

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 525608

(P2003 - 525608A)

(43)公表日 平成15年9月2日(2003.9.2)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ド <sup>*</sup> ( 参考 )
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 35/74	2 G 0 4 5
A 6 1 K 35/74		35/76	4 B 0 2 4
35/76		35/78	4 B 0 6 3
35/78		39/00	4 B 0 6 4
38/00		39/39	4 B 0 6 5
Z			
審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全169数 ) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 564357(P2001 - 564357)

(86)(22)出願日 平成13年2月28日(2001.2.28)

(85)翻訳文提出日 平成14年9月2日(2002.9.2)

(86)国際出願番号 PCT/US01/06356

(87)国際公開番号 W001/064874

(87)国際公開日 平成13年9月7日(2001.9.7)

(31)優先権主張番号 09/517,849

(32)優先日 平成12年3月2日(2000.3.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/616,289

(32)優先日 平成12年7月14日(2000.7.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ポストン ハート ファンデーション インコーポレイテッド  
 BOSTON HEART FOUNDATION, INC.  
 アメリカ合衆国 02142 マサチューセッツ州 ケンブリッジ メイン ストリート 139

(72)発明者 リーズ、アン エム.  
 アメリカ合衆国 02445 マサチューセッツ州 ブルックライン クリントン ロード 203

(74)代理人 弁理士 恩田 博宣 ( 外 1 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規な低密度リポタンパク質結合タンパク質と、アテローム性動脈硬化症の診断および治療におけるそれらの使用方法

(57)【要約】

天然およびメチル化LDL(低密度リポタンパク質)に結合することのできるポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド、LBP(LDL結合タンパク質)と呼ばれる単離ポリペプチド、およびその生物学的に活性な断片および類似体が開示される。また、動物がアテローム性動脈硬化症の危険を有するかどうかの決定方法、アテローム性動脈硬化症の治療に用いる薬剤の評価方法、アテローム性動脈硬化症の治療方法、構造またはLBPの代謝に異常のある細胞の治療方法も記載される。医薬組成物およびワクチン組成物も提供される。

```

met ser lys asn thr
val ser ser ala arg phe arg lys val asp_val asp
glu tyr asp glu asn lys phe val asp glu glu asp
gly gly asp gly gln ala gly pro asp glu gly glu
val asp ser cys leu arg gln gly asn met thr ala
ala leu gln ala ala leu lys asn pro pro ile asn
thr arg ser gln ala val lys asp arg ala gly ser
ile val leu lys val leu ile ser phe lys ala gly
asp ile glu lys ala val gln ser leu asp arg asn
gly val asp leu leu met lys tyr ile tyr lys gly
phe glu ser pro ser asp asn ser ser ala val leu
leu gln trp his glu lys ala leu ala ala gly gly
val gly ser ile val arg val leu thr ala arg lys
thr val

```

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】下記(a)～(o)から成る群より選択されるメンバーを含む単離ポリヌクレオチド：

(a) 配列番号1に示したアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号2に示したアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号3に示したアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号4に示したアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号5に示したアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(f) 配列番号6に示したアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(g) 配列番号7に示したアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(h) 配列番号8に示したアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(i) 配列番号9に示したアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(j) 配列番号43に示したアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(k) 配列番号44に示したアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(l) 配列番号47に示したアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(m) (a)～(k)または(l)のポリヌクレオチドとハイブリダイズし得ると共に、(a)～(k)または(l)のポリヌクレオチドと少なくとも約95

%の同一性を有するポリヌクレオチドであって、そのコード化ポリペプチドがLDLに結合できるポリヌクレオチド；

(n) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号43、配列番号44、または配列番号47のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、そのコード化ポリペプチドがLDLに結合できるポリヌクレオチド；および

(o) ポリペプチド(a)~(m)または(n)の生物学的に活性な断片であって、そのコード化ポリペプチドがLDLに結合できる断片。

【請求項2】前記のメンバーは下記(a)~(g)よりなる群から選択される請求項1に記載の単離ポリヌクレオチド；

(a) 配列番号43に示したアミノ酸配列のアミノ酸残基329~343(配列番号19)、329~354(配列番号20)、344~354(配列番号21)または529~538(配列番号22)を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号1および配列番号6に示したアミノ酸配列のアミノ酸残基14~43(配列番号23)または38~43(配列番号24)を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号47に示したアミノ酸配列のアミノ酸残基338~353(配列番号25)、338~365(配列番号26)、354~365(配列番号27)または444~453(配列番号28)を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号5に示したアミノ酸配列のアミノ酸残基96~110(配列番号29)を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号44に示したアミノ酸配列のアミノ酸残基69~75(配列番号41)を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(f) (a)~(d)または(e)のポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができ、該ポリヌクレオチドと少なくとも約95%の同一性を有するポリヌクレオチドであって、そのコード化ポリペプチドがLDLに結合できるポリヌク

レオチド；および

(g) ポリヌクレオチド(a)～(e)または(f)の生物学的に活性な断片であって、そのコード化ポリペプチドがLDLに結合できる断片。

【請求項3】前記ポリヌクレオチドが配列番号10に示した核酸を含む請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】前記ポリヌクレオチドが配列番号48に示した核酸を含む請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】前記ポリヌクレオチドが配列番号14に示した核酸を含む請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】前記ポリヌクレオチドが配列番号15に示した核酸を含む請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】前記ポリヌクレオチドが配列番号45に示した核酸を含む請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項8】前記ポリヌクレオチドが配列番号46に示した核酸を含む請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項9】前記ポリヌクレオチドがゲノムDNAである請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項10】請求項1に記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

【請求項11】請求項10に記載の組換えベクターを含む細胞。

【請求項12】請求項11に記載の細胞をLDL結合性タンパク質を発現させる条件下で培養することから成る、LDL結合性タンパク質の製造方法。

【請求項13】下記(a)～(n)よりなる群から選択されるメンバーを含む単離ポリペプチド：

(a) 配列番号1に示したアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(b) 配列番号2に示したアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(c) 配列番号3に示したアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(d) 配列番号4に示したアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(e) 配列番号5に示したアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(f) 配列番号6に示したアミノ酸配列を有するポリペプチド；

- (g) 配列番号7に示したアミノ酸配列を有するポリペプチド；
- (h) 配列番号8に示したアミノ酸配列を有するポリペプチド；
- (i) 配列番号9に示したアミノ酸配列を有するポリペプチド；
- (j) 配列番号43に示したアミノ酸配列を有するポリペプチド；
- (k) 配列番号44に示したアミノ酸配列を有するポリペプチド；
- (l) 配列番号47に示したアミノ酸配列を有するポリペプチド；
- (m) (a)～(k)または(l)のポリペプチドと少なくとも約95%の同一性を有し、LDLと結合できるポリペプチド；および
- (n) ポリペプチド(a)～(l)または(m)の生物学的に活性な断片であって、LDLに結合できる断片。

【請求項14】前記のメンバーが下記(a)～(g)よりなる群から選択される請求項13に記載の単離ポリペプチド：

- (a) 配列番号43に示したアミノ酸配列のアミノ酸残基329～343(配列番号19)、329～354(配列番号20)、344～354(配列番号21)または529～538(配列番号22)を有するポリペプチド；
- (b) 配列番号1および配列番号6に示したアミノ酸配列のアミノ酸残基14～43(配列番号23)または38～43(配列番号24)を有するポリペプチド；
- (c) 配列番号47に示したアミノ酸配列のアミノ酸残基338～353(配列番号25)、338～365(配列番号26)、354～365(配列番号27)または444～453(配列番号28)を有するポリペプチド；
- (d) 配列番号5に示したアミノ酸配列のアミノ酸残基96～110(配列番号29)を有するポリペプチド；
- (e) 配列番号44に示したアミノ酸配列のアミノ酸残基69～75(配列番号41)を有するポリペプチド；
- (f) (a)～(d)または(e)のポリペプチドと少なくとも約95%の同一性を有し、LDLに結合できるポリペプチド；および
- (g) ポリペプチド(a)～(e)または(f)の生物学的に活性な断片であって、LDLに結合できる断片。

【請求項15】動物にアテローム性動脈硬化症の恐れがあるかどうかを決定する方法であって、

動物を用意するステップと；

前記動物におけるLBP代謝または構造の様相を評価するステップであって、LBP代謝または構造の様相に異常があれば、アテローム性動脈硬化症の恐れがあることの徴候であるステップと；

から成る方法。

【請求項16】前記LBPは、LBP-1、LBP-2およびLBP-3よりなる群から選択される請求項15に記載の方法。

【請求項17】アテローム性動脈硬化症の治療に用いる薬剤を評価する方法であって、

試験細胞、無細胞系または動物を用意するステップと；

薬剤を用意するステップと；

前記薬剤を前記試験細胞、無細胞系または動物に治療上有効量で投与するステップと；

薬剤がLBP代謝または構造の様相に及ぼす影響を評価するステップであって、LBP代謝または構造の様相に変化があれば、アテローム性動脈硬化症治療において薬剤が有用であることを示すステップと；

から成る方法。

【請求項18】前記LBPは、LBP-1、LBP-2およびLBP-3よりなる群から選択される請求項17に記載の方法。

【請求項19】請求項17で同定された薬剤。

【請求項20】LBPポリペプチドの結合分子に対する結合を変える能力について薬剤を評価する方法であって、

薬剤を提供するステップと；

LBPポリペプチドを用意するステップと；

結合分子を用意するステップと；

前記薬剤と、前記LBPポリヌクレオチドと、前記結合分子を合わせるステップと；

前記LBPポリペプチドと結合分子とを含む複合体の形成を検出するステップであって、薬剤の存在下における複合体の形成が薬剤の不在下の場合と比べて変化していれば、薬剤がLBPポリペプチドと結合分子との結合を変えることを示すステップと；  
から成る方法。

【請求項21】前記LBPポリペプチドは、LBP-1、LBP-2およびLBP-3ポリペプチドよりなる群から選択される請求項20に記載の方法。

【請求項22】LBPポリペプチドに結合する能力について薬剤を評価する方法であって、

薬剤を用意するステップと；

LBPポリペプチドを用意するステップと；

前記薬剤を前記LBPポリペプチドと接触させるステップと；

前記薬剤の前記LBPポリペプチドに結合する能力を評価するステップと；

から成る方法。

【請求項23】請求項22で同定された薬剤。

【請求項24】LBP調節配列をコードする核酸に結合する能力について薬剤を評価する方法であって、

薬剤を用意するステップと；

LBP調節配列をコードする核酸を用意するステップと； 記薬剤を前記核酸と接触させるステップと；

前記薬剤の前記核酸に結合する能力を評価するステップと；

から成る方法。

【請求項25】請求項24で同定された薬剤。

【請求項26】動物のアテローム性動脈硬化症の治療方法であって、

アテローム性動脈硬化症の治療を必要とする動物を用意するステップと；

LBP構造または代謝の様相を変え得る薬剤を用意するステップと；

アテローム性動脈硬化症が治療されるように前記薬剤を前記動物に治療上有効量投与するステップと；

から成る方法。

【請求項27】前記のLBPポリペプチドが、LBP-1、LBP-2またはLBP-3ポリペプチドまたは生物学的に活性なその断片または類似体である請求項26に記載の方法。

【請求項28】アテローム性動脈硬化症の恐れがある動物の治療方法であって、

アテローム性動脈硬化症の恐れがある動物を用意するステップと；

LBP構造または代謝の様相を変え得る薬剤を用意するステップと；

動物が治療されるように動物に薬剤を治療上有効量投与するステップと；

から成る方法。

【請求項29】LBPの構造または代謝に異常を有する細胞の治療方法であって、

LBPの構造または代謝に異常を有する細胞を用意するステップと；

LBP構造または代謝の様相を変え得る薬剤を用意するステップと；

前記細胞が治療されるように前記薬剤を前記細胞に治療上有効量投与するステップと；

から成る方法。

【請求項30】動物のアテローム性動脈硬化症を治療するための医薬組成物であって、

アテローム性動脈硬化症が治療されるように前記動物のLBP代謝または構造の様相を変え得る治療上有効量の薬剤と；

医薬として許容し得る担体と；を含む医薬組成物。

【請求項31】前記の薬剤が、LBPポリペプチドまたは核酸、もしくは生物学的に活性なそれらの断片もしくは類似体である請求項30に記載の医薬組成物。

【請求項32】動物のアテローム性動脈硬化症を治療するためのワクチン組成物であって、

アテローム性動脈硬化症が治療されるように動物のLBP代謝または構造の様相を変え得る治療上有効量の薬剤と；

医薬として許容し得る担体と；を含むワクチン組成物。

【請求項33】動物のアテローム性動脈硬化症病変の診断方法であって、動物を用意するステップと；

アテローム性動脈硬化症病変中に存在するL B Pに結合できる標識物質を用意するステップと；

標識L B Pを生成するために、標識物質と前記L B Pが相互作用する条件下で動物に標識物質を投与するステップと；

動物中のアテローム性動脈硬化症病変の存在を診断するためにイメージングにより前記標識L B Pの局在および量を決定するステップと；  
から成る方法。

【請求項34】L B Pまたはその断片もしくは類似体に対して動物を免疫する方法であって、

L D Lを有する動物を用意するステップと；

L B Pまたはその断片もしくは類似体を用意するステップと；

前記L B Pの前記L D Lへの結合が変化するように、前記L B Pまたはその断片もしくは類似体に対する前記動物による抗体産生を刺激するために、前記動物に前記L B Pまたはその断片もしくは類似体を投与するステップと；を含む方法。

【請求項35】修飾L D Lおよび天然L D Lに結合する能力を有するL B Pポリペプチドの断片または類似体を生成する方法であって、

L B Pポリペプチドを用意するステップと；

前記L B Pポリペプチドの配列を変化させるステップと；

前記変化させたL B Pポリペプチドを、修飾L D Lおよび天然L D Lに結合する能力について試験するステップと；  
から成る方法。

【請求項36】アテローム性動脈硬化症の恐れがある患者の治療方法であって、アテローム性動脈硬化症の恐れがある患者を用意するステップと、以下に示す1以上を患者に投与するステップとから成る方法：

L B Pタンパク質またはその断片または類似体とアジュバント；

L B Pタンパク質をコードする核酸；

L B P タンパク質をコードする核酸を含むウイルスまたは細菌；および  
L B P タンパク質をコードする核酸を含む可食植物。

【請求項37】アテローム性動脈硬化症の恐れがある患者の治療方法であつて、

アテローム性動脈硬化症の恐れがある患者を用意するステップと；

患者によって生産された1以上の自己L B P タンパク質を同定するステップと

；

患者に投与された場合に1以上の自己L B P タンパク質に対する免疫応答を誘導する非自己L B P タンパク質を、患者に投与するステップと；

から成る方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の分野)**

本発明は、低密度リポタンパク質(LDL)に結合する新規なポリペプチド(LBP)、これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびにアテローム性動脈硬化症の治療方法、診断方法および治療薬に関する。

**【0002】****(発明の背景)**

アテローム性動脈硬化症は心臓発作と卒中の主因である。米国、欧州および日本における死の全体の約50%はアテローム性動脈硬化症によるものと報告されている。動脈壁のアテローム性硬化病変がアテローム性動脈硬化症の特徴である。これらのアテローム性硬化病変部にはコレステリルエステル(CE)が存在する。低密度リポタンパク質(LDL)は、血漿CEの主要担体であることが証明されており、かつ、CEをアテローム性硬化病変部に運搬する薬剤として関与することが示されている。

**【0003】**

脂質で満たされた分散マクロファージ群、いわゆる泡沫細胞は、アテローム性動脈硬化症の肉眼で見える最初の徴候であり、I型病変と称されている。これらのマクロファージはLDL由来のCEを含有していると報告されている。これらのマクロファージは、酸化LDLは認識するが、天然LDLは認識せず、酸化LDLを食べて泡沫細胞となる。それより大きく、より組織化された泡沫細胞集団である線状脂質沈着巣はII型病変を表す。これらの病変はさらに、プラークと称される複合病変に進展し、その結果、動脈の血流障害が生じ得る。

**【0004】**

動脈にLDLが蓄積するのは、動脈壁に機能的に変性した内皮細胞が存在することによると広く信じられている。アテローム性動脈硬化症の動物モデルにおいて、天然LDLもメチル化LDLも、大動脈病変部で再生する内皮島の周辺部だけに集中して不可逆的に蓄積し、そこには、機能的に変性した内皮細胞が存在するが、内皮の再生が終っているこれらの島の中心部には存在しないことが報告さ

れた。同様に、LDLはヒトアテローム性動脈硬化病変部に蓄積する。LDLを動脈病変部に集中的かつ不可逆的に蓄積させるメカニズムは未だ解明されていない。

#### 【0005】

##### (発明の要旨)

本発明の目的は、LDLに結合するポリペプチドを提供することである。

本発明のさらに別の目的は、動物にアテローム性動脈硬化症の恐れがあるかどうかを決定する方法を提供することである。

本発明のさらに別の目的は、アテローム性動脈硬化症の治療に用いるための薬剤を評価する方法を提供することである。本発明のさらに別の目的は、アテローム性動脈硬化症の治療方法を提供することである。

#### 【0006】

本発明のさらに別の目的は、アテローム性動脈硬化症の治療、診断および/または治療薬の決定を支援するために、LBP(低密度リポタンパク質結合タンパク質)遺伝子および/もしくはポリペプチド、またはその断片、類似体および変異体を利用することである。

#### 【0007】

本発明は、1つの態様において、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号43、配列番号44、配列番号47に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、任意の上記ポリヌクレオチドにハイブリダイズし得ると共に任意の上記ポリヌクレオチドと少なくとも約95%同一で、かつそのコード化ポリペプチドがLDLに結合し得るポリヌクレオチド、または、任意の上記ポリヌクレオチドの生物学的に活性で、かつそのコード化ポリペプチドがLDLに結合し得る断片とを包含する単離ポリヌクレオチドに関する。

#### 【0008】

ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号45、配列番号46、配列番号48に記

載の核酸配列を有する。

【0009】

本発明の別の態様は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号43、配列番号44、配列番号47に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、もしくは任意の上記ポリヌクレオチドと少なくとも約95%同一であると共にLDLに結合し得るポリペプチド、または、LDLに結合し得る任意の上記ポリヌクレオチドの生物学的に活性な断片を包含する単離ポリペプチドである。

【0010】

本発明の別の態様は、動物にアテローム性動脈硬化症の恐れがあるかどうかを決定する方法である。動物を用意する。その動物のLBP代謝または構造の様相を評価する。LBP代謝または構造の様相に異常があれば、アテローム性動脈硬化症の恐れがあることの徴候である。本発明の別の態様は、アテローム性動脈硬化症の治療に用いるための薬剤を評価する方法である。試験細胞、無細胞系または動物を用意する。薬剤を用意する。薬剤を試験細胞、無細胞系または動物に治療上有効量投与する。薬剤がLBP代謝または構造の様相に及ぼす影響を評価する。LBP代謝または構造の様相に変化があれば、アテローム性動脈硬化症治療において薬剤が有用であることを示している。

【0011】

本発明の別の態様は、薬剤を、LBPポリペプチドと、結合分子、例えば、天然LDL、修飾LDL、例えば、メチル化LDLもしくは酸化LDL、または動脈細胞外マトリックス構造成分との結合を変える能力について評価する方法である。薬剤を用意する。LBPポリペプチドを用意する。結合分子を用意する。薬剤とLBPポリペプチドと結合分子とを合わせる。LBPポリペプチドと結合分子とを含む複合体の形成を検出する。薬剤の存在下における複合体の形成が薬剤の不在下の場合と比べて変化していれば、薬剤がLBPポリペプチドと結合分子との結合を変えることを示している。

【0012】

本発明の別の態様は、薬剤をLBPポリペプチド結合能について評価する方法

である。薬剤を用意する。LBPポリペプチドを用意する。薬剤とLBPポリペプチドとを接触させる。薬剤のLBPポリペプチドに結合する能力を評価する。

【0013】

本発明の別の態様は、薬剤の、LBP調節配列をコードする核酸に結合する能力について評価する方法である。薬剤を用意する。LBP調節配列をコードする核酸を用意する。薬剤と核酸とを接触させる。薬剤の核酸結合能を評価する。

【0014】

本発明の別の態様は、動物におけるアテローム性動脈硬化症の治療方法である。アテローム性動脈硬化症の治療を必要とする動物を用意する。LBP構造または代謝の様相を変え得る薬剤を用意する。アテローム性動脈硬化症が治療されるように動物に薬剤を治療上有効量投与する。ある種の実施形態では、薬剤は、LBPポリペプチド、例えば、LBP-1、LBP-2もしくはLBP-3、またはその生物学的に活性な断片もしくは類似体である。ある特定の実施形態では、薬剤は、長さが約100、50、30、20、10、5、4、3または2以下のアミノ酸残基のポリペプチドである。ある特定の実施形態では、薬剤は、少なくとも約20%、40%、60%、80%、90%、95%または95%の酸性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0015】

本発明の別の態様は、アテローム性動脈硬化症の恐れがある動物の治療方法である。アテローム性動脈硬化症の恐れがある動物を用意する。LBP構造または代謝の様相を変え得る薬剤を用意する。動物が治療されるように動物に薬剤を治療上有効量投与する。

【0016】

本発明の別の態様は、LBPの構造または代謝に異常を有する細胞の治療方法である。LBP構造または代謝に異常を有する細胞を用意する。LBP構造または代謝の様相を変え得る薬剤を用意する。細胞が治療されるように細胞に薬剤を治療上有効量投与する。

【0017】

本発明の別の態様は、動物のアテローム性動脈硬化症を治療するための医薬組

成物であり、この組成物は、アテローム性動脈硬化症が治療されるように動物のLBP代謝または構造の様相を変え得る治療上有効量の薬剤と、医薬として許容し得る担体とを含む。

【0018】

本発明の別の態様は、動物のアテローム性動脈硬化病変を治療するためのワクチン組成物であり、この組成物は、アテローム性動脈硬化症が治療されるように動物のLBP代謝または構造の様相を変え得る治療上有効量の薬剤と、医薬として許容し得る担体とを含む。

【0019】

本発明の別の態様は、動物のアテローム性動脈硬化病変を診断する方法である。動物を用意する。アテローム性動脈硬化病変部に存在するLBP、例えば、LBP-1、LBP-2またはLBP-3に結合し得る標識物質を用意する。標識LBPを生成するために、標識物質とLBPとを相互作用させる条件下に動物に標識物質を投与する。動物中のアテローム性動脈硬化病変の存在を診断するためにイメージングにより標識LBPの局在または量を決定する。

【0020】

本発明の別の態様は、動物を、LBP、例えば、LBP-1、LBP-2もしくはLBP-3、またはその断片もしくは類似体に対して免疫する方法である。LDLを有する動物を用意する。LBPとLDLとの結合を変える、例えば、減少または増大させるようにLBPまたはその断片もしくは類似体に対する動物の抗体産生を刺激するために、動物にLBPまたはその断片もしくは類似体を投与する。

【0021】

本発明の別の態様は、天然LDLおよび修飾LDL、例えば、メチル化LDL、酸化LDL、アセチルLDLまたはシクロヘキサンジオン処理LDLに結合する能力を有するLBPポリペプチドの断片または類似体を生成する方法である。LBPポリペプチドを用意する。LBPポリペプチドの配列を変える。変性LBPポリペプチドを、修飾LDLおよび天然LDLに結合する能力について試験する。

## 【0022】

本発明のさらに別の態様は、LBPをコードするcDNAを単離する方法である。cDNAライブラリーを用意する。cDNAライブラリーを、天然LDLおよび修飾LDL、例えば、メチル化LDLまたは酸化LDLに結合するポリペプチドをコードするcDNAについてスクリーニングする。ポリペプチドをコードするcDNAを単離するが、このcDNAはLBPをコードする。

本発明の上記および他の特徴、目的ならびに効果は、図面と合わせて以下の明細書を読むことにより、より良く理解されるであろう。

## 【0023】

(詳細な説明)

本発明の態様により、新規な成熟ヒトおよびウサギポリペプチド、LBP-1、LBP-2およびLBP-3、ならびのそれらの生物学的に活性な類似体および断片が提供されると共に、そのようなポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドが提供される。LBPとは、低密度リポタンパク質(LDL)結合タンパク質の略語である。ポリヌクレオチド、ヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドという用語は、本明細書では互換的に用いられ、ポリヌクレオチド、タンパク質およびペプチドという用語も本明細書では互換的に用いられる。

## 【0024】

本発明は、図1に記載のウサギLBP-1(配列番号1);図2Aに記載のウサギLBP-2(配列番号47);図2Bに記載のウサギLBP-2の一部(配列番号2);図3に記載のウサギLBP-2の319~350(配列番号3);図4に記載のウサギLBP-2の299~350(配列番号4);図5に記載のウサギLBP-3(配列番号5);図6に記載のヒトLBP-1(配列番号6);図7Aに記載のヒトLBP-2(配列番号43);図7Bに記載のヒトLBP-2の322~538(配列番号7);図8Aに記載のヒトLBP-3(配列番号44);図8Bに記載のヒトLBP-3の17~546(配列番号8);図9に記載の、BHF-1と称されるヒトもしくはウサギLBP-1の14~33のアミノ酸配列;上記ポリヌクレオチドとハイブリダイズし得、かつ上記ポリヌクレオチドのいずれかと少なくとも約80%同一、より好ましくは少なくとも約9

0%同一、さらに好ましくは少なくとも約95%同一、最も好ましくは少なくとも約98%同一であると共に、コード化ポリペプチドがLDLに結合し得るポリヌクレオチド；またはコード化ポリペプチドがLDLに結合し得る上記ポリヌクレオチドのいずれかの生物学的に活性な断片；を包含する単離ポリヌクレオチドを提供する。

#### 【0025】

さらに、本発明には、図7A（配列番号43）に記載のヒトLBP-2のアミノ酸残基329～343（配列番号19）、329～353（配列番号20）、344～354（配列番号21）、もしくは529～538（配列番号22）；図1（配列番号1）および図6（配列番号6）に記載のウサギもしくはヒトLBP-1のアミノ酸残基14～43（配列番号23）もしくは38～43（配列番号24）；図2A（配列番号47）に記載のウサギLBP-2のアミノ酸残基338～353（配列番号25）、338～365（配列番号26）、354～365（配列番号27）もしくは444～453（配列番号28）；図5（配列番号5）に記載のウサギLBP-3のアミノ酸残基96～110（配列番号29）；図8A（配列番号44）に記載のヒトLBP-3のアミノ酸残基69～75（配列番号41）を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；上記ポリヌクレオチドにハイブリダイズし得、かつ上記ポリヌクレオチドのいずれかと少なくとも約80%同一、より好ましくは少なくとも約90%同一、さらに好ましくは少なくとも約95%同一、最も好ましくは少なくとも約98%同一であると共に、コード化ポリペプチドがLDLに結合し得るポリヌクレオチド；またはコード化ポリペプチドがLDLに結合し得る上記ポリヌクレオチドのいずれかの生物学的に活性な断片；を包含する単離ポリヌクレオチドも含まれる。

#### 【0026】

ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとは、ポリペプチドのコード配列のみを有するポリヌクレオチドと共に、追加コード配列および/または非コード配列を有するポリヌクレオチドをも指して言う。したがって、例えば、図1～9（配列番号1～9、43、44および47）の成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、成熟ポリペプチドのコード配列のみ；成熟ポリペプチドのコー

ド配列とリーダー配列もしくは分泌配列またはプロタンパク質配列などの追加コード配列；成熟ポリペプチドのコード配列（および、場合により、追加コード配列）ならびにイントロンまたは成熟ポリペプチドのコード配列の5'および/もしくは3'非コード配列などの非コード配列を有し得る。本発明のポリヌクレオチドは、さらに、成熟ポリペプチドのコード配列が、同じ読み取り枠内で宿主細胞由来のポリペプチドの発現および/または分泌を支援するポリヌクレオチド配列、例えばリーダー配列に融合しているポリヌクレオチドを包含するものとする。さらに、本発明のポリヌクレオチドは、コード配列が、読み取り枠中に、例えば、ポリヌクレオチドの精製を可能にするマーカー配列に融合しているポリヌクレオチドをも包含するものとする。

**【0027】**

本発明のポリヌクレオチドは、RNA、DNAもしくはPNA、例えば、cRNA、cDNA、ゲノムDNA、または合成DNA、RNAもしくはPNAの形態であり得る。DNAは、二本鎖または一本鎖であり得、一本鎖の場合、コード鎖または非コード（アンチセンス）鎖であり得る。

**【0028】**

好ましい実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、図10に記載のウサギLBP-1（配列番号10）；図2A（配列番号48）もしくは図11（配列番号11）に記載のウサギLBP-2の核酸；図12に記載のウサギLBP-2の配列番号11のヌクレオチド256~1617（配列番号12）；図13に記載のウサギLBP-2の配列番号11のヌクレオチド196~1617（配列番号13）；図14に記載のウサギLBP-3（配列番号14）；図15に記載のヒトLBP-1（配列番号15）；図7A（配列番号45）もしくは図16（配列番号16）に記載のヒトLBP-2；図8A（配列番号46）もしくは図17（配列番号17）に記載のヒトLBP-3の核酸；または図18に記載の、ウサギLBP-1のヌクレオチド97~156もしくはヒトLBP-1のヌクレオチド157~216（BHF-1）（配列番号18）；を含む。

**【0029】**

他の好ましい実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、

配列番号30 (GAAGAGGAAGAAGATGATGATGAAGATGAAGATGAAGATGATGAT)、

配列番号31 (GAAGAGGAAGAAGATGATGATGAAGATGAAGATGAAGATGATGATGTGTCAGAGGGCTCTGAAGTGCCCGAGAGTGAC)、

配列番号32 (GTGTCAGAGGGCTCTGAAGTGCCCGAGAGTGAC)、

配列番号33 (GAGGATGATGACCCCGATGGCTTCTTAGGC)、

配列番号34 (GTGGACGTGGATGAATATGACGAGAACAAGTTCGTGGACGAAGAAGATGGGGGCGACGGCCAGGCCGGGCCCGACGAGGGCGAGGTGGAC)、

配列番号35 (GACGAGGGCGAGGTGGAC)、

配列番号36 (GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAGACGACGAGGACGACGACGACGAC)、

配列番号37 (GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAGACGACGAGGACGACGACGACGACGACGTCGTGTCCGAGGGCTCGGAGGTGCCCGAGAGCGAT)、

配列番号38 (GTCGTGTCCGAGGGCTCGGAGGTGCCCGAGAGCGAT)、

配列番号39 (CCCCCGGGAAGCCAGCCCTCCCAGGAGCC)、

配列番号40 (GAGGATGGGGTCCAGGGTGAGCCCCCTGAACCTGAAGATGCAGAG)、

または配列番号42 (CGTGATGTCTCTGAGGAGCTG)

に記載の核酸を含む。

**【0030】**

成熟ポリペプチドをコードするコード配列は、図2A、7A、8Aおよび10~18 (配列番号10~18、45、46および48) または配列番号30~4

0もしくは42に示されているコード配列と同一であるか、あるいは、コード配列が、遺伝暗号の重複または縮重の結果として、図2A、7A、8Aおよび10～18（配列番号10～18、45、46および48）ならびに配列番号30～40および42と同じ成熟ポリペプチドをコードする異なるコード配列であり得る。

#### 【0031】

本発明はさらに、上記ポリヌクレオチドを含む組換えベクターを包含する。組換えベクターは、例えば、プラスミド、ウイルス粒子またはファージであり得る。ある特定の実施形態では、組換えベクターは発現ベクターである。組換えベクターはさらに、そのようなベクターを含有する細胞の同定に有用な種々のマーカー遺伝子を有し得る。

#### 【0032】

さらに、本発明は、そのような組換えベクターを有する細胞を包含する。本明細書に記載の組換えベクターは、例えば、トランスフォーメーション、トランスフェクションまたは感染により宿主細胞に導入し得る。

#### 【0033】

本発明はさらに、LBPを産生する方法を包含し、この方法は、LBPの発現を可能にする条件下で上記のような細胞を培養するステップを含む。

さらに、本発明には、図1（配列番号1）；図2A（配列番号47）；図2B（配列番号2）；図3（配列番号3）；図4（配列番号4）；図5（配列番号5）；図6（配列番号6）；図7A（配列番号43）；図7B（配列番号7）；図8A（配列番号44）；図8B（配列番号8）；もしくは図9（配列番号9）に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド；または上記ポリペプチドと少なくとも約80%同一、より好ましくは少なくとも約90%同一、さらに好ましくは少なくとも約95%同一、最も好ましくは少なくとも約98%同一であり、かつLDLに結合し得るポリペプチド；あるいはLDLに結合し得る上記ポリペプチドのいずれかの生物学的に活性な断片を包含する単離ポリペプチドも含まれる。図面中、ウサギとヒトのLBP-1、LBP-2およびLBP-3遺伝子間で異なるアミノ酸は太字で示されている。ウサギとヒトのLBP-1、LBP-2およ

びLBP-3間で異なるアミノ酸配列も、それぞれ、図19、20および21に明確に示されている。

【0034】

本発明はさらに、図7A(配列番号47)に記載のアミノ酸残基329~343(配列番号19)、329~354(配列番号20)、344~354(配列番号21)、もしくは529~538(配列番号22);図1(配列番号1)および図6(配列番号6)に記載のアミノ酸残基14~43(配列番号23)もしくは38~43(配列番号24);図2A(配列番号47)に記載のアミノ酸残基338~353(配列番号25)、338~365(配列番号26)、354~365(配列番号27)もしくは444~453(配列番号28);図5(配列番号5)に記載のアミノ酸残基96~110(配列番号29);図8A(配列番号8)に記載のアミノ酸残基69~75(配列番号41)を有するポリペプチド;または上記ポリペプチドと少なくとも約80%同一、より好ましくは少なくとも約90%同一、さらに好ましくは少なくとも約95%同一、最も好ましくは少なくとも約98%同一であり、かつLDLと結合し得るポリペプチド;あるいは、LDLに結合し得る上記ポリペプチドのいずれかの生物学的に活性な断片を包含する。

【0035】

本発明のポリペプチドは、例えば、天然精製産物、化学合成産物、および組換え誘導産物を包含するものとする。

本発明のポリペプチドは、例えば、LDLに結合させ、それによってアテローム性動脈硬化プラークの形成を阻害するのに用い得る。本発明のポリペプチドは、例えば、そのようなポリペプチドをインビボ発現させることにより、遺伝子療法にも用い得る。また、本発明のポリペプチドは、医薬組成物またはワクチン組成物にも用い得る。本発明のポリペプチドは、それらに対する抗体を産生させるための免疫原としても用い得、得られた抗体は、LBPポリペプチドに対するアンタゴニストとして用い得る。

【0036】

いずれの理論にも拘束されるわけではないが、LBPは、アテローム性動脈硬

化症がLDLの酸化により促進されるメカニズムを提供すると考えられる。LBPは、動脈壁で巣状の不可逆的結合を生じさせるために必要であると考えられ、しかも、そのような結合は、LDLをその天然状態から完全酸化状態に変えるので、アテローム性動脈硬化症における重要な初期事象である。

【0037】

天然ではなく酸化されたLDLは異物タンパク質であるから、マクロファージは酸化LDLを摂取して、先ず、I型病変である泡沫細胞となり、次いで、II型病変である線状脂質沈着巣を形成する。

【0038】

本発明はさらに、動物にアテローム性動脈硬化症の恐れがあるかどうかを決定する方法を包含する。動物を用意する。動物のLBP代謝または構造の様相を評価する。LBP代謝または構造の様相に異常があれば、アテローム性動脈硬化症の恐れがあることを示している。

【0039】

アテローム性動脈硬化症とは、LDLの不可逆結合、LDLの酸化、マクロファージの漸増、動脈の遮断阻害および組織の死(梗塞)が互いにわずかに混ざり合ったいくつかのステージからなる疾患または状態を指して言う。

【0040】

動物とは、ヒトおよび非ヒト動物を指して言う。非ヒト動物には、例えば、哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類および原虫類が含まれる。非ヒト動物は、哺乳動物、例えば、ウサギ、げっ歯動物、例えば、マウス、ラットもしくはモルモット、霊長類、例えば、サル、またはブタであるのが好ましい。動物にはトランスジェニック非ヒト動物も含まれる。トランスジェニック動物という用語は、異種DNA、すなわち、部分的もしくは全体的に異種のDNAをその細胞のDNAに導入すること；傷害、例えば、インビトロ誘発突然変異、例えば、欠失もしくは他の染色体転移をその細胞のDNAに導入すること；あるいは、同種DNAを、DNAが挿入される細胞のゲノムを変えるような方法でその細胞のDNAに導入すること、例えば、天然遺伝子のものとは異なる位置に挿入するか、またはその挿入により、同種宿主遺伝子のノックアウトもしくは置換が生じる

か、もしくは遺伝子の改変および/もしくは調節可能な発現および/もしくは代謝が生じることにより新たな遺伝情報を得た動物を包含するものとする。動物は、生殖細胞系列を含めたその細胞のすべて、またはその細胞の1つだけもしくはいくつかにトランスジーンを有し得る。本発明のトランスジェニック動物は、アテローム性動脈硬化症を研究するためまたはアテローム性動脈硬化症の治療用薬剤を評価するためのモデルとして役立ち得る。

#### 【0041】

ある特定の実施形態では、アテローム性動脈硬化症の恐れがあるかどうかの決定は出生前動物で行われる。

LBPとは、低密度リポタンパク質(LDL)およびメチル化LDLに結合し得るLDL結合タンパク質を指して言う。メチル化LDLとは、LDLのリシン残基の約50~約90%が化学結合メチル基を有するLDLを指して言う。メチル化LDLは、既に報告されている細胞表面レセプターには認識されない。例えば、Weisgraberら, J. Biol. Chem. 253:9053-9062(1978)参照。ある特定の実施形態では、LBPは、酸化LDLにも結合し得る。ある特定の好ましい実施形態では、LDLとLBPとの結合は不可逆的である。ある特定の好ましい実施形態では、LBPはLDLをどの細胞内小器官にも輸送しない。LBPの例は、本明細書に記載のLBP-1、LBP-2およびLBP-3である。

#### 【0042】

LBP代謝とは、LBPの産生、放出、発現、機能、作用、相互作用または調節の任意の様相を指して言う。LBPの代謝には、LBPポリペプチドの修飾、例えば、共有結合修飾または非共有結合修飾が含まれる。LBPの代謝には、LBPが他の物質中で誘発する修飾、例えば、共有結合修飾または非共有結合修飾が含まれる。LBPの代謝にはさらに、LBPポリペプチドの分布における変化および他の物質の分布においてLBPが誘発する変化も含まれる。

#### 【0043】

LBP代謝のどの様相も評価し得る。用いる方法は、当業者には公知の標準法であり、標準的な参考文献、例えば、Auubelら編, Current P

rotocol in Mol. Biology, New York: John Wiley & Sons, 1990; Kriegler, M. 編, Gene Transfer and Expression, Stockton Press, New York, NY, 1989; pDisplay gene expression system (Invitrogen, Carlsbad, CA) で確認することができる。評価し得る LBP の代謝の好ましい例としては、LBP ポリペプチドと結合分子、例えば、LDL との結合活性；標的遺伝子上での LBP ポリペプチドの転写促進活性；LBP タンパク質のレベル；LBP mRNA のレベル；LBP の修飾、例えば、リン酸化、グリコシル化もしくはアシル化のレベル；または LDL のトランスフェクト哺乳動物細胞結合に及ぼす LBP 発現の効果が挙げられる。

#### 【0044】

結合分子とは、LBP が結合し得る任意の分子、例えば、核酸、例えば、DNA 調節領域、タンパク質、例えば、LDL、代謝産物、ペプチド模倣体、非ペプチド模倣体、抗体、または任意の他のタイプのリガンドを指して言う。ある特定の好ましい実施形態では、評価される LBP 代謝の様相は、天然 LDL および / またはメチル化 LDL および / または酸化 LDL と結合する LBP の能力である。LDL との結合は、例えば、LDL に対する抗体、アフィニティークロマトグラフィー、アフィニティー同時電気泳動 (ACE) アッセイ、または ELISA アッセイにより証明し得る。実施例参照。他の実施形態では、評価されるのは、LBP の動脈細胞外マトリックス構成成分に結合する能力である。そのような成分の例としては、プロテオグリカン、例えば、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンおよびヘパリン硫酸プロテオグリカン；エラスチン；コラーゲン；フィブロネクチン；ビトロネクチン；および関連細胞外マトリックス分子が挙げられる。動脈細胞外マトリックス構成成分との結合は、当業者には公知の標準法、例えば、ELISA アッセイによって証明し得る。次いで、LBP に対する一次抗体を加え、その後、一次抗体に対する酵素共役二次抗体を加えると、適切な基質の存在下に安定な色が発生し、プレート上の色の発生をマイクロタイタープレート読み取り装置で測定する。

## 【0045】

LBPによる標的遺伝子の転写促進は、例えば、標的遺伝子のプロモーターをリポーター遺伝子、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼまたはルシフェラーゼに結合させ、LBP発現ベクターと共に同時トランスフェクトする一時的トランスフェクションアッセイで定量し得る。そのような評価はインビトロまたはインビボで実施し得る。LBPタンパク質、mRNAまたはリン酸化のレベルは、例えば、サンプル中、例えば動脈壁などの組織サンプル中で、当業者には公知の標準法を用いて測定し得る。

## 【0046】

ある特定の実施形態では、LBP構造、例えば、LBP遺伝子構造またはLBPタンパク質構造の様相を評価する。例えば、一次、二次または三次構造を評価し得る。例えば、遺伝子のDNA配列を決定しかつ/またはタンパク質のアミノ酸配列を決定する。当業者には公知であるような標準的なクローニング法および配列決定法を用い得る。ある特定の実施形態では、通常、アンチセンス核酸が特異的に結合する標的mRNAまたはDNA配列の存在または不在を検出するために、当業者には公知の標準法を用いて、アンチセンス核酸と細胞性LBP mRNAおよび/またはゲノムDNAとの結合活性を定量する。

## 【0047】

決定されるアテローム性動脈硬化症の危険率は、正常な動物に比べて危険率が低いかまたは高いかであり得る。例えば、危険率が低いことを示す異常は不活性LBPポリペプチドである。危険率が高いことを示す異常は、例えば、天然LBPポリペプチドより高い活性、例えば、高いLDL結合活性を有するLBPポリペプチドであろう。

## 【0048】

本発明はさらに、アテローム性動脈硬化症の治療に用いるための薬剤を評価する方法を包含する。試験細胞、無細胞系または動物を用意する。薬剤を用意する。試験細胞、無細胞系または動物に薬剤を治療上有効量投与する。LBP代謝または構造の様相に及ぼす薬剤の効果を評価する。LBP代謝または構造の様相に変化があれば、アテローム性動脈硬化症の治療における薬剤の有用性を示してい

る。

【0049】

ある特定の実施形態では、本発明の方法は、アテローム性動脈硬化症の治療に用いるための薬剤を評価するために、最初のインビトロ期と次のインビボ期という2期を用いる。薬剤を試験細胞または無細胞系にインビトロ投与し、LBP代謝の様相に変化が生じたら、次に、試験動物に薬剤を治療上有効量投与し、LBP代謝の様相に及ぼす薬剤の効果についてインビボ評価する。

【0050】

細胞とは、1個の細胞もしくは複数の細胞群、または動物の一部である細胞を指して言う。細胞は、ヒトまたは非ヒト細胞であり得る。細胞はトランスジェニック細胞をも包含するものとする。細胞は、例えば、培養物または動物から得ることができる。動物は、例えば、天然動物および非ヒトトランスジェニック動物を包含するものとする。ある特定の実施形態では、トランスジェニック細胞または非ヒトトランスジェニック動物は、LBPトランスジェン、またはその断片もしくは類似体を有する。ある特定の実施形態では、トランスジェニック細胞または非ヒトトランスジェニック動物は、LBP遺伝子に対するノックアウトを有する。

【0051】

試験細胞、無細胞系または動物は、LBP代謝の野生型パターンまたは非野生型パターンを有し得る。LBP代謝の非野生型パターンは、例えば、過小発現、過剰発現、無発現、または一時的な部位もしくは分布変化に起因し得る。そのような非野生型パターンは、例えば、LBP遺伝子、結合分子遺伝子、調節遺伝子、またはLBP代謝に直接または間接に影響を与える任意の他の遺伝子における1つ以上の突然変異に起因し得る。突然変異は、例えば、全体構造または微細構造、核酸における変化などの変化を包含するものとする。例としては、1塩基対の変化、例えば、ミスセンスまたはナンセンス変異、フレームシフト、欠失、挿入およびトランスロケーションがある。突然変異は優性または劣性であり得る。突然変異は、ホモ接合またはヘテロ接合であり得る。LBP-1、LBP-2またはLBP-3代謝の様相を評価するのが好ましい。

## 【0052】

薬剤は、例えば、任意の物質、例えば、抗アテローム性動脈硬化症薬を包含するものとする。本発明の薬剤は、LBP代謝の様相を変化させ得るのが好ましい。そのような変化は、例えば、LBPと、結合分子、例えば、LDLもしくは動脈細胞外マトリックス構成成分との相互作用の阻止もしくは減少；例えば、切断もしくは他の修飾によるLBPおよび/もしくは結合分子の失活；LBPと結合分子同士の親和性の変更；LBPおよび/もしくは結合分子の希釈；LBPおよび/もしくは結合分子発現の阻止；LBPおよび/もしくは結合分子合成の減少；異常LBPおよび/もしくは結合分子の合成；選択的にスプライシングされたLBPおよび/もしくは結合分子の合成；LBPおよび/もしくは結合分子の正しい立体構造折りたたみの阻止もしくは減少；LBPおよび/もしくは結合分子の結合特性の調節；LBPおよび/もしくは結合分子の活性化もしくは不活性化に必要なシグナルの干渉；結合を阻止するようなLBPおよび/もしくは結合分子の活性化もしくは不活性化；または他のレセプター、リガンドもしくはLBPおよび/もしくは結合分子の正常な合成または機能に必要な他の分子の妨害を含めた多様な事象のいずれかの結果であり得る。例えば、薬剤は、動脈壁細胞外マトリックスに集中して発現しているLDL上のLBP結合部位をブロックしたり、LBP上のLDL結合部位をブロックしたり、または二官能性であったり、すなわち両結合部位をブロックしたりする。

## 【0053】

薬剤の例としては、LBPポリペプチド、例えば、LBP-1、LBP-2もしくはLBP-3、またはその生物学的に活性な断片もしくは類似体；LBPポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片もしくは類似体をコードする核酸；LBP調節配列またはその生物学的に活性な断片もしくは類似体をコードする核酸；LBPポリペプチドに対する結合分子；LBP核酸、例えば、LBPに対する調節領域を含む核酸またはLBPもしくはその生物学的に活性な断片に対する構造領域を含む核酸に対する結合分子；アンチセンス核酸；LBPまたは結合分子の模倣体；LBPまたは結合分子に対する抗体；代謝産物；または抑制性炭水化物もしくは糖タンパク質が挙げられる。ある特定の実施形態では、薬剤は、ア

ンタゴニスト、アゴニストまたはスーパーアゴニストである。

【0054】

LBPの配列の存在が分ると、アテローム性動脈硬化症治療の際にLDLレベルを調節する天然または合成リガンドを捜し出すことができる。ある特定の実施形態では、薬剤は、LBPに対する天然リガンドである。ある特定の実施形態では、薬剤はLBPに対する人工リガンドである。

【0055】

類似体とは、アミノ酸配列または配列に関与しない事柄もしくは両方において天然LBPとは異なる化合物を指して言う。本発明の類似体は、一般に、天然LBP配列の実質的にすべての配列、好ましくは約100アミノ酸残基のセグメント、より好ましくは約50アミノ酸残基のセグメント、さらに好ましくは約30アミノ酸残基のセグメント、さらに好ましくは約20アミノ酸残基のセグメント、さらに好ましくは約10アミノ酸残基のセグメント、さらに好ましくは約5アミノ酸残基のセグメント、さらに好ましくは約4アミノ酸残基のセグメント、さらに好ましくは約3アミノ酸残基のセグメント、最も好ましくは約2アミノ酸残基のセグメントと、少なくとも約80%の相同、好ましくは少なくとも約90%の相同、より好ましくは少なくとも約95%の相同、最も好ましくは少なくとも約98%の相同を示す。非配列修飾には、例えば、LBPのインビボまたはインビトロ化学誘導体化が含まれる。非配列修飾としては、例えば、リン酸化、アセチル化、メチル化、カルボキシル化、またはグリコシル化における変化が挙げられる。そのような修飾を行う方法は当業者には公知である。例えば、リン酸化は、LBPを、リン酸化変更酵素、例えば、キナーゼまたはホスファターゼに暴露して修飾し得る。好ましい類似体には、LBPの生物学的活性を破壊しない、1つ以上の保存的アミノ酸置換、1つ以上の非保存的アミノ酸置換、欠失、または挿入により配列が野生型配列とは異なるLBPまたはその生物学的に活性な断片が含まれる。保存的置換には、通常、1個のアミノ酸を類似特性を有する別のアミノ酸に置き換える置換、例えば、以下の群：バリン、グリシン；グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リシン、アルギニン；およびフ

エニルアラニン、チロシン内の置換が含まれる。保存的置換の他の例は表1に示されている。

【0056】

【表1】

表1  
保存的アミノ酸置換

アミノ酸	記号	置換されるアミノ酸
アラニン	A	D-Ala, Gly, $\beta$ -Ala, L-Cys, D-Cys
アルギニン	R	D-Arg, Lys, D-Lys, ホモ-Arg, D-ホモ-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn, L-NMMA, L-NAME
アスパラギン	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
アスパラギン酸	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
システイン	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
グルタミン	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
グルタミン酸	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
グリシン	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, $\beta$ -Ala Acp
ヒスチジン	H	D-His
イソロイシン	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
ロイシン	L	D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
リシン	K	D-Lys, Arg, D-Arg, ホモ-Arg, D-ホモ-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
メチオニン	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
フェニルアラニン	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4, or 5-フェニルプロリン, cis-3,4, or 5-フェニルプロリン
プロリン	P	D-Pro, L-I-チアゾリジン-4-カルボン酸, D-or L-1-オキサゾリジン-4-カルボン酸
セリン	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
トレオニン	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
トリプトファン	W	D-Trp, Phe, D-Phe, Tyr, D-Tyr
チロシン	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
バリン	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

タンパク質のアミノ酸配列変異体は、当業者には公知の多様な方法のいずれかにより作成し得る。例えば、タンパク質またはタンパク質の特定ドメインもしくは領域をコードするDNAのランダム突然変異誘発、例えば、PCR突然変異誘発〔例えば、正確性が低下したTaqポリメラーゼを用いてDNAのクローン化断片にランダム突然変異を導入する方法；Leungら, Bio Technique 1:11-15(1989)〕、または飽和突然変異誘発〔例えば、一本鎖DNAをインビトロ化学処理もしくは照射して、相補的DNA鎖を合成する方法；Mayersら, Science 229:242(1985)〕を用い得る。ランダム突然変異誘発は、例えば、縮重オリゴヌクレオチド形成〔例えば、DNA自動合成機を用いて縮合配列を化学合成する方法；Narang, Te

trahedron 39:3 (1983); Itakuraら, Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. A.G. Walton, Amsterdam: Elsevier, pp. 273-289 (1981)]によっても達成し得る。非ランダムまたは特異的突然変異誘発を用いて特定領域に特定の配列または突然変異を与えることができる。これらの方法を用いて、例えば、タンパク質の既知アミノ酸配列の残基の欠失、挿入、または置換を有する変異体を創製し得る。複数の突然変異部位を、例えば、(i) 先ず、保存されたアミノ酸に置き換え、次いで達成された結果に基づいてよりラジカルな選択物に置き換えるか、(ii) 標的残基を除去するか、(iii) 特定された部位に隣接する同一もしくは異なるクラスの残基を挿入するか、または(iv) それらを組み合わせることにより、個別または連続修飾し得る。例えば、図2A、7A、8A、10~18(配列番号10~18、45、46および48)の配列のインビトロDNA配列修飾により類似体を生成することができる。例えば、インビトロ突然変異誘発を用いて、これらのDNA配列のいずれをも、1個以上のアミノ酸残基が、置換、例えば、表1に記載のような保存的置換を受けた類似体をコードする配列に変換することができる。

