

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4272348号
(P4272348)

(45) 発行日 平成21年6月3日(2009.6.3)

(24) 登録日 平成21年3月6日(2009.3.6)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K	14/435	(2006.01)	C O 7 K 14/435
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 A
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02 C

請求項の数 36 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-509740 (P2000-509740)	(73) 特許権者	500018608
(86) (22) 出願日	平成10年8月13日 (1998.8.13)		イエダ リサーチ アンド ディベロッ メント カンパニー リミテッド
(65) 公表番号	特表2001-514876 (P2001-514876A)		イスラエル国、76100 レホボト、ピ ーオーボックス 95、ワイズマン イン スティテュート オブ サイエンス (番地 なし)
(43) 公表日	平成13年9月18日 (2001.9.18)	(74) 代理人	100065226
(86) 国際出願番号	PCT/IL1998/000379		弁理士 朝日奈 宗太
(87) 国際公開番号	W01999/009063	(74) 代理人	100098257
(87) 国際公開日	平成11年2月25日 (1999.2.25)		弁理士 佐木 啓二
審査請求日	平成17年8月2日 (2005.8.2)	(72) 発明者	ノビック、ダニエラ
(31) 優先権主張番号	121554		イスラエル国、76302 レホボト、ハ ナシ ハリシヨン 40
(32) 優先日	平成9年8月14日 (1997.8.14)		
(33) 優先権主張国	イスラエル (IL)		
(31) 優先権主張番号	121639		
(32) 優先日	平成9年8月27日 (1997.8.27)		
(33) 優先権主張国	イスラエル (IL)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターロイキン-18結合タンパク質、それらの調製および用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド；
 (b) リーダー配列なしの(a)で定義されるポリペプチド；
 (c) (a)または(b)で定義されるポリペプチドの融合タンパク質、化学的に改変された誘導体およびそれらの混合物；
 からなる群より選択され、IL-18に結合し、IL-18に誘導されたIFN- γ 産生を遮断するIL-18結合タンパク質(IL-18BP)。

【請求項2】

非ウイルスタンパク質である請求項1記載のIL-18BP。

10

【請求項3】

ヒトのタンパク質である請求項2記載のIL-18BP。

【請求項4】

約40kDの分子量を有する請求項1、2または3記載のIL-18BP。

【請求項5】

融合タンパク質が免疫グロブリンまたはその断片からなる請求項1、2、3または4記載のIL-18BP。

【請求項6】

IgG2重鎖の定常領域に融合されたIL-18BPから選択される融合タンパク質である請求項5記載のIL-18BP。

20

【請求項 7】

化学的に改変された誘導体がポリエチレングリコール側鎖を含む請求項 1、2、3、4、5 または 6 記載の I L - 1 8 B P。

【請求項 8】

可溶性形態における請求項 1、2、3、4、5、6 または 7 記載の I L - 1 8 B P。

【請求項 9】

グリコシル化 I L - 1 8 B P である請求項 1、2、3、4、5、6、7 または 8 記載の I L - 1 8 B P。

【請求項 10】

非グリコシル化 I L - 1 8 B P である請求項 1、2、3、4、5、6、7 または 8 記載の I L - 1 8 B P。 10

【請求項 11】

請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 記載の I L - 1 8 B P をコードする D N A。

【請求項 12】

3 末端に終止コドンをもつ請求項 11 記載の D N A。

【請求項 13】

配列番号 1 の D N A 配列からなる D N A であって、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 記載の I L - 1 8 B P をコードする D N A。

【請求項 14】 20

プロモーターおよびエンハンサーなどの発現を促進する他の D N A 配列に機能的に連結させた請求項 11、12 または 13 記載の D N A。

【請求項 15】

ゲノム D N A である請求項 11、12、13 または 14 記載の D N A。

【請求項 16】

c D N A である請求項 11、12、13、14 または 15 記載の D N A。

【請求項 17】

配列番号 1 の D N A 配列からなる請求項 16 記載の c D N A。

【請求項 18】

細菌宿主における発現用に適合されている請求項 16 または 17 記載の c D N A。 30

【請求項 19】

請求項 11、12、13、14、15、16、17 または 18 記載の D N A からなる複製可能なベクター。

【請求項 20】

請求項 19 記載のベクターからなる形質転換された宿主細胞。

【請求項 21】

真核細胞である請求項 20 記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 22】

哺乳類細胞である請求項 21 記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 23】 40

ヒト、サル、マウスおよびチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞から選択される請求項 22 記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 24】

原核細胞である請求項 20 記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 25】

請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 記載の I L - 1 8 B P の産生方法であって、該 I L - 1 8 B P の発現に適する条件下で請求項 20、21、22、23 または 24 記載の宿主細胞を培養すること、および該 I L - 1 8 B P を単離することからなる方法。

【請求項 26】 50

配列番号 2 で示される アミノ酸配列 からなるポリペプチドに対する抗体。

【請求項 27】

ポリクローナル抗体である請求項 26 記載の抗体。

【請求項 28】

モノクローナル抗体である請求項 26 記載の抗体。

【請求項 29】

抗イディオタイプ抗体である請求項 26 記載の抗体。

【請求項 30】

キメラ抗体である請求項 26 記載の抗体。

【請求項 31】

ヒト化抗体である請求項 26 記載の抗体。

10

【請求項 32】

請求項 1 記載の IL - 18 B P の単離方法であって、

(a) ヒトの体液を IL - 18 が結合するクロマトグラフのカラムに通すこと、

(b) IL - 18 に結合できるタンパク質を溶出すること、および

(c) 該タンパク質を精製すること

からなる方法。

【請求項 33】

請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9 もしくは 10 記載の IL - 18 B P からなる IL - 18 阻害剤。

20

【請求項 34】

請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9 もしくは 10 記載の IL - 18 B P をコードする DNA からなる IL - 18 阻害剤。

【請求項 35】

IL - 18 の精製用の請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 記載の IL - 18 B P の 使用。

【請求項 36】

IL - 18 B P の検出検定における請求項 26、27、28、30 または 31 記載の抗体の 使用。

【発明の詳細な説明】

30

【0001】

[本発明の分野]

本発明は、インターロイキン - 18 (IL - 18) 結合タンパク質、以下 IL - 18 B P という、IL - 18 に結合できるタンパク質に関する。さらに詳細には、本発明は、体液から得られる可溶性 IL - 18 B P、宿主細胞における適した DNA ベクターの発現により得られる可溶性 IL - 18 B P、宿主細胞における適した DNA ベクターの発現により得られる IL - 18 B P のウイルスがコードするホモログ、多様な IL - 18 B P を発現するベクター、ヒトおよび他の哺乳類における IL - 18 B P の発現に有用なベクター、IL - 18 B P に対する抗体、IL - 18 活性を調節および / または遮断することによる該 IL - 18 B P の治療用途、IL - 18 活性の調節および / または遮断における該発現ベクターの治療用途ならびに該抗体の用途に関する。

40

【0002】

[本発明の背景]

1989年に、マウスの脾臓細胞から得られるインターフェロン - (IFN -) を誘導した内毒素誘導性血清活性が記述された (27)。この血清活性は、IFN - の直接的な誘導物質としてではなく、IL - 2 または分裂促進因子とともに共刺激物質として機能した。内毒素後 (post-endotoxin) のマウス血清から該活性を精製する試みにより、見かけ上均質な 50 ~ 55 k D a のタンパク質が明らかになった (26)。他のサイトカインは IFN - 産生のための共刺激物質として作用し得るので、該血清活性を中和するための IL - 1、IL - 4、IL - 5、IL - 6 または TNF に対する抗体を中和できないこと

50

から、それが異なる因子であることが示唆された。1995年に、同一の科学者により、IFN- γ 産生のための内毒素誘導性共刺激物質が挫瘡プロピオンバクテリウム (*P. acnes*) で前調整したマウスからの肝臓抽出物に存在することが立証された(31)。このモデルでは、肝臓マクロファージ集団(クッパー細胞)が増大し、前調整されていないマウスにとっては死に到ることのない低用量の細菌リポ多糖(LPS)がこれら前調整したマウスにとっては致死性的になる。その因子は、IFN- γ 誘導因子(IGIF)と名づけられ、後にインターロイキン-18(IL-18)と称されるが、1200グラムの挫瘡プロピオンバクテリウムで処理したマウスの肝臓から均質に精製された。精製されたIL-18のアミノ酸配列に由来する縮重オリゴヌクレオチドはマウスIL-18 cDNAをクローニングするために用いられた(31)。IL-18は157アミノ酸からなる18~19kDaのタンパク質であり、データベースによればいかなるペプチドに対しても明らかな類似性を有していない。IL-18およびインターロイキン-12(IL-12)のメッセンジャーRNAは、クッパー細胞で容易に検出され、マクロファージを活性化した。組換え体IL-18は、IL-12よりも強力に、明らかに異なる経路を介してIFN- γ を誘導する(31)。内毒素で誘導された血清活性と類似して、IL-18はそれ自体でIFN- γ を誘導しないが、主として分裂促進因子またはIL-2との共刺激物質として機能する。IL-18は明らかにIL-2依存性経路を介してT細胞の増殖を強化し、インビトロでTh1サイトカイン産生を強化し、ならびにIL-12と組み合わせた際に強化されたIFN- γ の産生に関して相乗作用を示す(24)。

10

【0003】

20

マウスIL-18に対する抗体の中和により、挫瘡プロピオンバクテリウムで前調整されたマウスにおける低用量LPSの致死を防げることが示された。他にも、前調整されたマウスにおけるLPS致死の媒介物質としてのIFN- γ の重要性を報告した。たとえば、抗-IFN- γ 抗体の中和はシュワルツマン様のショックからマウスを防御し(16)、IFN- γ 受容体が欠損したガラクトサミン処理のマウスはLPS誘導死に耐性であった(7)。したがって、マウスIL-18抗体の中和は、挫瘡プロピオンバクテリウムで前調整したマウスを致死性LPSから防御したことは予期できないものではなかった(31)。抗マウスIL-18処理はまた、生存マウスを重篤な肝性細胞障害から防御した。

【0004】

マウスの形態がクローニングされた後、1996年にIL-18のヒトcDNA配列が報告された(38)。組換えヒトIL-18は天然のIL-18活性を示す(38)。ヒト組換えIL-18は、ヒトT細胞において直接的なIFN- γ 誘導活性はないが、IFN- γ および他のTヘルパー細胞-1(Th1)サイトカインの産生のための共刺激物質として作用する(38)。これまでに、IL-18は、主としてTh1サイトカイン産生(IFN- γ 、IL-2および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子)(20)のための共刺激物質として、またマウスのナチュラルキラー細胞クローンのFASリガンド媒介性細胞障害のための共刺激物質としてみなされる(37)。

30

【0005】

冒された組織からIL-18をクローニングし、IL-18遺伝子の発現を研究することにより、このサイトカインと自己免疫病との密接な関連性が見出された。非肥満性糖尿病(NOD)マウスは、自己免疫インスリン炎および糖尿病が自然に進行し、シクロフォスファミドの単一注射によって促進し、同時進行しうる。IL-18 mRNAは、インスリン炎の初期段階のNODマウスの膵臓における逆転写酵素PCRによって証明された。IL-18のレベルは、シクロフォスファミド処理後に急速に増加し、IFN- γ mRNAの増加より前に起き、その後糖尿病になった。興味深いことに、これらの動態はIL-12-p40 mRNAのそれと似ており、各mRNAレベルの密接な関係に帰結する。膵臓RNAからIL-18 cDNAをクローニングし、続いて塩基配列を決定することにより、クッパー細胞およびインビボで前活性化されたマクロファージからクローニングされたIL-18配列との同一性を明らかにした。また、NODマウスマクロファージは、IL-18遺伝子発現によりシクロフォスファミドに応答し、一方、平行して処置され

40

50

た B a l b / c マウスのマクロファージは応答しなかった。したがって、I L - 1 8 発現は、自己免疫 N O D マウスにおいて異常に調節され、糖尿病の進行と密接に関連している (32) 。

【 0 0 0 6 】

I L - 1 8 は、T h 1 細胞上の F a s リガンドの機能的活性を増大することにより、免疫調節または炎症における潜在的役割を果たしている (10) 。 I L - 1 8 はまた、腎皮質で発現し、したがって分泌された神経 - 免疫調節物質であり、ストレスの多い実験後に免疫系を統制する重要な役割を果たしている可能性がある (9) 。

【 0 0 0 7 】

インビボで、I L - 1 8 はプロ I L - 1 8 の切断によって形成され、その内在活性が挫瘍プロピオンバクテリウムにおける I F N - 産生および L P S - 媒介性致死の原因となるらしい。その活性のため、ヒトの疾病における I L - 1 8 の生物学的活性を遮断することが、多くの疾病における治療上の戦略である。これは、可溶性受容体を用いることで、または細胞に結合した I L - 1 8 受容体に対する抗体を遮断することで成し遂げられ得る。

10

【 0 0 0 8 】

サイトカイン結合タンパク質 (可溶性サイトカイン受容体) は、各々の細胞表面サイトカイン受容体の細胞外リガンド結合ドメインに相当する。それらは、細胞表面受容体に共通なプレ m R N A の選択的スプライシングにより、または細胞表面受容体のタンパク質分解性切断により誘導される。とりわけ、I L - 6 および I F N - (30) 、 T N F (11、12) 、 I L - 1 および I L - 4 (21) 、 I F N - / (28、29) などを含む可溶性受容体が過去に記載されてきた。オステオプロテゲリン (O P G 、破骨細胞阻害因子としても知られる - O C I F) と呼ばれ、T N F R / F a s ファミリーのメンバーである 1 つのサイトカイン結合タンパク質は、分泌タンパク質としてのみ存在する可溶性受容体の最初の例であるらしい (1、34、39) 。

20

【 0 0 0 9 】

[本発明の要旨]

本発明は、I L - 1 8 結合タンパク質 (I L - 1 8 B P) およびウイルスにコードされた I L - 1 8 B P のホモログ (以下、ウイルス I L - 1 8 B P という) 、ならびに I L - 1 8 に結合可能なその融合タンパク質、突然変異タンパク質、機能的誘導體、活性断片、および環状変更された誘導體を提供する。本発明はまた、ヒトの体液から I L - 1 8 B P を単離する方法、および組換え手段によってそれらを得るための方法を提供する。本発明はまた、ヒトおよび他の哺乳類における I L - 1 8 B P の発現に適した I L - 1 8 B P の発現ベクターも提供する。本発明の特異的 I L - 1 8 B P 、そのウイルスにコードされた I L - 1 8 B P のホモログ、融合タンパク質、機能的誘導體、活性断片および環状変更された誘導體は、I L - 1 8 の生物学的活性を調節および / または遮断するために有用である。

30

【 0 0 1 0 】

宿主細胞における多様な I L - 1 8 B P の発現に適した D N A を含む複製可能な発現ビヒクル、それで形質転換された宿主細胞、ならびにそのような宿主の発現によって産生されるタンパク質およびポリペプチドもまた提供される。

40

【 0 0 1 1 】

本発明はさらに、ヒトおよび他の哺乳類における発現のため、I L - 1 8 活性の調節または遮断を要する疾病または症状の治療のため、適切なビヒクルおよび I L - 1 8 B P 、またはウイルス I L - 1 8 B P 、またはベクターからなる医薬組成物を提供する。

【 0 0 1 2 】

本発明はさらに、アフィニティー精製および免疫検定に適した I L - 1 8 B P およびウイルス I L - 1 8 B P に対する抗体を提供する。

【 0 0 1 3 】

[本発明の詳細な説明]

本発明は、I L - 1 8 に結合する多様な I L - 1 8 B P およびウイルス I L - 1 8 B P に

50

関する。そのような I L - 1 8 B P は、I L - 1 8 の生物学的活性を調節および/または遮断しうる。「I L - 1 8 B P およびウイルス I L - 1 8 B P」という用語には、(シグナル配列なしの)成熟タンパク質、シグナル配列、I L - 1 8 B P およびウイルス I L - 1 8 B P の突然変異タンパク質、I L - 1 8 B P およびウイルス I L - 1 8 B P の誘導体ならびに I L - 1 8 B P およびウイルス I L - 1 8 B P の短縮形態ならびにそれらの塩からなるタンパク質が含まれる。

【 0 0 1 4 】

本発明はさらに、宿主細胞および宿主細菌における多様な I L - 1 8 B P またはウイルス I L - 1 8 B P の発現に適した複製可能な発現ビヒクルに関する。本発明はさらに、ヒトおよび他の哺乳類における多様な I L - 1 8 B P またはウイルス I L - 1 8 B P の発現に適した発現ベクターに関する。

10

【 0 0 1 5 】

本発明はさらに、多様な I L - 1 8 B P、そのウイルス I L - 1 8 B P、突然変異タンパク質、融合タンパク質、機能的誘導体、活性画分および混合物をコードする DNA に関する。該 DNA は、ゲノム DNA、c DNA、合成 DNA、PCR 産物またはその組合せでありうる。本発明にしたがって、宿主細胞における多様な I L - 1 8 B P およびウイルス I L - 1 8 B P の発現のために、これらの DNA は複製可能な発現ビヒクルに挿入される。ストリンジェントな条件下で上記の DNA にハイブリダイズでき、ならびに I L - 1 8 に結合もできるタンパク質またはポリペプチドをコードする DNA もまた本発明に含まれる。

20

【 0 0 1 6 】

そのような DNA の 1 つは、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含み、3' 末端に終止コドンをもつ I L - 1 8 B P をコードする。

【 0 0 1 7 】

ヒトおよび他の哺乳類における多様な I L - 1 8 B P またはウイルス I L - 1 8 B P の発現用、すなわち遺伝子治療に適した発現ベクターは、ウイルスベクターまたは他のタイプのベクターであり得、ヒトおよび他の哺乳類における I L - 1 8 B P またはウイルス I L - 1 8 B P の効率的な発現を可能にする方法で該ベクターに I L - 1 8 B P 遺伝子または I L - 1 8 B P c DNA またはウイルス I L - 1 8 B P をコードする DNA が挿入された。ストリンジェントな条件下で上記の DNA にハイブリダイズし、I L - 1 8 に結合できるタンパク質またはポリペプチドをコードする DNA もまた本発明に含まれる。

30

【 0 0 1 8 】

I L - 1 8 B P の単離は、たとえば尿または血清などのヒト体液を I L - 1 8 が結合するクロマトグラフィーカラムに通し、その後、結合した I L - 1 8 B P を溶出するなどにより、本発明にしたがって実施されうる。

【 0 0 1 9 】

多様な I L - 1 8 B P およびウイルス I L - 1 8 B P もまた、組換え手段、すなわち、たとえば正しい方向で発現させる特定の宿主に適したプロモーター、発現エンハンサー、調節配列などを機能的に連結した後、適切な宿主で I L - 1 8 B P を発現することにより調製されうる。

40

【 0 0 2 0 】

多様な I L - 1 8 B P およびウイルス I L - 1 8 B P およびヒトおよび他の哺乳類における I L - 1 8 B P を発現するためのベクターが、治療、および I L - 1 8 が関与する、または外因的に投与されたもしくは内因的に産生された過剰の I L - 1 8 によって生じる症状の緩和に使用され得る。そのような症状には、たとえば自己免疫疾患、I 型糖尿病、慢性関節リウマチ、移植拒絶、炎症性腸疾患、敗血症、多発性硬化症、虚血性心臓病(心臓発作を含む)、虚血性脳障害、慢性肝炎、乾癬、慢性膵炎、急性膵炎などがある。

【 0 0 2 1 】

本発明にしたがって、I L - 1 8 B P が、1 回のクロマトグラフ段階により正常なヒトの尿から単離された。5 0 0 L の正常なヒトの尿から濃縮された未精製のヒト尿タンパク質

50

の調製物をアガロースに結合させたヒト I L - 1 8 からなるカラムにかけた。カラムを洗浄し、結合タンパク質を低 pH で溶出した。溶出画分を中和し、アリコート为非還元条件下における SDS - PAGE (1 0 % アクリルアミド) および銀染色によって分析した。約 4 0 k D のタンパク質バンドが溶出画分から特異的に得られた (図 1) 。

【 0 0 2 2 】

第 1 段階で得られた約 4 0 k D のタンパク質は、¹²⁵I - I L - 1 8 と特異的に架橋できる I L - 1 8 結合タンパク質として同定された (図 2) 。約 4 0 k D のタンパク質はさらに N 末端タンパク質配列分析によって特徴決定された。溶出されたタンパク質からのアリコートを SDS - PAGE につけ、P V D F 膜にエレクトロブロットングされ、タンパク質マイクロ配列分析にかけた。同様に、溶出タンパク質からのアリコートを直接タンパク質マイクロ配列分析にかけた。両方の場合で、2 つのポリペプチド配列が得られた。主要配列と少数配列であり、後者はアミノ酸 6 5 で始まるヒトのデフェンシン (登録番号 p 1 1 3 9 8) 断片に相当する。既知のデフェンシン配列を消去により、下記の配列が与えられた :

【 0 0 2 3 】

【 配列表 1 】

T-P-V-S-Q-Q-x-x-x-A-A-A
1 . . . 5 . . . 10 . . .

【 0 0 2 4 】

x はまだ未決定のアミノ酸を示す。

【 0 0 2 5 】

より長くより正確な配列を得るために、ならびに潜在的なシステイン残基を同定するために、変性条件下で溶出画分のアリコートを D T T で還元し、4 - ビニルピリジンと反応させ、マイクロ限外器 (ウルトラフリー (Ultrafree) 、カットオフ 1 0 , 0 0 0 D a 、ミリポア (Millipore) 社) によって脱塩し、タンパク質マイクロ配列分析にかけた。配列決定サイクル 1 番を行った後、プロリン以外の全ての N 末端ポリペプチドを遮断するために残りのタンパク質を o - フタルアルデヒドと反応させた後、配列決定を再開した。この方法で、以下のただ 1 つのタンパク質配列が得られた :

【 0 0 2 6 】

【 配列表 2 】

TFVSQXXXAA XASVRSTKDP CPSQPPVFPA AKQCPALEVT
1 10 20 30 40

【 0 0 2 7 】

(T=Thr; P=Pro; V=Val; S=Ser; Q=Gln; X=未決定; A=Ala; R=Arg; K=Lys; D=Asp; C=Cys; F=Phe; L=Leu; E=Glu)

得られた配列は、タンパク質データベースを調査することによって決定された他の既知タンパク質の配列とは有意に異なっている。しかし、c D N A ファイルを備えた t b l a s t n 研究プログラムによるゲノム研究機関 (The Institute of Genomic Research (TIGR) 、[HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) のデータベースを調査することにより、T H C 1 2 3 8 0 1 であることが示され、翻訳されるその読みとり枠 (2 1 8 コドン) は、I L - 1 8 B P の N 末端配列に高い相同性を示す配列を含む。ここに相同性が示される :

【 0 0 2 8 】

【 配列表 3 】

【0036】

本明細書で用いられるように、「IL-18の活性を遮断する」という表現は、IL-18の上記に例示した生物学的活性の少なくとも1つを遮断するためのIL-18BPの活性を指す。IL-18BPのIL-18遮断活性は、マウスの脾細胞におけるIL-18関連IFN- γ 発現を遮断するためのIL-18BPの能力によって例示される。より詳細に以下に示されるように、IL-18BPの調節または遮断能力は、ある程度IL-18BPがIL-18によるNF- κ Bの活性を阻害するという事実による。さらに、IL-18BPはIL-18の下記の活性、すなわちヒトおよびマウスの細胞におけるIFN- γ の誘導、IL-8の誘導およびNF- κ Bの活性の少なくとも1つを遮断する。

10

【0037】

cDNAライブラリーをスクリーニングするためのDNAプローブは、特異的なセンスおよびアンチセンスプライマーならびにTIGR配列からのプライマーとヒトのジャルカット(Jurkat)T細胞からのRNAを用いて逆転写PCRにより調製した。得られるPCR産物はDNA配列分析によって確認された。このPCR産物は³²[P]で標識され、末梢血単核細胞、ジャルカットT細胞系統、PBMCおよびヒトの脾臓に由来する4つのヒトcDNAライブラリーのスクリーニング用のプローブとして用いられた。多様な独立のcDNAクローンは4つのIL-18BPスプライス変異体に相当した(配列番号1、配列番号3、配列番号5および配列番号7)。全てのスプライス変異体は、想定される可溶性の分泌タンパク質をコードした。最も多量のもの(IL-18BP a)は192コドンの読み取り枠を有し、本明細書でしばしば28アミノ酸残基の「リーダー配列」として引用されるシグナルペプチド、続いて最初の40残基が完全に尿IL-18BP(配列番号2)のN末端タンパク質配列と一致する推定の成熟IL-18BP aがコードされる。システイン残基の位置から、このポリペプチドが免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーに属することが示唆された。興味深いことに、成熟IL-18BP a内の4つのGln残基のそれぞれが潜在的なN-グリコシル化部位であった。残り3つのIL-18BPの変異体はIL-18BP aほど多量にはなかった。それらには、28アミノ酸残基のシグナルペプチドとそれに続く85アミノ酸残基の成熟タンパク質をコードする、より短い1 kbのIL-18BP b cDNAが含まれた(配列番号4)。3番目の変異体であるIL-18BP cは2.3 kb cDNAに相当し、28アミノ酸残基のシグナルペプチドとそれに続く169アミノ酸残基の成熟IL-18BPをコードした(配列番号6)。4番目の変異体であるIL-18BP dは、28アミノ酸残基のシグナルペプチドとそれに続く133アミノ酸残基の成熟IL-18BPをコードした(配列番号8)。

