

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-508470

(P2009-508470A)

(43) 公表日 平成21年3月5日(2009.3.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 157 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-523042 (P2008-523042)
 (86) (22) 出願日 平成18年7月21日 (2006.7.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年3月12日 (2008.3.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/028691
 (87) 国際公開番号 W02007/014162
 (87) 国際公開日 平成19年2月1日 (2007.2.1)
 (31) 優先権主張番号 60/701,855
 (32) 優先日 平成17年7月21日 (2005.7.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

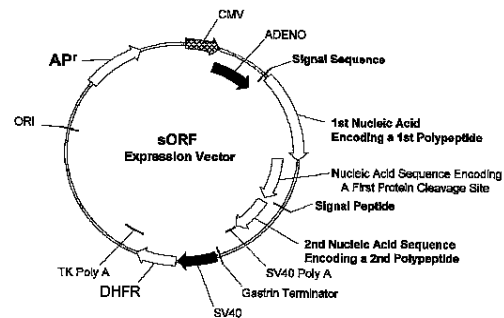
(71) 出願人 391008788
 アボット・ラボラトリーズ
 ABBOTT LABORATORIES
 アメリカ合衆国、イリノイ州 60064
 、アボット・パーク、アボット・パーク・
 ロード 100、エービー6エー1 0
 377
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100140523
 弁理士 渡邊 千尋
 (74) 代理人 100119253
 弁理士 金山 賢教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 SORF 構築物並びにポリタンパク質、プロタンパク質及びタンパク質分解による方法を含む複数の遺伝子発現

(57) 【要約】

組み換え宿主細胞内でプロセッシングを受けた一次翻訳産物を用いて、タンパク質を発現させるのに有用である構築物及び方法を開示する。単一オープンリーディングフレーム (sORF) を含む構築物を、複数のポリペプチドの発現を含めて、タンパク質発現用に記述する。一次翻訳産物 (プロタンパク質又はポリタンパク質) は、複数の目的タンパク質サブユニット間にインフレームで挿入された、インテイン又はヘッジホッグファミリー自動プロセッシングドメイン、その変種などのポリペプチドを含む。一次産物は、他のタンパク質分解性切断又はプロテアーゼ認識部位、複数のタンパク質サブユニットの少なくとも2個を分離する、シグナルペプチドダーゼ用の認識配列を含むシグナルペプチドなどの切断配列も含み得る。挿入された自動プロセッシングポリペプチド又は切断部位の配列は、別々の複数のタンパク質サブユニットの発現の効率を高めるように操作することができる。免疫グロブリンなどのタンパク質の効率的発現、分泌及び/又は多量体組立てを実施する独立した態様も開示する。ポリタンパク質が、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の各



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

s O R F 挿入断片を含む 1 種類以上の組み換えタンパク質産物を産生するための発現ベクターであり、前記 s O R F 挿入断片が、第 1 のポリペプチドをコードする第 1 の核酸配列と、第 1 のタンパク質切断部位をコードする第 1 の介在核酸配列と、及び第 2 のポリペプチドをコードする第 2 の核酸配列とを含み、前記第 1 のタンパク質切断部位をコードする前記介在核酸配列が前記第 1 の核酸配列と前記第 2 の核酸配列との間に作動可能に位置し、ならびに前記第 1 のタンパク質切断部位において切断可能である s O R F ポリペプチドを発現可能である、前記発現ベクター。

【請求項 2】

前記第 1 のタンパク質切断部位が自己プロセッシング切断部位を含む、請求項 1 に記載の発現ベクター。

【請求項 3】

前記自己プロセッシング切断部位が、インテインセグメント又は修飾インテインセグメントを含み、修飾インテインセグメントは、前記第 1 のポリペプチドと前記第 2 のポリペプチドとの切断を可能にするが、完全な連結を可能にしない、請求項 1 又は 2 の発現ベクター。

【請求項 4】

前記自己プロセッシング切断部位が、ヘッジホッグセグメント又は修飾ヘッジホッグセグメントを含み、修飾ヘッジホッグセグメントが、前記第 1 のポリペプチドの前記第 2 のポリペプチドからの切断を可能にする、請求項 1 又は 2 の発現ベクター。

【請求項 5】

第 1 のポリペプチドと第 2 のポリペプチドが多量体組立て可能である、請求項 1 から 4 のいずれかの発現ベクター。

【請求項 6】

前記第 1 のポリペプチドと前記第 2 のポリペプチドの少なくとも一方が細胞外分泌可能である、請求項 1 から 5 のいずれかの発現ベクター。

【請求項 7】

前記第 1 のポリペプチドと前記第 2 のポリペプチドの少なくとも一方がほ乳動物起源である、請求項 1 から 6 のいずれかの発現ベクター。

【請求項 8】

前記第 1 のポリペプチドと前記第 2 のポリペプチドの少なくとも一方が免疫グロブリン重鎖又はその機能的断片を含む、請求項 1 から 7 のいずれかの発現ベクター。

【請求項 9】

前記第 1 のポリペプチドと前記第 2 のポリペプチドの少なくとも一方が免疫グロブリン軽鎖又はその機能的断片を含む、請求項 1 から 8 のいずれかの発現ベクター。

【請求項 10】

前記第 1 のポリペプチドが免疫グロブリン重鎖又はその機能的断片を含み、前記第 2 のポリペプチドが免疫グロブリン軽鎖又はその機能的断片を含み、前記第 1 のポリペプチドと第 2 のポリペプチドが任意の順序である、請求項 1 から 9 のいずれかの発現ベクター。

【請求項 11】

前記第 1 のポリペプチドと前記第 2 のポリペプチドが多量体組立てにおいて会合して、機能的抗体又は他の抗原認識分子を形成可能である、請求項 1 から 10 のいずれかの発現ベクター。

【請求項 12】

前記第 1 のポリペプチドが前記第 2 のポリペプチドの上流にある、請求項 1 から 11 のいずれかの発現ベクター。

【請求項 13】

前記第 2 のポリペプチドが前記第 1 のポリペプチドの上流にある、請求項 1 から 12 のいずれかの発現ベクター。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

第3のポリペプチドをコードする第3の核酸配列を更に含み、前記第3の核酸配列が前記第2の核酸配列の後に作動可能に位置し、及び前記第3の配列が独立に前記第1の核酸配列又は前記第2の核酸配列のどちらかと同じでも、異なってもよい、請求項1から13のいずれかの発現ベクター。

【請求項 15】

前記第1、第2及び第3のポリペプチドの少なくとも2種類が多量体組立てにおいて会合可能である、請求項14の発現ベクター。

【請求項 16】

第2のタンパク質切断部位をコードする第2の介在核酸配列を更に含み、前記第2の介在核酸配列が前記第1及び前記第2の核酸配列の後に作動可能に位置し、及び前記第2の介在配列が前記第1の介在核酸配列と同じでも、異なってもよい、請求項1から15のいずれかの発現ベクター。

10

【請求項 17】

第3のポリペプチドをコードする第3の核酸配列と、及び第2のタンパク質切断部位をコードする第2の介在核酸配列とを更に含み、第2の介在核酸配列と第3の核酸配列がこの順で前記第2の核酸配列の後に作動可能に位置する、請求項1から16のいずれかの発現ベクター。

【請求項 18】

前記第3の核酸配列が、免疫グロブリン重鎖、軽鎖、又はそれぞれにその機能的断片をコードする、請求項1から17のいずれかの発現ベクター。

20

【請求項 19】

前記第3の核酸配列が、免疫グロブリン軽鎖又はその機能的断片をコードする、請求項14から18のいずれかの発現ベクター。

【請求項 20】

前記第3の核酸配列が、免疫グロブリン重鎖又はその機能的断片をコードする、請求項14から18のいずれかの発現ベクター。

【請求項 21】

第1のタンパク質切断部位をコードする前記第1の介在核酸配列が、シグナルペプチド切断部位又は修飾シグナルペプチド切断部位配列をコードするシグナルペプチド核酸を含む、請求項1から20のいずれかの発現ベクター。

30

【請求項 22】

前記第1の核酸配列又は前記第2の核酸配列の前に作動可能に位置する、シグナルペプチド切断部位をコードするシグナルペプチド核酸配列を更に含む、請求項1から21のいずれかの発現ベクター。

【請求項 23】

シグナルペプチド切断部位を各々独立にコードする2個のシグナルペプチド核酸配列を更に含み、一方のシグナルペプチド核酸配列が、前記第1のポリペプチドをコードする前記第1の核酸の前に作動可能に位置し、及びもう一方のシグナルペプチド核酸配列が、前記第2のポリペプチドをコードする前記第2の核酸の前に作動可能に位置する、請求項1から22のいずれかの発現ベクター。

40

【請求項 24】

前記シグナルペプチド核酸配列が、免疫グロブリン軽鎖シグナルペプチド切断部位又は修飾免疫グロブリン軽鎖シグナルペプチド切断部位をコードする、請求項21から23のいずれかの発現ベクター。

【請求項 25】

シグナルペプチド核酸配列が修飾又は非修飾免疫グロブリン軽鎖シグナルペプチド切断部位をコードし、及び前記修飾部位が、前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、及び前記第1のポリペプチドと前記第2のポリペプチドとの集合分子の少なくとも1つを切断し、その分泌を増大させることが可能であり、ならびに前記シグナルペプチド部

50

位の存在下の分泌レベルが、前記シグナルペプチド部位の非存在下の分泌レベルの約10%から約100倍大きい、請求項24の発現ベクター。

【請求項26】

第1のタンパク質切断部位をコードする前記介在核酸配列が、パイロコッカス ホリコシイ (*Pyrococcus horikoshii*) Pho Pol I 配列、サッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) VMA 配列、シネコシスティス (*Synechocystis*) 種 Strain PCC 6803 DnaE 配列、マイコバクテリウム ゼノピ (*Mycobacterium xenopi*) GyrA 配列、パイロコッカス (*Pyrococcus*) 種 GB-D DNA ポリメラーゼ、A型細菌インティン様 (BIL) ドメイン及びB型BILからなる群から選択されるインティン又は修飾インティン配列を含む、請求項1から3のいずれかの発現ベクター。

10

【請求項27】

第1のタンパク質切断部位をコードする前記介在核酸配列が、ヘッジホッグファミリーメンバーのC末端自動プロセッシング (auto-processing) ドメインを含み、ヘッジホッグファミリーメンバーがショウジョウバエ (*Drosophila*)、マウス、ヒト、又は他の昆虫若しくは動物種に由来する、請求項1、2及び4のいずれかの発現ベクター。

【請求項28】

第1のタンパク質切断部位をコードする前記介在核酸配列が、線虫由来の warthog、groundhog、若しくは他のホッグ (hog) 含有遺伝子からのC末端自動プロセッシングドメイン、又は襟鞭毛虫由来の Hoglet ドメインを含む、請求項1、2及び4のいずれかの発現ベクター。

20

【請求項29】

前記第1及び前記第2のポリペプチドが、腫瘍壊死因子、エリスロポイエチン受容体、RSV、EL/セレクトイン、インターロイキン1、インターロイキン12、インターロイキン13、インターロイキン18、インターロイキン23、CXCL-13、GLP-1R及びアミロイドベータからなる群から選択される抗原との結合に対する抗原特異性を有する、機能的抗体又は他の抗原認識分子を含む、請求項1から28のいずれかの発現ベクター。

30

【請求項30】

第1及び第2のポリペプチドが、D2E7、ABT-007、ABT-325、EL246又はABT-874の抗体由来の1対の免疫グロブリン鎖を含む、請求項1から28のいずれかの発現ベクター。

【請求項31】

第1及び第2のポリペプチドが、D2E7、ABT-007、ABT-325、EL246、ABT-874又は他の抗体の類似のセグメントに由来する、免疫グロブリン重鎖又は免疫グロブリン軽鎖セグメントから各々独立に選択される、請求項1から28のいずれかの発現ベクター。

【請求項32】

前記sORF挿入断片に対するプロモーター調節エレメントを更に含む、請求項1から31のいずれかの発現ベクター。

40

【請求項33】

前記プロモーター調節エレメントが誘導性又は構成的である、請求項32に記載の発現ベクター。

【請求項34】

前記プロモーター調節エレメントが組織特異的である、請求項32に記載の発現ベクター。

【請求項35】

前記プロモーターがアデノウイルス主要後期プロモーターを含む、請求項32に記載の

50

発現ベクター。

【請求項 36】

前記第1のタンパク質切断部位を切断可能であるプロテアーゼをコードする核酸を更に含む、請求項1から35のいずれかに記載の発現ベクター。

【請求項 37】

プロテアーゼをコードする前記核酸が、前記 s O R F 挿入断片内に作動可能に位置し、前記発現ベクターが、プロテアーゼをコードする前記核酸と、前記第1の核酸と前記第2の核酸の少なくとも一方との間に位置する第2の切断部位をコードする追加の核酸を更に含む、請求項36に記載の発現ベクター。

【請求項 38】

請求項1から37のいずれかに記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 39】

原核細胞である、請求項38に記載の宿主細胞。

【請求項 40】

エシェリキア コリ (*Escherichia coli*) である、請求項39に記載の宿主細胞。

【請求項 41】

真核細胞である、請求項38に記載の宿主細胞。

【請求項 42】

前記真核細胞が、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞及び真菌細胞からなる群から選択される、請求項41に記載の宿主細胞。

【請求項 43】

前記真核細胞が、ほ乳動物細胞、トリ細胞及び昆虫細胞からなる群から選択される動物細胞である、請求項42に記載の宿主細胞。

【請求項 44】

C H O 細胞又はジヒドロ葉酸還元酵素欠乏 C H O 細胞である、請求項43に記載の宿主細胞。

【請求項 45】

C O S 細胞である、請求項43に記載の宿主細胞。

【請求項 46】

酵母細胞である、請求項42に記載の宿主細胞。

【請求項 47】

前記酵母細胞がサッカロミセス セレビスエである、請求項46に記載の宿主細胞。

【請求項 48】

昆虫ヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*) S f 9 細胞である、請求項43に記載の宿主細胞。

【請求項 49】

ヒト胎児腎細胞である、請求項43に記載の宿主細胞。

【請求項 50】

請求項38に記載の宿主細胞を培地中で、ベクタータンパク質の発現に十分な条件下で培養することを含む、組み換えポリタンパク質又は複数のタンパク質を製造する方法。

【請求項 51】

前記ベクタータンパク質の回収及び/又は精製を更に含む、請求項50の方法。

【請求項 52】

前記複数のタンパク質が多量体組立て可能である、請求項50から51のいずれかの方法。

【請求項 53】

組み換えポリタンパク質又は複数のタンパク質が、生物学的に機能的である、及び/又は治療効果のある、請求項50から52のいずれかの方法。

【請求項 54】

10

20

30

40

50

請求項 38 に記載の宿主細胞を培地中で、免疫グロブリンタンパク質若しくはその機能的断片、組み立てられた抗体、又は他の抗原認識分子の製造に十分な条件下で培養することを含む、免疫グロブリンタンパク質若しくはその機能的断片、組み立てられた抗体、又は他の抗原認識分子を製造する方法。

【請求項 55】

請求項 50 から 54 のいずれかの方法によって製造されたタンパク質。

【請求項 56】

請求項 50 から 55 のいずれかの方法によって製造されたポリタンパク質。

【請求項 57】

請求項 50 から 56 のいずれかの方法によって製造された、組み立てられた免疫グロブリン、組み立てられた他の抗原認識分子、又は個々の免疫グロブリン鎖若しくはその機能的断片。

10

【請求項 58】

腫瘍壊死因子、エリスロポイエチン受容体、インターロイキン 18、E L / セレクチン又はインターロイキン 12 との特異的抗原結合をもたらす能力がある、又はその一因となる能力がある、請求項 57 に記載の免疫グロブリン、他の抗原認識分子、又は個々の免疫グロブリン鎖若しくはその機能的断片。

【請求項 59】

免疫グロブリンが D 2 E 7 である、又は機能的断片が D 2 E 7 の断片である、請求項 58 に記載の免疫グロブリン又はその機能的断片。

20

【請求項 60】

請求項 55 から 59 のいずれかに記載のタンパク質と、薬剤として許容される担体とを含む、薬剤組成物。

【請求項 61】

前記第 1 のタンパク質切断部位が、細胞のプロテアーゼ切断部位、又はウイルスのプロテアーゼ切断部位を含む、請求項 1 又は 2 の発現ベクター。

【請求項 62】

前記第 1 のタンパク質切断部位が、フューリン；I P N V の V P 4 ；タバコ エッチ (t o b a c c o e t c h) ウイルス (T E V) プロテアーゼ；ライノウイルスの 3 C プロテアーゼ；P C 5 / 6 プロテアーゼ；P A C E プロテアーゼ、L P C / P C 7 プロテアーゼ；エンテロキナーゼ；活性化第 X 因子プロテアーゼ；トロンピン；g e n e n a s e I ；M M P プロテアーゼ；カブモザイクポティウイルスの核封入タンパク質 a (N 1 a) ； Deng 熱 4 型フラビウイルスの N S 2 B / N S 3 、黄熱病ウイルスの N S 3 プロテアーゼ；カリフラワーモザイクウイルスの O R F V ；K E X 2 プロテアーゼ；C B 2 ；又は 2 A によって認識される部位を含む、請求項 1 又は 2 に記載の発現ベクター。

30

【請求項 63】

前記第 1 のタンパク質切断部位が、ウイルス内部切断可能シグナルペプチド切断部位である、請求項 1 又は 2 の発現ベクター。

【請求項 64】

前記ウイルス内部切断可能シグナルペプチド切断部位が、C 型インフルエンザウイルス、C 型肝炎ウイルス、ハンタウイルス、フラビウイルス又は風疹ウイルス由来の部位を含む、請求項 63 の発現ベクター。

40

【請求項 65】

二重ハイブリッド系のタンパク質の発現方法であり、前記二重ハイブリッド系がベイト (b a i t) タンパク質とプレイ (p r e y) タンパク質候補とを含み、ベイトタンパク質部分とプレイタンパク質候補部分とを含むポリタンパク質をコードする発現ベクターが導入された宿主細胞を用意する段階 (前記各部分は自己プロセッシング切断配列、シグナルペプチド配列又はプロテアーゼ切断部位によって分離されている) と、ポリタンパク質の発現、及びポリタンパク質の自己プロセッシング又はプロテアーゼ切断が可能である条件下で宿主細胞を培養する段階とを含む、前記方法。

50

【請求項 6 6】

ポリタンパク質が三重ハイブリッド系の切断可能成分を更に含む、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

2 A 配列を含まない、請求項 1 から 3 7 及び 6 1 から 6 4 のいずれかに記載の発現ベクター。

【請求項 6 8】

前記第 1 のタンパク質切断部位が、FMDV 2 A 配列、又は他のピコルナウイルス科 (Picornaviridae)、昆虫ウイルス、C 型口タウイルス、トリパノソマ若しくはサーモトガ マリチマ (Thermatoga maritima) 由来の 2 A 様ドメインを含む、請求項 1 又は 2 に記載の発現ベクター。

10

【請求項 6 9】

ポリタンパク質のコード配列を含む、組み換えタンパク質を発現するための発現ベクターであり、ポリタンパク質が少なくとも第 1 及び第 2 のタンパク質セグメントを含み、前記各タンパク質セグメントがその間のタンパク質切断部位によって分離されており、タンパク質切断部位が自己プロセシングペプチド切断配列、シグナルペプチド切断配列又はプロテアーゼ切断配列を含み、及び前記コード配列が宿主細胞中で発現可能であり、及び宿主細胞内で切断される、発現ベクター。

【請求項 7 0】

前記介在核酸配列がタグを更にコードする、請求項 1 から 3 7、6 1 から 6 4、6 7 及び 6 8 のいずれかの発現ベクター。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の分野は、分子生物学であり、特に、組み換えタンパク質発現、並びに、特に組み換えポリタンパク質又はプレタンパク質の翻訳後プロセシングを含めた、発現及びプロセシングの領域に一般に関係する。

【背景技術】

【0002】

診断ツール及び治療様式としての抗体の使用は、近年増加している。最初の FDA 認可モノクローナル抗体 OKT3 (Johnson and Johnson) は、腎移植拒絶患者の治療に認可された。転移性乳癌患者の治療用ヒト化モノクローナル抗体である Herceptin (Genentech Inc., South San Francisco, CA の商標) は、1998 年に認可された。多数の抗体療法が、種々の臨床発生段階において有望である。抗体技術の広範な臨床応用における 1 つの制約は、治療効力のために典型的には多量の抗体が必要であり、十分な製造に付随するコストが高いことである。チャニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞及び NSO 骨髄腫細胞は、抗体、他の生物学的治療薬などのグリコシル化ヒトタンパク質の商業規模製造に最も一般に使用されるほ乳動物細胞系である (Humphreys and Glover 2001, Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 4:172-85)。

ほ乳動物細胞系の製造は、典型的には、バッチ発酵槽中で 5 - 7 日の培養で 50 - 250 mg/L、又は流加発酵槽中で 7 - 12 日で 300 - 600 mg/L の収量である。非グリコシル化免疫グロブリンタンパク質は、酵母又は E. コリ (E. coli) 中で首尾よく製造することができるが (例えば、Humphreys DP, et al., 2000, Protein Expr Purif. 20(2):252-64 参照)、細菌発現系における成功は大部分が抗体断片を用いている (Humphreys, D. P. 2003, Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 2003 6:188-96)。

30

40

【0003】

複数の遺伝子セグメント又は遺伝子の発現の分野における重要な進展は、インテインの

50

発見である(例えば、Hirata, R et al., 1990, J. Biol. Chem. 265:6726-6733; Kane, PM et al., 1990, Science 250:, 651-657; Xu, M-Q and Perler, FB, 1996, EMBO Journal 15(19):5146-5153参照)。インテインは、遺伝子イントロンのタンパク質相当物と考えられ、タンパク質スプライシングを促進する。Snell K.の米国特許第7026526号に記述されているように、タンパク質スプライシングは、前駆体タンパク質の内部領域(インテイン)が切り出され、タンパク質のフランキング領域(エクステイン)が連結されて成熟タンパク質を形成するプロセスである。このプロセスは、原核生物と真核生物の両方に由来する多数のタンパク質において観察される(Perler, F.B., Xu, M.Q., Paulus, H. Current Opinion in Chemical Biology 1997, 1, 292-299; Perler, F.B. Nucleic Acids Research 1999, 27, 346-347)。インテイン単位は、タンパク質スプライシングを触媒するのに必要な成分を含み、インテインの移動に関するエンドヌクレアーゼドメインを含むことが多い(Perler, F.B., et al., Nucleic Acids Research 1994, 22, 1127-1127)。

10

【0004】

インテインに基づく系は、精製技術を創作し、発現遺伝子セグメントから新しい融合タンパク質を産生することに主に焦点が置かれているが、米国特許第7026526号は、植物において形質を積み重ねるための別々のタンパク質として、複数の遺伝子産物の発現のための修飾インテインを含むDNA構築物を報告している。しかし、いまだに欠如しているのは、機能的多量体タンパク質、細胞外分泌タンパク質、ほ乳動物タンパク質、又は真核生物宿主細胞中で産生されるタンパク質に組み立てられる別々のタンパク質の発現に、インテインに基づく系を首尾よく使用することができるという指摘である。免疫グロブリンがこれらのカテゴリーの全部に属することは注目に値する。

20

【0005】

米国特許第7026526号の修飾インテイン手法を他の遺伝子又は目的に拡張することの困難さを増大させているのは、関与するインテイン系に関連がある所望のエクステイン遺伝子セグメントの寄与の潜在的な重要性の認識である。Paulusによれば、「実際、タンパク質スプライシングは、専らインテインによって触媒されても、エクステイン配列によって著しく影響され得る。この影響は、インテイン配列が外来コード配列間にインフレームで挿入されたキメラタンパク質スプライシング系の発現が、上流又は下流のスプライス部位における切断などのかなりの副反応をもたらすことが多いということによって現れる(Xu M-Q, et al., 1993, Cell 75:1371-77及びShingledacker K, et al., 1998, Gene 207:187-95)。これは、タンパク質スプライシングに最適な構造を副反応なしにとるインテインの能力が、特定のエクステインに関連して進化したことを示唆している。」Paulus H, 2000, Protein splicing and related forms of protein autoprocessing, Annu. Rev. Biochem. 69:447-96を参照されたい。別の解説者によれば、「合理的設計によって望ましい特性及び活性をタンパク質に導入することは可能であるが、加工産物を効率的かつ実用的にするのに必要な微妙な変更は、我々の予測能力をいまだに超えていることが多い(Shao, Z. and Arnold, F.H. 1996. Curr. Opin. Struct. Biol. 6, 513-518)。...それでも、インテインに隣接する領域がスプライシング効率に影響することが見出され(Chong, S. et al., 1998, Nucleic Acids Res. 26, 5109-5115; Southworth, M.W. et al., 199, Biotechniques 27, 110-114)、一部のタンパク質宿主はインテイン活性に不適合であり得る。高発現及び

30

40

50

産物純度は重要な考慮事項ではあるが、最終産物が不活性である場合には実際的意味がない。」。Amitai G and Pietrovski, 1999, Nature Biotechnology 17: 854 - 855を参照されたい。

【0006】

したがって、好ましい結果が再連結のない切断である修飾インテイン系においては、所与のインテイン配列に関連した外来エクステインが存在すると、正確な切断、再連結の非存在、及び副反応の非存在の実際的な効率的組合せに影響を及ぼし得る。最終産物、例えば、免疫グロブリン及び他の生物学的治療薬として機能的活性を保持するある種のタンパク質の組み換え製造のための修飾インテイン手法の手直しは、革新のための難題であることは明らかである。

10

【0007】

本発明では、この難題を、インテインに基づく系に対して取り上げただけでなく、ヘッジホッグドメインに関して有用である適用分野に対して先駆的に探究した。ヘッジホッグファミリーのタンパク質は、脊椎動物胚におけるパターンニングに必須の細胞間シグナル伝達分子である。例えば、Mann, R. K. and Beachy, P. A. (2000) Biochim. Biophys. Acta. 1529, 188 - 202; Beachy, PA, (1997) Cold Spring Harb Symp Quant Biol 62: 191 - 204を参照されたい。未変性ヘッジホッグ前駆体タンパク質は、タンパク質スプライシングと類似した自動プロセッシング (autoprocesing) 反応によって、C末端断片 (Hh - C) とN末端断片 (Hh - N) に切断される。ヘッジホッグ系は、複数の別々のタンパク質セグメントの発現に適切な修飾系を含めた系を創造するために、実証されていない機会を提供するものである。

20

【0008】

単一のベクターを用いた組み換えDNA技術によって完全長抗体/免疫グロブリン分子を発現させる以前の試みは、不十分な結果に終わり、典型的には、抗体/免疫グロブリン分子の重鎖と軽鎖の発現レベルがかなり異なり、より具体的には、第2の遺伝子の発現レベルが低かった。他の要因は、適切に組み立てられた多量体抗体又はその機能的断片の最適な産生のために、一方の鎖に比較して他方の鎖のより高い発現レベルを必要とし得る。したがって、1つの問題は、細胞内の重鎖と軽鎖の発現の最適に満たない化学量論であって、組み立てられた多量体抗体は全体的に低収率になる。Fang等によれば、十分な生物学的機能を有する抗体を単一のベクターから高レベルで発現させるためには、重鎖と軽鎖を等モルで発現させる必要がある (Fang et al., 2005, Nature Biotechnology 23: 584 - 590、米国特許出願公開第2004/0265955号A1参照)。さらに、複数のポリペプチドを独立に発現するベクター系に依拠する従来の発現系は、プロモーター相互作用 (例えば、プロモーター干渉) などの要因にかなり影響される。これらの相互作用は、遺伝子の効率的発現及び/又は発現鎖の組立てを損ない得るものであり、又は1種類を超えるベクターを使用する必要があり得る (例えば、米国特許第6331415号、Cabilly et al. 参照)。複数のベクターを必要とすることは、一般に追加の操作が必要なことに加えて、個々のベクターの1種類以上が失われるなどの潜在的に面倒な事態のために不利である。

30

40

【0009】

単一のベクターから2種類以上のコード配列を発現する能力を制限する他の要因としては、ベクター自体のパッケージング容量が挙げられる。例えば、適切なベクター/コード配列を考慮する際に、考慮すべき要因としては、ベクターのパッケージング容量 (例えば、アデノ随伴ウイルスAAVの場合は約4,500bp)、ベクターによって移入された細胞又は器官による組み換えタンパク質のインビトロ/インビボでの発現期間 (例えば、アデノウイルスベクターの場合は短期発現)、ウイルスベクターを使用する場合にはベクターによる効率的感染を支援する細胞タイプ、遺伝子産物の所望の発現レベルなどが挙げられる。アデノウイルス、AAVなどのウイルスベクターのパッケージングの制約に加え

50

て、2種類以上の遺伝子産物の発現を制御する必要があることは、ベクターの構築、及び免疫グロブリン、その断片などのある種の遺伝子の発現系に関する選択肢を制限するものである。

【0010】

2種類以上のタンパク質又はポリペプチド配列を単一のベクターから発現させる更なる手法においては、2種類以上のプロモーター又は単一のプロモーターと、目的コード配列間の配列内リボソーム進入部位(IRES)配列とを使用して、個々のコード配列を発現させる。単一のベクター内の2種類のプロモーターを使用すると、プロモーター干渉のために、タンパク質発現が低くなり得る。2種類のコード配列をIRES配列によって分離すると、第2のコード配列の翻訳発現は、第1のコード配列の翻訳発現よりもかなり弱くなることが多い(Furler et al., 2001, Gene Therapy 8: 864-873)。米国特許出願公開第2004/0241821号は、異種コード配列がウイルスポリタンパク質コード配列の下流に取り込まれ、IRESによって該コード配列から分離されているフラビウイルスベクターを記載している。セグメントがプロテアーゼ認識部位によって分離された融合タンパク質を含めて、核に固定されたベクターによる組み換え遺伝子発現戦略が、米国特許出願公開第2005/0026137号に記載されている。

10

【0011】

単一オープンリーディングフレーム(sORF)中のポリタンパク質の形のタンパク質の結鎖は、ピコルナウイルス科(Picornaviridae)を含めて、多数の天然ウイルスの複製において認められる戦略である。翻訳後、ウイルスによってコードされたプロテナーゼは、ポリタンパク質の迅速な分子内(cis)切断を媒介して、別個の成熟タンパク質産物を与える。口蹄疫ウイルス(FMDV)は、ピコルナウイルス科内の一群であり、約225kDのポリタンパク質をコードする単一の長いオープンリーディングフレームを発現する。完全長翻訳産物は、キャプシドタンパク質前駆体(P1-2A)とポリタンパク質2BC及びP3の複製ドメインとの間に存在する2A領域のC末端において迅速な分子内(cis)切断を受ける。この切断は、リボソームのスタッター(stutter)機構によって、2A領域自体によって媒介される(Ryan et al., 1991, J. Gen. Virol. 72: 2727-2732); Vakharina et al., 1987, J. Virol. 61: 3199-3207)。

20

30

【0012】

タンパク質分解プロセッシング技術を使用する更に別の試みにおいて、組み換えインスリン製造の初期の記述としては、例えば、欧州特許第055945号(Genentech)及び欧州特許第037723号(The Regents of the University of California)が挙げられる。しかし、免疫グロブリンなどのはるかに大きく、より複雑な機能的タンパク質の組み換え発現を利用する状況において、かかる労力をかけ得ることは途方もない飛躍である。機能的抗体分子の例としては、4本以上の鎖(例えば、2本の免疫グロブリン重鎖と2本の軽鎖)の組立てを必要とするヘテロ多量体が挙げられる。

40

【0013】

組み換えタンパク質を産生するための代替発現系及び/又は改善された発現系が依然として要求されている。ある特定の要求は、現在利用可能な技術に比べて優位性をもたらす、完全長免疫グロブリン及びその抗原結合性フラグメントの効率的及び/又は正確な発現の領域に反映されている。本発明は、インティン、ヘッジホッグ自動プロセッシングセグメント、自己触媒のウイルスプロテアーゼ、そのそれぞれの変形物などの種々の戦略を用い

50

て、単一のベクター構築物を提供することによって、これらの要求に対処する。それとは別に、サブユニット（例えば、重鎖及び軽鎖又はその断片）の化学量論的關係を調節することによって、多量体（例えば、免疫グロブリン）の効率的組立ての要求に対処する。複数の実施形態においては、s O R F中の構築物は、対象となる酵素、免疫グロブリン、サイトカイン、ケモカイン、受容体、ホルモン、二重ハイブリッド系の各成分、他の多サブユニットタンパク質などの工業的又は生物学的に機能的なポリペプチドを発現させるための、自己プロセシングペプチド成分をコードする。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明は、発現カセット、ベクター、組み換え宿主細胞を提供し、組み換えポリタンパク質及びプレタンパク質の組み換え発現、及び翻訳後プロセシングを含めた、プロセシングの方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0015】

一実施形態においては、本発明は、s O R F挿入断片を含む1種類以上の組み換えタンパク質産物を産生するベクターを提供する。前記s O R F挿入断片は、第1のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、第1のタンパク質切断部位をコードする介在核酸配列と、第2のポリペプチドをコードする第2の核酸配列とを含み、前記第1のタンパク質切断部位をコードする前記介在核酸配列は、前記第1の核酸配列と前記第2の核酸配列との間に作動可能に位置し、前記発現ベクターは、前記第1のタンパク質切断部位において切断可能であるs O R Fポリペプチドを発現可能である。一実施形態においては、第1のタンパク質切断部位は、自己プロセシング切断部位を含む。一実施形態においては、自己プロセシング切断部位は、インテインセグメント又は修飾インテインセグメントを含み、修飾（又は非修飾）インテインセグメントは、発現された第1のポリペプチドと発現された第2のポリペプチドとの切断を可能にするが、両者を完全に連結することはできない。一実施形態においては、自己プロセシング切断部位は、ヘッジホッグセグメント又は修飾ヘッジホッグセグメントを含み、修飾（又は非修飾）ヘッジホッグセグメントは、発現された第1のポリペプチドと発現された第2のポリペプチドとの切断を可能にする。一実施形態においては、複数の別々のタンパク質（例えば、第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、第3のポリペプチドなど）が発現される。一実施形態においては、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドは、多量体組立て可能である。一実施形態においては、前記第1のポリペプチドと前記第2のポリペプチドの少なくとも一方は、細胞外分泌可能である。一実施形態においては、前記第1のポリペプチドと前記第2のポリペプチドの少なくとも一方は、ほ乳動物起源である。一実施形態においては、組み立てられた抗体を作製する、ベクター及び方法を提供する。

【0016】

複数の実施形態においては、本発明は、複数の別々のタンパク質の組み換え発現のための構築物及び方法を提供する。特定の実施形態においては、タンパク質は細胞外分泌可能である。特定の実施形態においては、タンパク質はほ乳動物起源である。特定の実施形態においては、タンパク質は多量体組立て可能である。特定の実施形態においては、タンパク質は免疫グロブリンである。

【0017】

一実施形態においては、（野生型、切断型又は改変形態の、インテイン、ショウジョウバエ、マウス、ヒト及び他の種由来のヘッジホッグのC末端自動プロセシングドメイン（Dassa et al, Trends in Genetics, Vol. 20 No. 11 Nov, 2004, 538-542; Ibrahim et al, Biochimica et Biophysica Acta 1760 (2006) 347-355）。自動プロセシングポリペプチド配列は、タンパク質分解プロセシングに関連して、タンパク質分解性部位と称する場合もあることに注意されたい。シノ

10

20

30

40

50

ラブディス エレガンス (*Caenorhabditis elegans*) などの線虫由来の *warthog*、*groundhog*、若しくは他のホッグ (*hog*) 含有遺伝子の C 末端自動プロセシングドメイン (Snell EA et al, Proc. R. Soc. B (2006) 273, 401-407; Aspöck et al, Genome Research, 1999, 9:909-923)、又は襟鞭毛虫由来の *Hoglet*-C 自動プロセシングドメイン (Aspöck et al, Genome Research, 1999, 9:909-923) を使用する。クロストリジウム サーモセラム (*Clostridium thermocellum*) などの細菌由来のものなどの A 型細菌インティン様 (BIL) ドメイン、及びロドバクター スフェロイデス (*Rhodobacter sphaeroides*) などの細菌由来の B 型 BIL ドメイン (Dassa et al, Journal of Biological Chemistry, Vol. 279, No. 31, July 30, 32001-32007) を含めた) プロテアーゼ認識部位、切断可能なシグナルペプチド、又は自動プロセシングポリペプチド配列を、組み換えプレタンパク質配列に取り込むことによって、プロタンパク質の効率的発現及び切断が可能になり、生理活性部分が遊離し、又はポリタンパク質内で発現された所望のタンパク質が遊離する。この実施形態は、プロタンパク質の天然タンパク質分解プロセシング酵素の同時発現が不要である。或いは、特定の認識部位と同起源のプロテアーゼは、プロテアーゼがタンパク質分解によって遊離し得るように、プレタンパク質配列、その間のプロテアーゼ認識部位と同一の広がりを持って (*coextensively*) 発現され得る。次いで、プレタンパク質の前駆体部分は、それに続くタンパク質分解性切断によって遊離し、プレタンパク質の活性部分が遊離する。更なる実施形態においては、操作された組み換えタンパク質の自己プロセシングが発現後に起こるように、2A 自己タンパク質分解プロセシングペプチド配列を成熟 (生理活性) 部分と前駆体タンパク質の間のプレタンパク質中に操作することができる。

10

20

30

40

50

【0018】

本発明の別の実施形態においては、本発明は、少なくとも 1 個の重鎖領域と少なくとも 1 個の軽鎖領域とを含むポリタンパク質を組み換え発現させることによって、組み換え免疫グロブリン分子の効率的発現方法を提供する。前記領域は、1 個以上のプロテアーゼ認識部位、シグナルペプチド、ポリペプチドの切断を媒介するが、連結を媒介しないインティン配列、ヘッジホッグ配列、他のインティン様若しくはヘッジホッグ様自動プロセシング配列、又はその変形物によって分離され、又はフランキングペプチドを翻訳中に分離する 2A ペプチドなどの配列によって、分離されている。更なる実施形態においては、プロテアーゼは、ポリタンパク質の残部からプロテアーゼ認識部位によって分離された、ポリタンパク質の一部として発現され得る。各プロテアーゼ認識部位は、同時に発現されるプロテアーゼと同起源である。次いで、タンパク質分解又はシグナルペプチダーゼの作用によって、プロテアーゼ及び他の個々のタンパク質が一次翻訳産物から遊離する。ポリタンパク質中のタンパク質サブユニットを分離する上記方法を併用して、所望の切断及びタンパク質発現を得ることもできる。

【0019】

免疫グロブリン発現の実施形態の場合には、軽鎖コード領域が複製されることによって、軽鎖コード領域が重鎖コード領域と 1 : 1 で発現力セット及び / 又は発現ベクター中に存在する場合よりも、完全免疫グロブリン分子の組立て及び / 又は発現が改善される。本発明の状況において、重鎖及び軽鎖タンパク質は、天然の重鎖及び軽鎖の機能的断片であり得る (機能的断片は、当分野で周知のように、その相手の抗体鎖との結合能力を保持し、同族の抗原との結合能力も保持する。したがって、本発明は、軽鎖成分と重鎖成分のコード領域比が 1 : 1 である、又は 1 : 1 を超える、構築物及び方法を提供する。例えば、一実施形態においては、LH 比は 2 : 1 であり、又は 2 : 1 を超え、他の実施形態においては、LH 比は 3 : 1、3 : 2、4 : 1 であり、又は 4 : 1 を超える。

【0020】

本発明の好ましい態様においては、軽鎖免疫グロブリンコード配列、又はその成分断片は、ポリタンパク質コード配列内で二重であり、重鎖及び軽鎖免疫グロブリンコード配列は、約2本の軽鎖と約1本の重鎖のモル比で存在し、1:1軽鎖:重鎖を超える比で発現される。軽鎖配列と重鎖配列は、ポリタンパク質中でプロテアーゼ切断部位、シグナル(又はリーダー)ペプチド、インテイン又は自己プロセシング部位によって連結されている。

【0021】

プロテアーゼ(エンドプロテアーゼ)及びシグナルペプチダーゼ、並びにポリタンパク質翻訳産物内の生物活性タンパク質の各成分を分離させるのに有用である、プロテアーゼ(エンドプロテアーゼ)及びシグナルペプチダーゼの認識部位のアミノ酸配列、及びその認識配列としては、フーリン、R X R / K - R (配列番号1); I P N VのV P 4、S / T X A - S / A G (配列番号2); タバコ エッチ (t o b a c c o e t c h) ウィルス (T E V) プロテアーゼ、E X X Y X Q - G (配列番号3); ライノウィルスの3 C プロテアーゼ、L E V L F Q - G P (配列番号4); P C 5 / 6 プロテアーゼ; P A C E プロテアーゼ、L P C / P C 7 プロテアーゼ; エンテロキナーゼ、D D D D K - X (配列番号5); 活性化第X因子プロテアーゼ、I E / D G R - X (配列番号6); トロンピン、L V P R - G S (配列番号7); g e n e n a s e I、P G A A H - Y (配列番号8); 及びMMPプロテアーゼ; カブモザイクポティウィルスの核封入タンパク質a (N 1 a); デング熱4型 (D E N 4) フラビウィルスのN S 2 B / N S 3、黄熱病ウィルス (Y F V) のN S 3 プロテアーゼ; カリフラワーモザイクウィルスのO R F V; 及びK E X 2 プロテアーゼ、M Y K R - E A D (配列番号)などが挙げられるが、これらだけに限定されない。別の内部切断部位の選択肢はC B 2である。切断が起こる認識配列内の位置をハイフンで示す。

10

20

【0022】

一実施形態においては、使用するシグナル配列は野生型であり、変異導入され、又は無作為に変異導入され、当分野で理解されている技術によるスクリーニングによって選択される。

【0023】

発現カセットも本発明の上記範囲内である。ここで、特定のポリタンパク質又はプレタンパク質(プロタンパク質、ポリタンパク質)のコード配列は、転写調節配列、発現ベクター、及び発現ベクター又は発現カセットを含む組み換え宿主細胞に作動可能に結合している。

30

【0024】

本発明は、単一のプロモーターの転写制御下にある重鎖及び軽鎖コード配列の発現に基づく、完全長免疫グロブリン又はその断片の発現系を提供する。ここで、重鎖と軽鎖の分離は、インテイン又は修飾インテイン(遊離タンパク質分子を切断するが、連結しない、又は抗体若しくは他のランキングタンパク質配列は、タンパク質の連結を防止するように修飾し得る。)によって、又はショウジョウバエ、マウス、ヒト及び他の種由来のヘッジホッグのC末端自動プロセシングドメインによって、又はシノラブディス エレガンスなどの線虫由来のw a r t h o g、g r o u n d h o g、及び他のホッグ(h o g)含有遺伝子のC末端自動プロセシングドメイン、襟鞭毛虫由来のH o g l e t - C自動プロセシングドメインによって、又はクロストリジウム サーモセラムなどの細菌由来のものなどのA型細菌インテイン様(B I L)ドメインによって、又はロドバクター スフェロイデスなどの細菌由来のB型B I Lドメインによって、媒介される。本発明に有用であるインテインとしては、サッカロミセス セレビスエ(S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) V M A、パイロコッカス(P y r o c o c c u s)、シネコシスティス(S y n e c h o c y s t i s)、当分野で公知の他のインテインなどが挙げられるが、これらだけに限定されない。重鎖と軽鎖の分離は、自己プロセシング切断部位、例えば、2 A又は2 A様配列によっても媒介され得る。

40

【0025】

50

一態様においては、本発明は、組み換え免疫グロブリンの発現用ベクターを提供する。このベクターは、免疫グロブリン分子又はその断片の第1の鎖のコード配列に作動可能に結合したプロモーターと、自己プロセッシング切断部位をコードする配列と、免疫グロブリン分子又はその断片の第2の鎖のコード配列とを含む。自己プロセッシング切断部位をコードする配列は、免疫グロブリン分子の第1の鎖のコード配列と免疫グロブリン分子の第2の鎖のコード配列との間に挿入されている。免疫グロブリン分子の第1の鎖又は第2の鎖は重鎖でも軽鎖でもよく、組み換え免疫グロブリンをコードする配列は完全長コード配列又はその断片であり得る。軽鎖に対応する第2の領域は、プロテアーゼ認識部位、シグナルペプチド、又は2A部位などの自己プロセッシング部位によって隣接領域から分離されている。正確なプロセッシングを受けた抗体鎖が生成するように、各抗体鎖成分が適切なプロセッシング部位、又はそれに関連した配列を有するという条件で、L鎖配列の2本のコピー及び1本のH鎖配列（又は各々の複数のコピー）が存在し得る。

10

【0026】

ベクターは、完全長ポリペプチド、例えば免疫グロブリン分子又はその断片を発現可能な任意の組み換えベクター、とりわけ、例えばプラスミドベクター、特にほ乳動物細胞における遺伝子発現に適切なプラスミドベクター、昆虫細胞における発現用のバキュロウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、増殖性アデノウイルスベクター、非増殖性(replication deficient)アデノウイルスベクター及びヘルパー依存型(gutless)アデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター又は非ウイルスベクター(プラスミド)であり得る。

20

【0027】

自己プロセッシング切断部位としては、2Aペプチド配列、例えば、口蹄疫ウイルス(FMDV)由来の2A配列などが挙げられる。更に好ましい態様においては、ベクターは、免疫グロブリン分子又はその断片の第1の鎖のコード配列と、免疫グロブリン分子又はその断片の第2の鎖のコード配列との間に位置し(すなわち、2A切断部位などの自己プロセッシング切断部位配列に隣接し)、第2の軽鎖配列にも隣接する、追加のタンパク質分解性切断部位をコードする配列を含む。例示的一手法においては、追加のタンパク質分解性切断部位は、コンセンサス配列RXK/R-R(配列番号1)を有するフェーリン切断部位である。自己プロセッシングペプチドを用いた組み換え免疫グロブリン発現用ベクターは、幾つかのプロモーターのいずれかを含み得る。ここで、プロモーターは、構成的、調節可能若しくは誘導性、細胞タイプ特異的、組織特異的又は種特異的である。ベクターは、免疫グロブリン鎖、プレタンパク質などのコード配列の1つ以上に対するシグナル配列をコードする配列を更に含み得る。

30

【0028】

本発明は、免疫グロブリン(すなわち、抗体)の重鎖及び軽鎖をコードする配列、自己プロセッシング切断部位をコードする配列を含むベクターであって、追加のタンパク質分解性切断部位をコードする配列を更に含み得、自己プロセッシング部位又はプロテアーゼ認識配列によってコード配列の残部から同様に分離されたプロテアーゼコード領域を含んでいてもよいベクターに感染した、宿主細胞又は宿主細胞の安定なクローンを更に提供する。完全長組み換え免疫グロブリン又はその断片の産生におけるかかる細胞又はクローンの使用も本発明の範囲に含まれる。適切な宿主細胞としては、ヨトウガ(Spodoptera frugiperda)細胞などの昆虫培養細胞、細菌を含む微生物、サッカロミセスセレピシエ、ピキアパストリス(Pichia pastoris)などの酵母細胞、トリコデルマリーセイ(Trichoderma reesei)、アスペルギルス(Aspergillus)、アウレオバシジウム(Aureobasidium)、ペニシリン(Penicillium)種などの真菌、並びにチャイニーズハムスター卵巣(例えば、CHO-K1、ATCC CCL 61; CHO DG44、Chasin et al., 1986, Som. Cell. Molec. Genet. 12: 555)、ベビーハムスター腎(BHK-21、BHK-570、ATCC CRL

40

50

8544、ATCC CRL 10314)、COS、マウス胚性(NIH-3T3、ATCC CRL 1658)、Vera細胞(ATCC CRL 1587として利用可能なアフリカミドリザル腎)、イヌ腎細胞(例えば、MDCK、ATCC CCL 34)、ラット下垂体細胞(GH1、ATCC CCL 34)、ヒト胎児腎細胞(例えば、HEK293、ATCC CRL 1573)を含めたある種のヒト細胞系などのほ乳動物細胞などが挙げられるが、これらだけに限定されない。ブタ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウシを含めて、ただしこれらだけに限定されない種々のトランスジェニック動物系も同様に使用することができる。卵白中での発現用のヒヨコ系並びにトランスジェニックヒツジ、ヤギ及びウシ系は、とりわけ、乳中での発現用に知られている。植物細胞も宿主細胞として適切である。

10

【0029】

関係する態様においては、本発明は、かかる細胞又はクローンによって産生される、組み換え免疫グロブリン分子又はその断片、及びこれらを製造する方法を提供する。ここで、免疫グロブリンは、自己プロセシング切断部位由来のアミノ酸、シグナルペプチド、インテイン、C末端自動プロセシングホッグ含有遺伝子、細菌インテイン様(BIL)ドメイン、又はプロテアーゼ認識配列を含む。インテインを使用する場合には、好ましくは、2本の抗体鎖が一緒にスプライスされて単一のポリペプチド鎖を形成しないように、又は抗体ポリペプチドの末端がインテインによって一緒にスプライスできないようなものであるように、修飾されたインテインである。インテインは、ポリタンパク質一次翻訳産物のインテイン及び/又はジャンクション近位アミノ酸配列が、切断されてエクステインを遊離するが、これらのエクステインタンパク質の連結は生じないという条件で、インフレーム融合としてNエクステインとCエクステインとの間、例えば、免疫グロブリン重鎖と免疫グロブリン軽鎖との間に位置する。

20

【0030】

本発明は、第1の発現タンパク質部分と第2のタンパク質部分の間に位置するヘッジホッグタンパク質プロセシングドメインを用いた翻訳後タンパク質プロセシング戦略を更に提供する。ヘッジホッグタンパク質プロセシングドメイン(Hh-C)は、タンパク質切断のみが起こるように、コレステロール転移部分を欠失するように短縮されていてもよい。Hh-Cが完全に切り出されない場合に備えて、第2のタンパク質部分のN末端にシグナルペプチドドメインを包含させると、成熟した第2のタンパク質をHh-C/第1のタンパク質部分からタンパク質分解によって分離し得る。ポリタンパク質が翻訳によって単一のメッセージから産生されるように、第1の発現タンパク質部分のコード配列と第2のタンパク質部分のコード配列の間に位置するヘッジホッグタンパク質プロセシングドメインを含むポリタンパク質をコードする配列を含む非天然組み換えDNA分子も、本発明のこの態様の範囲内である。

30

【0031】

本発明の更に別の態様は、新規に合成されたフーリンタンパク質を小胞体腔に向けるペプチド領域の付加を特徴とする、修飾フーリンである。本明細書に記載のインテイン又は修飾インテイン戦略も包含する。

【0032】

本発明の別の態様は、ポリタンパク質/自己プロセシング、インテインプロセシング、シグナルペプチド切断又はタンパク質分解性切断手法の二重ハイブリッド及び三重ハイブリッド(及び変種)技術への適用である。第1及び第2又は第1、第2及び第3のタンパク質は、適切な宿主細胞において単一の転写物からポリタンパク質として発現され、これらのタンパク質のコード配列は、自己プロセシング部位(例えば、2A)、インテイン、シグナルペプチド又はプロテアーゼ認識部位によって分離されている。この戦略は、1種類を超えるベクターを用いた同時移入を不要にし、又は従来のように、各タンパク質を単一の転写物から発現させることによって同時移入を不要にする。本発明の結果、経済性、効率及びタンパク質発現が改善され、結合対候補は互いに近接して、結合相手と結合しやすくなると考えられる。特定の一実施形態においては、ポリタンパク質は、ベイト(ba

40

50

i t) タンパク質と、目的ペイトタンパク質と相互作用する 1 種類以上のプレイ (p r e y) タンパク質候補である、自己プロセッシング、インティン、シグナルペプチド又はプロテアーゼ認識配列及び挿入 c D N A 配列とを含む。このクローニング及び発現戦略を図 8 及び 9 に模式的に示す。

【 0 0 3 3 】

一実施形態においては、本発明は、構築物の 5 ' 末端にある単一のプロモーターと、別々のタンパク質をコードする 2 個以上のエクステイン配列、及び発現される最後のエクステイン配列を除いて、各エクステイン配列のカルボキシ末端コード部分と融合した 1 個以上のインティン配列を含むインティン含有単位と、最後のエクステインタンパク質コード配列に続くポリアデニル化シグナルを含む 3 ' 末端配列とを含む細胞中で、複数の遺伝子産物を発現させるための D N A 構築物を提供する。インティン含有単位は、エクステインによってコードされたタンパク質に隣接する少なくとも 1 個のインティンを含む前駆体タンパク質として発現される。インティンの少なくとも 1 個は、エクステインの切り出しを触媒し得るものである。好ましくは、少なくとも 1 個のアミノ酸残基は、切り出されたエクステインがインティンによって連結されないように、インティン含有単位中で置換されており、又はインティン含有単位に付加している。特定の一実施形態においては、エクステイン配列の少なくとも 2 個が、タンパク質として発現した後に、多量体組立てにおいて会合可能である、構築物が形成される。一実施形態においては、少なくとも 2 個のエクステイン配列は、免疫グロブリン又は他の抗原認識分子をコードし得る。一実施形態においては、少なくとも 1 個のエクステイン配列は、タンパク質として発現した後に、細胞外分泌可能である。一実施形態においては、少なくとも 1 個のエクステイン配列は、ほ乳動物の遺伝子である。

10

20

【 0 0 3 4 】

複数の実施形態においては、本発明は、修飾又は非修飾インティンを用いた免疫グロブリン発現のための構築物及び方法を提供する。発現された免疫グロブリンセグメントは再連結 / 融合せず、それによって、組み立てられた抗体を複数のサブユニットから産生し得る。特定の一実施形態においては、修飾インティンは、C エクステインの第 1 の位置にあるアミノ酸残基中に変化を含む。特定の一実施形態においては、インティンセグメント内の最後から 2 番目のアミノ酸に変化がある。

30

【 0 0 3 5 】

複数の実施形態においては、本発明は、任意の遺伝子又は遺伝子の組合せの発現のための構築物及び方法を提供する。特定の一実施形態においては、C エクステインは修飾されている。更なる特定の一実施形態においては、C エクステインは、シグナル配列を用いて修飾されている。別の特定の実施形態においては、末端 C エクステイン成分が欠如している。

40

【 0 0 3 6 】

複数の実施形態においては、本発明は、インティン又はヘッジホッグ自動プロセッシングドメインの後に位置する、免疫グロブリンの第 2 の鎖 (重鎖又は軽鎖)、及び必要であれば第 3 の鎖に対する修飾シグナルペプチドを用いた、抗体遺伝子の発現のための構築物及び方法を提供する。一実施形態においては、セグメントの順序は以下のとおりである : 第 1 の鎖 - 第 1 のインティン又はヘッジホッグ - 第 1 の修飾シグナルペプチド - 第 2 の鎖 - 第 2 の修飾シグナルペプチド - 第 3 の鎖 (2 本の鎖の場合、例えば、第 3 の鎖又は「第 2 の修飾シグナルペプチド - 第 3 の鎖」セグメントは削除される。)。別の実施形態においては、第 2 のインティン又はヘッジホッグセグメントは、第 2 の鎖の後に含まれる。特定の一実施形態においては、かかる修飾シグナルペプチドを使用すると、抗体分泌が増加する。一実施形態においては、使用したシグナルペプチドを修飾して疎水性を低下させる。一実施形態においては、シグナルペプチドは非修飾である。

40

【 0 0 3 7 】

複数の実施形態においては、s O R F ベクターは、一過性発現のために与えられる。他の実施形態においては、s O R F ベクターは、安定な発現系において与えられる。一実施

50

形態においては、安定な宿主細胞は、当分野で理解されているように、例えば、形質移入及び他の技術によって、作製される。

【0038】

腫瘍壊死因子（アルファ）に特異的である抗体を発現させるための多数の例示的構築物を本明細書に具体的に開示するが、構築物は、他のタンパク質をコードする配列の置換と同じ戦略によって容易に調製することができる。特定の例としては、他の免疫グロブリン及び生物学的治療薬分子が挙げられる。更なる特定の例としては、E/Lセレクチン、インターロイキン12、インターロイキン18若しくはエリスロポイエチン受容体に特異的な抗体、又はアミノ酸配列及び/又はコード配列が当技術に利用可能である所望の特異性を有する任意の他の抗体が挙げられる。

10

【0039】

一実施形態においては、本発明は、sORF挿入断片を含む1種類以上の組み換えタンパク質産物を産生するベクターを提供する。前記sORF挿入断片は、第1のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、第1のタンパク質切断部位をコードする第1の介在核酸配列と、第2のポリペプチドをコードする第2の核酸配列とを含み、前記第1のタンパク質切断部位をコードする前記介在核酸配列は、前記第1の核酸配列と前記第2の核酸配列との間に作動可能に位置し、前記発現ベクターは、前記第1のタンパク質切断部位において切断可能であるsORFポリペプチドを発現可能である。一実施形態においては、前記第1のタンパク質切断部位は、自己プロセッシング切断部位を含む。

【0040】

一実施形態においては、自己プロセッシング切断部位は、インテインセグメント又は修飾インテインセグメントを含み、修飾インテインセグメントは、前記第1のポリペプチドと前記第2のポリペプチドとの切断を可能にするが、両者を完全に連結することはできない。一実施形態においては、自己プロセッシング切断部位は、ヘッジホッグセグメント又は修飾ヘッジホッグセグメントを含み、修飾ヘッジホッグセグメントは、前記第1のポリペプチドを前記第2のポリペプチドから切断可能にする。一実施形態においては、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドは、多量体組立て可能である。一実施形態においては、前記第1のポリペプチドと前記第2のポリペプチドの少なくとも一方は、細胞外分泌可能である。一実施形態においては、前記第1のポリペプチドと前記第2のポリペプチドの少なくとも一方は、ほ乳動物起源である。

20

30

【0041】

一実施形態においては、前記第1のポリペプチドと前記第2のポリペプチドの少なくとも一方は、免疫グロブリン重鎖又はその機能的断片を含む。一実施形態においては、前記第1のポリペプチドと前記第2のポリペプチドの少なくとも一方は、免疫グロブリン軽鎖又はその機能的断片を含む。一実施形態においては、前記第1のポリペプチドは免疫グロブリン重鎖又はその機能的断片を含み、前記第2のポリペプチドは免疫グロブリン軽鎖又はその機能的断片を含み、前記第1のポリペプチドと第2のポリペプチドは任意の順序である。一実施形態においては、前記第1のポリペプチドと第2のポリペプチドは、多量体組立てにおいて会合して、機能的抗体又は他の抗原認識分子を形成可能である。

【0042】

一実施形態においては、前記第1のポリペプチドは、前記第2のポリペプチドの上流にある。一実施形態においては、前記第2のポリペプチドは、前記第1のポリペプチドの上流にある。

40

【0043】

一実施形態においては、発現ベクターは、第3のポリペプチドをコードする第3の核酸配列を更に含み、前記第3の核酸配列は前記第2の核酸配列の後に作動可能に位置し、前記第3の配列は独立に前記第1の核酸配列又は前記第2の核酸配列のどちらかと同じでも、異なってもよい。一実施形態においては、前記第1、第2及び第3のポリペプチドの少なくとも2種類は、多量体組立てにおいて会合可能である。

【0044】

50

一実施形態においては、発現ベクターは、第2のタンパク質切断部位をコードする第2の介在核酸配列を更に含み、前記第2の介在核酸配列は前記第1及び前記第2の核酸配列の後に作動可能に位置し、前記第2の介在配列は前記第1の介在核酸配列と同じでも、異なってもよい。一実施形態においては、発現ベクターは、第3のポリペプチドをコードする第3の核酸配列と、第2のタンパク質切断部位をコードする第2の介在核酸配列とを更に含み、第2の介在核酸配列と第3の核酸配列はこの順で前記第2の核酸配列の後に作動可能に位置する。一実施形態においては、前記第3の核酸配列は、免疫グロブリン重鎖、軽鎖、又はそれぞれにその機能的断片をコードする。一実施形態においては、前記第3の核酸配列は、免疫グロブリン軽鎖又はその機能的断片をコードする。一実施形態においては、前記第3の核酸配列は、免疫グロブリン重鎖又はその機能的断片をコードする。

10

【0045】

発現ベクターの一実施形態においては、第1のタンパク質切断部位をコードする前記第1の介在核酸配列は、シグナルペプチド切断部位又は修飾シグナルペプチド切断部位の配列をコードするシグナルペプチド核酸を含む。一実施形態においては、発現ベクターは、前記第1の核酸配列又は前記第2の核酸配列の前に作動可能に位置する、シグナルペプチド切断部位をコードするシグナルペプチド核酸配列を更に含む。

【0046】

一実施形態においては、発現ベクターは、シグナルペプチド切断部位を各々独立にコードする2個のシグナルペプチド核酸配列を更に含み、一方のシグナルペプチド核酸配列は、前記第1のポリペプチドをコードする前記第1の核酸の前に作動可能に位置し、もう一方のシグナルペプチド核酸配列は、前記第2のポリペプチドをコードする前記第2の核酸の前に作動可能に位置する。複数の実施形態においては、2個のシグナルペプチド配列は、同じであり、又は異なる。

20

【0047】

一実施形態においては、シグナルペプチド核酸配列は、免疫グロブリン軽鎖シグナルペプチド切断部位又は修飾免疫グロブリン軽鎖シグナルペプチド切断部位をコードする。一実施形態においては、シグナルペプチド核酸配列は、修飾又は非修飾免疫グロブリン軽鎖シグナルペプチド切断部位をコードし、前記修飾部位は、前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、及び前記第1のポリペプチドと前記第2のポリペプチドとの集合分子の少なくとも1つを切断し、その分泌を増大させることが可能であり、前記シグナルペプチド部位の存在下の分泌レベルは、前記シグナルペプチド部位の非存在下の分泌レベルの約10%から約100倍大きい。

30

【0048】

一実施形態においては、第1のタンパク質切断部位をコードする前記介在核酸配列は、パイロコッカス ホリコシイ (*Pyrococcus horikoshii*) Pho Pol I 配列、サッカロミセス セレビシエVMA配列、シネコシステイス種 *Strain PCC 6803 DnaE* 配列、マイコバクテリウム ゼノピ (*Mycobacterium xenopi*) GyrA 配列、パイロコッカス種 GB-D DNAポリメラーゼ、A型細菌インティン様 (BIL) ドメイン及びB型BILからなる群から選択されるインティン又は修飾インティン配列を含む。

40

【0049】

一実施形態においては、第1のタンパク質切断部位をコードする介在核酸配列は、ヘッジホッグファミリーメンバーのC末端自動プロセシングドメインを含み、ヘッジホッグファミリーメンバーは、ショウジョウバエ、マウス、ヒト、又は他の昆虫若しくは動物種に由来する。一実施形態においては、第1のタンパク質切断部位をコードする介在核酸配列は、線虫由来の *warthog*、*groundhog*、又は他のホッグ含有遺伝子からのC末端自動プロセシングドメイン、又は襟鞭毛虫由来の *Hoglet* ドメインを含む。

【0050】

一実施形態においては、第1及び前記第2のポリペプチドは、腫瘍壊死因子、エリスロポイエチン受容体、RSV、EL/セレクチン、インターロイキン1、インターロイ

50

キン12、インターロイキン13、インターロイキン18、インターロイキン23、CXCL-13、GLP-1R及びアミロイドベータからなる群から選択される抗原との結合に対する抗原特異性を有する、機能的抗体又は他の抗原認識分子を含む。一実施形態においては、第1及び第2のポリペプチドは、D2E7、ABT-007、ABT-325、EL246又はABT-874の抗体由来の1対の免疫グロブリン鎖を含む。一実施形態においては、第1及び第2のポリペプチドは、D2E7、ABT-007、ABT-325、EL246、ABT-874又は他の抗体の類似のセグメントに由来する、免疫グロブリン重鎖又は免疫グロブリン軽鎖セグメントから各々独立に選択される。

【0051】

一実施形態においては、ベクターは、前記sORF挿入断片に対するプロモーター調節エレメントを更に含む。一実施形態においては、前記プロモーター調節エレメントは誘導性又は構成的である。一実施形態においては、前記プロモーター調節エレメントは組織特異的である。一実施形態においては、前記プロモーターは、アデノウイルス主要後期プロモーターを含む。

10

【0052】

一実施形態においては、ベクターは、前記第1のタンパク質切断部位を切断可能であるプロテアーゼをコードする核酸を含む。一実施形態においては、プロテアーゼをコードする前記核酸は、前記sORF挿入断片内に作動可能に位置し、前記発現ベクターは、プロテアーゼをコードする前記核酸と、前記第1の核酸と前記第2の核酸の少なくとも一方との間に位置する第2の切断部位をコードする追加の核酸を更に含む。

20

【0053】

一実施形態においては、本発明は、本明細書に記載のベクターを含む宿主細胞を提供する。一実施形態においては、宿主細胞は原核細胞である。一実施形態においては、前記宿主細胞はエシェリキア コリ (*Escherichia coli*) である。一実施形態においては、前記宿主細胞は真核細胞である。一実施形態においては、前記真核細胞は、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞及び真菌細胞からなる群から選択される。一実施形態においては、前記真核細胞は、ほ乳動物細胞、トリ細胞及び昆虫細胞からなる群から選択される動物細胞である。好ましい実施形態においては、前記宿主細胞は、CHO細胞又はジヒドロ葉酸還元酵素欠乏CHO細胞である。一実施形態においては、前記宿主細胞はCOS細胞である。一実施形態においては、前記宿主細胞は酵母細胞である。一実施形態においては、前記酵母細胞はサッカロミセス セレビスエである。一実施形態においては、前記宿主細胞は昆虫ヨトウガ Sf9 細胞である。一実施形態においては、前記宿主細胞はヒト胎児腎細胞である。

30

【0054】

一実施形態においては、本発明は、宿主細胞を培地中で、ベクタータンパク質の発現に十分な条件下で培養することを含む、組み換えポリタンパク質又は複数のタンパク質を製造する方法を提供する。一実施形態においては、方法は、前記ベクタータンパク質の回収及び/又は精製を更に含む。一実施形態においては、前記複数のタンパク質は、多量体組立て可能である。一実施形態においては、組み換えポリタンパク質又は複数のタンパク質は、生物学的に機能的であり、及び/又は治療効果がある。

40

【0055】

一実施形態においては、本発明は、請求項38に記載の宿主細胞を培地中で、免疫グロブリンタンパク質若しくはその機能的断片、組み立てられた抗体、又は他の抗原認識分子の製造に十分な条件下で培養することを含む、免疫グロブリンタンパク質若しくはその機能的断片、組み立てられた抗体、又は他の抗原認識分子を製造する方法を提供する。

【0056】

一実施形態においては、本発明は、本明細書の方法によって製造されるタンパク質又はポリタンパク質を提供する。一実施形態においては、本発明は、本明細書の方法によって製造される、組み立てられた免疫グロブリン、組み立てられた他の抗原認識分子、又は個々の免疫グロブリン鎖若しくはその機能的断片を提供する。一実施形態においては、免疫

50

グロブリン、他の抗原認識分子、又は個々の免疫グロブリン鎖若しくはその機能的断片は、腫瘍壊死因子、エリスロポイエチン受容体、インターロイキン18、EL/セレクチン又はインターロイキン12との特異的抗原結合をもたらす能力があり、又はその一因となる能力がある。一実施形態においては、免疫グロブリンはD2E7であり、又は機能的断片はD2E7の断片である。

【0057】

一実施形態においては、本発明は、タンパク質と薬剤として許容される担体とを含む、薬剤組成物又は医薬品を提供する。薬剤用の賦形剤及び担体は、当分野で理解されているように選択される。

【0058】

一実施形態においては、本発明は、第1のタンパク質切断部位が、細胞のプロテアーゼ切断部位、又はウイルスのプロテアーゼ切断部位を含む、発現ベクターを提供する。一実施形態においては、前記第1のタンパク質切断部位は、フューリン；IPNVのVP4；タバコエッチウイルス(TEV)プロテアーゼ；ライノウイルスの3Cプロテアーゼ；PC5/6プロテアーゼ；PACEプロテアーゼ、LPC/PC7プロテアーゼ；エンテロキナーゼ；活性化第X因子プロテアーゼ；トロンピン；genenase I；MMPプロテアーゼ；カブモザイクポティウイルスの核封入タンパク質a(N1a)； Deng熱4型フラビウイルスのNS2B/NS3、黄熱病ウイルスのNS3プロテアーゼ；カリフラワーモザイクウイルスのORF V；KEX2プロテアーゼ；CB2；又は2Aによって認識される部位を含む。一実施形態においては、前記第1のタンパク質切断部位は、ウイルスの内部切断可能なシグナルペプチド切断部位である。一実施形態においては、ウイルスの内部切断可能な前記シグナルペプチド切断部位は、インフルエンザCウイルス、C型肝炎ウイルス、ハンタウイルス、フラビウイルス又は風疹ウイルス由来の部位を含む。

【0059】

一実施形態においては、本発明は、二重ハイブリッド系がベイトタンパク質とプレイトタンパク質候補とを含み、ベイトタンパク質部分とプレイトタンパク質候補部分とを含むポリタンパク質をコードする発現ベクターが導入された宿主細胞を用意する段階であって、前記各部分が自己プロセッシング切断配列、シグナルペプチド配列又はプロテアーゼ切断部位によって分離されている段階と、ポリタンパク質の発現、及びポリタンパク質の自己プロセッシング又はプロテアーゼ切断が可能である条件下で宿主細胞を培養する段階とを含む、二重ハイブリッド系のタンパク質の発現方法を提供する。一実施形態においては、ポリタンパク質は、三重ハイブリッド系の切断可能成分を更に含む。