#### 【0057】

望ましい突然変異を同定する方法には、例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発[CunninghamおよびWells, Science 244:1081-1085 (1989)]、オリゴヌクレオチドを用いた突然変異誘発[Adelmanら, DNA, 2:183 (1984)]、カセット突然変異誘発[Wellsら, Gene 34:315 (1985)]、組合わせ突然変異誘発、およびファージディスプレイライブラリー(Ladnerら, PCT国際出願WO88/06630号)が含まれる。LBP類似体を、上述のように、例えば、本明細書に記載のLDLおよび/または動脈細胞外マトリックス成分と結合するそれらの能力について試験し得る。本発明の範囲内の他の類似体には、例えば、ペプチド安定性を増大させる修飾を有するものが含まれる。そのような類似体は、例えば、ペプチド配列中に(ペプチド結合を置換する)1つ以上の非ペプ

チド結合を有し得る。他の類似体には、例えば、天然L-アミノ酸、例えばD-アミノ酸、または非天然もしくは合成アミノ酸、例えば - もしくは - アミノ酸以外の残基を有する類似体；および環状類似体も含まれる。

【0058】

類似体は、ペプチドを加水分解不能にするためにペプチド主鎖に構造的修飾が導入されているペプチドをも含むものとする。そのようなペプチドは、消化されないので、経口投与に特に有用である。ペプチド主鎖の修飾には、例えば、アミド窒素、 - 炭素、アミドカルボニル、またはアミド結合の修飾、および延長、欠失または主鎖架橋を伴う修飾が含まれる。例えば、ペプチド主鎖は、カルボニルをスルホキシドに置き換えるか、ペプチド結合を逆にするか、またはカルボニル基をメチレンに置き換えることにより修飾し得る。そのような修飾は、当業者には公知の標準法に従って実施し得る。例えば、Spatola, A. F., "Peptide Backbone Modifications: A Structure-Activity Analysis of Peptides Containing Amide Bond Surrogates, Conformational Constraints, and Related Backbone Replacements," in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, pp. 267-357, B. Winstein (編), Marcel Dekker, Inc., New York (1983) 参照。

【0059】

類似体は、1個以上のアミノ酸残基が置換基を有するポリペプチド、または、別の化合物、例えば、ポリペプチドの半減期を増大させる化合物、例えば、ポリエチレングリコールと融合しているポリペプチドをも包含するものとする。

【0060】

断片とは、天然LBPポリペプチドのある部分を指して言う。断片は、長さが、好ましくは少なくとも約100アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも約50アミノ酸残基、さらに好ましくは少なくとも約30アミノ酸残基、さらに好ま

しくは少なくとも約20アミノ酸残基、さらに好ましくは少なくとも約5アミノ酸残基、さらに好ましくは少なくとも約4アミノ酸残基、さらに好ましくは少なくとも約3アミノ酸残基、最も好ましくは少なくとも約2アミノ酸残基である。断片には、例えば、切断された分泌形態、タンパク質分解断片、スプライシング断片、他の断片、および、関連遺伝子、例えば、LBP-1、LBP-2またはLPB-3の少なくとも一部と別の分子とのキメラ構築物が包含される。LBPの断片は、当業者には公知の方法で生成し得る。ある特定の実施形態では、断片は生物学的に活性である。候補断片のLBP生物学的活性を示す能力は、当業者には公知の方法で評価し得る。例えば、LBP断片は、本明細書に記載されているようなLDLおよび/または動脈細胞外マトリックス構成成分に結合するそれらの能力について試験し得る。断片には、その生物学的活性には必要とされないが、またはmRNA交互スプライシング事象もしくはタンパク質交互プロセッシング事象の結果として生じる残基を含有するLBP断片も包含される。

#### 【0061】

タンパク質の断片は、当業者には公知の多様な方法のいずれか、例えば、組換え、タンパク質分解消化、または化学合成によって形成することができる。ポリペプチドの内部断片または末端断片は、ポリペプチドをコードする核酸の一方の末端（末端断片の場合）または両末端（内部断片の場合）から1個以上のヌクレオチドを除去することによって形成し得る。突然変異誘発性DNAを発現させると、ポリペプチド断片が生じる。このように、「端部を少しずつ切断する（end nibbling）」エンドヌクレアーゼで消化して、一連の断片をコードするDNAを生成することができる。タンパク質の断片をコードするDNAも、例えば、ランダムせん断、制限消化または上記方法の組み合わせにより形成し得る。例えば、LBPの断片は、例えば、図2A、7A、8A、10~18（配列番号10~18、45、46および48）のDNA配列のいずれかを制限消化して、所望の断片をコードするようにインビトロ操作されたLBP DNAを発現させることにより形成し得る。

#### 【0062】

断片は、当業では公知の技術、例えば、慣用のメリフィールド固相f-Moc

または t - B o c 化学を用いて化学合成することもでき、例えば、本発明のペプチドは、断片がオーバーラップしていない所望の長さの断片に任意に分割したり、または所望の長さのオーバーラップ断片に分割することができる。

#### 【0063】

L B P またはその生物学的に活性な断片もしくは類似体、あるいは結合分子またはその生物学的に活性な断片もしくは類似体は、例えば、相補的分子上の結合部位に向かってその同種分子と競争し、それによって、L B P と細胞結合分子との結合を減少または排除し得る。L B P もしくは結合分子は、例えば、天然の L B P もしくは結合分子の精製もしくは分泌、組換え L B P もしくは結合分子、または合成 L B P もしくは結合分子から得ることができる。

#### 【0064】

したがって、類似体および断片を形成する方法およびそれらの活性を試験する方法は当業者には公知である。

薬剤は、アンチセンス分子として用いられる核酸であってもよい。アンチセンス療法は、例えば、転写および/または翻訳を阻害することによって、コードされたタンパク質の発現を阻害するために、細胞条件下に、L B P ポリペプチドまたはその突然変異体をコードする細胞 m R N A および/またはゲノム D N A と特異的にハイブリダイズする、例えば、結合するオリゴヌクレオチドまたはそれらの誘導体の投与または *i n s i t u* 生成を包含するものとする。結合は、慣用の塩基対相補性によるか、または、例えば D N A 二重鎖との結合の場合には、二重らせんの主溝における特異的相互作用によるものであり得る。

#### 【0065】

ある特定の実施形態では、アンチセンス構築物は、例えば、遺伝子発現に関与する L B P 遺伝子天然配列に結合する。これらの配列には、例えば、プロモーター、開始コドン、終止コドン、および R N A ポリメラーゼ結合部位が含まれる。他の実施形態では、アンチセンス構築物は、野生型遺伝子中には存在しないヌクレオチド配列に結合する。例えば、アンチセンス構築物は、外来の非野生型配列挿入物を含有する L B P 遺伝子領域に結合し得る。あるいは、アンチセンス構築物は、欠失を受けた L B P 遺伝子領域に結合し、それによって、通常は連続配置

されないが、連続配置されると非野生型配列を形成する、遺伝子の2つの領域を結合させ得る。非野生型配列に結合するアンチセンス構築物は、患者にインビボ投与すると、野生型LBP遺伝子の発現を阻害することなく、突然変異LBP遺伝子の発現を阻害するという利点を提供する。

#### 【0066】

本発明のアンチセンス構築物は、細胞内で転写されると、例えば、LBPポリペプチドをコードする細胞mRNAの少なくとも1つの非反復部分に相補的なRNAを生成する発現プラスミドとして送達され得る。あるいは、本発明のアンチセンス構築物は、*ex vivo*形成し、細胞内に導入すると、LBP遺伝子のmRNA配列(二本鎖)および/またはゲノム配列(三本鎖)とハイブリダイズして発現を阻害するオリゴヌクレオチドである。そのようなオリゴヌクレオチドは、内在性ヌクレアーゼ、例えばエキソヌクレアーゼおよび/またはエンドヌクレアーゼ耐性を有し、したがってインビボで安定な修飾オリゴヌクレオチドであるのが好ましい。アンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いるための核酸分子の例は、DNAおよびペプチド核酸(PNA)のホスホラミデート類似体、ホスホチオエート類似体、ホスホロジチオエート類似体およびメチルホスホネート類似体である。(さらに、米国特許5,176,996;同5,264,564;および同5,256,775も参照)。さらに、アンチセンス療法に有用なオリゴマーの一般的な構築法が概説されている。〔例えば、Van der Kroghら, *Biotechniques* 6:958-976(1988); Steinら, *Cancer Res.* 48:2659-2668(1988)参照〕。

#### 【0067】

模倣体とは、LBPまたは結合分子の形状および/または電荷分布において類似している分子を指して言う。模倣体は、ペプチドまたは非ペプチドであり得る。模倣体は、例えば、LBPと結合分子との結合を競争的に阻害し得るので、治療薬として作用し得る。例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発、リンカースキャニング突然変異誘発または飽和突然変異誘発などのスキャニング突然変異誘発を利用して結合分子の結合に関与する特定のLBPポリペプチドのアミノ酸

残基をマッピングすることにより、結合分子との結合においてそれらの残基を模擬し、したがって、LBPと結合分子との結合を阻害し、それによってLBPの機能に干渉するペプチド模倣体、例えば、ジアゼピンまたはイソキノリン誘導体を生成することができる。そのような残基の非加水分解性ペプチド類似体は、例えば、ベンゾジアゼピン〔例えば、Freidingerら, in Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall編, ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands (1988) 参照〕; アゼピン〔例えば、Huffmanら, in Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall編, ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands (1988) 参照〕; 置換 - ラクタム環〔例えば、Garveyら, in Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall編, ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands (1988) 参照〕; ケトメチレンシュードペプチド〔例えば、Ewensonら, J. Med. Chem. 29: 295 (1986); Ewensonら, in Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, IL (1985) 参照〕; ターンジペプチドコア〔例えば、Nagaiら, Tetrahedron Lett. 26: 647 (1985); Satoら, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 1231 (1986) 参照〕; または - アミノアルコール〔例えば、Gordonら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 126: 419 (1985); Dannら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 134: 71 (1986) 参照〕を用いて生成し得る。

【0068】

抗体は、直接または間接にLBP代謝に影響を与える任意の部分に対する抗体を包含するものとする。抗体は、例えば、LBPもしくは結合分子、またはそのサブユニットもしくは断片に対して産生し得る。例えば、抗体には、抗LBP-

1抗体、抗LBP-2抗体または抗LBP-3抗体；および抗結合分子抗体が含まれる。抗体断片は、例えば、Fab断片、Fab断片、F(ab)<sub>2</sub>断片、F(v)断片、H鎖モノマー、H鎖ダイマー、H鎖トリマー、L鎖モノマー、L鎖ダイマー、L鎖トリマー、1つのH鎖と1つのL鎖とからなるダイマー、および抗LBP抗体または抗結合分子抗体の活性を模擬するペプチドを包含するものとする。例えば、抑制性抗体のFab<sub>2</sub>断片は、例えば、酵素的切断により形成し得る。本発明には、ポリクローナル抗体もモノクローナル抗体も使用し得る。モノクローナル抗体を用いるのが好ましい。本発明には、天然抗体、組換え抗体またはキメラ抗体、例えばヒト化抗体が含まれる。患者がヒトである場合には、ヒト化抗体を用いるのが好ましい。抗体は、ヒト抗体由来の定常部と、抑制性マウスモノクローナル抗体由来の可変部とを有するのが最も好ましい。LBPに対するポリクローナル抗体の産生は実施例6に記載されている。モノクローナル抗体とヒト化抗体は、当業者には公知の標準法を用いて産生させる。モノクローナル抗体は、例えば、連続培養細胞系が産生する抗体が得られる任意の技術を用いて産生させ得る。例としては、ハイブリドーマ技術〔Kohler and Milstein, Nature 256:495-497(1975)〕、トリオーマ技術、ヒトベータ細胞ハイブリドーマ技術〔Kozborら, Immunology Today 4:72(1983)〕、およびヒトモノクローナル抗体を産生させるEBV-ハイブリドーマ技術〔Coleら, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, A.R.Lisa, Inc., pp.77-96(1985)〕が挙げられる。ヒト化抗体は、慣用の産生技術および回収技術〔Berkower, I., Curr. Opin. Biotechnol. 7:622-628(1996)；RamharayanおよびSkaletsky, Am. Biotechnol. Lab 13:26-28(1995)〕により産生させるのが好ましい。ある種の好ましい実施形態においては、LBP、好ましくはLDL結合部位に対する抗体を産生させ、Fab断片を形成する。これらの抗体またはそれら由来の断片は、例えば、LBP分子上のLDL結合部位をブロックするのに用い得る。

【0069】

薬剤には、LBPおよび/もしくは結合分子の合成、翻訳後修飾、または機能に必要な分子の阻害剤、またはLBPおよび/もしくは結合分子の合成もしくは機能を阻害する分子のアクチベーターが含まれる。薬剤には、例えば、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、ホルモン、シグナル成分、キナーゼ、ホスファターゼ、ホメオボックスタンパク質、転写因子、修正因子、翻訳因子および翻訳後因子または酵素が含まれる。薬剤は、例えば、LBPおよび/または結合分子を少なくとも部分的に失活または破壊し得る電離性放射線、非電離性放射線、超音波および毒物をさらに包含するものとする。

#### 【0070】

薬剤はさらに、完全にはLBP特異的ではない薬剤をも包含するものとする。例えば、ある薬剤は動脈プラークの形成に関連する他の遺伝子またはタンパク質を変性させ得る。そのような重複特異性によって、さらなる治療上の利点を得られるであろう。

#### 【0071】

本発明はさらに、アテローム性動脈硬化症の治療に有用であると確認された薬剤を包含する。

本発明は、LBPポリペプチドと結合分子との結合を変える能力について薬剤を評価する方法をさらに包含する。薬剤を用意する。LBPポリペプチドを用意する。結合分子を用意する。薬剤とLBPポリペプチドと結合分子とを合せる。LBPポリペプチドと結合分子とを含む複合体の形成を検出する。薬剤存在下の複合体の形成が薬剤不在下の場合に比べて変化していれば、薬剤がLBPポリペプチドと結合分子との結合を変えることを示している。

#### 【0072】

好ましい実施形態では、LBPポリペプチドは、LBP-1、LBP-2またはLBP-3である。結合分子の例としては、天然LDL、修飾LDL、例えば、メチル化LDLまたは酸化LDL、および動脈細胞外マトリックス構成成分がある。

#### 【0073】

結合の変更には、例えば、結合の阻害または促進が含まれる。薬剤の効力は、

例えば、種々の濃度の薬剤を用いて得られたデータから用量反応曲線を生成して評価し得る。複合体の形成を測定する方法は、標準的かつ当業者には公知の方法、例えば、本明細書に記載されているようなアフィニティー同時電気泳動（ACE）アッセイまたはELISAアッセイである。

【0074】

本発明はさらに、LBPポリペプチドと結合分子との結合を変え得ると確認された薬剤を包含する。

さらに、本発明は、薬剤をLBPポリペプチド結合能について評価する方法をも包含する。薬剤を用意する。LBPポリペプチドを用意する。薬剤をLBPポリペプチドと接触させる。薬剤のLBPポリペプチド結合能を評価する。LBPポリペプチドは、LBP-1、LBP-2またはLBP-3であるのが好ましい。結合は、例えば、当業者には公知の標準法、例えば、本明細書に記載されているようなアフィニティー同時電気泳動（ACE）アッセイまたはELISAアッセイを用いて複合体の形成を測定して決定し得る。

【0075】

本発明はさらに、LBPポリペプチドに結合し得ると確認された薬剤を包含する。

さらに本発明は、薬剤を、LBP調節配列をコードする核酸に結合する能力について評価する方法を包含する。薬剤を用意する。LBP調節配列をコードする核酸を用意する。薬剤を核酸と接触させる。薬剤の核酸結合能を評価する。LBP調節配列は、LBP-1、LBP-2またはLBP-3調節配列であるのが好ましい。結合は、例えば、当業者には公知の標準法、例えば、DNA移動度シフトアッセイ、DNアーゼIフットプリント分析分子生物学〔Ausubelら編、Current Protocols in John Wiley & Sons, New York, NY, (1989)〕により複合体の形成を測定して決定し得る。

【0076】

本発明はさらに、LBP調節配列をコードする核酸に結合し得ると確認された薬剤を包含する。

さらに、本発明は、動物のアテローム性動脈硬化症を治療する方法を包含する。アテローム性動脈硬化症の治療を必要とする動物を用意する。LBP構造または代謝の様相を変え得る薬剤を用意する。アテローム性動脈硬化症が治療されるように、薬剤を動物に治療上有効量投与する。

#### 【0077】

ある特定の好ましい実施形態では、薬剤は、LBPポリペプチド、例えば、LBP-1、LBP-2もしくはLBP-3、またはその生物学的に活性な断片もしくは類似体である。薬剤は、例えば、配列番号1~9、43、44および47に記載のポリペプチドであり得る。薬剤は、長さが、好ましくは約100アミノ酸残基以下、より好ましくは約50アミノ酸残基以下、さらに好ましくは約30アミノ酸残基以下、さらに好ましくは約20アミノ酸残基以下、さらに好ましくは約10アミノ酸残基以下、さらに好ましくは約5アミノ酸残基以下、さらに好ましくは約4アミノ酸残基以下、さらに好ましくは約3アミノ酸残基以下、最も好ましくは約2アミノ酸残基以下のポリペプチドである。LBPポリペプチドは、好ましくは少なくとも約20%の酸性アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも約40%の酸性アミノ酸残基、さらに好ましくは少なくとも約60%の酸性アミノ酸残基、さらに好ましくは少なくとも約80%の酸性アミノ酸残基、さらに好ましくは少なくとも約90%の酸性アミノ酸残基、さらに好ましくは少なくとも約95%の酸性アミノ酸残基、最も好ましくは少なくとも約98%の酸性アミノ酸残基を有する。酸性アミノ酸残基としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる。そのようなLBPポリペプチドの例はBHF-1であり、BHF-1は、ヒトまたはウサギLBP-1のアミノ酸残基14~33を含む20アミノ酸長断片である。図9(配列番号9)参照。BHF-1のアミノ酸残基の45%は酸性である。本発明はさらに、BHF-1の生物学的に活性な断片および類似体を包含する。

#### 【0078】

LBPの他の好ましい酸性領域は、図7A(配列番号43)に記載のヒトLBP-2のアミノ酸残基329~343(配列番号19)、329~354(配列番号20)、344~354(配列番号21)、および529~538(配列番号20)

号22) ; 図1 (配列番号1) および図6 (配列番号6) に記載のウサギもしくはヒトLBP-1のアミノ酸残基14~43 (配列番号23) および38~43 (配列番号24) ; 図2A (配列番号47) に記載のウサギLBP-2のアミノ酸残基338~353 (配列番号25)、338~365 (配列番号26)、354~365 (配列番号27) および444~453 (配列番号28) ; 図5 (配列番号5) に記載のウサギLBP-3のアミノ酸残基96~110 (配列番号29) ; 図8A (配列番号44) に記載のヒトLBP-3のアミノ酸残基69~75 (配列番号41) である。本発明は、これらのポリペプチドのいずれの生物学的に活性な断片および類似体をも包含するものとする。

#### 【0079】

薬剤の他の例としては、任意のアミノ酸またはアミノ酸類似体のホモポリマーまたはヘテロポリマーが挙げられる。ある特定の好ましい実施形態では、薬剤は、酸性アミノ酸またはその類似体のホモポリマーである。ある特定の実施形態では、薬剤は、1種以上の酸性アミノ酸および1種以上の他のアミノ酸またはそれらの類似体のヘテロポリマーである。例えば、薬剤には、ポリ(glu)、ポリ(asp)、ポリ(glu asp)、ポリ(glu N)、ポリ(asp N) およびポリ(glu asp N) が含まれる。Nとは、gluまたはasp以外の任意のアミノ酸またはその類似体を指して言う。ポリ(glu asp) とは、所与の長さのペプチドを得るためのgluおよびaspのすべての置換を指して言う。好ましいペプチドは、長さが約10アミノ酸以下、好ましくは長さが約7アミノ酸のポリ(glu) である。

#### 【0080】

ある特定の好ましい実施形態では、薬剤は、LBP核酸またはその生物学的に活性な断片もしくは類似体、例えば、LBP-1、LBP-2もしくはLBP-3ポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片もしくは類似体をコードする核酸である。薬剤は、例えば、配列番号10~18、45、46および48に記載のヌクレオチド配列を有する核酸であり得る。他の実施形態では、薬剤は、アンチセンス分子、例えば、LBP遺伝子配列に結合し得るものである。

#### 【0081】

治療とは、アテローム性動脈硬化症の症状の予防、治療、軽減、またはアテローム性動脈硬化症の治癒を包含するものとする。薬剤の投与は、薬剤を、標的領域、例えば、標的細胞または細胞外マトリックスに到達させる任意の方法を用いて達成し得る。これらの方法には、例えば、注射、沈着、移植、座剤、経口摂取、吸入、局所投与、または薬剤を標的領域にアクセスさせる任意の他の投与方法が含まれる。注射は、例えば、静脈内、皮内、皮下、筋肉内または腹腔内であり得る。移植には、移植し得る薬剤送達系、例えば、ミクロスフェア、ヒドロゲル、高分子リザーバ、コレステロールマトリックス、高分子系、例えば、マトリックス浸蝕系および/またはマトリックス拡散系および非高分子系、例えば、圧縮、融合または部分融合ペレットの挿入が含まれる。座薬には、グリセリン座薬が含まれる。経口摂取用量は腸溶コートし得る。吸入には、吸入器で薬剤をエアゾールと共に、単独でまたは吸収可能な担体に結合させて投与することが含まれる。

【0082】

薬剤は、単独または他の治療薬との組合わせて投与し得る。ある特定の実施形態では、薬剤は、リポソーム中に組み込むか、または高分子送達系中に組み込まれた適当な担体と組み合わせ得る。

【0083】

本発明のある特定の実施形態では、投与は、かなりの期間、例えば、かなりの時間、日、週、月または年にわたって、薬剤に連続暴露されるように設計し得る。これは、上記方法の1つを用いて薬剤を反復投与するか、または薬剤を反復投与するのではなく長期間にわたって動物に放出する徐放性送達系を用いて達成し得る。徐放性送達系とは、薬剤の全放出が投与直後に一度に起こるのではなく、一定時間遅れることを指して言う。放出は一気に起こるか、または徐々に連続して起こり得る。そのような系の投与は、例えば、持続性経口剤形、濃縮塊注射剤、経皮パッチまたは皮下インプラントにより得る。

【0084】

放出が一気に起こる系の例としては、例えば、高分子マトリックス中に封入され、特定の刺激、例えば、温度、pH、光、磁場、または分解酵素に対して感受性を有するリポソームに薬剤が捕捉されている系や、薬剤がマイクロカプセルコ

ア分解酵素と共にイオンコートマイクロカプセルで被包されている系がある。薬剤の放出が漸進的かつ連続的である系の例としては、例えば、薬剤がマトリックス内形態に含まれている浸蝕系や、薬剤が制御速度で、例えば高分子を通して浸透する拡散系がある。そのような持続性の系は、例えば、ペレットまたはカプセルの形態であり得る。

【0085】

薬剤は、液体に、例えば、溶解形態またはコロイド形態で懸濁し得る。液体は、溶剤、不完全溶剤または非溶剤であってよい。多くの場合、水または有機液を用い得る。

【0086】

薬剤は、アテローム性動脈硬化症状の出現前または出現後に投与し得る。ある特定の実施形態では、薬剤は、アテローム性動脈硬化症の家族歴がある患者、またはアテローム性動脈硬化症に対する素因を示し得る表現型を有する患者、または患者をアテローム性動脈硬化症にかかりやすくする遺伝子型を有すると診断された患者、または他の危険因子、例えば、高コレステロール血症、高血圧症を有する患者かもしくは喫煙患者に投与する。

【0087】

薬剤は動物に治療上有効量投与する。治療上有効量とは、アテローム性動脈硬化症を少なくとも部分的に予防または反転させ得る量を指して言う。治療上有効量は、少なくとも一部は、動物種、動物の大きさ、動物の年齢、使用する薬剤、使用する送達系、アテローム性動脈硬化症の発症に関する投与時期を考慮したり、1回用量方式、複数回用量方式または持続性用量方式のどれを用いるかを考慮したりすることで、個体ベースで決定される。治療上有効量は、そのような要因を用い、ただ日常的な実験を行うだけで当業者が決定し得る。

【0088】

薬剤の濃度は、好ましくは約0.1~約1000mg/kg体重/日、より好ましくは約0.1~約500mg/kg/日、さらに好ましくは約0.1~約100mg/kg/日、最も好ましくは約0.1~約5mg/kg/日である。特定の濃度は、一部には、ある薬剤は他の薬剤より有効なので、使用する特定の薬

剤によって決まる。実際に投与される薬剤の用量濃度は、少なくとも一部は、作用部位において望ましい最終濃度、投与方法、特定の薬剤の効力、特定の薬剤の寿命、アテローム性動脈硬化症の発症に関する投与時期によって決まる。剤形は、動物に実質的に有害な影響を与えないようなものであるのが好ましい。投与量は、上記要素を用い、ただ日常的な実験を行うだけで、当業者が決定し得る。

#### 【0089】

ある特定の実施形態では、種々の遺伝子構築物を遺伝子療法プロトコルの一部として用いて、薬剤、例えば、アゴニスト形態またはアンタゴニスト形態のLBPポリペプチドをコードする核酸を送達し得る。例えば、発現ベクターは、非野生型LBPを発現する細胞中のLBPポリペプチドの機能を再構成するか、あるいはLBPポリペプチドの機能を阻害するために、特定の細胞型中においてLBPポリペプチドをインビボトランスフェクトして発現させるのに用い得る。LBPポリペプチドおよびその突然変異体の発現構築物は、任意の生物学的に有効な担体、例えば、LBP遺伝子を細胞に効果的にインビボ送達し得る配合物または組成物中で投与し得る。方法には、例えば、組換えレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、および単純ヘルペスウイルス-1、または組換え細菌もしくは真核生物プラスミドなどを含めたウイルスベクター中に当該遺伝子を挿入する方法が含まれる。ウイルスベクターは細胞に直接感染し、形質導入を生じさせる；プラスミドDNAは、例えば、カチオン性リポソーム{リポフェクション™ [ミズーリ州ゲイザースバーグ所在のライフ・テクノロジーズ社(Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)] またはその誘導體(例えば、抗体コンジュゲート)、ポリリシンコンジュゲート、グラマシジンS、人工ウイルスエンベロープまたは他のそのような細胞内担体、ならびに遺伝子構築物の直接注射またはインビボで実施される $Ca_3$ , ( $PO_4$ )<sub>2</sub>沈降反応の助けを借りて送達し得る。上記の方法は、当業者には公知であり、過度の実験を行わずに実施し得る。適切な標的細胞のトランスダクションは遺伝子療法における重要な第1ステップであるから、特定の遺伝子送達系の選択は、意図する標的の表現型および投与経路、例えば、局所投与するか全身投与するかなどの要素によって決まるであろう。投与は、治療上有効であるように、

当業者には公知の方法を用いて、1つ以上の細胞型、または1つの細胞型内の1つ以上の細胞に送達し得る。好ましい実施形態においては、薬剤を動物の動脈壁細胞に投与する。例えば、遺伝子工学的に作成されたLBP遺伝子を動脈壁細胞に投与する。ある特定の実施形態では、出生前動物または胚細胞に投与する。LBP発現のインビトランスダクション用に提供される特定の遺伝子構築物は、本明細書に記載の診断アッセイ用などの、細胞のインビトロランスダクションにも有用であることが理解されよう。

#### 【0090】

ある特定の実施形態では、アテローム性動脈硬化症の療法は、LBPをコードする遺伝子のアンチセンスヌクレオチド類似体を用いて実施する。アンチセンスヌクレオチドは、非加水分解性「主鎖」、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートまたはメチルホスホネートを有する。ヌクレオシド塩基配列は、例えば、LBP-1、LBP-2またはLBP-3をコードする遺伝子の一部の配列と相補的である。そのような配列は、例えば、LBPの遺伝子配列がTAA CCGであれば、ATTGGCであり得る。そのような療法の1つの実施形態は、徐放性基質、例えばポリビニルアルコール中にLBP遺伝子の1種の一部のアンチセンス類似体を組み込んだものであり、これを、例えば皮下注射により、数週間または数ヶ月の期間にわたってアンチセンスヌクレオチド類似体を放出するように投与する。別の実施形態では、例えば、血管形成またはアテローム切除後に、傷害を受けた動脈壁に局所的にゲルを適用してLBP合成を阻害してLDLの蓄積を予防し得るように、アンチセンス類似体を高分子マトリックス、例えば、ポリビニルアルコール中に組込む。

#### 【0091】

本発明はさらに、アテローム性動脈硬化症の恐れがある動物の治療方法を包含する。アテローム性動脈硬化症の恐れがある動物を用意する。LBP構造または代謝の様相を変え得る薬剤を用意する。動物が治療されるように、動物に薬剤を治療上有効量投与する。アテローム性動脈硬化症の恐れがあることは、例えば、アテローム性動脈硬化症の家族歴、または、例えば高コレステロール血症、高血圧もしくは喫煙を有するアテローム性動脈硬化症に対する素因を示す表現型症状

に起因し得る。

【0092】

さらに、本発明は、LBP構造または代謝に異常を有する細胞の治療方法を包含する。LBP構造または代謝に異常を有する細胞を用意する。LBP構造または代謝の様相を変え得る薬剤を用意する。細胞が治療されるように、細胞に薬剤を治療上有効量投与する。

【0093】

ある特定の実施形態では、細胞は、培養細胞もしくは培養組織または胚線維芽細胞から得られる。細胞は、例えば、動物、例えば、天然動物または非ヒトトランスジェニック動物の一部であり得る。LBPは、LBP-1、LBP-2またはLBP-3であるのが好ましい。

【0094】

本発明はさらに、動物のアテローム性動脈硬化症を治療するための組成物を包含し、この組成物は、アテローム性動脈硬化症が治療されるように動物のLBP代謝または構造の様相を変え得る治療上有効量の薬剤と、医薬として許容し得る担体とを含む。医薬として許容し得る担体には、例えば、塩類溶液、リポソームおよび脂質エマルジョンが含まれる。

【0095】

ある特定の好ましい実施形態では、医薬組成物の薬剤は、LBPポリペプチド、例えば、LBP-1、LBP-2もしくはLBP-3、またはその生物学的に活性な断片もしくは類似体である。薬剤は、例えば、配列番号1~9、43、44および47に記載のポリペプチドであり得る。薬剤は、長さが、好ましくは約100アミノ酸残基以下、より好ましくは約50アミノ酸残基以下、さらに好ましくは約30アミノ酸残基以下、さらに好ましくは約20アミノ酸残基以下、さらに好ましくは約10アミノ酸残基以下、さらに好ましくは約5アミノ酸残基以下、さらに好ましくは約4アミノ酸残基以下、さらに好ましくは約3アミノ酸残基以下、最も好ましくは約2アミノ酸残基以下のポリペプチドである。ポリペプチドは、好ましくは少なくとも約20%の酸性アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも約40%の酸性アミノ酸残基、さらに好ましくは少なくとも約60%の

酸性アミノ酸残基、さらに好ましくは少なくとも約80%の酸性アミノ酸残基、さらに好ましくは少なくとも約90%の酸性アミノ酸残基、さらに好ましくは少なくとも約95%の酸性アミノ酸残基、最も好ましくは少なくとも約98%の酸性アミノ酸残基を有する。

【0096】

ある特定の好ましい実施形態では、薬剤は、LBP核酸、例えば、LBP-1、LBP-2もしくはLBP-3ポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片もしくは類似体をコートする核酸である。薬剤は、配列番号10~18、45、46および48に記載のヌクレオチド配列を有する核酸であり得る。

【0097】

本発明はさらに、動物のアテローム性動脈硬化症を治療するためのワクチン組成物を包含し、この組成物は、アテローム性動脈硬化症が治療されるように動物のLBP代謝または構造の様相を変え得る治療上有効量の薬剤と、医薬として許容し得る担体とを含む。

【0098】

さらに、本発明は、動物のアテローム性動脈硬化病変を診断する方法を包含する。動物を用意する。アテローム性動脈硬化病変部に存在するLBPに結合し得る標識物質を用意する。標識LBPが生じるように標識物質をLBPと相互作用させ得る条件下に標識物質を動物に投与する。動物のアテローム性動脈硬化病変の存在を診断するために、イメージングにより標識LBPの局在または量を決定する。

【0099】

LBPは、LBP-1、LBP-2またはLBP-3であるのが好ましい。イメージングは、例えば、磁気共鳴イメージング、ガンマ線カメライメージング、シングルフォトンエミッションコンピュータ断層撮影(SPECT)イメージング、ポジトロンエミッショントモグラフィー(PTT)を含めた当業者には公知の標準法で実施し得る。

【0100】

アテローム性動脈硬化症のイメージングおよび診断には、アテローム性動脈硬

化病変部のLBPにしっかり結合する薬剤を用いるのが好ましい。薬剤は、例えば、ガンマ線カメラ、SPECT、PETスキャニングまたは他の類似のテクノロジーによる臨床的イメージングに適した $^{99m}\text{Tc}$ または別の同位体で放射線標識する。LBPは極めて初期の病変で発生するので、上記イメージングは、視認できる膨張部や流れの妨害が起こるようには動脈内腔に未だ作用していない極めて初期の病変を捜し出すために血管造影または超音波よりも高感度である。初期の病変やより進行した病変の位置を特定することに加えて、LBPに結合するイメージング薬剤は、食餌療法と薬物療法の両方の効力を評価する手段として、動脈硬化の経過を辿るためにも使用することができる。

#### 【0101】

従って、本発明の診断の実施形態は、例えばLBPの1つに相補的なペプチドを放射線標識して、閉塞性動脈硬化のイメージング剤としてそれを使用することによる、そのようなペプチドの適用である。ペプチドは、LBPに結合することが知られているペプチド（例えばRRRRRRRまたはKKLKLXX）またはLBPのLBPの電気陰性度の高いドメインに結合する多カチオン性ペプチドである。

ガンマ線シンチレーション〔アンガー（Anger）〕カメラを用いて体外検出する場合には、 $^{99m}\text{Tc}$ 標識するために、テクネチウム結合リガンド、例えば、CGC、GGCGCまたはGGCGCFをペプチドのN末端またはC末端に組み込み得る。磁気共鳴イメージング（MRI）により体外イメージングを行う場合には、例えば、ガドリニウム結合キレート化剤、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）をペプチドのN末端またはC末端に共有結合させる。さらに他の実施形態では、LBP結合ペプチドを、例えば磁性イオン酸化物粒子に共有結合させる、当業者には公知の標準法により、例えばペプチドと磁性イオン酸化物を含有する活性化ポリスチレン樹脂ビーズとを結合させる。

#### 【0102】

本発明はさらに、LBP、例えば、LBP-1、LBP-2もしくはLBP-3、またはその断片もしくは類似体に対して動物を免疫する方法を包含する。LDLを有する動物を用意する。LBPまたはその断片もしくは類似体を容易する

。LBPとLDLとの結合を変えるため、例えば、結合を減少または増大させるために、LBPまたはその断片もしくは類似体に対する動物の抗体産生を促進するためにLBPまたはその断片もしくは類似体を動物に投与する。

【0103】

さらに、本発明は、修飾LDLおよび天然LDLに結合する能力を有するLBPポリペプチドの断片または類似体を生成する方法をも包含する。LBPポリペプチドを用意する。LBPポリペプチドの配列を変える。変性LBPポリペプチドを、修飾LDL、例えば、メチル化LDL、酸化LDL、アセチル化LDL、シクロヘキサジオン処理LDL(CHD-LDL)や、天然LDLに結合する能力について試験する。

【0104】

変性LBPの断片または類似体を生成し、例えば、本明細書に記載されているような当業者には公知の方法を用いて、これらの断片または類似体を、上記修飾LDLおよび天然LDLに結合する能力について試験し得る。これらの断片または類似体をメチル化LDLおよび天然LDLに結合する能力について試験するのが好ましい。変性LBPの断片または類似体の結合活性は、天然LBPの結合活性より高いことも低いこともあり得る。変性LBPの断片または類似体の方が高いのが好ましい。好ましい実施形態では、LBPは、LBP-1、LBP-2またはLBP-3である。

【0105】

本発明はさらに、LBPをコードするcDNAを単離する方法を包含する。cDNAライブラリーを用意する。天然LDLおよび修飾LDL、例えば、メチル化LDLまたは酸化LDLに結合するポリペプチドをコードするcDNAについてcDNAライブラリーをスクリーニングする。このポリペプチドをコードするcDNAを単離するが、このcDNAはLBPをコードする。

【0106】

高脂質血症患者のアテローム性動脈硬化は、LBPを用いた免疫処置により患者に免疫応答が生じた後では軽減され得る。LDLとLBPとの結合をブロックするであろう抗体の産生には多くの免疫療法製品を用い得る。

## 【0107】

1種以上のLBPを注射すると、抗LBP抗体が産生し、結果として、例えば、大動脈のアテローム性動脈硬化が軽減され得る。この効果は、LBPとLDLとの結合を阻害することによって実現すると考えられる。本発明に用い得るLBP免疫原には、ヒトLBP、非ヒトLBP、組換えLBP、および本明細書に記載のLBPと構造的に関連したタンパク質、例えば、1個以上のアミノ酸残基が天然LBPと異なる非天然タンパク質が含まれる。全長タンパク質に加えて、LBPドメインを含む1種以上のペプチドを注射すると、有効な免疫応答を生成することができる。例えば、LDL結合活性を有するLBPドメインを含むペプチドを注射すると、生体にLBPのLDL結合部位に対する抗体を産生させることができる。これらのペプチド免疫原は、ヒトLBP、非ヒトLBP、組換えLBP、および本明細書に記載のLBPと構造的に関連したタンパク質由来の配列を有し得る。

## 【0108】

本発明のタンパク質またはペプチド免疫原は、その免疫原性を増強するために修飾することができる。本発明の免疫原は、担体、例えば、コレラトキシンB鎖抗体またはモノクローナル抗体と結合または共役させ得る。本発明の免疫原は、アルミニウム塩で沈降させるか、またはホルムアルデヒドもしくは他のアルデヒドと架橋させることができる。本発明のタンパク質は、水、リン酸緩衝溶液または塩類溶液などの生理学的に許容し得る希釈剤と混合し得る。この組成物はさらにアジュバントを含み得る。RIBIアジュバントの他に、不完全フロイントアジュバント、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウムなどのアジュバントはすべて当業では周知である。本発明のアジュバントは、ペプチドまたはタンパク質の免疫原性に影響を与えるように調節し得る。そのような修飾の例としては、アルミニウム塩、サイトカイン、MF59（油と界面活性剤の流動化マイクロエマルジョン）、SAF-1（油性エマルジョン）、サポニン誘導体、（ポリホスファゼンなどの）ポリマー、および細菌性毒素を用いるものが挙げられる。抗原タンパク質 - アジュバント組み合わせについては、さらに、WO99/54452（本明細書に援用される）およびWO99/49890（本明細書に援用される）

にも記載されている。

【0109】

本発明の抗アテローム性動脈硬化性免疫を生成するためには、上記タンパク質およびペプチドの送達他に、多くの他の送達系を用い得る。LBP免疫原は、直接タンパク質抗原として送達するか、あるいはタンパク質抗原をコードする核酸として送達し得る。本発明の免疫療法製品であるタンパク質または核酸は、多くの送達経路を介して送達し得る。これらの経路には、注射、沈着、移植、座剤、経口摂取、吸入（例えば、鼻腔スプレーを介した送達）、および局所投与（例えば、スキンパッチを介した送達）が含まれる。

【0110】

本発明の免疫原をコードする核酸は、例えば注射により組織に直接投与したり、タンパク質として発現させたりすることができる。DNAまたはRNAは、送達担体（例えば、ウイルス、細菌、リポソームおよび金ビーズ）と結合しているか、または（トランスフェクション促進タンパク質、ウイルス粒子、リポソーム配合物、装填脂質およびリン酸カルシウム沈降物と結合していない）裸であり得る。核酸は、場合により、プロモーター、例えば、ウイルスプロモーターを含み得る。核酸によってコードされる免疫原は、宿主中で産生され、結果として、免疫応答が生じる。治療タンパク質およびペプチドをコードする核酸配列の送達法は、Felgnerら（米国第5,580,859号；本明細書に援用）およびBarbetら（米国第6,025,338号；本明細書に援用）により詳細に記載されている。タンパク質抗原をコードする核酸、例えば、RNAを含むウイルスリポソームのワクチン組成物は、WO99/52503（本明細書に援用される）に記載されている。タンパク質およびペプチドをコードする核酸も、すべて当業では周知であるリポソーム、ミクロ粒子、およびISCOMSで被包して個体に送達し得る（例えば、本明細書に援用される米国第6,013,258号参照）。

【0111】

植物組織により免疫原が産生されるように、本発明の免疫原をコードする核酸を植物のゲノムに入れることもできる。次いで、遺伝子修飾植物が個体により消

化されて、免疫原が摂取され、抗LBP免疫応答が生じ得る。食用植物ワクチンの生成法および使用法は、WO99/54452（本明細書に援用される）に記載されている。

#### 【0112】

食用ワクチンの生産には、タバコ、トマト、ジャガイモ、ナス、ペピーノ、ヤム、ダイズ、エンドウ、テンサイ、レタス、ピーマン、セロリ、ニンジン、アスパラガス、タマネギ、ブドウ、マスクメロン、イチゴ、コメ、ヒマワリ、ナタネ、ナノカノラ、コムギ、カラスムギ、トウモロコシ、ワタ、クルミノキ、トウヒノ針葉樹、ポプラおよびリンゴを含めた多くの植物が有用であり得る。食用ワクチンは、プロモーターおよびLBPをコードする配列を含む核酸構築物で形質転換された植物細胞を含み得る。LBPコード配列は、場合により、LBPペプチドに融合したコレラトキシンサブユニットBペプチドを含むキメラタンパク質をコードし得る。本発明の好ましい植物プロモーターには、CaMV 35S、パタチン(patatin)、mas、および顆粒結合デンブシンターゼプロモーターが含まれる。

#### 【0113】

本発明の食用ワクチンは、アテローム性動脈硬化症に罹患しているかその恐れがある哺乳動物に投与し得る。食用ワクチンは、経口投与する、例えば、本発明のトランスジェニック植物を食べるのが好ましい。本発明のトランスジェニック植物は、植物部分、エキス、ジュース、液、粉末または錠剤の形態であり得る。食用ワクチンは鼻腔内経路を介して投与することもできる。

#### 【0114】

本発明では、微生物のゲノムにLBP免疫原をコードする核酸を挿入することにより、微生物、例えば、弱毒化ウイルスまたは細菌を用いることができる。次いで、この修飾ベクターを宿主に送達して、免疫原をインビボ産生させることができる。これらのベクターが生成する免疫応答は、抗アテローム性動脈硬化免疫をもたらすと予想される。当業では公知の標準法（米国第5,866,136号および米国第6,025,164号、どちらも本明細書に援用される）を用いて、微生物のゲノムに核酸分子を挿入する。

## 【0115】

本発明の抗アテローム性動脈硬化法は、免疫療法により患者の抗LBP応答を刺激することにより、アテローム性動脈硬化症の恐れがある患者、例えば、ヒト、霊長類、ウマ、イヌ、ネコまたはヤギを治療するものである。本発明のLBPタンパク質およびペプチドは、本明細書に記載の多くの送達系を使って患者に送達し得る。この免疫療法は、一次免疫と、その後の追加の、例えば、1回、2回または3回のブースターとを含み得る。

## 【0116】

本発明はさらに、(1)アテローム性動脈硬化症の恐れがある患者を用意するステップと、(2)以下:(a)LBPタンパク質またはその断片もしくは類似体およびアジュバント;(b)LBPタンパク質をコードする核酸;(c)LBPタンパク質をコードする核酸を含むウイルスまたは細菌;および(d)LBPタンパク質をコードする核酸を含む食用植物のうち1種以上を患者に投与するステップとに従って、アテローム性動脈硬化症の恐れがある患者を治療する方法を包含する。この方法に用いられるLBPタンパク質は、本明細書に記載の任意のLBP、例えば、LBP-1、LBP-2またはLBP-3であり得る。2種以上の核酸あるいはLBPタンパク質またはその断片もしくは類似体の組合わせを患者に投与することもできる。例えば、LBPタンパク質、またはLBPタンパク質をコードする核酸の組合わせには、(1)LBP-1とLBP-2;(2)LBP-1とLBP-3;(3)LBP-2とLBP-3;および(4)LBP-1とLBP-2とLBP-3が含まれる。この方法は、場合により、患者をアテローム性動脈硬化症の恐れがあると診断するステップを含む。

## 【0117】

本発明はさらに、非自己LBPタンパク質または非自己LBPタンパク質をコードする核酸を患者に送達して自己LBPに対する免疫応答を生成する、アテローム性動脈硬化症の恐れがある患者の治療方法を提供する。具体的に言えば、この方法は、患者が産生する1種以上の自己LBPタンパク質、例えば、LBP-1、LBP-2またはLBP-3の同定を必要とする。この同定には、例えば、DNA配列分析、タンパク質配列分析、抗体反応性、ハイブリダイゼーション分

析、または核酸増幅を用い得る。次いで、非自己LBPタンパク質、例えば、1種以上の自己LBPタンパク質と1個以上のアミノ酸残基が異なる同種タンパク質、異種タンパク質、遺伝子修飾タンパク質または非天然タンパク質を患者に投与するか、あるいは、非自己LBPタンパク質をコードする核酸を患者に投与する。この免疫療法生成物の抗アテローム性動脈硬化有用性は、患者に投与したときに、1種以上の自己LBPタンパク質に対する免疫応答を生成するその能力によって決まる。したがって、非自己LBPタンパク質と自己LBPタンパク質とに大きな違いがあれば、交差免疫反応性にはならないであろうと予想される。この方法は、場合により、患者をアテローム性動脈硬化症の恐れがあると診断するステップを含む。

#### 【0118】

本発明の別の方法は、血漿中で循環する1種以上のLBPタンパク質のレベルを増大させて、アテローム性動脈硬化症の恐れがある患者を治療する方法である。この方法により、自己LBPレベルまたは非自己LBPレベルのいずれかを増大させ得る。非自己LBPタンパク質には、例えば、同種LBP、異種LBP、および遺伝子修飾LBPが含まれる。1種以上のLBPタンパク質の血漿レベルは、LBPタンパク質をコードする核酸を送達することにより増大させ得る。一般にLBPは、常態では循環性タンパク質としては出現しないので、この内因性分子は、溶解可能な形態で送達されると、免疫認識を受けやすいと予想される。この方法は、場合により、患者をアテローム性動脈硬化症の恐れがあると診断するステップを含む。

#### 【0119】

本発明はさらに、1種以上のLBPタンパク質、例えば、LBP-1、LBP-2またはLBP-3とヒトに用いるのに適したアジュバントとの混合物を含有する医薬組成物を包含する。この医薬組成物は、2種以上のLBPタンパク質の組み合わせを含有し得る。例えば、組成物は、以下：(1)LBP-1とLBP-2；(2)LBP-1とLBP-3；(3)LBP-2とLBP-3；および(4)LBP-1とLBP-2とLBP-3のいずれかを含有し得る。

#### 【0120】

本発明はさらに、アテローム性動脈硬化症の恐れがある患者にLBPを発現する細胞を送達する細胞治療方法を包含する。この細胞は、本発明の自己LBPタンパク質もしくは非自己LBPタンパク質またはペプチドを発現するように工学設計し得る。この工学設計細胞を患者に送達すると、LBPタンパク質がインビボ産生され、このタンパク質またはこのタンパク質をコードする核酸を個体に与えると関連免疫療法が生じる。細胞治療方法は、米国第5,955,095号(本明細書に援用される)に記載されている。

#### 【0121】

以下の非限定的な実施例により、本発明をさらに説明する。

#### 実施例

##### 実施例1：ウサギcDNAライブラリの構築

本実施例では、バルーンで内皮剥奪された治癒中のウサギ腹大動脈由来のmRNAを用いたウサギcDNAライブラリの構築について説明する。バルーンカテーターにより内皮剥奪されたウサギの大動脈はアテローム性動脈硬化症に対する有効なモデルであることが示されている(ミニック(Minick)ら、Am. J. Pathol. 第95巻、131~158頁(1979年))。

#### 【0122】

mRNAは、バルーン処理されたウサギ大動脈内に結合する局所LDLを最大化するバルーン処理の実施4週間後に得た。第1鎖cDNAは、4 $\mu$ gのmRNAと、2 $\mu$ gのオリゴd(T)プライマーと、メチル化dNTP混合物(各10mM)と、10mM DTT、800ユニットのスーパースク립トIIRT(ライフテクノロジーズ社、メリーランド州、ゲイザースバーグ)と、1 $\times$ 第1鎖cDNA合成用緩衝液(50mMトリス-HCl(pH8.3); 75mM KCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>)とを含有する50 $\mu$ Lの反応混合液を37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートすることにより合成した。次に1 $\times$ 第2鎖用緩衝液(30mMトリス-HCl(pH7.5); 105mM KCl; 5.2mM MgCl<sub>2</sub>)と、0.1mM DTTと、メチル化dNTP混合物(各10mM)と、50ユニットの大腸菌DNAポリメラーゼIと、3ユニットのリボヌクレアーゼHと、15ユニット大腸菌DNAリガーゼ(すべての酵素はライフテクノロジーズ社よ

り入手)を添加して250  $\mu$ Lに調整し、これを15 でさらに2.5時間インキュベートした。得られた二本鎖cDNA(ds cDNA)を、1.5ユニットのT4DNAポリメラーゼ(ノバゲン社、ウィスコンシン州、マジソン)により11 で20分間処理し、平滑末端ds cDNAを作成した。次にこれらをエタノール沈殿により濃縮し、T4DNAリガーゼ(ノバゲン社)によって端部にEcoRI/HindIIIリンカーを付着させた。これらのリンカーを連結したcDNAを、EcoRIおよびHindIII制限酵素で処理し、該cDNAの5'および3'末端にそれぞれEcoRIおよびHindIII認識配列を作った。ゲル排除クロマトグラフィーによってリンカーDNAを除去した後、これらのds cDNAを、T4DNAリガーゼによって一方向的にEX10xファージーム(ノバゲン社)に挿入し、製造者のプロトコル(ノバゲン社)に従ってファージ粒子内にパッケージングした。2  $\times$  10<sup>6</sup>個の独立したクローンを含むcDNAのファージライブラリを4  $\mu$ gのmRNAから得た。

#### 【0123】

実施例2: LDL結合タンパク質(LBP)をコードするウサギcDNAの同定

本実施例では、天然のLDLおよびメチルLDLのいずれにも結合するLBPをコードするcDNAを同定するためのウサギcDNAライブラリを機能的にスクリーニングするための方法について説明する。メチルLDLは、これまでに報告されている細胞表面受容体によっては認識されていない。例えば、ヴァイスグラバー(Weisgraber)ら、J. Biol. Chem. 第253巻、9053~9062頁(1978年)を参照のこと。

#### 【0124】

大腸菌ER1647細胞(ノバゲン社)の一晚培養物を実施例1で得たcDNAファージに感染させ、2  $\times$  YT寒天を含む直径150mmのプレートに2  $\times$  10<sup>4</sup>プラーク形成単位(pfu)の密度でプレートした。1  $\times$  10<sup>6</sup>ファージに相当する全部で50枚のプレートにプレートして、プラークの直径が1mmに達するまで37 でインキュベートした(5~6時間)。予め10mM IPTG溶液に浸しておいた乾燥ニトロセルロース膜を各プレートの上に重ねて組換えタンパク質の産生を誘導するとともに、メンブレン上にそれらのタンパク質を固定化

した。これらを37℃でさらに3～4時間、続いて4℃で一晩インキュベートした。

#### 【0125】

翌日、これらの膜を各プレートから引き上げ、以下のように処理した。TBS-T溶液(10mMトリス-HCl、pH8.0; 150mM NaCl、0.05%Tween20)で数回の簡単なリンス; HBB(20mM HEPES、pH7.5; 5mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、および5mM KCl)中の6Mグアニジン-HClによる10分間リンスを2回; HBB中の3Mグアニジン-HClによる5分間リンスを2回; 最後にTBSEN(TBS、1mM EDTA、0.02%NaN<sub>3</sub>)で簡単にリンス。