20

30

【0038】

さらなるIL-18BPのスプライス変異体の可能な存在をさらに研究するために、IL-18BP cDNAの全長に相当するプローブを用いてヒトゲノムライブラリーをスクリーニングした。長さの異なる5つのゲノムクローンがこのライブラリーで同定された。これらのクローンは外性および内性プライマーを用いてDNA配列分析にかけた。概して、7.8 kbの配列がこれらのクローンから組み立てられた(配列番号9)。7.8 kbの配列内で、膜貫通(TM)受容体をコードするエキソンは同定されなかった。全ての変異体は共通の翻訳開始部位を共有し、28アミノ酸残基の同一のシグナルペプチドおよびサイズとC末端配列の異なる可溶性の成熟タンパク質をコードした。IL-18BPの遺伝子座は、さらなる遺伝子を含み、マイナス鎖に位置する核有糸分裂装置タンパク質1(NUMA1)をコードする。この発見により、IL-18BP遺伝子はヒト染色体11q13に配置される(36)。

40

【0039】

相同性の調査が、スミス ウォーターマン アルゴリズムを用いて、完全なIL-18BP aのタンパク質配列とGenPeptデータベース([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))とで実施された。IL-18BPのホモログは、いくつかのポックスウイルスにおいてあらかじめ未知の機能をもつ分泌タンパク質として発現することが見出された。ウイルスは多様なサ

50

イトカイン受容体をコードすること、ならびにウイルスにコードされるそのような分子は対応するサイトカインを中和することにより免疫応答を阻害するおとり (decoy) 受容体として有用であることが以前に報告された (スプリッグ エムケー (Spriggs, MK)、1994年、Curr. Opin. Immunol.、6巻、526～529頁)。したがって、本発明はさらに、IL-18の生物学的活性の遮断物質または調節物質としても有用なIL-18BPのウイルスにコードされるホモログに関する。ウイルスにコードされるIL-18BPのホモログの例を表1で提供する。

【0040】

本発明にしたがって、ウイルスにコードされるIL-18BPのホモログは原核性または真核性宿主で発現されうる。本明細書で用いられるように、「ウイルスにコードされるIL-18BPのホモログ」という表現は、少なくとも70アミノ酸残基の配列において少なくとも50%の同一性を指す。より好ましくは、100アミノ酸残基の配列において、それに対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または最も好ましくは少なくとも90%の類似性を有する。

【0041】

【表1】

表1 ヒトIL-18BPに対して高い相同性を示すウイルスにコードされるタンパク質

GenPept 配列	ウイルスのタイプ
MCU60315_54	U60315 伝染性軟属腫ウイルスサブタイプ1
MCU60315_53	U60315 伝染性軟属腫ウイルスサブタイプ1
SWPHLSB_12	L22013 豚痘ウイルス
CV41KBPL_14	牛痘ウイルス
VVCGAA_5	痘瘡ウイルス
U01161_3 174	エクトロメリアウイルス (マウスポックスウイルス)
VVU18340_6	痘瘡ウイルス
VVU18338_7	痘瘡ウイルス
VVU18337_7	痘瘡ウイルス
VARCG_7 173	痘瘡主要ウイルス
MCU60315_51	伝染性軟属腫ウイルス
HNABV_1	非A型、非B型随伴新肝炎ウイルス

【0042】

IL-18BP aはサルのCOS7細胞で発現した。このため、IL-18BP aのcDNAを哺乳類発現ベクターpEF-BOSに挿入した。組換えタンパク質の精製を促進するために、枠内のIL-18BP ORFの3'末端に(His)₆配列をコードするカセットをつけ加えた。COS7細胞を発現ベクターで一過的にトランスフェクションし、これらの細胞の無血清培地(150ml)を濃縮し、金属キレートクロマトグラフィーによって精製した。IL-18BP aは、還元および非還元条件下において銀染色したSDS-PAGE上で単一のバンドとして移動し、尿IL-18BPと同じ見かけ分子量を有した。この調製物のタンパク質配列分析により、尿IL-18BPと同じN末端配列であることが示された。尿IL-18BPに対して生じた抗体を用いたIL-18BP aのイムノブロット分析により、尿タンパク質と同じ分子量バンドが示された。さらに、免疫沈降

に続く SDS - PAGE およびオートラジオグラフィーを用いて、IL - 18 B P a は抗体への結合を尿¹²⁵I - IL - 18 B P と置き換わることができた。したがって、IL - 18 B P a は尿から単離された IL - 18 B P と構造的に一致する。

【0043】

未精製および精製 IL - 18 B P a を IL - 18 の生物学的活性を阻害する能力について試験した。IL - 18 B P a は、マウス脾細胞、P B M C およびヒト K G - 1 細胞系統においてヒトおよびマウス IL - 18 の活性を阻害した（図9）。これらの結果により、生物学的に活性な IL - 18 B P をコードするものと IL - 18 B P a c D N A との同一性が確認される。

【0044】

本発明はさらに、IL - 18 B P およびウイルス IL - 18 B P の突然変異タンパク質および断片、ならびに他のポリペプチドまたはタンパク質を融合させた、野生型 IL - 18 B P およびウイルス IL - 18 B P またはその突然変異タンパク質またはそれらの断片からなり、IL - 18 またはそのホモログに結合できる融合タンパク質に関する。

【0045】

本明細書で用いられるように、「突然変異タンパク質」という用語は、IL - 18 B P の類似体またはウイルス IL - 18 B P の類似体を指し、野生型 IL - 18 B P またはウイルス IL - 18 B P の IL - 18 への結合と比較して得られる産物の能力が相当に変化することなく、天然の IL - 18 B P またはウイルス IL - 18 B P の1つ以上のアミノ酸残基が異なるアミノ酸残基によって置換され、または欠失し、または1つ以上のアミノ酸残基が天然の IL - 18 B P の配列またはウイルス IL - 18 B P に付加する。これらの突然変異タンパク質は、既知の合成および/または部位標的突然変異誘発技術、またはそのための適切な他の既知技術によって調製される。

【0046】

このような任意の突然変異タンパク質は、実質的に IL - 18 B P と同じ活性をもつように、好ましくは、IL - 18 B P と十分に重複的な、またはウイルス IL - 18 B P と十分に重複的なアミノ酸配列を有する。IL - 18 B P の活性の1つは IL - 18 結合能である。突然変異タンパク質が IL - 18 への実質的な結合活性を有する限り、アフィニティークロマトグラフィーによるなどの IL - 18 の精製に使用され得、したがって IL - 18 B P と実質的に同じ活性を有すると考えられ得る。したがって、たとえばラジオイムノ検定またはエリザ（E L I S A）検定といった、適切に標識された IL - 18 に結合するか否かを測定するための簡単なサンドイッチ競合検定にそのような突然変異タンパク質をかけることからなる常套実験により、所与の突然変異タンパク質は IL - 18 B P と実質的に同じ活性を有するか否かが決定され得る。

【0047】

好ましい実施態様において、そのような任意の突然変異タンパク質は、IL - 18 B P またはウイルスにコードされた IL - 18 B P ホモログのいずれかの配列と少なくとも40%の同一性または相同性を有する。より好ましくは、それらに対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または最も好ましくは少なくとも90%の同一性または相同性を有する。

【0048】

本発明にしたがって使用され得る IL - 18 B P ポリペプチドの突然変異タンパク質またはウイルス IL - 18 B P の突然変異タンパク質、またはそれをコードする核酸は、本明細書で与えられる教示および指導に基づいて、過度の実験を行なうことなく、当業者によって常套的に得ることのできる置換ペプチドまたはポリヌクレオチドと実質的に相応する有限集合の配列を含む。タンパク質化学と構造の詳細な説明として、本明細書に参照文献として組み込まれる、シュルツ ジーイー（Schulz, G.E.）ら、タンパク質構造の原理（Principles of Protein Structure）、スプリングー - ベルラグ（Springer-Verlag）社、ニューヨーク、1978年；クレイトン ティーイー（Creighton, T.E.）、タンパク質：構造と分子学的性質（Proteins : Structure and Molecular Properties）、ダブリュエ

10

20

30

40

50

イチ フリーマン (W.H. Freeman) 社、サンフランシスコ、1983年を参照。コドンの優先性などのヌクレオチド配列置換の説明に関しては、前出のオースベル (Ausubel) ら、A. 1. 1 ~ A. 1. 24 および前出のサムブロック (Sambrook) ら、付録 C および D を参照。

【0049】

本発明にしたがって、突然変異タンパク質の好ましい変化は「保存的」置換として知られているものである。IL - 18BP ポリペプチドまたはタンパク質またはウイルス IL - 18BP の保存的アミノ酸置換は、十分に類似の物理化学的性質を有するグループ内の同義アミノ酸を含み、該グループのメンバー間での置換は、グランサム (Grantham)、サイエンス、185巻、862 ~ 864 頁 (1974年) の分子の生物学的機能を保存し得る。アミノ酸の挿入および欠失は、機能を変化させることなく、上記に定義された配列においてもなされ得り、詳細には該挿入または欠失がたとえば30以下、好ましくは10以下の数アミノ酸のみを伴うなら、アンフィンセン (Anfinsen)、「タンパク質鎖の折りたたみを支配する原理 (Principles That Govern The Folding of Protein Chains)」、サイエンス、181巻、223 ~ 230 頁 (1973年) のシステイン残基などの機能的構造に重要なアミノ酸を除去または置換することはない。このような欠失および/または挿入によって産出されるタンパク質および突然変異タンパク質は本発明の範囲内にある。

10

【0050】

しかし、生物学的活性を要求されないシステイン残基は、たとえば IL - 18BP の活性低下をもたらし得る望ましくない分子内または分子間ジスルフィド架橋の形成を避けるために他の残基と置換されてもよい。

20

【0051】

好ましくは、同義アミノ酸グループは表 I で定義されるものである。より好ましくは、同義アミノ酸グループは表 II で定義されるものであり、最も好ましくは、同義アミノ酸グループは表 III で定義されるものである。

【0052】

【表 2】

表 I

同義アミノ酸の好ましいグループ

アミノ酸	同義グループ	
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn	
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His	
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu	
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro	10
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr	
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala	
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val	
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly	
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile	
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe	
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr	20
Cys	Ser, Thr, Cys	
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His	
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln	
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn	
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys	
Asp	Glu, Asn, Asp	
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu	30
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met	
Trp	Trp	

【 0 0 5 3 】

【 表 3 】

表 II

同義アミノ酸のより好ましいグループ

アミノ酸	同義グループ	
Ser	Ser	
Arg	His, Lys, Arg	
Leu	Leu, Ile, Phe, Met	
Pro	Ala, Pro	10
Thr	Thr	
Ala	Pro, Ala	
Val	Val, Met, Ile	
Gly	Gly	
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu	
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe	
Tyr	Phe, Tyr	20
Cys	Cys, Ser	
His	His, Gln, Arg	
Gln	Glu, Gln, His	
Asn	Asp, Asn	
Lys	Lys, Arg	
Asp	Asp, Asn	
Glu	Glu, Gln	30
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu	
Trp	Trp	

【 0 0 5 4 】

【 表 4 】

表 III

同義アミノ酸の最も好ましいグループ

アミノ酸	同義グループ	
Ser	Ser	
Arg	Arg	
Leu	Leu, Ile, Met	
Pro	Pro	10
Thr	Thr	
Ala	Ala	
Val	Val	
Gly	Gly	
Ile	Ile, Met, Leu	
Phe	Phe	
Tyr	Tyr	20
Cys	Cys, Ser	
His	His	
Gln	Gln	
Asn	Asn	
Lys	Lys	
Asp	Asp	
Glu	Glu	30
Met	Met, Ile, Leu	
Trp	Met	

【0055】

本発明における用途のため、IL-18BPポリペプチドまたはタンパク質の突然変異タンパク質、またはウイルスIL-18BPの突然変異タンパク質を得るために用いられ得るタンパク質におけるアミノ酸置換の産生の例として、マーク(Mark)らの米国特許再発行第33,653号、第4,959,314号、第4,588,585号および第4,737,462号；コス(Koths)らの第5,116,943号；ナーメン(Namen)らの第4,965,195号；チョング(Chong)らの第4,879,111号；およびリー(Lee)らの第5,017,691号などで提示されるような既知の方法段階および米国特許第4,904,584号(シャウ(Shaw)ら)で提示されるリシン置換タンパク質が含まれる。

40

【0056】

本発明の好ましい他の実施態様において、IL-18BPまたはウイルスIL-18BPの任意の突然変異タンパク質は、IL-18BPまたはウイルスIL-18BPのアミノ酸配列に本質的に相当する配列を有する。「本質的に相当する」という用語は、とくにIL-18への結合能力の範囲では天然タンパク質の基本的特性に作用せず、力の天然タンパク質の配列に対して微小な変化をもつタンパク質を包含することが意図される。「本質

50

的に相当する」という言葉に収まると一般的に考えられる変化のタイプは、これらのタンパク質をコードするDNAの簡便な突然変異誘発技術に起因するものであり、少数の微小変化をもたらし、上記の方法で所望の活性をスクリーニングする。IL-18への結合に加えて、該突然変異タンパク質はまたIL-18活性を調節および/または遮断し得る。

【0057】

本発明の突然変異タンパク質には、本発明にしたがってストリンジェントな条件下でIL-18BPをコードするまたはウイルスIL-18BPをコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズするDNAまたはRNAなどの核酸によってコードされるタンパク質が含まれる。本発明はまた、所望の核酸の同定および精製におけるプローブとしても有用な核酸も含む。さらに、そのような核酸は、本発明のIL-18BPの機能的活性を保持するポリペプチドをコードするかどうかを決定するための主要な候補でありうる。「ストリンジェントな条件」という用語は、当業者が常習的に「ストリンジェント」と呼ぶハイブリダイゼーションおよびそれに続く洗浄条件を指す。アウスベル(Ausubel)ら、「分子生物学の最新プロトコル」、前出、インターサイエンス(Interscience)社、ニューヨーク、6.3および6.4(1987年、1992年)、および前出のサムブロックらを参照。制約がないならば、ストリンジェントな条件の例には、研究中のハイブリッドの算出T_mから12~20 低く、たとえば2×SSCおよび0.5%SDS中で5分間、2×SSCおよび0.1%SDS中で15分間；37 度で0.1×SSCおよび0.5%SDS中で30~60分間、次いで68 度で0.1×SSCおよび0.5%SDS中で30~60分間の洗浄条件が含まれる。当業者は、ストリンジェントな条件がまた、DNA配列、(10~40塩基などの)オリゴヌクレオチドプローブまたは混合オリゴヌクレオチドプローブの長さにも依存することを理解している。混合プローブが用いられる場合、SSCのかわりに塩化テトラメチルアンモニウム(TMAC)を使用するのが好ましい。前出のアウスベルを参照。

【0058】

本発明はさらに、本発明のIL-18BPをコードするが、遺伝コードの重縮によるコードンの配列において異なる核酸を含む。おそらくストリンジェントな条件下において図4から7で示されるDNA配列にハイブリダイズしないが、それにもかかわらず本発明のIL-18BPをコードできるようなDNAも本発明に含まれる。

【0059】

「融合タンパク質」という用語は、たとえば体液におけるより長い滞留時間を有する他のタンパク質と融合されたIL-18BP、またはウイルスIL-18BP、またはそれらの突然変異タンパク質からなるポリペプチドを指す。したがって、IL-18BPまたはウイルスIL-18BPは、たとえば免疫グロブリンまたはその断片などの他のタンパク質、ポリペプチドなどに融合されてもよい。滞留時間を延ばすためにポリエチレングリコール(PEG)と融合されてもよい。

【0060】

本明細書の「塩」という用語は、IL-18BP、ウイルスIL-18BP、それらの突然変異タンパク質、または融合タンパク質のカルボキシル基の塩およびアミノ基の酸付加塩の両方を指す。カルボキシル基の塩は、当分野で知られる方法によって形成され得、たとえばナトリウム、カルシウム、アンモニウム、鉄、亜鉛の塩などの無機塩、たとえばトリエタノールアミン、アルギニン、リシン、ペペリジン、プロカインなどのアミンで形成される有機塩基との塩が含まれる。たとえば酸付加塩には、たとえば塩酸、硫酸などの鉱酸との塩、および、たとえば酢酸または乳酸などの有機酸との塩が含まれる。もちろん、このようないずれの塩も、IL-18BPに対して実質的に同様の活性を有さなければならない。

【0061】

本明細書で使用される「機能的誘導体」は、IL-18BPまたはウイルスIL-18BP、およびそれらの突然変異タンパク質および融合タンパク質の誘導体を包括し、それらは当分野で知られる方法によって、たとえば残基上の側鎖として存在する官能基またはN

10

20

30

40

50

- もしくはC - 末端基から調製され得、薬学的に許容されうる限り、すなわちIL - 18BPまたはウイルスIL - 18BPの活性と実質的に同様のタンパク質の活性を破壊せず、それを含む組成物に対して毒性を与えない限り本発明に含まれる。これらの誘導体には、たとえばポリエチレングリコール側鎖が含まれ、それは抗原性部位を遮蔽し、体液におけるIL - 18BPまたはウイルスIL - 18BPの滞留を延長しうる。他の誘導体には、カルボキシル基の脂肪族エステル、アンモニアと第1または第2アミンとの反応によるカルボキシル基のアミド、アシル部(たとえばアルカノイルまたは炭素環状アロイル基)で形成されたアミノ酸残基の遊離アミノ基のN - アシル誘導体またはアシル部で形成された(たとえばセリルまたはスレオニル残基の)遊離ヒドロキシル基のO - アシル誘導体が含まれる。

10

【0062】

IL - 18BP、またはウイルスIL - 18BP、突然変異タンパク質および融合タンパク質の「活性断片」として、本発明は、画分が実質的にIL - 18を結合する能力を保持しているならば、単独のまたはたとえば糖またはリン酸残基などのタンパク質分子に結合する関連分子もしくは残基とともにタンパク質分子のポリペプチド鎖の任意の断片もしくは前駆体、それら自身によるタンパク質分子または糖残基の凝集体を包括する。

【0063】

本明細書で使用される「環状変更された誘導体」という用語は、環状分子を産生するために末端が直接的にまたはリンカーを介してともに連結し、続いて本来の分子での末端と異なる末端を有する新しい直線分子を産生するために環状分子が他の位置で開環する直線分子を指す。環状変更には、環状化され、次いで開環する分子と等価な構造の分子が含まれる。したがって、環状変更された分子は直線分子としてデノボ合成されてもよく、環状化および開環段階を経ない。環状変更された誘導体の調製は、国際公開第WO95/27732号公報に記載されている。

20

【0064】

たとえば大腸菌などの原核細胞、または酵母もしくは昆虫細胞などの他の真核細胞などの多様な組換え細胞は、IL - 18BPまたはウイルスIL - 18BPを産生できる。組換え体IL - 18BPまたはウイルスIL - 18BPを産生するために、IL - 18BPをコードし、かつ形質転換(たとえば大腸菌、哺乳類細胞および酵母細胞)または昆虫細胞を感染するのに適したDNAを担う適切なベクターを構築するための方法は当分野でよく知られている。たとえば、アウスベル(Ausubel)ら編、「分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols In Molecular Biology)の最新プロトコル、1993年;およびサムブロック(Sambrook)ら編、「分子クローニング: 実験手引き(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、第2版、コールドスプリングハーバー出版(Cold Spring Harbor Press)、1989年を参照。

30

【0065】

IL - 18BPタンパク質、またはウイルスIL - 18BPの発現のために、IL - 18BPまたはウイルスIL - 18BP、それらの断片、突然変異タンパク質または融合タンパク質、および機能的に連結された転写および翻訳調節シグナルをコードするDNAが、宿主細胞の染色体に所望の遺伝子配列を組み込むことのできるベクターに挿入される。安定して導入DNAを染色体に組み込んだ細胞を選択できるためには、発現ベクターを含む宿主細胞の選択用に1つ以上のマーカーが使用される。該マーカーは、栄養要求性宿主に対するプロトトローフィー、たとえば抗生物質などの生物致死剤耐性、銅などの重金属に対する耐性を与える。選択可能なマーカー遺伝子は、発現されるDNA遺伝子配列に直接的に連結されるか、またはコトランスフェクションによって同じ細胞に導入されうる。さらなる要素もまた、単鎖結合タンパク質mRNAの最適合成に必要とされうる。これらの要素には、転写プロモータ、エンハンサー、および終止シグナルと同様にスプライスシグナルが含まれ得る。

40

【0066】

選択細胞に導入されうるDNA分子は、好ましくは受容宿主において自律複製可能なプラ

50

スミドまたはウイルスベクターに組み込まれる。好ましい原核性プラスミドは p B r 3 2 2 の誘導体である。好ましい真核性ベクターには、B P V、ワクシニア、S V 4 0、2 - マイクロンサイクルなど、またはそれらの誘導体が含まれる。そのようなプラスミドおよびベクターは当分野で周知である(2~5、22)。一度、該ベクターまたは該構築物を含む D N A 配列を発現用に調製すると、発現ベクターは、形質転換、トランスフェクション、リポフェクション、接合、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、直接マイクロインジェクションなどの多様な適した方法のいずれかによって適切な宿主細胞に導入され得る。

【0067】

本発明で使用されうる宿主細胞は、原核性または真核性であり得る。好ましい原核性宿主には、大腸菌、バチルス、ストレプトマイセス、シュードモナス、サルモネラ、セラッティアなどの細菌が含まれる。最も好ましい原核性宿主は大腸菌である。特に重要な細菌宿主には、大腸菌 K 1 2 株 2 9 4 (A T C C 3 1 4 4 6)、大腸菌 X 1 7 7 6 (A T C C 3 1 5 3 7)、大腸菌 W 3 1 1 0 (F⁻、ラムダ⁻、光栄養性 (A T C C 2 7 3 2 5) が含まれる。このような条件下において、該タンパク質はグリコシル化されない。原核性宿主は、発現プラスミドにおいてレプリコンおよび制御配列と和合性がなければならない。

10

【0068】

しかし、天然の I L - 1 8 B P がグリコシル化タンパク質ならば、原核性宿主より真核性宿主が好ましい。好ましい真核性宿主は、たとえばヒト、サル、マウス、およびチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞などの哺乳類細胞であり、なぜならば、それらは正しい部位でのグリコシル化と同様に正しい折りたたみ、正しいジスルフィド結合形成を含むタンパク質分子の翻訳後修飾を提供するためである。酵母細胞および昆虫細胞もまた、高マンノースグリコシル化を含む翻訳後ペプチド修飾を実施しうる。

20

【0069】

強力なプロモータ配列および多コピー数のプラスミドを利用し、酵母および昆虫細胞における所望のタンパク質の産生に利用され得る多数の組換え D N A 戦略が存在する。酵母および昆虫細胞は、クローニングされた哺乳類遺伝子産物においてリーダー配列を認識し、成熟得 I L - 1 8 B P を分泌する。ベクターの導入後、宿主細胞は、ベクターを含む細胞の増殖を選別する選択培地で増殖する。クローン化された遺伝子配列の発現により、I L - 1 8 B P、ウイルス I L - 1 8 B P、それらの融合タンパク質、または突然変異タンパク質または断片が産生される。上述されたクローニング、クローンの単離、同定、特性決定および配列決定手順は、以降の実施例においてより詳細に記載される。

30

【0070】

その後、発現タンパク質は、抽出、沈殿、クロマトグラフィー、電気泳動などを含む任意の常套手法によって、またはたとえばカラム内に含まれるゲルマトリックス上に固定化された抗 - I L - 1 8 B P モノクローナル抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーによって単離および精製される。該組換え I L - 1 8 B P を含む粗調製物をカラムに通し、それにより I L - 1 8 B P を特異的抗体によってカラムに結合させ、一方で不純物を流す。洗浄後、本目的のため通常使用される条件下、すなわちたとえば p H 1 1 または p H 2 などの高いまたは低い p H で該タンパク質をゲルから溶出させる。

40

【0071】

本発明はさらに、哺乳類およびより特異的にはヒトにおける I L - 1 8 B P またはウイルス I L - 1 8 B P またはそれらの誘導体の発現に有用なベクターに関する。哺乳類における遺伝子の短および長期の発現用ベクターは、文献で周知である。たとえば骨格筋、血管平滑筋および肝臓への遺伝子送達により全身レベルの治療タンパク質をもたらすことが、研究によって示されてきた。骨格筋は、その多量性、血管分布、およびアクセス性のため、有用な標的である。しかしながら、他の標的および特異的には免疫細胞の骨髄前駆体もうまく用いられてきた。たとえば筋などにおけるタンパク質発現のための最近入手可能なベクターには、プラスミド D N A、リポソーム、タンパク質 - D N A 共役物ならびにアデノウイルス、アデノ随伴ウイルスおよびヘルペスウイルスに基づくベクターが含まれる。

50

これらのうち、アデノ随伴ウイルス (AAV) に基づくベクターが、遺伝子発現の持続期間およびレベルの点で、ならびに安全性考慮の点で最もうまくいっている (ケスラー ピーデー (Kessler, P.D.)、1996年、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93巻、14082~14087頁)。

【0072】

AAV系のベクターの構築手法は、詳細に記載され (シニダー (Snyder) ら、1996年、ヒト遺伝学における最新プロトコル (Current Protocols In Human Genetics)、12.1.1~12.1.17章、ジョン ウィレイ&ソング (John Wiley & Sons) 社)、本発明に組み込まれる。簡潔には、野生型 AAVゲノムを含むプラスミド p s u b 2 0 1 は、制限酵素 X b a I で切断され、たとえばサイトメガロウイルスプロモータ、コザック 10
共通配列などの効率的な真核プロモータ、I L - 1 8 B P またはウイルス I L - 1 8 B P、またはそれらの突然変異タンパク質または融合タンパク質またはそれらの断片、適切な 3' 非翻訳領域およびたとえばシミアンウイルス 40 のポリアデニル化シグナルなどのポリアデニル化シグナルをコードする DNA 配列からなる構築物と連結する。得られる組換えプラスミドは、たとえばヒト T 2 9 3 細胞などの哺乳類細胞へ、たとえば p A A V / A d などのヘルパー AAV プラスミドでコトランスフェクションする。次いで、該培養物をヘルパーウイルスとしてのアデノウイルスで感染し、48~60時間後に培養上清を回収する。該上清を硫酸アンモニウム沈降により分画し、C s C l 密度勾配で精製し、透析した後、アデノウイルスを破壊するために 5 6 で過熱し、他方で、I L - 1 8 B P またはウイルス I L - 1 8 B P、またはそれらの突然変異タンパク質または融合タンパク質を発 20
現できる、得られる組換え AAV はこの段階で安定である。

