒトIgG4H鎖領域および κ L鎖不変領域をコードするDNAにそれぞれ連結させ、真核細胞用発現ベクターに挿入した。

【0283】

(1. 5A8のH鎖可変領域のヒト型化)

10

20

30

40

50

5A8のH鎖可変領域を、PCR変異誘発によって、ヒト型化した。3回のPCR反応を、異なる3対のオリゴヌクレオチドPCRプライマー：(a)プライマー312 - 56(配列番号16)および312 - 57(配列番号17)；(b)プライマー312 - 58(配列番号18)および312 - 59(配列番号19)；ならびに(c)312 - 60(配列番号20)および312 - 61(配列番号21)を使用して行った。各PCR反応は、適切な各プライマーを30pmoles、1μgのpMDR904(挿入配列は、配列番号8)、16μlの1.25mM dXTP、0.5μlのTaqポリメラーゼ(5U/μl)、および10μlの10xPCR緩衝液を含んでいた。PCRのインキュベーション条件は、94℃で3分間、45℃で2分間、および72℃で2分間のインキュベーションを10サイクルであった。PCR産物を、2%アガロースゲルで分画し、約160bp、175bpおよび165bpに対応するバンドを切り出した。3つのPCRフラグメントをGENECLEAN II(登録商標)を用いて、100μlずつのTE緩衝液に別々に溶出した。

10

【0284】

3つの溶出したPCRフラグメント(各10μl)を組み合わせ、1回目のPCRと同一反応条件下で、2回目のPCRにかけた。このとき、オリゴヌクレオチドプライマー312 - 56(配列番号16)および312 - 61(配列番号21)を使用し、94℃で3分間、72℃で2分間および72℃で2分間のインキュベーションで20サイクル行った。PCR産物を2%のアガロースゲルで分画し、約365bpに対応するバンドを切り出した。PCRフラグメントを、GENECLEAN II(登録商標)を用いて溶出し、この溶出物を、20μlのTE緩衝液に再懸濁し、上記のように、DNAポリメラーゼ1のクレノウフラグメントで処理した。

【0285】

次に、PCRフラグメントをベクターpNNO3(配列番号7)に連結した。EcoR5で直線化し、仔ウシのアルカリホスファターゼで5'末端を脱リン酸化し、低融点アガロースゲルで分画し、直線化したpNNO3(2.7kb)に対応するバンドを切り出すことによって、ベクターpNNO3を連結用に調製した。次いで、直線化し、脱リン酸化したpNNO3を、T4DNAリガーゼを用いて、クレノウで処理したPCR5A8ヒト型VHフラグメントに連結した。

20

【0286】

連結混合物を使用して、E.coli JA221(lq)をアンピシリン耐性に形質転換した。E.coli JA221(lq)を、アメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville, MDに、受託番号第ATCC68845号で寄託した。コロニーを増殖させ、ミニプレップDNAを調製した。組換えプラスミドをスクリーニングし、約400bpのSac2フラグメントの存在を調べた。DNA配列分析により、1つのプラスミド、pMDR989 - 15(挿入配列は、配列番号22)が、ネズミ5A8VH配列を設計されたヒト型配列に変換する必要がある変異体を約50%有していたことを除けば、他のプラスミドはすべて正しい配列を有していることが分かった。従って、上記のように、pMDR989 - 15を、2回目のPCRに2度かけた。その後、ベクターpMDR991挿入物を、DNA配列分析によって同定し、設計された5A8VHヒト型配列を作製した。

30

【0287】

配列番号23は、pMDR991挿入物のDNA配列を示す。配列番号23のヌクレオチド1から357は、ヒト型5A8VH配列のAA2 - AA12Bをコードする。ベクターpMDR991は、ヒト型5A8VHのAA1およびAA121 - AA122のコドンを含んでいない。下記のように、ヒト型5A8VH真核細胞用発現ベクターを作製したときに、オリゴヌクレオチドを使用して、これらのコドンを「再構築」した。

40

【0288】

(2. 5A8のL鎖可変領域のヒト型化) ヒト型5A8VL領域全体に広がる、10個のオリゴヌクレオチドを連結し、そして正しい配列を有する構築物をスクリーニングすることによって、ヒト型5A8のL鎖可変領域を調製した。以下に、プロトコールの詳細を示す。

【0289】

オリゴヌクレオチドの312 - 62を312 - 71にわたるもの(それぞれ、配列番号24から配列番号33)(各20pmoles)を乾燥させ、1mMATPおよび1μlのT4ポリヌクレオチドキナーゼ(10U/μl)を含む20μlの1xキナーゼ緩衝液に別々に再懸濁した。キナーゼ反応混合物を、37℃で1時間インキュベートした。70℃で5分間インキュベートすることによって、この反応を停止した。

50

【0290】

キナーゼで処理したオリゴヌクレオチド(各0.4 µg)を互いに、25 µlの10mMATPおよび2 µlのT4DNAリガーゼ(10U/ µl)と組合わせて、反応混合物を、室温で6時間インキュベートした。連結混合物を、TE緩衝液で飽和したフェノール:クロロホルム(1:1)で抽出し、次いでエタノールで沈澱させた。

【0291】

エタノール沈澱物を、50 µlの1x150mM制限酵素緩衝液(10x150mMの制限酵素緩衝液は、100mMトリス - HCl、pH8.0、1.5MNaCl、100mMMgCl₂、1mg/mlゼラチン、10mMジチオスレイトール)で再懸濁し、制限酵素Bgl₂およびAsp718を用いて、37 °Cで16時間インキュベートした。消化産物を2%アガロースゲルで電気泳動にかけ、330bpに対応するバンドを切り出した。GENECLEAN II(登録商標)を使用してこのフラグメントを溶出し、溶出物をエタノール沈澱させた。エタノール沈澱物を20 µlのTE緩衝液に再懸濁した。

10

【0292】

次に、330bpフラグメントをベクターpNN03(配列番号7)に連結した。Asp718およびBgl₂で直線化し、仔ウシのアルカリホスファターゼでボ末端を脱リン酸化し、低融点アガロースゲルで分画し、直線化したpNN03(2.7kb)に対応するバンドを切り出すことによって、連結用のベクターpNN03を調製した。次いで、直線化し脱リン酸化したpNN03を、T4DNAリガーゼを用いて、ヒト型VL領域をコードする330bpのオリゴヌクレオチドフラグメントに連結した。

【0293】

20

連結混合物を用いて、E.coli JA221(lq)をペニシリン耐性に形質転換した。コロニーを増殖させ、ミニプレップDNAを調製した。組換えプラスミドをスクリーニングして、約400bpのSac2フラグメントの存在を調べた。DNA配列の分析によって、ベクターpMDR1003が、5A8 κL鎖可変領域に設計されたヒト型配列を有することが認められた。

【0294】

配列番号34は、pMDR1003挿入物のDNA配列を示す。配列番号34のヌクレオチド11から343は、ヒト型5A8VL配列のAA1 - AA12をコードする。ベクターpMDR1003は、ヒト型5A8VLのAA12のコドンを含んでいない。下記のように、ヒト型5A8VL真核細胞用発現ベクターを作製したときに、オリゴヌクレオチドを使用して、コドンを「再構築」した。

(3. 5A8ヒト型H鎖発現ベクター)

30

中間プラスミドpMDR1001、pBAG101およびpSAB132を連結させることによって、5A8ヒト型H鎖(pMDR1002)を有する真核細胞用発現ベクターを以下のように構築した。

【0295】

(A. 中間プラスミドpMDR1001)

ヒトHG3免疫グロブリンH鎖シグナル配列(Sequence of Proteins of Immunological Interest、p.460(4th ed.)を参照のこと)、ヒト型5A8H鎖可変領域のAA1 - AA122、次いで、RNA5'スプライス部位をコードするDNAを有するように、中間プラスミドpMDR1001を構築した。pLCB7およびpMDR991から、プラスミドpMDR1001を構築した。pLCB6およびpMDR904から、プラスミドpLCB7を構築した。

【0296】

40

ヒト免疫グロブリンH鎖シグナル配列、RNA5'スプライス部位、およびPstIおよびBstE2の制限部位をコードするDNAを有するように、プラスミドpLCB6を設計した。pLCB6を形成するために、オリゴヌクレオチド312 - 45(配列番号35)、312 - 50(配列番号36)、および312 - 49にわたる312 - 46(それぞれ、配列番号58から配列番号61)を、ポリヌクレオチドキナーゼで処理し、上記のように連結した。次いで、連結したオリゴヌクレオチド自身を、プラスミドpNN03の2701bpのAsp718/BamH1フラグメントに連結させ、pLCB6を作製した。pLCB6挿入物のDNA配列は、配列番号37である。

【0297】

プラスミドpLCB6をPstIおよびBstE2で開裂し、2820bpのフラグメントを単離した。そのフラグメントを、pMDR904の346bpのSmaI/SacIIフラグメントに連結した。397bpのStyI制

50

限フラグメントによって、プラスミドpLCB7を同定した。pLCB7挿入物のDNA配列は、配列番号38である。

【0298】

プラスミドpLCB7およびpMDR991を別々にPst1およびBstE2で開裂し、2820bp(ベクター)および337bp(挿入物)フラグメントをそれぞれ低融点アガロースで別々に分画することによって単離した。次いで、これらのフラグメントを連結した。特徴的なHae2制限パターン(1871bp、523bp、393bpおよび370bp)の存在により、プラスミドpMDR1001を同定した。pMDR1001挿入物のDNA配列は、配列番号39である。

【0299】

プラスミドpMDR1001をNot1およびHind3で開裂し、プラスミド挿入物を含む443bpのフラグメントを、低融点アガロースで分画することによって単離した。

【0300】

(B. 中間プラスミドpSAB132)

中間プラスミドpSAB132を、汎用真核細胞用発現シャトルベクターとなるように構築した。このベクターは、ヒトサイトメガロウイルス極(immediate)初期プロモーターおよびエンハンサーを有する。pSAB132の構築は、同一譲受人の米国特許出願第07/770,967号の55 - 56ページに記載されている。pSAB132の全配列は、配列番号40として示す。

【0301】

ベクターpSAB132を、NotIで直線化した。次いで、7913bpの直線化したベクターを脱リン酸化し、低融点アガロースで分画することによって単離した。

【0302】

(C. 中間プラスミドpBAG101)

ヒトIgG4H鎖不変領域をコードするゲノムDNAを有するように、中間プラスミドpBAG101を構築した。

【0303】

J.Sambrookら、Molecular Cloning、ch.9(Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989)の記載に実質的に従って、ゲノムDNAをヒト胎盤から調製した。IgG4不変領域をコードするDNAを、オリゴヌクレオチド370 - 38(配列番号41)および370 - 40(配列番号42)をプライマーとして使用するPCRによって、上記のように、ゲノムDNAから増幅した。

【0304】

約2109bpのPCRフラグメントをゲル電気泳動によって単離し、EcoR5で直線化したpNN03に連結した。3887bpおよび3896bp Bgl2制限フラグメントの存在によって、プラスミドpBAG101を同定した。pBAG101挿入物のDNA配列は、配列番号43である。pBAG101挿入物中のヒトIgG4H鎖不変領域をコードするDNA配列を、Genbank受託番号第K01316 - PR:HUMIGCD2の対応配列から得た。

【0305】

プラスミドpBAG101をNot1およびHind3で開裂し、プラスミド挿入物を含む2109bpフラグメントを、低融点アガロースで分画することにより単離した。

【0306】

(D. ベクターpMDR1002の最終構築)

pMDR1002を作製するために、3つのフラグメント:(a)pMDR1001の443bp NotI/Hind3フラグメント;(b)7913bp NotIで直線化したpSAB132;および(c)pBAG101の2109bp Not1/Hind3フラグメントを連結した。連結混合物を使用して、E.coli JA221(Iq)を、アンピシリン耐性に形質転換した。コロニーを増殖させ、ミニプレップDNAを調製した。組換えプラスミドをスクリーニングして、pMDR1002を同定する、約1276bpおよび9160bpのEcoR1フラグメントの存在を調べた。

【0307】

pMDR1002の挿入物のDNA配列は、配列番号44として示す。このDNA配列によってコードされたアミノ酸配列は、配列番号45として示す。pMDR1002挿入物は、5'から3'の順に、(1)免疫グロブリンシグナル配列(配列番号45のAA - 19 - AA - 1に対応する、配列番号44のヌ

10

20

30

40

50

クレオチド12 - 68)、(2)5A8のH鎖可変領域に設計されたヒト型配列のAA1 - AA122(配列番号45のAA1 - AA122に対応する、配列番号44のヌクレオチド69 - 434)、次いで、ヒトIgG4H鎖(すなわち、H鎖不変領域)(配列番号45のAA123 - AA448に対応する、配列番号44のヌクレオチド712 - 1005、1396 - 1431、1550 - 1879、および1977 - 2296)のAA114 - AA478(Kabat番号)をコードするゲノムDNA(Genbank受託番号第K01316号のヌクレオチド27から2525)をコードするDNAを含んでいる。

【0308】

PMDR1002を有するE.coliを、アメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville、MDに、受託番号第ATCC68847号で寄託した。

【0309】

10

(4.5A8ヒト型L鎖発現ベクター)

中間プラスミドpMDR1006およびpSAB132を連結することによって、5A8ヒト型L鎖(pMDR1007)を有する真核細胞用発現ベクターを構築した。中間プラスミドpMDR985、pMDR986およびpMDR1003を連結することによって、プラスミドpMDR1006を構築した。特定の構築方法については、以下に記載する。

【0310】

(A. 中間プラスミドpMDR985)

プロトタイプのヒト免疫グロブリンκL鎖シグナル配列をコードするDNAを有するように、中間プラスミドpMDR985を構築した。

【0311】

20

プラスミドpMDR985を作製するために、オリゴヌクレオチド360 - 81(配列番号46)および360 - 82(配列番号47)をポリヌクレオチドキナーゼで処理し、上記のように連結した。

【0312】

次いで、連結したオリゴヌクレオチド自身を、仔ウシのアルカリホスファターゼで脱リン酸化したプラスミドpNNO3の2707bpのHind3/EcoR5フラグメントに連結した。連結混合物を使用して、E.coli JA221(Iq)をアンピシリン耐性に形質転換した。コロニーを増殖させ、ミニプレップDNAを調製した。

【0313】

組換えプラスミドをスクリーニングして、pMDR985を同定する、約461bpおよび2321bpのEcoO1091フラグメントの存在を調べた。

30

【0314】

pMDR985挿入物のDNA配列は、配列番号48として示す。DNA配列分析によって、pMDR985が、シグナル配列(配列番号48のヌクレオチド9から77)の正しいコドンを持っていることが確認されたが、クローニング産物であるため、設計されたHind3部位(挿入物の5')は、pMDR985内には再構成されなかった。

【0315】

プラスミドpMDR985をAat2およびEcoR5で開裂し、プラスミド挿入物を含む572bpフラグメントを、低融点アガロースで分画することによって、単離した。

【0316】

40

(B. 中間プラスミドpMDR986)

ヒトκL鎖(すなわち、L鎖不変領域)のAA108 - AA214(Kabat番号)をコードするゲノムDNAを有するように、中間プラスミドpMDR986を構築した。

【0317】

J.Sambrookら、Molecular Cloning、ch.9(Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989)の記載に実質的に従って、ヒト胎盤からゲノムDNAを調製した。ゲノムDNAをEcoRIで開裂し、κ鎖不変領域(Genbank受託番号第J00241 - PR:HUMIGKC3)を含む2.5kbのEcoRIフラグメントを、pUC8のEcoRI部位にクローン化し、pAB8を作製した。

【0318】

プライマーとして、オリゴヌクレオチド370 - 54(SEQIDNO:49)および370 - 55(配列番号50)を使用するPCRによって、上記のように、κ不変領域(AA108 - AA214)をコードするDNAを

50

pAB8から増幅した。約1240bpのPCRフラグメントを単離し、脱リン酸化した、EcoR5で直線化したpNNO3に連結した。1314bp XmnI制限フラグメントの存在によって、プラスミドpSAB153を同定した。pSAB153のDNA配列は、配列番号51である。

【0319】

プラスミドpMDR986をpSAB153から以下のように構築した。プライマーとしてオリゴヌクレオチド360 - 83(配列番号52)および370 - 55(配列番号50)を使用するPCRによって、 κ 不変領域をpSAB153から増幅した。約1276bpのPCRフラグメントをGENECLEAN II(登録商標)溶出、次いでアガロース電気泳動によって単離し、エタノール沈澱させ、20 μ lのTE緩衝液に再懸濁した。精製したPCRフラグメントを、DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントで処理し、仔ウシのアルカリホスファターゼによって脱リン酸化した、EcoR5で直線化したpNNO3に連結した。

10

【0320】

連結混合物を使用して、E.coli JA221(lq)細胞を形質転換した。DNAをアンピシリン耐性コロニーから調製し、Eco01091制限消化によりスクリーニングした。1122bpのEco01091制限フラグメントの存在により、プラスミドpMDR986を同定した。次いで、pMDR986プラスミドを使用して、E.coli GM2929を形質転換した。これは、そのDNA(dam - 13、dcm - 6株)をメチル化しない。

【0321】

pMDR986挿入物のDNA配列は、配列番号53である。DNA配列分析により、pMDR986が、ヒト κ 鎖のAA108 - AA214をコードするために正しいエクソンを有していることが確認された。しかし、クローニング産物であるため、不変領域の設計されたNotI部位3'は、pMDR986中では再構成されず、代わりに、Pvu1部位が作製された。

20

【0322】

プラスミドpMDR986をAat2およびBcl1で開裂し、仔ウシのアルカリホスファターゼで処理し、3443bpのフラグメントを、低融点アガロースで分画することによって単離した。

【0323】

(C. 中間プラスミドpMDR1003)

プラスミドpMDR1003の構築は、上記の通りである。このプラスミドは、ヒト型5A8 κ L鎖可変領域をコードするDNAを有する。pMDR1003のDNA配列は、配列番号34として示す。

【0324】

プラスミドpMDR1003をEcoR5およびBgl2で開裂し、プラスミド挿入物を含む326bpのフラグメントを、低融点アガロースで分画することによって単離した。

30

【0325】

(D. ベクターpMDR1007の最終構築)

ベクターpMDR1007をpSAB132(配列番号40)およびpMDR1006(挿入DNA配列は、配列番号54である)から構築した。

【0326】

3つのフラグメント:(a)pMDR985の572bp Aat2/EcoR5フラグメント;(b)pMDR986の3442bp Aat2/Bcl1フラグメント;および(c)pMDR1003の326bp EcoR5/Bgl2フラグメントを連結し、pMDR1006を作製した。連結混合物を使用して、E.coli JA221(lq)(源?)をアンピシリン耐性に形質転換した。コロニーを増殖させ、ミニプレップDNAを調製した。組換えプラスミドをスクリーニングし、特徴的なEco01091制限フラグメント(2741bp、767bpおよび461bp、243bpおよび129bp)の存在を調べ、pMDR1006を同定した。pMDR1006の挿入物のDNA配列は、配列番号54として示す。

40

【0327】

プラスミドpMDR1006をNot1で開裂し、1693bpフラグメントを単離した。Not1フラグメントを、仔ウシのアルカリホスファターゼで予め脱リン酸化した、Not1で直線化したpSAB132(配列番号40)に連結した。脱リン酸化した反応混合物を低融点アガロースで分画し、次いで、これを使用してE.coli JA221(lq)をアンピシリン耐性に形質転換した。コロニーを増殖させ、ミニプレップDNAを調製した。組換えプラスミドをスクリーニングして、特

50

徴的なApaI消化パターン(6249bp、1593bp、1246bpおよび498bpの断片)を調べ、pMDR1007を同定した。

【 0 3 2 8 】

pMDR1007挿入物のDNA配列は、配列番号55として示す。このDNA配列によってコードされるアミノ酸配列は、配列番号56として示す。pMDR1007挿入物は、5'から3'の順に、(1)免疫グロブリンκ鎖シグナル配列(配列番号56のAA-22-AA-1に対応する、配列番号55のヌクレオチド35-100)、(2)5A8のL鎖可変領域(配列番号56のAA1-AA112に対応する、配列番号55のヌクレオチド101-436)、次いで、ヒトκL鎖(すなわち、L鎖不変領域)(配列番号56のAA113-AA219に対応する、配列番号55のヌクレオチド437および782-1101)のAA108-AA214(Kabat番号)をコードするゲノムDNA(Genbank受託番号第J00241-PR:HUMIGKC3のヌクレオチド1から1201)をコードするDNAを含んでいる。