#### 【0126】

次にこれらの膜を5%脱脂乾燥乳を含むTBSEN溶液中で室温にて30分間、続いて1%脱脂乾燥乳を含むTBSEN溶液中で10分間ブロックした。ブロッキング後、これらの膜を天然のヒトLDL(実施例11に記載したようにして得られたもの、あるいはメチル化ヒトLDL(meLDL)(ヴァイスグレーバー(Weisgraber)ら、J. Biol. Chem. 第253巻、9053～9062頁(1978年)を参照のこと)とともに、1×TBSENと、1%脱脂乾燥乳と、1mM PMSFと、0.5×プロテアーゼ阻害剤溶液(1mM L-アミノカプロン酸/1mMベンザミジン)とを含む溶液中で、4μg/mLの濃度でインキュベートした。インキュベーションは、攪拌台上で穏やかに攪拌しながらガラスシャーレの中で室温で4時間行った後、攪拌せずに4℃で一晩行った。

#### 【0127】

特異的に結合したメチルLDLと天然LDLを、ニトロセルロース膜上でヒトLDLに対する抗体によって検出した。ヒツジの抗ヒトLDLポリクローナル抗体(ベーリンガーマンハイム社、インディアナ州、インディアナポリス)を大腸菌plysE細胞抽出液で吸着して、バックグラウンドを消した。吸着のために、大腸菌plysE細胞を対数期まで増殖させ、遠沈し、1mM PMSFと、2mM L-アミノカプロン酸と、1mMベンザミジンとを含むPBS中に再懸

濁した。この細胞懸濁液に対して、液体窒素と冷水道水に浸漬することによる凍結融解サイクルを8回行った。抗LDL抗体/細胞抽出物溶液を緩やかに攪拌しながら4℃で1時間インキュベートした(1 mLの抗体溶液/3 mg粗細胞抽出物)。インキュベーションに続いて、この混合物を遠心分離し(10,000×g; 10分間; 4℃)、上清を使用時まで0.02%NaN<sub>3</sub>の存在下に4℃で保存した。膜に対して以下のように免疫スクリーニングを行った。(i)1%ゼラチンを含むTBSENによる室温での5分間洗浄を3回、(ii)1%ゼラチンを含むpH7.4のPBS中で30分間のインキュベーション、(iii)吸着されたヒツジの抗ヒトLDL抗体(ベーリンガー・マンハイム、インディアナ州、インディアナポリス)を含む新鮮なPBS/ゼラチン溶液中(1:1000希釈)、穏やかに攪拌しながら室温で2時間のインキュベーション、(iv)pH7.4のTBS中での3回の簡単な洗浄、(v)ロバの抗ヒツジアルカリホスファターゼ結合抗体(シグマ社、ミズーリ州、セントルイス)を含むPBS/ゼラチン溶液(1:10,000希釈)中、穏やかに攪拌しながら室温で1時間インキュベーション、(vi)pH7.4のTBSで3回の簡単な洗浄、次に(vii)アルカリホスファターゼ基質展開キット(ノバゲン社)を用いて、製造者の指示に従って展開を行った。LBPを生産したファージプラークは、膜上に青色の「ドーナツ」として現れた。

#### 【0128】

LBPのcDNAを含む実施例1からのファージをプラーク精製し、ノバゲン社によって提供される「Cre媒介性プラスミド切出しによるオートサブクロニング(Autosubcloning by Cre-mediated Excision)」と呼ばれるプロトコールに従って、プラスミドサブクロンに変換した。DNA配列は、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法(サンガー(Sanger)ら、Proc.Natl.Acad.Sci., 米国、第74巻、5463~5467頁(1977年))によって得、アプライドバイオシステムズ社の自動シーケンサによって解析した。各cDNAのオープンリーディングフレーム(ORF)は、これらのcDNAのセンスおよびアンチセンス鎖から得たコンセンサス配列から決定した。配列決定により、これまでに

は知られていなかった3つの遺伝子が単離されたことが確認された。これらの遺伝子はLDL抗体結合に対する機能的スクリーニングによって選択されたものであるから、これらの遺伝子によってコードされるタンパク質をLDL結合タンパク質(LBP)、具体的にはLBP-1、LBP-2およびLBP-3と名付けた。ウサギLBP-1、LBP-2およびLBP-3、ならびに対応するタンパク質に対するcDNA配列は配列番号10~14および48に示されている。

#### 【0129】

それぞれのcDNAのコード配列に基づいて、組換えタンパク質の大きさは、LBP-1は16.2kDa、LBP-2は40kDa、LBP-3は62.7kDaであると決定した。

#### 【0130】

実施例3：LBP cDNAまたはcRNAを用いたウサギRNAのノーザンブロット分析

本実施例では、LBP mRNAの大きさと組織分布について説明する。全RNAを種々のウサギ組織、すなわち、副腎、胸大動脈、腹大動脈、バルーン処理して内皮再生した腹大動脈、心臓、腎臓、平滑筋細胞、肺および肝臓から、トリゾール試薬(ライフテクノロジーズ社)によって単離し、エタノール沈殿によって濃縮した。RNAのゲル電気泳動を1×MOPS緩衝液(0.2M MOPS、pH7.0; 50mM酢酸ナトリウム; 5mM EDTA, pH8.0)および0.37Mホルムアルデヒドを含む1.2%アガロースゲル中で行った。ゲルに各被験組織からの20µgの全RNAを流し、1×MOPS緩衝液中、100ボルトで2時間電気泳動した。RNAを支持されたニトロセルロース膜上にプロットし(Schleicher & Schuell社、ニューハンプシャー州、キーン)、80℃で2時間バークすることにより固定化した。放射性標識したLBP-1、LBP-2およびLBP-3 cDNAまたはcRNAプローブへのハイブリダイゼーションを、当業者に公知の標準的な方法によって実施し(例えば、アウスベル(Ausubel)ら、Current Protocols in Molecular Biology; John Wiley & Sons (1989年)を参照のこと)、シグナルをオートラジオグラフィーによって検出した

。

#### 【0131】

結果は以下の通りであった。mRNAの大きさは、LBP-1が約1.3 kb、LBP-2が約2.3~2.5 kb、LBP-3が約4.7 kbであった。LBP-1、LBP-2およびLBP-3のmRNAは調べたすべての組織において認められたが、バルーン処理された腹大動脈において最も多く認められた。

#### 【0132】

##### 実施例4：ヒトLBP cDNAおよびゲノムクローンの単離

本実施例では、ヒトLBP cDNAの単離について説明する。ヒトLBP cDNAクローンは3つのcDNAライブラリから単離した。ヒト胎児脳cDNAライブラリはストラタジーン社(カリフォルニア州、ラ・ホーヤ)から入手し、ヒト肝臓およびヒト大動脈cDNAはクローンテック社(カリフォルニア州、パロアルト)から入手し、ロー(Law)ら(遺伝子発現(Gene Expression)、第4巻、77~84頁(1994年))に記載されている方法に従って、ウサギLBP-1、LBP-2またはLBP-3に由来する放射性標識したcDNAプローブを用いてスクリーニングを行った。いくつかの強くハイブリダイズしたクローンを同定し、プラーク精製した。クローンはヒトLBP1、LBP-2およびLBP-3であることが、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション方法とアプライド・バイオシステムズ社の自動シーケンサーによる分析とによるDNA配列決定によって確認された。これらのcDNA配列およびヒトLBP-1、LBP-2およびLBP-3に対する対応するタンパク質は、それぞれ配列番号15、16および17に示されている。

#### 【0133】

ヒトゲノムライブラリーのスクリーニングは、cDNAライブラリスクリーニングから得られたLBP-1、LBP-2およびLBP-3クローンのそれぞれを用いて行った。3つのcDNAのそれぞれにハイブリダイズするクローンを単離し、配列決定を行った。LBP-1、LBP-2およびLBP-3に対するゲノム配列が、それぞれ図22~24に示されている。LBP-1のオープンリーディングフレームは、LBP-1遺伝子の4つのエクソンにまたがっている(図

22、配列番号49)。ゲノム配列によって予測されるLBP-1タンパク質は、上述のcDNAクローンによって予測されるものと同じである。LBP-2のオープンリーディングフレームは、LBP-2遺伝子の5つのエクソンにまたがっている(図23、配列番号50)。ゲノム配列によって予測されるLBP-2タンパク質は、そのアミノ末端にさらに別の321個のアミノ酸を含んでいるという点で、上述のcDNAクローンによって予測されるものとは異なっている(LBP-2cDNAは、5'トランケーションである)。LBP-3のオープンリーディングフレームは、LBP-3遺伝子の10のエクソンにまたがっている(図24、配列番号51)。ゲノム配列によって予測されるLBP-3タンパク質は、そのアミノ末端にさらに別の16個のアミノ酸(LBP-3cDNAは、5'トランケーションである)およびアミノ酸第130位にアスパラギンを含んでいるという点で、上述のcDNAクローンによって予測されるものとは異なっている。ウサギとヒトの対応するLBP-1、LBP-2およびLBP-3タンパク質配列の比較を、図19、20および21に示す。

#### 【0134】

実施例5：組換えLBP-1、LBP-2およびLBP-3ウサギタンパク質の大腸菌からの単離

LBPcDNAを、実施例1および2に記載のように得たオリジナルpEX10xプラスミドより単離し、組換えタンパク質を発現されるためにPPROEX-HTベクター(ライフテクノロジーズ社)にサブクローン化した。形質転換された大腸菌DH10B培養物にIPTGを添加することにより、大腸菌組換えタンパク質を誘導したところ、6-ヒスチジンタグ(N末端)を含む組換えタンパク質が発現した。このタグ付きタンパク質を、製造者(キアゲン社、カリフォルニア州、サンタクララ)によって提供されるプロトコールの記載されるように、Ni-NTA(ニッケルニトリロ三酢酸)と結合させることにより、全細胞タンパク質から精製した。クロマトグラフィー工程後に得られた調製物は、約90%の純度であり、最終精製工程として調製用SDS-PAGEを行った。

#### 【0135】

特性決定手順によって必要とされる場合には、Iodobeads(ピアス社

、イリノイ州、ロックフォード)を用いてLBPのヨウ素化を行った。Iodobeadsを、蓋付き微量遠心管に入れた500  $\mu$ CiのNa<sup>125</sup>I溶液(17 Ci/mg)(ニューイングランドヌクレア社、マサチューセッツ州、ボストン)中、室温で5分間インキュベートした。Iodobeads - Na<sup>125</sup>I微量遠心管にタンパク質溶液を加え、室温で15分間インキュベートした。このインキュベーションの終了時に、全可溶性およびTCA沈殿可能なカウントを決定するために、アリコートを取り出した。次に放射性標識されたタンパク質を冷アセトンで沈殿させた(2.5容; -20 ; 2.5時間)。このインキュベーション後、沈殿したタンパク質を遠心分離(14,000 g; 1時間; 室温)によって回収し、試料用緩衝液(6 M尿素/50 mMトリス, pH 8.0 / 2 mM EDTA)中に再懸濁した。タンパク質調製物の完全性はSDS-PAGEによって評価した。

#### 【0136】

組換えLBPの同一性は、当業者に公知の標準的なタンパク質配列決定プロトコルを用いて確認した(微量シーケンシングのためのタンパク質およびペプチド精製に対する実務ガイド(A Practical Guide for Protein and Peptide Purification for Microsequencing)、マツダイラ(Matsudaira)ら、Academic Press, Inc., 第2版(1993年))。解析は、アプライドバイオシステムズ社のモデル477Aタンパク質シーケンサーおよびオンラインモデル120PTHアミノ酸アナライザを用いて行った。

#### 【0137】

実施例6: LBP-1、LBP-2およびLBP-3に対する抗体の生産

本実施例では、LBP-1、LBP-2およびLBP-3に対するポリクローナル抗体の生産について説明する。精製した組換えLBPタンパク質(0.5 mL; 200  $\mu$ g)とRIBIアジュバント(RIBIイムノケムリサーチ社、モンタナ州、ハミルトン)との混合物を、雄のモルモット(ダンキンハートリー(Dunkin Hartley); ハゼルトンリサーチプロダクツ社、ペンシルベニア州、デンバー)に、背側の胸部および腹部部位に沿って3~5カ所に皮下

注射した。静脈穿刺により、1日目(免疫化前採血)、28日目、49日目および70日目に採血を行った。ブースタ注射は、21日目(100 $\mu$ g;皮下)、42日目(50 $\mu$ g;皮下)および63日目(25 $\mu$ g;皮下)に行った。モルモット抗血清の力価は、系列希釈「ドットブロッキング」によって評価した。免疫前抗血清も同時に評価した。3回目のLBPタンパク質のブースタ後、組換えタンパク質に対する力価は、最高レベルに達し、ドットプロット検定において156pgの検出可能な比色応答を示した。

#### 【0138】

組換えLBP-1、LBP-2またはLBP-3に対するポリクローナル抗体の特異性は、ウェスタンブロット分析(Towbinら、Proc. Natl. Acad. Sci. 米国、第76巻、4350頁(1979年))を用いて実証した。タンパク質-抗体複合体は、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗モルモットIgGを用いて免疫化学的に可視化した後、ニトロブルーテトラゾリウム(バイオラッドラボラトリーズ社、カリフォルニア州、ヘラクレス)で染色した。非特異的結合は、トリス緩衝生理食塩水(100mMトリス;0.9%NaCl, pH7.4)中の3%脱脂乾燥乳によってブロックした。

#### 【0139】

##### 実施例7:免疫組織化学的特性決定

本実施例ではプラークを覆う内皮細胞内または該内皮細胞上、隣接する平滑筋細胞内または該細胞上、および細胞外マトリックス内のLBPの存在について説明する。さらに、LDLとLBPの同所局在性についても実証した。これらの結果は、バルーン処理したウサギの動脈病変と、ヒトアテローム性動脈硬化症のプラークとを免疫組織化学的方法によって調べることにより得た。

#### 【0140】

バルーンにより内皮剥奪された大動脈は、組織採取の24時間前にヒトLDLのボラス注射(3mg;静注)を受けたウサギから得た。アテローム性動脈硬化症のプラークを含むヒト大動脈は、通常の剖検試料から得た。組織を10%緩衝ホルマリン中に固定し(24時間以内)、自動組織包埋機を用いてパラフィン中に包埋した。組織切片を裁断し(5~7 $\mu$ )、60 $^{\circ}$ で1時間インキュベート

することにより、スライドグラスに載置した。切片のパラフィン除去を行った。脱イオン水による最終洗浄の後、切片を1%  $H_2O_2$  /  $H_2O$  とともに室温で5分間インキュベートすることにより、内因性ペルオキシダーゼ活性を除外した。切片を室温で5分間リン酸緩衝生理食塩水(PBS)によってリンスし、非特異的結合を二次抗体の起源に応じて5%正常ヤギ血清または5%正常ウサギ血清でブロックした(シグマ社、ミズーリ州、セントルイス)(1時間、室温)。次に切片をウサギ型のLBP-1、LBP-2またはLBP-3に対するモルモットポリクローナル抗体の1:50希釈物(5%正常ヤギ血清/PBS中)とともにインキュベートした。免疫前血清ならびにLBP-1、LBP-2またはLBP-3に対する特異的抗血清も対照に含めた。後者においては、組織切片とともにインキュベートする前に、組換えLBP-1、LBP-2またはLBP-3とともにインキュベートして遠心分離を行うことにより一次抗体が完全に吸着され、除去されている。アフィニティ精製されたヒトアポリポタンパク質Bに対するウサギポリクローナル抗体(ポリサイエンス社、ペンシルベニア州、ウォリントン)を1:100(5%正常ウサギ血清/PBS中)の希釈率で用いた。切片を加湿チャンバ内において室温で2時間インキュベートした。インキュベーション終了時に、切片をPBSでリンスし、ヤギ抗モルモットビオチン化IgG複合体(ベクターラボラトリーズ社、カリフォルニア州、バーリングゲーム)の1:200(5%正常ヤギ血清/PBS中)希釈物とともに、あるいは、ウサギ抗ヤギビオチン化IgG複合体(ベクターラボラトリーズ社、カリフォルニア州、バーリングゲーム)の1:250(5%正常ウサギ血清/PBS中)希釈物とともに、湿ったチャンバ内において室温にて1時間インキュベートした。切片をPBSでリンスし、抗原-抗体シグナルをアビジン/ビオチンHRP複合体(Vectastain ABCキット;ベクター・ラボラトリーズ、カリフォルニア州、バーリングゲーム)を用いて増幅した。切片をDAB基質を用いて限界させ(4~6分間、室温)、ヘマトキシリンによって対比染色した。バルーン処理したウサギの動脈において、抗LBP-1、抗LBP-2および抗LBP-3抗体を用いた免疫組織化学試験により、LBP-1、LBP-2およびLBP-3は機能的に改変された内皮細胞内または該細胞上の再生内皮細胞の島の縁に局在化しており、こ

の位置は不可逆LDL結合が実証されている(チャン(Chang)ら、動脈硬化と血栓症(Arteriosclerosis and Thrombosis)、第12巻、1088~1098頁(1992年))位置と同じであることが示された。LBP-1、LBP-2およびLBP-3は、機能的に改変された内皮細胞の下にある内膜平滑筋細胞内または該細胞上にも見られ、また程度は低いものの、細胞外マトリックス内にも見られた。LDL結合が可逆的であることが実証されている(Arteriosclerosis and Thrombosis)、第12巻、1088~1098頁(1992年))依然内皮剥奪されたままの領域においては、LBP-1、LBP-2またはLBP-3は全く見られなかった。バルーン処理したウサギ大動脈の、抗ヒトアポリポタンパク質B抗体による免疫組織化学試験により、LBP-1、LBP-2およびLBP-3と同じ部位にLDLが存在することが示された。

#### 【0141】

通常の剖検で採取したヒトアテローム性プラークにおいて、抗LBP-1、抗LBP-2および抗LBP-3抗体との免疫組織化学試験により、LBP-1、LBP-2およびLBP-3は、プラークを覆う内皮細胞内または該細胞上、ならびに隣接する平滑筋細胞内または該細胞上にも見られることが示された。ヒト組織において、細胞外マトリックス内にLBP-1、LBP-2およびLBP-3が存在することのより大きな証拠があった。

パラフィン切片を用いて得られたこれらの結果は、凍結切片を用いて得られた結果と同じであった。

#### 【0142】

実施例8：LBPとLDLまたはHDLとのアフィニティ同時電気泳動(ACE)アッセイ

#### 【0143】

本実施例では、LBP-1、LBP-2またはLBP-3と、LDLとの間で結合が起こること、ならびに、LBP-1、LBP-2またはLBP-3と、HDL(高密度リポタンパク質)の間では結合が起こらないという事実によって説明されるように、この結合が特異的であることについて説明する。組換えウサ

ギLBP-1、LBP-2またはLBP-3のLDLへの結合の親和性と特異性の分析は、アフィニティ電気泳動の原理(リー(Lee)とランダー(Lander)、Proc.Nat1.Acad.Sci.、米国、第88巻、2768~2772頁(1991年))を用いて実施した。50mM MOPSナトリウム、pH7.0、125mM酢酸ナトリウム、0.5%CHAPS中に溶かしたアガロース(1%;65)を調製した。9本の平行なバーからなるテフロン(登録商標)コーム(45×4×4mm/バーの間隔3mm)を、プレキシガラス製のキャストリングトレイに適合させたGel Bondフィルム(FMCバイオプロダクツ社、メイン州、ロックランド)上に、バーの長軸がキャストリングトレイの長軸に平行になるように配置した。テフロンストリップ(66×1×1mm)をキャストリングトレイの縁から4mmの位置に、該ストリップの長軸がキャストリングトレイの短軸と平行になるようにキャストリングトレイの縁の上に配置した。次に溶かしたアガロース(>65)を約4mmの高さに達するまで注いだ。コームとストリップを除去すると、66×1mmのスロットに隣接して9個の45×4×4mmの矩形のウェルを含むゲルができた。LDLまたはHDL試料をゲル緩衝液(50mM MOPSナトリウム、pH7.0、125mM酢酸ナトリウム)中に所望の濃度の2倍の濃度で調製した。次に試料を等量の溶かしたアガロース(50mMMOPS、pH7.0;125mM酢酸ナトリウム;50)と混合し、適切な矩形のウェルにピペットで注入し、ゲル化させた。LBP-1およびLBP-3の結合の親和性および特異性を、いくつかの濃度のLDL(540~14nM)およびHDL(2840~177nM)を用いて試験した。一定量(0.003nM~0.016nM)の<sup>125</sup>I標識したLBP-1、LBP-2またはLBP-3(50mM MOPSナトリウム、pH7.0;125mM酢酸ナトリウム;0.5%ブロムフェノールブルー;6%(wt/vol)スクロースに懸濁)をスロットに流した。ゲルを70v/2時間/20で電気泳動した。泳動終了後、ゲルを風乾し、増感紙とともにX線フィルムを-70で一晩ゲルに露出することにより、遅延プロファイルを可視化した。

#### 【0144】

LDLはLBP-1、LBP-2およびLBP-3のゲル内での移動を濃度依

存性かつ飽和可能に遅らせたが、このことは、LDLへのLBP-1、LBP-2およびLBP-3の結合が高度に特異的であることを示すものである。この結論は、HDLがLBP-1、LBP-2またはLBP-3を遅らせなかったという事実によって裏付けられる。アフィニティ同時電気泳動アッセイから作成した結合曲線からは、LBP-1はLDLに $K_d = 25.6 \text{ nM}$ で結合し、LBP-2(ウサギクローン26)はLDLに $K_d = 100 \text{ nM}$ で結合し、LBP-3(80 kDa断片)はLDLに $K_d = 333 \text{ nM}$ で結合することが示された。

#### 【0145】

LBP-1、LBP-2およびLBP-3のLDLへの結合の親和性および特異性の試験に加えて、「コールドな」(すなわち、放射性標識されていない)LBP-1、LBP-2またはLBP-3が、放射性標識されたLBP-1、LBP-2またはLBP-3のLDLへの結合を競争的に阻害する能力も調べた。競争試験は、一定濃度のコールドなLDLと、放射性標識されたLBP-1と、漸加量のコールドな組換えLBP-1(6~31  $\mu\text{M}$ )とを用いて実施した。ACEアッセイ試料およびゲルは本明細書記載のようにして調製した。コールドなLBP-1は放射性標識されたLBP-1のLDLへの結合を濃度依存的に阻害し、コールドなLBP-2は、放射性標識されたLBP-2のLDLへの結合を濃度依存的に阻害し、コールドなLBP-3は、放射性標識されたLBP-3のLDLへの結合を濃度依存的に阻害した。

#### 【0146】

ウサギおよびヒトのLBP-2は、アミノ末端に長い酸性アミノ酸伸張部を含んでいる(ウサギLBP-2アミノ酸残基338~365、ヒトLBP-2アミノ酸残基329~354)。LBP-2のこの部分がLDL結合ドメインである可能性については、上記酸性アミノ酸領域の有無のみが異なる2つのウサギLBP-2クローンを、当業者に公知の標準的な方法に従って発現ベクターにサブクローニングすることによって試験した(それぞれ、クローン26およびクローン45)。次にこれらの2つのクローンのLDLへの結合の親和性と特異性を評価するために、ACEアッセイを行った。LDLは、クローン26由来の放射性標識したLBP-2のゲル中の移動を濃度依存的かつ飽和的に遅らせた。クローン

45由来の放射性標識したLBP-2の移動は遅らせられなかった。

【0147】

一定濃度のコールドなLDLおよびクローン26由来の放射性標識LBP-2と、漸加濃度のコールドな組換えLBP-2/クローン26およびLBP-a/クローン45を用いた競争について調べた。コールドなクローン26由来のLBP-2は、クローン26由来の放射性標識されたLBP-2のLDLへの結合を濃度依存的に阻害した。一方、クローン45由来のLBP-2は、クローン26由来の放射性標識されたLBP-2のLDLに対する結合に影響を及ぼさなかった。これらの結果は、酸性アミノ酸の長い伸張部分が、LBP-2のLDLに対する結合ドメインを含んでいることを示している。

【0148】

実施例9：阻害剤存在下におけるLBP-1またはLBP-2とLDLとのアフィニティ同時電気泳動(ACE)アッセイ

本実施例では、LBP-1またはLBP-2とLDLとの間の結合がポリグルタミン酸またはBHF-1によって阻害されることについて説明する。第3の化合物が有する、予め相互作用することが示されている2つのタンパク質間の結合を阻害する能力を、実施例8に記載したACEアッセイに変更を加えて試験した。第3の化合物を一番上に加えるか、もしくは放射性標識されたタンパク質と一緒にウェルに加えた。第3の化合物が結合を阻害していれば、放射性標識されたタンパク質はゲル中を流れることになる。第3の化合物が結合を阻害していなければ、放射性標識されたタンパク質の移動はゲル中へのタンパク質のキャストによって遅らされることになる。

【0149】

ポリグルタミン酸(平均分子量約7,500、約7モノマーに相当)によるLBP-1/LDLまたはLBP-2/LDL結合の阻害は、一定量のLDL(148nM)をすべての矩形のレーンにキャストすることによって示された。一定量(1μL)の<sup>125</sup>I標識LBP-1またはLBP-2(0.003nM~0.016nM)を、漸加濃度のポリグルタミン酸(シグマ社より入手)(0~0.4nM)とともに、ゲルの上部のウェルに流し込んだ。ゲルを70ボル

トで2時間電気泳動し、乾燥させ、増感紙とともにX線フィルム上に-70 で一晩載置した後、現像してLBP-1およびLBP-2の遅延プロファイルを決した。ポリグルタミン酸の濃度が増大するに従って、LDLによる放射性標識されたLBP-1およびLBP-2の移動の遅延が濃度依存的に低下し、このことから、ポリグルタミン酸がLBP1、LBP-2とLDLとの間の結合を阻害することが示された。

#### 【0150】

BHF-1によるLBP-1/LDLまたはLBP-2/LDL結合の阻害は、一定量のLDL(148nM)をすべての矩形のレーンにキャストすることによって示された。一定量の<sup>125</sup>I標識LBP-1(0.003nM~0.016nM)を、実施例15に記載のようにした得た漸加濃度のBHF-1(0~10nM)とともに、ゲルの上部のウェルに流し込んだ。ゲルを70ボルトで2時間電気泳動し、乾燥させ、増感紙とともにX線フィルム上に-70で一晩載置した。その後、フィルムを現像してLBP-1の遅延プロファイルを決した。BHF-1の濃度が増大するに従って、LDLによる放射性標識されたLBP-1の移動の遅延が濃度依存的に低下し、このことから、BHF-1がLBP1とLDLとの間の結合を阻害することが示された。

#### 【0151】

実施例10：LDLに結合するLBPの断片、類似体および模倣体を同定するためのアフィニティ同時電気泳動(ACE)アッセイ

本実施例では、LDLに結合し、従って、LDL分子上の結合部位を占領し、これらの部位を動脈壁内のLBPへの結合に利用できなくすることにより、動脈壁内のLBPに結合するLDLの阻害剤として使用することのできる、LBPの断片、類似体または模倣体を同定するための方法について説明する。

#### 【0152】

LBPの断片は化学的開裂によって作成するか、あるいは周知のアミノ酸配列から合成する。これらの断片の試料(コールド)を個別に、実施例8に記載のようにして放射性標識されたLBPに添加し、様々な断片の潜在的阻害能力を評価する。阻害能があると同定された断片のより小さい部分へこの手順を繰り返し適

用することにより、当該断片の最小の活性ポリペプチド断片を同定する。同様の方法で、LBPの類似体を調べてLDLへの結合による阻害剤として作用する類似体を同定する。同様にして、LBPの模倣体(LBP分子上のLDL結合部位のコンホメーションおよび/または電荷分布を真似た分子)も同様の様式で調べ、LBP上のLDL結合部位に対する親和性を示す分子を同定する。

#### 【0153】

このようにして同定した阻害剤の親和性は、LBP上のLDL結合部位に対するLDL自身の親和性と少なくとも同等の強さである。これらの阻害剤は、少なくとも競争的に、さらにあるものは不可逆的かつ優先的に、LDL結合部位に結合することにより、該結合部位を体液性LDLへの結合に利用できなくする。

#### 【0154】

#### 実施例11：ELISAアッセイ

本実施例では、試験化合物の有する、特異的LBPに対するLDLの結合を阻止する能力を定量するための、ELISAプレートアッセイの利用について説明する。

#### 【0155】

一例において、ELISAアッセイは以下のようにして実施した。LDLを50mM  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ 、pH9.6/0.02%  $\text{NaN}_3$ に希釈し、96穴プレート(ImmunoWare 96穴Reacti-Bind EIAポリスチレンプレート、ピアス社(イリノイ州、ロックフォード))のウェルに加え、最終濃度を1ウェルあたり0.1~1 $\mu\text{g}$ の範囲とした。プレートを室温で6時間インキュベートした。インキュベーション時間の終了時に、ウェルをトリス緩衝生理食塩水(pH7.4(TBS))で3回洗浄し、TBS/0.02%  $\text{NaN}_3$ (シグマ社、ミズーリ州、セントルイス)に溶解した200 $\mu\text{L}$ の1%ウシ血清アルブミン(BSA)により室温で一晩ブロックした。次にウェルを、TBSに溶解した200 $\mu\text{L}$ のLBPタンパク質(5~10 $\mu\text{g}$ /ウェル)および様々な濃度の試験化合物とともにインキュベートした。プレートは室温で1時間インキュベートした。次にウェルをTBSで3回洗浄し、TBS/0.02%  $\text{NaN}_3$ に溶解した200 $\mu\text{L}$ の1%ウシ血清アルブミン(BSA)により室温で2時

間ブロックした。インキュベーション時間終了時に、ウェルをTBSで3回洗浄し、適当なモルモットの抗LBPタンパク質ポリクローナル抗体の1:1000希釈物(TBS/0.05%Tween20中)をウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした。その後、ウェルをTBS/0.05%Tween20で3回洗浄し、ヤギ抗モルモットIgGアルカリホスファターゼ複合体(シグマ社)の1:30,000希釈物を各ウェルに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートした。ウェルをTBS/0.05%Tween20で3回洗浄し、200mLのp-ニトロフェニルホスフェート基質(シグマ社、ミズーリ州、セントルイス)をウェルに添加することにより、比色測定反応を実施した。反応は室温で30分間進行させ、50 $\mu$ Lの3N NaOHによって停止した。ELISAプレートリーダーを用いて405nmにおける吸光度を決定した。組換えタンパク質に対するLDLの結合の阻止における試験化合物の有効性は、対照群と処理群の吸光度値を比較することによって評価した。

#### 【0156】

第2の例において、ELISAアッセイは以下のようにして実施した。LDLをトリス緩衝生理食塩水(pH7.4、TBS)中に希釈し、96穴プレート(ImmunoWare96穴Reacti-Bind EIAポリスチレンプレート、ピアス社(イリノイ州、ロックフォード))のウェルに加え、最終濃度を1ウェルあたり0.2 $\mu$ gとした。プレートを室温で1時間インキュベートした後、ウェルをTBSで3回洗浄し、TBSに溶解した1%ウシ血清アルブミン(TBS中BSA)により室温で1時間ブロックした。ウェルをTBSで2回洗浄した後、試験阻害剤化合物の濃度を変えるかもしくは変えずに、LBP-1またはLBP-2(0.025 $\mu$ g/ウェル)またはLBP-3(0.01 $\mu$ g/ウェル)を加えた。各条件につき4ウェルを当てた。プレートを室温で1時間インキュベートした後、TBS/0.02%Tween20(TBS/Tween)で3回洗浄した。モルモット抗LBPポリクローナル抗体の適切な希釈物(抗体に応じて1:750~1:1500)を各条件につき3つのウェルに加え、1時間インキュベートした。各条件の4つめのウェルには、ネガティブコントロールとして抗LBP抗体の代わりに緩衝液を加えた。1時間後、TBS/Tween

で再度3回洗浄し、ヤギ抗モルモットIgGアルカリホスファターゼ結合抗体（シグマ社）の1：10,000希釈物（TBS/Tween中）を各ウェルに加えた。プレートを室温で1時間インキュベートし、TBS/Tweenで3回洗浄した。アルカリホスファターゼ基質キット（バイオラッド社、カリフォルニア州、ヘラクレス）から以下のようにして新鮮な基質溶液を調製した。1mLの5倍濃縮ジエタノールアミン緩衝液と4mLの蒸留水とを混合した。リン酸p-ニトロフェニルの錠剤（5mg）1錠を加え、錠剤が完全に溶解するまでボルテックス攪拌した。基質溶液を即時にウェルに加えた。アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗モルモットIgGの漸加濃度の希釈物（TBS/Tween中1：100,000希釈物）、続いて基質を5つの空ウェルに加えてポジティブコントロールとした。基質を添加した後、プレートを迅速にELISAプレートリーダーにセットし、37℃で約75分間保持してから、405nmにおける吸光度を測定した。37℃のELISAリーダー内でのインキュベーションは、吸光度を最適化するために調節（60～90分）する場合もあった。試験阻害剤の有効性は、ネガティブコントロールの吸光度を差し引いた後、試験阻害剤とLBPを混合したウェルにおける吸光度と、阻害剤を含まずにLBPを含んだウェルにおける吸光度とを比較することにより決定した。

#### 【0157】

別法として、LDLではなくLBPを結合させた。LDLに結合する組換えLBPタンパク質およびLBP-LDL結合に対する種々の濃度の阻害剤の影響は、LDLに対する抗体を用いて決定した。この相互作用はレポータ酵素（たとえば、アルカリホスファターゼ）に結合された二次抗体を用いることで可視化した。

#### 【0158】

ELISAプレートアッセイを用いて、LDLに対するOBPタンパク質の結合に影響を与えることのできる薬剤をスクリーニングした。たとえば、LBP-1およびヒトLBP-3タンパク質配列に由来するペプチドを合成し（それぞれ、BHF-1およびBHF-2）、この様式でのLDLのLBP-1およびLBP-2への結合を低減することが示されている。これらの結果はACEアッセイ

によって得られた結果と一致していた。

【0159】

実施例12：LBP上のLDL結合部位をブロックするためのLBPに対するヒト化抗体の投与

本実施例では、動脈のLBP分子上のLDL結合部位をブロックするための、LBP-1、LBP-2またはLBP-3に対するヒト化抗体の患者への投与について説明する。マウスモノクローナル抗体を組換えDNA技術によってヒト化するか、あるいは当業者に公知の標準的な手法によって(バークオーバー(Berkower)I., Curr. Opin. Biotechnol. 第7巻、622~628頁(1996年);ラムハラヤン(Ramharayan)とスカレツキー(Skaletsky), Am. Biotechnol. Lab、第13巻:26~28頁(1995年))LBPおよび/またはLBP上のLDL結合部位に対して製造した。また、ゴディング(Goding)J.W., 「Monoclonal Antibodies (モノクローナル抗体) - 原理と実践(Principles and Practice), アカデミックプレス社、ニューヨーク州、ニューヨーク(1986年)」に記載されるように、対応するFab断片も製造した。これらの抗体をLBP分子上のLDL結合部位をブロックするのに十分な量、すなわち1日あたり1~10mg/kgを非経口的に投与した。これにより、LDLの酸化を容易にするために必要とされる動脈によるLDLの不可逆な取り込みが防止される。

【0160】

実施例13：LDLの調製

本実施例では、LDLの調製について説明する。LDLは、正常脂血(normal lipemic)ドナーの血漿から調製した(チャン(Chang)ら、Arterioscler. Thromb., 第12巻、1088~1098頁(1992年))。100mLの全血液を100mM EDTA二ナトリウムを含む試験管に入れた。血漿を低速遠心分離により赤血球から分離した(2,000g; 30分間; 4)。KBr溶液を用いて血漿の密度を1.025gm/mLに調整し、100,000×g、12で18~20時間遠心分離した。超低密

度リポタンパク質 (VLDL) を遠心管の上部からパスツールピペットを用いて除去した。下層の密度をKBr溶液を用いて1.050 g/mLまで高め、100,000 × g、12 で、22~24時間遠心分離した。延長パスツールピペットチップを用いて遠心管の上部からLDLを除去した。LDL調製物の純度は、ヒトLDL、ヒトHDL、ヒト免疫グロブリンおよびヒトアルブミンに対する抗体との、オクタロニー免疫二重拡散によって評価した。1 mM EDTAおよび10 μMブチル化ヒドロキシトルエン (BHT) を含む0.9%生理食塩水、pH 9.0に対して透析を行うことにより(1 L, × 2, 約16時間)、LDL溶液からKBrを除去した。BHTはLDLの酸化を防止するためのものである。透析に続き、LDLタンパク質をローリー法(Lowryら、J. Biol. Chem. 第193巻、265~275頁(1951年))によって測定し、LDLは使用時まで4 で保存した。LDL調製物の保存期間は4~6週間以内とした。

#### 【0161】

#### 実施例14：HDLの調製

本実施例ではHDLの調製について説明する。HDLは、正常脂血ドナーの血漿から調製した。100 mLの全血液を100 mM EDTA二ナトリウムを含む試験管に入れ、血漿を遠心分離により赤血球から回収した(2,000 g; 30分間; 4 )。次に、ヘパリンナトリウム(5,000ユニット/mL)およびMnCl<sub>2</sub>(1 M)を最終濃度がそれぞれ200ユニット/mLおよび0.46 Mとなるように順に添加することにより、血漿中に存在するアポリポタンパク質B含有リポタンパク質を沈殿させた(ワーニック(Warnick)とアルバース(Albers)、J. Lipid Res., 第19巻、65~76頁(1978年))。その後試料を遠心分離した(2000 g; 1時間; 4 )。上清を回収し、固体KBrをゆっくり加えることにより密度を1.21 g/mLに調整した。HDLは超遠心分離(100,000 g; > 46時間; 12 )により分離した。このHDL調製物の純度は、ヒトHDL、ヒトLDL、ヒト免疫グロブリンおよびヒトアルブミンに対する抗体を用いて、オクタロニー免疫二重拡散によって評価した。HDL試料を生理食塩水pH 9.0 / 1 mM EDTA /

10  $\mu$ M BHTに対して透析し(4 L, 24時間/4 )、全タンパク質をローリー法(Lowryら、J. Biol. Chem. 第193巻、265~275頁(1951年))によって測定した。LDLは使用時まで4 で保存した。LDL調製物の保存期間は2週間以内とした。

#### 【0162】

#### 実施例15：BHF-1の合成

本実施例では、アミノ酸残基14~33を含むヒトまたはウサギLBP-1の断片であるBHF-1の合成について説明する。BHF-1は、アプライドバイオシステムズモデル430Aペプチドシンセサイザーを用いて、標準的なT-BocNMP化学サイクルによって合成した。BHF-1の配列は以下の通りである。

#### 【0163】

val - asp - val - asp - glu - tyr - asp - glu - asn - lys - phe - val - asp - glu - glu - asp - gly - gly - asp - gly (配列番号9)。

#### 【0164】

合成後、このペプチドをフッ化水素酸/アニソール(10/1(v/v))により、-10 で30分間開裂させた後、0 で30分間インキュベートした。その後、BHF-1を沈殿させ、冷ジエチルエーテルで3回洗浄した。アミノ酸カップリングは、ニンヒドリン試験によってモニターした(>99%)。

#### 【0165】

このBHF-1ペプチドを、高速液体クロマトグラフィー(逆相Vydac C<sub>4</sub>カラム(2.24 x 25 cm)により、流速9 mL/分、直線勾配分離(60分間で2~98%B))を用いて均一になるまで精製した。緩衝液Aは0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)/ミリQ水からなるものとし、緩衝液Bは0.085%TFA/80%アセトニトリルからなるものとした。勾配法は室温で行い、210および277 nmにおける吸光度をモニターした。

#### 【0166】

高速原子衝撃質量分析により、プロトン化分子イオン(M+H)<sup>+</sup>がm/z =

2290.2においてピークに達することがわかり、この結果は計算値とよく一致していた。アミノ酸分析において、ペプチド内の各アミノ酸の相対存在比に対する実験値は理論値とよく一致していた。凍結乾燥したペプチドは-20℃で保存した。

#### 【0167】

実施例16：LDLとLBPとの間の結合を阻害する薬剤を見つけるためのインビトロスクリーニング

本実施例では、LDLとLBPとの間の結合を阻害する薬剤を見つけるためのインビトロスクリーニングについて説明する。

#### 【0168】

薬剤になりうる候補ポリペプチド、たとえばLBP-1、LBP-2、LBP-3、BHF-1または他の任意のポリペプチドを選ぶ。インビトロにおいてLDLのLBPへの結合を阻害するポリペプチドの最短の断片を決定する。ペプチドは本明細書に記載する標準的な技術によって合成する。阻害アッセイは、スクリーニングのための標準的ELISA技術、および本明細書中に記載するようにELISAの結果を確認するためのアフィニティ同時電気泳動(ACE)アッセイを用いて実施する。このスクリーニング方法において使用可能な別のアッセイとしては、たとえば、蛍光偏光やパルス限外ろ過エレクトロスプレー質量分析などが挙げられる。短いペプチド、例えば2量体から20量体までのペプチドを、その化学的特性によってLDL結合部位、たとえば酸性領域になりそうな候補ポリペプチドの配列に亘って合成する。ペプチドの長さを次第に短くしながら、インビトロにおける、および培養中の哺乳動物細胞に対しての、LDL結合を阻害する能力を調べる。たとえば、LBP遺伝子を発現するようにトランスフェクションされた哺乳動物細胞内で、そのペプチドがLDL結合の阻害に与える影響を試験する。阻害剤として同定された各ペプチドについて、LBP-1、LBP-2およびLBP-3のそれぞれを用いて試験し、単一の阻害剤がすべてのLBPに対して機能するかどうかを決定する。

#### 【0169】

最小の活性配列が決定されたところで、このペプチド主鎖を以下に検討するよ

うにタンパク質分解を阻害するように改変する。たとえば、カルボニルをスルホキシドに置換するか、ペプチド結合を反転させるか、カルボニル基をメチレン基に置換するか、あるいは他の同様の標準的な手法によって改変を行う。アミノ酸、ペプチドおよびタンパク質の化学と生化学 (Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins)、第7巻、267~357頁 (B. Weinstein (編)、Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク (1983年) に記載の、 spatola (Spatola), A. F., “ペプチド主鎖の改変 (Peptide Backbone Modifications): アミド結合代用物を含むペプチドの構造活性分析、コンホメーション上の制約、および関係した主鎖置換 (A Structure-Activity Analysis of Peptides Containing Amide Bond Surrogates, Conformational Constraints, and Related Backbone Replacements)” を参照のこと。これらの類似体が有する、インビトロにおけるLDLのLBPへの結合を阻害する能力は、たとえば、ELISA、ACE、蛍光偏光、および/またはパルス化限外ろ過エレクトロスプレー質量分析などによって、上述の天然のペプチドに対するものと同様の方法で試験する。

#### 【0170】

実施例17：培養哺乳動物細胞を用いたLDLとLBPとの間の結合を阻害する薬剤のインビトロスクリーニング

本実施例では、ACEアッセイやELISAなどのインビトロ試験によってLDLとLBPとの間の結合の阻害剤候補であることが示された薬剤の細胞ベースのインビトロスクリーニングについて説明する。

#### 【0171】

一般的に組換え遺伝子構築物の発現に用いられる、293細胞などの哺乳動物細胞を用いて、細胞表面上にLBPを発現する細胞系列を開発する。このことは、LBPオープンリーディングフレーム (ORFS) を哺乳動物の発現プラスミドベクターである、pDisplay (インビトロゲン社、カリフォルニア州

、カールスバッド)にサブクローニングすることによって実施する。上記pDisplayは、目的の遺伝子を細胞表面上で発現させるために設計されたものである。LBPを生産するために哺乳動物細胞を用いることにより、機能的に活性な天然のコンホメーションでLBPを発現させることができる。したがって、安定的にトランスフェクトされ、LBPを表面に発現している哺乳動物細胞系列は、個々にもしくは組み合わせて、細胞培養物中のLDL結合をブロックする阻害剤をアッセイおよびスクリーニングするのに特に適しているとともに、これらの化合物の細胞毒性を評価するのにも適している。

#### 【0172】

具体的には、LBPのORFをTaqポリメラーゼ(パーキンエルマー社)および適当なプライマーを用いて、cDNA鋳型からPCR(パーキンエルマー社、カリフォルニア州、フォスターシティ)により増幅する。増幅されたLBPのORFをアガロースゲル電気泳動法によって精製し、バイオラッドDNA精製キット(バイオラッド社、カリフォルニア州、ヘラクレス)を用いてゲル薄片から抽出する。精製されたDNAを制限酵素BglIIおよびSalI(ニューイングランドバイオラボ社、マサチューセッツ州、ビバリー)で切断して付着端を作成し、上述したアガロースゲル電気泳動法およびDNA抽出によって再度精製する。次に、得られたLBPのORFを、哺乳動物発現ベクター、pDisplay(インビトロゲン社)内のBglII/SalI部位にライゲーションによってサブクローニングする。組換えプラスミドは、大腸菌TOP10株(インビトロゲン社)またはDH5(ライフテクノロジーズ社、ニューヨーク州、グランドアイランド)の形質転換によって確立する。組換えpDisplay/LBPプラスミドDNAは、大腸菌一晚培養物からバイオラッド社プラスミドミニプレップキットを用いて単離し、BglII/SalIで切断し、アガロースゲル電気泳動法により分析する。うまく形質転換されたクローン中のLBPORFについては、自動ジデオキシDNA配列決定により確認する。ヒト腎臓293細胞へのトランスフェクションを行うために、1~2μgのDNAを6μLのリポフェクタミン試薬(ライフテクノロジーズ社)と混合し、ライフテクノロジーズ社のプロトコールに記載されるように細胞とともにインキュベートする。トランスフ

エクト細胞中でのLBP発現は、トランスフェクション48時間後に得られた細胞抽出物のウェスタンブロット分析によって確認する。安定してトランスフェクトされた293細胞を選ぶために、抗生物質G418（ライフテクノロジー社）を800 $\mu$ g/mLの濃度で増殖培地に加える。G418耐性を有するコロニーが組換えLBPを発現しているかどうかを、ウェスタンブロットによって調べ、LBPを発現している組換えクローンを拡大してLDL結合について検定するとともに、試験化合物のLDL結合を阻害する能力を調べるために用いる。

#### 【0173】

実施例18：LDLとLBPとの間の結合を阻害する薬剤のインビボスクリーニング

本実施例では、LDLとLBPとの間の結合の有望な阻害剤候補であることがインビトロ試験によって示された薬剤のインビボスクリーニングについて説明する。

#### 【0174】

まず最初に、治癒中のバルーンカテーテルにより内皮剥奪されたウサギ大動脈の動脈病変モデルにおいて、インビボ阻害活性を試験する（ロバーツ（Roberts）ら、*J. Lipid Res.*、第24巻、1160～1167頁（1983年）；チャン（Chang）ら、*Arterioscler. Thromb.*、第12巻、1088～1098頁（1992年））。上記モデルは、ヒトのアテローム性動脈硬化症病変に対する優れた類似物であることが示されている。ヒトのアテローム性動脈硬化症に対する他の有用な動物モデルとしては、アポEノックアウトマウスおよびLDL受容体ノックアウトマウスが挙げられる。これらのマウスモデルのいずれも、高濃度の血漿コレステロールおよび自然発生アテローム性動脈硬化様の病変の発症を特徴としている。

#### 【0175】

阻害剤候補のそれぞれは、5匹～10匹のバルーン処理したウサギを用いて試験するが、同数のウサギに対照ペプチドまたはプラシーボを与える。内皮再生（治癒）が部分的に完了した時期である、大動脈内皮剥奪の4週間後に、ペプチドおよび類似体の毎日の非経口（静脈内または皮下投与）または胃内投与を、体重

1 kgあたり10 mgの初期濃度で開始する。この初期濃度は結果に応じて最大100 mg/kgまでで増減させる。30分後、短期研究において阻害剤候補が治療中の動脈病変におけるLDL捕捉を阻害する能力を有するどうかを試験するために、 $^{125}\text{I}$  (または $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) 標識LDLのボラスを静脈注射する。

$^{125}\text{I}$ -LDLを用いる場合、前述のように(ロバーツ(Roberts)ら、J. Lipid Res., 第24巻、1160~1167頁(1983年); チャン(Chang)ら、Arterioscler. Thomb., 第12巻、1088~1098頁(1992年))、8~24時間後に動物を屠殺し、大動脈を摘出、洗浄し、摘出大動脈を定量的オートラジオグラフィーに供する。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -LDLを用いる場合は、前述のように(リース(Lees)とリース(Lees)、アテローム症候群(Syndromes of Atherosclerosis), Fuster編、Futura Publishing Co., ニューヨーク州、アーモンク、385~401頁(1996年))、2~24時間目に生存している麻酔した動物の外部カメラ撮影を行い、続いて屠殺、摘出、摘出した大動脈の撮影を行うことによって分析する。試験終了直前に、動物に対してCBC、肝酵素および尿検査を含む標準的な毒性試験を行う。

#### 【0176】

最も効果的かつ毒性の少ない化合物を、2%コレステロール食餌を摂ったウサギの短期研究において試験する(シュヴェンケ(Schwenke)とカリュー(Carew)、Arteriosclerosis、第9巻、895~907頁(1989年))。それぞれの阻害剤候補は、5~10匹のウサギにおいて試験し、同数のウサギに対照ペプチドまたはプラシーボを与える。動物には阻害剤候補またはプラシーボを1日に1回以上与え、これを2週間以内の期間実施する。毎日の投与の頻度は投与経路によって決定する。活性な薬物またはプラシーボを非経口投与する場合には、これらを一日あたり1~3回の頻度で投与し、2%コレステロール食餌を続ける。薬物またはプラシーボを経口投与する場合には、これらを2%コレステロール食餌に混合する。シュヴェンケ(Schwenke)とカリュー(Carew)(Arteriosclerosis、第9巻、895~907頁(1989年))は、ウサギ大動脈の病変を起こしやすい領域に

におけるLDL濃度は、2%コレステロール食餌を16日間与えたウサギにおいて、通常の22倍以上に増加しており、増加したLDL含量は初期アテローム性動脈硬化症の組織学的証拠よりも優位であることを示している。したがって、阻害剤候補の効果の分析は、コレステロール給餌の開始から2週間後に、<sup>125</sup>I-LDLを注射し、これを8~24時間の間循環させて、試験群および対照群の両方の動物の摘出大動脈に対して定量的オートラジオグラフィーを実施することにより試験する。大動脈のコレステロール含量の定量は適時実施する(シュヴェンケ(Schwenke)とカリュー(Carew)(Arteriosclerosis、第9巻、895~907頁(1989年);シュヴェンケ(Schwenke)とカリュー(Carew)(Arteriosclerosis、第9巻、908~918頁(1989年))。

#### 【0177】

上記の手法は、最も有望な阻害剤候補を同定するとともに、それらの投与の最良の経路および頻度を同定するものである。このようにして同定された阻害剤を、次にコレステロール給餌ウサギの長期研究において試験する。この長期コレステロール給餌研究は、コレステロール給餌の開始後、より長い間隔で<sup>125</sup>I-LDLを注射することにより阻害剤の有効性を調べ、病変が起こりやすい大動脈の部位をアテローム性動脈硬化症の証拠を見いだすために組織学的に調べたことを除いては、短期コレステロール給餌研究と同様の方法で実施する。試験時間は2、4および6ヶ月目である。主要な動脈を肉眼で組織学的に観察して、アテローム性動脈硬化症の証拠と程度を調べる。必要であれば、他の許容される動物モデル、たとえばアテローム性症候群に罹りやすい霊長類など(ウィリアムス(Williams)ら、Arterioscler.Thromb.Vast.Bio1、第15巻、827~836頁(1995))、遺伝子組み換えマウス、および/またはワタナベウサギを短期および長期コレステロール給餌によって試験する。