【0073】

これまで、可溶性サイトカイン受容体の生理学的役割は確立されていなかった。たとえば TNF 系で示されたように (11、12)、可溶性受容体は特異的なリガンドに結合し、ほとんどの場合それらの生物学的活性を阻害する。たとえば I L - 6 などのごく少数の場合、可溶性受容体が生物学的活性を増強する。T B P (TNF 結合タンパク質) としても知られる組換え可溶性 TNF 受容体は、動物モデルにおいて敗血症ショックを妨げることが見出され、一方、I L - 1 受容体の可溶形態は、マウスの同種移植レシピエントにおけるインピボでのアロ反応性の進行において強い阻害作用を有することが見出された。

【0074】

同様に、本発明の I L - 1 8 B P およびウイルス I L - 1 8 B P は、たとえば I 型糖尿病において、敗血症において、自己免疫疾患において、移植拒絶、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、敗血症、多発性硬化症、急性心臓発作を含む虚血性心臓病、虚血性脳障害、慢性肝炎、乾癬、慢性肝炎、および急性肝炎において、I L - 1 8 活性の調節物質としての用途が見出され得る。したがって、たとえば I L - 1 8 の内因的産生または外因的投与が疾患を誘起するまたは患者の症状を悪化させる任意の疾患において使用され得る。

【0075】

本発明はさらに、薬学的に許容しうる担体および本発明の I L - 1 8 B P もしくはウイルス I L - 1 8 B P またはそれらの活性な突然変異タンパク質、融合タンパク質およびそれらの塩、それらの機能的誘導体または活性断片からなる医薬組成物に関する。

【0076】

本発明はさらに、薬学的に許容しうる担体、および本発明の I L - 1 8 B P またはウイルス I L - 1 8 B P またはそれらの突然変異タンパク質または断片または融合タンパク質のインピボでの発現を達成するために、すなわち遺伝子治療での用途のために、I L - 1 8 B P またはウイルス I L - 1 8 B P またはそれらの突然変異タンパク質、それらの断片または融合タンパク質を発現し、かつヒトおよび他の哺乳類への投与に適した AAV 系のウイルスベクターまたは他のベクターの任意の 1 つのたとえばウイルスベクターからなる医薬組成物に関する。

【0077】

本発明の医薬組成物は、I L - 1 8 B P またはウイルス I L - 1 8 B P、またはそれらの

10

20

30

40

50

誘導体、または発現用ベクターを生理学的に許容しうる担体、および/または安定剤および/または賦形剤と混合することにより、投与用に調製され、たとえば投薬用バイアルでの凍結乾燥による投薬形態で調製される。投薬方法は、同様な薬剤の許容される任意の投与様式を介しうるものであり、たとえば静脈内に、筋内に、皮下的に、局所注射または局部塗布により、または継続注入などにより治療されうる症状に依存する。投与されうる活性化合物の量は、投与経路、治療される疾患および患者の症状に依存する。たとえば局所注射は、静注よりも体重あたり低量のタンパク質を要する。

【0078】

したがって、IL-18の異常な発現から過剰のIL-18に至る、または外因的に投与されたIL-18による合併症の場合の自己免疫疾患、I型糖尿病、慢性関節リウマチ、移植拒絶、炎症性腸疾患、敗血症、多発性硬化症、急性心臓発作を含む虚血性心臓病、虚血性脳障害、慢性肝炎、乾癬、慢性膵炎および急性膵炎および同様な疾患の治療のために、IL-18BP、またはウイルスIL-18BP、またはインビボで前記を発現するベクターが必要とされる。

10

【0079】

本発明はまた、IL-18BPまたはウイルスIL-18BPに対する、ならびにそれらの突然変異タンパク質、融合タンパク質、塩、機能的誘導体および活性画分に対する抗体を含む。「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(MAb)、キメラ抗体、可溶性または結合形態で標識され得る抗体に対する抗-イディオタイプ(抗-Id)抗体、およびヒト化抗体ならびに酵素切断、ペプチド合成または組換え技術などの、しかしこれらに限らない任意の既知技術により提供されるそれらの断片を含むことを意味する。

20

【0080】

ポリクローナル抗体は、抗原で免疫された動物の血清由来の抗体分子の不均一な集団である。モノクローナル抗体は、実質的に抗原に特異的な抗体の均一な集団を含み、その集団は実質的に同様なエピト-ブ結合部位を含む。MAbは当業者に周知の方法により得られ得る。たとえば、コーラー(Kohler)およびミルスタイン(Milstein)、ネイチャー256巻、495~497頁(1975年);米国特許第4,376,110号;アウスベルら編、前出、ハロー(Harlow)およびレーン(Lane)、抗体:実験手引き(ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL)、コールドスプリングハーバーラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)(1988年);およびコリーガン(Colligan)ら編、免疫学の最新プロトコル、グリーン出版協会およびヴィレイ インターサイエンス(Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience)、ニューヨーク、(1992年、1993年)を参照。これらの文献の内容は参照文献として本明細書に完全に組み込まれる。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、GILDを含む任意の免疫グロブリンクラスおよびその任意のサブクラスのものであり得る。本発明のMAbを産生するハイブリドーマは、インビトロ、インサイチュ、またはインビボで培養され得る。インビボまたはインサイチュでの高力価なMAbの産生により、これが現在好ましい産生方法である。

30

【0081】

キメラ抗体は分子であり、それらの異なる部分は異なる動物種に由来し、マウスMAb由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する。キメラ抗体は、適用における免疫原性を減少させるため、および産生の収率を増加させるために主として用いられ、たとえばマウスMAbはハイブリドーマからより高い収率をあげるがヒトにおいてより高い免疫原性を有し、ヒト/マウスキメラMAbが用いられる。キメラ抗体およびその産生方法は、当分野で周知である(キャビリー(Cabilly)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81巻:3273~3277(1984年);モリソン(Morrison)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81巻:6851~6855(1984年);ボウリアネ(Boulianne)ら、ネイチャー312巻:643~646頁(1984年);キャビリー(Cabilly)ら、欧州特許出願125023(1984年11月14日発行);ノイベルガー(Neuberger)ら、ネイチャー314巻:268~270頁(1985年);タニグチ(Taniguchi)ら

40

50

、欧州特許出願 1 7 1 4 9 6 (1 9 8 5 年 2 月 1 9 日 発行) ; モリソン (Morrison) ら、
 欧州特許出願 1 7 3 4 9 4 (1 9 8 6 年 5 月 5 日 発行) ; ノイベルガーら、P C T 出願、
 国際公開第 W O 8 6 / 0 1 5 3 3 号 公 報 (1 9 8 6 年 3 月 1 3 日 発行) ; クドウ (Kudo)
 ら、欧州特許出願 1 8 4 1 8 7 (1 9 8 6 年 6 月 1 1 日 発行) ; モリソンら、欧州特許出
 願 1 7 3 4 9 4 (1 9 8 6 年 5 月 5 日 発行) ; サハガン (Sahagan) ら、J. Immunol. 1 3
 7 巻 : 1 0 6 6 ~ 1 0 7 4 頁 (1 9 8 6 年) ; ロビンソン (Robinson) ら、国際特許出願
 、国際公開第 W O 9 7 / 0 2 6 7 1 号 公 報 (1 9 8 7 年 5 月 7 日 発行) ; リウ (Liu) ら
 、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8 4 巻 : 3 4 3 9 ~ 3 4 4 3 頁 (1 9 8 7 年) ; サン (S
 un) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8 4 巻 : 2 1 4 ~ 2 1 8 頁 (1 9 8 7 年) ; ベタ
 ー (Better) ら、サイエンス 2 4 0 巻 : 1 0 4 1 ~ 1 0 4 3 頁 (1 9 8 8 年) ; およびハ
 ロー (Harlow) およびレーン (Lane)、抗体 : 実験手引き、前出。これらの文献は、参照
 文献として本明細書に完全に組み込まれる。

10

【 0 0 8 2 】

抗 - イディオタイプ (抗 - I d) 抗体は、抗体の抗原結合部位とともに、一般的に独自の
 決定基を認識する抗体である。I d 抗体は、M A b の起源として同じ種および遺伝型の動
 物 (たとえばマウス系統) に抗 - I d が調製される M A b を免疫することにより調製され
 得る。免疫化された動物は、免疫抗体のイディオタイプ決定基を認識し、これらのイディ
 オタイプ決定基 (抗 - I d 抗体) に対する抗体を産生することにより応答する。たとえ
 ば、本明細書に参照文献として完全に組み込まれる米国特許第 4 , 6 9 9 , 8 8 0 号を参照
 。

20

【 0 0 8 3 】

抗 - I d 抗体は、さらに他の動物での免疫応答を誘発し、いわゆる抗 - 抗 - I d 抗体を産
 生するための「免疫原」としても用いられる。抗 - 抗 - I d は、抗 - I d を誘発した源の
 M A b にエピトープが同一であり得る。したがって、M A b のイディオタイプ決定基に対
 する抗体を用いることによって、同一な特異性をもつ抗体を発現する他のクローンを同定
 できる。

【 0 0 8 4 】

したがって、I L - 1 8 B P および本発明の関連タンパク質に対して生じる M A b は、B
 A L B / c マウスなどの適切な動物において抗 - I d 抗体を誘発するために用いられ得る
 。このような免疫化されたマウス由来の脾臓細胞は、抗 - I d M a b を分泌する抗 - I
 d ハイブリドーマを産生するために使用される。さらに、抗 - I d M a b は、キーホー
 ルリンペットヘモシアニン (K L H) などの担体に結合し、さらなる B A L B / c マウス
 を免疫するために用いられ得る。これらのマウス由来の血清は、I L - 1 8 B P エピト
 ープまたはウイルス I L - 1 8 B P のエピトープに対して特異的な始原 M A b の結合性質を
 有する抗 - 抗 - I d 抗体を含む。

30

【 0 0 8 5 】

したがって、抗 - I d M A b は、I L - 1 8 B P またはウイルス I L - 1 8 B P などの
 評価されるエピトープに構造的に類似したそれ自体のイディオタイプエピトープ、すなわ
 ち「イディオトープ」を有する。

【 0 0 8 6 】

「ヒト化抗体」という用語は、たとえばよりヒトの体に和合するよう遺伝工学手法でマウ
 ス抗体を操作することによって得られる抗体を含むことを意味する。そのようなヒト化抗
 体は、低減した免疫原性を有し、ヒトの薬物動態を改善した。これらは、たとえば Molecu
 lar Immunology、3 0 巻、1 6 号、1 4 4 3 ~ 1 4 5 3 頁、1 9 9 3 年におけるヒト化抗
 - T N F 抗体で記載されるような当分野で周知の技術によって調製され得る。

40

【 0 0 8 7 】

「抗体」という用語はまた、完全な分子と同様に抗原に結合できる F a b および F (a b
) 2 などのそれらの断片の両方を含むことを意味する。F a b および F (a b) 2 断
 片は完全な抗体の F c 断片を欠き、血液循環をより速く通過し、完全な抗体より少ない非
 特異的な組織結合を有し得る (ウォール (Wahl) ら、J. Nucl. Med. 2 4 巻 : 3 1 6 ~ 3

50

25(1983年))。FabおよびF(ab')₂および本発明に有用な抗体の他の断片が、完全な抗体分子用に本明細書で開示された方法にしたがって、IL-18BPまたはウイルスIL-18BPの検出および定量化に用いられ得ることが理解されよう。そのような断片は、典型的には(Fab断片を産生するために)パペインまたは(F(ab)₂断片を産生するために)ペプシンなどの酵素を用いるタンパク質分解切断によって産生される。

【0088】

抗体が分子と特異的に反応でき、それによって該分子が抗体に結合する場合、抗体は分子を「結合できる」といわれる。「エピトープ」という用語は、抗体によって結合され得、抗体によって認識もされ得る任意の分子の部分の部分を指すことを意味する。エピトープすなわち「抗原決定基」は、通常アミノ酸または糖鎖などの分子の化学的に活性な表面基からなり、特異的な三次元構造特性および特異的な電荷特性を有する。

10

【0089】

「抗原」は抗体によって結合され得、さらに動物に抗原のエピトープに結合できる抗体を産生することを誘発できる分子または分子の1部分である。抗原は、1つ以上のエピトープを有し得る。上記で言及された特異的な反応は、きわめて選択的な様式で抗原が相応する抗体と反応し、他の抗原によって誘起されうる多数の他の抗体とは反応しない。

【0090】

本発明に有用な抗体の断片を含む抗体は、IL-18BPまたはウイルスIL-18BP、または試料中の関連タンパク質を定量的にまたは定性的に検出するために、または本発明のこのようなタンパク質を発現する細胞の存在を検出するために使用されうる。これは、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、または蛍光定量検出と共益した蛍光標識抗体(以下参照)を用いる免疫蛍光技術によって達成され得る。

20

【0091】

本発明に有用な抗体(またはそれらの断片)は、IL-18BPまたはウイルスIL-18BP、および本発明の関連タンパク質のインサイチュ検出のために免疫蛍光または免疫電子顕微鏡などのように組織学的に使用され得る。インサイチュ検出は、患者から組織学的試料を取り、そのような試料に本発明の標識抗体をあてがうことによって達成され得る。抗体(または断片)は、好ましくは生物学的試料に該標識抗体(または断片)をかけるまたはかぶせることによって提供される。このような手法の使用により、IL-18BPまたはウイルスIL-18BP、または関連タンパク質のみだけでなく、試料組織上の分布も決定できる。本発明を用いて、当業者は、このようなインサイチュ検出を達成するために(染色手法などの)様々な任意の組織学的方法が改変され得ることを容易に理解されよう。

30

【0092】

IL-18BPまたはウイルスIL-18BP、または本発明の関連タンパク質のための検定は、生物学的流体、組織抽出物、リンパ球または白血球、または組織培養でインキュベーションされた細胞などの新鮮に採取された細胞などの生物学的試料をIL-18BPまたは関連タンパク質を同定できる検出可能に標識された抗体の存在下でインキュベーションし、当分野で周知の多数の任意の技術によって抗体を検出することからなる。

40

【0093】

生物学的試料は、ニトロセルロースなどの固相支持体または担体、または細胞、細胞粒子または可溶性タンパク質を固定化できる他の支持体または担体で処理され得る。次いで、支持体または担体は適切な緩衝液で洗浄され、続いて本発明にしたがって検出可能に標識された抗体で処理され得る。次いで、固相支持体または担体は、非結合の抗体を除去するために緩衝液で2回洗浄され得る。その後、固体の支持体または担体上に結合した標識の量は、常套手段によって検出され得る。

【0094】

抗原または抗体に結合できる任意の支持体または担体は、「固相支持体」、「固相担体」、「固体の支持体」、「固体の担体」、「支持体」または「担体」によって意図される。

50

周知の支持体または担体には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロンアミラーゼ、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、ガブロス (gabbros)、およびマグネタイトが含まれる。該担体の性質は、本発明の目的のためにはある程度可溶性であるか、不溶性であるかのいずれかであり得る。支持体材料は、結合分子が抗原または抗体に結合できる限り、事実上任意の可能な構造配置を有し得る。したがって、支持体または担体の構造は、ビーズ、または円筒形のような、試験チューブの内表面、または棒の外表面のような球形であり得る。または、該表面は、シート、試験片などの平坦であり得る。好ましい支持体または担体にはポリスチレンビーズが含まれる。当業者は、抗体または抗原を結合するための他の多くの適切な担体を知っていよう、または常套実験の使用によって上記を確かめることができよう。

10

【0095】

本発明にしたがって所与の多数の抗体の結合活性は、周知の方法にしたがって測定され得る。当業者は、常套実験を行なうことにより各測定用の有効なおよび最適な検定条件を決定できよう。

【0096】

洗浄、攪拌、振とう、ろ過などの他の段階が、慣習的にまたは特定の条件に必要なように、該検定に付け加えられてもよい。

【0097】

本発明の抗体が検出可能に標識され得る方法の1つとして、酵素に上記を結合させ酵素免疫検定 (EIA) で使用する。その結果、この酵素は、後に適切な基質に曝されると、検出される化学的部分を産生するような方法で、たとえば分光光度、蛍光光度または視覚的手段により、基質と反応する。検出可能に抗体を標識するのに使用され得る酵素には、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、スタフィロコッカスクレアーゼ、デルタ - 5 - ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファ - グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホースラディッシュペルオキシターゼ、アルカリフォスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシターゼ、ベータ - ガラクトシターゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース - 6 リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼが含まれるが、これらに限らない。該検出は、酵素に対して色素原基質を用いる比色法により達成され得る。検出はまた、同様に調整された標準と比較して基質の酵素反応の程度の視覚的比較によっても達成され得る。

20

30

【0098】

検出は、様々な他の任意の免疫検定を用いて達成され得る。たとえば、抗体または抗体断片を放射標識することにより、放射免疫検定 (RIA) の使用で IL - 18 BP またはウイルス IL - 18 BP を検出できる。RIA の良い説明は、本明細書に参照文献として組み込まれ、チャード ティー (Chard T.) による「放射免疫検定および関連技術への序論 (An Introduction to Radioimmuno Assay and Related Techniques)」とタイトルされた章に詳しい文献のあるワーク ティーエス (Work, T.S.) らによる分子生物学の実験技術および生物化学 (Laboratory Techniques and Biochemistry In Molecular Biology)、北オランダ出版会社 (North Holland Publishing Company)、ニューヨーク (1978年) に見出される。放射活性アイソトープは、ガンマカウンターまたはシンチレーションカウンターの使用などの方法によりまたはオートラジオグラフィーにより検出され得る。

40

【0099】

本発明の抗体を蛍光化合物で標識することも可能である。蛍光標識された抗体は適切な波長の光に曝すと、その存在が蛍光により検出され得る。最も広く使用される蛍光標識化合物には、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o - フタルアルデヒドおよびフルオレアミンがある。

【0100】

抗体は、¹⁵²Eu または他のランタニド系列などの蛍光放出金属を用いて検出可能に標識され得る。これらの金属は、ジエチレントリアミン 5 酢酸 (ETPA) などの金属キレー

50

ト基を用いて抗体に付着され得る。

【0101】

抗体はまた、ビオチンに結合させることにより検出可能に標識され得る。次いでビオチン化抗体は、蛍光化合物またはペルオキシダーゼなどの酵素または放射活性アイソトープなどに結合したアビジンまたはストレプトアビジンによって検出され得る。

【0102】

抗体はまた、化学発光化合物に結合させることにより検出可能に標識され得る。次いで、化学発光タグ化された抗体の存在により、化学反応の過程で生じる化学発光の存在を検出することにより測定される。特に有用な化学発光標識化合物の例として、ルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩および蓚酸エステルがある。

【0103】

同様に、生物発光化合物は、本発明の抗体を標識するために使用され得る。生物発光は、酵素タンパク質が化学発光反応の効率を増加させる生物学的システムに見出される化学発光の1タイプである。生物発光タンパク質の存在は、ルミネセンスの存在を検出することにより測定される。標識の目的に重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンである。

【0104】

本発明の抗体分子は、「ツーサイト(two-site)」または「サンドウィッチ」検定としても知られるイムノメトリック検定での利用に適用され得る。典型的なイムノメトリック検定において、一定量の非標識抗体(または抗体の断片)が固体の支持体または担体に結合し、検出可能に標識された一定量の可溶性抗体は、固相抗体、抗原、および標識抗体間で形成された3重複合体の検出および/または定量ができるよう添加される。

【0105】

典型的なおよび好ましいイムノメトリック検定には、固相に結合させた抗体をまず試験試料に接触させ、二元固相抗体-抗原複合体の形成によって試料から抗原を抽出する「おもて」検定が含まれる。適切なインキュベーション期間後、固体の支持体または担体を洗浄し、もしあるならば未反応の抗原を含む液体試料の残基を除去し、続いて、未知量の(「レポーター分子」として機能する)標識抗体を含む溶液と接触させる。非標識抗体を介して固体の支持体または担体と結合させた抗原と標識抗体とを複合化させるための第2インキュベーション期間後、固体の支持体または担体を2回洗浄し、未反応の標識抗体を除去する。

【0106】

本発明の抗原に有用でもあり得る「サンドウィッチ」検定の他のタイプには、いわゆる「同時」および「逆」検定も用いられる。「同時」検定は、固体の支持体または担体に結合させた抗体および標識抗体の両方が同時に試験試料に添加されるようにただ1回のインキュベーション段階が含まれる。インキュベーションが完了した後、固体の支持体または担体を洗浄し、液体試料の残基および非複合化標識抗体を除去する。続いて、支持体または担体とともに標識抗体の存在は、慣習的な「おもて」サンドウィッチ検定におけるように測定される。

【0107】

「逆」検定において、まず標識抗体溶液を液体試料に、続いて適切なインキュベーション期間後、固体の支持体または担体に結合させた非標識抗体を添加する段階的な添加が利用される。第2のインキュベーション後に、固相を常套な様式で洗浄し、試験試料の残基および未反応の標識抗体溶液を除去する。次いで、固体の支持体または担体とともに標識抗体の測定は、「同時」および「おもて」検定におけるように測定される。

【0108】

本発明はまた、上記で定義された本発明の任意のタンパク質をコードするDNA分子、任意の該DNA分子からなる複製可能な発現ベクター、発現ベクターで形質転換された原核性および真核性の宿主細胞好ましくはCHO細胞を含む宿主細胞を提供する。本発明はま

10

20

30

40

50

た、ヒトおよび他の哺乳類における発現の目的のために本発明の任意のタンパク質をコードする発現ベクターの産生方法を含む。

【0109】

本発明はまた、本発明の形質転換細胞を培養し、このような形質転換された宿主細胞内で該DNA分子および発現ピヒクルによってコードされるタンパク質を回収することにより本発明の任意のタンパク質の産生方法を含む。

【0110】

IL-18活性の調節におけるIL-18BPまたはウイルスIL-18BPの使用に加えて、それらはもちろんIL-18自身の精製用にも使用され得る。この目的のために、IL-18BPまたはウイルスIL-18BPをアフィニティーカラムに結合させ、粗IL-18を通す。次いで、IL-18がたとえば低pHにおける溶出などにより、カラムから回収され得る。

10

【0111】

本発明は、以下の非制約的な実施例によって説明されよう。

【0112】

実施例1：IL-18結合タンパク質の単離

大腸菌IL-18(2.5mg、ペプロテック(Peprotech)社、ニュージャージー州)を製造業者の説明書にしたがってアフィゲル(Affigel)-10(0.5mg、バイオラッド(BioRad))に結合させカラムに詰めた。粗尿タンパク質(1000倍濃縮、500ml)を0.25ml/分の流速でカラムにかけた。カラムをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で250mlの0.5M NaClで洗浄した。続いて、結合タンパク質をpH2.2の25mMクエン酸およびベンズアミジン(1mM)で溶出し、直に1M Na₂CO₃で中和した。1mlの画分を採取した。該画分をSDS-PAGEおよび銀染色によって分析した。IL-18結合タンパク質を約40,000ダルトンのタンパク質として画分2~8で溶出した(図1)。IL-18BPに相当する約40kDのバンドは、銀染色において明瞭な黄色を呈した。様々な画分を実施例2で記載するように¹²⁵I-IL-18との架橋、SDS-PAGEおよびオートラジオグラフィーによって分析した。IL-18結合タンパク質は画分2~8で見出され、IL-18アガロースゲルカラムから溶出された(図2)。

20

【0113】

実施例2：標識IL-18に対するアフィニティー精製IL-18BPの架橋

アフィニティー精製段階から得られるIL-18BPの試料(40μl)を¹²⁵I-IL-18(5,000,000cpm)とインキュベーション(70分、4℃)した。続いて、ジメチルスルホキシド(Me₂SO、20mM)に溶解したジスクシンイミジルスベリン酸(DSS)を最終濃度が2mMになるよう添加し、混合物を4℃で20分間おいた。pH7.5の1MのTris-HClおよび最終濃度100mMの1M NaClを添加することにより、反応を停止した。ジチオスレイトール(DTT、最終25mM)を含む試料緩衝液を添加し、混合物をSDS-PAGE(7.5%アクリルアミド)、続いてオートラジオグラフィーによって分析した(図2)。

30

【0114】

おそらく約20kDの¹²⁵I-IL-18に架橋した約40kDのタンパク質からなる分子量58kDの特異的バンドがIL-18アフィニティーカラム(レーン2および3)から溶出された画分で観察されたが、他の全ての粗尿タンパク質を含むカラム洗浄(レーン1)では観察されなかった。

40

【0115】

実施例3：タンパク質配列分析

実施例1のアフィニティーカラムから得られた溶出画分を非還元条件下におけるSDS-PAGE(10%アクリルアミド)によって分離し、PVDF膜にエレクトロブロットイングした(プロ-プロット(Pro-Blot)、アプライドバイオシステムズ社(Applied Biosystems)、アメリカ合衆国)。膜をクマシーブルーで染色し、約40kDのバンドを切除

50

し、プロサイスマイクロシークエンサー (Procise microsequencer) (アプライドバイオシステム社、アメリカ合衆国) によるタンパク質配列分析にかけた。つぎの主要配列が得られた:

【0116】

【配列表4】

T-P-V-S-Q-Q-x-x-x-A-A-A

1 . . . 5 . . . 10 . .