10

【 0 3 2 9 】

pMDR1007を有するE.coliを、アメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville、MDに、受託番号第ATCC68846号で寄託した。

【 0 3 3 0 】

(5. ヒト型5A8の発現)

予備実験において、COS7細胞を発現ベクターpMDR1007およびpMDR1002で、エレクトロポレーションによりトランスフェクトし、細胞を48時間培養した。次いで、この細胞を³⁵S-メチオニンで放射標識した。次いで、細胞抽出物および馴化培養物培地をプロテインA-セファロースとともにインキュベートした。プロテインA-セファロースを洗浄し、結合タンパク質を、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)負荷緩衝液で溶出し、PAGEで分析した。免疫グロブリンL鎖のプロテインA沈澱によって証明されるように、馴化培地では、免疫グロブリン凝集分子が、非常に低い収率で検出された。

20

【 0 3 3 1 】

(寄託物)

本発明による細胞および抗体ホモログを、1990年11月20日付けで、Linthicum、Maryland、U.S.A.のIn Vitro International、Inc.culture collectionに、ブダペスト条約の下で寄託され、以下のように同定される培養物により例示する：

「5A8-2F6」

「7-27-1F8-2B4」

「7-27-5F2-2C5」

「CHO 379 clone 12.1」

「CHO-160」

これらの培養物には、それぞれ、IVI-10257からIVI-10261までの受託番号が与えられた。これらの寄託物は、1991年6月20日に、アメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville、Marylandに移され、アメリカンタイプカルチャーコレクションにより、ブダペスト条約の下で、受託番号第HB10881号、第HB10882号、第HB10883号、第CRL10884号および第CRL10885号でそれぞれ保管されている。

30

【 0 3 3 2 】

本発明によるDNA配列および組換えDNA分子、ならびにこれらを調製するのに有用な微生物を、1991年11月21日付けで、アメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville、Maryland、U.S.A.に、ブダペスト条約の下で寄託され、以下のように同定される培養物により例示する：

40

「E.coliK12JA221(lq)」

「E.coliK12JA221(lq)/pMDR1007」

「E.coliK12JA221(lq)/pMDR1002」

「E.coliK12JA221(lq)/pMDRg04」

「E.coliK12JA221(lq)/pMDR927」

これらの培養物には、それぞれ、受託番号第ATCC68845号から第ATCC68849号までが与えられた。

50

【 0 3 3 3 】

(配 列)

下記のもは配列一覧表に記載されている配列のまとめである：

配列番号1	pre - HIVgp160のDNA配列	
配列番号2	pre - HIVgp160のアミノ酸配列	
配列番号3	可溶性HIVgp120のDNA配列	
配列番号4	可溶性HIVgp120のアミノ酸配列	
配列番号5	VH01 PCRプライマーのDNA配列	
配列番号6	VH02 PCRプライマーのDNA配列	
配列番号7	pNN03のDNA配列	10
配列番号8	pMDR904挿入物(5A8VH)のDNA配列	
配列番号9	5A8のH鎖可変領域のDNA配列	
配列番号10	5A8のH鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号11	ACE149 PCRプライマーのDNA配列	
配列番号12	ACE150 PCRプライマーのDNA配列	
配列番号13	pMDR927挿入物(5A8 VL)のDNA配列	
配列番号14	5A8のL鎖可変領域のDNA配列	
配列番号15	5A8のL鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号16	312 - 56 PCRプライマーのDNA配列	
配列番号17	312 - 57 PCRプライマーのDNA配列	20
配列番号18	312 - 58 PCRプライマーのDNA配列	
配列番号19	312 - 59 PCRプライマーのDNA配列	
配列番号20	312 - 60 PCRプライマーのDNA配列	
配列番号21	312 - 61 PCRプライマーのDNA配列	
配列番号22	pMDR989 - 15挿入物のDNA配列	
配列番号23	pMDR991挿入物のDNA配列	
配列番号24	312 - 62のオリゴヌクレオチドのDNA配列	
配列番号25	312 - 63のオリゴヌクレオチドのDNA配列	
配列番号26	312 - 64のオリゴヌクレオチドのDNA配列	
配列番号27	312 - 65のオリゴヌクレオチドのDNA配列	30
配列番号28	312 - 66のオリゴヌクレオチドのDNA配列	
配列番号29	312 - 67のオリゴヌクレオチドのDNA配列	
配列番号30	312 - 68のオリゴヌクレオチドのDNA配列	
配列番号31	312 - 69のオリゴヌクレオチドのDNA配列	
配列番号32	312 - 70のオリゴヌクレオチドのDNA配列	
配列番号33	312 - 71のオリゴヌクレオチドのDNA配列	
配列番号34	pMDR1003挿入物のDNA配列	
配列番号35	312 - 45のオリゴヌクレオチドのDNA配列	
配列番号36	312 - 50のオリゴヌクレオチドのDNA配列	
配列番号37	pLCB6挿入物のDNA配列	40
配列番号38	pLCB7挿入物のDNA配列	
配列番号39	pMDR1001挿入物のDNA配列	
配列番号40	pSAB132のDNA配列	
配列番号41	370 - 38 PCRプライマーのDNA配列	
配列番号42	370 - 40 PCRプライマーのDNA配列	
配列番号43	pBAG101挿入物のDNA配列	
配列番号44	pMDR1002挿入物のDNA配列 (pre - 5A8ヒト型H鎖)	
配列番号45	pMDR1002挿入物のアミノ酸配列 (pre - 5A8ヒト型H鎖)	
配列番号46	360 - 81のオリゴヌクレオチドのDNA配列	
配列番号47	360 - 82のオリゴヌクレオチドのDNA配列	50

配列番号48 pMDR985挿入物のDNA配列
配列番号49 370 - 54 PCRプライマーのDNA配列
配列番号50 370 - 55 PCRプライマーのDNA配列
配列番号51 pSAB153挿入物のDNA配列
配列番号52 360 - 83 PCRプライマーのDNA配列
配列番号53 pMDR986挿入物のDNA配列
配列番号54 pMDR1006挿入物のDNA配列
配列番号55 pMDR1007挿入物のDNA配列 (pre - 5A8ヒト型L鎖)
配列番号56 pMDR1007挿入物のアミノ酸配列 (pre - 5A8ヒト型L鎖)
配列番号57 pNN03合成ポリリンカーのDNA配列
配列番号58 312 - 46のオリゴヌクレオチドのDNA配列
配列番号59 312 - 47のオリゴヌクレオチドのDNA配列
配列番号60 312 - 48のオリゴヌクレオチドのDNA配列
配列番号61 312 - 49のオリゴヌクレオチドのDNA配列。

10

【 0 3 3 4 】

前述に数多くの実施態様を示したが、本発明の組成物および方法を用いる他の実施態様を提供するために、われわれの基本的な実施態様を改変し得ることは明白である。従って、多くの実施態様の変法の全ては、前述の明細書および添付の請求の範囲で明示されている本発明の範囲に含まれることは明白である。

【 0 3 3 5 】

20

(配列表)

【 0 3 3 6 】

【化 1】

配列表

(1) 一般的情報:

- (i) 出願人: ハーリー、リチャード、
 ショム、ハトリシエール、
 トマス、ティビット、タフリス、
 ロサ、マダレット、ティ、
 ロサ、ジョセフ、ジエ。

(ii) 発明の名称: AIDS、ARCおよびHIV感染の予防および治療に有用な抗CD4抗体ホモログ

(iii) 配列数: 61

10

(iv) 関連住所:

- (A) 住所人: フィッシュ、ソット、ニブ
 (B) 番地: 4-7、7A、ニブ 876
 (C) 市: ニューヨーク
 (D) 州: ニューヨーク
 (E) 国: アメリカ合衆国
 (F) 郵便番号: 10022-6250

(v) コンピューター読み出し形態:

- (A) 媒体型: フロッピーディスク
 (B) コンピューター: IBM PC 互換用
 (C) 操作システム: PC-DOS/MS-DOS
 (D) ソフトウェア: パテントインリリース #1.0、バージョン #1.25

20

(vi) 現在の出願データ:

- (A) 出願番号: W0
 (B) 出願日:
 (C) 分類:

(viii) 代理人/事務所情報:

- (A) 氏名: ハーリー、ショム、ティビット、エフ。
 (B) 登録番号: 27,794
 (C) 照会/記録番号: B148 CIP

(ix) 電話回線情報:

- (A) 電話: (212) 715-0600
 (B) テレファックス: (212) 715-0673
 (C) テレックス: 14-8367

30

(2) SEQ ID NO:1の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 2571塩基対
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状

【 0 3 3 7 】

【化 2】

- (ii)配列の種類: cDNA
 (iii)ハイボセティカル配列: No
 (iv)アンチセンス: No
 (ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号: sig peptide
 (B)存在位置: 1..87
 (ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号: mat peptide
 (B)存在位置: 88..2568
 (ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号: misc feature
 (B)存在位置: 1533..1534
 (D)他の情報: /注 = "gp120/gp41 開裂部位"
 (ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号: CDS
 (B)存在位置: 1..2568
 (ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号: misc feature
 (B)存在位置: 1
 (D)他の情報: /注 = "pre-HIV gp160"
 (xi)配列: SEQ ID NO:1:

ATG AGA GIG AAG GAG AAA TAT CAG CAC TTG TGG AGA TGG GGG TTG AGA 48
 Met Arg Val Lys Glu Lys Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp Gly Trp Arg
 -29 -25 -20 -15

TGG GGC ACC ATG CTC CTT GGG ATG TTG ATG ATC TGT AGT GCT ACA GAA 96
 Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Thr Glu
 -10 -5 1

AAA TTG TGG GTC ACA GTC TAT TAT GGG GTA CCT GIG TGG AAG GAA GCA 144
 Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala
 5 10 15

ACC ACC ACT CTA TTT TGT GCA TCA GAT GCT AAA GCA TAT GAT ACA GAG 192
 Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu
 20 25 30 35

GTA CAT AAT GGT TGG GGC ACA CAT GCC TGT GTA CCC ACA GAC CCC AAC 240
 Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
 40 45 50

GCA CAA GAA GTA GTA TTG GTA AAT GIG ACA GAA AAT TTT AAC ATG TGG 288
 Pro Gln Glu Val Val Leu Val Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
 55 60 65

【 0 3 3 8 】

【化 3】

AAA AAT GAC ATG GTA GAA CAG ATG CAT GAG GAT ATA ATC AGT TTA TGG Lys Asn Asp Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp 70 75 80	336	
GAT CAA AGC CTA AAG CCA TGT GTA AAA TTA ACC CCA CTC TGT GGT AGT Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Ser 85 90 95	384	
TTA AAG TGC ACT GAT TTG AAG AAT GAT ACT AAT ACC AAT AGT AGT AGC Leu Lys Cys Thr Asp Leu Lys Asn Asp Thr Asn Thr Asn Ser Ser Ser 100 105 110 115	432	
GGG AGA ATG ATA ATG GAG AAA GGA GAG ATA AAA AAC TGC TCT TTC AAT Gly Arg Met Ile Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn 120 125 130	480	10
ATC AGC ACA AGC ATA AGA GGT AAG GTG CAG AAA GAA TAT GCA TTT TTT Ile Ser Thr Ser Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Phe Phe 135 140 145	528	
TAT AAA CTT GAT ATA ATA CCA ATA GAT AAT GAT ACT ACC AGC TAT AAG Tyr Lys Leu Asp Ile Ile Pro Ile Asp Asn Asp Thr Thr Ser Tyr Lys 150 155 160	576	
TTG ACA AGT TGT AAC ACC TCA GTC AAT ACA CAG GCC TGT CCA AAG GTA Leu Thr Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val 165 170 175	624	
TCC TTT GAG CCA AAT CCC ATA CAT TAT TGT GCC CCG GGT GGT TTT GCG Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala 180 185 190 195	672	20
AAT CTA AAA TGT AAT AAT AAG AGC TTC AAT GGA ACA GGA CCA TGT ACA Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Thr 200 205 210	720	
AAT GTC AGC ACA GTA CAA TGT ACA CAT GGA AAT AGG CCA GTA GTA TCA Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser 215 220 225	768	
ACT CAA CTG CTG TTA AAT GGC AGT CTA GCA GAA GAA GAG GTA GTA AAT Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val Ile 230 235 240	816	
AGA TGT GTC AAT TTC ACG GAC AAT GCT AAA ACC ATA ATA GTA CAG CTG Arg Ser Val Asn Phe Thr Asp Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu 245 250 255	864	
AAG ACA TGT GTA GAA AAT AAT TGT ACA AGA CCC AAC AAC AAT ACA ACA Asn Thr Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg 260 265 270 275	912	
AAA AGA ATC CGT ATC CAG AGA GGA CCA GGG AGA GCA TTT GGT ACA ATA Lys Arg Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile 280 285 290	960	

【 0 3 3 9 】

【化4】

GGA AAA ATA GGA AAT ATG AGA CAA GCA CAT TGT AAC MIT AGT AGA GCA Gly Lys Ile Gly Asn Met Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Arg Ala 295 300 305	1008	
AAA TGG AAT AAC ACT TTA AAA CAG ATA GCT AGC AAA TTA AGA GAA CAA Lys Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln Ile Ala Ser Lys Leu Arg Glu Gln 310 315 320	1056	
TIT GGA AAT AAT AAA ACA ATA ATC TIT AAG CAA TCC TCA GGA GGG GAC Phe Gly Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe Lys Gln Ser Ser Gly Gly Asp 325 330 335	1104	
CCA GAA MIT GTA AGC CAC AGT TTT AAT TGT GGA GGG GAA TTT TTC TAC Pro Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr 340 345 350 355	1152	10
TGT AAT TCA ACA CAA CTG TTT AAT AGT ACT TGG TTT AAT AGT ACT TGG Cys Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Phe Asn Ser Thr Trp 360 365 370	1200	
AGT ACT GAA GGG TCA AAT AAC ACT GAA GGA AGT GAC ACA ATC ACC CTC Ser Thr Glu Gly Ser Asn Asn Thr Glu Gly Ser Asp Thr Ile Thr Leu 375 380 385	1248	
CCA TGC AGA ATA AAA CAA AIT ATA AAC ATG TGG CAG AAA GTA GCA AAA Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Lys Val Gly Lys 390 395 400	1296	
GCA ATG TAT GGC CCT CCC ATC AGT GGA CAA MIT AGA TGT TCA TCA AAT Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn 405 410 415	1344	20
AIT ACA GGG CTG CTA TTA ACA AGA GAT GGT GGT AAT AGC AAC AAT GAG Ile Thr Gly Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Ser Asn Asn Glu 420 425 430 435	1392	
TCC GAG ATC TTC AGA CCT GGA GGA GGA GAT ATG AGG GAC AAT TGG AGA Ser Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg 440 445 450	1440	
AGT GAA TTA TAT AAA TAT AAA GTA GTA AAA MIT GAA CCA TTA GGA GTA Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val 455 460 465	1488	
GCA CCC ACC AAG GCA AAG AGA AGA GTG GTG CAG AGA GAA AAA AGA GCA Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala 470 475 480	1536	
GTG GGA ATA GGA GCT TTG TTC CTT GGG TTC TTG GGA GCA GCA GGA AGC Val Gly Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser 485 490 495	1584	
ACT ATG GGC GCA GCG TCA ATG AGC CTG AGG GTA CAG GCC AGA CAA TTA Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu 500 505 510 515	1632	

【0340】

【化5】

TTC TCT GGT ATA GTG CAG CAG CAG AAC AAT TIG CTG AGG GCT ATT GAG Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu 520 525 530	1680	
GCG CAA CAG CAT CTG TTG CAA CTC ACA GTC TGG GGC ATC AAG CAG CTC Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu 535 540 545	1728	
CAG GCA AGA ATC CTG GCT GTG GAA AGA TAC CTA AAG GAT CAA CAG CTC Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu 550 555 560	1776	
CTA GGG AAT TGG GGT TGC TCT GGA AAA CTC AAT TGC ACC ACT GCT GTG Leu Gly Ile Thr Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val 565 570 575	1824	10
CGT TGG AAT GCT AGT TGG AGT AAT AAA TCT CTG GAA CAG AAT TGG AAT Pro Thr Asn Ala Ser Thr Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Thr Asn 580 585 590 595	1872	
CAC ACG ACC TGG AIG GAG TGG CAC AGA GAA AAT AAC AAT TAC ACA AGC His Thr Thr Thr Met Glu Thr Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser 600 605 610	1920	
TTA ATA CAC TCC TTA AAT GAA GAA TCG CAA AAC CAG CAA GAA AAG AAT Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn 615 620 625	1968	
GAA CAA GAA TTA TTG GAA TTA GAT AAA TGG GCA AGT TTG TGG AAT TGG Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Thr Ala Ser Leu Thr Asn Thr 630 635 640	2016	20
TTC AAC ATA ACA AAT TGG CTG TGG TAT ATA AAA TTA TTC ATA AIG ATA Phe Asn Ile Thr Asn Thr Leu Thr Tyr Ile Lys Leu Phe Ile Met Ile 645 650 655	2064	
GTA GGA GGC TTG GTA GGT TTA ACA ATA GTT TTT GCT GTA CTT TCT ATA Val Gly Gly Leu Val Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Ile 660 665 670 675	2112	
GIG AAT AGA GTT AGG CAG GGA TAT TCA CCA TTA TCG TTT CAG ACC CAC Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr His 680 685 690	2160	
CTC CCA ACC CCG AGG GGA CTC GAC AGG CTC GAA GGA ATA GAA GAA GAA Leu Pro Thr Pro Arg Gly Pro Asp Arg Pro Glu Gly Ile Glu Glu Glu 695 700 705	2208	30
GGT GGA GAG AGA GAC AGA GAC AGA TCC AAT CGA TTA GTG AAC GGA TCC Gly Gly Glu Arg Asp Arg Asp Arg Ser Ile Arg Leu Val Asn Gly Ser 710 715 720	2256	
TTC GCA CTT ATC TGG GAC GAT CTG CCG AGC CTG TCC CTC TTC AGC TAC Leu Ala Leu Ile Thr Asp Asp Leu Arg Ser Leu Cys Leu Phe Ser Tyr 725 730 735	2304	

【0341】

【化6】

CAC CAC TIG AGA GAC TTA CTC TIG ATT GGA AGG AGG ATT GIG GAA CTT 2352
His Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg Ile Val Glu Leu
740 745 750 755
CIG GGA CGC AGG GGG TGG GAA GGC CTC AAA TAT TGG TGG AAT CTC CTA 2400
Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu
760 765 770
CAG TAT TGG AGT CAG GAA CTA AAG AAT AGT GCT GGT AGC TIG CTC AAT 2448
Gln Tyr Trp Ser Gln Glu Leu Lys Asn Ser Ala Val Ser Leu Leu Asn
775 780 785
GCC ACA GGC ATA GCA GGA GCT CAG GGG ACA GAT AGG GGT ATA GAA GGA 2496
Ala Thr Ala Ile Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val
790 795 800
GGA CAA GGA GCT TGT AGA GCT ATT CGC CAC ATA CTT AGA AGA ATA AGA 2544
Val Gln Gly Ala Cys Arg Ala Ile Arg His Ile Pro Arg Arg Ile Arg
805 810 815
CAG GGC TIG GAA AGG ATT TIG CTA TAA 2571
Gln Gly Leu Glu Arg Ile Leu Leu
820 825

10

(2)SEQ ID NO:2の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 856アミノ酸

(B)型: アミノ酸

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: タンパク質

(xi)配列: SEQ ID NO:2:

20

Met Arg Val Lys Glu Lys Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp Gly Trp Arg
-29 -25 -20 -15
Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Thr Glu
-10 -5 1
Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala
5 10 15
Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu
20 25 30 35
Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
40 45 50
Pro Gln Glu Val Val Leu Val Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
55 60 65
Lys Asn Asp Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp
70 75 80