#### 【0178】

実施例19：LBPタンパク質に対する能動免疫の誘導による、バルーンにより内皮剥奪されたウサギ大動脈における放射性標識LDLの蓄積のインビボ阻害

本実施例では、LBPタンパク質に対する免疫の誘導が、バルーンにより内皮剥奪されたウサギの大動脈のアテローム性動脈硬化症のモデルにおける放射性標識LDLの蓄積に与える効果について説明する。

【0179】

雄ニュージーランド白ウサギ(ハゼルトンリサーチプロダクツ社、ペンシルベニア州、デンバー)において、以下に示すようにして免疫を誘導した。精製したヒト組換えLBP-2またはBHF-1ペプチド(1mL; 1mg)とRIBIアジュバント(RIBIイムノケムリサーチ社、モンタナ州、ハミルトン)との混合物をウサギの背側の胸部および腹部領域に沿って2~5カ所に皮下注射した。1日目(免疫前採血)、35日目、63日目、および91日目に静脈穿刺により採血を行った。ブースタ注射は28日目(500µg; 皮下)、56日目(250µg; 皮下)および84日目(125µg; 皮下)に行った。

【0180】

ウサギの力価は、ELISAプレート形式を用いて系列希釈により評価した。免疫化前血清を同時に評価した。LBPタンパク質またはペプチドの3回目のブースタ後に、3回目のLBPタンパク質のブースタ後、組換えタンパク質に対する力価は、最高レベルに達し、ドットプロット検定において156pgの検出可能な比色応答を示した。力価は、30分以内に対照より0.5高い吸光度の読みを生じる抗体の最大希釈として定義される。ポリクローナル抗体の特異性は、実施例6に記載のようにしてウエスタンブロット分析を用いて示した。

【0181】

93日目に、免疫化したウサギおよび対照のウサギの腹大動脈を、Fogarty 4番塞栓摘出用カテーテル(チャン(chang)ら、Arteriosclerosis and Thrombosis 第12巻、1088~1098頁(1992年))を用いて内皮剥奪した。バルーン処理の4週間後に、ウサギに<sup>125</sup>I標識したLDLをボラス注射した(1mL; 静注)。血液試料を注射後、1時間間隔で8時間にわたり、また24時間目採取した。血液試料を2000rpm(40)で30分間で遠心分離し、血清中に存在する全活性を、ガンマカウンタを用いて測定した。全TCA沈降性のカウントを、TCAをこの

血清に10%の終濃度まで加え、その後4 で10分間インキュベートすることにより測定した。次いで、血清試料を遠心分離し(2000rpm; 30分間; 40 )、上清に存在する全活性を測定した。TCA沈降性カウントを減算、すなわち、全可溶性カウントからTCA沈殿後の上清中に存在するカウントを引くことにより、計算した。抗体力価の測定のための血液試料は、放射性標識したLDLを注射する前に採取した。

#### 【0182】

24時間後に、これらのウサギに、5%エバンスブルー染料を静脈注射して15分間循環させた。内皮の被覆が存在しない大動脈の領域は、青く染まるが、内皮による被覆が残っている領域は染まらない。インキュベーション期間の終了時に、これらのウサギを麻酔して腹部および胸部の大動脈を切開してすすぎ、10%TCA中に一晩室温で固定した。これらの大動脈を、次いで、生理的食塩水で徹底的にすすぎ、秤量し、計数し、吸い取り乾燥させ、内皮剥奪されたウサギの腹大動脈中の放射性標識したLDL蓄積のパターンを可視化するためにX線フィルム上に置いた。

#### 【0183】

組換えヒトLBP-2またはBHF-1ペプチドに対するウサギを免疫化は、バルーンにより内皮剥奪された腹大動脈中の放射性標識したLDL蓄積のパターンを変化させた。投薬量および内皮再生パーセントを補正すると、免疫化したバルーン処理したウサギにおける放射性標識LDLの蓄積は、免疫化していないバルーン処理したウサギの場合よりも低かった。これらの結果は、LBPに対する能動免疫が傷害された動脈壁内のLDLの蓄積を変え得る有効な手段を提供することを示している。

#### 【0184】

実施例20：LDLとLBPとの間の結合を阻止するヒトにおける薬剤のスクリーニング

ヒトの研究を、新たな薬物の安全性(フェーズI)、効力(フェーズII)および他の治療剤と比較しての効力(フェーズIII)の試験に関する標準的FDAプロトコールに従って行う。インフォームドコンセントを行った後に研究に登

録された被験者の年齢は、18～70歳である。妊娠中もしくは妊娠可能性のある女性または初期アテローム性動脈硬化症以外の病気例えば癌、肝臓病もしくは糖尿病を有する被験者は、除外する。FDAのフェーズIIおよびフェーズIII試験における研究のために選択する被験者は、標準的技術例えば超音波および/または血管造影法により以前に記録されたアテローム性動脈硬化症を有するか、または少なくとも一人の記録されたアテローム性動脈硬化症を有する一親等の親類を有することによりアテローム性動脈硬化症の高度の危険にあることが知られている被験者である。被験者自身は、正常または異常な血漿脂質を有する。最初の試験には、活性薬物について20～50人の被験者が、プラシーボについて20～50人の被験者（同じ年齢、性別およびアテローム性動脈硬化症の状態を有する）が含まれる。被験者数を、予め、統計的有意性に必要な数により決定する。阻害剤の効力についての終点には、高い危険にある被験者並びに既知の頸動脈または冠状動脈疾患を有する被験者の頸動脈の厚みの超音波測定；アテローム性動脈硬化事象；アテローム性動脈硬化症による死亡；およびすべての被験者におけるすべての原因による死亡が含まれる。スタッドラー（Stadler）（Med. and Biol. 第22巻、25～34頁（1996年））による非侵襲的分析（超音波による頸動脈の厚みの測定）を、6～12ヶ月の間隔で3年間にわたって行う。アテローム性動脈硬化事象および死亡並びにすべての原因による死亡を、3年目に表にする。

#### 【0185】

FDAフェーズI試験における薬物の経口投与量は、0.01～10g/日にわたり、動物研究の結果により決定する（kgベースにて推定する）。フェーズIの研究から得られたデータに基づいて、投与量の範囲および回数をフェーズIIおよびIIIの試験において狭める。もし薬物の非経口投与が、動物研究により、唯一の有効な方法であると決定されたならば、ヒト被験者における非経口投与を注射により並びに経皮的経路および鼻吸入経路により試験する。非経口薬物の試験は、経口投与についてのもと同じアウトラインに従う。

こうして、ヒトについての最適な治療スケジュールおよび投薬量を確立する。

#### 【0186】

#### 実施例21：アテローム性動脈硬化症を有する個人のBHF-1による治療

この実施例は、アテローム性動脈硬化症を有する個人を、その個人における動脈に結合したLDLのレベルを低下させるようにLBP断片例えばBHF-1を用いて治療する方法を説明する。BHF-1をここに記載したようにして得る。そのBHF-1を動物に体重1kg当たり0.5~10mgの濃度でポラスまたは注射にて静脈投与する。かかる投与を、現在、コレステロール低下剤を用いて行われているようにして、アテローム性動脈硬化症の徴候の発生または進行を防止するために無期限に繰り返す。安定な被験者を、年に2回調べて任意のアテローム性動脈硬化症疾患の程度を物理的検査および非侵襲的試験、例えば頸動脈の厚み、主要な動脈の超音波および/またはガンマカメラ撮影により評価して、アテローム性動脈硬化症病変が存在するかどうかわび以前に存在した場合には緩解または進行しているかどうかを決定する。

#### 【0187】

#### 実施例22：LBPでの免疫化によるアポEノックアウトマウスにおけるアテローム性動脈硬化症のインビボでの減少

LBP-1、LBP-2およびLBP-3のそれぞれを用いて別個の免疫化実験を実施した。免疫はアポEノックアウトマウスにLBPタンパク質(LBP-1、LBP-2またはLBP-3)をRIBIアジュバント(RIBIイムノケムリサーチ社、モンタナ州、ハミルトン)とともに注射することにより誘導した。アポEノックアウトマウス(ジャクソンラボラトリーズ社、メイン州、バーハーバー)は高脂血症であり、したがって、ヒトのアテローム性動脈硬化症のモデルとなる。アポEノックアウトマウスは高い血漿コレステロール濃度を有し、自然発生アテローム性動脈硬化様病変を発症している。

#### 【0188】

4週齢のアポEノックアウトマウス(ジャクソンラボラトリーズ社、メイン州、バーハーバー)に耳標を付け、異なるケージに無作為に割り当て、体重を測定した。体重は1週間毎に測定した。動物は1週間の間慣らした。通常の齧歯類用固体飼料を自由に与え、動物を12時間：12時間の明暗サイクル下に維持した。以下の4群のマウスを、組換えLBPタンパク質(40μgの組換えタンパク

質/マウス1匹)+R I B Iアジュバント、またはR I B Iアジュバントのみ(対照群)で処理した。

【0189】

L B P - 1 : ウサギ組換えL B P - 1で免疫化(6-H i s タグ)。

L B P - 2 : ウサギ組換えL B P - 2クローン26で免疫化(6-H i s タグ)

。

L B P - 3 : ウサギ組換えL B P - 3で免疫化(6-H i s タグ)。

対照 : アジュバントを受ける

血液試料(免疫前血清)を第1回目の組換えタンパク質およびR I B Iアジュバントの注射前に回収した(製造者のマニュアルに従う)。21日後、マウスにブースタ注射(初期量の半量)を行い、その7日後に採血した。力価は、対照血清の吸光度の変化の2倍の吸光度変化を生じた血清の最大希釈として定義する(60分; 37)。1ウェルあたりの組換えタンパク質の量は100ngとした

。

【0190】

ブースタ注射は平均力価値が1:1000に達するまで21日間隔で行った。この際、マウスの食餌をウェスタンタイプに切り替えて(ハーランドテクラッド社、ウィスコンシン州、マジソン)、自由に飼料を与えた。血液試料はこの時点(後眼窩静脈叢採血法)およびその後1ヶ月毎に採取した。

【0191】

E L I S A形式を用いて、市販の全コレステロールおよびトリグリセリド検定キット(シグマ社、ミズーリ州、セントルイス)により、血液試料の全コレステロール、H D Lコレステロールおよびトリグリセリド濃度を分析した。H D L濃度は、ヘパリン/M n C l<sub>2</sub>を用いてリポタンパク質を含むアポBを沈殿させた後に決定した。

【0192】

アポEノックアウトマウスを26週齢目に屠殺した。マウスをメトキシフルオランで麻酔し、心臓穿刺により全血を採取した。正中開胸術を行い、カニューレを右心室に挿入し、右心房への切れ目から無制限に灌流を行った。マウスは生理

食塩水で灌流した後、束収縮が停止するまで10%リン酸緩衝ホルマリンで灌流した。この時点で、大動脈を露出させ、インサイチュで外膜性の脂質を除去した。大動脈を心臓から腸骨分岐部まで除去し、10%リン酸緩衝ホルマリン中に一晩放置した。

#### 【0193】

大動脈を以下のようにして染色した。70%エタノールリンスを軽く行った後、35%エタノール/50%アセトン中0.5%(重量/体積) Sudan IV の濾過溶液中に、室温で10分間連続的振盪下で浸漬した。結合しなかった染料は、バックグラウンドの色が透明になるまで、大動脈を振盪下、80%エタノール溶液中でインキュベートすることにより除去した。血管を蒸留水中でリンスし、生理的食塩水の中に入れ、大動脈弓から腸骨分岐まで長手方向に切開した。血管のピンを外し、写真撮影を行った。写真をAstra1200Sスキャナ(UMAXテクノロジー社、カリフォルニア州、フリーモント)および市販のグラフィックプログラム(Canvas; デネバソフトウェア社、フロリダ州、マイアミ)を用いてデジタル化した。全体および病変の面積をMATLAB(ザ・マソワークス社、マサチューセッツ州、ナティック)のシグナル処理ツールボックスを用いて決定した。含有百分率は、病変面積を全面積で除することによって求めた。

#### 【0194】

第2の分析は、コレステロールを単位重量の動脈として求める、コレステロール抽出法によって大動脈のアテローム性動脈硬化を測定することによって行った。この方法は、病変の大きさ測定において、多くの断面の厚みを測定しようとするよりも正確であるかもしれない。具体的には、動脈の重量を測定した後、コレステロールを抽出した。その後、大動脈のコレステロール含量を気液クロマトグラフィーによって測定した。このようにして単位重量の動脈あたりのコレステロール量を決定した。

#### 【0195】

第1回目のブースタ注射後、LBP-1に対して免疫化した何匹かのアポEノックアウトマウスは比較的高い抗LBP-1力価( $\leq 1:5000$ )を有してい

たが、同じ群の他のものは中程度のレベル ( $> 1 : 500 \sim < 1 : 1000$ ) を示した。アポE ノックアウトマウスにおける LBP - 2 / 26 の力価は、この時点では低かった ( $< 1 : 500$ )。アポE ノックアウトマウスにおける LBP - 3 の力価は、中程度 ( $\geq 1 : 500 \sim < 1 : 1000$ ) から低い ( $< 1 : 500$ ) 範囲にあった。

#### 【0196】

第2回目のブースタ注射後、LBP - 1 に対して免疫化したアポE ノックアウトマウスは中程度から高い力価 ( $> 1 : 1000 \sim \leq 1 : 8000$ ) を有していた。LBP - 2 / 26 に対して免疫化したアポE ノックアウトマウスは、中程度の力価レベル ( $> 1 : 2000$ ) を有していた。アポE ノックアウトマウスにおける LBP - 3 力価は、中程度から高いレベル ( $> 1 : 1000 \sim > 1 : 8000$ ) にあった。

#### 【0197】

第3回目のブースタ注射後、LBP - 1 に対して免疫化したマウスの大半は比較的高い力価 ( $> 1 : 10,000$ ) を有していたが、残りは中程度から高い力価 ( $> 1000 \sim < 1 : 10,000$ ) を有していた。何匹かのアポE ノックアウトマウスは、中程度 ( $< 1 : 5000$ ) から低い ( $< 1 : 1000$ ) 力価を有していた。LBP - 3 の力価は高いもの ( $> 1 : 5000 \sim \leq 1 : 10,000$ ) から中程度 ( $> 1 : 1000 \sim < 1 : 5000$ ) に及んだ。

#### 【0198】

データはT試験およびWilcoxonを用いて解析した。LBP - 1、LBP - 2 / 26 またはLBP - 3 に対する免疫化は、アポE ノックアウトマウスの体重に対して有意な影響 ( $P > 0.05$ ) を与えなかった。試料の大きさが小さかったことやアポE ノックアウトマウスにおける大きな変動のために、LBP - 1、LBP - 2 / 26 またはLBP - 3 に対する免疫化が、全コレステロール、HDLコレステロールまたはトリグリセリドの濃度に影響を与えるかどうかを決定することはできなかったが、そうであるようには見えなかった。

#### 【0199】

LBP - 1 またはLBP - 3 に対する免疫化は、アポE ノックアウトマウスま

たはLDL受容体陰性ノックアウトマウスの病変に有意な影響 ( $P > 0.05$ ) を与えなかった。しかしながら、アポEノックアウトマウスをLBP-2に対して免疫化した場合、病変部位に有意な影響が見られ(表2)、外れ値を除外してみると、動脈壁コレステロール濃度に対する有意な影響が見られる(表3)。LBP-2免疫化アポEノックアウトマウスは、対照である非免疫化マウスと比較して、大動脈のアテローム性動脈硬化が有意に減少していた。いかなる特定の理論にも束縛されるわけではないが、LBP-2タンパク質に対して生産された循環抗体は、動脈壁に対するLDLの結合をブロックすると考えられる。

【0200】

【表2】

表2-LBP-免疫化アポEマウスにおける病変部位

アポEマウス	病変面積 範囲%	治療面積 変化	P値 Wilcoxon
対照	9.40		
LBP-1	6.05	-0.36%	0.07
LBP-2	6.01	-0.36%	0.01
LBP-3	7.14	-0.24%	0.36

【表3】

表3-LBP免疫化アポEマウスにおける動脈コレステロール含量

	動脈壁 コレステロール (ugコレステロール /mg動脈)	治療面積 コレステロール 変化	P値 Wilcoxon
対照	6.33		
LBP-1	3.82	-0.40%	0.14
LBP-2	3.28	-0.48%	0.07
LBP-2 (アウトライアー 削除)	1.83	-0.71%	0.01
LBP-3	4.48	-0.29%	0.20

実施例23: BHF-1で免疫化したLDL受容体ノックアウトマウスにおけるアテローム性動脈硬化のインビボでの減少

## 【0201】

BHF-1ペプチドを用いて免疫化実験を実施した。LDL受容体(LDLR)ノックアウトマウス(B6、129S-Ldlr<sup>tm1Her</sup>、ジャクソンラボラトリーズ社、ミズーリ州、バーハーバー)にBHF-1ペプチドを(BHF-1ペプチドの合成については実施例15を参照)RIBIアジュバント(RIBIイムノケムリサーチ社、モンタナ州、ハミルトン)とともに注射した。LDLRノックアウトマウスは、高脂血症であり、したがって、ヒトのアテローム性動脈硬化症のモデルとなる。LDLRノックアウトマウスは高い血漿コレステロール濃度を有し、自然発生アテローム性動脈硬化様病変を発症している。

## 【0202】

4週齢のLDLRノックアウトマウスに耳標を付け、異なるケージに無作為に割り当て、体重を測定した。体重は1週間毎に測定した。動物は実験に先だって1週間慣らした。通常の齧歯類用固体飼料を自由に与え、動物を12時間：12時間の明暗サイクル下に維持した。マウスは以下のように実験群と対照群に分けた。(1)実験群、16匹のマウスをBHF-1.20.Lペプチドで免疫化した。(2)対照群、8匹のマウスをウシ血清アルブミンで免疫化した。

## 【0203】

実験群のマウスには、ペプチドおよびアジュバントの初回注射に先だって、5週齢から7週齢までの2週間の間、BHF-1.20.Lペプチドを毎日皮下注射(9.99 µg/g体重; 200 µL最終体積)した。BHF-1.20.LペプチドおよびRIBIアジュバント(50 µgのペプチド/マウス一匹)の初回注射に先だって、7週齢目に血液試料(免疫前血清)を(製造者のマニュアルに記載されるようにして)採取した。21日後、マウスにブースタ注射(初回投与量の半量)を行い、その7日後に採血を行った。力価は、対照血清の吸光度の変化の2倍の吸光度変化を生じた血清の最大希釈として定義する(60分; 37)。1ウェルあたりのペプチド量は100 ngとした。ブースタ注射は21日間隔で行った。

## 【0204】

E L I S A形式を用いて、市販の全コレステロールおよびトリグリセリド検定

キット（シグマ社、ミズーリ州、セントルイス）により、血液試料の全コレステロール、HDLコレステロールおよびトリグリセリド濃度を分析した。HDL濃度は、ヘパリン/MnCl<sub>2</sub>を用いてリポタンパク質を含むアポBを沈殿させた後に決定した。

#### 【0205】

通常の齧歯類固体飼料を与えた場合、LDLRノックアウトマウスにおける全血清コレステロール濃度は、比較的低く保たれていた。一方、高脂肪食を与えた場合、上記マウスにおける全血清コレステロール濃度は増加した。したがって、マウスは16週齢目に改変「ウェスタンタイプ」食餌（0.1%コレステロール含量）（ハーランドテクラッド社、ウィスコンシン州、マジソン）に切り換え、自由に給餌した。この食餌は全血清コレステロール濃度を600~800mg/dlの範囲まで高めることにより、病変の形成速度を増加させると予想された。血液試料は18週齢目（後眼窩静脈叢採血法）およびその後1ヶ月毎に採取した。

#### 【0206】

30週齢目に、実施例22に記載したようにマウスを屠殺し、大動脈を除去した。大動脈のアテローム性動脈硬化は、コレステロールを動脈の単位重量として求める実施例22に記載のコレステロール抽出法によって測定した。

#### 【0207】

BHF-1.20.Lに対する免疫化は、LDLRノックアウトマウスの体重に何の影響も与えなかった。12週間にわたって改変「ウェスタンタイプ」食餌を摂取することにより、実験群および対処群のいずれにおいても全血清コレステロール、HDLコレステロールおよびトリグリセリドが有意に（ $P < .05$ ）増加した。全血清コレステロール、HDL血清コレステロールおよび血清トリグリセリド濃度のレベルは、実験群と対照群の間で有意な違い（ $P > .05$ ）は見られなかった。

#### 【0208】

BHF-1ペプチドで免疫化したマウスは、対照である非免疫化マウスよりも24%も低い大動脈コレステロール含量（ $P > 0.037$ ）しか有していなかつ

た。いかなる特定の理論にも束縛されるわけではないが、免疫化によってBHF-1ペプチドに対する循環抗体が生産されたと考えられる。これらの抗体は、動脈壁へのLDL結合をブロックすることによって大動脈のコレステロール含量を低減すると考えられる。

#### 【0209】

当業者は、本明細書に記載した発明の特定の実施形態の多くの同等物を日常の実験を用いて確認することができるであろう。それらのおよび他のすべての同等物は、請求の範囲に包含されるものとする。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】ウサギLBP-1のアミノ酸配列（配列番号1）を示す図。ウサギとヒトのLBP-1間で異なるアミノ酸は太字で示されている。

【図2A】ウサギLBP-2のヌクレオチド配列（配列番号48）およびアミノ酸配列（配列番号47）を示す図。

【図2B】ウサギLBP-2のアミノ酸配列の一部（配列番号2）を示す図。ウサギとヒトのLBP-2間で異なるアミノ酸は太字で示されている。図2Aおよび図2Bに示されている配列が異なる所では、図2AがウサギLBP-2配列を表す。

【図3】ウサギLBP-2のアミノ酸319～350個のアミノ酸配列（配列番号3）を示す図。

【図4】ウサギLBP-2のアミノ酸299～350個のアミノ酸配列（配列番号4）を示す図。

【図5】ウサギLBP-3のアミノ酸配列（配列番号5）を示す図。ウサギとヒトのLBP-3間で異なるアミノ酸は太字で示されている。

【図6】ヒトLBP-1のアミノ酸配列（配列番号6）を示す図。ウサギとヒトのLBP-1間で異なるアミノ酸は太字で示されている。

【図7A】ヒトLBP-2のヌクレオチド配列（配列番号45）およびアミノ酸配列（配列番号43）を示す図。

【図7B】ヒトLBP-2のアミノ酸322～538のアミノ酸配列（配列番号7）を示す図。ウサギとヒトのLBP-2間で異なるアミノ酸は太字で示さ

れている。

【図8A】ヒトLBP-3のヌクレオチド配列(配列番号46)およびアミノ酸配列(配列番号44)を示す図。

【図8B】ヒトLBP-3のアミノ酸17~546のアミノ酸配列(配列番号8)を示す図。ウサギとヒトのLBP-3間で異なるアミノ酸は太字で示されている。図8Aと図8Bに示されている配列が異なる所では、図8AがヒトLBP-3配列を表す。

【図9】ヒトまたはウサギのLBP-1のアミノ酸14~33、いわゆるBFH-1のアミノ酸配列(配列番号9)を示す図。

【図10】ウサギLBP-1をコードするcDNA配列(配列番号10)と、対応アミノ酸配列を示す図。ウサギとヒトのLBP-1間で異なるアミノ酸は太字で示されている。

【図11】ウサギLBP-2の一部をコードするcDNA配列(配列番号11)と、対応アミノ酸配列を示す図。ウサギとヒトのLBP-2間で異なるアミノ酸は太字で示されている。図2Aと図11に示されている配列が異なるところでは、図2AがウサギLBP-2の配列を表す。

【図12】ウサギLBP-2の配列番号11のヌクレオチド256~1617のcDNA配列(配列番号12)と、対応アミノ酸配列を示す図。

【図13】ウサギLBP-2の配列番号11のヌクレオチド196~1617のcDNA配列(配列番号13)と、対応アミノ酸配列を示す図。

【図14】ウサギLBP-3をコードするcDNA配列(配列番号14)と、対応アミノ酸配列を示す図。ウサギとヒトのLBP-3アミノ酸の違いは太字で示されている。

【図15】ヒトLBP-1をコードするcDNA配列(配列番号15)と、対応アミノ酸配列を示す図。ウサギとヒトのLBP-1間で異なるアミノ酸は太字で示されている。

【図16】ヒトLBP-2の一部をコードするcDNA配列(配列番号16)と、対応アミノ酸配列を示す図。ウサギとヒトのLBP-2間で異なるアミノ酸は太字で示されている。

【図17】ヒトLBP-3の一部をコードするcDNA配列(配列番号17)と、対応アミノ酸配列を示す図。ウサギとヒトのLBP-3間で異なるアミノ酸は太字で示されている。図8Aと図17に示されている配列が異なるところで、図8AがヒトLBP-3配列を表す。

【図18】BHF-1をコードするcDNA配列(配列番号18)を示す図。

【図19】ウサギLBP-1のアミノ酸配列(上の配列、Rabbit)と整列させたヒトLBP-1のアミノ酸配列(下の配列、Human)に相当する図。

【図20】ウサギLBP-2のアミノ酸配列の一部(上の配列、Rabbit)と整列させたヒトLBP-2のアミノ酸配列の一部のアミノ酸配列(下の配列、Human)に相当する図。

【図21】ウサギLBP-3のアミノ酸配列(上の配列、Rabbit)と整列させたヒトLBP-3の一部のアミノ酸配列(下の配列、Human)に相当する図。

【図22】ヒトLBP-1のゲノム配列を示す図。

【図23】ヒトLBP-2のゲノム配列を示す図。1枚目の図中の英文は、ヒトcAMP依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット アクセション番号X07767に対応(1561で始まるラインまでの矢印を辿る)にする。

【図24】ヒトLBP-3のゲノム配列を示す図。

【図1】

met ser lys asn thr  
val ser ser ala arg phe arg lys val asp val asp  
glu tyr asp glu asn lys phe val asp glu glu asp  
gly gly asp gly gln ala gly pro asp glu gly glu  
val asp ser cys leu arg gln gly asn met thr ala  
ala leu gln ala ala leu lys asn pro pro ile asn  
thr arg ser gln ala val lys asp arg ala gly ser  
ile val leu lys val leu ile ser phe lys ala gly  
asp ile glu lys ala val gln ser leu asp arg asn  
gly val asp leu leu met lys tyr ile tyr lys gly  
phe glu ser pro ser asp asn ser ser ala val leu  
leu gln trp his glu lys ala leu ala ala gly gly  
val gly ser ile val arg val leu thr ala arg lys  
thr val

FIG. 1

【図2A-1】

```

ggctgtgtg tgcgtgcgtg cagtgagtg agtgtgtgca ttttttttt tcttttttt 60
ttctctctct ttttttttt ttgcaaaga aacagcagcg ccgcccgcgc tccgccgagg 120
cgctgcgccc cccggggggg ggaggcggag gaggcgggca gcggcgggag gaggggagcc 180
ggggaggggg gcgccgcctt gggaggggag cagcgcgcac ggtgcagccc gcccgggcgg 240
gaggg atg gcg ggg ccc ccg gcc cta ccc ccg ccg gag acg gcg gcg gcc 290
Met Ala Gly Pro Pro Ala Leu Pro Pro Pro Glu Thr Ala Ala Ala
1 5 10 15

gcc acc acg gcc gcg gcc gcc gcc tcg tcg tcc gcc gct tcc ccg cac 338
Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ser Ala Ala Ser Pro His
20 25 30

tac caa gag tgg att ctg gac acc atc gac tcg ctg cgc tcg cgc aag 386
Tyr Gln Glu Trp Ile Leu Asp Thr Ile Asp Ser Leu Arg Ser Arg Lys
35 40 45

gcg cgg ccg gac ctg gag cgc atc tgc cgg atg gtg cgg cgg cgg cac 434
Ala Arg Pro Asp Leu Glu Arg Ile Cys Arg Met Val Arg Arg Arg His
50 55 60

ggc ccg gag ccg gag cgc acg cgc gcc gag ctc gag aaa ctg atc cag 482
Gly Pro Glu Pro Glu Arg Thr Arg Ala Glu Leu Glu Lys Leu Ile Gln
65 70 75

cag cgc gcc gtg ctc cgg gtc agc tac aag ggg agc atc tcg tac cgc 530
Gln Arg Ala Val Leu Arg Val Ser Tyr Lys Gly Ser Ile Ser Tyr Arg
80 85 90 95

aac gcg gcg cgc gtc cag ccg ccc cgg cgc gga gcc acc ccg ccg gcc 578
Asn Ala Ala Arg Val Gln Pro Pro Arg Arg Gly Ala Thr Pro Pro Ala
100 105 110

ccg ccg cgc gcc ccc cgc ggg ggc ccc gcc gcc_gcc gcc gcg ccg ccg 626
Pro Pro Arg Ala Pro Arg Gly Gly Pro Ala Ala Ala Ala Ala Pro Pro
115 120 125

ccc acg ccc gcc ccg ccg ccg ccg ccc gcg ccc gtc gcc gcc gcc gcc 674
Pro Thr Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Val Ala Ala Ala Ala
130 135 140

gcc ccg gcc ccg gcg ccc cgc gcg gcc gcc gcc gcc gct gcc gcc aca 722
Ala Pro Ala Arg Ala Pro Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr
145 150 155

gcg ccc ccc tcg ccc ggc ccc gcg cag ccg ggc ccc cgc gcg cag ccg 770
Ala Pro Pro Ser Pro Gly Pro Ala Gln Pro Gly Pro Arg Ala Gln Arg
160 165 170

gcc gcg ccc ctg gcc gcg ccg ccg ccc gcg ccc gcc gct ccc ccg gcg 818
Ala Ala Pro Leu Ala Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Ala Pro Pro Ala
180 185 190

```

FIG. 2A-1

## 【図2A-2】


gcg gcg ccc ccg gcc ggc ccg cgc cgc gcc ccc ccg ccc gcc gcc gcc Ala Ala Pro Pro Ala Gly Pro Arg Arg Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ala 195 200 205	866
gtc gcc gcc ccg gag tcg ccg ctg ccg ccg cca cag ccg ccg gcg Val Ala Ala Arg Glu Ser Pro Leu Pro Pro Pro Pro Gln Pro Pro Ala 210 215 220	914
ccg cca cag cag cag cag cag ccg ccg ccg cca ccg ccg ccg cag cag Pro Pro Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro Pro Pro Pro Gln Pro Gln Gln 225 230 235	962
cca cag ccg ccg ccg gag ggg ggc gcg gcg ccg gcc gcc gcc ccg gcg Pro Gln Pro Pro Pro Glu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Gly Gly Pro Ala 240 245 250 255	1010
egg ccc gtg agc ctg ccg gaa gtc gtg cgc tac ctc egg ggt agc agc Arg Pro Val Ser Leu Arg Glu Val Val Arg Tyr Leu Gly Gly Ser Ser 260 265 270	1058
ggc gct gcc gcc cgc ctg acc ccg gcc cgc gtg cag ggt ctg ctg gaa Gly Ala Gly Gly Arg Leu Thr Arg Gly Arg Val Gln Gly Leu Leu Glu 275 280 285	1106
gag gag gcg gcg gcg ccg gcc cgc ctg gag cgc acc cgt ctc gga gcg Glu Glu Ala Ala Ala Arg Gly Arg Leu Glu Arg Thr Arg Leu Gly Ala 290 295 300	1154
ctt gcg ctg ccc cgc ggg gac agg ccc gga ccg gcg cca ccg gcc gcc Leu Ala Leu Pro Arg Gly Asp Arg Pro Gly Arg Ala Pro Pro Ala Ala 305 310 315	1202
agc gcc cgc gcg gcg ccg aac aag aga gct ggc gag gag cga gtg ctt Ser Ala Arg Ala Ala Arg Asn Lys Arg Ala Gly Glu Glu Arg Val Leu 320 325 330 335	1250
gaa aag gag gag gag gag gag gag gaa gac gac gag gac gac gac Glu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Glu Asp Asp Asp 340 345 350	1298
gac gac gtc gtg tcc gag gcc tcg gag gtg ccc gag agc gat cgt ccc Asp Asp Val Val Ser Glu Gly Ser Glu Val Pro Glu Ser Asp Arg Pro 355 360 365	1346
gcg ggt gcg cag cat cac cag ctg aat gcc gcc gag cgc gcc ccg cag Ala Gly Ala Gln His His Gln Leu Asn Gly Gly Glu Arg Gly Pro Gln 370 375 380	1394
acc gcc aag gag ccg gcc aag gag tgg tcg ctg tgt gcc ccc cac cct Thr Ala Lys Glu Arg Ala Lys Glu Trp Ser Leu Cys Gly Pro His Pro 385 390 395	1442
ggc cag gag gaa ggg ccg ggg ccg gcc gcg gcc agt gcc acc cgc cag Gly Gln Glu Glu Gly Arg Gly Pro Ala Ala Gly Ser Gly Thr Arg Gln 400 405 410 415	1490

FIG. 2A-2

## 【図2A-3】


gtg ttc tcc atg gcg gcc ttg agt aag gag ggg gga tca gcc tct tcc	1538
Val Phe Ser Met Ala Ala Leu Ser Lys Glu Gly Gly Ser Ala Ser Ser	
420 425 430	
acc acc ggg cct gac tcc ccg tcc ccg gtg cct ttg ccc ccc ggg aag	1586
Thr Thr Gly Pro Asp Ser Pro Ser Pro Val Pro Leu Pro Pro Gly Lys	
435 440 445	
cca gcc ctc cca gga gcc gat ggg acc ccc ttt ggc tgc cct gcc ggg	1634
Pro Ala Leu Pro Gly Ala Asp Gly Thr Pro Phe Gly Cys Pro Ala Gly	
450 455 460	
cgc aaa gag aag ccg gca gac ccc gtg gag tgg aca gtc atg gac gtc	1682
Arg Lys Glu Lys Pro Ala Asp Pro Val Glu Trp Thr Val Met Asp Val	
465 470 475	
gtg gag tac ttc acc gag gcg gcc ttc cct gag caa gcc acg gct ttc	1730
Val Glu Tyr Phe Thr Glu Ala Gly Phe Pro Glu Gln Ala Thr Ala Phe	
480 485 490 495	
cag gag cag gag atc gac ggc aag tcc ctg ctg ctc atg cag cgc acc	1778
Gln Glu Gln Glu Ile Asp Gly Lys Ser Leu Leu Leu Met Gln Arg Thr	
500 505 510	
gat gtc ctc acc ggc ctg tcc atc cgc ctg ggg cca gcg ttg aaa atc	1826
Asp Val Leu Thr Gly Leu Ser Ile Arg Leu Gly Pro Ala Leu Lys Ile	
515 520 525	
tat gag cac cat atc aag gtg ctg cag cag ggt cac ttc gag gac gat	1874
Tyr Glu His His Ile Lys Val Leu Gln Gln Gly His Phe Glu Asp Asp	
530 535 540	
gac ccg gaa ggc ttc ctg gga t gagcacagag ccgcccggcc ccttgcccc	1926
Asp Pro Glu Gly Phe Leu Gly	
545 550	
acccccaccc cgcctggacc cttcctgccc tccatgtcac ccaaggtgtc ccagaggcca	1986
ggagctggac tgggcaggcg aggggtgcgg acctaccctg attctggtag ggggcggggc	2046
cttgctgtgc tcattgctac cccccaccc cgtgtgtgtc tctgcacctg cccccagcac	2106
acccctccc gagcctggat gtcgcctggg actctggcct gatcattttg cccccagatc	2166
agccccctcc ctccctcctg tcccaggaca ttttttaaaa gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2226
attggggagg gggctgggaa ggtgcccaa gatcctcctc ggcccaacca ggtgtttatt	2286
cctatatata tatatatatg ttttgttctg cctgtttttc gtttttttgg gcgtggcctt	2346
tcttccctcc caccaccact catggcccaa gcctgctctg cctgtctggc gggagcagct	2406
gggaatggga ggagggtggg accttgggtc tgtctccac cctctctccc gttggttctg	2466
ttgtcgtccc agctggctgt attgtttttt aatattgcac cgaagggttg tttttttttt	2526
tttaataaaa attttaaaaa aaggaaaaaa aaaaa	2561

FIG. 2A-3

【 2 B】

asp cys arg ser ser ser asn asn arg Xaa pro lys  
gly gly ala ala arg ala gly gly pro ala arg pro  
val ser leu arg glu val val arg tyr leu gly gly  
ser ser gly ala gly gly arg leu thr arg gly arg  
val gln gly leu leu glu glu glu ala ala ala arg  
gly arg leu glu arg thr arg leu gly ala leu ala  
leu pro arg gly asp arg pro gly arg ala pro pro  
ala ala ser ala arg ala ala arg asn lys arg ala  
gly glu glu arg val leu glu lys glu glu glu glu  
glu glu glu glu asp asp glu asp asp asp asp  
val val ser glu gly ser glu val pro glu ser asp  
arg pro ala gly ala gln his his gln leu asn gly  
gly glu arg gly pro gln thr ala lys glu arg ala  
lys glu trp ser leu cys gly pro his pro gly gln  
glu glu gly arg gly pro ala ala gly ser gly thr  
arg gln val phe ser met ala ala leu ser lys glu  
gly gly ser ala ser ser thr thr gly pro asp ser  
pro ser pro val pro leu pro pro gly lys pro ala  
leu pro gly ala asp gly thr pro phe gly cys pro  
ala gly arg lys glu lys pro ala asp pro val glu  
trp thr val met asp val val glu tyr phe thr glu  
ala gly phe pro glu gln ala thr ala phe gln glu  
gln glu ile asp gly lys ser leu leu leu met gln  
arg thr asp val leu thr gly leu ser ile arg leu  
gly pro ala leu lys ile tyr glu his his ile lys  
val leu gln gln gly his phe glu asp asp asp pro  
glu gly phe leu gly

FIG. 2B

【3】

ala ser ala arg ala ala arg asn lys arg ala  
gly glu glu arg val leu glu lys glu glu glu glu  
glu glu glu glu asp asp glu asp asp asp asp  
val val ser glu gly ser glu val pro glu ser asp  
arg pro ala gly ala gln his his gln leu asn gly  
gly glu arg gly pro gln thr ala lys glu arg ala  
lys glu trp ser leu cys gly pro his pro gly gln  
glu glu gly arg gly pro ala ala gly ser gly thr  
arg gln val phe ser met ala ala leu ser lys glu  
gly gly ser ala ser ser thr thr gly pro asp ser  
pro ser pro val pro leu pro pro gly lys pro ala  
leu pro gly ala asp gly thr pro phe gly cys pro  
ala gly arg lys glu lys pro ala asp pro val glu  
trp thr val met asp val val glu tyr phe thr glu  
ala gly phe pro glu gln ala thr ala phe gln glu  
gln glu ile asp gly lys ser leu leu leu met gln  
arg thr asp val leu thr gly leu ser ile arg leu  
gly pro ala leu lys ile tyr glu his his ile lys  
val leu gln gln gly his phe glu asp asp asp pro  
glu gly phe leu gly

FIG. 3

【图4】


.thr arg leu gly ala leu ala  
leu pro arg gly asp arg pro gly arg ala pro pro  
ala ala ser ala arg ala ala arg asn lys arg ala  
gly glu glu arg val leu glu lys glu glu glu glu  
glu glu glu glu asp asp glu asp asp asp asp asp  
val val ser glu gly ser glu val pro glu ser asp  
arg pro ala gly ala gln his his gln leu asn gly  
gly glu arg gly pro gln thr ala lys glu arg ala  
lys glu trp ser leu cys gly pro his pro gly gln  
glu glu gly arg gly pro ala ala gly ser gly thr  
arg gln val phe ser met ala ala leu ser lys glu  
gly gly ser ala ser ser thr thr gly pro asp ser  
pro ser pro val pro leu pro pro gly lys pro ala  
leu pro gly ala asp gly thr pro phe gly cys pro  
ala gly arg lys glu lys pro ala asp pro val glu  
trp thr val met asp val val glu tyr phe thr glu  
ala gly phe pro glu gln ala thr ala phe gln glu  
gln glu ile asp gly lys ser leu leu leu met gln  
arg thr asp val leu thr gly leu ser ile arg leu  
gly pro ala leu lys ile tyr glu his his ile lys  
val leu gln gln gly his phe glu asp asp asp pro  
glu gly phe leu gly

FIG. 4

## 【図5A】

met lys asn gln  
asp lys lys asn gly ala ala lys gln pro asn pro  
lys ser ser pro gly gln pro glu ala gly ala glu  
gly ala gln gly arg pro gly arg pro ala pro ala  
arg glu ala glu gly ala ser ser gln ala pro gly  
arg pro glu gly ala gln ala lys thr ala gln pro  
gly ala leu cys asp val ser glu glu leu ser arg  
gln leu glu asp ile leu ser thr tyr cys val asp  
asn asn gln gly ala pro gly glu asp gly val gln  
gly glu pro pro glu pro glu asp ala glu lys ser  
arg ala tyr val ala arg asn gly glu pro glu pro  
gly thr pro val val asn gly glu lys glu thr ser  
lys ala glu pro gly thr glu glu ile arg thr ser  
asp glu val gly asp arg asp his arg arg pro gln  
glu lys lys lys ala lys gly leu gly lys glu ile  
thr leu leu met gln thr leu asn thr leu ser thr  
pro glu glu lys leu ala ala leu cys lys lys tyr  
ala glu leu leu glu glu his arg asn ser gln lys  
gln met lys leu leu gln lys lys gln ser gln leu  
val gln glu lys asp his leu arg gly glu his ser  
lys ala ile leu ala arg ser lys leu glu ser leu  
cys arg glu leu gln arg his asn arg ser leu lys  
glu glu gly val gln arg ala arg glu glu glu glu  
lys arg lys glu val thr ser his phe gln met thr  
leu asn asp ile gln leu gln met glu gln his asn  
glu arg asn ser lys leu arg gln glu asn met glu

FIG. 5A

【 5 B】

leu ala glu arg leu lys lys leu ile glu gln tyr  
glu leu arg glu glu his ile asp lys val phe lys  
his lys asp leu gln gln gln leu val asp ala lys  
leu gln gln ala gln glu met leu lys glu ala glu  
glu arg his gln arg glu lys asp phe leu leu lys  
glu ala val glu ser gln arg met cys glu leu met  
lys gln gln glu thr his leu lys gln gln leu ala  
leu tyr thr glu lys phe glu glu phe gln asn thr  
leu ser lys ser ser glu val phe thr thr phe lys  
gln glu met glu lys met thr lys lys ile lys lys  
leu glu lys glu thr thr met tyr arg ser arg trp  
glu ser ser asn lys ala leu leu glu met ala glu  
glu lys thr leu arg asp lys glu leu glu gly leu  
gln val lys ile gln arg leu glu lys leu cys arg  
ala leu gln thr glu arg asn asp leu asn lys arg  
val gln asp leu ser ala gly gly gln gly pro val  
**ser** asp ser gly pro glu arg arg pro **glu pro ala**  
**thr thr ser lys glu gln gly val glu gly pro gly**  
ala gln val pro **asn ser pro arg ala thr asp ala**  
**ser cys cys ala gly ala pro ser thr glu ala ser**  
gly gln thr gly pro gln glu pro thr **thr ala thr**  
ala

FIG. 5B

【6】

met ser lys asn thr val ser ser ala  
arg phe arg lys val asp val asp glu tyr asp glu  
asn lys phe val asp glu glu asp gly gly asp gly  
gln ala gly pro asp glu gly glu val asp ser cys  
leu arg gln gly asn met thr ala ala leu gln ala  
ala leu lys asn pro pro ile asn thr lys ser gln  
ala val lys asp arg ala gly ser ile val leu lys  
val leu ile ser phe lys ala asn asp ile glu lys  
ala val gln ser leu asp lys asn gly val asp leu  
leu met lys tyr ile tyr lys gly phe glu ser pro  
ser asp asn ser ser ala met leu leu gln trp his  
glu lys ala leu ala ala gly gly val gly ser ile  
val arg val leu thr ala arg lys thr val

FIG. 6

## 【图7A-1】

atg gcg ggg ccc ccg gcc cta ccc ccg ccg gag acg gcg gcg gcc gcc	48
Met Ala Gly Pro Pro Ala Leu Pro Pro Pro Glu Thr Ala Ala Ala Ala	
1 5 10 15	
acc acg gcg gcc gcc gcc tcg tcg tcc gcc gct tcc ccg cac tac caa	96
Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ser Ala Ala Ser Pro His Tyr Gln	
20 25 30	
gag tgg atc ctg gac acc atc gac tcg ctg cgc tcg cgc aag gcg cgg	144
Glu Trp Ile Leu Asp Thr Ile Asp Ser Leu Arg Ser Arg Lys Ala Arg	
35 40 45	
ccg gac ctg gag cgc atc tgc cgg atg gtg cgg cgg cgg cac ggc ccg	192
Pro Asp Leu Glu Arg Ile Cys Arg Met Val Arg Arg Arg His Gly Pro	
50 55 60	
gag ccg gag cgc acg cgc gcc gag ctc gag aaa ctg atc cag cag cgc	240
Glu Pro Glu Arg Thr Arg Ala Glu Leu Glu Lys Leu Ile Gln Gln Arg	
65 70 75 80	
gcc gtg ctc ccg gtc agc tac aag ggg agc atc tcg tac cgc aac gcg	288
Ala Val Leu Arg Val Ser Tyr Lys Gly Ser Ile Ser Tyr Arg Asn Ala	
85 90 95	
ggc cgc gtc cag ccg ccc cgg cgc gga gcc acc ccg ccg gcc ccg ccg	336
Ala Arg Val Gln Pro Pro Arg Arg Gly Ala Thr Pro Pro Ala Pro Pro	
100 105 110	
cgc gcc ccc cgc ggg gcc ccc gcc gcc gcc gcc gcc gcc gcg ccg ccg	384
Arg Ala Pro Arg Gly Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Pro Pro	
115 120 125	
ccc acg ccc gcc ccg ccg cca ccg ccc gcg ccg_gtc gcc gcc gcc gcc	432
Pro Thr Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Val Ala Ala Ala Ala	
130 135 140	
ccg gcc ccg gcg ccc cgc gcg gcc gcc gcc gcc gcc aca gcg ccc ccc	480
Pro Ala Arg Ala Pro Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Pro Pro	
145 150 155 160	
tcg cct ggc ccc gcg cag ccg ggc ccc cgc gcg cag ccg gcc gcg ccc	528
Ser Pro Gly Pro Ala Gln Pro Gly Pro Arg Ala Gln Arg Ala Ala Pro	
165 170 175	
ctg gcc gcg ccg ccg ccc gcg cca gcc gct ccc ccg gcg gtg gcg ccc	576
Leu Ala Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Ala Pro Pro Ala Val Ala Ala Pro	
180 185 190	
ccg gcc ggc ccg cgc cgc gcc ccc ccg ccc gcc gtc gcc gcc ccg gag	624
Pro Ala Gly Pro Arg Arg Ala Pro Pro Pro Ala Val Ala Ala Arg Glu	
195 200 205	
ccg ccg ctg ccg ccg ccg cca cag ccg ccg gcg ccg cca cag cag cag	672
Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Gln Pro Pro Ala Pro Pro Gln Gln Gln	
210 215 220	

FIG. 7A-1

## 【图7A-2】


caq ccg ccg ccg ccg cag cca cag ccg ccg ccg gag ggg ggc gcg gtg Gln Pro Pro Pro Pro Gln Pro Gln Pro Pro Pro Glu Gly Gly Ala Val 225 230 235 240	720
cgg gcc ggc ggc gcg gcg ccg ccc gtg agc ctg ccg gaa gtc gtg cgc Arg Ala Gly Gly Ser Ala Ala Arg Pro Val Ser Leu Arg Glu Val Val Arg 245 250 255	768
tac ctc ggg ggc agc ggc ggc gcc ggc ggt cgc cta acc cgc ggc cgc Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ala Gly Arg Leu Thr Arg Gly Arg 260 265 270	816
gtg cag ggg ctg ctg gag gag gag gcg gcg gct cga ggc cgt ctg gag Val Gln Gly Leu Leu Glu Glu Glu Ala Ala Ala Arg Gly Arg Leu Glu 275 280 285	864
cgc acc cgt ctc gga gcg ctt gcg ctg ccc cgc ggg gac agg ccc gga Arg Thr Arg Leu Gly Ala Leu Ala Leu Pro Arg Gly Asp Arg Pro Gly 290 295 300	912
cgg gcg ccg ccg gcc gcc agc gcc cgc ccg tct cgc agc aag aga ggt Arg Ala Pro Pro Ala Ala Ser Ala Arg Pro Ser Arg Ser Lys Arg Gly 305 310 315 320	960
gga gaa gag cga gta ctt gag aaa gaa gag gaa gaa gat gat gat gaa Gly Glu Glu Arg Val Leu Glu Lys Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Glu 325 330 335	1008
gat gaa gat gaa gaa gat gat gtg tca gag ggc tct gaa gtg ccc gag Asp Glu Asp Glu Glu Asp Asp Val Ser Glu Gly Ser Glu Val Pro Glu 340 345 350	1056
agt gac cgt cct gca ggt gcc cag cac cac cag ctt aac ggc gag ccg Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ala Gln His His Gln Leu Asn Gly Glu Arg 355 360 365	1104
gga cct cag agt gcc aag gag agg gtc aag gag tyg acc ccc tgc gga Gly Pro Gln Ser Ala Lys Glu Arg Val Lys Glu Trp Thr Pro Cys Gly 370 375 380	1152
ccg cac cag ggc cag gat gaa ggg ccg ggg cca gcc ccg ggc agc gcc Pro His Gln Gly Gln Asp Glu Gly Arg Gly Pro Ala Pro Gly Ser Gly 385 390 395 400	1200
acc cgc cag gtg ttc tcc atg gca gcc atg aac aag gaa ggg gga aca Thr Arg Gln Val Phe Ser Met Ala Ala Met Asn Lys Glu Gly Gly Thr 405 410 415	1248
gct tet gtt gcc acc ggg cca gac tcc ccg tcc ccc gtg cct ttg ccc Ala Ser Val Ala Thr Gly Pro Asp Ser Pro Ser Pro Val Pro Leu Pro 420 425 430	1296
cca gcc aaa cca gcc cta cct ggg gcc gac ggg acc ccc ttt gcc tgt Pro Gly Lys Pro Ala Leu Pro Gly Ala Asp Gly Thr Pro Phe Gly Cys 435 440 445	1344

FIG. 7A-2

【 7A-3】

ccg ccc ggg cgc aaa gag aag cca tct gat ccc gtc gag tgg acc gtg	1392
Pro Pro Gly Arg Lys Glu Lys Pro Ser Asp Pro Val Glu Trp Thr Val	
450 455 460	
atg gat gtc gtc gaa tat ttt act gag gct gga ttc ccg gag cag gcg	1440
Met Asp Val Val Glu Tyr Phe Thr Glu Ala Gly Phe Pro Glu Gln Ala	
465 470 475 480	
aca gct ttc caa gag cag gaa att gat ggc aaa tct ttg ctg ctc atg	1488
Thr Ala Phe Gln Glu Gln Glu Ile Asp Gly Lys Ser Leu Leu Leu Met	
485 490 495	
cag cgc aca gat gtg ctc acc ggc ctg tcc atc cgc ctc ggg cca gcc	1536
Gln Arg Thr Asp Val Leu Thr Gly Leu Ser Ile Arg Leu Gly Pro Ala	
500 505 510	
ctg aaa atc tac gag cac cac atc aag gtg ctt cag caa ggc cac ttt	1584
Leu Lys Ile Tyr Glu His His Ile Lys Val Leu Gln Gln Gly His Phe	
515 520 525	
gag gat gat gac ccc gat ggc ttc tta ggc	1614
Glu Asp Asp Asp Pro Asp Gly Phe Leu Gly	
530 535	

FIG. 7A-3

【7B】

glu glu arg val leu glu lys glu glu glu glu asp  
asp asp glu asp glu asp glu glu asp asp val ser  
glu gly ser glu val pro glu ser asp arg pro ala  
gly ala gln his his gln leu asn gly glu arg gly  
pro gln ser ala lys glu arg val lys glu trp thr  
pro cys gly pro his gln gly gln asp glu gly arg  
gly pro ala pro gly ser gly thr arg gln val phe  
ser met ala ala met asn lys glu gly gly thr ala  
ser val ala thr gly pro asp ser pro ser pro val  
pro leu pro pro gly lys pro ala leu pro gly ala  
asp gly thr pro phe gly cys pro pro gly arg lys  
glu lys pro ser asp pro val glu trp thr val met  
asp val val glu tyr phe thr glu ala gly phe pro  
glu gln ala thr ala phe gln glu gln glu ile asp  
gly lys ser leu leu leu met gln arg thr asp val  
leu thr gly leu ser ile arg leu gly pro ala leu  
lys ile tyr glu his his ile lys val leu gln gln  
gly his phe glu asp asp asp pro asp gly phe leu  
gly