【0117】

xはまだ未決定のアミノ酸を表す。

10

【0118】

さらに、微小配列が得られた:

【0119】

【配列表5】

A-x-Y-x-R-I-P-A-x-A-I-A

1 . . . 5 . . . 10 . .

【0120】

この2つの配列のため、より長い配列データを得ることはできなかった。微小配列は、デフェンシンのアミノ酸65で始まるヒトのデフェンシン断片(登録番号p11398)として同定された。主要配列は、blastpおよびtblastn研究プログラムによるNCBIおよびTIGRにおける入手可能な全てのデータベースを調査することにより決定した際に、他の任意の既知タンパク質と結びつかなかった。

20

【0121】

より長くより正確な配列を得るために、ならびに潜在的なシステイン残基を同定するために、IL-18-アガロースカラムから溶出された画分の他のアリコート(6MグアニジンHCl中DTTで還元させ、4-ビニルピリジンと反応させ、マイクロ限外ろ過装置(ウルトラフリー(Ultrafree)、カットオフ10,000ダルトン、ミリポア社(Millipore))によって脱塩し、タンパク質微小配列分析にかけた。サイクル番号1の配列決定後、フィルターをo-フタルアルデヒドと反応させ、Pro以外のN-末端ポリペプチドを遮断した。この方法で、主要配列のみが下記のように得られた:

30

【0122】

【配列表6】

TPVSQXXXAA XASVRSTKDP CPSQPPVFPA AKQCPALEVT

1 10 20 30 40

【0123】

(T=Thr; P=Pro; V=Val; S=Ser; Q=Gln; X=未知; A=Ala; R=Arg; K=LYS; D=Asp; C=Cys; F=Phe; L=Leu; E=Glu)

40

サイクル6、7、8および11において、低レベルのThrシグナルが得られた。この低いレベルのため、本発明者らは該サイクルで特異的なアミノ酸残基を特定しないようより慎重に考慮した。

【0124】

得られる配列は、タンパク質データベースを調査することにより決定されるように他の任意の既知タンパク質の配列と有意に異なる。しかし、tblastn研究プログラムによるTIGRデータベースの調査により、cDNAファイルが与えられ、翻訳されるとオープンリーディングフレーム(218コドン)がIL-18BPのN-末端配列ときわめて相同な配列を含むTHC123801であることが示された。本明細書によって相同性が示され:

50

示唆する(図3B)。内因性IL-18は、マウス脾細胞において高濃度のLPSにより誘導され、IFN- γ が産生される。実際に、LPS(10 μ g/ml)によるIFN- γ 誘導はまた、尿IL-18BPによっても阻害された(図3C)。コンカナバリンA(ConA)はT細胞を活性化し、IL-18不在下においてIFN- γ を産生する(13)。実際に、ConAによるIFN- γ の誘導は高濃度のIL-18BPでさえ阻害されなかった(図3D)。IL-18BPは、IFN- γ 産生の非特異的阻害剤というよりIL-18の生物活性の特異的阻害剤であった。IL-18BPはまた、IL-18およびTNF- α の組合せによって誘導されるヒトのKG-1細胞においてヒトIL-18の活性を阻害した。

【0130】

ヒトおよびマウス単核細胞におけるIFN- γ の共誘導によって測定されるように、上記のデータにより、尿IL-18BPがヒトだけでなくマウスIL-18活性を阻害することが立証される。>90%までIL-18活性を低減したIL-18BPの濃度は、IL-18自身の濃度と同程度であり、これら2つのタンパク質間の高親和的相互作用が示唆される。

【0131】

実施例6：IL-18BPをコードするcDNAクローンの単離

Jurkat T細胞(CRL 8163、アメリカンタイプカルチャーコレクション)をスーパー スクリプト(SuperScript)RNアーゼH⁻逆転写酵素(ギブコビーアールエル社(Gibco-BRL))およびランダムプライマー(プロメガ社(Promega)、ウインズコンシン州マディソン)で逆転写した。続いて、タック(Taq)DNAポリメラーゼ(シグマ(Sigma)社)およびTIGRクローンTHC123801のヌクレオチド24~44(センス)および500~481(逆)に相当するプライマーを用いて、得られるcDNA断片をPCRにより増幅した。増幅は、アニーリング(55 $^{\circ}$ C、2分)および伸張(70 $^{\circ}$ C、1分)の30サイクルで実施した。得られるPCR産物は、アガロース(1%)ゲル電気泳動により分離し、溶出し、pGEM-Tイージー(easy)TAクローニングベクターにクローニングした(プロメガ社)。個々のクローンから得られるDNAをT7およびSP6プライマーで配列決定した。

【0132】

得られる477bpの断片をランダムプライミングによって³²P標識した。様々なヒトcDNAおよびゲノムライブラリーをスクリーニングするために、このプローブを用いた。対のニトロセルロース膜を取り、6 \times SSC、10 \times デンハルト溶液、0.1% SDS および100 μ g/mlのサケ精子DNAからなる緩衝液中で60 $^{\circ}$ Cでプローブとハイブリダイゼーションした。膜を洗浄し、-80 $^{\circ}$ Cで一晩コダック(Kodak)XAR膜に感光させた。対のポジティブクローンをプラーク精製した。プラスミドをpCEV9クローンから切除し、自己連結した。製造業者の説明書にしたがって、他のライブラリーから得られるcDNAクローンを単離した。モデル373Aおよび377シークエンサー(アプライドバイオシステム社)を用いて、単離クローンの自動DNA配列分析を実施した。標準プロトコルにはこれらのクローニング手法が用いられた(33)。

【0133】

つぎのライブラリーがスクリーニングされた： pCEV9クローニングベクター(15)で構築され、ティー ミキ(T. Miki)の厚意により提供されたヒト単球cDNAライブラリー；クローンテック社(Clontech)(カリフォルニア州パロアルト(Palo Alto))からの、ヒトJurkat白血性T細胞cDNAライブラリー、ヒト末梢血白血球cDNAライブラリーおよびヒト脾臓cDNAライブラリー。ラムダFIX I Iベクターのヒト胎盤ゲノムライブラリーはストラタジーン社(Stratagene)(カリフォルニア州、ラジョラ(La Jolla))から入手した。

【0134】

4つの異なるIL-18BPスプライス変異体に相当する全てのcDNAクローンを得、特徴決定された。全てのスプライス変異体は、推定可溶性分泌タンパク質をコードした。

10

20

30

40

50

最も多量のもの (IL-18BP a) は、28 アミノ酸残基のシグナルペプチド、続いて最初の40 残基 (配列番号10) が尿IL-18BP (配列番号2) のN-末端タンパク質配列と完全に一致する推定成熟IL-18BP a をコードする192 コドンのオープンリーディングフレームを有した。システイン残基の位置から、このポリペプチドが免疫グロブリン (Ig) スーパーファミリーに属することを示唆された。成熟IL-18BP a 内の4つの各Gln 残基は潜在的なN-グリコシル化部位であった。IL-18BP の他の3つのスプライス変異体は有意に豊富ではなかった。

【0135】

他の1 kb のIL-18BP b c DNA は85 アミノ酸残基の成熟タンパク質をコードした (配列番号4)。第3の変異体であるIL-18BP c は、169 アミノ酸残基の成熟IL-18BP をコードする2.3 kb のcDNA によって示される (配列番号6)。第4の変異体であるIL-18BP d は133 アミノ酸残基の成熟IL-18BP をコードした (配列番号8)。エキソン内で、プロmRNA に沿ってスプライシングが2つの部位に生じた。IL-18BP d におけるこれらの事象とさらなる5'エキソンにより、多様なcDNA クローンで3つの異なる5' UTR を生じた。したがって、異なるIL-18BP 変異体が明瞭な転写調節シグナルに応答して生じる可能性があり得る。

【0136】

膜貫通ドメインをもつ受容体をコードするcDNA はこれまで見つからなかった。

【0137】

実施例7: 哺乳類発現ベクターの構築、組換えIL-18BP の産生、および組換えIL-18BP の生物学的活性の評価

IL-18BP a cDNA のコード領域は、センスプライマー5' TATATCTAGAGCCACCATGAGACACA ACTGGACACCA および逆プライマー: 5' ATATCTAGATTAAATGATGATGATGATGATGACCCCTGCTGCTGTGTGGACTGC を用いてPCR により増幅した。PCR 産物をXbaI で切断し、pEF-BOS 発現ベクター (25) のXbaI 部位にクローニングし、pEF-BOS-IL-18BP a を得た。該構築物をDNA 配列決定により確認した。

【0138】

記載されているように (35)、pEF-BOS-IL-18BP a プラスミドDNA (10 µg) およびDEAEデキストラン (120 µg) を含む1.4 ml のTD 緩衝液での6 × 10⁷ COS 細胞のバッチを室温で30 分間インキュベーションした。次いで、細胞をDMEM-10% FBS で洗浄し、DMEM-10% で4時間平板培養し、洗浄し、無血清DMEM で3~5日間インキュベーションした。培地を回収し、限外ろ過 (10 kD カットオフ) により6倍に濃縮し、製造業者の説明書にしたがってIL-18BP-His₆ をイミダゾールを用いてタロン (Talon) カラム (クローンテック社 (Clontech)) 上で溶出物として分離した。

【0139】

尿の免疫学的交差反応性およびCOS7 で発現されるIL-18BP をつぎのように評価した: 尿IL-18BP (5 µg) をクロラミンT 法により¹²⁵I で標識した。COS7 細胞の上清 (250 µl) を尿IL-18BP に対する抗体と混合し (1時間、室温、最終容量500 µl)、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、0.05% ツイーン (Tween) 20 および0.5% ウシ血清アルブミン (ウォッシュ緩衝液 (Wash Buffer)) で1:1000 に希釈した。次いで、¹²⁵I 標識された尿IL-18BP (10⁶ cpm) を添加し、1時間後にタンパク質G-セファロース (20 µl) を添加した。混合物を懸濁し (1.5時間、4°C)、続いてビーズを単離し、3 × ウォッシュ緩衝液およびPBS で一回洗浄した。次にビーズを試料緩衝液で溶出し、非還元条件下でSDS-PAGE (10% アクリルアミド) で分離し、オートラジオグラフィを行なった。

【0140】

IL-18BP a は、還元および非還元条件下における銀染色を伴うSDS-PAGE で単一のバンドとして移動し、尿IL-18BP と同様な見かけ分子量を有した (データは

10

20

30

40

50

示さず)。この調製物のタンパク質配列分析により、尿IL-18BPと同様なN-末端配列が明らかにされ、後者はN-末端で分解されなかったことを示唆している。

【0141】

尿IL-18BPに対して生じた抗体を用いるIL-18BPaのイムノプロット分析により、尿タンパク質と同様な分子量バンドが示された。さらに、免疫沈降、続いてSDS-PAGEおよびオートラジオグラフィーを用いて、IL-18BPaが尿¹²⁵I-IL-18BPの抗体への結合と取って代わることができた。したがって、IL-18BPaは尿IL-18BPに構造的に一致する。

【0142】

未精製および精製IL-18BPaをIL-18の生物学的活性を阻害する能力について試験した。IL-18BPaは、用量に依存的な様式でマウス脾細胞、PBMCおよびヒトKG-1細胞系統においてヒトおよびマウスIL-18の活性を誘導するIFN- γ を阻害した(図9)。

10

【0143】

様々な生物学的検定および移動度変位検定(実施例8)の結果から、IL-18活性の阻害がクローンIL-18BPの固有性質であり、尿IL-18BPにおけるデフェンシンの共溶出断片などの任意の付随不純物の性質ではないことが証明された。

【0144】

実施例8：電気泳動移動度変位検定

ヒトKG-1細胞でのNF- κ BのIL-18誘導活性における尿および組換えIL-18BPの作用も研究された。ヒトのKG-1細胞(1mlのRMPi中 4×10^6 個)をhuIL-18(10ng/ml)またはIL-18BP(20分、室温)とあらかじめ混合したhuIL-18のどちらかで刺激した。37°Cで20分後に細胞を氷冷のPBSで3回洗浄し、直ちに液体窒素で凍結した。充填した該細胞容積の3倍の緩衝液A(10mM トリスpH7.6、0.4NaCl、0.2mMEDTA、グリセロール(20%容量)、1.5mM MgCl₂、2mMジチオスレイトール(DDT)、0.4mM PMSF、1mM Na₃VO₄、ロイペプチン、ペプスタチンおよびアプロチニン各2 μ g/ml)に細胞ペレットを再懸濁した。細胞デブリスを遠心(15,000 \times g、15分)により除去し、上清のアリコート液体窒素で凍結し、-80°Cで保存した。標準としてウシ血清アルブミンを用いてブラドフォード検定(バイオ-ラッド(Bio-Rad))によりタンパク質濃度を測定した。NF- κ B結合要素(10pmol、プロメガ社(Promega))に相応する2本鎖オリゴヌクレオチドを[32P]dCTP(300Ci/mmole)およびT4ポリヌクレオチドキナーゼ(ニューイングランドバイオラブ社(New England Biolabs))で標識した。遊離ヌクレオチドをスピカラムによって除去した。IL-18またはIL-18およびIL-18BPで処理された細胞の抽出物(10 μ gタンパク質)をHEPES(pH7.5、10mM)、60mMKCl、1mMMgCl₂、2mMEDTA、1mM DTTおよびグリセロール(5%容量)からなる20 μ lの緩衝液中でポリdIdC(500ng、ファルマシア社(Pharmacia))および変性サケ精子DNA(100ng、シグマ社)とともに標識プローブ(3×10^4 cpm)とインキュベーション(15分、室温)した。続いて、混合物を5%未変性ポリアクリルアミドゲルにかけた。0.5 \times TBE(40mM トリスHCl、45mMホウ酸および2.5mMEDTA)中185Vで電気泳動を行なった。ゲルを真空乾燥し、-80°Cで一晩オートラジオグラフィーを行なった。IL-18は、p50NF- κ Bホモダイマーおよびp65/p50NF- κ Bヘテロダイマーの形成を誘導することが見出された。NF- κ B共通配列に相当する放射標識オリゴヌクレオチドと結合したKG1細胞の抽出物を用いた電気泳動移動度変位検定による測定時に、尿および組換えIL-18BPはIL-18によるNF- κ Bの活性化を阻害した。

20

30

40

【0145】

実施例9：大腸菌、酵母および昆虫細胞におけるIL-18BPの発現

IL-18BPはまた、たとえば大腸菌などの原核細胞または酵母および昆虫細胞などの

50

他の真核細胞などの他の組換え細胞によって産生され得る。任意の I L - 1 8 B P をコードする D N A を担い、組換え I L - 1 8 B P を産生するために大腸菌および酵母細胞の形質転換または昆虫細胞の感染に適する、ふさわしいベクターを構築するため、周知の方法が利用される。酵母細胞での発現のため、I L - 1 8 B P をコードする D N A (実施例 6) を切断し、酵母細胞のトランスフェクションに適した発現ベクターに挿入される。昆虫細胞での発現のため、I L - 1 8 B P をコードする D N A をバキュロウイルスに挿入し、該昆虫細胞を該組換えバキュロウイルスで感染させる。大腸菌での発現のため、I L - 1 8 B P をコードする D N A を適切なオリゴヌクレオチドを用いて部位標的突然変異誘発法にかけ、その結果、開始 A T G コドンが成熟 I L - 1 8 B P の第 1 コドンの直前に挿入される。または、このような D N A を適切なセンスおよびアンチセンスプライマーを用いて P C R により調製され得る。続いて、得られる c D N A 構築物を当分野で周知の技術により適切に構築された原核発現ベクターに挿入される (23) 。

10

【 0 1 4 6 】

実施例 1 0 : I L - 1 8 B P a のインビボ発現のためのアデノ関連発現ベクターの構築

I L - 1 8 B P a をコードする機能的遺伝子は、プラスミド p c D N A 3 (インビトロゲン社 (Invitrogen) 、カリフォルニア州サンディエゴ) に基づいて構築される。5' 端にコザック (Kozak) 共通配列をもつ I L - 1 8 B P c D N A を制限部位を破壊する方法で p c D N A 3 の X b a I 部位に連結する。部位標的突然変異誘発法により、新しい X b a I 部位がネオマイシンカセットの前 (本来の p c D N A 3 配列の塩基 2 1 5 1) かつ S V 4 0 ポリアデニル化シグナルの後 (本来の p c D N A 3 配列の塩基 3 3 7 2) に挿入される。次いで、この構築物を X b a I で切断し、得られる 4 . 7 k b のミニ遺伝子が記載 (シニダー (Snyder) ら、1 9 9 6 年、ヒト遺伝学の最新プロトコル (Current Protocols In Human Genetics) 、1 2 . 1 . 1 ~ 1 2 . 1 . 1 7 章、ジョン Wiley & Sons) のプラスミド p s u b 2 0 1 の X b a I 部位に挿入される。ヘルパー A A V プラスミド p A A V / A d を用いて、得られる組換えプラスミドをヒト T 2 9 3 細胞にコトランスフェクションする。次に、培養物をヘルパーウイルスとしてのアデノウイルスに感染させ、4 8 ~ 6 0 時間のインキュベーション後に細胞を採取する。細胞を 3 回の凍結 - 融解サイクルにかけ、細胞デブリスを遠心により除去し、上清を硫酸アンモニウムで 3 3 % 飽和させる。続いて、混合物を遠心し、該硫酸アンモニウムを 5 0 % 飽和させることにより、上清から r A A V を沈降させる。ウイルスをさらに C s C l により精製し、透析し、いかなるアデノウイルスも破壊するために 5 6 ° C で 1 5 分最終加熱する。

20

30

【 0 1 4 7 】

実施例 1 1 : I L - 1 8 B P の組換え融合タンパク質の構築

I g G 2 重鎖の定常領域と融合させた I L - 1 8 B P からなるタンパク質の産生は次のように実施されうる：適切なオリゴヌクレオチドを用いて、I L - 1 8 B P の D N A を部位標的突然変異にかけ、コード配列の直前および直後に単一の制限部位を導入する。I g G 2 重鎖の定常領域をもつプラスミド、たとえば p R K C O 4 2 F c 1 (6) を部位標的突然変異誘発法にかけ、融合タンパク質の相で翻訳されるように I g G 1 重鎖の A s p 2 1 6 にできるだけ近くに同じ単一の制限部位を導入する。5' 非翻訳配列からなり、I L - 1 8 B P をコードする d s D N A 断片が、単一の制限部位での消化により、または適切に設計されたプライマーを用いた P C R により調製される。変異した p R K C D 4 2 F c 1 は、該プラスミドおよび I g G 1 配列を含む大断片を生じるように同様に設計される。続いて、2 つの断片を連結し、I L - 1 8 B P および I g G 1 重鎖の約 2 2 7 個の C - 末端アミノ酸 (ヒンジ領域ならびに C H 2 および C H 3 ドメイン) からなるポリペプチド前駆体をコードする新しいプラスミドを生じる。融合タンパク質をコードする D N A が適切な制限酵素を用いた消化により該プラスミドから単離され、続いて効率的な原核または真核発現ベクターに挿入される。

40

【 0 1 4 8 】

実施例 1 2 : 化学的に改変された I L - 1 8 B P s の産生

血漿における I L - 1 8 B P の半減期を増加させるため、ポリエチレングリコール (P E

50

G)で化学的に改変されたIL-18BPsが作製されうる。IL-18BP郡市のシステイン残基にPEGを架橋させることにより、改変がなされ得る。アミノ末端に余分のシステイン残基、グリコシル化部位、および各IL-18BPのカルボキシル末端を含む変異体IL-18BPsが構築され得る。所望の変異を含むオリゴヌクレオチドを用いたPCRにより、突然変異誘発が実施され得る。これらの変異タンパク質は当分野で周知の通常の様式で発現される。これらのタンパク質のペギレーション(Pegylation)が実施され、活性が評価される。

【0149】

実施例13：IL-18BPに対するポリクローナル抗体の調製

まず、完全フロイントアジュバンドに乳化された尿IL-18BPの純化調製物5μgをウサギに皮下注射した。3週間後、不完全フロイントアジュバンドのIL-18BP調製物5μgを再び皮下注射した。PBS溶液としてのIL-18BPをさらに2回10日おきに注射した。最終免疫の10日後にウサギから採血した。抗体レベルの進行は放射免疫検定によって追跡された。¹²⁵I-標識IL-18BP(166,000cpm)をウサギ血清の様々な希釈物(1:50、1:500、1:5,000、1:50,000)と混合した。タンパク質-Gアガロースビーズ(20μl、ファルマシア社(Pharmacia))の懸濁物を全容積が200μlになるよう添加した。混合物を1時間室温におき、続いてビーズを3回洗浄し、結合放射活性が測定された。ヒトレプチンに対するウサギ抗血清がネガティブコントロールとして用いられた。IL-18R抗血清の力価は1:500および1:5000の間であり、ネガティブコントロールの力価は1:50より低かった。

【0150】

実施例14：IL-18BPに対するモノクローナル抗体の調製

最初に、完全フロイントアジュバンドの乳化物の精製IL-18BP 2μgを雌Balb/Cマウス(3ヵ月齢)注射し、3週間後、不完全フロイントアジュバンドで皮下注射した。PBSでIL-18BPをさらに3回10日おきに皮下注射した。最終免疫の10日後にウサギから採血した。融合の4および3日前に、最終ブースト(boosts)がIRIAによる測定時に最も高い結合力価を示すマウスの腹腔内に施される(下記参照)。融合は、NSO/1ミエローマ細胞系統および融合パートナーとしての動物の脾臓およびリンパ節からの両方から調製されるリンパ球を用いて融合が実施される。融合細胞は、マイクロ培養プレートに播種し、HATおよび15%馬血清を補足したDMEMでハイブリドーマを選別する。IL-18BPに対する抗体を産生することが見出されるハイブリドーマを限界希釈法でサブクローニングし、腹水産生のためプリスタン(pristane)で初回免疫されたBalb/Cマウスに注射した。抗体のアイソタイプは市販のエリザキット(アマーシャム社(Amersham)、英国)を用いて定義される。

【0151】

抗IL-18BPモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングが次のように実施される：逆固相放射免疫検定(IRIA)により、ハイブリドーマの上清を抗IL-18BP抗体の存在下で試験する。エリザプレート(ダイナテックラボラトリー社(Dynatech Laboratories)、バージニア州アレキサンドリア)をタロンで精製したIL-18BP a-His₆(10μg/ml、100μl/穴)でコーティングする。4で一晩インキュベーション後、プレートをBSA(0.5%)およびツィーン20(0.05%)を含むPBSで2回洗浄し、37で少なくとも2時間洗浄溶液中で遮断する。プレートを3回洗浄し、室温で2時間、ヤギ-抗-マウスホースラディッシュペルオキシターゼ(HRP、ジャックソンラブズ(Jackson Labs)、1:10,000、100μl/穴)の複合物を添加する。プレートを4回洗浄し、基質としてH₂O₂を用いるABTS(2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸、シグマ社)により発色させる。プレートを自動エリザ読み取り機で読み取る。ネガティブコントロール値より少なくとも5倍高いODを与える試料がポジティブと考えられる。

【0152】

実施例15：モノクローナル抗体を用いたIL-18BPのアフィニティークロマトグラ

フィー

IL-18BPに対する抗体は、アフィニティークロマトグラフィーによってIL-18BPの精製に利用される。ハイブリドーマにより分泌されるモノクローナル抗体を含む腹水液を50%飽和の硫酸アンモニウム沈降により精製され、続いてPBSで長い透析を行った。製造業者によって指定されるように、約10mgの免疫グロブリンを1mlのアフィゲル(バイオラッドUSA社(BioRad USA))に結合させる。

【0153】

4 および0.25ml/分の流速で、(250lの粗尿に等価な)250mlのヒト尿タンパク質を0.5mlの抗IL-18BP抗体カラムにかける。洗浄でタンパク質が検出されなくなるまでカラムをPBSで洗浄する。pH2.2の25mMクエン酸緩衝液(8x1カラム容量画分)でIL-18BPを溶出し、直ちに1M Na₂CO₃で中和する。この調製物のさらなる精製物は、サイズ排除クロマトグラフィーにより得られる。

【0154】

実施例16：エリザ試験

マイクロタイタープレート(Microtiter plate)(ダイナテック(Dynatech)またはマキシソープ(Maxisorb)、ヌンク社(Nunc)製)を4で一晩抗IL-18BPモノクローナル抗体(無血清ハイブリドーマ上清または腹水液の免疫グロブリン)でコーティングする。プレートをBSA(0.5%)およびツィーン20(0.05%)を含むPBSで洗浄し、37度で少なくとも2時間同じ溶液で遮断する。試験試料は、遮断溶液で希釈し、37度で4時間ウェルに添加する(100μl/穴)。続いて、プレートをツィーン20(0.05%)を含むPBSで3回洗浄し、4で一晩のさらなるインキュベーションのためウサギ抗IL-18BP血清を添加する。プレートを3回洗浄し、室温で2時間、ヤギ抗-ウサギホースラディッシュペルオキシターゼ(HRP、ジャックソンラブズ(Jackson Labs)、1:10,000、100μl/穴)の複合物を添加する。プレートを4回洗浄し、基質としてH₂O₂を用いるABTS(2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸、シグマ社)により発色させる。プレートを自動エリザ読み取り機で読み取る。

【0155】

実施例17：非グリコシル化ヒトIL-18BPは生物学的に活性である。

【0156】

精製組換えIL-18BP_aをIL-18の生物学的活性を阻害する能力について試験した。IL-18BP_aは、用量に依存的な様式でマウスの脾細胞、PBMCおよびヒトKG-1細胞系統におけるヒトおよびマウスIL-18の活性を誘導するIFN-γを阻害した(図9)。

【0157】

C末端でHis₆タグを有する精製IL-18BP_a(1.5μg、50μl)をpH7.5に調整し、N-グリコシダーゼF(3μl、500,000U/ml、PNGアーゼF、ニューイングランバイオラブ社(New England Biolabs))と混合した。混合物を非還元条件下で37度で24時間インキュベーションした。非還元条件下において試料由来および非消化IL-18BP-His₆由来のアリコートでSDS-PAGEによって分析し、続いてIL-18BPに対する抗体でイムノブロッキングした。IL-18BP-His₆の約40kDのバンドがPNGアーゼ処理画分で消失することが見出され、新規な約20kDのバンドが得られた。該産物の分子量およびPNGアーゼFの特異性から、IL-18BP-His₆充分グリコシル化されたことが示された。

【0158】

PNGアーゼ処理画分、非分解IL-18BP-His₆および緩衝液中にPNGアーゼを含む対照試料をタロンビーズにそれぞれ吸収させ、燐酸緩衝液で洗浄し、イミダゾール(100mM)で溶出した。ヒトIL-18(20ng/ml)、LPS(2μg/ml)およびマウスの脾細胞を用いて、溶出画分を生物検定にかけた。結果を以下の表に示す：

:

10

20

30

40

50

【 0 1 5 9 】

【表 5】

試料	IFN- γ (ng/ml)
対照	7.5
消化していないIL-18BP-His ₆	0
PNGアーゼ処理したIL-18BP-His ₆	0

10

【 0 1 6 0 】

したがって、脱グリコシル化IL-18BPはIL-18活性の調節物質として生物学的に活性であると結論づけられる。

【 0 1 6 1 】

具体的な実施態様の前記記載から、本発明の一般的性質が明らかにされ、最新の知識を応用することにより、そのような具体的実施態様を一般的概念から逸脱することなく容易に改変および/または様々な適用に適応させることが可能であり、したがってそのような適応および改変は開示された実施態様に等価な意味および範囲内で理解されることが意図されるべきであり、意図されているものである。本明細書で用いられる表現または専門用語は説明の目的のためのものであり、限定のためのものではないことが理解されよう。

20

【 0 1 6 2 】

[参照文献]

1. Anderson, D.M., et al., A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 1997.390 (6656): p. 175-179

2. Bollon, D.P., et al. (1980) *J. Clin. Hematol. Oncol.* 10:39-48.

3. Botstein, D., et al. (1982) *Miami Wint. Symp.* 19:265-274.

4. Broach, J. R., in "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Life Cycle and Inheritance", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 445-470 (1981).