30

【0342】

【化7】

Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Ser
 85 90 95
 Leu Lys Cys Thr Asp Leu Lys Asn Asp Thr Asn Thr Asn Ser Ser Ser
 100 105 110 115
 Gly Arg Met Ile Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn
 120 125 130
 Ile Ser Thr Ser Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Phe Phe
 135 140 145
 Tyr Lys Leu Asp Ile Ile Pro Ile Asp Asn Asp Thr Thr Ser Tyr Lys
 150 155 160
 Leu Thr Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val
 165 170 175
 Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala
 180 185 190 195
 Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Thr
 200 205 210
 Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser
 215 220 225
 Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val Ile
 230 235 240
 Arg Ser Val Asn Phe Thr Asp Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu
 245 250 255
 Asn Thr Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg
 260 265 270 275
 Lys Arg Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile
 280 285 290
 Gly Lys Ile Gly Asn Met Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Arg Ala
 295 300 305
 Lys Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln Ile Ala Ser Lys Leu Arg Glu Gln
 310 315 320
 Phe Gly Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe Lys Gln Ser Ser Gly Gly Asp
 325 330 335
 Pro Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr
 340 345 350 355
 Cys Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Phe Asn Ser Thr Trp
 360 365 370

10

20

30

【0343】

【化 8】

Ser Thr Glu Gly Ser Asn Asn Thr Glu Gly Ser Asp Thr Ile Thr Leu
 375 380 385
 Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Lys Val Gly Lys
 390 395 400
 Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn
 405 410 415
 Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Ser Asn Asn Glu
 420 425 430 435
 Ser Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg
 440 445 450
 Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val
 455 460 465
 Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala
 470 475 480
 Val Gly Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser
 485 490 495
 Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu
 500 505 510 515
 Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu
 520 525 530
 Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu
 535 540 545
 Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu
 550 555 560
 Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val
 565 570 575
 Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn
 580 585 590 595
 His Thr Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser
 600 605 610
 Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn
 615 620 625
 Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp
 630 635 640
 Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Leu Phe Ile Met Ile
 645 650 655

10

20

30

【 0 3 4 4 】

【化9】

Val Gly Gly Leu Val Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Ile
 660 665 670 675
 Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr His
 680 685 690
 Leu Pro Thr Pro Arg Gly Pro Asp Arg Pro Glu Gly Ile Glu Glu Glu
 695 700 705
 Gly Gly Glu Arg Asp Arg Asp Arg Ser Ile Arg Leu Val Asn Gly Ser
 710 715 720
 Leu Ala Leu Ile Trp Asp Asp Leu Arg Ser Leu Cys Leu Phe Ser Tyr
 725 730 735
 His Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg Ile Val Glu Leu
 740 745 750 755
 Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu
 760 765 770
 Gln Tyr Trp Ser Gln Glu Leu Lys Asn Ser Ala Val Ser Leu Leu Asn
 775 780 785
 Ala Thr Ala Ile Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val
 790 795 800
 Val Gln Gly Ala Cys Arg Ala Ile Arg His Ile Pro Arg Arg Ile Arg
 805 810 815
 Gln Gly Leu Glu Arg Ile Leu Leu
 820 825

10

20

(2) SEQ ID NO:3の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 1497塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: CDS
- (B)存在位置: 1..1494

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc feature
- (B)存在位置: 1
- (D)他の情報: 注 = "可溶性 HIV gp120"

30

【0345】

【化 1 0】

(xi)配列: SEQ ID NO:3:

ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GIG CTG CTG CTG TGT GCA Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly 1 5 10 15	48	
GCA GTC TTC GGT TGG CCC AGC CAG GAA ATC CAT GGC CGA TTC AGA AGA Ala Val Phe Val Ser Pro Ser Gln Glu Ile His Ala Arg Phe Arg Arg 20 25 30	96	
GCA GGC AGA TCC ATG GTA CCT GIG TGG AAG GAA GCA ACC ACC ACT CTA Gly Ala Arg Ser Met Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr Thr Leu 35 40 45	144	10
TTT TGT GCA TCA GAT GCT AAA GCA TAT GAT ACA GAG GGA CAT AAT GGT Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His Asn Val 50 55 60	192	
TGG GGC ACA CAT GGC TGT GTA CCC ACA GAC CCC AAC CCA CAA GAA GTA Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln Glu Val 65 70 75 80	240	
GTA TTG GTA AAT GIG ACA GAA AAT TTT AAC ATG TGG AAA AAT GAC ATG Val Leu Val Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn Asp Met 85 90 95	288	
GTA GAA CAG ATG CAT GAG GAT ATA ATC AGT TTA TGG GAT CAA AGC CTA Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu 100 105 110	336	20
AAG CCA TGT GTA AAA TTA ACC CCA CTC TGT GGT AGT TTA AAG TGC ACT Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Ser Leu Lys Cys Thr 115 120 125	384	
GAT TTG AAG AAT GAT ACT AAT ACC AAT AGT AGT AGC GGG AGA ATG ATA Asp Leu Lys Asn Asp Thr Asn Thr Asn Ser Ser Ser Gly Arg Met Ile 130 135 140	432	
ATG GAG AAA GCA GAG ATA AAA AAC TGC TCT TTC AAT ATC AGC ACA AGC Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Ser Thr Ser 145 150 155 160	480	
ATA AGA GGT AAG GIG CAG AAA GAA TAT GCA TTT TTT TAT AAA CTT GAT Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Phe Phe Tyr Lys Leu Asp 165 170 175	528	30
ATA ATA CCA ATA GAT AAT GAT ACT ACC AGC TAT AAG TTG ACA AGT TGT Ile Ile Pro Ile Asp Asn Asp Thr Thr Ser Tyr Lys Leu Thr Ser Cys 180 185 190	576	
AAC ACC TCA GTC AIT ACA CAG GCC TGT CCA AAG GTA TCC TTT GAG CCA Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro 195 200 205	624	

【 0 3 4 6】

【化 1 1】

ATT CCC ATA CAT TAT TGT GGC CGG GCT GGT TTT GCG ATT CTA AAA TGT Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys 210 215 220	672	
AAT AAT AAG ACG TTC AAT GGA ACA GGA CCA TGT ACA AAT GTC AGC ACA Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr 225 230 235 240	720	
GTA CAA TGT ACA CAT GGA ATT AGG CCA GTA GTA TCA ACT CAA CTG CTG Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu 245 250 255	768	
TTA AAT GGC AGT CTA GCA GAA GAA GAG GTA GTA ATT ACA TCT GTC AAT Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Val Val Ile Arg Ser Val Asn 260 265 270	816	10
TTC ACG GAC AAT GCT AAA ACC ATA ATA GTA CAG CTG AAC ACA TCT GTA Phe Thr Asp Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Thr Ser Val 275 280 285	864	
GAA ATT AAT TGT ACA AGA CCC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGA ATC CGT Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Arg Ile Arg 290 295 300	912	
ATC CAG AGA GGA CCA GGG AGA GCA TTT GTT ACA ATA GGA AAA ATA GGA Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys Ile Gly 305 310 315 320	960	
AAT AIG ACA CAA GCA CAT TGT AAC ATT AGT AGA GCA AAA TGG AAT AAC Asn Met Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp Asn Asn 325 330 335	1008	20
ACT TTA AAA CAG ATA GCT AGC AAA TTA AGA GAA CAA TTT GGA AAT AAT Thr Leu Lys Gln Ile Ala Ser Lys Leu Arg Glu Gln Phe Gly Asn Asn 340 345 350	1056	
AAA ACA ATA ATC TTT AAG CAA TCC TCA GGA GGG GAC CCA GAA ATT GTA Lys Thr Ile Ile Phe Lys Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val 355 360 365	1104	
ACG CAC AGT TTT AAT TGT GGA GGG GAA TTT TTC TAC TGT AAT TCA ACA Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Ser Thr 370 375 380	1152	
CAA CTG TTT AAT AGT ACT TGG TTT AAT AGT ACT TGG AGT ACT GAA GGG Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Phe Asn Ser Thr Trp Ser Thr Glu Gly 385 390 395 400	1200	30
TCA AAT AAC ACT GAA GGA AGT GAC ACA ATC ACC CTC CCA TGC AGA ATA Ser Asn Asn Thr Glu Gly Ser Asp Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile 405 410 415	1248	
AAA CAA ATT ATA AAC AIG TGG CAG AAA GTA GGA AAA GCA AIG TAT GGC Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Lys Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala 420 425 430	1296	

【 0 3 4 7 】

【化 1 2】

CCT CCC ATC AGT GGA CAA ATT AGA TGT TCA TCA AAT ATT ACA GGG CTG Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu 435 440 445	1344
CCT TTA ACA AGA GAT GGT GGT AAT AGC AAC AAT GAG TCC GAG ATC TTC Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Ser Asn Asn Glu Ser Glu Ile Phe 450 455 460	1392
AGA CCT GGA GGA GGA GAT ATG AGG GAC AAT TGG ACA AGT GAA TTA TAT Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr 465 470 475 480	1440
AAA TAT AAA GTA GTA AAA ATT GAA CCA TTA GGA GTA GCA CCC ACC AAG Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys 485 490 495	1488
CCT AGT TAA Leu Ser	1497

10

(2) SEQ ID NO:4の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 498アミノ酸

(B)型: アミノ酸

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: タンパク質

(xi)配列: SEQ ID NO:4:

20

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

30

【 0 3 4 8】

【化 1 3】

Asp Leu Lys Asn Asp Thr Asn Thr Asn Ser Ser Ser Gly Arg Met Ile
 130 135 140
 Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Phe Phe Tyr Lys Leu Asp
 165 170 175
 Ile Ile Pro Ile Asp Asn Asp Thr Thr Ser Tyr Lys Leu Thr Ser Cys
 180 185 190
 Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro
 195 200 205
 Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys
 210 215 220
 Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr
 225 230 235 240
 Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu
 245 250 255
 Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val Ile Arg Ser Val Asn
 260 265 270
 Phe Thr Asp Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Thr Ser Val
 275 280 285
 Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Arg Ile Arg
 290 295 300
 Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys Ile Gly
 305 310 315 320
 Asn Met Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp Asn Asn
 325 330 335
 Thr Leu Lys Gln Ile Ala Ser Lys Leu Arg Glu Gln Phe Gly Asn Asn
 340 345 350
 Lys Thr Ile Ile Phe Lys Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val
 355 360 365
 Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Ser Thr
 370 375 380
 Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Phe Asn Ser Thr Trp Ser Thr Glu Gly
 385 390 395 400
 Ser Asn Asn Thr Glu Gly Ser Asp Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile
 405 410 415

10

20

30

【0 3 4 9】

【化 1 4】

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Lys Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
 420 425 430
 Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu
 435 440 445
 Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Ser Asn Asn Glu Ser Glu Ile Phe
 450 455 460
 Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr
 465 470 475 480
 Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys
 485 490 495
 Leu Ser

10

(2)SEQ ID NO:5の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 22塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: /注="VH01 PCR プライマー"

(xi)配列: SEQ ID NO:5:

AGGISMARCT GCAGSAGTCW GG

22

(2)SEQ ID NO:6の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 32塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

30

【0350】

【化 1 5】

- (iii) ハイボセティカル配列: No
 (iv) アンチセンス: No
 (ix) 配列の特徴:
 (A) 特徴を表す記号: misc feature
 (B) 存在位置: 1
 (D) 他の情報: / 注 = "VH02 PCRプライマー"
 (xi) 配列: SEQ ID NO:6:

TCAGGAGAG GGGAGGGGGG TGGGTGGGC CC

32

10

- (2) SEQ ID NO:7の情報:

- (i) 配列の特色:
 (A) 長さ: 2755塩基対
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 環状

- (ii) 配列の種類: cDNA

- (iii) ハイボセティカル配列: No

- (iv) アンチセンス: No

- (ix) 配列の特徴:
 (A) 特徴を表す記号: misc feature

- (B) 存在位置: 1

- (D) 他の情報: / 注 = "pNN03"

- (xi) 配列: SEQ ID NO:7:

20

TGGGGGTTT CCGGATGAC GGTGAAAGC TTGTACACT GGAGTGGG GAGAGGTGA 60
 CAGGTGTCT GTAGGCTAT GGGGACCA GACAGGCG TCAGGGCG TGAGGGGTC 120
 TTGGGGGTC TGGGGGGG CTTAATATG CCGCTACA GGAGTTGA CTTAGATCC 180
 ACGATGCG GTGTGAATA CCGACAGAT GGTAGGAG AAAATACCG ATTAGGGGC 240
 ATTGGCAT CAGGTCGC AACTGTGG AAGGGGATC GGTGGGGC TGTGGCTAT 300
 TAGGGAGT GGTGAAGG GTGTGTCG CAGGGCAT AAGTTGGTA AGCGAGGT 360
 TTTCAGAC AGAGGTGT AAAAGTAC CAGTGGCA GTTAGGGC GGGTCCAC 420
 CAGATGTC AAGCTTGT AGGGGAT TTGATGTC AGATGTC AGCTATAGT 480
 ATGATGCA TGTGCTCA CATCCATC CCGGGGCA ATTGTAAT ATGTCTAC 540
 CTTTTCG TCATGATG TTATGGTC AATTTTAC AATATAG AGGGGAC 600

30

【 0 3 5 1】

【化 1 6】

ATAAAGTGA AAGGCGGG TGCTATGA GAGGCTAC TACATAT TCGTGGGC	660
TCACGGGG CTTTCAGTC GCGAAGG TGGGGGAG TCGTATAT AATGGGCA	720
CGGGGGGA GAGGGGTT GGTGTTGG GGTCTTGG CTTCTGCT CACGACTG	780
CTGGGCGG TGGTGGCT GGGGGAGG GATCAGTC ACTCAAGG GGTATAGG	840
TCTTCAG AATCGGGA TAAGCAGA AAGACATG GACCAAGG CCAGCAAG	900
GCGAGAAC GTAAAGGC CGGTGCTG GGTGTTTC ATGGCTGG CGGCTGTC	960
GAGATACA AAATGAGG CTAAGTCAG AGTGGGAA ACGGACAG ACTATAGA	1020
TACAGGCT TCGGGGAG AAGCTGTC GTCGCTTC CTTTGGAC CTTGGGCT	1080
AACGATAC TGTGGGCT TCGGGTGG GAGGGGAG CGGTGCTA TACTCAGC	1140
TCTAGTAT TCACTGCT GATGCTTT GGTTCAGG TGGGCTGT GCAAGAAC	1200
CGGTGAGG CGAGGGTG CGGTGTTG GGTATGTC GCTGAGTC CAGCGGTA	1260
AGACAGAT TATGGGCT GCGAGGAG AGTGGTAA GGTATAGG ACGGATAT	1320
GTAGGGG CACAGACT CTTGAGTG TGGTATAT ACGGTAC CACAGACA	1380
GTATTTGA TCGGGCTT GTCAGGCA GTACCTTG GAAAGAGT TGTGCTCT	1440
TGTGGGCA AATCAAGC CGGTGAGG GGTGTTTT TGTGCTAA GAGGATTT	1500
AAGGCGAA AAAAGATC TCAAGAT CTTGATCT TTTTACGG GTCTAGCT	1560
CAGGAGG AAAATCAG TTAGGAT TGTGCTGA GATATCAA AAGGATCT	1620
AACGATCC TTTAATTA AAATGAGT TTTAATTA TCAAGTAT ATAGAGTA	1680
AGTGGGAG ACATGACA ATGCTATC AGTGGGAC CTTTTCAG CTTGCTTA	1740
TTTGTGAT CATTAGTG CTTCTGCG GTCTGAGA TACTAGAT ACGGAGGC	1800
TTACATTG GCGGAGTG TCAATGTA CGGAGAGC CAGCTACG GCTTCAGT	1860
TTTCAGCA TAAAGGCG AGGGGAGG GCGAGGCA GAGGCTTC TCAACTTA	1920
TGGGCTCA TCACTGAT TAATGTTG CGGAGGTA GATATAG TTTGAGTT	1980
AATAGTTC GCAAGTGT TGGATGCT ACAGGATG TGTGCTAG CTTGCTTT	2040
GATGCTCT CATTAGTC CGTTCGCA GATCAGGC GATATAG ATCGGATG	2100
TGTGCAAA AAGGCTAG CTTGCTGT CTTGATG TGTGAGAG TATGTTGC	2160
GAGGTTAT CATTAGCT TATGAGCA CTTGATTT CTTTATGT CATTGATC	2220
GTAAGTCT TTTGCTAG TGTGATAC TCACTAGT CATTGAGA ATAGTATG	2280

10

20

30

【 0 3 5 2】

【化 17】

CGGGAGGGA GTTGGGCTTG CCGGGGCTCA ATACGGGATA ATACGGGGCC ACATAGGAGA 2340
 ACCTTAAAG TGTTCATCAT TGGAAAGCT TCTTGGGGCC GAAACCTTC AGGATCTTA 2400
 CCGGCTTGA GATCAGTTC GATGTAACC ACTGGGAC CCACCTGTC TTGAGCATCT 2460
 TTACCTTCA CCGGCTTTC TGGTGGCA AAAACAGGA GCGAAATGC GCGAAAAAG 2520
 GCAATAGGG GCACAGGAA AGTGGATA CTCTACTCT TCTTTTCA ATATTATGA 2580
 AGCATTAAT AGGCTATG TCTCATGAG GCACTATAT TTGATGTTT TTAGAAAAAT 2640
 AAACAATAG GGGTGGGG CACATTTCC GAAAGTGC CACCTAGCT CTAGAAACC 2700
 ATTATTATCA TGACATAAC CTATAAAAT AGGGATCA CCGGGGCTT TGTTC 2755

(2) SEQ ID NO:8の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 365塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc feature
- (B)存在位置: 1
- (D)他の情報: / 注 = "pMDR904 挿入"

(xi)配列: SEQ ID NO:8:

AGGTAGGCT GCACAGTCT GCACTGAC TGGTAAGCC TGGGGCTCA GTGAGATGT 60
 CCGCAAGGC TTCTGGTAC ACATACATA GGTATGTTT ACATGGGTC AGGAGAGC 120
 CCGGGGAGG CCGTACAGG ATGGATATA TTATCTCTA CATCATGCT ACATAGTAC 180
 ATGAGAGTT CAAGGCAAG GCACTGCTA CTTCAGCAA ATCTTCCAG ACAGCTTAC 240
 TGGAGTCCG CAGCTGAC TCTGAGGCT CCGGGCTCA TTCTGGTCA AGAGAGAGC 300
 ATTAATAGC GAGGGGGCC TGGTTCTCT ACTGGGGCA AGGAGGAGC GTACAGTCT 360
 CTCA 365

(2) SEQ ID NO:9の情報:

【0353】

【化 18】

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 366塩基対
 (B)型: 核酸
 (C)鎖の数: 一本鎖
 (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: CDS

(B)存在位置: 1..366

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: /注 = "5A8 H鎖可変領域"

(xi)配列: SEQ ID NO:9:

GAG GIG AAG CIG CAG GAG TCT GGA CTT GAA CIG GGA AAG CTT GGG GCT Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	48
1 5 10 15	
TCA GIG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC ACT AGC TAT Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	96
20 25 30	
GTT ATA CAC TGG GIG AGG CAG AAG CTT GGG CAG GGC CTT GAC TGG ATT Val Ile His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile	144
35 40 45	
GGA TAT ATT AAT CTT TAC AAT GAT GGT ACT GAC TAC GAT GAG AAG TTC Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asp Tyr Asp Glu Lys Phe	192
50 55 60	
AAA GGC AAG GCT ACA CIG ACT TCA GAC AAA TCC TCC ACC ACA GGC TAC Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	240
65 70 75 80	
ATG GAG CIG AGC AGC CIG ACC TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	288
85 90 95	
GCA AGA GAG AAG GAT AAC TAC GCG AGG GCG GCC TGG TTT GCT TAC TGG Ala Arg Glu Lys Asp Asn Tyr Ala Thr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp	336
100 105 110	
GGC CAA GCG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	366
115 120	

【 0 3 5 4 】

【化 1 9】

(2)SEQ ID NO:10の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 122アミノ酸

(B)型: アミノ酸

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: タンパク質

(xi)配列: SEQ ID NO:10:

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

10

20

(2)SEQ ID NO:11の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 27塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: /注 = "ACE149 PCRプライマー"

30

【0355】

【化 2 0】

(xi)配列: SEQ ID NO:11:

CCTGATATCG TAATGACCA GCTTCCA

27

(2)SEQ ID NO:12の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 22塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

10

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc feature
- (B)存在位置: 1
- (D)他の情報: /注 = "ACE150 PCR プライマー"