FIG. 7B

## 【图8A-1】

atg aag aac caa gac aaa aag aac ggg gct gcc aaa caa tcc aat cca	48
Met Lys Asn Gln Asp Lys Lys Asn Gly Ala Ala Lys Gln Ser Asn Pro	
1 5 10 15	
aaa agc agc cca gga caa ccg gaa gca gga ccc gag gga gcc cag gag	96
Lys Ser Ser Pro Gly Gln Pro Glu Ala Gly Pro Glu Gly Ala Gln Glu	
20 25 30	
cgg ccc agc cag gcg gct cct gca gta gaa gca gaa ggt ccc ggc agc	144
Arg Pro Ser Gln Ala Ala Pro Ala Val Glu Ala Glu Gly Pro Gly Ser	
35 40 45	
agc cag gct cct cgg aag ccg gag ggt gct caa gcc aga acg gct cag	192
Ser Gln Ala Pro Arg Lys Pro Glu Gly Ala Gln Ala Arg Thr Ala Gln	
50 55 60	
tct ggg gcc ctt cgt gat gtc tct gag gag ctg agc cgc caa ctg gaa	240
Ser Gly Ala Leu Arg Asp Val Ser Glu Glu Leu Ser Arg Gln Leu Glu	
65 70 75 80	
gac ata ctg agc aca tac tgt gtg gac aat aac cag ggg ggc ccc ggc	288
Asp Ile Leu Ser Thr Tyr Cys Val Asp Asn Asn Gln Gly Gly Pro Gly	
85 90 95	
gag gat ggg gca cag ggt gag ccg gct gaa ccc gaa gat gca gag aag	336
Glu Asp Gly Ala Gln Gly Glu Pro Ala Glu Pro Glu Asp Ala Glu Lys	
100 105 110	
tcc cgg acc tat gtg gca agg aat ggg gag cct gaa cca act cca gta	384
Ser Arg Thr Tyr Val Ala Arg Asn Gly Glu Pro Glu Pro Thr Pro Val	
115 120 125	
gtc aat gga gag aag gaa ccc tcc aag ggg gat cca aac aca gaa gag	432
Val Asn Gly Glu Lys Glu Pro Ser Lys Gly Asp Pro Asn Thr Glu Glu	
130 135 140	
atc cgg cag agt gac gag gtc gga gac cga gac cat cga agg cca cag	480
Ile Arg Gln Ser Asp Glu Val Gly Asp Arg Asp His Arg Arg Pro Gln	
145 150 155 160	
gag aag aaa aaa gcc aag ggt ttg ggt aag gag atc acg ttg ctg atg	528
Glu Lys Lys Lys Ala Lys Gly Leu Gly Lys Glu Ile Thr Leu Leu Met	
165 170 175	
cag aca ttg aat act ctg agt acc cca gag gag aag ctg gct gct ctg	576
Gln Thr Leu Asn Thr Leu Ser Thr Pro Glu Glu Lys Leu Ala Ala Leu	
180 185 190	
tgc aag aag tat gct gaa ctg ctg gag gag cac cgg aat tca cag aag	624
Cys Lys Lys Tyr Ala Glu Leu Leu Glu Glu His Arg Asn Ser Gln Lys	
195 200 205	

FIG. 8A-1

## 【图8A-2】

cag atg aag ctc cta cag aaa aag cag agc cag ctg gtg caa gag aag Gln Met Lys Leu Leu Gln Lys Lys Gln Ser Gln Leu Val Gln Glu Lys 210 215 220	672
gac cac ctg cgc ggt gag cac agc aag gcc gtc ctg gcc cgc agc aag Asp His Leu Arg Gly Glu His Ser Lys Ala Val Leu Ala Arg Ser Lys 225 230 235 240	720
ctt gag agc cta tgc cgt gag ctg cag cgg cac aac cgc tcc ctc aag Leu Glu Ser Leu Cys Arg Glu Leu Gln Arg His Asn Arg Ser Leu Lys 245 250 255	768
gaa gaa ggt gtg cag cgg gcc cgg gag gag gag gag aag cgc aag gag Glu Glu Gly Val Gln Arg Ala Arg Glu Glu Glu Glu Lys Arg Lys Glu 260 265 270	816
gtg acc tcg cac ttc cag gtg aca ctg aat gac att cag ctg cag atg Val Thr Ser His Phe Gln Val Thr Leu Asn Asp Ile Gln Leu Gln Met 275 280 285	864
gaa cag cac aat gag cgc aac tcc aag ctg cgc caa gag aac atg gag Glu Gln His Asn Glu Arg Asn Ser Lys Leu Arg Gln Glu Asn Met Glu 290 295 300	912
ctg gct gag agg ctc aag aag ctg att gag cag tat gag ctg cgc gag Leu Ala Glu Arg Leu Lys Lys Leu Ile Glu Gln Tyr Glu Leu Arg Glu 305 310 315 320	960
gag cat atc gac aaa gtc ttc aaa cac aag gac cta caa cag cag ctg Glu His Ile Asp Lys Val Phe Lys His Lys Asp Leu Gln Gln Gln Leu 325 330 335	1008
gtg gat gcc aag ctc cag cag gcc cag gag atg cta aag gag gca gaa Val Asp Ala Lys Leu Gln Gln Ala Gln Glu Met Leu Lys Glu Ala Glu 340 345 350	1056
gag cgg cac cag cgg gag aag gat ttt ctc ctg aaa gag gca gta gag Glu Arg His Gln Arg Glu Lys Asp Phe Leu Leu Lys Glu Ala Val Glu 355 360 365	1104
tcc cag agg atg tgt gag ctg atg aag cag cea gag acc cac ctg aag Ser Gln Arg Met Cys Glu Leu Met Lys Gln Gln Glu Thr His Leu Lys 370 375 380	1152
caa cag ctt gcc cta tac aca gag aag ttt gag gag ttc cag aac aca Gln Gln Leu Ala Leu Tyr Thr Glu Lys Phe Glu Glu Phe Gln Asn Thr 385 390 395 400	1200
ctt tcc aaa agc agc gag gta ttc acc aca ttc aag cag gag atg gaa Leu Ser Lys Ser Ser Glu Val Phe Thr Thr Phe Lys Gln Glu Met Glu 405 410 415	1248

FIG. 8A-2

## 【图8A-3】


aag atg act aag aag atc aag aag ctg gag aaa gaa acc acc atg tac	1296
Lys Met Thr Lys Lys Ile Lys Lys Leu Glu Lys Glu Thr Thr Met Tyr	
420 425 430	
cgg tcc cgg tgg gag agc agc aac aag gcc ctg ctt gag atg gct gag	1344
Arg Ser Arg Trp Glu Ser Ser Asn Lys Ala Leu Leu Glu Met Ala Glu	
435 440 445	
gag aaa aca gtc cgg gat aaa gaa ctg gag gcc ctg cag gta aaa atc	1392
Glu Lys Thr Val Arg Asp Lys Glu Leu Glu Gly Leu Gln Val Lys Ile	
450 455 460	
caa cgg ctg gag aag ctg tgc cgg gca ctg cag aca gag cgc aat gac	1440
Gln Arg Leu Glu Lys Leu Cys Arg Ala Leu Gln Thr Glu Arg Asn Asp	
465 470 475 480	
ctg aac aag agg gta caq gac ctg agt gct ggt gcc cag gcc tcc ctc	1488
Leu Asn Lys Arg Val Gln Asp Leu Ser Ala Gly Gly Gln Gly Ser Leu	
485 490 495	
act gac agt gcc cct gag agg agg cca gag ggg cct ggg gct caa gca	1536
Thr Asp Ser Gly Pro Glu Arg Arg Pro Glu Gly Pro Gly Ala Gln Ala	
500 505 510	
ccc agc tcc ccc agg gtc aca gaa gcg cct tgc tac cca gga gca ccg	1584
Pro Ser Ser Pro Arg Val Thr Glu Ala Pro Cys Tyr Pro Gly Ala Pro	
515 520 525	
agc aca gaa gca tca ggc cag act ggg cct caa gag ccc acc tcc gcc	1632
Ser Thr Glu Ala Ser Gly Gln Thr Gly Pro Gln Glu Pro Thr Ser Ala	
530 535 540	
agg gcc	1638
Arg Ala	
545	

FIG. 8A-3

【 8 B - 1】

lys ser ser pro gly gln pro glu ala gly pro glu gly ala  
gln glu arg pro ser gln ala ala pro ala val glu ala glu gly  
pro gly ser ser gln ala pro arg lys pro glu gly ala gln ala  
arg thr ala gln ser gly ala leu arg asp val ser glu glu leu  
ser arg gln leu glu asp ile leu ser thr tyr cys val asp asn  
asn gln gly gly pro gly glu asp gly ala gln gly glu pro ala  
glu pro glu asp ala glu lys ser arg thr tyr val ala arg asn  
gly glu pro glu pro thr pro val val tyr gly glu lys glu pro  
ser lys gly asp pro asn thr glu glu ile arg gln ser asp glu  
val gly asp arg asp his arg arg pro gln glu lys lys lys ala  
lys gly leu gly lys glu ile thr leu leu met gln thr leu asn  
thr leu ser thr pro glu glu lys leu ala ala leu cys lys lys  
tyr ala glu leu leu glu glu his arg asn ser gln lys gln met  
lys leu leu gln lys lys gln ser gln leu val gln glu lys asp  
his leu arg gly glu his ser lys ala val leu ala arg ser lys  
leu glu ser leu cys arg glu leu gln arg his asn arg ser leu  
lys glu glu gly val gln arg ala arg glu glu glu glu lys arg  
lys glu val thr ser his phe gln val thr leu asn asp ile gln  
leu gln met glu gln his asn glu arg asn ser lys leu arg gln  
glu asn met glu leu ala glu arg leu lys lys leu ile glu gln  
tyr glu leu arg glu glu his ile asp lys val phe lys his lys  
asp leu gln gln gln leu val asp ala lys leu gln gln ala gln  
glu met leu lys glu ala glu glu arg his gln arg glu lys asp  
phe leu leu lys glu ala val glu ser gln arg met cys glu leu  
met lys gln gln glu thr his leu lys gln gln leu ala leu tyr  
thr glu lys phe glu glu phe gln asn thr leu ser lys ser ser

FIG. 8B-1

【 8 B - 2】

glu val phe thr thr phe lys gln glu met glu lys met thr lys  
lys ile lys lys leu glu lys glu thr thr met tyr arg ser arg  
trp glu ser ser asn lys ala leu leu glu met ala glu glu lys  
thr val arg asp lys glu leu glu gly leu gln val lys ile gln  
arg leu glu lys leu cys arg ala leu gln thr glu arg asn asp  
leu asn lys arg val gln asp leu ser ala gly gly gln gly ser  
leu thr asp ser gly pro glu arg arg pro glu gly pro gly ala  
gln ala pro ser ser pro arg val thr glu ala pro cys tyr pro  
gly ala pro ser thr glu ala ser gly gln thr gly pro gln glu  
pro thr ser ala arg ala \*\*\*

## FIG. 8B-2

【 9】

val asp val asp  
glu tyr asp glu asn lys phe val asp glu glu asp  
gly gly asp gly

## FIG. 9

## 【図10A】

```

1  AAG CCT CGC AGC GGT CCG GGC GGC GCC GCG GAG GCT
37  CGA GGG CCG CCG GCG GCG GCG ATG TCG AAG AAC ACG
    met ser lys asn thr

73  GTG TCG TCG GCG CCG TTC CCG AAG GTG GAC GTG GAT
    val ser ser ala arg phe arg lys val asp val asp

109 GAG TAC GAC GAG AAC AAG TTC GTG GAC GAG GAA GAC
    glu tyr asp glu asn lys phe val asp glu glu asp

145 GGC GGC GAC GGC CAG GCG GGG CCG GAC GAG GGC GAG
    gly gly asp gly gln ala gly pro asp glu gly glu

181 GTG GAC TCG TGC CTG CCG CAA GGG AAC ATG ACA GCC
    val asp ser cys leu arg gln gly asn met thr ala

217 GCC CTG CAG GCG GCG CTG AAG AAC CCT CCC ATC AAC
    ala leu gln ala ala leu lys asn pro pro ile asn

253 ACC AGG AGC CAG GCG GTG AAG GAC CCG GCA GGC AGC
    thr arg ser gln ala val lys asp arg ala gly ser

289 ATC GTG CTG AAG GTG CTC ATC TCC TTC AAG GCC GGC
    ile val leu lys val leu ile ser phe lys ala gly

325 GAC ATA GAA AAG GCC GTG CAG TCC CTG GAC AGG AAC
    asp ile glu lys ala val gln ser leu asp arg asn

361 GGC GTG GAC CTG CTC ATG AAG TAC ATC TAC AAG GGC
    gly val asp leu leu met lys tyr ile tyr lys gly

397 TTC GAG AGC CCC TCC GAC AAC AGC AGC GCC GTG CTC
    phe glu ser pro ser asp asn ser ser ala val leu


433 CTG CAG TGG CAC GAG AAG GCG CTG GCT GCA GGA GGA
    leu gln trp his glu lys ala leu ala ala gly gly

469 GTG GGC TCC ATC GTC CGT GTC CTG ACT GCA AGG AAA
    val gly ser ile val arg val leu thr ala arg lys

505 ACC GTG TAG CCT GGC AGG AAC GGG TGC CTG CCG GGC
    thr val


```

FIG. 10A

【 10B】

541 AGC GGG AGC TGC CGG TAC AAA GAC CAA AAC GCC CAG  
577 ATG CCG CCG CTG CCC TGT GGG CGG CGT CTG TTC CCA  
613 GCT TCG CTT TTT CCC TTT CCC GTG TCT GTC AGG ATT  
649 ACA TAA GGT TTC CCT TCG TGA GAA TCG GAG TGG CGC  
685 AGA GGG TCC TGT TCA TAC GCG CCG TGC GTC CGG CTG  
721 TGT AAG ACC CCT GCC TTC AGT GTC CTT GAG CAA CGG  
757 TAG CGT GTC GCC GGC TGG GTT TGG TTT TGT CGT GCA  
793 GGG ATC TGG TCA GAA TTT GAG GCC AGT TTC CTA ACT  
829 CAT TGC TGG TCA GGA AAT GAT CTT CAT TTA AAA AAA  
865 AAA AAA AGA CTG GCA GCT ATT ATG CAA AAC TGG ACC  
901 CTC TTC CCT TAT TTA AGC AGA GTG AGT TTC TGG AAC  
937 CAG TGG TGC CCC CCC CCC CGC CCC GGC CGC CGT CCT  
973 GCT CAA GGG AAG CCT CCC TGC AGA GCA GCA GAG CCC  
1009 CTG GGC AGG AGC GCC GCG TCC CGC TCC CAG GAG ACA  
1045 GCA TGC GCG GTC ACG CGG CAC TTC CTG TGC CTC CCA  
1081 GCC CCA GTG CCC CGG AGT TCT TCA GGG CGA CAG GGA  
1117 CCT CAG AAG ACT GGA TCC GAT CCA GAC AGA CGC CCA  
1153 TTC TTG GTT CAG CTC AGT GTT TTC AAA AGG AAC GTG  
1189 CTA CCG TGG GTA GAG CAC ACT GGT TCT CAG AAC ACG  
1225 GCC GGC GCT TGA CGG TTG TCA CAG CTC CAG AAC AAA  
1261 TCC TGG GAG ACA GGC GAG CGC GAG TCG CCG GGC AGG  
1297 AAT TCC ACA CAC TCG TGC TGT TTT TGA TAC CTG CTT  
1333 TTT GTT TTG TTT TGT AAA AAT GAT GCA CTT GAG AAA  
1369 ATA AAA CGT CAG TGT TGA CAA AAA AAA AAA AAA AAA

FIG. 10B

【 11A】


1 GAC TGC CGC AGC AGC AGC AAC AAC CGC TAG CCG AAG  
 asp cys arg ser ser ser asn asn arg Xaa pro lys  
 37 GGT GGC GCG GCG CGG GCC GGC GGC CCG GCG CGG CCC  
 gly gly ala ala arg ala gly gly pro ala arg pro  
 73 GTG AGC CTG CGG GAA GTC GTG CGC TAC CTC GGG GGT  
 val ser leu arg glu val val arg tyr leu gly gly  
 109 AGC AGC GGC GCT GGC GGC CGC CTG ACC CGC GGC CGC  
 ser ser gly ala gly gly arg leu thr arg gly arg  
 145 GTG CAG GGT CTG CTG GAA GAG GAG GCG GCG GCG CGG  
 val gln gly leu leu glu glu glu ala ala ala arg  
 181 GGC CGC CTG GAG CGC ACC CGT CTC GGA GCG CTT GCG  
 gly arg leu glu arg thr arg leu gly ala leu ala  
 217 CTG CCC CGC GGG GAC AGG CCC GGA CGG GCG CCA CCG  
 leu pro arg gly asp arg pro gly arg ala pro pro  
 253 GCC GCC AGC GCC CGC GCG GCG CGG AAC AAG AGA GCT  
 ala ala ser ala arg ala ala arg asn lys arg ala  
 289 ~~GCC~~ GAG GAG CGA GTG CTT GAA AAG GAG GAG GAG GAG  
 gly glu glu arg val leu glu lys glu glu glu glu  
 325 GAG GAG GAG GAA GAC GAC GAG GAC GAC GAC GAC GAC  
 glu glu glu glu asp asp glu asp asp asp asp asp  
 361 GTC GTG TCC GAG GGC TCG GAG GTG CCC GAG AGC GAT  
 val val ser glu gly ser glu val pro glu ser asp  
 397 CGT CCC GCG GGT GCG CAG CAT CAC CAG CTG AAT GGC  
 arg pro ala gly ala gln his his gln leu asn gly  
 433 GGC GAG CGC GGC CCG CAG ACC GCC AAG GAG CGG GCC  
 gly glu arg gly pro gln thr ala lys glu arg ala  
 469 AAG GAG TGG TCG CTG TGT GGC CCC CAC CCT GGC CAG  
 lys glu trp ser leu cys gly pro his pro gly gln

FIG. 11A

## 【図11B】

505 GAG GAA GGG CCG GGG CCG GCC GCG GGC AGT GGC ACC  
 glu glu gly arg gly pro ala ala gly ser gly thr  
 541 CGC CAG GTG TTC TCC ATG GCG GCC TTG AGT AAG GAG  
 arg gln val phe ser met ala ala leu ser lys glu  
 577 GGG GGA TCA GCC TCT TCG ACC ACC GGG CCT GAC TCC  
 gly gly ser ala ser ser thr thr gly pro asp ser  
 613 CCG TCC CCG GTG CCT TTG CCC CCC GGG AAG CCA GCC  
 pro ser pro val pro leu pro pro gly lys pro ala  
 649 CTC CCA GGA GCC GAT GGG ACC CCC TTT GGC TGC CCT  
 leu pro gly ala asp gly thr pro phe gly cys pro  
 685 GCC GGG CCG AAA GAG AAG CCG GCA GAC CCC GTG GAG  
 ala gly arg lys glu lys pro ala asp pro val glu  
 721 TGG ACA GTC ATG GAC GTC GTG GAG TAC TTC ACC GAG  
 trp thr val met asp val val glu tyr phe thr glu  
 757 GCG GGC TTC CCT GAG CAA GCC ACG GCT TTC CAG GAG  
 ala gly phe pro glu gln ala thr ala phe gln glu  
 793 CAG GAG ATC GAC GGC AAG TCC CTG CTG CTC ATG CAG  
 gln glu ile asp gly lys ser leu leu leu met gln  
 829 CGC ACC GAT GTC CTC ACC GGC CTG TCC ATC CGC CTG  
 arg thr asp val leu thr gly leu ser ile arg leu  
 865 GGG CCA GCG TTG AAA ATC TAT GAG CAC CAT ATC AAG  
 gly pro ala leu lys ile tyr glu his his ile lys  
 901 GTG CTG CAG CAG GGT CAC TTC GAG GAC GAT GAC CCG  
 val leu gln gln gly his phe glu asp asp asp pro  
 937 GAA GGC TTC CTG GGA TGA GCA CAG AGC CGC CGC GCC  
 glu gly phe leu gly  
 973 CCT TGT CCC CAC CCC CAC CCC GCC TGG ACC CAT TCC  
 1009 TGC CTC CAT GTC ACC CAA GGT GTC CCA GAG GCC AGG  
 1045 AGC TGG ACT GGG CAG GCG AGG GGT GCG GAC CTA CCC  
 1081 TGA TTC TGG TAG GGG GCG GGG CCT TGC TGT GCT CAT

FIG. 11B

【 11C】

1117	TGC	TAC	CCC	CCC	ACC	CCG	TGT	GTG	TCT	CTG	CAC	CTG
1153	CCC	CCA	GCA	CAC	CCC	TCC	CGG	AGC	CTG	GAT	GTC	GCC
1189	TGG	GAC	TCT	GGC	CTG	CTC	ATT	TTG	CCC	CCA	GAT	CAG
1225	CCC	CCT	CCC	TCC	CTC	CTG	TCC	CAG	GAC	ATT	TTT	TAA
1261	AAG	AAA	AAA	AGG	AAA	AAA	AAA	AAT	TGG	GGA	GGG	GGC
1297	TGG	GAA	GGT	GCC	CCA	AGA	TCC	TCC	TCG	GCC	CAA	CCA
1333	GGT	GTT	TAT	TCC	TAT	ATA	TAT	ATA	TAT	ATG	TTT	TGT
1369	TCT	GCC	TGT	TTT	TCG	TTT	TTT	GGT	GCG	TGG	CCT	TTC
1405	TTC	CCT	CCC	ACC	ACC	ACT	CAT	GGC	CCC	AGC	CCT	GCT
1441	CGC	CCT	GTC	GGC	GGG	AGC	AGC	TGG	GAA	TGG	GAG	GAG
1477	GGT	GGG	ACC	TTG	GGT	CTG	TCT	CCC	ACC	CTC	TCT	CCC
1513	GTT	GGT	TCT	GTT	GTC	GCT	CCA	GCT	GGC	TGT	ATT	GCT
1549	TTT	TAA	TAT	TGC	ACC	GAA	GGG	TTG	TTT	TTT	TTT	TTT
1585	TAA	ATA	AAA	TTT	TAA	AAA	AAG	GAA	AAA	AAA	AAA	AAA

FIG. 11C

## 【図12A】

256       GCC AGC GCC CGC GCG GCG CGG AAC AAG AGA GCT  
           ala ser ala arg ala ala arg asn lys arg ala  
  
 289   GGC GAG GAG CGA GTG CTT GAA AAG GAG GAG GAG GAG  
       gly glu glu arg val leu glu lys glu glu glu glu  
  
 325   GAG GAG GAG GAA GAC GAC GAG GAC GAC GAC GAC GAC  
       glu glu glu glu asp asp glu asp asp asp asp asp  
  
 361   GTC GTG TCC GAG GGC TCG GAG GTG CCC GAG AGC GAT  
       val val ser glu gly ser glu val pro glu ser asp  
  
 397   CGT CCC GCG GGT GCG CAG CAT CAC CAG CTG AAT GGC  
       arg pro ala gly ala gln his his gln leu asn gly  
  
 433   GGC GAG CGC GGC CCG CAG ACC GCC AAG GAG CGG GCC  
       gly glu arg gly pro gln thr ala lys glu arg ala  
  
 469   AAG GAG TGG TCG CTG TGT GGC CCC CAC CCT GGC CAG  
       lys glu trp ser leu cys gly pro his pro gly gln  
  
 505   GAG GAA GGG CGG GGG CCG GCC GCG GGC AGT GGC ACC  
       glu glu gly arg gly pro ala ala gly ser gly thr  
  
 541   CGC CAG GTG TTC TCC ATG GCG GCC TTG AGT AAG GAG  
       arg gln val phe ser met ala ala leu ser lys glu  
  
 577   GGG GGA TCA GCC TCT TCG ACC ACC GGG CCT GAC TCC  
       gly gly ser ala ser ser thr thr gly pro asp ser  
  
 613   CCG TCC CCG GTG CCT TTG CCC CCC GGG AAG CCA GCC  
       pro ser pro val pro leu pro pro gly lys pro ala  
  
 649   CTC CCA GGA GCC GAT GGG ACC CCC TTT GGC TGC CCT  
       leu pro gly ala asp gly thr pro phe gly cys pro  
  
 685   GCC GGG CGC AAA GAG AAG CCG GCA GAC CCC GTG GAG  
       ala gly arg lys glu lys pro ala asp pro val glu  
  
 721   TGG ACA GTC ATG GAC GTC GTG GAG TAC TTC ACC GAG  
       trp thr val met asp val val glu tyr phe thr glu

FIG. 12A

## 【図12B】

```

757 GCG GGC TTC CCT GAG CAA GCC ACG GCT TTC CAG GAG
    ala gly phe pro glu gln ala thr ala phe gln glu

793 CAG GAG ATC GAC GGC AAG TCC CTG CTG CTC ATG CAG
    gln glu ile asp gly lys ser leu leu leu met gln

829 CGC ACC GAT GTC CTC ACC GGC CTG TCC ATC CGC CTG
    arg thr asp val leu thr gly leu ser ile arg leu

865 GGG CCA GCG TTG AAA ATC TAT GAG CAC CAT ATC AAG
    gly pro ala leu lys ile tyr glu his his ile lys


901 GTG CTG CAG CAG GGT CAC TTC GAG GAC GAT GAC CCG
    val leu gln gln gly his phe glu asp asp asp pro

937 GAA GGC TTC CTG GGA TGA GCA CAG AGC CGC CGC GCC
    glu gly phe leu gly

973 CCT TGT CCC CAC CCC CAC CCC GCC TGG ACC CAT TCC
1009 TGC CTC CAT GTC ACC CAA GGT GTC CCA GAG GCC AGG
1045 AGC TGG ACT GGG CAG GCG AGG GGT GCG GAC CTA CCC
1081 TGA TTC TGG TAG GGG GCG GGG CCT TGC TGT GCT CAT
1117 TGC TAC CCC CCC ACC CCG TGT GTG TCT CTG CAC CTG
1153 CCC CCA GCA CAC CCC TCC CGG AGC CTG GAT GTC GCC
1189 TGG GAC TCT GGC CTG CTC ATT TTG CCC CCA GAT CAG
1225 CCC CCT CCC TCC CTC CTG FCC CAG GAC ATT TTT TAA
1261 AAG AAA AAA AGG AAA AAA AAA AAT TGG GGA GGG GGC
1297 TGG GAA GGT GCC CCA AGA TCC TCC TCG GCC CAA CCA
1333 GGT GTT TAT TCC TAT ATA TAT ATA TAT ATG TTT TGT
1369 TCT GCC TGT TTT TCG TTT TTT GGT GCG TGG CCT TTC
1405 TTC CCT CCC ACC ACC ACT CAT GGC CCC AGC CCT GCT
1441 CGC CCT GTC GGC GGG AGC AGC TGG GAA TGG GAG GAG
1477 GGT GGG ACC TTG GGT CTG TCT CCC ACC CTC TCT CCC
1513 GTT GGT TCT GTT GTC GCT CCA GCT GGC TGT ATT GCT
1549 TTT TAA TAT TGC ACC GAA GGG TTG TTT TTT TTT TTT
1585 TAA ATA AAA TTT TAA AAA AAG GAA AAA AAA AAA

```

FIG. 12B

【 13A】

196 ACC CGT CTC GGA GCG CTT GCG  
thr arg leu gly ala leu ala

217 CTG CCC CGC GGG GAC AGG CCC GGA CGG GCG CCA CCG  
leu pro arg gly asp arg pro gly arg ala pro pro

253 GCC GCC AGC GCC CGC GCG GCG CGG AAC AAG AGA GCT  
ala ala ser ala arg ala ala arg asn lys arg ala

289 GGC GAG GAG CGA GTG CTT GAA AAG GAG GAG GAG GAG  
gly glu glu arg val leu glu lys glu glu glu glu

325 GAG GAG GAG GAA GAC GAC GAG GAC GAC GAC GAC GAC  
glu glu glu glu asp asp glu asp asp asp asp asp

361 GTC GTG TCC GAG GGC TCC GAG GTG CCC GAG AGC GAT  
val val ser glu gly ser glu val pro glu ser asp

397 CGT CCC GCG GGT GCG CAG CAT CAC CAG CTG AAT GGC  
arg pro ala gly ala gln his his gln leu asn gly

433 GGC GAG CGC GGC CCG CAG ACC GCC AAG GAG CGG GCC  
gly glu arg gly pro gln thr ala lys glu arg ala

469 AAG GAG TGG TCG CTG TGT GGC CCC CAC CCT GGC CAG  
lys glu trp ser leu cys gly pro his pro gly gln

505 GAG GAA GGG CGG GGG CCG GCC GCG GGC AGT GGC ACC  
glu glu gly arg gly pro ala ala gly ser gly thr


541 CGC CAG GTG TTC TCC ATG GCG GCC TTG AGT AAG GAG  
arg gln val phe ser met ala ala leu ser lys glu

577 GGG GGA TCA GCC TCT TCG ACC ACC GGG CCT GAC TCC  
gly gly ser ala ser ser thr thr gly pro asp ser

613 CCG TCC CCG GTG CCT TTG CCC CCC GGG AAG CCA GCC  
pro ser pro val pro leu pro pro gly lys pro ala

649 CTC CCA GGA GCC GAT GGG ACC CCC TTT GGC TGC CCT  
leu pro gly ala asp gly thr pro phe gly cys pro


FIG. 13A

【 13B】

585 GCC GGG CGC AAA GAG AAG CCG GCA GAC CCC GTG GAG  
 ala gly arg lys glu lys pro ala asp pro val glu  
 721 TGG ACA GTC ATG GAC GTC GTG GAG TAC TTC ACC GAG  
 trp thr val met asp val val glu tyr phe thr glu  
 757 GCG GGC TTC CCT GAG CAA GCC ACG GCT TTC CAG GAG  
 ala gly phe pro glu gln ala thr ala phe gln glu  
 793 CAG GAG ATC GAC GGC AAG TCC CTG CTG CTC ATG CAG  
 gln glu ile asp gly lys ser leu leu leu met gln  
 829 CGC ACC GAT GTC CTC ACC GGC CTG TCC ATC CGC CTG  
 arg thr asp val leu thr gly leu ser ile arg leu  
 865 GGG CCA GCG TTG AAA ATC TAT GAG CAC CAT ATC AAG  
 gly pro ala leu lys ile tyr glu his his ile lys  
 901 GTG CTG CAG CAG GGT CAC TTC GAG GAC GAT GAC CCG  
 val leu gln gln gly his phe glu asp asp asp pro  
 937 GAA GGC TTC CTG GGA TGA GCA CAG AGC CGC CGC GCC  
 glu gly phe leu gly  
 973 CCT TGT CCC CAC CCC CAC CCC GCC TGG ACC CAT TCC  
 1009 TGC CTC CAT GTC ACC CAA GGT GTC CCA GAG GCC AGG  
 1045 AGC TGG ACT GGG CAG GCG AGG GGT GCG GAC CTA CCC  
 1081 TGA TTC TGG TAG GGG GCG GGG CCT TGC TGT GCT CAT  
 1117 TGC TAC CCC CCC ACC CCG TGT GTG TCT CTG CAC CTG  
 1153 CCC CCA GCA CAC CCC TCC CGG AGC CTG GAT GTC GCC  
 1189 TGG GAC TCT GGC CTG CTC ATT TTG CCC CCA GAT CAG  
 1225 CCC CCT CCC TCC CTC CTG TCC CAG GAC ATT TTT TAA  
 1261 AAG AAA AAA AGG AAA AAA AAA AAT TGG GGA GGG GGC  
 1297 TGG GAA GGT GCC CCA AGA TCC TCC TCG GCC CAA CCA  
 1333 GGT GTT TAT TCC TAT ATA TAT ATA TAT ATG TTT TGT  
 1369 TCT GCC TGT TTT TCG TTT TTT GGT GCG TGG CCT TTC  
 1405 TTC CCT CCC ACC ACC ACT CAT GGC CCC AGC CCT GCT  
 1441 CGC CCT GTC GGC GGG AGC AGC TGG GAA TGG GAG GAG  
 1477 GGT GGG ACC TTG GGT CTG TCT CCC ACC CTC TCT CCC  
 1513 GTT GGT TCT GTT GTC GCT CCA GCT GGC TGT ATT GCT  
 1549 TTT TAA TAT TGC ACC GAA GGG TTG TTT TTT TTT TTT  
 1585 TAA ATA AAA TTT TAA AAA AAG GAA AAA AAA AAA

FIG. 13B



【 14B】

541 GAA AAG AAG AAG GCC AAG GGT CTG GGA AAG GAG ATC  
glu lys lys lys ala lys gly leu gly lys glu ile

577 ACG CTG CTG ATG CAG ACA CTG AAC ACG CTG AGC ACC  
thr leu leu met gln thr leu asn thr leu ser thr

613 CCA GAG GAG AAG CTG GCG GCT CTG TGC AAG AAG TAT  
pro glu glu lys leu ala ala leu cys lys lys tyr

649 GCG GAA CTG CTC GAG GAG CAC CGG AAC TCG CAG AAG  
ala glu leu leu glu glu his arg asn ser gln lys

685 CAG ATG AAG CTE CTG CAG AAG AAG CAG AGC CAG CTG  
gln met lys leu leu gln lys lys gln ser gln leu

721 GTG CAG GAG AAG GAC CAC CTG CGT GGC GAG CAC AGC  
val gln glu lys asp his leu arg gly glu his ser

757 AAG GCC ATC CTG GCC CGC AGC AAG CTC GAG AGC CTG  
lys ala ile leu ala arg ser lys leu glu ser leu

793 TGC CGG GAG CTG CAG CGG CAC AAC CGC TCG CTC AAG  
cys arg glu leu gln arg his asn arg ser leu lys

829 GAA GAA GGT GTG CAG CGA GCC CGA GAG GAG GAG GAG  
glu glu gly val gln arg ala arg glu glu glu glu

865 AAG CGC AAG GAG GTG ACG TCA CAC TTC CAG ATG ACG  
lys arg lys glu val thr ser his phe gln met thr


901 CTC AAC GAC ATT CAG CTG CAG ATG GAG CAG CAC AAC  
leu asn asp ile gln leu gln met glu gln his asn

937 GAG CGC AAC TCC AAG CTG CGC CAG GAG AAC ATG GAG  
glu arg asn ser lys leu arg gln glu asn met glu

973 CTG GCC GAG CGG CTC AAG AAG CTG ATT GAG CAG TAC  
leu ala glu arg leu lys lys leu ile glu gln tyr


1009 GAG CTG CGA GAA GAG CAC ATC GAC AAA GTC TTC AAA  
glu leu arg glu glu his ile asp lys val phe lys

FIG. 14B

【 14C】

1045 CAC AAG GAT CTG CAG CAG CAG CTG GTG GAC GCC AAG  
 his lys asp leu gln gln gln leu val asp ala lys  
 1081 CTC CAG CAG GCC CAG GAG ATG CTG AAG GAG GCA GAG  
 leu gln gln ala gln glu met leu lys glu ala glu  
 1117 GAG CGG CAC CAG CGG GAG AAG GAC TTT CTC CTG AAG  
 glu arg his gln arg glu lys asp phe leu leu lys  
 1153 GAG GCC GTG GAG TCC CAG AGG ATG TGC GAG CTG ATG  
 glu ala val glu ser gln arg met cys glu leu met  
 1189 AAG CAA CAG GAG ACC CAC CTG AAG CAG CAG CTT GCC  
 lys gln gln glu thr his leu lys gln gln leu ala  
 1225 CTA TAC ACA GAG AAG TTT GAG GAG TTC CAG AAC ACT  
 leu tyr thr glu lys phe glu glu phe gln asn thr  
 1261 CTT TCC AAA AGC AGC GAG GTG TTC ACC ACA TTC AAA  
 leu ser lys ser ser glu val phe thr thr phe lys  
 1297 CAG GAA ATG GAA AAG ATG ACA AAG AAG ATC AAG AAG  
 gln glu met glu lys met thr lys lys ile lys lys  
 1333 CTG GAG AAA GAG ACC ACC ATG TAC CGT TCC CGG TGG  
 leu glu lys glu thr thr met tyr arg ser arg trp  
 1369 GAG AGC AGC AAC AAG GCC CTG CTT GAG ATG GCT GAG  
 glu ser ser asn lys ala leu leu glu met ala glu  
 1405 GAG AAA ACA CTC CGG GAC AAA GAG CTG GAA GGC CTG  
 glu lys thr leu arg asp lys glu leu glu gly leu  
 1441 CAG GTG AAA ATC CAG CGG CTG GAG AAG CTG TGC CGG  
 gln val lys ile gln arg leu glu lys leu cys arg  
 1477 GCA CTG CAG ACA GAG CGC AAT GAC CTG AAC AAG AGG  
 ala leu gln thr glu arg asn asp leu asn lys arg  
 1513 GTG CAG GAC CTG AGT GCC GGT GGC CAG GGC CCC GTC  
 val gln asp leu ser ala gly gly gln gly pro val

FIG. 14C

【 14D】


1549 TCC GAC AGC GGT CCT GAG CGG AGG CCA GAG CCC GCC  
 ser asp ser gly pro glu arg arg pro glu pro ala  
 1585 ACC ACC TCC AAG GAG CAG GGT GTC GAG GGC CCC GGG  
 thr thr ser lys glu gln gly val glu gly pro gly  
 1621 GCT CAA GTA CCC AAC TCT CCA AGG GCC ACA GAC GCT  
 ala gln val pro asn ser pro arg ala thr asp ala  
 1657 TCC TGC TGC GCA GGT GCA CCC AGC ACA GAG GCA TCA  
 ser cys cys ala gly ala pro ser thr glu ala ser  
 1693 GGC CAG ACA GGG CCC CAG GAG CCC ACC ACT GCC ACT  
 gly gln thr gly pro gln glu pro thr thr ala thr  
 1729 GCC TAG AGA GCT TGG TGC TGG GGT GTG CCA GGA AGG  
 ala  
 1765 GAG CAG GCA GCC CAG CCA GGC CTG GCC CAG CCC AGG  
 1801 CTC CCA TGC TAA GCA GTC CGG TGC TGA GGC CAG GAT  
 1837 GTT CTG ACC TGG CTG GCA CCT GAC CCT CTG CAG TCT  
 1873 TGG ATT TTG TGG GTC AGT TTT ACA TGC ATA TGG CAC  
 1909 ACA TGC AAG GCC TCA CAC ATT TGT GTC TCT AAG TGT  
 1945 ACT GTG GGC TTG CAT CGG GGG TGA CGA TGG ACA GAT  
 1981 GAA GCC AGC GGC TCC CTT GTG AGC TGA AGT CTT ACG  
 2017 GAG GAG ACG GCG TCT GCA GTG CCA TCG CAG TGA CCT  
 2053 GCA GGA CGA GTT CCT TGA GCT TTC CCT GCC TGC TTT  
 2089 GAG GCT GAG ACC CCT CCC GGC CCT TCA GAG CTC CTG  
 2125 ACA GGT GAT ACA CAC CCA GCC TTG ACC GCA CTT CTC  
 2161 TTG GGT AGC TGG GCT CTC CTA GCC TCC CCC AGA GGC  
 2197 GCC ATT GCT TCT CTT GAC TTG GAG AGG GGA TGC CCA  
 2233 GGC GTG GCC TTG GCA GGC ACT GGG AGC TAG TGA TTG  
 2269 GGC TGC TCT CCT GCC TCG AGC AGG GGC AGG AGT GTT  
 2305 TCT GGT GGG ATG ATG CGC TCG CTG GTC AGG AGC CCC  
 2341 GTG GGC GCT GCT TCC CCC GCC CTC TGG TGA TGC CAG  
 2377 GAC CAG GCC AGT GAT GCT TCT CAG TAG CCT TAC CAT  
 2413 TCA CAG GTG CCT CTC CAG CCC GCA CAG TGA GTG ACA  
 2449 AGA TCA TCC AAA GGA TTC CTT CTG AAG GTG TTC GTT  
 2485 TCG TTT TGT TTT GTT GCA CGT GAC GGT TTG TAT TGA  
 2521 GGA CCC TCT GAG GAA GAG GGG TGC TGT AGC AGT GGT  
 2557 CCC TGC GTG CCT GGC TCC AGT GTC CTG CCC TCC CCC  
 2593 CCC TCG CCA TGG CTC CTC GGC CGC CTT GGT GCT GAG  
 2629 GTT TCT GTT TGG TGA GAT CAG GTT GTC TGT TCA GAG

FIG. 14D

## 【图14E】

2665 AGA AGA GGC GTC TGA TGG CTT TGC CGC CAG CTT GCC  
 2701 TGC GGG CCT CAA TCC CGG GAG GCC GCC CGG TTC CCG  
 2737 TCA CTG TTG TCC CCG TGC AGT GCG TTG CTG GTC CCC  
 2773 AGG ACC AGC TGC TCG TTT GCT GTA TGG GTC AGT TTC  
 2809 TGC TTC CTG CCC CCC ACT CCA CCT AAC TGC AAT CCT  
 2845 TGG GGT TTC CCT GGT TCT CGT CCC TGG TAC CTC TGT  
 2881 GCC CAA GAA GTA GCC TTC TTT GGG ATT CTT GTT CTG  
 2917 CCC ATG CGG GAG CTG CTG CTG TCT GAC AGG TGA GGC  
 2953 CTG AGA CTC AGC GGC TGA CAG AGC TGC AGA GCT CTG  
 2989 CAC GGT GGC TCC CGG GGC GGC CTC TGT GTG CTG CAC  
 3025 ACC GCT GCT CTG CTG GCA CTG GCC AGT CTG TGC AGA  
 3061 GCA TTT GAG TAC TGG CTC AGG AGG GAG GGC TCT GCT  
 3097 GGC CTC GAG GGA CAG CGC CAC GTC TCC AGC TGG GCT  
 3133 CAG GGA GAG CCC CAG ACT GGC TGC GTA GGG TGC TTG  
 3169 GGG TTT GCT TCT TGC AGT ATT TCT TGG AAG CTG TTT  
 3205 TGT TGT CCT GCT ATT CCT TCA TCT TCC ACA GTC CAC  
 3241 GCT CAG CCT TTA ACT TGG ATC CCT CAC ATA ACA GGG  
 3277 TTC ATG AGA CCC GCA AGT ACG CCC AAG CTA CGT ATG  
 3313 GCT GAG GCC AGC TGG CAG GTG AAT GGC ACG CCA TTG  
 3349 CTG CTG CTA ATC CCT GGC ATA TCT TTA GTT CAC CTC  
 3385 GAA ATG CCC CCG CCA CAG TGC AAG CAG TGA GTC CAC  
 3421 GTG CCA CCC TGG GCT GAA TCC CAC CCC CTG TGA GTG  
 3457 TTG CCC GAG ATT GTG TCT CTT CTG AAT GCC TTC ACT  
 3493 GGG AAT GGC CTC TGC CGC CTC CTG CTC AGG GAG GCT  
 3529 TTC CCC TTC CCT CAG CCC CTG TGC CAG ACT GAG GTA  
 3565 CAA GAA CCG CCA AGC CCA TGC AAG GTG TGG CTA GGC  
 3601 GCC AGG GTG CAG GAA GGA GGC AGG TAG CTG CCT GCA  
 3637 CCC TTG AAA GCC AAG AGG CCT ACG GTG GCC TCC ATC  
 3673 CTG GCT TGC CTC ACT TCA GCT ACC TCG CAT AGC CCA  
 3709 GGG GTG GGG CTA TTG GAT TCC AGG GTG GGG GGA TGG  
 3745 GAA GCT GCA GGG GGC AGG TGG CTC TCA CTA GGC TTC  
 3781 CCA GCT CAG GAA TGT GGG CCT CAG GTA GGG GAG AGC  
 3817 CTT TGC TCC ACT CCA CCC ATT TGC AGG CAT CTA GGC  
 3853 CAG TCT AGA TGG CGA CCC CTT CTC TTC CTC TCC ATT  
 3889 GAC CAA ATC GTA CCT GTC TCT CCA GCT GCT CGC TTG  
 3925 CTC TGC TTT CCA AAG TCA GCC CAG GTA CCC AGG TGC  
 3961 CGC CCA CAT TGG CCT GGA ACC TGG ACC AGA GGC AAG  
 3997 GGA GGT GGC CTA TCC TTG AGT GAT AGC CAG TGC CTT  
 4033 CCT CAC CCG GTG GCT TCC ATG CCT GTG ACC TCA GAT  
 4069 TTA GGA CCA AGA GCT GTG TTG GTT TCT TAC GTT GTG  
 4105 AGC TTT CCC TCC AGG GGA CCA CAG CAG GTG AGG CTC  
 4141 GGA GCC CAG AGC CCT TGG CGC CGC CAG CAG TAA CTT  
 4177 GTG TCC GGA CCT TGT CCA GCT GAG CGC TTC GTG TAT

FIG. 14E

【 14F】

```
4213 GAC TCA GCT TCG TGT GTG AGT CCA GCG GAG TGC GTC
4249 ACG TGA CCT AGA CTC AGC GGT GTC AGC CGC ACT TTG
4285 ATT TGT TTG TTT TCC ATG AGG TTT TTG GAC CAT GGG
4321 CTT AGC TCA GGC AAC TTT TCT GTA AGG AGA ATG TTA
4357 ACT TTC TGT AAA GAT GCT TAT TTA ACT AAC GCC TGC
4393 TTC CCC CAC TCC CAA CCA GGT GGC CAC CGA GAG CTC
4429 ACC AGG AGG CCA ATA GAG CTG CTC CAG CTC TCC CAT
4465 CTT GCA CCG CAC AAA GGT GGC CGC CCC AGG GAC AGC
4501 CAG GCA CCT GCC TGG GGG AGG GGC TTC TCT TCC TTA
4537 TGG CCT GGC CAT CTA GAT TGT TTA AAG TTG TGC TGA
4573 CAG CTT TTT TTG GTT TTT TGG TTT TTG TTT TTG TTT
4609 TTG TTT TTG TTT TTG TCT ACT TTT GGT ATT CAC AAC
4645 AGC CAG GGA CTT GAT TTT GAT GTA TTT TAA GCC ACA
4681 TTA AAT AAA GAG TCT GTT GCC TTA AAA AAA AAA AAA
4717 AAA AAA
```

FIG. 14F

## 【図15A】

```

1   GAC GCC TCA GAG CCG AAC AGG GAA GTG AAT CAG GCG
37  CCG GGT AGT GGG TTG CTG GGC TGG GCT TGC TGA GGT
73  AGA GGC AGC GCC AAG AAG AGG CCT TTG CCG CTG GTC
109 GGG ATT GGG ATG TCG AAG AAC ACA GTG TCG TCG GCC
      met ser lys asn thr val ser ser ala

145 CGC TTC CGG AAG GTG GAC GTG GAT GAA TAT GAC GAG
      arg phe arg lys val asp val asp glu tyr asp glu

181 AAC AAG TTC GTG GAC GAA GAA GAT GGG GGC GAC GGC
      asn lys phe val asp glu glu asp gly gly asp gly

217 CAG GCC GGG CCC GAC GAG GGC GAG GTG GAC TCC TGC
      gln ala gly pro asp glu gly glu val asp ser cys

253 CTG CGG CAA GGA AAC ATG ACA GCT GCC CTA CAG GCA
      leu arg gln gly asn met thr ala ala leu gln ala

289 GCT CTG AAG AAC CCC CCT ATC AAC ACC AAG AGT CAG
      ala leu lys asn pro pro ile asn thr lys ser gln

325 GCA GTG AAG GAC CGG GCA GGC AGC ATT GTC TTG AAG
      ala val lys asp arg ala gly ser ile val leu lys

351 GTG CTC ATC TCT TTT AAA GCT AAT GAT ATA GAA AAG
      val leu ile ser phe lys ala asn asp ile glu lys

397 GCA GTT CAA TCT CTG GAC AAG AAT GGT GTG GAT CTC
      ala val gln ser leu asp lys asn gly val asp leu

433 CTA ATG AAG TAT ATT TAT AAA GGA TTT GAG AGC CCG
      leu met lys tyr ile tyr lys gly phe glu ser pro

469 TCT GAC AAT AGC AGT GCT ATG TTA CTG CAA TGG CAT
      ser asp asn ser ser ala met leu leu gln trp his

505 GAA AAG GCA CTT GCT GCT GGA GGA GTA GGG TCC ATT
      glu lys ala leu ala ala gly gly val gly ser ile

541 GTT CGT GTC TTG ACT GCA AGA AAA ACT GTG TAG TCT
      val arg val leu thr ala arg lys thr val


```

FIG. 15A

## 【図 15 B】


577 GGC AGG AAG TGG ATT ATC TGC CTC GGG AGT GGG AAT  
 613 TGC TGG TAC AAA GAC CAA AAC AAC CAA ATG CCA CCG  
 649 CTG CCC TGT GGG TAG CAT CTG TTT CTC TCA GCT TTG  
 685 CCT TCT TGC TTT TTC ATA TCT GTA AAG AAA AAA ATT  
 721 ACA TAT CAG TTG TCC CTT TAA TGA AAA TTG GGA TAA  
 757 TAT AGA AGA AAT TGT GTT AAA ATA GAA GTG TTT CAT  
 793 CCT TTC AAA ACC ATT TCA GTG ATG TTT ATA CCA ATC  
 829 TGT ATA TAG TAT AAT TTA CAT TCA AGT TTT AAT TGT  
 865 GCA ACT TTT AAC CCT GTT GGC TGG TTT TTG GTT CTG  
 901 TTT GGT TTT GTA TTA TTT TTA ACT AAT ACT GAA AAA  
 937 TTT GGT CAG AAT TTG AGG CCA GTT TCC TAG CTC ATT  
 973 GCT AGT CAG GAA ATG ATA TTT ATA AAA AAT ATG AGA  
 1009 GAC TGG CAG CTA TTA ACA TTG CAA AAC TGG ACC ATA  
 1045 TTT CCC TTA TTT AAT AAG CAA AAT ATG TTT TTG GAA  
 1081 TAA GTG GTG GGT GAA TAC CAC TGC TAA GTT ATA GCT  
 1117 TTG TTT TTG CTT GCC TCC TCA TTA TCT GTA CTG TGG  
 1153 GTT TAA GTA TGC TAC TTT CTC TCA GCA TCC AAT AAT  
 1189 CAT GGC CCC TCA ATT TAT TTG TGG TCA CGC AGG GTT  
 1225 CAG AGC AAG AAG TCT TGC TTT ATA CAA ATG TAT CCA  
 1261 TAA AAT ATC AGA GCT TGT TGG GCA TGA ACA TCA AAC  
 1297 TTT TGT TCC ACT AAT ATG GCT CTG TTT GGA AAA AAC  
 1333 TGC AAA TCA GAA AGA ATG AAT TGC AGA AAG AAA GAA  
 1369 AAA CTA TGG TGT AAT TTA AAC TCT GGG CAG CCT CTG  
 1405 AAT GAA ATG CTA CTT TCT TTA GAA ATA TAA TAG CTG  
 1441 CCT TAG ACA TTA TGA GGT ATA CAA CTA GTA TTT AAG  
 1477 ATA CCA TTT AAT ATG CCC GGT AAA TGT CTT CAG TGT  
 1513 TCT TCA GGG TAG TTG GGA TCT CAA AAG ATT TGG TTC  
 1549 AGA TCC AAA CAA ATA CAC ATT CTG TGT TTT AGC TCA  
 1585 GTG TTT TCT AAA AAA AGA AAC TGC CAC ACA GCA AAA  
 1621 AAT TGT TTA CTT TGT TGG ACA AAC CAA ATC AGT TCT  
 1657 CAA AAA ATG ACC GGT GCT TAT AAA AAG TTA TAA ATA  
 1693 TCG AGT AGC TCT AAA ACA AAC CAC CTG ACC AAG AGG  
 1729 GAA GTG AGC TTG TGC TTA GTA TTT ACA TTG GAT GCC  
 1765 AGT TTT GTA ATC ACT GAC TTA TGT GCA AAC TGG TGC  
 1801 AGA AAT TCT ATA AAC TCT TTG CTG TTT TTG ATA CCT  
 1837 GCT TTT TGT TTC ATT TTG TTT TGT TTT GTA AAA ATG  
 1873 ATA AAA CTT CAG AAA ATA AAA TGT CAG TGT TGA ATA  
 1909 ATT AAA AAA AAA AAA AA