【0060】

一実施形態においては、発現ベクターは2A配列を含まない。一実施形態においては、前記第1のタンパク質切断部位が、FMDV 2A配列、又は他のピコルナウイルス科、昆虫ウイルス、C型ロタウイルス、トリパノソーマ若しくはサーモトガマリチマ(Thermatogamaritima)由来の2A様ドメインを含む、発現ベクターを提供する。

【0061】

一実施形態においては、本発明は、ポリタンパク質のコード配列を含む、組み換えタンパク質を発現する発現ベクターを提供する。ポリタンパク質は、少なくとも第1及び第2のタンパク質セグメントを含み、前記各タンパク質セグメントは、その間のタンパク質切断部位によって分離されており、タンパク質切断部位は、自己プロセッシングペプチド切断配列、シグナルペプチド切断配列又はプロテアーゼ切断配列を含み、前記コード配列は、宿主細胞中で発現可能であり、宿主細胞内で切断される。

【0062】

一実施形態においては、本発明は、介在核酸配列がタグを更にコードする、発現ベクターを提供する。

【0063】

本発明の他の態様、特徴及び利点は、添付図面と併せて、開示目的で示す、以下の本発

10

20

30

40

50

明の説明から明らかである。

【 0 0 6 4 】

一般に、本明細書において使用する用語及び句は、当業者に公知の標準の教科書、学術雑誌及びコンテクストを参照することによって見出すことができる、その分野で認識されている意味を有する。本明細書に規定する定義は、本発明の状況においてその具体的な使用を明らかにするものである。

【 0 0 6 5 】

特定の理論に拘泥するものではないが、本発明に関係する基本原理又は機序の考え又は理解について本明細書で考察する。説明又は仮説の最終的な正確さにかかわらず、本発明の一実施形態が有効であり、有用であることを認識されたい。

10

(発明の詳細)

【 0 0 6 6 】

以下の説明及び非限定的例によって、本発明を更に理解することができる。

【 0 0 6 7 】

本発明は、酵素、ホルモン(例えば、インスリン)、サイトカイン、ケモカイン、受容体、抗体、他の分子などの構造タンパク質又は生物活性タンパク質の発現のための系、例えば、構築物及び方法を提供する。好ましくは、タンパク質は、インターロイキン、完全長免疫グロブリン、その断片、当分野で理解されている他の抗原認識分子などの免疫調節性タンパク質、又は他の生物学的治療薬分子である。かかるシステムの概要は、組み換え製造が、単一のプロモーターの転写制御下にある重鎖及び軽鎖コード配列の発現に基づき、単一の翻訳産物(ポリタンパク質)から別々の重鎖及び軽鎖への転化が、各フランキングペプチドをリボソームにおいて翻訳中に分離するインテイン、ホッグ含有自動プロセシングドメイン、2A又は2A様配列によって媒介され、又は成熟生物活性タンパク質の2本の鎖の間に位置する1個以上のプロテアーゼ認識配列におけるタンパク質分解プロセシングの結果である、免疫グロブリン分子の特定の状況におけるものである。

20

【 0 0 6 8 】

(インテインセグメント、ホッグドメイン、2A若しくは2A様又はプロテアーゼ認識部位及び各々に対するその変形物に関係していても、いなくても)介在部位は、切断部位と称し得る。複数の3個以上のタンパク質セグメントが発現される場合、かかる切断部位は、複数のセグメントの少なくとも任意の2個の間に位置し得、又は切断部位は、各セグメントの後に位置し得、最後のセグメントの後でもよいが、最後のセグメントの後ではないことが好ましい。複数の切断部位を使用する場合には、各々は、別の切断部位と同じでも、無関係でもよい。

30

【 0 0 6 9 】

一態様においては、本発明は、組み換え免疫グロブリンの発現用ベクターを提供する。このベクターは、免疫グロブリン分子又はその断片の第1の鎖のコード配列に作動可能に結合したプロモーターと、自己プロセシング又は他のタンパク質分解性切断部位をコードする配列と、免疫グロブリン分子又はその断片の第2の鎖のコード配列とを含む。自己プロセシング又は他のタンパク質分解性切断部位をコードする配列は、免疫グロブリン分子の第1の鎖のコード配列と免疫グロブリン分子の第2の鎖のコード配列との間に挿入され、免疫グロブリン軽鎖をコードする第3の領域も、自己プロセシング又は他のタンパク質分解性切断部位によってポリタンパク質の残部から分離されている。

40

【 0 0 7 0 】

一実施形態においては、免疫グロブリンポリタンパク質分子の第1の鎖又は第2の鎖は、重鎖でも軽鎖でもよい。組み換え免疫グロブリンセグメントをコードする配列は、完全長コード配列又はその断片であり得る。特定の実施形態においては、第2の軽鎖コード配列は、本発明の実施においてプロセシングを受けるポリタンパク質をコードする配列の一部でなければならない。すなわち、まとめると、2本の軽鎖と1本の重鎖を任意の順序で含む3個のセグメントがある。特定の実施形態においては、構築物は、これらの成分で、以下の順序で構成される：a) IgH - I g L、b) I g L - I g H、c) I g H - I g

50

L - I g L、d) I g L - I g H - I g L、e) I g L - I g L - I g H、f) I g H - I g H - I g L、g) I g H - I g L - I g H、及び/又はh) I g L - I g H - I g H。一実施形態においては、ハイフンは、切断部位配列が位置する場所を示し得る。

【0071】

或いは、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖コード配列は、その間のインテインコード配列にインフレームで融合している。インテインは、スプライシング活性を欠くように修飾され、又は重鎖及び軽鎖の末端は、スプライシングが好ましくは起きないように、若しくはスプライシングが低効率で起きて、スプライシングされていない抗体分子が優勢であるように、設計されている。また、修飾インテインは、軽い及び重い抗体ポリペプチドが、一次翻訳産物の介在インテイン部分から解放されるように、部位特異的タンパク質分解性切断活性が残留しているという条件で、(エンドヌクレアーゼ領域が以前に存在した)エンドヌクレアーゼ領域が存在しないように更に修飾し得る。軽い又は重い抗体ポリペプチドは、Nエクステインであり得、Cエクステインであり得る。

10

【0072】

ベクターは、完全長ポリタンパク質を発現可能である任意の組み換えベクター、例えば、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、増殖性アデノウイルスベクター、非増殖性アデノウイルスベクター及びヘルパー依存型アデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター若しくは非ウイルスベクター(プラスミド)又は当分野で公知の任意の他のベクターであり得る。免疫グロブリン又は他のタンパク質が発現される宿主細胞に適切なベクターが好ましい。バキュロウイルスベクターは、昆虫細胞における遺伝子発現に利用可能である。多数のベクターが当分野で公知であり、多数のベクターが市販されており、又は当分野に容易に利用することができる。

20

【0073】

切断部位

好ましい自己プロセッシング切断部位としては、インテイン配列、修飾インテイン、ヘッジホッグ配列、他のホッグファミリー配列、2A配列、例えば、口蹄疫ウイルス(FMDV)由来の2A配列、各々に対するその変形物などが挙げられる。

【0074】

その認識配列を2A配列の代わりに使用し得るプロテアーゼとしては、上述したように、フューリン、トランスゴルジ網ではなく小胞体を標的とする修飾フューリン、IPNVのVP4、TEVプロテアーゼ、核局在化シグナル欠損TEVプロテアーゼ(TEV N1s-)、ライノウイルスの3Cプロテアーゼ、PC5/6プロテアーゼ、PACEプロテアーゼ、LPC/PC7プロテアーゼ、エンテロキナーゼ、Xaプロテアーゼ、トロンピン、genenase I、MMPプロテアーゼなどが挙げられるが、これらだけに限定されない。本発明の実施において有用である他のエンドプロテアーゼは、カブモザイクポティウイルスの核封入タンパク質a(N1a)(Kim et al. 1996. *Virology* 221:245-249); デング熱4型(DEN4)フラビウイルスのNS2B/NS3(Falgout et al. 1993. *J. Virol.* 67:2034-2042; Lai et al. 1994. *Arch. Virol. Suppl.* 9:359-368)、黄熱病ウイルス(YFV)のNS3プロテアーゼ(Chambers et al. 1991. *J. Virol.* 65:6042-6050); カリフラワーモザイクウイルスのORF V(Torruella et al. 1989. *EMBO Journal* 8:2819-2825); その例がPsp-GBD Polインテイン(Xu, M.Q. 1996. *EMBO* 15:5146-5153)である、インテイン; その例がインフルエンザCウイルスの内部切断可能シグナルペプチドである、内部切断可能シグナルペプチド(Pekosz A. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3233-3238); 及びKEX2プロテアーゼ、MYKR-EAD(配列番号9); KEX2、及びERを標的にした修飾KEX2(Chaudhuri et a

30

40

50

1. 1992. *Eur. J. Biochem.* 210: 811 - 822 参照) を含めて、ただしこれらだけに限定されないプロテアーゼである。ERを唯一の対象とする修飾KEX2は、それぞれ表7A及び7Bに示すコード配列及びアミノ酸配列を有し、KEX2-sol-KDELと呼ばれる。サッカロミセス セレピシエ由来のKEX2の一次アミノ酸配列は、膜結合ドメインを除去し、タンパク質のC末端においてERターゲティング配列KDELを付加するように修飾された。適切な切断認識部位を含むポリタンパク質の切断に有用である他のヒトプロテアーゼとしては、米国特許出願公開第2005/0112565号に記載のヒトプロテアーゼなどが挙げられる。キロショウジョウバエ由来のソニックヘッジホッグタンパク質、特にそのプロセシングドメインは、ポリタンパク質一次翻訳産物からタンパク質を解放するのにも役立ち得る。

10

【0075】

トランスゴルジ網(TGN)ではなく小胞体(ER)を標的とする修飾フューリンプロテアーゼは、天然フューリンプロテアーゼ同様、本発明の範囲内である。Vorhees et al. 1995. *EMBO Journal* 14: 4961 - 4975は、フューリンのEED E(配列番号10)部分(アミノ酸775 - 778)がTGNに対するプロテアーゼのターゲティングに関与すると記述した(Nakayama et al. 1997. *Biochem. Journal* 327: 625 - 635)。Zerangue et al. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2431 - 2436は、タンパク質のC末端におけるKKXXを含めた、ER輸送シグナルを報告した。このように、修飾フューリンが開発され、フューリン切断活性を、TGN及びその後の区画の代わりに、又はそれらに加えて、ER区画に向けるのに使用される。

20

【0076】

更に別の態様においては、ベクターは、免疫グロブリン分子又はその断片の第1の鎖のコード配列と、免疫グロブリン分子の第2の鎖及び/又は第3の鎖(例えば、第1又は第2の鎖の複製)又はその断片のコード配列との間に位置する(すなわち、2A切断部位であり得る、切断部位配列に隣接する)、追加の切断部位をコードする配列を含む。例示の一手法においては、追加のタンパク質分解性切断部位は、コンセンサス配列RXK(R)R(配列番号1)を有するフューリン切断部位である。

30

【0077】

プロモーターを含む調節配列; 宿主細胞

組み換え免疫グロブリン又は他のタンパク質の発現用ベクターは、当分野で公知である幾つかのプロモーターのいずれかを含み得る。ここで、プロモーターは、構成的、調節可能若しくは誘導性、細胞タイプ特異的、組織特異的又は種特異的である。更なる具体例としては、例えば、テトラサイクリン応答性プロモーターが挙げられる(Gossen M, Bujard H, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992, 15; 89(12): 5547 - 5551)。ベクターは、キメラ遺伝子が発現される宿主細胞に適応されるレプリコンであり、細菌細胞においても同様に機能的であるレプリコンを含むことも望ましく、有利には、分子生物学的操作に好都合な細胞であるエシェリキア コリである。

40

【0078】

遺伝子発現用宿主細胞は、動物細胞、特にほ乳動物細胞であり得、又は微生物細胞(細菌、酵母、真菌、ただし好ましくは真核生物)若しくは植物細胞であり得る。特に適切な宿主細胞としては、ヨトウガ細胞などの昆虫培養細胞、サッカロミセス セレピシエ、ピキア パストリスなどの酵母細胞、トリコデルマ リーセイ、アスペルギルス、アウレオバシジウム、ペニシリン種などの真菌、及びCHO(チャイニーズハムスター卵巣)、BHK(ベビーハムスター腎)、COS、293、3T3(マウス)、Ver o(アフリカミドリザル)細胞などのほ乳動物細胞などが挙げられる。ブタ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウシを含めて、ただしこれらだけに限定されない種々のトランスジェニック動物系も同様に使用することができる。卵白中での発現用のヒヨコ系並びにトランスジェニッ

50

クヒツジ、ヤギ及びウシ系は、とりわけ、乳中での発現用に知られている。バキュロウイルスベクター、特にAcNPVベクターは、例えばポリヘドリンプロモーター、又は昆虫細胞系における他の強力なプロモーター（promote）の調節性制御下にあるsORFの発現によって、本発明の単一のORF抗体発現及び切断に使用することができる。かかるベクター及び細胞系は当分野で周知であり、市販されている。ほ乳動物細胞に使用されるプロモーターは、構成的（ヘルペスウイルスTKプロモーター、McKnight, Cell 31:355, 1982; SV40初期プロモーター、Benoit et al. Nature 290:304, 1981 ラウス肉腫ウイルスプロモーター、Gorman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777, 1982; サイトメガロウイルスプロモーター、Foeking et al. Gene 45:101, 1980; マウス乳癌ウイルスプロモーター、一般にEtcheverry in Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al., eds, pp.162-181, Wiley & Sons, 1996 参照）であり得、又は調節することができる（メタロチオネインプロモーター、例えば、Hamer et al. J. Molec. Appl. Genet. 1:273, 1982）。ベクターは、特定のは乳動物細胞、特にレトロウイルス、ワクシニア及びアデノウイルスに感染するウイルスに基づくことができ、それらの誘導体は、当分野で公知であり、市販されている。プロモーターとしては、サイトメガロウイルス、アデノウイルス後期、ワクシニア7.5Kプロモーターなどが挙げられるが、これらだけに限定されない。酵母及び真菌のベクター（例えば、Bennett, J.W. and Lasure, L.L. (eds.), More Gene Manipulations in Fungi, Academy Press, Inc., New York中のVan den Handel, C. et al. (1991), 397-428参照）及びプロモーターも周知であり、広範に利用可能である。エノラーゼは周知の構成的酵母プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼは周知の調節されたプロモーターである。

【0079】

特定のプロモーター、転写終結配列、及び組織特異的配列をコードする配列などの他の任意の配列の選択は、その中での発現が望まれる細胞タイプによって主に決定される。細菌、酵母、真菌、ほ乳動物、昆虫、ヒヨコ又は他の動物細胞であり得る。

【0080】

シグナル配列

ベクターに取り込まれる、切断、タンパク質分解性プロセッシング又は自己プロセッシングを受けるタンパク質のコード配列は、1個以上のシグナル配列をコードする1個以上の配列を更に含み得る。これらのコードされたシグナル配列は、ポリタンパク質内の1個以上の成熟セグメントと結合し得る。例えば、免疫グロブリン重鎖リーダー配列をコードする配列は、ポリタンパク質コード配列の残部とインフレイムで作動可能に結合した、重鎖のコード配列に先行し得る。同様に、軽鎖リーダーペプチドコード配列又は他のリーダーペプチドコード配列は、免疫グロブリン軽鎖コード配列の一方又は両方とインフレイムで結合し得る。リーダー配列鎖は、隣接鎖によって（2Aなどの）自己プロセッシング部位から分離され、又はプロテアーゼ認識配列をコードする配列によって分離され、適切な読み枠が維持される。

【0081】

免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の化学量論

本明細書の多数の実施形態においては、免疫グロブリン/抗体軽鎖（Ig L）及び重鎖（Ig H）は、ベクターレベルで、又は発現された細胞内レベルで、宿主細胞内に約1:1（Ig L: Ig H）で存在する。本明細書等の組み換え手法は、重鎖と軽鎖の等モルの発現に依拠するが（例えば、米国特許出願公開第2005/0003482号A1又は国際公開第2004/113493号参照）、他の実施形態においては、本発明は、一次翻

訳産物がポリタンパク質であるときに、軽鎖と重鎖のコード配列の比が2 : 1であり、鎖の自己プロセシング又はタンパク質分解プロセシングと同時発現される、方法、発現カセット及びベクターを提供する。複数の実施形態においては、比は約2 : 1又は2 : 1よりも大きいなど、1 : 1よりも大きい。特定の一実施形態においては、軽鎖コード配列は、1 : 1 (I g L : I g H) を超える比で使用される。特定の実施形態においては、I g L : I g H比は2 : 1である。

【0082】

本発明は、免疫グロブリン(すなわち、抗体)の重鎖及び1本又は少なくとも2本の軽鎖をコードする配列と、その間の自己プロセシング、プロテアーゼ認識部位、シグナルペプチドなどの切断部位をコードする配列とを含み、追加のタンパク質分解性切断部位をコードする配列を更に含み得る、ベクターで転換された、又はベクターに感染した、宿主細胞又は宿主細胞の安定なクローンを更に提供する。完全長組み換え免疫グロブリン若しくはその断片、又は複数のサブユニット(例えば、二連鎖(two-chain)若しくは多連鎖(multi-chain)分子、又はプロタンパク質として天然に産生され、切断若しくはプロセシングされて、前駆体から誘導されるタンパク質及び活性部分を遊離するもの)を含む他の生物活性タンパク質の産生における、かかる細胞又はクローンの使用も本発明の範囲に含まれる。非限定的例としては、インスリン、インターロイキン18、インターロイキン1、骨形成タンパク質4、骨形成タンパク質2、任意の他の二連鎖骨形成タンパク質、神経成長因子、レニン、キモトリプシン、トランスフォーミング成長因子及びインターロイキン1 が挙げられる。

【0083】

関係する態様においては、本発明は、かかる細胞又はクローンによって産生される、組み換え免疫グロブリン分子若しくはその断片又は他のタンパク質、並びにこれらを製造する方法、ベクター及び宿主細胞を提供する。免疫グロブリンは、(インテイン、ヘッジホッグドメインなどの)自己プロセシング切断部位、切断部位又はシグナルペプチド切断から誘導されるアミノ酸を含む。複数の実施形態においては、本発明は、本明細書に記載の1種類以上の構築物を含む宿主細胞を提供する。

【0084】

本発明は、免疫グロブリン分子又はその断片の発現用の単一のベクター構築物、及び該ベクター構築物をインビトロ又はインビボで使用方法を提供する。ベクターは、第1の免疫グロブリンコード配列と第2の免疫グロブリンコード配列の間、及び第2の免疫グロブリンコード配列と第3の免疫グロブリンコード配列の間に、自己プロセシング又は他のプロテアーゼ認識配列を有し、単一のプロモーター及び転写物を用いた機能的抗体分子の発現を可能にする。例示的なベクター構築物は、オープンリーディングフレーム間の自己プロセシング切断部位をコードする配列を含み、切断後に、自己プロセシング切断部位を含むアミノ酸を除去するための自己プロセシング切断部位に隣接する追加のタンパク質分解性切断部位を更に含み得る。ベクター構築物は、完全長生物活性免疫グロブリン又はその断片のインビトロ及びインビボでの産生の増加に関連する方法に有用である。少なくとも2本の異なる鎖を有する他の生物活性タンパク質も同じ戦略によって製造することができるが、一方の鎖のコード配列が他方の鎖のコード配列に対して1を超える比で存在する必要は必ずしもないと理解される。

【0085】

特定の組成物及び方法を本明細書に例示するが、幾つかの代替の組成物及び方法のいずれでも本発明の実施に使用するのに適用可能であり、適切であると理解される。本発明のポリタンパク質発現カセット及びベクター、宿主細胞並びに方法の評価は、当分野で標準の手順によって実施し得ることも理解されたい。本発明の実施は、別段の記載がない限り、当業者の範囲内である、細胞生物学、(組み換え技術を含めた)分子生物学、微生物学、生化学及び免疫学の従来技術を使用する。かかる技術は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989)、Oligonucleotide

Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984)、Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987)、Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.)、Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.)、Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987)、Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1993)、PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994) 及び Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991) などの文献に詳細に説明されている。これらの各々を参照により本明細書に明確に組込む。

10

【0086】

別段の記載がない限り、本明細書において使用する全用語は、当業者に対するものと同じ意味を有する。本発明の実施は、当業者の知識の範囲内である、微生物学及び組み換えDNA技術の従来技術を使用する。

【0087】

タンパク質に関連して本明細書において一般に使用する「修飾」という用語は、少なくとも1個のアミノ酸残基が基準分子において置換された、基準分子から除去された、又は基準分子に付加された、セグメントを指す。同様に、核酸に関連して、この用語は、少なくとも1個の核酸サブユニットが基準分子において置換された、基準分子から除去された、又は基準分子に付加された、セグメントを指す。

20

【0088】

本明細書では「インテイン」という用語は、インテイン自体の除去を促進し、エクステインとして知られるフランキングセグメントを連結する、タンパク質の内部セグメントを典型的には指す。インテインの多数の例が種々のタイプの生物体において認められ、構造的及び/又は機能的特徴を共有する場合もある。本発明は、存在が認められている、また、今後存在が認められ、又は発見される、インテイン及びその変種を広範に使用することができる。例えば、Gogarten JP et al., 2002, Annu Rev Microbiol. 2002; 56: 263-87; Perler, F. B. (2002), InBase, the Intein Database. Nucleic Acids Res. 30, 383-384 (また、インターネットによる、New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA; <http://www.neb.com/neb/inteins.html> のウェブサイト; Amitai G, et al., Mol Microbiol. 2003, 47(1): 61-73; Gorbalenya AE, Nucleic Acids Res. 1998; 26(7): 1741-1748. Non-canonical inteins) を参照されたい。タンパク質においては、インテイン含有単位又はインテインスプライシング単位は、構造的側面が切断、連結などの反応の一因となり得る、フランキングエクステインの一部を包含すると理解される。この用語は、「修飾インテイン」成分を含む、インテインに基づく系に関連したカテゴリーとしても理解される。

30

40

【0089】

本明細書では「修飾インテイン」という用語は、切断又は切り出されたエクステインがインテインによって完全に連結されないように、少なくとも1個のアミノ酸残基が、インテインスプライシング単位において置換された、インテインスプライシング単位から除去された、又はインテインスプライシング単位に付加された、合成インテイン又は天然インテインを指す。

【0090】

50

本明細書では「ヘッジホッグ」という用語は、自己タンパク質分解性機能をもたらす構造を有するメンバーを含む遺伝子ファミリー（及び対応するタンパク質セグメント）を指す。ファミリーメンバーとしては、例えば、ショウジョウバエ、マウス、ヒト及び他の種由来の類似体が挙げられる。また、「ヘッジホッグセグメント」という用語は、かかるファミリーメンバーだけを包含するものではなく、シノラブディス エレガンスなどの線虫由来の warthog、groundhog 及び他のホッグ (hog) 含有遺伝子の自動プロセシングドメイン、並びに襟鞭毛虫由来の Hoglet - C 自動プロセシングドメインにも広範に関係する。例えば、Perler FB. Protein splicing of inteins and hedgehog autoproteolysis: structure, function, and evolution, *Cell*. 1998, 92(1):1-4; Koonin, EV et al., (1995) A protein splice-junction motif in hedgehog family proteins. *Trends Biochem Sci*. 20(4): 141-2; Hall TM et al., (1997) Crystal structure of a Hedgehog autoprocessing domain: homology between Hedgehog and self-splicing proteins. *Cell* 91(1): 85-97; Snell EA et al, *Proc. R. Soc. B* (2006) 273, 401-407; Aspöck et al, *Genome Research*, 1999, 9:909-923 を参照されたい。ヘッジホッグセグメントの特定の例は、キイロショウジョウバエから得られるソニックヘッジホッグタンパク質である。この用語は、「修飾ヘッジホッグ」成分を含む、ヘッジホッグに基づく系に関連したカテゴリーとしても理解される。

【0091】

「修飾ヘッジホッグ」セグメントという用語は、切断されたセグメントが完全に連結されないように、少なくとも1個のアミノ酸残基が、ヘッジホッグスプライシング単位において置換された、ヘッジホッグスプライシング単位から除去された、又はヘッジホッグスプライシング単位に付加された、合成ヘッジホッグセグメント又は天然ヘッジホッグセグメントを指す。

【0092】

本明細書では「ベクター」という用語は、1個以上の異種又は組み換えDNA配列を含み、異なる宿主細胞間を移動するように設計された、プラスミド、ウイルス、他のビヒクルなどのDNA又はRNA分子を指す。「発現ベクター」及び「遺伝子治療ベクター」という用語は、細胞における異種DNA断片の取り込み及び発現に有効である任意のベクターを指す。クローニング又は発現ベクターは、追加の元素を含み得る。例えば、発現ベクターは、2つの複製系を有することがあり、したがって2種類の生物体中で、例えば発現用のヒト細胞とクローニング及び増幅用の原核生物宿主中で、維持することができる。タンパク質又はポリペプチドの発現が、例えばウイルスベクター又は非ウイルスプラスミドベクターから得られるように、核酸を細胞に導入するのに有効である任意の適切なベクターを使用することができる。発現に有効な任意の細胞、例えば、昆虫細胞及び酵母、ほ乳動物細胞などの真核細胞は、本発明の実施に有用である。

【0093】

「異種DNA」及び「異種RNA」という用語は、これらが存在する細胞又はゲノム若しくはベクターの一部に対して内因性（自然）ではないヌクレオチドを指す。一般に、異種DNA又はRNAは、形質導入、感染、移入、転換、電気穿孔法、遺伝子銃による転換などによって細胞に添加される。かかるヌクレオチドは、一般に、少なくとも1個のコード配列を含むが、コード配列は発現されなくてもよい。「異種DNA」という用語は、「異種コード配列」又は「導入遺伝子」とも称し得る。

【0094】

本明細書では「タンパク質」及び「ポリペプチド」という用語は、区別なく使用するこ

とができ、本発明の自己プロセッシング切断部位含有ベクターを用いて発現される対象の「タンパク質」及び「ポリペプチド」を典型的には指す。かかる「タンパク質」及び「ポリペプチド」は、以下に更に記述する研究、診断又は治療目的に有用である任意のタンパク質又はポリペプチドであり得る。本明細書では、ポリタンパク質は、2種類以上のポリペプチド産物を産生するプロセッシング用のタンパク質である。

【0095】

本明細書では「多量体」という用語は、集合して機能的タンパク質を形成する、2本以上の（「サブユニット」と称する場合もある）ポリペプチド鎖からなるタンパク質である。多量体は、2本（2量体）、3本（3量体）、4本（4量体）又は5本以上（例えば、5量体など）のペプチド鎖で構成され得る。多量体は、自己組織化によって生成し得るものであり、又は組立てを補助する触媒などの成分を必要とし得る。多量体は、同一のペプチド鎖のみで構成され（ホモ多量体）、又は2種類以上の異なるペプチド鎖で構成され得る（ヘテロ多量体）。かかる多量体は、構造的又は化学的に機能的であり得る。酵素、ホルモン、抗体、サイトカイン、ケモカイン及び受容体を含めて、ただしこれらだけに限定されない多数の多量体が当分野で知られ、使用されている。したがって、多量体は、生物学的（例えば、薬剤）にも、工業的（例えば、バイオプロセッシング/生物生産）にも有用であり得る。

10

【0096】

本明細書では「タグ」という用語は、挿入ベクターの1種類以上の発現産物の検出及び/又は精製を可能にするように機能し得る、発現ベクターに取り込むことができるペプチドを指す。かかるタグは当分野で周知であり、標識アビジン（例えば、光学的方法又は比色定量法によって検出することができる蛍光性マーカー又は酵素活性を含むストレプトアビジン）によって検出することができる、ピオチン部分のポリペプチドに対する放射性標識アミノ酸又は付加物（attachment）などが挙げられる。FLAG、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、セルロース結合ドメイン、チオレドキシン、NusA、ミスチン（mistin）、キチン結合ドメイン、クチナーゼ、AGT、GFPなどの親和性タグは、タンパク質発現及び精製系などに広く用いられている。ポリペプチドに対するタグの更なる非限定的例としては、ヒスチジンタグ、放射性同位体又は放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 又は ^{153}Sm ）；蛍光タグ（例えば、FITC、ローダミン、ランタニドリン光体）、酵素タグ（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）；化学発光タグ；ピオチニル基；二次レポーター（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体用結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）によって認識される所定のポリペプチドエピトープ；及びガドリニウムキレートなどの磁性剤（magnetic agent）が挙げられるが、これらだけに限定されない。

20

30

【0097】

本発明のウイルス性遺伝子治療ベクターに関連して本明細書で使用する「複製欠陥のある」という用語は、ウイルスベクターがそのゲノムを独立して更に複製することができず、含むことができないことを意味する。例えば、対象細胞がrAAVピリオンに感染したときには、異種遺伝子が感染細胞中で発現されるが、感染細胞がAAV rep及びcap遺伝子並びに補助的な機能遺伝子を欠いているために、rAAVを複製することができない。

40

【0098】

本明細書では「レトロウイルス導入ベクター」とは、導入遺伝子をコードするヌクレオチド配列を含み、ベクターのパッケージングに必要なヌクレオチド配列を更に含む発現ベクターを指す。好ましくは、レトロウイルス導入ベクターは、細胞中で導入遺伝子が発現するのに必要な配列も含む。

【0099】

本明細書では「パッケージング系」とは、組み換えウイルスのパッケージングに關与す

50

るウイルスタンパク質をコードする遺伝子を含む1組のウイルス性構築物を指す。典型的には、パッケージ系の構築物は、パッケージ細胞に最終的に取り込まれる。

【0100】

本明細書では「第二世代」レンチウイルスベクター系とは、アクセサリ-遺伝子 *vif*、*vpr*、*vpu* 及び *nef* が除去又は不活性化されたものなど、機能的アクセサリ-遺伝子を欠くレンチウイルスパッケージ系を指す。例えば、Zufferey et al. 1997. Nat. Biotechnol. 15: 871-875 を参照されたい。

【0101】

本明細書では「第三世代」レンチウイルスベクター系とは、第二世代ベクター系の諸特性を有し、*tat* 遺伝子が除去又は不活性化されたものなど、機能的 *tat* 遺伝子を更に欠く、レンチウイルスパッケージ系を指す。典型的には、*rev* をコードする遺伝子は、別の発現構築物で与えられる。例えば、Dull et al. 1998. J. Virol. 72: 8463-8471 を参照されたい。

【0102】

ウイルス又はウイルスベクターに関して本明細書で使用する「シュードタイプ化 (*pseudotyped*)」とは、未変性ウイルスエンベロープタンパク質を異種ウイルスエンベロープタンパク質又は機能的に改変されたウイルスエンベロープタンパク質で置換することを指す。

【0103】

組み換えDNA構築物又はベクターに関連して本明細書で使用する「作動可能に結合した」という用語は、組み換えDNA構築物又はベクターのヌクレオチド成分が、通常は共有結合していることを意味する。一般に、「作動可能に結合した」DNA配列は、隣接し、また、分泌リーダーの場合には、同じ読み枠内で隣接する。しかし、エンハンサーは、発現が上方制御される配列と隣接する必要はない。この用語は、作動可能に位置する、と同じである。

【0104】

エンハンサー配列は、プロモーター依存性遺伝子の発現に影響を及ぼし、未変性遺伝子の5'又は3'領域に位置し得る。「エンハンサー」は、隣接遺伝子の転写を刺激又は阻害するシス作用エレメントである。転写を阻害するエンハンサーは「サイレンサー」とも称する。エンハンサーは、コード配列から、また、転写された領域の下流の位置から、数キロ塩基対 (kb) までの距離にわたって、どちらの方向でも機能し得る (すなわち、コード配列と結合し得る。)。また、核マトリックス付着領域 (Chung, Cell, 1993, Aug 13; 74(3): 505-14, Frisch et al, Genome Research, 2001, 12: 349-354, Kim et al, J. Biotech 107, 2004, 95-105) など、インスレーター又はクロマチン開始 (*opening*) 配列は、安定に組み込まれた遺伝子カセットの転写を促進するのに使用し得る。

【0105】

本明細書では「遺伝子」又は「コード配列」という用語は、適切な調節配列に作動可能に結合したときに、ポリペプチドにインビトロ又はインビボで転写 (DNA) 及び翻訳 (mRNA) される核酸配列を意味する。遺伝子は、コード領域に先行する領域、及びコード領域に続く領域、例えば、5'非翻訳 (5'UTR) 又は「リーダー」配列、及び3'UTR 又は「トレーラー」配列、並びに個々のコードセグメント (エキソン) の間の介在配列 (イントロン) を含んでも、含まなくてもよい。

【0106】

「プロモーター」は、RNAポリメラーゼの結合を誘導し、それによってRNA合成を促進するDNA配列、すなわち、転写を誘導するのに十分な最小配列である。プロモーター及び対応するタンパク質又はポリペプチドの発現は、細胞型特異的、組織特異的又は種特異的であり得る。プロモーター配列に隣接していても、していなくてもよいエンハンサ

10

20

30

40

50

一配列も本発明の核酸構築物又はベクターに含まれる。

【0107】

本明細書において広範に使用する「転写調節配列」又は発現制御配列は、プロモーター配列、及び付随するコード配列の転写を、しばしば栄養又は環境のシグナルに応じて、変調又は調節する物理的に付随する配列を含む。これらの付随する配列は、組織又は細胞の特異的発現、環境シグナルに対する応答、転写を増加又は減少させるタンパク質の結合などを決定し得る。「調節可能プロモーター」は、その活性がシス又はトランス作用因子によって影響を受ける任意のプロモーターである（例えば、外部のシグナル又は薬剤によって活性化される誘導性プロモーター）。

【0108】

「構成的プロモーター」は、多数又は全部の組織/細胞型においてほとんどの場合にRNA生成を誘導する任意のプロモーター、例えば、ほ乳動物細胞においてクローン化DNA挿入断片の構成的発現を促進するヒトCMV最初期エンハンサー/プロモーター領域である。

【0109】

「転写調節タンパク質」、「転写調節因子」及び「転写因子」という用語は、本明細書では区別なく使用され、DNA応答エレメントに結合し、それによって関連遺伝子の発現を転写的に調節する核タンパク質を指す。転写調節タンパク質は、一般に、DNA応答エレメントに直接結合するが、DNAとの結合は、DNA応答エレメントと結合する、又はDNA応答エレメントに結合される、別のタンパク質との結合を介して間接的であり得る。

【0110】

本明細書では「配列内リボソーム進入部位」又は「IRES」とは、シストロン（タンパク質コード化領域）の開始コドン（ATGなど）への直接の配列内リボソーム進入を促進し、それによって遺伝子のcap非依存的翻訳をもたらすエレメントを指す。例えば、Jackson R. J. et al. 1990. Trends Biochem Sci 15: 477-83) 及び Jackson R. J. and Kaminski, A. 1995. RNA 1: 985-1000を参照されたい。本明細書に記載の例は、シストロンの開始コドンへの直接の配列内リボソーム進入を促進することができる、任意のIRESエレメントの使用に関連する。本明細書では「IRESの翻訳調節下」とは、翻訳がIRESと関連し、cap非依存的に進行することを意味する。例えば、重鎖及び2個の軽鎖コード配列は、2本の鎖を分離するタンパク質分解性又は自己プロセシングの必要なしに、個々のコード配列を分離するIRESを介して翻訳することができる。

【0111】

「自己プロセシング切断部位」又は「自己プロセシング切断配列」は、翻訳後又は同時翻訳プロセシング切断部位配列として本明細書では定義される。かかる「自己プロセシング切断」部位又は配列とは、2A部位、配列若しくはドメイン、又は2A様部位、配列若しくはドメインによって本明細書では例示される、DNA又はアミノ酸配列を指す。本明細書では「自己プロセシングペプチド」は、翻訳後、自己プロセシング切断部位を含むタンパク質又はポリペプチドの迅速な分子内(cis)切断を媒介して、別個の成熟タンパク質又はポリペプチド産物を産生する、自己プロセシング切断部位又は配列をコードするDNA配列のペプチド発現産物として本明細書では定義される。

【0112】

本明細書では「追加のタンパク質分解性切断部位」という用語は、本発明の発現構築物に2A又は2A様配列などの自己プロセシング切断部位に隣接して取り込まれ、切断後に残留する追加のアミノ酸を自己プロセシング切断配列によって除去する手段を提供する、配列を指す。例示的な「追加のタンパク質分解性切断部位」は、本明細書に記載されており、コンセンサス配列RXK/R-Rを含むフューリン切断部位が挙げられるが、これだけに限定されない。かかるフューリン切断部位は、フューリン、タンパク質分泌経路内の

10

20

30

40

50

他のセリンプロテアーゼなどの内因性サブチリシン様プロテアーゼによって切断し得る。

【0113】

本明細書では「免疫グロブリン」及び「抗体」という用語は、目的の抗原決定基と結合可能である F a、F (a b ') 2、F v などの完全な分子及びその断片を指す。かかる「免疫グロブリン」及び「抗体」は、分子量約 23,000 ダルトンの 2 本の同一の軽いポリペプチド鎖、及び分子量 53,000 - 70,000 の 2 本の同一の重鎖で構成される。4 本の鎖は、「Y」配置でジスルフィド結合によって連結されている。重鎖は、ガンマ (I g G)、ミュー (I g M)、アルファ (I g A)、デルタ (I g D) 又はイプシロン (I g E) として分類され、所与の抗体のエフェクター機能を決定する、免疫グロブリンのクラス名称の基礎である。軽鎖は、カッパ又はラムダとして分類される。本明細書において「免疫グロブリン又はその断片」に言及するときには、かかる「その断片」が、免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片であり、特に完全な免疫グロブリンの結合親和性の少なくとも 10% の結合親和性でその同族リガンドと結合する免疫グロブリン断片であることを理解されたい。

10

【0114】

抗体の F a b 断片は、抗体分子の一価の抗原結合性フラグメントである。F v 断片は、軽鎖の可変領域と、2 本の鎖として発現された、重鎖の可変領域とを含む、遺伝子操作された断片である。

【0115】

「ヒト化抗体」という用語は、抗体の本来の結合活性を依然として保持しながら、より厳密にヒト抗体に類似するために、非抗原結合領域において 1 個以上のアミノ酸が置換された、抗体分子を指す。例えば、米国特許第 6,602,503 号を参照されたい。

20

【0116】

本明細書では「抗原決定基」という用語は、特定の抗体と接触する分子の断片 (すなわち、エピトープ) を指す。タンパク質又は糖タンパク質のタンパク質又はペプチド又は糖ペプチドの多数の領域は、タンパク質の所与の領域又は 3 次元構造に特異的に結合する抗体の産生を誘導し得る。これらの領域又は構造は、抗原決定基又はエピトープと称する。抗原決定基は、抗体との結合について、完全な抗原 (すなわち、免疫応答の誘発に使用される免疫原) と競合し得る。

【0117】

本発明の組み換えタンパク質又はポリペプチドに関して、「断片」という用語は、対応する完全長タンパク質又はポリペプチドのアミノ酸配列の全部ではないが、その一部と同じアミノ酸配列を有し、対応する完全長タンパク質又はポリペプチドの機能又は活性の少なくとも 1 つを保持する、ペプチド又はポリペプチドを意味する。断片は、好ましくは、完全長タンパク質又はポリペプチドの少なくとも 20 - 100 個の隣接アミノ酸残基を含む。

30

【0118】

本明細書では「投与すること」又は「導入すること」という用語は、(免疫グロブリンを含めた) タンパク質を、それを必要とするヒト又は動物に、当分野で公知の任意の経路によって送達することを意味する。薬剤担体及び製剤又は組成物も当分野で周知である。投与経路としては、静脈内、筋肉内、皮内、皮下、経皮、粘膜、腫瘍内、粘膜などが挙げられる。或いは、これらの用語は、細胞若しくは培養細胞、及び又は対象の細胞若しくは器官への組み換えタンパク質発現用ベクターの送達を指し得る。かかる投与すること又は導入することは、インピボ、インピトロ又は生体外で起こり得る。組み換えタンパク質又はポリペプチドの発現用ベクターは、移入 (物理的手段 (例えば、リン酸カルシウム移入、電気穿孔法、微量注入又はリポフェクション) による細胞への異種 DNA の挿入を典型的には意味する。)、感染 (感染体、すなわちウイルスを介した導入を典型的には指す。)、又は形質導入 (細胞の安定なウイルス感染、又は一微生物から別の微生物へのウイルス性媒介物 (例えば、バクテリオファージ) を介した遺伝物質の移動を典型的には意味する。)) によって細胞に導入することができる。

40

50

【0119】

「形質転換」は、異種DNAを含む細菌、又は発癌遺伝子を発現し、したがって、連続成長状態に変換された細胞、例えば、腫瘍細胞を指すのに典型的には使用される。細胞を「形質転換する」のに使用されるベクターは、プラスミド、ウイルス、他のビヒクルなどである。

【0120】

典型的には、細胞は、異種DNA（すなわち、ベクター）を細胞に投与、導入又は挿入するための手段に応じて、「形質導入された」、「感染した」、「移入された」又は「転換された」と称される。「形質導入された」、「移入された」及び「転換された」という用語は、異種DNAの導入方法にかかわらず、本明細書では区別なく使用することができる。

10

【0121】

本明細書では、「安定に転換された」、「安定に移入された」及び「トランスジェニック」という用語は、ゲノムに組み込まれた非天然（異種）核酸配列を有する細胞を指す。安定な移入は、そのゲノムへの組み込みによって、又はエピソーム要素として、安定に複製する移入DNAを含む娘細胞の集団からなる細胞系又はクローンの樹立によって示される。「移入」は、安定でない、すなわち、一過性である場合もある。一過性移入の場合には、外因性又は異種DNAが発現されるが、導入された配列は、ゲノムには組み込まれず、又は宿主細胞は複製することができない。

【0122】

本明細書では「生体外投与」とは、一次細胞を対象から採取し、ベクターを細胞に投与して、形質導入された、感染した、又は移入された組み換え細胞を産生し、組み換え細胞を同じ又は異なる対象に再投与するプロセスを指す。

20

【0123】

「マルチシストロニック転写物」とは、1つを超えるタンパク質コード領域、又はシストロンを含む、mRNA分子を指す。2つのコード領域を含むmRNAを「バイシストロニック転写物」と表す。「5'の近位にある」コード領域又はシストロンは、その翻訳開始コドン（通常AUG）がマルチシストロニックmRNA分子の5'末端に最も近いコード領域である。「5'の遠位にある」コード領域又はシストロンは、その翻訳開始コドン（通常AUG）がmRNAの5'末端に最も近い開始コドンではないものである。

30

【0124】

「5'の遠位にある」及び「下流の」という用語は、mRNA分子の5'末端に隣接しないコード領域を指すのにも同じ意味で使われる。

【0125】

本明細書では「同時転写された」とは、2個（又は2個を超える）オープンリーディングフレーム、コード領域又はポリヌクレオチドが、プロモーターを含む単一の転写制御又は調節エレメントの転写制御下にあることを意味する。

【0126】

本明細書では「宿主細胞」という用語は、ベクターが形質導入された、ベクターに感染した、ベクターが移入された、又はベクターで転換された、細胞を指す。ベクターは、プラスミド、ウイルス粒子、ファージなどであり得る。温度、pHなどの培養条件は、発現用に選択された宿主細胞で以前に使用された条件であり、当業者には明らかである。「宿主細胞」という用語は、形質導入された、感染した、移入された、又は転換された、最初の細胞及びその子孫を指すことを理解されたい。

40

【0127】

本明細書では「生物活性」及び「生物活性な」という用語は、培養細胞系、又はELISAプレート中でのリガンド-受容体アッセイなどの無細胞系において、特定のタンパク質に起因する活性を指す。「免疫グロブリン」、「抗体」又はその断片の「生物活性」は、抗原決定基と結合し、それによって免疫機能を促進する能力を指す。ホルモン又はインターロイキンの「生物活性」は、当分野で公知である。

50

【0128】

本明細書では「腫よう」及び「癌」という用語は、正常な成長及び/又は発生の制御を少なくとも部分的に失った細胞を指す。例えば、腫よう又は癌細胞は、しばしば、接触阻止を一般に失い、浸潤性となり得、及び/又は転移能力を有する。

【0129】

抗体は、重鎖と軽鎖のヘテロ2量体である免疫グロブリンタンパク質である。典型的な抗体は、結合した、2本の重鎖と2本の軽鎖（又はその機能的断片）とを有する多量体である。抗体は、しばしばアイソタイプに応じて、2量体、3量体、4量体、5量体など、更なる重合体構造次数（polymeric order of structure）を有し得る。抗体は、ほ乳動物培養発現系において、単一のベクター又は2種類のベクターから、完全長で発現することが極めて困難であることが証明された。抗体の製造には幾つかの方法が現在使用されている。すなわち、「ポリクローナル」抗体を製造するための動物のインビボでの免疫化、モノクローナル抗体を製造するためのB細胞ハイブリドーマのインビトロでの細胞培養（参照により本明細書に組込む、Kohler, et al. 1988. Eur. J. Immunol. 6:511; Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）及び（例えば、参照により本明細書に組込むCabilly他、米国特許第6331415号に記載の）組み換えDNA技術である。

10

【0130】

免疫グロブリンポリペプチドの基本分子構造は、分子量約23,000ダルトンの2本の同一の軽鎖と、分子量53,000-70,000の2本の同一の重鎖とを含み、4本の鎖はジスルフィド結合によって「Y」配置で連結されていることがよく知られている。アミノ酸配列は、Yの上端のN末端から各鎖の下端のC末端まで伸びる。N末端は、抗原結合の特異性を与える（約100アミノ酸長の）可変領域である。

20

【0131】

本発明は、自然の配列（すなわち、抗原による刺激に応じて生成される配列）を有する完全長抗体及び抗体断片、単一の安定に折り畳まれたポリペプチド鎖中の重鎖と軽鎖の両方の抗原結合可変領域を結合させる単鎖抗体；（第2の重鎖のFc領域と結合した重鎖/軽鎖2量体を含む）一価の抗体；免疫グロブリン分子の完全「Y」領域を含む「Fab断片」、すなわち、「Y」の分枝、軽鎖若しくは重鎖単体又はその部分（すなわち、Fabとして一般に知られる、1本の重鎖と1本の軽鎖の集合体）；2種類以上の異なる抗原に対して特異性を有する「ハイブリッド免疫グロブリン」（例えば、米国特許第6,623,940号などに記載のクアドローマ又は二重特異性抗体）；重鎖及び軽鎖が、異なる種又は特異性（specificities）由来の重鎖及び軽鎖を模倣した「複合（composite）免疫グロブリン」；並びに重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列の各々の部分が2種類以上の種に由来する（すなわち、可変領域がネズミ抗体などの一出所に由来し、定常領域がヒト抗体などの別の出所に由来する）「キメラ抗体」を含めて、ただしこれらだけに限定されない、全タイプの免疫グロブリンを製造するための改善された方法を対象とする。

30

【0132】

本発明の組成物及び方法は、重鎖若しくは軽鎖が「ほ乳動物の」、「キメラの」ものであり、又はその効力を増大させるように修飾されている、免疫グロブリン又はその断片の製造に有用である。修飾抗体は、無修飾体の同じ生物活性を保持する、アミノ酸と核酸の両方の配列変種、及び活性が変化するように修飾された（すなわち、補体結合、膜との相互作用、及び他のエフェクター機能を改善する定常領域の変化、又は抗原結合特性を改善する可変領域の変化）、アミノ酸と核酸の両方の配列変種を含む。本発明の組成物及び方法は、触媒作用の免疫グロブリン又はその断片も更に含み得る。

40

【0133】

「変種」免疫グロブリンをコードするポリヌクレオチド配列は、基準ポリペプチド配列から1個以上のアミノ酸が変化した「変種」免疫グロブリンアミノ酸配列をコードし得る

50

。以下の同じ考察を、対象となる他の生物活性タンパク質配列（及びそのコード配列）に適用することができる。変種ポリヌクレオチド配列は、置換されたアミノ酸が、置換したアミノ酸と類似した構造的又は化学的性質を有する「保存的」置換を含む、変種アミノ酸配列をコードし得る。目的タンパク質の変種は、天然の配列のアミノ酸配列と実質的に同一（少なくとも約80から99%同一、及びこれらの間の全整数）であるアミノ酸配列を用いて作製することができ、機能的に等価な3次元構造を形成し、天然タンパク質の生物活性を保持すると理解される。ある種のアミノ酸置換が、タンパク質配列において、タンパク質の機能に影響を及ぼさずになされ得ることは、生物学分野では周知である。一般に、保存的アミノ酸置換、又は類似のアミノ酸の置換は、タンパク質機能に影響を及ぼさずに許容される。類似のアミノ酸は、サイズ及び/又は荷電特性が類似したアミノ酸であり得る。例えば、アスパラギン酸とグルタミン酸及びイソロイシンとバリンは、類似のアミノ酸対である。一アミノ酸を別のアミノ酸で置換することは、自然の二次及び三次構造の形成が、意図した以外には乱されないときに許容される。アミノ酸対間の類似度は、当分野では幾つかの方法で評価されている。例えば、参照により本明細書に組込む、Dayhoff et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure, 1978. Volume 5, Supplement 3, Chapter 22, pages 345-352は、アミノ酸類似度の尺度として使用することができるアミノ酸置換の度数分布表を記載している。Dayhoff等の度数分布表は、進化的に異なる種々の出所からの、同じ機能を有するタンパク質のアミノ酸配列の比較に基づく。

10

20

【0134】

開示されたヌクレオチド（及びアミノ酸）配列の置換変種、挿入変種及び欠失変種は、当分野で周知の方法によって容易に調製することができる。これらの変種は、本発明の具体的例示配列と実質的な配列同一性を有し、所望の機能性が保存される限り、具体的例示配列と同様に使用することができる。

【0135】

本明細書では、実質的な配列同一性とは、変種ポリヌクレオチド又はタンパク質が、変種が由来するポリヌクレオチド又はタンパク質と同じ能力で機能するのに十分な相同性（又は同一性）を指す。好ましくは、この配列同一性は、70%又は80%を超え、より好ましくは、この同一性は85%を超え、又はこの同一性は90%を超え、及び又は、これは95%を超え、70から100%までの全整数である。機能が等価である、又は配列の機能を改善するように設計された、又は方法論的な利点を与える、置換変異、挿入変異及び欠失変異を行うことは当業者の技術範囲内に十分ある。任意の天然タンパク質を包含し得る、又は適格な従来技術項目を包含し得る実施形態/変形形態は、特許請求する本発明の範囲内にはないものとする。元の完全長配列の、生成した断片及び/又は変異体の幾つかは、完全長配列の所望の特性を保持することができるように、本発明のポリヌクレオチド配列を短縮及び/又は変異し得ることは当分野で周知である。より大きな核酸分子から断片を生成するのに適切である多種多様な制限酵素が周知である。また、Bal31エキソヌクラーゼをDNAの時間制御制限消化（time-controlled limited digestion）に好都合に使用できることは周知である。例えば、参照により本明細書に組込む、Maniatis et al., 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pages 135-139を参照されたい。Wei et al., 1983. J. Biol. Chem. 258:13006-13512も参照されたい。（「erase-a-base」手順と一般に称される）Bal31エキソヌクラーゼの使用によって、当業者は、対象の核酸の一端又は両端からヌクレオチドを除去して、対象のヌクレオチド配列と機能的に等価である広範な断片を生成することができる。当業者は、このようにして、すべて元のコード配列に沿った場所から、制御された種々の長さの数百の断片を作製することができる。当業者は、作製された断片の諸特性を常法に従って試験又はスクリーニ

30

40

50

ングして、本明細書に教示する断片の有用性を決定することができる。完全長配列の変異配列、又はその断片は、部位特異的変異誘発によって容易に作製できることも周知である。例えば、参照により本明細書に組込む、Larionov, O. A. and Nikiforov, V. G. 1982. Genetika 18:349-59; Shortle et al. (1981) Annu. Rev. Genet. 15:265-94を参照されたい。当業者は、欠失型、挿入型又は置換型変異を常法に従って生じさせることができ、完全長野生型配列又はその断片の所望の特性を含む生成変異体、例えば、ホルモン、サイトカイン、抗原結合性又は他の生物活性を保持する生成変異体を特定することができる。

【0136】

それに加え、又はそれとは別に、変種ポリヌクレオチド配列は、置換されたアミノ酸が、置換したアミノ酸とは異なる構造的又は化学的性質を有する「非保存的」置換を含む、変種アミノ酸配列をコードし得る。変種免疫グロブリンをコードするポリヌクレオチドは、アミノ酸の挿入配列(insertions)若しくは欠失配列(deletions)又はその両方を含む変種アミノ酸配列もコードし得る。また、変種免疫グロブリンをコードするポリヌクレオチドは、基準ポリヌクレオチド配列と同じポリペプチドをコードし得るが、遺伝コードの縮重のために、基準ポリヌクレオチド配列と1個以上の塩基が異なるポリヌクレオチド配列を有する。

【0137】

本発明の組み換え免疫グロブリンに関して、「断片」という用語は、対応する完全長免疫グロブリンタンパク質のアミノ酸配列の全部ではないが、一部と同じであるアミノ酸配列を有し、対応する完全長タンパク質と本質的に同じ生物学的機能若しくは活性を保持する、又は対応する完全長タンパク質の機能若しくは活性の少なくとも1つを保持する、ポリペプチドを意味する。断片は、好ましくは、完全長免疫グロブリンの少なくとも20-100個の隣接アミノ酸残基を含み、好ましくは、完全長抗体と同じ抗原に結合する能力を保持する。

【0138】

本明細書では「配列同一性」という用語は、配列アラインメントプログラムを用いて整列させたときに、整列した2つ以上の配列における核酸又はアミノ酸配列同一性を意味する。「%相同性」という用語は、本明細書の「%同一性」という用語と本明細書では区別なく使用され、配列アラインメントプログラムを用いて整列させたときに、整列した2つ以上の配列間の核酸又はアミノ酸配列同一性のレベルを指す。例えば、本明細書では、80%相同性は、規定のアルゴリズムによって求められる80%配列同一性と同じものを意味し、したがって所与の配列の相同体は、所与の配列の長さにわたって80%を超える配列同一性を有する。

【0139】

比較のための最適な配列アラインメントは、例えば、Smith and Waterman. 1981. Adv. Appl. Math. 2:482の局所的相同性アルゴリズムによって、Needleman and Wunsch. 1970. J. Mol. Biol. 48:443の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson and Lipman. 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444の類似度検索(search for similarity)法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ処理(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, Wis.中のGAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA)によって、National Center for Biotechnology Informationウェブサイト(nlm.nih.gov/参照)を通して公的に利用可能であるソフトウェアを用いた、BLASTアルゴリズム、Altschul et al. 1990. J. Mol. Biol. 215:403-410によって、又は目視検査(一般に、Ausubel et

10

20

30

40

50

a 1. , 下記参照) によって、実施することができる。本発明では、比較のための最適な配列アラインメントは、最も好ましくは、Smith and Waterman, 1981. Adv. Appl. Math. 2: 482の局所的相同性アルゴリズムによって実施される。Altschul et al. 1990 and Altschul et al. 1997も参照されたい。

【0140】

2つ以上の核酸又はタンパク質配列に関連して、「同一の」又はパーセント「同一性」という用語は、最大一致で比較及び整列させたときに、本明細書に記載の配列比較アルゴリズムの1つ、例えば、Smith-Watermanアルゴリズム、当分野で公知の他のアルゴリズム、例えば、BLASTを用いて測定して、又は目視検査によって測定して、同じである、又は同じアミノ酸残基若しくはヌクレオチドを指定割合で含む、2つ以上の配列又は部分配列を指す。

10

【0141】

本発明によれば、自然の配列と80、85、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99% (及び80から100までの全整数) 又は99%を超える配列同一性を有する、自己プロセッシング切断ポリペプチド及びポリペプチド自体をコードする配列変種も包含する。少なくとも5、少なくとも10、又は少なくとも15単位のひと続きであるポリペプチドのアミノ酸断片、記載の同一性条件に従ってそれと相同である断片、及び少なくとも15、少なくとも30、又は少なくとも45単位のひと続きである核酸配列の断片も包含する。

20

【0142】

核酸配列は、核酸配列と基準核酸配列が、中度から高度の厳密性のハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で特異的にハイブリッド形成する場合に、基準核酸配列と「選択的にハイブリッド可能」であるとみなされる。ハイブリダイゼーション条件は、核酸結合複合体又はプローブの融解温度(T_m)に基づく。例えば、「最大厳密性」は、典型的には約 $T_m - 5$ の(プローブの T_m よりも 5° 低い)温度で生じ、「高度の厳密性」は T_m よりも約 $5 - 10^\circ$ 低い温度で生じ、「中間の厳密性」はプローブの T_m よりも約 $10 - 20^\circ$ 低い温度で生じ、「低度の厳密性」は T_m よりも約 $20 - 25^\circ$ 低い温度で生じる。機能的に、最大厳密性条件は、ハイブリダイゼーションプローブと厳密な同一性又はほぼ厳密な同一性を有する配列の特定に使用することができ、高度の厳密性の条件は、プローブと約80%以上の配列同一性を有する配列の特定に使用される。

30

【0143】

中度及び高度の厳密性のハイブリダイゼーション条件は当分野で周知である(例えば、Sambrook, et al., 1989, Chapters 9 and 11及びAusubel, F.M., et al., 1993参照。高度の厳密性の条件の例は、50%ホルムアミド、 $5 \times SSC$ 、 $5 \times$ デンハート液、0.5% SDS及び $100 \mu g/ml$ 変性担体DNA中、約42でのハイブリダイゼーションと、それに続く $2 \times SSC$ 及び0.5% SDSによる室温での2回の洗浄と、 $0.1 \times SSC$ 及び0.5% SDSによる42での追加の2回の洗浄とを含む。目的の天然タンパク質と同じ生物活性を有するポリペプチドをコードし、中度から高度の厳密性のハイブリダイゼーション条件下でハイブリッド形成する2A配列変種は、本発明の範囲内であるとみなされる。

40

【0144】

遺伝コードの縮重の結果として、同じ2A若しくは2A様ポリペプチド配列又は他のプロテアーゼ若しくはシグナルペプチダーゼ切断配列をコードする幾つかのコード配列が生成し得る。例えば、トリプレットCGTはアミノ酸アルギニンをコードする。アルギニンは、代わりに、CGA、CGC、CGG、AGA及びAGGによってもコードされる。したがって、コード領域における同義コдонのかかる置換は、本発明に包含される配列変種の範囲内であることを理解されたい。

【0145】

かかる配列変種は、高度の厳密性の条件下で親配列とハイブリッド形成する場合も、し

50

ない場合もあることを更に理解されたい。これは、例えば、配列変種が、親ヌクレオチドによってコードされるアミノ酸の各々に対して異なるコドンを含むときに起こり得る。それでも、かかる変種は、本発明によって具体的に企図され、包含される。

【0146】

治療様式としての抗体の潜在能力は、現在、現行技術の生産能力及び費用によって制限されている。免疫グロブリン（又は他のタンパク質）産生用の改善されたウイルス性又は非ウイルス性単一発現ベクターは、単一のベクターから2つ以上のコード配列、すなわち、二重特異性又は多重特異性を有する免疫グロブリン又は他のタンパク質の発現及び送達を促進する。本発明は、これらの制限に対処し、単鎖抗体、完全長抗体、抗体断片などの操作された抗体、2本鎖ホルモン、2本鎖サイトカイン、2本鎖ケモカイン、2本鎖受容体などを含めて、本明細書に詳述する、任意の免疫グロブリン（すなわち、抗体）若しくはその断片、他の複部構成（multi part）タンパク質又は結合タンパク質対に適用可能である。

10

【0147】

I R E S

配列内リボソーム進入部位（IRES）エレメントは、ピコルナウイルスmRNA中で最初に発見された（Jackson et al. 1990. Trends Biochem. Sci. 15:477-83）及びJackson and Kaminiski. 1995. RNA 1:985-1000）。当業者によって一般に使用されるIRESの例としては、表Iに記載のもの、及び米国特許第6,692,736号に記載のものが挙げられる。当分野で公知である「IRES」の例としては、ピコルナウイルスから入手可能なIRES（Jackson et al., 1990）、並びに、例えば、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質（BiP）、血管内皮増殖因子（VEGF）（Huez et al. 1998. Mol. Cell. Biol. 18:6178-6190）、線維芽細胞成長因子2（FGF-2）、インスリン様成長因子（IGFII）、翻訳開始因子eIF4G及び酵母転写因子TFIID及びHAP4、Novagenから市販されている脳心筋炎（encephelomyocarditis）ウイルス（EMCV）（Duke et al. 1992. J. Virol 66:1602-9）及びVEGF IRES（Huez et al. 1998. Mol. Cell. Biol. 18:6178-90）など、ウイルス又は細胞のmRNA源から入手可能なIRESが挙げられるが、これらだけに限定されない。IRESは、カルジオウイルス、ライノウイルス、アフトウイルス、HCV、フレンドマウス白血病ウイルス（FrMLV）、モロニーマウス白血病ウイルス（MoMLV）などの種々のウイルスにおいても報告されている。本明細書では「IRES」は、IRES配列の機能的変形物がシストロンの開始コドンへの直接の配列内リボソーム進入を促進し得る限り、該変形物を包含する。IRESは、ほ乳動物、ウイルス又は原生動物のものであり得る。

20

30

【0148】

IRESは、下流のシストロンの開始コドンへの直接の配列内リボソーム進入を促進し、cap非依存的翻訳をもたらす。したがって、下流のシストロンの産物は、ポリタンパク質の切断も、モノシストロニックmRNAの生成も必要とせず、バイシストロニック（又はマルチシストロニック）mRNAから発現され得る。配列内リボソーム進入部位は、約450ヌクレオチド長であり、一次配列の中度の保存、及び二次構造の強固な保存を特徴とする。IRESの最も重要な一次配列の特徴は、その開始がIRESの3'末端の約25ヌクレオチド上流にあるピリミジンリッチ部位である。Jackson et al. (1990)を参照されたい。

40

【0149】

主要な3クラスのピコルナウイルスIRESが特定され、特徴づけられた。すなわち、カルジオ及びアフトウイルスクラス（例えば、脳心筋炎ウイルス、Jang et al. 1990. Gene Dev 4:1560-1572）、エンテロ及びライノウイルスクラス（例えば、ポリオウイルス、Borman et al. 1994. E

50

MBO J. 13:3149-3157)、並びにA型肝炎ウイルス(HAV)クラス、Glass et al. 1993. Virology 193:842-852)である。最初の2クラスの場合、2つの一般的原理が適用される。第一に、IRESの450ヌクレオチド配列の大部分が、リボソーム結合及び翻訳開始に寄与する二次及び三次構造を特に維持する機能を果たす。第二に、リボソーム侵入部位は、IRESの3'末端において、保存されたオリゴピリミジン域(tract)の約25ヌクレオチド下流に位置するAUGトリプレットである。翻訳は、リボソーム侵入部位(カルジオウイルス)において、又は次の下流のAUG(エンテロ/ライノウイルスクラス)において開始され得る。アフトウイルスにおいては両方の部位で開始される。HCV、及びウシウイルス性下痢症ウイルス(BVDV)、ブタコレラウイルス(CSFV)などのペスチウイルスは、それぞれ、341nt及び370nt長5'-UTRを有する。これらの5'-UTR断片は、類似のRNA二次構造を形成し、適度に効率的なIRES機能を有し得る(Tsukiyama-Kohara et al. 1992. J. Virology 66:1476-1483; Frolov et al. 1998. RNA 4:1418-1435)。最近の研究によれば、フレンドマウス白血病ウイルス(MLV)5'-UTR及びラットレトロトランスポゾンウイルス様30S(VL30)配列は、レトロウイルス起源のIRES構造を含む(Torrent et al. 1996. Hum. Gene Ther 7:603-612)。

【0150】

真核細胞においては、翻訳は、通常、リボソームによって、開始因子の制御下で、キャッピングされたmRNA 5'末端からスキャンして開始される。しかし、幾つかの細胞mRNAは、cap非依存的翻訳を媒介するIRES構造を有することが見出された(vander Velde, et al. 1999. Int J Biochem Cell Biol. 31:87-106)。IRESエレメントとしては、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質(BiP)(Macejak et al. 1991. Nature 353:90-94)、ショウジョウバエのアンテナペディアmRNA(Oh et al. 1992. Gene and Dev 6:1643-1653)、線維芽細胞成長因子-2(FGF-2)(Vagner et al. 1995. Mol. Cell. Biol. 15:35-44)、血小板由来増殖因子B(PDGF-B)(Bernstein et al. 1997. J. Biol. Chem. 272:9356-9362)、インスリン様成長因子II(Teerink et al. (1995) Biochim. Biophys. Acta 1264:403-408)、及び翻訳開始因子eIF4G(Gan et al. 1996. J. Biol. Chem. 271:623-626)が挙げられるが、これらだけに限定されない。最近、血管内皮増殖因子(VEGF)がIRESエレメントを有することも見出された(Stein et al. 1998. Mol. Cell. Biol. 18:3112-3119; Huez et al. 1998. Mol. Cell. Biol. 18:6178-6190)。IRES配列の更なる例としては、ピコルナウイルスHAV(Glass et al. 1993. Virology 193:842-852); EMCV(Jang and Wimmer. 4:1560-1572); ポリオウイルス(Borman et al. 1994. EMBO J. 13:3149-3157); HCV(Tsukiyama-Kohara et al. 1992. J. Virology 66:1476-1483); ペスチウイルスBVDV(Frolov et al. 1998. RNA. 4:1418-1435); リーシュマニアLRV-1(Maga et al. 1995. Mol. Cell. Biol. 15:4884-4889); レトロウイルス: MoMLV(Torrent et al. 1996. Hum. Gene Ther. 7:603-612). VL30、ハーベイマウス肉腫ウイルス、REV(Lopez-Lastra et al. 1997. Hum. Gene Ther. 8:1855-1865)が挙げられる。IRESは、当分野で公知である標準組み換え方法

10

20

30

40

50

及び合成方法を用いて調製することができる。クローニングに都合がよいように、制限酵素切断部位を操作して、使用するIRES断片の末端に入れることができる。

【0151】

ウイルス又は非ウイルスベクターによって決まる単一の転写物から2種類以上のタンパク質を発現させるために、配列内リボソーム進入部位(IRES)配列を一般に使用して、第2、第3、第4のコード配列などを発現させる。2種類のコード配列をIRESによって連結すると、第2のコード配列の翻訳発現レベルがかなり減少することが多い(Furler et al., 2001, Gene Therapy 8: 864-873)。実際、同じプロモーターに作動可能に結合した2つ以上のコード配列の転写を制御するためにIRESを使用すると、第2、第3などのコード配列の発現レベルが、プロモーターに隣接するコード配列よりも低下し得る。また、IRES配列は、ベクターの完全なパッケージングに影響を及ぼすのに十分な長さであり得る。例えば、eCMV IRESは507塩基対の長さを有する。

10

【0152】

(一次翻訳産物として)ポリタンパク質の形のタンパク質の発現は、ピコルナウイルス科を含めて、ただしこれだけに限定されない、多数のウイルスの複製において採用される戦略である。翻訳後、ウイルスによってコードされた自己プロセシングペプチドは、ポリタンパク質の迅速な分子内(cis)切断を媒介して、別個の(成熟)タンパク質産物を与える。本発明は、単一のプロモーターを用いて、2種類以上のタンパク質又はポリペプチドコード配列の発現を促進する、(本明細書では2Aペプチド配列によって例示される)自己プロセシングペプチド配列又は他のプロテアーゼ切断部位を含む組み換えタンパク質又はポリペプチド発現用ベクターが提供される点で、IRESの使用を上回る利点を提供する。2種類以上のタンパク質又はポリペプチドは、有利なモル比で発現される。免疫グロブリンの場合、ポリタンパク質は、各々の間でコードされた自己プロセシング部位又はプロテアーゼ認識部位を含む、1本の重鎖のコード配列と、1又は2本の軽鎖のコード配列とによってコードされる。

20

【0153】

インテイン含有構築物においては、2本の免疫グロブリン鎖間のインテインを含むインフレーム融合ポリタンパク質中で発現され、インテイン-免疫グロブリン鎖接合部における切断を可能にするが、2つの免疫グロブリンタンパク質を再連結しない適切な特徴を有する、重鎖及び軽鎖セグメントの各々のちょうど1個が存在し得る。別のインテイン含有構築物においては、第1及び/又は第2のセグメントから切断部位によって分離されていてもよい、1個以上の追加の免疫グロブリンセグメントが存在する。例えば、インテイン手法を用いて、1個の重鎖セグメントと1個の軽鎖セグメントとを発現させ、又は1本の重鎖と2本の軽鎖とを発現させる。

30

【0154】

上記「自己プロセシング切断部位」又は「自己プロセシング切断配列」とは、翻訳後、自己プロセシング切断部位を含むポリペプチドの迅速な分子内(cis)切断が起こり、別個の成熟タンパク質産物が産生する、DNAコード又はアミノ酸配列を指す。かかる「自己プロセシング切断部位」は、本明細書では2A部位、配列若しくはドメイン又はインテインによって例示される、同時翻訳又は翻訳後プロセシング切断部位とも称し得る。2A部位、配列又はドメインは、リボソームの活性を改変して、エステル結合の加水分解を促進し、それによって、分離した下流の翻訳産物の合成が進むように翻訳複合体からポリペプチドが遊離することによって、翻訳効果を示す(Donnelly, 2001)。或いは、2A部位又はドメインは、それ自体のC末端をシスで切断して一次分解産物を産生することによって、「自動タンパク質分解」又は「切断」を示す(Furler and Palmenberg, 1990, Ann. Rev. Microbiol. 44: 603-623)。シグナルペプチダーゼ切断部位を含めて、他のプロテアーゼ認識配列を、自己プロセシング部位の代わりに使用することができる。インテインは、ポリタンパク質においても有用である。