(xi)配列: SEQ ID NO:12:

GTTAGATTC CAGCTTCTC CC

22

20

(2)SEQ ID NO:13の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 340塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc feature
- (B)存在位置: 1
- (D)他の情報: /注 = "pMDR927 挿入"

30

(xi)配列: SEQ ID NO:13:

CCTGATATCG TAATGACCA GCTTCCATCC TCCCTACGTC TGTCAGTTCG ACACAGGTT

60

【 0 3 5 6】

【化 2 1】

ACATGATCT GCAATGTCAG TCGAGGCTT TTTATGAGA CCAATCAAAA GAACATCTG 120
 GCTGGTAC AGCAGAAAC AGGGAGTCT CTTAACTGC TGTATTACG GGCATCCT 180
 AGGAATCTG GGGTTCATG TCGCTTACA GCGATGGAT CTTGGACGA TTTCACCTC 240
 ACGATACGA GGTGTAGGC TGAAGACCG GAGTTTATT ACCTGACGA ATATTATAC 300
 TATCGGAGT TGGTGGAGG GACCAAGCTG GAGTCTTAC 340

(2) SEQ ID NO:14の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 336塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: CDS

(B)存在位置: 1..336

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: / 注 = "5A8 L鎖可変領域"

(xi)配列: SEQ ID NO:14:

GAT AUC GUA AUG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTA GCT GTC TCA GTT GCA 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 GAG AAG GTT ACT AUG AUC TGC AAG TCC AGT CAG AGC CTT TTA TAT AGT 96
 Glu Lys Val Thr Met Ile Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 ACC AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGC CAG 144
 Thr Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 TCT CCT AAA CTG CTG AAT TAC TGG GCA TCC ACT AGG GAA TCT GGG GTC 192
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

【 0 3 5 7 】

【化 2 2】

CTT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC 240
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 ATC AGC AGT GIG AAG GGT GAA GAC CIG GCA GIT TAT TAC TGT CAG CAA 288
 Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 TAT TAT AGC TAT CGG AGC TTC GGT GCA GGG ACC AAG CIG GAG ATC AAA 336
 Tyr Tyr Ser Tyr Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

(2)SEQ ID NO:15の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 112アミノ酸

(B)型: アミノ酸

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: タンパク質

(xi)配列: SEQ ID NO:15:

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

(2)SEQ ID NO:16の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 58塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

【0358】

【化 2 3】

- (ii)配列の種類: cDNA
- (iii)ハイボセティカル配列: No
- (iv)アンチセンス: No
- (ix)配列の特徴:
 - (A)特徴を表す記号: misc feature
 - (B)存在位置: 1
 - (D)他の情報: /注="312-56 PCR プライマー"
- (xi)配列: SEQ ID NO:16:

10

GTCAGCTGC AGGAGCTGC AGCTGAGTG AAAAGGCTG GGGCTCAGT GAAGGCT

58

(2)SEQ ID NO:17の情報:

- (i)配列の特色:
 - (A)長さ: 49塩基対
 - (B)型: 核酸
 - (C)鎖の数: 一本鎖
 - (D)トポロジー: 直鎖状
- (ii)配列の種類: cDNA
- (iii)ハイボセティカル配列: No
- (iv)アンチセンス: No
- (ix)配列の特徴:
 - (A)特徴を表す記号: misc feature
 - (B)存在位置: 1
 - (D)他の情報: /注="312-57 PCR プライマー"
- (xi)配列: SEQ ID NO:17:

20

AGGATTATA TATCCATTC ACTCAAGGC CCGCCAGGC GCGTGGTC

49

(2)SEQ ID NO:18の情報:

- (i)配列の特色:
 - (A)長さ: 47塩基対
 - (B)型: 核酸
 - (C)鎖の数: 一本鎖
 - (D)トポロジー: 直鎖状
- (ii)配列の種類: cDNA
- (iii)ハイボセティカル配列: No
- (iv)アンチセンス: No

30

【 0 3 5 9】

【化 2 4】

- (ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号: misc feature
 (B)存在位置: 1
 (D)他の情報: / 注 = "312-58 PCR プライマー"
 (xi)配列: SEQ ID NO:18:

TTGGTGGGC AGGGGCGGCG GCGGGCGGTT GAGTGGGTTG GATATAT

47

(2)SEQ ID NO:19の情報:

(i)配列の特色:

10

- (A)長さ: 75塩基対
 (B)型: 核酸
 (C)鎖の数: 一本鎖
 (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc feature
 (B)存在位置: 1
 (D)他の情報: / 注 = "312-59 PCR プライマー"

20

(xi)配列: SEQ ID NO:19:

GAGGGGTTG TGTTCAGAC TTAGGCGGT GAGCTGATG TAGGCGTGT TGGTGATG

60

GTCCTAAGTC ACTGT

75

(2)SEQ ID NO:20の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 75塩基対
 (B)型: 核酸
 (C)鎖の数: 一本鎖
 (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

30

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc feature
 (B)存在位置: 1
 (D)他の情報: / 注 = "312-60 PCR プライマー"

【 0 3 6 0】

【化 2 5】

(xi)配列: SEQ ID NO:20:

AGGCGACAGT GACTTAGAC GATTCACCA ACACAGGCTA CATGGAGCTC AGCAGGCTA 60
GGTCGAGCA CACCTG 75

(2)SEQ ID NO:21の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 55塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: /注="312-61 PCR プライマー"

(xi)配列: SEQ ID NO:21:

ACAGGGTAC CAGGTCGCT TGGGCGAGT AAGCAACCA GCGGGGCTC GCGTA 55

(2)SEQ ID NO:22の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 331塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: /注="pMDR989-15挿入"

(xi)配列: SEQ ID NO:22:

【0 3 6 1】

【化 2 6】

AAGTGA AAA GGGGGGGT TCAGTGAAGG TGTCTTGCA GGCCTCAGGA TACACATCA 60
 CTAGCTTGT TTACACAGG GGTAGGACA AGGCGGGA GGGCTTGC TGTATGGT 120
 ATATTATCT TTACATGTT GGTACGACT AGGATGAGA GTTCAAGGC AAGGCAAC 180
 TGACTTACA CAATCTCT AGCAGAGCT ACCTGAGCT CAGCAGGCT ACCCTGAGG 240
 ACTCTGGGT CTATACGTT GATAGAGA AGGATACCA GCGAGGGG GCGGCTTTC 300
 CTATCTGGG CAGGAGT GTTCAAGTC T 331

(2) SEQ ID NO:23の 情報:

10

(i) 配列の 特色:

- (A) 長さ: 358塩 基 対
- (B) 型: 核 酸
- (C) 鎖 の 数: 一 本 鎖
- (D) トポロジー: 直 鎖 状

(ii) 配列の 種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル 配列: No

(iv) アンチセンス: No

(ix) 配列の 特徴:

- (A) 特徴を表す記号: misc feature
- (B) 存在位置: 1
- (D) 他 の 情報: / 注 = "pMDR991挿入"

20

(xi) 配列: SEQ ID NO:23:

GTGAGCTGC AGAGTCTGG ACCTGAGTG AAAAGGCTG GGGCTCAGT GAGGCTGCT 60
 TCGAGGCTT CAGGATAC ATTACAGC TTGTTTATC ACTGGTTC GAGGCGCT 120
 GGGAGGCT TTGAGTCT TGTATATT ATCTTACA ATGATGTC TGATAGAT 180
 GAGAGTCA AAGCAGGC CAGGAGT TTGAGCTT CAGCAGAC AGCTATCT 240
 GAGTACA GCGAGGTC TGAGAGT GGGCTTAT ACCTGCAAG AGAGAGAT 300
 AACTAGCA GGGGGGCT GTTCTTAC TGGGGGAG GGAAGCTT CAGGCT 358

(2) SEQ ID NO:24の 情報:

30

(i) 配列の 特色:

- (A) 長さ: 56塩 基 対
- (B) 型: 核 酸
- (C) 鎖 の 数: 一 本 鎖
- (D) トポロジー: 直 鎖 状

(ii) 配列の 種類: cDNA

【 0 3 6 2】

【化 2 7】

- (iii)ハイボセティカル配列: No
 (iv)アンチセンス: No
 (ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号: misc feature
 (B)存在位置: 1
 (D)他の情報: /注="312-62オリゴヌクレオチド"
 (xi)配列: SEQ ID NO:24:

GTACCCGCG ATATGGTAT GAGCCAGTTC CCAGACCTCC TAGCTGGTTC ACTTGCACG 60
 AGGGCT 66

10

(2)SEQ ID NO:25の情報:

- (i)配列の特色:
 (A)長さ: 62塩基対
 (B)型: 核酸
 (C)鎖の数: 一本鎖
 (D)トポロジー: 直鎖状
 (ii)配列の種類: cDNA
 (iii)ハイボセティカル配列: No
 (iv)アンチセンス: No
 (ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号: misc feature
 (B)存在位置: 1
 (D)他の情報: /注="312-63オリゴヌクレオチド"
 (xi)配列: SEQ ID NO:25:

20

ACTATAAAT CCAGTCCG TCCTCGGCTT TTATATAGTA CCATCCAAA GAGCTACTG 60
 GC 62

(2)SEQ ID NO:26の情報:

- (i)配列の特色:
 (A)長さ: 69塩基対
 (B)型: 核酸
 (C)鎖の数: 一本鎖
 (D)トポロジー: 直鎖状
 (ii)配列の種類: cDNA
 (iii)ハイボセティカル配列: No

30

【 0 3 6 3 】

【化 2 8】

(iv) アンチセンス: No

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: misc feature

(B) 存在位置: 1

(D) 他の情報: / 注 = "312-64オリゴヌクレオチド"

(xi) 配列: SEQ ID NO:26:

CTGGTACGAG CAGAAACAG GGCAGGCTCC TAAAGGCGG ATTACGCGG CATCCACTAG 60
GGATTCGG 69

10

(2) SEQ ID NO:27の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 72塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: No

(iv) アンチセンス: No

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: misc feature

(B) 存在位置: 1

(D) 他の情報: / 注 = "312-65オリゴヌクレオチド"

(xi) 配列: SEQ ID NO:27:

20

GGTCCGCGAT GCGTTCGAG GCGAGGATC TGGGACGAT TTGACGCTA CCGACAGAG 60
TTTCCAGCT CA 72

(2) SEQ ID NO:28の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 69塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: No

(iv) アンチセンス: No

30

【0364】

【化 2 9】

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: /注 = "312-66オリゴヌクレオチド"

(xi)配列: SEQ ID NO:28:

AGACGCGCA GGTGTTTACT GTCAGCAATA TTATAGCAAT CGGAGCTTGG GTCAGGCGAC 60

CAAGCGGCA 69

(2)SEQ ID NO:29の情報:

10

(i)配列の特色:

(A)長さ: 67塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: /注 = "312-67オリゴヌクレオチド"

20

(xi)配列: SEQ ID NO:29:

GATCTCCAGC TTGGTCCGCT GACCGAAGCT CGCATAGCTA TATATATGCT GACAGTATA 60

AATCTGC 67

(2)SEQ ID NO:30の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 71塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

30

【 0 3 6 5 】

【化 3 0】

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: /注="312-68オリゴヌクレオチド"

(xi)配列: SEQ ID NO:30:

AGGTCCTCAG CAGTCAAACT GCTGATGGTG AGAGTGAAT CAGTGGGAGA TGGACGGCTT 60
 GAGAGCGCT C 71

(2)SEQ ID NO:31の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 69塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: /注="312-69オリゴヌクレオチド"

(xi)配列: SEQ ID NO:31:

AGGTAAGGCA GATTGGGAG TGGATGCGCA GTAAATCAGC AGTTTAGGAG GATGGGCTG 60
 TTTCCTGCTG 69

(2)SEQ ID NO:32の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 63塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

【 0 3 6 6 】

【化 3 1】

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: 注="312-70オリゴヌクレオチド"

(xi)配列: SEQ ID NO:32:

GTACAGGCGC AAGTAGTCTT TTGATTTGTT ACTATATATAA AGGCTTCCAC TCGACATGCA 60
GTT 63

(2)SEQ ID NO:33の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 68塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: 注="312-71オリゴヌクレオチド"

(xi)配列: SEQ ID NO:33:

TATAGTAGCG CACCTCTCAA GAGACACAGC TAGGAGAGCT GGAGATGGG TCATTACCAT 60
ATCCAGGG 68

(2)SEQ ID NO:34の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 344塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: 注="pMDR1003挿入"

【 0 3 6 7 】

【化 3 2】

(xi) 配列: SEQ ID NO:34:

```

GGTACCCCTG GATATGCTAA TGAACACATC TCCACACTCC CTACCTGCTT CACTTGGAGA    60
GAGGCTACT ATAACTGCA AGTCCAGTGG GAGCCTTTTA TATAGTCCA ATCAAAAGAA    120
CTACTTGGCC TGGTACACAG AGAACCAGG GCGCCTCTCT AAACCTGCTA TTATCTGGCC    180
ATCCACTAGG GATCTGGGG TCCCTGATCG CTCTCTAGGC AGTCCATCTG GGACAGATT    240
CACTCTACC ATCAGCAGTT TCCAGGCTGA AGAGCTGGCA GCTTATCTACT GTACGCTATA    300
TTTATGCTCT CCGAGCTTCC GTGAGGGGAC CAGCTGGGAG ATCT                344

```

10

(2) SEQ ID NO:35の 情報:

(i) 配列の 特色:

- (A)長さ: 51塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: No

(iv) アンチセンス: No

(ix) 配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc feature
- (B)存在位置: 1
- (D)他の 情報: / 注 = "312-45オリゴヌクレオチド"

20

(xi) 配列: SEQ ID NO:35:

```

GTACGGGGCC GCGACCTTGG ATGGGACCTG GAGGCTCTTC TCCCTCTCTG C                51

```

(2) SEQ ID NO:36の 情報:

(i) 配列の 特色:

- (A)長さ: 44塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: No

(iv) アンチセンス: No

30

【 0 3 6 8】

【化 3 3】

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: 注 = "312-50オリゴヌクレオチド"

(xi)配列: SEQ ID NO:36:

GATCCAGCT TAGGATTCAC CAGGAGAC GGTGAGGTC GAGG

44

(2)SEQ ID NO:37の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 144塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: / 注 = "pLCB6挿入"

(xi)配列: SEQ ID NO:37:

GTACGGGGC CCGACATGG AAGGAGGTC GAGGATGTC TCGTGGTGG CAGTACGAC

60

AGGTGGGAC TCGAGGTTC AAGGAGGTC TAGGATTCAC CAGGAGGTC AAGGATGTC

120

CAGGAGGTC CAGGATGTC ATCC

144

(2)SEQ ID NO:38の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 461塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

10

20

30

【 0 3 6 9】

【化 3 4】

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: / 注 = "pLCB7挿入"

(xi)配列: SEQ ID NO:38

GTAAGGAGGC GGCAGATGG ACTGGAGCAG GAGGGTCATC TCGTGGCAGC CAGTAGCACC	60
AGGAGGACAC TCCAGGTC AACAGCAGCA GTCGGAGCT GAAGTGTAA AGGAGGAGC	120
TTCAGTAAAG ATGTCAGCA AGGTCAGC ATACACATC ACTAGCATG TTATACACG	180
GATAGGAGC AGGAGGAGC AGGAGGAGC GAGGAGCA TATATATATC CTTACATCA	240
TGCTACTGAC TACATGAGA AGTCAAGG CAGGAGCA GTCAGTACG ACAAATGTC	300
CAGCAGGC TACATGAGC TACAGAGCT GAGTACAG GATCAGGAG TCAATATG	360
TGCTAGAGC AGGATGACT AGGAGAGG GGGAGGTT GCTACAGG GCAAGGAGC	420
CAGGAGAC GTCATGAG GTCAGTCA AGGAGGAT C	461

10

(2)SEQ ID NO:39の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 461塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

20

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: / 注 = "pMDR1001挿入"

(xi)配列: SEQ ID NO:39:

GTAAGGAGGC GGCAGATGG ACTGGAGCAG GAGGGTCATC TCGTGGCAGC CAGTAGCACC	60
AGGAGGACAC TCCAGGTC AACAGCAGCA GTCGGAGCT GAAGTGTAA AGGAGGAGC	120
TTCAGTAAAG GTCATGAGA AGGTCAGC ATACACATC ACTAGCATG TTATACACG	180
GATAGGAGC GGGAGGAGC AGGAGGAGC GAGGAGCA TATATATATC CTTACATCA	240
TGCTACTGAC TACATGAGA AGTCAAGG CAGGAGCA GTCAGTACG AGGATGACT	300
CAGCAGGC TACATGAGC TACAGAGCT GAGTACAG GATCAGGAG TCAATATG	360

30

【 0 3 7 0 】

【化 3 5】

TCGACAGAG AAGGTAAC TACGGAAGG GCGGCGGTTT GCTTACTGG GCGAAGGAC 420
CGGCGACG GCTGCTGAG GTCAGTCTA AGGTCGATC C 461

(2) SEQ ID NO:40 の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 7892塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: No

(iv) アンチセンス: No

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: misc feature

(B) 存在位置: 1

(D) 他の情報: / 注 = "pSAB132"

(xi) 配列: SEQ ID NO:40:

GAATGAGC TTGATGCTT GAGGTCGTT ACCTACCTA CGGTAAATG CCGCGTGGC 60
TGACCGGCA AGACCGGCG CCGATGAGG TCAATATGA GGTATGTTCC CATAGTAACT 120
CGATAGGGA CTTTCCGTTG AGGTCAATG GTCGATATT TAGGTAAAC TCGGCTATG 180
CGATACATC AAGGTATCA TTGCTCAAT AGCGGCTCA TTGAGTCAA TCGGCTAAA 240
TGGCGGCTT GCGATATGC CGATACATG ACCATATGG ACCTTCTAC TTGCGATAC 300
ATCTATGAT TAGTATGCG TATTAACAT GTCATCGGT TTGCGAGTA CATCATGGG 360
CGTGATAGC GGTTCATAC AGGGGCTTT CCAATGCTC ACCCATGCA GTTCAATGG 420
AGTTGTTT GGCACAAA TCAAGGAC TTTCAAAAT GTGTACAA CCGCGGCA 480
TTGAGGAAA TGGCGGTAG GGTGTAGG TGGAGTCT ATATAGGAG AGCTGTTTA 540
GTGACGTC AGATCGGCG GAGCGGCT CCACTGCT TTGACTCA TAGAGATC 600
CGGATGAT CAGCGCTCG GACTATAG CATCGGTAC TCGAGTACT GAAAACTAG 660
AAATTAAT GGTATGTTA GCTTTTGT CTTTATTC AGTCTGGA TCGGTGGTG 720
GTCAATCA AAGATGCT GTTATGTA TGTGCTTT ACCTATGAG CTGTAGGA 780
GTGTATTC TCTTAAAA GCTCGGAT TTATCGGCG GCGGCTCA CCGTACGCG 840