FIG. 15B

【 16A】

1 GAA GAG CGA GTA CTT GAG AAA GAA GAG GAA GAA GAT  
 glu glu arg val leu glu lys glu glu glu glu asp  
 37 GAT GAT GAA GAT GAA GAT GAA GAA GAT GAT GTG TCA  
 asp asp glu asp glu asp glu glu asp asp val ser  
 73 GAG GGC TCT GAA GTG CCC GAG AGT GAC CGT CCT GCA  
 glu gly ser glu val pro glu ser asp arg pro ala  
 109 GGT GCC CAG CAC CAC CAG CTT AAC GGC GAG CCG GGA  
 gly ala gln his his gln leu asn gly glu arg gly  
 145 CCT CAG AGT GCC AAG GAG AGG GTC AAG GAG TGG ACC  
 pro gln ser ala lys glu arg val lys glu trp thr  
 181 CCC TGC GGA CCG CAC CAG GGC CAG GAT GAA GGG CCG  
 pro cys gly pro his gln gly gln asp glu gly arg  
 217 GGG CCA GCC CCG GGC AGC GGC ACC CGC CAG GTG TTC  
 gly pro ala pro gly ser gly thr arg gln val phe  
 253 TCC ATG GCA GCC ATG AAC AAG GAA GGG GGA ACA GCT  
 ser met ala ala met asn lys glu gly gly thr ala  
 289 TCT GTT GCC ACC GGG CCA GAC TCC CCG TCC CCC GTG  
 ser val ala thr gly pro asp ser pro ser pro val  
 325 CCT TTG CCC CCA GGC AAA CCA GCC CTA CCT GGG GCC  
 pro leu pro pro gly lys pro ala leu pro gly ala  
 361 GAC GGG ACC CCC TTT GGC TGT CCT CCC GGG CGC AAA  
 asp gly thr pro phe gly cys pro pro gly arg lys  
 397 GAG AAG CCA TCT GAT CCC GTC GAG TGG ACC GTG ATG  
 glu lys pro ser asp pro val glu trp thr val met  
 433 GAT GTC GTC GAA TAT TTT ACT GAG GCT GGA TTC CCG  
 asp val val glu tyr phe thr glu ala gly phe pro  
 469 GAG CAG GCG ACA GCT TTC CAA GAG CAG GAA ATT GAT  
 glu gln ala thr ala phe gln glu gln glu ile asp

FIG. 16A

【 16 B】

505 GGC AAA TCT TTG CTG CTC ATG CAG CGC ACA GAT GTG  
 gly lys ser leu leu leu met gln arg thr asp val  
  
 541 CTC ACC GGC CTG TCC ATC CGC CTC GGG CCA GCC CTG  
 leu thr gly leu ser ile arg leu gly pro ala leu  
  
 577 AAA ATC TAC GAG CAC CAC ATC AAG GTG CTT CAG CAA  
 lys ile tyr glu his his ile lys val leu gln gln  
  
 613 GGC CAC TTT GAG GAT GAT GAC CCC GAT GGC TTC TTA  
 gly his phe glu asp asp asp pro asp gly phe leu  
  
 649 GGC TGA GCG CCC AGC CTC ACC CCT GCC CCA GCC CAT  
 gly  
  
 685 TCC GGC CCC CAT CTC ACC CAA GAT CCC CCA GAG TCC  
 721 AGG AGC TGG ACG GGG ACA CCC TCA GCC CTC ATA ACA  
 757 GAT TCC AAG GAG AGG GCA CCC TCT TGT CCT TAT CTT  
 793 TGC CCC TTG TNT CTG TCT CAC ACA CAT CTG CTC CTC  
 829 AGC ACG TCG GTG TGG GGA GGG GAT TGC TCC TTA AAC  
 865 CCC AGG TGG CTG ACC CTC CCC ACC CAG TCC AGG ACA  
 901 TTT TAG GAA AAA AAA AAT GAA ATG TGG GGG GCT TCT  
 937 CAT CTC CCC AAG ATC CTC TTC CGT TCA GCC AGA TGT  
 973 TTC CTG TAT AAA TGT TTG GAT CTG CCT GTT TAT TTT  
 1009 GGT GGG TGG TCT TTC CTC CCT CCC CTA CCA CCC ATG  
 1045 CCC CCC TTC TCA GTC TGC CCC TGG CCT CCA GCC CCT  
 1081 AGG GGA CTA GCT GGG TTG GGG TTC CTC GGG CCT TTT  
 1117 CTC TCC TCC CTC TTT TCT TTC TGT TGA TTG TCG CTC  
 1153 CAG CTG GCT GTA TTG CTT TTT AAT ATT GCA CCG AAG  
 1189 GTT TTT TAA ATA AAA TTT TA

FIG. 16B

## 【図17A】

```

1   CA AAA AGC AGC CCA GGA CAA CCG GAA GCA GGA CCC GAG GGA GCC
    lys ser ser pro gly gln pro glu ala gly pro glu gly ala

45  CAG GAG CGG CCC AGC CAG GCG GCT CCT GCA GTA GAA GCA GAA GGT
    gln glu arg pro ser gln ala ala pro ala val glu ala glu gly

90  CCC GGC AGC AGC CAG GCT CCT CGG AAG CCG GAG GGG GCT CAA GCC
    pro gly ser ser gln ala pro arg lys pro glu gly ala gln ala

135 AGA ACG GCT CAG TCT GGG GCC CTT CGT GAT GTC TCT GAG GAG CTG
    arg thr ala gln ser gly ala leu arg asp val ser glu glu leu

180 AGC CGC CAA CTG GAA GAC ATA CTG AGC ACA TAC TGT GTG GAC AAT
    ser arg gln leu glu asp ile leu ser thr tyr cys val asp asn

225 AAC CAG GGG GGC CCC GGC GAG GAT GGG GCA CAG GGT GAG CCC GCT
    asn gln gly gly pro gly glu asp gly ala gln gly glu pro ala

270 GAA CCC GAA GAT GCA GAG AAG TCC CGG ACC TAT GTG GCA AGG AAT
    glu pro glu asp ala glu lys ser arg thr tyr val ala arg asn

315 GGG GAG CCT GAA CCA ACT CCA GTA GTC TAT GGA GAG AAG GAA CCC
    gly glu pro glu pro thr pro val val tyr gly glu lys glu pro

360 TCC AAG GGG GAT CCA AAC ACA GAA GAG ATC CGG CAG AGT GAC GAG
    ser lys gly asp pro asn thr glu glu ile arg gln ser asp glu

405 GTC GGA GAC CGA GAC CAT CGA AGG CCA CAG GAG AAG AAA AAA GCC
    val gly asp arg asp his arg arg pro gln glu lys lys lys ala

450 AAG GGT TTG GGG AAG GAG ATC ACG TTG CTG ATG CAG ACA TTG AAT
    lys gly leu gly lys glu ile thr leu leu met gln thr leu asn

495 ACT CTG AGT ACC CCA GAG GAG AAG CTG GCT GCT CTG TGC AAG AAG
    thr leu ser thr pro glu glu lys leu ala ala leu cys lys lys

540 TAT GCT GAA CTG CTG GAG GAG CAC CGG AAT TCA CAG AAG CAG ATG
    tyr ala glu leu leu glu glu his arg asn ser gln lys gln met


585 AAG CTC CTA CAG AAA AAG CAG AGC CAG CTG GTG CAA GAG AAG GAC
    lys leu leu gln lys lys gln ser gln leu val gln glu lys asp

630 CAC CTG CGC GGT GAG CAC AGC AAG GCC GTC CTG GCC CGC AGC AAG
    his leu arg gly glu his ser lys ala val leu ala arg ser lys

675 CTT GAG AGC CTA TGC CGT GAG CTG CAG CGG CAC AAC CGC TCC CTC
    leu glu ser leu cys arg glu leu gln arg his asn arg ser leu

```

FIG. 17A

【 17B】


720 AAG GAA GAA GGT GTG CAG CGG GCC CGG GAG GAG GAG GAG AAG CGC  
 lys glu glu gly val gln arg ala arg glu glu glu glu lys arg  
 765 AAG GAG GTG ACC TCG CAC TTC CAG GTG ACA CTG AAT GAC ATT CAG  
 lys glu val thr ser his phe gln val thr leu asn asp ile gln  
 810 CTG CAG ATG GAA CAG CAC AAT GAG CGC AAC TCC AAG CTG CGC CAA  
 leu gln met glu gln his asn glu arg asn ser lys leu arg gln  
 855 GAG AAC ATG GAG CTG GCT GAG AGG CTC AAG AAG CTG ATT GAG CAG  
 glu asn met glu leu ala glu arg leu lys lys leu ile glu gln  
 900 TAT GAG CTG CGC GAG GAG CAT ATC GAC AAA GTC TTC AAA CAC AAG  
 tyr glu leu arg glu glu his ile asp lys val phe lys his lys  
 945 GAC CTA CAA CAG CAG CTG GTG GAT GCC AAG CTC CAG CAG GCC CAG  
 asp leu gln gln gln leu val asp ala lys leu gln gln ala gln  
 990 GAG ATG CTA AAG GAG GCA GAA GAG CGG CAC CAG CGG GAG AAG GAT  
 glu met leu lys glu ala glu glu arg his gln arg glu lys asp  
 1035 TTT CTC CTG AAA GAG GCA GTA GAG TCC CAG AGG ATG TGT GAG CTG  
 phe leu leu lys glu ala val glu ser gln arg met cys glu leu  
 1080 ATG AAG CAG CAA GAG ACC CAC CTG AAG CAA CAG CTT GCC CTA TAC  
 met lys gln gln glu thr his leu lys gln gln leu ala leu tyr  
 1125 ACA GAG AAG TTT GAG GAG TTC CAG AAC ACA CTT TCC AAA AGC AGC  
 thr glu lys phe glu glu phe gln asn thr leu ser lys ser ser  
 1170 GAG GTA TTC ACC ACA TTC AAG CAG\_GAG ATG GAA AAG ATG ACT AAG  
 glu val phe thr thr phe lys gln glu met glu lys met thr lys  
 1215 AAG ATC AAG AAG CTG GAG AAA GAA ACC ACC ATG TAC CGG TCC CGG  
 lys ile lys lys leu glu lys glu thr thr met tyr arg ser arg  
 1260 TGG GAG AGC AGC AAC AAG GCC CTG CTT GAG ATG GCT GAG GAG AAA  
 trp glu ser ser asn lys ala leu leu glu met ala glu glu lys  
 1305 ACA GTC CGG GAT AAA GAA CTG GAG GGC CTG CAG GTA AAA ATC CAA  
 thr val arg asp lys glu leu glu gly leu gln val lys ile gln  
 1350 CGG CTG GAG AAG CTG TGC CGG GCA CTG CAG ACA GAG CGC AAT GAC  
 arg leu glu lys leu cys arg ala leu gln thr glu arg asn asp  
 1395 CTG AAC AAG AGG GTA CAG GAC CTG AGT GCT GGT GGC CAG GGC TCC  
 leu asn lys arg val gln asp leu ser ala gly gly gln gly ser  
 1440 CTC ACT GAC AGT GGC CCT GAG AGG AGG CCA GAG GGG CCT GGG GCT  
 leu thr asp ser gly pro glu arg arg pro glu gly pro gly ala

FIG. 17B

## 【図 17C】

1485 CAA GCA CCC AGC TCC CCC AGG GTC ACA GAA GCG CCT TGC TAC CCA  
 gln ala pro ser ser pro arg val thr glu ala pro cys tyr pro  
 1530 GGA GCA CCG AGC ACA GAA GCA TCA GGC CAG ACT GGG CCT CAA GAG  
 gly ala pro ser thr glu ala ser gly gln thr gly pro gln glu  
 1575 CCC ACC TCC GCC AGG GCC TAG AGA GCC TGG TGT TGG GTC ATG CTG  
 pro thr ser ala arg ala \*\*\*  
 1620 GGA AGG GAG CGG CAG CCC AGC CAG GCC TGG CCC ATA AAA GGC TCC  
 1665 CAT GCT GAG CAG CCC ATT GCT GAA GCC AGG ATG TTC TTG ACC TGG  
 1710 CTG GCA TCT GGC ACT TGC AAT TTT GGA TTT TGT GGG TCA GTT TTA  
 1755 CGT ACA TAG GGC ATT TTG CAA GGC CTT GCA AAT GCA TTT ATA CCT  
 1800 GTA AGT GTA CAG TGG GCT TGC ATT GGG GAT GGG GGT GTG TAC AGA  
 1845 TGA AGT CAG TGG CTT GTC TGT GAG CTG AAG AGT CTT GAG AGG GGC  
 1890 TGT CAT CTG TAG CTG CCA TCA CAG TGA GTT GGC AGA AGT GAC TTG  
 1935 AGC ATT TCT CTG TCT GAT TTG AGG CTC AGA CCC CTC CCT GCC CTT  
 1980 TCA GAG CTC AAA ACA AGT AAT ACA CCA AGG TCT TGA CTG CAT TTG  
 2025 TCT TGT GAG CAG GGC TTG CTT GGT CAG CTC AGG CCC TCC TAG CTG  
 2070 CTT GGA GGC TCC TTT GAT TCT CTA CAC CTG GAA AAG GTG TCC CTA  
 2115 GGC AGA GCC CTG GCA GGG CGC TCA GAG CTG GGA TTT CCT GCC TGG  
 2160 AAC AAG GGA CCT GGA GAA TGT TTT TGC GTG GGA TGA TGT GCT GGT  
 2205 CAG GAG CCC CTT GGG CAT CGC TTC CCC TGC CCT TTG GTA GTG CCA  
 2250 GGA CCA GGC CAA TGA TGC TTC TCA GTA GCC TTA TCA TTC ACA GGT  
 2295 GCC TCT CTA GCC TGC ACA AAT GAT TGA CAA GAG ATC ACC CAA AGG  
 2340 ATT ATT TCT GAA GGT GTT TTT TTC TTT ATT TCT TTT TCT TTT TTT  
 2385 TTT TTT CTT TTT CTT TTT TTT TTG CAC ATG ACA GTG TTT GTA TTG  
 2430 AGG ACC TTC CAA GGA AAA GGG ATG CTG TAC CAG TGG TGC CTG GGT  
 2475 GCC TGG CCT CCA GTG TCC CAC CTC CTT CAC CAC CCC ACT TGG CTC  
 2520 CTT TGC CAT CTT GAT GCT GAG GTT TCC TGT TTG GTG AGA TCA GGT  
 2565 TGT TTG TGG TAA AAG AAA GGA AAG GGC TTC TGA TGG CTT TGC CAC  
 2610 AAG CTT ACC TGT GGG TTT CAG TCC TGA GAG GCC ACC ACC AGT TCC  
 2655 CAT CAG CAC TGT CTC CAT GCA GCA GTT GCT GGG TCC CAT GTC CAG  
 2700 CTG CCT CTT TGG CTT CAT GGG TTT TTC TGC TTC CTG CCC CCA CCC  
 2745 CCA CAT GTG CAA TCC TCA AGA TTT GTC CTG ATT CTA TTT CCT GGC  
 2790 ACC TCC CTG CCT GTC CTT GGG GAT TCT ACT TCT TCC TGT GTG GGG  
 2835 CCC ATA GCT GTT GTC TAA CAG GTA AGA AAT GAA ATT GAA CTA TTG  
 2880 ACT GGG CCC CAG AAA TCC ATA AAA TGG CTG CAG ACA GTT GTT TCT  
 2925 GTG TCC TGT TCT ACC CCC ACT CCA GTA CAT AAC TAC TAT GTA CTG  
 2970 TGT AGA GCC ATT CTA TAT GCT GAA TGT TCT GCT GTT GCA AAC TTG  
 3015 CCA GGG TAT TAG CCA GTG TTT GTG CCA AGC AGT TTT CGG GGA CAA  
 3060 CAG AAT GAC TCA GAC CAA GAT GGA TAG GAT GGT TAG GGC TTT GCT  
 3105 TCT TGC TGT TTT TCT TTG AAC TAG TCA TTG TCC TGC AGG TCC CTT  
 3150 CAT CTT CCA TAC CTA GCC CAC TCT TTT AGC CCT TAC CTT AAA TCT  
 3195 CTC AGA TAA GTT GGT TCA CAA AGA ATG TTA AGT ACT GAA TCA TGT  
 3240 GTG ACT GAG ACC AGA GAT GGC AAA TGA ATG GCA CAC CAT TTC TCC  
 3285 TTC TCC TGC CCC AGG GCA GGT ACC ACT GAT CTG CAT CAG AGT TGC  
 3330 CTG CTA TTC TCT GGT GTA TCC TTC ACA TCT AGG TGC CCT CAA GCA  
 3375 GCT GTG TGA GTG TTG AGA TCT CTG CCA TCT CTG GCT GAG ATA CTG  
 3420 CTG TCC TGT GAA GTG TTT CCC ATG ACC TTT TTC TTC CCC TTT GAA  
 3465 TCC CTC TTG TCT GGA GTA GTC CTT GCC TTC TTC TTG CTC CAG TAG

FIG. 17C


【 17 D】

```

3510 GCC TTT TCC TTA CCC CAG CCC TTG TGC CAG GCT AAG CTG GTA CAA
3555 GAG CTG CCA ACT CAC AGA GTT TTG CTA GGC GAG AGA GGT GCA GGG
3600 AAG AGG CAG AGG TAT GCA CCT TCC CCC TTG AAG AGA GGG GAA AGG
3645 CCT ACA GTG GCC CAC ATA ATT GCC TGA CTC ACA CTT CAG CTA CCT
3690 CTT AAT GCC TGT GGA GGG ACT GGA GCT GCT GGA TCC CAG TGT GGT
3735 GGT GTA GGA GGC CAC AGT GAG CAG GTG GCC CCA GCT GGG TTT CCC
3780 AGG TCA GGA ATG TGG GCC CCA GGC AAG GTG CAG CCT TTG CTC ACA
3825 GCT CCA TCC ATG TCT AGA CCT TCA GGC CAG TCT GCA GAT GAG GTT
3870 CCC TAC CTT TTT CTT CTC TTC ATT GAC CAA ATC AAC CAA TCA CTA
3915 CAG CTG CTC TGC TTC TGC TTT CCA AAG TAG CCC AGG TCC TGG GCC
3960 AGA TGC AGG GGA GGT GCC TAT CCA TGA GTG AAG GCC AGT GTC TTC
4005 CTC ACC TGG GTG GTC CCA CAC TTG TGA CCC TCA GTT TTA GGA CCC
4050 AAG ATC TGT GTT GGT TTC TTA GAT TGC TAG CTT TTC CTC CAG GGG
4095 ACC ACA GCA GGT GAA GCT CAA GAG CGC ATG GCT CTG CTA ATA GTA
4140 AAT TGT TTT CAG GGC CTT GTC CAG CTG AGA GCT TCA TGT CCA CCA
4185 GAT TCT GAG AGG TGT CAG CAG CAC TTT TTT TTA TTT GTT GTT
4230 TGT TTT CCA TGA GGT TAT CGG ACC ATG GGC TGA GCT CAG GCA CTT
4275 TCT GTA GGA GAC TGT TAT TTC TGT AAA GAT GGT TAT TTA ACC CTC
4320 CTC CAC CCC ATC ACG GTG GCC CTG AGG GCT GAC CCG GAG GCC AGT
4365 GGA GCT GCC TGG TGT CCA CCG GGG AGG GCC AAG GCC TGC TGA GCT
4410 GAT TCT CCA GCT GCT GCC CCA GCC TTT CCG CCT TGC ACA GCA CAG
4455 AGG TGG TCA CCC CAG GGA CAG CCA GGC ACC TGC TCC TCT TGC CCT
4500 TCC TGG GGG AAA GGA GCT GCC TTC TGT CCC TGT AAC TGC TTT CCT
4545 TAT GGC CCA ACC CGG CCA CTC AGA CTT GTT TGA AGC TGC ACT GGC
4590 AGC TTT TTT GTC TCC TTT GGG TAT TCA CAA CAG CCA GGG ACT TGA
4635 TTT TGA TGT ATT TTA AAC CAC ATT AAA TAA AGA GTC TGT TGC CTT
4680 AAA AAA AAA AAA AAA AAA

```

FIG. 17D

【 18】


```

GTG GAC GTG GAT GAG TAC GAC GAG AAC AAG TTC GTG
val asp val asp glu tyr asp glu asn lys phe val

GAC GAG GAA GAC GGC GGC GAC GGC
asp glu glu asp gly gly asp gly

```

FIG. 18

【 19】

```

1 50
Rabbit MSKNTVSSAR FRKVDVDEYD ENKFVDEEDG GDGQAGPDEG EVDSCLRQGN
Human .....

51 100
Rabbit MTAALQAALK NPPINTRSQA VKDRAGSIVL KVLISFKAGD IEKAVQSLDR
Human .....K.....N.....K

101 150
Rabbit NGVDLLMKYI YKGFESPSDN SSAVLLQWHE KALAAGGVGS IVRVLTARKT
Human .....M.....

151
Rabbit V
Human .

```

FIG. 19

## 【図 20】

	1		50
Rabbit	EERVLEKEEE	EEEEDEDED	DDDVVSEGSE VPESDRPAGA QHHQLNGGER
Human	.....	.DDD..EDEE	.....
	51		100
Rabbit	GPQTAKERAK	EWSLCGPHPG	QEEGRGPAAG SGTRQVFSMA ALSKEGGSAS
Human	...S....V.	..TP....Q.	.D.....P. ....MN....T..
	101		150
Rabbit	STTGPDSPP	VPLPPGKPAL	PGADGTPFGC PAGRKEKPAD PVEWTVMDVV
Human	VA.....	.....	.....P.....S. ....
	151		200
Rabbit	EYFTEAGFPE	QATAFQEQEI	DGKSLLLMQR TDVLTGLSIR LGPALKIYEH
Human	.....	.....	.....
	201	220	
Rabbit	HIKVLQOGHF	EDDDPEGFLG	
Human	.....	.....D....	

FIG. 20

## 【図 21】

	1	50
Rabbit	MKNQDKKNGA AKQPNPKSSP GQPEAGAEGA QGRPGRPAPA REAEG-ASSQ	
Human	-----P... .E..SQA... V...PG...	
	51	100
Rabbit	APGRPEGAQA KTAQPGALCD VSEELSRQLE DILSTYCVDN NQGAPGEDGV	
Human	..RK..... R...S...R. ....G.....A	
	101	150
Rabbit	QGPEPEPEDA EKSRAYVARN GEPEPGTPVV NGEKETSKEAE PGTEEIRTS	
Human	....A..... .T..... Y...P..GD .N....Q..	
	151	200
Rabbit	EVGDRDHRRP QEKKKAKGLG KEITLLMOTL NTLSTPEEKL AALCKKYAEL	
Human	.....	
	201	250
Rabbit	LEEHRNSQKQ MKLLQKQSQ LVQEKDHLRG EHSKAILARS KLESLCRELQ	
Human	.....V.....	
	251	300
Rabbit	RHNRSLKEEG VQRAREEEEK RKEVTSHFQM TLNDIQLQME QHNERNKSLR	
Human	.....V.....	
	301	350
Rabbit	QENMELAERL KKLIEQYELR EEHIDKVKFH KDLQQQLVDA KLQQAQEMLK	
Human	.....	
	351	400
Rabbit	<del>EA</del> ERHQREK DFLLEAVES QRMCELMKQQ ETHLKOQLAL YTEKFEEFQN	
Human	.....	
	401	450
Rabbit	TLKSSSEVFT TFKQEMKMT KKIkkLEKET TMYRSRWESS NKALLEMAEE	
Human	.....	
	451	500
Rabbit	KTLRDKLEEG LQVKIQRLEK LCRALQTERN DLNKRVDLS AGGQGPVSDS	
Human	..V.....SLT..	
	501	550
Rabbit	GPERRPEPAT TSKEQVVEGP GAQVPNSPRA TDASCCAGAP STEASGQTGP	
Human	.....A.S...V .E.P.YP.....	
	551	
Rabbit	QEPTTATA	
Human	....S.R.	

FIG. 21

【図 22A】

1	AAGCTTTATAAAGATTTAACTACCTAATAAGGTAGAGAAGTAATTTATGTGCCACTAAA	60
61	AAATACTCAATTTCTGAATGTTCTGCCAAAATTAACCTGTGAGATCATTAATCATTGAC	120
121	TAGAAACACGTTGAGTACCTATTATGTACTAGGCACCTTAGATCATTGTGAGACAATAAAA	180
181	AATACTGCATTAGAAAAGGACATTTTCACATCTTAAATGCAATAAGCATTATTTGGCTG	240
241	GCAGTTAATTACATTTAACACATTAAACATATAGAGCAAAAATCTGAGCAATCAAAATAA	300
301	TTATACCCTTGAGCAATCGATTATTTAAATTTCTTTTCACTATTCCCTTAAGCTGATTTCT	360
361	ACTCTGGGATTTCTTCATAGTTCTCAAAATAAGAAAATAAAAAATTTCCATAAATAAGGCAA	420
421	TACAAAAGAAATAGAAATGTAAGAGAAGAGATATATTAGCTCTTGAATCCCTGTTCCATT	480
481	TGCTGTCAATAGTGCCTCTAATGTTTCGATTTTCTCTTCAAGAAAAATCTTGATTTAAAA	540
541	GGAAGAAAAGTACAATCACCTTAAACAGCTAAAGTATACTGATTAGCATCTACTAAAGT	600
601	TAGCAAAGACTGAAACTGAAAAAAATTTGTAATACTTTTATTCTAAGTTATATAACGCCA	660
661	TTCAACCATAGTAATGATTTTATACTTTGGTATATGGCTTTTAAAAATAAATATGCCAAC	720
721	AGGTAAAAATTTTCCCTTGCTGTCTTAAGGCATTCCTAAGAGAATTTTACCAGTGTGT	780
781	GTTCACTAATCTGAATGTTAATTTAAACAATGTTACTTCTATCACCTAAATGATATACTTA	840
841	TAGAAGAGTGGTTTAAATTTGGGAAACAGAAAACACCACATTTGCTTCTTCCCAAGAAAAGG	900
901	GATGTATTCCATTCTCGAGGTCTCTCTCCCACTCTCTATTATATATAATATACTGCATA	960
961	GATAAATATACACACATTATATATGTATTTTGAAGTAAAGAAGACTGGACATATGT	1020
1021	ATTTACATGTATATATCCAAACAATATTTAATTTTGGAGTCTCTCTCCCTCTTCTGATT	1080
1081	ATTTATCTCAGTATGAATTTCTCAAACTGTACGGTCTTTCACATTTTCATTTCATTCAAG	1140
1141	CATGTATCGAGTCCCTTCTGCATGCTTAGCTTTTTTGTGATATGGAAGGAAGATACAAAAG	1200
1201	AAAAACTGTTTCTGCCCTTACAGAACTTTCCATCTCTCTAGGAAGGAGATAAAAACACCA	1260
1261	TATATCATTAAAGAAATTTATAAGACTAGTCCCAAAACCAATGGTACAAGCAACATGCATT	1320
1321	TTACATTTATGTAGAAATTTAGAGCTTGGAAACACTTTTCGTGATATATAATCTAAGAAC	1380
1381	AATCTGTAAAGTGCACATTTATAGCTCCATTTTCAGTGTAGGAACTCTGAGACAGAAT	1440
1441	TTAAGTGACATGCTCTCGTTTAAACATTTAGAGTGAAGAGTCAACACTTAAGCCTGAGTT	1500
1501	TTCTGATTTAAGCCTAGTGTCTTTTCAACACAGCACTGGAACCAAAGATTGTGGTAC	1560
1561	ACAACAAGGCAACAGCCAGTCTTCTTGTGCGAGGTCCAACTAAACTGGACCCATACCGAG	1620
1621	CAGTGTCCAGCCAAATGTCCAAATTAATTTATCCTGCAAAATTTGTTCTTCAAGTAA	1680
1681	TACACACAGCACAACTACCATTTCCTCGTCTTAGTGCCTTTATCTCTACATTCAGAA	1740
1741	ATGGGGATGTCAAATATTTTAAATCTGGCCTAGATGGAATCAATATAAATCTCAAATC	1800
1801	ATAATAAATCTTAAAGGTCTGGTTTCCACCAATCTTCCACATTTTGTTTTCCCCCAG	1860
1861	CCTAGAGAGCCCTAACCTACCTCACCCCTTTTCGAGCATTCTTGCTCCAAACGACCACCT	1920
1921	ATTTTAAAGATGTCAATGACCCTTTCCCAAATTTCTACAATTCACCCCGTTTTGGCACCC	1980
1981	GACCCAGCGCCTGCCCGGACAGTTCCTCCTCCCTCCCAATAGATTTGATACCGAGTTCA	2040
2041	GGTTCTGCAGATCCCGTTGCGATGCTGTACACAGCACTGACAGATAAGATTTGACCTTT	2100
2101	CGACTCCGTCTTGGGACTTCCCGCTGGCCAAGAAGGGTAGTTCCAATCCCAGGAAAACG	2160
2161	GGCTTCTGCTCAGGAACGCAGCCTCTAGCAGCGCACAGTCTGAGGCAATGCTCCGGCA	2220
2221	ATTAGAACGATGCTGGGCGCCCGGGTGTGCATCACTCTGCCTCATACTCCTACCAACTGC	2280
2281	AGGGCACTCGGTCCGGCAGCCAGTCCATCCACCCACCCCAAGTCCAGCCAGCCGGAC	2340
2341	CTTACGCAGGACCCCGATGATAGGTGCTTACGGCTGCAGCAAAAAGCCAAAGGCCACTGC	2400
2401	CGCTGCTGCCATCCCGCCAACTGAGACCCCTAGACTGSAACCCAGAAAAGCGTTTCT	2460
2461	TATGGGAACCCCCACCGAGAATCACGTGACGCAATCGGACGACCAATCGCTTCTTACC	2520
2521	TCTGCCCGCGGTCCAGCTTTTGGCCCTCCCTCTCGCCCGCGCTCCTTCGCCAGCCCG	2580
2581	CCCCTTGCCTGCGGAGACCCCGCCTTCCCGCTGTGTCTCTGCGCTCCTTCCCTCGCG	2640
2641	CGCGCTCTCCGTGGAAGAGCAGGGGCGAGCTGGGAGGCGCCAAAGGGAGCGGACCTGAG	2700
2701	GAGGAAGAAACGGGGCTAGCGCGCAGGCCAGAACGGTCCGAGCCCGGCAGTCCGGCGAC	2760
2761	GCCTCAGAGCGGAAGAGGGAAGTGAATCAGGCGCCGGGTAGTGGGTTGCTGGGCTGGGCT	2820
2821	TGCTCAGGTAGAGGCAGCGCCAAGAAGAGGGCTTTGCGGCTGGTCCGGATTGSGATGTGC	2880
	M S	
2881	AAGAACACAGTGTGCTCGGCCCGCTTCCGGAAGGTGGACGTGGATGAATATGACGAGAAC	2940
	K N T V S S A R F R K V D V D E Y D E N	

FIG. 22A

【図 2 2 B】

2941	AAGTTCGTGGACGAAGAAGATGGGGGCGACGGCCAGGCCGGGGCCCGACGAGGGCGAGGTG K F V D E E D G G D G Q A G P D E G E V	3000
3001	GACTCCTGCCTGGGCAATATCCTTGCATTACCGCCCTCCCCACCCAGCCAGCCAG D S C L R Q	3060
3061	CCCCCCTTCTCCTGGGACCCGGGAGCCTGCAGGATCCGGGGGCACCGGGCGGGAGCTG	3120
3121	CCTCTCAACCTGCGGCTTAACCTGTCTCTTTGGGATCGCCCGCTCTGAGAGGGCAAGGGG	3180
3181	GAAGCCCCCGTTTCTACCCAGTCGGCAGGAGACGCGAGGGTCCCACTCTTGAAGCGCTG	3240
3241	CCGTACCCCGCGCGCCTTCCACGCCCCAGATTCCTCAGGTTSCACCCGAGTGCCTGCCT	3300
3301	GCCTCGGGAACCTGGTCCCGCCCGCCGCCCTCGCGGGCGCTGGGGAAGGGCGCCCGGCT	3360
3361	GGTGGGGGAGGCTGGTGCOCGACCGCCTTAGTTTTCCTTCTAGAACTCTGATTTCTGGG	3420
3421	GTACATTAGCTCCAGAAATTTCTGATTGTGGGGAACCTGCATCTTTCCTTAGTGGTTTT	3480
3481	GTTTTTGGTTGTGTTTTTTGTTATTGGTAGCGTTAAGGTAGTTTATTGCTTACCGGGGG	3540
3541	CCGGGGGAGATGGGACTGTTGCAAAATGAGGGTCCCTGTGCTTTCAGCCCATGGCCCTT	3600
3601	TTTAAAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGGGGATTTGGCAAAATATACATTGTACAG	3660
3661	AAITTTCTTAAGTGGGGGAGGGGAATGAATACAAAAATACAAAACCTCTAGAAGGAAGCT	3720
3721	TGGAGCCTTTTACCTGCTAAGAAAAGGACAATAGAAAAACACGGGGAAATGCGTGTGGA	3780
3781	GAATCCTTGGAATATTTAAAATAAACCCCAATGAATAAGATAGAAGATGAGTCATTGCT	3840
3841	ATAAAGCAGAATCATTTTTGTAATCCTAAAATGTTTCCATTTTAGTTAAAATATGGCAG	3900
3901	TCAGTCCCGGTTTCTGTTTTGTCATATTTGAATATTCATAACTTTGGCTTCGCATTTGC	3960
3961	ATTACATCTTTTTAGAAAAATGTAATGTTGCAAAAAACCGAAGCTGTAGTTTTAGAA	4020
4021	AATCTCAGACACTGAATTTGTATGCATTTCTAATTTCTGGGTGTATTTCATAAGGAAGCT	4080
4081	CTCAACAATGTCCTGTTATAGTGGGGAAATATGAGAGTGAAAAATTTAATGGCAACAAT	4140
4141	ATCCTTTTTTAAAGGCACCTAAAATAGAGCATTAGACATTTATCAATATATAGATAGTCT	4200
4201	TTGCCCACTTTCACAATTAATAGCTGTGCTCTTTTGCATTTAATAACTTAAGTG	4260
4261	CTTGGAGTTATAAAAAATGAGCTAATCTACATCAGGCATGCTTCTCTAGAAAATCCCTGCA	4320
4321	GCCTTGAATAACAGCTTGTCAACCAGAGATTTGTGTAAGAACTTTTCTTTAGAAAA	4380
4381	TAAATGGTGAACATGCTTCTCAAAAACATTATTGTGATGGGATAAGATGGTGTTTTTATG	4440
4441	AAACCCAGTGTATTTTAGGTAATTTGTGGTGAATTTAAAAGGTACTGCTGTATCCATA	4500
4501	TCAGTGGATCTGCTTTTTGATCAGTTTCACTTAAAATATAAAGATACTGTCTCTTCTTAC	4560
4561	CGTTACATACAGCCAGGAAAGACAGCCCTAGTSGTGGGGTACTAGAGTTGGAGGAACAAG	4620
4621	TGAATCTGTGGTTTTTCTTTTAGGGGAATGTTGTACATTCTGACAGTCTGATTGGCCT	4680
4681	TCTGTTTCTCATGCTTGCTAACTACTAGTGTCTTCAAAGAGAGCCTGAATTTAATAGGT	4740
4741	ATGGTCTAACACAGTTTGAATAACCTTTGTGAAATATGAGAGAAAAATCTAAAGCAAAA	4800
4801	AATTAAGCTGCCACCTAAGGGACATATGAATTTTACATCTTCTGTGATGCCTCTTTTCA	4860
4861	TCAATATTGAGAGATTGCTAATGTGTATCATTCAGATTGCTAATCTGCCAGCATGTTCTA	4920
4921	CCAGCATTTAGATAATACAGAATATGGTTCTAGCAAAAGTTTGGTCTTTATTTTTTCAA	4980
4981	TTAGAATCACAGGAAAAGACATATTTTGGTTGATAATAGGTTATTTCATTGGGGGACTA	5040
5041	ATAATTCTGATATATATTTTAGGATTTCTTTAACACCACTCTAGGTAATGTTGCATATG	5100
5101	TATCTCACTGGGAAATGAAAGACTATCAAGGTGTTCACTTGATAGTTAGAACCAAGGGTG	5160
5161	AAACAGTCTTTGCTTTATTAATAAAAGTCTAATGTTCTATTTTGTCTTTTGATATTTTGC	5220
5221	CTTTGATTAACATCCTGAAAACCAACACATGAATTTCCAGTATTGAACATAGTAGCCAA	5280
5281	AGTAATTTCTTTTTATATGTAATCAAGTCATAAAGAACCAGTGGTTATAATGCTTTCT	5340
5341	GGGGCCATCCTTTGCTGTTACACCCTTAACCTCCATCACAGAAACATGACAGTGCCT G N M T A A L	5400
5401	TACAGCAGCTCTGAAGAACCCCTATCAACACCAAGAGTCAGGCAGTGAAGGTGAGTC Q A A L K N P P I N T K S Q A V K	5460

FIG. 22B

【図 22C】

5461	GCAGACTACAACACAGTGATCTCTGCTGATATCTTATPCTTAGTAAATCCTTGCAGTGC	5520
5521	AAAAAAAAATCAATATTTAACTGTTTGCTATCTTTGACAAGAAGAGTTTATAATGTAGT	5580
5581	TTGATAGGTAAAAATTTACCGTGAAAAAATAGCCCTATAATGTAGTTATGATAAATGCTGC	5640
5641	ATGGTAAAGATACAGTAAAGTTCAAACGATAGTGAATCATTGTGTGTGTTTTTAGAGGAG	5700
5701	ACCACTCAGGCTGAATTTGAGCAAAGGTTTGAAAAAATAGTTAAACCTTTACAAAAATAA	5760
5761	ACAGATTGTAATTGCTTTTTAAAGATTTTTAAAACCATACAATACTAAATACTTATTA	5820
5821	TAGAAAGCTCAGACATATGAGAAGGTTAAAAAGATAGTGGTTTTGTGGTCCCAGCACCCAG	5880
5881	AGATAACAGTTACTACTTTGGGGCCTTGCTGTATTGTTACAGAGTTCCCTTTTGTTTTTT	5940
5941	TAAGAATGAATTTTAAACGGGCTTTTTCAGCTATATGCAATGGTACATGAGCTTTCTC	6000
6001	TCCCCAATAAGTTAATAGCCTTTTTAACACTTGTATATGGATAAGCTCCAGTGTATACA	6060
6061	TAATAATCTTTTGTATATTTAGACTGACTTTTTTTTTCTATTGTAAACCACTGAAA	6120
6121	TCAATATTTTGGTAAATTTTTAATCTTCTCTTTGAGTAAATGTAGCAGTGAATTA	6180
6181	CTGGATCAAAGAATGCACTTTTTTAAGGCTTTTGGTATGCAGTATTGCCAAATGCCCC	6240
6241	TTCCAGAACAGTTGTGCAACTTACATTTCTGCGAGTCTTTACTAATTTCTTAACCTATTTA	6300
6301	CGTATTTATTTAAATGATGCCCATAGCATCAACCCCGTTGTCATAGCTATTCATACAT	6360
6361	CCTAGGAGCTTCAAGAATCTCAATTGAATAGTAGTAAGTAATAACTTAGGTAATGCGATA	6420
6421	ATAATTATCTAGGTAACATAATTTTTATTGGGAAAAATTTCTTTGGTTTTTACAAGTTG	6480
6481	TAAAGATTGTCGTTGAAATTTTCATTTTACCGTGGATGCAAAGATATTTTTCTAAATCTG	6540
6541	GTAATGTCAGTCTTAAACCAAAGATAACAGTAGGTGGTAGAACATTCTGTGAAATCCT	6600
6601	GACCACTAGGAATGCTCGAGGTAICACTTTGTGTTGAATGGAAGGAGAAACGAATTTGTTG	6660
6661	AAAAGGTCAGTTAAGTGTTCCTTTGCTTGGCCGGATGGGTAAGAAAAATAACTGCTTTTG	6720
6721	AAGCAGGCTTTTGCCAAAGAAAAAGATCATTATTAATGAACATCACTATATTTTCATATC	6780
6781	TACAGTCAATTCATATAAATACAGTCAATTTCTTTTAAAGACAGCTTGGTTTTATTAATA	6840
6841	TTTTTAAATAAAAAAGTTTTTAAAGAAAAATTAATCTCTGAAGGATAATCAAGGTGAAC	6900
6901	TGCAAAATCTGCCTCCTTGTGTTGTTGGGAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACG	6960
6961	GAGTCTCACTCTATCACCCAGGTTGGAGTGCAGTGGTGCATCTCAACTCACTGCACCCT	7020
7021	CCGCCTCCCGGTTAAGCAATCCTCCTGCTTACGCCTCCCGAGTAGCTGGGATCACAGG	7080
7081	CACACACCACATGCTTGGATAATTTCTGTATTTTAGAAGAAACAGGTTTTTACCATT	7140
7141	TTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAGGTGATCTGCCATCTCGGCCTCCCAAA	7200
7201	GTGCTGGGATTACAGCTGTGGGCCACCACCCGGCCGTTTTGTTGGGATTTTTTTTTTTT	7260
7261	TAAGATCAAGACATAAATTTAAATGTTGTTTTAATAAATGTTAAATTTATCACATTGATC	7320
7321	GTTTAGCAAAATCCTCTCAGCTCTGCCTTCAATTTATGTTAATAGTCTGTCAAGTTTCTTAC	7380
7381	CACCTCCACTGCTACTATGCTTACCACATCCAGCCTGTATTATTGCAATTCCTCCTAAT	7440
7441	TGCTCTCCCTGCTTCTACCTTATCCCTTACTCCCAAGCTTATTTCTGTAACATAGATG	7500
7501	CCAAAGCAATCCTGTTAAATGTGAGTCAGATTATGGCACTGCTCTTAAACCTTCCAAT	7560
7561	GTCTTCTCATTTCTCTCAGTAAAGCCAAACTCCTTACAATGCCTGTAGGCCTTACACGA	7620
7621	TCTGTCTCCATAACCTCTGACTTACTCACGTGCTTTTCTCCCAAAATCCACTCCAAC	7680
7681	CACATTTGGGTTTTTTTTCTGTTTCTGGAACACACTGAACACACACTAATAGCACTGTCTT	7740
7741	TCCTCTGTGTAACACTTTCTCTCAGTTATCCCAAGCCTTCTTTACAGTCTTCCAGGTCC	7800
7801	TTACTCAAATGTACATTCATAGTGTAGACTTTTCTGAAATTTCTAAACCTTCTCATACAG	7860
7861	ATATGTCTAAATGTTCTGTTATTTATTGACCCACCAGGACCGGGCAGGCAGCATTGTCTT	7920
	D R A G S I V L	
7921	GAAGGTGCTCATCTCTTTTAAAGCTAATGATATAGAAAAGGCAGTTCAATCTCTGGACAA	7980
	K V L I S F K A N D I E K A V Q S L D K	
7981	GAATGGTGTGGATCTCCTAATGAAGTATATTTATAAAGGATTGAGAGCCCGTCTGACAA	8040
	N G V D L L M K Y I Y K G F E S P S D N	
8041	TAGCAGTGTATGTTACTGCAATGGCATGAAAAGGTAAGTTATGAATTATAAATCTATAT	8100
	S S A M L L Q W H E K	

FIG. 22C

【図 22D】

8101	GACTGGTTCTTTTACAATAGGGAATGACAATGACAACCTCTCTCACCTAAATAACCATTT	8160
8161	TGATTTGTGTACATTTTGTATTACAAAATAAAATGCATGAAAAGGATAGTTCATATTT	8220
8221	ATGTTTACTAGCCTTGGTCTTAAGAGATTCTGATCCAAACACTTGTGTTTATTCAACAAT	8280
8281	GATTATTAGTAATTAACATAATCTTGAACCTCTGAATTAATCAAACCTTTGTAAAAGAA	8340
8341	AATAAGCAATACAAATCAAGAATTCTTTACAGTGACCAAAAAGGTGAAAACAACACAAGG	8400
8401	ATCGAATATGATTCACCA	8419
8420	TTAAAAGGAATGACATTCCTGACACATGCTATAACATTAATAAACCTTGAAAACATACCAA	8479
8480	GTGAAATGAGCCAAACACAAAAGAACTAATATTTTATAATTTTACTTATATGAATAATC	8539
8540	TAGGATAGGCCAAACACAAAAGGACAGAAAGTCCCTTAGAGGTTACTAGGAAAGTAGGGAAAG	8599
8600	CAAGGAATAGGGAGTTAGTGTCTAATAGGTACAGAGTTCCCTCCTTGGAGTGGTAAAAG	8659
8660	TTTTGGAAACAGATAGTGGTGTGGCTACAGTACATTGTGAATATAATTAATGCCAATGG	8719
8720	ATTTTACACTTAAAGATGGTTAAAATGGCAAATTTTGTGTAGATATTTTACAACCTTTTT	8779
8780	TAAAGAATTAGGAGTTTGGAGGATCAAGAATTCCTTAAATCATGTTTTTCTATTTTCATGT	8839
8840	GTATATTTTGAATGTAAGTATAGTGTGGTACATCATCTGTCAAAGAGTATAAGTGAAT	8899
8900	TTGAGCTTTGGGTAAAAAAGTGGATAACATGTAATAGAACAGTCATAAAAAATTAGG	8959
8960	TGTTTGAAGTGTATCTGAGTGAAAACACAAACATAAGAAAAAGCACATAGTAAAACAAT	9019
9020	AGTTCCCTTTTACTCTAAAATGCACCAATTTGGGTAGTAATTTATATGGCACCCCTATT	9079
9080	CATGGAACACTTTCTGTGGCAGGTACCACTACTATTAATGTTTTTATTAACTTTACAAC	9139
9140	AACCTGTGGAAGTATATAAATATCTTTATCATCCTCAATTTACAGATGAAAAGCTAGCT	9199
9200	TTAAAACCCAAAGCCAGCGTAGTTCCTAGCATAGCCCTCAAGATTGCAGTGAACATTTGATTAC	9259
9260	TTATTATATCCACATATCTTCAAAGGACTTTATAAATTTAACTCATTAACTCCTCAT	9319
9320	AAAAATGGAGGGAAATGCTTGCTATTATTCCTCTTTTGTCACTGAGGAAACTGAGGCATG	9379
9380	TGTGAAGTCTTCATTTCTTCCAAATGTGAGTCAACAGTTTACCAATCTTCGAGTATT	9439
9440	TCTGAAATCTATCTGTTCAAGCGTATCTAATGCAGCTGTTACAGCATCTCTCCAGTCT	9499
9500	GTGGCCATAGCTTCCCTGACTGGTTTTCCAGTAAACAGTTTGGCTCCTTCAAATCTGTTT	9559
9560	TCCACCCAGCCATCAAATGATATCTTTAAAATCAAATTTGCCCTTGTGAGTCACTGCA	9619
9620	GGGATAAAGTCAAAGTTCCTCAAGTCTAGCTTCATCTTCCATGTCAATCTTCCCTCAGGC	9679
9680	TATGCAATGCCAGCCTTTTCCCTGAATGCACCAATTTGTTTACACCTCCATACATTTG	9739
9740	CTCATGATTTTCTGGTGTAGCCTGTCCCTACTCATCTTTTAAATGTGTCATTTCCCTCC	9799
9800	ATGAAGCCTTAGCTGAAACATTCCTCTATACTGTAACTGGGTATAAGCCTCTCCCTGG	9859
9860	TGCTTAAATAGCACCTGCAGCACAACCTCTCATTTCCATAGATTAGATTAATAATTTACCTGTT	9919
9920	TATATGCTCTGTCTCCTCATGCTAGACCAGAAAATGCTGTATTTGTTCACTTTTGTATCCC	9979
9980	CAGCATCTAGCACAGTACTCAGTATACAAAGGTATCCATAAATATTTTGAACAGAAA	10039
10040	GAAACCAGAGCTCAGATTCCTAATACTTTGATCATTTACTCTCTATTTTCAAATTAGAGTC	10099
10100	AGAGTTAAAGTTTCTAAGTCTTAGCTATTAACAATACCTTCTTTCTTTGGGAGAAAAA	10159
10160	AAATCTGACAAAGGCTGACTAATCGAAGTGAAGTTGGGATGGTTGATCCCAGTTGAAT	10219
10220	TTTCTCTGACTATGTGGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT	10279
10280	ACACTATGCTGCAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTCTTGC	10339
10340	TCTGTGCCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCAATCTCGGCTCACTGCAAGCTCCGCCCTCT	10399
10400	GGGTTACACCAATGTCCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGCACCCGCCA	10459
10460	CCACGCCCGGTAATTTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTACCATGTTAGCCAGG	10519
10520	ATGGTCTTGATCTCCTGACCTCGTGTATCCGCCGGCCTCGGCCCTCCCAAAGTGTGGGATT	10579
10580	ACAGGGGTGAGCCACCGCGCCCGCTATGCTGCAGATTTTTTAAACATTTATTAGAAT	10639
10640	TAATGTACTAAAATGTAACCTAGTATCTCACTAGAAATGTAACCTCATGAGGGCAGGGACT	10699
10700	TTCAAGGTTTTGTTTTATTACTGTAACTCAGTGCCAAGAAGTACCTGGTGCATAATTG	10759
10760	GTGCTCAAGAATTTATTATTTGTTAACTAATAAATTCAGGGTCTATAGCAGTGCCCATTC	10819
10820	CTTCTTTAAGAAAAATGTTTTACCAATATGAGAAATGACCTTTTATTATCTGTCAACA	10879
10880	TTTACATCCTGGTTTTGTTTTTAGGCACCTTGCTGCTGGAGGAGTAGGGTCCATTGTTCTGTG A L A A G G V G S I V R V	10939
10940	TCTTACTGCAAGAAAACTGTGTAGTCTGGCAGGAAAGTGGATTATCTGCCTCGGGAGTG L T A R K T V *	10999