30

5. Broach, J. R., (1982) *Cell* 28:203-204.

6. Byrn R. A. et al., 1990, *Nature (London)* 344:667-670.

7. Car, B. D., V. M. Eng, B. Schnyder, L. Ozmen, S. Huang, P. Gallay, D. Heumann, M. Aguet, and B. Ryffel. 1994. Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J. Exp. Med.* 179:1437-44 issn: 0022-1007.

8. Chater, K. F. et al., in "Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology", Akademiai Kiado, Budapest, Hungary (1986), pp. 45-54).

9. Conti, B., J. W. Jahng, C. Tinti, J. H. Son, and T. H. Joh. 1997. Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* 272:2035-2037.

40

10. Dao, T., K. Ohashi, T. Kayano, M. Kurimoto, and H. Okamura. 1996. Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cell-Immunol.* 173:230-5 issn: 0008-8749.

11. Engelmann, H., D. Aderka, M. Rubinstein, D. Rotman, and D. Wallach. 1989. A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J. Biol. Chem.* 264:11974-11980.

12. Engelmann, H., D. Novick, and D. Wallach. 1990. Two tumor necrosis factor-bi

50

- inding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J. Biol. Chem.* 265:1531-1536.
13. Fantuzzi, G., et al., IL-18 regulation of IFN-g production and cell proliferation as revealed in interleukin-1b converting enzyme-deficient mice. *Blood*, 1998. 91: p. 2118-2125.
14. Gryczan, T., "The Molecular Biology of the Bacilli", Academic Press, NY (1982), pp. 307-329).
15. Gutkind, J.S., et al., A novel c-fgr exon utilized in Epstein-Barr virus-infected B lymphocytes but not in normal monocytes. *Molec. Cell. Biol.*, 1991. 11: p. 1500-1507. 10
16. Heremans, H., J. Van Damme, C. Dillen, R. Dijkmans, and A. Billiau. 1990. Interferon gamma, a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman-like shock reactions in mice. *J. Exp. Med.* 171:1853-69 issn: 0022-1007.
17. Izaki, K. (1978) *Jpn. J. Bacteriol.* 33:729-742).
18. John, J. F., et al. (1986) *Rev. Infect. Dis.* 8:693-704).
19. Kendall, K. J. et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169:4177-4183).
20. Kohno, K., J. Kataoka, T. Ohtsuki, Y. Suemoto, I. Okamoto, M. Usui, M. Ikeda, and M. Kurimoto. 1997. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J. Immunol.* 158:1541-1550. 20
21. Maliszewski, C. R., T. A. Sato, T. Vanden Bos, S. Waugh, S. K. Dower, J. Slack, M. P. Beckmann, and K. H. Grabstein. 1990. Cytokine receptors and B cell functions. I. Recombinant soluble receptors specifically inhibit IL-1- and IL-4-induced B cell activities in vitro. *J. Immunol.* 144:3028-3033.
22. Maniatis, T., in "Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 3: Gene Expression", Academic Press, NY, pp. 563-608 (1980).
23. Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
24. Micallef, M. J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1996. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur-J-Immunol* 26: 1647-51 issn: 0014-2980. 30
25. Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acid Res.* 18: 5322-5328.
26. Nakamura, K., H. Okamura, K. Nagata, T. Komatsu, and T. Tamura. 1993. Purification of a factor which provides a costimulatory signal for gamma interferon production. *Infect-Immun* 61: 64-70 issn: 0019-9567.
27. Nakamura, K., H. Okamura, M. Wada, K. Nagata, and T. Tamura. 1989. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect-Immun* 57: 590-5 issn: 0019-9567. 40
28. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1994. The Human Interferon alpha/beta Receptor - Characterization and Molecular Cloning. *Cell* 77: 391-400.
29. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1992. Soluble Interferon-alpha Receptor Molecules Are Present in Body Fluids. *FEBS Lett* 314: 445-448.
30. Novick, D., H. Engelmann, D. Wallach, and M. Rubinstein. 1989. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J. Exp. Med.* 170: 1409-1414.
31. Okamura, H., H. Tsutsui, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori, K. Akita, M. Namba, F. Tanabe, K. Koni 50

- shi, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378: 88-91.
32. Rothe, H., N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and H. Kolb. 1997. Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J-Clin-Invest* 99: 469-74 issn: 0021-9738.
33. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and M. T., *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. ed. 1989, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
34. Simonet, W. S., et al., Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997. 89(2): p. 309-319. 10
35. Sompayrac, L. H. and K. L. Danna, Efficient infection of monkey cells with DNA of simian virus 40. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1981. 78: p. 7575-7578.
36. Sparks, C. A. et al., Assignment of the nuclear mitotic apparatus protein NuMA gene to human chromosome 11q13. *Genomics*, 1993. 17: p. 222-224.
37. Tsutsui, H., K. Nakanishi, K. Matsui, K. Higashino, H. Okamura, Y. Miyazawa, and K. Kaneda. 1996. IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J. Immunol.* 157: 3967-73 issn: 0022-1767.
38. Ushio, S., M. Namba, T. Okura, K. Hattori, Y. Nukada, K. Akita, F. Tanabe, K. Konishi, M. Micallef, M. Fujii, K. Torigoe, T. Tanimoto, S. Fukuda, M. Ikeda, H. Okamura, and M. Kurimoto. 1996. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J. Immunol.* 156: 4274-4279. 20
34. Okayama, H. and Berg, P. (1983) A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 3: 280-289.
39. Yasuda, H., et al., Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*, 1998. 139: p. 1329-1337.

【図面の簡単な説明】 30

【図1】 リガンドアフィニティー精製されたIL-18結合タンパク質のSDS-PAGE (ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動)を示す。(500Lの正常なヒトの尿の限外ろ過により濃縮された)粗尿タンパク質をIL-18アガロースカラムにかけた。このカラムを洗浄し、結合タンパク質をpH2.2で溶出した。溶出画分を中和し、アリコート为非還元条件および銀染色の下でSDS-PAGE (10%アクリルアミド)によって分析した。レーンは、1:粗尿タンパク質(1.5µg、ゲル上にのせた); 2~9:それぞれIL-18アガロースカラムからの溶出1~8; 10:右側に示すようにkDの分子量マーカー。矢印はIL-18BPに相当するバンドを示す。

【図2】 下記の調製の可溶性IL-18結合タンパク質に架橋させた¹²⁵I-IL-18 (見かけ分子量19kD)からなる複合体のSDS-PAGE (7.5%アクリルアミド)のオートラジオグラムを示す。レーン1:IL-18アフィニティーカラムの洗浄。レーン2:IL-18アフィニティーカラムの溶出2。レーン3:IL-18アフィニティーカラムの溶出3。分子量マーカーは(kDで)右側に示す。矢印は架橋した産物を示す(58kD)。 40

【図3】 IL-18BPによるIFN- γ のIL-18誘導産生の阻害を示す。
(A) 直接どちらかを添加する、または尿IL-18BPとあらかじめ混合する(1h、37°C)というLPS (1µg/ml)およびヒトIL-18 (5ng/ml)の示される組合せでマウスの脾細胞を刺激した(24hr、37°C)。培養におけるmuIFN- γ のレベルは24時間後に測定された。
(B) 増加濃度のヒトIL-18BPとあらかじめ混合した(1h、37°C)マウスIL 50

- 18 (10 ng/ml) とともに LPS (1 µg/ml) とマウスの脾細胞をインキュベーションした (24 h)。

(C) 増加濃度のヒト IL-18BP とともに LPS (10 µg/ml) とマウスの脾細胞をインキュベーションした (24 h)。

(D) 増加濃度のヒト IL-18BP とともに ConA (1 µg/ml) とマウスの脾細胞をインキュベーションした (24 h)。

(E) TNF- (20 ng/ml) および huIL-18 (25 ng/ml) のいずれか単独を添加し、または尿 IL-18BP とあらかじめ混合し (1 h、37 °C)、ヒト KG-1 細胞を刺激した。

【図4】 ヒト IL-18BP a cDNA およびタンパク質の配列を示す。シグナルペプチドに下線を施す。

10

【図5】 ヒト IL-18BP b cDNA およびタンパク質の配列を示す。シグナルペプチドに下線を施す。

【図6】 ヒト IL-18BP c cDNA およびタンパク質の配列を示す。シグナルペプチドに下線を施す。

【図7】 ヒト IL-18BP d cDNA およびタンパク質の配列を示す。シグナルペプチドに下線を施す。

【図8】 ヒト IL-18BP 遺伝子の配列を示す。ヒトゲノムクローンの配列 (7.1 kb) を決定し、3つの cDNA ライブラリーから単離された多様な cDNA クローンの配列と比較した。共通の翻訳開始コドンはヌクレオチド 683 ~ 685 である。NuMA 1 遺伝子は、ヌクレオチド 3578 から末端までのマイナス鎖上に位置する。

20

【図9】 ヒトおよびマウスの IL-18 活性における組換え体 IL-18BP の作用を示す。

His₆ でタグをつけた IL-18BP a は、COS7 細胞で一過的に発現し精製された。

(A) ヒト IL-18 (5 ng/ml) を、His₆ でタグをつけた IL-18BP a または RPMI のどちらかとあらかじめ混合し、LPS (1 µg/ml) とともにマウスの脾細胞に添加した。IFN-γ 産生を 24 時間後に測定した。

(B) マウス IL-18 (10 ng/ml) を、His₆ でタグをつけた IL-18BP a または RPMI のどちらかとあらかじめ混合し、LPS (1 µg/ml) とともにマウスの脾細胞に添加した。IFN-γ 産生を 24 時間後に測定した。

30

(C) ヒト IL-18 (25 ng/ml) を、COS7-IL-18BP a または RPMI のどちらかとあらかじめ混合し、IL-12 (10 ng/ml) の存在下でヒト PBM C に添加した。

(D) ヒト IL-18 (25 ng/ml) を、COS7-IL-18BP a または RPMI のどちらかとあらかじめ混合し、TNF-α (20 ng/ml) の存在下でヒト KG-1 細胞に添加した。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Novick, Daniela
 Dinarello, Charles
 Rubinstein, Menachem
 Kim, Soo Hyun
 Veda Research and Development Co. Ltd.

<120> Interleukin-18 Binding Proteins, their Preparation and Use

<130> IL-18 Rubinstein

10

<140>

<141>

<150> 123463

<151> 1999-07-22

<150> 122134

<151> 1997-11-06

<150> 121369

<151> 1997-09-29

<150> 121639

<151> 1997-08-27

20

<150> 121554

<151> 1997-08-14

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1343

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30

<400> 1

```

gagaagagga cgttgtcaca gataaagagc caggctcacc agctcctgac gcatgcatca 60
tgaccatgag acacaactgg acaccagacc tcagcccttt gtgggtcctg ctctgtgtg 120
cccacgtcgt cactctcctg gtcagagcca cacctgtctc gcagaccacc acagctgcca 180
ctgcctcagt tagaagcaca aaggaccctt gcccctccca gcccctcagt ttcccagcag 240
ctaagcagtg tccagcattg gaagtgacct ggccagaggt ygaagtgcca ctgaatggaa 300
cgctgagctt atcctgtgtg gcctgcagcc gcttcccca cttcagcacc ctctactggc 360
tgggcaatgg ttccttcatt gagcacctcc caggccgact gtgggagggg agcaccagcc 420

```

```

gggaacgtgg gagcacaggt acgcagctgt gcaaggcctt ggtgctggag cagctgaccc 480
ctgcccctgca cagcaccaaac ttctcctgtg tgctcgtgga ccctgaacag gttgtccage 540
gtcacctcgt cctggcccag ctctgggctg ggtcgaagggc aaccttgccc cccacccaag 600
aagcccctgcc ctccagccac agcagctccac agcagcaggg ttaagactca gcacagggcc 660
agcagcagca caaccttgac cagagcttgg gtctctacctg tctacctgga gtgaacagtc 720
cctgactgcc tctaggtctg gtggatgctg aacacacccc ctctctctct gctttgggtc 780
ccttctctca ccaaatcaca actccattcc cacctacctg gaaaatcaca gcctccttat 840
aatgcctcct ctccctgcca ttctctctcc acctatccat tagccttctt aacgtccctc 900
tctccacact gctctactgc tcagaaaacca ccaagactgt tgatgcctta gccttgcact 960
ccagggccct acctgcattt cccacatgac tttctggaag cctcccaact attcttgctt 1020
ttcccagaca gctcccactc ccatgtctct gctcatttag tcccgctctc ctccaccgcc 1080
cagcagggga agctcaagc ctgggtgaaa tgctgctctc tcaagtgaagt catcctcttt 1140
cagctctggc cgcattctgc agacttctca tcttcgtgct gtatgttttt tttttccccc 1200
ttcactctaa tggactgttc cagggaaagg atgggggac cagctgcttc ggatccacc 1260
tgtatctgtg tcatcccac atgggtcctc ataaaggatt attcaatgga aaaaaaaaaa 1320
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 1348

```

10

```

<210> 2
<211> 192
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)..(23)

```

20

```

<400> 2
Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu Trp Val Leu Leu
  1             5             10             15
Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala Thr Pro Val Ser
             20             25             30
Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Lys Asp Pro
             35             40             45
Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys Gln Cys Pro Ala
             50             55             60
Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr Leu
             65             70             75             80
Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn Phe Ser Ile Leu
             85             90             95
Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu
             100            105            110

```

30

Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr Gly Thr Gln Leu
 115 120 125

Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala Leu His Ser Thr
 130 135 140

Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg His
 145 150 155 160

Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala Thr Leu Pro Pro
 165 170 175

Thr Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser Ser Pro Gln Gln Gln Gly
 180 185 190

10

<210> 3
 <211> 1038
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 gagaagagga cgttgtcaca gataaagagc caggetcacc agctcctgac gcatgcatca 60
 tgaccatgag acacaactgg acaccagacc tcagcccttt gtgggtcctg ctctctgtgtg 120
 cccacgtcgt cactctcctg gtcagagcca cactctcttc gcagaccacc acagctgcca 180
 ctgcctcagt tgaagcaca aaggacocct gccctccca gcccccagtg ttcccagcag 240
 ctaagcagtg ccagcattg gaagtgaact ggccagaggt ggaagtgcca ctgagctggg 300
 ctgagggcaa ccttgcccc cacccaagaa gccctgccc ccagccacag cagtccacag 360
 cagcagggtc aagactcagc acagggccag cagcagcaca accttgaccs gagcttgggt 420
 cctaccctgtc tacctggagt gaacagtcct tgactgcctg taggctgcgt ggatgcgcaa 480
 cacacccct ccttctctgc ttgggtccc ttctctcacc aaattcaaac tccattccca 540
 cctaccctaga aaatcacagc ctccctataa tgctcctcc cctctgcat ctctctccac 600
 ctatccatta gccttcctaa cgtcctactc ctccactgc tctactgtc agaaaccacc 660
 aagactgtg atgccttagc ctgcactcc agggccctac ctgcatttc cacatgactt 720
 tctggaagcc tcccaactat tcttgcttt cccagacagc tcccactccc atgtctctgc 780
 tcatttagtc ccgtcttct caccgcccc gcaggggaac gctcaagcct gggtgaaatg 840
 ctgcctcttc agtgaagcca tctctttca gctctggccg cattctgcag acttctatc 900
 ttctgtctgt atgtttttt ttcccccct cactctaag gactgttcca gggaaggat 960
 gggggcacc gctgcttcgg atcccaactg tatctgtgtc atccccacat gggtcctcat 1020
 aaaggattat tcaatgga 1038

20

30

<210> 4
 <211> 113
 <212> FRT
 <213> Homo sapiens

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)..(28)

<400> 4
Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu Trp Val Leu Leu
1 5 10 15
Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala Thr Pro Val Ser
20 25 30
Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Lys Asp Pro
35 40 45
Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys Gln Cys Pro Ala
50 55 60
Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Ser Trp Ala Glu
65 70 75 80
Gly Asn Leu Ala Pro His Pro Arg Ser Pro Ala Leu Gln Pro Gln Gln
85 90 95
Ser Thr Ala Ala Gly Leu Arg Leu Ser Thr Gly Pro Ala Ala Ala Gln
100 105 110
Pro

10

20

<210> 5
<211> 7063
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
gaattcgtgg ccgcgtcgac gccagagggg ctaggatgag agacagaggg tgtgatggg 60
ggtgctggga aatgtacccg acottggggc tgggtggctgg gggagtgggt agcctgggaa 120
aggccaggat gtggacggac tggatggca ttgagcctga agtgggtccaa cttgggggttc 180
cccagtgcct aggaaaagtg tcccctgaa tgtcagtgtg aaggtgaagg aggaagcaga 240
tgcctgttca tatgaaaaca aagacctggc tgtgaagagg ggaggcggac accaaagtcc 300
tgacacttgg gcgggacaga attgatctgt gagagactca tctagtccat accctagggtg 360
accctggggg tggcatgggg gtagattaga gatcccagtc tggtatcctc tggagagtag 420
gagtcccagg agctgaaggt ttctggccac tgaactttgg ctaaagcaga ggtgtcacag 480
ctgctcaaga ttccctgggt aaaaagtcaa agtgaatatag agggtcgggg cagtgccttc 540
ccagaaggat tgctcggcat cctgccttc ccagaagcag ctctgggtgt gaagagagca 600
ctgcctccct gtgtgactgg gtgagtcocat attctctott tgggtctcaa ttttgccttc 660

30

cccaatgaag gggtaagatt ggactaggtā agcatcttac aaccatttgt ggtcatgaga 720
 gctggggtgg ggaaggattg tcaactgacc cccccagctc tgtttctaag tgctgaaaga 780
 gctccaggct atgctaoggg agggagaagcc agctactgag gaaaagccaq ctactgagaa 840
 aaagcgggag tggtttacca ttctcctccc ccacctttca ccagagaaga ggacgttgtc 900
 acacataaag agccaggctc accagctcct gacgcatgca tcatgaccat gagacacaac 960
 tggacaccag acctcagccc tttgtgggtc ctgctcctgt gtgcccacgt cgtcactctc 1020
 ctggtcagag ccacacctgt ctgcagacc accacagctg ccactgacct agttaagaagc 1080
 acaaaggacc cctgcccctc ccagcccoca gtgttcccag cagctaagca gtgtccagca 1140
 ttggaagtga cctggccaaga ggtggaagtg ccactgaatg gaaogctgag cttatcctgt 1200
 gtggcctgca gccgcttccc caacttcagc atcctctact ggctgggcaa tggttccttc 1260
 attgagcacc tcccaggccg actgtgggag gggagcacca gccgggaacg tgggagcaca 1320
 ggtacgcagc tgtgcaaggc cttgggtctg gagcagctga cccctgccc gcacagcaac 1380
 aactttctct gtgtgctcgt ggaccctgaa caggttgtcc agcgtcacgt cgtcctggcc 1440
 cagctctggg tgaggagccc aaggagaggg ctccaggaac agggagagct ctgcttccat 1500
 atgtggggag gaaagggctg gctctgccc agcagcctgt gaactaatgc ccagcatccc 1560
 tcaaggtcag ccagacaaaa aggaacttag gtcttgggca gaggaggtgt agcctggggc 1620
 aaagtgatga gatgtccctc ctttctctgg cctgatcctt gtctgccttc acttcccctag 1680
 gctgggctga gggcaacctt gcccccacc caagaagccc tgcccctccag ccacagcagt 1740
 ccacagcagc agggtraaqa cccagcacag ggcagcagc agcacaacct tgaccagagc 1800
 ttgggtctca cctctctacc tggagtgaa cgtcccctgac tgcctgtagg ctgcttggat 1860
 gcgcaacaca ccccctctct ctctgctttg ggtcccctct ctaccacaaat tcaaacctcca 1920
 tccccacctā cctagaaaaat cacagcctcc ttataatgcc tccctcctct gccattctct 1980
 ctccacctat ccattagctt tctaactgtc ctaactctca cactgctcta ctgctcagaa 2040
 accaccaaga ctgtrgatgc cttagccttg cactccaggg ccttaacctgc atttcccaca 2100
 tgactttctg gaagcctccc aactattctt gcttttccca gacagctccc actcccattg 2160
 ctctgctcct ttagtcccgt ctctctcacc gcccccagcag gggaaacgctc aagcctgggt 2220
 gaaatgctgc ctcttcagtg aagtcatcct ctctcagctc tggccgcatt ctgcaagctt 2280
 cctatctctg tgcctgatgt ttttttttc ccccttcact ctaatggact gttccaggga 2340
 agggatgggg gcagcagctg cttcggatcc acactgtatc tgtgtcatcc ccacatgggt 2400
 cctcataaag gattattcaā tggaggcatc ctgacatctg ttcatttagg ctccagttcc 2460
 actcccagga actttgctg tcccacgagg gagtatggga gagatggact gccacacaga 2520
 agctgaaqac aacacctgct tcaggggaa cagggcgtt gaaaaagaaa agagagaaca 2580
 gcccataaag ctcccgggga gcagagggca ctaatggaga gtgggaagag cctggaaaqa 2640
 tgtggcctca ggaaaaggga cgagagaaag gagggtggtat ggaagactca gcaggaaaca 2700
 ggtaggcttc aaagagccta tattcctctt tttcccacac cgatcaagtc aactcagtac 2760
 tcaogggaga aaaaatagact ttatttacaā gtaataacat ttagaaaaqa tccatccccg 2820
 gccctraaaa accttcccct cactccaaat cccaccccag tgcgaagtctg gggaaaggtag 2880
 ggtgtgagct gctgctgaaq gctgtcccc aaccocactc ctgagacaca gggcccctcc 2940
 gtcctgggaa agagcatcct ctggcagggt ctcccaccag gtcagaccca gtcctggact 3000
 tcaagagtga gggcccctgc tgggcccagc caccaggaca gcaggaaaca gggcctactc 3060
 ctcttatggc ccttcttaga tccagaggct aagaggaaqa ctggccaggc ccaaggacct 3120
 agccatcaaa accagctcaā aatctggttg tgatggagaa gtgactttgc tttaaagaaa 3180
 aaggaggaac ggtagggaga gcgcccacac tgtccatgct ccaggccccc tgggcccagct 3240
 ccgagaaggc gccagtgaaq gaccagggac caggccaggg tgggggcagg catcactgtc 3300
 totaggggtt tggctactgt tggcctggga gctgagagaa ggcaactgaga gggacagtag 3360
 gcggaggacc aggtgacggc agcatcgggg acacaggtgg ggccactcac tggtaactggc 3420
 cctttagtgc tttgctgaa agagacacag tcacatggcc agatgagaac ttgctatact 3480
 agcctgcacc cactggctgg gaagatctct tccctgctccc acgcccctgt ctggatcccc 3540