40

50

【0155】

インティン

本明細書では、インティンは、Nエクステインによって一次発現産物のN末端方向に区切られ、また、Cエクステインによって一次発現産物のC末端方向に区切られる、発現されたタンパク質内のセグメントである。天然のインティンは、インティンの切り出し、並びにN及びCエクステインの再結合（タンパク質連結）を媒介する。しかし、本発現産物に関連して、インティン又はフランキングエクステインアミノ酸配列の一次配列は、タンパク質骨格がエクステインの非存在下で、又はエクステインの少量若しくは最小限の連結によって切断されるようなものであり、その結果、エクステインタンパク質は、結合して融合タンパク質を形成することなく、一次翻訳産物（ポリタンパク質）から遊離する。一次発現産物（任意のタンパク質分解性切断の前の、mRNAによって合成されたタンパク質）のインティン部分は、Nエクステイン/インティン及びインティン/Cエクステイン接合部におけるタンパク質分解性切断を媒介する。一般に、天然のインティンは、NエクステインとCエクステインのスプライシングトゥゲザー（*splicing together*）（ペプチド結合の形成による連結）も媒介する。しかし、（抗体分子の重鎖と軽鎖によって具体的に例示される）2種類のポリペプチドを発現する目的に適用される本発明においては、タンパク質連結は起こらないことが好ましい。これは、天然にでも、変異によってでも連結活性を持たないインティンを組み入れることによって実施することができる。或いは、スプライシングは、スプライス部位における、又はスプライス部位に隣接する、アミノ酸を変化させて、遊離タンパク質の連結を防止する変異によって、阻止し得る。Xu and Perler, 1996, EMBO J. 15: 5146 - 5153を参照されたい。Ser、Thr又はCysは、通常、Cエクステインの開始点（*start*）に存在する。

10

20

【0156】

インティンは、その遺伝子が他のタンパク質の遺伝子内にも存在するタンパク質クラスである。インティンは、エクステインと称するフランキング宿主遺伝子と一緒に、単一のmRNAとして転写され、単一のポリペプチドとして翻訳される。翻訳後、インティンは、自己触媒現象を開始してインティン自体を除去し、フランキング宿主タンパク質セグメントを新しいポリペプチド結合と接合する。この反応は、インティンによってのみ触媒され、他の細胞タンパク質、補助因子及びATPを必要としない。インティンは、種々の単細胞生物中に存在し、サイズが異なる。多くのインティンは、ゲノム内での移動性の原因となるエンドヌクレアーゼドメインを含む。

30

【0157】

インティンによって媒介される反応は、バイオテクノロジーに使用され、特に精製、タンパク質チップ構築などのインビトロでの状況で、また、植物系統の改善に使用されている（Perler, F. B. 2005. IUBMB Life 57(7): 469 - 76）。変異は、自然のインティンヌクレオチド配列に導入され、これらの変異体の一部は、諸特性が変化することが報告されている（Xu and Perler, 1996. EMBO J. 15(9), 5146 - 5153）。インティンに加えて、細菌インティン様（BIL）ドメイン及びヘッジホッグ（Hog）自動プロセシングドメイン、Hog/インティン（HINT）スーパーファミリーの他の2メンバーも、類似の機序によって翻訳後の自己プロセシングを触媒することが知られている（Dassa et al. 2004. J. Biol. Chem. 279(31): 32001 - 32007）。

40

【0158】

インティンは、特定の宿主タンパク質においてインフレームの挿入配列として存在する。自己スプライシング反応においては、インティンは、前駆体タンパク質からインティン自体を切り出し、フランキング領域のエクステインは、結合して、宿主遺伝子機能を回復する。これらのエレメントは、ゲノム内の移動性の原因となるエンドヌクレアーゼ機能も含む。インティンは、ある範囲のサイズ（134から1650アミノ酸）で存在し、真正

50

細菌、真核生物及び古細菌のゲノム中で特定された。モデルスプライシング/レポーター系を用いた実験によれば、エンドヌクレアーゼ、タンパク質切断及びタンパク質スプライシング機能は、分離し得る (Xu and Perler, 1996, EMBO J. 15: 5146-5153)。下記例は、パイロコッカス ホリコシイ Pho Pol I、サッカロミセス セレビスイエ VMA 及びシネコシスティス種由来のインテインを使用して、抗体の重鎖と軽鎖由来の配列を有する融合タンパク質を産生する。インテインのスプライシング能力を除去するように設計されたインテインの変異によって、自己切断を起こして、正確にコードされた抗体の重鎖と軽鎖を生成する単一のポリペプチドが産生される。この戦略は、他の多連鎖タンパク質、ホルモン又はサイトカインの発現に同様に使用することができ、その成熟、生物活性形態への前駆体タンパク質 (プロタンパク質) のプロセッシングに適合させることもできる。パイロコッカス ホリコシイ Pho Pol I、S. セレビスイエ VMA 及びシネコシスティス種のインテインの使用を本明細書で具体的に例示したが、当分野で公知である他のインテインを、本発明のポリタンパク質発現ベクター及び方法に使用することができる。

10

20

30

40

50

【0159】

パイロコッカス ホリコシイ Pho Pol I、S. セレビスイエ VMA 及びシネコシスティス種のインテインに加えて、多数の他のインテインが当分野で公知である (例えば、Perler, F. B. 2002, InBase, the Intein Database, Nucl. Acids Res. 30(1): 383-384 及び New England Biolabs ウェブサイト、例えば、<http://tools.neb.com/inbase/> から利用可能である Intein Database and Registry を参照されたい。) インテインは、酵母、マイコバクテリア、超好熱性古細菌などの広範囲の生物体において特定されている。ある種のインテインは、エンドヌクレアーゼ活性、並びに部位特異的なタンパク質切断及びスプライシング活性を有する。エンドヌクレアーゼ活性は、本発明の実施には不要である。エンドヌクレアーゼコード領域は、タンパク質切断活性が維持される限り、除去することができる。

【0160】

タンパク質スプライシングプロセスの機序は、詳細に研究されており (Chong et al. 1996, J. Biol. Chem. 271: 22159-22168; Xu and Perler, 1996, EMBO J. 15: 5146-5153)、保存されたアミノ酸がインテイン及びエクステインスプライシングポイントに見出された (Xu et al. 1994, EMBO J. 13: 5517-5522)。本明細書に記載の構築物は、第1のコード配列の5'末端に融合したインテイン配列を含み、第2のコード配列は、インテインのC末端にインフレームで融合している。適切なインテイン配列は、タンパク質スプライシングエレメントを含むことが知られているタンパク質のいずれかから選択することができる。公知の全インテインを含むデータベースは、ワールドワイドウェブ上に見出すことができる (Perler, F. B. 1999, Nucl. Acids Res. 27: 346-347)。インテインコード配列は、第2のコード配列の3'末端から5'末端において (インフレームで) 融合している。このタンパク質をある種の細胞小器官に向けるために、適切なペプチドシグナルをタンパク質のコード配列に融合させることができる。

【0161】

第2のエクステインコード配列の後に、同じ細胞中で複数のタンパク質を発現させるために、インテインコード配列 - エクステインコード配列を所望の回数繰り返すことができる。複数のインテイン (multi-intein) を含む構築物の場合、異なる出所からのインテインエレメントを使用することが有用であり得る。発現される最後の遺伝子の配列の後に、転写終結配列が、有利にはポリアデニル化配列を含めて、所望のとおりに入挿される。ポリアデニル化配列と終結配列の順序は、当分野で理解されている順序とすることができる。一実施形態においては、ポリアデニル化配列は終結配列に先行し得る。

【0162】

修飾インテインスプライシング単位は、目的のかかる修飾インテインがインテインからエクステインの切り出しを触媒し得るが、エクステインの連結を触媒し得ないように設計された（例えば、米国特許第7026526号及び米国特許出願公開第20020129400号参照）。パイロコッカス種GB-D DNAポリメラーゼにおけるC末端エクステイン接合部の変異誘発によって、エクステイン及びインテインの切断を誘導するが、それに続くエクステインの連結を阻止する改変スプライシングエレメントが生成した（Xu and Perler, 1996, EMBO J 15: 5146-5153）。セリン538からアラニン又はグリシン（SerからAla又はGly）への変異は、切断を誘導したが、連結を阻止した。かかる位置においては、SerからMet又はSerからThrによっても、別々のセグメントに切断され、少なくとも部分的に再連結されないポリタンパク質の発現が得られる。他のインテインスプライシング単位における等価な残基の変異は、インテインとのC末端エクステイン接合部におけるアミノ酸の相互的保存（relative conservation）のために、エクステインセグメントの連結も防止し得る。保存/相同性が低い場合には、例えば、Cエクステインの始めの幾つかの、例えば、約5個の残基、及び/又はインテインセグメントの最後の幾つかの残基が、系統的に変化し、所与のエクステインセグメント、特に本明細書に開示され、当分野で理解されているエクステインセグメントの切断を支援するが、スプライシングを支援しない能力についてスクリーニングされる。エンドヌクレアーゼドメインを含まないインテインが存在する。これらのインテインとしては、シネコシスティス種dnaEインテイン、マイコバクテリウムゼノピGyrAタンパク質などが挙げられる（Magnasco et al, Biochemistry, 2004, 43, 10265-10276; Telenti et al, 1997, J. Bacteriol. 179: 6378-6382）。他のインテインは、自然界に存在し、又はエンドヌクレアーゼ含有インテインをコードする配列からエンドヌクレアーゼコードドメインを除去することによって人工的に作製された（Chong et al, 1997, J. Biol. Chem. 272: 15587-15590）。所望であれば、インテインは、マイコバクテリウムゼノピGyrAタンパク質由来のインテインなど、スプライシング機能を実施するのに必要な最少のアミノ酸からなるように最初に選択される（Telenti et al, 1997, 上記）。別の実施形態においては、エンドヌクレアーゼドメインを除去するように修飾された、マイコバクテリウムゼノピGyrAタンパク質又はサッカロミセスセレピシエVMAインテイン由来のインテインなど、エンドヌクレアーゼ活性のないインテインが選択される（Chong et al, 1997, 上記）。

【0163】

インテインスプライシング単位を更に修飾すると、切断反応の反応速度が変わり得る。したがって、スプライシング単位の遺伝子配列を単に変更するだけでタンパク質投与量を制御することができる。

【0164】

一実施形態においては、C末端エクステインの第1の残基は、グリシン又はアラニンを含むように操作される（パイロコッカス種GB-D DNAポリメラーゼとのエクステイン連結を防止することが判明した修飾）（Xu and Perler, 1996, EMBO J 15: 5146-5153）。この実施形態においては、好ましいC末端エクステインタンパク質は、未変性アミノ酸配列中のN末端メチオニンの後にグリシン又はアラニン残基を自然に含む。インテインのC末端にエクステインのグリシン又はアラニンが融合すると、ポリタンパク質のプロセッシング後に未変性アミノ酸配列が得られる。別の実施形態においては、人工グリシン又はアラニンは、自然の配列を改変することによって、又は追加のアミノ酸残基を自然の配列のN末端に付加することによって、C末端エクステイン中に位置する。この実施形態においては、タンパク質の未変性アミノ酸配列は、ポリタンパク質プロセッシング後に1個のアミノ酸によって改変される。更なる実施形態においては、本発明に有用である他の修飾は、米国特許第7026526号に記載されて

いる。

【0165】

パイロコッカス種 GB-D DNAポリメラーゼインテインのDNA配列は、米国特許第7,026,526号の配列番号1である。N末端エクステイン接合部は、「aac」配列(配列番号1のヌクレオチド1-3)であり、アスパラギン残基をコードする。未変性GB-D DNAポリメラーゼ前駆体タンパク質中のスプライシング部位は、配列番号1中のヌクレオチド3及びヌクレオチド1614に続く。C末端エクステイン接合部は、セリン残基をコードする「agc」配列(配列番号1のヌクレオチド1615-1617)である。C末端エクステインのセリンからアラニン又はグリシンへの変異によって、ポリタンパク質の切り出しを促進し得るが、エクステイン単位の連結を促進し得ない、修飾インテインスプライシングエレメントが形成される。

10

【0166】

マイコバクテリウムゼノピGyrA最小インテインのDNA配列は、米国特許第7,026,526号の配列番号2である。N末端エクステイン接合部は、「tac」配列(配列番号2のヌクレオチド1-3)であり、チロシン残基をコードする。前駆体タンパク質中のスプライシング部位は、配列番号2のヌクレオチド3及びヌクレオチド597に続く。C末端エクステイン接合部は、「acc」配列(配列番号2のヌクレオチド598-600)であり、トレオニン残基をコードする。C末端エクステインのトレオニンからアラニン又はグリシンへの変異によって、ポリタンパク質の切り出しを促進するが、エクステイン単位を連結しない、修飾インテインスプライシングエレメントが形成される。

20

【0167】

2A系

本発明の2Aプロテアーゼプロセッシング実施形態に目を向けると、2Aの活性は、ペプチド結合の形成を阻止する、コドン間のリボソームの読み飛ばしを必要とし得るが(de Felipe et al. 2000. Human Gene Therapy 11:1921-1931; Donnelly et al. 2001. J. Gen. Virol. 82:1013-1025)、2Aドメインは、むしろ自己融解酵素のように作用すると考えられる(Ryan et al. 1989. Virology 173:35-45)。口蹄疫ウイルス(FMDV)2Aコード領域を、発現ベクターにクローン化し、標的細胞に移入した研究によって、人工レポーターポリタンパク質のFMDV 2A切断が広範囲の異種発現系(コムギ胚芽溶解物及びトランスジェニックタバコ(Halpin et al., 米国特許第5,846,767号(1998)及びHalpin et al. 1999. The Plant Journal 17:453-459)、Hs 683ヒト神経こう腫細胞系(de Felipe et al. 1999. Gene Therapy 6:198-208;以下「de Felipe II」と記述する。)、ウサギ網状赤血球溶解物及びヒトHTK-143細胞(Ryan et al. 1994. EMBO J. 13:928-933)及び昆虫細胞(Roosien et al. 1990. J. Gen. Virol. 71:1703-1711)において効率的であることが立証された。生物学的に関連する分子に対する、FMDV 2Aによって媒介される異種ポリタンパク質の切断が、IL-12について示された(p40/p35ヘテロ2量体; Chaplin et al. 1999. J. Interferon Cytokine Res. 19:235-241)。移入されたCOS-7細胞において、FMDV 2Aは、p40-2A-p35ポリタンパク質が、IL-12に関連する活性を有する、生物学的に機能的なp40及びp35サブユニットに切断されるのを媒介した。

30

40

【0168】

FMDV 2A配列を、単独で、又は種々のIRES配列と一緒に、発現ベクターに取り込み、パイシストロニック、トリシストロニック及びテトラシストロニックベクターを構築した。動物において2Aによって媒介される遺伝子発現の効率は、Furler(2001)によって、FMDV 2A配列を介して連結された、シヌクレインとEGFP

50

又はCu/Znスーパーオキシドジスムターゼ(SOD-1)とEGFPをコードする組み換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて実証された。EGFPとシヌクレインは、2A配列を含むベクターから、対応するIRES系ベクターよりも実質的に高いレベルで発現されたが、SOD-1は、同等又はわずかに高いレベルで発現された。

【0169】

自己プロセッシング切断部位をコードするDNA配列は、エンテロ、ライノ、カルジオ、アフト又は口蹄疫ウイルス(FMDV)を含めて、ただしこれらだけに限定されない、ピコルナウイルスに由来するウイルス配列によって例示される。好ましい実施形態においては、自己プロセッシング切断部位コード配列は、FMDVに由来する。自己プロセッシング切断部位としては、2A、2A様ドメインなどが挙げられるが、これらだけに限定されない(参照によりその全体を組込む、Donnelly et al. 2001. J. Gen. Virol. 82:1027-1041)。

10

【0170】

或いは、プロテアーゼ認識部位を、自己プロセッシング部位の代わりに用いることができる。適切なプロテアーゼ及び同族認識部位としては、フェーリン、RXR/K-R(配列番号1);IPNVのVP4、S/TXA-S/AG(配列番号2);タバコエッチウイルス(TEV)プロテアーゼ、EXXYXQ-G(配列番号3);ライノウイルスの3Cプロテアーゼ、LEVL FQ-GP(配列番号4);PC5/6プロテアーゼ;PACEプロテアーゼ、LPC/PC7プロテアーゼ;エンテロキナーゼ、DDDDK-X(配列番号5);活性化第X因子プロテアーゼIE/DGR-X(配列番号6);トロンピン、LVPR-GS(配列番号7);genenase I、PGA AH-Y(配列番号8);及びMMPプロテアーゼ;内部切断可能なシグナルペプチド(その例は、インフルエンザCウイルスの内部切断可能シグナルペプチドである。)(Pekosz A. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:I13233-13238)(MGRMAMKWLVIICFSITSQPASA、配列番号11)などが挙げられるが、これらだけに限定されない。プロテアーゼは、ポリタンパク質の一部としてトランス又はシスで与えられ得る。プロテアーゼは、同じ転写内でコードされ、例えば、自己プロセッシング部位又はプロテアーゼ認識部位によって、一次翻訳産物の残部から分離される。

20

【0171】

より多くの抗体治療が臨床応用に認可されるようになるにつれ、これらの治療タンパク質を製造する方法がこの20年間で着実に改善された(Wurm, FM, 2004, "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells," Nat. Biotechnol. 22(11):1393)。しかし、更に効率的で信頼性の高い製造方法が工業界で望まれている。幾つかの望ましい特徴としては、培地へのより高レベルの抗体分泌、製造細胞系の遺伝的安定性の改善、細胞系のより大きな産生速度などが挙げられる。

30

【0172】

治療抗体のより効率的な製造方法の本発明者らの探索において、本発明者らは、単一オープンリーディングフレームから抗体の重鎖と軽鎖を発現させる方法を開発した。かかる一方法においては、インテインコード配列を用いて、単一オープンリーディングフレーム(sORF)内の抗体の重鎖と軽鎖の各遺伝子を分離する。かかるsORF抗体発現技術によってもたらされる利点としては、重鎖と軽鎖の遺伝子量比を操作する能力、ER中で多サブユニットを組み立てるための重鎖と軽鎖のポリペプチドの近接、高効率タンパク質分泌の潜在能力などが挙げられる。

40

【0173】

ほ乳動物細胞中でモノクローナル抗体を発現する他の技術は、各々それ自体のプロモーター及び調節配列と一緒に、2つの別々のORF中に重鎖と軽鎖の遺伝子を導入する必要がある。プロモーター干渉は、この方法に付随する懸念である。抗体の重鎖と軽鎖の各コ

50

ード配列を発現細胞系に導入する代替法は、抗体の重鎖と軽鎖の各コード配列を分離する配列内リボソーム進入部位 (IRES) を使用しなければならない。この方法は、IRES配列の下流のコード配列を翻訳する効率が低いので、広範には用いられていない。最近、口蹄疫ウイルス (foot-and-mouth virus) ペプチド (2Aペプチド) をコードする配列を用いて、抗体の重鎖と軽鎖の各コード配列を分離する方法が記述された (Fang et al., 2005, Nat. Biotechnol., 23 (5): 584-90)。この方法では、抗体の重鎖と軽鎖及び2Aペプチドを単一のmRNAとして転写する。しかし、抗体の重鎖と軽鎖の各ポリペプチドは、小胞体 (ER) に入る前に切断される。また、2個の非天然アミノ酸が、重鎖と軽鎖の切断/分離後に、重鎖のC末端に残る。本発明のインテイン発現系は、基本的に異なる。本発明のインテイン発現系は、重鎖と軽鎖のポリペプチドが翻訳され、単一のポリタンパク質としてERに導入される点で、2A法とは異なる。有利なことに、非天然アミノ酸を成熟抗体分子に含める必要がない。

10

20

30

40

50

【0174】

以下の説明はすべて、以下の発現カセットを含む抗体産生ベクターに関連する：p.ホリコシイPol Iインテイン-分泌シグナル-軽鎖-ポリAなどのプロモーター-分泌シグナル-重鎖-wtインテイン、p.ホリコシイPol Iインテイン-軽鎖-ポリAなどのプロモーター-分泌シグナル-重鎖-修飾インテイン、p.ホリコシイPol Iインテイン-分泌シグナル-軽鎖-ポリAなどのp.ホリコシイPol Iインテイン-分泌シグナル-軽鎖-Pol修飾インテインなどのプロモーター-分泌シグナル-重鎖-Pol修飾インテイン、p.ホリコシイPol Iインテイン-修飾分泌シグナル-軽鎖-ポリAなどのプロモーター-分泌シグナル-重鎖-wt又は修飾インテイン、P.ホリコシイPol Iインテイン-修飾分泌シグナル-重鎖-ポリAなどのプロモーター-分泌シグナル-軽鎖-wt又は修飾インテイン、P.ホリコシイPol Iインテイン-修飾分泌シグナル-軽鎖-ポリAなどのp.ホリコシイPol Iインテイン-修飾分泌シグナル-軽鎖-wt又は修飾インテインなどのプロモーター-分泌シグナル-重鎖-wt又は修飾インテイン、P.ホリコシイPol Iインテイン-フェーリン切断部位-分泌シグナル-軽鎖-ポリAなどのプロモーター-分泌シグナル-重鎖-フェーリン切断部位-修飾インテイン及びP.ホリコシイPol Iインテイン-フェーリン切断部位-軽鎖-ポリAなどのP.ホリコシイPol Iインテイン-フェーリン切断部位-軽鎖-フェーリン切断部位-修飾インテインなどのプロモーター-重鎖-フェーリン切断部位-修飾インテイン。更なる構築物においては、修飾Psp-GBD Polインテインを使用する。

【0175】

本明細書に具体的に例示するポリタンパク質は、P.ホリコシイPol Iインテインを使用する。P.ホリコシイPol Iインテインは、その前及び後でD2E7のそれぞれ重鎖及び軽鎖とインフレームで融合している。-1位にあるアミノ酸はリジンであり、+1位にあるアミノ酸は、軽鎖シグナルペプチドの第1のアミノ酸であるメチオニンであった。+1位のメチオニンを使用すると、本発明者らが後半のセクションで実証するように、スプライシング、重鎖と軽鎖の接合を廃することができる。スプライシングには、セリン、システイン、トレオニンなどの求核性アミノ酸残基が+1位に必要であると理解される。wtインテインに加えて、最後のアミノ酸のアスパラギン及び最後から2番目のヒスチジンを変える変異は、これらの変異として使用することができ、一般にスプライシングを廃し、N末端スプライシング接合部における切断を維持する (Mills, 2004; Xu, 1996, Chong, 1997)。或いは、インテインの第1のアミノ酸を変える変異を使用することもでき、かかる変異は、一般にスプライシングを廃し、C末端スプライシング接合部における切断を維持し、N末端スプライシング接合部における切断を廃し、又は弱まった切断を維持する (Nichols, 2004; Evans, 1999及びXu, 1996)。例えば、これは、「スプライシングを完全に遮断し、分枝中間体の形成を阻害し、両方のスプライス部位における切断をもたらす」こ

とが示された (Xu, M. Q., EMBO vol. 15:5146-5153)。

【0176】

別のポリペプチドにおいては、フーリン切断部位を含むと、接合部配列が変化し、続いて分泌中にフーリン切断による切り出しが起こる。インテインの野生型配列を表9に示す。パイロコッカス種GB-DのDNAポリメラーゼIにおいては、切断/スプライス部位は、RQRRAIKILAN/S (配列番号138) (N末端) 及びHN/SYYGYGYAK (配列番号139) (C末端) である。望ましくは、エンドヌクレアーゼコード領域は、HindIII切断によって切り出される。切断、スプライシング及びエンドヌクレアーゼの各機能は互いに分離され、このエンドヌクレアーゼ領域は、小リンカーで置換されて、依然として切断及びスプライシング可能であるミニインテインを生成し得る (Telenti et al., 1997, J. Bacteriol., 179: 6378-6382)。少なくとも1種類の酵母インテインは、ほ乳動物細胞において機能することが注目される (Mootz et al., 2003, J. Am. Chem. Soc., 125: 10561-10569)。D2E7 (免疫グロブリン) インテイン構築物のコード配列及びアミノ酸配列については表8A及び8Bを参照されたい。表8Cは、D2E7インテイン構築物発現ベクターの完全ヌクレオチド配列である。修飾Psp Pol Iインテインと融合した、D2E7の重鎖をコードする融合構築が記述されている (Humira - アダリムマブの登録商標)。修飾Psp Pol Iインテイン自体は、D2E7軽鎖のコード領域と融合している。軽鎖配列は、二重であり得、インテイン、シグナルペプチド又はプロテアーゼ切断部位によって、ポリタンパク質の残部から分離されている。この実施形態においては、重鎖分泌シグナルが成熟重鎖に先行する。インテインは、上述したように改変され、セリン1は、トレオニンに変化し、内部のHindIII断片が切り出されてエンドヌクレアーゼ活性が取り除かれている。インテインは、成熟D2E7軽鎖領域とインフレームで融合する。別の実施形態は、成熟軽鎖の5'側の軽鎖分泌シグナルを含む。D2E7インテイン構築物及び発現ベクターの略図については図10及び11を参照されたい。発現構築物及び完全発現ベクターのヌクレオチド配列並びにD2E7インテイン構築物のアミノ酸配列については表8A-8Cを参照されたい。

10

20

30

【0177】

シグナルペプチド及びシグナルペプチダーゼ

タンパク質が膜へのタンパク質ターゲティングについての情報をそのアミノ酸配列中に含むというシグナル仮説は、30年以上知られている。Milsteinとその共同研究者は、骨髄腫細胞由来のIgGの軽鎖が、より高い分子量で合成され、小胞体小胞 (ミクロソーム) を翻訳系に添加したときに、その成熟型に転換されることを発見し、これらの結果に基づいて、ミクロソームが、アミノ末端伸長ペプチドを除去することによって前駆体タンパク質型を成熟型に転換するプロテアーゼを含む、モデルを提案した。シグナル仮説は、ミトコンドリア、葉緑体などの種々の細胞内膜に局在するタンパク質内に異なるターゲティング配列を含むようにすぐに拡張された。これらの異なるターゲティング配列は、搬出されたタンパク質から特異的シグナルペプチダーゼ (SPase) によって切断されることが後日見出された。

40

【0178】

細菌においてシグナルペプチドの切断に関与する少なくとも3種類の異なるSPaseが存在する。SPase Iは、SecYEG経路又はtwin arginine translocation (Tat) 経路によって搬出される非リポタンパク質基質を処理し得る。Sec経路によって搬出されるリポタンパク質は、SPase IIによって切断される。SPase IVは、II型分泌装置の成分である、IV型prepilin及びprepilin様タンパク質を切断する。

【0179】

真核生物においては、小胞体 (ER) 膜を標的とするタンパク質は、タンパク質を共翻

50

訳的に、又は翻訳後に、Sec 61 トランスポーション装置に向けるシグナルペプチドによって媒介される。ERシグナルペプチドは、その細菌的な対応物と類似した特徴を有する。ERシグナルペプチドは、シグナルペプチダーゼ複合体(SPC)によってER腔に搬出された後、搬出されたタンパク質から切断される。タンパク質を真核細胞内の異なる場所に分別する各シグナルペプチドは、これらの細胞が多数の種々の膜状及び含水区画を含むので、異なるものでなければならない。ERを標的とするタンパク質は、切断可能なシグナル配列を含むことが多い。驚くべきことに、多数の人工ペプチドがトランスポーションシグナルとして機能し得る。最も重要な特徴は、あるしきい値を超えた疎水性であると考えられる。ERシグナルペプチドは、ロイシン残基の含量が、細菌のシグナルペプチドよりも高い。シグナル認識粒子(SRP)は、リボソームから出現した後に切断可能シグナルペプチドと結合する。SRPは、新生タンパク質をER膜に向けるのに必要である。ER腔へのタンパク質のトランスポーション後、搬出されたタンパク質はSPCによってプロセッシングを受ける。別の実施形態は、真核細胞中に天然に存在するシグナル(リーダー)ペプチドプロセッシング酵素を利用する。真核生物においては、小胞体(ER)膜を標的とするタンパク質は、タンパク質を共翻訳的に、又は翻訳後に、Sec 61 トランスポーション装置に向けるシグナルペプチドによって媒介される。ERシグナルペプチドは、シグナルペプチダーゼ複合体(SPC)によってER腔に搬出された後、搬出されたタンパク質から切断される。公知のERシグナルペプチドの大部分は、N末端で切断可能であり、又は内部で切断不可能である。最近、C型肝炎ウイルス、ハンタウイルス、フラビウイルス、風疹ウイルス及びインフルエンザCウイルス中に見出されるポリタンパク質など、幾つかのウイルス性ポリタンパク質が、ER SPCによって切断される可能性が最も高い内部シグナルペプチドを含むことが見出された。ウイルス性ポリタンパク質の成熟に関するこれらの研究によれば、SPCは、アミノ末端に位置するシグナルペプチドだけでなく、内部シグナルペプチドの後に位置するシグナルペプチドも切断し得る。

10

20

【0180】

プレセニリン型アスパラギン酸プロテアーゼシグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)は、その膜貫通領域内のシグナルペプチドを切断する。SPPは、ヒトにおけるシグナルペプチド由来のHLA-Eエピトープの生成に必須である。最近、C型肝炎ウイルス、ハンタウイルス、フラビウイルス、風疹ウイルス及びインフルエンザCウイルス中に見出されるポリタンパク質など、幾つかのウイルス性ポリタンパク質が、ER SPCによって切断される可能性が最も高い内部シグナルペプチドを含むことが見出された。したがって、予測されるシグナルペプチダーゼ基質特異性エレメントの変異誘発によって、ウイルス感染能(infectivity)を遮断し得る。ポリタンパク質の成熟に関するこれらの研究は、SPCが、アミノ末端に位置するシグナルペプチドだけでなく、内部シグナルペプチドの後に位置するシグナルペプチドも切断し得ることを示しているので、やはり極めて興味深い。シグナルペプチダーゼは当分野で周知である。例えば、Paetzelt M. 2002. Chem. Rev. 102(12): 4549; Pekosz A. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 13233-13238; Marius K. 2002. Molecular Cell 10: 735-744; Okamoto K. 2004. J. Virol. 78: 6370-6380, Vol. 78; Martoglio B. 2003. Human Molecular Genetics 12: R201-R206及びXia W. 2003. J. Cell Sci. 116: 2839-2844を参照されたい。

30

40

【0181】

小胞体(ER)膜を標的とするタンパク質は、タンパク質を共翻訳的に、又は翻訳後に、Sec 61 トランスポーション装置に向けるシグナルペプチドによって媒介される。ERシグナルペプチドは、シグナルペプチダーゼ複合体(SPC)によってER腔に搬出された後、搬出されたタンパク質から切断される。公知のERシグナルペプチドの大部分は、N末端で切断可能であり、又は内部で切断不可能である。最近、C型肝炎ウイルス、

50

ハンタウイルス、フラビウイルス、風疹ウイルス及びインフルエンザCウイルス中に見出されるポリタンパク質など、幾つかのウイルス性ポリタンパク質が、ER SPCによって切断される可能性が最も高い内部シグナルペプチドを含むことが見出された。ウイルス性ポリタンパク質の成熟に関するこれらの研究によれば、SPCは、アミノ末端に位置するシグナルペプチドだけでなく、内部シグナルペプチドの後に位置するシグナルペプチドも切断し得る。

【0182】

本発明は、単一の転写物におけるポリペプチドの発現に内部切断可能シグナルペプチドを利用する。次いで、転写された単一のポリペプチドは、SPCによって切断されて、個々のペプチドが分離され、又は個々のペプチドがタンパク質に組み立てられる。本発明の方法は、転写された単一のポリペプチドにおける免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の発現、続いて切断、次いで成熟免疫グロブリンへの組立てに適用可能である。この技術は、ポリペプチドサイトカイン、成長因子、又は種々の他のタンパク質、例えば、転写された単一のポリペプチドにおけるIL-12p40及びIL-12p35、次いでIL-12への組立て、又は転写された単一のポリペプチドにおけるIL-12p40及びIL-23p19、次いでIL-23への組立てに適用可能である。

10

【0183】

シグナルペプチダーゼ手法は、ほ乳動物発現ベクターに適用可能であり、前駆体又はポリタンパク質から機能的抗体、又はプロセシングを受けた他の産物が発現される。抗体の場合には、ベクターから重鎖と軽鎖の両方を含むポリタンパク質として産生され、重鎖と軽鎖の間の介在配列は、内部切断可能シグナルペプチドである。この内部切断可能シグナルペプチドは、ERに存在するプロテアーゼ、主にシグナルペプチダーゼ、プレセニン又はプレセニン様プロテアーゼによって切断されて、重鎖と軽鎖が残され、折り畳まれ、組み立てられて、機能的分子を与え得るものであり、望ましくは分泌される。C型肝炎ウイルス由来の内部切断可能シグナルペプチドに加えて、ERに存在するプロテアーゼによって切断され得る他の内部切断可能な配列は、置換することができる。同様に、本発明の実施は、シグナルペプチダーゼが切断を起こす宿主細胞に限定する必要はなく、プレセニン、プレセニン様プロテアーゼ、及びポリペプチドをプロセシングするための他のプロテアーゼを含めて、ただしこれらだけに限定されないプロテアーゼも含む。これらのプロテアーゼは、とりわけ、引用した論文に概説されている。

20

30

【0184】

また、本発明は、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の発現に限定されず、単一の転写物において発現される他のポリペプチド及びポリタンパク質も含み、続いて内部シグナルペプチドが切断されて、各ペプチド又はタンパク質が遊離する。これらのタンパク質は、成熟産物中で一緒に組み立てられても、組み立てられなくてもよい。

【0185】

個々のポリペプチドが交互に存在する発現構築物、すなわち、「ペプチド1 - 内部切断可能シグナルペプチド - ペプチド2」又は「ペプチド2 - 内部切断可能シグナルペプチド - ペプチド1」も本発明の範囲内である。本発明は、「ペプチド1 - 内部切断可能シグナルペプチド - ペプチド2 - 内部切断可能シグナルペプチド - ペプチド3」など、内部切断可能シグナルペプチドによって連結された2種類を超えるペプチドの発現を更に含む。

40

【0186】

また、本発明は、I型とII型の両方の膜貫通タンパク質の発現に適用され、また、発現構築物を包囲する他のプロテアーゼ切断部位の付加に適用される。一例は、フェーリン又はPC5/6切断部位を免疫グロブリン重鎖の後に付加して、重鎖ペプチドのカルボキシル末端における追加のアミノ酸残基の切断を促進することである。例えば、「重鎖 - フェーリン切断部位 - 内部切断可能シグナルペプチド - 軽鎖」である。本発明は、離れた、又は直列の、1個を超える内部切断可能シグナルペプチドも含む。例えば、「重鎖 - フェーリン切断部位 - 内部切断可能シグナルペプチド - 内部切断可能シグナルペプチド - 軽鎖」である。また、本発明は、「HCシグナルペプチド - 重鎖 - フェーリン切断部位 - 内部

50

切断可能シグナルペプチド - LCシグナルペプチド - 軽鎖」など、重鎖及び軽鎖の自己シグナルペプチドが維持又は除去される状況も含む。

【0187】

以下の記述は、本明細書にその一部が記載されている抗体産生ベクターに関連する。ベクターの設計としては、以下が挙げられるが、これらだけに限定されない。

【0188】

ベクター設計の表

【0189】

【表1】

プロモーター—分泌シグナル—重鎖—内部切断可能シグナルペプチド—分泌シグナル—軽鎖—ポリA、	10
プロモーター—分泌シグナル—重鎖—内部切断可能シグナルペプチド—軽鎖—ポリA、	
プロモーター—分泌シグナル—重鎖—内部切断可能シグナルペプチド—分泌シグナル—軽鎖—内部切断可能シグナルペプチド—分泌シグナル—軽鎖—ポリA、	
プロモーター—分泌シグナル—重鎖—フューリン切断部位—内部切断可能シグナルペプチド—フューリン切断部位—分泌シグナル—軽鎖—ポリA、及び	
プロモーター—重鎖—フューリン切断部位—内部切断可能シグナルペプチド—フューリン切断部位—軽鎖—フューリン切断部位—内部切断可能シグナルペプチド—フューリン切断部位—軽鎖—ポリA。	20

【0190】

融合構築物の一具体例は、内部切断可能シグナルペプチドと融合したD2E7重鎖をコードする(Humira/アダリムマブ)。内部切断可能シグナルペプチド自体は、D2E7軽鎖のコード領域と融合している。この実施形態においては、重鎖分泌シグナルが成熟重鎖に先行する。内部切断可能シグナルペプチド配列は、インフルエンザCウイルスに由来する。フューリン切断部位は、重鎖のカルボキシ末端に含まれる。成熟抗体に対する感情(affect)を最小化するために、重鎖の最後から3番目のアミノ残基をプロリンからアルギニンに変異させて、フューリン切断部位を作製した。別の実施形態は、成熟軽鎖の5'側の軽鎖分泌シグナルを含む。表9A-9Cを参照されたい。インフルエンザCウイルス由来の最小の内部切断可能シグナルペプチド配列(MGRMAMKWLVIICFSITSQPASA、配列番号11)を例に使用する。より長い配列を使用して切断効率を高めることもできる。GenBankアクセッション番号AB126196を参照されたい。同じアミノ酸配列をコードする種々のヌクレオチド配列を使用することもできる。

【0191】

本発明は、単一の転写物内でコードされたポリタンパク質内の1種類以上のポリペプチドの成熟のために、内部切断可能シグナルペプチドを更に利用することができる。次いで、転写された単一のポリペプチドは、SPCによって切断されて、個々のペプチドが分離され、又は個々のペプチドがタンパク質に組み立てられる。本発明は、転写された単一のポリペプチドにおいて免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を発現させ、次いで成熟免疫グロブリンに組み立てるのに適用可能である。本発明は、ポリペプチドサイトカイン、成長因子、又は種々の他のタンパク質、例えば、転写された単一のポリペプチドにおいてIL-12p40及びIL-12p35を発現させ、次いでIL-12に組み立てるのに、又は転写された単一のポリペプチドにおいてIL-12p40及びIL-23p19を発現させ、次いでIL-23に組み立てるのに、適用可能である。

【0192】

本発明のベクター構築物のための2個以上の異種DNA配列間の2A配列又は他のプロテアーゼ若しくはシグナルペプチダーゼ切断(認識)部位の位置的なサブクロニングによって、単一の発現ベクターを介して2種類以上の遺伝子を送達及び発現させることがで

10

20

30

40

50

きる。FMDV 2A配列、プロテアーゼ認識配列などの自己プロセッシング切断部位は、単一のウイルスベクターから、例えば、抗体、ヘテロ2量体受容体又はヘテロ2量体タンパク質の個々の部分であり得る、2種類以上のタンパク質、ポリペプチド又はペプチドを発現及び送達させる独特の手段をもたらすことが好ましい。

【0193】

FMDV 2Aは、FMDVゲノム中でそれ自体のC末端における単一の切断を誘導する機能を果たし、したがってシスで機能するポリタンパク質領域である。FMDV 2Aドメインは、約19アミノ酸長(LLNFDLLKLAGDVESNPGP、配列番号12; TLNFDLLKLAGDVESNPGP、配列番号13; Ryan et al. 1991. J. Gen. Virol. 72: 2727-2732)であると一般に報告されているが、わずかに14アミノ酸残基(LLKLAGDVESNPGP、配列番号14)のオリゴペプチドも、未変性FMDVポリタンパク質プロセッシングにおけるその役割と同様に、2A C末端における切断を媒介することが判明した。

10

【0194】

2A配列の変形物は、ポリタンパク質の効率的プロセッシングを媒介する能力について研究された(Donnelly et al. 2001)。2A配列の相同体及び変種は、本発明の範囲内に含まれ、以下の配列、すなわち、QLLNFDLLKLAGDVESNPGP、配列番号15; NFDLLKLAGDVESNPGPFF、配列番号16; LLKLAGDVESNPGP、配列番号17; NFDLLKLAGDVESNPGP、配列番号18; APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP、配列番号19; VT
ELLYRMKRAETYCPRLLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLN
FDLLKLAGDVESNPGP、配列番号20; LLAIHPTEARHKQKIV
APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP、配列番号141; EARHKQK
IVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP、配列番号142などが挙げられるが、これらだけに限定されない。

20

【0195】

2A配列及びその変種は、自己プロセッシング又は他の切断部位が存在することによってポリタンパク質の切断後に個々のタンパク質が適切なモル比及び/又は量で発現されるように、自己プロセッシング切断部位又は他のプロテアーゼ切断部位を介して連結された、タンパク質又はポリペプチドのコード配列を含む任意の(プラスミド又はウイルス系)ベクターを含めて、自己プロセッシングポリタンパク質を発現するベクターの作製に使用することができる。これらのタンパク質は、ベクター自体に対して異種でもよく、互いに異種でもよく、又は自己プロセッシング切断部位、例えば、FMDVに対して異種でもよく、したがって、本発明の実施に用いられる自己プロセッシング切断部位は、切断機能を果たし、又は切断を媒介する能力において、自己プロセッシング切断部位と同じ出所に由来する異種タンパク質とコード配列とを区別しない。

30

【0196】

一実施形態においては、本発明によるベクターに含まれるFMDV 2A配列は、LLNFDLLKLAGDVESNPGP(配列番号12)を含むアミノ酸残基をコードする。或いは、本発明によるベクターは、ピコルナウイルス、昆虫ウイルス、C型ロタウイルス、トリパノソーマ反復配列又は細菌サーモガ マリチマ由来の2A様ドメインを含めて、ただしこれらだけに限定されない、Donnelly et al. 2001. J. Gen. Virol. 82: 1027-1041に考察された他の2A様領域のアミノ酸残基をコードし得る。

40

【0197】

本発明は、アミノ酸の1個以上に対して親ヌクレオチドのコドンとは異なるコドンを有する2A又は2A様ポリペプチドの核酸コード配列など、2A又は2A様ペプチド配列をコードする核酸配列変種の使用を企図する。かかる変種は、本発明によって具体的に企図され、包含される。2Aペプチド及びポリペプチドの配列変種も同様に本発明の範囲に含まれる。同様に、シス又はトランスで供給されるプロテアーゼは、ポリタンパク質の領域

50

間の同起源のプロテアーゼ認識（切断）部位を介してタンパク質分解プロセッシングを媒介し得る。

【0198】

インティン - 抗体発現構築物を用いた更なる実験においては、本発明者らは、ほ乳動物（293E）細胞において、ER中で、抗体（D2E7）重鎖及び軽鎖アミノ酸配列に関連して、パイロコッカス ホリコシイ Pol I インティンによって媒介されるタンパク質スプライシング反応が起こり得ることを示した。このタイプの反応を単一オープンリーディングフレーム（sORF）形式の抗体発現に用いるために、本発明者らは、ほ乳動物細胞（293E）において、ER中で、抗体重鎖及び抗体軽鎖のアミノ酸配列に関連して、2種類の構築物、pTT3 - HcintLC1aa - p.hori及びpTT3 - HcintLC3aa - p.horiを用いて、この反応が起こり得ることを示した。表11A及び12Aを参照されたい。

10

【0199】

これらの構築物をPTT3ベクター骨格上で作製した。このベクターは、懸濁培養液中の移入された293E細胞（エプスタインバーウイルス（EBV）核抗原1を発現する細胞）においてそのエピソーム増幅を可能にする、エプスタインバーウイルス複製開始点を有する（Durocher, 2002, "High level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells, Nucleic Acids Research 30(2):E9）。各ベクターは、CMVプロモーターの調節制御下で転写的に発現される、1個のORFを含んだ。ORFにおいては、シグナルペプチド（SP）を各々有するD2E7の重鎖と軽鎖の間にP.ホリコシイ Pol I インティンがインフレームで挿入された。pTT3 - HcintLC1aa - p.hori及びpTT3 - HcintLC3aa - p.hori構築物は、D2E7抗体の重鎖と軽鎖の各配列をインティン配列から分離する、1個の自然のエクステインアミノ酸、又は3個の自然のエクステインアミノ酸をインティンのどちらかの側に含んだ。これらの構築物を一過性の移入によって293E細胞に導入した。培養上清と細胞ペレット試料の両方を分析した。

20

【0200】

サイトゾル画分と細胞内膜画分の分離を可能にする条件下で細胞ペレット試料を溶解した。これらの画分の両方を、抗重鎖又は抗カップ軽鎖抗体を用いたウエスタンブロット（WB）によって分析した。これらのプロット上で、本発明者らは、構築物のORFにおけるような3部構成（tri-partite）体（130kDa）、スプライシング現象から誘導されるHとLの融合物（fusion）（80kDa）、抗体重鎖（50kDa）、及び抗体軽鎖（25kDa）に対応する4つのタンパク質種の発現を観測した。最初の2つのタンパク質種は抗重鎖と抗軽鎖の両方の抗体によって検出され、重鎖は抗重鎖抗体によってのみ検出され、軽鎖は抗軽鎖抗体によってのみ検出された。これらの構築物の両方において、重鎖と軽鎖の両方の抗体によって検出された80kDaのタンパク質種が存在することは、タンパク質スプライシング現象が起きたことを示している。また、4つのタンパク質種は全部、小胞体（ER）を含む、細胞内（sub-cellular）の膜画分中に主に存在した。これは、（ORFの最初にコードされた）重鎖シグナルペプチドがポリペプチド全体をERに誘導し、そこでスプライシング反応が起きたことを示している。特定の理論に拘泥するつもりはないが、重鎖と軽鎖の遊離ポリペプチドは、不完全なスプライシングに起因する、N末端及びC末端スプライシング接合部における切断の結果である可能性が高いと考えられる。

30

40

【0201】

細胞ペレット試料を、全RNA抽出、及び抗体重鎖プローブと抗体軽鎖プローブの両方を用いたノーザンブロット分析にも使用した。ノーザンブロット分析によって、これらのsORF構築物中に、重鎖プローブと軽鎖プローブの両方とハイブリッド形成した3部構

50

成 (tripartite) mRNA (3.4 kb) が出現したが、別々の重鎖又は軽鎖の mRNA は出現しなかった。これに対し、従来の手法を用いて、すなわち、2 個の pTT3 ベクターに保有された 2 個の別々の ORF から抗体の重鎖と軽鎖を導入して、D2E7 抗体を発現させた細胞ペレット試料においては、重鎖 (1.4 kb) 及び L 鎖 (0.7 kb) の各 mRNA が、それぞれ重鎖又は軽鎖プローブを用いて検出された。これらの対照細胞ペレットにおいては、3 部構成 mRNA は検出されなかった。

【0202】

上記データは、単一の ORF を含む構築物 (D2E7 重鎖 - P. ホリコシイ (horikoshi) インテイン - D2E7 軽鎖) を用いて、3 種類のタンパク質全部を含む単一の mRNA が転写されたことを示している。この 3 部構成メッセージは、3 部構成ポリペプチドに翻訳され、3 部構成ポリタンパク質の N 末端に存在する重鎖シグナルペプチドによって誘導されて、ER に同時翻訳的に移入された。この構築物を用いて、インテインによって媒介されるタンパク質スプライシング反応が ER 内で起きた。これは、インテインによって媒介される反応を、抗体の発現、及び他の多サブユニット分泌タンパク質、すなわち、折り畳まれ、適切に翻訳後修飾されるために分泌経路を通過する必要があるタンパク質の発現に使用できることを示唆している。

10

【0203】

培養上清も分析した。ウエスタンブロット及び ELISA によって、pTT3 - HcintLC1aa - p.hori 構築物の発現から分泌される抗体を検出することができる。これらの研究を以下でより詳細に考察する。分泌抗体発現量は、軽鎖シグナルペプチドをコードする配列内の点変異と変異の両方によって増加した。

20

【0204】

インテインによって媒介される連結を阻害するが、N 末端又は C 末端のスプライシング接合部における切断反応を維持するように設計された変異によって、抗体分泌レベルが増加した。

【0205】

抗体分泌の効率を増加させる目的で、3 タイプの点変異を設計し、試験した。第 1 のタイプの変異は、C 末端エクステインの第 1 セリン残基のコドンにおけるものであった。これらの構築物は、Ser から Met (S > M) への変化を含んだ (構築物 pTT3 - HcintLC - p.hori、構築物 E 及び構築物 A)。第 2 のタイプの変異は、インテインの第 1 セリン残基のコーディングにおけるものであった。かかる構築物は Ser から Thr (S > T) への変化を含んだ (構築物 E)。第 3 のタイプの変異は、インテインの最後から 2 番目のアミノ酸であるヒスチジン残基のコドンにおけるものであった。これらの構築物は His から Ala (H > A) への置換変異を含んだ (構築物 A 及び構築物 B)。これらの変異を単独で、又は組み合わせて、導入した。変異体構築物全部を、文献に記載の反応機構に従って、N 又は C 末端スプライシング接合部における切断を維持し、遊離したエクステインのスプライシングを減少させるように、又は両方、設計した。以下に概説するように、D2E7 抗体の分泌は、幾つかのこれらの構築物を用いて実施される。

30

【0206】

一実験においては、これらの構築物を一過性移入によって 293E 細胞に導入し、7 日後、培養した上清の IgG 抗体価を ELISA 分析によって分析した。構築物 pTT3 - HcintLC3aa - p.hori、pTT3 - HcintLC1aa - p.hori、E、A 及び B の抗体価は、それぞれ 17.0 + 0.6、113.8 + 2.6、225.8 + 10.0、9.3 + 0.5、161.7 + 4.4 及び 48.2 + 1.0 ng/ml (平均 + s.d.) であった。

40

【0207】

これらの上清試料を変性条件下の SDS - PAGE ゲルでも分析し、ヒト IgG 重鎖に対する抗体及びヒトカッパ軽鎖に対する抗体と一緒にプロットした。これらのウエスタンブロット上で、抗体重鎖 (約 50 kDa) 及び抗体軽鎖 (約 25 kDa) は、構築物 pTT3 - HcintLC - p.hori 及び構築物 A から生成した上清において明瞭に見ら

50

れ、E L I S Aによって測定したI g Gレベルの順位と一致した。

【0208】

これらの移入から得られた細胞ペレット試料もウエスタンブロット分析によって特徴づけられた。3部構成ポリペプチド(約130kDa)は、抗体重鎖(約50kDa)及び軽鎖(約25kDa)バンドと一緒に、上記の全構築物を含む細胞ペレットにおいて見られる。これらのうち、構築物pTT3-HcintLC-p.hori及び構築物Aは、最も強い重鎖及び軽鎖バンドを与えた。したがって、細胞内遊離重鎖及び軽鎖レベルと、組み立てられ、分泌された抗体との間に相関があると結論された。抗体の重鎖と軽鎖の融合物である、スプライスされた産物(約80kDa)は、構築物pTT3-HcintLC3aa-p.horiを用いて作製された細胞ペレット中に存在し、構築物pTT3-HcintLC1aa-p.horiから作製された細胞ペレット中により少ない程度に存在した。これは、構築物pTT3-HcintLC-p.hori及び構築物A、B及びEでは存在しなかった。これは、タンパク質スプライシングレベルが、抗体分泌効率と逆相関することを示している。これは、抗体構造についての一般的知識に基づいて、抗体の重鎖と軽鎖の連結が誤った折り畳みをもたらし、その結果、この誤った折り畳みが、誤って折り畳まれたタンパク質の分解に対する細胞機構のために、分泌を阻止するという予測と一致する。これらのプロット上の別のタンパク質種は、(軽鎖抗体によって認識されるが、重鎖抗体によっては認識されない)インティン-軽鎖融合物(80kDa)であった。この融合物は、更なる切断の非存在下で、N末端のスプライシング接合部における切断から生成した。このバンドは、本明細書に記載の構築物A、B、E、pTT3-HcintLC3aa-p.hori、pTT3-HcintLC1aa-p.horiにおいて存在し、構築物pTT3-HcintLC-p.hori及び構築物Hにおいてほとんど存在しなかった。したがって、このタンパク質種の存在も、抗体分泌量と逆の関係にあった。最後に、インティンバンドは、これらの細胞溶解物においても、KLHと複合化した、P・ホリコシイペプチドに対して産生されたウサギポリクローナル抗血清を用いて検出された。

10

20

【0209】

本発明者らは、sORF構築物pTT3-HcintLC-p.horiを用いて分泌されたD2E7抗体が、重鎖及び軽鎖の正確なN末端配列、正確な重鎖及び軽鎖分子量、並びに完全な分子量を有することを示した。

30

【0210】

sORF構築物pTT3-HcintLC-p.horiの1つを用いて分泌されたD2E7抗体をプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、その重鎖とその軽鎖の両方のN末端配列に関して分析した。明確な結果は、重鎖のN末端ペプチド配列がEVQLVESGGG(配列番号21)であり、軽鎖のN末端配列がDIQMTQSPSS(配列番号22)であったことを示している。したがって、この構築物を用いて、シグナルペプチダーゼw DIQMTQSPSSによって用いられる切断部位は、従来の2個のORF/2種類のベクターの手法においてDE27抗体発現に使用された切断部位と同じである。

40

【0211】

これらのデータは、次世代の構築物の設計に重要な科学的見識を提供する。すなわち、ほ乳動物のERペプチダーゼは、その提示には幾つかの明白な要件があるにしても、新規合成ポリタンパク質中のシグナルペプチドを認識し、正確に切断することができる(下記参照)。

【0212】

この精製抗体を、従来の製造方法によって製造されたD2E7と一緒に、質量分析法によって分析した。変性条件下では、pTT3-HcintLC-p.hori構築物から産生されたD2E7軽鎖は、質量スペクトル上の単一ピークを与え、その分子量(MW)は23408.8であった。一方、標準製造方法から作製されたD2E7軽鎖の分子量(MW)は23409.7であり、よく一致した。また、変性条件下では、pTT3-Hc

50

i n t L C - p . h o r i 構築物から産生されたD 2 E 7重鎖は、質量スペクトル上で1本の主ピークと2本の副ピークを与え、その分子量(MW)はそれぞれ50640.6、50768.2及び50802.4であった。一方、標準製造方法から作製されたD 2 E 7重鎖の分子量(MW)はそれぞれ50641.7、50768.6及び50804.1であり、やはりよく一致した。3本のピークは、D 2 E 7重鎖の標準変形物に対応する。

【0213】

p T T 3 - H c i n t L C - p . h o r i 構築物から産生されたこのD 2 E 7抗体の自然条件下で完全な分子量(MW)も、本製造方法から作製されたD 2 E 7抗体と一緒に、質量分析法によって測定した。p T T 3 - H c i n t L C - p . h o r i 構築物から産生されたD 2 E 7抗体は、それぞれMW148097.6、148246.9及び148413.1の3本のピークを有した。本製造方法から作製されたD 2 E 7抗体もそれぞれMW148096.0、148252.3及び148412.8の3本のピークを有した。

10

【0214】

これらのデータは、p T T 3 - H c i n t L C - p . h o r i 構築物から産生されたD 2 E 7抗体が、変性条件と自然条件の両方で、従来の製造方法から作製されたD 2 E 7抗体と同一サイズであることを明確に示した。従来の製造方法と比較して、完全に信頼のおけるアミノ酸配列を有する抗体を産生する能力は、本発明の抗体発現系の利点の1つである。例えば、Nature Biotechnology, 2005においてFangらによって記述された2A系を用いて、産生された抗体は、その重鎖のC末端に2個の余分な非天然アミノ酸を含んだ。これは、切断の性質上、回避することができない。

20

【0215】

本発明者らは、p T T 3 - H c i n t L C - p . h o r i s O R F 構築物を用いて産生されたD 2 E 7抗体が、TNFとの結合に対して、本製造方法から作製されたD 2 E 7抗体と同じ親和性を有することも示した。バイオセンサーチップ全体にわたって固定化ヤギ抗ヒトIgGを介して捕捉されたrhTNFa拮抗物質と、可溶性rhTNFaとの間の実時間の結合相互作用を、Biacore 3000装置(Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden)を用いて、製造者の指示及び標準手順に従って測定した。手短に述べると、rhTNFa一定分量をHBS-EP(Biacore)緩衝剤で希釈し、150µl一定分量を固定化タンパク質マトリックス全体に流量25ml/minで注入した。等濃度の分析物を無処置の基準表面全体に同時注入して、バルク屈折率バックグラウンドを減算するためのブランクのセンサーグラムとした。センサーチップ表面を、10mMグリシンの25ml/minで5分間の2回の注入を含むサイクル間で再生した。次いで、得られた実験結合センサーグラムをBIA評価4.0.1ソフトウェアを用いて評価して、動力学的速度パラメータを求めた。各拮抗物質のデータセットを1:1ラングミュアモデルに適合させた。これらの試験では、適合を最大分析物結合能(RU)又はRmax特性について局所的に選択しながら、結合及び解離データを全体的な適合分析(global fit analysis)プロトコル下で分析した。この場合、ソフトウェアは、単一解離(single dissociation)定数(kd)、会合定数(ka)及び親和性定数(Kd)を計算した。平衡解離定数は $Kd = kd / ka$ である。動力学的速度(on-rate)、動力学的速度(off-rate)及び全体の親和性を、1-100nMの範囲の異なるTNF濃度を用いて求めた。構築物p T T 3 - H c i n t L C - p . h o r i から産生されたD 2 E 7抗体の動力学的速度、動力学的速度及び全体の親和性は、それぞれ $1.61E+6 (M^{-1} s^{-1})$ 、 $5.69E-5 (s^{-1})$ 及び $3.54E-11 (M)$ であった。本製造方法によって製造されたD 2 E 7抗体の動力学的速度、動力学的速度及び全体の親和性は、それぞれ $1.73E+6 (M^{-1} s^{-1})$ 、 $6.72E-5 (s^{-1})$ 及び $3.89E-11 (M)$ であった。Biacore分析によれば、このs O R F 構築物を用いて産生されたD 2 E 7抗体は、TNFに対して、従来の製造方法によって製造されたD 2 E 7抗体と類似の親和性を有する。

30

40

【0216】

50

シグナルペプチドの修飾

本発明者らは、s O R F構築物設計、Heavy chain - i n t - L i g h t C h a i nにおいて、軽鎖シグナルペプチド配列の疎水性を部位特異的変異誘発によって減少させると、抗体分泌レベルが約10倍増加したことを示した。

【0217】

本発明者らは、P・ホリコシイntyン配列後に、軽鎖シグナルペプチド配列が「M D M R V P A Q L L G L L L W F P G S R C」（配列番号23）から「M D M R V P A Q L L G D E W F P G S R C」（配列番号24）に変化した構築物Hを設計した。上述した同じタイプの移入実験において、この構築物を発現した細胞の上清は、E L I S A分析によって測定して2047 + 116 ng / mlの抗体を含んだ。この抗体分泌レベルは、2A技術を用いて記述したレベルと類似している（1.6 μg / ml）。この上清のウエスタンブロット分析は、抗体重鎖及び抗体軽鎖に対応する強いバンドを示した。

10

【0218】

対照実験では、この同じ軽鎖シグナルペプチド変異を、この抗体を発現するベクターに（2種類の別々のベクター中の2個の別々のオープンリーディングフレームから抗体の重鎖と軽鎖を発現させる）従来手法によって導入した。この構築物においては、疎水性領域は、従来の構築物設計において、ER上のシグナル認識粒子（SRP）複合体へのターゲティング、及びトランスロコンへの入口（entrance）の誘導に重要であるので、予想されたように、配列番号24を与える配列番号23の変化は、抗体分泌を消滅させた。これは、s O R F構築物の設計において、軽鎖シグナルペプチドがERシグナルペプチダーゼによって認識及び切断され得るとしても、軽鎖シグナルペプチドのターゲティング機能が不必要であることを立証しており、O R F全体が、O R Fの始めの重鎖シグナルペプチドによって誘導されてERに入るといふ仮説と一致する。

20

【0219】

s O R F構築物Hを用いて分泌されたD 2 E 7抗体をプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、その軽鎖のN末端配列に関して分析した。軽鎖のN末端ペプチド配列は、非切断シグナルペプチドである（明確な）M D M R V P A Q L L（配列番号26）であった。文献は、ほ乳動物のERシグナルペプチドのH領域が、（SRP）複合体へのターゲティング、及びトランスロコンを介したトランスロケーションの誘導において主に機能することを示唆しているが、本発明者らのデータは、シグナルペプチドの疎水性（H）領域も、シグナルペプチダーゼによる認識及び切断にある役割を果たすことを示唆した。

30

【0220】

本発明者らは、p T T 3 - H c i n t L C - p . h o r i構築物と構築物Hの両方を用いて分泌されたD 2 E 7抗体が、細胞アッセイにおいて生物学的に活性であることを示した。構築物p T T 3 - H c i n t L C - p . h o r i及び構築物Hを用いて産生されたD 2 E 7抗体を精製し、T N F aによって誘発される細胞傷害性を中和する能力をL 9 2 9細胞において試験した。このアッセイを本質的に米国特許第6090382号（その中の実施例4参照）に記載のように実施した。ヒト組み換えT N F aは、ネズミL 9 2 9細胞において細胞傷害性を生じ、このアッセイに使用された。D 2 E 7、抗T N F a抗体は、この細胞傷害性を中和し得るので、L 9 2 9アッセイは、特定のD 2 E 7抗体調製物の生物活性を評価するのに使用することができる細胞アッセイの1つである。このアッセイによって分析すると、p T T 3 - H c i n t L C - p . h o r i構築物と構築物Hの両方から産生されたD 2 E 7は、T N F aによって誘発される細胞傷害性を中和した。そのI C 5 0値は、標準製造方法から作製されたD 2 E 7によるI C 5 0値と類似していた。

40

【0221】

本発明者らは、軽鎖シグナルペプチド領域の設計が異なる追加の構築物を検討した。高い抗体分泌効率を与える最適なs O R F構築物設計を特定するために、本発明者らは、C末端スプライシング部位とそれに続くシグナルペプチドの周囲の領域を変化させた幾つかの追加の構築物を設計した。構築物Jは、H構築物の「M D M R V P A Q L L G D E W

50

F P G S R C」(配列番号24)の代わりに、インテインの最後のNに続く「M D M R V P A Q W F P G S R C」(配列番号25)を決定し、更にこのシグナルペプチド内の疎水性領域を除去し、C末端領域及びシグナルペプチダーゼ切断部位を保持した。構築物Kは、インテインの最後のNに直接続く成熟軽鎖配列の発現を誘導した。構築物Lは、切断部位の前の-1及び-2アミノ酸をシグナルペプチダーゼによって変化させた構築物p T T 3 - H c i n t L C - p . h o r iにおけるように、「M D M R V P A Q L L G L L L L W F P G S R C」(配列番号23)の代わりに、インテインの最後のNに続く「M D M R V P A Q L L G L L L L W F P G S G G」(配列番号27)の発現を誘導した。

【0222】

一実験においては、これらの構築物を一過性移入によって293E細胞に導入し、7日後、培養した上清のIgG抗体価をELISA分析によって分析した。構築物H、J、K及びLの抗体価は、それぞれ2328.5+79.9、1289.7+129.6、139.3+4.7及び625.0+20.6 ng/ml(平均+s.d.)であった。

10

【0223】

これらの移入から得られた細胞ペレット試料をウエスタンブロット分析によっても分析した。全構築物は、上記3部構成ポリペプチドバンド(約130kDa)、重鎖バンド(約50kDa)及び軽鎖バンド(約25kDa)を有し、(重鎖と軽鎖の両方の抗体によって認識される)検出可能なスプライス産物(80kDa)を持たなかった。この構築物群のうち、構築物Kは、極少量の細胞内軽鎖のみを産生し、代わりにインテイン-軽鎖融合に対応するタンパク質種、N末端スプライス部位における一切断現象の産物を産生した点で、最も特徴的なウエスタンブロット(WB)パターンを示した。このタンパク質種は、この群の他の構築物では存在しなかった。構築物Kは、他の構築物とは2つの面で異なっていた。すなわち、構築物Kは、シグナルペプチダーゼによる切断部位を持たず、C末端エクステインの第1アミノ酸残基としてメチオニン又はセリンの代わりにアスパラギン酸を含んだ。これらの特徴の一方又は両方は、インテインと抗体軽鎖の間の領域における切断を防止し、抗体分泌を減少させ得た。

20

【0224】

s O R F構築物J及びLを用いて分泌されたD2E7抗体をプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、その軽鎖のN末端配列を分析した。この分析によれば、構築物Jによって産生された軽鎖のN末端ペプチド配列は、非切断シグナルペプチドであるM D M R V P A Q L Lであった。一方、構築物Lによって産生された軽鎖のN末端ペプチド配列は、正確なシグナルペプチド切断後の成熟軽鎖であるD I Q M T Q S P S Sであった。したがって、構築物Lは、構築物p T T 3 - H c i n t L C - p . h o r iよりも抗体分泌を増加させる設計であり(異なる一過性移入において0.6-1ug/ml)、その軽鎖は同時に正確なN末端配列を有した。

30

【0225】

本発明者らは、組み立てられた抗体をs O R F構築物からインテインを用いて発現させる機構、及び抗体分泌レベルを更に増加させる方法を探索した。記述したs O R F構築物の大部分を移入した細胞の細胞内試料は、プロセッシングを受けない軽鎖とプロセッシングを受けた軽鎖に対応する2つの抗体軽鎖種を含んだ。正の対照構築物又はp T T 3 - H c i n t L C - p . h o r i構築物を移入した細胞においては、プロセッシングを受けた軽鎖のみが分泌された。これは、結合した野生型軽鎖シグナルペプチドを有する、プロセッシングを受けない軽鎖を組み立てることができず、分泌できないことを示している。これに対し、H及びJ構築物から得られたプロセッシングを受けない軽鎖は、組み立てることができ、分泌することができた。どちらも変異シグナルペプチドを含んだ。プロセッシングを受けない形態とプロセッシングを受けた形態の間の細胞内軽鎖ポリペプチド分布に見られるように、軽鎖シグナルペプチドプロセッシングの程度は、構築物に応じて変わる。構築物p T T 3 - H c i n t L C - p . h o r iに比較して、構築物Lは、プロセッシングを受けた軽鎖の量が増加した。これは、抗体分泌の増加につながった。

40

【0226】

50

上記実験データに基づいて、sORF構築物から抗体分泌を増加させる一方法は、軽鎖シグナルペプチドのプロセッシング効率を改善することである。これは、疎水性領域及び切断部位周囲領域における変異を系統的に試験することによって、また、長さの異なるシグナルペプチドを試験することによって実施される。これは、この提示 (presentation) において効率的に切断することができるペプチド配列を酵母中でスクリーニングすることによって、また、CHO細胞において類似のスクリーニングを実施することによって、実施することもできる。

【0227】

sORF構築物からの抗体分泌レベルを増加させるのに使用することができる別の方法は、3部構成mRNAの安定性を増加させるために、異なる5'及び3'非翻訳領域(UTR)を試験することである。というのは、これらのmRNAは、抗体の重鎖と軽鎖を別々にコードする従来のmRNAよりも大きいからである。

10

【0228】

sORF構築物からの抗体分泌レベルを増加させる別の方法は、安定なCHO又はNS0細胞系を作製し、選択し、DHFR又はGSを用いて増幅させて、組み換え遺伝子コピー数を増加させることである。抗体分泌レベルは、組み換え遺伝子の位置をエピソーム(一過性)からゲノム(安定な)に変更することによって独立に増加する。抗体分泌レベルは、コピー数を増加させることによって、及び/又は5'及び3'UTR、プロモーター並びにエンハンサー配列を操作することによっても、増加する。ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)を発現するベクターをdhfr欠損細胞系に移入する。ベクターコピー数の多い細胞系を、dhfrの競合的阻害剤であるメトトレキサートを用いて選択する(Kaufman, R. J. and Sharp, P. A. J Mol. Biol. (1982) 159: 601-621)。更に独立した選択肢として、グルタミンシンセターゼ選択マーカーと併せてサイトメガロウイルスプロモーターエンハンサーを保有する発現ベクターを用いて、発現を増加させる(Bebbington, C. R. (1991) Methods 2: 138-145)。組み換え遺伝子コピー数の増加に加えて、sORF構築物設計からのプロセッシングに特に適している細胞系譜もこの方法において選択される。

20

【0229】

挿入配列を含む修飾インテインの使用

30

D2E7の重鎖と軽鎖の各ポリペプチドから分離された細胞内インテインタンパク質を追跡するために、本発明者らは、pTT3-LcintHC-p.horiと構築物Hの両方の構築物において、アミノ酸配列位置FRKVR!RGRG(!は挿入部位、-HT1)及びEGKR!IPEF(-HT2)にヒスチジンタグを導入した4構築物を作製した。P.ホリコシインテイン中のこれらの2つの位置は、その3次元構造を維持し、したがってその機能を維持しつつ、挿入断片を許容し得るループであると仮定した。一実験においては、293E細胞の移入に続いて4日間インキュベートした後、培養上清のIgG抗体価をELISA分析によって分析した。構築物pTT3-LcintHC-p.hori-HT1、pTT3-LcintHC-p.hori-HT2、構築物H-HT1、構築物H-HT2及び構築物Hの抗体価は、それぞれ78.3+3.2、67.3+0.6、663.0+15.5、402.7+5.5、747.0+22.5 ng/ml(平均+s.d.)であった。2つの位置の両方に挿入配列を含むP.ホリコシインテインを使用すると、組み立てられた抗体が分泌された。特に、第1の位置に内部挿入タグを含むインテインを使用すると、挿入配列を含まないインテインを使用した場合と類似した抗体分泌レベルが得られた。