FIG. 22D

## 【図22E】

11000	GGAATTGCTGGTACAAAGACCAAACAACCAATGCCACCGCTGCCCTGTGGGTAGCATC	11059
11060	TGTTTCTCTCAGCTTTGCCTTCTTGCTTTTTTCATATCTGTAAAGAAAAAATTACATATC	11119
11120	AGTTGTCCCTTAAATGAAAATTGGGATAATATAGAAGAAATGTGTAAAAATAGAAGTGTT	11179
11180	TCATCCTTTCAAACCATTTCAGTGTATGTTTATACCAATCTGTATATAGTATAAATTTACA	11239
11240	TTCAAGTTTAAATTTGTGCAACTTTAACCCTGTGGGTGGTTTTTTTGTCTGTTTTGTTT	11299
11300	TGTATTATTTTAACTAATACTGAGAGATTTGGTCAGAAATTTGAGGCCAGTTTCTAGCT	11359
11360	CATTGCTAGTCAGGGAAATGATATTTATAAAAAATATGAGAGACTGGCAGCTATTAACAT	11419
11420	TGCAAACTGGACCATAATTCCTTATTTAATAAGCAAATATCTTTTTGGAAATAGTGG	11479
11480	TGGGTGAATACCACTGCTAAGTTATAGCTTTGTTTTGGCTTGCCTCCTGATTATCTGTAC	11539
11540	TGTGGGTTTAAAGTATGCTACTTCTCTCAGCATCCAATAATCATGGCCCTCAATTTAT	11599
11600	TGTGGTCACCCAGGGTTCAGAGCAAGAAGTCTTGCTTTATACAAATGTATCCATAAAATA	11659
11660	TCAGAGCTTGTGGGCATGAACATCAAACTTTTTGTCCACTAATATGGCTCTGTTGGAA	11719
11720	AAAAC TGCAAAATCAGAAAGAATGATTTGCAGAAAGAAAGAAAACTATGGTGTAAATTTAA	11779
11780	ACTCTGGGCAGCCTCTGAATGAAATGCTACTTCTTTAGAAATATAATAGCTGCCTTAGA	11839
11840	CATTATGAGGTATACAAC TAGTATTTAGATACCATTTAATATGCCCCGTAATGTCTTC	11899
11900	AGTGTCTTCAGGGTAGTTGGGATCTCAAAGATTTGGTTCAGATCCAACAACAAATACACA	11959
11960	TTCTGTGTTTTAGCTCAGTGTTTCTAAAAAAGAAACTGCCACACAGCAAAAAATGTT	12019
12020	TACTTTGTTGGACAAACCAATCAGTTC TCAAAAAATGACCGGTGCTTATAAAAAGTTAT	12079
12080	AAATATCGAGTAGCTCTAAAACAAACCCTGACCAAGAGGGAAGTGAGCTTGTGCTTAG	12139
12140	TATTTACATTGGATGCCAGTTTTGTAATCACTGACTTATGTGCAAACTGGTGCAGAAAT	12199
12200	CTATAAACTCTTTGCTGTTTTTGATACCTGCTTTTGTTCATTTGTTTTGTTTTGTAA	12259
12260	AAATGATAAACTTCAGAAAATAAAATGTCAGTGTGAATAAATTTATTTTTCTCTGACAC	12319
12320	TTTAACAATTATGAATGTATGGTTAATTAAGAGGAAAGGTTTTCTGCTTCTACCACCAAG	12379
12380	TACTGTACTCTTAACAAGAACAGTTTGGTAGGGTTTTTATAAGACTATATAGATATAAGA	12439
12440	TGATAGAGAAGAGAGTCATGAATGATGTCAGAGCACTACTGAAGCCTTTGGAGTGATTCC	12499
12500	ATAGCCTTCTGGATGCCAGCTGAATACCTATATGTAGTATCACTGCCCAAAGACCTAGAC	12559
12560	TAGAAAGTGCAAAGTAGCTTAGCAGCTGCAGTCATTCCTCCAGCCTCCAAAATCTCT	12619

FIG. 22E


【図 23A】

```

1 - GATCCCTCTCCAGGTGGAAG - 60 /|\
51 - CTCCTTCATACCAAAGTTTAAAGGCCCTGGGGATACGAGTAACTTTGACGACTATGAGG - 120 |
121 - AAGAAGAAATCCGGGTCTCCATCAATGAGAAGTGTGGCAAGGAGTTTCTGAGTTTAGG - 180 |
181 - GGCATGCCTGTGCCCCATGGGTTTTCTTTTTCTTTTTCTTTTTTTGGTCGGGGGGG - 240 |
241 - TGGGAGGGTTGGATTGAACAGCCAGAGGGCCCCAGAGTTCCCTTGCATCTAATTCACCCC - 300 |
301 - CACCCACCCCTCAGGGTTAGGGGGAGCAGGAAGCCAGATAATCAGAGGGACAGAAACA - 360 |
361 - CCAGCTGCTCCCTCCTCCTCCCTTACCCTCCTGCCCTCCTCCCCTTTTCCCTTCCCTC - 420 |
421 - TTTCCCCACAGCCCCCAGCCCCCTCAGCCCTCCAGCCCTCCTGCTGCTTTTAAACGA - 480 |
481 - GTTCTCAACTCCAGTCAGACCAGGTCCTGCTGGTGTATCCAGGGACAGGGTATGGAAAG - 540 |
541 - AGGGGCTACGCTTAACCTCCAGCCCCACCCACACCCCATCCACCCAACACAGGCC - 600 |
Human cAMP-dependent protein kinase
catalytic subunit alpha
Accession number X07767 (until *)
- follow arrow until line that
begins 1561 -
601 - CACTTGCTAAGGGCAATGAACGAAGCGCCACCTTCTTTGCGAGTAATCTGCCTGGG - 660 |
661 - AAGGAGAGATTTTGTGACATGTTGAGTGGGTGCTTGCTAGAAATTTTTTAAAAAAC - 720 |
721 - AACAAATTTAAATCTTATTTAAGTCCACCAGTGCCTCCCTCCCTCCTCTACTCCC - 780 |
781 - ACCCTCCCATGTCCCCCATTCCTCAATCCATTTTAAAGAGAAGCAGACTGACTTTGG - 840 |
841 - AAAGGAGGGCGTGGGGTTTGAACCTCCCGCTGCTAATCTCCCTGGGCCCTCCCGG - 900 |
901 - GGAATCCTCTCTGCCAATCCTCGAGGGTCTAGGCCCTTTAGGAAGCTCCGCTCTCTT - 960 |
961 - TTTCCCCAACAGACCTGTCTTACCCTTGGGCTTTGAAAGCCAGACAAAGCAGCTGCC - 1020 |
1021 - TCTCCCTGCCAAAGAGGAGTCAATCCCCAAAAGACAGAGGGGGAGCCCCAAGCCAAAGT - 1080 |
1081 - CTTTCTCCAGCAGCGTTTCCCCCAACTCCTTAATTTATCTCCGCTAGATTTTAAAC - 1140 |
1141 - GTCCAGCCTTCCCTCAGCTGAGTGGGGAGGGCATCCCTGCAAAAGGGAACAGAAGAGGCC - 1200 |
1201 - AAGTCCCCCAAGCCACGGCCCGGGGTTCAAGGCTAGAGCTGCTGGGAGGGGCTGCC - 1260 |
1261 - TTTTACTCACCCACAGCTTCCCGCTCCCCATCCTGGGCGCCCTCCTCCAGCTTAGCT - 1320 |
1321 - GTCAGCTGTCCATCACCTCTCCCCCACTTCTCATTTGTGCTTTTTTCTCTCGTAATAGA - 1380 |
1381 - AAAGTGGGGAGCCGCTGGGGAGCCACCCCATTCATCCCGTATTTCCCTCTCATAACT - 1440 |
1441 - TCTCCCATTCCCAGGAGGAGTCTCAGGCTGGGGTGGGGCCCGGGTGGGTGCGGGGGC - 1500 |
1501 - GATTCACCTGTGTGCTGCGAAGGACGAGACTTCTCTTGAACAGTGTGCTGTGTAAAC - 1560 |
1561 - ATATTTGAAAACATAACCAATAAAGTTTGT* TAAAAAAAAGTGTGCTGTGTCTC - 1620 |
1621 - GACTTCGATCACCCACCCACACCCCCAGGGGTTGAAAGGGAATTCGGACCCAGC - 1680 |
1681 - GTGCAGGCCGATCAGGTCCTGGCTTGAAGTCCCTTGAACACAGGGTTTAGCTGAAATCCG - 1740 |
1741 - GCCTCCTTCGGCCCCGAGGAGAAACGAGCGTCAAATGCCCTTTGACCCAGATTCGG - 1800 |
1801 - GGTCCCCAAATCTGCGGCGCGCCCCCTCGGCGTCCAGCCCGGGACCCAGAGGGCGCTTA - 1860 |
1861 - GGGAGGGCTGGGGCTGGCGGCCAGGAGGCCAGCGGGCGGGGGGGGGCCCTGGCAGG - 1920 |
1921 - GGGAGTAGAAGGGGAGAGGTTGCGGCCCTTCCCGCATCCTCAGCGCCGGGCCAGG - 1980 |
1981 - CGGCTGAGGGACGCGGGGGCGGCGCAGCAGGAGGTTCCCGCAGCACCTTGGAGCG - 2040 |
2041 - CGGCAGCCCCGGCCCGGGCGGGGAGTTCCCGGTAAGTGGGTCCCGAGAGCGGAGCGC - 2100 |
2101 - GCTGGAGAGCGTGGAGAGGGGGCTGGGGCGCGGGGACGCTTGGGTCCCGCGCCCAATG - 2160 |
2161 - GCTGGAGGGCGGGCAGCGCGCCCGCCCGCCCTGCCCCCCCCCTCTCCCTTCCCCCGG - 2220 |
2221 - CACTCCCTTCCCTTCCCCCGCCCGCCCTTTCCCGCCCGCCCGCCCGCCCACTCC - 2280 |
2281 - GCGGCGCTCCTTAAAAAGCGCGGGGAGTTGTAAGGGGGGGCGGAGCGAGCCGAGTG - 2340 |
2341 - AGCGAGAGCGCAGGGTAAAGGGGGCGGGCGGGGGCCCGGCTCCACCTTAAAGCGGGC - 2400 |
2401 - GCGTGGGGTGGGAGGGAGGAAGGCGGGCGGGGAGGAGGGAGGGAGGGAAGGAAGG - 2460 |
2461 - GGGCCGAGTGTCCCGGGCCAGGCGCGCTGCGGCGCGGGCGGGCGGGGAGGGGCC - 2520 |
2521 - GGCCGCGCCGCTCCCTCCTCCCTCCGATCCCGGCCCGCGCGGCCAGCAGAA - 2580 |
2581 - GCGGGTCTGTGTGCTGCGTGGAGTGAAGTGTGTGCATATTTTTTCTCTCTT - 2640 |
2641 - TCTTCTCTCACTGTTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTTTTTTTTT - 2700 |
2701 - TTTTTTTTTTGCAAAGAAACAGCAGCCCGCCGCTCCGCGAGGCGCTGCGCCCCC - 2760 |
2761 - GGGGGGGAGGCGGAGGAGGGCGGGCAGCGGGAGGGAGGGAGCGGGGAGGGGGCGC - 2820 |

```

FIG. 23A

【 23B】

2821 - CGCGCTGGGAGGGAGGCAGCGCCACGGTGCAGCCGGCCGGCGGGAGGCATGGCGGGG - 2880  
 - M A G

2881 - CCCCCGGCCCTACCCCCGCGSAGACGGCGCGGCCGCCACCACGGCGCCGCGCCCTCG - 2940  
 - P P A L P P P E T A A A A T T A A A A S

2941 - TCGTCCGCGCTTCCCCGCACTACCAAGAGTGGATCCTGGACACCATCGACTCGTGGCG - 3000  
 - S S A A S P H Y Q E W I L D T I D S L R

3001 - TCGCGCAAGGCGCGCGGACCTGGAGCGCATCTGCCGGATGGTGGCGCGGCGCACGGC - 3050  
 - S R K A R P D L E R I C R M V R R R H G

3061 - CCGGAGCCGGAGCGCACGGCGCCGAGCTCGAGAAACTGATCCAGCAGCGCGCCGTGCTC - 3120  
 - P E P E R T R A E L E K L I Q Q R A V L

3121 - CGGGTCAAGCTACAAGGGGAGCATCTCGTACCGCAACGCGCGCGCGTCCAGCCGCCCCGG - 3180  
 - R V S Y K G S I S Y R N A A R V Q P P R

3181 - CGCGGAGCCACCCCGCCGGCCCCGCGCGCCGCCCGCCCGGGGCCCCCGCCGCGCCGCC - 3240  
 - R G A T P P A P P R A P R G A P A A A A

3241 - GCCGCGCGCGCGCGCCACGCGCCCGCCGCGCAACCGCCCGCGCCCGTGGCGCGCGCC - 3300  
 - A A A P P P T P A P P P P P A P V A A A

3301 - CCCCCGGCCCGGGCGCCCGCGCGCGCCGCCCGCCACAGCGCCCCCTCGCCTGGC - 3360  
 - A P A R A P R A A A A A T A P P S P G

3361 - CCGCGCAGCCGGGCCCCCGCGCGCAGGGGCGCGCCCTGGCGCGCGCGCGCCCGCG - 3420  
 - P A Q P G P R A Q R A A P L A A P P P A

3421 - CCAGCCGCTCCCCCGCGGTGGCGCCCCCGCGCGCCCGCGCGCGCCCCCGCCCGCC - 3480  
 - P A A P P A V A P P A G P R R A P P P A

3481 - GTCGCCGCCCGGGAGCCGCGCTGCCGCGCCGCCACAGCCCGCGCGCGCCACAGCAG - 3540  
 - V A A R E P P L P P P P Q P P A P P Q Q

3541 - CAGCAGCCCGCGCGCGCCAGCCACAGCCCGCCCGGAGGGGGCGCGGTGCCGGCCGGC - 3600  
 - Q Q P P P P Q P Q P P P E G G A V R A G

3601 - GGCGCGCGCGCGCCCGTGAGCCTGCGGGAAGTCGTGCGCTACCTCGGGGGCAGCGCGCC - 3660  
 - G A A R P V S L R E V V R Y L G G S G G

3651 - GCCGCGGTTCGCCTAACCCGCGCCCGTGCAGGGGCTGCTGGAGGAGGAGCGCGCGCT - 3720  
 - A G G R L T R G R V Q G L L E E E A A A

3721 - CGAGGCCGTCTGGAGCGCACCCGTCTCGGAGCGCTTGGCTGCCCGCGGGGACAGGCC - 3780  
 - R G R L E R T R L G A L A L P R G D R P

3781 - GGACGGGCGCGCGCGCCGCGCCAGCGCCCGCGCTCTCGCAGCAAGGTGAGCGCGCCGGG - 3840  
 - G R A P P A A S A R P S R S K

3841 - AGCGGGGCGCCCGCGGTGGGCAGGTGCGGGCAAGTTGGTGGCGGGGCCCCAGTCCC - 3900  
 3901 - GGGAGGAACTGGGTGGCGGGTGGCTGGGGCTTTGCCGCGCTTTCCTGCGGGCTCGTGCC - 3960

FIG. 23B

## 【図 23C】

3961 - TGGTGACCTTGGCAAGTGATTGAATCTCCCGGAGCCTCAGTTTCTCCGCTGTAAACCGG - 4020  
 4021 - GTTAAATAACAGTAGCGACCCCTTGGGGTTGTTGAGCGAGTTTAGTAAGATTTGGTTGTC - 4080  
 4081 - GAGGGCTTTAGTTAACACAGAGCCTGGCACGGAGTGAATGCGTAAAAAGTTAGTCCGTATT - 4140  
 4141 - GTTCTTAAAGGTGGAATCGGTTCTCTCTCCCCACCGCCCGGACGCCACAGTCAGGGTCTG - 4200

4201 - GGATTAGAACAGCTACTAATTTTGCATGCTTCTCTCTCCGCTCCAGAGAGGTGGAGAAG - 4260  
 - R G G E E

4261 - AGCGAGTACTTGAGAAAGAAGAGGAAGAAGATGATGATGAAGATGAAGATGAAGAAGATG - 4320  
 - R V L E K E E E E D D D E D E D E D D

4321 - ATGTGTCAGAGGGCTCTGAAGTGCCCGAGAGTGACCGTCTGCAGGTGCCAGCACCACC - 4380  
 - V S E C S E V P E S D R P A G A Q H H Q

4381 - AGCTTAAACGGCGAGCGGGGACCTCAGAGTGCCAAGGAGAGGGTCAAGGAGTGGACCCCT - 4440  
 - L N G E R G P Q S A K E R V K E W T P C

4441 - GCGGACCCGACCCAGGGCCAGGATGAAGGGCGGGGCCAGCCCGGGCAGCGGCACCCGCC - 4500  
 - G P H Q G Q D E G R G P A P G S G T R Q

1 - AGGTGTTCTCCATGGCAGCCATGAACAAGGAAGGGGAACAGGTAAGGATCCCTCTGGGT - 60  
 - V F S M A A M N K E G G T

61 - GGGGAAGAGTGCTAGGTGGAGAGGAAGTCCAGCCGAAAGACAAAGCAAAGACAGGTGTTT - 120

121 - TTTTCTTCCAGCTTCTGTGTCACCGGGCCAGACTCCCGTCCCGGTGCCTTTGCC - 180  
 - A S V A T G P D S P S P V P L P

181 - CCAGGCAAACAGCCCTACCTGGGGCCGACGSGACCCCTTTGGCTGTCCGTAAGTTGGG - 240  
 - P G K P A L P G A D G T P F G C P

241 - GTATTGGAGACATGGGGTGCTGCTCAGGTGTGTGGTACAGCCAGAGACATCCGTGTT - 300

301 - CACTGGTGTCTGTTTGTGTTTATGATGCAGTCCCGGGCCAAAGAGAAGCCATCTGATCCCGT - 360  
 - P G R K E K E S D P V

361 - CGAGTGGACCGTGTGGATGTCGTCGAATATTTTACTGAGGCTGGATTCCCGGAGCAGGC - 420  
 - E W T V M D V V E Y F T E A G F P E Q A

421 - GACAGCTTTCCAAGAGCAGGTGAGTTTCCAGCCAGGACTACACACTGACAGACACAGAG - 480  
 - T A F Q E Q

481 - GGCCTCCCTGGGATGTGCCCTGATCCCGGCTTTCTCTGTTCTCTGTCACCCAGGAAATT - 540  
 - E I

541 - GATGSCAAATCTTTGCTGCTCATGCAGCGCACAGATGTGCTCACCGCCCTGTCCATCCGC - 600  
 - D G K S L L L M Q R T D V L T G L S I R

601 - CTCGGGCCAGCCCTGAAAATCTACGAGCACCATCAAGGTCTTCCAGCAAGGCCACTTT - 660  
 - L G P A L K I Y E H H I K V L Q Q G H F

FIG. 23C

【図 2 3 D】

661 - GAGGATGATGACCCCGATGGCTTCTTAGGCTGAGCGCCAGCCTCACCCCTGCCCCAGCC - 720  
- E D D D P D G F L G \*

721 - CATTCCGGCCCCATCTCACCAAGATCCCCAGAGTCCAGGAGCTGGACGGGACACCC - 780

781 - TCAGCCCTCATAACAGATTCCAAGGAGAGGGCACCCCTTTGTCCTTATCTTTGCCCTTG - 840

841 - TGTCTGTCTCACACACATCTGCTCCTCAGCACGTGGTGTGGGGAGGGGATGCTCCTTA - 900

901 - AACCCCAAGGTGGCTGACCCCTCCCCACCCAGTCCAGGACATTTTAGGAAAAAAAATGAA - 960

961 - ATGTGGGGGGCTTCTCATCTCCCAAGATCCTCTTCCGTTCCAGCCAGATGTTTCCGTGAT - 1020

1021 - AAATGTTTGGATCTGCCGTGTTATTTTGGTGGGTGGTCTTTCTCCCTCCCTACCACCC - 1080

1081 - ATGCCCCCTTCTCAGTCTGCCCTGGCCCTCCAGCCCTAGGGGACTAGCTGGGTTGGG - 1140

1141 - TTCTCCGGGCTTTTCTCTCCTCCCTTTTCTTCTGTTGATTGTCGCTCCAGCTGGGTG - 1200

1201 - TATTGCTTTTAAATATTCACCGAAGGTTTTTAAATAAAATTTTAAAAAAGAAAAAGG - 1260

1261 - GAAAAAAGCCACGGAGTCCATTTATGAAATGGGGTGGGAGAGGGCACTAAAGAGCCT - 1320

1321 - CCTAAGAGAGCCTCAGGTTAGGACAGAAATGTTTGGGGAGGGAGAAAAACAGAAACAATG - 1380

1381 - AATTATAGTGCCTCACAGCCATGTATAACAATAATTGCTCCAGGAAGGTGGGAATATT - 1440

1441 - GCTTTTTTTCTCTGTAATCTCACCGTGTCCGCTGTCCAGAACAGAGCTAGGCACACAGC - 1500

1501 - AGGTGCTCAATTTTGTTTTTCGTTTAGACAGGTTTCATTCTTCCACCGAGGCTGGAGTG - 1560

1561 - CAGTGGTGTATCATAGCTCATTGTAGCCTCAAACCTCTGGGCTGAAGTGTCTCCCTCCAC - 1620

1621 - CTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGACTACAGGTGCACTCTGCCATGCCGGGCTAACTTTTAA - 1680

1681 - AAATTTTGTCCGGGCACAGTGGCTCATGCCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGG - 1740

1741 - TGGGTGGATCATGAGGTCAGGAGTTCAAGATCAGCCTGGCCAAAGATGATGAAACCCCTGTC - 1800

1801 - TCTACTAAAAATAAAAAAAATTAGCTGGGCGTGGTGGTGGTGGCTGTAATCCTAGC - 1860

1861 - TATTCAGGAGGCTGAGGCAGAGGATTGCTTACACCTGGGAGGCGGAGGGTGCAGTGAGCC - 1920

1921 - AAGATCGTGCCACTGCACCTCCAGCCTGGGTGACAAAGTGAGACTCTGTCTCAAAAAAAA - 1980

1981 - TCTTTGTGTGTGTGTGGAGATGAGGGTATGCACCTTTGTGGCCAGGTTGGCCCTCGAAGTC - 2040

2041 - CCAGCCAAGCAATCTGCCCTGGGATTACAAGCCTGAGCCACCATGCCTGGCCTCAAAAT - 2100

2101 - GTTGAATGGCTAGCAGTTAAGTCTTGGGTTTATAAGCATTTCCTCAACTGCTCCCA - 2160

2161 - AGTCCCATAGACAAAAAATCATAAAATCCACCTTACAGAAAGAGGAGCTGGCCCGG - 2220

2221 - CACAGAGATGCTGTCTGCCCGGGTACACAGGGTGGCATCTGACACCCCTGTCTGAGTTC - 2280

2281 - TTCACTCAGAGTCTTTAAATATAATAGCGTATTTGACATAATGTACATTAATAACTATA - 2340

2341 - AACCTGTGAGCCTTTGTCTACTGCAAAAGATCCACTACAAATATTGGGGCAGGGATCTGT - 2400

2401 - TCTTGGACCATAGTAGTGTCTCCAGACCTCATGGTCTTTCATTAATAACACAGAAAAT - 2460

2461 - TCCTTCTGGGCCATCAGATCAGACCATGAGATAGAAGATTTCCAAGTGAAGATTTGTGTT - 2520

2521 - CAAGACAGAGTCTTGTCTGTCACTCAGGCTAGAGTGTACTGGTGAATCATAACTGTGG - 2580

2581 - TGACAGCCTCGAATTTTGGGTACAAGTATTCTCATGCCTCAGACAACACCCAACTAAT - 2640

2641 - ATTTTGGTFTTTGTATAGACAGGGTCTTGTCTATGTGGCTTAGGCTGGTCTGAACTCCTG - 2700

2701 - GCCTCAAGCAGTCTCCCGCTTCCAGCCTCCTAAAGTGTGAGGATTACAGACATGAGCCAC - 2760

2761 - CAAGTCCAGCCTGAAGATTTTAAAAATATTGTTAGTAGTAGTCGCCAGAGTTACTACA - 2820

2821 - TCCAAAGTCCCTACTAAGTCTAAGTAGTCCCTACTAAGTCTAAGGCAGTTTCTCAACT - 2880

2881 - CATTAGAGTTGTTTTTTGTTTTTAAAGAAAAAAGAGGCTGGGCACTTTAGGAGACCGAC - 2940

2941 - ACGGGAGGATGGCTTGAGTCCAGGAGTTGAGACCAACCTGGGCAACATGGGCCCCATC - 3000

3001 - TCTAAAAATTTTAAATTAATAAAATGTTTTAACAAACAAAAGCGTTCTGGGAGTGAGGG - 3060

3061 - CTGGGGCCTGGGCGGCCCTCATTCCATATACCTGTGCCGGGTTGAGGGGTTGGAGACAGT - 3120

3121 - TTAGAGACCCCTCCACTCTAGGAATCCACCTCGAGAGATAAAGTCCCGGCCCTAGCCAC - 3180

3181 - ACCCCAGGACACGGCCAGAGGCCACCTCCCTAGGCGGGTCCCTCCCAACCGCCAGGTTTC - 3240

3241 - CTGGAGCGCGTGGGCGCGTGTGCAGGGGTAGGGGGCCGAGGGCGCGGGACTGGAGAGG - 3300

3301 - CGCGCCCTCCCGCGTGTGAAATTCAAAAGAGGCGAACGGCCCGCGCGCGCGCGCGG - 3360

3361 - GCTCCGGTGGAGAGGTCAGGCAGGGGCCAGTCCGAGGCTCCCGGGCGGGGTCGAACCC - 3420

3421 - GCGGCCAACCTGAGCAGCAGCGGAAGCTTAAAGAGCTCAGGTTCCCGCCCCCGGCCCTA - 3480

3481 - CCATGGCTACAGAGCAGTGGTTCGAGGGGTGGCTCCCCCTGGACCCTGGAGAAACACCGC - 3540

3541 - CTCAGACGCCCTGGAACTGGGACCGCCCTGCGGAGACCCCTCCAGGTCGACGCCCC - 3600

3601 - CTGGCAGGCTGGRAACCACTGAGCCGATCCTGAAGATGCCGAGGGGGCGGCTGGCTG - 3660

3661 - AGGCCCGGGCTCCACGTCTTCCCAACCTCTGGTCCCGGCCCTGGGCCAGCACCTC - 3720

FIG. 23D

【図 2 3 E】

3721 - CCGCCTATCCCTGGACACTTTGTTTCAGCCCCATCACCCAACAGCTGGCTACCTACTGA - 3780  
3781 - AGAAGGCAGATGATTTCCAGAGCTACTTGCTCTACAGGTGATGCTGGACAGGGTCCCAGG - 3840  
3841 - TCCCCATGGGTAAGGAGACTTGGAGGGAGGCGACAGGATGGGTGACACACACCAGGGTC - 3900  
3901 - GCAAATTAACAAGCGCTAGGAGCCAGAGGGAGACAGTGAAGAAGCTAGCATATTAGAAT - 3960  
3961 - CCAGTTTAAAGAGAATGAGGAAGACTGTAGAATTGCCGGTAGGGGATGGCTGCTATTACTG - 4020  
4021 - TCGTGGCAGGGTGGCCCTGGGGTGTCAAGTCTCTAGGACTTTTTCTCCAGTTTTTAAG - 4080  
4081 - TGCTGCTTACATTTTGAGCCCTGTGCTGGCTAAACAAGACCACCTGAGCCAAACTTGG - 4140  
4141 - CCTGCAGGACATCAGTTTGGAGCTCCAAAGGATAATGTGATTCAGAGACCAGGTTCCCT - 4200  
4201 - GTGACTCTCAATTCAGTGTCCATTTGGAATTTCTAGGAGGCTGGGGTGGGGTTGTTTGC - 4260  
4261 - GTGTTTGTTTTIGAGATGGAGTCTCACTCTGTGCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGCAT - 4320  
4321 - CTCAGCTCACTGCAACCTCCGCCCTCCGGATTGAAGCAATTTCTGCTCAGCTCCCGA - 4380  
4381 - GTAGCTGGGATTACAGGCCGCCACCAACATGTGTGCGCCGGCTAATTTTTTCTTTTCTT - 4440  
4441 - AGTAGAGACAGATTTACCACATCTGGCCAGACTGGTCTTGAGCTCCTGACCTCATGATC - 4500  
4501 - CACCCGCTTGGCCTCCCAAGTGTGGAAATTACAGACGTGAGCCACCAGCCCTACCCGA - 4560  
4561 - GGCTGGGTTTTTTTGTTTTGTTTTGTGTATGTGTTTTTTTGAATGGAGTCTTGCTCT - 4620  
4621 - GTCACCTAGGCTGGAGTGCAGTGGGGCGAAGTCACTGCTGCAACCTCCGCCCTCCAGG - 4680  
4681 - TTCGAGGATTTCTCATGAGGCTGTTTTTTTTTTTAAATGAGACAGGGTCTCGTGTGTC - 4740  
4741 - ACCCAAGCTGGAGTGAAGTGGGGCAGTATAGCTCACTGACCCCTCGAAGTCTGCTGCT - 4800  
4801 - CAAGCAATCTCCACCTCCCTCCTGGGTAACTGGGACTACAGGTGCCACCATGCCAGC - 4860  
4861 - TAATTAATTTTGTGTAGAGATGGGTTCTTGCTATGTTGCCCTAGGCTTGCTGGAACCTCT - 4920  
4921 - GGCCCTCAAGCAATCTCCAGCCTCAGCCTCCCAAACCTTAGGATTGCAGGCGTAGCCCA - 4980  
4981 - CTGTGCCAGACCCTGCAGGAAGCTCTGGGTCTAAGTGTGTGACACTCAGGTGTCAGC - 5040  
5041 - ACTTTAACAAGTGTTCCAAATGGGTTTGTATGCAGGTAACCCAGAAAGATGTTACAGAAA - 5100  
5101 - CACTGAAACTGGGGGCTTTTCTAATGGGTCAAAGCCAGGGATACAGGTGGGATTGAGTA - 5160  
5161 - GAATGGGGAAAACCTGGGGGTGGGGAGGGTTGTGAGGATTCCAGGCAAGGCCCTT - 5220  
5221 - CTTCTTCAGCAGAGACCAAGTACAGAAGGAGCAGCTGGCCAAGGCCATGCCACCTTCT - 5280  
5281 - TACAGATGTGTGAGCCCTACTTCTGTACCTGGAGGCAGCCGAGAGAAGCATACCCCCA - 5340  
5341 - TCTATGGACCCCTGCAGGAGCTGGTCCGAAGGGGTGTGTGAGGTTTCTTAGACCCCA - 5400  
5401 - CGCCCTTTCTTCTGCGAGCTCTGAGCCTGTGGGGATGGTGGAGGGGAGGCCACTCCT - 5460  
5461 - CGCAGGCCAGCTGATCTCACTGTACCCCTCTTTGTATGAGCTGTTAGAGATCTCCCAA - 5520  
5521 - CAGCTGACCTGGCCCTGGAACAGCTGCTCCTCATGTACGCTTCTTTGGGTTCTGTTGAC - 5580  
5581 - CTGGAGGAGATGAACCCCTTAGGTAAAATGGTAGGAGACTCAGATGGGGGATGAAGGA - 5640  
5641 - GTCCAAGGCCAGCCTCACCCCTCCATTCTCTCATGTTCTGCCAGCATCTCCTGTTTCTT - 5700  
5701 - TTGCGGGAGGTTCTCCATCAGCCTGTCCCATGAGGTCTCCATCTTCAGATACTGTGCC - 5760  
5761 - AACCCCTACACTGCCAGCCGCTTCCCCGCTACCTCTATAAGAAGATGCGCTGGCACCT - 5820  
5821 - GGAAGCCACCCAGAGGCCCTTGGTGGGGACAAGATTCCCTTGTGGATTAGTAAGTCT - 5880  
5881 - CTTACCCAAATCAAAGTCTCCCTTTCTATGATGAATGCCAATATGACCCCTCAAACCG - 5940  
5941 - TCACCAGCAAAGTGAAGTGAAGTGAAGCCAGGGCCGAGGCAGTGGCTCACGCTGTAATCCCA - 6000  
6001 - ACACCTTTGGGAGGCCGAGGCAGGAGATCACTTGAGCTCAAGAGTTTGAAGTCAAGCTG - 6060  
6061 - GCAAGATGGCAAGACCCTGTCTCAACAACAAGAAATTCCGCCAGGCGTGATGGCTGGCAC - 6120  
6121 - CTGTAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTTAGGCAGGAGGAGCACTTGAGCCCAGGAATCAAG - 6180  
6181 - GCTACGGTGAGCTGTGATTGTGCCACTGCACTCCACCCCTGAGTGGGAAGCAATAATCTGTC - 6240  
6241 - TTCTAAAAAAGGAGTGAACCCAGGAACTAAAGGCTTTTGAAGGCTACCTCTATT - 6300  
6301 - TTCTAAAAAAGGAGTGAACCCAGGAACTAAAGGCTTTTGAAGGCTACCTCTATT - 6360  
6361 - GAGAAAAGGCTTTGGAGTCAACATCTTACCTGAGAACTTCAGGGCAACTTCTGATGAGTT - 6420  
6421 - CCCACCTCAACTCCAAAATTAAGCCCTCAACAGAAGTAGCTAGGAAGCTGATCACTTCT - 6480  
6481 - AATTACAGCTCCCTCCCTCCTAGCTACTTTCTGTGCTATCGAGATACTTGGGAAGCAC - 6540  
6541 - AGGCCAGAGTCCAGCCAATTCGTGCCACAGATCCAGAAGCTGTGGTCCATCGGCCGATG - 6600  
6601 - GGTGCCCTTAGGACCAGCCAGGATGACCTTTATTCATGGTAGGAGCTAGGGCAATAGCA - 6660  
6661 - ACGTGGGCTGGGAGCTGGAGGGGAGGCAGAACCCACCAAGACAATCCACCTTCCCA - 6720  
6721 - AACACTTTGCTTCCCTTAGTAGTGTAGCATTATTTGTTGCCCTGAAAAGCACTTCATGC - 6780  
6781 - AGACCCAGTAACAACCCATGAGATCTATGCTATTGGCCCAATTTAACAAAGAAAACAG - 6840  
6841 - GGTGCTCAGAGAAGTTGTTACTGCCCCAAGGACACACAGCTAGCAGAGCGAATGGACAGG - 6900  
6901 - TCAGGACCAGTATTACGCTCTAGGAGCCATTACTAAGTCTCTGATCAACRAGSAAACA - 6960  
6961 - AGTTTCCCCGGGGTTTTTCCACCCGAGCTGAAAACAAGCCCTTTTACCTTGAGCCT - 7020

FIG. 23E

## 【図 23 F】

7021 - CTCACTCAAAGGGAGGGACTCCCGAGGGGCAGGGGGCACTCAAGTCCAGGCCTGTCTATC - 7080  
 7081 - CCTGGCCCCCCCACCCAGGATTTTGTGCCCGCACCGCTTGGGGACTACCAGCAGCTGCT - 7140  
 7141 - GACCATCGGCTTCGAGGAGCCACGCCACGCTGGCCACCGACCTGCTGGTGCAGATCCT - 7200  
 7201 - CACGGGCCAGGCAGGCCAGGCCCGGCCTCCGAGCGCAGCCGGGCTGCGGGGTGGGCAGC - 7260  
 7261 - GCAGGGTCTTGAACCTGGGGAAGAGGGTAGGAGCTGGAAGTTGACAGTTCCAACTCCA - 7320  
 7321 - GAATAGGGGGCAGGGGAGGGGCTCACTCGTTCTCCAGTGCAGCCGGGCTCGCCTTCCA - 7380  
 7381 - AAGGGCCAGGCCGAGCTGACCTGTCTGCACCGAGTCCGGCTTGGCCGTGGGGCCCTGAAT - 7440  
 7441 - GCGGACACGTCAGTTTGTGTTAAATAAAGAAAGAAAGAGGTCACAGGCTCAGCGTCGG - 7500  
 7501 - CTGCGAATGCCGCGCCCTCCCCCGGGGATTTGCCCCACCCACTCGCGTGGCCCTTCTGGG - 7560  
 7561 - AAATGTAGTCTTTTGAAGAAGCCTGGAATTCGCAATAGCCGGACGAGAGTTTGGCGCA - 7620  
 7621 - TGCGCATAGCGCACATGAAGCAAAAAGGGAAGTGGTGCCCGTCAACACCGGAACCCAGA - 7680  
 7681 - AACTGCAAGTTTAGGGTACCGGGAAATTCACGTCCTACTGGAGGAAGAGACTTAAGGC - 7740  
 7741 - TACGCCCCACTCCCATATTTTGAACCGGAAGTTATTTATTTTAGCGTAGAAGACTACTTTT - 7800  
 7801 - CCCGACGCGCCCCAGGAAAGTGCCCTCGATCAGTTTCTAAGGGCCCGAGTTAGACTTTT - 7860  
 7861 - TTTTCTCTTCCAGCTTTTGGGACTTGGGGCCGGACAGGTCGTCGTCTTTCTTGGGGTA - 7920  
 7921 - TCCGGGTGCGGACAAAGGTGGGAGAGCCCTACGGTATCCAAGCTT - 7965

FIG. 23F



【図 24B】

2521 - AGGAAATCCAGGTCCCGTTAGAAACACCTCAGCCACCAGCAGCTAACTGCCCTTCCTGTT - 2580  
2581 - TGAGGCATTTCTAGAATGATCTGAATGGCAAGAAATGGGTTTGTGGGGGGAAGGAGAT - 2640  
2641 - GGACTAGAAGTTGCTCCGTGCCATCCCTGTGTGCTGATGCTTTACATACTTTTATGATCT - 2700  
2701 - AACAAATATGTTCCGGTGGTAGTGAGAAATAGTTGTGTCAATTTTACAGTAAACAGACTT - 2760  
2761 - AAAGAAGTTAGGCAACGATTACTATAATTCCTTGATTTAAAGATGTTTCGAATCTAAAT - 2820  
2821 - TCTGACAGGAAGTACTAGATTGCTGAATGATACTCCATTCTTCTTCTCAGTTTCCATAAAA - 2880  
2881 - AAAAAAGTTAGGCAACATTTAACTCAAACCTGATGAGTTTGGCTGGGCCTGAAAAATCCCA - 2940

2941 - ACCAGTGGTATAATCGTCTTCTTTCTCACICTACCCCTCATCCTCTCCTGCTGTAGGGGC - 3000  
- A

3001 - TCAAGCCAGAACGGCTCAGTCTGGGGCCCTTCGTGATGTCTCTGAGGAGCTGAGCCGCCA - 3060  
- Q A R T A Q S G A L R D V S E E L S R Q

3061 - ACTGGAAGACATACTGAGCACATACTGTSTGGACAATAACCAGGGGGCCCCGGCGAGGA - 3120  
- L E D I L S T Y C V D N N Q G G P G E D

3121 - TGGGGCACAGGGTGAACCCGAGATGCAGAGAAGTCCCGGACCTATGTGGC - 3180  
- G A Q G E P A E P E D A E K S R T Y V A

3181 - AAGGAATGGGAGCCTGAACCAACTCCAGTAGTCAATGGAGAGAAGGAACCCCTCCAAGGG - 3240  
- R N G E P E P T P V V N G E K E P S K G

3241 - GGATCCAAACACAGAAGAGATCCGGCAGAGTGACGAGGTCGGGAGCCGAGACCATCGAAG - 3300  
- D P N T E E I R Q S D E V G D R D H R R

3301 - GCCACAGGAGAAGAAAAAGCCAAGGGTTTGGGTGAGCAGAGGGGGCTCTTTGTGAAGC - 3360  
- P Q E K K K A K G L G

3361 - TGGTGAGGAGAGGGAGTTTGGACTTGACGTTCTCTGGGCCAGTCTGTTCTGCCAGGATC - 3420  
3421 - AAAGGAAAACGGTACTTCTCAGAGCAGCAAGTCACTCTAGTCTAATCAAAGCCAGGGATG - 3480  
3481 - TGGGGCCACGGCATAGAGAGATGCAGGAGTTACCAGCACAAAGCCTCTGGGTTTTGGA - 3540  
3541 - GCAACTGGAGCTTGGCATGGGACCTGTTCTCTCTTTGAGAAAAATGGAGACGGGAGGCTAG - 3600  
3601 - GGTAGGCTCCTGTGCCAGCCAGTACTACCTGCTGTGTGACCTTGGGTGTGTCCTTCTCC - 3660  
3661 - TCTCTGGGTCTTAGTTTATATTTCTCTTTACAGTAAGAAAATTAGACTAGGCCAGAGTTG - 3720  
3721 - AAAACCCAAATATCTGCATAAGCTGGGCTTGGCCATGGGGCCACCTGAAGATGGAGGCTT - 3780  
3781 - TACTGCTCCCTGATTAGTTGCTCICACTAGCCAACTGAGAGCAGGCAAACTACAGGCT - 3840  
3841 - GGGTGCAGTCAGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAAAGAAAAGCCAGAAATCT - 3900  
3901 - AGAGTTATGTGAGAAGTCTAGATTTTTTCATAGTTAGCAGCTAAAATGGTAAGAGCCAAA - 3960  
3961 - CAAAACCCATCCGTGGGTGGATTGGCACACATGCCTGCGAATTGCAGTCTCCATGCTG - 4020  
4021 - ATCTCTTGGGCCCTTCTGGGAGGCCAGAGGGAAGGCTCCCTGACTCAGTCACAGGCAATG - 4080  
4081 - GGGAAATAGGCAGTGACAGTCAATTTACAGCAGGGTATGTATGTTTAAAGAGTCTAGGCCGG - 4140  
4141 - GGTGTGGTGGCTCACGCCTGTAATTGCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGTGGATCACC - 4200  
4201 - TGAGGGTCAGGAGTTCGAGAACAGCCTGGCCAACTGATGAAATCCCGTCTCTACTAAAA - 4260  
4261 - ATACAAAAATTAGCTGGACATGCTGGCACACGCCTGTAATCCAGCTACTTGGGAGGCTG - 4320  
4321 - AGGCAGGAGAATGGCTTGAACCCGGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAAGTGAAGTGTGCCAC - 4380  
4381 - TACATCCAGCCTGGGTGACAAGAGTGAACCTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAACTA - 4440  
4441 - GAATCTAAGTCGAGTGTCAATATATCCATGTTTTATTCCTATTCCTTTTCCCCTTATGT - 4500  
4501 - ATCCTCTTACTTTAAAGAGGAACCTTAAAAAATCTTAGGGACGACTAGGCAGAGTGGCTC - 4560  
4561 - ACACCTGTAAGTCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGCAGATTATGAGGTCAGGAGTTC - 4620  
4621 - GAGACCAGCCTGGCCAAACATGGTGAACCCCGAGTCTACTAAAGATACAAAAAATCAGCC - 4680  
4681 - GGGCGTGGTGGCACGTGCCTATAATCCCAGATACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAAATCAC - 4740  
4741 - TTGAACCCGTGAGGCAGGTTTTCAGTGAGCTGAGATCATGCCATTGCACCTCCACCTGGG - 4800

FIG. 24B

【図 2 4 C】

4801 - TGACAGGGTGAGACTCCATCTCAAAAAAGAAAAGGAAAAATCTTAACGTACATACA - 4860  
4861 - TGGAAAGATCATCTTTTCAACCCCAACCCCAACTGAGATGGAGTTTGGCTCTTGTAC - 4920  
4921 - CCAAGCTGGAGTGCACCTGGCGCGATCTAGCTCCCTGCAAGCTCCGCTCCCGGGTTCACA - 4980  
4981 - CCATTCTCCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGCTCCTGCTACCATGCCC - 5040  
5041 - GGCTAATTTTTTTGTATTTTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCATCTGTGTAGCCAGGATG - 5100  
5101 - GTTTTGATCTCCTGACCTCGTGATCCGCGCCTCAGCCTCCCAAAGTGTGGGATTACA - 5160  
5161 - GGCCTAAGCCACTGCACCCCGCCTTTTTTTTTAATTAATTAATTTTTTTAGACAGAGTC - 5220  
5221 - TCGCTCTGTCCCAAGCTGGAGTGCAGTGGCGCGATCTGGGCTCACTGCAACCTCCGCTC - 5280  
5281 - CTGGGTTACGGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGCTCCTG - 5340  
5341 - CTACCATGCCCGGCTAATTTTTTTSTATTTTTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCACTGTGTT - 5400  
5401 - AGCCAGGATGGTTTGTATCTCCTGACCTCGTGATCCGCGCGCCTCAGCCTCCCAAAGTCC - 5460  
5461 - GCCTCAGCCTCCCAAAGTGTGGGATTACAGGCGTAAGCCACTGTACCCTGCCTTTTTTT - 5520  
5521 - TTTAATTAATTAATTTTTTTAGACAGAGTCTCGCTCTGTACCAAGCTGGAGTGCAGTGG - 5580  
5581 - CGCGATTTGGGCTCACTGCAACCTCCGCTTCTTGGGTTCAAGCGATTTTCTACCTCAGC - 5640  
5641 - CTCGGAGTAACCTGGGACTACAGGCGCGTCCACCACACCAAGCTAATTTTTTTGTGTAT - 5700  
5701 - GTCTTTAGTAGAGATGGGGTTTACCATGTAGGATGGTCTCGATCTCTTGACCTCGTGA - 5760  
5761 - TCCGCTGCCTCCGCTCCCAAAGTGTGGGATTACAGGATGAGCCACCTTGCCTGGCC - 5820  
5821 - TCCGCTGCCTCCGCTCCCAAAGTGTGGGATTACAGGATGAGCCACCTTGCCTGGCC - 5880  
5881 - TCTCAAGGAGGCTAAGATACCTATTCCTTTTTGGATCCTACCTCTATCAGGAGGGTGGGC - 5940  
5941 - CTTCTTGCATTGAAACAGTATGAAACAGTAGCCCTGAATTCATAAGTGGGACACCTTT - 6000  
6001 - CTTCTATTEGTAGAGCAGGAGTTTTTTTTCTCCTGCCAATGGTGCCTACTAAGGAGATTT - 6060  
6061 - CACTAGGGTACAGTCGTTTCAATTTGATAAGCATTGTTGAGCATACTCTCTGTGATGGTAC - 6120  
6121 - TATGGACAGTACTGGGGCTATAGTGGGGCAGGATGAGTTGGTCTTATGGCAGGAAG - 6180  
6181 - GCAGCTAATCAACAAGCAAAATATAAAGTATGATGGGAGGGCTGTCTTCAGCACTCATG - 6240  
6241 - AGTGTGAGCCAGGCTGGAGGGGACACCTGGAGAAGAGGGTGCATGTCTTTGCTCCTGT - 6300

6301 - GCTTTTCAGGAAGGASATCAGTTGCTGATGCAGACATTGAATACTCTGAGTACCCCG - 6360  
- K E I T L L M Q T L N T L S T P E

6361 - AGGAGAAGCTGGCTGCTCTGTGCAAGAAGTATGCTGAAGTGGTCAAGTTCACCCCTCCGCG - 6420  
- E K L A A L C K K Y A E L

6421 - GGCACCTTCCCTGCGTTGGGAAAATCAGCATGCCACCTGGTGTAAAGTTGGGGGTGCAGA - 6480  
6481 - GTC AAGTAGTGGCTTAATTCCTGTTCAAGCTTTTCTCTGAAGTATCTGTTAAATGGGGAA - 6540  
6541 - TCACTTCCAGCCAGCCTCTTCAGGGCTGTGCAGCAAGAGGAGAAACTGCATATTCCTTGA - 6600  
6601 - AAGAAATTTCTCAAAGAATGATTC AAGGTTGAGAGCCCTTGTTCCTGGCCTGAGTCCA - 6660  
6661 - AGACACCTTGTGATCTTGATGCTCTTCCCTCAAATACAGATGCATAGAGCCATTATCACA - 6720  
6721 - GTTAATAAAAATAACACTAGTCACTTGATACTTTTTTCTTTTACTCCAGAGCAGTCTTCT - 6780  
6781 - TGTCACTGCCTCCTCATATTTCCCATGACATTGACTTTTAAACAGAACTAGACTAGCTGT - 6840  
6841 - CTTGTAGGATGCCCCCTTCTAGCTTTGTCATCTCTGTGGTATCATTTACTTCTTTACCT - 6900  
6901 - CCTGGTACATGTAAGTGAAGTAGAAGTGTAGCTCTAAGCTTGATCCAAATTCAGCTTCAAC - 6960  
6961 - TTTTGTACAAGAATTTCTTAAGTACTTCAATGTTCCATCACAATAAATGCAAAGCATGC - 7020  
7021 - TCTTCCCACTTTGTTGTAACATTTGTCAGTGGGTGGGGGTGGGGCAGCCAGATTCTTCC - 7080  
7081 - ATCATCAGGTCCTTGTGCAATTTGAACTAACAGATTTATCCATTGATGGTCACAGCCT - 7140  
7141 - GTGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATTTATTTATTTATTTATTTTGTGAGAC - 7200  
7201 - GGGGTCTGTCTGTGCGCCAGGCTGGGGTGCAGTGGCACGATCTCGGCTCGCTGCAAGC - 7260  
7261 - TCCGCTTCTGGGTTTCAATTCCTGCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGTCTACAG - 7320  
7321 - GCGCCSACCACATGCTAGGCTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTASTAGAGACGGGGT - 7380  
7381 - TTCACCGTGTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCTTGACCTCGTGATCCGCCCCCTCGGCC - 7440  
7441 - TCCCAAAGTGTGGGATTACAGGCTTGAGCCACCACGCTGGCCTATTTATTTATTTATT - 7500  
7501 - CAGAGTCAGAGTCTCGCTCTGTCAACAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCGATCTCGGCTCATT - 7560  
7561 - GCAAACCTCCACCTCCAGGTTCAAGCGAGTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGA - 7620  
7621 - TTACAGGTCATGTACCCATGCCTGGCTAAATTTGTATGTTTTTAGTAGAGACAGAGTTT - 7680

FIG. 24C

【図 2 4 D】

7681 - CAGTATGTTGGCCAGGATGGTCTTGATCTCTTGGCCTCGTGATCCGCCCGTCTCAGCCTC - 7740  
7741 - CCAAAGTGTCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACTGTGCCTGGCCTCTAAGTATTTATTTTAA - 7800  
7801 - AATTAATTCATTCCACACACATTTATTAATATTTTCTGTAAAGGAACCTTACTCATCTTT - 7860  
7861 - AAAATGGGGAATGTCATACCTGCCTAATGACATCTTGTAAAGGATTAATAAAAGGTATA - 7920  
7921 - AGGAAGATAAGCACCCCTTTTGGAGTGTCCAGCCAGGGGAAAATGCTGATGCAAGAGAG - 7980  
7981 - GAAATGAGTGTCTAGAGTGGTGTGTGAGTAGAGGAGGGAGCTGAGGCCTGCCAAGAA - 8040  
8041 - GGGGGCTTGGCTGTGGTAACCACATGGCTAGGTCTGTGTGACTGGAGGAGAGGACGGGGC - 8100  
8101 - AGGTGGACTGGTAGATGTGCAGCTTGTGCCCTGATTCCTAGTTCCTCTGTGTTTTGA - 8160  
8161 - GATTTGATGAGAACCATGAAATAGTTGTCTGGAAGGAGAGGAGTGTGAATAGCATATGCA - 8220  
8221 - TTGTATTGGGATTGCTGCTTCTTCTGAAATGGTGGCCATGAATTTAAAGTGAGACTCTT - 8280  
8281 - CAAGTAGGGTTGTTATAGTACTCGTCTAAAGCAGGAAGGTGCTTTACTAGGGTTGCAGTA - 8340  
8341 - CTACTGGGGGAGGGCCAAGAGAGTTGAGGGTGTAAAGAAATCCAGCCAGGTAATGTAGTT - 8400  
8401 - ATTTTAAAGGAGAGTGGAAAGGATGGTTGAGTCAATGGATTGGAGGTCTATAGGGTAAGA - 8460  
8461 - GACTTCTGAGGATCACAGATACTGATTGGAATGAGCTAAAAAGATAGGTGATGGTAGCT - 8520  
8521 - CTGGACTGGGATGCTGGAATAGGATAGTGGGTGTGCTCTCTGGTAGTGACAAATCTAG - 8580  
8581 - ATCTCGCTGTCCAAGATAAATTCGTCTCTAGCTAATTTGACATGTGGCCAGTTTGAATTT - 8640  
8641 - GAACATGCTATAAATGTAAGATACACATCAGCTTTTGAAGACTTAAGCAAAAACAAGAA - 8700  
8701 - TATAAAACATCTTTTGTGAGAGAGTGTCTCAGTCAACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGTG - 8760  
8761 - ATGTCCTGCTTCCAGGTICAAACGATTCCTCTGCCCTCACAGCCTCCTGGAGTAACTGAGA - 8820  
8821 - TTACAGGCGCATGCCACCAAACTGGCTACTTTTTGTATTTTTTTTTTAGTAGAAACGGT - 8880  
8881 - TTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCTGACCTCAAGTGATCTGCCTGCCTCAG - 8940  
8941 - CCTCCCAAAGTGTGGGATACAGGCATGAGCCACCCTCCCGCCTCACTTTTTTACAT - 9000  
9001 - TGATTCCTGTTTGAATTTGTAATGTTTGGATATAGGTTAAATACATATATTACTAAA - 9060  
9061 - TTAATTTACCTGTTTTTACTTTTTAGTGGCGCCAGTAGAATATTTTAATTACTTAT - 9120  
9121 - GTGGTTTGCAATATATTTCTGTGTACAGGCCTGGATAGGGTCATGGGAGGGGAACCTGAG - 9180  
9181 - CTGGGAAAGGAGTGGTTTTGTGGAAGAGGTGATGGACTGTGAGGCCAGGAGTTAGAAG - 9240  
9241 - GATTATCTGTTGATACTGAAGTGGCCACAAATGAGAAAAGTAATGTGTGGGAGAGCG - 9300  
9301 - CTGATGAACCGCAGCGCTAACGTTTTGAAGGAATGCGAGGGAGCGATGGGGGCTGTCTGT - 9360  
9361 - TAATAGGCACAAGGTACGGTAGCAGGTGGTCTCATCCTCGGSCATGAGTGTCCAGCAAGT - 9420  
9421 - TGGGGAATGCAACAGCTTGAAGTGGCTCTAGTGGCCAGAGTCAAGAGCTGGAATAGGAA - 9480  
9481 - **TGGCATCTGCTGGCTGTGTGGCCCTGCTTGGCCCTAGTGAAGTACCATTCTCTGTCCC** - 9540  
9541 - **TACGGTGGAGCCTTTGGGGTTATTGTGAGTTCATGGGAGGAGCGTGAAGCACCCGGCACA** - 9600  
9601 - GCATCAGCCCATGAGAGTGCCTCTGGCCTGAGAGGGTAGGGTCAGGGCAGCTCAGGAGA - 9660  
9661 - CCTAGACCTGCATAGTGATCCCCCACCAGGAAGGCCCCACAAGATGCTCACCTGCCCT - 9720