10

20

30

```

tcccttgtga gccccaggg t t t c a g t t g c t g g c t g t g c c t g a g c a g c t c t g g g t g c t c t 3600
ccatgagaat ggggccatct gtctttctctc cttggagagg agctaccagg acagggacac 3660
ctcttaccoc acaccctcca gcagcctggc gtggccocat cttggatgct acttgggtggg 3720
goggtctggg gggtgcccat gctctcatcg ggtttccctc ccccatcctg ccagtgcctc 3780
taccttgccc ttggctcgag ggtgggacc aatggcgqca gcagtggcgg cgtctggctgt 3840
ggtgggtgga atgcgcgag aacggcggg tccactgcga gtgttggggg aagccttggg 3900
cagggccttc ttgagggctc cccgcccgag aaggctgttc cctagcttct tgggtgtgtt 3960
gaggatgctg aaggccatcg actggcgccg gtccagcctgc aaggaagggc tgtcagaccg 4020
ggagacccaa tgcctccttc ccaggccagc gtgctgtgcc acgctgtacc agcaaggctc 4080
cgccaggggc tgccttcctc ccccttcagc ccagcctca cctgtttagt agaagctgga 4140
gctgctttct tctgggcttc agtagtgctc tgtttgcgcc ctctcatgctg gtctcgggga 4200
gtcatggggc gtgggaaaca gctgggtggc ttcttagact atggagaaga ggacagttag 4260
gcagacagta gcaagaggag tccatctga agccaggtgt cttgtcctct cagagctgag 4320
tggaccctgt aagtcaactg gcaacctgct ccccttccca actctggggc agatccttcc 4380
cttcccaaca gtcccatcc atgggtcagg cctttggaga gagggaaaqa gagggggaaq 4440
tgagggaagg agagagaagg ctccctttag tccttggtag gctgggctcg acctgagcac 4500
agtgtctggg taacaccagc gaggccaccg gccctacctc gtagtccag ggcctctggg 4560
gggctctagg gaggaccctc tgcctgctg ccgggtgtgt atgccaagtgc cctcggctat 4620
ctggatttgg tgcctgctgg ctcggcgccg ggtctcttgg gggctctccag ttttcatctc 4680
ctcatctgtg atgggtgcca ggtcagggg aggctgcatg ggtggaagag gttgtcagtg 4740
gaccatagct gtatggagat ggaggaggac ctggggctgt tccagaactc tacactcgcc 4800
cgacacttat ggtcgggacc cttcctgctc acgaggtaga aagacacaag cctccttctc 4860
tgttctgctt tctacctaaq cctggggcaa atggcacaag cagtgcagtc ctgaccagat 4920
tcctctctga gctcctgctc acccccaggg acttccacctc tgagtgcctc ccagctgtct 4980
gttccacctg gaacatgaga aggtcaccoc tccccctctc cggccagtca gtgatccagg 5040
gocctagtgc ttaggctaga tcagcaggtg ggattccaag gaagggcagg gatgggaggc 5100
cctgcacagt gaccccaggc ctcaccctgg actccaggga tagcaggtct tcagatgtgg 5160
ggggcacact cgtttgctgt gctgcagctc tgcactgctg ttccagtcac ccagctgctc 5220
aggctcatcc tggcaagtgc coatgtagaa gctgttctct cctgtggaag gcagggaagt 5280
gggaacaaat gtagcaggag tccggcaggtc acctcctggc cctggtatct tggcagcctt 5340
tgcctgccacc taocccataa acttgaagcc cggcacacca gtctgattca gtgccgcagg 5400
tgcaaggagta cggcacacag actatttcta tccatggggc ttgctcacca ccttctctct 5460
ggagagggca gaagaggcca cacgcagaga ctgctactac actttattca cctgccaagg 5520
cttgggtggc aacaccaga ggaacaaat aaggaccggg aattaattcc caggggctcc 5580
ctgggtgccca aaggacaaga gcttccaaga agagtctggc cagcctggcc tttccagcag 5640
cccatcaccc cctgagaagg gcatggagga ctccccacag ctaagtgtca caattgtgct 5700
gggaatcccg ggcctttaac tctggctaag agtgcctccc acacagccag cccctagatg 5760
ggcaggtaag gaaggccctg aggctgcagg aaggaggggc aggtggagct ggtatgtagc 5820
aaggaggcca gccttggatt tttaaaaagc tttcctcttt tccctgtgoc acgatccacc 5880
ttccagttca attttgggtg atagtaagtc cctgtagtcc cctcaccctg aggggcccc 5940
ctggacaccc cggcctggga acgacagca gaactgcgag tgggtggggc gtagccaggc 6000
aagctgagca gggctgagtt gccataatcg ggagaaccca ggcgagctag agactgagta 6060
gaggagggtg ctgcaggctc agcctgggaa gcaggagcag accgcgtgct gtagaacgat 6120
gagttggcgc tgtctggctc tccacatctc agcttctgga agacagagtg aatctgttgc 6180
agtgtacagt ccttggcact gtacagaagc tccccattcc cttccgaagc cctcagatcc 6240
cacggccatc ccatgtatcc ccaactgctt tgcaaaaggtc cttaaaagtgt gtgtctgcaa 6300
gaaatgggccc ttgtcgacag aagcctcac aagggtgtgc tgatgtgtgc aagactcttc 6360
tacgcatttt tttcatggag tctattcata atgctttgag gtagggaatg cagagtgttt 6420

```

10

20

30

```

atcggcccat tttggagatg aagtgc aaag aaataaaagtg actagcccca aatcacactg 6480
ctaggaagta tcagagctgg ggctaggccc catgtctcct gactagtcag gctcatccca 6540
cagcctctgc tgcacctcag tccaaaacttc cagggccctt accatgttcc agaacttccc 6600
ccaacttctt ggtagcaggg ggcaccctaa acacacaggt cccccctgct gtaccagggg 6660
ccccctctcc cctcctccca aacctccccct tcaagatgtg gaaacaaagg caagggcctg 6720
caqcctgtca ggcagtcacc tgggcagcaa caatgcctct cagctgcatg gggcatgctg 6780
ggaggcacag gatgggctgc agcttcgcca cgttctctcc cttcacctg cacaggctca 6840
gtgctacgca tggagagaat gctagcctta gtcaggaggc agggatctaa tcctagccct 6900
gcctttttct tcagaagtgc ccttaaccaa gtcactgccc tttttaagac ctctcagctt 6960
tcccactgta acatggactg gctgctcacc cctcctgct cctgactgag tgcccagtgc 7020
aaagatgccc ttgagaggaa gtgggaattg ctgacctgac gac 7063

```

```

<210> 6
<211> 197
<212> FRT
<213> Homo sapiens

```

10

```

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)..(28)

```

```

<400> 6
Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu Trp Val Leu Leu
  1           5           10           15

Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala Thr Pro Val Ser
           20           25           30

Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Lys Asp Pro
           35           40           45

Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys Gln Cys Pro Ala
  50           55           60

Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr Leu
  65           70           75           80

Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn Phe Ser Ile Leu
           85           90           95

Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu
 100           105           110

Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr Gly Thr Gln Leu
 115           120           125

Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala Leu His Ser Thr
 130           135           140

```

20

30

Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg His
 145 150 155 160

Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Val Arg Ser Pro Arg Arg Gly Leu Gln
 165 170 175

Glu Gln Glu Glu Leu Cys Phe His Met Trp Gly Gly Lys Gly Gly Leu
 180 185 190

Cys Gln Ser Ser Leu
 195

<210> 7
 <211> 1360
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10

<400> 7
 gggccgccc cgaccacgca gctaaacaca gctaacttga gtcttgagc tcctaaaggg 60
 aagcttctgg aaaggaaggc tcttcaggac ctcttaggag ccaaagaaga ggacgttgtc 120
 acagataaag agccaggctc accagctcct gacgcatgca tcatgaccat gagacacaac 180
 tggacaccag acctcagccc ttgtggtggtc ctgctcctgt gtgccacagt cgtcaacttc 240
 ctggtcagag ccacacctgt ctgcagagcc accacagctg ccaactgcctc agttagaagc 300
 acaaaggacc cctgcccctc ccagccccca gtgttcccag cagctaagca gtgtccagca 360
 ttggaagtga cctggccaga ggtggaagtg ccaactgaat gaacgctgag cttatcctgt 420
 gtggcctgca gccgcttccc caacttcagc atcctctact ggctgggcaa tggttccttc 480
 attgagcacc tcccaggccg actgtgggag gggagcacca gccgggaacg tgggagcaca 540
 ggctgggctg agggcaacct tgcctccccc ccaagaagcc ctgcccctcca gccacagcag 600
 tccacagcag cagggttaag actcagcaca gggccagcag cagcacaacc ttgaccagag 660
 cttgggtcct acctgtctac ctggagtga cagtccctga ctgcccgtag cctgctgga 720
 tgcgcaaac acccccctct tctctgcttt gggctccctc tctcaccaaa ttcaaacttc 780
 attcccacct acctagaaaa tcacagcctc cttataatgc ctctctctcc tgccattctc 840
 tctccacctc tccattagcc ttccctaacgt cctactcctc acactgctct actgctcaga 900
 aaccaccaag actgtrgatg ccttagcctt gcactccagg gccctaactg ctttcccac 960
 atgactttct ggaagcctcc caactattct tgcttttccc agacagctcc cactcccatg 1020
 tctctgctca tttagtcccg tcttctcac cgcctccagca ggggaacgct caagcctggt 1080
 tgaaatgctg cctcttcagt gaagtcctcc tctttcagct ctggccgcat tctgcagact 1140
 tccatctctc gtgctgtag ttttttttt ccccttcac tctaattggc tgttccaggg 1200
 aagggatggg ggcagcagct gottcggatc cactctgtat ctgtgtcctc cccacatggg 1260
 tctcataaaa ggattattca atggaggcat cctgacatct gtccatttag gcttcagttc 1320
 cactcccagg aactttgctt gtcccacgag ggagtatggg 1360

20

<210> 8
 <211> 161
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)..(28)

<400> 8

Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu Trp Val Leu Leu
1 5 10 15

Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala Thr Pro Val Ser
20 25 30

Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Lys Asp Pro
35 40 45

Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys Gln Cys Pro Ala
50 55 60

Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr Leu
65 70 75 80

Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn Phe Ser Ile Leu
85 90 95

Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu
100 105 110

Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr Gly Trp Ala Glu
115 120 125

Gly Asn Leu Ala Pro His Pro Arg Ser Pro Ala Leu Gln Pro Gln Gln
130 135 140

Ser Thr Ala Ala Gly Leu Arg Leu Ser Thr Gly Pro Ala Ala Ala Gln
145 150 155 160

Pro

<210> 9
<211> 7812
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9

gtcgcacggta cccccgggaa agatttaata cgactcacta tagggcggga cagaattgat 60
ctgtgagaga ctcacttagt tcatacccta ggtgaccctg ggggtggcat gggggtagat 120

10

20

30

```

tagagatccc agtctggtat cctctggaga gtaggagctc caggagctga aggtttctgg 180
coactgaact ttggctaagg cagaggtgtc acagctgctc aagattccct ggtaaaaaag 240
tgaaagtgaa atagagggtc ggggcagtg cttcccagaa ggattgctcg gcatcctgcc 300
cttcccagaa gcagctctgg tgctgaagag agcactgcct cctgtgtga ctgggtgagt 360
coatattctc tctttgggtc tcaattttgc cttcccta at gaaggggtaa gattggacta 420
ggtaagcatc ttacaacct ttgtgggtcat gagagctggg ggggggaagg attgtcactt 480
gaccccccca gctctgtttc taagtgtcga aagagctcca ggctatgcta cgggaggaga 540
agccagctac tgaggaaaag ccagctactg agaaaaagcg ggagtggttt accattctcc 600
tcccccaact ttcaccagag aagaggacgt tgtcacacat aaagagccag gctcaaccagc 660
tcttgaccga tgcattcatga ccatgagaca caactggaca ccaggtaggc cttgggggcta 720
cgcatgggca ggcggggtag ggtgaggtct atgaacagaa tggagcaatg ggctaaccgg 780
gagccttcc tccaaggcaa accaccagc gcacctgggtg ctggtgcttt aagaaacctgg 840
gcagatattg tagctctggc tccagctcaa agcttctctg tactctgttc aataaagggc 900
taaggggtgg gtgctgaggg gtccctcttc ccgctctgat tccctggcta gaaccagac 960
atctctgggc tggagttaca tccctaaccc ggagccccc tctgtctcca gacccgctga 1020
cctgtaactg tctttctctc agacctcagc cctttgtggg tctgtctcct gtgtgcccac 1080
gtcgtcactc tctgtgtcag agccacaact gtctcgcaga ccaccacagc tgcactgccc 1140
tcaqttagaa gcacaaaagg cccctgcccc tcccagcccc cagtgttccc agcagctaag 1200
cagtgtccag cattggaagt gacctggcca gagggtggaag tgcactgag taagaaagcac 1260
agtgtgtggg ggtgggttat gggcacagag gttcccaggg tgggttgac tcttgagcgc 1320
cagtccccct ctgcccattg accaccagct gagccagctg ggtgagcac gcaccattct 1380
cccccccaa cccaggtgtca tgggtgcagg ctgggcgag ctcccagat gctccctatc 1440
aaataggaca gagaactcaa gacataagta atggtcacag gacctcccag agccttggtt 1500
gcagtggacc ccaaggccag cccctccacc cagagcctgc tggcctctgg ccatctcaga 1560
ggagcagcag ccatccagca ctgcctctgt cacctgggct cccaagtcac cgaggctggg 1620
cactagaaaa ggtcatcctg aggagacagg ttcagaagag gattcatcac gtgaaccaag 1680
gaccattcct cacattcccc gtgtttaggg ctagggcctc tgggagacaa ctgcacttct 1740
gtaacggacg tccccacctg ggtggtgtgc agagcagttc tctaggttcc agatgcatgg 1800
ggactggggg gagctggcag agagggcaca gcagagcagg gtagggggaag ggcctgctct 1860
tctgaagagc taactgtctg ctgtgtccct agatggaaag ctgagcttat cctgtgtggc 1920
ctgcagccgc tcccccaact tcagcatcct ctactggctg ggcaatggtt ccttcattga 1980
gcacctccca ggcgcactgt gggaggggag caccaggtga gggctgcagc agccaggtgg 2040
gtgggaagga agccttctgc ggccttctca tgaccttcc tccccctccg ctccagccgg 2100
gaaactggga gcacaggtac gcagctgtgc aaggccttgg tgcctggagca gctgacccct 2160
gccctgcaca gcaccaact ctctctgtgt ctctgtggacc ctgaacaggt tgtccagcgt 2220
cacgtctctc tggcccagct ctgggtgagg agcccaagga gaggcctcca ggaacaggag 2280
gagctctgct tccatattgt gggaggaag ggtgggctct gccagagcag cctgtgaact 2340
aatgcccagc attcctcaag gtcagccaga caaaaaggaa cttaggtctt gggcagagga 2400
ggtgtagcct ggggcaaagt gatgagatgt cctcctttc cttggcctga tccctgtctg 2460
ccttcaactc cctaggctgg gctgagggca accttgcctc ccaccaaga agccttgcct 2520
tccagccaca gcagtcaca gcagcagggt taagactcag cacaggcca gcagcagcac 2580
aaccttgacc agagcttggg tctacctgt ctacctggag tgaacagctc ctgactgcct 2640
gtaggctgag tggatgagca acacacccc tcttctctg ctttgggtcc cttctctcac 2700
caaatcaaaa ctccattccc acctacctag aaaatcacag cctccttata atgcctctc 2760
ctctgcatc tctctctcca cctatccatt agccttctca acgtcctact cctcacactg 2820
ctctactgct agaaaccac caagactgt gatgccttag ccttgoactc cagggcccta 2880
cctgcatttc ccacatgact ttctggaagc ctcccaacta ttcttgcctt tcccagacag 2940
ctcccaactc catgtctctg ctcatctagt cccgtcttcc tcaccgcccc agcaggggaa 3000

```

10

20

30

cgctcaagcc tgggtgaaat gctgctctt cagtgaagtc atcctctttc agctctggcc 3060
gcattctgca gacttccctat ctctogtctg tatgtttttt ttttccccct tcactctaata 3120
ggactgttcc aggggaaggga tgggggcagc agctgcttcc gatccacact gtatctgtgt 3180
catccccaca tgggtcccca taaaggatta ttcaatggag gcatcctgac atctgttcat 3240
ttaggcttca gtccactcc caggaacttt gcctgtccca cgaggagta tgggagagat 3300
ggactgccac acagaagctg aagacaacac ctgcttcagg ggaacacagg cgcttgaaaa 3360
agaaaagaga gaacagccca taatgctccc cgggagcaga ggccactaat ggagagtggg 3420
aagagcctgg aaagatgtgg cctcaggaaa agggatgaga gaaaggaggt ggtatggag 3480
actcagcagg aacaaggtag gcttcaaaag gcctatattc ctctttttcc cacaccgac 3540
aagtcaactc agtactcacg ggagaaaaat agactttatt tacaagtaat aacatttaga 3600
aaagatccat cccgggcoct taaaaacctt cccatcactc caaatcccac cccagtgcac 3660
gtctggggaa ggtagggtgt gactgtctgc tgaaggctgt cccccaacct cactcctgag 3720
acacagggcc catccgtcct gggaagagc atcctctggc aggtgctccc accaggtcag 3780
accagtcct ggacttcaag agtgagggcc cctgctgggc ccagccacca ggacagcagg 3840
aaccagggcc tactcctctt atggctccct ctagatccag aggctaagag gaagactggc 3900
caggcccaag gacccagcca tcaaaaccag cctcaaatct ggttctgatg gagaagtgc 3960
tttgccttaa gaaaaaagga ggcaaggtag ggagagcgc cacactgtcc atgctccagg 4020
ccccctggc cagctccag aaggcgcag tgaaggacca gggaccaggc cagggtgccc 4080
gcaggcatac ctgtctctag ggtcttggct actgttggcc tggggctga gagaaggcac 4140
tgagagggac agtagccga ggaccagggt acggcagcat cggggacaca ggtggggcca 4200
ctcactggta ctggccctt agtgccttgc ctgaaagaga cacagtccca tggccagatg 4260
agaacttgcg ataactagct gcacccactg gctgggaaga tctcttctg ctcccacgcc 4320
cctgtctgga tccccctct tgtgagcccc agggttatca gttgctggct gtgctgagc 4380
agctctgggt gctctccatg agaatggggc catctgtctt ctctccttgg agaggagcta 4440
ccaggacagg gacacctctt acccccacac ctccagcagc ctggcgtggc cccatcttgg 4500
atgctacttg gtggggcggt ctgggggggt cccatgtctt catcgggttt cctccccca 4560
tcctgccagt gcctctacct tgcccttggc tcgaggggtg gcaccaatgg cggcagcagt 4620
ggcggcctg gctgtgtgg tggcaatgcg cggagaacgg cgggttccac tgcgagtgtt 4680
gggggaagcc ttggacaggg ccttcttga ggtccccgc cgcagaaggc tgttccctag 4740
ctctctgggt gtgttgagg tgcgaaaggc catcagactg cgcgggtcag cctgcaagga 4800
agggcttca gaccgggaga ccaaatgctg ccttcccagg ccagcgtgct gtgccacgct 4860
gtaccagcaa ggtcccgcga gggcgtcgt tcatccccct tcagccccag cctcacctgt 4920
ttagtagaag ctggagctgc tttctcttgg gcctcagtag tgetctgttt gcgcccctca 4980
tgtcggcttc ggggagtcac ggggcgtgg aaacagctgg tggcctctt agactatgga 5040
gaagaggaca gttagcaga cagtagcaag aggagtcaca tctgaagcca ggtgtcttgt 5100
cctctcagag ctgagtgagc ctgtgaagtc aacgtgcaac ctgctcccc tcccactct 5160
gggccagatc ctccccct caacagttcc catccatggg tcaggccctt ggagagaggg 5220
aaagagaggg ggaagtgagg gaaggagaga gaaggctccc tttagtcctt ggtgagctgg 5280
gcctgacctg agcacagtgc tggagtaaca cccaggagcc accgoccta cctcaggagt 5340
tccaggggcc tgggtggggct ctaggagac ccgtttgcgc tgctgcccgg tggatgacc 5400
agtcccctg gctatctgga tggctgcat gctggctcg cgcagggct cttgggggtc 5460
tccagtttt atctcctcat ctgtgatggt gcccaggctc agggaaaggct gcatgggtgg 5520
aagagggtgt cagtggacca tagctgtatg gagatggagg aggacctgg gctgttccag 5580
aactctacac tcgcccgaca cttatggtcg ggacccttcc tgcctacgag gtagaaagac 5640
acaagcctcc tttcctgttc tgccttctac ctaagccctg ggcaaatggc acaagcagtg 5700
cagtcctgac cagattcctc tctgagctcc tgcctacccc cagggacttc acccctgagt 5760
gccctccagc tgtctgttcc acctggaaca tgagaaggtc accccttccc ctcttccggc 5820
agtcagtgat ccagggccct agtgcctcagg ctagatcagc aggtgggatt ccaaggaagg 5880

10

20

30

```

gcaggggatgg gaggcctgc acagtgaccc caggcctcac cctggactcc agggatagca 5940
ggtccttcaga tgtggggggc acactcgatt gcgctgctgc agctctgcaa tgcgggtcca 6000
gtcatccagc tgctcaggct catcctggca agtgcccatg tagaagctgt tccttcctgt 6060
ggaaggcagg gaagtgggaa caaatgagcc tggagtcggc aggtcacctc ctggccctgg 6120
catcttgcca gcctttgctg ccacctaccc cataaacttg aagcccggca caccagtctg 6180
atlcagtgcc gcaggtgagc gagtacggca cacagactat ttctatccta ggggcttgc 6240
caccaccttc tcctggaga gggcagaaga ggtcacacgc agagactgct actacatctt 6300
atccacctgc caaggcttgg tggccaacac ccagaggaac aaattaagga ccgggaatta 6360
atccaccagg gctccctggg gcccaaaagga caagagcttc caagaagagt ctggccagcc 6420
tggcctttcc agcagcccat caccgcctga gaagggcatg gaggactccc cacagctaag 6480
tgtcacaatt gtgctgggaa tcccgggccc ttaactctgg ctaagagtgc ccccaacaca 6540
gccagccctt agatgggagc gtaaggaaag ccctgaggct gcaggaagga ggggcagggtg 6600
gagctggatg gtagcaagga gcccagcctt ggatttttaa aaagcttcc tcctttccct 6660
gtgccacgat ccacctcca gtctaatttt ggggtatagt aagtccctgt agtccctca 6720
cctggagggg cccactgga cccccggcc tgggaacgac gaggcagaact gcgagtgggtg 6780
gggcggtagc caggcaagct gaggcaggct gagttgcat aatcgggaga acccaggcga 6840
gctagagact gtagtaggga ggtggctcgc aggctagcct gggaaagcagg agcagaccgc 6900
gtgctgtaga acgatgagtt ggcgctgtct ggctcttcca catctagctt ctggaagaca 6960
gagtgaaatt gttgcagtgt acagtcctc gcaactgtaca gaagcttccc attccctcc 7020
gaagccccca gatcccacgg cacatccatg tattcccaac tgctttgcaa aggtccctaa 7080
agtgtgtgtc tgcaagaaat gggccttgtc gacagaagcc ctccacaagg ggtgctgatg 7140
ttgtcaagac tcttctacgc atttttttca tggagctctat tcataatgct ttgaggtagg 7200
gaatgcagag tgtttatcgg cccattttgg agatgaagtg caaagaaata aagtgactag 7260
ccccaaatca cactgctagg aagtatcaga gctggggcta ggccccatgt ctccctgacta 7320
gtcaggctca tcccacagcc tctgctgtcc ctcaagccaa acttccaggg cccttaccat 7380
gttccagaac ttcccccaac ttcttggtag cagggggcac cctaaacaca caggtcccc 7440
ctgctgtacc aggggcccc tctccctcc tcccaaacct ccccttcaag atgtggaaac 7500
aaaggcaagg gcctgcagcc tgtcaggcag tccactgggc agcaacaatg cctctcagct 7560
gcabggggca tgtgggagg cacaggatgg gctgcagctt cgccacgttc tctccctca 7620
ccctgcacag gctcagtgct acgcatggag agaatgctag ccttagtcag gaggcagga 7680
tctaatecca gccctgcctt tttcttcaga agtgccctta accaagtcac tgccctttt 7740
aaagaccttc agctttcca ctgtaacatg gactggctgc tcatccctcc ctgctcctga 7800
ctgagtgccc ag 7812

```

10

20

30

```

<210> 10
<211> 40
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 10
Thr Pro Val Ser Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser
  1             5             10             15
Thr Lys Asp Pro Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys
             20             25             30
Gln Cys Pro Ala Leu Glu Val Thr
             35             40