40

【0230】

上記データは、本発明のsORF構築物設計が、内部タグを含む修飾インテインの使用を含むことを示している。種々のタグが当分野で公知である。本発明のタグとしては、蛍光タグ、化学発光タグなどが挙げられるが、これらだけに限定されない。かかる構築物を用いて、個々の細胞における蛍光検出によって、発現されたポリタンパク質の量をモニタ

50

一することができる。また、これらの細胞をFACSによってタンパク質発現レベルに従って分別することができる。かかるタグの使用は、FACS分析による高産生性細胞又は細胞系の選択を可能にするので、安定な細胞系産生において特に有用である。本発明に教示するように、完全長インテインは、フランク抗体の重鎖と軽鎖から自己切断 (auto-cleaved) された後、細胞溶解物中に観測された。これは、蛍光標識インテインの検出、及び安定な細胞系産生におけるその使用の基礎を提供するものである。タグは、タンパク質の精製に使用することもできる。

【0231】

上記データから、本発明者らは、P.ホリコシイPol Iインテインによって媒介されるタンパク質スプライシング反応が293E細胞において、ER中で、(D2E7によって具体的に例示される)抗体の重鎖及び軽鎖の各アミノ酸配列に関連して、起こり得ることを学んだ。C末端エクステインの第1のアミノ酸におけるS>M、インテインの最後から2番目のアミノ酸におけるH>Aなどの点置換 (point substitution) 変異によって、分泌抗体レベルが増加した。構築物H及びJなどにおける軽鎖シグナルペプチドのH領域の疎水性を低下させると、抗体分泌レベルが更に増加した。軽鎖シグナルペプチドを欠く構築物における抗体分泌レベルは比較的低い。これは、C末端スプライシング接合部における切断効率が低いためであると考えられた。この切断の効率を増加させるために、2つの手法が使用される。第1の手法は、+1位においてアスパラギン酸以外のアミノ酸を使用する。本明細書に記載の幾つかの構築物も、+1位のメチオニンを使用し、C末端スプライシング接合部における切断が効率的であった。この切断の効率を増加させる第2の手法は、本開示に記載のものなどの異なるタイプの切断部位が後に続いてよいリンカーを用いて、C末端切断部位と軽鎖球状構造との間隔を変えることである。

10

20

【0232】

P.ホリコシイインテイン及びD2E7抗体を含む種々の構築物を記述し、試験したが、例えば抗体の重鎖と軽鎖の間に取り込まれた、(ヘッジホッグ及び関係するファミリーを含めて)他のインテイン及びインテイン様タンパク質を本発明のSORF設計に使用する。(2サブユニットタンパク質、及び2個を超えるサブユニットを有するタンパク質を含めて)他の複数サブユニットタンパク質を、抗体の重いタンパク質及び軽いタンパク質の代わりに同様に使用する。

30

【0233】

上記P.ホリコシイPol Iインテイン構築物に加えて、本発明者らは、Sce.VMAインテイン及びSsp.dnaEミニインテインを用いて類似の構築物を設計した：pTT3-Hc-VMAint-LC-0aa、pTT3-Hc-VMAint-LC-1aa、pTT3-Hc-VMAint-LC-3aa、pTT3-Hc-Ssp-GA-int-LC-0aa、pTT3-Hc-Ssp-GA-int-LC-1aa及びpTT3-Hc-Ssp-GA-int-LC-3aa。これらの構築物を293E細胞に移入し、上清及び細胞ペレット試料を分析した。

【0234】

一実験においては、293E細胞の移入に続いて7日間インキュベートした後、培養上清のIgG抗体価をELISA分析によって分析した。構築物pTT3-Hc-VMAint-LC-0aa、pTT3-Hc-VMAint-LC-1aa、pTT3-Hc-VMAint-LC-3aa、pTT3-Hc-Ssp-GA-int-LC-0aa、pTT3-Hc-Ssp-GA-int-LC-1aa及びpTT3-Hc-Ssp-GA-int-LC-3aaの抗体価は、それぞれ 9.0 ± 3.5 、 12.0 ± 0.0 、 39.7 ± 1.2 、 90.0 ± 2.0 、 38.7 ± 1.5 及び 32 ± 2.6 ng/ml (平均 \pm s.d.)であった。

40

【0235】

これらの移入から得られた細胞ペレット試料をウエスタンブロット分析によっても分析した。3部構成ポリペプチドは、これらの試料の全部で観測された。また、重鎖ポリペ

50

チドは、構築物 p T T 3 - H c - V M A i n t - L C - 0 a a、p T T 3 - H C - S s p - G A - i n t - L C - 0 a a、p T T 3 - H C - S s p - G A - i n t - L C - 1 a a 及び p T T 3 - H C - S s p - G A - i n t - L C - 3 a a で観測され、軽鎖ポリペプチドは、p T T 3 - H C - S s p - G A - i n t - L C - 0 a a、p T T 3 - H C - S s p - G A - i n t - L C - 1 a a 及び p T T 3 - H C - S s p - G A - i n t - L C - 3 a a で観測された。

【0236】

これらの実験の結果によれば、タンパク質の1クラスとしてのインティンは、本発明者らが記述した s O R F タンパク質発現戦略に首尾よく使用することができる。また、インティンに加えて、細菌インティン様 (B I L) ドメイン及びヘッジホッグ (H o g) 自動プロセシングドメイン、H o g / インティン (H I N T) スーパーファミリーの他の2メンバーを、本明細書に記載の構築物設計と類似した構築物設計に適用可能である。

10

【0237】

さらに、P . ホリコシイ P o l I インティン及び S c e . V M A インティンを含めて、多数のインティン中に存在するエンドヌクレアーゼ領域は、本発明の遺伝子発現戦略に不用であるので、エンドヌクレアーゼドメインを除去し、小さなリンカーで置換して、「ミニインティン」を作製することができる。

【0238】

これらの操作されたミニインティンも上記構築物設計に有用である。これらの操作されたミニインティンは、インティンコード領域がかなり小さいという利点があり、したがって目的ポリペプチドをコードする配列を拡大することができ、及び / 又は組み換え DNA 分子の取扱いをより容易にすることができる。

20

【0239】

2 A 又は 2 A 様配列、プロテアーゼ認識配列などの自己プロセシングペプチドの使用に関連した1つの懸念は、1本以上のポリペプチド鎖の C 又は N 末端が、一次翻訳産物内の特定の鎖の切断位置及び相対位置に応じて、自己プロセシングペプチドから誘導されるアミノ酸、すなわち 2 A によって誘導されるアミノ酸残基、又はプロテアーゼ認識配列を含むことである。これらのアミノ酸残基は、宿主に対して「外来性」であり、組み換えタンパク質がインビボで発現されると、又は送達されると (すなわち、遺伝子療法に関連してウイルス若しくは非ウイルスベクターから発現され、又はインビトロで製造された組み換えタンパク質として投与されると)、免疫応答を誘発し得る。また、2 A によって誘導されるアミノ酸残基、又はプロテアーゼ部位由来のアミノ酸残基は、除去しないと、産生細胞においてタンパク質分泌を妨害することがあり、及び / 又はタンパク質高次構造を変換することがあり、発現レベルが最適未満となり、及び / 又は組み換えタンパク質の生物活性が低下し得る。

30

【0240】

追加のタンパク質分解性切断部位が、切断後に残留した自己プロセシング切断部位由来のアミノ酸残基の除去手段として、ポリペプチドコード配列と自己プロセシング切断部位 (すなわち、2 A 配列) 又は他のプロテアーゼ切断部位との間に設けられるように操作された遺伝子発現構築物を、本発明の実施に使用することができる。

40

【0241】

追加のタンパク質分解性切断部位の例は、フューリン、タンパク質分泌経路内の他のセリンプロテアーゼなどの内因性サブチリシン様プロテアーゼによって切断され得る、コンセンサス配列 R X K (R) R (配列番号 1) を有するフューリン切断部位である。米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 4 2 7 2 1 号によれば、第 1 のタンパク質の N 末端の 2 A 残基は、第 1 のポリペプチドと 2 A 配列の間にフューリン切断部位 R A K R を導入することによって効率的に除去することができる。また、2 A 配列と 2 A 部位に隣接するフューリン切断部位とを含むプラスミドを使用すると、2 A 配列のみを含むプラスミドよりもタンパク質発現レベルが高くなることが判明した。この改善によって、2 A 残基をタンパク質の N 末端から除去したときに、より長い 2 A 配列、2 A 様配列又は他の自己プロセシング

50

配列を使用することができる点で更なる利点提供される。2 A 配列、2 A 様配列などのかかるより長い自己プロセシング配列は、2 種類以上のポリペプチドのより良好な等モル発現を単一のプロモーターを介して促進し得る。免疫グロブリン発現の更なる増加は、ポリタンパク質中に免疫グロブリン軽鎖コード配列が 2 回存在し、重鎖コード配列が 1 回しか存在しないときに得られる。

【0242】

十分なヒト特性を有する抗体又はその類似体を使用することが有利である。これらの試薬は、非ヒト種由来の抗体又は類似体によって誘発される、望ましくない免疫応答を回避する。自己プロセシングペプチドから誘導されるアミノ酸残基に対して起こり得る宿主免疫応答に対処するために、発現されたポリペプチド、すなわち抗体から自己プロセシングペプチド配列を除去するように、タンパク質分解性切断部位のコード配列を、第 1 のタンパク質のコード配列と自己プロセシングペプチドのコード配列との間に（当分野で公知である標準方法を用いて）挿入することができる。これは、インビボで使用される治療抗体又は診断抗体に特に有用である。

10

【0243】

組み換え DNA 技術ベクターを用いて発現させることができる、当分野で公知である任意の追加のタンパク質分解性切断部位を、本発明の実施に使用することができる。ポリペプチド又はタンパク質コード配列と（2 A 配列などの）自己プロセシング切断配列との間に挿入することができる、例示的な追加のタンパク質分解性切断部位としては、フューリン切断部位、R X K (R) R (配列番号 1) ; 活性化第 X 因子切断部位、I E (D) G R (配列番号 6) ; シグナルペプチダーゼ I 切断部位、例えば L A G F A T V A Q A (配列番号 2 8) 及びトロンピン切断部位、L V P R G S (配列番号 7) が挙げられるが、これらだけに限定されない。

20

【0244】

1 種類を超える成熟タンパク質を単一オープンリーディングフレームから発現させる I R E S、フューリン、2 A 及びインテイン手法の代替として、本発明は、ポリタンパク質内の第 1 のタンパク質部分と第 2 のタンパク質部分の間に位置するヘッジホッグタンパク質ドメインを用いたタンパク質プロセシングも規定する。本発明者らは、抗体の重鎖と軽鎖の各遺伝子を分離するために、ヘッジホッグ自動プロセシングドメインを有する抗体の重鎖と軽鎖を発現させる単一オープンリーディングフレームを設計した。かかる O R F を保有する細胞においては、少なくとも 1 本の抗体重鎖、1 本の抗体軽鎖及び 1 個のヘッジホッグ自動プロセシングドメインからなる単一の m R N A を転写し、使用して、対応するポリタンパク質を産生させる。翻訳後に、ヘッジホッグ自動プロセシングドメインは、抗体の重鎖と軽鎖の分離を媒介する。

30

【0245】

タンパク質のヘッジホッグファミリーは、種々の発生系においてモルフォゲンとして働く保存されたシグナル伝達分子を含み、広範囲のヒト疾患に関与する (K a l d e r o n , D . 2 0 0 5 . B i o c h e m S o c T r a n s . D e c ; 3 3 (P t 6) : 1 5 0 9 - 1 2) 。ヘッジホッグタンパク質は、2 個の構造ドメインと、細胞シグナル伝達において機能する N 末端ドメイン (H h - N) と、これら 2 個のドメイン間を切断する翻訳後自動プロセシング現象を触媒する C 末端ドメイン (H h - C) とを有し、N 末端ドメインの C 末端にコレステロール部分を付加し、それによってシグナル伝達分子を活性化する。 (T r a c i e t a l . 1 9 9 7 . C e l l , 9 1 , 8 5 - 9 7) 。

40

【0246】

かかる s O R F 抗体発現技術によってもたらされる利点としては、重鎖と軽鎖の遺伝子量比を操作する能力、E R 中で多サブユニットを組み立てるための重鎖と軽鎖のポリペプチドの近接、高効率タンパク質分泌の潜在能力などが挙げられる。

【0247】

H h - C タンパク質ドメインは、E R 中での自動プロセシング反応を触媒して、下記単

50

ーオープンリーディングフレーム構築物設計において、抗体重鎖ポリペプチドとHh-Cポリペプチドの間を翻訳後に切断するのに使用することができる。

【0248】

タンパク質のヘッジホッグファミリーは、N末端シグナル伝達ドメイン及びC末端自動プロセシングドメインを有する。そのC末端自動プロセシングドメインは、それ自体をN末端ドメインから切断し、そのC末端にコレステロール部分を2段階反応機序によって付加する (Porter et al., 1996, Science, 274 (5285): 255-9)。コレステロールに加えて、DTT、グルタチオンなどの他の求核剤も自動プロセシングを刺激する (Lee et al., 1994, Science, 266, 1528-1537)。切断反応はC末端自動プロセシングドメインによって触媒されるので、ヘッジホッグタンパク質のN末端シグナル伝達ドメインを抗体の重鎖又は軽鎖のポリペプチドで置換したときも類似の切断反応が起こる。この反応は、単一オープンリーディングフレームによってコードされたポリタンパク質に含まれる抗体の重鎖と軽鎖を分離するのに使用することができる。

10

【0249】

まず、抗体発現を一過性発現系において試験する。このために、構築物をPTT3ベクター骨格上に作製する。このベクターは、懸濁培養中の移入された293E細胞(エプスタインバーウイルス核抗原1を発現する細胞)においてそのエピソーム増幅を可能にするEBV複製開始点を有する (Durocher et al., 2002)。各ベクターは、CMVプロモーターによって駆動される、単一オープンリーディングフレームを有する。一構築物設計 pTT3-HC-Hh-C25-LC においては、キイロシヨウジョウバエに由来するソニックヘッジホッグタンパク質のC末端ドメイン全体を、その各々がシグナルペプチド(SP)を有するD2E7の重鎖と軽鎖の間にインフレームで挿入した。これらの構築物を一過性の移入によって293E細胞に導入する。培養上清と細胞ペレット試料の両方を分析する。

20

【0250】

サイトゾル画分と細胞内膜画分の分離を可能にする条件下で細胞ペレット試料を溶解する。これらの画分の両方を、抗重鎖又は抗カップ軽鎖抗体を用いた免疫プロット技術によって分析する。これらのプロット上で、観察されるタンパク質種としては、ポリタンパク質(HC-Hh-C25-LC)、Hh-C25-LC、別々の重鎖(HC)及び軽鎖(LC)などが挙げられる。後者の3つのタンパク質種の存在によって、自動プロセシング反応が起きたことが確認される。遊離の重鎖は、Hh-Cタンパク質ドメインによって触媒される切断から生成し、遊離の軽鎖ポリペプチドは、シグナルペプチダーゼによる切断の結果である。小胞体(ER)を含む細胞内の膜画分中のタンパク質種の分離(segregation)は、本発明者らのORFの始めの重鎖シグナルペプチドがORF全体をER中に誘導し、そこで切断反応が起こることを示唆している。

30

【0251】

これらの細胞ペレット試料を、全RNA抽出、及び抗体重鎖特異的プローブと抗体軽鎖特異的プローブの両方を用いたノーザンプロット分析に供する。これらのノーザンプロット上で、重鎖プローブと軽鎖プローブの両方とハイブリッド形成する3部構成mRNAが観察されることによって、構築物設計のsORF性が確認される。これに対し、従来の手法を用いて、すなわち、2個のpTT3ベクターに保有された2個の別々のORFから抗体の重鎖と軽鎖を導入して、D2E7抗体を発現させた細胞ペレット試料においては、重鎖(1.4kb)及びL鎖(0.7kb)の各mRNAが、それぞれ重鎖又は軽鎖プローブを用いて検出された。

40

【0252】

これらの実験は、単一のORFを含む構築物(D2E7重鎖-Hh-C25-D2E7軽鎖)を用いて、3種類のタンパク質全部を含む単一のmRNAが転写されることを示している。この3部構成メッセージは、3部構成ポリペプチドに翻訳され、ORFの始めに存在する重鎖シグナルペプチドによって誘導されて、ERに同時翻訳的に移入される。こ

50

れは、Hh - Cタンパク質ドメインが、抗体の発現、並びに他の多サブユニット分泌タンパク質、及び/又は折り畳まれ、適切に翻訳後修飾されるために分泌経路を通過する必要がある他のタンパク質の発現に有用であることを示している。

【0253】

細胞ペレットに加えて、本明細書で考察するように、培養上清の分泌抗体をウエスタンブロットとELISAの両方を用いて分析する。除去されたhh - C25を用いた構築物を試験して、ポリタンパク質プロセッシング及び抗体分泌レベルの効率を比較することができる。

【0254】

Hh - C25タンパク質ドメインからC末端63アミノ酸を除去すると、タンパク質プロセッシングを触媒し得るが、コレステロール付加を触媒し得ないタンパク質ドメインHh - C17が生成することが判明した。Hh - C17は、組み換えタンパク質として十分に発現し、その結晶構造が決定された(Tracie et al., 1997. 上記)。したがって、別の構築物設計pTT3 - HC - C17 - LCにおいては、この切断型タンパク質ドメインをD2E7抗体の重鎖と軽鎖の間に挿入した。

10

【0255】

本発明者らが本明細書で詳述するのと類似した構築物設計において試験した、ヘッジホッグタンパク質とインテインの相同性アラインメントにおいては、最後の8アミノ酸は、最後に予測されたシート二次構造を超えた延長部分(extension)であり、自動プロセッシング効率に寄与する場合もあれば、寄与しない場合もある。したがって、追加

20

【0256】

これらの構築物を一過性移入によって293E細胞に導入し、7日後、培養上清のIgG抗体価をELISA分析によって分析することができる。pTT3 - HC - C25 - LC、pTT3 - HC - C17 - LC、pTT3 - HC - C17sc - LC及びpTT3 - HC - C17hn - LCの抗体価は、それぞれ0.038、0.042、0.040及び0.046ug/mlである。

【0257】

これらの上清試料をSDS - PAGEゲル(変性条件)でも分析し、ヒトIgG重鎖に特異的な抗体及びヒトカッパ軽鎖に特異的な抗体と一緒にブロットする。これらのウエスタンブロット上で、抗体重鎖(約50kDa)及び抗体軽鎖(約25kDa)タンパク質を観測することができ、これらはELISAによって測定されたIgGレベルと相関し得る。

30

【0258】

これらの移入から得られた細胞ペレット試料もウエスタンブロット分析によって分析する。4つの上記タンパク質種の存在及び比重を異なる構築物間で比較して、構築物設計の各々によってもたらされるタンパク質プロセッシング効率を求めることができる。

【0259】

別のクラスの自己プロセッシングタンパク質、インテインにおいては、最後の2個のアミノ酸はHisAsnである傾向にある。インテインによって触媒されるタンパク質スプライシングプロセスにおいては、AsnはHisによって補助されて環化し、その結果、インテインとそのC末端フランキングポリペプチドの間のペプチド結合が切断される。インテインに対して、ヘッジホッグ自動プロセッシングタンパク質は、天然にC末端フランキングポリペプチドを持たず、保存されたAsnをポリペプチドのこの位置に持たない。一構築物設計pTT3 - HC - C17hn - LCにおいては、本発明者らはHis - Asnをこの位置に導入して、Ser - Cysを置換した。理論に拘泥するつもりはないが、この位置における操作された切断部位によって、この特定の構築物設計におけるヘッジホッグ自動プロセッシングタンパク質と抗体軽鎖の分離がより効率的になる。抗体分泌効率を上述したように試験する。

40

【0260】

50

ヘッジホッグ自動プロセシングタンパク質を含む s O R F 構築物によって産生される抗体を特徴づける。上記 s O R F 構築物を用いて分泌された D 2 E 7 抗体を、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、その重鎖とその軽鎖の両方の N 末端配列を分析する。これらの精製抗体を、標準製造方法から作製された D 2 E 7 と一緒に、変性条件下で、上記のように質量分析法によって分析する。質量分析法を用いて、これらの構築物から産生された D 2 E 7 抗体の自然条件下での完全な分子量 (M W) を、本製造方法から作製された D 2 E 7 抗体と一緒に、求める。

【 0 2 6 1 】

D 2 E 7 抗体とヒト T N F の結合を上記 B i a c o r e を用いて分析する。動力学的オン速度、動力学的オフ速度及び全体の親和性を、1 - 1 0 0 n M の範囲の異なる T N F 濃度を用いて求める。

10

【 0 2 6 2 】

本発明は、2種類以上のポリペプチド又はタンパク質のコード配列と自己プロセシング切断配列とを含む構築物を細胞に導入するための種々のベクターのいずれかの使用を企図する。遺伝子発現ベクターの多数の例が当分野で公知であり、それらはウイルス起源の場合もあれば、非ウイルス起源の場合もある。本発明の実施に使用することができる非ウイルス遺伝子送達方法としては、プラスミド、リボソーム、核酸/リボソーム複合体、陽イオン性脂質などが挙げられるが、これらだけに限定されない。

【 0 2 6 3 】

ウイルスベクター

ウイルスベクター及び他のベクターは、効率的に細胞を形質導入し、それ自体の D N A を宿主細胞中に導入する。組み換えウイルスベクターを作製する際に、非必須遺伝子は、目的タンパク質又はポリペプチドをコードする発現可能な配列で置換される。例示的ベクターとしては、(レンチウイルスベクターを含めた)レトロウイルスベクター、その増殖性、非増殖性及びヘルパー依存型を含めたアデノウイルス (A d) ベクター、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクター、サルウイルス 4 0 (S V - 4 0) ベクター、ウシ乳頭腫ベクター、エプスタインバーベクター、ヘルペスベクター、ワクシニアベクター、モロニーマウス白血病ベクター、ハーベイマウス肉腫ウイルスベクター、マウス乳癌ウイルスベクター、ラウス肉腫ウイルスベクター、非ウイルス性プラスミドなどのウイルスベクター及び非ウイルスベクターが挙げられるが、これらだけに限定されない。パキユロウイルスベクターは周知であり、昆虫細胞における発現に適切である。ほ乳動物細胞又は他の真核細胞における発現に適切であるおびたしい量のベクターが当分野で周知であり、多数市販されている。商業供給源としては、S t r a t a g e n e 、 L a J o l l a 、 C A ; I n v i t r o g e n 、 C a r l s b a d 、 C A ; P r o m e g a 、 M a d i s o n 、 W I 及び S i g m a - A l d r i c h 、 S t . L o u i s 、 M O などが挙げられる。多数のベクター配列が G e n B a n k を通して利用可能であり、ベクターに関する追加の情報は、インターネット上で R i k e n B i o S o u r c e C e n t e r を介して利用可能である。

20

30

【 0 2 6 4 】

ベクターは、複製開始点を典型的には含み、ベクターを特定し、選択することができる「マーカー」又は「選択マーカー」機能を更に含んでも、含まなくてもよい。任意の選択マーカーを使用することができるが、組み換えベクター用の選択マーカーは当分野で一般に公知であり、適切な選択マーカーを宿主細胞に応じて選択する。抗生物質又は他の毒素に対する耐性を与えるタンパク質をコードする選択マーカー遺伝子の例としては、アンピシリン、メトトレキセート、テトラサイクリン、ネオマイシン (S o u t h e r n e t a l . 1 9 8 2 . J M o l A p p l G e n e t . 1 : 3 2 7 - 4 1) 、 ミコフェノール酸 (M u l l i g a n e t a l . 1 9 8 0 . S c i e n c e 2 0 9 : 1 4 2 2 - 7) 、 ピューロマイシン、ゼオマイシン、ハイグロマイシン (S u g d e n e t a l . 1 9 8 5 . M o l C e l l B i o l . 5 : 4 1 0 - 3) 、 ジヒドロ葉酸還元酵素、グルタミンシンセターゼ及び G 4 1 8 が挙げられるが、これらだけ

40

50

に限定されない。当業者には理解されるように、発現ベクターは、典型的には、複製開始点、発現すべきコード配列に作動可能に結合したプロモーター、並びにリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写ターミネーター配列を、発現されるコード配列に応じて適宜含む。

【0265】

ベクター又は他のDNA配列を「組み換え」と称するのは、典型的には作動可能に結合されていないDNA配列の作動可能な結合が天然から単離され、又は天然に存在することを単に認めるものである。調節（発現及び/又は制御）配列は、発現及び/又は制御配列が転写及び、適宜、核酸配列の翻訳を調節するときに、核酸コード配列に作用可能に結合している。したがって、発現及び/又は制御配列は、プロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、コード配列の5'側の開始コドン（すなわち、ATG）、イントロンのスプライシングシグナル及び終止コドンを含む。

【0266】

アデノウイルス遺伝子治療ベクターは、強い一過性発現、優れた力価、並びに分裂細胞及び非分裂細胞をインビボで形質導入する能力を示すことが知られている（Hitt et al. 2000. Adv in Virus Res 55:479-505）。本発明の組み換えAdベクターは、ベクターを非複製性（replication-defective）Adビリオンに取り込まれるようにするパッケージング部位と、2種類以上の目的ポリペプチド又はタンパク質、例えば、目的免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖のコード配列と、自己プロセシング切断部位を単独で、又は追加のタンパク質分解性切断部位と組み合わせて、コードする配列とを含む。感染性ビリオンへの取り込みに必要又は有用な他のエレメントとしては、5'及び3' Ad ITR、E2遺伝子、E4遺伝子部分、並びに場合によってはE3遺伝子などが挙げられる。

【0267】

組み換えAdベクターに封入された非複製性Adビリオンは、当分野で公知である標準技術によって、Adパッケージング細胞及びパッケージング技術を用いて作製される。これらの方法の例を、例えば、米国特許第5,872,005号に見出すことができる。2種類以上の目的ポリペプチド又はタンパク質のコード配列は、一般に、アデノウイルス中の除去されたウイルスゲノムE3領域に挿入される。本発明の実施に用いるのに好ましいアデノウイルスベクターは、1種類以上の野生型Ad遺伝子産物、例えば、E1a、E1b、E2、E3及びE4を発現しない。好ましい実施形態は、E1、E2A、E4及び場合によってはE3遺伝子領域の機能を補完するパッケージング細胞系と一緒に典型的には使用されるビリオンである。例えば、米国特許第5,872,005号、同5,994,106号、同6,133,028号及び同6,127,175号を参照されたい。

【0268】

したがって、本明細書では「アデノウイルス」及び「アデノウイルス粒子」とは、特段の記載がない限り、ウイルス自体又はその誘導体を指し、全血清型及び下位分類並びに天然体と組み換え体の両方を包含する。かかるアデノウイルスは、野生型でもよく、又は当分野で公知である、若しくは本明細書に開示する種々の方法で修飾されていてもよい。かかる修飾としては、感染性ウイルスを作製するために粒子中にパッケージされたアデノウイルスゲノムに対する修飾などが挙げられる。かかる修飾としては、E1a、E1b、E2a、E2b、E3又はE4コード領域の1個以上の欠失など、当分野で公知である欠失が挙げられる。例示的なパッケージング及び産生細胞は、293、A549又はHeLa細胞に由来する。アデノウイルスベクターは、当分野で公知である標準技術によって精製され、処方される。

【0269】

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、染色体を組み込むことによって細胞に潜在的に感染し得るヘルパー依存型（helper-dependent）ヒトパルボウイルスである。染色体に組み込むその能力及びその非病原性のために、AAVは、ヒト遺伝子治療ベクターとして重要な可能性を有する。本発明の実施に用いるために、rAAVビリオンは、

10

20

30

40

50

当業者に公知である標準方法によって製造することができ、転写方向に作用可能に結合した成分として、転写開始及び終結配列を含めた制御配列並びに目的コード配列を含むように構築される。より具体的には、本発明の組み換えAAVベクターは、ベクターを非複製性(replication-defective)AAVビリオンに取り込まれるようにするパッケージング部位と、2種類以上の目的ポリペプチド又はタンパク質、例えば、目的免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖のコード配列と、自己プロセッシング切断部位を単独で、又は1個以上の追加のタンパク質分解性切断部位と組み合わせ、コードする配列とを含む。本発明の実施に用いるAAVベクターは、転写方向に作用可能に結合した成分として、転写開始及び終結配列を含めた制御配列も含むように構築される。これらの成分の5'及び3'末端は、機能的AAV ITR配列に隣接する。「機能的AAV ITR配列」とは、ITR配列がAAVビリオンの救出、複製及びパッケージング用として機能することを意味する。

10

20

30

40

50

【0270】

組み換えAAVベクターは、選択された組み換えポリペプチド又はタンパク質産物の標的細胞における発現及び産生を誘導し得ることも特徴とする。したがって、この組み換えベクターは、 capsid 形成に、また、組み換えAAV(rAAV)ビリオンの感染に対する物理的構造に必須であるAAV配列の少なくとも全部を含む。したがって、発現ベクター用AAV ITRは、(例えば、Kotkin, 1994, Hum. Gene Ther. 5:793-801に記載の)野生型ヌクレオチド配列を含む必要がなく、ヌクレオチドの挿入、欠失若しくは置換によって改変することができ、又は幾つかのAAV血清型のいずれからも誘導することができる。一般に、AAVベクターは、当分野で公知であるアデノ随伴ウイルス血清型から誘導される任意のベクターであり得る。

【0271】

典型的には、AAV発現ベクターを産生細胞に導入し、続いてAAVヘルパー構築物を導入する。ヘルパー構築物は、産生細胞中で発現可能であるAAVコード領域を含み、AAVベクターにはないAAVヘルパー機能を補完する。ヘルパー構築物は、参照により本明細書に組込む米国特許第6,548,286号に記載のように、典型的には、p5に続く開始コドンをATGからACGに変異させることによって、大きいRepタンパク質(Rep78及びRep68)の発現を下方制御するように設計し得る。これに続いて、ヘルパーウイルス及び/又は追加のベクターを産生細胞に導入する。ヘルパーウイルス及び/又は追加のベクターは、効率的rAAVウイルス産生を支援し得る補助的機能を提供する。次いで、産生細胞を培養して、rAAVを産生する。これらの段階を標準方法によって実施する。本発明の組み換えAAVベクターに封入された非複製性AAVビリオンは、当分野で公知である標準技術によって、AAVパッケージング細胞及びパッケージング技術を用いて作製される。これらの方法の例を、例えば、参照によりその全体を本明細書に組込む米国特許第5,436,146号、同5,753,500号、同6,040,183号、同6,093,570号及び同6,548,286号に見出すことができる。パッケージング用の更なる組成物及び方法は、やはり参照によりその全体を本明細書に組込むWang他(米国特許出願公開第2002/0168342号)に記載されており、当業者の知識の範囲内の技術を含む。

【0272】

本発明の実施において、rAAV又は他のベクター発現ベクタービリオン(vector expression vector virion)を産生する宿主細胞としては、ほ乳動物細胞、昆虫細胞、微生物、酵母などが挙げられる。宿主細胞は、AAV(又は他の)rep及びcap遺伝子が宿主細胞中に安定に維持されたパッケージング細胞、又はAAVベクターゲノムが安定に維持され、パッケージされた産生細胞でもあり得る。例示的なパッケージング及び産生細胞は、293、A549又はHeLa細胞に由来する。AAVは、当分野で公知である標準技術によって精製され、処方される。(ベクターに応じた)追加の適切な宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、CHO-DX-B11、CHO-DG44細胞などのCHOジヒドロ葉酸還元酵素欠損変種

(例えば、Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. 77:4216-4220参照)、PerC.6細胞(Jones et al., 2003, Biotechnol. Prog. 19:163-168)、Sp/20マウス骨髄腫細胞(Coney et al., 1994, Cancer Res. 54:2448-2455)などが挙げられる。

【0273】

レトロウイルス(Retroviral)ベクター

レトロウイルスベクターも遺伝子送達用の一般的ツールである(Miller, 1992, Nature 357:455-460)。レトロウイルスベクター、より具体的にはレンチウイルスベクターを本発明の実施に使用することができる。したがって、本明細書では「レトロウイルス」又は「レトロウイルスベクター」という用語は、それぞれ「レンチウイルス」及び「レンチウイルスベクター」を含むものとする。レトロウイルスベクターが試験され、目的遺伝子を広範囲の標的細胞のゲノムに安定に導入するための適切な送達ビヒクルであることが判明した。レトロウイルスベクターは、再配列されていない単一コピー導入遺伝子を細胞中に送達することができるので、遺伝子を細胞に移送するのに適している。また、レトロウイルスは、レトロウイルスのエンベロープ糖タンパク質が宿主細胞上の特異的細胞表面受容体と結合することによって宿主細胞に入る。その結果、コードされた未変性エンベロープタンパク質が、未変性エンベロープタンパク質とは異なる細胞特異性を有する(例えば、未変性エンベロープタンパク質と比較して、異なる細胞表面受容体に結合する)異種エンベロープタンパク質で置換されたシュードタイプレトロウイルスベクターも本発明の実施に有用であり得る。1個以上の標的タンパク質コード配列をコードするレトロウイルスベクターを特定の標的細胞に送達させる能力は、本発明の実施に望ましい。

10

20

【0274】

本発明は、例えば、1個以上の導入遺伝子配列を含むレトロウイルス導入ベクター、1個以上のパッケージングエレメントを含むレトロウイルスパッケージングベクターなどのレトロウイルスベクターを提供する。特に、本発明は、シュードタイプレトロウイルス産生用の異種エンベロープタンパク質又は機能的に修飾されたエンベロープタンパク質をコードするシュードタイプレトロウイルスベクターを提供する。

【0275】

本発明のレトロウイルスベクターのコア配列は、例えば、B、C及びD型レトロウイルス並びにスピマウイルス及びレンチウイルスを含めて、多種多様なレトロウイルスから容易に誘導し得る(RNA Tumor Viruses, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985参照)。本発明の組成物及び方法に使用するのに適切なレトロウイルスの例としては、レンチウイルスが挙げられるが、これだけに限定されない。本発明の組成物及び方法に使用するのに適切な他のレトロウイルスとしては、トリ白血病ウイルス、ウシ白血病ウイルス、マウス白血病ウイルス、ミンク細胞増殖巣誘導(Mink-Cell Focus-Inducing)ウイルス、マウス肉腫ウイルス、細網内皮症ウイルス、ラウス肉腫ウイルスなどが挙げられるが、これらだけに限定されない。特に好ましいマウス白血病ウイルスとしては、4070A及び1504A(Hartley and Rowe, J. Virol. 19:19-25)、エーベルソン(ATCC No. VR-999)、フレンド(ATCC No. VR-245)、グラッフィ、グロス(ATCC No. VR-590)、キルスタイン(Kirsteni)ハーベイ肉腫ウイルス及びラウシャー(ATCC No. VR-998)、モロニーマウス白血病ウイルス(ATCC No. VR-190)などが挙げられる。かかるレトロウイルスは、American Type Culture Collection(ATCC; Manassas, VA)などの寄託所又はコレクションから容易に得ることができ、又は一般に利用可能な技術によって公知の出所から単離することができる。他のレトロウイルスは、商業的に利用可能である。

30

40

50

【0276】

本発明のレトロウイルスベクター配列は、レンチウイルスから誘導することができる。好ましいレンチウイルスは、ヒト免疫不全症ウイルス、例えば、1型又は2型（すなわち、HIV-1又はHIV-2。ここで、HIV-1は、リンパ節症関連ウイルス3（HTLV-III）及び後天性免疫不全症候群（AIDS）関連ウイルス（ARV）と以前は呼ばれていた。）、又はAIDS若しくはAIDS様疾患と結びつけられ、また、関連づけられたHIV-1若しくはHIV-2に係する別のウイルスである。他のレンチウイルスとしては、ヒツジビスナノマエディウイルス、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、ウシレンチウイルス、サル免疫不全ウイルス（SIV）、ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）、ヤギ関節炎脳炎ウイルス（CAEV）などが挙げられる。

10

【0277】

レトロウイルスの適切な属及び系統は、当分野で周知である（例えば、参照により本明細書に組込む、Fields Virology, Third Edition, edited by B.N. Fields et al. 1996. Lippincott-Raven Publishersを参照されたい。例えば、表1を含めて、Chapter 58, Retroviridae: The Viruses and Their Replication, Classification, pages 1768-1771を参照されたい。）。レトロウイルスを産生する産生細胞及び産生細胞系を生成するレトロウイルスパッケージング系、及びかかるパッケージング系を作製する方法も、当分野で公知である。

20

【0278】

典型的なパッケージング系は、少なくとも2種類のパッケージングベクター、すなわち、gag、pol、又はgagとpol遺伝子を含む第1のヌクレオチド配列を含む第1のパッケージングベクターと、異種又は機能修飾エンベロープ遺伝子を含む第2のヌクレオチド配列を含む第2のパッケージングベクターとを含む。レトロウイルスエレメントは、HIVなどのレンチウイルスから誘導することができる。ベクターは、機能的tat遺伝子及び/又は機能的アクセサリ-遺伝子(vif、vpr、vpu、vpx、nef)を欠き得る。パッケージング系は、rev遺伝子を含むヌクレオチド配列を有する第3のパッケージングベクターを更に含み得る。パッケージング系は、第1、第2及び場合によっては第3のヌクレオチド配列を含むパッケージング細胞の形で提供され得る。

30

【0279】

本発明は、種々の発現系、特に真核細胞、有利にはほ乳動物細胞を用いた発現系に適用可能である。未変性タンパク質をグリコシル化する場合には、発現系は、未変性様のグリコシル化を発現タンパク質にもたらず発現系であることが好ましい。

【0280】

レンチウイルスは、env遺伝子によってコードされるエンベロープ糖タンパク質SU(gp120)及びTM(gp41)、gag遺伝子によってコードされるCA(p24)、MA(p17)及びNC(p7-11)並びにpol遺伝子によってコードされるRT、PR及びINを含めて、幾つかの構造的なビリオンタンパク質を共有する。HIV-1及びHIV-2は、ウイルスRNAの合成及びプロセッシング並びに他の複製機能の調節に關与する、アクセサリ-タンパク質及び他のタンパク質を含む。アクセサリ-タンパク質は、vif、vpr、vpu/vpx及びnef遺伝子によってコードされ、組み換え系から除外する（又は不活性化する）ことができる。また、tat及びrevは、例えば、変異又は欠失によって、除外又は不活性化し得る。

40

【0281】

第1世代のレンチウイルスベクターパッケージング系は、gag/pol及びenvに対して別々のパッケージング構築物をもたらし、安全上の理由で、異種又は機能修飾エンベロープタンパク質を典型的には使用する。第2世代レンチウイルスベクター系においては、アクセサリ-遺伝子vif、vpr、vpu及びnefが欠失又は不活性化されている。第3世代レンチウイルスベクター系は、tat遺伝子が（例えば、変異によって）欠

50

失又は不活性化されたベクター系である。

【0282】

tatによって通常もたらされる転写調節の補償は、ヒトサイトメガロウイルス最初期(HCAAV-IE)エンハンサー/プロモーターなどの強力な構成的プロモーターを使用することによってもたらされ得る。他のプロモーター/エンハンサーは、当分野で理解されているように、構成的プロモーター活性の強度、標的組織に対する特異性(例えば、肝臓特異的プロモーター)、又は所望の発現制御に関係した他の因子に基づいて選択することができる。例えば、一部の実施形態においては、tetなどの誘導性プロモーターを用いて発現を制御することが望ましい。典型的な第3世代レンチウイルスベクター系は、4種類のプラスミド、すなわち、gag pol、rev、エンベロープ及び導入ベクター 10
に対して各々1種類を必要とするように、revをコードする遺伝子は、別々の発現構築物上に設けることができる。使用するパッケージング系の世代にかかわらず、gag及びpolを単一の構築物上又は別々の構築物上に設けることができる。

【0283】

典型的には、パッケージングベクターは、パッケージング細胞中に含まれ、移入、形質導入又は感染によって細胞に導入される。移入、形質導入又は感染方法は当業者に周知である。本発明のレトロウイルス導入ベクターは、移入、形質導入又は感染によってパッケージング細胞系に導入して、産生細胞又は細胞系を産生することができる。本発明のパッケージングベクターは、例えば、リン酸カルシウム移入、リポフェクション又は電気穿孔法を含めた標準方法によって、ヒト細胞又は細胞系に導入することができる。一部の実施 20
形態においては、パッケージングベクターをneoなどの優性選択マーカー、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)、グルタミンシンセターゼ又はADAと一緒に細胞に導入し、続いて適切な薬物の存在下で選択し、クローンを単離する。選択マーカー遺伝子は、パッケージングベクターによってコードされる遺伝子に物理的に連結し得る。

【0284】

適切なパッケージング細胞によってパッケージング機能が発現されるように構成された安定な細胞系が知られている。例えば、米国特許第5,686,279号及びOry et al. 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. 93:11400-11406を参照されたい。これらは、パッケージング細胞を記載している。安定な細胞系産生の更なる記述は、Dull et al. 1998. J. Virol. 72(11):8463-8471及びZufferey et al. 1998. J. Virol. 72:9873-9880に見出すことができる。 30

【0285】

Zufferey et al. 1997. Nat. Biotechnol. 15:871-75は、HIV-1エンベロープ遺伝子を含むpolの3'側の配列が除去されたレンチウイルスパッケージングプラスミドを教示している。構築物は、tat及びrev配列を含み、3'LTRはポリA配列で置換されている。5'LTR及びpsi配列は、誘導性プロモーターなどの別のプロモーターで置換されている。例えば、CMVプロモーター又はその誘導体を使用することができる。 40

【0286】

パッケージングベクターは、パッケージング機能に加えて、レンチウイルスタンパク質の発現を促進し、安全性を向上させる変化を含み得る。例えば、gagの上流にあるHIV配列を全部除去することができる。また、エンベロープの下流にある配列を除去することができる。さらに、RNAのスプライシング及び翻訳を促進するようにベクターを改変する段階を設けることができる。 40

【0287】

場合によっては、Dull et al. 1998. 上記に記載のパッケージング系などの条件付きの(conditional)パッケージング系を使用する。例えばZufferey et al. 1998. J. Virol. 72:9873-9880によって記述されたように、HIV-1長末端反復(LTR)を欠失させることによ 50

ってベクターのバイオセーフティを改善する自己不活型ベクター (SIN) の使用も好ましい。テトラサイクリン誘導性LTRなどを介して、誘導性ベクターを使用することもできる。

【0288】

プロモーター

本発明のベクターは、サイトメガロウイルス (CMV) 即時型プロモーター、RSV LTR、MOMLV LTR、PGKプロモーターなどの構成的プロモーター；mTTR、TK、HBV、hAAT、調節可能又は誘導性プロモーターを含めた、組織又は細胞タイプ特異的プロモーター、エンハンサーなどを含めて、ただしこれらだけに限定されない異種制御配列を典型的には含む。

10

【0289】

有用なプロモーターとしては、LSPプロモーター (Ill et al. 1997. Blood Coagul. Fibrinolysis 8S2:23-30)、EF1-アルファプロモーター (Kim et al. 1990. Gene 91(2):217-23) 及び Guo et al. 1996. Gene Ther. 3(9):802-10) などが挙げられる。最も好ましいプロモーターとしては、伸長因子1-アルファ (EF1a) プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1 (PGK) プロモーター、サイトメガロウイルス前初期遺伝子 (CMV) プロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター (LSP)、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニフトリベータアクチン (CAG) プロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター (TRE)、トランスチレチンプロモーター (TTR)、サルウイルス40 (SV40) プロモーター、CK6プロモーターなどが挙げられる。本発明の実施に有用である有利なプロモーターは、アデノウイルス主要後期プロモーターである (Berkner and Sharp. 1985. Nucl. Acids Res. 13:841-857)。アデノウイルス主要後期プロモーターを使用した、具体的に例示する発現ベクターの配列を以下に示す。これらのプロモーター及び多数の追加のプロモーターの配列は当分野で公知である。関連する配列は、公的データベースから容易に入手することができ、本発明の実施に用いるベクターに取り込むことができる。

20

【0290】

本発明の実施における特定の好ましいプロモーターは、アデノウイルス主要後期プロモーターである。発現カセットは、5' から 3' 方向に、アデノウイルス主要後期プロモーター、目的タンパク質又は目的タンパク質鎖の第1のコード配列に作動可能な3部構成リーダー配列、自己プロセシング配列又はプロテアーゼ切断配列をコードする配列、目的タンパク質又はタンパク質鎖の第2のコード配列を含むことができ、自己プロセシング配列又はプロテアーゼ切断配列をコードする配列を含んでいてもよく、続いて目的タンパク質又はタンパク質鎖の第3のコード配列を含むことができる。翻訳がポリタンパク質コード配列内で終結しないように、これらのコード配列の全部が同じ読み枠中で共有結合している。タンパク質合成中、又はポリペプチドの合成完了後に、自己プロセシング又はタンパク質分解プロセシングによって、ポリタンパク質が適切なタンパク質鎖又はタンパク質に切断される。免疫グロブリン合成の場合には、軽鎖のコード配列は、ポリタンパク質コード配列内に2回存在する。有利には、リーダー配列コード領域は、タンパク質又はタンパク質鎖配列と連結され得る。シグナルペプチダーゼによるプロセシングは、プロセシング部位の下流にあるタンパク質のN末端におけるある残留アミノ酸残基を除去する更なる利点を有し得る。免疫グロブリン重鎖成分は、Met、タンパク質開始メチオニン；HC、重鎖；LC、軽鎖、SPPC、自己プロセシング又はプロテアーゼ切断部位である。免疫グロブリン合成用発現構築物としては、以下のものなどが挙げられる：Met-プロテアーゼ-SPPC-HCリーダー配列-HC-SPPC-LCリーダー配列-LC-SPPC-LCリーダー配列-LC、Met-プロテアーゼ-SPPC-LCリーダー配列-LC-SPPC-LCリーダー配列-LC-SPPC-HCリーダー配列-HC、Met-プロテアーゼ-SPPC-LCリーダー配列-LC-SPPC-HCリーダー配列-HC

30

40

50

- S P P C - L Cリーダ配列 - L C、H Cリーダ配列 - H C - S P P C - L Cリーダ配列 - L C - S P P C - L Cリーダ配列 - L C、L Cリーダ配列 - L C - S P P C - H Cリーダ配列 - H C、M e t - プロテアーゼ - S P P C - H Cリーダ - H C - S P P C - L Cリーダ - L C。

【0291】

具体的に例示するポリタンパク質コード配列（産物 M e t - H Cリーダ - H C - 操作されたフューリン部位 - T E V切断部位 - T E V N i aプロテアーゼ - T E V切断部位 - L Cリーダ - L Cを図1に模式的に示す。この構築物の発現用発現ベクターを図2に示す。抗 T N F (D 2 E 7)は、そのH C及びL C配列に対する例示的な抗体である。L Cリーダ配列は、治療抗体の産生に不要な場合もある。S P P SはT E Vプロテアーゼ認識部位であり、T E V部位の5'側にコードされたフューリン部位がある。T E V切断後のフューリン切断によって、「正確な」C末端リジン残基を重鎖に回復させる。D 2 E 7 - T E V発現ベクターの完全なD N A配列を表1に示す。

10

【0292】

L Cのタンデム反復をコードし、2 Aプロテアーゼ配列を切断部位として用いて切断された、具体的に例示するD 2 E 7ポリタンパク質発現構築物（D 2 E 7 - L c - L C - H C）を設計した。D 2 E 7軽鎖C末端を、フューリン切断部位を付加するように修飾した。これは、（一般に）最後から2番目のアミノ酸におけるG l uからA r gへの変化、及びC末端へのリジンの付加をもたらす。2個のL C配列をH Cの5'側に配置することによって、2個のL Cコピーは同じアミノ酸配列を維持する。発現ベクターの完全ヌクレオチド配列を表6 Cに示す。ポリタンパク質のアミノ酸配列及びコード配列をそれぞれ表6 B及び6 Aに示す。配列番号29 - 31も参照されたい。模式的な発現ベクターマップを図7に示す。

20

【0293】

具体的に例示する別のポリタンパク質（及びそのコード配列）は、A B T - 0 0 7 - T E Vのものである。それぞれ表2 B及び2 Aを参照されたい。配列番号33及び32を参照されたい。この組み換え抗体は、エリスロポイエチン受容体（E p o R）に特異的に結合する。操作されたA B T - 0 0 7 - T E Vポリタンパク質をコードする発現ベクターの完全配列を表2 Cに示す（配列番号35。配列番号34も参照されたい。ベクターの略図を図3に示す。

30

【0294】

具体的に例示する追加のポリタンパク質及びそのコード配列は、A B T - 8 7 4 - T E Vのものである。それぞれ表3 B及び3 Aを参照されたい。この抗体は、インターロイキン12に特異的に結合する。発現ベクターの略図を図4に示す。配列番号35 - 37も参照されたい。

【0295】

具体的に例示する更に別のポリタンパク質（及びそのコード配列）はE L 2 4 6 - G G - T E Vのものである。表4 B及び4 Aを参照されたい。その中でコードされる抗体は、E / Lセレクトインに特異的に結合する。発現ベクターを図5に模式的に示す。配列番号38 - 40も参照されたい。

40

【0296】

A B T - 3 2 5 - T E Vは、インターロイキン18に対する結合特異性を有する、操作された抗体である。ポリタンパク質のコード配列及びアミノ酸配列をそれぞれ表5 A及び5 Bに示す。完全な発現ベクター配列を表5 Cに示す。その合成用の発現ベクターを図6に示す。配列番号41 - 43も参照されたい。

【0297】

核局在化シグナル（N L S）を除去したT E Vプロテアーゼも提供する（T E V N L S -）。T E V又はT E V（N L S -）プロテアーゼは、分離したベクター又は分離した転写物の一部として細胞中で過渡的に、又は安定に発現させることもできる。T E V（N

50

LS -) タンパク質は、ERアンカー配列を含めることによって、又は小さなリボソーム結合タンパク質と融合させることによって、以前のNLS部分において、それぞれER又はリボソームに固定され得る。

【0298】

本願は、合成中の、又は合成後の細胞における、前駆体タンパク質及びポリタンパク質のタンパク質分解性切断の考察を含むが、ポリタンパク質及び前駆体タンパク質（プロタンパク質）は、これらのタンパク質の収集後に適切なプロテアーゼを用いてインビトロで実施できると理解される。

【0299】

本発明の範囲内で、特定の発現された抗体（免疫グロブリン）としては、とりわけ、腫瘍よう壊死因子に特異的に結合する抗体（HUMIRA / D2E7（Abbott Biotechnology Ltd.、Hamilton、Bermudaのアダリムマブの商標）に対応する、及び / 又は由来する、操作された抗体）、インターロイキン12（ABT - 874に由来する、操作された抗体）、インターロイキン18（ABT - 325に由来する、操作された抗体）、組み換えエリスロポイエチン受容体（ABT - 007に由来する、操作された抗体）、インターロイキン18（ABT - 325に由来する、操作された抗体）、E / Lセレクチン（EL246 - GGに由来する、操作された抗体）などが挙げられる。操作されたポリタンパク質のコード配列及びアミノ酸配列を表1 - 5に示す。本発明に適切である更なる抗体としては、例えば、Remicade（インフリキシマブ）、Rituxan / Mabthera（リツキシマブ）、Herceptin（トラスツマブ）、Avastin（ベバシズマブ）、Synagis（パリビズマブ）、Erbix（セツキシマブ）、Reopro（アブシキシマブ）、Orthoclone OKT3（ムロモナブ - CD3）、Zenapax（ダクリズマブ）、Simlect（バシリキシマブ）、Mylotarg（ゲムツズマブ）、Campath（アテムツズマブ）、Zevalin（イブリツモマブ）、Xolair（オマリズマブ）、Bexxar（トシツモマブ）及びRaptiva（エファリツマブ）が挙げられる。ここで、一般に、商標 - 商品名の後に括弧内のそれぞれの一般名が続く。追加の適切なタンパク質としては、例えば、エポエチンアルファ、エポエチンベータ、エタネルセプト、ダーベポエチンアルファ、フィルグラスチム、インターフェロンベータ1a、インターフェロンベータ1b、インターフェロンアルファ - 2b、インスリングルルギン、ソマトロピン、テリパラタイド、ホリトロピンアルファ、ドルナーゼ、第VII因子、第VII因子、第IX因子、イミグルセラゼ、ネシリチド、レノグラスチム及びフォンウィルブランド因子の1種類以上が挙げられる。ここで、1個以上の一般名称は、製品の1個以上の商標 - 商品名に各々対応し得る。他の抗体及びタンパク質は、当分野で理解されているように、本発明に適切である。

【0300】

本発明は、目的とする2種類以上のポリペプチド、タンパク質又はプロタンパク質のコード配列の制御された発現も企図する。遺伝子調節系は、特定の遺伝子の調節された発現に有用である。例示的一手法においては、遺伝子調節系又はスイッチは、リガンド結合ドメイン、転写活性化ドメイン及びDNA結合ドメインを有するキメラ転写因子を含む。これらのドメインは、実質的に任意の出所から得ることができ、新規タンパク質を得るための幾つかの方法のいずれにおいても組み合わせることができる。調節可能な遺伝子系は、キメラ転写因子と相互作用するDNA応答エレメントも含む。この転写調節エレメントは、調節すべき遺伝子に隣接する。

【0301】

本発明の実施に使用することができる例示的転写調節系としては、例えば、ショウジョウバエエクジソン系（Yao et al. 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. 93:3346）、カイコエクジソン系（Suhr et al. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. 95:7999）、RU486を誘導物質として使用するGene Switch（Valentis、The

10

20

30

40

50

Woodlands、TXの商標)合成プロゲステロン受容体系(Osterwalder et al. 2001. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(22):12596-601);テトラサイクリン(Tc)又は類似体、例えばドキシサイクリンなどの小分子を使用して標的の転写を調節(オン又はオフ)する、Tet及びRevTet Systems(テトラサイクリンによって調節される発現系、BD Biosciences Clontech、Mountain View、CAの商標)(Knott et al. 2002. Biotechniques 32(4):796、798、800);各々が転写活性化因子又はDNA結合タンパク質と連結された2種類の細胞内分子と一緒に運ぶ小分子の使用に基づく、ARIAD Regulation Technology(Ariad、Cambridge、MA)が挙げられる。これらの成分が一緒になると、目的遺伝子の転写が活性化される。Ariadは、ホモ2量体化に基づく系、及びヘテロ2量体化に基づく系を有する(Rivera et al. 1996. Nature Med. 2(9):1028-1032; Ye et al. 2000. Science 283:88-91)。

10

【0302】

自己プロセッシング又はプロテアーゼによって切断された組み換えポリペプチドの形の抗体若しくはその断片、他の異種タンパク質又はプロタンパク質をコードする核酸配列を含む本発明の発現ベクター構築物は、外来、治療又は導入遺伝子を細胞、例えば、体細胞に送達するために、又はベクターによって形質導入された細胞による組み換えポリペプチドの産生において、インビトロで、生体外で、又は生体内で細胞に導入することができる。

20

【0303】

宿主細胞及びベクターの送達

本発明のベクター構築物は、当分野で公知である標準方法によって、インビトロで、又は生体外で、適切な細胞に導入することができる。かかる技術としては、例えば、リン酸カルシウムを用いた移入、培養細胞への微量注入(Capecchi. 1980. Cell 22:479-488)、電気穿孔法(Shigekawa et al. 1988. BioTechnology 6:742-751)、リボソームによって媒介される遺伝子移入(Mannino et al. 1988. BioTechnology 6:682-690)、脂質によって媒介される形質導入(Feigner et al. 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417)、及び高速微粒子銃を用いた核酸送達(Klein et al. 1987. Nature 327:70-73)が挙げられる。

30

【0304】

インビトロ又は生体外で発現させるために、機能的タンパク質産物の発現に有効な任意の細胞を使用することができる。タンパク質発現に用いられる細胞及び細胞系の多数の例が当分野で知られている。例えば、原核細胞及び昆虫細胞を発現に使用することができる。また、酵母などの真核微生物も使用することができる。原核生物系、昆虫系及び酵母系における組み換えタンパク質の発現は、当分野で一般に公知であり、本発明の組成物及び方法を用いて、抗体又は他のタンパク質の発現に適合させることができる。

40

【0305】

発現に有用である細胞の例としては、線維芽細胞などのほ乳動物細胞、ヒツジ、ブタ、ネズミ、ウシの各細胞などの非ヒトほ乳動物由来の細胞、昆虫細胞などが更に挙げられる。ほ乳動物細胞の具体例としては、COS細胞、VERO細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、CHO DX B11細胞、CHO DG44細胞、PerC.6細胞、Sp2/0細胞、293細胞、NSO細胞、3T3線維芽細胞、W138細胞、BHK細胞、HEPG2細胞及びMDCK細胞が挙げられるが、これらだけに限定されない。

【0306】

宿主細胞は、プロモーターを誘導するために、形質転換体を選択するために、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために、適宜改変された、従来の栄養培地中で培養

50

される。ほ乳動物宿主細胞は、種々の培地中で培養することができる。ハムF10 (Sigma)、最小必須培地 (MEM)、Sigma)、RPMI 1640 (Sigma)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、Sigma)などの市販培地は、典型的には宿主細胞の培養に適切である。所与の培地は、一般に、(インスリン、トランスフェリン、上皮成長因子などの)ホルモン及び/又は他の成長因子、(塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、リン酸塩などの)塩、(HEPESなどの)緩衝剤、(アデノシン、チミジンなどの)ヌクレオシド、抗生物質、微量元素並びにグルコース又は等価なエネルギー源が必要に応じて補充されている。任意の他の必要な補助剤も、当業者に周知のように、適切な濃度で含めることができる。温度、pHなどの特定の細胞系に適切な培養条件は、当分野で一般に公知である。多数の細胞系の培養に対する培養条件は、例えば、(インターネット上で「atcc.org/SearchCatalogs/AllCollections.cfm」から利用可能なATCCカタログにおいて、又は供給業者によって指示されるように、示唆される。

10

20

30

40

50

【0307】

発現ベクターは、種々の経路(例えば、皮内、静脈内、腫瘍内、脳中に、門脈内、腹腔内、筋肉内、膀胱中になど)によって、インビボで投与して、自己プロセッシング切断配列を介して接続された複数の遺伝子を送達して、動物モデル又はヒト対象において2種類以上のタンパク質又はポリペプチドを発現させ得る。投与経路に応じて、治療タンパク質は、その効果を局所的(脳又は膀胱中)又は全身的(他の投与経路)に引き出す。オープンリーディングフレームの5'側にある組織特異的プロモーターを使用すると、オープンリーディングフレーム全体によってコードされるタンパク質又はポリペプチドの組織特異的発現をもたらされる。

【0308】

導入遺伝子を保有する組み換え発現ベクターを標的細胞にインビトロで、生体外で、又はインビボで導入する種々の方法が既に記述されており、当分野で周知である。本発明は、2種類以上の目的タンパク質又はポリペプチドのコード配列を含む組み換えベクターに標的細胞を感染させ、標的細胞中でタンパク質又はポリペプチドを発現させることによる、治療方法、ワクチン及び癌療法を提供する。

【0309】

例えば、本発明の組み換えベクターのインビボでの送達は、脳、肝臓、血管、筋肉、心臓、肺及び皮膚を含めて、ただしこれらだけに限定されない多種多様な器官タイプを標的とすることができる。

【0310】

生体外の遺伝子移入の場合には、標的細胞を宿主から取り出し、本発明の組み換えベクター及び当分野で周知の方法を用いて実験室で遺伝子改変する。

【0311】

本発明の組み換えベクターは、上記方法を含めて、ただしこれらだけに限定されない従来の投与方法によって投与することができる。本発明の組み換えベクターは、溶液及び懸濁液、微小胞、リポソーム並びに注射用又は注入用溶液を含めて、ただしこれらだけに限定されない種々の処方とすることができる。好ましい形式は、投与方法及び治療用途に応じて決まる。

【0312】

免疫グロブリン又は他の生物活性タンパク質のインビボでの産生における本発明の組み換え発現ベクター構築物の利点は、患者における単一のベクターの長期投与及び持続性の抗体発現、十分な生物活性を有する抗体又はその断片(又は他の生物活性タンパク質)のインビボでの発現、並びにヒト細胞において産生される抗体の自然な翻訳後修飾を含む。望ましくは、発現されたタンパク質は、免疫応答が誘発されないように、天然タンパク質と同一、又は十分に同一である。発現されたタンパク質は、前記タンパク質を必要とする患者において、複数の機会に投与され、又は連続して発現される。

【0313】

本発明の組み換えベクター構築物は、療法又は研究に用いられる組み換え抗体及び他の生物活性タンパク質のインビトロでの産生にも有用である。組み換えタンパク質産生方法は、当分野で周知であり、本明細書に記載の自己プロセッシング切断部位又は他のプロテアーゼ切断部位を含むベクター構築物を用いた組み換え抗体の発現に利用することができる。

【0314】

一態様においては、本発明は、上記のものなどの発現ベクターを細胞に導入して、移入された細胞を得ることによって、組み換え免疫グロブリン又はその断片を製造する方法を提供する。この発現ベクターは、5'から3'方向に、免疫グロブリン重鎖及び2本の軽鎖又はその断片のコード配列に作動可能に結合したプロモーター、前記鎖の各々の間の2A若しくは2A様配列又はプロテアーゼ切断部位などの自己プロセッシング配列を含む。免疫グロブリン重鎖のコード配列、又は免疫グロブリン軽鎖のコード配列は、所与のベクター構築物において2A配列の5'側(すなわち、第1)にあり得ると理解される。或いは、プロテアーゼ切断部位と同起源であるプロテアーゼを、ポリタンパク質の残部から自己プロセッシングを受け、又は別個の(又は同じ)プロテアーゼによってタンパク質分解切断されるように、ポリタンパク質の一部として発現させることができる。(二重又は三重ハイブリッド系から得られたタンパク質など)他の多連鎖タンパク質又は他のタンパク質は、やはり正確な大きさの自己プロセッシング部位又はプロテアーゼ認識部位が挿入された関連コード配列を置換することによって、プロセッシングを受けた活性型で発現され得る。別々のタンパク質が産生される。

10

20

【0315】

二重(及び他の)ハイブリッド系手法を用いて、タンパク質複合体の公知(know)リガンド又はサブユニットに対するまだ認知されていない結合相手について、cDNAライブラリーをスクリーニングした。この系の適切な変形物を用いて、公知複合体において結合を阻害する、結合と競合する、又は結合を乱す、タンパク質又はサブユニットを特定することもできる。二重(及び他の)ハイブリッド系は、種々の科学研究に適用されてきたが、これらのシステムは、偽陽性又は偽陰性の結果の重要性頻度(significance frequency)のために不十分であり得る。これらの偽シグナルは、少なくとも一部の例では、結合相手タンパク質候補又は分裂(disrupter)タンパク質候補に対する「ベイト」タンパク質の相対発現の不均衡に起因した。本発明の戦略の更なる利点は、わずか1種類のプラスミドが宿主細胞に移入され、又は転換され、バイナリーベクター二重ハイブリッドスキームにおける2つの選択ではなく、単一の選択のみがこのプラスミドに必要である点である。この手法は、三重ハイブリッド系にも適用することができる。二重ハイブリッド系の考察については、Toby and Golemis, 2001, Methods 24:201-217; Vidal and Legrain, 1999, Nucl. Acids Res. 27:919-929; Drees, B., 1999, Curr. Op. Chem. Biol. 3:64-70及びFields and Song, 1989, Nature 340:245-246を参照されたい。図9は、ベイト及びプレイタンパク質(又はプレイタンパク質候補)に対するポリタンパク質/自己プロセッシング又はプロテアーゼ切断発現戦略の略図である。図8は、この手法を用いたベイト及びプレイタンパク質産生用の発現カセットを含むベクターを示す。ベクター発現カセットは、2Aペプチドの翻訳後に自己プロセッシングを受ける、GAL4::ベイト::2Aペプチド融合物としてベイトタンパク質を最初に翻訳するように構成されている。第2のオープンリーディングフレーム(ORF)は、NFカッパB::ライブラリー融合タンパク質である。ベイトタンパク質をMCS1中に操作するには、2A自己プロセッシングペプチド配列中にインフレームで翻訳する必要がある。下流MCS2における発現ライブラリーの操作は、さほど重要ではない。

30

40

【0316】

本明細書の戦略は、タンパク質分解性切断によって成熟活性型にプロセッシングを受ける

50

プロ体 (pro-form) として発現されるタンパク質の発現に同様に適合させることができ、したがって組み換え発現のための組成物及び方法をもたらす。かかるタンパク質の例としては、とりわけ、インターロイキン1及び18 (IL-1及びIL-18) インスリンが挙げられるが、これらだけに限定されない。IL-1及びIL-18は、炎症細胞の細胞質において産生される。これらの分子は、伝統的分泌シグナルを欠き、生物活性型として分泌されるためにはプロテアーゼによって切断されなければならない。IL-1は、インターロイキン変換酵素 (ICE) によって成熟型にプロセシングされる。プロIL-18は、カスパーゼによって成熟IL-18に転化される。これらの組み換え型分子の産生は困難である。というのは、宿主として頻繁に使用される細胞は、これらのタンパク質の生物活性成熟型を産生するのに必要なプロテアーゼを発現しないからである。プロドメインのないこれらのサイトカインの発現は、不活性分子及び/又は低レベルの産生をもたらす。本発明は、潜在的に有毒なプロテアーゼを目的タンパク質と同時に発現させる必要なしに、操作された自己プロセシング部位 (例えば、2A配列)、又はプロドメインと成熟ポリペプチドのアミノ酸との間に挿入されたプロテアーゼ切断部位を含む一次翻訳産物を提供する。

10

20

30

40

50

【0317】

関係する態様においては、本発明は、上記のものなどの発現ベクターを細胞に導入することによって、組み換え免疫グロブリン又はその断片を製造する方法を提供する。この発現ベクターは、第1と第2の各免疫グロブリンコード配列の間に追加のタンパク質分解性切断部位を更に含む。好ましい追加のタンパク質分解性切断部位は、コンセンサス配列 R X K / R - R (配列番号1) を有するフーリン切断部位である。考察については、米国特許出願公開第2005/0003482号A1を参照されたい。

【0318】

本発明の例示的一態様においては、細胞へのベクターの導入又は投与の後に、以下の段階の1つ以上が続く：移入された細胞を、細胞を選択し、ポリタンパク質又はプロタンパク質を発現させる条件下で、培養する段階と、免疫グロブリン若しくはその断片又は他のタンパク質の発現を測定する段階と、免疫グロブリン若しくはその断片又は他のタンパク質を収集する段階。

【0319】

本発明の別の態様は、目的とする組み換え免疫グロブリン若しくはその断片又は他のタンパク質を発現させるための細胞を提供する。この細胞は、2本以上の免疫グロブリン鎖若しくはその断片又は他のプロタンパク質若しくはタンパク質の発現のための発現ベクター、免疫グロブリン又は他の鎖又はその断片の第1のコード配列に作動可能に結合したプロモーター、自己プロセシング配列又は2A若しくは2A様配列、プロテアーゼ認識部位などの他の切断コード配列、及び免疫グロブリン又は他の鎖又はその断片の第2のコード配列を含む。自己プロセシング切断配列又はプロテアーゼ認識部位コード配列は、第1と第2の各コード配列の間に挿入されている。関係する一態様においては、細胞は、上記発現ベクターを含み、この発現ベクターは、第1と第2の各免疫グロブリンの間の追加のタンパク質分解性切断部位又は他の目的コード配列を更に含む。好ましい追加のタンパク質分解性切断部位は、コンセンサス配列 R X R / K - R (配列番号1) を有するフーリン切断部位である。

【0320】

本明細書では「免疫グロブリン分子又はその断片の第1の鎖のコード配列」とは、抗体又は免疫グロブリンの軽鎖又は重鎖、又はその断片を含めて、ただしこれらだけに限定されないタンパク質分子をコードする核酸配列を指す。

【0321】

本明細書では「免疫グロブリン分子又はその断片の第2の鎖のコード配列」とは、抗体又は免疫グロブリンの軽鎖又は重鎖、又はその断片を含めて、ただしこれらだけに限定されないタンパク質分子をコードする核酸配列を指す。本発明の一態様においては、重鎖コード配列の1コピー当たり免疫グロブリン軽鎖コード配列が2コピー存在するときに、改

善された発現が結果として生ずると理解される。

【0322】

抗体又は免疫グロブリン又はその断片に対して第1又は第2の鎖をコードする配列としては、IgG、IgM、IgD、IgE又はIgAに由来する重鎖又はその断片などが挙げられる。概して、抗体又は免疫グロブリン又はその断片に対して鎖をコードする配列としては、IgG、IgM、IgD、IgE又はIgAに由来する軽鎖又はその断片も挙げられる。抗体分子全体の遺伝子並びにその修飾型又は誘導型としては、例えば、Fab、単鎖Fv(scFv)及びF(ab')₂のような他の抗原認識分子断片が挙げられる。抗体及び断片は、動物由来であり、ヒト-マウスキメラであり、ヒト化であり、Deimmunisation(商標)(Biovation Ltd)によって改変され、Fc受容体に対する親和性を変えるように改変され、又は完全なヒトであり得る。抗体又は他の組み換えタンパク質は、それが投与されるヒト又は動物において免疫応答を誘発しないことが望ましい。

10

【0323】

抗体は、二重特異性であり得る。抗体としては、二抗体(diantibodies)、クアドローマ、ミニ抗体、ScBs抗体、knobs-into-holes抗体などが挙げられるが、これらだけに限定されない。

【0324】

抗体自体の産生及び回収は、当分野で周知である種々の方法によって実施することができる(Harlow et al., 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory)。他の目的タンパク質は、当分野で周知の方法に従って、収集及び/又は精製及び/又は使用される。

20

【0325】

本発明の実施においては、組み換えDNA技術を用いた抗体又はその変種(類似体)の製造は、宿主細胞の増殖、及びコード配列の発現に適切な培養条件下で修飾組み換え宿主細胞を培養することによって実施することができる。発現の成功をモニターするために、抗原に対する抗体レベルをELISA、RIAなどの標準技術によってモニターすることができる。抗体は、当分野で公知である標準技術によって培養上清から回収される。これらの抗体の精製体は、言うまでもなく、プロテインA、プロテインG又はプロテインLカラムを用いて、又は特定の抗原に対する、さらには特異性が望まれる抗原の特定のエピトープに対する、アフィニティークロマトグラフィーを含めて、ただしこれらだけに限定されない標準精製技術によって容易に調製することができる。抗体は、硫酸アンモニア(ammonia sulfate)沈殿、サイズ限定(size-limited)膜ろ過などの他の技術と併せて、イオン交換カラム、サイズ排除カラムなどの従来クロマトグラフィーによって精製することもできる。発現系がシグナルペプチドを含むように設計された場合、生成した抗体は、培地又は上清中に分泌される。しかし、細胞内での産生も可能である。

30

【0326】

ヒトIg部位(loci)を用いて操作されたマウス由来の抗原特異的完全ヒトモノクローナル抗体の製造及び選択は、既に記述されている(Jakobovits et al., 1998, Advanced Drug Delivery Reviews 31:33-42; Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15:146-156; Jakobovits et al., 1995, Curr Opin Biotechnol 6:561-566; Green et al., 1994, Nature Genetics Vol.7:13-21)。

40

【0327】

治療用モノクローナル抗体の高レベル発現がトランスジェニックヤギの乳中で得られ、抗原結合レベルが、従来細胞培養技術を用いて製造されたモノクローナル抗体の抗原結

50

合レベルと同じであることが判明した。この方法は、ヒト治療タンパク質をその乳中で発現させることを可能にする遺伝情報を保有したトランスジェニック動物の乳中でのヒト治療タンパク質の発現に基づく。これらの組み換えタンパク質は、産生された後、標準技術によって乳から効率的に精製することができる。例えば、Pollack et al. 1999. J. Immunol. Meth. 231:147-157及びYoung et al. 1998. Res Immunol. 149(6):609-610を参照されたい。トランスジェニック動物由来の動物乳、卵白、血液、尿、精しょう及びカイコの繭は、組み換えタンパク質の工業規模での製造のための源として可能性があることが示された(Houdebine L M. 2002. Curr Opin Biotechnol 13:625-629; Little et al. 2000. Immunol Today, 21(8):364-70及びGura T. 2002. Nature, 417:584-5860。本発明は、本発明の自己プロセッシング切断部位をコードするベクター及び/又はプロテアーゼ認識部位ベクターを用いた、組み換え抗体又は変種(類似体)又はその目的とする他のタンパク質の発現のためのトランスジェニック動物発現系の使用を企図する。

【0328】

アグロバクテリウム(Agrobacterium)感染、遺伝子銃形質転換、プロトプラスト形質転換などによって形質転換された、ジャガイモ、トマト、タバコ、コムギ及び他の植物を含めて、ただしこれらだけに限定されない植物における組み換えタンパク質の製造も、首尾よく実証された。トランスジェニックタバコの種子中での組み換えヒトGM-CSF発現、及び植物における単鎖抗体を含めた抗体の発現が示された。例えば、Streafield and Howard. 2003. Int. J. Parasitol. 33:479-93; Schillberg et al. 2003. Cell Mol Life Sci. 60:433A5; Pogue et al. 2002. Annu. Rev. Phytopathol. 40:45-74及びMcCormick et al. 2003. J Immunologic al Methods, 278:95-104を参照されたい。本発明は、本発明のプロテアーゼ切断部位又は自己プロセッシング切断部位をコードするベクターを用いた、目的とする組み換え免疫グロブリン若しくはその断片又は他のタンパク質の発現のためのトランスジェニック植物発現系の使用を企図する。

【0329】

昆虫細胞と併せたバキュロウイルスベクター発現系も、組み換えタンパク質製造用の実行可能なプラットフォームとして普及しつつある。バキュロウイルスベクター発現系は、ほ乳動物細胞培養に比べて、培養の容易さ、高い発現レベルなどの利点をもたらすと報告されている。例えば、Ghosh et al. 2002. Mol Ther. 6:5-11及びIkonomou et al. 2003. Appl Microbiol Biotechnol. 62:1-20を参照されたい。本発明は、本発明の自己プロセッシング切断部位をコードするベクターを用いた、組み換え免疫グロブリン又はその断片の発現用のバキュロウイルスベクター発現系の使用を更に企図する。バキュロウイルスベクター及び適切な宿主細胞は、当分野で周知であり、市販されている。

【0330】

酵母系も、本発明の自己プロセッシング切断部位をコードするベクターを用いて、二重又は三重ハイブリッド系を含めて、目的とする組み換え免疫グロブリン若しくはその断片又は他のタンパク質の発現に使用することができる。例えば、参照により本明細書に組込む、米国特許第5,643,745号を参照されたい。

【0331】

自己プロセッシングペプチドのコード配列を単独で、又はタンパク質分解性切断部位の追加のコード配列と組み合わせる含む、本発明の発現カセット及びベクター及び組み換え宿主細胞は、任意のタンパク質発現系において、二重及び三重ハイブリッド系の組み換え免疫グロブリン又はその断片、プロタンパク質、生物活性タンパク質及びタンパク質成分の

発現に有用であると理解される。その幾つかは、当分野で公知であり、その例は本明細書に記載されている。当業者は、本発明のベクターを任意のタンパク質発現系用に容易に適合させることができる。

【0332】

化合物、構築物又は組成物を特許請求するときには、本明細書に開示する参考文献に教示されているものを含めて、当分野で公知である化合物、構築物及び組成物は含まれないことを理解すべきである。マーカッシュ群又は他の群を本明細書において使用するときには、群の個々のメンバー全部、並びに群内から可能である、全部の組合せ及び部分組合せ (s u b c o m b i n a t i o n) が開示に個々に含まれるものとする。

【実施例1】

【0333】

インテインによって媒介されたプロセッシングによる免疫グロブリンの発現
抗体分子の効率的発現戦略は、インテインが重鎖と軽鎖の間に位置し、成分タンパク質がN末端とC末端の各タンパク質の連結なしに遊離されるように、インテイン配列及び/又は接合部配列が修飾された、ポリタンパク質発現による。かかる構築物内では、機能的切断配列がポリタンパク質内の各免疫グロブリン由来のタンパク質の分離を促進するように設けられている限り、関連する重鎖及び軽鎖の各々の1コピーが存在し得、又は軽鎖は二重であり得、又は重鎖と軽鎖の両方の複数のコピーがあり得る。インテイン戦略は1回を超えて使用することができ、又は異なるタンパク質分解プロセッシング配列又は酵素は、免疫グロブリン由来のタンパク質の少なくとも一方の末端に位置し得る。

【0334】

パイロコッカス ホリコシイ由来のインテインは、上で手短かに述べたように、構築物に取り込まれ、正確にプロセッシングを受けた、十分に機能的であるD2E7抗体を首尾よく産生することが示された。試験した追加のインテインは、サッカロミセス セレビスエ及びシネコシス種 S t r a i n P C C 6 8 0 3 由来のものであり、分泌抗体を産生することがE L I S Aによって示された。

【0335】

パイロコッカス ホリコシイ P h o P o l I インテインのPCR増幅及びサブクローニング：

ゲノムDNAをテンプレートとして用い、P l a t i n u m T a q H i F i d e l i t y DNA Polymerase Supermix (Invitrogen、Carlsbad、CA)を用いて、以下のオリゴヌクレオチドをp.ホリコシイ P h o P o l I インテイン (N C B I / タンパク質アクセッション# O 5 9 6 1 0、DNAポリメラーゼI DNA配列全体のGenBankアクセッション#は、P.ホリコシイのゲノム配列全体から取られた、B A 0 0 0 0 0 1 . 2 : 1 6 8 6 3 6 1 . . 1 6 9 0 0 6 8である。)の増幅に使用した。ゲノムDNAをATCCから購入した。

P.ホリコシイ i n t - 5 ' .

【0336】

【化1】

P.ホリコシイ int-5' AGCATTTTACCAGATGAATGGCTCCC (配列番号52)

P.ホリコシイ int-3' AACGAGGAAGTTCTCATTATCCTCAAC (配列番号53)

【0337】

PCRを以下のプログラムによって実施した。

【0338】

10

20

30

40

【表 2】

段階	1	2	3	4	5	6	7	8
温度	94℃	94℃	55℃	72℃	段階2 に戻る (34 回)	72℃	4℃	終了
時間	2分間	1分間	1分間	2分間		5分間	保持	

【0339】

PCR産物をpCR2.1-TOPO (Invitrogen) にサブクローニングし、挿入断片の配列を決定し、正確であることを確認した。この時点で、プリントアウトエラーのために、インテインの3'末端から欠損した配列のあることがわかった。次いで、それに続くPCR反応中に欠損配列を埋めて、インテインをD2E7の重鎖及び軽鎖に連結した。

【0340】

D2E7重鎖-インテイン-D2E7軽鎖の融合物を作製するために、オリゴヌクレオチドプライマーを設計した。PCR産物をそれに続くPCR反応においてプライマーとして使用することができるようにプライマーを設計した。

【0341】

【表 3】

項目	配列	配列番号
HC-インテイン-5'	AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA- AGCATTTTACCAGATGAATG	54
改訂 LC- インテイン-3'	<u>GGGCGGGCACGCGCATGTCCAT-</u> <u>GTTGTGTGCGTAAAGTAGTC</u>	55
HC- インテイン(1aa)-5'	AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA-<u>AAC-</u> AGCATTTTACCAGATGAATG	56
改訂 LC- インテイン(1aa)- 3'	<u>GGGCGGGCACGCGCATGTCCAT-<u>ACT-</u></u> <u>GTTGTGTGCGTAAAGTAGTC</u>	57
HC- インテイン(3aa)- 5'	AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA-<u>TTAGCAAAC-</u> AGCATTTTACCAGATGAATG	58
改訂 LC- インテイン(3aa)- 3'	<u>GGGCGGGCACGCGCATGTCCAT-<u>GTAATAACT-</u></u> <u>GTTGTGTGCGTAAAGTAGTC</u>	59
HC-SrfI-5'	<u>TGCCCGGGCGCCACC-</u> <u>ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGG</u>	60
LC-BamHI- 3'	<u>TGGATCC-CCGCGGCCGCTCA-</u> <u>ACACTCTCCCTGTTGAAGCTC</u>	61

成分を説明するための配列用コード：

重鎖配列 (太字の赤色) - 軽鎖配列 (下線) - P. ホリコシイインテイン配列 (普通の Arial) - P. ホリコシイエクステイン配列 (太字の下線を引いた青色) SrfI 認識配列 G C C C G G G C (二重下線) 緑色

10

20

30

40

50

BamHI 認識配列 GGATCC (紫色の破線の下線)

終止コドン、TCA (Times New Roman、オリーブ)

コザック

【0342】

D2E7重鎖 - インテイン - D2E7軽鎖融合物のPCR増幅及び組立て：上で產生されたPCR2.1-TOPO-p.ホリコシインテインクロンをテンプレートとして用い、プライマーP.ホリコシint-5'及び改訂P.hori-3'を用いて、PCRを実施して適切な3'末端をインテインに回復させた。使用したポリメラーゼは、Platinum Taqを用いて起こるAテーリングを回避するためにPfuI DNAポリメラーゼであった。

10

【0343】

PCRを以下のプログラムによって実施した。

【0344】

【表4】

段階	1	2	3	4	5	6	7	8
温度	94℃	94℃	55℃	72℃	段階2 に戻る (34 回)	72℃	4℃	終了
時間	2分間	1分間	1分間	2分間		5分間	保持	

20

【0345】

PCR増幅産物をQiaquick Gel Extractionキット(Qiagen、Valencia、CA)によってゲル精製した。この産物を次の反応セットにおいてテンプレートとして用いた。

【0346】

3セットのPCR反応を実施して、インテインコード配列の5'及び3'側に異なる数のエクステイン残基を含むインテインコード配列を作製した。エクステインコドンは、このインテインが天然にその一部であるP.ホリコシ中の未変性DNAポリメラーゼ遺伝子に由来する。プライマーを以下のように使用した：セット1は、0個のエクステイン配列を導入し(HC-インテイン-5'及び改訂LC-インテイン-3')、セット2は1個のアミノ酸(3塩基対)をインテインの両末端に導入し(HC-インテイン(1aa)-5'及び改訂LC-インテイン(1aa)-3')、セット3は、3個のアミノ酸(9塩基対)をインテインの両末端に導入する(HC-インテイン(3aa)-5'及び改訂LC-インテイン(3aa)-3')。

30

【0347】

PCRプログラムは上記と同じであった。PCR産物をQiaquick Gel Extractionキット(Qiagen)によってゲル精製した。これらの産物を次の反応セットにおいてプライマーとして用いた。

40

【0348】

3セットのPCR反応を実施して、間に0、1又は3個のエクステインアミノ酸を有する、D2E7重鎖とインテインの融合物を作製した。反応のテンプレートはD2E7重鎖DNAである。上記PCR産物をそれぞれ3'プライマーとして用い、HC-SrfI-5'を全反応における5'プライマーとして用いた。PfuI DNAポリメラーゼを使用した。

【0349】

PCRを以下のプログラムによって実施した。

【0350】

【表5】

段階	1	2	3	4	5	6	7	8
温度	94℃	94℃	55℃	72℃	段階2 に戻る (39 回)	72℃	4℃	終了
時間	2分間	1分間	1分間	2分間		5分間	保持	

【0351】

10

PCR産物をQiaquick Gel Extractionキット(Qiagen)によってゲル精製した。この生成物を次の反応セットにおいてプライマーとして用いた。

【0352】

3セットのPCR反応を実施して、間に0、1又は3個のエクステインアミノ酸を有する、D2E7重鎖-インテインとD2E7軽鎖の融合物を作製した。反応のテンプレートはD2E7軽鎖DNAである。直前に記載のPCR産物をそれぞれ5'プライマーとして用い、LC-BamHI-3'を全反応における3'プライマーとして用いた。PfuI DNAポリメラーゼを使用した。

【0353】

20

PCRを以下のプログラムによって実施した。

【0354】

【表6】

段階	1	2	3	4	5	6	7	8
温度	94℃	94℃	55℃	72℃	段階2 に戻る (39 回)	72℃	4℃	終了
時間	2分間	1分間	1分間	2分間		5分間	保持	

30

【0355】

産生されたPCR産物は、ゲル上で泳動させると、拡散して、まばらになった。これらの反応物(reaction)をPCRの最終回にテンプレートとして直接使用した。HC-SrfI-5'及びLC-BamHI-3'をプライマーとして用いた。PfuI DNAポリメラーゼを使用した。上記と同じPCRプログラムを使用した。PCR産物をQiaquick Gel Extractionキット(Qiagen)によってゲル精製した。

【0356】

Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit(Invitrogen)を用いて、上記精製PCR産物をpCR-BluntII-TOPO(Invitrogen)にサブクローニングした。クローンの配列を決定して、構築物が予想した核酸配列を有することを確認した。正確なクローンが各産物タイプに対して存在した。D2E7重鎖-インテイン-D2E7軽鎖カセットをpCR-BluntII-TOPOからSrfI及びNotIを用いて切り出し、同じ酵素で制限切断(restrict)されたpTT3にサブクローニングし、ゲル精製した。

40

【0357】

D2E7重鎖-インテイン-D2E7軽鎖に対する3種類の発現構築物を、P.ホリコシインテインを利用して設計した：pTT3-HcintLC-p.hori(プラスミドマップについては図14参照)、pTT3-HcintLC1aa-p.hori及

50

び p T T 3 - H c i n t L C 3 a a - p . h o r i 。

【 0 3 5 8 】

表 1 0 A . p T T 3 - H c i n t L C - p . h o r i のヌクレオチド配列 (配列番号
6 2)

【 0 3 5 9 】

【 化 2 】

5'-

g c g g c c g c t c g a g g c c g g c a a g g c c g g a t c c c c c g a c c t c g a c c t c t g g c t a a t a a g g a a a t t a t t t c a t t g c a a
t a g t g t g t g g a a t t t t t g t g t c t c a c t c g g a a g g a c a t a t g g g a g g g c a a a t c a t t g g t c g a g a t c c c t c g g a g a t c
t c t a g c t a g a g g a t c g a t c c c c g c c c c g g a c g a a c t a a a c c t g a c t a c g a c a t c t c t g c c c c t t c t c g c g g g g c a g t
g c a t g t a a t c c c t t c a g t g g t g g t a c a a c t t g c c a a c t g g g c c c t g t c c a c a t g t g a c a c g g g g g g g a c c a a a c
a c a a a g g g g t t c t c t g a c t g t a g t t g a c a t c c t a t a a a t g g a t g t g c a c a t t g c c a a c a c t g a g t g g c t t t c a t c c t g g
a g c a g a c t t t g c a g t c t g t g g a c t g c a a c a c a a c a t t g c c t t a t g t g t a a c t c t g g c t g a a g c t t a c a c c a a t g c t g
g g g g a c a t g t a c c t c c c a g g g g c c c a g g a a g a c t a c g g g a g g c t a c a c c a a c g t c a a t c a g a g g g g c c t g t g t a
g c t a c c g a t a a g c g g a c c c t a a g a g g g c a t t a g c a a t a g t g t t a t a a g g c c c c t g t a a c c t a a a c g g g t a g c
a t a t g c t t c c c g g g t a g t a g t a t a t a c t a t c c a g a c t a a c c c t a a t t c a a t a g c a t a t g t t a c c c a a c g g g a a g c a t a t g

ctatcgaattagggtagtaaaagggcctaaggaacagcgatatctcccaccccatgagctgtcacggttttattaca
 tggggcaggattccacgagggtagtgaaccatttagtcacaagggcagtggtgaagatcaaggagcgggcagt
 gaactctcctgaatcttcgctgcttctcattctccttcggttagctaatagaataactgctgagttgtaacagtaaggtg
 atgtgaggtgctcgaaaacaaggttcaggtgacgccccagaataaaattggacggggggttcagtggtggcatt
 gtgctatgacaccaatataaccctcacaacccttgggcaataaatactagtgttaggaatgaaacattctgaatatct
 ttaacaatagaaatccatgggggtggggacaagccgtaaagactggatgtccatctcacacgaatttatggctatgggc
 aacacataatcctagtgaatatgatactggggfattaagatgtgtcccaggcagggaccaagacaggtgaacct
 gttgttacctctatttgaacaaggggaaagagagtggacgcccacagcagcggactccactggttgtcttaacac
 ccccgaaaattaaacggggctccacgccaatggggccataaacaagacaagtgccactctttttgaaattgt
 ggagtgggggacgcgctagccccacacgccgcccgtgagggttggactglaaaataaggggtglaataactggct
 gattgaaccccgtaaccactgcggtcaaaccacttggccacaaaaccactaatggcaccggggaataacctgc
 ataagtaggtgggcccgaagataggggcccgattgtcgcgatctggaggacaaattacacacacttgcgcctga
 gcgccaagcacaggggtgtgttccatattcagaggtcgcctgagagcacgggtgggctaattgttccatgggtagc
 atatactacccaaatatctggatagcatalgtctatcctaatactatctgggtagcataggctatcctaatactatctgggt
 agcatatgctatcctaatactatctgggtagtatatgctatcctaattatatactgggtagcataggctatcctaatactatct
 tgggtagcatalgtctatcctaatactatctgggtagtatatgctatcctaatactatctgggtagcatalgtctatcctaata
 gagattagggtagtatatgctatcctaattatatactgggtagcatalactacccaaatatctggatagcatalgtctatccta
 atctatatactgggtagcatalgtctatcctaatactatatactgggtagcatalgtctatcctaatactatatactgggtagcatalgtct
 atcctaatactatatactgggtagtatatgctatcctaattatatactgggtagcatalgtctatcctaatactatatactgggtagcatal
 atgctatcctaatactatatactgggtagtatatgctatcctaatactatatactgggtagcatalgtctatcctaatactatatactgggt
 aaacatgagaatttctgaagacgaaagggcctcgtgatacgcctattttataggtaatgtcatgataataatggttct
 tagacgtcagggtggcacttttcggggaaatgtgcgccaacccctattgtttattttctaaatacattcaaataatgtatcc
 gctcatgagacaataaccctgataaatgctcaataatgtgaaaaaggaagagtatgagattcaacatttccgtgct
 gcccttattccctttttgcggaatttgcctcctgttttgctcaccagaaacgctgggtgaaagtaaaagatgctgaagat
 cagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatcacaacagcggtaagatccttgagagtttcgccccgaagaa
 cgtttccaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggtattatcccgtgtgacgcccgggcaagagcaactc
 ggtcggcgatacactattctcagaatgacttgggtgagctaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatga
 cagtaagagaattatgagtgctgccataacctgagtgataaacactgcccgaacttacttctgacaacgatcggga
 ggaccgaaggagcctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccgggagctg
 aatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgccctgcagcaatggcaacaacggtgacgcaaacattta
 actggcgaactacttactctagctcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccact
 ctgctgctggcccttccggctggctgggttattgtgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcgggtatcattgca
 gcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacg
 aatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgacagaccaagttactcatatatacttta
 gattgatttaaaactcatttttaattaaaaggatcaggtagaagatccttttgataatctcatgaccaaaaatcccttaacg
 tgagtttctgctcactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgctgagtaatct
 gctgctgcaaaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggttggttgcccggatcaagagctaccaactcttttccgaa
 ggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagttagccgtagttaggccaccactcaagaac
 tctgtagcaccgcctacataacctcgtctgctaatactgttaccagtggtgctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttacc
 gggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacggggggtcgtgcacacagccc
 agctggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcagcgttcccga
 gggagaaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctcggaaacaggagagcgcagaggagcgttccaggg
 ggaaacgcctggatctttatagctcgtcgggttcgccacctctgacttgagcgtcgtttttgtgatgctcgtcagggg
 gggagcctatggaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttctggccttttctcactatgttcttc
 ctgcttaccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataaccgctcggcgacccgaacgacc
 gagcgcagcagtcagtgagcaggaagcgggaagagcggccaatacgcgcaaacccgctctccccgcgctggc
 cgattcattaatgcagctggcagcagaggttcccactggaagcgggagtgagcgcgaacgcaattaatgtgagt
 tagctcactcattaggcaccaccaggctttacactttatgcttccggctcgtatgtgtgtggaattgtgagcggataacaatt
 tcacacaggaaacagctatgacctgattacgccaaagctctagctagaggtcagcaattctcatgtttgacagcttat
 catcgcagatccgggcaacggtgttccattgctgcagggcgcagaactggtaggtatggaagatctatacattgaatc

10

20

30

40

aatattggcaattagccatattagtcattgggtatataagcataaatcaatattggctattggccattgcatacgttgatctat
atcataatatgtacatttatattggctcatgtccaatatgaccgccatgttgacattgattattgactagtattaaatagtaatc
aattacggggcattagttcatagcccatatatggagttccgcttacataacttacggtaaatggcccgctggctgac
cgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgccaatagggacttccattgac
gtcaatgggtggagatttacggtaaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtccgccccctatt
gacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgccagtacatgacctacgggacttctacttggcagta
tctacgtattagtcacgtattaccatggtgatgggtttggcagtacaccaatgggctggatagcgggttgactcac
ggggattccaagtctccacccccattgacgtcaatgggagttgtttggcaccaaaatcaacgggacttccaaaatgt
cgtaataaccccgccccgtgacgcaaattggcggttaggcgtgtacgggtggaggctatataagcagagctcgtt
agtgaaccgtcagatctcactctctccgcacgtctgtctgcgagggccagctgttgggctcgcggtgaggacaaa
tcttcgcggtctttccagfactcttggatcggaaacccgtcggcctccgaacggfactccgccaccgaggacctgag
cgagtccgcacgaccggatcggaaaacctctcgagaaaggcgtctaacagtcacagtcgcaaggtaggctgag
caccgtggcggcgccagcgggtggcggtcggggtgttctggcggagggtctgtctgatgtatgaattaaagtaggc
ggcttgagacggcggatggtcaggtgaggttggcaggcttgagatccagctgttggggtgagtactccctctcaa
aagcgggcattactctgcgctaagattgtcagttccaaaaacgaggaggattgatattcacctggcccgatctggcc
atacacttgagtgacaatgacatccacttgccttctctccacaggtgtccactcccagggtccaagttgggcgcccacc
atggagttgggctgagctggcttctctgcgcattttaaaagggtgtccagtg-
gaggtgcagctgggtggagctctgggggaggcttggtagcagcccggcaggtccctgagactctctgtgcgccctctgg
attcacctttagattatgccatgactgggtccggcaagctccaggaaggcctggaatgggtctcagctatcactt
ggaatagtggtcacatagactatgaggactctgtggagggccgattaccatctccagagacaacgccaagaactc
cctgtatctgcaaatgaacagctcagagctgaggatacggcctatattactgtgcgaaagtctcgtaccttagcacc
gctctcccttactattggggccaaggtagccttggcaccgtctcagtgctgcgaccaaggggccatcggtctcc
cctggcaccctcctcaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgctgtgcaaggactacttccccga
accgggtgacgggtgctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccgggtgctctacagctcctcag
gacttactccctcagcagcgtggtagccttccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatc
acaagcccagcaacaccaagggtggacaagaaagttgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccg
tgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagcttctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcc
cggaccctgaggctacatgctgtggtggtagcgtgagccacgaagacctgagggtcaagttcaactggtacgtgg
acggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggctcag
cgtctcaccgtctgaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggctccaacaaagccctccc
gccccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatc
ccgggatgagctgaccaagaaccaggctagcctgacctgctgtgcaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtg
gagtgaggagcaatgggagccgggagacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctcctc
ttcctctacagcaagctaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatga
ggctctgcacaaccactacgcgagaagagcctctccctgtctccgggtaaa-
agcatttaccagatgaatggctcccaattgttgaanaatgaaaagttcagattcgtaaaattgggagacttcatagatag
ggagattgaggaaaacgctgagagagtgaaagggatggtgaaactgaaattctagagggttaaagatcttaaagc
ccttcttcaatagagaaaacaaaaagagcagctcaagaaggtaaggccctaattagacaccgctattcaggg
aaggttacagcattaaactaaagtcaggggagaaggatcaaaataacctcaggtcatagtctgttctcagtaaaaaat
ggaaagctagttaaaggtcaggggagatgaaactcaagcctgggtgatctcgttgcgttccaggaagggttaaactcca
gaaagcaagcaagtgctaaatctcgttgaactactcctgaaattaccggaagaggagacatcgaacatcgtaatgat
gatcccagttaaaggtagaaagaattcttcaaggatgctcaaaacattatactggatcttcggggaggggagaaa
ggccaagaaccgagggcgctatctcaagcatcttgaagattaggatagcttaagctcaagagaagaggctgtga
agtctcagactgggagtcactaaagaggtagcgaagccttacgagaccctcattaagaacctgaaatataacggtaa
tagcagggcatacatggttgaattaaactctcagggatgtagttagcttaatgccaatagaagaactaaaggagtg
ataattggagaacctaggggtcctaagataggtagccttattgatgtatgattcatttgcaagctcctaggttactac
ataagtagcggagatgtagagaaagatagggtgaagttccacagtaaaagatcaaaacgttctcagggatatacgga
aacttccgagaagttattggaaaggtaggagaggaagaggatataatgaggatcagggaaaattagccatgc
catatttagagtttagcgggaaggtaagagaattccagagttcatcttccatccccaatggatattaaggtagccttct
aagggactcaacgtaatgctgaagaattaacgttctccactaagagtgagctattagtaaccagcttactcttct

10

20

30

40

gaactccattggagtttcggatataaagattgaacatgagaaaggggttacagagttacataaataagaaggaatc
 ctccaatggggatatagtacttgatagcgtcgaatctatcgaagttgaaaaatacagagggctacgtttatgatctaagt
 ttgaggataatgagaactcctcgttggtcggactactttacgcacacaac-
 atggacatgocgctgcccgccagctgctgggctgctgctgctggtccccggctcgcgatgacacatccagatg
 acccagctccatcctccctgctgcatctgtaggggacagagtcaccatcacttgcgggcaagtcagggcatcaga
 aattactagcctggtatcagcaaaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccactttgcaatcag
 gggcccatctcgggtcagtggtcagtggtatctgggacagattcactctcaccatcagcagcctacagcctgaagatg
 tgcaacttattactgtcaaaaggataaccgtgcaccgtatactttggccaggggaccaaggtggaaatcaaacgtac
 ggtggctgcaccatctgtcttcatctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgctgctg
 aataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
 gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta
 cgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcggccgtcacaagagcttcaacag
 gggagagtgt -3'

10

【 0 3 6 0 】

表 1 0 B . p T T 3 - H c i n t L C - p . h o r i におけるオープンリーディング
フレームのアミノ酸配列 (配列番号 6 3)

【 0 3 6 1 】

【 化 3 】

Mefglswlflvailkgvqcevqlvesggglvqpgrslrlscaasgftddyamhwvrqapgkglewvsaitwnsghid
 yadsvegrftisrdnaknslylqmnsiraedtavyycakvsylstassldywgqgtlvvssastkgpsvfplapsskst
 sggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkv
 epkscdkthtccppcapellggpsvflfpkpkdtilmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpr
 eeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppsrdeitknqvsitclvkgyf
 psdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhhealthnhytqkslslspgk-
 silpdewlpivenekrvfvkigdfidreieenaervkrdgeteilevkdilkalsfnretkkselkkvkalirhrysgkvysikl
 ksgrrikitsghslsvkngklvkrgdelkpgdlvvvprklkpeskqvlnlvellklpeeetsnivmmipvkgrknffkg
 mlktlywifgegerprtagrylkhlerlgyvklkrrgcevidweslkryrklyetliknkynngnsraymvefnsldrddvslm
 pieelkewiigeprgpkigtfdvddsakllgyyissgdvekdvfkfhskdqnvlediaklaeklfkvrrrgyievsgki
 shaifrvlaegkripefiftspmdikvafikglngnaeelfstksellvnqllllnsigvsdikiehekgvyrvyinkkessng
 divldsvsievekyegyvydlsvednenflvgflllyahn-
 mdmrvpaqllglllwfpgsrqdiqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgirnylawyqqkpgkapklliyaastlqsgvp
 srfsgsgsgtdftltisslqpedvatyyccqrynrapytfgqgkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypre
 akvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslssltskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

20

30

配列のテキスト / フォントシンボルコード :

p T T 3 ベクター - 重鎖 - インテイン - 軽鎖

【 0 3 6 2 】

以下の 2 個の構築物では、上記構築物との唯一の違いは、P . ホリコシイ (下線) に固
有のエクステイン配列を含むことである。示した配列は、D 2 E 7 重鎖コード領域の末端
(赤色で示した最後の 9 塩基対) から D 2 E 7 軽鎖コード領域の 5 ' 末端 (分離線 (s e
p a r a t e l i n e) 上のピンク色で示した最初の 9 塩基対) までである。

40

【 0 3 6 3 】

表 1 1 A . p T T 3 - H c i n t L C 1 a a - p . h o r i 部分コード配列 (配列番
号 6 4)

【 0 3 6 4 】

【化4】

5'-ccgggtaaa-

aacagcatttaccagatgaatggctcccaattgtgaaaatgaaaaagttcgattcgtaaaaattggagacttcatag
 ataggagattgaggaaaacgctgagagagtgaagagggatggtgaaactgaaattctagagggttaaagatcttaa
 agcccttctcaatagagaaaacaaaaagagcgcgagctcaagaaggtaaaggccctaattagacaccgctattca
 ggaaggttacagcattaaactaaagtcagggagaaggatcaaaataacctcaggtcatagtctgttctcagtaaa
 aatggaaagctagttaaggctcaggggagatgaactcaagcctgggtgatctcgttgcgttccaggaagggttaaact
 tccagaaagcaagcaagtgctaaatctcgttgaactactcctgaaattacccgaagaggagacatcgaacatcgta
 atgatgatcccagttaaaggtagaagaatttctcaagggatgctcaaaacattatactggatcttcggggaggga
 gaaaggccaagaaccgcagggcgctatctcaagcatctgaaagattaggatacgttaagctcaagagaagagggc
 tgtgaagttctcgcactgggagtcacttaagaggtacaggaagccttacgagaccctattaagaacctgaaatataac
 ggtaatgagggcatacatggttgaatttaactctcagggatgtagtgagcttaatgccaatagaagaacttaagg
 agtgataattggagaacctaggggtcctaagataggtacctcattgatgtagatgattcatttgcaaagctcctagggt
 actacataagtagcggagatgtagagaaagataggggtgaagtccacagtaaagatcaaaacgcttctcagggatat
 agcgaacttgcgagaagttattggaaaggtagaggagaggaagaggatatattgaggtatcagggaaaattagc
 catgccatatttagagtttagcggaaaggaagagaattccagagttcatcttcacatcccaatggatattaaggtagc
 ctctctaagggactcaacggtaatgctgaagaattaacgcttccactaagagtgagctattagtaaccagcttatcct
 tctctgaactccattggagttcggatataaagattgaacatgagaaaggggttacagagttacataaataagaag
 gaatctccaatggggatagtagtacttgatagcgtcgaatctatcgaagtgaaaaatacagagggctacgtttatgatct
 aagtgtaggataatgagaacttctcgttggctcggactacttacgcacacaacagt-
 atggacatg -3'

10
20

【0365】

表11B. 重鎖の上流の4個のアミノ酸、及びインテインの下流の4個のアミノ酸を示す p T T 3 - H c i n t L C 1 a a - p . h o r i 部分アミノ酸配列 (配列番号65)

【0366】

【化5】

Pgknsilpdewlpivenekvrvfkigdfidreieenaervkrdgeteilevkdllkalsfnretkksselkkvkalirhrysgkv
 ysiklksgrrikitsghslsvkngklvkvrgdelkpgdlvvvprlklpeskqvlnlvellklpeeetsnivmmipvkgrk
 nffkgmiktlywifgegerprtayrlykhlrlgyvklkrrgcevidweslkryrklyetliknlkyngnsraymvefnslrdv
 vslmpieelkewiigeprgpkigtidvddsfakllgyyissgdvekdvfkfhskdqnvlediaklaeklfkvrrgrgyie
 vsgkishaifrvlaegkripefiftspmdikvafknglnaeeftfstsellvnlqllllnsigvsdikehekgyrvyinkk
 essngdivldsvesievekyegyvydlsvednenflvgfglyahn-s-mdm

30

重鎖3'配列 - インテイン - エクステイン - 軽鎖5'配列

【0367】

表12A. p T T 3 - H c i n t L C 3 a a - p . h o r i 部分コード配列 (配列番号66)

【0368】

【化6】

5'-ccgggtaaa-ttagcaaac-

agcatttaccagatgaatggctcccaattgtgaaaatgaaaaagttcgattcgtaaaaattggagacttcatagatag
 ggagattgaggaaaacgctgagagagtgaagagggatggtgaaactgaaattctagagggttaaagatcttaaagc
 ccttctcaatagagaaaacaaaaagagcgcgagctcaagaaggtaaaggccctaattagacaccgctattcaggg
 aagggttacagcattaaactaaagtcagggagaaggatcaaaataacctcaggtcatagtctgttctcagtaaaaaat
 ggaaagctagttaaggctcaggggagatgaactcaagcctgggtgatctcgttgcgttccaggaagggttaaactcca
 gaaagcaagcaagtgctaaatctcgttgaactactcctgaaattacccgaagaggagacatcgaacatcgtaaatgat
 gatcccagttaaaggtagaagaatttctcaagggatgctcaaaacattatactggatcttcggggaggggagaaa
 ggccaagaaccgcagggcgctatctcaagcatctgaaagattaggatacgttaagctcaagagaagaggctgtga
 agtctcgcactgggagtcacttaagaggtacaggaagccttacgagaccctattaagaacctgaaatataacggtaa
 tagcagggcatacatggttgaatttaactctcagggatgtagtgagcttaatgccaatagaagaacttaaggagtg

40
50

ataattggagaacctaggggtcctaagataggtaccttcattgatgtagatgattcatttgcaaagctcctaggftactac
 ataagtagcggagatgtagagaaagataggggtgaagttccacagtaaagatcaaaacgttctcgaggatagcga
 aactgcccgagaagttattggaaaggtgaggagaggaagaggatatattgaggtatcagggaaaattagccatgc
 cataattagagttttagcggaggtaagagaattccagagttcatcttcacatccccaatggatattaaggtagccttcct
 aagggactcaacggtaatgctgaagaattaacgttctcactaagagtgagctattagtaaccagctatccttctcct
 gaactccattggagtttcggatataaagattgaacatgagaaaggggttacagagttacataaataagaaggaatc
 ctccaatggggatatagtacttgatagcgtcgaatctatcgaagtgaaaaatacaggggctacgtttatgatctaagtg
 ttgaggataatgagaactcctcgtggcttcggactacttacgcacacaac-agttattac-atggacatg-3'

【 0 3 6 9 】

表 1 2 B . インテイン及びフランキング配列を示す p T T 3 - H c i n t L C 3 a a 10
 - p . h o r i 部分アミノ酸配列 (配列番号 6 7)

【 0 3 7 0 】

【 化 7 】

Pgk-lan-

silpdewlpivenekvrfvkigdfidreieenaervkrdgeteilevkdikalsfnretkkselkvvkalerhrysgkvysiki
 ksgrrikitsghslfsvkngklvkrgdelkpgdlvvvpgriklpeskqvlnlvellklpeeetsnivmmipvkgrknffkg
 mlktlywifgegerprtagrylkhlerlgyvklkrrgcevidwesikryrklyetliknkyngnsraymvefnslrdvslm
 pieelkewiigeprgpkigtfdvddsfaflgyyissgdvekdrvkfhskdqnvlediaklaeklfkvrrrgyievsyki
 shaifrvlaegkripefiftspmdikvafkglngnaeeltfstksellvnqllllnsigvsdikehekgvyrvyinkkessng
 dividsvsievekyegyvydlsvednenflvgflllyahn-syy-mdm

20

重鎖 3 ' 配列 - インテイン - エクステイン - 軽鎖 5 ' 配列

【 0 3 7 1 】

構築物 A、B、E、H、I、J、K 及び L に用いたプライマーは、以下のものであった

。

【 0 3 7 2 】

【化 8】

YKF1:GGACTACTTTACGCAGCCAACATGGACATGC (配列番号 68)
 YKR1:GCATGTCCATGTTGGCTGCGTAAAGTAGTCC (配列番号 69)
 YKF2:GGACTACTTTACGCAGCCAACAGTATGGACATGC (配列番号 70)
 YKR2:GCATGTCCATACTGTTGGCTGCGTAAAGTAGTCC (配列番号 71)
 YKF3:GGTGAGGAGAGGAAGAGG (配列番号 72)
 YKR3:CCAGAGGTCGAGGTTCG (配列番号 73)
 YKF4:CGGCGTGGAGGTGC (配列番号 74)
 YKR4:CAACAATTGGGAGCCATTCATCTGGTAAAATGGTTTTACCCGGAG
 (配列番号 75) 10
 YKF5: CCGCCCAGCTGCTGGGCGACGAGTGGTCCCCGGCTCGCG
 (配列番号 76)
 YKR5:Cgcgagccggggaaccactcgtcgcccagcagctgggagg (配列番号 77)
 YKF6: tgagcggccgctcga (配列番号 78)
 YKR6: gttgtgtgcgtaaag (配列番号 79)
 YKF7: agcattttaccagat (配列番号 80)
 YKR7:ggtggcgcccaaact (配列番号 81)
 YKF8: ctttacgcacacaacatggacatgcgctg (配列番号 82)
 YKR8:tcgagcggccgctcaacactctcccct (配列番号 83)
 YKF9: agtttgggcccaccatggagtttgggctg (配列番号 84) 20
 YKR9:atctggtaaaatgctttaccggagacag (配列番号 85)
 YKF10: agtttgggcccaccatggacatgcgctg (配列番号 86)
 YKR10: atctggtaaaatgctacactctcccctgtg (配列番号 87)
 YKF11: ctttacgcacacaacatggagtttgggctg (配列番号 88)
 YKR11: tcgagcggccgctcatttaccggagacag (配列番号 89)
 YKF12: cgccaagctctagc (配列番号 90)

 YKR12: ggtcgaggtcggg (配列番号 91)
 YKF13: acatgcgctgcccggccagtggttccccggctcgcatg (配列番号 92)
 YKR13:catcgcgagccggggaaccactgggcccggcagcgcgatg (配列番号 93) 30
 YKF14: ctttacgcacacaacgacatccagatgacc (配列番号 94)
 YKR14:ggtcatctggatgtcgtgtgtgcgtaaag (配列番号 95)
 YKF15: tggttccccggctcgGgaGgcgacatccagatgacc (配列番号 96)
 YKR15: ggtcatctggatgtcgcctcccagccggggaacca (配列番号 97)

【0373】

構築物 A を調製するために、プラスミド pTT3 HC-int-LC P.hori
 をテンプレート 2 として用い、重複 DNA 断片を、それぞれ変異誘発プライマー YKF1
 とプライマー YKR3 及び変異誘発プライマー YKR1 とプライマー YKF3 を用いて増
 幅させた。上記 2 個の PCR 断片の混合物をテンプレートとして用い、プライマー YKF
 3 と YKR3 を用いて、上記 2 個の断片を連結する DNA 断片を PCR 増幅によって作製 40
 した。次いで、この PCR 断片を制限酵素 EcoRI 及び NotI で切断し、同じ制
 限酵素で切断した pTT3 HC-int-LC P.hori にクローン化した。

【0374】

変異誘発プライマー YKF2 と YKR2 を YKF1 と YKR1 の代わりに用い、プラス
 ミド pTT3 HC-int-LC-1aa P.hori をプラスミド pTT3 HC
 -int-LC P.hori の代わりに PCR テンプレートとして用い、pTT3 H
 C-int-LC P.hori ベクターをクローニング用骨格として用いた以外は、構
 築物 A と同様にして構築物 B を作製した。

【0375】

構築物 E を調製するために、プラスミド pTT3 HC-int-LC-1aa P. 50

h o r i をテンプレートとして用い、プライマー-Y K F 4 及び変異誘発プライマー-Y K R 4 を用いて、D N A 断片を増幅した。このP C R 断片をS a c I I 及びM f e I によって切断し、同じ制限酵素で切断したp T T 3 H C - i n t - L C P . h o r i にクローン化した。

【0376】

構築物Hの場合、p T T 3 H C - i n t - L C P . h o r i をテンプレート2として用いた。変異誘発プライマー-Y K F 5 及びプライマー-Y K R 3 を一方の断片に用い、プライマー-F 3 及び変異誘発プライマー-R 5 を他方の断片に用いて、重複断片を増幅した。P C R 増幅の2回目を上記2断片をテンプレートとして用い、プライマー-Y K F 3 及びY K R 3 を用いて実施した。この断片を制限酵素E c o R I 及びN o t I で消化し、同じ酵素で切断したp T T 3 H C - i n t - L C P . h o r i にクローン化した。

10

【0377】

構築物Jの場合、p T T 3 H C - i n t - L C P . h o r i をテンプレート2として用いた。変異誘発プライマー-Y K F 1 3 及びプライマー-Y K R 3 を一方の断片に用い、プライマー-F 3 及び変異誘発プライマー-R 1 3 を他方の断片に用いて、重複断片を増幅した。P C R 増幅の2回目を上記2断片をテンプレートとして用い、プライマー-Y K F 3 及びY K R 3 を用いて実施した。この断片を制限酵素E c o R I 及びN o t I で切断し、同じ酵素で切断したp T T 3 H C - i n t - L C P . h o r i にクローン化した。

【0378】

構築物Kの場合、p T T 3 H C - i n t - L C P . h o r i は、テンプレート2として役立った。変異誘発プライマー-Y K F 1 4 及びプライマー-Y K R 3 を一方の断片に用い、プライマー-F 3 及び変異誘発プライマー-R 1 4 を他方の断片に用いて、重複断片を増幅した。P C R 増幅の2回目を上記2断片をテンプレートとして用い、プライマー-Y K F 3 及びY K R 3 を用いて実施した。この断片を制限酵素E c o R I 及びN o t I で消化し、同じ酵素で切断したp T T 3 H C - i n t - L C P . h o r i にクローン化した。

20

【0379】

構築物Lの場合、p T T 3 H C - i n t - L C P . h o r i をテンプレート2として用いた。変異誘発プライマー-Y K F 1 5 及びプライマー-Y K R 3 を一方の断片に用い、プライマー-F 3 及び変異誘発プライマー-R 1 5 を他方の断片に用いて、重複断片を増幅した。P C R 増幅の2回目を上記2断片をテンプレートとして用い、プライマー-Y K F 3 及びY K R 3 を用いて実施した。この断片を制限酵素E c o R I 及びN o t I で消化し、同じ酵素で切断したp T T 3 H C - i n t - L C P . h o r i にクローン化した。

30

【0380】

全構築物のヌクレオチド配列を確認した。全構築物は、D 2 E 7 重鎖の(P G K をコードする)最後のコドンとD 2 E 7 軽鎖成熟配列の(D I Q をコードする)第1のコドンとの間の配列を除いて、p T T 3 H C - i n t - L C P . h o r i と同じ配列を有する。w t 又は変異体軽鎖シグナル配列と併せてw t 又は変異体インテインを含む、この領域内の配列を、下記全構築物に対して示す。

【0381】

表13A . 構築物Aの部分コード配列(配列番号98)

40

【0382】

【化9】

Ccgggtaaa-
 agcatttaccagatgaatggctcccaattgtgaaaatgaaaagttcgattcgtaaaaattggagactcatagatag
 ggagattgaggaaaacgctgagagagtgaaagagggatggtgaaactgaaattctagagggttaaagatcttaaagc
 ccttcctcaatagagaaacaaaaagagcgagctcaagaaggtaaaggccctaattagacaccgctattcaggg
 aaggtttacagcattaaactaaagtcaggggagaaggatcaaaataacctcagggtcatagtctgttctcagtaaaaaat
 ggaaagctagttaagggtcaggggagatgaactcaagcctggtgatctcgttgcgtccaggaagggttaaactcca
 gaaagcaagcaagtgctaaatctcgttgaactactcctgaaattaccggaagaggagacatcgaacatcgtaatgat

50

gatcccagttaaaggtagaaagaatttctcaaaagggatgctcaaaacattatactggatcttcggggagggagaaa
 ggccaagaaccgcagggcgctatctcaagcatcttgaagattaggatacgttaagctcaagagaagaggctgtga
 agttctcgactgggagtcacttaagaggtacaggaagccttacgagaccctcattaagaacctgaaatataacggtaa
 tagcagggcatacatgggtgaatttaactcctcagggatgtagtgagcttaatgccaatagaagaacttaaggagtgg
 ataattggagaacctaggggtcctaagataggtacctcattgatgtagatgattcatttgcaaagctcctaggtactac
 ataagtagcggagatgtagagaaagataggggtgaagttccacagtaaagatcaaaacgttctcgaggatatacgca
 aactgccgagaagttatttgaaaggtgaggagaggaagaggatataattgaggtatcagggaaaattagccatgc
 catatttagagtttagcgggaaggaagagaattccagagttcatcttcacatccccaatggatattaaggtagccttcct
 aagggactcaacggtaatgctgaagaattaacgttctcactaagagttagctattagtaaccagcttatccttctct
 gaactccattggagttcggatataaagattgaacatgagaaaggggttacagagttacataaataagaaggaatc
 ctccaatggggatatagtacttgatagcgtcgaatctatcgaagttgaaaaatacagagggctacgtttatgatctaagt
 ttgaggataatgagaacttctcgttggcttcggactactttacgcagccaacatggacatgcgcggtgccgcccagct
 gctgggctgctgctgctgtggtccccggctcgcgatgc-gacatccag

10

【 0 3 8 3 】

表 1 3 B . 構築物 A におけるインテイン及びフランキング配列を示す部分アミノ酸配列 (配列番号 9 9)

【 0 3 8 4 】

【 化 1 0 】

Pgk-

silpdewlpivenekvrvfkigdfidreieenaervkrdgeteilevkdalkalsfnretkksselkkvkalirhrysgkvysikl
 ksgrrikitsghslsvkngklvkrgdelkpgdlvvvprlklpeskqvlnlvelllklpeeetsnivmmipvkgrknffkg
 mlktywifgegerprtagrylkhlerlgyvklkrrgcevidweslkryrklyetliknklyngnsraymvefnsrldvslm
 pieelkewiigeprgpkigtfdvddsakllgyyissgdvekdrvkfhskdqnvlediaklaeklfkvrrrgyievsgki
 shaifrvlaegkripefiftspmdikvafikglnnaeelfstksellvnqlillnsigvsdikiehekgyrvyinkkessng
 dividsvesievekyegyvydlsvednenflvfgillyaanmdmrvpaqlglillwfpgrsc-diq

20

【 0 3 8 5 】

表 1 4 A . 構築物 B における部分コード配列 (配列番号 1 0 0)

【 0 3 8 6 】

【 化 1 1 】

Ccgggtaaa-

agcatttaccagatgaatggctcccaattgtgaaaatgaaaagttcgattcgtaaaaattggagacttcatagatag
 ggagattgaggaaaacgctgagagagtgaagagggatggtgaaactgaaattctagaggttaaagatcttaaacg
 ctttcttcaatagagaaacaaaaagagcagctcaagaaggtaaaggcctaattagacaccgctattcaggg
 aaggttacagcattaaactaaagtcagggagaaggatcaaaataacctcaggtcatagtctgttctcagtaaaaaat
 ggaaagctagttaaaggtcaggggagatgaactcaagcctggtgatctcgttgcgttccaggaagggttaaactcca
 gaaagcaagcaagtgctaaatctcgttgaactactcctgaaattacccgaagaggagacatcgaacatcgtaatgat
 gatcccagttaaaggtagaaagaatttctcaaaagggatgctcaaaacattatactggatcttcggggagggagaaa
 ggccaagaaccgcagggcgctatctcaagcatcttgaagattaggatacgttaagctcaagagaagaggctgtga
 agttctcgactgggagtcacttaagaggtacaggaagccttacgagaccctcattaagaacctgaaatataacggtaa
 tagcagggcatacatgggtgaatttaactcctcagggatgtagtgagcttaatgccaatagaagaacttaaggagtgg
 ataattggagaacctaggggtcctaagataggtacctcattgatgtagatgattcatttgcaaagctcctaggtactac
 ataagtagcggagatgtagagaaagataggggtgaagttccacagtaaagatcaaaacgttctcgaggatatacgca
 aactgccgagaagttatttgaaaggtgaggagaggaagaggatataattgaggtatcagggaaaattagccatgc
 catatttagagtttagcgggaaggaagagaattccagagttcatcttcacatccccaatggatattaaggtagccttcct
 aagggactcaacggtaatgctgaagaattaacgttctcactaagagttagctattagtaaccagcttatccttctct
 gaactccattggagttcggatataaagattgaacatgagaaaggggttacagagttacataaataagaaggaatc
 ctccaatggggatatagtacttgatagcgtcgaatctatcgaagttgaaaaatacagagggctacgtttatgatctaagt
 ttgaggataatgagaacttctcgttggcttcggactactttacgcagccaacagtatggacatgcgcggtgccgccc
 gctgctgggctgctgctgctgtggtccccggctcgcgatgc-gacatccag

30

40

【 0 3 8 7 】

50

表 1 4 B . 構築物 B における部分アミノ酸配列 (配列番号 1 0 1)

【 0 3 8 8 】

【 化 1 2 】

Pgk-

silpdewlpivenekvrvfkigdfidreieenaervkrdgeteilevkdIkalsfnretkkselkkvkalirhrysgkvysiki
ksgrrikitsghslfsvkngklvkvrqdelkpgdlvvvpgriklpeskqvlnlvellklpeeetsnivmmipvkgrknffkg
mlklywifgegerprtagrylkhleryvklkrrgcevidweslkryrklyetliknlkyngnsraymvefnslrdvvsIm
pieelkewiigeprgpkigtfdvdds fakllgyyissgdvekdrvkfhskdqnvlediaklaeklfkvrrrgyievsgki
shaifrvlaegkripefiftspmdikvafkglngnaeelfstksellvnqllllnsigvsdikehekgvrvyinkkessng
divldsvesievekyegyvydlsvednenflvfglllyaansmdmrvpaqlglllwfpgsr-diq

10

【 0 3 8 9 】

表 1 5 A . 構築物 E における部分コード配列 (配列番号 1 0 2)

【 0 3 9 0 】

【 化 1 3 】

Ccgggtaaa-

accatttaccagatgaatggctccaattgttga aaaatgaaaagttcgattcgtaaaaattggagacttcatagatag
ggagattgaggaaaacgctgagagagtgaagagggatgggtgaaactgaaattctagaggtaaagatcttaaagc
ccttctcaatagagaaacaaaaagagcgagctcaagaaggtaaaggccctaattagacaccgctattcaggg
aaggttacagcattaaactaaagtcagggagaaggatcaaaataacctcaggtcatagctgttctcagtaaaaat
ggaaagctagttaaggctaggggagatgaactcaagcctggtgatctcgttgcgtccaggaaggtaaaaactcca
gaaagcaagcaagtgctaaatctcgttgaactactcctgaaattaccgaagaggagacatcgaacatcgtaatgat
gatcccagttaaaggtagaagaatttctcaagggatgctcaaacattatactggatctcggggaggagaaa
ggccaagaaccgcagggcgctatctcaagcatctgaaagattaggatacgttaagctcaagagaagaggctgtga
agttctcgactgggagtcactaaagaggtacaggaagccttacgagaccctcattaagaacctgaaatataacggtaa
tagcagggcatacatgggtgaatttaactctcagggatgtagtgagctaatgccaatagaagaacttaaggagtg
ataattggagaacctaggggtcctaagataggtacctcattgatgtagatgattcattgcaaagctcctaggtactac
ataagtagcggagatgtagagaaagataggggtgaagttccacagtaaagatcaaaacgttctcgaggatatacgga
aactgccgagaagttattggaaaggtaggagaggaagaggatattgaggtatcagggaaaattagccatgc
catatttagagtttagcggaaaggaagagaattccagagttcatctcacatcccaatggatattaaggtagccttctt
aagggactcaacggtaatgctgagaattaacgttctcactaagagtgagctattagtaaccagcttacccttctct
gaactccattggagttcggatataaagattgaacatgagaaaggggttacagagttacataaataagaaggaatc
ctcaatggggatatagtactgtatagcgtcgaatctatcgaagttgaaaatacagagggctacgttatgatctaagtg
ttgaggataatgagaactcctcgttggctcggactacttacgcacacaacagatggacatgvcgctgcccgcca
gctgctgggcctgctgctgctgtgttccccggctcgcgatgc-gacatccag

20

30

【 0 3 9 1 】

表 1 5 B . 構築物 E における部分アミノ酸配列 (配列番号 1 0 3)

【 0 3 9 2 】

【 化 1 4 】

Pgk-

tilpdewlpivenekvrvfkigdfidreieenaervkrdgeteilevkdIkalsfnretkkselkkvkalirhrysgkvysikl
sgrrikitsghslfsvkngklvkvrqdelkpgdlvvvpgriklpeskqvlnlvellklpeeetsnivmmipvkgrknffkg
mlklywifgegerprtagrylkhleryvklkrrgcevidweslkryrklyetliknlkyngnsraymvefnslrdvvsIm
pieelkewiigeprgpkigtfdvdds fakllgyyissgdvekdrvkfhskdqnvlediaklaeklfkvrrrgyievsgki
shaifrvlaegkripefiftspmdikvafkglngnaeelfstksellvnqllllnsigvsdikehekgvrvyinkkessng
divldsvesievekyegyvydlsvednenflvfgllyahnsmdmrvpaqlglllwfpgsr-diq

40

【 0 3 9 3 】

表 1 6 A . 構築物 H における部分コード配列 (配列番号 1 0 4)

【 0 3 9 4 】

【化 1 5】

Ccggtaaa-

agcattttaccagatgaatggctcccaattgttgaaaatgaaaaagttcgattcgtaaaaattggagacttcatagatag
 ggagattgaggaaaacgctgagagagtgaagagggatggtgaaactgaaattctagagggttaaagatcttaaagc
 ctttccttcaatagagaaacaaaaaagagcagctcaagaaggtaaaggccctaattagacaccgctattcaggg
 aaggttacagcattaaactaaagtcaggggagaaggatcaaaataacctcaggtcatagtctgttctcagtaaaaaat
 ggaaagctagttaaggtcaggggagatgaaactcaagcctggtgatctcggtgctggtccaggaagggttaaactcca

gaaagcaagcaagtgctaaatctcgttgaactactcctgaaattacccgaagaggagacatcgaacatcgtaatgat
 gatcccagttaaaggtagaagaatttctcaagggtgctcaaaacattatactggatcttcggggaggagaaa 10
 ggccaagaaccgagggcgctatctcaagcatcttgaagattaggatacgtaagctcaagagaagaggctgtga
 agttctcactgggagtcacttaagaggtacaggaagctttacgagaccctcattaagaacctgaaatataacggtaa
 tagcagggcatacatggttgaatttaactctcagggatgtagtgacttaatgccaatagaagaacttaaggagtgg
 ataattggagaacctaggggtcctaagataggtaccttcatgtagatgattcatttgcaaagctcctaggttactac
 ataagtagcggagatgtagagaaagataggggtgaagttccacagtaaaagatcaaaacgttctcagggatatagcga
 aactgccgagaagttattggaaaggtgaggagaggaagaggatattgaggtatcaggggaaaattagccatgc
 catatttagagtttagcggaggtaagagaattccagagttcatcttcacatcccaatggatattaaggtagccttcct
 aagggactcaacggtaatgctgaagaaltaacgttctccactaagagtgagctattagtaaccagcttatccttctcct
 gaactccattggagttcggatataaagattgaacatgagaaaggggttacagagttacataaataagaaggaatc
 ctccaatggggatagtagctttagcgcgaatctatcgaagttgaaaaatacagagggtacgtttatgatctaagtg 20
 ttgaggataatgagaacttctcgttggcttcggactactttacgcacacaacatggacatgcccgtgcccggccagct
 gctgggacgagtggttccccggctcgcgatgc-gacatccag

【0 3 9 5】

表 1 6 B . 構築物 H における部分アミノ酸配列 (配列番号 1 0 5)

【0 3 9 6】

【化 1 6】

Pgk-

silpdewlpivenekvrvfkigdfidreieenaervkrdgeteilevkdikalsfnretkkselkkvkalirhrysgkvysiki
 ksgrrikitsghslsvkngklvkvrqdelkpgdlvvvpgrrlklpeskqvlnlvellklpeeetsnivmmipvkgrknffkg
 mlktlywifgegerprtagrylkhlerlgyvklkrrgcevdweslkryrklyetliknlkyngnsraymvefnslrdvvsIm 30
 pieelkewiigeprgpkigfidvdsfakllgyyissgdvekdrvkfhskdqnvlediaklaeklfkgvrrrgyievsgki
 shaifrvlaegkripefiftspmdikvafkglngnaeelfstksellvnqilllinsigvsdikehekgvyrvyinkkessng
 divldsvesievekyegyvydlsvednenflvgflllyahnmdmrvpaqllgdewfpgsrc-diq

【0 3 9 7】

表 1 7 A . 構築物 J における部分コード配列 (配列番号 1 0 6)

【0 3 9 8】

【化 1 7】

Ccgggtaaa-

agcattttaccagatgaatggctcccaattggtgaaaatgaaaagttcgattcgtaaaaattggagacttcatagatag
 ggagattgaggaaaacgctgagagagtgaaagagggatgggtgaaactgaaattctagagggttaaagatcttaaagc
 cctttcctcaatagagaaacaaaaagagcgagctcaagaaggtaaaggccctaattagacaccgctattcaggg
 aaggtttacagcattaaactaaagtcagggagaaggatcaaaataacctcaggtcatagctgttctcagtaaaaaat
 ggaaagctagttaaggcaggggagatgaactcaagcctggtgatctcgttgcgttccaggaagggttaaactcca
 gaaagcaagcaagtgctaaatctcgttgaactactcctgaaattacccgaagaggagacatcgaacatcgtaatgat
 gatcccagttaaaggtagaagaatttctcaagggatgctcaaaacattatactggatcttcggggaggagaaa
 ggccaagaaccgcagggcgctatctcaagcatctgaaagattaggatacgttaagcicaagagaagaggctgtga
 agttctcgcactgggagtcacttaagaggtacaggaagcittacgagaccctcattaagaacctgaaatataacggtaa
 tagcagggcatacatgggtgaatttaactctcagggatgtagtgcctaatgccaatagaagaacttaaggagtg
 ataattggagaacctaggggtcctaagataggtacctcattgatgtagatgattcattgcaaagctcctaggttactac
 ataagtagcggagatgtagagaaagataggggtgaagttccacagtaaagatcaaaacgttctcgaggatatacgga
 aacttgcgagaagttatttgaaaggtgaggagaggaagaggatataattgaggtatcagggaaaattagccatgc
 catatttagagtttagcgggaaggtaagagaattccagagttcatctcacatccccaatggatattaaggtagccttctt
 aagggactcaacggtaatgctgaagaattaacgttctcactaagagtgagctattagtaaccagctatccttctct
 gaactccattggagttcggatataaagattgaacatgagaaaggggttacagagttacataaataagaaggaatc
 ctccaatggggatatagtacttgatagcgtcgaatctatcgaagttgaaaaatacgaggggctacgtttatgatctaagtg
 ttgaggataatgagaactcctcgttggctcggactacittacgcacacaacatggacatgcgctgcccgccagtg
 gttccccggctcgcgatgc-gacatccag

10

20

【0 3 9 9】

表 1 7 B . 構築物 J における部分アミノ酸配列 (配列番号 1 0 7)

【0 4 0 0】

【化 1 8】

Pgk-

silpdewlpivenekvrvkigdfidreieenaervkrdgeteilevkdIkalsfnretkkselkkvkalirhrysgkvysikl
 ksgrrikitsghslsvkngklvkvrqdelkpgdlvvpgrlklpeskqvlnlvellklpeeetsnivmmipvkgrknffkg
 mlktlywifegerprtagrylkhlerlgyvklkrrgcevidweslkryrklyetliknlkyngnsraymvefnsldrddvslm
 pielkewiigeprgpkigtfdvdds fakllgyyissgdvekdrvkfhskdqnvlediaklaeklfkvrrrgyievsgki
 shaifrvlaegkripefiftspmdikvafkglngnaeeltfstksellvnqlilllnsigvsdikehekgvyrvyinkkessng
 divldsvesievekyegyvydlsvednenflvgflllyahnmdmrvpaqwfpgsrc-diq

30

【0 4 0 1】

表 1 8 A . 構築物 K における部分コード配列 (配列番号 1 0 8)

【0 4 0 2】

【化 1 9】

Ccggtaaa-

agcatttaccagatgaatggctccaattgttgaaaatgaaaaagttcgattcgtaaaaattggagacttcatagatag
 ggagattgaggaaaacgctgagagagtgagagggatggtgaaactgaaattctagaggtaaagatcttaaagc
 ccttctcaatagagaaacaaaaagagcgagctcaagaaggtaaaggccctaattagacaccgctattcaggg
 aaggttacagcattaaactaaagtcagggagaaggatcaaaataacctcaggtcatagctgttctcagtaaaaaat
 ggaaagctagttaaggctaggggagatgaactcaagcctggtgatctcgttgcgtccaggaaggtaaaaactcca
 gaaagcaagcaagtgctaaatctcgttgaactactcctgaaattaccgaagaggagacatcgaacatcglaatgat
 gatcccagttaaaggtagaagaattcttcaagggatgctcaaaacattatactggatcttcggggaggagaaa
 ggccaagaaccgagggcgctatctcaagcatctgaaagattaggatacgttaagctcaagagaagaggctgtga
 agttctcactgggagtcacttaagaggtacaggaagccttaccgagaccctcattaagaacctgaaatataacggtaa
 tagcagggcatacatggttgaatttaactctcagggatgtagtgagcttaatgccaatagaagaactaaggagtg
 ataattggagaacctaggggtcctaagataggtagcttcatgtagatgattcattgcaaagctcctaggttactac
 ataagtagcggagatgtagagaaagatagggtgaagttccacagtaaagatcaaaacgttctcagggatatacgga
 aactgccgagaagttattggaaaggtgaggagaggaagaggatataattgaggtatcagggaaaattagccatgc
 catatttagagtttagcgggaaggtaagagaattccagagttcatctccatccccaatggatattaaggtagccttctt
 aagggactcaacgtaaatgctgaagaattaacgttctcactaagagtgagctattagtaaccagctatccttctct
 gaactccattggagttcggatataaagattgaacatgagaaaggggttacagagttacataaataagaaggaatc
 ctcaatggggatatagtacttgatagcgtcgaatctatcgaagttgaaaaatacaggggctacgtttatgatctaagt
 ttgaggataatgagaacttctcgttggctcggactactttacgcacacaac-gacatccag

10

20

【0 4 0 3】

表 1 8 B . 構築物 K における部分アミノ酸配列 (配列番号 1 0 9)

【0 4 0 4】

【化 2 0】

Pgk-

silpdewlpivenekvrvfkigdfidreieenaervkrdgeteilevkdikalsfnretkkselkkvkalirhrysgkvysiki
 ksgrrikitsghslsvkngklvkvrqdelkpgdlvvvprgkklpeskqvlnlvellklpeeetsnivmmipvkgrknffkg
 mlktywifgegerprtagrylkhleryvklkrrgcevidweslkryrklyetliknlkynngnsraymvefnslrdvvlm
 pieelkewiigeprgpkigtfdvddsfaiklgyyissgdvekdrvkfhskdqnvlediaklaeklfkvrrgrgyievsgki
 shaifrvaegkripefiftspmdikvafikgingnaeeltfstksellvnlqllllnsigvsdikehekgvyrvyinkkessng
 divldsvesievekyegyvydlsvedenflvgflllyahn-diq

30

【0 4 0 5】

表 1 9 A . 構築物 L における部分コード配列 (配列番号 1 1 0)

【0 4 0 6】

【化 2 1】

Ccggtaaa-

agcatttaccagatgaatggctccaattgttgaaaatgaaaaagttcgattcgtaaaaattggagacttcatagatag
 ggagattgaggaaaacgctgagagagtgagagggatggtgaaactgaaattctagaggtaaagatcttaaagc
 ccttctcaatagagaaacaaaaagagcgagctcaagaaggtaaaggccctaattagacaccgctattcaggg
 aaggttacagcattaaactaaagtcagggagaaggatcaaaataacctcaggtcatagctgttctcagtaaaaaat
 ggaaagctagttaaggctaggggagatgaactcaagcctggtgatctcgttgcgtccaggaaggtaaaaactcca

40

gaaagcaagcaagtgctaaatctcgttgaactactcctgaaattacccgaagaggagacatcgaacatcgtaatgat
gatcccagttaaaggtagaaagaatttctcaaaagggatgctcaaacattatactggatcttcggggagggagaaa
ggccaagaaccgcagggcgctatctcaagcatctgaaagattaggatacgttaagctcaagagaagaggctgtga
agttctcgcactgggagtcacttaagaggtagcgaagccttacgagaccctcattaagaacctgaaatataacggtaa
tagcagggcatacatggttgaatttaactctcagggatgtagtgagcttaatgccaatagaagaacttaaggagtgg
ataattggagaacctaggggtcctaagataggtacctcattgatgtagatgattcatttgcaaagctcctaggttactac
ataagtagcggagatgtagagaaagataggggtgaagttccacagtaaagatcaaaacgttctcgaggatatagcga
aactgcccgagaagttattggaaaggtgaggagaggaagaggatattgaggtatcagggaaaattagccatgc
catatttagagtttagcgggaaggaattccagagttcatctccacatccccaatggatattaaggtagccttcct
aagggactcaacggtaatgctgaagaattaacgttctccactaagagtgagctattagttaaccagctatccttctcct
gaactccattggagttcggatataaagattgaacatgagaaaggggttacagagttacataaataagaaggaatc
ctccaatggggatatagtacttgatagcgtcgaatctatcgaagtgaaaaatacaggggctacgtttatgatctaagt
ttgaggataatgagaacttctcgttggtcggactacttacgcacacaacatggacatgcgcggtcccgccagct
gctgggcctgctgctgtgtgtgtccccggctcgggaggc-gacatccag

10

【 0 4 0 7 】

表 1 9 B . 構築物 L における部分アミノ酸配列 (配列番号 1 1 1)

【 0 4 0 8 】

【 化 2 2 】

Pgk-

silpdewlpivenekrvfvkigdfidreieenaervkrdgeteilevkdIkalsfnretkkselkkvkalirhrysgkvysiki
ksgrrikitsghslsvkngklvkvrgdelkpgdlvvpgrlklpeskqvlnlvellklpeeetsnivmmipvkrknffkg
mlktywifgegerprtayrlykhlrlgyvklkrgevidweslkryrklyetliknlkyngnsraymvfnsldrsvslm
pieelkewiigeprgpkigtfidvddsakllgyyissgdvdkrvkfhskdqnvlediaklaeklfkvrrrgyievsgki
shaifrvlaegkripefiftspmdikvafllglnnaeeltfstksellvnqllllnsigvsdikehekgvyrvyinkkessng
divldsvsievekyegyvydlsvednenflvgflllyahnmdmrvpaqlgllllwfpvgsgg-diq

20

重鎖 3 ' 配列 - インテイン + 軽鎖シグナルペプチド配列 - 軽鎖成熟配列

【 0 4 0 9 】

ゲノム DNA をテンプレートとして用い、Pfu - I Hi Fidelity DN
A Polymerase (Stratagene) を用いた、サッカロミセス セレピ
シエ VMA インテイン (GenBank アクセション # AB093499) の増幅に以
下のオリゴヌクレオチドを使用した。Yeast - Geno - DNA - Template
キット (G Biosciences、cat. # 786 - 134) を用いてサッカロ
ミセス セレピシエの培養からゲノム DNA を調製した。

30

【 0 4 1 0 】

【 化 2 3 】

Sce VMA インテイン 5' : TGCTTTGCCAAGGGTACCAATGTTTT (配列番号 112)

Sce VMA インテイン 3' : ATTATGGACGACAACCTGGTTGGCAA (配列番号 113)

【 0 4 1 1 】

PCR を以下のプログラムによって実施した。

40

【 0 4 1 2 】

【 表 7 】

段階	1	2	3	4	5	6	7	8
温度	94℃	94℃	55℃	72℃	段階2 に戻る (39 回)	72℃	4℃	終了
時間	2分間	1分間	1分間	2分間		5分間	保持	

50

【 0 4 1 3 】

PCR産物をテンプレートとして用い、以下のプライマー対を用いて、P.ホリコシイ
 インテイン構築物に関して、インテインの0aa、1aa又は3aaバージョンを作製し
 た。Pfu-I Hi Fidelity DNA Polymerase (Strat
 agene)を用いた。

【 0 4 1 4 】

【化24】

Sce-5'-Sap

CCGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGCTTTGCCAAGGGTA
 CCAATGTTTT (配列番号114)

10

Sce-5'-1aa-Sap

CCGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGGGTGCTTTGCCAAGG
 GTACCAATGTTTT (配列番号115)

Sce-5'-3aa-Sap

CCGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATATGTCCGGGTGCTTTG
 CCAAGGGTACCAATGTTTT (配列番号116)

Sce-3'-Van911

CAGCAGGCCCAGCAGCTGGGCGGGCACGCGCATGTCCATATTATGGAC
 GACAACCTGGTTGGCAA (配列番号117)

20

Sce-3'-1aa-Van911

CAGCAGGCCCAGCAGCTGGGCGGGCACGCGCATGTCCATGCAATTATG
 GACGACAACCTGGTTGGCAA (配列番号118)

Sce-3'-3aa-Van911

CAGCAGGCCCAGCAGCTGGGCGGGCACGCGCATGTCCATTTCTCCGCA
 ATTATGGACGACAACCTGGTTGGCAA (配列番号119)

30

【 0 4 1 5 】

PCRを上記と同じプログラムによって実施した。各反応タイプから得られたPCR産
 物をpCR-BluntII-TOPO (Invitrogen)にサブクローニングし
 、各タイプの挿入断片の配列を決定し、正確であることを確認した。

【 0 4 1 6 】

E.コリ中のpTT3-HcintLC p.ホリコシイ構築物中への相同組み換えを
 介してD2E7重鎖-インテイン-D2E7軽鎖の融合物を作製するために、オリゴヌク
 レオチドプライマーを設計した。PCRによって作製された(pTT3ベクター、重鎖及
 び軽鎖領域を含むが、P.ホリコシイインテインを含まない)ベクターとVMAインテ
 イン挿入断片との間の40塩基対オーバーハングを操作することによって、連結の利点なし
 に、2個のDNAを混合し、E.コリに転換して、0aa、1aa及び3aaバージョン
 のpTT3-HC-VMAint-LC中への2個の断片のE.コリ相同組み換えを起こ
 し得る。

40

【 0 4 1 7 】

VMA相同組み換えプライマー：

【 0 4 1 8 】

【化25】

VMA-HR5':

CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (配列番号120)

VMA-HR3':

GCAGCAGGCCAGCAGCTGGGCGGGCACGCGCATGTCCAT (配列番号121)

【0419】

pTT3-HcintLC 相同組み換えプライマー:

【0420】

【化26】

pTT3int-HR5':

ATGGACATGCGCGTGCCCGCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGC (配列番号122)

pTT3int-HR3':

TTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTGCGTGTAGTGGT (配列番号123)

【0421】

インテインのPCRを以下のプログラムで実施した: Pfu-Hi Fidelity DNA Polymerase (Stratagene) を使用した。

【0422】

【表8】

段階	1	2	3	4	5	6	7	8
温度	94℃	94℃	60℃	72℃	段階2 に戻る (34 回)	72℃	4℃	終了
時間	2分間	1分間	1分間	1.5分 間			5分間	保持

【0423】

ベクターのPCRを以下のプログラムで実施した: Platinum Taq Hi Fidelity Supermix (Invitrogen) を使用した。

【0424】

【表9】

段階	1	2	3	4	5	6	7	8
温度	94℃	94℃	60℃	68℃	段階2 に戻る (24 回)	68℃	4℃	終了
時間	2分間	30秒 間	30秒 間	10分 間		5分間	保持	

【0425】

pTT3-HcintLCへのVMAインテインの相同組み換えを実施するために、以下の戦略を用いた。PCR産物をゲル精製し、Qiaquick Gel Extractionキット(Qiagen)を用いて各々を溶出緩衝剤50μl中に溶出させた。ベクターPCR産物3μlをエッペンドルフ管中で混合し、所望のVMAインテインPCR産物3μlを添加した(別個の管中の0aa、1aa又は3aa)。各混合物をE.コリ中に転換し、次いで細胞をLB+アンピシリンプレートに蒔き、37Cで終夜インキュベートした。コロニーを培養物2mlに増殖させた。プラスミドDNAをWizard P

10

20

30

40

50

rep Kits (Promega) を用いて調製し、制限エンドヌクレアーゼ消化及びアガロースゲル電気泳動によって分析した。正確な制限パターンを生成したクローンを DNA 配列に関して分析した。

【0426】

S. セレブシエ VMA インテインを利用した、D2E7 重鎖 - インテイン - D2E7 軽鎖に対する 3 個の発現構築物を作製した：pTT3 - Hc - VMAint - LC - 0aa、pTT3 - Hc - VMAint - LC - 1aa 及び pTT3 - Hc - VMAint - LC - 3aa。図 15 のプラスミドマップも参照されたい。

【0427】

表 20 . プラスミド pTT3 - D2E7 重鎖 - インテイン - D2E7 軽鎖全体の配列 (配列番号 124)

10

【0428】

【化 2 7】

5'-

gccccgctcgaggccggcaaggccggatccccgacctcgacctctggctaataaaggaaatttttattgcaa
tagtggttgaatTTTTGTGTCCTCCTCGGAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTGGTCGAGATCCCTCGGAGATC
tctagctagaggatcgatccccgccccggacgaactaaacctgactacgacatctctgcccctcttcgcgggcagt
gcatgtaatccctcagttggttgtaacaacttgccaactgggcccctgtccacatgtgacacgggggggaccaaac
acaaaggggttctgactgtagtgacatcctataaatggatgtgcacatttgccaacactgagtggcttcatcctgg
agcagactttcagctctgtgactgcaacacaacattgcccttatgtgtaactcttggctgaagctcttacaccaatgctg
ggggacatgtacctccagggggccaggaagactacgggaggctacaccaacgtcaatcagaggggctgtgta
gctaccgataagcggaccctcaagagggcattagcaatagtggttataaggccccctgttaaccctaaacgggtagc
atatgcttccgggtagtagtataactatccagactaacctaatcaatagcatatgttaccacaacgggaagcatatg
ctatcgaattagggtagtaaaagggctctaaggaacagcgatctcccacccatgagctgtcacggtttattaca
tggggctcaggattccacgagggtagtgaaacatttagtcacaagggcagtggtgaagatcaaggagcgggcagt
gaactctctgaatctcgcctgctctcattctcctcgtttagctaataagaataactgctgagttgtaacagtaagggtg
atgtgaggtgctcgaaaacaaggttcagggtgacgccccagaataaaaittgacggggggtcagtggtggcatt
gtgctatgacaccaatataaccctcacaaccccttgggcaataaataactagtgtaggaatgaaacattctgaatatct
ttaacaatagaaatccatgggggtggggacaagccgtaaagactggatgtccatctcacacgaatttatggctatgggc
aacacataatcctagtgaatgatgactgggggtattaagatgtgtccaggcagggaacacaggtgaacat
gttgttacctctatttgaacaaggggaagagagtgacgcccagcagcaggactccactgggttctctaacac
ccccgaaaattaaacggggctccacgccaatggggccataaacaagacaagtggcactcttttttgaattgt
ggagtgggggcacgcgtcagccccacacgcccctgcccgtttggactgtaaaataagggtgtaataacttggct
gattgtaaccccgtaaccactgcccgtcaaacacttggccacaaaaccactaatggcaccggggaataacctgc
ataagtaggtgggcccgaagataggggcccgcgattgctgcgatctggaggacaaattacacacacttgcgcctga
gcccgaagcacagggttgttggtcctcatattcacgaggtcgtgagagcacgggtgggctaattgtccatgggtagc
atatactaccacaaatatctggatagcatatgctatcctaattctatactgggtagcataggctatcctaattctatactgggt
agcatatgctatcctaattctatactgggtagtatactatcctaatttatactgggtagcataggctatcctaattctatact
tgggtagcatatgctatcctaattctatactgggtagtatactatcctaattctgtatccgggtagcatatgctatcctaata
gagattagggtagtatactatcctaatttatactgggtagcatatactaccacaaatatctggatagcatatgctatccta
atctatactgggtagcatatgctatcctaattctatactgggtagcataggctatcctaattctatactgggtagcatatgct
atcctaattctatactgggtagtatactatcctaatttatactgggtagcataggctatcctaattctatactgggtagcat
atgctatcctaattctatactgggtagtatactatcctaattctgtatccgggtagcatatgctatcctcatgataagctgtc
aaacatgagaatttctgaagacgaaagggcctcgtgatacgcctattttataggtaatgcatgataataatgggttct
tagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgaggaaacccctatttattttctaaatacattcaaatatgtatcc
gctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacattccgtgtc
gcccttattccctttttgcccattttgccttctgttttgcaccagaaacgctgggtgaaagtaaaagatgctgaagat
cagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttcgccccgaagaa
cgtttccaatgatgagcacittaaagttctgctatgtggcgggtattatcccgtgtgacgcccgggcaagagcaactc
ggtcggcgatacactattctcagaatgacttgggtgagtagtaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatga
cagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcccgaacttacttctgacaacgatcggga
ggaccgaaggagctaacgcctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctg
aatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatggcaacaacgttgcgcaactatta
actggcgaactacttactctagcttccgggaacaattaatagactggatggaggcggataaaagttgcaggaccactt
ctgcccctcggcccttccggctggctggttattgtgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcggggtatcattgca
gcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacg
aaatagacagatcgtgagataggtgctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttactcatatatacttta
gattgatttaaaacttcaattttaaaggatctagggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaaaacccctaacg
tgagtttctgctcactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaattct

10

20

30

40

gctgctgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggttggcgggatcaagagctaccaactctttccgaa
ggtaactggctcagcagagcgcagataccaaatactgttctctagtgtagccgtagttagccaccactcaagaac
tctgtagcaccgcctacatacctcgtctgctaactctgttaccagtggtgctgcccagtgccgataagtcgtgtctacc
gggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacggggggtcgtgcacacagccc
agcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcttcccgaa
gggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctcggaaacaggagagcgcacgagggagcttccaggg
ggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcaggggg
gaggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacgggttctggcctttgtggtcctttgtcacatgttcttc
ctgcttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacgacc
gagcgcagcagtcagtgagcaggaagcgggaagagcggccaatacgcacaaccgcttccccgcgcttggc
cgattcattaatgcagctggcagcagaggttcccagctggaaagcgggcagtgagcgcacaacgcaattaatgtgagt
tagctcactcattaggcaccacaggcttaccattatgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatt
tcacacaggaaacagctatgacatgattacgccaagctctagctagaggctcagccaatttcatgtttgacagcttatt
catcgcagatccgggcaacgttgttgcattgctgcagggcagaactggtaggtatggaagatctatacattgaatc
aatattggcaattagccatattagtcattggttatatagcataaatcaatattggctattggccattgcatacgttctat
atcataatgtacattatattggctcatgtccaatatgaccgcatgttgacattgattattgactagtattaatagtaatc
aattacggggtcattagttcatagccatataatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgac
cgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggacttccattgac
gtcaatgggtggagtattacggtaaacgcccacttggcagtacatcaagtgtatcataatgccaaagtcggccccctatt
gacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagctacatgacctacgggacttctacttggcagtac
tctacgtattagtcacgtattaccatgggtgatcgggtttggcagtacaccaatgggcgtggatagcgggttgactcac
ggggattccaagctccacccccattgacgtcaatgggagttgtttggcaccaaaaatcaacgggacttccaanaatgt
cgtaataacccccgccccgtgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctcgttt
agtgaaaccgtcagatctcactctctccgcacgtctcgcagggccagctgttgggctcgcggttgaggacaac
tcttcgcggtcttccagctcttggatcggaaacccgctcggcctccgaacggctactccgccaccgagggacctgag
cgagtccgcacacgggatcggaaaacctctcgagaaaggcgttaaccagtcacagtcgcaaggtaggctgag
caccgtggcggggcggcagcgggtggcggctcggggtgtttcggcggaggtgctgctgatgtaattaaagtaggc
ggcttgagacggcggatggctcaggtgaggtgtggcagggctgagatccagctgttggggtgagtactccctctcaa
aagcgggcattactctcgcgtaagattgtcagttccaanaacgaggaggatttgatattcacctggccccgatctggcc
atacactgagtgacaatgacatccacttgccttctctccacaggtgtccactcccaggtccaagttgggcgccacc
atggagttgggctgagctggccttctctcgcgattttaaagggtgtccaggtg-
gagggtcagctgggtggagtctgggggaggcttggtagcagccccggcaggttccctgagactctcctgtcggcctctgg
attcacctttagatgattatgccaatgcactgggtccggcaagctccagggaaaggcctggaatgggtctcagctatcact
ggaatagtggtcacatagactatgcggactctgtggagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactc
cctgtatctgcaaatgaacagctctgagagctgaggatacggccgtatattactgtgcgaaagctcgtaccttagcacc
gcgtcctccttgactattggggccaaggtaccctggcaccgtctcagtgctgcgaccaagggccatcggcttcc
cctggcacctcctccaagagcacctctgggggcacagcggcctgggctgctggtcaaggactacttccccga
accggtgacgggtgctggtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtctacagctcctcag
gactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatc
acaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccg
tgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagcttctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcc
cggaccctgaggctacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgagggtcaagttcaactggtacgtgg
acggcgtggagggtgataatgccaagacaagccgaggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcag
cgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaaatggcaaggagtacaagtgaaggctccaacaagccctcca
gccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatc
ccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtg
gagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttc
ttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgttctctcatgtcctcgatgcatga
ggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa-
tgcttggcaagggtaccaatgttttaatggcggatgggtctattgaaatgtattgaaaacattgagggtgtaataaggta

10

20

30

40

tgggtaaagatggcagacctcgtgaggtaattaaattgccagaggaagagaaactatgtacagcgtcgtgcagaa
 aagtcagcacagagcccacaaaagtgactcaagtcgtgaagtgccagaattactcaagttacgtgtaatgcgaccc
 atgagttgggtgtagaacacctcgtagtgccgccggttctcgtaccattaagggtgtcgaatatttgaagttactttt
 gagatgggcaaaaagaaagccccgacggtagaattgttgagctgtcaaggaagttcaaagagctaccaatat
 ctgaggggctgagagagccaacgaattagtagaatcctatagaaaggctcaaataaagctattttgagtggaacta
 ttgagggccagagatcttctcgttgggttccatgttcgtaaagctacctaccagacttacgctccaattcttatgagaat
 gaccacttttcgactacatgcaaaaaagtaagttcatctcaccattgaagggtccaaaagctactgttattacttggtt
 atggattggtgatggattgtctgacagggcaacttttcggtgattccagagatacttctttagtgaacgtgttactgaat
 atgctgaaaagtgaattgtgcgccgagtataaggacagaaaagaaccacaagttgcaaaaactgttaattgtact
 ctaaagttgcagaggaatggtaatcgcaataatcttaatactgagaatccattatgggacgctattgttggcttaggatt
 ctgaaggacgggtgtcaaaaatattccttcttctgtctacggacaatatcggctactcgtgaaacatttctgtggtctaat
 tgattctgatggctatgttactgatgagcatggattaaagcaacaataaagacaattcacttctgtcagagatggttg
 gttcccttgcctcgttcttaggcttagtagtctcggtaacgcagaacctgtaagggtgacatgaatggcaccacaata
 aaattagttatgctatttatagtctggaggatgtttgcttaacgttcttcaaggtgtgccggctctaaaaaattcaggc
 ctgctcccgccgctgctttgcacgtgagtgccgaggattttatcaggtacaagaattgaaggaagacgattattatg
 ggattactttatctgatgattctgatcatcagttttgcttgccaaccagggtgtcgtccataat-
 atggacatgcgcggtgccgcccagctgctgggctgctgctgctgtggttccccggctcgcgatgcgacatccagatg
 acccagctccatccctcctgctgcatctgtaggggacagagtcaccatcacttctcgggcaagtcagggcatcaga
 aattacttagcctggatcagcaaaaaccagggaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccactttgcaatcag
 ggtcccatctcgggtcagtgccagtggtatcgggacagattcactctcaccatcagcagcctacagcctgaagatgt
 tgcaacttactgtcaaaaggataaccgtgcaccgtatactttggccaggggaccaaggtggaaatcaaactgac
 ggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgctgctg
 aataactctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
 gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcaccctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta
 cgagaaacacaaaagtctacgcctgcaaggtcacccatcagggcctgagctcggccgtcacaagagacttcaacag
 gggagagtgt -3'

10

20

p T T 3 ベクター - 重鎖 - インテイン - 軽鎖

【 0 4 2 9 】

以下の構築物では、上記構築物との唯一の違いは、(青色で示した) S・セレピンエに
 固有のエクステイン配列を含むことである。示した配列は、D 2 E 7 重鎖コード領域の末
 端(赤色で示した最後の9塩基対)からD 2 E 7 軽鎖コード領域の5'末端(ピンク色で
 示した最初の9塩基対)までである。

30

【 0 4 3 0 】

表 2 1 . p T T 3 - H C - V M A i n t - L C - 1 a a における部分コード配列(配
 列番号 1 2 5)

【 0 4 3 1 】

【 化 2 8 】

5'-ccgggtaa-ggg-
 tgctttgccaagggtagcaatgtttaaattggcggatgggtctattgaatgtattgaaaacattgaggtggaataaggta
 tgggtaaagatggcagacctcgtgaggtaattaaattgccagaggaagagaaactatgtacagcgtcgtgcagaa
 aagtcagcacagagcccacaaaagtgactcaagtcgtgaagtgccagaattactcaagttacgtgtaatgcgaccc
 atgagttgggtgtagaacacctcgtagtgccgccggttctcgtaccattaagggtgtcgaatatttgaagttactttt
 gagatgggcaaaaagaaagccccgacggtagaattgttgagctgtcaaggaagttcaaagagctaccaatat
 ctgaggggctgagagagccaacgaattagtagaatcctatagaaaggctcaaataaagctattttgagtggaacta
 ttgagggccagagatcttctcgttgggttccatgttcgtaaagctacctaccagacttacgctccaattcttatgagaat
 gaccacttttcgactacatgcaaaaaagtaagttcatctcaccattgaagggtccaaaagctactgttattacttggtt

40

atggattggtgatggattgtctgacagggcaacttttcggtgattccagagataacttcttgatggaacgtgtactgaat
 atgctgaaaagtgaaattgtgctgcccagagataaggacagaaaagaaccacaagttgccaaaactgttaattgtact
 ctaaagttgtcagaggtaatggatttcgcaataatcttaatactgagaatccattatgggacgctattgttggcttaggatt
 ctgaaggacgggtgcaaaaatattccttcttctgtctacggacaatatcgggtactcgtgaaacatttctgtggtcta
 tgattctgatggctatgttactgatgagcatggatfaaagcaacaataaagacaattcatacttctgtcagagatggttg
 gttccctgtcgtctttaggcttagtagtctcggtaacgcagaacctgctaagggtgacatgaatggcaccacaata
 aaattagttatgctatttatagtctggggagatgtttgcttaacgttcttcgaagtgtccggctctaaaaaattcaggc
 ctgctcccggcgtgctttgcacgtgagtgccgaggattttatcaggtacaagaattgaaggaagacgattattatg
 ggattactttatctgatgattctgatcatcagttttgcttgccaaccagggtgtcgtccataat-tgc-atggacatg-3'

重鎖 3' 配列 - インテイン - エクステイン - 軽鎖 5' 配列

10

【 0 4 3 2 】

表 2 2 . p T T 3 - H C - V M A i n t - L C - 3 a a (配列番号 1 2 6)

【 0 4 3 3 】

【 化 2 9 】

ccgggtaaataatgctcgggtgctttgccaagggtaccaatgttttaatggcggatgggtctattgaatgtattgaaaacatt
 gaggttggaataaaggatcatgggtaaagatggcagacctcgtgaggaatfaaattgccagaggaagagaaaactat
 gtacagcgtcgtgcagaaaagtcagcacagagcccacaaaagtgactcaagtcgtgaagtgccagaattactcaa
 gtttacgtgtaatgacgacctgagttggtttagaacacctcgtagtgccgcttctgtctaccattaagggtgtc
 gaatatttgaagttactttgagatgggcaaaaagaaagccccgacggtagaattgttgagctgtcaaggaagt
 tcaaagagctacccaatatctgaggggctgagagagccaacgaattagtagaatcctatagaaaggcttcaata
 aagcttattttagtgactattgaggccagagatcttctctgttgggtcccatgttcgtaaagctacctaccagactac
 gctccaattctttatgagaatgaccacttttcgactacatgcaaaaagtaagttcatctcaccattgaagggtcaaaa
 gtactgtctatttacttggttatggattggtgatggattgtctgacagggcaacttttcggtgattccagagatacttcttg
 atggaacgtgttactgaatatgctgaaaagtgaaattgtgcccagagataaggacagaaaagaaccacaagttgc
 caaaactgttaattgtactctaaagttgtcagaggtaatggatttcgcaataatcttaataactgagaatccattatgggac
 gctattgtggcttaggattctgaaggacgggtgcaaaaatattccttcttctgtctacggacaatacgggtactcgtgaa
 acatttctgtcgttctaattgattctgatggctatgttactgatgagcatggtattaagcaacaataaagacaattcata
 ctctgtcagagatgggttgggttccctgtcgttctttaggcttagtagtctcgggtaacgcagaacctgctaagggtgaca
 tgaatggcaccacaataaaaattagttatgctatttatagtctggggagatgtttgcttaacgttcttcgaagtgtccg
 gctctaaaaaattcaggcctgctcccggcgtgctttgcacgtgagtgccgaggattttatcaggtacaagaattga
 aggaagacgattattatgggattactttatctgatgattctgatcatcagttttgcttgccaaccagggtgtcgtccataattg
 cggagaaatggacatg

20

30

重鎖 3' 配列 - インテイン - エクステイン - 軽鎖 5' 配列

【 0 4 3 4 】

シネコシステイス種 *S t r a i n P C C 6 8 0 3 D n a E* インテイン：合成、P C R 増幅及びクローニング

シネコシステイス種 *S t r a i n P C C 6 8 0 3 D n a E* インテインは、天然に分裂したインテインである (N C B I アクセション # S 7 6 9 5 8 及び S 7 5 3 2 8) 。本発明者らは、このインテインの N 末端半分と C 末端半部分を、統合的に合成することによって 1 個のオープンリーディングフレームとして連結した。所望のタンパク質配列のコード配列を、C H O 細胞中での発現用にコドン最適化した (www.geneart.com) 。得られたヌクレオチド配列を表 2 3 に示す。

40

【 0 4 3 5 】

表 2 3 . *S s p - D i* (モンゴルキヌゲネズミ (*C r i c e t u l u s g r i s e u s*) における発現用に最適化されたコード配列) (配列番号 1 2 7 及び 1 2 8 も参照)

【 0 4 3 6 】

【化30】

KpnI EcoRI

GGCGAATTGGGTACCGAATTCCTGCCTGTCCCTTCGGCACCAGATCCTGACCGTGGAGTA
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCCGCTTAACCCATGGCTTAAGACGGACAGGAAGCCGTGGCTCTAGGACTGGCACCTCAT
C L S F G T E I L T V E Y
 CGGCCCTCTGCCATCGGCAAGATCGTGTCCGAAGAGATCAACTGCTCCGTGTACTCCGT
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

GCCGGGAGACGGATAGCCGTTCTAGCACAGGCTTCTCTAGTTGACGAGGCACATGAGGCA
G P L P I G K I V S E E I N C S V Y S V
AccI

GGACCTGAGGGCCGGTGTATACTCAGGCCATCGCCCAGTGGCACGACCGGGGCGAGCA
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCTGGGACTCCCGGCCACATATGAGTCCGGTAGCGGGTCACCGTGTGGCCCCGCTCGT
D P E G R V Y T O A I A O W H D R G E O

10

AgeI

GGAGGTGCTGGAGTACGAGCTGGAGGACGGCTCCGTGATCCGGGCCACCTCCGACCACCG
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCTCCACGACCTCATGCTCGACCTCCTGCCGAGGCACTAGGCCCGGTGGAGGCTGGTGGC
E V L E Y E L E D G S V I R A T S D H R

PvuII BglIII PvuII BspMI

GTTTCTGACCACCGACTATCAGCTGCTGGCCATCGAGGAGATCTTCGCCCGGCAGCTGGA
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CAAAGACTGGTGGCTGATAGTTCGACGACCGGTAGCTCCTCTAGAAGCGGGCCGTCGACCT
F L T T D Y O L L A I E E I F A R O L D

20

BstNI BstNI

CCTGCTGACCCTGGAGAACATCAAGCAGACCGAGGAGGCCCTGGACAACCACCGGCTGCC
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGACGACTGGGACCTCTTGTAGTTTCGTCTGGCTCCTCCGGGACCTGTTGGTGGCCGACGG
L L T L E N I K Q T E E A L D N H R L P

BstXI BstNI

TTTCCCTCTGCTGGACGCCGGCACCATCAAGATGGTGAAGGTGATCGGCAGGCGGTCCCT
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAAGGGAGACGACCTGCGGCCGTGGTAGTTCTACCACTTCCACTAGCCGTCCGCCAGGGA
F P L L D A G T I K M V K V I G R R S L

GGGCGTGCAGCGGATCTTCGACATCGGCCTGCCTCAGGACCACAACCTTCTGCTGGCCAA
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCCGCACGTCGCCTAGAAGCTGTAGCCGGACGGAGTCCTGGTGTGAAAGACGACCGGTT
G V Q R I F D I G L P Q D H N F L L A N

30

NarI

KasI SacI

HaeII HindIII

CGGCGCCATCGCCGCAACAAGCTTGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTC
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCCGCGGTAGCGGCGGTTGTTTCGAACTCGAGGTCGAAAACAAGGG

G A I A A N
 1

【0437】

上記合成DNAをテンプレートとして使い、Platinum Taq Hi Fidelity Supermix (Invitrogen)を用いた、シネコシステイス種 Strain PCC6803 DnaEインテインの増幅に以下のオリゴヌクレオチドを使用した。S.セレピシエVMAインテインを用いて実施したように、これらのプライマーは、pTT3-HcintLCベクターへのPCR産物の相同組み換え用配列と同様に、エクステイン配列も導入して、0aa、1aa及び3aaバージョンを作製する：

【0438】

【化 3 1】

Ssp-geneart-5'-HR:

CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGCCTGTCC
TTCGGCACCGAG (配列番号 129)

Ssp-geneart-3'-HR:

GCAGCAGGCCAGCAGCTGGGCGGGCACGCGCATGTCCATGTTGGCG
GCGATGGCGCCGTTGGCC (配列番号130)

Ssp-GA-1aa-5'-HR:

CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATATTGCCTG
TCCTTCGGCACCGAG (配列番号131)

10

Ssp-GA-1aa-3'-HR:

GCAGCAGGCCAGCAGCTGGGCGGGCACGCGCATGTCCATACAGTTGG
CGGCGATGGCGCCGT (配列番号 132)

Ssp-GA-3aa-5'-HR:

CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGCCGAGTAT
TGCCTGTCCTTCGGCACCGAG (配列番号 133)

20

Ssp-GA-3aa-3'-HR:

CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGCCGAGTAT
TGCCTGTCCTTCGGCACCGAG (配列番号 134)

【 0 4 3 9】

PCRを以下のプログラムによって実施した。

【 0 4 4 0】

【表 1 0】

段階	1	2	3	4	5	6	7	8
温度	94℃	94℃	60℃	68℃	段階2 に戻る (34 回)	68℃	4℃	終了
時間	2分間	30秒 間	30秒 間	1分間		5分間	保持	

30

【 0 4 4 1】

pTT3-HcintLCへの、コドンが最適化されたシネコシステイス種 Strain PCC6803 DnaEインテインの相同組み換えを得るために、以下の戦略を用いた。PCR産物をゲル精製し、各々を溶出緩衝剤 Qiaquick Gel Extractionキット (Qiagen) 50ul中に溶出させた。(VMAインテインを用いた相同組み換えに使用したのと同じ)ベクターPCR産物2μlをエッペンドルフ管中で所望のシネコシステイス種 Strain PCC6803 DnaEインテインPCR産物(別個の管中の0aa、1aa又は3aa)2μlと混合した。次いで、核酸をE.コリに転換し、LB+アンピシリンプレートに蒔き、次いで37で終夜インキュベートした。コロニーを培養物2mlに増殖させ、Wizard prepキット (Promega)を用いてDNAの準備をし、制限エンドヌクレアーゼ消化及びアガロースゲル電気泳動によって分析した。正確な制限パターンを生成するクローンをDNA配列に関して分析して、所望の配列が存在することを確認する。

40

50

【 0 4 4 2 】

シネコシステイス種 S t r a i n P C C 6 8 0 3 D n a E インテインを利用して、
D 2 E 7 重鎖 - インテイン - D 2 E 7 軽鎖に対する 3 個の発現構築物を設計した： p T T
3 - H c - S s p - G A - i n t - L C - 0 a a (図 1 6 のプラスミドマップ参照)、 p
T T 3 - H c - S s p - G A - i n t - L C - 1 a a 及び p T T 3 - H c - S s p - G A
- i n t - L C - 3 a a 。

【 0 4 4 3 】

表 2 4 . プラスミド p T T 3 - D 2 E 7 重鎖 - S s p - G A - インテイン - D 2 E 7
軽鎖全体の配列 (配列番号 1 3 5)

【 0 4 4 4 】

10

【 化 3 2 】

5'-

g c g g c c g c t c g a g g c c g g c a a g g c c g g a t c c c c c g a c c t c g a c c t c t g g c t a a t a a a g g a a a t t t t t c a t t g c a a
f a g t g t g t t g g a a t t t t t g t g t c t c a c t c g g a a g g a c a t a t g g g a g g g c a a a t c a t t t g g t c g a g a t c c c t c g g a g a t c
t c t a g c t a g a g g a t c g a t c c c c g c c c c g g a c g a a c t a a a c c t g a c t a c g a c a t c t c t g c c c t t c t c g c g g g g c a g t
g c a t g t a a t c c c t c a g t t g g t t g g t a c a a c t t g c c a a c t g g g c c c t g t t c c a c a t g t g a c a c g g g g g g g a c c a a a c
a c a a g g g g t t c t c t g a c t g t a g t t g a c a t c c t a t a a a t g g a t g t g c a c a t t t g c c a a c a c t g a g t g g c t t t c a t c c t g g
a g c a g a c t t t g c a g t c t g t g g a c t g c a a c a c a a c a t t g c c t t a t g t g t a a c t t g g t g a a g c t t a c a c c a a t g c t g
g g g g a c a t g t a c c t c c c a g g g g c c a g g a a g a c t a c g g g a g g c t a c c a a c g t c a a t c a g a g g g g c c t g t g t a
g c t a c c g a t a a g c g g a c c c t c a a g a g g g c a t t a g c a a t a g t g t t a t a a g g c c c c t t g t a a c c t a a a c g g g t a g c
a t a t g c t t c c g g g t a g t a g t a t a t a c t a t c c a g a c t a a c c t a a t c a a t a g c a t a t g t t a c c c a a c g g g a a g c a t a t g
c t a t c g a a t t a g g g t a g t a a a a g g g t c c t a a g g a a c a g c g a t a t c t c c c a c c c a t g a g c t g t c a c g g t t t t a t t a c a
t g g g g t c a g g a t t c c a c g a g g g t a g t g a a c c a t t t a g t c a c a a g g g c a g t g g c t g a a g a t c a a g g a g c g g g c a g t
g a a c t c t c t g a a t c t c g c c t g c t t c t c a t t c i c c t t g t t a g c t a a t a g a a a a c t g c t g a g t t g t a a c a g t a a g g t g t
a t g t g a g g t g c t c g a a a c a a g g t t c a g g t g a c g c c c c a g a a t a a a a t t g g a c g g g g g t c a g t g g t g g c a t t
g t g c t a t g a c a c c a a t a t a a c c t c a c a a a c c c c t t g g g c a a t a a t a c t a g t g t a g g a a t g a a c a t t c t g a a t a t c t
t t a a c a a t a g a a a t c c a t g g g g t g g g g a c a a g c c g t a a a g a c t g g a t g t c c a t c t c a c a c g a a t t a t g g c t a t g g g c
a a c a c a t a a t c c t a g t g c a a t a t g a t a c t g g g g t t a t a a g a t g t g t c c c a g g c a g g g a c c a a g a c a g g t g a a c c a t
g t t g t t a c a c t c t a t t t g t a c a a g g g g a a g a g a g t g g a c g c c g a c a g c a g c g g a c t c c a c t g g t t g t c t a a c a c
c c c c g a a a t t a a a c g g g g t c c a c g c c a a t g g g g c c a t a a c a a a g a c a a g t g g c c a c t c t t t t t t g a a t t g t
g g a g t g g g g c a c g c g t c a g c c c c a c a c g c c c c t g c g g t t t g g a c t g t a a a t a a g g g t g t a a a c t t g g c t
g a t t g t a a c c c c g t a a c c a c t g c g g t c a a a c c a c t t g c c a c a a a a c c a c t a a t g g c a c c c c g g g g a a t a c c t g c
a t a a g t a g g t g g g c g g g c c a a g a t a g g g g c g g a t t g t c g a t c t g g a g g a c a a a t t a c a c a c a c t t g c g c c t g a
g c g c c a a g c a c a g g g t g t t g g t c c a t t c a c g a g g t c g t g a g a c a c g g t g g g c t a a t g t g c a t g g g t a g c
a t a t a c t a c c c a a a t a t c t g g a t a g c a t a t g c t a t c c t a a t c t a t a t c t g g g t a g c a t a g g c t a t c c t a a t c t a t a t c t g g t
a g c a t a t g c t a t c c t a a t c t a t a t c t g g g t a g t a t a t g c t a t c c t a a t t a t a t c t g g g t a g c a t a g g c t a t c c t a a t c t a t a t c
t g g g t a g c a t a t g c t a t c c t a a t c t a t a t c t g g g t a g t a t a t g c t a t c c t a a t c t g t a t c c g g g t a g c a t a t g c t a t c c t a a t a
g a g a t t a g g g t a g t a t a t g c t a t c c t a a t t a t a t c t g g g t a g c a t a t a c t a c c c a a a t a t c t g g a t a g c a t a t g c t a t c c t a
a t c t a t a t c t g g g t a g c a t a t g c t a t c c t a a t c t a t a t c t g g g t a g c a t a g g c t a t c c t a a t c t a t a t c t g g g t a g c a t a t g c t
a t c c t a a t c t a t a t c t g g g t a g t a t a t g c t a t c c t a a t t a t a t c t g g g t a g c a t a g g c t a t c c t a a t c t a t a t c t g g g t a g c a t
a t g c t a t c c t a a t c t a t a t c t g g g t a g t a t a t g c t a t c c t a a t c t g t a t c c g g g t a g c a t a t g c t a t c c t a t g a t a a g c t g c
a a a c a t g a g a a t t t c t g a a g a c g a a a g g g c c t c g t g a t a c g c c a t t t t a t a g g t a a t g t c a t g a t a a a t a a t g g t t c t
t a g a c g t c a g g t g g c a c t t t c g g g g a a a t g t g c g c g g a a c c c a t t t g t t a t t t t c t a a a t a c a t t c a a a t a t g t a t c c
g c t a t g a g a c a a a a c c c t g a t a a a t g c t t c a a t a a t t g a a a a g g a a g a g a t a g a g t a t t c a a c a t t c c g t g t c
g c c t a t c c c t t t t t g c g g c a t t t g c c t t c c t g t t t t g t c a c c c a g a a a c g c t g g t g a a a g t a a a g a t g c t g a a g a t

20

30

40

cagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttcgccccgaagaa
cgtttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcgggtattatcccgtgtgacgccgggcaagagcaactc
ggtcggcgatacactattctcagaatgacttggtgagctaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatga
cagtaagagaattatgcagtgtccataacatgagtgataaactgcccgaacttactctgacaacgatcggga
ggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctg
aatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgctcgcagcaatggcaacaacggtgcgcaaaactatta
actggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccactt
ctgcgctcggccctccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcgggtatcattgca
gcactggggccagatggttaagccctcccgtatcgtagtatctacacgacggggagttaggcaactatggatgaacg
aaatagacagatcgcigagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgacagcaagttactcatatatacttta
gattgatttaaaactcatttttaattaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaatacccttaacg
tgagtttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttctgagatcctttttctgcgcgtaatct
gctgctgcaaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttccgaa
ggtaactggctcagcagagcgcagataccaaatactgttcttagtgtagccgtagttaggccaccactcaagaac
tctgtagcaccgcctacatacctcgtctgctaactctgttaccagtggtgctgctgccagtgggcgataagtcgtgtcttacc
gggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacggggggtcgtgcacacagccc
agctggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggccacgctcccga
gggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctcggaaacaggagagcgcacgagggagctccaggg
ggaaacgcctggtaictttatagctctgctgggttcgccacctctgactgagcgtcgatttttgtatgctcgtcagggg
gaggagcctatgaaaaacgccagcaacgcggccttttaccggttctgctggccttttctgctcactgttcttct
ctgcttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataaccgctcggcgcagccgaacgacc
gagcgcagcagcagtgagtgagcaggaagcggaaagagcggcccaatacgcgaaaccgcctctccccgcgctggc
cgattcattaatgcagctggcagcagcaggttcccactggaagcgggagtgagcgcacgcaattaatgtgagt
tagctcactcattaggcaccacaggctttacactttatgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatt
tcacacaggaacagctatgacctatgacctacgccaagctctagctagaggctgaccaattctcatgtttgacagcttat
catcgcagatccgggcaacggtgttccattgctgcagggcgcagaactggttaggtatggaagatctatacattgaatc
aatattggcaattagccatattagctattggttatatagcataaatcaatattggctattggccattgcatacgtgtatctat
atcataatgtacattatattggctcatgtccaatagaccgcatgttgacattgattattgactagttattaatagtaac
aattacggggtcattagttcatagcccatatattggagtccgctacataacttacggtaaatggcccgcctggctgac
cgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactttccattgac
gtcaatgggtggagtatttacggtaactgccacttggcagtcacaaagtgtatcatatgccaagtccgccccctatt
gacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagtcacatgaccttacgggactttcctacttggcagtcaca
tctacgtattagctatcgtattaccatggtgatgcgggtttggcagtcaccaatgggctggatagcgggttggactcac
ggggatttccaagcttccacccattgacgtcaatgggagttgtttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgt
cgttaataaccccgccccgtgacgcaaatggcggtagggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctcgtt
agtgaaccgtcagatcctcactcttccgcatcgtctcgcagggccagctgttgggctcgcggtgaggacaac
tcttcgcggtcttccagctcttggatcggaaaaccgctcggcctccgaacggtactccgccaccgagggacctgag
cgagtcggcatcgaccggatcggaaaaccctcgcagaaaaggcgtcaaccagtcacagtcgcaaggtaggctgag
caccgtggcgggcccagcgggtggcgggtcggggtgttctggcggagggtgctgctgatgataaataagtaggc
ggcttgagacggcggatggtcagggtaggtgtggcaggctgagatccagctgttggggtgagactccctctcaa
aagcgggcattacttctcgcgtaagattgtcagttccaaaaacgaggaggattgatattcactggcccgatctggcc
atacacttgagtgacaatgacatccactttgccttctcaccaggtgtccactcccagggtccaagtttggcggccacc
atggagttgggctgagctggcttttctgtcgcgattttaaagggtgccagtg-
gaggtgcagctggtggagcttgggggaggcttggacagcccggcaggctccctgagactctcctgtcggcctctgg
attcactttgatgattatgccatgactgggtccggcaagctccaggggaaggcctggaatgggtctcagctatcactt
ggaatagtggtcacaatagactatgcggactctgtggaggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactc
cctgtatctgcaaatgaacagctctgagagctgaggatacggccgtatattactgtcgaagaagctcgtaccttagcacc
gctcctcccctgactattggggccaaggtaacctgtaccgctcgcagtgctgacccaaggggccatcggcttcc
ccctggcaccctcctcaagagcacctctgggggacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccga
accggtgacggtgtcgtggaactcaggcggcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgcctacagctcctcag

10

20

30

40

gacttactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcctggtggcaccagacctacatctgcaacgtgaatc
acaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccg
tgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagcttctcttcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcc
cggacccttgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtaagttcaactggtacgtgg
acggcgtggagggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcag
cgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcca
gccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatc
ccgggatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtg
gagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctcctc
ttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatga
ggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcccgtgctccgggtaaa-
tgctgtccttcggcaccgagatcctgaccgtggagtacggccctctgcctatcggcaagatcgtgtccgaagagatc
aactgctccgtgtactccgtggaccctgagggccgggtgtatactcaggccatcgcccagtggcacgaccggggcg
agcaggaggtgctggagtacgagctggaggacggctccgtgatccgggccacctccgaccaccgggttctgaccac
cgactatcagctgctggccatcgaggagatcttcgcccggcagctggacctgctgacctggagaacatcaagcag
accgaggaggccctggacaaccaccggctgccttccctctgctggacgccggcaccatcaagatggtgaaggtga
tcggcagggcgtccctgggctgacgcggatcttcgacatcggcctgcctcaggaccacaacttctgctggccaac
ggcgccatcgcccacaac-
atggacatgctcgtgcccggccagctgctgggctgctgctgctggttccccggctcgcgatgacatccagatg
accagcttccatcctcctgctgcatctgtaggggacagagtcaccatcactgtcgggcaagtcagggcatcaga
aattacttagcctggtatcagcaaaaaccagggaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccactttgcaatcag
gggtcccatctcgggtcagtgagcagtggtatctgggacagattcactctcaccatcagcagcctacagcctgaagatgt
tgcaacttattactgtcaaaaggtataaccgtgcaccgtatactttggccaggggaccaaggtggaaatcaaacgtac
ggtggctgcaccatctgtcttcatctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctg
aataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcaccctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta
cgagaaacacaaagtctacgcctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgcctgcacaaagagcttcaacag
gggagagtgt -3'

10

20

p T T 3 ベクター - 重鎖 - インテイン - 軽鎖

【 0 4 4 5 】

以下の構築物では、上記構築物との唯一の違いは、（青色で示した）シネコシステイス
種 S t r a i n P C C 6 8 0 3 に固有のエクステイン配列を含むことである。示した配
列は、D 2 E 7 重鎖コード領域の末端（赤色で示した最後の 9 塩基対）から D 2 E 7 軽鎖
コード領域の 5 ' 末端（ピンク色で示した最初の 9 塩基対）までである。

30

【 0 4 4 6 】

表 2 5 . p T T 3 - H C - S s p - G A - i n t - L C - 1 a a、コード配列の関連
部分（配列番号 1 3 6）

【 0 4 4 7 】

【 化 3 3 】

Ccgggtaaa-tatt-
gcctgtccttcggcaccgagatcctgaccgtggagtacggccctctgcctatcggcaagatcgtgtccgaagagatca
actgctccgtgtactccgtggaccctgagggccgggtgtatactcaggccatcgcccagtggcacgaccggggcga
gcaggaggtgctggagtacgagctggaggacggctccgtgatccgggccacctccgaccaccgggttctgaccacc
gactatcagctgctggccatcgaggagatcttcgcccggcagctggacctgctgacctggagaacatcaagcaga
ccgaggaggccctggacaaccaccggctgccttccctctgctggacgccggcaccatcaagatggtgaaggtgat

cggcagggcgtccctgggctgacgcggatcttcgacatcggcctgcctcaggaccacaacttctgctggccaacg
gcgcatcggcccacaac-tgt-atggacatg

40

p T T 3 ベクター - 重鎖 - インテイン - 軽鎖

【 0 4 4 8 】

50

表 26 . p T T 3 - H C - S s p - G A - i n t - L C - 3 a a - コード配列の
関連部分 (配列番号 1 3 7)

【 0 4 4 9 】

【 化 3 4 】

Ccgggtaaa-gccgagtatt-
gcctgtccttcggcaccgagatcctgaccgtggagtacggccctctgcctatcggaagatcgtgtccgaagagatca
actgtccgtgtactccgtggaccctgaggccgggtgtatactcaggccatcgccagtgccacgaccggggcgga
gcaggaggtgtctggagtacgagctggaggacggctccgtgatccgggccacctccgaccaccggttctgaccacc
gactatcagctgtctggccatcgaggagatcttcgccggcagctggacctgtgacctggagaacatcaagcaga
ccgaggaggccctggacaaccaccggctgcctttccctctgctggacgccggccacctcaagatggtgaaggtgat
cggcaggcgggtccctggcggtgcagcggatcttcgacatcggcctgcctcaggaccacaacttctgctggccaacg
gcgccatcgccgccaac-tgtttcaac-atggacatg

10

p T T 3 ベクター - 重鎖 - インテイン - 軽鎖

【 0 4 5 0 】

また、表 8 A - 8 C は、変異 (セリンからトレオニンへ) パイロコッカス S s p . G B
D P o l インテインを用いた、D 2 E 7 インテイン融合タンパク質、発現ベクター及び
コード配列の関連配列である。

【 0 4 5 1 】

表 8 A . D 2 E 7 インテイン融合タンパク質のコード配列 (配列番号 4 8)

【 0 4 5 2 】

20

【 化 3 5 】

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
GGGAGGCTTGGTACAGCCCGCAGGTCCTGTGAGACTCTCCTGTGCGGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGC
ACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAATGGGTCTCAGCTATCACTTGAATAGTGGTCACATAGACTATGCG
GACTCTGTGGAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGC
TGAGGTACCGCCGTATATTACTGTGCGAAAGTCTCGTACCTTAGCACCCGCTCCTCCCTTGACTATTGGGGCCAAGGTAC
CCTGGTACCCGTCTCGAGTGCCTCGACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGA
CCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC
CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGC
CCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTC
CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG
ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA
CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA
CACCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAACCATTTTACCGGAAGAATGGGTT
CCACTAATTAACGAAAGTAAAGTAAAGATATTCCGCATTGGGGACTTCGTTGATGGACTTATGAAGGCGAACCAAGGAAAA
GTGAAGAAAACGGGGGATACAGAAGTTTTAGAAGTTCAGGAATTCATGCGTTTTCTTTGACAGGAAGTCCAAGAAGGCC
CGTGTAAATGGCAGTGAAGCCGTGATAAGACACCGTTATTCCGGAAATGTTTATAGAATAGTCTTAAACTCTGGTAGAAAAA
TAACAATAACAGAAGGGCATAGCCTATTTGTCTATAGGAACGGGGATCTCGTTGAGGCAACTGGGGAGGATGTCAAAATTG
GGGATCTTCTTGCAGTTCGAAGATCAGTAAACCTACCAGAGAAAAGGGAAACGCTTGAATATTGTTGAACTTCTTCTGAATCT
CTCACCGGAAGAGACAGAAGATATAATACTTACGATTCCAGTTAAAGGCAGAAAAGAACTTCTCAAGGGAATGTTGAGAAC
ATTACGTTGGATTTTTGGTGAGGAAAAGAGAGTAAGGACAGCGAGCCGCTATCTAAGACACCTTGAAAAATCTCGGATACAT

30

40

AAGGTTGAGGAAAATTGGATACGACATCATTGATAAGGAGGGGCTTGAGAAATATAGAACGTTGTACGAGAACTTGTGA
 TGTTGTCCGCTATAATGGCAACAAGAGAGAGATTTAGTTGAATTTAATGCTGTCCGGGACGTTATCTCACTAATGCCAGAG
 GAAGAACTGAAGGAATGGCGTATTGGAAGTAAATGGATTGAGATGGGACGTTTCGTAGATATTGATGAAGATTTTCC
 AAGCTTGATACGATAGCGGAGTCTACAGGGTTTATGTAAACGAGGAACTTAAGTTTACGGAATACAGAAAAGAAAAGAAT
 GTATATCACTCTCACATTGTTCCAAAGGATATTCTCAAAGAACTTTTGGTAAGGTCTCCAGAAAAATATAAGTTACAAGAA
 ATTTAGAGAGCTTGTAGAAAATGGAAAACCTTGACAGGGGAGAAAGCCAAACGCATTGAGTGGTACTTAACGGAGATATAGT
 CCTAGATAGAGTCGTAGAGATTAAGAGAGAGTACTATGATGGTTACGTTTACGATCTAAGTGTGATGAAGATGAGAATTTG
 CTGCTGGCTTTGGATTCTCTATGCACATAATGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGG
 GACAGAGTCACCATCACTTGTCCGGCAAGTCAGGGCATCAGAAATTACTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGC
 CCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCATCTCGGTTACAGTGGCAGTGGATCTGGGACAG
 ATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAGGTATAACCGTGCACCGTATAC
 TTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGAAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC
 AGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGG
 ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG
 CACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA

10

【 0 4 5 3 】

表 8 B . D 2 E 7 インテイン融合構築物のアミノ酸配列 (配列番号 4 9)

【 0 4 5 4 】

【 化 3 6 】

MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTLPEEWVPLIKNGKVKIFRIGDFVDGLMKAN
 QGKVKKTGDTEVLEVAGIHAFSFDRKSKKARVMAVKAVIRHRYSGNVYRIVLNSGRKITITEGHSLFVYRNGDLVEATGEDVKIGD
 LLAVPRSVNLPEKRERLNIVELLLNLSPEETEDIILTIPVKGRKNFFKGMRLRLRWIFGEEKRVRTASRYLRHLENLGYIRLRKIGYDI
 IDKEGLEKYRTLYEKLVDVRYNGNKREYLVEFNAVVDVSLMPEEELKEWRIGTRNGFRMGTFVDIDEDFAKLGYSVGVYRVYV
 NEELKFTEYRKKKNVYHSHIVPKDILKETFGKVFQKNISYKFKFRELVENGLDREKAKRIEWLLNGDIVLDRVVEIKREYYDGYVY
 DLSVDEDENFLAGFGFLYAHNDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSTLQSGVPSRFS
 GSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQW
 KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

20

30

【 0 4 5 5 】

表 8 C . D 2 E 7 インテイン融合構築物の発現ベクターの完全ヌクレオチド配列 (配列番号 5 0)

【 0 4 5 6 】

【化 3 7】

GAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGACGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTG
GCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCC
AATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTAC
ATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTG
GCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAT
CGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCA
CGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACG
GGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCAATGACGCAAATGGGCAGGGAATTCGAGCTC
GGTACTCGAGCGGTGTTCCGCGGTCCTCCTCGTATAGAACTCGGACCACTCTGAGACGAAGGC
TCGCGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCTAAGTGGGAGGGGTAGCGGTGTTGTCCACTAGGG
GGTCCACTCGCTCCAGGGTGTGAAGACACATGTCGCCCTCTTCGGCATCAAGGAAGGTGATTGG
TTTATAGGTGTAGGCCACGTGACCGGGTGTTCCTGAAGGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGC
GCGTTCGTCTCACTCTCTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGTTGA
GGACAAACTCTTCGCGGTCTTTCCAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTA
CTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGACTGTTG
GGGTGAGTACTCCCTCTCAAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTGAGTTTTCCAAAACG
AGGAGGATTTGATATTCACCTGGCCCGCGGTGATGCCTTTGAGGGTGGCCGCGTCCATCTGGTC
AGAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCTTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCTGGCCATACACTT
GAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAACCGGAAT

TGTACCCGCGGCCAGAGCTTGCCCGGGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTT
 GTCGCGATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA
 CAGCCCGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCGGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCA
 TGGTCCACATAGACTATGCGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAA
 GAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGATACGGCCGTATATTACTGTGCGA
 AAGTCTCGTACCTTAGCACCGCGTCTCCCTTGACTATTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGT
 CTCGAGTGCCTGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCT
 GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCT
 GTGGAAGTACAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGG
 ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC
 TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG
 ACAAAGTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCT
 CTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG
 GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG
 CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
 CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAG
 CCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG
 TGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGG
 TCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA
 ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC
 CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCTGAGGCTCT
 GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAACCAATTTTACCGGAAGAA
 TGGGTTCCACTAATTAACCGGTAAGTTAAGATATCCGCATTGGGGACTTCGTTGATGGACT
 TATGAAGGCGAACCAAGGAAAAGTGAAGAAAACGGGGGATACAGAAGTTTGAAGTTGCAGGA
 ATTCATGCGTTTTCTTTGACAGGAAGTCCAAGAAGGCCCGTGTAAATGGCAGTGAAGCCGTGAT
 AAGACACCGTTATCCGGAATGTTTATAGAATAGTCTTAAACTCTGGTAGAAAAATAACAATAAC
 AGAAGGGCATAGCCTATTTGTCTATAGGAACGGGATCTCGTTGAGGCAACTGGGGAGGATGTC
 AAAATTGGGGATCTTCTTGCAGTTCGAAGTCAAGATCAGTAAACCTACCAGAGAAAAGGGAACGTTGAA
 TATTGTTGAACCTTCTTCTGAATCTCACCGGAAGAGACAGAAGATATAACTTACGATTCCAGT
 TAAAGGCAGAAAGAACCTCTTCAAGGGAATGTTGAGAACATTACGTTGGATTTTTGGTGAGGAAA
 AGAGAGTAAGGACAGCGAGCCGCTATCTAAGACACCTTGAATACTCGGATACATAAGGTTGAG
 GAAAATTGGATACGACATCATTGATAAGGAGGGGCTTGAGAAATATAGAACGTTGTACGAGAAAC
 TTGTTGATGTTGTCGCTATAATGGCAACAAGAGAGATTTTAGTTGAATTTAATGCTGTCCGG
 GCGTTATCTACTAATGCCAGAGGAAGAACTGAAGGAATGGCGTATTGGAAGTGAAGTGGATT
 CAGAATGGGTACGTTCTGATAGATATTGATGAAGATTTTCCAAGCTTGGATACGATAGCGGAGTCT
 ACAGGGTTTATGTAACGAGGAACCTAAGTTTACGGAATACAGAAAGAAAAGAAATGTATATCACT
 CTCACATTGTTCCAAGGATATTCTCAAAGAACTTTTTGGTAAGGTCTTCCAGAAAAATATAAGTT
 ACAAGAAATTTAGAGAGCTTGTAGAAAATGGAAAACCTTACAGGGGAGAAAGCCAAACGCATTGAG
 TGGTTACTTAACGGAGATATAGTCTAGATAGAGTCGTAGAGATTAAGAGAGAGTACTATGATGG
 TTACGTTTACGATCTAAGTGTGATGAAGATGAGAATTTCTTGTCTGGCTTTGGATTCTCTATGC
 ACATAATGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGGGACAGAGTCA
 CCATCACTTGTGCGGCAAGTCAAGGCATCAGAAATTAAGCTTACGCTGGTATCAGCAAAAACCAGG
 GAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCATCTCGGTTCA
 GTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATGTTGC
 AACTTATTACTGTCAAAGGTATAACCGTGCACCGTATACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAAA
 TCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
 GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAA
 AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGG
 ACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT
 CTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTACAAAAGAGCTTCAACAGGGG
 AGAGTGTGAGCGGCCGCGTTTAAACTGAATGAGCGCGTCCATCCAGACATGATAAGATACATT
 GATGAGTTTGGACAAACCACAAGTGAATGCAGTGAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCA
 TTATGTTTTCAGGTTTCAAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGT
 GGTATGGCTGATTATGATCCGGCTGCCTCGCGGTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGT
 CATGCAGCTCCCGGAGACGGTCAAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCG
 TCAGGGCGCGTCAAGCGGTGTTGGCGGTGTCGGGGCGCAGCCATGACCGGTGACGGCGCGG
 CCTTTTTTTTTAATTTTTATTTTTATTTTTGACGCGCCGAAGGCGCGATCTGAGCTCGGTACA
 GCTTGGCTGTGGAATGTGTGTGATGAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGA

10

20

30

40

AGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAG
 CAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCC
 GCCCATCCCGCCCCTAACTCCCGCCAGTTCGGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTT
 TTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTT
 TTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGT
 AAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTATTTAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAAGTGC
 TCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTACTTCTGCTCTAAAAGCTG
 CGGAATTGTACCCGCGGCCTAATACGACTCACTATAGGGACTAGTATGGTTCGACCATTGAACTG
 CATCGTCGCCGTGTCCCAAATATGGGGATTGGCAAGAACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTC
 AGGAACGAGTTCAAGTACTTCAAAGAATGACCACAACCTCTTCAGTGGAAAGGTAACAGAATCT
 GGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTCTCCATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAA
 TTAATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTCTTGCCAAAAGTT
 TAGATGATGCCTTAAGACTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATA
 GTCGGAGGCAGTTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGA
 CAAGGATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCCAGAAATTGATTTGGGGAAATATAAA
 CTTCTCCCAGAATACCCAGGCGTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAGT
 TTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAAGCGGCCGAGCGCGCGGATCTGAAACGGGAGATGGGG
 GAGGCTAACTGAAGCACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAA
 AAGACAGAATAAAACGCACGGGTGTTGGGTGTTTTGTTTATAAACGCGGGGTTCCGTCCAGGG
 CTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCATTGGGGCCAATACGCCGCGTTTTCTTCTTT
 TCCCCACCCACCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGCTCGCAGCCAACGTGGGGCGGC
 AGGCCCTGCCATAGCCACTGCCCCGTGGTTAGGGACGGGTCCCCCATGGGAATGTTTTA
 TGGTTCGTGGGGTATTATTTGGGCGTTGCGTGGGGTCTGGAGATCCCCGGGCTGCAGGA
 ATTCGTTACACTTACGGTAAATGGCCGCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCATT
 GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGG
 TGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC
 CCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGG
 ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTATGCGGTTTTGGC
 AGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCAAAGTCTCCACCCATTGA
 CGTCAATGGGAGTTTGTGTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCAAATGTGTAACAACCTCCG
 CCCATTGACGCAAAGGGCGGGAATTCGAGCTCGGTACTCGAGCGGTGTTCCGCGGTCTCC
 TCGTATAGAACTCGGACCACTCTGAGACGAAGGCTCGCGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCT
 AAGTGGGAGGGGTAGCGGTGTTGTCCACTAGGGGGTCCACTCGCTCCAGGGTGTGAAGACAC
 ATGTGCGCCTCTTCGGCATCAAGGAAGGTGATTGGTTTATAGGTGTAGGCCACGTGACCGGGT
 TTCCTGAAGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGCGTTCGTCTCACTCTCTTCCGCATCGC
 TGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGTGGAGACAACTCTTCGCGGTCTTCCAGTAC
 TCTTGATCGGAAACCGTCCGCCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTC
 CGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGACTGTTGGGGTGAAGTACTCCCTCTCAAAGCGGGCA
 TGACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCAAAAACGAGGAGGATTTGATATTCACCTGGCCCGCG
 GTGATGCCTTTGAGGGTGGCCGCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCTT
 GAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCT
 CTCCACAGGTGTCCACTCCAGGTCCAACCGGAATTGTACCCGCGGCCAGAGCTTGGGGCGC
 CACCGCGGCCGCGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAATA
 GAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTAT
 AAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGT
 GTGGGAGGTTTTTTTCGGATCCTCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGT
 TATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCT
 AATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCCGGAAACCTG
 TCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAAAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGC
 TCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAG
 CTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTG
 AGCAAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTCTTCCATAG
 GCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGAC
 AGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACC
 CTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCT
 CACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACC
 CCCCCTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGA
 CACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGC
 GGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTAT
 CTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAA

10

20

30

40

ACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGAT
 CTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAA
 GGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCCTTTTAATTAATAAATGAAGT
 TTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAG
 GCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGAT
 AACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACG
 CTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGG
 TCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTT
 CGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTC
 GTTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGT
 TGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGT
 GTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTT
 TTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCT
 CTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAGTTAAAAGTGCTCATCATT
 GGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTA
 ACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA
 AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCAT
 ACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTT
 GAATGTATTTAGAAAAATAAAATAAGGGTTCGCGCGACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGA
 CGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTG
 TCTCGCGCTTTTCGGTGTGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACA
 GCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGG
 CGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGCACCATATG
 CGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTGCCATTCA
 GGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGA
 AAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTTACGACGTTG
 TAAAACGACGGCCAGTGAATT

【 0 4 5 7 】

表 9 . フランキング配列情報の限られた未変性 P s p - G B D P o l インテイン配列のアミノ酸配列 (N C B I アクセション N o . A A A 6 7 1 3 2 . 1) (配列番号 5 1)

【 0 4 5 8 】

【 化 3 8 】

N/SILPEEWVPLIKNGKVKIFRIGDFVDGLMKANQGKVKKTGDTEVLEVAGIHAFSFD
RKSKKARVMVAVKAVIRHRYSGNVYRIVLNSGRKITITEGHSLFVYRNGDLVEATGED
VKIGDLLAVPRSVNLPEKRERLNIVELLLNLSPEETEDIILTIPVKGRKNFFKGMLRTL
RWIFGEEKRVRTASRYLRHLENLGYIRLRKIGYDIIDKEGLEKYRTLYEKLVDVVRYN
GNKREYLVEFNAVRDVISLMPEEELKEWRIGTRNGFRMGTFVDIDEDFAKLLGYVY
SEGSARKWKNQTGGWSYTVRLYNENDEVLDDMEHLAKKFFGKVKRGKNYVEIPK
KMAYIIFESLCGTLAENKRVPEVIFTSSKGVRFWAFLEGYFIGDGDVHPSKRVRLSTK
SELLVNLVLLNLSLGVSAIKLGYDSGVYRVYVNEELKFTEYRKKKNVYHSHIVPKDI
LKETFGKVFQKNISYKKFRELVENGLDREKAKRIEWLLNGDIVLDRVVEIKREYYD
GYVYDLSVDEDENFLAGFGFLYAHN/SYYGYGYA

/ はスプライス部位であり、下線を引いたアミノ酸はインテイン配列であり、残りはエクステイン配列情報である。

【 実施例 2 】

【 0 4 5 9 】

免疫グロブリンポリタンパク質配列並びにキイロショウジョウバエヘッジホッグ自動プロセシングドメイン、C 1 7 及び C 2 5 配列を有するベクターの構築

抗体分子の効率的発現の更なる戦略は、ヘッジホッグドメインが重鎖と軽鎖の間に位置し、コレステロールが N 末端タンパク質に付加せずに成分タンパク質が遊離されるように、ヘッジホッグドメイン配列及び / 又は接合部配列が修飾された、ポリタンパク質発現である。かかる構築物内では、機能的切断配列がポリタンパク質内の各免疫グロブリン由来のタンパク質の分離を促進するように設けられている限り、関連する重鎖及び軽鎖の各々の 1 コピーが存在し得、又は軽鎖は複製されて、少なくとも 2 本の軽鎖を与え得、又は重

10

20

30

40

50

鎖と軽鎖の両方の複数のコピーがあり得る。特定の切断部位戦略（例えば、ヘッジホッグドメイン）は1回を超えて使用することができ、又は複数の切断部位に対して、各々が独立であり得る。したがって、異なるタンパク質分解プロセッシング配列又は酵素は、免疫グロブリン又は免疫グロブリン由来のタンパク質の少なくとも1個の末端に関して位置し得る。

【0460】

ゲノムDNAをテンプレートとして用い、Platinum Taq Hi Fidelity PCR Supermix (Invitrogen)を用いた、キイロショウジョウバエヘッジホッグC末端自動プロセシングドメイン(Hh-C)、配列Hh-C17、Hh-C17切断物(truncation)（及び変異を有するもの）及びHh-C25 (GenBankアクセッション#L02793.1)の増幅に以下のオリゴヌクレオチドを使用した。ゲノムDNAをショウジョウバエD.Mel-2細胞の凍結バイアル(Invitrogen、cat.#10831-014)から調製した。

【0461】

【化39】

C17-5': TGCTTCACGCCGGAGAGCAC (配列番号141)

C17-full-3' ATTATGGACGACAACCTGGTTGGCAA (配列番号142)

C25-actual-3': ATCGTGGCGCCAGCTCTGCG (配列番号143)

C17-3': GCAACTGGCGGCCACCGAGT (配列番号144)

C17-scya-3': CGCATAGCAACTGGCGGCCA (配列番号145)

C17-sc/hn-3': GTTGTGGGCGGCCACCGAGT (配列番号146)

【0462】

PCRを以下のプログラムによって実施した。

【0463】

【表11】

段階	1	2	3	4	5	6	7	8
温度	94°C	94°C	55°C	68°C	段階2 に戻る (34 回)	68°C	4°C	終了
時間	2分間	1分間	1分間	2.5分 間			5分間	保持

【0464】

E. コリ中のpTT3-HcintLC p. ホリコシイ構築物中への相同組み換えを介してD2E7重鎖-Hh-C-D2E7軽鎖の融合物を作製するために、オリゴヌクレオチドプライマーを設計した。PCRによって作製された(pTT3ベクター、重鎖及び軽鎖領域を含むが、P. ホリコシイインテインを含まない)ベクターとHh-Cドメイン挿入断片との間の40塩基対オーバーハングを操作することによって、連結の利点なしに、2個のDNA断片を混合し、E. コリに転換して、(最初のPCR産物が指示する種々のバージョンの)pTT3-HC-Hh-C-LCへの2個の断片のE. コリ相同組み換えを起こし得る。

【0465】

Hh-Cドメイン相同組み換えプライマー:

【0466】

【化40】

C17-HR5':

CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGCTTCACG
CCGGAGAGCAC (配列番号147)

C17-full-HR-3':

GCAGCAGGCCCAGCAGCTGGGCGGGCACGCGCATGTCCATGCACTGG
CTGTTGATCACCG (配列番号148)

10

C25-actual-HR-3':

GCAGCAGGCCCAGCAGCTGGGCGGGCACGCGCATGTCCATATCGTGGC
GCCAGCTCTGCG (配列番号149)

C17-HR3':

GCAGCAGGCCCAGCAGCTGGGCGGGCACGCGCATGTCCATGCAACTGG
CGGCCACCGAGT (配列番号150)

20

C17-scya-HR-3':

GCAGCAGGCCCAGCAGCTGGGCGGGCACGCGCATGTCCATCGCATAGC
AACTGGCGGCCA (配列番号151)

30

C17-sc/hn-HR-3':

GCAGCAGGCCCAGCAGCTGGGCGGGCACGCGCATGTCCATGTTGTGGG
CGGCCACCGAGT (配列番号152)

【0467】

pTT3 - H c i n t L C 相同組み換えプライマー:

【0468】

【化41】

pTT3int-HR5':

ATGGACATGCGCGTGCCCGCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGC (配列番号153)

40

pTT3int-HR3':

TTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTGCGTGTAGTGGT (配列番号154)

【0469】

Hh - CドメインのPCRを以下のプログラムで実施した: Pfu - I H i F i d
e l i t y DNA Polymerase (Stratagene) を使用した。

【0470】

50

【表 1 2】

段階	1	2	3	4	5	6	7	8
温度	94℃	94℃	60℃	72℃	段階2 に戻る (34 回)	72℃	4℃	終了
時間	2分間	1分間	1分間	1.5分 間			5分間	保持

10

【0471】

ベクターのPCRを以下のプログラムで実施した：Platinum Taq Hi Fidelity Supermix (Invitrogen)を使用した。

【0472】

【表 1 3】

段階	1	2	3	4	5	6	7	8
温度	94℃	94℃	60℃	68℃	段階2 に戻る (24 回)	68℃	4℃	終了
時間	2分間	30秒 間	30秒 間	10分 間		5分間	保持	

20

【0473】

pTT3-HcintLCへのHh-Cドメインの相同組み換えを実施するために、以下の戦略を用いた。PCR産物をゲル精製し、各々を溶出緩衝剤(Qiaquick Gel Extractionキット、Qiagen)50μl中に溶出させた。ベクターPCR産物3μlをエッペンドルフ管中で所望のHintドメインPCR産物(種々のバージョン)3μlと混合した。PCR増幅産物をE.コリに転換し、LB+アンピシリンプレートに蒔き、37で終夜インキュベートした。コロニーを培養物2mlに増殖させ、Wizard prepキット(Promega)を用いてプラスミドDNAを抽出し、DNA試料を制限エンドヌクレアーゼ消化及びアガロースゲル電気泳動によって分析した。正確な制限パターンを生成したクローンをDNA配列に関して分析して、所望の配列が作製されたことを確認した。

30

【0474】

キイロショウジョウバエヘッジホッグC末端自動プロセシングドメインを利用した、D2E7重鎖-Hh-C-D2E7軽鎖発現に対する5個の発現構築物を設計した：pTT3-HC-Hh-C17-LC、pTT3-HC-Hh-C17-SC-LC、pTT3-HC-Hh-C17-HN-LC及びpTT3-HC-Hh-C25-LC。

40

【0475】

表27. プラスミドpTT3-D2E7重鎖-Hh-C17-D2E7軽鎖全体の配列(配列番号155)

【0476】

【化 4 2】

5'-

gcgggcgcctcgaggccggcaaggccggatccccgacctcgacctctggctaataaaggaaatattttcattgcaa
tagtgtgttggaaatttttgtgtctctcactcgggaaggacataatgggaggggcaaatacatttggcgcgagatcccccgaggatc
tctagctagaggatcgcacccccggacgaactaaacctgactacgacatctctgccccctcttcgcggggcagt
gcatgtaatcccttcagttgggtgtgacaacttgccaactgggcccctgttccacatgtgacacggggggggaccaaac
acaaaggggttctctgactgtagtgcacatcctataaaatggatgtgcacatttgccaacactgagtggttcatcctgg
agcagactttgcagctctgtggactgcaacacaacattgcctttatgtgtaactcttggctgaagctcttacaccaatgctg
ggggacatgtacctcccagggggccaggaagactacgggagggtacaccaacgtcaatcagaggggacctgtgta
gctaccgataagcggaccctcaagagggcattagcaatagtgtttataaggccccctgttaaccctaaacgggtagc
atagtctccgggtagtagtataactatccagactaacctaaatcaatagcatagttaccacgggaagcatatg
ctatcgaattagggtagtaaaagggcctaaggaacagcgatactcccacccatgagctgacaggtttattaca
tggggcaggattccacgagggtagtaaccatfttagtcacaagggcagtggtgaagatcaaggagcgggcagt
gaactctctgaatcttcgctgcttctcattctccttcggtttagctaaatagaataactgctgagttgtgaacagtaagggtg
atgtgaggtgctcgaaaacaaggttcaggtgacgccccagaataaaatggacgggggggtcagtggtggcatt
gtgctatgacaccaataaacctcacaacccccgtggcaataaataactagtgtaggaatgaaacattctgaatatct
ttaacaatagaaatccatgggggtgggacaagccgtaaagactggatgtccatctcacacgaatftatggctatgggc
aacacataatcctagtgaatatgactgggggttaatagatgttcccaggcagggaccaagacaggtgaacat
gtgttacactctatttgaacaaggggaaagagagtgagcggcagcagcggactccactgggtgctcctaacac
ccccgaaaatgaacggggctccacgccaatggggcccataaacaagacaagtgccactcttttttgaatgtg
ggagtgggggcagcgtcagccccacacgcccctgcggttttgactgtaaaataagggtgtaataactggct
gattgtaaccccgtaaccactgcggtcaaaccactgcccacaaaaccactaatggcaccggggaataacctgc
ataagtaggtgggcccgaagatagggcgcgattgctgcatctggaggacaaattacacacactgcgctga
gcgccaagcacaggggtgttggctctatctacgaggtcgtgagagcaggtgggctaagtgtccatgggtagc
atatactacccaataatctggatagcatalgctatcctaatactatctgggtagcataggctatcctaatactatactgggt
agcatalgctatcctaatactatactgggtagtagtatgctatcctaattatatactgggtagcataggctatcctaatactatact
tgggtagcatatgctatcctaatactatactgggtagtagtatgctatcctaatactgtagcgggtagcatatgctatcctaata
gagattaggttagtagtatgctatcctaattatatactgggtagcatatactacccaataatctggatagcatalgctatccta
atctatactgggtagcatatgctatcctaatactatactgggtagcataggctatcctaatactatactgggtagcatatgct
atcctaatactatactgggtagtagtatgctatcctaattatatactgggtagcataggctatcctaatactatactgggtagcat
atgctatcctaatactatactgggtagtagtatgctatcctaatactgtagcgggtagcatatgctatcctcatgataagctgct
aaacatgagaatftctgaagacgaaagggcctcgtgatacgcctatfttatagggttaatgtcatgataataatggttct
tagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatftttctaaatacattcaaatatgtatcc
gctcatgagacaataacctgataaatgcttcaataatftgaaaaggaagagtagtagtattcaacatttccgtgct
gcccttattccctttttgcgccattttgccttctgttttgcaccagaaacgctgggtgaaagttaaagatgctgaagat
cagttgggtgacagagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcccccgaagaa
cgttttcaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtgtgacggggcaagagcaactc
ggtcggcgatacactattctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatga
cagtaagagaattatgcagtgctgcataaccatgagtgataacactgcgccaacttacttctgacaacgatcggga
ggaccgaaggagctaacccgtttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctg
aatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatggcaacaacggtgcaactatta
actggcgaacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccactt
ctgcgctcggccctccggctggctgggttattgctgataaatctggagccggtagcgtgggtctcgggtatcattgca
gactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacg
aaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttactcatatatacttta
gattgattaaaacttcaatfttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaatcccttaacg
tgagtttctgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaact
gctgcttgaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgttggcgatcaagagctaccaactcttttccgaa
ggtaactggctcagcagagcgcagatacacaataactgttctctagtgtagccgtagttaggccaccactcaagaac
tctgtagcaccgctacataacctcgtctgtaatcctgttaccagtggtgctgctgcccagtgggcgataagtcgtgttacc
gggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacgggggggtcgtgacacagccc

10

20

30

40

agcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggccacgcttcccgaa
 gggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctcggaacaggagagcgcacgagggagcttccaggg
 ggaaacgcctggatctttatagtcctgtcgggttcgccacctctgactgagcgtcgatttttgatgctcgcaggggg
 ggggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacgggtcctggccttttgccttttgctcacatgctcttc
 ctgcttatcccctgattctgtggataaccgfatfaccgctttgagtgagctgataccgctcgcgcgagccgaacgacc
 gagcgcagcagtcagtgagcaggaagcgggaagagcggccaatacgcacaaccgctctccccgcgcttggc
 cgattcattaatgcagctggcagcagaggttcccgactggaaagcgggagtgagcgcacaacgaattaatgtgagt
 tagctcactcattagccacccaggctttacactttatgcttccggctcgtatggtgtggaattgtgagcggataacaatt
 tcacacaggaaacagctatgaccatgattacgccaagctctagctagaggtcgaccaattctcatgtttgacagctat
 catcgcagatccgggcaacggtgttgcattgctgcaggcgcagaactggtaggtatggaagatctatacattgaatc
 aatattggcaattagccatattagtcattggttatatagcataaatcaatattggctattggccattgcatacgttgcattat
 atcataatatgtacattatattggctcatgtccaatatgaccgcatgttgacattgattatgactagtattataagtaatc
 aattacggggctcattagttcatagccatataatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgac
 cgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgac
 gtcaatgggtggagtaattacggtaaacgcccacttggcagfacatcaagtgtatcatatgccaagtccgccccctatt
 gacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagtcacatgacctacgggactttcctacttggcagtaca
 tctacgtattagtcacgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacaccaatgggcgtggaatagcggittgactcac
 ggggattccaagtctccacccccattgacgtcaatgggagtttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgt
 cgtaataacccccgcccgttgcagcaaatgggcggttaggcgtgtacggtgggaggctatataagcagagctcgitt
 agtgaaccgtcagatcctcactctctccgcacgctgtctgcgagggccagctgttgggctcgcgggtgaggacaac
 tctcgcggcttccagctacttggatcgaaacccgctcggcctccgaacgggtactccgccaccgagggacctgag
 cgagtcgcacgaccggatcggaaaacctctcgagaaaggcgtctaaccagtcacagtcgcaaggtaggctgag
 caccgtggcggggcgcagcgggtggcggctggggttggctggcggagggtgctgctgatgtaattaaagtaggc
 ggtcttgagacggcggatggtcaggtgaggtgtggcagggcttgagatccagctgttggggtgagctccctctcaa
 aagcgggcaacttctgcgtaagattgtcagttccaaaacgaggaggattgatattcacctggcccgatctggcc
 atacacttgagtgacaatgacatccactttgccttctctccacaggtgtccactcccaggccaagttgggcccacc
 atggagttgggctgagctggcttttcttgcgcattttaaaagggtgtccagtg-
 gaggtgcagctggtggagctgggggaggctggtacagcccggcaggctccctgagactctcctgtgcccctctgg
 attcacctttgatgattatgcatgactgggtccggcaagctccagggaaggcctggaatgggtctcagctatcactt
 ggaatagtggtcacatagactatgcccactctgtggaggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactc
 cctgtatctgcaaatgaacagctctgagagctgaggatacggccgtatattactgtgcaaaagtctcgtaccttagcacc
 gctcctcccttactattggggccaaggtaccctggtcaccgctctcagctgctgcgcaaaaggtctcgtaccttagcacc
 ccctggcaccctcctcaagagcaccctctgggggacagcggccctgggctgcttggtaaggactacttccccga
 accggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccttgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtctacagctcctcag
 gactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaaccagacctacatctgcaacgtgaatc
 aagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccg
 tggccagcaccctgaactcctgggggaccgtcagcttctcttcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcc
 cggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgagggtcaagttcaactggtacgtgg
 acggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtaaacagcagctaccgtgtggtcag
 cgtcctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctccaacaaagccctcca
 gccccatcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatc
 ccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagctgacctgcttggtaaaaggcttctatcccagcgcacatcgcctgt
 gagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacggctccttc
 ttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgttctctcatgctccgtgatgcatga
 ggctctgcacaaccactacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa-
 tgcttacgcccggagagcagcagcgtctgtggagagtgaggtccggaagccgctcggcgagctctctatcggagatc
 gtgttttgagcatgaccgcaacggacagggcgtctacagcgaagtgtatcctcttcatggaccgcaacctcagcag
 atgcaaaactttgtcagctgcacacggacgggtggagcagtgctcacgggtgacgcccggctcacttggtagcgtttg
 cagccggagagccagaagctcagtttgtttgcggatcgcatcgaggagaagaaccaggtgctcgtacgggatg
 tggagacgggagcgtgagggcccagcagctcgtcaaggtgggacagtgctgcgagtaagggcgtggtcgcgccc

10

20

30

40

ctgaccgcgagggcaccattgtggtcaactcgggtggccgagttgctatgcggtgatcaacagccagtcg-
 atggacatgctgctgcccgccagctgctgggctgctgctgctggtccccggctcgcatgcatccagatg
 acccagcttccatcctccctgctgcatcigttaggggacagagtcaccatcacttgcgggcaagtcagggcatcaga
 aattacttagcctggatcagcaaaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccactttgcaatcag
 gggctccatctcgggtcagtgagtgatctgggacagattcactctcaccatcagcagcctacagcctgaagatgt
 tgcaacttattactgtcaaaggataaccgtgcaccgtatactttggccaggggaccaaggtggaaatcaaacgtac
 ggtggctgcaccatctgtctcactctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctg
 aataactctatcccagagagggccaaagtacagtggaagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
 gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagacta
 cgagaaacacaaagtctacgctgccaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagctcaacag
 gggagagtgt -3'

10

p T T 3 ベクター - 重鎖 - H h - C 1 7 - 軽鎖

【 0 4 7 7 】

以下の構築物においては、上記構築物との唯一の違いは、C 1 7 領域の切り詰めであり、その結果、コレステロール転移活性 (transferred activity) が除去される。示した配列は、D 2 E 7 重鎖コード領域の末端 (H C コード配列の最後の 9 塩基対、表の第 1 行) から D 2 E 7 軽鎖コード領域の 5' 末端 (L C コード配列の最初の 9 塩基対、表の最終行) までである。

【 0 4 7 8 】

表 2 8 . プラスミド p T T 3 - H C - C 1 7 - s c - L C の部分コード配列 (配列番号 1 5 6)

20

【 0 4 7 9 】

【 化 4 3 】

Ccgggtaaa-

tgcttcacgcccggagagcacagcgtgctggagagtggagtcgggaagccgctcggcgagctctctatcggagatc
 gtgtttgagcatgaccgccaacggacaggccgtctacagcgaagtatcctctcatggaccgcaacctcgagcag
 atgcaaaactttgtcagctgcacacggacgggtggagcagtgctcacgggtgacgccggctcacttggttagcgtttg
 cagccggagagccagaagctcacgtttgtttgctgcatcagaggagaagaaccaggtgctcgtacgggatg
 tggagacgggagcgtgaggccccagcagtgctcaaggtgggagtgctgcgcagtaagggcggtggtcgcgccc
 ctgaccgcgagggcaccattgtggtcaactcgggtggccgagttgc-atggacatg

30

重鎖 3' 配列 - H h - C 1 7 - 軽鎖 5' 配列

【 0 4 8 0 】

以下の構築物においては、上記構築物 p T T 3 - H C - C 1 7 - s c - L C との唯一の違いは、ヘッジホッグ C 1 7 領域中の最後の 2 個のアミノ酸の S C から H N への変異 (下線) である。示した配列は、D 2 E 7 重鎖コード領域の末端 (H C コード配列の最後の 9 塩基対、表の第 1 行) から D 2 E 7 軽鎖コード領域の 5' 末端 (表の最終行) までである。

【 0 4 8 1 】

表 2 9 . プラスミド p T T 3 - H C - C 1 7 - h n - L C の部分コード配列 (配列番号 1 5 7)

40

【 0 4 8 2 】

【 化 4 4 】

ccgggtaaa-

tgcttcacgcccggagagcacagcgtgctggagagtggagtcgggaagccgctcggcgagctctctatcggagatc
 gtgtttgagcatgaccgccaacggacaggccgtctacagcgaagtatcctctcatggaccgcaacctcgagcag
 atgcaaaactttgtcagctgcacacggacgggtggagcagtgctcacgggtgacgccggctcacttggttagcgtttg
 cagccggagagccagaagctcacgtttgtttgctgcatcagaggagaagaaccaggtgctcgtacgggatg
 tggagacgggagcgtgaggccccagcagtgctcaaggtgggagtgctgcgcagtaagggcggtggtcgcgccc
 ctgaccgcgagggcaccattgtggtcaactcgggtggccgcccacaac-atggacatg

重鎖 3' 配列 - H h - C 1 7 - 変異 - 軽鎖 5' 配列

50

【 0 4 8 3 】

以下の構築物においては、C 1 7ではなく、H i n tドメインの完全C 2 5領域を使用する。示した配列は、D 2 E 7重鎖コード領域の末端（H Cコード配列の最後の9塩基対、表の第1行）からD 2 E 7軽鎖コード領域の5'末端（L Cコード配列の最初の9塩基対、表の最終行）までである。

【 0 4 8 4 】

表 2 9 B . p T T 3 - H C - C 2 5 - H i n t - L C由来の部分コード配列（配列番号 1 5 8 ）

【 0 4 8 5 】

【 化 4 5 】

ccgggtaaa-

tgcttcacgcccggagagcacagcgctgctggagagtggagtcgggaagccgctcggcgagctctctatcggagatc
 gtgtttgagcatgaccgccaacggacaggccgtctacagcgaagtgatcctctcatggaccgcaacctcgagcag
 atgcaaaactttgtcagctgcacacggacgggtggagcagtgtcacggtgacgcccggctcacctggtagcgttgg
 cagccggagagccagaagctcacgtttgtgttgcggatcgatcgaggagaagaaccaggtgctcgtacgggatg
 tggagacggggcagctgaggccccagcgagtcgtcaaggtgggacagtgtgcgacagtaagggcgtggtcgcgccg
 ctgaccgcgagggcaccattgtgtcaactcgggtggccgccagttgctatgcggtgatcaacagccagtcgctggc
 ccactggggactggctcccatgcgctgtgtccacgctggaggcgtggctgccgccaaggagcagttgcacagtt
 cgccgaaggtggtgagctcggcgcagcagcagaatggcatccattggtatgccaatgcgctctacaaggtaagga
 ctacgttctgccgagagctggcgccacgat-
 atggacatg

[重鎖 3'配列 - H h - C 2 5ドメイン - 軽鎖 5'配列]

【 0 4 8 6 】

（配列番号 1 4 0 ）

H h - C 2 5及び関係する構築物のアミノ酸配列（下向きの矢印は切断部位を示す；
 : H h - C 1 7 : H h - C 1 7 s c) :

【 0 4 8 7 】

【 化 4 6 】

cftpestallesgvrkplgelsigdrvlsmtangqavysevilfmdrnleqmqnfvqlhtdggavltvtpahlvsvwqpe
 sqkltfvfadrieeknqvlrvdvetgelrpqrvvkvgsvrskgvvaplrtregtivvnsvaasc ↓ ya
 vinsqs_↓lahwglapmrlstleawlpakeqlhsspkvvssaqqngihwyanalykvkdyvlpqswrhd

【 実施例 3 】

【 0 4 8 8 】

タンパク質分解プロセッシング用のT E V認識配列を用いた抗体発現

目的抗体を含む、免疫グロブリン重鎖と軽鎖の各配列セグメント間のT E V認識配列を用いて、構築物及び発現ベクターを作製して、腫瘍壊死因子、インターロイキン12、インターロイキン18及びエリスロポイエチン受容体に特異的な抗体の発現を誘導する。好ましくは、構築物は、インフレーションリーダー配列が先行する目的抗体重鎖の転写を誘導する、アデノウイルス主要後期プロモーター及びサイトメガロウイルスエンハンサーを含む発現ベクターを含む。重鎖コード配列は、インフレーションフェーリン切断部位及びT E V認識配列（E - P - V - Y - F - Q - G）、続いて核局在化領域欠損T E Vプロテアーゼのコード領域（C e r i a n i e t a l . (1 9 9 8) P l a n t M o l e c B i o l . 3 6 : 2 3 9）、続いて第2のT E V認識配列と連結される。第2のT E V認識配列は、目的抗体軽鎖のコード領域と連結された抗体軽鎖のリーダー配列、及び終止コドンにインフレーションで連結される。コード領域にはポリアデニル化シグナルが続く。関連する配列を以下に示す。

【 0 4 8 9 】

表 1 . D 2 E 7 (H u m i r a / アダリムマブ) T E V発現ベクター完全D N A配列（配列番号 4 4 ）

10

20

30

40

50

【 0 4 9 0 】

【 化 4 7 】

GAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGACGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCCTGG
 CTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT
 AGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA
 AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCCTGGCATT
 TGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT
 ACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTT
 CCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCA
 AAATGTCGTAACAACCTCCGCCCAATGACGCAAATGGGCAGGGAATTCGAGCTCGGTACTCGAGC
 GGTGTTCCGCGGTCTCTCGTATAGAACTCGGACCACTCTGAGACGAAGGCTCGCGTCCAGGCC
 AGCACGAAGGAGGCTAAGTGGGAGGGGTAGCGGTCGTTGTCCACTAGGGGGTCCACTCGCTCCAG
 GGTGTGAAGACACATGTCGCCCTCTTCGGCATCAAGGAAGGTGATTGGTTTTATAGGTGTAGGCCAC
 GTGACCGGGTGTTCCTGAAGGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGGTTTCGCTCTACTCTCTTC
 CGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCGCGGTCTTTC
 CAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCG
 AGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGACTGTTGGGGTGAGTACTCCCTCTCAAAGCGG
 GCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCAAAAACGAGGAGGATTTGATATTCACCTGGCCCC
 CGGTGATGCCTTTGAGGGTGGCCGCTCCATCTGGTCAGAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCT
 TGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTCT
 CTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAACCGGAATTGTACCCGCGGCCAGAGCTTGCCCGGGCGCC
 ACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGCGGATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTG
 CAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCCGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCGGC
 CTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGA
 ATGGGTCTCAGCTATCACTTGGGAATAGTGGTCACATAGACTATGCGGACTCTGTGGAGGGCCGATT
 CACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGG
 ATACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGTCTCGTACCTTAGCACCGCGTCCTCCCTTGACTATTGGG
 GCCAAGGTACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCCTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC
 CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG
 AACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCC
 TACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC
 AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
 AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC
 AGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATG
 CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG

10

20

AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
 CGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACA
 AAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
 GTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTC
 AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATA
 CAAGACCACGCTCCCGTGGTACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGA
 CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
 ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTAGGGGTAACGCGAACCAGTTTATTTCCAGGGGAGCT
 TGTTTAAGGGGCCGCGTGATTATAACCCAATATCGAGTGCCATTTGTCATCTAACGAATGAATCTG
 ATGGGCACACAACATCGTTGTATGGTATTGGTTTTGGCCCTTTCATCATCACAACAAGCATTTGTT
 TAGAAGAAATAATGGTACACTGTTAGTTCAATCACTACATGGTGTGTTCAAGGTAAGAATACCAC
 AACTTTGCAACAACACCTCATTGATGGGAGGACATGATGCTCATTCCGCATGCCTAAGGATTTCCC
 ACCATTTCCCTCAAAGACTGAAATTCAGAGAGCCACAAAGGGAAGAGCGCATATGTCTTGTGACAA
 CCAACTTCCAAACTAAGAGCATGTCTAGCATGGTTTTAGATACTAGTTGCACATTCCTTTCATCTG
 ATGGTATATTCTGAAACATTGGATTCAGACCAAGGATGGGCACTGTGGTAGCCCGTTGGTGTCAA
 CTAGATATGGGTTTATTGTTGGTATACACTCAGCATCAAATTTACCAACACAAACAATTATTTTA
 CAAGTGTGCCGAAAGACTTCATGGATTTATTGACAAATCAAGAGGCGCAGCAATGGGTTAGTGGT
 TGGCGATTGAATGCTGACTCAGTGTTATGGGGAGGCCACAAAGTTTTTCATGAGCAAACCTGAAGA
 ACCTTTTAGCCAGTCAAAGAAGCAACTCAACTCATGAGTGAATTAGTCTACTCGCAAGGGATGG
 ACATGCGCGTGCCCGCCAGCTGCTGGCCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCTCCCGCTCGCGATGCGACA
 TCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGGGACAGAGTCACCATCACTTGTG
 GGGCAAGTCAGGGCATCAGAAATTAAGCTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAG
 CTCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGTCCCATCTCGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTG
 GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAA
 GGTATAACCGTGCACCGTATACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAATCAAACGTACGGTGGCT
 GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTG
 GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCCCTCAA
 TCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG
 CACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCCATC
 AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGAGCGGCCGCGTTTAAA
 CTGAATGAGCGCGTCCATCCAGACATGATAAGATAACATGATGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATA
 AATGCAGTGAATAAAGTGTATTTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATA
 AGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTG
 TGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCCGGCTGCC
 TCGCGCGTTTTCCGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTT
 GTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGT
 CGGGGCGCAGCCATGACCGGTGACGGCGCGCCTTTTTTTTTAATTTTTATTTTATTTTATTTTGTGAC
 GCGCCGAGGCGCGTACTGAGCTCGGTACAGCTTGGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGG
 AAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA
 GGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCA
 GCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTCCGCCATTCTC
 CGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATT
 CCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCTCGAGGAACTGA
 AAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTATTTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGT
 GGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGT
 ACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGCCTAATACGACTCACTATAGGGACTAGTAT
 GGTTCCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCAAAATATGGGGATTGGCAAGAACGGAGACC
 TACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTCAAGTACTTCAAAGAATGACCACAACCTCTTCACTGG
 AAGGTAAACAGAATCTGGTATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTCTCCATTCCCTGAGAAGAATCGA
 CCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAAAGAACCACCAGGAGGACTCA
 TTTTCTTGCCAAAAGTTTAGATGATGCCTTAAGACTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGT
 AGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGCAGTTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACAGGCCACC
 TCAGACTCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCAGAAATTGATT
 TGGGGAAATATAAACTTCTCCAGAATAACCCAGGCGTCTCTCTGAGTCCAGGAGGAAAAAGGC
 ATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAAGCGGCCGAGCGCGGATCTGGAAAC
 GGGAGATGGGGGAGGCTAACTGAAGCACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGA
 CGGCAATAAAAAGACAGAATAAAAACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACCGGGGTTTCG
 GTCCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCCATTTGGGGCAATACGCCCGCGTTTC
 TTCTTTTTCCCACCCCAAGTTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCCGGGGC
 GGCAGGCCCTGCCATAGCCACTGGCCCCGTGGGTTAGGGACGGGGTCCCCCATGGGGAATGGTTT

10

20

30

40

ATGGTTCGTGGGGGTTATTATTTTGGGCGTTGCGTGGGGTCTGGAGATCCCCGGGCTGCAGGAAT
 TCCGTTACATTACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACG
 TCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAG
 TATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATT
 GACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT
 ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTGCGGTTTGGCAGTACATC
 AATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGG
 AGTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACG
 CAAAAGGGCGGGAATTTCGAGCTCGGTACTCGAGCGGTGTTCCGCGGTCTCTCGTATAGAACTC
 GGACCACTCTGAGACGAAGGCTCGGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCTAAGTGGGAGGGGTAG
 CGGTCTGTGCCACTAGGGGGTCCACTCGCTCCAGGGTGTGAAGACACATGTCGCCCTCTTCGGCA
 TCAAGGAAGGTGATTGGTTTATAGGTGTAGGCCACGTGACCGGGTGTTCCTGAAGGGGGGCTATA
 AAAGGGGGTGGGGGCGGTTTCGTCCTACTCTTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTG
 GGCTCGCGGTTGAGGACAACTCTTCGCGGTCTTCCAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCC
 TCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCT
 CGACTGTTGGGGTGAGTACTCCCTCTCAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTC
 CAAAACGAGGAGGATTTGATATTCACCTGGCCCCGGGTGATGCCTTTGAGGGTGGCCGCTCCAT
 CTGGTCAGAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCTTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCTGGCCATA
 CACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAACCG
 GAATTTGATCCCGCGGAGACTTTCGCGGCCACCGCGGGGATCCAGACATGATAAGA
 TACATTGTAGTGTGAGTTTGGACAAACCACAAGTGAATGCAGTGAACAAAAATGCTTTATTTGTGAAAT
 TGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAAACAAGTTAACAACAACAATTGC
 ATTCATTTTATGTTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTCGGATCCTCTTGGCGTAATCA
 TGGTCATAGCTGTTTCCGTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGA
 AGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCA
 CTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGG
 AAAGGCGGTTTGCATTTGGGCGCTCTTCCGCTTCCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTC
 GGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGAT
 AACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGT
 TGCTGGCGTTCTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGA
 GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGC
 TCTCTGTTCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGGCGC
 TTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGT
 GCACGAACCCCCGTTTCAGCCCAGCCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCC
 GGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATG
 TAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTG
 GTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAC
 AAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGA
 TCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACACTACGTTAA
 GGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCCTTTTAAATTAATAATGAAAT
 TTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAAATCAGTGAG
 GCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTATCCATAGTTGCTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAA
 CTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCA
 CCGGCTCCAGATTTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTCTGC
 AACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGT
 TAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATG
 GCTTCATTACGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAA
 GCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATG
 GTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTG
 AGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCGGCGTCAA
 TACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGG
 GCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCA
 ACTGATCTTACGATCTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATG
 CCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTTCTCTTTTCAATATT
 ATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATA
 AACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTTATTA
 TCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATG
 ACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCC
 GGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTACGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACTA
 TGCGGCATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAATACCGCACAGATGCG

10

20

30

40

TAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGA
TCGGTGCAGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAG
TTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTTACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATT

【 0 4 9 1 】

表 2 A . A B T - 0 0 7 T E V 構 築 物 : ポリタンパク質のコード配列 (配列番号 3
2)

【 0 4 9 2 】

【 化 4 8 】

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG
CCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGCCTCCATCAGTAGTTACTACTGGA
GCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCGGGGGGGAGGGGAGCACCAACTACAACC
CCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCTGTGACCGCT
GCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGCGACTGGGGATCGGGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCCTCAGCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCTAGAAGCACCTCCGAGAGCACAGCGG
CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCT
GCACACCTTCCCAGCTGTCTGCACTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGCAGCTGCCCTCCAGCAACTTCG
GCACCCAGACCTACACATGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGT
GTCGAGTGCACCCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCT
CATGATCTCCCGAACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG
TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGGCCAGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCA
GCGTCTCACCCTGTGACCCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCTCCCAGC
CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAG
GAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCGACGACATCGCGGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAG
CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA
CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTAGGGGTAACGCGAACCCAGTTTATTTCCAGGGGAGCTTGTTTAAGGGGCCGCGTG
ATTATAACCCAATATCGAGTGCCATTTGTCATCTAACGAATGAATCTGATGGGCACACAACATCGTTGTATGGTATTGGTTTT
GGCCCTTTCATCATCACAAACAAGCATTGTTTGTAGAGAAATAATGGTACACTGTTAGTTCAATCACTACATGGTGTGTTCAA
GGTAAAGAATACCACAACCTTGAACAACACCTCATTGATGGGAGGGACATGATGCTCATTGCGATGCCTAAGGATTTCCC
ACCATTTCTCAAAGCTGAAATTCAGAGAGCCACAAGGGGAAGAGCGCATATGCTTGTGACAACCAACTTCAAACCTAA
GAGCATGTCTAGCATGGTTTCAGATACTAGTTGCACATTCCCTTCTGATGGTATATTCTGGAAACATTGGATTGAGACC
AAGGATGGGCACTGTGGTAGCCCGTTGGTGTCAACTAGAGATGGGTTTTATTGTTGGTATACACTCAGCATCAAATTTACC
AACACAACAATTATTTACAAGTGTGCCGAAAGACTTCATGGATTTATTGACAAATCAAGAGGCGCAGCAATGGGTTAGTG
GTTGGCGATTGAATGCTGACTCAGTGTATGGGGAGGCCACAAAGTTTTATGAGCAAACCTGAAGAACCCTTTCAGCCAG
TCAAAGAAGCAACTCAACTCATGAGTGAATTAGTCTACTCGCAAGGGATGCGCGTGCCCGCCAGCTGCTGGGCTGCTG
CTGCTGTGGTTCCCCGGCTCGCGATGCGACATCCAGCTGACCCAATCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
AGTCACCATCACTTCCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
AGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAAGTGGATCTGGGACAGAATTC
ACTCTACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATACTTACCCTCCGACGTTCCG
GCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG
AAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAAC
GCCCTCAAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC
TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA

10

20

30

【 0 4 9 3 】

表 2 B . A B T - 0 0 7 T E V ポリタンパク質アミノ酸配列 (配列番号 3 3)

【 0 4 9 4 】

【 化 4 9 】

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIG
GEGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLRVTAADTAVYYCARERLIGIDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGT
QTYTCNVLDHKSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTSKT

40

KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLRSRKREPVYFQGSFLFKGPRDYNPISSAICHLTNE
 GHHTSLYGIGFGPFIITNKHLFRNNGTLLVQSLHGKVFVKNNTTLLQQLHLDGRDMMMLIRMPKDFPPFPQKL
 KFREPQREERICLVTTNFQTKSMSSMVS DTSCTFPSSDGFWKHWIQTKDGHCGSPLVSTRDGFIVGIHSA
 SNFTNTNNTYFTSVPKDFMDLLTNQEAQQWVSGWRLNADSVLWGGHKVFMSPKEEFPQVKEATQLMSE
 LVYSQGMVRVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGI RNDLGWYQKPKGKAP
 KRLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLPEDFATYYCLQHNTYPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

【 0 4 9 5 】

表 2 C . 完全 A B T - 0 0 7 T E V 構 築 物 発 現 ベ ク タ ー 配 列 (配 列 番 号 3 4)

【 0 4 9 6 】

【 化 5 0 】

GAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGACGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTG
 GCTGACCCGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCC
 AATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTAC
 ATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTG
 GCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAT
 CGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCA
 CGGGGATTTCAAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAATCAACG
 GGACTTTCAAATGTCTGTAACAACCTCCGCCCAATGACGCAAATGGGCAGGGAATTCGAGCTC
 GGTACTCGAGCGGTGTTCCGCGGTCTCCTCGTATAGAACTCGGACCACTCTGAGACGAAGGC
 TCGCGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCTAAGTGGGAGGGGTAGCGGTGCTTGTCCACTAGGG
 GGTCCACTCGCTCCAGGGTGTGAAGACACATGTCGCCCTCTTCGGCATCAAGGAAGGTGATTGG
 TTTATAGGTGTAGGCCACGTGACCGGGTGTCTCTGAAGGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGC
 GCGTTCGTCCTCACTCTCTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGGTTGA
 GGACAAACTCTTCGCGGTCTTTCCAGTACTCTTGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTA
 CTCCGCCACCGGAGGACCTGAGCGAGTCCGACCTCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGACTGTTG
 GGGTGAAGTACTCCCTCTCAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCAAACG
 AGGAGGATTTGATATTCACCTGGCCCGCGGTGATGCCTTTGAGGGTGGCCGCGTCCATCTGGTC
 AGAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCTTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCTGGCCATACACTT
 GAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAACCGGAAT
 TGTACCCGCGGCCAGAGCTTGCCCGGGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTT
 GTCGCGATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTG
 AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGCCTCCATCAGTAGTTACTACTG
 GAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCGGGGGGGAGG
 GGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAA
 CCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA
 GAGCGACTGGGGATCGGGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCGTC
 GACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCTAGAAGCACCTCCGAGAGCACAGC
 GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGGAACTCAGG
 CGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC
 AGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACATGCAACGTAGATC
 ACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACC
 GTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACC
 CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCAGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
 GAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGG
 GAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCCTGTGACCCAGGACTGG
 CTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAA
 CCATCTCAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGG
 AGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACAT
 CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCATGCT
 GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
 GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC
 CTCTCCCTGTCTAGGGGTAAACGCGAACCAGTTTATTTCCAGGGGAGCTTGTTAAAGGGGCCGC

10

20

30

40

GTGATTATAACCCAATATCGAGTGCCATTTGTCATCTAACGAATGAATCTGATGGGCACACAACAT
CGTTGTATGGTATTGGTTTTGGCCCTTTCATCATCACAACAAGCATTGTTTAGAAGAAATAATG
GTACACTGTTAGTTCAATCACTACATGGTGTGTTCAAGGTAAGAATACCACAACCTTTGCAACAAC
ACCTCATTGATGGGAGGGACATGATGCTCATTGCGATGCCTAAGGATTTCCACCATTTCTCAA
AAGCTGAAATTCAGAGAGCCACAAGGGGAAGAGCGCATATGTCTTGACAACCAACTTCCAAAC
TAAGAGCATGTCTAGCATGGTTTCAGATACTAGTTGCACATTCCCTTCATCTGATGGTATATTCTG
GAAACATTGGATTGAGACCAAGGATGGGCACTGTGGTAGCCCGTTGGTGTCAACTAGAGATGGG
TTTATTGTTGGTATACACTCAGCATCAAATTTACCAACACAACAATTATTTTACAAGTGTGCCGA
AAGACTTCATGGATTTATTGACAAATCAAGAGGCGCAGCAATGGGTTAGTGGTTGGCGATTGAAT
GCTGACTCAGTGTATGGGGAGGCCACAAGTTTTCATGAGCAAACCTGAAGAACCCTTTGAGC
CAGTCAAAGAAGCAACTCAACTCATGAGTGAATTAGTCTACTCGAAGGGATGCGCGTGCCCGC
CCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCGGCTCGCGATGCGACATCCAGCTGACCCA
ATCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAG
GGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCT
ATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGA
ATCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAA
TACTTACCCTCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCA
TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCT
GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG
GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATC
AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGAGCGGCCGCGTTTA
AACTGAATGAGCGCGTCCATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAC
AGAATGCAGTGAATAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTA
TAAGCTGCAATAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCAATTTATGTTTCAGGTTGAGGGGGAGG
TGTGGGAGGTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCCGGCT
GCCTCGCGGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCA
CAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAGCCCGTCAAGGCGCGTCAAGGCGGTTG
GCGGGTGTGCGGGCGCAGCCATGACCGGTGACGGCGCGCCTTTTTTTTTAATTTTTATTTTATT
TTATTTTTGACCGCGCAAGGCGCGATCTGAGCTCGGTACAGCTTGGCTGTGGAATGTGTGTCA
GTTAGGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAAT
TAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATG
CATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGC
CCAGTTCGCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCC
GCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCA
AAAAGCTCCTCGAGGAACTGAAAACCAGAAAGTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTAT
TTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAAGTCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTA
CTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGCCTAA
TACGACTCACTATAGGGACTAGTATGGTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCAAAAT
ATGGGGATTGGCAAGAACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCC
AAAGAATGACCACAACCTCTCAGTGAAGGTAACAGAATCTGGTATTATGGGTAGGAAAACC
TGGTTCTCCATTCCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAA
CTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCAATTTCTTGCCAAAAGTTTAGATGATGCCTTAAGACTTATT
GAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGCAGTTCTGTTTACCA
GGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAATTTGAA
GTGACACGTTTTTCCAGAAATTGATTTGGGGAATATAAACTTCTCCAGAATACCCAGGCGTC
CTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTA
AGCGGCCGAGCGCGCGGATCTGGAACGGGAGATGGGGGAGGCTAACTGAAGCACGGAAGGA
GACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGTGT
TGGGTGTTTTGTTATAAACGCGGGGTTCCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATACCCACCG
AGACCCATTGGGGCCAATACGCCCGGTTTTCTTCTTTTCCCACCCACCCCAAGTTCCGG
GTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGAGGCCCTGCCATAGCCACTGGCCCC
GTGGGTTAGGGACGGGGTCCCCATGGGAATGGTTTATGGTTCTGGGGTTATTATTTTGGG
CGTTGCGTGGGTCTGGAGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGTTACATTAATTACGGTAAATG
GCCCGCTGGGTGACGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCAT
AGTAACCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACT
TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTTATTGACGTCAATGACGGTAAATGG
CCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGT
ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGT
TTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTGGCACCAA

10

20

30

40

AATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAAAGGGCGGGAATT
CGAGCTCGGTACTCGAGCGGTGTTCCGCGGTCTCTCTCGTATAGAACTCGGACCACTCTGAGA
CGAAGGCTCGCGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCTAAGTGGGAGGGGTAGCGGTCTGTTGTC
ACTAGGGGGTCCACTCGCTCCAGGGTGTGAAGACACATGTCGCCCTCTTCGGCATCAAGGAAG
GTGATTGGTTTATAGGTGTAGGCCACGTGACCGGGTGTTCCTGAAGGGGGGCTATAAAAGGGG
GTGGGGGCGCGTTCGTCTCACTCTCTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCT
CGCGGTTGAGGACAACTCTTCGCGGTCTTCCAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTC
CGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCT
CGACTGTTGGGGTGAAGTACTCCCTCTCAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTT
CCAAAACGAGGAGGATTTGATATTCACCTGGCCCGCGGTGATGCCTTTGAGGGTGGCCGCGTC
CATCTGGTCAGAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCTTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCTGGC
CATACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCC
AACCGGAATTGTACCCGCGGCCAGAGCTTGCGGGCGCCACCGCGGCCGCGGGGATCCAGACA
TGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAGTGAATGCAGTGAATAAACAAGTTAACAACA
GTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACA
CAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTCGGATCCTCTTG
GCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATA
CGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTG
CGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGG
CCAACGCGCGGGGAAAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCGCTTCTCGCTCACTGACTC
GCTGCGCTCGGTGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTT
ATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAG
GAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTCTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAC
AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGACTATAAAGATACCAGGCGTTTC
CCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGC
CTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGT
AGTTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCT
TATCCGGTAACACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC
CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGG
CCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTT
CGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTT
GTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTAC
GGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAA
GGATCTTACCTAGATCCCTTTAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTA
AACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTT
GTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCT
GGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAA
ACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGT
CTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTT
GCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTT
CCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGG
TCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGC
ATAATTCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGT
CATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATAC
CGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCT
CAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTTCA
GCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAA
GGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTTCTCTTTTTCAATATTATTGAAGCAT
TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGG
GGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCAATTATTATCATGACAT
TAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGGTTTTCGGTGATGACGGTGAA
AACCTCTGACACATGACGCTCCCGGAGACCGTCCAGAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGC
AGACAAGCCCGTCAAGGCGCGTCAAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCTGGCTTAACTATGC
GGCATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTA
AGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTGCGCATCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGA
TCGGTGCGGCCCTTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTA
AGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTTACGACGTTGTAACGACGGCCAGTGAATT

10

20

30

40

【 0 4 9 7 】

表 3 A . A B T - 8 7 4 (J 6 9 5) T E V ポリタンパク質のコード配列 (配列番号 3 5)

【 0 4 9 8 】

50

【化 5 1】

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTTTAAAGGTGTCCAGTGTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
 GGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATG
 CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTATACGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGC
 AGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAG
 CTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTAAGACCCATGGTAGCCATGACAACCTGGGGCCAAGGGACAATGGTACCGTCTCT
 TCAGCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG
 GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGTTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACAC
 CTTCCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC
 AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA
 CTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCCCAAAACCAAGGAC
 ACCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAA
 CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
 GTCAGCGTCTCACCCTGCTGACACCAGGACTGGCTGAATGGCAAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC
 AGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCCG
 GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG
 AGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGC
 AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
 ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTAGGGGTAACCGGAACAGTTTATTTCCAGGGGAGCTTGTAAAGGGGCCG
 CGTGATTATAACCAATATCGAGTGCCATTTGTCTAATGAATGAATCTGATGGGCACACAACATCGTTGTATGGTATTG
 GTTTTGGCCCTTTCATCATCACAACAAGCATTGTTTAGAAGAAATAATGGTACACTGTTAGTTCAATCACTACATGGTGTG
 TTCAAGGTAAGAATAACCACAACCTTTGCAACAACACCTCATTGATGGGAGGGACATGATGCTCATTCGATGCCTAAGGAT
 TTCCCAACATTTCTCAAAGCTGAAATTCAGAGAGCCACAAGGGAAGAGCGCATATGTCTTGTGACAACCAACTTCCAA
 ACTAAGAGCATGTCTAGCATGTTTTCAGATACTAGTTGCACATCCCTTCTCATCTGATGGTATATTCTGGAACATTGGATT
 CAGCCAAAGGATGGGCACTGTGGTAGCCCGTTGGTGTCAACTAGAGATGGGTTTATTGTTGGTATACACTCAGCATCAAATT
 TCACCAACACAAACAATTATTTTACAAGTGTGCCAAAGACTTTCATGGATTTATTGACAAATCAAGAGGGCGCAGCAATGGGT
 TAGTGTTGGCGATTGAATGCTGACTCAGTGTATTGGGGAGGCCACAAAGTTTTCATGAGCAAACCTGAAGAACCCTTTC
 GCCAGTCAAAGAAGCAACTCAACTCATGAGTGAATTAGTCTACTCGCAAGGGATGACTTGGACCCCACTCCTCTTCTCAC
 CCTCCTCCTCCACTGCACAGGAAGCTTATCCAGTCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCCGGGCAGA
 GAGTACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGATCCAACATCGGCAGTAATACTGTAAAGTGGTATCAGCAGCTCCAGGAACGG
 CCCCCAACTCCTCATCTATTACAATGATCAGCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGATCCAAGTCTGGCACCT
 CAGCCTCCCTCGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAAGACGAGGCTGACTATTACTGCCAGTCATATGACAGATACCCAC
 CCGGCCCTGCTCTCGGAACTGGGACCAAGGTACAGTACTAGGTACGCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCC
 GCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAG
 TGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACCCCTCCAACAAAGCAACAACAAGTA
 CGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAA
 GGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTTCATGA

10
20
30
40
50

【 0 4 9 9 】

表 3 B . A B T - 8 7 4 (J 6 9 5) T E V ポリタンパク質のアミノ酸配列 (配列番
号 3 6)

【 0 5 0 0 】

【化 5 2】

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEW
 VAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKTHGSHDNWQGTMVTV
 SSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 KVSNAKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLRSRKREPVIYFQGSIF
 KGPRDYNPISSAICHLTNSDGHFTSLYIGIFGPFITNKHLLFRNNGTLLVQSLHGVFKVKNNTTTLQQH
 LIDGRDMMLIRMPKDFPPFPQKLKFRREPQREERICLVTTNFQTKSMSSMVSDTSCFPPSSDGIFWKHWIQ
 TKDGHCSPVSTRDGFIVGIHSASNFTNTNNYFTSVPKDFMDLLTNQEAQQWVSGWRLNADSVLWG
 GHKVFMSKPEEPFQPVKEATQLMSELVYSQGMTWTPLLFLTLLHCTGSLSQSVLTQPPSVSGAPGQR
 VTISCSGSRNSIGSNTVKWYQQLPGTAPKLLIYNDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADY
 YCQSYDRYTHPALLFGTGTKVTVLQPKAAPSVTLPFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA
 DSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS*

40
50

【 0 5 0 1 】

表 3 C . A B T - 8 7 4 (J 6 9 5) T E V 発現ベクターの完全ヌクレオチド配列 (配列番号 3 7)

50

【 0 5 0 2 】

【 化 5 3 】

GAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGACGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGG
 CTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT
 AGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA
 AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATT
 TGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT
 ACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGATTT
 CCAAGTCTCACCCCAATTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCA
 AAATGTGCTAACAACTCCGCCCCAATGACGCAAACTGGGCAGGGAATTCGAGCTCGGTACTCGAGC
 GGTGTTCCGCGGTCTCCTCGTATAGAAACTCGGACCCTCTGAGACGAAGGCTCGCGTCCAGGCC
 AGCACGAAGGAGGCTAAGTGGGAGGGGTAGCGGTGCTTGTCCACTAGGGGGTCCACTCGCTCCAG
 GGTGTGAAGACACATGTCGCCCTCTTCGGCATCAAGGAAGGTGATTGGTTTTATAGGTGTAGGCCAC
 GTGACCGGGTGTTCCTGAAGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGGTTTCGTCTCACTCTCTTC
 CGTACTCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAACTCTTCGCGGTCTTTC
 CAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCG
 AGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGACTGTTGGGGTGAGTACTCCCTCTCAAAGCGG
 GCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTTCAAAAACGAGGAGGATTTGATATTCACCTGGCCCC
 CGGTGATGCCTTTGAGGGTGGCCGCTCCATCTGGTCAGAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCT
 TGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCTGGCCATACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTCT
 CTCCACAGGTGTCCACTCCAGGTCCAACCGGAATTGTACCCGCGGCCAGAGCTTGCCCCGGGCGCC
 ACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGCGGATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTCAAGGT
 CAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC
 GTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGA
 GTGGGTGGCATTATACGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGAT
 TCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCTGAG
 GACACGGCTGTGTATTACTGTAAGACCCATGGTAGCCATGACAACTGGGGCCAAGGGACAATGGT
 CACCGTCTCTCAGCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCAC
 CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT
 GTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGCTCCTCAGGACT
 CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACTACATCTGCAA
 CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA
 CTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC
 CAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTG
 AGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
 GACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCTCACCGTCTGC
 ACCAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCC
 ATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC
 ATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACAAGACCACGCCTCC
 CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
 GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA
 GCCTCTCCCTGTCTAGGGGTAAACGCGAACCAAGTTTATTTCCAGGGGAGCTTGTTTAAGGGGCCG
 GTGATTATAACCAATATCGAGTGCCATTTGTCATCTAACGAATGAATCTGATGGGCACACAACAT
 CGTTGTATGGTATTGGTTTTGGCCCTTTCATCATCACAACAAGCATTGTGTTAGAAGAAATAATG
 GTACTGTATTAGTTCAATCACTACATGGTGTGTTCAAGGTAAAGAATACCACAACCTTTGCAACAAC
 ACCTCATTGATGGGAGGGACATGATGCTCATTGCGATGCCTAAGGATTTCCCACTTTCTCTAAA
 AGCTGAAATTCAGAGAGCCACAAAGGGAAGAGCGCATATGCTTGTGACAACCAACTTCCAAACT
 AAGAGCATGTCTAGCATGGTTTCAGATACTAGTTGCACATTCCTTCATCTGATGGTATATTCTGGA
 AACATTGGATTACAGACCAAGGATGGGCACTGTGGTAGCCGTTGGTGTCAACTAGAGATGGGTTT
 ATTGTTGGTATACACTCAGCATCAAATTTACCAACACAACAATATTTTACAAGTGTGCCGAAA
 GACTTCATGGATTTATTGACAAATCAAGAGGCGCAGCAATGGGTTAGTGGTTGGCGATTGAATGCT
 GACTCAGTGTATGGGGAGGCCACAAAGTTTTCATGAGCAAACCTGAAGAACCCTTTCAGCCAGTC
 AAAGAAGCAACTCAACTCATGAGTGAATTAGTCTACTCGCAAGGGATGACTTGGACCCCACTCCTC
 TTCTCACCTCCTCCTCCACTGCACAGGAAGCTTATCCAGTCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCAG
 TGCTGGGGCCCCCGGGCAGAGAGTCACCATCTTGTCTGGAAGCAGATCCAACATCGGCAGTA
 ATACTGTAAGTGGTATCAGCAGCTCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATTACAATGATC

10

20

30

40

AGCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGATCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTCGCCA
TCACTGGGCTCCAGGCTGAAGACGAGGCTGACTATTACTGCCAGTCATATGACAGATACACCCACC
CCGCCCTGCTCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTCACAGTACTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGG
TCACTCTGTTCCCGCCCTCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAA
GTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGA
GTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCT
GACGCCTGAGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACC
TGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTTCATGAGCGGCCGCGTTTAACTGAATGAGCGCGTC
CATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAA
ATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAACAA
GTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAA
AGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCCGGCTGCCTCGCGCGTTTCGGTG
ATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGAT
GCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGCAGCCAT
GACCGGTGACGGCGCGCTTTTTTTTTAATTTTTATTTATTTATTTTATTTTGGACGCGCGAAGGCGC
GATCTGAGCTCGGTACAGCTTGGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCT
CCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCC
CCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCC
GCCCCAACTCCGCCATCCCGCCCCAACTCCGCCAGTTCGCCCCATTCTCCGCCCATGGCTGA
CTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATCCAGAAGTAGTGA
GGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAGCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGT
TAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTATTTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAA
GAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTACTTCTGCTCTAAA
AGCTGCGGAATTGTACCCGCGGCCTAATACGACTACTATAGGACTAGTATGGTTCGACCATTGA
ACTCATCGTCGCGTGTCCCAAAAATATGGGGATTGGCAAGAACGAGACCTACCCTGGCCCTCCG
CTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACCACAACCTCTTCAGTGAAGGTAAACAGAA
TCTGGTATTATGGGTAGGAAAACCTGGTCTCCATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAG
AATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAG
TTTAGATGATGCCTTAAGACTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGAT
AGTCGGAGGCAGTTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGAC
AAGGATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCCAGAAATTGATTTGGGGAAATATAAACT
TCTCCAGAATACCCAGGCGTCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAGTTTG
AAGTCTACGAGAAGAAAGACTAAGCGGCCGAGCGCGGGATCTGGAAACGGGAGATGGGGGAGG
CTAACTGAAGCACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGAC
AGAATAAAACGCACGGGTGTTGGGTGTTTTGTTTATAAACGCGGGGTTTCGGTCCCAGGGCTGGCA
CTCTGTGATACCCACCGAGACCCCATTTGGGGCAATACGCCCGCGTTTCTTCTTTTCCCCACCC
CACCCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCAT
AGCCACTGGCCCCGTGGGTTAGGGACGGGGTCCCCATGGGGAATGGTTTATGGTTCGTGGGGGT
ATTATTTGGGCGTTGCGTGGGGTCTGGAGATCCCCCGGGCTGCAGGAATCCGTTACACTTA
CGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATG
TTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTG
CCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTA
AATGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCT
ACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGC
GGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACC
AAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAAGGGCGGGAAT
TCGAGCTCGGTACTCGAGCGGTGTTCCGCGGTCTCCTCGTATAGAACTCGGACCACTCTGAGAC
GAAGGCTCGGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCTAAGTGGGAGGGGTAGCGGTGTTGTCCACTA
GGGGTCCACTCGTCCAGGGTGTGAAGACACATGTCGCCCTCTTCGGCATCAAGGAAGGTGATT
GGTTTATAGGTGTAGGCCACGTGACCGGGTGTTCCTGAAGGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGC
GCGTTCGTCCTCACTCTCTTCCGCATCGTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGTTGAGG
ACAAACTCTTCGCGGTCTTCCAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGCGCTCCGACCGTACTCC
GCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGACTGTTGGGGTGA
GTACTCCCTCTCAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAACGAGGAGGA
TTTGATATTCACCTGGCCCCGCGGTGATGCCTTTGAGGGTGGCCGCGTCCATCTGGTCAGAAAAGAC
AATCTTTTTGTTGTCAAGCTTGAAGTGTGGCAGGCTTGAAGTCTGGCCATACACTTGAAGTGA
GACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAACCGGAATTGTACCCGCGG
CCAGAGCTTGCGGGCGCCACCGCGGCCGCGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTT
GGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCT
TTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTT

10

20

30

40

AGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTTCGGATCCTCTTGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTT
 CCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAA
 GCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAG
 TCGGGAACCTGTTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAAAGGCGTTTTGCG
 TATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCG
 GTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAA
 CATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTCTTCC
 ATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCG
 ACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCGCTCTCTGTTCCGACC
 CTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTTCTCATAGCTCAC
 GCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCG
 TTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACT
 TATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA
 GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTG
 CTGAAGCCAGTTACCTTCGGA AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGG
 TAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATC
 CTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCA
 TGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCCTTTTAATTA AAAAATGAAGTTTTAAATCAATCT
 AAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAG
 CGATCTGTCTATTTTCGTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGA
 GGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTT
 ATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCT
 CCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCA
 ACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTTCGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTC
 CGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTT
 CGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACT
 GCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAG
 TCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACC
 GCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCA
 AGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCAGTCTGTCACCCAATGATCTTCAGCA
 TCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAAAGGG
 AATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTAT
 CAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTT
 CCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACC
 TATAAAAATAGGCGTATCAGAGGCCCTTTCGTTCTCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTC
 TGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGC
 CCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGC
 AGATTGTAAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATAC
 CGCATCAGGCGCCATTCCGCTTACGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCT
 TCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGG
 GTTTTCCAGTTACGACGTTGTA AAAACGACGGCCAGTGAATT

10

20

30

【 0 5 0 3 】

表 4 A . E L 2 4 6 G G (抗 E / L セレクチン) T E V ポリタンパク質をコードす
 る核酸配列 (配列番号 3 8)

【 0 5 0 4 】

【 化 5 4 】

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTTCTGTGCGGATTTTAAAAGGTGTCCAGTGCGAGGTGCA
 GCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGG
 GTCCGGATACGCATTCAGTAGTTCCTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGGCCT
 GGAGTGGATGGGGCGGATTTATCCTGGAGATGGAGATACTAACTACAATGGGAAGTTCAAGGGC
 CAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAG
 GCTAGCGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGAGCGCGCGTGGGATCCACGGTCTATGATGGTT
 ACCTCTATGCAATGGACTACTGGGGTCAAGGTACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCGTGCACCAA
 GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT
 GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCT
 GACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
 GTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC

40

ACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAA
 GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
 AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
 CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAG
 GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCG
 AGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATC
 CCGCGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAG
 CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCC
 CGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA
 AGAGCCTCTCCCTGTCTAGGGGTAACCGCAACCAGTTTATTTCCAGGGGAGCTTGTAAAGGG
 GCCGCGTGATTATAACCCAATATCGAGTGCCATTTGTCATCTAACGAATGAATCTGATGGGCACA
 CAACATCGTTGTATGGTATTGGTTTTGGCCCTTTCATCATCACAACAAGCATTGTGTTAGAAGAA
 ATAATGGTACTGTTAGTTCAATCACTACATGGTGTGTTCAAGGTAAGAATACCACAACCTTTCG
 AACAAACCTCATTGATGGGAGGGACATGATGCTCATTGCGCATGCCTAAGGATTTCCACCATTT
 CCTCAAAGCTGAAATTCAGAGAGCCACAAGGGGAAGAGCGCATATGTCTTGACAACCAACTT
 CCAAATAAGAGCATGTCTAGCATGGTTTCAGATACTAGTTGCACATTCCCTTCATCTGATGGTAT
 ATTCTGAAACATTGGATTGACCAAGGATGGGCACTGTGGTAGCCCGTTGGTGTCAACTAGA
 GATGGGTTTTATTGTTGGTATACACTCAGCATCAAATTTACCAACACAACAATTATTTACAAGT
 GTGCCGAAAGACTTCATGGATTTATTGACAAATCAAGAGGCGCAGCAATGGGTTAGTGGTTGGC
 GATTGAATGCTGACTCAGTGTATGGGGAGGCCACAAAGTTTTTCATGAGCAAACCTGAAGAACCC
 TTTGAGCCAGTCAAAGAAGCAACTCAACTCATGAGTGAATTAGTCTACTCGCAAGGGATGGACAT
 GCGCGTGCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTCCCGGCTCGCGATGCGACAT
 CGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTG
 CAAGTCCAGTCAGAGCCTTTCATATAGAAGCAATCAAAGAAGCTCGTTGGCCTGGTACCAGCAGA
 AACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACTGGGCTAGCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGA
 CCGATTCAGTGGATCCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAA
 GATGTGGCAGTTTATTACTGTCACCAATATTATAGCTATCCGTACACGTTCCGAGGGGGACCAA
 GGTGGAATTAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT
 TGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA
 CAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC
 AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA
 CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA
 ACAGGGGAGAGTGTGA

10

20

【 0 5 0 5 】

表 4 B . E L 2 4 6 G G (抗 E / L セレクチン) T E V ポリタンパク質のアミノ酸
 配列 (配列番号 3 9)

30

【 0 5 0 6 】

【 化 5 5 】

MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSSWIGWVRQMPGKGLEW
 MGRIYPGDGDTNYNGKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARARVVGSTVYDGYLYAM
 DYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHFT
 PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGG
 PSVFLFPPKPKDRLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
 QKLSLSLRGKREPVEYFQGSFLKGPDPYNPISAIHLTNEVDGHTTSLYIGIFGPFITNKHLFRRNNG
 TLLVQSLHGVFVKNTTLLQQLHIDGRDMMMLIRMPKDFPFPQKLFREPQREERICLVTTNFQTKSM
 SSMVSDTSCFPPSSDGIKWKHWIQTKDGHGCSPLVSTRDGFIVGIHSASNTNTNNTNYFTSVPKDFMD
 LLTNQEAQQWVSGWRNLNADSVLWGGHKVFMSPKEEPFQPVKEATQLMSELVYSQGMMDRVPAL
 LGLLLLWFPGRCDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLSYRSNQKNSLAWYQQKPGQPPKLLI
 YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCHQYYSYPYTFGGGKVEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLS
 KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

40

【 0 5 0 7 】

表 4 C . E L 2 4 6 G G (抗 E / L セレクチン) T E V ポリタンパク質発現ベクタ
 ーの完全ヌクレオチド配列 (配列番号 4 0)

【 0 5 0 8 】

50

【化 5 6】

GAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGACGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGG
 CTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT
 AGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA
 AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATT
 TGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT
 ACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTT
 CCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCA
 AAATGTCGTAACAACCTCCGCCCAATGACGCAAATGGGCAGGGAATTCGAGCTCGGTACTCGAGC
 GGTGTTCCGCGGTCCTCCTCGTATAGAACTCGGACCACTCTGAGACGAAGGCTCGCGTCCAGGCC
 AGCACGAAGGAGGCTAAGTGGGAGGGGTAGCGGTCGTTGTCCACTAGGGGGTCCACTCGCTCCAG
 GGTGTGAAGACACATGTCGCCCTTTCGGCATCAAGGAAGGTGATTGGTTTTATAGGTGTAGGCCAC
 GTGACCGGGTGTTCCTGAAGGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGCGTTCGTCCTCACTCTCTTC
 CGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAACTCTTCGCGGTCTTTC
 CAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCG
 AGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGACTGTTGGGGTGAGTACTCCCTCTCAAAGCGG
 GCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTTCAAAAACGAGGAGGATTTGATATTCACCTGGCCCG
 CGGTGATGCCTTTGAGGGTGGCCGCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCT
 TGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCT
 CTCCACAGGTGTCCACTCCAGGTCCAACCGAATTGTACCCGCGGCCAGAGCTTGCCCGGGCGCC
 ACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGCGGATTTTAAAAGGTGTCCAGTGCAGAGTG
 CAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGG
 GTCCGGATACGCATTCAGTAGTTCCTGGATCGGTCGAGATACTAACTACAATGGGAAGTTCAAGGGCCAG
 AGTGGATGGGGCGGATTTATCCTGGAGATGGAGATACTAACTACAATGGGAAGTTCAAGGGCCAG
 GTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCTAG
 CGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGAGCGCGCGTGGGATCCACGGTCTATGATGGTTACCTCTA
 TGCAATGGACTACTGGGGTCAAGGTACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCGTCGACCAAGGGCCCATC
 GGTCTTCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGT
 CAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTGCTGGAACCTAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC
 ACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
 CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG
 GACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGA
 AGCCGCGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCG
 GACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT
 GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG
 CAGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCCTGTCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
 AGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGCGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT
 CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
 GGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
 ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
 CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGACCTCTCCCTGTCTAGGGGTAAACGCGAACC
 AGTTTATTTCCAGGGGAGCTTGTTTAAGGGGGCGCGTATTATAACCCAATATCGAGTGCCATTTG
 TCATCTAACGAATGAATCTGATGGGCACACAACATCGTTGTATGGTATTGGTTTTGGCCCTTTCATC
 ATCACAATAAAGCATTGTTTAGAAGAAATAATGGTACACTGTTAGTTCAATCACTACATGGTGTG
 TTCAAGGTAAAGAATAACCACAACCTTTGCAACAACACCTCATTGATGGGAGGGACATGATGCTCATT
 CGCATGCCTAAGGATTTCCACCATTTCCCTCAAAGCTGAAATTCAGAGAGCCACAAAGGGAAGA
 GCGCATATGTCTTGTGACAACCAACTTCAAACCTAAGAGCATGTCTAGCATGGTTTCAGATACTAG
 TTGCACATTCCTTTCATCTGATGGTATATTCTGGAAACATTGGATTACAGCAAGGATGGGCACTG
 TGGTAGCCCGTTGGTGTCAACTAGAGATGGGTTTTATTGTTGGTATACACTCAGCATCAAATTCAC
 CAACACAAACAATTATTTTACAAGTGTGCCGAAAGACTTCATGGATTTATTGACAAATCAAGAGGC
 GCAGCAATGGGTTAGTGGTTGGCGATTGAATGCTGACTCAGTGTATGGGGAGGCCACAAAGTTTT
 CATGAGCAAACCTGAAGAACCCTTTCAGCCAGTCAAAGAAGCAACTCAACTCATGAGTGAATTAG
 TCTACTCGCAAGGGATGGACATGCGCGTGGCCGCCCAGCTGCTGGGCTGCTGCTGCTGTGGTTCC
 CCGGCTCGCGATGCGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGA
 GGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTCATATAGAAGCAATCAAAGAAGTCTGTTG
 GCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACTGGGCTAGCACTAGGGA
 ATCTGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGATCCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG
 CCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTACCAATATTATAGCTATCCGTACACGTTCCG
 AGGGGGGACCAAGGTGGAATTAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCAGCATC
 TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA

10

20

30

40

GGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAG
AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA
CGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCTCACAAAGA
GCTTCAACAGGGGAGAGTGTGAGCGGCCGCGTTTAAACTGAATGAGCGCGTCCATCCAGACATG
ATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGT
GAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAAC
AATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTACGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAAC
CTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCCGGCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGTGACGGTGAAA
ACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGA
CAAGCCCCTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGCAGCCATGACCGGTGACG
GCGCGCTTTTTTTTTAATTTTTATTTTATTTTATTTTACGCGCCGAAGGCGCGATCTGAGCTCGG
TACAGCTTGGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCA
GAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCA
GCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCCGCCCTAACTCC
GCCCATCCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTT
ATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTT
GGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAAGT
TTAGTCTTTTTGCTTTTTATTTTACAGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAAATCAAGAAGTGTCTCTC
AGTGGATGTTGCCTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATT
GTACCCGCGGCCTAATACGACTCACTATAGGGACTAGTATGGTTCGACCATTGAACTGCATCGTCG
CCGTGTCCCAAAATATGGGGATTGGCAAGAACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAG
TTCAAGTACTTCCAAAGAATGACCACAACCTCTCAGTGGAAAGTAAACAGAATCTGGTGTATTATG
GGTAGGAAAACCTGGTCTCCATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTT
CTCAGTAGAGAACTCAAAGAACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTAGATGATGAC
TTAAGACTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTTGGATAGTCGGAGGCG
TTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACTCAGACTCTTTGTGACAAGGATCGCA
GGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCAGAAATGATTTGGGAAATATAAACTTCTCCAGAATA
CCCAGGCGTCTCTCTGAGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTACGAGA
AGAAAGACTAAGCGGCCGAGCGCGGGATCTGAAAACGGGAGATGGGGGAGGCTAACTGAAGCA
CGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAAACGC
ACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGTTCGGTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACC
CCACCGAGACCCCAATTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTTCTTCTTTTCCCCACCCCAAGTT
CGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCCACTGGCCCC
GTGGGTTAGGGACGGGTCCCCCATGGGAATGGTTTATGGTTCGTGGGGGTTATTATTTTGGGCG
TTGCGTGGGGTCTGGAGATCCCCCGGGCTGCAGGAATCCGTTACACTTACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC
GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGT
ACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTG
GCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC
GCTATTACCATGGTGTGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGG
GGATTTCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGAC
TTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAAAGGGCGGGAATTCGAGCTCGGTACTC
GAGCGGTGTTCCGCGGTCTCCTCGTATAGAACTCGGACCACTCTGAGACGAAGGCTCGCGTCCA
GGCCAGCACGAAGGAGGCTAAGTGGGAGGGGTAGCGGTTCGTTGTCCACTAGGGGGTCCACTCGCT
CCAGGGTGTGAAGACACATGTCGCCCTCTTCGGCATCAAGGAAGGTGATTGGTTTATAGGTGTAGG
CCACGTGACCGGGTGTTCCTGAAGGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGCGTTCGTCTCTACTC
TCTTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCGCGGT
CTTTCCAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTG
AGCGAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGACTGTTGGGGTGAAGTACTCCCTCTCAAAA
GCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTGAGTTTCCAAAAACGAGGAGGATTTGATATTCACCTGG
CCCAGGTTGATGCCTTTGAGGGTGGCCGCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACAATCTTTTTTGTGTCA
AGCTTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCTT
TTCTCTCCACAGTGTCCACTCCCAGTCCAACCGGAATTGTACCCGCGGCCAGAGCTTGGGGGCG
CCACCGCGCCGCGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACATA
GAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTAT
AAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTTCAGGTTTACGGGGGAGGT
GTGGGAGGTTTTTTTCGGATCCTCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTA
TCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAAT
GAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGT
GCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAAAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCC

10

20

30

40

GCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCA
AAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG
GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTCTTCCATAGGCTCCGCCCC
CCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAG
ATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGA
TACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCA
GTTTCGGTGTAGGTTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCT
GCGCCTTATCCGTAACACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAG
CAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTTGAAGTGG
TGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACC
TTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTT
GTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACG
GGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAG
GATCTTACCTAGATCCCTTTTAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTA
AACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTG
TCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGC
CCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCA
GCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTA
TTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGC
TACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTCCCAACGATCA
AGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTT
GTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACT
GTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAG
TGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCTCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAG
AACTTTAAAAGTGTCTCATCATTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACC
GTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACC
AGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC
GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCT
CATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCC
CCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGC
GTATCACGAGGCCCTTTCGTTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGC
TCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCG
TCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAG
AGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCC
ATTGCCATTACGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCC
AGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTTA
CGACGTTGTAACGACGGCCAGTGAATT

10

20

30

【 0 5 0 9 】

表 5 A . A B T - 3 2 5 T E V ポリタンパク質のコード配列 (配列番号 4 1)

【 0 5 1 0 】

【 化 5 7 】

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTCTTGTGCGGATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
AACAGAGGTGAAAAAACCAGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACACTGTTACCAGTTACTGGATCGG
CTGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGATTCATCTATCCTGGTACTCTGAAACCAGATACAGTC
CGACCTTCCAAGGCCAGGTACCATCTCAGCCGACAAGTCTTCAATACCGCCTCCTGCAGTGGAGCAGTCTAAAGGCC
TCGGACACCGCATGTATTACTGTGCGCGAGTCGGCAGTGGCTGGTACCCTTATACTTTTGATATCTGGGGCCAAAGGAC
AATGGTCACCGTCTCTCAGCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGG
GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC
CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGGAGGAGCAGTACA
ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGT
CTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA
CCCTGCCCCATCCCGCGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGA
CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGG
CTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC

40

ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTAGGGGTAAACGCGAACCAAGTTTATTTCCAGGGG
 AGCTTGTTTAAAGGGGCCGCGTGATTATAACCCAATATCGAGTGCCATTTGTCATCTAACGAATGAATCTGATGGGCACACA
 ACATCGTTGTATGGTATTGGTTTTGGCCCTTTCATCATCACAACAAGCATTGTTTGAAGAAATAATGGTACTGTTAGT
 TCAATCACTACATGGTGTGTTCAAGGTAAGAATAACCACAACCTTGGCAACAACACCTCATTGATGGGAGGGACATGATGCT
 CATTGCGATGCCTAAGGATTTCCACCATTTCTCAAAGCTGAAATTCAGAGAGCCACAAAGGGAAGAGCGCATATGCT
 TGTGACAACCAACTTCCAAACTAAGAGCATGCTAGCATGGTTTCAGATACTAGTTGCACATTCCTTCATCTGATGGTATA
 TTCTGAAACATTGGATTGAGACCAAGGATGGGCACTGTGGTAGCCCGTTGGTGTCAACTAGAGATGGGTTTATTGTTGGT
 ATACACTCAGCATCAAATTTACCAACACAAACAATTATTTACAAGTGTGCCGAAAGACTTCATGGATTTATTGACAAATCA
 AGAGGCGCAGCAATGGGTTAGTGGTTGGCGATTGAATGCTGACTCAGTGTATGGGGAGGCCACAAAGTTTTTCATGAGCA
 AACCTGAAGAACCTTTCCAGCCAGTCAAAGAAGCAACTCAACTCATGAGTGAATTAGTCTACTCGCAAGGGATGGAAGCCC
 CAGCGCAGCTTCTCTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATAACCACTGGAGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACC
 CTGTCTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTATTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCA
 GCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCTTCATCTATACTGCATCCACCAGGGCCACTGATATCCCAGCCAGGTTCAAGT
 GCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCCTCCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGT
 ATAATAACTGGCCTTCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCA
 TCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTAGCGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG
 CCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGA
 CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCCAAGTCA
 CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA

【 0 5 1 1 】

表 5 B . A B T - 3 2 5 T E V ポリタンパク質アミノ酸配列 (配列番号 4 2)

【 0 5 1 2 】

【 化 5 8 】

MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKGSGYTVTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGFYIPGDSETRYSPTF
 QGQVTISADKSFNTAFLQWSSLKASDTAMYCARVGSWYPTFDIWQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCP
 PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNSVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLRSRKREPVEVFQGSFLKGPDPYNPISAIHLTNE
 DGHTTSLYIGIFGPFITNKHLFRNRNGTLLVQSLHGVEFKVNTTTLQQLIDGRDMLIRMPKDFPPFPQKLFREPQREERICL
 VTTNFQTKSMSSMVS DTSCTFPSSDGFVWKHWIQTKDGHGCSPLVSTRDGFVGIHSASNFNTNNTNYFTSVPKDFMDLLTNQEA
 QQWVSGWRLNADSVLWGGHKVFMSKPEEPFQPVKEATQLMSELVYSQGMEAPAQLLFLLLWLPDPTTGEIVMTQSPATLSVS
 PGERATLSCRASESISNLAWYQQKPGQAPRLFIYTASTRATDIPARFSGSGSGTEFTLTISSLSQSEDFAVYYCQQYNNWPSITF
 GQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS
 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

【 0 5 1 3 】

表 5 C . 完全 A B T - 3 2 5 T E V ポリタンパク質発現ベクターのヌクレオチド配列 (配列番号 4 3)

【 0 5 1 4 】

10

20

30

【化 5 9】

GAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGACGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGA
CCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGA
GTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGG
TAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC
GCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGA CTACGCGGGATTTCCAAGTCTC
CACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTTTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCA
ATGACGCAAATGGGCAGGGAATTCGAGCTCGGTACTCGAGCGGTGTTCCGCGGTCTCCTCGTATAGAACTCGGACCAC
TCTGAGACGAAGGCTCGCGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCTAAGTGGGAGGGGTAGCGGTCGTTGTCCACTAGGGGG
TCCACTCGCTCCAGGGTGTGAAGACACATGTCGCCCTCTCGGCATCAAGGAAGGTGATTGGTTTTATAGGTGTAGGCCAC
GTGACCGGGTGTTCCTGAAGGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGCGTTCGTCTCACTCTCTTCCGCATCGCTGTCT
GCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGTTGAGGACAACTCTTCGCGGTCTTTCAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCG
GCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGACTGTTGGG
GTGAGTACTCCCTCTAAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAAACGAGGAGGATTTGATATTCA
CCTGGCCCGCGGTGATGCCTTTGAGGGTGGCCGCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCTTGAGG
TGTGGCAGGCTTGAGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCCACAGGTGTCCACTCCC
AGGTCCAACCGGAATTGTACCCGCGGCCAGAGCTTGCCCGGGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTCCTT
GTCGCGATTTTAAAAGGTGCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAACAGAGGTGAAAAAACCCGGGGAGTCTCT
GAAGATCTCCTGTAAGGGTCTGGATACACTGTTACCAGTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCC

TGGAGTGGATGGGATTCATCTATCCTGGTACTCTGAAACCAGATACAGTCCGACCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAG
 CCGACAAGTCCCTTCAATACCGCCTTCTGCAGTGGAGCAGTCTAAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGCGA
 GTCGGCAGTGGCTGGTACCCTTATACTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTACCGTCTCTTCAGCGTCGACCAA
 GGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAG
 GACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCC
 TACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
 AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCA
 CCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGGACCGTCACTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTC
 CCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
 GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCTGTGGTACAGCTCCTCA
 CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGA
 GAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGCGAGGAGATGACC
 AAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
 AGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTACAGCAAGCTCACCGTG
 GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA
 GAGCCTCTCCCTGTCTAGGGGTAAACCGGAACCAAGTTTATTTCCAGGGGAGCTTGTTAAGGGGGCCGCGTATTATAACC
 CAATATCGAGTGCCATTTGTATCTAACGAATGAATCTGATGGGCACACAACATCGTTGTATGGTATTGGTTTTGGCCCTT
 CATCATCACAACAAGCATTGTTTAGAAGAAATAATGGTACTGTTAGTTCAATCACTACATGGTGTGTTCAAGGTAAGAA
 ATACCACAACCTTTGCAACAACACCTCATTGATGGGAGGGACATGATGCTCATTGCGATGCCTAAGGATTTCCACCATTTCC
 TCAAAGCTGAAATTCAGAGAGCCACAAGGGGAAGAGCGCATATGCTTGTGACAACCAACTTCAAACCTAAGAGCATGTC
 TAGCATGGTTTTAGATACTAGTTGCACATCCCTTCTGATGGTATATTCTGGAACATTGGATTAGACCAAGGATGGG
 CACTGTGGTAGCCCGTTGGTGTCAACTAGAGATGGGTTTATTGTTGGTATACACTCAGCATCAAATTTACCAACACAACA
 ATTATTTTACAAGTGTGCCGAAAGACTTCATGGATTTATTGACAAATCAAGAGGCGCAGCAATGGGTTAGTGGTTGGCGATT
 GAATGCTGACTCAGTGTATGGGGAGGCCACAAGTTTTTATGAGTCAAACCTGAAGAACCCTTTAGCCAGTCAAAGAAGC
 AACTCAACTCATGAGTGAATAGTCTACTCGCAAGGGATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTTCTCCTGCTACTCTGGCT
 CCCAGATACCACTGGAGAAATAGTATGACGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCTTCATC
 CCTGCAGGGCCACTGAGAGTATTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCTTCATC
 TATACTGCTCCACAGGCGCCACTGATATCCAGCCAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCAT
 CAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGACGAGTATAATAACTGGCCTTCGATCACCTTCGGCCAAGG
 GACACGACTGGAGATTAACGAACACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG
 AACTGCTAGCGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCC
 AATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCT
 GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGA
 GCTTCAAACAGGGGAGAGTGTGAGCGGCCGCTTAAACTGAATGAGCGCTCCATCCAGACATGATAAGATACATTGAT
 GAGTTTGGACAAACCACAACACTAGAATGCAGTAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAAC
 CATTATAAGCTGCAATAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCAATTTATGTTTCAGGTTCAAGGGGGAGGTGTGGGAGGTT
 TTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCCGGCTGCCTCGCGCTTTCGGTATGACGGTG
 AAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCA
 GGGCGCTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATGACCGGTGACGGCGCGCCTTTTTTTTTAATTTTTATT
 TTATTTTTTTTTGACGCGCCGAAGGCGCGATCTGAGCTCGGTACAGCTTGGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGG
 AAAGTCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGAAAGTCCC
 CAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCC
 ATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAG
 GCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGAAAAAGCTCCTCGA
 GGAAGTAAAAACCAGAAAGTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTTCAAGTCCCGGATCCCGTGGTGGTGCAA
 ATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGG
 AATTGTACCCGCGGCTAATACGACTCACTATAGGGACTAGTATGGTTCGACCATTGAACTGCATCGTCCCGGTGTCCCAA
 AATATGGGATTGGCAAGAACGGAGACCTACCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCAAAGAATGACCAC
 AACCTCTCAGTGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTCTCCATTCTGAGAAGAATCGACC
 TTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAAAGAACCACCAGGAGCTCAATTTCTTGCCAAAAGTTTA
 GATGATGCCTTAAGACTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGCAGTTCTGTT
 TACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTT
 TTCCAGAAAATTGATTTGGGAAATAAACTTCTCCAGAATACCCAGGCGTCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGC
 ATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAAGCGGCCGAGCGCGGATCTGAAACGGGAGATGGGGGAG,
 GCTAACTGAAGCACGGAAGGAGACAATAACCGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACG
 GGTGTTGGGTGCTTTGTTTATAACCGGGGTTCCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCCATG
 GGGCAATACGCCCGCTTTCTTCTTTTCCCCACCCACCCCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAAC
 GTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCCACTGGCCCCGTGGGTTAGGGACGGGGTCCCCCATGGGGAATGGTTTATGGT
 TCGTGGGGGTTATTTTTGGGCGTTGCGTGGGGTCTGGAGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGTTACATTACTTACGG
 TAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAACGCCA

10

20

30

40

ATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATG
 CCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTT
 CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGA
 TAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTGTTTTGGCACAAAATCAACGG
 GACTTTCCAAAATGTCGTAAACAACTCCGCCCATTTGACGCAAAAGGGCGGGAATTCGAGCTCGGTACTCGAGCGGTGTT
 CGCGGTCTCCTCGTATAGAACTCGGACCACTCTGAGACGAAGGCTCGCGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCTAAGTG
 GGAGGGGTAGCGGTGTTGCTCACTAGGGGGTCCACTCGCTCCAGGGTGTGAAGACACATGTCGCCCTCTTCGGCATCA
 AGGAAGGTGATTGGTTTATAGGTGTAGGCCAGTGACCGGGTGTTCCTGAAGGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGC
 GTTCGTCCTCACTCTTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGTTGAGGACAAACTTTCGCGGT
 CTTCCAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCAT
 CGACCGGATCGGAAACCTCTCGACTGTTGGGGTGAAGTACTCCCTCTCAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGT
 CAGTTTTCCAAAACGAGGAGGATTTGATATTCACCTGGCCCGCGTGATGCCTTTGAGGGTGGCCGCGTCCATCTGGTCA
 GAAAAGACAATCTTTTTGTTGCAAGCTTGAAGTGTGGCAGGCTTGAAGTCTGGCCATACACTTGAAGTACAAATGACATCC
 ACTTTGCCCTTCTCTCCACAGGTGTCACCTCCAGGTCCAAACCGGAATTGTACCCGCGGCCAGAGCTTGGCGGCCACC
 GCGGCCGCGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCT
 TTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAAACAAGTTAACAAACAACAAATGCATTC
 ATTTTATGTTTCAGGTTCAAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTCGGATCCTCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCT
 GTGTGAAATTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGA
 GTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGA
 ATCGGCCAACGCGCGGGGAAAGGCGGTTTGCATTTGGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGG
 TCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGA
 AAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCGCGTTGCTGGCGTTCTTCCATAGGCTCCG
 CCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGT
 TTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCG
 GGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA
 AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCAGTAAAGGATTTTG
 GTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCCTTTAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAG
 TAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTCCATCCATAGTTG
 CCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGAC
 CCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCCTGCAACTTT
 ATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTT
 GCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCG
 AGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGC
 AGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGT
 GAGTACTAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGGGCAGCGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACC
 GCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATCATTGAAAACGTTCTTCCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTG
 TTGAGATCCAGTTGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAG
 CAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCACTCTTCTTTTTC
 AATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGG
 GTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGC
 GTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCTTTCGGTGTGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTC
 ACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCGTACGCGGTGTTGGCGGGTGTGCGGGC
 TGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAAG
 GAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCG
 CTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTTACGACG
 TTGTAACAGACGGCCAGTGAATT

10
20
30
40

【 0 5 1 5 】

表 6 A . D 2 E 7 L C - L C - H C ポリタンパク質構築物のコード配列 (配列番号 2 9)

【 0 5 1 6 】

【 化 6 0 】

ATGGACATGCGGTGCCCGCCAGCTGCTGGGCTGCTGCTGCTGTTCCCGGCTCGCGATGCGACATCCAGATGA
 CCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGGGACAGAGTCAACCATCACTTGTGGGCAAGTCAGGGCATCAGAAAT
 TACTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTC
 CCATCTCGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCTACAGCCTGAAGATGTTGCAACT

50

TATTACTGTCAAAGGTATAACCGTGCACCGTATACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCA
 CCATCTGTCTTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT
 ATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCA
 GGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAAGTCTAC
 GCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAAGGTGTAAGAGACTTCTCAA
 GTTGGCAGGAGACGTTGAGTCCAACCCTGGGCCCATGGACATGCGCGTGCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTG
 TGGTTCCCCGGCTCGCGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGGGACAGAGTCCAC
 CATCACTTGTGGGCAAGTCAGGGCATCAGAAATTACTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCT
 GATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCCTCTCGGTTGAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
 CATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAGGTATAACCGTGCACCGTATACTTTTGGCCAGGG
 GACCAAGGTGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG
 AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCA
 ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG
 AGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAAGTCTACGCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAG
 CTTCAACAGGGGAAGGTGTAAGAGACTTCTCAAGTTGGCAGGAGACGTTGAGTCCAACCCTGGGCCCATGGAGTTTGGC
 TGAGCTGGCTTTTCTTGTGCGGATTTTAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA
 CAGCCCCGCGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCGGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCA
 AGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAATGGGTCTCAGCTATCACTTGAATAGTGGTACATAGACTATGCGGACTCTGTGGAGG
 GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGATACGGCC
 GTATATTACTGTGCGAAAGTCTCGTACCTTAGCACCGCTCCTCCCTTACTATTGGGGCCAAGGTACCCTGGTACCGTC
 TCGAGTGCCTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
 TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA
 CACCTTCCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCA
 CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC
 AAAACTCACACATGCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAA
 GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAG
 TTCAACTGGTACGTGGAGCGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGCAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACC
 GTGTGGTACGCTCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCC
 CTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATC
 CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
 TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
 CAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

10

20

【 0 5 1 7 】

表 6 B . D 2 E 7 L C - L C - H C ポリタンパク質アミノ酸配列 (配列番号 3 0)

【 0 5 1 8 】

30

【 化 6 1 】

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRF
 SGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVLNNFYPREAKVQ
 WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGRCKRLLKLAGDVESNPGP
 MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRF
 SGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVLNNFYPREAKVQ
 WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGRCKRLLKLAGDVESNPGP
 MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSRLSCAASGTFDDYAMHWVRQAPGKLEWVSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCP
 PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
 PVLDSDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

40

【 0 5 1 9 】

表 6 C . D 2 E 7 L C - L C - H C ポリタンパク質発現ベクター D N A 配列の完全ヌクレオチド配列 (配列番号 3 1)

【 化 6 2 】

GAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGACGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGA
 CCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGA
 GTATTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGG

TAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC
GCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGATTTCCAAGTCTC
CACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCA
ATGACGCAAATGGGAGGAAATTCGAGCTCGGTACTCGAGCGGTGTTCCGCGGTCCTCCTCGTATAGAAACTCGGACCAC
TCTGAGACGAAGGCTCGCGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCTAAGTGGGAGGGGTAGCGGTGCTTGTCCACTAGGGGG
TCCACTCGCTCCAGGGTGTGAAGACACATGTCGCCCTTTCGGCATCAAGGAAGGTGATTGGTTTATAGGTGTAGGCCAC
GTGACCGGGTGTTCCTGAAGGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGCGTTCGTCCTCACTCTCTCCGCATCGCTGTCT
GCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGTTGAGGACAACTCTTCGCGGTCTTCCAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCG
GCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGACTGTTGGG
GTGAGTACTCCCTCTCAAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTGAGTTTCCAAAACGAGGAGGATTTGATATTCA
CCTGGCCCGCGGTGATGCCCTTTGAGGGTGGCCGCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCTTGAGG
TGTGGCAGGCTTGAGATCTGGCCATACACTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCCTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCC
AGGTCCAACCGAATTGTACCCGCGGCCAGAGCTTGCCCGGGCGCCACCATGGACATGCGCGTGCCTCCGCCCAGCTGCT
GGGCCTGCTGCTGCTGTTGCCCGGCTCGCGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
TAGGGGACAGAGTACCATCACTTGTGCGGCAAGTCAGGGCATCAGAAATTAAGCTTATGCTGATCAGCAAAAACAGGG
AAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCATCTCGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGG
GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATGTTGCAACTTACTGTCAAAGGTATAACCGTGCACC
GTATACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGA
TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA
GGTGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCACAGCCTC
AGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGA
GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAAGGTGTAAGAGACTTCTCAAGTTGGCAGGAGACGTTGAGTCCAACCT
GGGCCATGGACATGCGCGTCCCGCCAGCTGCTGGGCTGCTGCTGCTGCTGTTGCCCGGCTCGCGATGCGACATC
CAGATACCAGTCTCCACTCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGGGACAGAGTACCATCACTTGTGCGGCAAGTCAAGGCAT
CAGAAAATTACTTAGCTGGTATCAGCAAAAACAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATC
AGGGGTCCCATCTCGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATG
TTGCAACTTACTGTCAAAGGTATAACCGTGCACCGTATACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAATCAAACGTACGG
TGGCTGCACCATCTGCTTCACTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGA
ATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGTAAGTCCAGGAGAGTGTG
ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA
AAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAAGGTGTAAGAG
ACTTCTCAAGTTGGCAGGAGACGTTGAGTCCAACCTGGGCCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGCGGA
TTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCCGCAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCGGCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAAGGGCCTGGAAT
GGGTCTCAGCTATCACTTGAATAGTGGTACATAGACTATGCGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC
AAGGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGATACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGTCTCG
TACCTTAGCACCGCGTCTCCCTGACTATTGGGGCCAAGGTACCCTGGTACCGTCTCGAGTGCCTCGACCAAGGGCCC
ATCGGTCTTCCCGCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC
TTCCCGAACCAGGTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGT
CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG
AATCACAAGCCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCCGTG
CCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCACTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGA
CCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCACTGGTACGTTGACCGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTACGCTGACCGTCTCCAG
CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAC
CATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC
CAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACACTCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAATAACAAGACCACGCTCCCGTGGACTCCGACGGTCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGAATTAGTCTACTCGCAAGGGGCGGCCGCTTTAAACTGAATGAGCGCGTCCATCCAG
ACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAGTAAACAACAATGCAATCATTATTTGTTGAAATTTGTGAT
GCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAACAAGTAAACAACAATGCAATCATTATTTGTTGAAATTTGTGAT
GGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCCGGCTGCCTCGCG
CGTTTCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGG
GAGCAGACAAGCCCGTCAAGGGCGGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCGCAGCCATGACCGGTGACGGCGCGG
CCTTTTTTTTTAATTTTTATTTTTATTTTTGACGCGCCGAAGGCGCGATCTGAGCTCGGTACAGCTTGGCTGTGGAATG
TGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCA
ACCAGGTGTGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCA
CCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTT
TATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCTCTGAGCTATCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCT

10

20

30

40

TTTGCAAAAAGCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTATTTACAGGTCCCG
GATCCGGTGGTGGTGC AAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTACTT
CTGCTCTAAAAGCTGCGAAATTGTACCCGCGGCTAATACGACTACTATAGGGACTAGTATGGTTCGACCATTGAACTGC
ATCGTCGCCGTGTCCAAAATATGGGGATTGGCAAGAACGGAGACCTACCCTGGCCTCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTA
CTTCCAAAAGAAATGACCACAACCTCTTCAGTGAAGGTAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTCTCCAT
TCCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCA
TTTTCTTGCCAAAAGTTTAGATGATGCCTTAAGACTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGATA
GTCGGAGGCAGTTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGA
ATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCAGAAAATTGATTTGGGGAAATATAAACTTCTCCCAGAATACCCAGGCGTCTCTCTGAG
GTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAAGCGGCCGAGCGCGCGGATCTGGA
AACGGGAGATGGGGGAGGCTAACTGAAGCACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAA
GACAGAATAAAACGCACGGGTGTTGGGTGCTTTGTTTCATAAACCGGGGTTCCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTGATAC
CCCACCGAGACCCCATTGGGGCCAATACGCCCGGTTTTCTTCTTTTCCCCACCCCAACCCCAAGTTCGGGTGAAGGCC
CAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCCACTGGCCCCGTGGGTTAGGGACGGGGTCCCCAT
GGGGAATGGTTTATGGTTCGTGGGGTTATTATTTGGGCGTTGCGTGGGGTCTGGAGATCCCCGGGCTGCAGGAATTC
CGTTACATTACTTACGGTAAATGGCCCCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT
TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACA
TCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACAT
GACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATCGGTTTTGGCAGTAC
ATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGATTTCAAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGG
CACCAAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAAAGGGCGGGAATTCGAGCTCGGT
ACTCGAGCGGTGTTCCGCGTCTCCTCGTATAGAAACTCGGACCCTCTGAGACGAAGGCTCGCGTCCAGGCCAGCAC
GAAGGAGGCTAAGTGGGAGGGGTAGCGGTGATTGTTTATAGGTGTAGGCCACGTGACCGGTTTCTGAAAGGGGGCTATAAAA
CCCTCTTCGGCATCAAGGAAGGTGATTGGTTTATAGGTGTAGGCCACGTGACCGGTTTCTGAAAGGGGGCTATAAAA
GGGGTGGGGGGCGCTTTCGTCCTCACTCTCTTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGTTGAGGA
CAAACCTTTCGCGGTCTTTCAGTACTCTTGGATCGGAAAACCGTCGGCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCT
GAGCGAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGACTGTTGGGGTGTAGTACTCCCTCTCAAAGCGGGCATGACTTC
TGCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAACGAGGAGGATTTGATATTCACCTGGCCCGCGGTGATGCCTTTGAGGGTGGCCG
CGTCCATCTGGTCAGAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCTTGGAGTGTGGCAGGCTTGGATCTGGCCATACACTTGG
TGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAACCGGAATTGTACCCGCGGCCAGAGCT
TGCGGGCGCCACCGCGGCCGCGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAAACCACAACACTAGAAATGCA
GTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAAACA
CAACAATTGCATTCTTTTATGTTTCAGGTTCCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTCCGATCCTCTTGGCGTAATCATGGTC
ATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTG
GGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAAACCTGTGCTGCC
AGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAAAGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGAC
TCGCTGCGCTCGGTGTTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGG
GGATAACGCAGGAAAGACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTC
TTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATA
AAGATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCG
CCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGTTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTGGTGTAGGTGCTTCCGCTCA
AGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGGTCCAAACCG
GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGCTACACGA
GTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCGGTTACCTT
CGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGTCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTTTGTTGCAAGCAGCAGAT
TACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACG
TTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCCTTTTAAATTAATAAAGTAAATCAATCTA
AAGTATATAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGCT
TCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATAACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAAT
GATACCGCGAGACCCGACTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGT
GGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTT
TGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTGGTTGGTATGGCTTCACTCAGCTCCGTTCCC
AACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCCGTCCTCCGATCGTTGTCAGAA
GTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTT
TTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAAGTCACTTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTCCCGGGCGTCAAT
ACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATTTGGAAAACGTTCTTCCGGGGCGAAAACCTCTCAAG
GATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTACCAGC
GTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCAT
ACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAA
TAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACC

10

20

30

40

TATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCCTCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTC
 CCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGC
 GGGTGTGGGGCTGGCTTAACATGCGGCATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGACCATATGCGGTGTGAAATACCGCA
 CAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTG
 CGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTC
 CCAGTTACGACGTTGTAACGACGGCCAGTGAATT

【実施例 4】

【0520】

内部切断可能シグナルペプチド構築物を有するポリタンパク質としての抗体の発現
 更なる実施形態は、抗体発現のためのコード配列、発現ベクター及び方法で構成される
 。一次発現構築物は、内部切断可能シグナルペプチドを有するポリタンパク質を含み、発
 現とそれに続く切断によって、多連鎖（例えば、二連鎖）抗体分子が形成される。 10

【0521】

表 7 A . D 2 E 7 内部切断可能シグナルペプチド構築物のコード配列（配列番号 4 5
 ）

【0522】

【化 6 3】

atggagttgggctgagctggcttttctgtcgcgattttaaagggtgccagtgtgaggtgcagctggaggctctggggaggcttg
 gtacagcccggcaggtccctgagactctcctgtcggcctctggattcacctttgatgattatgcatgcaactgggtccggcaagctcc
 aggaaggcctggaatgggtctcagctatcacttgaatagtgggtcacatagactatgaggactctgtggagggccgattaccatct
 ccagagacaacgccaagaactccctgtatctgcaaatgaacagtctgagagctgaggatacggccgtatattactgtcgaagtctc
 gtacctagcaccgcgtcctccttactattggggccaagggtaccctggcaccgtctcagtgctcgaaccaaggcccatcggtct
 tcccctggcacctcctccaagagcacctctgggggcacagcggcctgggctgcctggtaaggactacttccccgaaccgggtg
 acggtgtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagca
 gcgtggtagcctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaaccaaggtggac
 aagaaagttagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagctctcc
 tctcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtgggtgggacgtgagccacgaagacc
 ctgaggtcaagttcaactggtagcggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtaaacagcac
 gtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccct
 ccagccccatcagaaaacctctcaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggat
 gagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctcaaggtctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgg
 gcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgtggactccgacggctccttctctacagcaagctaccgtggacaa
 gagcaggtggcagcaggggaacgttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctcctccct
 gtctaggggtaaacgcatgggacgaatggcaatgaaatggttagtgttataatgtttctctataacaagtcaacctgcttctgctatgg
 acatgcgctgcccggcagctgctggcctgctgctgctgtgtgttccccggctcgcgatcgacatccagatgaccagctccatc
 ctccctgtctgcatctgtaggggacagagtcacatcacttgcgggcaagtgcaggcatcagaaactttagcctggtatcagcaaa
 aaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccacttgcacatcagggggtccatctcggttcagtgagcagtgatctggg
 acagatttactctcaccatcagcagcctacagcctgaagatggtgcaacttattactgtcaaggtataaccgtgaccgtatactttgg
 ccaggggaccaaggtggaaatcaaacgtacgggtgacctatgcttctcctcccggatctgatgagcagttgaaatctggaa
 ctgctctgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggtaact
 cccagagaggtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaacgagactacg
 agaaacacaaagtctacgcctgcgaagtacccatcagggcctgagctcggcgtcacaagagcttcaacaggggagagtggtga 40

【0523】

表 7 B . D 2 E 7 内部切断可能シグナルペプチドポリタンパク質のアミノ酸配列（配
 列番号 4 6 ）

【0524】

【化 6 4】

MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE
WVSAITWNSGHIDYADSVGRFTISRDNALNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
RGKRMGRMAMKWLVIICFSITSPASAMDMRVPAQLLGLLLLWFGSRCDIQMTQSPSSLSASVGD
RVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVAT
YYCQRYNRAPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

10

【 0 5 2 5】

表 7 C . 完全 D 2 E 7 内部切断可能シグナルペプチドポリタンパク質発現ベクター D
N A 配列 (配列番号 4 7)

【 0 5 2 6】

【化 6 5】

gaagttcctattccgaagttcctattctctagacgttacataacttacggtaaattggcccgctggctgaccgccaacg
acccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggt
ggagtatttacggtaaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtagcggccctattgacgtcaatg
acggtaaattggcccgctggcattatgccagttacatgaccttattggactttctacttggcagttacatctacgtattag
tcatcgtattaccatgggtgatgagggtttggcagttacatcaatgggctggatagcgggttgactcacggggatttcaa
gtctccacccttattgacgtcaatgggagttgtttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactcc
gccccaatgacgcaaattggcagggattcgagctcggtagcgggtgttccgcggtcctcctcgtatagaac
tcggaccactctgagacgaaggctcgcgtccaggccagcaggaaggaggtaagtgggaggggtagcggctcgtt
gtccactaggggtccactcgcgtccagggtgtgaagacacatgtcgcctctcctcggcatcaaggaagggtgattggtta
taggtgtaggccacgtgaccgggtgttctgaagggggctataaaaggggtgggggcgcttcctcactctct
tccgcatcgtctcgcgaggccagctgtgggctcgcgggtgaggacaaactctcgcgggtcttccagttactcttg
atcggaaaccgctcggcctccgaacggtagctccgcccaggaggactgagcagctcggcatcagaccggatcgg
aaaacctcgcactgttgggtgagtagtccctcctcaaaagcgggcatgactctcgcgtaagattgtagtttcaaaa
acgaggaggattgatattaccctggcccggtgatgccttgagggtggccgctcctcgtcagaaaagaca
atcttttgtgtcaagctgagggtgtggcaggcttgagatctggccatacacttgagtgacaatgacatccactttgctt
ctctccacaggtgtccactcccaggccaaccggaattgtaccgcggccagagcttggccggcgccaccatgga
gtttggctgagctggcttttctgtcgcgattttaaagggtgtccagttgaggtgagctggtggagctgggggagg
cttggtacagcccggcaggtccctgagactctcctgtcggcctctggattcaccttgatgattatgccatgactgggt
cgggcaagctccagggaaggcctggaatgggtctcagctatcacttggaaatagtggtacatagactatgaggact
ctgtggaggggcattaccatctccagagacaacgccaagaactcctgtatctgcaaatgaacagctgagagct
gaggatacggccgtatattactgtcgaagctcgtaccttagcaccgctcctcctgactattggggccaaggta
ccctggtcaccgtctcagtgctcagcaaggccatcggcttccccctggcaccctcctcaagagcacctctg
ggggcacagcggccctgggctgctgtgcaaggactactccccgaaccggtagcgggtgtcgtggaactcaggcgc
cctgaccagcggcgtgcacacctccgggtgtcctacagttcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgt
gcccctcagcagctgggacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaaccaagggtggaca
agaaagttagcccaaatctgtgacaaaactcacatgccaccgtgccagacctgaactcctggggggacc
gtcagcttctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgagggtacatgctgtggtggtg
gacgtgagccacgaagacctgagggtcaagtcaactggtacgtggacggcgtggagggtgataatgccaagaca
aagccgaggaggagcagtagaacagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgaccaggactggctg
aatggcaaggagtacaagtgaaggctccaacaagccctcccagccccatcgagaaaacctctccaagc
caaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggctc
agcctgacctgctgtgcaaaaggcttctatcccagcagatcggcgtggagtgaggagcaatgggcagccggag

20

30

40

aacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaa
gagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaag
agcctctccctgtctaggggtaaacgcatgggacgaatggcaatgaaatggtagttggtataatattgttctataaca
agtcaacctgcttctgctatggacatgcgcggtgcccggcagctgctgggctgctgctgctggttccccggctcgcg
atgagacatccagatgaccagctcctcctcctgctgcatctgtaggggacagagtcaccatcactgtcgggca
agtcagggcatcagaaattacttagcctggatcagcaaaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgctgc
atccacttgaatcaggggtcccatctcgggtcagtgagtgatctgggacagattcactctcaccatcagcagcc
tacagcctgaagatggtgcaacttactgtcaaaaggtataaccgtgcaccgtatactttggccaggggaccaaggt
ggaaatcaaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcct
ctgtgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaaggtggataacgccctccaatcgg
gtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctg
agcaaagcagactacgagaaacacaaagctacgcctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcac
aaagagctcaacaggggagagtggtgagcggccgctttaaactgaatgagcgcgtccatccagacatgataaga
tacattgatgagttggacaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgcttatttggaaatttggatgctattgcttt
atttgaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcatttatgtttcaggttcagggggaggt
gtgggaggtttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggatggctgattatgatccggctgcctcgcgcttccggt
gatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagctgtctgtaagcggatgccgggagca
gacaagcccgtcagggcgcgctcagcgggtgtggcgggtgctggggcgcagccatgaccggctgacggcgcgcc
tttttttaatttttattttattttttgacgcgcccgaaggcgcgatctgagctcggtagcagcttggctggaatgtgtgca
gttaggggtgaaagtcaccaggtccccagcaggcagaagatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaacc
aggtgtggaaagtccccaggtccccagcaggcagaagtaigcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccatag
tcccgccctaactcccgccatcccggccctaactcccggcagttcccggcattctcccggccatggctgactaattttt
tattatgcagaggccgaggccgctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggtttttggaggcctaggc
ttttgcaaaaagctcctcgaggaactgaaaaaccagaaagtaactggtaagtttagtctttttgctttttttaggtccc
ggatccgggtggtggtgcaaatcaaagaactgctcctcagtgatggttgccttacttctaggcctgtacggaagtgtact
ctgctctaaaagctgcggaattgtacccgcgccctaatacagactcactatagggactagtaggttcgaccattgaact
gcatctgcccgtgtcccaaaatattggggattggcaagaacggagacctaccctggcctccgctcaggaacgaggt
caagtaactccaagaatgaccacaacctctcagtggaaggtaaacagaatctggtgattatgggtaggaaaacct
ggtctcattcctgagaagaatcgacctttaaaggacagaattaatagttctcagtagagaactcaaagaaccac
cacgaggagctcatttcttgccaaaagtttagatgatgccttaagacttattgaacaaccggaattggcaagtaaagta
gacatggtttggatagtcggaggcagttctgtttaccaggaagccatgaatcaaccaggccacctcagactcittgtga
caaggatcatgcaggaattgaaagtgacacggttttccagaaattgattggggaaatataaacttctcccagaatac
ccaggcgtcctctgagggtccaggaggaaaaaggcatcaagtaagtttgaagtctacgagaagaagactaag
cggccgagcgcgagatctggaaacgggagatgggggaggctaactgaagcacggaaggagacaataaccgga
aggaacccgctatgacggcaataaaaagacagaataaaacgcacgggtgtgggtcgtttgtcataaacgcg
gggtcgggtccagggtggaactctgctgataccccaccgagacccattggggccaatacggccgcttcttctttt
ccccacccaccccccaagttcgggtgaaggcccagggtcgcagccaacgtcggggcggcaggccctgccata
gccactggccccgtgggttagggacgggggtccccatggggaatggttatggttcgtgggggtattatttgggctg
cgtggggtctggagatccccgggtgcaagattccggtacattactacggtaaatggcccgcctggctgaccgcc
caacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaa
tgggtggagtatttacggtaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgt
caatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagctacatgacctatgggacttctacttggcagtacatctacg
tattagctacgctattaccatggtgatgctggtttggcagtacatcaatgggctggatagcgggttggactcacggggatt
tccaagtctccacccattgacgtcaatgggagttgtttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaaaca
actccgccccattgacgcaaaagggcgggaattcgagctcggctactcgagcgggtgtccgcggtcctcctcgtataga
aactcggaccactctgagacgaaggctcgcgtccaggccagcacgaaggaggtaagtgggaggggttagcggctc
gttgcactaggggtccactcgtccagggtgtgaagacacatgtcggcctctcggcatcaaggaaggtgattgggt
ttataggtgtaggccacgtgaccgggtgttctgaagggggctataaaaggggggtgggggcgctcgtcctcactc
tctccgcatcgctgtctgagggccagctgttgggctcgcgggtgaggacaaaactctcgggtcttccagctactctg
gatcggaaaccgctcggcctccgaacggctactccgccaccgaggacctgagcagctccgcatcagaccggatcg

10

20

30

40

gaaaacctctcgactgttgggggtgagtactccctctcaaaagcgggcatgacttctgcgctaagattgtcagtttccaaa
 aacgaggaggatttgatattcacctggcccgcgggtgatgcctttgaggggtggccgctccatctggcagaaaagac
 aatcttttgttgcagcttgagggtggcaggcttgagatctggccatacactgagtgacaatgacatccactttgcctt
 tctctccacaggtgtccactcccagggtccaaccggaattgtaccgcgccagagcttgcggggccaccgcgggc
 gcggggatccagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgcttt
 atttgtaaatttgatgctattgctttattgtaaccattataagctgcaataaacaagtaacaacaacaattgcattcat
 tttatgtttcaggttcagggggagggtggtgggaaggttttccggtcctcttggcgtaatcatggcatagctgttctctgtgga
 aatgttatccgctcacaattccacacaacatacagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaatagagt
 gagtaactcacattaattgcttgcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaa
 tcggccaacgcgcggggaaaggcggttgcgattggcgctcttccgcttctcgcctcactgactcgtcgcgctcgggt
 cggtcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacgggtatccacagaatcaggggataacgca
 ggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgcgtggcgttctcca
 taggctccgccccctgacgagcatcacaanaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccggacaggaactata
 aagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctcctctgttccgacctgcccgttaccggataacctgtccg
 ccttctcccttccggaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttccgctcaag
 ctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccgtcgccttatccgtaactatcgtctgagccaaccggg
 taagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtgctac
 agagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagatttggatctcgcgctcgtcgaagccagta
 ccttcgaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaccaccgctggtagcgggtggtttttgttgaagcag
 cagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggctgacgctcagtggaacgaa
 aactcacgtaagggtatttggcatgagattcaaaaaggatcttccactagatccctttaataaaaaatgaagttta
 aatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcgatct
 gtctatttctcatccatagttgctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggttaccatctggcccca
 gtgctgcaatgataccgagagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaaggg
 ccgagcgcagaagtggctctgcaactttatccgctccatccagcttattaattgttgccgggaagctagagtaagtagt
 tcgccagtaaatagtttgcgaacgttggcattgctacaggcatcgtgggtgacgctcgtcgttggatggctcattc
 agctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttggcaaaaaagcggtagctcctcgggtctc
 cgatcgttgcagaagtaagtggccgagtggtatcaciccatggtatggcagcactgcataattctctactgcatgcc
 atccgtaagatgcttttctgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctc
 ttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcattggaaaacgttctc
 gggcgaaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgtatgtaaccactcgtgcaccaactgatctcag
 catcttttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaaatgccgcaaaaagggaataagggc
 gacacggaaatgttgaatactcatactcttcttttcaatattatgaagcattatcaggggtattgtctcatgagcggata
 catattgaaatgtatttagaaaaataaacaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaa
 gaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggcccttctcgtcgcgcttccggtgatgac
 ggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacgggtcacagctgtctgtaagcggatgccgggagcagacaa
 gcccgtagggcgctcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtact
 gagagtgcaccatagcgggtgtaataaccgcacagatgcgtaaggagaaaataaccgcatcagggcaccattcggc
 attcaggctgcgcaactgttgggaaggcgatcgggtgcgggcctctctcgtattacgccagctggcgaagggggat
 gtgctgcaaggcgattaagtgggtaacgccagggtttccagttacgacgttgtaaacgacggccagtgaaat

【 0 5 2 7 】

材料及び方法：

記述した構築物を 293 - 6 E 細胞に以下のように移入する。使用した細胞は、指数増殖期の HEK 293 - 6 E 細胞 (0 . 8 から 1 . 5 × 1 0 ⁶ 細胞 / m l) である。この細胞は、30 回未満継代培養された。培養物を新しい増殖培地に 3 又は 4 日おきに濃度 3 × 1 0 ⁵ 細胞 / m l まで接種する。増殖培地は、ジェネテシン (G 4 1 8) 2 5 u g / m l (G I B C O (商標) C a t . N o . 1 0 1 3 1 - 0 2 7) 及び 0 . 1 % P l u r o n i c F - 6 8 (界面活性剤、G I B C O (商標) C a t . N o . 2 4 0 4 0 - 0 3 2) を補充した F r e e S t y l e (商標) 2 9 3 E x p r e s s i o n M e d i u m (G I B C O (商標) C a t . N o . 1 2 3 3 8 - 0 1 8 、 I n v i t r o g e n 、 C a r l s b a d 、 C A) である。移入培地は、最終濃度 1 0 m M H E P E S B u f f

10

20

30

40

50

er Solution ml (GIBCO (商標) Cat. No. 15630-080) を含む FreeStyle (商標) 293 Expression Medium (GIBCO (商標) Cat. No. 12338-018) である。移入のために、最適なベクターDNAを添加して、最適化実験に基づいて変化する濃度 $1 \mu\text{g}$ (重鎖 + 軽鎖) / ml とする。PEI (ポリエチレンジアミン)、線状、25 kDa、 $1 \text{mg} / \text{ml}$ 無菌原液、pH 7.0 (Polysciences, Inc., Warrington, PA) を移入媒介物質として DNA : PEI 比 1 : 2 で添加する。使用した栄養補給 (Feeding) 培地は、Tryptone N1 Medium (TekniScience Inc. Tel # 1-800-267-9799 から入手可能な Organotechnie France 製 TN1 粉末、Cat No. 19554) である。FreeStyle (商標) 293 Expression Medium 中 5% w/v 原液を添加して最終濃度 0.5% にする。標準実験室装置を一般に使用する。Cedex Cell Counting System を使用する (Innovatis, Bielefeld, Germany)。

10

【0528】

各小規模移入を 125 ml 三角フラスコ中で以下のように実施する。新しい培地 20 ml 一定分量に生細胞 1×10^6 細胞 / ml を接種する。(注: より大きい体積の場合、培養物は容器の公称容量の 20 - 25%、例えば 500 ml フラスコ中培養物 100 ml とすべきである)。次いで、培養物を 5% CO_2 の加湿雰囲気中で回転速度 130 rpm で 37 インキュベーター中に置く。

20

【0529】

DNA - PEI 複合体調製物を、移入培地を水浴で 37 に加温し、凍結 PEI 原液及び (-20 で貯蔵した) DNA 溶液を室温で解凍することによって調製する。使用する DNA 及び PEI の各量は、移入される培養物の総体積に基づく。DNA / PEI 複合体 2.5 ml 及び Tn1 2.5 ml を含む培養物 20 ml は、合計 DNA 25 μg 及び PEI 50 μg を要する。(例えば、10 個の移入物用の) DNA : PEI 複合体は、最適な DNA ベクターを含有する溶液を添加した管 A に、移入培地 12.5 ml を最終濃度 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ まで混合することによって形成される。PEI に対して移入培地 12.5 ml を添加する (20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、最終濃度)。PEI 混合物を約 10 秒間ボルテックス攪拌して混合した後、DNA 溶液と混合する。PEI と DNA の各混合物を組み合わせた後、組合せを 10 秒間ボルテックス攪拌して混合する。次いで、混合物を室温で 15 分間 (ただし、20 分間以下) 静置する。DNA : PEI 複合体溶液 2.5 ml を HEK-6E 細胞 20 ml に添加する。移入から約 20 から 24 時間後に、5% TN1 補助剤を各フラスコに最終濃度 0.5% まで添加する。

30

【0530】

細胞密度及び生存度を 4 日目及び 7 日目に求める。細胞ペレットを、ウエスタン分析及びノーザンプロット分析用に培養物 2 ml 一定分量から収集する)。ペレットを分析まで -80 で凍結する。移入から 7 日後に細胞を 1000 rpm (10 min) の遠心分離によって収集し、プレフィルター紙及び Corning 0.22 μm CA Filter システムによって上清をろ過する。上清試料も分析、例えば ELISA アッセイに使用するまで 80 で貯蔵する。

40

【0531】

ノーザンプロット分析の場合、過渡的に移入された 293-6E 細胞から全 RNA を以下のように単離する。凍結細胞ペレットを氷上で解凍する。RNA を Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, cat. # 74104) を用いて、製造者の指示に従って精製する。

【0532】

ホルムアルデヒド / アガロースゲル調製は以下のとおりである。アガロース (Ambion, cat. # 9040) 2 グラムを蒸留水 161.3 ml 中で煮沸する。1 M MOPS (モルホリノプロパンスルホン酸) pH 7.0 4 ml、1 M NaOAc 1 ml

50

、0.5 M EDTA 0.4 mlを添加し、混合物を60 に冷却する。次いで、37%ホルムアルデヒド(J. T. Baker、cat # 2106-01) 33.3 mlを添加し、溶融アガロース溶液を静かに混合する。ゲルを注ぎ、換気フード中で凝固させる。

【0533】

1 M MOPS、pH 7.0 30 ml、1 M NaOAc 7 ml、0.5 M EDTA 3 ml及び1.5までのDEPC(ジエチルピロカルボナート)処理dH₂Oを混合することによって、泳動緩衝剤を調製する。

【0534】

formaldehyde load dye(Ambion、cat. # 8552) 3部をRNA 1部と混合することによってRNA試料を調製する。1レーン当たりRNA 3から5 µgを泳動させる。使用したRNA分子量マーカーは、0.5 - 10 Kb RNA Ladder(Invitrogen、cat. # 15623-200)からである。試料を65 で5分間加熱して変性し、氷冷する。次いで、10 µg/µl臭化エチジウム(Pierce、cat. # 17898) 0.5 µlを各試料に添加する。各試料を短時間遠心分離して液体をペレットにする。

10

【0535】

ゲル電気泳動を以下のように実施する。ホルムアルデヒド/アガロースゲルを泳動緩衝剤で覆い、試料を載せ、次いで150 Vで2時間換気フード中で泳動させる。バンドを紫外線透視法によって検査し、永久記録用に写真を撮影する。

20

【0536】

DEPCで処理したdH₂Oの幾つかの变化物(change)にゲルを5分間浸漬して、ホルムアルデヒドを除去することによって、キャピラリートランスファーを実施する。次いで、ゲルを50 mM NaOH、10 mM NaCl中に室温で20分間浸漬して、二本鎖RNAを更に変性させる。ゲルを、DEPCで処理したdH₂Oで1回リンスし、次いで、20×SSC(NaCl 175.3 g;クエン酸ナトリウム88.2 g;10 M NaOHを用いてpH約7.0へ、1 Lに調節した体積)に室温で20分間浸漬して中和する。Hybond-N+膜(Amersham Biosciences、cat # RPN303B)を浸漬し、ゲルと同じサイズに切断し、DEPCで処理したdH₂Oで湿らせる。3 Mろ紙(Whatman cat # 3030917)をゲル及び膜と同じサイズに切断する。上部に組み立てられる層を通してろ紙が20×SSCを毛管作用によって吸い取るように、20×SSC貯蔵器上の固体担体に3 Mろ紙の層を配置することによって、移行系を組み立てる。この毛管作用体(wick)、Hybond-N+膜、サイズに切断した3 Mろ紙3枚、及びGel Blot Paper(Schleicher & Schuell、cat. # 10427920)の厚い積層物の上にゲルを置く。平坦な支持体を積層物の上に置き、必要に応じて荷重(通常、1リットルビンの水)を加えて、効率的キャピラリートランスファーを確かなものにする。プラスチックラップを使用して、空気にさらされる貯蔵器を覆って蒸発を防止する。室温で終夜移行させる。次いで、移行系を分解し、プロットを6×SSCに浸漬して、アガロースを除去する。膜を風乾し、UVに曝露してプロットを架橋する。

30

40

【0537】

DNAプローブテンプレートは、D2E7の重鎖及び軽鎖のコード領域である。所望のテンプレート100 ngを、Alk Phos Direct Labeling Reagentsキット(アルカリホスファターゼ標識系、Amersham Biosciences、cat. # RPN3680)を用いて製造者の指示に従ってアルカリリン酸塩で標識する。プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーション段階を、標識の場合と同じキットを用いて実施した(ハイブリダイゼーション緩衝剤を含む)。膜をハイブリダイゼーションオープン中で65 で少なくとも1時間プレハイブリダイズする。プローブを煮沸し、プレハイブリダイゼーション緩衝剤/プロットに直接添加する。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーションオープン中で65 で終夜起きた。ハイブ

50

リダイゼーション溶液をデカントし、膜を2×SSCで短時間洗浄してハイブリダイゼーション溶液を除去し、次いで2×SSC、0.1%SDSで65℃で各15分間2回洗浄し、最後に0.1×SSC、0.1%SDSで65℃で各15分間2回洗浄した。膜上のバンドを可視化するために、化学発光を用いた。プロットにCDP-Star Detection Reagent (1,2-ジオキセタン基質からのフォトープ(photope)のアルカリホスファターゼ依存的生成、Amersham Biosciences, cat.#RPN3682)を室温で5分間塗布する。過剰の試薬をプロットから抜き取り、次いでプロットをプラスチック保護シートで包んだ。プロットをKodak Biomax MRフィルム(X線フィルム、Kodak, cat.#8952855)に曝露し、10秒から最高10分間開始した。フィルムをKodak M35A X-OMAT Processor(X線現像機/現像処理機)によって現像した。

10

【0538】

ウエスタンプロット用細胞ペレット試料を以下のように調製した。細胞内抗体発現の分析のために、細胞をNP40溶解緩衝剤(50mM Tris-HCl, pH7.5、150mM NaCl、1%NP40(オクチルフェノールポリ(エチレングリコールエーテル))、5mM BME及びプロテアーゼ阻害剤カクテルIII)で溶解し、氷上で10分間インキュベートした。膜及び不溶性タンパク質の各画分を、微量遠心機を用いて遠心分離によって16,000rpmで30分間収集する。可溶細胞内又はサイトゾル画分と呼ばれる上清をゲル分析に使用し、DTTを含むSDSローディングバッファーを添加した。ペレットを等体積の溶解緩衝剤で懸濁させ、DTTを含むSDSゲルローディングバッファーを添加した。培養上清試料をウエスタンプロット用に以下のように調製した。培養上清をCentricon Ultra(限外ろ過装置、Millipore)によって、MWカットオフ30,000ダルトンで濃縮し、又はウエスタンプロットに直接使用した。免疫プロット(ウエスタン分析)のために、試料をNUPAGE 4-12%Bis-Tris(ポリアクリルアミド)ゲルによって分離し、PVDF膜に標準方法によって移した。膜をブロッキング溶液(0.05%Tween 20(ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート)及び5%粉乳を含むPBS)中で1時間インキュベートし、洗浄し、PBST緩衝剤で1:1000希釈してDakoCytomation(Denmark)製ポリクローナルウサギ抗ヒトIgG/HRP又はポリクローナルウサギ抗ヒトカップ軽鎖/HRPと一緒にインキュベートし、次いでPBSTを3回変えて室温で再度洗浄した。GE/Amersham Biosciences(Piscataway, NJ)製ECL Plus Western Blotting Detection(化学発光及び化学蛍光検出)Systemを検出に使用した。

20

30

【0539】

ELISAアッセイを、Southern Biotech(Birmingham, AL)製ヤギ抗ヒトIgG、UNLB及びヤギ抗ヒトIgG/HRP、プロット緩衝剤として2%乳のPBS溶液、基質としてK-Blue(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン及び過酸化水素(H₂O₂、Neogen、Lansing、MI)を用いて、標準方法によって実施した。プレートをSpectramaxマイクロプレートリーダーによって主波長650nm及び基準波長490nmで読み取った。

40

【0540】

Invitrogen(Carlsbad, CA)製Protein A Agaroseビーズ、Pierce製Immuno Pure(A)IgG Binding Buffer、洗浄緩衝剤としてPBS、pH7.4、及び(1M Tris pH9.5で中和した)溶出緩衝剤として0.1M酢酸/150mM NaCl、pH3.5を用いて、標準方法によって分泌抗体を親和性精製した。

【0541】

完全な分子量の測定 構築物pTT3 HC-int-LC P.horiから産生されたD2E7試料の完全な分子量をLC-MSによって分析した。タンパク質マイクロラップ(Michrom Bioresources, Inc. cat. 004/

50

25109/03)を備えた1100キャピラリーHPLCシステム(Agilent SN DE 14900659)を用いて、試料を脱塩し、Q Star Pulsar i質量分析計(Applied Biosystems、SN K1820202)に導入した。試料を溶出させるために、緩衝剤A(0.08%FA、0.02%TFAのHPLC水溶液)と緩衝剤B(0.08%FAと0.02%TFAのアセトニトリル溶液)を用いて、流量50 μ L/minで15分間勾配をかけた。

【0542】

軽鎖及び重鎖の分子量の測定 構築物 pTT3 HC-int-LC P.horiから産生された未変性D2E7試料をLC-MSによって分析した。軽鎖と重鎖を連結するジスルフィド結合を20mM DTT中で37 $^{\circ}$ Cで30分間還元した。PLRP-Sカラム(Michrom Bioresources, Inc. 8 μ m、4000、1.0 \times 150mm、P/N 901-00911-00)を備えた1100キャピラリーHPLCシステム(Agilent SN DE 14900659)を用いて、軽鎖を重鎖から分離し、それらをQ Star Pulsar i質量分析計(Applied Biosystems、SN K1820202)に導入した。カラムを60 $^{\circ}$ Cで加熱した。緩衝剤A(0.08%FA、0.02%TFAのHPLC水溶液)と緩衝剤B(0.08%FAと0.02%TFAのアセトニトリル溶液)を用いたHPLC勾配を、流量50 μ L/minで60分間流して試料を溶出させた。

10

【0543】

制限エンドヌクレアーゼをNew England Biolabs(Beverly, MA)から入手した。クローニングに使用した特注のオリゴヌクレオチド、DNAポリメラーゼ、DNAリガーゼ及びE.コリ系統をInvitrogen(Carlsbad, CA)から入手した。プロテアーゼ阻害剤カクテルIIIをCalbiochem(La Jolla, CA)から入手した。Qiagen(Valencia, CA)製品をDNA単離及び精製に使用した。

20

【0544】

参照及び変形物による組込みに関する記載

本願を通して言及する全参考文献、例えば、発行若しくは登録された特許又は等価物、特許出願公報、未公開特許出願を含めた特許文献、及び非特許文献又は他の原資料を、参照により個々に本明細書に組込むかのごとく、参照によりその全体を本明細書に組込む。万一、引用した参考文献と本願の開示に不一致が生じた場合には、本明細書の開示を優先する。本明細書の一部の参考文献は、情報、例えば、出発材料、追加の出発材料、追加の試薬、追加の合成方法、追加の分析方法、追加の生体材料、追加の細胞、及び本発明の追加の使用の各出所に関する詳細を提供するために、参照により本明細書に組込まれる。

30

【0545】

本明細書で言及する全部の特許及び刊行物は、本発明が関係する当業者の技術レベルを示している。本明細書で引用する参考文献は、その刊行日又は出願日の時点における最新技術を示し得るものであり、この情報は、適格な従来技術内である特定の実施形態を排除するために、必要に応じて、本明細書で使用できるものとする。例えば、組成物を本明細書で特許請求するときには、本明細書で引用する参考文献において授权的に開示する化合物を含めて、本出願人の発明に関連した適格な従来技術として公知であり、利用可能である化合物は、本明細書の組成物クレームに含まれないものであることを理解すべきである。

40

【0546】

本明細書の添付物を、明細書及び/又は図面の一部として参照により組込む。

【0547】

本明細書では「含む(comprise)」、「含む(comprises)」、「含まれる(compri sed)」又は「含むこと(comprising)」という用語は、言明した特徴、整数、段階又は成分の存在を明示すると解釈すべきであるが、1つ以上の他の特徴、整数、段階、成分又はこれらの群の存在又は追加を除外するものではない

50

。したがって、本明細書では、含むことは、含めて (i n c l u d i n g)、含む (c o n t a i n i n g)、有する、又はを特徴とすると同義であり、包括的又はオープンエンド (o p e n - e n d e d) である。本明細書では、「からなる」は、特許請求の範囲に明示されていないあらゆる要素、段階、成分などを排除する。本明細書では、「から本質的になる」は、(例えば、活性成分に関係して)特許請求の範囲の基本的及び新規の特性に物質的に影響を及ぼさない材料又は段階を排除しない。本明細書の各場合において、「含む」、「から本質的になる」及び「からなる」という用語のいずれも、それ以外の2つの用語のどちらかで置換し得るものであり、それによって、必ずしも同一の広がりを持つとは限らない、別々の実施形態及び/又は範囲を開示し得る。本明細書に説明的に記述された本発明は、本明細書に具体的に開示しない任意の要素又は制約の非存在下で適切に実施し得る。

10

【0548】

範囲、例えば、温度範囲、時間範囲、組成若しくは濃度範囲、又は他の値の範囲などを本明細書で開示するときにはいつでも、全部の中間範囲及び部分範囲 (s u b r a n g e)、並びに所与の範囲に含まれる個々の値全部が開示に含まれるものとする。本発明は、図面に示す任意の実施形態、又は明細書に例示する任意の実施形態を含めて、開示する実施形態に限定されるべきではない。これらの実施形態は、例又は説明として示すものであって、限定的なものではない。本明細書の記載に含まれる任意の部分範囲、又は範囲若しくは部分範囲内の個々の値は、特許請求の範囲から除外し得ることを理解されたい。

20

【0549】

本発明を、種々の特定の、及び/又は好ましい、実施形態及び技術に関連して記述した。しかし、多数の変形及び改変が、本発明の精神及び範囲内でなされ得ることを理解すべきである。本明細書に具体的に記載したものの以外の組成物、方法、装置、装置部品、材料、手順及び技術を、過度の実験を行うことなく、本明細書に大まかに開示する本発明の実施に使用できることは当業者には明らかである。これは、具体的に例示したものの以外の、例えば、出発材料、生体材料、試薬、合成方法、精製方法、分析法、アッセイ方法及び生物学的方法に拡張することができる。本明細書に記載の上述のもの(例えば、組成物、方法、装置、装置部品、材料、手順及び技術など)の当分野で公知である全部の機能的等価物は、本発明に包含されるものとする。使用した用語及び表現は、説明の用語として使用され、限定的な用語ではない。かかる用語及び表現の使用において、示した、また、記述した特徴又はその部分の任意の等価物を除外することを意図したものではない。そうではなく、種々の改変が、特許請求する本発明の範囲内で可能であることを認識されたい。したがって、本発明を実施形態、好ましい実施形態、及び必須でない特徴によって具体的に開示したが、本明細書で開示する概念の改変及び変形が当業者によってなされ得るものであり、かかる改変及び変形は、添付の特許請求の範囲に規定された本発明の範囲内とみなされることを理解すべきである。

30

【0550】

追加の参考文献

米国特許第6258562号、米国特許第6090382号；米国特許第6455275号；欧州特許第1080206号B1；国際公開第9960135号；米国特許第5912167号；米国特許第5162601号；国際公開第199521249号A1；米国特許第5149783号；米国特許第5955072号；米国特許第5532142号；米国特許出願公開第20040224391号；米国特許第6537806号；米国特許第5846767号；米国特許出願公開第20030099932号；国際公開第9958663号；米国特許出願公開第20030157641号；米国特許出願公開第2003048306号A2；米国特許第6114146号；米国特許第6060273号；米国特許第5925565号；米国特許出願公開第20040241821号；国際公開第2003100021号A2；国際公開第2003100022号A2；米国特許出願公開第20040265955号；米国特許出願公開第20050003482号；米国特許出願公開第20050042721号；国際公開第2005017149号；国際公

40

50

開第2004113493号；米国特許出願公開第20050136035号；国際公開第2004108893号；米国特許第6692736号；米国特許出願公開第20050147962号；米国特許第6331415号；米国特許第6632637号；米国特許出願公開第20040063186号；米国特許第7026526号；米国特許第6365377号；国際公開第2005123915号；米国特許第5665567号；国際公開第9741241号A1；欧州特許第0701616号B1；米国特許出願公開第20060010506号；国際公開第2006048459号；米国特許第6852510号；国際公開第2005072129号；米国特許第5648254号；米国特許第6908751号；米国特許出願公開第20050221429号；国際公開第2005071088号；国際公開第2005108585号；国際公開第2005085456号；米国特許第7029876号；米国特許第6638762号；米国特許第6544780号；米国特許第5519164号；国際公開第2003031630号；米国特許第6294353号；国際公開第2005047512号；米国特許第7052905号；米国特許第7018833号；米国特許出願公開第20020034814号；米国特許出願公開第20040126883号；米国特許出願公開第20050002907号；米国特許出願公開第20050112095号；米国特許出願公開第20050214258号；欧州特許第0598029号。

10

【0551】

Mathys S et al., 1999, Gene 231(1-2):1-13, Characterization of a self-splicing mini-intein and its conversion into autocatalytic N- and C-terminal cleavage elements: facile production of protein building blocks for protein ligation.

20

【図面の簡単な説明】

【0552】

【図1】好ましい安定なsORF発現ベクター構築物を示す図である。

【図2】（自動プロセシング部位であり得る）第2のタンパク質切断部位をコードする追加の（第2の）介在核酸、及び第3のポリペプチドをコードする第3の核酸配列を更に含む、好ましい安定なsORF発現ベクター構築物を示す図である。かかるベクターは、2種類を超えるポリペプチドを発現可能である。

30

【図3】好ましい一過性sORF発現ベクター構築物（例えば、pTT3-HC-Ssp-GA-int-LC-Oaa）を示す図である。

【図4】二重ハイブリッド系用の2Aセグメントを含む発現ベクターを示す図である。ベクター発現カセットは、2Aペプチドの翻訳後に自己プロセシングを受ける、GAL4：：ベイト：：2Aペプチド融合物としてベイトタンパク質を最初に翻訳するように構成されている。第2のオープンリーディングフレーム（ORF）は、NFカップB：：ライブラリー融合タンパク質である。

【図5】図4のプラスミド（2A切断を含む2-ハイブリッド系）の発現領域の拡大線状図である。

40

【図6】免疫グロブリン発現用のインティンに基づくsORFベクターを示す図である。

【図7】抗体などの組立て（assembling）多量体分子の発現のために選択された点変異を含む幾つかのsORF構築物を示す図である。

【図8】変化したシグナルペプチド、例えば、修飾免疫グロブリン軽鎖シグナルペプチドを含むsORF構築物を示す図である。

【図9】ヘッジホッグ自動プロセシングドメインを用いたsORF構築物を示す図である。

。

【 図 1 】

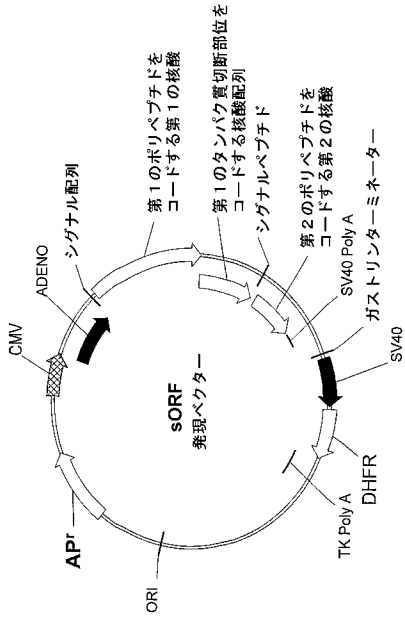


Fig. 1

【 図 2 】

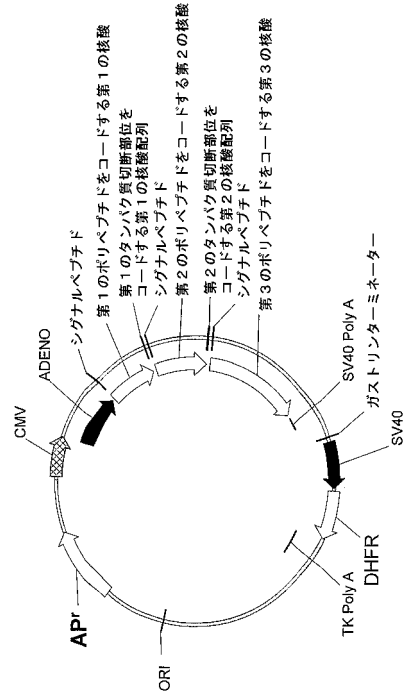


Fig. 2

【 図 3 】

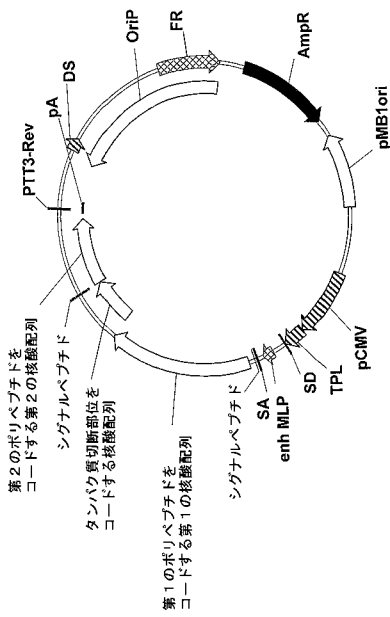


Fig. 3

【 図 4 】

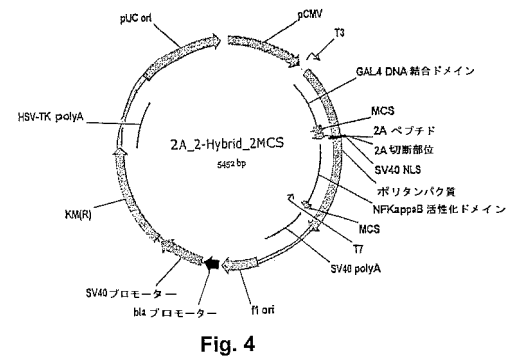


Fig. 4

【 図 5 】

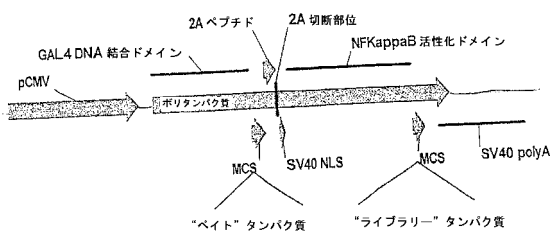


Fig. 5

【 図 6 】

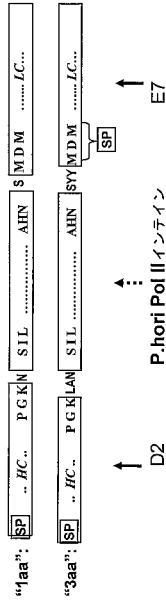
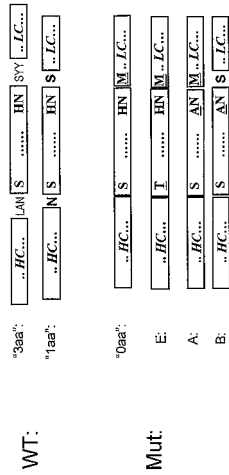


Fig. 6

【 図 7 】



*"3aa" = pTT3-HcintLC3aa-p.hori
 "1aa" = pTT3-HcintLC1aa-p.hori
 "0aa" = pTT3-HcintLC-p.hori
 ** AA は、変異を表す。
 *** LAN及びSYは、未変性エクスチンミアミノ酸残基である。

Fig. 7

【 図 8 】

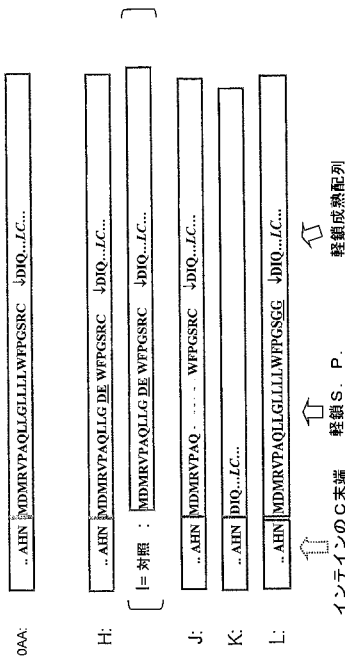


Fig. 8

↓ : シグナルペプチド (S. P.) 切断部位

【 図 9 】

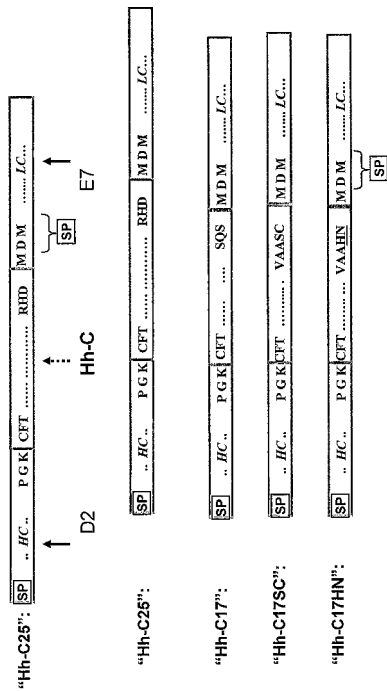


Fig. 9

【配列表】

2009508470000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	A
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	B
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	C
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	C 0 7 K	16/24	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
	A 6 1 K	39/395	V
	A 6 1 P	43/00	

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

(74) 代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74) 代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72) 発明者 カーンソン, ジェラルド・アール

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 2 1 7 8、ベルモント、ケント・ストリート・2

(72) 発明者 ギオン, ウエンディ

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 5 0 7、チャールトン、パトリッジ・ヒル・ロード・2 8 8

(72) 発明者 ザルフエルト, ヨツヘン・ゲー

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 5 3 6、ノース・グラフトン、オールド・ウエストボロ・ロード・1 7 7

(72) 発明者 クー, チーチー

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 5 4 5、シユルーズベリー、ターン・ドライブ・1 2

(72) 発明者 リギアー, デイーン・エイ

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 5 6 8、アプトン、ヒツコリー・レイン・1 7

(72) 発明者 クーンズ, ユーン

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 8 9 0、ウインチエスター、アンバーウッド・ドライブ・3 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA41 CA04 CA20 DA02 EA04 FA17 GA11 HA14

4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA01Y AA80Y AA93X AB01 AC14 BA02 BC03 BC07 BC11 CA25

CA44

4C084 AA06 BA44 NA14 ZB212

4C085 AA13 CC22 DD62

4H045 AA11 DA76 EA20 FA74

【要約の続き】

セグメント、又は抗原認識可能な断片を含む場合、一実施形態においては、選択可能な化学量論比は、重鎖セグメント 1 個当たりの軽鎖セグメントが少なくとも 2 コピーであり、その結果、適切に折り畳まれ、組み立てられた機能的

抗体が作製される。免疫グロブリン軽鎖由来のものを含めて、修飾シグナルペプチドを記載する。