【 0 3 7 1 】

【化 3 6】

TCGCGCGCC GCACTGCGC CCGAGGGTC CGCAGCGCC CAGCTGCGC CCGCTTCGA	900
TATTTATTC GAGCGCAGC ATCGCGCGA TAAAGACAG CAGCGACG CTTGGGGTCT	960
CGTGGGGT TACGGCGCC GTCGACGTC CCGTGGGTC TCTGCTGCG CAGCGCGCG	1020
GTCGCGCG TACGCTGCG TGTCTGCG CCGCGCAG GCGCGCGA CCGCTCTCA	1080
CGCGCGGAC TCGTGGCG GTCAGCGCT AAGGAGCAG GTCACGTC AGCAGCGCT	1140
TATTTGCG AGAGTGGCG GCGCTGCG AGGGCGCGT GCACTGCGC GCGCGCGCG	1200
CACAGTGG CCGCTGCGT GCGCGAGT TCTGGGCT CCGAGCGCG TCGCTGCT	1260
CGGAGCGT CCGCGACG CAGCGCGT TCTGCTGCG CTTGGGTC CCGAGTGG	1320
GTCGCGCG CCGCGCGC CCGTGGGTC AGTGGAGCG CCGCGGAG CCGTGGCGG	1380
GCTGCGCG GCGCGCGC CCGTGGGTC TCGCGCGT CCGCTCTCA GCGCTGCT	1440
CGTGGCGG CCGCTGCT CCGCGGTC CCGCTGCG AGCGCGTC TCGCGCGC	1500
GCTGCGG GCGCGAGG TCTGCGCG CCGCTGCT CCGCGGTC CCGCGCGT	1560
CCTGCGCT CCGCGAGG TCGCGGTC CCGCTGCT CCGCGGTC TCGCGGCG	1620
CGCGCGCG AGCGCGCT CAGCGAGG CCGCGGTC GAGCTGCG TCGAGAGG	1680
AGTGGGTC TCGGAGAG GCGCGGTC CCGCGCGC GCGCGGTC TCTGCTGCG	1740
GATGAGGTC CAGTGGCG CCGCGAGG AAGGAGTC TACAGCGG CAGCGAGG	1800
TCTGCGCG CCGCGGCG CCGCGAGG GCGCGCGA CAGCGGTC GAGCGGTC	1860
TCTGCGCG CCGCGGTC AGCGAGG TCGCGCGG AGCGAGG GCGCGCGC	1920
GCTGCGCT GCTGCGCT CCGCGCGC TACAGCGCT CCGCGGTC AGCGAGG	1980
GCGCGCGC GCGCGGTC AGCTGAGG TCGCGCGG CCGCGGAG GCACTGCGC	2040
ACTGCGCG CCGCGCGC CCGCGGTC CCGCGGTC TCGCGGTC ATTCTGCG	2100
CGCGAGG GCTGAGAG GCGCGGTC AGCGAGG CCGCGGTC CCGCGCGG	2160
GCGCGGTC CCGCGGTC CCGCGAGG GCGCGGTC AAGCGCGA GAGCGGTC	2220
AGCGAGG GCTGCGG GCTGAGG GAGCGGTC CCGCGGTC GCGCGGTC	2280
TCGCGCGC AAAAGTGA CAGCGGTC GCGCGCGG CAGCGCGT CAGTGGCG	2340
AGTGGAG TCGCGGTC TCTGCGG GAGCGGTC TCTGCGG TCGCGGTC	2400
GCGCGGTC CCGCGGTC TCTGCGG TCGCGGTC ATAAATTT TCGCGGTC	2460
ATGCGGTC CCGCGGTC TCTGCGG TCGCGGTC ATCGCGCT AGCGGTC	2520

10

20

30

【 0 3 7 2 】

【化 3 7】

TGAATGGGAG CAGTGGGGA ATGCGTTTAA TGAGGAAAC CIGTTTTGCT CAGAGGANT 2580
 GGCATCTAGT GATGATGAGG CACCTGGGA CTTCTACAT TCTACTGCTC CAAAAAGAA 2640
 GAGAAGGTA GAGACGCGA AGGACCTTCC TTGAGATG CTAAGTTTT TGAGTCATCC 2700
 TGTGTTTGT AATGAGACTC TTGCTTGCTT TCGTATTTC ACCACAAAGG AAAAAGCTGC 2760
 ACTGCTATAC AAGAAATTA TGGAAAAATA TTCTGTACCC TTATATAGTA GGCATACAG 2820
 TTTATATCAT AACATACGT TTTTCTTAC TCCACACAGG CATAGAGTGT CTTCTATTAA 2880
 TACTATGCT CAAAAATGT GTACCTTAG CTTTATATT TGTAAAGGG TTATATAGGA 2940
 AATTTTGTG TATAGTGGT TGACTAGCA TCTATATCAG CCAATACACA TTGTAGAGG 3000
 TTTTACTGCT TTTAAAAAC CTTCCACAC TCCCGCTGA CCGTAACAT AAATGATG 3060
 CATTTTGTG TGTACTGCT TTATATGAG CTTATATG TTACAAATA AGCAATAGCA 3120
 TCACAAAT CACAAATAA GCTTTTTT CACGCTATC TACTTGTGT TTGTCCAAAC 3180
 TCACTATGT ATCTATCAT GTCTGATCC TCTAGGCGGG AGCATGCTG GCGGCTTCA 3240
 CCGCGCTAC AGTGGGCT GTCTGGCT ATATGCGTA CATCACTGT GCGGAGATC 3300
 GCGCTGCA CTTGGGCT ATGAGCTT GTTGGGCT GGGTGGTG GAGGCGGG 3360
 TGGGGGGG AGTGGGCT GGCATCTCT TCGTGGCT ATCTGTGAG GCGGCTGCT 3420
 TCAAGGCT CACTATCTA CTGGCTGT TCTATATCA GCGTGGCT AAGGAGAGC 3480
 GTGAGCTC CATCTATAA ATAAATTA ATAAATTA AAAAAAGG GCGTGGCT 3540
 AAGCTGCA GCTGTATGT TTCTGCTGT GACTTTGT GCGTGTAT CACTATCT 3600
 GGCACACG AGTGGAGG ACTTCCAG TATTTTAAA TTACCTTAG AAGGGCTT 3660
 GTGAAAGC CTTACCAAT TTCTTTTG TTATGAGC TATTTACAG GAGGACAG 3720
 AGGTGGTG GCGGCTAT GATGGATG TCTCTCAAG TACAGAGT TAGGTTAT 3780
 GAGGACAG AGGAGCTCC TGGGATCC GACTATTA GATATTTA TGAGTTGA 3840
 CAAACACA CTAATATCA GTGAAAAA TCTTTTAT GTGAAATG TGAGTTAT 3900
 GCTTTATG TACCTATAT AAGCTGAT AATAGATA ACACACAA TTGCTATAT 3960
 TTATGTTT AGGTGAGG GAGGTGAG GAGTTTTT AAGGAGTA AAACCTAT 4020
 AATGGGTA TGGGATTA TGATCTAG TCAAGGCT ATATCTAAA TATCTATAT 4080
 TACCTTTT ACAAATTA AAGCTAAG TACAAATTT TTGAGTAG TTTATATAG 4140
 CACTATCT ATGCTGCT GAGTATGA AAAACATAT GTATGATA TACCTTAT 4200

10

20

30

【 0 3 7 3 】

【化 3 8】

GCGTACATAT AAGGCTACA GATATTTTT GGTATTTTT CTGTATAGC AGTCAGCTT 4260
 TTTCCTTTCT GGTGTAATA GCAAGGAGC CAGAGCTCT ATTACATAAC ACAGCTGAC 4320
 TCATAAACT TAGCAATCT GAAGGAAGT CCGTGGGCT TTCTACCTT CTTCTCTTT 4380
 TTGAGGAGT AGAATGTGA GAGTCAGCG TAGGCTATC ATTACATAT GGTATTTCT 4440
 CAGAGAAA CAGGTTTCC TCTTAAGG CATTCCACA CCGCTCCAT TCATCAGTC 4500
 CATGGTTGG ATCTTAAT ACACAACAA TTGATTCAG TAGTTTACA CATTATCAC 4560
 TTAAAAAT TATATTAC TTAGGCTT AATCTCTGT AGGTAGTTG TCCAATTAT 4620
 TCACACACA GAAGTAGGT TCTTCACAA AGATCTAAG CAGCAAAAG TCCATGGTC 4680
 TTATAAAT GGTAGCTT AGGAGGAG CAGGAACT GAAAGATCT TCTGTATG 4740
 CTTCTCTC GTAGCTTCA AACTATCT TGTGCTTT TTCTCTGG AACTCAGCA 4800
 GCACTCTG GTATCTGG AGAGTTAT ATTCTCCAA ATCAATTTT GGGAAAAG 4860
 TGTACCTT AATCTCTG ATGATCTG TCACAAGAG TCTGAGTGG CCGCTGCT 4920
 TCTGCTCT CCGTAAACA GAATCTCT CCACTTCA AACTATCT ACTTACTG 4980
 CCAATCTG TTCTTATA AGCTTAAG CACTTCAA ACTTCTGA AGAAATGAG 5040
 CTTCTCTG TGTCTCTG AGCTCTCT TGAAGCTT ATTATCTG TCTTTAAG 5100
 GTCTCTCT CTGAGATG GAGACAGG TTTCTCTC CATTATCT AGATCTCT 5160
 TACTTCTC TGAAGGCT GGGCTATC TTGGAATG CTGAGCTG TTCTGAGG 5220
 GAGGCTGG TAGCTCTG TTCTCTCA TCCATATT TTGAGAGG CCGAGCTG 5280
 AGTCACTG TGAAGCTG ATGAGCTG GATTAATC CTAAGCTT TCACTTGG 5340
 ATTCTCTA AGTTCTGG GAAATCTG CCGTCTCT TCCCCCTC CAGCTTTT 5400
 GCAAGCTT AGGCTTCAA AAGGCTCT TCACTCTC TGAATCTT CAGAGCTCA 5460
 GGGGCTCT GCTCTCTT AATAAAAA AATTATCT CCACTCTG GAGATCTG 5520
 GCACTCTG GAGTCTGG GGGCTCTG CCGTCTGG GGGGCTTA TGTCTCTA 5580
 CTAATCTA TGTCTCTG CCGTCTGG TCACTCTT GAAATCTT GACATCTA 5640
 GCTCTCTG AGCTCTAG CTTCTCTA AGGCTCTG GAGCTCTC AAGGCTCT 5700
 GGGGCTCA GGGGCTCT GGGGCTCT GGGGCTCT ATGAGCTT CAGTCTCT 5760
 TAGGCTCT TATCTCTT TACTCTCT GATCTCTT AGATCTCT GAGCTCTC 5820
 CATTCTCT GTAAATCT GATCTCTC GTAGCTCA AATCTCTT CAGCTCTT 5880

10

20

30

【 0 3 7 4 】

【化 3 9】

.TGGGCTTCT GGTTCACGA CTGCTGAGC TGGTGTTC GGGGGGGG AGGGGATCA 5940
 GGTTCACAA AGGGGATAT AGGTGTTC ACAGATCAG GGTATAGC AGGAAGAC 6000
 ATGTGACAA AAGGACGA AAAGGACAG AACGGTAAA AGGGGGGT GTGGGGTT 6060
 TTGATAGC TGGGGGGG TGAGAGCT CACAAAATC GAGGTACAG TCGAGGTG 6120
 GGAAGGGA CAGGATATA AAGTACAG GGTGTGGG CTGAGGCT CTTGGTGC 6180
 TGTGTGTC GAGGTGCT GGTATAGG TACGTGGG GTTGTGGG TTGGGAGC 6240
 GGGGGGTT CTATAGCT AGGTGTAG TGTGTAGT GGTGTAGT GTTGTGCT 6300
 AAGGGGCT GTGTGACA ACGGGGTT CAGGTGAC GTTGTGCT ATGGGTAC 6360
 TGTGTGTC AGTGAAGC GGTAGACG GATATGCT CAGGTGCT AGGATGCT 6420
 AAGGTATA GGTAGGAG GTTGTAGC GTTGTAGC AGTGTGAA GTTGTGCT 6480
 AAGTGGCT AAGTAGAG GATATGTT GGTATGCT GTTGTGAA GGTATGCT 6540
 TTGGGAAA GGTGTGAG GTTGTGCT GGTATGAA CAGGTGCT TGGGTGCT 6600
 TTTGTGTT GGTAGGCA GTTGTGCT AAAAAAG GTTGTGAA AGTGTGCT 6660
 ATTTGTGA GGGGTGCA GGTGTGCT AAGTATCT CAGTATAG GTTGTGCT 6720
 ATGTATAT CAAAGGAT CTATAGAG ATTTGTGA ATTTATAG AGTGTGAA 6780
 TGTGTGAA GTTGTGCA GTTGTGCT TGTGTGCT AAGTGTCT AATGTGCT 6840
 GGTATGCT CAGGTGCT TGTGTGCT TGTGTGCT TGTGTGCT CAGGTGCT 6900
 TGTATGTA GGTATGCA GGTATGCA TGTGTGCA GTTGTGCT GATATGCA 6960
 GGTATGCT CAGGTGCT AGTGTGCA GGTATGCT AAGTGTGCT AAGTGTGCT 7020
 GGTATGCT GTTGTGCT TGTGTGCT TGTGTGCT TGTGTGCT TGTGTGCT 7080
 GGTATGCA GTTGTGCT AGTGTGCT TGTGTGCT TGTGTGCT TGTGTGCT 7140
 ATGTGTGT CAGGTGCT GTTGTGCT GTTGTGCT GTTGTGCT CAGGTGCT 7200
 AAGTGTGA GGTATGCT CAGGTGCT AAAAAAG TGTGTGCT GGTGTGCT 7260
 ATGTGTGA GGTATGCT GGTGTGCT TGTGTGCT TGTGTGCT AAGTGTGCT 7320
 AATGTGTA GTTGTGCT AAGTGTGA TGTGTGCT TGTGTGCT GTTGTGCT 7380
 AAGTGTCT CAGTATAG TGTGTGCT CAGTGTCT GTTGTGCT GTTGTGCT 7440
 GATATGCT GGTATGCT CAGTGTGA AAGTGTGA TGTGTGCT AAGTGTGCT 7500
 GGTGTGCT TGTGTGCT TGTGTGCT TGTGTGCT GTTGTGCT AAGTGTGCT 7560

10

20

30

【 0 3 7 5 】

【化 4 0】

GCGCCCACT GATCTTCAGC ATGCTTACT TTCAACAGG TTTCTGGGAG AGCAAAAACA 7620
 GGAAGGAAA ATGGGCGAAA AAAGGAGTA AGGGCTACAC GGAATGTTG AATATCATA 7680
 GCTCTCTTT TTCAATATA TTCAAGGCT TATCAGGCT ATGCTCTCT GAGCGATAC 7740
 ATATTGCAAT GATTTCGAA AATTAACAA ATAGGGGCTC GCGGCACAT TCCCGAAAA 7800
 GGGCAACAG AGGCTAAGA AACCTTTT ATCATGACAT TAACCTATA AATAGGCTT 7860
 ATCAGAGGC GCTTCTGCT TCAGATTC CG 7892

(2) SEQ ID NO:41の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 33塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc:feature
- (B)存在位置: 1
- (D)他の情報: / 注 = "370-38 PCRプライマー"

(xi)配列: SEQ ID NO:41:

TCAGCTTCT GGGCGAGGC AGGCTAC TTG

33

(2) SEQ ID NO:42の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 30塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc:feature
- (B)存在位置: 1
- (D)他の情報: / 注 = "370-40 PCR挿入"

【0376】

10

20

30

【化 4 1】

(xi)配列: SEQ ID NO:42:

AGTGTGGGGA CAGTGGGACC GCGTCTGGCT

30

(2)SEQ ID NO:43の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 2029塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

10

(ii)配列の種類: ゲノムDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: /注="pBAG101挿入"

(xi)配列: SEQ ID NO:43:

TGCATTTTCT GGGCAGGAC AGGCTTGACC TTGGCTGGGG GATGGGAGGG GCGTATGGTG 60
 AGGAGGTTGG GCGCAGGAG GTGCTACACC AATGGGATGG AGGGACACA GTGGACCTTG 120
 CATTGACCTT GCGGATAGA CAGCAAGGGA GGGGCTTGTT GCGCTGGGGC CAGCTCTGTT 180
 CCGACAGGCG GTTCATATGG CACTACCTCT CTGTGACCTT CCAACAGGGC CCAATGGTTC 240
 TTGGGCTTGG GCGCTGCTTC CAGGAGGACC TGTGATAGA CAGGGGCTTT GGGCTGGCTG 300
 GTTATGACTT ACTTGGGGA ACGGTGAGG GTGTGTGGA ACTATGGGTC CCGTACCGAC 360
 GGGGTGGACA CCGTGGGGC TGTCTATAG TGTTCAGGAC TGTACTGCTT CAGCAGGTGG 420
 GTTACGGTTC CATTGAGGAG CTGTGGCAG AAGACTACA CTTGCTAGTT AGATCACAG 480
 CCGAGTACA CCAAGTTGA CAGCAGCTT GGTGAGGCG CAGCAGGG AGGGAGGGTG 540
 TTGGCTGGA GCGAGGCTTA GCGCTGCTG CTTGAGGAC CCGGCTGGTG CAGGGGAGC 600
 CAGGGGAGC AAGGATGCG CATTGCTCT CATTAGGCG AGGCTTGGA CCAAGGACT 660
 CATTGTCAG GAGAGGTTT TTGGCTTTT TGTACAGGC TCGGGCACC ACAGGCTGGA 720
 TCGGGTACC CAGGGGCTG GCGATACAG GCGGTGCTG GCGTACACC TGTATAGAC 780
 CATTGCTGG AGTACCTTC CCGTACCTA AGGGACCTT AAGGGGAA CTTTCTACTC 840

20

30

【 0 3 7 7 】

【化 4 2】

CCCTAGCTCA GACACCTTCT CTTCTTCCAG ATCTGAGTAA CTCTCATCTT TCTCTCTGCA	900
GAGTCCAAAT ATGTTTCCCT ATGCTCATCA TCTCTAGGTA AGCTAACCA GCTCTGCTCC	960
TTCTAGTCAA GCTGCTACAG GTCTCTTACA GTAGCTTCCA TCTAGGTA GCTCTTCTCC	1020
GGGTCTCTAC GCTCTCATCT CCATCTCTTC CTCTGCTCTT GAGTCTCTCT GCTGCTCTCT	1080
AGTCTCTCTT TTTCTCTTAA AATCTAGGA CACTCTCTCT ATCTCTCTGA CCTCTGAGGT	1140
CAGTCTCTCT GTCTCTCTCT TCTCTCTGA AGCTCTCTCT GTCTCTCTCA ACTCTGAGGT	1200
GGTCTCTCTT GAGTCTCTCA ATCTCTCTCT AAGCTCTCTT GAGTCTCTCT TCTCTCTCT	1260
GTCTCTCTCT GTCTCTCTCT TCTCTCTCT GCTCTCTCT TCTCTCTCT GCTCTCTCT	1320
CAGTCTCTCT GTCTCTCTCA AAGCTCTCTT GTCTCTCTCT GAGTCTCTCT TCTCTCTCT	1380
CAGTCTCTCT AAGCTCTCTT TCTCTCTCT AAGCTCTCTT AAGCTCTCTT GCTCTCTCT	1440
GTCTCTCTCT AAGCTCTCTT GTCTCTCTCT GTCTCTCTCT AAGCTCTCTT GCTCTCTCT	1500
AAGTCTCTCT GTCTCTCTCT TCTCTCTCT AAGTCTCTCT GAGTCTCTCT AAGTCTCTCT	1560
GCTCTCTCTT AAGTCTCTCT GCTCTCTCT TCTCTCTCT GCTCTCTCT AAGTCTCTCT	1620
GCTCTCTCTT GCTCTCTCT AAGTCTCTCT TCTCTCTCT GCTCTCTCT TCTCTCTCT	1680
AAGTCTCTCT AAGTCTCTCT AAGTCTCTCT GCTCTCTCT GCTCTCTCT TCTCTCTCT	1740
TCTCTCTCT GCTCTCTCT AAGTCTCTCT GCTCTCTCT GCTCTCTCT TCTCTCTCT	1800
AAGTCTCTCT AAGTCTCTCT AAGTCTCTCT GCTCTCTCT GCTCTCTCT GCTCTCTCT	1860
TCTCTCTCT GCTCTCTCT AAGTCTCTCT GCTCTCTCT AAGTCTCTCT AAGTCTCTCT	1920
AAGTCTCTCT GCTCTCTCT GCTCTCTCT GTCTCTCTCT GCTCTCTCT GCTCTCTCT	1980
GCTCTCTCT GCTCTCTCT GCTCTCTCT TCTCTCTCT GCTCTCTCT	2029

10

20

(2) SEQ ID NO:44の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 2560塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: ゲノムDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: mat peptide

(B)存在位置: 連結 (69..435, 712..1005, 1396..1431,
1550..1879, 1977..2296)

30

【0378】

【化 4 3】

(ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号:intron
 (B)存在位置:436..711

(ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号:intron
 (B)存在位置:1006..1395

(ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号:intron
 (B)存在位置:1432..1549

(ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号:intron
 (B)存在位置:1880..1976

(ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号:misc feature
 (B)存在位置:1
 (D)他の情報:／注="pMDR1002挿入:pre-5A8ヒト型L鎖"

(ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号:exon
 (B)存在位置:12..435

(ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号:exon
 (B)存在位置:712..1005

(ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号:exon
 (B)存在位置:1396..1431

(ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号:exon
 (B)存在位置:1550..1879

(ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号:exon
 (B)存在位置:1977..2296

(ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号:CDS
 (B)存在位置:連結(12..435, 712..1005, 1396..1431, 1550..1879, 1977..2296)

10

20

30

【 0 3 7 9 】

【化 4 4】

(xi)配列: SEQ ID NO:44:

GCGGGGCGAC C AIG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TGC TTG CIG GCT GGA Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val -19 -15 -10	50
GCA CCA GGT GCC CAC TCC CAG GTC CAA CIG CAG GAG TCT GGA GCT GAA Ala Pro Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu -5 1 5 10	98
GIG AAA AAG CCT GGG GCT TCA GIG AAG GIG TCC TGC AAG GCT TCT GGA Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly 15 20 25	146
TAC ACA TTC ACT AGC TAT GAT ATA CAC TGG GIG AGG CAG GCG CCT GGG Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly 30 35 40	194
CAG GCC CTT GAG TGG AIT GGA TAT AIT AAT CCT TAC AAT GAT GGT ACT Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr 45 50 55	242
GAC TAC GAT GAG AAG TTC AAA GGC AAG GCC ACA GIG ACT TTA GAC CCA Asp Tyr Asp Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Val Thr Leu Asp Pro 60 65 70	290
TCC ACC AAC ACA GGC TAC AIG GAG CAC AGC AGC CIG AGG TCT GAG GAC Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp 75 80 85 90	338
ACT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA GAG AAG GAT AAC TAC GCG ACG GCG Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Lys Asp Asn Tyr Ala Thr Gly 95 100 105	386
GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACC CIG GTC ACC GTC TCC TCA G Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 110 115 120	435
GTCAGTCTCA AGCTGGTAC CGGGGATTC AGATGTCAG CATGCTGAG CACAGATAT	495
CAGCTTTCG GGGCGGGG GGGGACATT TGGGCGGG CAGGAGGG GCTAGCTGA	555
GGAGTGGC GCGAGGAG TGCACACA ATGGGATGA GGGGACAC TGGAGTTGC	615
ATGGACATC GGGATAGAC AAGAGGAG GGGGCTTGC GGGGCGGC CAGCTTTC	675
CCACAGGGG GTCACATGC AACACCTTC TTGGAG CT TCC ACC AAG GGC CCA Ala Ser Thr Lys Gly Pro 125	728
TCC GTC TTC CCC CIG GCG CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr 130 135 140	776

10

20

30

【 0 3 8 0】

【化 4 5】

GCC GGC CUG GGC TGC CUG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTC ACC Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr 145 150 155 160	824
GTC TGC TGG AAC TCA GGC GGC CUG ACC AGC GGC GTC CAC ACC TTC CCG Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 165 170 175	872
GCT GTC CTA CAG TUC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTC GTC ACC Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 180 185 190	920
GTC CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACG AAG ACC TAC ACC TGC AAC GTA GAT Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp 195 200 205	968
CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTC GAC AAG AGA GTT G GTCAGAGGCC His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val 210 215 220	1015
AGCAGCGGA GCGAGGGT CUCGCGAAG CCAGGCTCAG CCCTCCGTC TCGAGCGAC 1075	
CCGCGCTGC AGCGGAGC CAGGCGCA AGCGAGGCC CACGCTGTC CUCAGCGGA 1135	
GGCTCTGAC CAGCGCTC ATGCTCAGG AGAGGCTT CCGCTTTT CCAGAGCT 1195	
CCGCGACA CAGGCTGAT GCGCTAC CCAGGCTGC GCATCAGG CAGGCTGC 1255	
GCTCAGCTT GCGAGGAC MTTGCGGA GCGGCTGC CCGAGCTTA GCGGCTTA 1315	
AAGCGAAC TCTCAGCT CACGCTC AGCGCTTC TCTCAGCA TCTCAGTAC 1375	
TCCCTCTT CUCCTGAG AG TCC AAA TTT GGT CCC CCA TGC CCA TCA Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser 225 230	1424
TGC CCA G GTCAGCAAC CCAGGCTGC CCCTCAGCT CAGGCGGA CAGGCTCT Cys Pro 1481	
AGAGTACT GCATCAGG ACAGGCGCA GCGGCTCT GAGCTTCA CCTCCTTC 1541	
TCTCAG CA CCT GAG TTC CUG GCG CCA CCA TCA GTC TTC CUG TTC CCC Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro 235 240 245	1590
CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC TCC CCG ACC CCT GAG GTC AGC Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr 250 255 260	1638
TGC GTC GTC GTC GAC GTC AGC CAG GAA GAC CCC GAG GTC CAG TTC AAC Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn 265 270 275	1686

10

20

30

【 0 3 8 1 】

【化 4 6】

TGG TAC GIG GAT GGC GIG GAG GIG CAT AAT GGC AAG ACA AAG CIG CCG Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg 280 285 290	1734	
GAG GAG CAG TTC AAC AGC AGC TAC CTT GIG GTC AGC GTC CTC ACC GTC Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val 295 300 305 310	1782	
CIG CAC CAG GAC TGG CIG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TTC Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser 315 320 325	1830	
AAC AAA GGC CTC CCG TTC TTC ATC GAG AAA ACC ATC TTC AAA GGC AAA G Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys 330 335 340	1879	10
GIGGGACCCA GGGGGTGGCA GGGGACACAG GACAGAGGAC AGGTTGGGAC ACGGTCGGC	1939	
CIGGGAGTCA CCGCTGTCAC AACCTCTGTC CTCACAG GG CAG CCC CGA GAG CCA Gly Gln Pro Arg Glu Pro 345	1993	
CAG GIG TAC ACC CIG CCC CCA TTC CAG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln 350 355 360	2041	
GTC AGC CIG ACC TGC CIG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC GGC Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala 365 370 375 380	2089	
GIG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC AGC Val Glu Thr Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr 385 390 395	2137	20
CGT CCC GIG CIG GAC TTC GAC GGC TTC TTC CTC TAC AGC AGG CTA Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu 400 405 410	2185	
ACC GIG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA TGC TTC Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser 415 420 425	2233	
GIG ATG CAT GAG GCT CIG CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TTC Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser 430 435 440	2281	
CIG TCT CIG GGT AAA TGAGTGGCAG GGGGGCAAG CCGGGCTTC CCGGGCTTC Leu Ser Leu Gly Lys 445	2336	30
GGGGTGGGC GAGGATGCTT GGCAGTAC CCGCTACAT ACTTGGAGG CACCTACAT	2396	
GGAAATTAAG CACCTACAT TGGGGGGC CCGGTCAGA CAGGATGT TCTTTACAG	2456	
GGTCAGGCGT ACTGTCAGC CAGAGTACA TTAGGGAGC AGAGGGGTC CACCTGTC	2516	

【 0 3 8 2 】

【化 4 7】

CACACIGGA TTTCAAGGAT OCTCAGTTC CATTGCGG CGGC

2560

(2) SEQ ID NO:45の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 468 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: SEQ ID NO:45:

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 -19 -15 -10 -5

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 1 5 10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 15 20 25

Thr Ser Tyr Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 30 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asp Tyr Asp
 50 55 60

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Val Thr Leu Asp Pro Ser Thr Asn
 65 70 75

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 80 85 90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Lys Asp Asn Tyr Ala Thr Gly Ala Trp Phe
 95 100 105

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 110 115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
 130 135 140

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 160 165 170

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 175 180 185

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
 190 195 200 205

10

20

30

【 0 3 8 3 】

【化 4 8】

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

10

20

30

(2)SEQ ID NO:46の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 77塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

【0384】

【化 4 9】

- (ii)配列の種類: cDNA
- (iii)ハイボセティカル配列: No
- (iv)アンチセンス: No
- (ix)配列の特徴:
 - (A)特徴を表す記号: misc feature
 - (B)存在位置: 1
 - (D)他の情報: / 注 = "360-81オリゴヌクレオチド"
- (xi)配列: SEQ ID NO:46:

10

AGGTTACCAT GGAATGAGG GTGGGGGTC AGGTCGCGG GATGTCGTC CAGTGGGTC
CAGGTCGAG AGGTCAT 60
77

(2)SEQ ID NO:47の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 73塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

20

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc feature
- (B)存在位置: 1

(D)他の情報: / 注 = "360-82オリゴヌクレオチド"

(xi)配列: SEQ ID NO:47:

ATCAACCTG GCACTGGA GATGAGAG CAGAGGTC AGGTCGAG CAGGTCAT
CATGTCATG GTA 60
73

30

(2)SEQ ID NO:48の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 77塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

【0385】

【化50】

- (ii)配列の種類: cDNA
- (iii)ハイボセティカル配列: No
- (iv)アンチセンス: No
- (ix)配列の特徴:
 - (A)特徴を表す記号: misc feature
 - (B)存在位置: 1
 - (D)他の情報: /注 = "pMDR985挿入"
- (xi)配列: SEQ ID NO:48:

10

AGGTAACAT GGACATGAG GTCCCGGTC AGGTCGGAG GATCGGTC CTTGGCTCC 60
 CAGGTCGAG AGGTCAT 77

(2)SEQ ID NO:49の情報:

- (i)配列の特色:
 - (A)長さ: 45塩基対
 - (B)型: 核酸
 - (C)鎖の数: 一本鎖
 - (D)トポロジー: 直鎖状
- (ii)配列の種類: cDNA
- (iii)ハイボセティカル配列: No
- (iv)アンチセンス: No
- (ix)配列の特徴:
 - (A)特徴を表す記号: misc feature
 - (B)存在位置: 1
 - (D)他の情報: /注 = "370-54 PCRプライマー"
- (xi)配列: SEQ ID NO:49:

20

TCGGTGACA AACGTAGIG CACTTCTAA ACTCTGAGG GGTCC 45

(2)SEQ ID NO:50の情報:

- (i)配列の特色:
 - (A)長さ: 30塩基対
 - (B)型: 核酸
 - (C)鎖の数: 一本鎖
 - (D)トポロジー: 直鎖状
- (ii)配列の種類: cDNA
- (iii)ハイボセティカル配列: No

30

【0386】

【化 5 1】

- (iv) アンチセンス: No
 (ix) 配列の特徴:
 (A) 特徴を表す記号: misc feature
 (B) 存在位置: 1
 (D) 他の情報: / 注 = "370-55 PCRプライマー"
 (xi) 配列: SEQ ID NO:50:

TTGGGGGGGG CAGGTTTCIT CTCTTCAAAA

30

10

- (2) SEQ ID NO:51の情報:

- (i) 配列の特色:
 (A) 長さ: 1241塩基対
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (ii) 配列の種類: ゲノムDNA
 (iii) ハイボセティカル配列: No
 (iv) アンチセンス: No
 (ix) 配列の特徴:
 (A) 特徴を表す記号: misc feature
 (B) 存在位置: 1
 (D) 他の情報: / 注 = "pSAB153挿入"
 (xi) 配列: SEQ ID NO:51:

20

TTGTCACAA AGGTAATGCG ACTTTCTAAA CTCTGAGGGG GTGGGATGAC GTGGGATTC 60
 TTGGGCTAAA GCGTTGAGTT TACTGCAAGG TCAGAAAAGC ATGCAAGGCG CTCAGATGG 120
 CTGCAAGAGG CTCAACAAAC ACGATTAGCA ACTTTATTTA GGATGAGGGG GAAGCTAGGA 180
 AGAATCTCAA AACATCAAGA TTCTAATTAC GCGTCTTGCT CTGCTTGCTA TATTTATCTG 240
 GGATAGCAT GCGTTTCTCT GTGCTGCTCT AACCTGCTCT GTGATCTCTC GCAACCAACA 300
 CAGGCAAGGG CAGACCTTTC TTACTTAAC ACGCTGCTCT TTGCTCTCTT CCGTGGTAC 360
 TTGGGCTGCA CCGCTGCTCT TACTCTCTCT GCGCTCTGAT GAGGCTTGA ATTCTGTAAC 420
 TCGCTCTCTT GCTGCTCTCT TGATAACTT CTATCTCTCA GAGGCTAAG TACATCTGAA 480
 GGTGCTAAC GCGCTCTCT CCGCTCTCT CTAGCTCTCT GTGCTCTCT AGGCTCTCTA 540
 GCGCTCTCT TACCTCTCA GCGCTCTCT GCGCTCTCT AACCTCTCT ACGCTCTCTA 600

30

【 0 3 8 7 】

【化 5 2】

CAAGTCTAC GCGTGGGAG TCACCATCA GCGGCGAGC TCGGGGTC CAAGAGCCT 660
 CACAGGGGA GAGGTGAGA GCGAGAGTG CCGGCGAGC CCGGCGAGT CAGAGGAC 720
 CCGGCGAT CCGTGGGCT CCGAGGCTT TTGAGAGG GAGGAGGCT TATGGGGC 780
 CCGAGTCA TCGTCACT CAGGCGGTC CCGGCGAGC CCGGCGAT TCGTCACT 840
 GCGAGGAT GATGATTA AGGAGCTT TCGAGGTC GCGGCGAT TCGTCACT 900
 TATGATTA TATGATTA TCGAGTCA CCGGCGAT CCGGCGAT TCGTCACT 960
 TATGATTA TATGATTA TCGAGTCA CCGGCGAT CCGGCGAT TCGTCACT 1020
 CCGGCGAT TCGAGTCA TCGAGTCA CCGGCGAT TCGAGTCA CCGGCGAT 1080
 CCGGCGAT TCGAGTCA TCGAGTCA TCGAGTCA TCGAGTCA TCGAGTCA 1140
 TCGAGTCA TCGAGTCA TCGAGTCA TCGAGTCA TCGAGTCA TCGAGTCA 1200
 CCGGCGAT TCGAGTCA TCGAGTCA TCGAGTCA TCGAGTCA TCGAGTCA 1241

10

(2) SEQ ID NO:52の 情報:

(i) 配列の 特色:

(A) 長さ: 20塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

20

(ii) 配列の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル配列: No

(iv) アンチセンス: No

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: misc feature

(B) 存在位置: 1

(D) 他の情報: /注="360-83 PCRプライマー"

(xi) 配列: SEQ ID NO:52:

TCAGTCAAA AGGAGTTC

20

30

(2) SEQ ID NO:53の 情報:

(i) 配列の 特色:

(A) 長さ: 1276塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

【 0 3 8 8】

【化 5 3】

- (ii)配列の種類: ゲノム DNA
 (iii)ハイボセティカル配列: No
 (iv)アンチセンス: No
 (ix)配列の特徴:
 (A)特徴を表す記号: misc feature
 (B)存在位置: 1
 (D)他の情報: /注 = "pMDR986挿入"
 (xi)配列: SEQ ID NO:53:

TCATGATCAA AGGTAAGTGC ACTTTCATAA CTCGAGGCG GTGGGATGAC GGGGCAATTC 60
 TTGGCCATAA GATATGAGTT TACTGCAAGG TCAGAAAGC ATGCAAGGC CTCAGATGG 120
 CTCGAAAGAG CTCACACAAA ACAAATTAGA ACTTTATTA GGAATAGGG GAGGCTAGGA 180
 AGAAACTCAA AACATCAGA TTTTAAATAC GATTCTGGT CTTCTGCTA TATTATCTG 240
 GGAATAGCAT GCTGTTTCT GTCCTGCTT AACATGCTT GGTATATTC GCAATCAACA 300
 CAGGCAAGG CAGAGCTTG TTACTTAAAC AACTCTGTT TGGCTCTCT CCGCAGGAC 360
 TGGGCTCA GATCTGCTT TCACTTCTT GCTCTGCTT GAGGCTGTA ATCTGCTAC 420
 TGGCTGCTT GTCCTGCTT TCACTTCTT CTTCTGCTT GAGGCTGTA ATCTGCTAC 480
 GGTGCTAC GCTCTGCTT GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC 540
 GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC 600
 CAAGTCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC 660
 CAGGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC 720
 GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC 780
 GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC 840
 GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC 900
 TATTATCTT TATTATCTT TATTATCTT TATTATCTT TATTATCTT TATTATCTT 960
 GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC 1020
 GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC 1080
 GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC 1140
 TATTATCTT TATTATCTT TATTATCTT TATTATCTT TATTATCTT TATTATCTT 1200
 CAGGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC GGTGCTAC 1260

10

20

30

【 0 3 8 9 】

【化 5 4】

CCCAATGCG GCGGCG

1276

(2) SEQ ID NO:54の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 1701塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: ゲノムDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: /注 = "pMDR1006挿入"

(xi)配列: SEQ ID NO:54:

GCGGCGGCGG TCGACGACG AATCGACGT TACGATGAC ATGAGGGTCC CGGCTACGT	60
CGGGGGGTC CCGCTGCTCT GCGGCGGAG TCGACGAGT GATGCTGTA TCGACGAGT	120
TCGACGATC CCGCTGCTCT CACTGGAGA GAGGGCTACT ATAACTGCA AGTCGATG	180
GAGGCTGTA TATGCTGCA ATAAAGAA CCGCTGCTCT TCGACGAGT AGAACTGAG	240
GCGGCTGCT AAACCTGCA TATGCTGCT ATCGACGAG GATGCTGCT TCGCTGCT	300
CGCTGCTCT AGGGCTGCT GCGACGCTT CACTGCTCT ATCGACGAG TCGAGGCTA	360
AGAGCTGCA GCTGCTGCT GCGACGCTT TATGCTGCT GCGACGCTT GCGAGGCTA	420
CGAGCTGCT ATAAAGCTA AGTCGCTCT CCGACGCTT AGGGCTGCT ATCGAGGCT	480
CGCTGCTCT CCGACGCTT GATGCTGCT CAGGCTGCA AAGCTGCTA AAGCTGCTA	540
ATGGCTGCA AAGCTGCTA ACGACGCTT TTAGCTGCT ATCGAGGCT AGGGCTGCT	600
TAGGCTGCA CCGACGCTT CAGCTGCTA AATGCTGCT TCGCTGCTT TCGCTGCTT	660
ATGGCTGCA ACGCTGCTT TCGCTGCTT TCGCTGCTT TCGCTGCTT TCGCTGCTT	720
CGAGCTGCT AAGCTGCTA CCGCTGCTT TAAACGCTT CCGCTGCTT TCGCTGCTT	780
GCGCTGCTT CCGCTGCTT TCGCTGCTT TCGCTGCTT CCGCTGCTT CCGCTGCTT	840
GCGCTGCTT CCGCTGCTT CCGCTGCTT AATGCTGCT CCGCTGCTT CCGCTGCTT	900

10

20

30

【 0 3 9 0】

【化 5 5】

TGGAGGIGG ATTAGGGGCT CCGATGGGT AACTGGGG AGAGGHTGAC AGAGGGGAC 960
 AGCAGGACA GCGCTTACG CCGACAGGC ACGCTGAGC TGAGGAGG AGACTAGAG 1020
 AATACAAAG TCTAGGGG GCGAGTACG CAGCAGGCT TGAGGAGG CCGTACAGG 1080
 AGCTGACA GCGGAGGAG TGAGGAGG AAGTGGGG ACGTGGCT CAGTGGAG 1140
 CCGAGGGCT CCGTGGCT GCGGAGG CCGTGGCT CCGGAGCT ACGGAGG 1200
 CCGGAGCT CCGTGGCT CCGGAGCT CCGTGGCT CCGGAGCT ACGGAGG 1260
 AAGTGGAG AGAGGAGT AAGTGGAG AAGTGGAG CCGGAGCT TCGTGGCT 1320
 CCGTGGCT AAGTGGCT GCGGAGCT AAGTGGCT TCGTGGCT AAGGAGT 1380
 AAGTGGCT AAGTGGCT CCGGAGCT TCGTGGCT CCGTGGCT TCGTGGCT 1440
 CCGTGGCT TCGTGGCT AAGTGGCT CCGGAGCT AAGTGGCT CCGGAGCT 1500
 CCGGAGCT TCGTGGCT CCGGAGCT CCGGAGCT CCGGAGCT AAGGAGT 1560
 AAGTGGCT AAGGAGCT CCGGAGCT TCGTGGCT TCGTGGCT TCGTGGCT 1620
 AAGTGGCT CCGGAGCT CCGGAGCT AAGTGGCT CCGGAGCT CCGGAGCT 1680
 CCGGAGCT TCGTGGCT C 1701