```

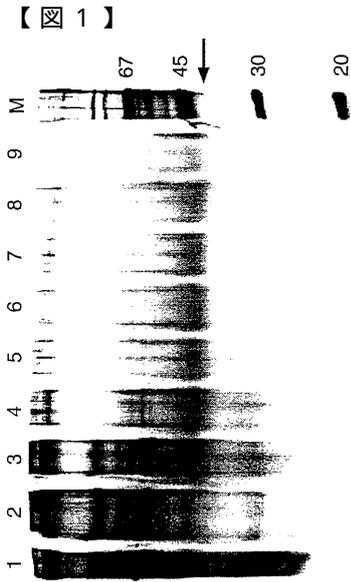


FIG. 1

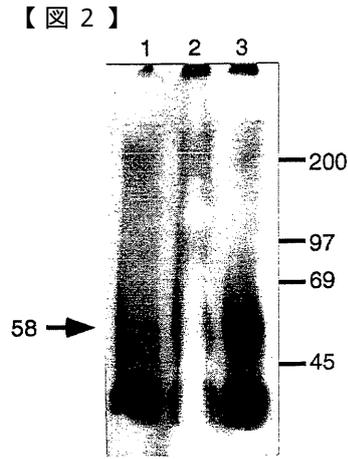


FIG. 2

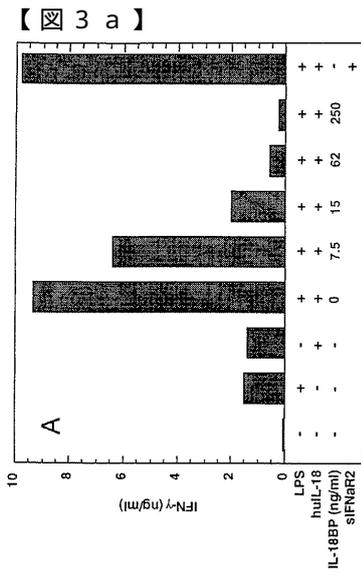


FIG. 3a

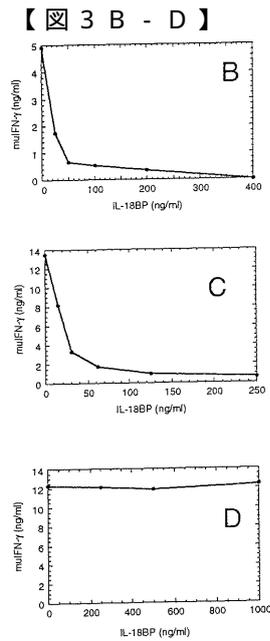


Fig. 3 B-D

【 図 3 E 】

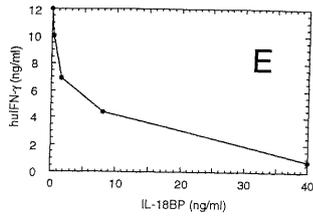


Fig. 3E

【 図 4 】

IL-18Bpa; DNA配列

長さ:1348 1997年12月14日15時41分 タイプ:N チェック:2207

1 GAGAAGAGGA CGTTGTGACA GATAAAGAGC CAGGCTCACC AGTCCTGAC
51 GCATGCATCA TGACCATGAG ACACAAGTGG ACACCAGACC TCAGCCCTTT
101 GTGGGTCCTG CTCCTGTGTG CCCACGTGT CACTCTCTG GTCAGAGCCA
151 CACCTGTCTC GCAGACCACC ACAGCTGCCA CTGCCTCAGT TAGAAGCACA
201 AAGGACCCCT GCCCTCCCA GCCCCAGTG TTCCAGCAG CTAAGCAGTG
251 TCCAGCATTG GAAGTGACCT GGCCAGAGGT GGAAGTGCCA CTGAATGGAA
301 CGCTGAGCTT ATCCTGTGTG GCCTGCAGCC GCTTCCCAA CTTGAGCATC
351 CTCTACTGGC TGGGCAATGG TTCTTCATT GAGCACCTCC CAGGCCGACT
401 GTGGGAGGGG AGCACCAGCC GGGAACGTGG GAGCACAGGT ACGCAGCTGT
451 GCAAGGCCTT GGTGCTGGAG CAGCTGACCC CTGCCCTGCA CAGCAACAAC
501 TTCTCCTGTG TGCTCGTGA CCCTGAACAG GTTGCCAGC GTCACGCTGT
551 CCTGGCCAG CTCTGGGCTG GGCTGAGGGC AACCTTGCC CCCACCCAAG
601 AAGCCCTGCC CTCAGCCAC AGCAGTCCAC AGCAGCAGGG TTAAGACTCA
651 GCACAGGGCC AGCAGCAGCA CAACCTGAC CAGAGCTGG GTCTACCTCA
701 TCTACCTGGA GTGAACAGTC CCTGACTGCC TGTAGGCTGC GTGGATGCGC
751 AACACACCCC CTCCTTCTCT GCTTTGGGTC CCTTCTCA CCAAATTCAA
801 ACTCCATTCC CACCTACTA GAAAATCACA GCCTCCTTAT AATGCCTCT
851 CCTCCTGCCA TTCTCTCTCC ACCTATCCAT TAGCCTTCT AACGTCTAC
901 TCCTCACACT GCTCTACTGC TCAGAAACCA CCAAGACTGT TGATGCCTTA
951 GCCTTGCACT CCAGGGCCCT ACCTGCATTT CCCACATGAC TTTCTGGAAG
1001 CCTCCAACT ATTCTTGCTT TTCCAGACA GCTCCCACT CCATGTCTCT
1051 GCTCATTTAG TCCCGTCTTC CTCACCGCC CAGCAGGGGA ACGCTCAAGC
1101 CTGTTGAAA TGCTGCCTCT TCAGTGAAGT CATCTCTTT CAGCTCTGGC
1151 CGCATTCTGC AGACTTCTA TCTTCGTGCT GTATGTTTT TTTTCCCCC
1201 TTCACTTAA TGGACTGTT CAGGGAAGGG ATGGGGGCAC CAGCTGCTTC

【 図 4 A 】

1251 GGATCCACAC TGTATCTGTG TCATCCCCAC ATGGGTCTTC ATAAAGGATT
1301 ATTCAATGGA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

(配列番号1)

IL-18Bpa;タンパク質配列

長さ:192 1998年6月5日13時39分 タイプ:P チェック:3073

1 MRHNWTPDLS PLVVLLCAH VVTLVLRATP VSQTTAATA SVRSTKDPCP
51 SQPPVFPAAK QCPALEVTWP EVEVPLNGTL SLSCVACSRF PNFSLYWLK
101 NGSFIEHLPK RLWEGSTSRE RGSTGTQLCK ALVLEQLTPA LHSTNFSCVL
151 VDPEQVVQRH VVLAQLWAGL RATLPPTQEA LPSSHSPQQ QG

(配列番号2)

【 図 5 】

IL-18Bpb; DNA配列

長さ:1038 1998年6月19日14時10分 タイプ:N チェック:8005

1 GAGAAGAGGA CGTTGTGACA GATAAAGAGC CAGGCTCACC AGTCCTGAC
51 GCATGCATCA TGACCATGAG ACACAAGTGG ACACCAGACC TCAGCCCTTT
101 GTGGGTCCTG CTCCTGTGTG CCCACGTGT CACTCTCTG GTCAGAGCCA
151 CACCTGTCTC GCAGACCACC ACAGCTGCCA CTGCCTCAGT TAGAAGCACA
201 AAGGACCCCT GCCCTCCCA GCCCCAGTG TTCCAGCAG CTAAGCAGTG
251 TCCAGCATTG GAAGTGACCT GGCCAGAGGT GGAAGTGCCA CTGAGCTGGG
301 CTGAGGGCAA CCTTGCCCC CACCAAGAA GCCCTGCCCT CCAGCCACAG
351 CAGTCCACAG CAGCAGGGTT AAGACTCAGC ACAGGGCCAG CAGCAGACA
401 ACCTTGACCA GAGCTTGGGT CCTACCTGTC TACCTGGAGT GAACAGTCCC
451 TGACTGCCTG TAGGCTGCGT GGATGCGCAA CACACCCCTT CCTTCTCTGC
501 TTTGGGTCCC TTCTCTCACC AAATTCAAAC TCCATTCACA CCTACTAGA
551 AAATCACAGC CTCCTTATAA TGCCTCTCC TCTGCCATT CTCTCTCCAC
601 CTATCCATTA GCCTTCTAA CGTCTACTC CTCACACTGC TCTACTGCTC
651 AGAAACCACC AAGACTGTTG ATGCCTTAGC CTTGCACTCC AGGGCCCTAC
701 CTGCATTTC CACATGACTT TCTGGAAGCC TCCCAACTAT TCTGTCTTT
751 CCCAGACAGC TCCACTCCC ATGTCTCTGC TCAATTAGTC CCGTCTCTCT
801 CACCGCCCA GCAGGGGAAC GCTCAAGCTT GGTTGAAATG CTGCCTCTTC
851 AGTGAAGTCA TCCTCTTTCA GCTCTGGCCG CATTCTGCAG ACTTCTATC
901 TTGCTGCTGT ATGTTTTTTT TTTCCCTT CACTCTAATG GACTGTCCA
951 GGGAAAGGAT GGGGGACCA GCTGCTCGG ATCCACACTG TATCTGTGTC
1001 ATCCACAT GGGTCTCAT AAAGGATTAT TCAATGGA

(配列番号3)

【 図 5 A 】

huIL-18BPb
クローン-m7
ペプチド

I MRHNWTPD LSPLWVLLLC AHVVTLVRA TPVSTTTAA TASVRSKDP
49 CPSQPPVFFA AKQCPALEVT WPEVEVPLSW AEGNLAPHPR SPALQPQST
99 AAGLRLSTGP AAAQP*

(配列番号4)

【 図 6 】

huIL-18BPc;seq 長さ:7063 1998年7月16日19時47分 タイプ:N チェック:9314

1 GAATTCGCGG CCGCGTCGAC GCCAGAGGG CTAGGATGAG AGACAGAGGG
51 TGTGATGGTG GGTGCTGGGA AATGTACCCG ACCTTGGGGC TGGTGGCTGG
101 GGGAGTGGGT AGCCTGGGAA AGGCCAGGAT GTGGACGGAC TGGTATGGCA
151 TTGAGCCTGA AGTGGTCCAA CTGGGGTTC CCCAGTGCTC AGGAAAGTTG
201 TCCCTTGAA TGTCAGTGTG AAGGTGAAGG AGGAAGCAGA TGCCTGTTCA
251 TATGGAAACA AAGACCTGGC TGTGAAGAGG GGAGCGGCAC ACCAAAGTCC
301 TGACACTTGG GCGGGACAGA ATTGATCTGT GAGAGACTCA TCTAGTTCAT
351 ACCCTAGGTG ACCCTGGGGG TGGCATGGGG GTAGATTAGA GATCCCACTC
401 TGGTATCCTC TGGAGAGTAG GAGTCCCAGG AGCTGAAGGT TTCTGGCCAC
451 TGAACCTTGG CTAAGCAGA GGTGTACACG CTGCTCAAGA TTCCCTGGTT
501 AAAAAAGTAA AGTGAATAG AGGGTCGGGG CAGTCTTTC CCAGAAGGAT
551 TGCTCGCAT CCTGCCCTC CCAGAAGCAG CTCTGGTCTC GAAGAGAGCA
601 CTGCCCTCCT GTGTGACTGG GTGAGTCCAT ATTCTCTCTT TGGGTCTCAA
651 TTTTGCCTTC CTAATGAAG GGGTAAGATT GGAAGTGGTA AGCATCTTAC
701 AACCAATTTG GTTCATGAGA GCTGGGGTGG GGAAGGATTG TCACTTGACC
751 CCCCAGCTC TGTTTCTAAG TGCTGAAAGA GCTCCAGGCT ATGCTACGGG
801 AGGAGAAGCC AGCTACTGAG GAAAAGCCAG CTAAGTAGAA AAAGCGGGAG
851 TGGTTTACCA TTCTCTCCC CCACCTTCCA CCAGAAGA GAAGCTTGTG
901 ACACATAAAG AGCCAGGCTC ACCAGTCTCT GACGCATGCA TCATGACCAT
951 GAGACACAAC TGGACACCAG ACCTCAGCCC TTTGTGGTCT CTGCTCCTGT
1001 GTGCCACAGT CGTCACTCTC CTGGTCAGAG CCACACCTGT CTGCAGAGCC
1051 ACCACAGCTG CCATGCTCTC AGTTAGAAGC ACAAGGACC CCTGCCCTC
1101 CCAGCCCCCA GTGTTCCAG CAGCTAAGCA GTGTCCAGCA TTGGAAGTGA
1151 CCTGGCCAGA GGTGGAAGTG CCACTGAATG GAACGCTGAG CTTATCCTGT
1201 GTGGCTGCA GCCCTTCCC CACTTCAGC ATCTCTACT GGCTGGGCAA

【 図 6 A 】

1251 TGGTTCCTTC ATTTGACACC TCCCAGGCCG ACTGTGGGAG GGGAGACCA
1301 GCCGGGAACG TGGGAGCACA GGTACGCAGC TGTGCAAGGC CTTGGTGCTG
1351 GAGCAGCTGA CCCCTGCCCT GCACAGCAC ACCCTCTCCT GTGTGCTCGT
1401 GGACCTGAA CAGGTTGTC AGCCTCAGCT GTCCTGGCC CAGCTCTGGG
1451 TGAGGAGGCC AAGGAGAGGC CTCAGGAAC AGGAGGAGCT CTGCTTCCAT
1501 ATGTGGGGAG GAAAGGGTGG GCTCTGCCAG AGCAGCCTGT GAACTAATGC
1551 CCAGCATTC TCAAGGTGAG CCAGACAAA AGGAACTTAG GTCTTGGGCA
1601 GAGGAGGTGT AGCCTGGGGC AAAGTGTGA GATGTCCTC CTTTCTTGG
1651 CTGATCCTT GTCTGCTTC ACTTCCCTAG GCTGGGCTGA GGGCAACCTT
1701 GCCCCCAACC CAAGAAGGCC TGCCCTCCAG CCACAGCAGT CCACAGCAGC
1751 AGGGTTAAGA CTCAGCACAG GGCAGCAGC AGCACAACCT TGACCAGAGC
1801 TTGGGTCTA CCGTCTACC TGGAGTGAAC AGTCCCTGAC TGCTGTAGG
1851 CTGCGTGGAT GGGCAACACA CCCCCTCCTT CTCTGCTTG GGTCCCTTCT
1901 CTCACCAAT TCAAACCTCA TTCCCACTA CCTATGAAA CACAGCCTC
1951 TTATAATGCC TCCTCTCCT GCAATTTCTT CTCACCTAT CCATTAGCT
2001 TCCTAACGTC CTACTCTCA CACTGCTCA CTGCTCAGAA ACCACCAAGA
2051 CTGTTGATGC CTTAGCCTTG CACTCCAGG CCCTACTGAC ATTTCCACA
2101 TGACTTTCTG GAAGCCTCCC AACTATTTCT GCTTTTCCA GACAGCTCCC
2151 ACTCCCATGT CTCTGCTCAT TTAGTCCCGT CTTCTCACC GCCCAGCAG
2201 GGGAACGCTC AAGCTGGTT GAAATGCTGC CTCTCAGTG AAGTCACTCT
2251 CTTTCAGCTC TGGCCGATT CTGCGACTT CCTATCTTCG TGCTGATGT
2301 TTTTTTTTC CCCCTCACT CTAATGGACT GTTCCAGGGA AGGGATGGGG
2351 GCAGCAGCTG CTTGGATCC ACAGTGTAT TGTGTATCC CCACATGGGT
2401 CCTCATAAAG GATTATTCAA TGGAGGATC CTGACATCTG TTCATTTAGG
2451 CTTCACTCC ACTCCAGGA ACTTTGCTG TCCACAGGG GAGTATGGGA
2501 GAGATGGACT GCCACACAGA AGCTGAAGAC AACACTGCTT TCAGGGGAAC

Fig. 6A

【 図 6 B 】

2551 ACAGGCGCTT GAAAAAGAAA AGAGAGAACA GCCCATAATG CTCCCAGGGA
2601 GCAGAGGCCA CTAATGGAGA GTGGGAAGAG CTTGGAAAGA TGTGGCTCA
2651 GGAAGAGGGA TGAGAGAAA GAGGTGGTAT GGAAGACTCA GCAGAAACAA
2701 GGTAGGCTTC AAAGAGCTA TATTCCTCTT TTTCCACAC CGATCAAGTC
2751 AACTCAGTAC TCACGGGAGA AAAATAGACT TTATTTACAA GTAATAACAT
2801 TTAGAAAAGA TCCATCCCGG GCCCTTAAA ACCTTCCCAT CACTCCAAAT
2851 CCCACCCAG TGCAAGTCTG GGGAAAGTAG GGTGTGAGCT GCTGTGAAAG
2901 GCTGTCCCC AACCCACTC CTGAGACACA GGGCCATCC GTCCTGGGAA
2951 AGAGCATCCT CTGGCAGTG CTCCCACCA GTCAGACCA GTCTGGACT
3001 TCAAGAGTGA GGGCCCTGC TGGCCAGC CACCAGGACA GCAGGAACCA
3051 GGGCCTACTC CTCTTATGT CCCTTCTAGA TCCAGAGGT AAGGAAGA
3101 CTGGCCAGC CCAAGGACC AGCCATCAA ACCAGCTCA AATCTGGTTG
3151 TGATGGAGAA GTGACTTGC TTTAAGAAA AAGGAGGCAA GGTAGGGAGA
3201 GCGCCACAC GTTCCATGT CCAGGCCCCG TGGCCAGCT CCGAGAAGGC
3251 GCCAGTGAAG GACCAGGAC CAGGCCAGGG TGGGGCAGG CATCACTGTC
3301 TCTAGGGTT TGGCTACTGT TGGCTGGGA GCTGAGAGAA GGCAGTGA
3351 GGGCAGTAG GCGGAGGACC AGGTGACGC AGCATCGGG ACACAGGTGG
3401 GGCCTACTC TGGTACTGG CTTTATGTC TTTGCTGAA AGAGACACAG
3451 TCACATGCC AGATGAGAAC TTGGGATACT AGCTGCACC CACTGGCTGG
3501 GAAGATCTCT TCCTGCTCC ACGCCCTGT CTGGATCCCC TCCTTGTGA
3551 GCCCAGGGT TATCAGTTG TGGCTGTGCC TGAGCAGCTC TGGGTGCTCT
3601 CCATGAGAA TGGGCCATCT GTCTTCTCTC CTTGGAGAG AGTACCAGG
3651 ACAGGGACAC CTCTTACCC ACACCTCCA GCAGCTGGC GTGGCCCAT
3701 CTTGGATGCT ACTTGGTGG GCGGTCTGGG GGGTCCCAT GCTCTCATCG
3751 GGTTCCTCT CCCCCTCTG CAGTGCCTC TACTTGCCT TTGGCTCGAG
3801 GGGTGGCACC AATGGCGGA GCAGTGGCG CCGTGGCTGT GGTGGTGGCA

Fig. 6B

【 図 6 C 】

3851 ATGCGCGGAG AACGGCGGGT TCCACTCGGA GTGTTGGGGG AAGCCTTGGG
3901 CAGGGCCTTC TTTGAGGCTC CCCGCCGAG AAGGCTGTTT CCTAGCTTCT
3951 TGGGTGTGTT GAGGATGCTG AAGGCCATCG ACTGGCCCGG CTCAGCCTGC
4001 AAGGAAGGGC TGTGAGACCG GGAGACCCAA TGTGCTCTC CCAGGCCAAG
4051 GTGCTGTGCC ACGCTGTACC AGCAAGGTCC CGCCAGGGCG TCGTTCATC
4101 CCCCTTCAGC CCCAGCTCA CTTGTTTGTG AGAAGCTGGA GCTGCTTCT
4151 TCTGGGCTTC AGTAGTCTC TGTTCGCCC CTTCATGTCG GTCCTGGGGA
4201 GTCATGGGGC GTGGGAACA GCTGGTGCCC TTCTTAGACT ATGGAGAAGA
4251 GGACAGTTAG GCAGACAGTA GCAAGAGGAG TCACATCTGA AGCCAGGTGT
4301 CTTGCTCTCT CAGAGCTGAG TGGACCTGT AAGTCAACGT GCAACTGTCT
4351 CCCCTTCCCA ACTCTGGGCC AGATCTTCC CTCCCAACA GTTCCCATCC
4401 ATGGGTCAAG CCCTTGGAGA GAGGGAAGA GAGGGGAAG TGAGGGAAGG
4451 AGAGAGAAGG CTCCTTTAG TCTTGGTGA GCTGGCCCTG ACCTGAGCAC
4501 AGTGCTGGAG TAACACCCAG GAGCCACCGC GCCTACTCA GGAATTCAG
4551 GGCCCTGGTG GGGCTCTAGG GAGACCGCTT TGCGCTGCTG CCGGGTGGTG
4601 ATGCCAGTGC CCTCGGCTAT CTGGATTGGC TGCATGCTGG CTCGGCCGAG
4651 GGCTCTTGG GGGTCTCCAG TTTTCACTC CTCATCTGTG ATGGTGCCCA
4701 GGCTCAGGGA AGGCTGCATG GGTGGAAGAG GTGGTCACTG GACCATAGCT
4751 GTATGGAGAT GGAGGAGGAC CTGGGGCTGT TCCAGAACT TACACTCGCC
4801 CGACACTTAT GGTGCGGACC CTTCCTGCTC ACGAGGTAGA AAGACACAAG
4851 CCTCCTTCC TGTCTCTGTT TCTACTAAG CCTCGGCCAA ATGGCACAAG
4901 CAGTGCAGTC CTGACCAAGT TCTCTCTGA GCTCCTGCTC ACCCCAGGG
4951 ACTTACCACC TGAGTGCCTC CAGCTGTCT GTTCCACTCG GAACATGAGA
5001 AGGTCAACCC TTCCCTCTT CGGCCAGTCA GTGATCCAG GCCCTAGTGC
5051 TCAGGCTAGA TCAGCAGGTG GGATTCAAAG GAAGGGCAGG GATGGGAGGC
5101 CCTGCACAGT GACCCAGGC CTCACCTGG ACTCCAGGGA TAGCAGGTT

Fig. 6C

【 図 6 D 】

5151 TCAGATGTGG GGGGCACACT OGATTGGCT GCTGCAGCTC TGCAATGCGG
5201 TTCCAGTCAT CCAGCTGCTC AGGCTCATCC TGGCAAGTGC CCATGTAGAA
5251 GCTGTTCTTT CCTGTGGAAG GCAAGGAAAT GGGAAACAAAT GAGCCTGGAG
5301 TCGGCAGGTC ACCTCCTGGC CCTGGCATCT TGCCAGCCTT TGCTGCCACC
5351 TACCCCAATA ACTTGAAGCC CGGCACACCA GTCTGATTCA GTGCCGACGG
5401 TGCAGGAGTA CGGCACACAG ACTATTTCTA TCCTAGGGGC TTGCTCACCA
5451 CCTTCTCCTT GGAGAGGGCA GAAGAGGTCA CACCCAGAGA CTGCTACTAC
5501 ATCTTATTCA CCTGCCAAGG CTTGGTGGCC AACACCAGA GGAACAAAT
5551 AAGGACCGGG AATTAATTC CAGGGGCTCC CTGGTGCCCA AAGGACAAGA
5601 GCTTCCAAGA AGAGTCTGGC CAGCCTGGCC TTTCCAGCAG CCCATCACCG
5651 CCTGAGAAGG GCATGGAGGA CTCCCACAG CTAAGTGTA CAATGTGCT
5701 GGGAAATCCG GGCCTTAACT TCTGGCTAAG AGTGCCCCCA ACACAGCCAG
5751 CCCCTAGATG GGCAGGTAAG GAAGGCCCTG AGGCTGCAGG AAGGAGGGGG
5801 AGGTGGAGCT GGATGGTAGC AAGGAGGCCA GCCTTGGATT TTTAAAAGC
5851 TTTCTCTTT TCCCTGTGCC ACGATCCACC TTCCAGTCTA ATTTGGGGT
5901 ATAGTAAATC CCTGTAGTCC CCTCACTGG AGGGGCCCA CTGGACACCC
5951 CGGCCTGGGA ACGACGAGCA GAACTGCGAG TGGTGGGGCG GTAGCAGGC
6001 AAGCTGAGCA GGGCTGAGTT GCCATAATCG GGAGAACCCA GGGGAGCTAG
6051 AGACTGAGTA GAGGAGTGG CTCGCAAGCT AGCCTGGAA CAGAGACAG
6101 ACCCGTGTCT GTAGAAGAT GAGTTGGCGC TGTCTGGCTC TTCCACTCT
6151 AGCTTCTGGA AGACAGAGT AATCTGTTGC AGTGTACAGT CCTGGCACT
6201 GTACAGAGC TTCCATTCC CTCCGAAGC CCTCAGATCC CACGGCACAT
6251 CCATGTATTC CCAACTGCTT TGCAAAGTCT CTTAAAGTGT GTGTCTGCAA
6301 GAAATGGGCC TTGTGACAG AAGCCCTCAC AAGGTGGTGC TGATGTTGTC
6351 AAGACTCTTC TACGATTTT TTTGATGGAG TCTATTCTA ATGCTTTGAG
6401 GTAGGGAATG CAGAGTGT TTCCGCCCAT TTTGAGATG AAGTCAAAG

Fig. 6D

【 図 6 E 】

6451 AAATAAAGTG ACTAGCCCA AATCACACTG CTAGGAAGTA TCAGAGCTGG
6501 GGCTAGGCCC CATGTCTCCT GACTAGTACG GCTCATCCCA CAGCCTCTGC
6551 TGTCCCTCAG TCACAACTTC CAGGGCCCTT ACCATGTCC AGAACTTCCC
6601 CCAACTTCTT GTAGTACAGG GGCACCCATA ACACACAGGT CCCCCCTGCT
6651 GTACCAGGGG CCCCCTCTCC CCTCTCCCA AACCTCCCT TCAAGATGTG
6701 GAAACAAAGG CAAGGCCCTG CAGCCTGTC GGCAGTCCAC TGGGCAGCAA
6751 CAATGCCTCT CAGCTGCATG GGGCATGCTG GGAGGCACAG GATGGCTGC
6801 AGCTTCGCCA CGTTCCTCTC CTTCACCTG CACAGGCTCA GTGCTACGCA
6851 TGGAGAGAAT GCTAGCCTTA GTCAGGAGGC AGGGATCTAA TCCTAGCCCT
6901 GCCTTTTTCT TCAGAAGTGC CCTTAACCAA GTCAGTCCCT TTTTAAAGAC
6951 CTCTCAGCTT TCCCACTGTA ACATGGACTG GCTGCTATC CCTCCCTGCT
7001 CTGACTGAG TGCCACAGTC AAAGATGCC TTAGAGGAA GTGGGAATTG
7051 CTGACCTGTC GAC

(配列番号5)