9721 - CCCTATCCCTGTCCCAGCTGGAGGAGCACCGGAATTCACAGAAGCAGATGAAGCTCCTA - 9780  
L E E H R N S Q K Q M K L L

9781 - CAGAAAAAGCAGAGCCAGCTGGTGCAGAGAAGGACCACCTGCGCGGTGAGCAGCAAG - 9840  
- Q K K Q S Q L V Q E K D H L R G E H S K

9841 - GCCCTCCTGGCCCGCAGCAAGCTTGAAGCCCTATGCCGTGAGCTGCAGCGGCACAACCCG - 9900  
- A V L A R S K L E S L C R E L Q R H N R

9901 - TCCCTCAAGGTAGGCCTGGGCCCCCTGGAACAGGTGACTCTGGTTTCCCTTACTTCCACT - 9960  
- S L K

9961 - TAATGTTTTCTTTCATGGGCTTCTCTTAAAAAGTAGTGCAGGCTAGGGCCAGGCGCAGT - 10020  
10021 - GGCACACATAAGTGATTAAAAATCTTCTGGCCACTAAAAACAGAAATTAATTTAGTAA - 10080  
10081 - TATACTTAACCCAATATCCAAAACATTACAATTTCAACATGAAATCAGTGTAAAAAGCA - 10140  
10141 - AGGCTGGGTGTGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAACACTTTGGGAGGCTGAGGTGGATGG - 10200  
10201 - ATCACTTGAGGCCAGGAGTTTGAACCAACCTGGTCAACGCAGTGAACCCCACTTCTACT - 10260  
10261 - AAAAATACAAAAATTAGCCGAGTGTGCTGGCAAATGCCATAAATCCAGCTCACTCAGGTG - 10320

FIG. 24D

【図24E】

10321 - GCTCAGGCATGAGAATTGCTTGCACCTGGGAGGCTGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATTGCA - 10380  
10381 - TCACTGCAATTACAGCCTGGGCAACAGAGTGAGACTCAGTGTCCAAAAAAAAAAAAAGTA - 10440  
10441 - GTGCAGGCTTGTGGCATAGAATAACACTTTCTCAATAATGCCTTACGTTAAGAGAGTACT - 10500  
10501 - GCTTGTAAATCATTGACATGTATTAGATAAGGTGAAGGATAAAGTACTAAGAGAAATCCAT - 10560  
10561 - AATGCACTGCGCTTAGTATTTCTCAATGAAATGACAGTCCCTGGTAAGCGGAGGCCTGG - 10620  
10621 - CTCTGACAAGCAGCTCTTGTCCCAGACGTTGGTGCAGTCAGGAACCTGGGTCCTTCCCATG - 10680  
10681 - TTCTGCTGCTTCTATGGTGGTGCAGTCTGTGTTACACCAAGTTTAAATACAGCCTTTT - 10740  
10741 - AACTTTCTTTTTTATATGTAAATCTTACATGTAGTTTTTAGAATGAAATTATATACAT - 10800  
10801 - GTACCATTTTCATATCCTGTGTCCTTTTTTTCACTTTACATAACATTTTTCCCTATCAGTAT - 10860  
10861 - GTGTAGGGCTATCTTCTCATTATATGGATATATATATCAGTGCCTAGTTAAAGCATTT - 10920  
10921 - TGGGGGTTGTTTTACAATTTTTTCATTATTACATATAGAACTATAGTGAAAATTTCTTGTAT - 10980  
10981 - ATTTATCACTGGTCAGTTATATAGAACTTATCTGTAGGATAAGTCATGGAATTTGAAATGG - 11040  
11041 - CTAGGTCACAGTATATGCAGATTTTTTCATTTTTAATAGATTTTGCTGGATTGCCCTCCAGT - 11100  
11101 - GAGGGGGCAGTGTGCCTTCCCATCAAAGTGTGAGTGCCTAATTCTGCACAACCTTTCG - 11160  
11161 - AAACCTGGGTGTTACTAAATTTAACAGCTTGGTCTCTGGGGGTACAGAGGGGACAAAT - 11220  
11221 - GCACATTAATCTGAAATCTGGAAGAATAGGCCTTAGGAGATCCGACTTGCCTCAGAAATGG - 11280  
11281 - CACTTAGCACTTACATGTGTGCATGTGTGCCTGCATTTTTTCTTCTTTTTTTTTTTTGG - 11340  
11341 - GGGACGGAGTCTTGTCTGTGGCCCATCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCGATCATAG - 11400  
11401 - CTCACCACAACCTCGCCCTCCCAGGTTCAAATGACTCCTCTGCCTCAGCCTCCCAAGCAG - 11460  
11461 - CTGGGACCACAGGTGCACACCATCAGCCGGGCTAATTTTTGTATTTTAGTAGAAACGGGG - 11520  
11521 - TTTACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCAAACCTCCTGACCTCGTGATCCGCCACCTCAGC - 11580  
11581 - CTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCCCTGCCATGTGCCTGCATTTTT - 11640  
11641 - CTAGGGGAGAATCTCAGTTGATGTCACCTGATATACAGAGGGCCCATTTGGAACCCGCA - 11700  
11701 - TTGCACAACATCCTGGAGTCTGGCTACTCCACGCTTTGGGAGCAGGGAGGGCTGTTGGCA - 11760  
11761 - GAGACCATCTGTGGACTAGCTGGGGACCTTGTGAGGTAGCAGTGGATGATGGCTCTCG - 11820

11821 - GGCTGACTTCTTTGCCAGGAAGAAGTSTGACGCGGGCCCGGGAGGAGGAGAGAAGCG - 11880  
- E E G V Q R A R E E E E K R

11881 - CAAGGAGGTGACCTCGCACTTCCAGGTGACACTGAATGACATTCAGCTGCAGATGGAACA - 11940  
- K E V T S H F Q V T L N D I Q L Q M E Q

11941 - GCACAATGAGCGCAACTCCAAGCTCGCCAAAGAGAACATGGAGCTGGCTGAGAGGCTCAA - 12000  
- H N E R N S K L R Q E N M E L A E R L K

12001 - GAAGCTGATTGAGCAGTATGAGCTGCGCGAGGAGGTAAGGGTATCAGGACAGCAGTCAT - 12060  
- K L I E Q Y E L R E E

12061 - GGCCAGAAATGTGAGGTTTTGAGTGTGTGCTAGGCACTGGGACAGTACCTTTTCAGGC - 12120  
12121 - TTCATCCCATTCTCCCTTTCTTCTCCTCCTCCTCCTTGGGAGGAGAGTAATGTTATTC - 12180  
12181 - TCATGATAAAAAACAGGTGTGGAGAAGAGACTCACTTACAGCCACACAGCCCAAGTCC - 12240  
12241 - ACAGTGCCCTTGTCCCAAATGACTGGGCCAGGCATCTTTTGGAAATTAGAACTATCCACATT - 12300  
12301 - TTAGAATGAGGTACATGTATGGACTGTGTCTATATAGCACCCCTCAGCAGGGCCTTGGG - 12360  
12361 - GAAGCCAGACACATTAATGTATTTATGCAGTAGAACTCCAAATACTCACCTACATTATG - 12420  
12421 - GGCTTACAATGATGCAGGTCAAGTCTGGCTGCCAGCTTATGACAAATTCATTTTTAGAA - 12480  
12481 - CTTTGTAGAATTTGGAATTGCAGGGGAGGGGTGTACCTGTGATCAGTGATGGACTCCAGA - 12540  
12541 - GACTGTGTCCACTGATTCCTTGTCTCCTGCCACTCAAAGGCAGAAATTTATCAGGCTG - 12600  
12601 - GGCGTGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAACACTTTGGGAGGCCAAAGCGGGCGGATCACC - 12660  
12661 - TGAGGTGAGGATTCAGACCCAGCCTGGCCAAACATGGTGAACCCCTGTCTCTACTAAAAA - 12720  
12721 - TACAAAAAATTAGCCAGGTGTGGTGGTGCACGGCTGTAGTCCAGCTACTCAGGAGGCTG - 12780  
12781 - AGGCAGGAGAATGCTTGAACCCAGGAGGCAGAGGTTGCAATGAGCCAAGATTGTGCTAC - 12840  
12841 - TGCACCTAGCCTGGGTGATATACCCAGACTCCATCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGC - 12900  
12901 - AGGATGTCACCTCCTTTGTCACTGCGTTGGCTGCCACCCAGGCCTTGAATCTTTGGAT - 12960

FIG. 24E

【 2 4 F 】

12961 - CTTCCCTGCCAGTCACTGGCTSTTCTGGGCGGTTCTCATCATGAGAAGGGAGACCTGC - 13020  
13021 - AGCCCCCTTACAGGGCTGGCAGAGGACCTGCTCTGGATTAGGCCCTTTCTAGCCCCCTGG - 13080  
13081 - GGTGTGGCAGTGGGTGAGACCGGGAAGATCTGCCCTCTTAGGTTTCATAGGCCAAAGTGAT - 13140  
13141 - GATCGTGTGTGCAGGACCTAGAGGGCGCTCCCCGACCCACCCCTTTCCCTTGGCATACTT - 13200  
13201 - CATCCTCTGGGAACAAGCTGCTTGTGGTTTGGGGGAGTTGGTTTGGTTCTTATCCC - 13260  
13261 - TCAGCGCTGAGACATAGAGGGCTTCCTGGGCCACTACAGTGGAGACGAACTTCAAGAATC - 13320  
13321 - TGAATACCCCGTTTTCTCTCCCGCAAGGCAAAAAGGACTTAGTACTACCTGTGGAG - 13380  
13381 - AAGGAGGTGCAGGACTACAGGCCCTGCTGCTTGCATTTACAGCCCTCCCCAGACAGAC - 13440  
13441 - ACAGGCACCCTCATCATACCCAACTGGACTTACCTGCTAGGCACCTTCCCTTCCCCATC - 13500  
13501 - CAAAAAATGGAGTTATTTCCCTTATTTAGCAAGTCCAGTTGATTTTACCTTTGAAGT - 13560  
13561 - AGCACCTGAGTCCCTTCCCTTCTCTCCATCCCTTCTCTCTCACCTGACACAGGTCTGCAG - 13620  
13621 - CGCTCCTCTAGTAGGCAGGACAGCCATTCCTTGGGGATGCACATGTCTAGTCTTTGCCTA - 13680  
13681 - GATATGGCAAGTCTTTGCCAACTGAGCTAGGCTGTTATGTTCTTAGAGGCATTGTTTTG - 13740  
13741 - CCCATTCTTCCATTTACAAGAGAATCAGGGACACAGAAGTGGGGCTTCCAGCCCCATA - 13800  
13801 - GGTGATCAATCCTGGGGTCAGAGATTTGAGTGTGTTTATTGCTTGCCTTCTGGGAGCAG - 13860  
13861 - ATTCCATCCATAAACCATGTGCTTACCAAGGCTGACTCACTGGGAGAGAACGACGCTGA - 13920  
13921 - GGTGGAAAGCTGACCTTCCAGAGACTTGGGGCCCATGTTGTGTGGTACACATGGGAGTC - 13980  
13981 - CATCATATCAGATTGAGATGGGGGGCTGGGCAAGTGCCTGGTCTGTGGCTGTGGGGCT - 14040

14041 - ACCCTGAGAAAGGGAGCGCCTGACAAGCCGACTGCTCCCACCATCTTTGTTGCAGCATAT - 14100  
- H I

14101 - CGACAAAGTCTTCAAACCAAGGACCTACAACAGCAGCTGGTGGATGCCAAGCTCCAGCA - 14160  
- D K V F K H K D L Q Q Q L V D A K L Q Q

14161 - GCCCCAGGAGATGCTAAAGGAGGCAGAAAGAGCGGCACCAGCGGGAGAAGGATTTTGTGAG - 14220  
- A Q E M L K E A E E R H Q R E K D F

14221 - GCTCAGSCCCAGGGTTGGGGTGGGGGTGTGGGAGGAGACAGGCTGGGCTCTGGCTCAGC - 14280  
14281 - TCATAGCCGGGTATATGGGAGAAGTCTGGCCAGACCAGGCACAGATTCCCTGAGTACCA - 14340  
14341 - GTCTGAGAGCAGGAAGCCTCAGTGGGTCTGGTGTGTGGCTAAAAACCAACATAGCCC - 14400

14401 - CTGGGGGCTTCTGACAGGATCTGGGGTTCTGTCTTGAAAATAGCTCCTGAAAGAGGCAGT - 14460  
- L L K E A V

14461 - AGAGTCCCAGAGGATGTGTGAGCTGATGAAGCAGCAAGAGACCCACCTGAAGCAACAGGT - 14520  
- E S Q R M C E L M K Q Q E T H L K Q Q

14521 - GAGAGCATATAACCTGACCCTGTGCCTTCAAGTTTCCCTCACTGGGCCCCATCCTGGGGG - 14580  
14581 - TAGTGAAATGGGACCCCTCAITCTAGGACTGGCTGTGTCCCTGGCTGCTATGACGCCTTGGT - 14640  
14641 - TGAGCTTAGGTGGGCTCAGAGGACTTCATTTGTAGCTCAGAAATGTATTGCTTTTGAGGA - 14700  
14701 - GGTAGGAACAGAAGAGTTTGAANAATCAACATAAAGGCAAAAATAAAGTCAACCCTAAGTCT - 14760  
14761 - CCTACTTTCCAGGCTTAGCATTTGGATTATATCCTTCAAATATATAGCTTTGCTTTGT - 14820  
14821 - TTTAAGGAAAAATAGTATCTCAATAGAATTACTGGTCAGAGAGTCAAGGACGGGTCTGAG - 14880  
14881 - TGTGTTGACCAGAGTGCCTCCCAGAGAAACCCAGTCTTATCTGTGGGCTGCTTTCTCCCC - 14940

14941 - ACAGCTTGCCCTATACACAGAGAAGTTTGGAGGTTCCAGAACACACTTTCCAAAAGCAG - 15000  
- L A L Y T E K F E E F Q N T L S K S S

FIG. 24F



【 図 2 4 H 】

16982 - CCTGGCCCATAAAAGGCTCCCATGCTGAGCAGCCCATGCTGAAGCCAGGATGTTCTGAC - 17041  
17042 - CTGGCTGGCATCTGGCACTTGCAATTTGGATTTTGTGGGTGAGTTTACGTACATAGGG - 17101  
17102 - CATTTTGC AAGGCTTGCAAATGCATTTATACCTGTAAGTGTACAGTGGGCTTGCAATGG - 17161  
17162 - GGATGGGGTGTGTACAGATGAAGTCAGTGGCTGTCTGTGAGCTGAAGAGTCTTGAGAG - 17221  
17222 - GGGCTGTCACTCTGTAGCTGCCATCACAGTGAAGTGGCAGAAGTGAAGTGTAGCATTTCTCT - 17281  
17282 - GTCTGATTTGAGGCTCAGACCCCTCCCTGCCCTCAGAGCTCAAGACAAGTAATACACC - 17341  
17342 - AGGTCTTGACTGCATTTGTCTTGTGAGCAGGGCTTGGTGGTCAAGCTCAGGCCCTCCTAG - 17401  
17402 - CTGCTCTGGAGGCTCCTTTGATTCTCTAGACCTGGAAAAGGTGTCCCTAGGCAGAGCCCT - 17461  
17462 - GGCAGGGCGCTCAGAGCTGGGGATTTGCTGCCTGGAACAAGGGACCTGGAGAATGTTTTT - 17521  
17522 - GCGTGGGATGATGTGCTGGTCAGGAGCCCTTGGGCATCGCTTCCCTGCCCTTTGGTAG - 17581  
17582 - TGCCAGGACCAGGCCAATGATGCTTCTCAGTAGCCTTATCATTACAGGTGCCTCTCTAG - 17641  
17642 - CCTGCACAAATGATGACAAGAGATCACCCAAAGGATTATTTCTGAAGTGTTTTTTTCT - 17701  
17702 - TTATTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTT - 17761  
17762 - TGTATTGAGGACCTTCCAAGGAAGAGGGATGCTGTAGCAGTGGTGCCTGGGTGCCCTGGCC - 17821  
17822 - TCCAGTGTCCACCTCCTTACCACCCCACTTGGCTCCTTTGGCATCTTGATGCTGAGGT - 17881  
17882 - TTCCTGTTTGGTGAGATCAGGTTGTTTGTGGTAAAAGAAAGGAAGGGCTTCTGATGGCT - 17941  
17942 - TTGCCACAAGCTTACCTGTGGGTTTCAGTCTGAGAGGCCACCACAGTTCCTCATCAGCA - 18001  
18002 - CTGCTCCATGCAGCAGTGTCTGGGTCCCATGTCAGCTGCCTCTTGGCTTCAATGGGT - 18061  
18062 - TTTCTGCTTCTGCCCCACCCCATGTCGAATCCTCAAGATTGTCCTGATTCCTATT - 18121  
18122 - TCCTGGCACCTCCCTGCCTGTCTTGGGATTTCTACTTCTTCTGCTGTGGGAGCCCATAG - 18181  
18182 - CTGTTGTCTAACAGGTAAGAAATGAATTTGAATTTGACTGGGCCCCAGAAATCCATAA - 18241  
18242 - AATGGCTGCAGACAGTGTGTTCTGTGTCTTCTTACCCTTCCAGTACATACTACT - 18301  
18302 - ATGTACTGTGTAGAGCCATTCTATATGCTGAATGTTCTGCTGTTGCAAACTTGCAGGGT - 18361  
18362 - ATTAGCCAGTGTGTTGTCAGCAGTGTCTGGGACAACAGAATGACTCAGACCAAGATG - 18421  
18422 - GATAGGATGGTTAGGGCTTTGCTTCTGCTGTTTTTCTTTGAAAGCTAGTTCATTGTCTCTG - 18481  
18482 - CAGGTCCCTTCACTTCCATAGCTAGCCACTCTTTAGCCCTTACCTTAAATCTCTCAG - 18541  
18542 - ATAAGTTGTTTACAAAGAAATGTTAAGTACTGAATCATGTGTGACTGAGACCAGAGATGG - 18601  
18602 - CAAATGAATGGCACACCATTTCTCTTCTCTGCCCCAGGGCAGGTACCCTGATCTGCA - 18661  
18662 - CTAGAGTTGCCCTGCTATTCTCTGGTGTATCCTTACATCTAGGTGCCCTCAAGCAGCTGT - 18721  
18722 - GTGAGTGTGAGATCTGTGCCATCTCTGGTGTGAGTACTCTGTCTGTGAGTGTCTCC - 18781  
18782 - CATGACCTTTTCTTCCCTTTGAAATCCCTCTGTCTGGAGTAGTCTTGCCTTCTCTCTG - 18841  
18842 - TCCAGTAGGGCTTTTCCCTACCCACCCCTGTGCCAGGCTAAGCTGGTACAAGAGCTG - 18901  
18902 - CCAACCTCACAGAGTGTGTTGCTAGGCGAGAGGTCAGGGAAAGGGCAGAGGTATGCAC - 18961  
18962 - CTTCCCTTGAAGAGAGGGGAAAGCCCTACAGTGGCCACATAATGCTGACTCACAC - 19021  
19022 - TTCAGCTACCTCTTAATGCCTGTGGAGGGACTGAGCTGCTGGATCCCAGTGTGGTGGTG - 19081  
19082 - TAGGAGGCCACAGTGAAGGCTGGCCAGCTGGGTTTCCAGGTGAGGAATGTGGGCC - 19141  
19142 - CAGGCAAGGTGCAGCCTTTGCTCACAGCTCCATCCATGCTAGACCTTCAGGCCAGTCTG - 19201  
19202 - CAGATGAGGTTCCCTACCTTTTCTTCTCTTATTGACCAATCAACCAATCACTACAGC - 19261  
19262 - TGCTCTGCTTCTGCTTTCCAAAGTAGCCAGGCTCTGGGCCAGATGCAGGGGAGGTGCCT - 19321  
19322 - ATCCATGAGTGAAGGCCAGTGTCTTCCCTCACCTGGGTGGGTCCACACTTGTGACCTCAG - 19381  
19382 - TTTTAGGACCAAGATCTGTGTTGGTTTCTTAGATTGCTAGCTTTTCTCCAGGGGACCAC - 19441  
19442 - AGCAGGTGAAGCTCAAGAGCGCATGGCTCTGCTAATAGTAAATGTTTTTCCAGGGCTTGT - 19501  
19502 - CCAGTGAAGCTTCAIGTCCACCAGATTCTGAGAGGTGTCAGCAGCACTTTTTTTTTT - 19561  
19562 - ATTTGTTGTTTGTTTTCCATGAGGTTATCGGACCATGGGCTGAGCTCAGGCACCTTCTGT - 19621  
19622 - AGGAGACTGTTATTTCTGTAAGATGTTATTTAACCTTCTCACCCCATCAGGTTGGCC - 19681  
19682 - CTGAGGGCTGACCCGGAGGCCAGTGGAGCTGCCTGGTGTCCACGGGGGAGGGCAAGGCC - 19741  
19742 - TGCTGAGCTGATCTCCAGCTGCTGCCAGCCTTCCGCTTGCACAGCACAGAGGTGG - 19801  
19802 - TCACCCAGGGACAGCCAGGCACCTGCTCCTTTCCTTCCCTTCCCTGGGGGAGGGAGCTGCC - 19861  
19862 - TTCTGTCCCTGTAACCTGCTTTCTTATGGCCAGCCCGGCCACTCAGACTGTTTGAAGC - 19921  
19922 - TGCACTGGCAGCTTTTTTGTCTCTTTGGGATTTCAACAACAGCCAGGGACTTGATTTTGA - 19981  
19982 - TGTATTTTAAACCACATTAATAAAGAGTCTGTTGCCTTACTGTTTCTCTCTCTGACCTG - 20041  
20042 - TGTATTCCTTTGTTCTGGATCTGATCCATTCAGCCCTTCCATCATCACTGACTTGTTC - 20101  
20102 - AGGTCTGCTGCAGAGCGCCATGGTGGTTCCCTGGTATCTTACATATCCACAGTGTCTT - 20161  
20162 - TGAGCAGTCCACAGCCTCAGGATGCTGGCATTTCACTTGAGCTGCCTGAGTGGAGCC - 20221  
20222 - CTTGGCAAAGTTGGCAAAGACCCTTGCCTCAGAGAGGATCACACACACAAAAAGTTT - 20281

FIG. 24H

## 【図 24 I】

20282 - CCCTGACCTGGGGGCTCACAGGCTAGTGAAGGAAAAGGTACTTTAGCTATAGACAGGT - 20341  
 20342 - CAATGGTGTGAGAGCAGAGAGGAGGCCCTGCCCTTCAGCAAGGTGAGGGGTGATA - 20401  
 20402 - CCTGGAATGGCCCTCTGAACCACAGGGCAGGTAGAAGATGAACGTCATTTAGTGATTAAA - 20461  
 20462 - TGGTACAGCTGGGAAGCAGGTCCATGGGACTGGGAGAGGGGTGAGGCTGGGCCAGAGT - 20521  
 20522 - CTGGGTACCAGGTTAAGGAATGTGGGCTAGATCCAGAGGGCAGGGGGGCAACTGAAGGT - 20581  
 20582 - GTTCAATAGGAAATGATAGGCTCCAGCAGTAAGGCAAAAGGCATGGAGCCAGGCATAG - 20641  
 20642 - GCCATTTGAGGCCAGGTTAAGAGGGGTGGACACTCATCACTGCTATTTGGTCTGAGCT - 20701  
 20702 - GTGGGTAGGCTCCTATAGCCCTGGCCTGCCAAGGGAATTCACAGGGGCTCTAATTGTA - 20761  
 20762 - TGCATTCCTAAGGAGAGCACATTCCTCTGTTCAGTTTTACACCCCCATTACCACCT - 20821  
 20822 - CAAGCATGGGACTCCTATATGGGAGACATGCTGCTGGTGGCCTCACCCAGCACCCGTTC - 20881  
 20882 - TCTCTGGGTCTGGGTTGGTCAGGCACAAAGGATGATATGTGCTGAATGCCAGGAAATG - 20941  
 20942 - GCAGAGACAACCCACCTGCCCTTCCTCCAGGCCCTCCACAAATAGATGCCCCACAATGA - 21001  
 21002 - CTGTGACAGTCCCAGCAGAGCCTCTGACCCTTCTAGCTGGGTCTGATACATGTTTTCCA - 21061  
 21062 - TGCTGGCCATGTTATTTCTAGTCCGAGATCCTCTGGAGGGTGTGGGGGGGTGCCGCC - 21121  
 21122 - AACTCTTGGAGATTCCAAGCAAAGCAGCTCTGAGAATAATGAGGTTTCTGACCCCCAGT - 21181  
 21182 - GAAGCAGCTGAGGATGGGAACCACAGGGGTGCTCCCTCTGTGACGAGCATTACCACCTGC - 21241  
 21242 - TACTCTAGCAGTCCGGTGGGGAAGGAGAGGGATTCTGTGTGTCCCAAGTCTGGGCCCT - 21301  
 21302 - GGTATTGAAAAGTTGGGAATTACTCTTTACCCTTGTGGAGTGTCTGAGTGTGGGAG - 21361  
 21362 - TACCCAGGAAGAAGCCCTGAGCAGTGCCTCAGGAGCAGTGCCTATGGCTCCCCACATC - 21421  
 21422 - AGCCAAGAGGGCCCAACCCAGGAAGCCACTCCTGCCCGGGATGGGAAGGTGGGCTGGG - 21481  
 21482 - TGGCTGTGTGCACTGCCCTGGGCCAGTCACTTGAGCCTGCTGAGCCGCTGGCCAAACA - 21541  
 21542 - TGAGCCTCTCTCCTGTTGTATCAGATGCTGTTCTGGGACCTGCCAGGAGCCTCTGCC - 21601  
 21602 - AGGGCTTTAAATAGCTGCCCCATTGATCTGGCTGCAGGCAGCAGTCACTGGGTC - 21661  
 21662 - AGCCTCCATCAGGTGCTCAGGTTTCCCTGAGGACTGGAGTCAAGTCCAGGGAATCGCGT - 21721  
 21722 - GGTCTACCTTATGACCTGGTCTCCCCACCTGTCTCCTAGGCCTGGGGGTGGGGAGG - 21781  
 21782 - ACTCCTGTCACTTCATCTGCGGCAAAATACAGCCCCACCACTTACCAGAGAAAATGTC - 21841  
 21842 - TGGCATTGTAGAGAGAGGGGTTTTGCCCTCAAAGACTGTGCTTACTTTCAGTAGAATG - 21901  
 21902 - GGGAAATGACACTGSTATCTTCCTTAAGSGTTGTTATGGGGATGAAATGTATGTAAGTGC - 21961  
 21962 - TCAATAGGGCACTGGACTCACTCCATTGATGGCTGTCTTTGCTCGAAGTGTCTTCTGAT - 22021  
 22022 - GCTGTGCTGTGTGCTCTGTGCTTCTTCTGTGCTTACATTCCTCTCTCTCACTCACTC - 22081  
 22082 - ACTCTGTCTCTCCTCTCCCCGCCCCACCCCTTTCTGACAAAGCCACCACCTTTTGTA - 22141  
 22142 - AGGAAGTGTAGCTTCTCTGAAACTGCCGGGAAAGGAAATCTTTTTAAATAGACAT - 22201  
 22202 - CACACAACCAACAGGGTCCCTAGGTTAGGCGGGGAGGTGAGSTCGAGTGAGA - 22255

FIG. 24I

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

					International Application No PCT/US 01/06356		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER							
IPC 7	C12N15/12	C07K14/47	C07K7/08	C07K16/18	C12Q1/68		
	A61K38/04	A61K38/17	A61K39/00	G01N33/53	G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC							
B. FIELDS SEARCHED							
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)							
IPC 7	C12N	C07K	C12Q	A61K	G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched							
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)							
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBL, MEDLINE							
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT							
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages					Relevant to claim No.	
X	WO 98 23282 A (BOSTON HEART FOUNDATION INC) 4 June 1998 (1998-06-04)  the whole document  -----  -/--					1-22,24, 26-32, 34-37	
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.					<input checked="" type="checkbox"/>	Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :							
* A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance			* T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention				
* E* earlier document but published on or after the international filing date			* X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone				
* L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)			* Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.				
* O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			* &* document member of the same patent family				
* P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed							
Date of the actual completion of the international search				Date of mailing of the international search report			
14 September 2001				27/09/2001			
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HW Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016				Authorized officer  van de Kamp, M			

7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/US 01/06356

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE EM_HUM 'Online! EMBL; ID HSAF6088, AC AF006088, 29 July 1997 (1997-07-29) WELCH M D ET AL.: "Homo sapiens Arp2/3 protein complex subunit p16-Arc (ARC16) mRNA, complete cds" XP002177049 Note: 99.4% nt seq identity with SEQ ID NO:15 in 1833 nt overlap (1-1831:94-1925), 100.0% aa seq identity with SEQ ID NO:6 in 151 aa overlap (1-151:1-151) the whole document -& WELCH M D ET AL.: "The human Arp2/3 complex is composed of evolutionary conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly" JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 138, no. 2, 28 July 1997 (1997-07-28), pages 375-384, XP002177045 abstract figure 1	1,2,6, 10,11, 13,14
A	WO 94 16074 A (UNIV ST LOUIS ;US HEALTH (US); FAUCI ANTHONY S (US); FORD RICHARD) 21 July 1994 (1994-07-21) Note: 99.2% (74.4%) nt seq identity of SEQ ID NO:1 with SEQ ID NO:46 (14) in 1021 (1860) nt overlap (781-1799:1638-621 (2-1799:2480-681)) example 1 page 75-76 claim 4	1,5,8
A	WO 91 06011 A (UNIV LEHIGH) 2 May 1991 (1991-05-02) page 2, line 17 -page 3, line 14 page 9, line 20 -page 13, line 22 claims 1-9	
A	EP 0 586 094 A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND) 9 March 1994 (1994-03-09) page 4, line 33-54 page 6, line 4-31	
A	DE 42 22 385 A (BOEHRINGER INGELHEIM INT) 13 January 1994 (1994-01-13) column 2, line 23-35 example 3 claims 1-8	
	-/-	

7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 01/06356

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 773 290 A (KOWA CO) 14 May 1997 (1997-05-14) page 3, line 12-18 examples 1-7	
A	TKACHUK V A ET AL.: "Identification of an atypical lipoprotein-binding protein from human aortic smooth muscle as T-cadherin" FEBS LETTERS, vol. 421, no. 3, 16 January 1998 (1998-01-16), pages 208-212, XP002177046 abstract figure 1	
A	KUZMENKO Y S ET AL.: "Characteristics of smooth muscle cell lipoprotein binding proteins (p105/p130) as T-cadherin and regulation by positive and negative growth regulators." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 246, no. 2, 19 May 1998 (1998-05-19), pages 489-494, XP002177047 ISSN: 0006-291X abstract figures 1-5	
A	RAMPRASAD M P ET AL.: "Cell surface expression of mouse macroscialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 93, no. 25, 1996, pages 14833-14838, XP002177048 1996 ISSN: 0027-8424 abstract figures 3,6	
A	LEES A M ET AL.: "99M Technetium-labeled low density lipoprotein: receptor recognition and intracellular sequestration of radiolabel" JOURNAL OF LIPID RESEARCH, vol. 32, no. 1, January 1991 (1991-01), pages 1-8, XP001002803 ISSN: 0022-2275 abstract page 1, left-hand column, line 1 -right-hand column, line 10	

7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1,2,9-37 (all partially); 3 (completely)

An isolated polynucleotide encoding a polypeptide comprising the amino acid (aa) sequence of SEQ ID NO:1 or 9, or a polynucleotide capable of hybridizing to it which is at least 95% identical and wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL, or a polynucleotide encoding a polypeptide comprising an aa sequence with at least 90% sequence identity with the aa sequence of SEQ ID NO:1 or 9 and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment of any of these polynucleotides wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL. A polynucleotide as said encoding a polypeptide comprising the aa residues 14-43 (SEQ ID NO:23) or 38-43 (SEQ ID NO:24) of the aa sequence of SEQ ID NO:1, or a polynucleotide capable of hybridizing to it which is at least 95% identical and wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL, or a biologically active fragment thereof wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL. A polynucleotide as said comprising the nucleic acid of SEQ ID NO:10. A recombinant vector comprising a polynucleotide as said, a cell comprising said vector, and a method for producing an LDL binding protein (LBP) comprising culturing said cell. An isolated polypeptide having the aa sequence of SEQ ID NO:1 or 9, or a polypeptide which is at least 95% identical to said polypeptide and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment of said polypeptide capable of binding to LDL. A polypeptide as said having the aa residues 14-43 (SEQ ID NO:23) or 38-43 (SEQ ID NO:24) of the aa sequence of SEQ ID NO:1, or a polypeptide which is at least 95% identical and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment thereof capable of binding to LDL. Methods of use of (said) LBP polypeptides in determination of risk for arteriosclerosis, and in the evaluation of agents for treatment of arteriosclerosis, of agents for the ability to alter binding of LBP polypeptide to a binding molecule, or of agents for the ability to bind to an LBP polypeptide or to a nucleic acid encoding an LBP regulatory sequence, and agents identified therewith. Methods of treatment, diagnosis and immunization. Pharmaceutical and vaccine compositions. Methods of making LBP fragments and analogs.

2. Claims: 1,2,9-37 (all partially); 4 (completely)

An isolated polynucleotide encoding a polypeptide comprising the amino acid (aa) sequence of SEQ ID NO:2-4 or 47, or a polynucleotide capable of hybridizing to it which is at least 95% identical and wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL, or a polynucleotide encoding a polypeptide comprising an aa sequence with at least 90%

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

sequence identity with the aa sequence of SEQ ID NO:2-4 or 47 and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment of any of these polynucleotides wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL. A polynucleotide as said encoding a polypeptide comprising the aa residues 338-353, 338-365, 354-365 or 444-453 (SEQ ID NOs 25-28) of the aa sequence of SEQ ID NO:47, or a polynucleotide capable of hybridizing to it which is at least 95% identical and wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL, or a biologically active fragment thereof wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL. A polynucleotide as said comprising the nucleic acid of SEQ ID NO:48. A recombinant vector comprising a polynucleotide as said, a cell comprising said vector, and a method for producing an LDL binding protein (LBP) comprising culturing said cell. An isolated polypeptide having the aa sequence of SEQ ID NO:2-4 or 47, or a polypeptide which is at least 95% identical to said polypeptide and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment of said polypeptide capable of binding to LDL. A polypeptide as said having the aa residues 338-353, 338-365, 354-365 or 444-453 (SEQ ID NOs 25-28) of the aa sequence of SEQ ID NO:47, or a polypeptide which is at least 95% identical and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment thereof capable of binding to LDL. Methods of use of (said) LBP polypeptides in determination of risk for arteriosclerosis, and in the evaluation of agents for treatment of arteriosclerosis, of agents for the ability to alter binding of LBP polypeptide to a binding molecule, or of agents for the ability to bind to an LBP polypeptide or to a nucleic acid encoding an LBP regulatory sequence, and agents identified therewith. Methods of treatment, diagnosis and immunization. Pharmaceutical and vaccine compositions. Methods of making LBP fragments and analogs.

## 3. Claims: 1,2,9-37 (all partially); 5 (completely)

An isolated polynucleotide encoding a polypeptide comprising the amino acid (aa) sequence of SEQ ID NO:5, or a polynucleotide capable of hybridizing to it which is at least 95% identical and wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL, or a polynucleotide encoding a polypeptide comprising an aa sequence with at least 90% sequence identity with the aa sequence of SEQ ID NO:5 and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment of any of these polynucleotides wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL. A polynucleotide as said encoding a polypeptide comprising the aa residues 96-110 (SEQ ID NO:29) of the aa sequence of SEQ ID NO:5, or a polynucleotide capable of hybridizing to it which is at least 95% identical and wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL, or a biologically active fragment thereof wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL. A polynucleotide as said comprising the

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

nucleic acid of SEQ ID NO:14. A recombinant vector comprising a polynucleotide as said, a cell comprising said vector, and a method for producing an LDL binding protein (LBP) comprising culturing said cell. An isolated polypeptide having the aa sequence of SEQ ID NO:5, or a polypeptide which is at least 95% identical to said polypeptide and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment of said polypeptide capable of binding to LDL. A polypeptide as said having the aa residues 96-110 (SEQ ID NO:29) of the aa sequence of SEQ ID NO:5, or a polypeptide which is at least 95% identical and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment thereof capable of binding to LDL. Methods of use of (said) LBP polypeptides in determination of risk for arterosclerosis, and in the evaluation of agents for treatment of arterosclerosis, of agents for the ability to alter binding of LBP polypeptide to a binding molecule, or of agents for the ability to bind to an LBP polypeptide or to a nucleic acid encoding an LBP regulatory sequence, and agents identified therewith. Methods of treatment, diagnosis and immunization. Pharmaceutical and vaccine compositions. Methods of making LBP fragments and analogs.

## 4. Claims: 1,2,9-37 (all partially); 6 (completely)

An isolated polynucleotide encoding a polypeptide comprising the amino acid (aa) sequence of SEQ ID NO:6 or 9, or a polynucleotide capable of hybridizing to it which is at least 95% identical and wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL, or a polynucleotide encoding a polypeptide comprising an aa sequence with at least 90% sequence identity with the aa sequence of SEQ ID NO:6 or 9 and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment of any of these polynucleotides wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL. A polynucleotide as said encoding a polypeptide comprising the aa residues 14-43 (SEQ ID NO:23) or 38-43 (SEQ ID NO:24) of the aa sequence of SEQ ID NO:6, or a polynucleotide capable of hybridizing to it which is at least 95% identical and wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL, or a biologically active fragment thereof wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL. A polynucleotide as said comprising the nucleic acid of SEQ ID NO:15. A recombinant vector comprising a polynucleotide as said, a cell comprising said vector, and a method for producing an LDL binding protein (LBP) comprising culturing said cell. An isolated polypeptide having the aa sequence of SEQ ID NO:6 or 9, or a polypeptide which is at least 95% identical to said polypeptide and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment of said polypeptide capable of binding to LDL. A polypeptide as said having the aa residues 14-43 (SEQ ID NO:23) or 38-43 (SEQ ID NO:24) of the aa sequence of SEQ ID NO:6, or a polypeptide which is at least 95% identical and capable of binding to LDL, or a

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

biologically active fragment thereof capable of binding to LDL. Methods of use of (said) LBP polypeptides in determination of risk for arteriosclerosis, and in the evaluation of agents for treatment of arteriosclerosis, of agents for the ability to alter binding of LBP polypeptide to a binding molecule, or of agents for the ability to bind to an LBP polypeptide or to a nucleic acid encoding an LBP regulatory sequence, and agents identified therewith. Methods of treatment, diagnosis and immunization. Pharmaceutical and vaccine compositions. Methods of making LBP fragments and analogs.

## 5. Claims: 1,2,9-37 (all partially); 7 (completely)

An isolated polynucleotide encoding a polypeptide comprising the amino acid (aa) sequence of SEQ ID NO:7 or 43, or a polynucleotide capable of hybridizing to it which is at least 95% identical and wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL, or a polynucleotide encoding a polypeptide comprising an aa sequence with at least 90% sequence identity with the aa sequence of SEQ ID NO:7 or 43 and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment of any of these polynucleotides wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL. A polynucleotide as said encoding a polypeptide comprising the aa residues 329-343, 329-354, 344-354 or 529-538 (SEQ ID NOs 19-22) of the aa sequence of SEQ ID NO:43, or a polynucleotide capable of hybridizing to it which is at least 95% identical and wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL, or a biologically active fragment thereof wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL. A polynucleotide as said comprising the nucleic acid of SEQ ID NO:45. A recombinant vector comprising a polynucleotide as said, a cell comprising said vector, and a method for producing an LDL binding protein (LBP) comprising culturing said cell. An isolated polypeptide having the aa sequence of SEQ ID NO:7 or 43, or a polypeptide which is at least 95% identical to said polypeptide and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment of said polypeptide capable of binding to LDL. A polypeptide as said having the aa residues 329-343, 329-354, 344-354 or 529-538 (SEQ ID NOs 19-22) of the aa sequence of SEQ ID NO:43, or a polypeptide which is at least 95% identical and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment thereof capable of binding to LDL. Methods of use of (said) LBP polypeptides in determination of risk for arteriosclerosis, and in the evaluation of agents for treatment of arteriosclerosis, of agents for the ability to alter binding of LBP polypeptide to a binding molecule, or of agents for the ability to bind to an LBP polypeptide or to a nucleic acid encoding an LBP regulatory sequence, and agents identified therewith. Methods of treatment, diagnosis and immunization. Pharmaceutical and vaccine compositions. Methods of making LBP fragments and analogs.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## 6. Claims: 1,2,9-37 (all partially); 8 (completely)

An isolated polynucleotide encoding a polypeptide comprising the amino acid (aa) sequence of SEQ ID NO:8 or 44, or a polynucleotide capable of hybridizing to it which is at least 95% identical and wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL, or a polynucleotide encoding a polypeptide comprising an aa sequence with at least 90% sequence identity with the aa sequence of SEQ ID NO:8 or 44 and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment of any of these polynucleotides wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL. A polynucleotide as said encoding a polypeptide comprising the aa residues 69-75 (SEQ ID NO:41) of the aa sequence of SEQ ID NO:44, or a polynucleotide capable of hybridizing to it which is at least 95% identical and wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL, or a biologically active fragment thereof wherein the encoded polypeptide is capable of binding to LDL. A polynucleotide as said comprising the nucleic acid of SEQ ID NO:46. A recombinant vector comprising a polynucleotide as said, a cell comprising said vector, and a method for producing an LDL binding protein (LBP) comprising culturing said cell. An isolated polypeptide having the aa sequence of SEQ ID NO:8 or 44, or a polypeptide which is at least 95% identical to said polypeptide and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment of said polypeptide capable of binding to LDL. A polypeptide as said having the aa residues 69-75 (SEQ ID NO:41) of the aa sequence of SEQ ID NO:44, or a polypeptide which is at least 95% identical and capable of binding to LDL, or a biologically active fragment thereof capable of binding to LDL. Methods of use of (said) LBP polypeptides in determination of risk for arteriosclerosis, and in the evaluation of agents for treatment of arteriosclerosis, of agents for the ability to alter binding of LBP polypeptide to a binding molecule, or of agents for the ability to bind to an LBP polypeptide or to a nucleic acid encoding an LBP regulatory sequence, and agents identified therewith. Methods of treatment, diagnosis and immunization. Pharmaceutical and vaccine compositions. Methods of making LBP fragments and analogs.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.1

Remark 1: Although claims 15, 16 and 33 (as far as in vivo methods are concerned) are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Remark 2: Although claims 17, 18, 26-29, 34, 36 and 37 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 23, 25, 33

Remark 3: Claims not searched: 23, 25, 33. Claims searched incompletely: 19, 26, 28-30, 32. Present claims 23, 25 and 33 relate to agents defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the capacity to bind to LBP or to a nucleic acid encoding an LBP regulatory sequence. Present claims 19, 26, 28-30 and 32 relate to agents defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the capacity to have an effect on an aspect of LBP structure or metabolism. The claims cover all agents having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compounds by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of claims 19, 26, 28-30 and 32 which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds defined by claims 1-9, 13 and 14.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/06356

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9823282	A	04-06-1998	AU 736142 B2	26-07-2001
			AU 7408898 A	22-06-1998
			EP 0969855 A1	12-01-2000
			JP 2001506983 T	29-05-2001
			WO 9823282 A1	04-06-1998
WO 9416074	A	21-07-1994	AU 6234194 A	15-08-1994
			WO 9416074 A2	21-07-1994
WO 9106011	A	02-05-1991	US 5135848 A	04-08-1992
			AU 6641690 A	16-05-1991
			EP 0497881 A1	12-08-1992
			JP 5504196 T	01-07-1993
			WO 9106011 A1	02-05-1991
EP 0586094	A	09-03-1994	EP 0586094 A1	09-03-1994
			JP 6087895 A	29-03-1994
			US 5521071 A	28-05-1996
DE 4222385	A	13-01-1994	DE 4222385 A1	13-01-1994
			AU 678978 B2	19-06-1997
			AU 4564093 A	31-01-1994
			CA 2117099 A1	20-01-1994
			CN 1082609 A	23-02-1994
			WO 9401553 A1	20-01-1994
			EP 0613498 A1	07-09-1994
			FI 941077 A	08-03-1994
			HU 68246 A2	28-06-1995
			JP 6510673 T	01-12-1994
			MX 9304074 A1	31-05-1994
			NO 940797 A	07-03-1994
			NZ 254102 A	22-08-1997
			ZA 9304873 A	18-01-1994
EP 0773290	A	14-05-1997	JP 9163988 A	24-06-1997
			EP 0773290 A2	14-05-1997
			US 5665872 A	09-09-1997

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
A 6 1 K	39/00	A 6 1 K	D 4 C 0 8 4
	39/39		N 4 C 0 8 5
	39/395		4 C 0 8 7
		45/00	4 C 0 8 8
		48/00	4 H 0 4 5
	45/00	A 6 1 P	
	48/00	9/10	
A 6 1 P	9/10	C 0 7 K	
C 0 7 K	14/47	14/47	
C 1 2 N	1/15	C 1 2 N	
	1/19		
	1/21		
	5/10		
C 1 2 P	21/02	C 1 2 P	C
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 Q	
	1/68		A
G 0 1 N	33/15	G 0 1 N	Z
	33/50		Z
	33/53		D
	33/566		
		C 1 2 N	Z N A A
		15/00	A
		5/00	
		A 6 1 K	
		37/02	

(81)指定国 E P ( A T , B E , C H , C Y ,  
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I  
 T , L U , M C , N L , P T , S E , T R ) , O A ( B F  
 , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W ,  
 M L , M R , N E , S N , T D , T G ) , A P ( G H , G  
 M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z  
 , U G , Z W ) , E A ( A M , A Z , B Y , K G , K Z ,  
 M D , R U , T J , T M ) , A E , A G , A L , A M ,  
 A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B  
 Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K  
 , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E ,  
 G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J  
 P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R  
 , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K ,  
 M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R  
 O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J  
 , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z ,  
 V N , Y U , Z A , Z W

(72)発明者 リーズ、ロバート エス .  
 アメリカ合衆国 02445 マサチューセッ  
 ツ州 ブルックライン クリントン ロー  
 ド 203

(72)発明者 ロー、サイモン ダブリュ .  
 アメリカ合衆国 02173 マサチューセッ  
 ツ州 レキシントン グリーンウッド ス  
 トリート 38

(72)発明者 アルホナ、アニバル エイ。  
アメリカ合衆国 02134 マサチューセツ  
ツ州 ボストン コモンウェルス アベニ  
ュー 1238 アパートメント 22

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB10 BB14 BB46  
BB50 CA26 DA13 DA36 FB02  
GC10  
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA03  
DA05 DA06 DA11 DA12 EA02  
EA04 GA11 HA12  
4B063 QA19 QA20 QQ08 QQ13 QQ43  
QR08 QR42 QR56 QS25 QS34  
QX02  
4B064 AG01 CA02 CA05 CA06 CA10  
CA19 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X  
AA90Y AA93Y AB01 BA02  
CA24 CA44 CA46  
4C084 AA01 AA02 AA07 AA13 AA27  
BA01 BA08 BA22 CA17 MA65  
ZA452  
4C085 AA03 AA14 CC03 CC21 DD21  
EE01 FF24 GG02  
4C087 AA01 AA02 BC30 BC84 ZA45  
4C088 AB11 AC01 BA40 MA66 ZA45  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
BA55 CA40 DA75 EA27 EA50  
FA72 FA74

专利名称(译)	新型低密度脂蛋白结合蛋白及其在动脉粥样硬化诊断和治疗中的应用方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003525608A</a>	公开(公告)日	2003-09-02
申请号	JP2001564357	申请日	2001-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	波士顿HEART FOUND		
申请(专利权)人(译)	波士顿心脏基金会有限公司		
[标]发明人	リーズアンエム リーズロバートエス ローサイモンダブリュ アルホナアニバルエイ		
发明人	リーズ、アン エム. リーズ、ロバート エス. ロー、サイモン ダブリュ. アルホナ、アニバル エイ.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K35/74 A61K35/76 A61K36/00 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/39 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61K49/00 A61P9/10 C07K14/47 C07K14/705 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68 G01N33/92 A61K35/78		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61K48/00 A61K49/0004 A61P9/10 C07K14/47 C07K14/705 G01N33/6893 G01N33/92 G01N2800/044 G01N2800/323		
FI分类号	A61K35/74 A61K35/76 A61K35/78 A61K39/00.Z A61K39/39 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P9/10 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68. A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB46 2G045/BB50 2G045/CA26 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/GC10 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA03 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA27 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA17 4C084/MA65 4C084/ZA452 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/CC03 4C085/CC21 4C085/DD21 4C085/EE01 4C085/FF24 4C085/GG02 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC30 4C087/BC84 4C087/ZA45 4C088/AB11 4C088/AC01 4C088/BA40 4C088/MA66 4C088/ZA45 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA55 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA27 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	09/517849 2000-03-02 US 09/616289 2000-07-14 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

分离的多核苷酸，其编码能够结合天然和甲基化的LDL（低密度脂蛋白）的多肽，称为LBP的分离的多肽（LDL结合蛋白）及其生物活性片段，以及公开了类似物。另外，用于确定动物是否有动脉粥样硬化风险的方法，用于治疗动脉粥样硬化的试剂的评估方法，用于治疗动脉粥样硬化，异常结构或LBP代谢的方法。还描述了处理某些细胞的方法。还提供了药物和疫苗组合物。

アミノ酸	記号	置換されるアミノ酸
アラニン	A	D-Ala, Gly, $\beta$ -Ala, L-Cys, D-Cys
アルギニン	R	D-Arg, Lys, D-Lys, ホモ-Arg, D-ホモ-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn, L-NMMA, L-NAME
アスパラギン	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
アスパラギン酸	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
システイン	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
グルタミン	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
グルタミン酸	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
グリシン	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, $\beta$ -Ala Acp
ヒスチジン	H	D-His
イソロイシン	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
ロイシン	L	D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
リシン	K	D-Lys, Arg, D-Arg, ホモ-Arg, D-ホモ-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
メチオニン	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
フェニルアラニン	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4, or 5-フェニルプロリン, cis-3,4, or 5-フェニルプロリン
プロリン	P	D-Pro, L-L-チアゾリジン-4-カルボン酸, D-or L-1-オキサリジン-4-カルボン酸
セリン	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
トレオニン	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
トリプトファン	W	D-Trp, Phe, D-Phe, Tyr, D-Tyr
チロシン	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
バリン	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met