10

20

(2) SEQ ID NO:55の 情報:

(i) 配列の 特色:

(A) 長さ: 1701塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ゲノムDNA

(iii) ハイボセティカル配列: No

(iv) アンチセンス: No

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: sig peptide

(B) 存在位置: 35..100

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: mat peptide

(B) 存在位置: 連結(101..437, 782..1101)

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: intron

(B) 存在位置: 438..781

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: misc feature

30

【0 3 9 1】

40

【化 5 6】

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: 注 = "pMDR1007挿入:pre-5A8ヒト型
L鎖"

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: exon

(B)存在位置: 35..436

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: exon

(B)存在位置: 782..1101

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: CDS

(B)存在位置: 連結 (35..437, 782..1101)

(xi)配列: SEQ ID NO:55:

G G G G G G G G G T T C A A C C A A T T C T A G C T T A C C A T G G A C A T G A G G G T C C C	52
Met Asp Met Arg Val Pro	
-22 -20	
G C T C A G C T C C G G C C T C T G G C T C C A G G T G C C A G A G G T	100
Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro Gly Ala Arg Gly	
-15 -10 -5	
G A T A T C G T A A T G A C C C A G T C T C C A G A C T C T A G C T G T C A C T T G A	148
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
G A G A G G C T A C T A T A A C T G C A A G T C C A G T G G A G C C T T T A T A T A G T	196
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gly Ser Leu Leu Tyr Ser	
20 25 30	
A C C A A T C A A A G A A C T A C T T T G G C T G G T A C C A G C A G A A A C C A G G C A G	244
Thr Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
35 40 45	
C C T C C T A A A C T G C C G A A T T A C T G G C A T C C A C T A G G G A A T C T G G G T C	292
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val	
50 55 60	
C C T G A T G C C T T C T C A G G C A G T C C T G G G A C A G A T T T C A C T C T C A C C	340
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
65 70 75 80	
A T C A G C A G T T T G C A G C T G A A G A C G T G C A G T T A T T A C T G T C A G C A A	388
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln	
85 90 95	
T A T T A T A G C T A T C G G A C G T T C G G T C A G G G A C C A A G C T G A G A T C A A A C	437
Tyr Tyr Ser Tyr Arg Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105 110	

【 0 3 9 2 】

【化 5 7】

GTAAGTCAC TTTCFAACT CAGAGGGGT CGGATACGT GGCNTTCIT TGGCTAAGC	497
ATTGAGTTA CAGCAGGTC AGAAAGGCT GCAAGGCGT CAGATGGCT GCAAGAGCT	557
CCACAAAC AATTAGAC TTATTAAGG AATAGGGGA AGCTAGGAG AACTCAAA	617
CATCAAGTT TAAATAGC TTCTGGTCT CATTGCTTA ATTCTGGG ATAAGCTGC	677
TGTTTCTGT CAGTCCTAA CAGGCGGT GATTTCGCG AAACAACACA CCAAGGGCA	737
GAATCTGTT ACTTAACAC CATCTGTTT GCTCTTTC TCAG GA ACT GIG GCT	792
Arg Thr Val Ala	115
GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT	840
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser	120 125 130
GGA ACT GGC TCT GGT GIG TGC CIG CIG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG	888
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu	135 140 145
GCC AAA GTA CAG TGG AAG GIG GAT AAC GCC CTC CAA TGG GGT AAC TCC	936
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser	150 155 160
CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC	984
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu	165 170 175 180
AGC AGC ACC CIG AGC CIG AGC AAA GCA GAC TAC CAG AAA CAC AAA GTC	1032
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val	185 190 195
TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CIG AGC TCG CCC GTC ACA AAG	1080
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys	200 205 210
AGC TTC AAC AGG GCA GAG TGT TAGAGGAGA AGGCGGCGA CCGCTCTTC	1131
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	215
AGTCCAGCC TCACCGGTC CCATCTTTC GCGCTGACC CATTTCAC AGGGAGCTA	1191
CGCTATGCG GCGCTCCAG CATATCTTC AACTACGCG CCGCTCTTC CAGGCTTAA	1251
ATTATGTTA TGTTGGGGA GATGATTA ATAAGTTAA TCTTTCGAC TGTTGTTCT	1311
CCTCTCTTC AATTATATA TATTATCTG TGTATACA ACTACTCAAT TTCTCTTAA	1371
AGGACTAAA TATGTATCA TCTAAGGCG CATACCAAT TATAAAAAT ATCTCTCAT	1431
CCTTTTAC CATCTCTCT CAGCAACA GTCTCTCT AAACCTAAA GCTCTCTCT	1491
CACACATCC CCGGCGGCT GATAGGAG AGTCTCTCT TGTCTCTCT CAGCTACCA	1551

10

20

30

【 0 3 9 3 】

【化 5 8】

AGGCGGCGTA GTCGCTTTTA AGGGGACAG GTCGCTAGCT CAGTATTCCT TTAGTCTCAT 1611
 TCCGCGGGA TCAACCAAGG CAGCTTTTC AAAAGAGAA AGCGGGGCT CAGTCTTTC 1671
 AAGGATCTTC ACATCCCAT CCGCGGCGC 1701

(2) SEQ ID NO:56の情報:

(i) 配列の特色:

(A)長さ: 241アミノ酸

(B)型: アミノ酸

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: SEQ ID NO:56:

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 -22 -20 -15 -10
 Leu Pro Gly Ala Arg Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser
 -5 1 5 10
 Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser
 15 20 25
 Gly Ser Leu Leu Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr
 30 35 40
 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser
 45 50 55
 Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 60 65 70
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
 75 80 85 90
 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Arg Thr Phe Gly Arg Gly
 95 100 105
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
 110 115 120
 Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
 125 130 135
 Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
 140 145 150
 Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165 170

【 0 3 9 4】

【化 5 9】

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 175 180 185
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
 190 195 200
 His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser His Asn Arg Gly Glu
 205 210 215
 Cys

(2)SEQ ID NO:57の情報:

10

(i)配列の特色:

(A)長さ: 115塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: /注="pNN03合成ポリリンカー"

20

(xi)配列: SEQ ID NO:57:

GGGGGGGGG TCGACACG ACCATCAAG CTTGGTACC GGGATTCAG ATTTCAGCA
 60
 TCGTCAGAT CAGGATTCG ATTCATGGA TCTCAGATC CCAATCGCG GCGCC
 115

(2)SEQ ID NO:58の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 44塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

30

【0395】

【化 6 0】

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: /注 = "312-46オリゴヌクレオチド"

(xi)配列: SEQ ID NO:58:

TGATGACACA GAGGCGGCACT GCGAGGTGCA AATGCGAGTCT AGAG

44

(2)SEQ ID NO:59の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 44塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: /注 = "312-47オリゴヌクレオチド"

(xi)配列: SEQ ID NO:59:

TGCAATGACA GAGTCAAGCT GCGGTGAGCT GAGTGGTAG CTTC

44

(2)SEQ ID NO:60の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 46塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: /注 = "312-48オリゴヌクレオチド"

【 0 3 9 6】

10

20

30

【化 6 1】

(xi)配列: SEQ ID NO:60:

GCACACGCA GACGACGAG GACGACGCA TGGGACGCG GCGGCA

46

(2)SEQ ID NO:61の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 52塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(iii)ハイボセティカル配列: No

(iv)アンチセンス: No

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc feature

(B)存在位置: 1

(D)他の情報: /注 = "312-49オリゴヌクレオチド"

(xi)配列: SEQ ID NO:61:

TGACGACGAG AGGACGACGAG GACGACGAG TGGGACGCG GCGGCA

52

【図面の簡単な説明】

【 0 3 9 7】

【図 1 A】図1は、緩衝液の存在下(図1A)、無標識のLeu3A存在下(図1B)、CD4 VIに特異的なモノクローナル抗体OKT4Aの存在下(図1C)、CD4 V3V4に特異的なモノクローナル抗体OKT4の存在下(図1D)あるいは、本発明のモノクローナル抗体5A8の存在下(図1E)の、フルオレッセインイソチオシアネートで標識したCD4 VIに特異的なモノクローナル抗体Leu3A(「Leu3A - FITC」)で染色した、ヒト末梢血リンパ球の蛍光活性化細胞選別(「FACS」)のプロフィールを示す。データは、蛍光強度の対数(y軸)に対して外への広がり(x軸)の関数として示した。

【図 1 B】図1は、緩衝液の存在下(図1A)、無標識のLeu3A存在下(図1B)、CD4 VIに特異的なモノクローナル抗体OKT4Aの存在下(図1C)、CD4 V3V4に特異的なモノクローナル抗体OKT4の存在下(図1D)あるいは、本発明のモノクローナル抗体5A8の存在下(図1E)の、フルオレッセインイソチオシアネートで標識したCD4 VIに特異的なモノクローナル抗体Leu3A(「Leu3A - FITC」)で染色した、ヒト末梢血リンパ球の蛍光活性化細胞選別(「FACS」)のプロフィールを示す。データは、蛍光強度の対数(y軸)に対して外への広がり(x軸)の関数として示した。

【図 1 C】図1は、緩衝液の存在下(図1A)、無標識のLeu3A存在下(図1B)、CD4 VIに特異的なモノクローナル抗体OKT4Aの存在下(図1C)、CD4 V3V4に特異的なモノクローナル抗体OKT4の存在下(図1D)あるいは、本発明のモノクローナル抗体5A8の存在下(図1E)の、フルオレッセインイソチオシアネートで標識したCD4 VIに特異的なモノクローナル抗体Leu3A(「Leu3A - FITC」)で染色した、ヒト末梢血リンパ球の蛍光活性化細胞選別(「FACS」)のプロフィールを示す。データは、蛍光強度の対数(y軸)に対して外への広がり(x軸)の関数として示した。

【図 1 D】図1は、緩衝液の存在下(図1A)、無標識のLeu3A存在下(図1B)、CD4 VIに特異的なモノクローナル抗体OKT4Aの存在下(図1C)、CD4 V3V4に特異的なモノクローナル抗体OKT4の存在下(図1D)あるいは、本発明のモノクローナル抗体5A8の存在下(図1E)の、フルオレッセインイソチオシアネートで標識したCD4 VIに特異的なモノクローナル抗体Leu3A(「Leu3A - FITC」)で染色した、ヒト末梢血リンパ球の蛍光活性化細胞選別(「FACS」)のプロフィールを示す。データは、蛍光強度の対数(y軸)に対して外への広がり(x軸)の関数

10

20

30

40

50

として示した。

【図 1 E】図 1 は、緩衝液の存在下(図 1A)、無標識の Leu3A 存在下(図 1B)、CD4 VI に特異的なモノクローナル抗体 OKT4A の存在下(図 1C)、CD4 V3V4 に特異的なモノクローナル抗体 OKT4 の存在下(図 1D)あるいは、本発明のモノクローナル抗体 5A8 の存在下(図 1E)の、フルオレッセインイソチオシアネートで標識した CD4 VI に特異的なモノクローナル抗体 Leu3A (「Leu3A - FITC」)で染色した、ヒト末梢血リンパ球の蛍光活性化細胞選別(「FACS」)のプロフィールを示す。データは、蛍光強度の対数(y軸)に対して外への広がり(x軸)の関数として示した。

【図 2 A】図 2 A は、過剰の HIVgp120 と前もってインキュベートしたものおよびインキュベートしていない、ヒト CD4+細胞株 H9 の、本発明の抗体ホモログ(5A8)、および抗 CD4 モノクローナル抗体 Leu3A、OKT4A および OKT4 による免疫蛍光染色を示す。点線は、過剰の HIVgp120 の否存在下(左のプロフィール)あるいは存在下(右のプロフィール)での、抗 CD4 モノクローナル抗体による染色、そして実線は、関連のない負コントロールのマウス抗体による染色を示す。

10

【図 2 B】図 2 B は、過剰の HIVgp120 と前もってインキュベートしたものおよびインキュベートしていない、ヒト CD4+細胞株 H9 の、本発明の抗体ホモログ(5A8)、および抗 CD4 モノクローナル抗体 Leu3A、OKT4A および OKT4 による免疫蛍光染色を示す。点線は、過剰の HIVgp120 の否存在下(左のプロフィール)あるいは存在下(右のプロフィール)での、抗 CD4 モノクローナル抗体による染色、そして実線は、関連のない負コントロールのマウス抗体による染色を示す。

20

【図 2 C】図 2 C は、過剰の HIVgp120 と前もってインキュベートしたものおよびインキュベートしていない、ヒト CD4+細胞株 H9 の、本発明の抗体ホモログ(5A8)、および抗 CD4 モノクローナル抗体 Leu3A、OKT4A および OKT4 による免疫蛍光染色を示す。点線は、過剰の HIVgp120 の否存在下(左のプロフィール)あるいは存在下(右のプロフィール)での、抗 CD4 モノクローナル抗体による染色、そして実線は、関連のない負コントロールのマウス抗体による染色を示す。

【図 2 D】図 2 D は、過剰の HIVgp120 と前もってインキュベートしたものおよびインキュベートしていない、ヒト CD4+細胞株 H9 の、本発明の抗体ホモログ(5A8)、および抗 CD4 モノクローナル抗体 Leu3A、OKT4A および OKT4 による免疫蛍光染色を示す。点線は、過剰の HIVgp120 の否存在下(左のプロフィール)あるいは存在下(右のプロフィール)での、抗 CD4 モノクローナル抗体による染色、そして実線は、関連のない負コントロールのマウス抗体による染色を示す。

30

【図 2 E】図 2 E は、過剰の HIVgp120 と前もってインキュベートしたものおよびインキュベートしていない、ヒト CD4+細胞株 H9 の、本発明の抗体ホモログ(5A8)、および抗 CD4 モノクローナル抗体 Leu3A、OKT4A および OKT4 による免疫蛍光染色を示す。点線は、過剰の HIVgp120 の否存在下(左のプロフィール)あるいは存在下(右のプロフィール)での、抗 CD4 モノクローナル抗体による染色、そして実線は、関連のない負コントロールのマウス抗体による染色を示す。

【図 2 F】図 2 F は、過剰の HIVgp120 と前もってインキュベートしたものおよびインキュベートしていない、ヒト CD4+細胞株 H9 の、本発明の抗体ホモログ(5A8)、および抗 CD4 モノクローナル抗体 Leu3A、OKT4A および OKT4 による免疫蛍光染色を示す。点線は、過剰の HIVgp120 の否存在下(左のプロフィール)あるいは存在下(右のプロフィール)での、抗 CD4 モノクローナル抗体による染色、そして実線は、関連のない負コントロールのマウス抗体による染色を示す。

40

【図 2 G】図 2 G は、過剰の HIVgp120 と前もってインキュベートしたものおよびインキュベートしていない、ヒト CD4+細胞株 H9 の、本発明の抗体ホモログ(5A8)、および抗 CD4 モノクローナル抗体 Leu3A、OKT4A および OKT4 による免疫蛍光染色を示す。点線は、過剰の HIVgp120 の否存在下(左のプロフィール)あるいは存在下(右のプロフィール)での、抗 CD4 モノクローナル抗体による染色、そして実線は、関連のない負コントロールのマウス抗体による染色を示す。

50

【図2H】図2Hは、過剰のHIVgp120と前もってインキュベートしたものおよびインキュベートしていない、ヒトCD4+細胞株H9の、本発明の抗体ホモログ(5A8)、および抗CD4モノクローナル抗体Leu3A、OKT4AおよびOKT4による免疫蛍光染色を示す。点線は、過剰のHIVgp120の否存在下(左のプロフィール)あるいは存在下(右のプロフィール)での、抗CD4モノクローナル抗体による染色、そして実線は、関連のない負コントロールのマウス抗体による染色を示す。

【図3】図3は、本発明のモノクローナル抗体(5A8)および2つのCD4 V1に特異的なモノクローナル抗体(Leu3AおよびOKT4A)に対する抗体濃度(0.026 - 2,000ng/ml)の関数として、シンシチウム形成の阻害パーセント(^{51}Cr 放出を定量)を示す。

【図4】図4は、本発明のモノクローナル抗体(5A8)、CD4 V1に特異的な2つのモノクローナル抗体(Leu3AおよびOKT4A)、およびCD4 V3V4(2 - 103 - D11)に特異的な「OKT4様」モノクローナル抗体に対する抗体濃度(3.2 - 10,000ng/ml)の関数として、シンシチウム形成の阻害パーセント(^{51}Cr 放出を定量)を示す。

【図5】図5は、本発明の抗体ホモログ(モノクローナル抗体5A8)および種々のコントロール抗体(CD4 VIに特異的な抗体OKT4AおよびLeu3A、およびアイソタイプのあったコントロール抗体MOPC21およびUPC10)により生じたヒト末梢血リンパ球の破傷風トキシイド(「TT」)誘導の増殖阻害(3H - チミジンの取り込みで定量され、「cpm $\times$ 10E3(1000)」で同定される)の、アッセイの4日目(図5)および5日目(図6)を示している。「TTコントロール」と示した棒は、TT刺激なしの細胞増殖基準(白の棒)および抗体なしのTT応答(黒の棒)を示す。TT刺激なしの抗体のみの増殖に対する効果は、大きな斑点を付けた棒で示す。さらに、図5は、TT刺激(すなわち、TTに対する応答抑制)後の、10 $\mu\text{g/ml}$ (斑点を付けた棒)(MOPC21および5A8のみ)、1 $\mu\text{g/ml}$ (水平の線を付けた棒)(全ての抗体)、および0.1 $\mu\text{g/ml}$ (斜線を付けた棒)(全ての抗体)の種々の濃度の抗体により生じた、増殖に対する効果を示す。

【図6】図6は、本発明の抗体ホモログ(モノクローナル抗体5A8)および種々のコントロール抗体(CD4 VIに特異的な抗体OKT4AおよびLeu3A、およびアイソタイプのあったコントロール抗体MOPC21およびUPC10)により生じたヒト末梢血リンパ球の破傷風トキシイド(「TT」)誘導の増殖阻害(3H - チミジンの取り込みで定量され、「cpm $\times$ 10E3(1000)」で同定される)の、アッセイの4日目(図5)および5日目(図6)を示している。「TTコントロール」と示した棒は、TT刺激なしの細胞増殖基準(白の棒)および抗体なしのTT応答(黒の棒)を示す。TT刺激なしの抗体のみの増殖に対する効果は、大きな斑点を付けた棒で示す。さらに、図6は、TT刺激(すなわち、TTに対する応答抑制)後の、10 $\mu\text{g/ml}$ (斑点を付けた棒)(MOPC21および5A8のみ)、1 $\mu\text{g/ml}$ (水平の線を付けた棒)(全ての抗体)、および0.1 $\mu\text{g/ml}$ (斜線を付けた棒)(全ての抗体)の種々の濃度の抗体により生じた、増殖に対する効果を示す。

【図7A】図7Aは、5A8(実線、Mn 261 - 85およびMn 251 - 87)あるいはアイソタイプのあったコントロールのモノクローナル抗体MOPC21(破線、Mn265 - 85およびMn265 - 87)による処理の前、処理中、および処理後の種々の時点における、アカゲザルの末梢白血球数を示す。y軸は、血液1マイクロリッター当りの白血球数(1000単位)を示す。x軸は、日数を示し、5A8あるいはMOPC21を0日目、2日目および4日目に注射した。

【図7B】図7Bは、5A8(実線、Mn 261 - 85およびMn 251 - 87)あるいはアイソタイプのあったコントロールのモノクローナル抗体MOPC21(破線、Mn265 - 85およびMn265 - 87)による処理の前、処理中、および処理後の種々の時点における、アカゲザルの末梢白血球数を示す。y軸は、血液1マイクロリッター当りの白血球数(1000単位)を示す。x軸は、日数を示し、5A8あるいはMOPC21を0日目、2日目および4日目に注射した。

【図8A】図8Aは、5A8(実線、Mn261 - 85(上のパネル)およびMn251 - 87(下のパネル)あるいはアイソタイプのあったコントロールのモノクローナル抗体MOPC21(破線、Mn265 - 85(上のパネル)およびMn265 - 87(下のパネル)))による処理の前、処理中、および処理後の種々の時点における、アカゲザルの末梢CD4+リンパ球数を示す。CD4+細胞数は、蛍光標識のCD4 V3V4に特異的なモノクローナル抗体FITC - OKT4(白丸および黒丸)で染色後のFACS分析により、あるいは、単離細胞を過剰の5A8とともにインビトロでインキュベート後、次に蛍光標識のヤギ抗マウスIg(白の三角および黒の三角)で染色後のFACS分析によって定量す

10

20

30

40

50

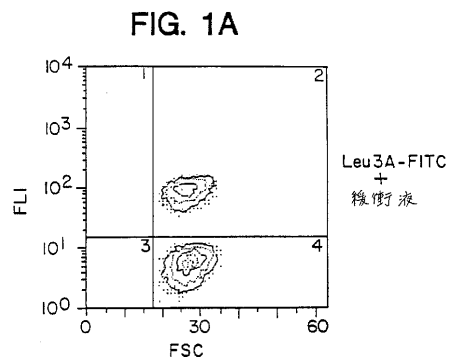
る。y軸は、1マイクロリッター当りのCD4+細胞数を示す。x軸は、日数を示し、5A8あるいはMOPC21を0日目、2日目および4日目に注射した。

【図8B】図8Bは、5A8(実線、Mn261-85(上のパネル)およびMn251-87(下のパネル)あるいはアイソタイプのあったコントロールのモノクローナル抗体MOPC21(破線、Mn265-85(上のパネル)およびMn265-87(下のパネル))による処理の前、処理中、および処理後の種々の時点における、アカゲザルの末梢CD4+リンパ球数を示す。CD4+細胞数は、蛍光標識のCD4 V3V4に特異的なモノクローナル抗体FITC-OKT4(白丸および黒丸)で染色後のFACS分析により、あるいは、単離細胞を過剰の5A8とともにインビトロでインキュベート後、次に蛍光標識のヤギ抗マウスIg(白の三角および黒の三角)で染色後のFACS分析によって定量する。y軸は、1マイクロリッター当りのCD4+細胞数を示す。x軸は、日数を示し、5A8あるいはMOPC21を0日目、2日目および4日目に注射した。

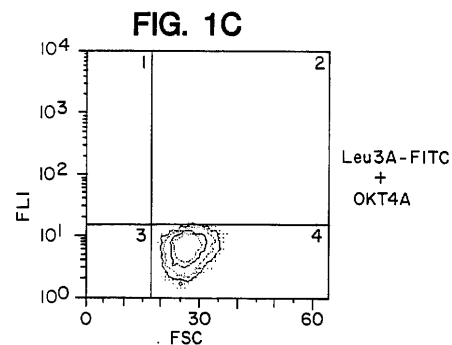
10

【図9】図9は、5A8(実線、Mn261-85およびMn251-87)あるいはアイソタイプのあったコントロールのモノクローナル抗体MOPC21(点線、Mn265-85およびMn265-87)による処理の前、処理中、および処理後の種々の時点における、アカゲザルの抗破傷風トキソイドの力価を示す。y軸は、標準の抗破傷風トキソイド免疫血清に比例して確立される抗破傷風トキソイド抗体の、血液1ミリリッター当りのユニット数を示す。x軸は、日数を示し、5A8あるいはMOPC21を0日目、2日目および4日目に注射し、そして破傷風トキソイドを3日目および21日目に注射した。0日から9日の下の棒は、インビボにおける、5A8によるCD4の飽和コーティングの時期を示す。

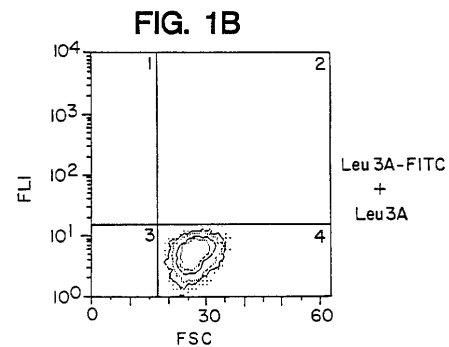
【図1A】



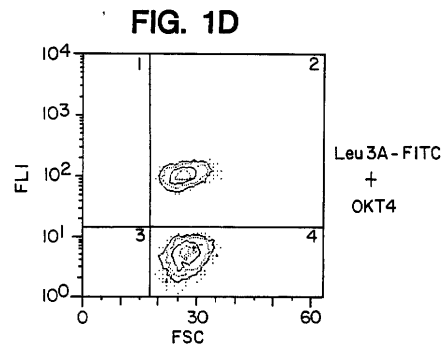
【図1C】



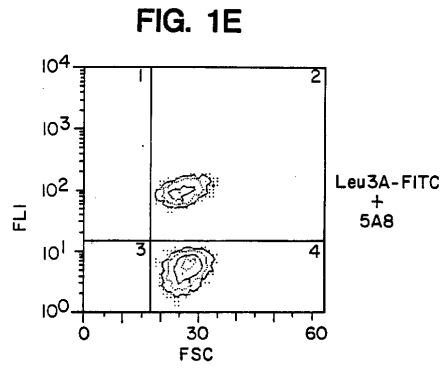
【図1B】



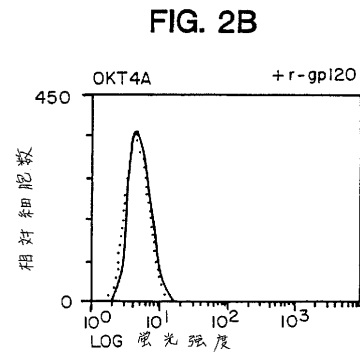
【図1D】



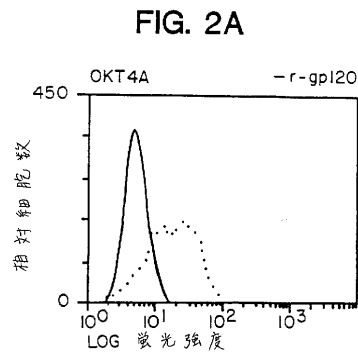
【図 1 E】



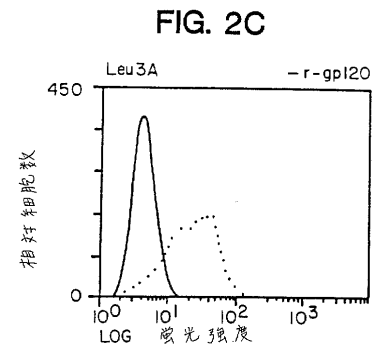
【図 2 B】



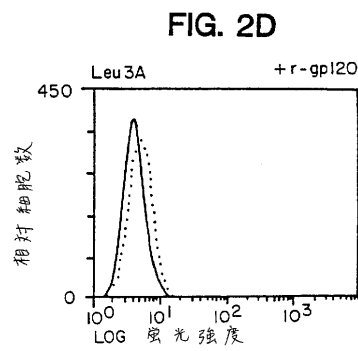
【图 2 A】



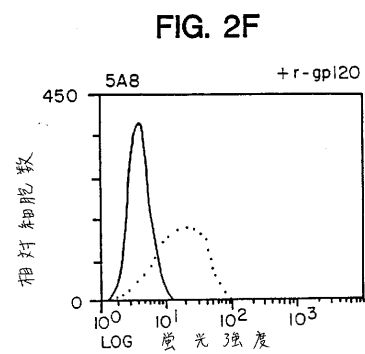
【图 2 C】



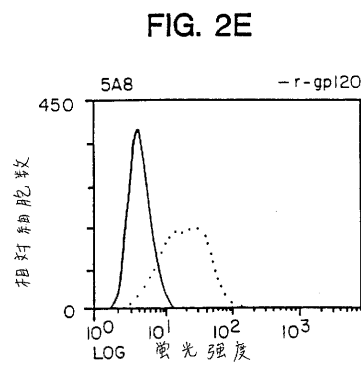
【图 2 D】



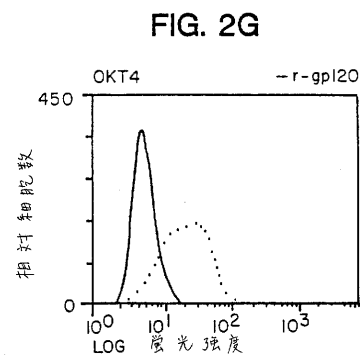
【图 2 F】



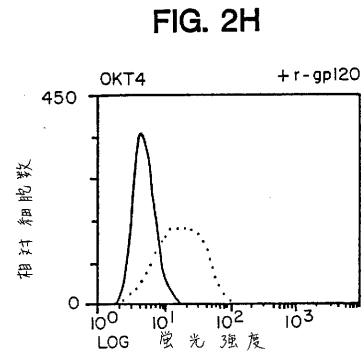
【图 2 E】



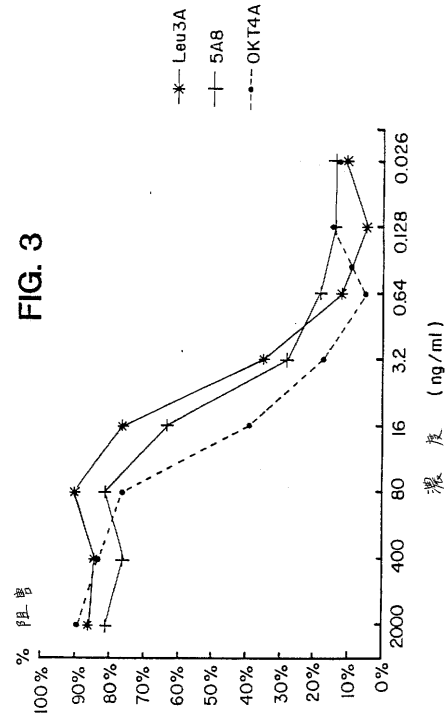
【图 2 G】



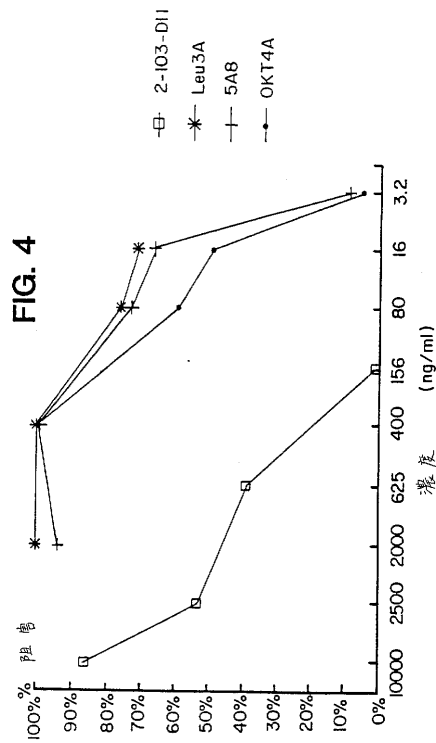
【 図 2 H 】



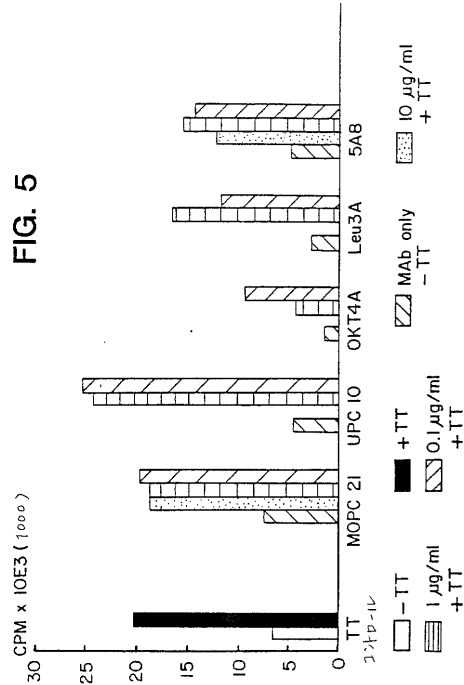
【 図 3 】



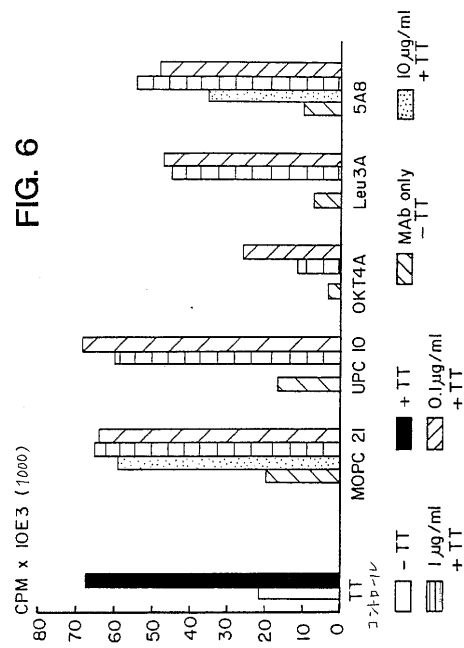
【 図 4 】



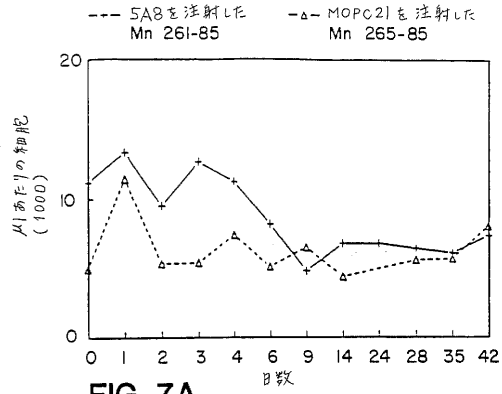
【 図 5 】



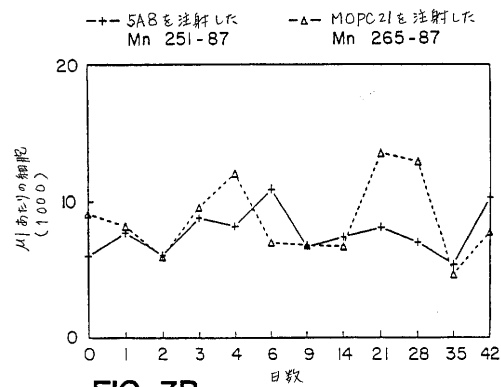
【図 6】



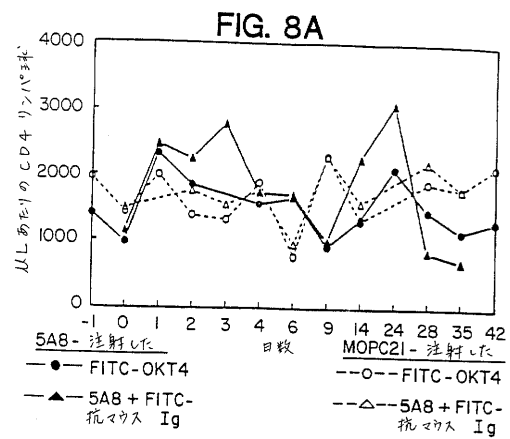
【図 7 A】



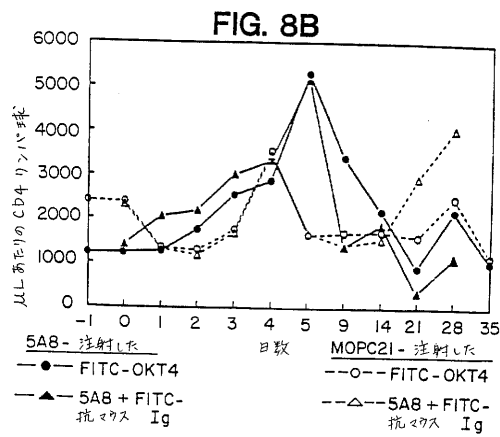
【図 7 B】



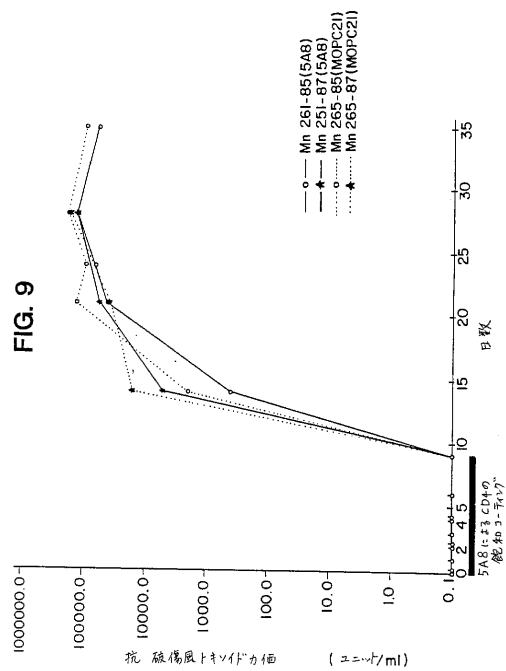
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 9】



【配列表】

0004642035000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 16/28 (2006.01) A 6 1 P 37/04
C 1 2 N 5/07 (2010.01) C 0 7 K 16/28
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 N 5/00 E
C 1 2 P 21/08

(72)発明者 リンダ シー . パークリー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 6 5 ウェスト ニュートン , ウィンスロップ スト
リート 3 4

(72)発明者 パトリシア エル . チョルム
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 6 9 クウィンシー , リバティール ストリート 2 1
7

(72)発明者 デビッド ダブリュー . トーマス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 8 1 ウェレスリー , アイゼンハワー サークル 1
4

(72)発明者 マーガレット ディー . ローザ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 9 0 ウィンチェスター , グローブ ストリート 3
2

(72)発明者 ジョーゼフ ジェイ . ローザ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 9 0 ウィンチェスター , グローブ ストリート 3
2

合議体

審判長 鈴木 恵理子

審判官 吉田 佳代子

審判官 鶴飼 健

(56)参考文献 J . E X P . M E D , V O L . 1 7 2 (O C T . 1 9 9 0) , P . 1 1 4 3 - 1 1 5 0

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N15/00-15/90

C12N1/00-5/28

C12P21/00-21/08

C07K14/00-16/46

C12Q1/00-1/70

G01N33/00-33/98

A61K31/00-48/00

A61P1/00-43/00

P U B M E D

M E D L I N E (S T N)

B I O S I S / W P I (D I A L O G)

专利名称(译)	抗CD4抗体同源物可用于预防和治疗AIDS，ARC和HIV感染		
公开(公告)号	JP4642035B2	公开(公告)日	2011-03-02
申请号	JP2007012057	申请日	2007-01-22
申请(专利权)人(译)	Biogen Idec公司，Emuei公司		
当前申请(专利权)人(译)	Biogen Idec公司，Emuei公司		
[标]发明人	リンダシーバークリー パトリシアエルチショルム デイビッドダブリュートーマス マーガレットディーローザ ジョーゼフジェイローザ		
发明人	リンダ シー. バークリー パトリシア エル. チショルム デイビッド ダブリュ. トーマス マーガレット ディー. ローザ ジョーゼフ ジェイ. ローザ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P31/00 A61P31/18 A61P37/04 C07K16/28 C12N5/07 C12P21/08 A61K38/00 A61P31/12 C07K14/00 C07K16/00 C07K16/18 C07K19/00 C12N5/10 C12R1/91 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K38/00 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/18 A61P37/04 C07K16/2812 C07K2317/24 C07K2319/00 C07K2319/02		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61P31/00 A61P31/18 A61P37/04 C07K16/28 C12N5/00.E C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.202.G C12N5/00.202.L C12N5/077 C12N5/0783		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA69 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA29 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
审查员(译)	鈴木惠理子		
助理审查员(译)	肯・鵜飼		
优先权	07/618542 1990-11-27 US		
其他公开文献	JP2007175055A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供抗CD4抗体有效阻断HIV诱导的合胞体形成，而不显著阻断HIV gp120 (糖基化外膜蛋白) 与人CD4的结合，并提供抑制5A8模拟肽或半肽化合物在CD4 + 细胞之间由HIV诱导的合胞体形成和/或抑制CD4 + // SP>细胞的HIV感染。解决方案：本发明涉及抗CD4抗体有效阻断HIV诱导的合胞体形成而不显著阻断HIV gp120与人CD4的结合。本发明还涉及在CD4 + 细胞之间由HIV诱导的抑制合胞体形成的5A8模拟肽或半肽化合物，以及抑制CD4 + 细胞。Ž

【 図 1 B 】