IL-18BPc;タンパク質

長さ:197 1998年6月5日13時41分 タイプ:P チェック:3353

1 MRHNWTPDLS PLWVLLCAH VVTLVLRATP VSQTTAATA SVRSTKDCPC
51 SQPPVFFPAK QCPALEVTP EVEVPLNGL SLSCVACSRF PNFSLYLWLG
101 NGSFIEHLP RLWEGSTRE RGSTGTQLCK ALVLEQLTPA LHSTNFCVL
151 VDPEQVVQRH VVLAQLWVRS PRRRLQEQUE LCFHMWGGKG GLCQSSL

(配列番号6)

【 図 7 】

IL-18BPd;DNA

長さ:1360 1998年6月19日14時55分 タイプ:N チェック:8757

1 GCGGCCCGCT CGACCAAGCA GCTAAACACA GCTAACTTGA GTCTTGGAGC
51 TCCTAAAGGG AAGCTTCTGG AAAGGAAGGC TCTTCAGGAC CTCTTAGGAG
101 CCAAGAAGA GGACGTTGTC ACAGATAAAG AGCCAGGCTC ACCAGTCTCT
151 GACGCATGCA TCATGACCAT GAGACACAAC TGGACACCAG ACCTCAGCCC
201 TTTGTGGGTC CTGCTCCTGT GTGCCACGT CGTCACTCTC CTGGTCAGAG
251 CCACACCTGT CTCGACAGACC ACCACAGCTG CCACTGCCTC AGTTAGAAGC
301 ACAAAGGACC CCTGCCCTC CCAGCCCCCA GTGTTCCAG CAGCTAAGCA
351 GTGTCCAGCA TTGGAAGTGA CCTGGCCAGA GGTGGAAGTG CCACTGAATG
401 GAACGCTGAG CTTATCCTGT GTGGCCTGCA GCCGCTTCCC CAACTCAGC
451 ATCCTCTACT GGCTGGGCAA TGGTCTCTTC ATTGAGACCC TCCAGGCCG
501 ACTGTGGGAG GGGAGCACCA GCCGGGAAGC TGGGAGCACA GGCTGGGCTG
551 AGGGCAACCT TGCCCCCACC CCAAGAAAGC cTGCCCTCCA GCCACAGCAG
601 TCCACAGCAG CAGGGTTAAG ACTCAGCACA GGGCCAGCAG CAGCACAACC
651 TTGACCAGAG CTTGGGCTCT ACCTGTCTAC CTGGAGTGA GAGTCCCTGA
701 CTGCTGTAG GCTGCGTGGG TGCGCAACAC ACCCCCTCTC TCTCTGCTTT
751 GGGTCCCTTC TCTCACAAA TTCAAaCTCC ATTCCCACCT ACCTAGAAAA
801 TCACAGCCTC CTTATaATGC CTCCTCCTCC TGCCATTCTC TCTCCACTA
851 TCCATTAGCC TTTCTAACGT CTACTCCTC ACACTGCTCT ACTGCTCAGA
901 AACCACCAAG ACTGTTGATG CCTTAGCCTT GCACTCCAGG GCCCTACCTG
951 CATTTCCCAC ATGACTTTCT GGAAGCCTCC CAACTATTCT TGCTTTTCCC
1001 AGACAGCTCC CACTCCCATG TCTCTGCTCA TTTAGTCCCG TCTTCTCAC
1051 CGCCCCAGCA GGGGAACGCT CAAGCCTGGT TGAATGCTG CCTTTCAGT
1101 GAAGTCATCC TCTTTACGCT CTGGCCGCA TCTGACAGT TCCTATCTTC
1151 GTGCTGATG TTTTTTTTTT CCCCTTCAC TCTAATGGAC TGTTCCAGGG

【 図 7 A 】

1201 AAGGGATGGG GGCAGCAGCT GCTTCGGATC CACACTGTAT CTGTGTATC
 1251 CCCACATGGG TCCTCATAAA GGATTATTCA ATGGAGGCAT CCTGCATCT
 1301 GTCCATTTAG GCTTCAGTTC CACTCCAGG AACTTTGCTT GTCCCACGAG
 1351 GGAGTATGGG

(配列番号7)

IL-18BPd;タンパク質

長さ:161 1998年6月5日13時40分 タイプ:P チェック:2239

1 MRHNWTFDLS PLWVLLCAH VVTLVLRATP VSQTTTAATA SVRSTKDPCP
 51 SQPPVFPAAK QCPALEVTWP EVEVPLNGTL SLSCVACSRF PNFSLYWL
 101 NGSFIEHLPG RLWEGSTRE RGSTGWAEQN LAPHPRSPAL PQQSTAAGL
 151 RLSTGPAAP P

(配列番号8)

【 図 8 】

HuIL-18BP遺伝子

長さ:7812 1998年7月15日11時55分 タイプ:N チェック:7058

1 GTCGACGGTA CCCCCGGGAA AGATTTAATA CGACTCACTA TAGGGCGGGA
 51 CAGAATTGAT CTGTGAGAGA CTCATCTAGT TCATACCTTA GGTGACCTTG
 101 GGGGTGGCAT GGGGGTAGAT TAGAGATCCC AGTCTGGTAT CCTGTGGAGA
 151 GTAGGAGTCC CAGGAGCTGA AGGTTTCTGG CCACTGAACT TTGGCTAAAG
 201 CAGAGGTGTC ACAGCTGCTC AAGATTCCTT GGTTAAAAAG TGAAGTGAA
 251 ATAGAGGGTC GGGGAGTGC TTTCCAGAA GGATGTCTCG GCATCCTGCC
 301 CTTCCAGAA GCAGCTCTGG TGCTGAAGAG AGCAGTGCCT CCCTGTGTGA
 351 CTGGGTGAGT CCATATTCTC TCTTTGGGTC TCAATTTTGC CTTCCCTAAT
 401 GAAGGGGTAA GATTGGACTA GGTAAGCATC TTACAACCAT TTGTGGTCTA
 451 GAGAGCTGGG GTGGGGAAGG ATTGTCACTT GACCCCCCA GCTCTGTTTC
 501 TAAGTGCTGA AAGAGTCCA GGCTATGCTA CGGGAGGAGA AGCCAGCTAC
 551 TGAGGAAAAG CCAGCTACTG AGAAAAAGCG GGAGTGGTTT ACCATTCTCC
 601 TCCCCACCT TTCACCAGAG AAGAGGACGT TGTCACACAT AAAGAGCCAG
 651 GCTCACCAGC TCCTGACGCA TGCATCATGA CCATGAGACA CAACTGGACA
 701 CCAGGTAGGC CTTGGGGCTA CGCATGGGCA GCGGGGGTAG GGTGAGGTTT
 751 ATGAACAGAA TGGAGCAATG GGCTAACCCG GAGCCTCTAC TCCAAGGCAA
 801 ACCACCCAGC GCACCTGGTG CTGTTGCTTT AAGAACCCTG GCAGATATTG
 851 TAGCTCTGGC TCCAGTCTAA AGCTTCTCTG TACTCTGTTC AATAAAGGGC
 901 TAAGGGGTGG GTGTGAGGG GTCCCTCTTC CCGCTCTGAT TCCTGGGCTA
 951 GAACCCAGAC ATCTCTGGC TGGAGTTACA TCCTTACCCG GGCAGCCAC
 1001 TCTGTCTCA GAGCCGCTGA CCTGTAACTG TCCTTCTCTC AGACCTCAGC
 1051 CCTTTGTGGG TCCTGCTCCT GTGTGCCAC GTCGTCACCT TCCTGGTCA
 1101 AGCCACACCT GTCTCGCAGA CCACCACAGC TGCCACTGCC TCAGTTAGAA
 1151 GCACAAAGGA CCCCCTGCCC TCCCAGCCCC CAGTGTCCC AGCAGCTAAG

【 図 8 A 】

1201 CAGTGTCCAG CATTGGAAGT GACCTGGCCA GAGGTGGAAG TGCCACTGAG
 1251 TAAGAAGCAC AGTGGTGGAG GGTGGGCTAT GGGCAGAG GTTCCACAGG
 1301 TCGGGTTGAC TCCTGAGCGC CAGTCCCTT CTCCCATGT ACCACAGCT
 1351 GAGCCAGCTG GGCTGAGCAC GCACATTTT CCTCCCAA CCCAGTGTCA
 1401 TGGGTGCAGG CTGGGCGAG CTCCCAAGAT GCTCCATATC AAATAGGACA
 1451 GAGAACTCAA GACATAAGTA ATGGTCACAG GACCTCCAG AGCCTTGGTT
 1501 GCAGTGGACC CCAAGGCCAG CCCCACAC CAGAGCCTGC TGGCTCTGG
 1551 CCATCTCAGA GGAGCAGCAG CCATCCAGCA CTGCCTCTGT CACCTGGGCT
 1601 CCCAAGTCAC CGAGGCTGG CACTAGAAA GGCTCATCTG AGGAGACAGG
 1651 TTCAGAAGAG GATTATCAC GTGAACCAAG GACCATCTC CACATTCCCC
 1701 GTGTTTAGGG CTAGGGCCTC TCGGAGACAA CTGCATCTT GTAACGGAGC
 1751 TTCCACCTA GGTGGTGTG AGAGCAGTTC TCTAGTTCC AGATGCATGG
 1801 GGACTGGGGG GAGCTGGCAG AGAGGGCACA GCAGAGCAGG GTAGGGGAAG
 1851 GGCTGCTCT TCTGAAGAG TAACCTGCTG CTGTGCTCT AGATGGAAG
 1901 CTGAGCTTAT CCGTGTGGC C1GCAGCGC TTCCCAACT TCAGCATCTC
 1951 CTACTGGCTG GGCAATGGT CTTCAATGA GCACCTCCA GCGCGACTGT
 2001 GGGAGGGGAG CACCAAGTGA GGTGCGCAG AGCCAGGTGG GTGGGAAGGA
 2051 AGCTCTCTG GGCCTTCTCA TGACCTTCC TTCCCTCCG CTCCAGCCGG
 2101 GAACTGGGA GCACAGGTAC GCAGCTGTG AAGGCTTGG TGCTGGAGCA
 2151 GCTGACCCCT GCGCTGACA GCACCAACT CTCTGTGTG CTCGTGGACC
 2201 CTGAACAGGT TGTCCAGGT CACGTCTCC TGGCCAGCT CTGGGTGAGG
 2251 AGCCCAAGGA GAGGCTCCA GGAACAGGAG GAGCTCTGCT TCCATATGT
 2301 GGGAGGAAAG GGTGGGCTCT GCCAGGAGC CTTGTGAACT AATGCCAGC
 2351 ATTCTCAAG GTACGCCAGA CAAAAAGGAA CTTAGTCTT GGGCAAGGA
 2401 GGTGTAGCT GGGGCAAGT GATGAGATG CCTCTCTTC CTTGGCTCTA
 2451 TCCTGTCTG CCTTCACTTC CTAAGGCTGG GCTGAGGGCA ACCTTGGCCC

Fig. 8A

【 図 8 B 】

2501 CCACCCAAGA AGCCTGCCC TCCAGCCACA GCACTCCACA GCAGCAGGT
 2551 TAAGACTCAG CACAGGGCCA GCAGCAGCAC AACCTTGACC AGAGCTTGGG
 2601 TCCTACTGTT CTACCTGGAG TGAACAGTCC CTGACTGCCT GTAGGCTGGC
 2651 TGGATGGCCA ACACACCCCC TCCTCTCTG CTTTGGGTC CTCTCTCAC
 2701 CAAATTCAAA CTCATTCCT ACCTACTAG AAAATCAGAG CTTCTTATA
 2751 ATGCTCTCTC CTCTGCTAT TCTCTCCA CCTATCCATT AGCCTTCTA
 2801 ACGTCTACT CCTCACACTG CTCTACTGCT CAGAAACCAC CAAGACTGTT
 2851 GATGCTTAG CTTGCACTC CAGGGCCCTA CCTGATTC CCACATGACT
 2901 TTCTGGAAG CTCCCACTA TTCTGCTTT TCCAGACAG CTCCCACTCC
 2951 CATGTCTCTG CTCATTTAGT CCGCTCTCC TCACCGCCCC AGCAGGGGAA
 3001 CGTCAAGCC TGGTTGAAAT GCTGCTCTT CAGTGAAGTC ATCTCTTTT
 3051 AGCTCTGCC GCATTTGCA GACTTCTAT CTCTGTGCTG TATGTTTIT
 3101 TTTTCCCCCT TCACTTAAT GGACTGTTCC AGGGAAGGA TGGGGGAGC
 3151 AGCTGCTGG GATCCACACT GTATCTGTGT CATCCCCA TGGGTCTCA
 3201 TAAAGGATTA TTCAATGGAG GCACTCTGAC ATCTGTTTAT TTAGGCTTCA
 3251 GTTCCACTCC CAGGAACTT GCCTGTCCCA CGAGGGAGTA TGGGAGAGAT
 3301 GGACTGCCAC ACAGAACTG AAGACAACAC CTGCTTCAAG GGAACACAGG
 3351 CGCTTGAATA AGAAAAGGA GAACAGCCCA TAATGCTCC CGGGAGCAGA
 3401 GGCCACTAAT GGAGAGTGG AAGAGCTGG AAAGATGTGG CCTCAGGAAA
 3451 AGGGATGAGA GAAAGGAGG GGTATGGAAG ACTCAGCAGG AACAAAGTAG
 3501 GCTCAAAGA GCTATATTC CTCTTTTCC CACACCGATC AAGTCAACTC
 3551 AGTACTCAGC GGAGAAAAAT AGACTTTAT TACAAGTAAT AACATTTAGA
 3601 AAAGATCCAT CCCCAGCCCT TAAAAACCTT CCACTCACTC CAAATCCAC
 3651 CCCAGTCAA GTCTGGGAA GGTAGGGTGT GAGCTGCTG TGAAGGCTGT
 3701 CCCCCAACCC CACTCTGAG ACACAGGGCC CATCCGCTC GGAAGAGAG
 3751 ATCTCTGGC AGGTGCTCC ACCAGGTGAG ACCCAGTCTT GGACTTCAAG

Fig. 8B

【 8 C 】

3801 AGTGAGGGCC CTGTGCTGGC CCAGCCACCA GGACAGCAGG AACCAAGGGCC
3851 TACTCTCTTT ATGGTCCCTT CTAGATCCAG AGGCTAAGAG GAAGACTGGC
3901 CAGGCCCAAG GACCCAGCCA TCAAAACCAG CCTCAAATCT GGTGTGATG
3951 GAGAAGTGAC TTTGCTTTAA GAAAAAAGGA GGCAGGTAG GGAGAGCGCC
4001 CACACTGTCC ATGTCCAGG CCCCCTGGCC CAGTCCGAG AAGGCCCCAG
4051 TGAAGGACCA GGGACCAGCC CAGGTGCGG GCAGGCATCA CTGTCTTAG
4101 GGGTTTGGCT ACTGTTGGCC TGGGAGCTGA GAGAAGGCAC TGAGAGGGAC
4151 AGTAGGCGGA GGACCAGGTG ACGGCAGCAT CGGGACACA GGTGGGGCCA
4201 CTCACTGGTA CTGGCCCTTT AGTGCCTTTC CTGAAAGAGA CACAGTCACA
4251 TGCCCAAGATG AGAACTTGGG ATACTAGCCT GCACCCACTG GCTGGGAAGA
4301 TCTCTTCTG CTCCACGCC CCTGTCTGA TCCCCTCCT TGTGAGCCCC
4351 AGGGTTATCA GTTGTGGCT GTGCCGAGC AGCTCTGGGT GCTCTCCATG
4401 AGAATGGGGC CATCTGTCT CTCTCCTTGG AGAGAGGCTA CCAGGACAGG
4451 GACACCTTT ACCCCACACC CTCCAGCAG CTGGCGTGGC CCCATTTGG
4501 ATGCTACTTG GTGGGGCGGT CTGGGGGTGG CCCATGCTCT CATCGGTTT
4551 CCCCCTCCCA TCTGCCAGT GCCTTACCT TGCCCTTGGC TCGAGGGGTG
4601 GCACCAATGG CGGACGAGT GCGCGCTG GCTGTGTGG TGGCAATGG
4651 CGGAGAACGG CGGGTCCAC TGCAGTGT GGGGGAAGCC TTGGACAGGG
4701 CCTTCTTGA GGCTCCCCG CGCAGAAGC TGTCCCTAG CTCTTGGGT
4751 GTGTTGAAGA TGCTGAAGGC CATCGACTG CGCCCGTCA CCGCAAGGA
4801 AGGGCTGTCA GACCCGGAGA CCCAATGCTG CCTTCCAGG CCAGCCTGCT
4851 GTGCCAGCT GTACCAACAA GGTCCCGCA GGGCGTCTG TCATCCCTC
4901 TCAGCCCAAG CCTCACTGT TTAGTAGAAG CTGGAGCTG TTTCTTCTG
4951 GCCTCAGTAG TGCTGTGTT GCGCCCTCA TGTCGGTCT GGGGATCAT
5001 GGGGCGTGG AAACAGCTGG TGGCCTTCT AGACTATGA GAAGAGGACA
5051 GTTAGGCAGA CAGTAGCAAG AGGAGTACA TCTGAAGCCA GGTGTCTGT

Fig. 8C

【 8 D 】

5101 CCTCTCAGG CTGAGTGGAC CTTGTAAGTC AACGTGCAAC CTGCTCCCCT
5151 TCCCAACTCT GGGCCAGATC CTTCCTTCC CAACAGTCC CATCCATGGG
5201 TCAGGCCCTT GGAGAGAGG AAAGAGAGGG GGAAGTGAGG GAAGGAGAGA
5251 GAAGGTCCCT TTTAGTCTT GGTGAGCTGG GCTGACCTG AGCACAGTGC
5301 TGGAGTAACA CCCAGGAGCC ACCGCGCTA CCTCAGGAGT TCCAGGGCCC
5351 TGGTGGGGCT CTAGGGAGC CCGTTTGGC TGCTGCCGGG TGGTATGCC
5401 AGTGCCCTCG GCTATCTGA TTGGCTGCAT GCTGGCTCG CGCAGGGCT
5451 CTTGGGGTCC TCCAGTTTTC ATCTCCTCAT CTGTGATGTT GCCCAGGCTC
5501 AGGGAAGGCT GCATGGGTGG AAGAGGTGGT CAGTGGACCA TAGCTGTATG
5551 GAGATGGAGG AGGACCTGGG GCTGTTCCAG AACTCTACAC TCGCCGACA
5601 CTTATGGTGG GGACCTTCC TGCTACGAG GTAGAAAGAC ACAAGCTCC
5651 TTTCTGTTT TGCTTCTAC CTAAGCCCTG GGCAATGGC ACAAGCAGT
5701 CAGTCTGAC CAGATTCTC TCTGAGCTCC TGCTACCCC CAGGACTTC
5751 ACCCTGAGT GCCCTCAGC TGTCTGTTCC ACCTGGAACA TGAGAAGTTC
5801 ACCCTTCCC CTCTTGGCC AGTCAGTAT CCAGGGCCCT AGTGTCCAG
5851 CTAGATCAG AGGTGGGATT CCAAGGAAG GCAGGGATGG GAGGCCCTGC
5901 ACAGTGACC CAGGCTCAC CCTGGACTCC AGGATAGCA GGTCTCAGA
5951 TGTGGGGGG ACACTGATT GCGCTGCTG AGCTCTGCA TGGGTTCGA
6001 GTCATCCAG TGCTCAGGT CATCTGGCA AGTCCCATG TAGAAGCTGT
6051 TCCTCTCTG GAAAGGCAG GAAGTGGAA CAAATGAGCC TGGAGTCCGG
6101 AGTCACTCC CTGGCCCTG CATCTTCCA GCCTTTGCT CCACCTACC
6151 CATAAAGTTG AAGCCCGCA CACCAGTCTG ATTCAGTGG GCAGGTGCA
6201 GAGTACGGCA CACAGACTT TTCTATCTA GGGCTTCT CACCACCTC
6251 TCCCTGGAGA GGGCAGAAGA GGTACACGC AGAGACTGCT ACTACATCTT
6301 ATTCACCTG CAAGGCTGG TGGCCACAC CCAGAGGAAC AAATTAAGGA
6351 CCGGGAATTA ATTCCAGGG GCTCCCTGGT GCCCAAGGA CAAGAGCTC

Fig. 8D

【 8 E 】

6401 CAAGAAGAGT CTGGCCAGCC TGGCCTTCC AGCAGCCAT CACCCCTGA
6451 GAAGGGCATG GAGGACTCCC CACAGCTAAG TGTCACAAT GTGCTGGGA
6501 TCCCGGCCCT TAACTCTGG CTAAGATGC CCCCACACA GCCAGCCCT
6551 AGATGGCAG GTAAGGAAG CCTGTAGCT GCAGGAAGGA GGGCAGGTG
6601 GAGCTGGATG GTAGCAAGGA GGCAGCCTT GATTTTAA AAAGCTTCC
6651 TCTTTCCCT GTGCCACGAT CCACCTCCA GTCTAATTT GGGGTATAGT
6701 AAGTCCCTGT AGTCCCTCA CCTGGAGGG CCCCACTGA CACCCCGCC
6751 TGGGAACGAC GAGCAGAACT GCGAGTGGT GGGCGGTAGC CAGGCAAGCT
6801 GAGCAGGGCT GAGTTGCCAT AATCGGAGA ACCCAGGCGA GCTAGAGACT
6851 GAGTAGAGGA GGTGGCTGC AGCTAGCCT GGAAGCAGG AGCAGACCGC
6901 GTGCTGTAGA ACGATGAGT GGGCTGTCT GGCTCTTCCA CATTAAGCTT
6951 CTGGAAGACA GAGTGAATCT GTTGCAGTGT ACGTCCCTG GCACTGTACA
7001 GAAGCTCCC ATTCCCTCC GAAGCCCTCA GATCCAGCG CACATCCATG
7051 TATTTCCAA CTGTTTGC AAAGTCTTAA AGTGTGTGC TGCAAGAAAT
7101 GGGCCTTGC GACAGAAGCC CTCACAAGGT GGTGTGATG TTGTCAAGAC
7151 TCTTCTACGC ATTTTTFCA TGGAGTCTAT TCATAATGCT TTGAGGTAGG
7201 GAATGCAGAG TGTTTATCG CCCTATTTGG AGATGAAGTG CAAAGAAATA
7251 AAGTGACTAG CCCCATCA CACTGCTAGG AAGTATCAGA GCTGGGGCTA
7301 GGGCCCATGT CTCTGACTA GTCAGGCTCA TCCCACAGCC TCTGCTGTCC
7351 CTCAGTCAA ACTTCCAGGG CCCTTACCAT GTTCCAGAAC TTCCCCCAAC
7401 TTCTTGGTAG CAGGGGGCAC CCTAACACA CAGTCCCCC CTGCTGTACC
7451 AGGGGCCCC TCTCCCTCC TCCAAACCT CCCCCTCAG ATGTGAAAC
7501 AAAGGCAAG GCCTGACGC TGTGAGCAG TCCAATGGG AGCAACAATG
7551 CCTCTCAGT GCATGGGGCA TGCTGGGAG CACAGGATGG GCTGAGCTT
7601 CGCCAGTTC TCTCCCTCA CCCTGCACG GCTCAGTGT ACGCATGGAG
7651 AGAATGCTAG CCTTAGTCA GAGGCAGGA TCTAATCTA GCCCTGCCTT

Fig. 8E

【 8 F 】

7701 TTTCTCAGA AGTGGCCCTTA ACCAAGTAC TGCCCTTTT AAGACCTCTC
7751 AGCTTTCCCA CTGTAACATG GACTGGCTGC TCATCCCTCC CTGCTCTGTA
7801 CTGAGTGCCC AG

(配列番号9)

【 9 】

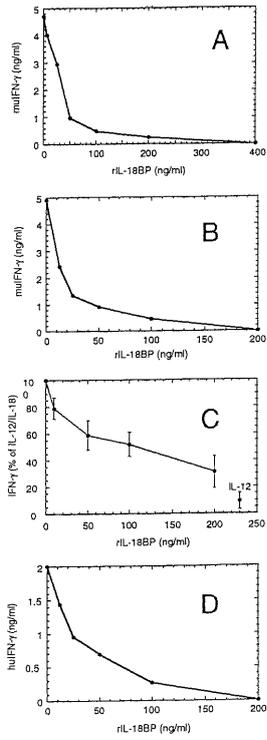


Fig. 9 A-D

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K 16/18	(2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 1/22	(2006.01)	C 0 7 K 1/22	
A 6 1 K 31/711	(2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	P

- (31)優先権主張番号 121860
 (32)優先日 平成9年9月29日(1997.9.29)
 (33)優先権主張国 イスラエル(IL)
 (31)優先権主張番号 122134
 (32)優先日 平成9年11月6日(1997.11.6)
 (33)優先権主張国 イスラエル(IL)
 (31)優先権主張番号 125463
 (32)優先日 平成10年7月22日(1998.7.22)
 (33)優先権主張国 イスラエル(IL)

- (72)発明者 ディナレロ、チャールズ
 アメリカ合衆国、8 0 3 0 2 コロラド州、ボールダー、フィフティーンズ ストリート 3 3 3
 (72)発明者 ルビンステイン、メナケム
 イスラエル国、5 4 0 4 2 ギバト シュムエル、ハトマー ストリート 1 6
 (72)発明者 キム、スーヒュン
 イスラエル国、7 6 3 4 8 レボト、ハマアピル ストリート 4

審査官 池上 文緒

- (56)参考文献 Biochem. J. (1994) vol.300, no.2, p.281-290
 FASEB J. (1991) vol.5, no.11, p.2567-2574

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
 C12N15/00-15/90
 PubMed
 BIOSIS/WPI(DIALOG)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq