明　細　書

発明の名称 ： 抗ＰＤ－Ｌ１抗体

技術分野

[0001] 本発明は、抗PD-L1抗体に関し、より詳細には、ラット抗ウシPD-L1抗体の相補鎖決定領域（CDR）を含む可変領域とラット以外の動物の抗体の定常領域とを有する抗PD-L1抗体に関する。

背景技術

[0002] 免疫抑制受容体Programmed death 1（PD-1）とそのリガンドであるProgrammed death ligand 1（PD-L1)は過剰な免疫応答を抑制し、免疫寛容に深く関連している因子として京都大学、本庶 佑氏らによって同定された分子である（非特許文献１：Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T The EMBO Journal. 1992 Nov;11(11):3887-3895.）。腫瘍における免疫抑制に関与していることも近年明らかにされ、ヒト医療では、PD-1の働きを阻害する抗体医薬が開発され、実用化されている（小野薬品工業株式会社「オプジーボ（登録商標）」）。

[0003] これまで、本発明者らは、動物難治性疾病に対するPD-1又はPD-L1を標的とする免疫療法の開発を行い、この新規免疫療法が疾病横断的かつ動物横断的に応用が可能であることを明らかにしてきた（非特許文献２：Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology. 2014 Aug;142(4):551-61.、非特許文献３：Maekawa N, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Adachi M, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. PLoS One. 2014 Jun 10;9(6):e98415.、非特許文献４：Mingala CN, Konnai S, Ikebuchi R, Ohashi K. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2011 Jan;34(1):55-63.）。

[0004] しかし、本発明者らがこれまでに作製した抗体は、ラット抗体であるため、ラット以外の動物には頻回投与できない。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T The EMBO Journal. 1992 Nov;11(11):3887-3895.

非特許文献2：Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology. 2014 Aug;142(4):551-61.

非特許文献3：Maekawa N, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Adachi M, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. PLoS One. 2014 Jun 10;9(6):e98415.

非特許文献4：Mingala CN, Konnai S, Ikebuchi R, Ohashi K. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2011 Jan;34(1):55-63.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、ラット以外の動物にも頻回投与が可能な抗PD-L1抗体を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、イヌPD-1およびPD-L1の結合を阻害可能なラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体(4G12)の可変領域を決定し、この可変領域遺伝子と、イヌ免疫グロブリン(ヒトIgG4に相当するIgG-D)の定常領域遺伝子を組み合わせたキメラ抗体遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣細胞(Chinese hamster ovary cell:CHO細胞)を培養増殖させることにより、ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体を作製することに成功した。さらに、ラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体(4G12)の可変領域のCDRを決定した。

また、本発明者らは、ウシPD-1およびPD-L1の結合を阻害可能なラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体(4G12)の可変領域を決定し、この可変領域遺伝子と、ウシ免疫グロブリン（ウシIgG1、ただし、ADCC活性を抑制するために、CH2ドメインのFcγ受容体予想結合部位に変異を加えた（図１９参照。アミノ酸番号及び変異: 250 E→P, 251 L→V, 252 P→A, 253 G→deletion, 347 A

→S, 348 P→S; Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology 2014 Aug; 142(4):551-561.）。)の定常領域遺伝子を組み合わせたキメラ抗体遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣細胞(Chinese hamster ovary cell:CHO細胞)を培養増殖させることにより、ラットーウシキメラ抗PD-L1抗体を作製することに成功した。本発明は、これらの知見により完成されたものである。

[0008] 本発明の要旨は以下の通りである。

（１）(a)QSLLYSENQKDY（配列番号３７）のアミノ酸配列を有するCDR1、WATのアミノ酸配列を有するCDR2及びGQYLVYPFT（配列番号３８）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖と、(b)GYTFTSNF（配列番号３９）のアミノ酸配列を有するCDR1、IYPEYGNT（配列番号４０）のアミノ酸配列を有するCDR2及びASEEAVISLVY（配列番号４１）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域とラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖とを含む、抗PD-L1抗体。

（２）L鎖可変領域とH鎖可変領域がラットに由来する（１）記載の抗体。

（３）L鎖可変領域がラット抗ウシPD-L1抗体のL鎖可変領域であり、H鎖可変領域がラット抗ウシPD-L1抗体のH鎖可変領域である（２）記載の抗体。

（４）L鎖可変領域が配列番号１のアミノ酸配列を有し、H鎖可変領域が配列番号２のアミノ酸配列を有する、（３）記載の抗体。

（５）ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域が、Lambda鎖又はKappa鎖の定常領域のアミノ酸配列を有する（１）～（４）のいずれかに記載の抗体。

（６）ラット以外の動物抗体のH鎖定常領域が、ヒトのIgG4に相当する免疫グロブリンの定常領域のアミノ酸配列を有する（１）～（５）のいずれかに記載の抗体。

（７）ラット以外の動物がウシであり、ウシ抗体のH鎖定常領域が、ADCC活性及び/又はCDC活性を低下させる変異が導入されたものである（１）～（５）のいずれかに記載の抗体。

（８）ラット以外の動物がイヌであり、イヌ抗体のL鎖定常領域が、Lambda鎖

の定常領域のアミノ酸配列を有し、かつ、イヌ抗体のH鎖定常領域が、ヒトのIgG4に相当する免疫グロブリンの定常領域のアミノ酸配列を有する（６）記載の抗体。

（９）ウシ抗体のL鎖定常領域が、Lambda鎖の定常領域のアミノ酸配列を有し、かつ、ウシ抗体のH鎖定常領域が、ADCC活性及び/又はCDC活性を低下させる変異が導入されたものである（７）記載の抗体。

（１０）イヌ抗体のL鎖定常領域が配列番号３のアミノ酸配列を有し、イヌ抗体のH鎖定常領域が配列番号４のアミノ酸配列を有する（８）記載の抗体。

（１１）ウシ抗体のL鎖定常領域が配列番号１００のアミノ酸配列を有し、ウシ抗体のH鎖定常領域が配列番号１０２のアミノ酸配列を有する（９）記載の抗体。

（１２）L鎖２本とH鎖２本の４本鎖構造を持つ（１）～（１１）のいずれかに記載の抗体。

（１３）（１）～（１２）のいずれかに記載の抗体を有効成分として含む、医薬組成物。

（１４）がん及び／又は感染症の予防及び／又は治療のための（１３）記載の医薬組成物。

（１５）がん及び／又は感染症が、腫瘍性疾患、白血病、ヨーネ病、アナプラズマ病、細菌性乳房炎、真菌性乳房炎、マイコプラズマ感染症（例えば、マイコプラズマ性乳房炎、マイコプラズマ性肺炎など）、結核、小型ピロプラズマ病、クリプトスポリジウム症、コクシジウム症、トリパノソーマ病及びリーシュマニア症からなる群より選択される（１４）記載の医薬組成物。

（１６）(a’）QSLLYSENQKDY（配列番号３７）のアミノ酸配列を有するCDR1、WATのアミノ酸配列を有するCDR2及びGQYLVYPFT（配列番号３８）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖をコードするDNAと、(b’）GYTFTSNF（配列番号３９）のアミノ酸配列を有するCDR1、IYPEYGNT（配列番号４０）のアミノ酸配列を有するCDR2及びASEEAVISLVY（配列番号４１）のアミノ酸配列を有するCDR3を含

むH鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖をコードするDNAとを含む、人工遺伝子DNA。

（１７）（１６）記載の人工遺伝子DNAを含むベクター。

（１８）（１７）記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

（１９）（１８）記載の宿主細胞を培養し、培養物から抗PD-L1抗体を採取することを含む、抗体の製造方法。

（２０）QSLLYSENQKDY（配列番号３７）のアミノ酸配列を有するCDR1、WATのアミノ酸配列を有するCDR2及びGQYLVYPFT（配列番号３８）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖をコードするDNA。

（２１）GYTFTSNF（配列番号３９）のアミノ酸配列を有するCDR1、IYPEYGNT（配列番号４０）のアミノ酸配列を有するCDR2及びASEEAVISLVY（配列番号４１）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖をコードするDNA。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2016-159088、特願2016-159089、特願2017-110723及び特願2017-61454の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

[0009] 本発明により、新規な抗PD-L1抗体が得られた。この抗体は、ラット以外の動物にも利用可能である。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]組み換えイヌPD-1に対する組み換えイヌPD-L1結合の阻害。イヌPD-1-IgへのイヌPD-L1-Igの結合をELISAプレート上で検出した。抗体非添加時の吸光度（O.D.）を100％とし、各抗体濃度におけるO.D.を相対値として表した。イヌPD-L1に交差反応を示したラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体4G12; Rat IgG2a（κ）、5A2; Rat IgG1（κ）、および6G7; Rat IgM（κ)のうち、4G12, 6G7両クローンは結合阻害能が高かった。

[図2]pDC6ベクターとラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体の模式図。

[図3]ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12およびc6G7の発現と精製。非還元条件にてSDS-PAGEを行い、CBB染色によりバンドを可視化した。a：プロテインA精製のみ、b：＋ゲル濾過クロマトグラフィー精製。

[図4]ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12およびc6G7のPD-1/PD-L1結合阻害活性。

[図5]ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12高発現細胞の樹立。

[図6]ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12のSDS-PAGE像。ラット抗ウシPD-L1抗体4G12およびラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12を還元条件および非還元条件にて電気泳動し、CBB染色により可視化した。還元条件では50 kDa付近に抗体重鎖、25 kDa付近に抗体軽鎖のバンドが見られた。目的以外のバンドは検出されなかった。

[図7]ラット抗ウシPD-L1抗体4G12およびラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12のイヌPD-1/PD-L1結合およびCD80/PD-L1結合阻害活性。ラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体4G12およびラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12はイヌPD-1-IgおよびCD80-IgへのPD-L1-Ig結合量を低下させ、キメラ抗体化による結合阻害活性の変化は認められなかった。

[図8]ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12によるイヌ免疫担当細胞活性化効果。イヌPBMCを３日間刺激培養し、上清中のIL-2およびIFN-γ濃度をELISA法により定量した。また、刺激培養２日目に培養液中に核酸アナログEdUを添加し、その取り込み量をフローサイトメトリーにより定量した。ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12はイヌPBMCからのIL-2およびIFN-γ産生を増大させ、CD4+およびCD8+リンパ球の増殖を亢進した。

[図9]口腔内メラノーマ（A）および未分化肉腫（B）におけるPD-L1の発現。

[図10]口腔内メラノーマ罹患犬を対象に行ったラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12投与治療試験における腫瘍のCT画像および外観。(a,d）治療開始前、(b,e）治療10週時点、(c,f）治療34週時点。5回の抗体投与（治療開始後10週）で顕著な抗腫瘍効果が認められ、34週時点ではさらなる腫瘍の縮小が確認された。

[図11]図１０で示した口腔内メラノーマ罹患犬における腫瘍長径の推移。ベースライン長径に比して、30%以上の縮小を部分奏功（PR）とした。

[図12]未分化肉腫罹患犬を対象に行ったラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12投与治療試験におけるCT画像。(a,c）治療開始前、(b,d）治療3週時点。2回の抗体投与で顕著な腫瘍の縮小が認められた。

[図13]口腔内メラノーマ罹患犬（肺転移症例）を対象に行ったラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12投与治療試験におけるCT画像。(a,d,g）治療開始前、(b,e,h）治療6週時点、(c,f,i）治療18週時点。9回の抗体投与により複数の肺転移巣が消失した。

[図14]口腔内メラノーマ罹患犬の肺転移発生後の生存率の推移。抗体投与群では、対照群と比べて生存期間が延長された可能性がある。

[図15]ラット抗ウシPD-L1抗体4G12のL鎖可変領域及びH鎖可変領域における、CDR1、CDR2及びCDR3領域を図示する。

[図16]ラット抗ウシPD-L1抗体4G12の交差反応性。ラット抗ウシPD-L1抗体4G12は、ヒツジ、ブタのPD-L1に結合することが確認された。

[図17]スイギュウの白血球に対するラット抗ウシPD-L1抗体4G12の反応性。ラット抗ウシPD-L1抗体4G12は、スイギュウの血中マクロファージ（CD14+CD11b+細胞）に強く結合した。また、スイギュウのリンパ球（CD14-CD11b-細胞）に対して、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12は弱く結合した。この結合性の違いは、マクロファージとリンパ球におけるPD-L1の発現量を反映していると思われる。

[図18]ラット抗ウシPD-L1抗体4G12によるヒツジまたはブタPD-1/PD-L1の結合阻害試験。ラット抗ウシPD-L1抗体4G12は、ヒツジおよびブタPD-1/PD-L1の結合を濃度依存的に阻害できることが示された。

[図19]ラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体ch4G12の アミノ酸配列。ラット抗ウシPD-L1抗体4G12のL鎖可変領域及びH鎖可変領域における、CDR1、CDR2及びCDR3領域を示し、さらに、ウシIgG1（CH2ドメイン）に変異を加えたアミノ酸（アミノ酸番号および変異：250 E→P, 251 L→V, 252 P→A, 253 G→dele

tion, 347 A→S, 348 P→S）も示す。

[図20]pDC6ベクターとラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体ch4G12の模式図。

[図21]ラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体ch4G12の精製純度の確認。

[図22]ラット-ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体ch4G12の結合特異性。

[図23]ラット-ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体ch4G12のウシPD-1/PD-L1結合阻害活性（ウシPD-L1発現細胞と可溶性ウシPD-1の結合阻害試験の結果）。

[図24]ラット-ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体ch4G12のウシPD-1/PD-L1結合阻害活性（ウシPD-1発現細胞と可溶性ウシPD-L1の結合阻害試験の結果）。

[図25]ラット-ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体ch4G12のウシリンパ球応答に対する活性化効果（細胞増殖）。

[図26]ラット-ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体ch4G12のBLV抗原に対するウシリンパ球応答の活性化効果（IFN-γ産生量）。

[図27]ラット-ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体ch4G12を投与したBLV実験感染牛におけるBLV抗原に対するT細胞の細胞増殖応答。

[図28]ラット-ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体ch4G12を投与したBLV実験感染牛におけるBLVプロウイルス量の変化。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0012] 本発明は、(a)QSLLYSENQKDY（配列番号３７）のアミノ酸配列を有するCDR1、WATのアミノ酸配列を有するCDR2及びGQYLVYPFT（配列番号３８）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖と、(b)GYTFTSNF（配列番号３９）のアミノ酸配列を有するCDR1、IYPEYGNT（配列番号４０）のアミノ酸配列を有するCDR2及びASEEAVISLVY（配列番号４１）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域とラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖とを含む、抗PD-L1抗体を提供する。

[0013] ラット抗ウシPD-L1抗体4G12のL鎖可変領域におけるCDR1～3は、ぞれぞれ、QSLLYSENQKDY（配列番号３７）のアミノ酸配列からなる領域、WATのアミノ酸

配列からなる領域、GQYLVYPFT（配列番号３８）のアミノ酸配列からなる領域である（図１５参照）。

[0014] また、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12のH鎖可変領域におけるCDR1～3は、ぞれぞれ、GYTFTSNF（配列番号３９）のアミノ酸配列からなる領域、IYPEYGNT（配列番号４０）のアミノ酸配列からなる領域及びASEEAVISLVY（配列番号４１）のアミノ酸配列からなる領域である（図１５参照）。

[0015] QSLLYSENQKDY（配列番号３７）のアミノ酸配列、WATのアミノ酸配列及びGQYLVYPFT（配列番号３８）のアミノ酸配列、並びに、GYTFTSNF（配列番号３９）のアミノ酸配列、IYPEYGNT（配列番号４０）のアミノ酸配列及びASEEAVISLVY（配列番号４１）のアミノ酸配列においては、１個、２個、３個、４個又は５個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されてもよい。

[0016] 本明細書において、抗体とは、全長抗体の他、Fab、F(ab)’$_2$、ScFv、Diabody、V_H、V_L、Sc(Fv)$_2$、Bispecific sc(Fv)$_2$、Minibody、ScFv-Fc monomer、ScFv-Fc dimerなどの低分子化されたものも含む概念である。

[0017] 本発明の抗PD-L1抗体において、L鎖可変領域とH鎖可変領域がラットに由来するとよい。例えば、L鎖可変領域がラット抗ウシPD-L1抗体のL鎖可変領域であり、H鎖可変領域がラット抗ウシPD-L1抗体のH鎖可変領域であるとよい。

[0018] ラット抗ウシPD-L1抗体のL鎖可変領域のアミノ酸配列及びH鎖可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号１及び２に示すが、配列番号１及び２のアミノ酸配列においては、1若しくは複数個（例えば、５個以下、多くても１０個程度）のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されてもよく、これらの変異が導入されても、PD-L1抗体のL鎖可変領域又はH鎖可変領域としての機能を有しうる。

[0019] ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域及びH鎖定常領域は、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12と交差反応するPD-L1を産生する動物由来のものであるとよい。

[0020] 抗体のL鎖には、Kappa鎖（カッパ鎖）とLambda鎖（ラムダ鎖）があり、本発明の抗PD-L1抗体において、ラット以外の動物の抗体のL鎖定常領域は、Kappa鎖又はLambda鎖のどちらの鎖の定常領域のアミノ酸配列を有するものであ

ってもよいが、存在比率は、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ、ウシではLambda鎖の方が高く、マウス、ラット、ヒト、ブタではKappa鎖の方が高い。存在比率の高い鎖の方が好ましいと考えられるので、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ、ウシではLambda鎖の定常領域のアミノ酸配列を有することが好ましく、マウス、ラット、ヒト、ブタではKappa鎖の定常領域のアミノ酸配列を有することが好ましい。

[0021] ラット以外の動物の抗体のH鎖定常領域は、ヒトのIgG4に相当する免疫グロブリンの定常領域のアミノ酸配列を有するとよい。H鎖は、定常領域の違いにより、γ鎖、μ鎖、α鎖、δ鎖、ε鎖に分けられ、この違いによりそれぞれIgG、IgM、IgA、IgD、IgEの5種類のクラス（アイソタイプ）の免疫グロブリンが形成される。

[0022] 免疫グロブリンG（IgG）はヒト免疫グロブリンの70-75%を占め、血漿中に最も多い単量体の抗体である。軽鎖2本と重鎖2本の4本鎖構造をもつ。ヒトIgG1、IgG2、IgG4は分子量は約146,000であるが、ヒトIgG3はFab領域とFc領域をつなぐヒンジ部が長く、分子量も170,000と大きい。ヒトIgG1はヒトIgGの65%程度、ヒトIgG2は25%程度、ヒトIgG3は7%程度、ヒトIgG4は3%程度を占める。血管内外に平均して分布する。ヒトIgG1は、エフェクター細胞表面のFcレセプターや補体因子に強い親和性を有するので、抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）を誘導し、また、補体を活性化して補体依存性細胞傷害活性（CDC）を誘導する。ヒトIgG2とヒトIgG4は、Fcレセプターや補体因子への親和性が低いことから、ADCC活性及びCDC活性が低い。

[0023] 免疫グロブリンM（IgM）はヒト免疫グロブリンの約10%を占める、基本の4本鎖構造が5つ結合した五量体の抗体である。分子量は970,000。通常血中のみに存在し、感染微生物に対して最初に産生され、初期免疫を司る免疫グロブリンである。

[0024] 免疫グロブリンA（IgA）はヒト免疫グロブリンの10-15%を占める。分子量は160,000。分泌型IgAは2つのIgAが結合した二量体の抗体になっている。IgA1は血清、鼻汁、唾液、母乳中に存在し、腸液にはIgA2が多く存在する。

[0025] 免疫グロブリンD（IgD）はヒト免疫グロブリンの1%以下の単量体の抗体である。B細胞表面に存在し、抗体産生の誘導に関与する。

[0026] 免疫グロブリンE（IgE）はヒト免疫グロブリンの0.001%以下と極微量しか存在しない単量体の抗体である。寄生虫に対する免疫反応に関与していると考えられるが、寄生虫の稀な先進国においては、特に気管支喘息やアレルギーに大きく関与している。

[0027] イヌでは、IgGのH鎖として、IgG-A（ヒトIgG2に相当）、IgG-B（ヒトIgG1に相当）、IgG-C（ヒトIgG3に相当）、IgG-D（ヒトIgG4に相当）の配列が同定されている。本発明の抗体では、ADCC活性、CDC活性をともに持たないIgG H鎖定常領域が好ましい（ヒトではIgG4）。ヒトIgG4に相当する免疫グロブリンの定常領域が同定されていない場合には、ヒトIgG1に相当する免疫グロブリンの当該領域に変異を加えることにより、ADCC活性、CDC活性をともに持たなくなったものを使用するとよい。

ウシでは、IgGのH鎖として、IgG1、IgG2、IgG3の配列が同定されている。本発明の抗体では、ADCC活性、CDC活性をともに持たないIgG H鎖定常領域が好ましい（ヒトではIgG4）。ヒトIgG1の定常領域は野生型ではADCC活性およびCDC活性を持つが、特定の部分にアミノ酸置換や欠損を加えることにより、それらの活性を低下させられることが知られている。ウシにおいて、ヒトIgG4に相当する免疫グロブリンの定常領域が同定されていないので、ヒトIgG1に相当する免疫グロブリンの当該領域に変異を加え、これを使用することができる。その一例として、ウシ抗体のH鎖定常領域（IgG1鎖, GenBank: X62916）のCH2ドメインに変異を加えたアミノ酸配列とヌクレオチド配列（コドンを最適化したもの）を、ぞれぞれ、配列番号１０２及び１０３に示す。

[0028] ラット以外の動物がイヌである場合、イヌの抗体のL鎖定常領域が、Lambda鎖の定常領域のアミノ酸配列を有し、かつ、イヌ抗体のH鎖定常領域が、ヒトのIgG4に相当する免疫グロブリンの定常領域のアミノ酸配列を有する抗PD-L1抗体がより好ましい。

ラット以外の動物がウシである場合、ウシ抗体のL鎖定常領域が、Lambda鎖

の定常領域のアミノ酸配列を有し、かつ、ウシ抗体のH鎖定常領域が、ADCC活性及び/又はCDC活性を低下させる変異が導入されたものである抗PD-L1抗体がより好ましい。

[0029] 本発明の抗PD-L1抗体は、ラット-イヌキメラ抗体、イヌ化抗体、完全イヌ型抗体、ラット-ウシキメラ抗体、ウシ化抗体、完全ウシ型抗体を包含するが、動物は、イヌとウシに限定されるわけではなく、ヒト、ブタ、サル、マウス、ネコ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、水牛、ウサギ、ハムスター、モルモット等などを例示することができる。

[0030] 例えば、本発明の抗PD-L1抗体は、イヌ抗体のL鎖定常領域が配列番号３のアミノ酸配列を有し、イヌ抗体のH鎖定常領域が配列番号４のアミノ酸配列を有する抗PD-L1抗体であるとよい。

また、例えば、本発明の抗PD-L1抗体は、ウシ抗体のL鎖定常領域が配列番号１００のアミノ酸配列を有し、ウシ抗体のH鎖定常領域が配列番号１０２のアミノ酸配列を有する抗PD-L1抗体であるとよい。

[0031] 配列番号３及び４並びに配列番号１００及び１０２のアミノ酸配列においては、1若しくは複数個（例えば、５個以下、多くても１０個程度）のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されてもよく、これらの変異が導入されても、抗体のL鎖定常領域又はH鎖定常領域としての機能を有しうる。

[0032] 本発明の抗PD-L1抗体は、L鎖２本とH鎖２本の４本鎖構造を持つとよい。

[0033] 本発明の抗PD-L1抗体は、以下のようにして製造することができる。同定したラット抗ウシPD-L1抗体の可変領域配列とラット以外の動物（例えば、イヌ、ウシなど）の抗体（好ましくは、ヒトIgG4抗体、ヒトIgG4抗体に相当する抗体又はヒトIgG1に相当する免疫グロブリンの当該領域に変異を加え、ADCC活性および/又はCDC活性を低下させたもの）の定常領域配列を含む人工遺伝子を合成し、その人工遺伝子をベクター（例えば、プラスミド）に挿入後、宿主細胞（例えば、CHO細胞などの哺乳類細胞）に導入し、該宿主細胞を培養することにより、培養物から抗体を採取する。

[0034] 本発明者らが同定したラット抗ウシPD-L1抗体のL鎖可変領域のアミノ酸配

列とヌクレオチド配列を、それぞれ、配列番号１及び５に示す。さらに、コドン最適化後のヌクレオチド配列を配列番号１５に示す。

[0035] 本発明者らが同定したラット抗ウシPD-L1抗体のH鎖可変領域のアミノ酸配列とヌクレオチド配列を、それぞれ、配列番号２及び６に示す。さらに、コドン最適化後のヌクレオチド配列を配列番号１６に示す。

[0036] イヌ抗体のL鎖定常領域（Lambda鎖，GenBank：E02824.1）のアミノ酸配列とヌクレオチド配列を、それぞれ、配列番号３及び７に示す。さらに、コドン最適化後のヌクレオチド配列を配列番号１７に示す。

ウシ抗体のL鎖定常領域（Lambda鎖，GenBank：X62917）のアミノ酸配列とヌクレオチド配列を、それぞれ、配列番号１００及び１０１に示す。さらに、コドン最適化後のヌクレオチド配列を配列番号１０４に示す。

[0037] イヌ抗体のH鎖定常領域（IgG-D鎖，GenBank：AF354267.1）のアミノ酸配列とヌクレオチド配列を、それぞれ、配列番号４及び８に示す。さらに、コドン最適化後のヌクレオチド配列を配列番号１８に示す。

ウシ抗体のH鎖定常領域（IgG1鎖，GenBank：X62916を改変）のアミノ酸配列とヌクレオチド配列（コドン最適化後）を、それぞれ、配列番号１０２及び１０３に示す。

[0038] また、配列番号９は、ラット抗ウシPD-L1抗体のL鎖可変領域とイヌ抗体のL鎖定常領域（Lambda鎖，GenBank：E02824.1）とからなるキメラL鎖のアミノ酸配列を示す。ラット抗ウシPD-L1抗体のL鎖可変領域とイヌ抗体のL鎖定常領域（Lambda鎖，GenBank：E02824.1）とからなるキメラL鎖のヌクレオチド配列（コドン最適化後）を配列番号１９に示す。

また、配列番号１０５は、ラット抗ウシPD-L1抗体のL鎖可変領域とウシ抗体のL鎖定常領域（Lambda鎖，GenBank：X62917）とからなるキメラL鎖のアミノ酸配列を示す。ラット抗ウシPD-L1抗体のL鎖可変領域とウシ抗体のL鎖定常領域（Lambda鎖，GenBank：X62917）とからなるキメラL鎖のヌクレオチド配列（コドン最適化後）を配列番号１０７に示す。

[0039] 配列番号１０は、ラット抗ウシPD-L1抗体のH鎖可変領域とイヌ抗体のH鎖定

常領域（IgG-D鎖，GenBank：AF354267.1）とからなるキメラH鎖のアミノ酸配列を示す。ラット抗ウシPD-L1抗体のH鎖可変領域とイヌ抗体のH鎖定常領域（IgG-D鎖，GenBank：AF354267.1）とからなるキメラH鎖のヌクレオチド配列（コドン最適化後）を配列番号２０に示す。

配列番号１０６は、ラット抗ウシPD-L1抗体のH鎖可変領域とウシ抗体のH鎖定常領域（IgG1鎖，GenBank：X62916を改変）とからなるキメラH鎖のアミノ酸配列を示す。ラット抗ウシPD-L1抗体のH鎖可変領域とウシ抗体のH鎖定常領域（IgG1鎖，GenBank：X62916を改変）とからなるキメラH鎖のヌクレオチド配列（コドン最適化後）を配列番号１０８に示す。

[0040] この他、各種動物のL鎖定常領域及びH鎖定常領域のアミノ酸配列とヌクレオチド配列は、公知のデータベースから入手することができ、これらの配列を利用することができる。

[0041] イヌ、ヒツジ、ブタ、スイギュウ、ヒト、ウシのL鎖定常領域及びH鎖定常領域のアミノ酸配列とヌクレオチド配列を下記の表にまとめた。

（表）

種名	Ig領域		塩基配列	アミノ酸配列	GenBank Accession No.	IMGT Database	Reference
イヌ（学名：*Canis lupus familiaris*）	イヌIg重鎖定常領域（CH1～CH3）	IgG-D	GCCTCCACCACGGGCCCCTCGGTTTTCCCACTGGCC CCCAGCTGGGGGTCCACTTCCGGCTCCAGGGTGGGC CTGGCCTGCCTGGTGTCAGGCTACTTCCCCGAGCCT GTAACTGTGTCCTGGAATTCCGGCTCCTTGACCAGC GGTGTGCACACCTTCCCGTCCGTCCTGCAGTCCTCA GGGCTCTACTCCGTCAGCAGGACGGTGACAGTGCCC TCCAGCAGGTGGCCCAGCGAGACCTTCACCTGCAAC GTGGTCCACCCGGCCAGCAACACTAAAGTAGACAAG CCAGTGCCCAAAGAGTCCACCGTCCAAGTCTATATCC CCATGCCCAGTCCCTGAATCACTGGGAGGGCCTTCG GTCTTCATCTTTCCCCCGAAACCCAAGGACATCCTC AGGATTACCCGAACACCCGAGATCACCTGTGTGGTG TTAGATCTGGGCCGTGAGGACCCTGAGGTGCAGATC AGCTGGTTCGTGGATGGTAAGGAGGTGCACACAGCC AAGACGCAGCCTCGTGAGGAGCAGTTCAACAGCACG TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCATTGAGCACCAG GACTGGCTCACCGGAAAGGAGTTCAAGTGCAGAGTC AACCACATAGCCCTCCCGTCCCCCATCGAGAGGACT ATCTCCAAAGCCAGAGGGCAAGCCCATCAGCCCAGT GTGTATGTCCTGCCACCATCCCCAAAGGAGTTGTCA TCCAGTGACAGGTCACCCTGACCTCCGTCATCAAA GACTTCTTCCCACCTGAGATTGATGTGGAGTGGCAG AGCAATGGACAGGCCGGAGGCCGAGAGCAAGTACCAC AGGAGTGCGGCCGAGCTGGAGGAGGACGGGTCCTAC TTCCTGTACAGCAAGCTCTCTGTGGACAAGAGCCGC TGGCAGCAGGGAGACACCTTCACATGTGCGGTGATG CATGAAGCTCTACACAAGACTACACAGATCTATCGG TCTCCCATTCTCCGGGTAAATGA （配列番号8）	ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALAC LVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFP SVLQSSGLYSISSTVTVPSSRWPSETF TCNVVHPASNTKVDKPVPKESTCKDS PCPVPESLGGPSVFIFPPKPKDILRITRT PEITCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEV HTAKTQPREQGFNSTYRVVSVLPIEHQ DWLTGKEFKCRVNHIGLPSPIERTISKA RGQAHQPSVYVLPPSPKELSSSDTVTL TCLIKDFFPPEIDVEWQSNGQPEPESKY HTTAPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQ QGDTFTCAVMHEALQNHYTDLSLSHS PGK* （配列番号4）	AF354267	http://www.imgt.org/IMGT_repertoire/index.php?section=LocusGene&repertoire=genetable&species=Dog&group=IGHC	Tang L. et al., Vet. Immunol. Immunopathol. 80 (3-4), 259-270 (2001), PMID: 11457479
	イヌIg軽鎖定常領域	Ig lambda（CL）	CAGCCCAAGGCCTCCCCCTCGGTCACACTCTTCCCG CCCTCCTCTGAGGAGCTCCAGCAGCCCACAAGGCCACC CTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACGCCGAGCGGG GTGACGGTGGCCTGGAAGGCAAGCGGCAGCCCCGT CACCCAGGGCGTGGAGACCACCAAGCCCTCCAAGCA GAGCAACAAGAAGTACCCGGCGAGCAGCTACCTGAG CCTGACGCCTGACAAGTGGAAATCTCACAGCAGCTT CAGCTGCCTGGTCACGGACGAGGGGAGCACCGTGG AGAAGAAGGTGGCCCCGGCAGAGTGCTCTTAG （配列番号7）	QPKASPSVTLFPPSSEELQANKATLVC LISDFYPSGVTVAWKASQSPVTQGVET TKPSKQSNNKYAASSYLSLTPDKWKSH SSFSCLVTHEGSTVEKKVAPAECS* （配列番号3）	E02824	登録なし	なし

種名	Ig領域		塩基配列	アミノ酸配列	GenBank Accession No.	IMGT Database	Reference
ヒツジ（学名：*Ovis aries*）	ヒツジIgG重鎖定常領域（CH1~CH3）	IgG1	GCCTCAACAACACCCCCGAAAGTCTACCCTCTGACT TCTTGGTGGGGGACACGTCGAGCTCCATCGTGACC CTGGGGTGCCTGGTCTCCAGCTATATGCCCGAGCCG GTGACCGTGACCTCGAACTCTGGTCCCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTCCCGGCCATCGTCGAGTCCTCC GGGTCTACTCTCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCG TCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTTCATCTGCAAC GTAGCCCACCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAG CGTGTTGAGCCCGGATGCCCGGACCCATGCAAACAT TGCCGATGCCCACCCCCTGAGCTCCCCGGGAGGACC GTCTGTCTTCATCTTCCCACCGAAAGCCAAGGACAC CCTTATGATCTCTCGAACCGGGGAGGTGACGTGTGT GGTGGTGGACGTGGGGCAGGATGACCCCGAGGTGC AGTTCTCCTGGTTCGTGGACAACGTGGAGGTGCACA CGGCCAGGACAAAGCCGAGAGAGGAGCAGTTCAACA GCACCTTCCGCGTGGTCAGCGCCCTGCCCATCCAGC ACCAAGACTGGACTGAGAGAAAGGAGTTCAAGTGCA AGGTGCACAACGAAGCCCTCCCGGCCCCCATCGTGA GGACCATCTCCAGGACCAAAGGGCAGGCCCGGGAG CCGCAGGTGTACGTCCTGGCCCCACCCCAGGAAGAG CTCAGCAAAAGCACGCTCAGGGTCACCTGGCTGGTC ACCGGCTTCTACCCAGACATCGACGTGGAGTGGCAG CAGAAAATGGGCAGCCTGAGTCCGAGGACAAGTAC GGCACGACCACATCCCAGCTGGACGCCGACGGCTCC TACTTCCTGTACAGCAGGCTCAGGGATGGACAAGAAG AGCTGGCAAGAAGGAGACACGTACGCGTGTGTGGTG ATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAG TCGATCTCTAAGCCTCCGGGTAAATGA （配列番号43）	ASTTPPKVYPLTSCCGDTSSSIVTLGC LVSSYMPEPVTVTWNSGALTSGVHTF PAILQSSGLYSLSSVVTVPASTSGAQT FICNVAHPASSTKVDKRVEPGCPDPCK HCRGPPPELPGGPSVFIFPPKPKDTLTI SCTPEVTCVVVDVGQDDPEVQFSWFV DNVEVRTARTKPREEQFNSTFRVVSAL PIQHQDWTGGKEFKCKVHNEALPAPIV RTISRTKGQAREPQVYVLAPPQEELSK STLSVTCLVTGFYPDYIAVEWQKNGQP ESEDKYGTTTSQLDADGSYFLYSRLRV DKNSWQEGDTYACVVMHEALHNHYTQ KSISKPPGK* （配列番号42）	X69797	http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=sheep&group=IGHC	Dufour V. et al. J. Immunol. 156, 2163-2170 (1996). PMID: 8690905
		IgG2	GCCTCCACCACAGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGACT TCTTGCTGCGGGGGACACGTCGAGCTCCAGCTCCATC GTGACCCTCGGCTGCCTGGTCTCCAGCTATATGCCG GAGCCGTCACCGTCACCTCGAACTCTGGTCCGCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCCATCCTGCAG TCCTCCGGGCTCTACTCTCTCAGCAGCGTGGTGACC GTGCCGGCCAGCACCTCAGGAGCCCAGACCTTCATC TGCAACGTAGCCCACCCGGCCAGCAGCGCCAAGGTG GACAAGCGTGTTGGGATCTCCAGTCAGTACTCCAAG TGTTCTAAACCGCCTTGCGTGAGCGACGGTCTGTG TTCATCTTCCCCCCGAAACCCAAGGACAGCCTCATG ATCACAGGAACGCCCGAGGTCACGTGTGTGGTGCTG GACGTGGGCCAGGGTGACCCCGAGGTGCAGTTCTCC TGGTTCGTGGACAACGTGGAGGTGCGCACGGCCAGG ACAAAGCCGAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTC CGGGTGGTCAGCGCCCTGCCCATCCAGCACGACCAG TGGACTGGAGGAAAGGAGTTCAAGTGCAAGGTCCAC AGGAAAGCCTCCCCGCCCCCATCGTGAGGACCATC TCCAGGGCCAAAGGGCAGGCCCCGGGAGCCCGCAGGT GTACCTCCTGCCCCCACCCCAGGAAGAGCTCAGCAA AAGCACGCTCAGCGTCACCTGCCTGGTCAAGGGCTT CTACCCAGACTACATCGCCGTGGAGTGGCAGAGAGC GGGGCAGCCTGAGTGGGAGGACAAGTACGGCACGAC CACATCCCAGCTGCACGCCCGACGGCTCCTACTTCCT GTACAGCAGGCTCAGGGTGGACAAGAGCAGCTGGCA AAGAGGAGACACGTACGCGTGTGTGGTGATGCACGA GGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCGATGTC TAAGCCTCCGGGTAAATGA （配列番号45）	ASTTAPKVYPLTSCCGDTSSSSIVTL GCLVSSYMPEPVTVTWNSGALTSGVH TFPAILQSSGLYSLSSVVTVPASTSGA QTFICNVAHPASSAKVDKRVCISSDYS KCSKPPCVSRPSVFIFPPKPKDSLMITG TPEVTCVVVDVGQGDPEVQFSWFVDN VEVRTARTKPREEQFNSTFRVVSALPI QHDHWTGGKEFKCKVHSKGLPAPIVRT ISRAKGQAREPQVYVLAPPQEELSKST LSVTCLVTGFYPDYIAVEWQRAHQPES EDKYGTTTSQLDADGSYFLYSRLRVDK SSWQRGDTYACVVMHEALHNHYTQKS ISKPPGK* （配列番号44）	X70993		Clarkson C.A. et al., Mol. Immunol., 30, 1195-1204 (1993). PMID: 8413324
	ヒツジIg軽鎖定常領域	Ig kappa(CK)	CCATCCGTCTTCCTCTTCAAACCATCTGAGGAACAG CTGAGGACCGGAACTGTCTCTGTCGTGTGTCTTGGTG AATGATTTCTACCCGAAAGATATCAATGTCAAGGTGA AAGTGGATGGGGTTACCCAGAACAGCAACTTCCAGA ACAGCTTCACAGACCAGGACAGCAAGAAAAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCCTGACACTGTCCAGCTCAG AGTACCAGAGCCATAACGCCTATGCGTGTGAGGTCA CCCACGAGGGCTGCCCACCGCCCGTCAAGAGCT TCAATAAGAATGAATGTTAG （配列番号47）	PSVFLFKPSEEQLRTGTVSVVCLVNDF YPKDINVKVKVDGVTQNSNEQNSFTDQ DSKKSTYSLSSTLTLSSSEYQSHNAYA CEVSHKSLPTALVKSFNKNEC* （配列番号46）	X54110	登録なし	Jenne C.N. et al., Dev. Comp. Immunol. 30 (1-2), 165-174 (2006). PMID: 16083958
		Ig lambda(CL)	GGTCAGCCCAAGTCCGCACCCTCGGTCACCCTGTTC CCGCCTTCCACGGAGGAGCTCAGTACCAACAAGGCC ACCGTGGTGTGTCTCATCAACGACTTCTACCCGGGT AGCGTGAACGTGGTCTGGAAGGCAGATGGCAGCACC ATCAATCAGAACGTGAAGACGCACCGAGGCCTCCAAA CAGAGCAACAGCAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTG ACCCTGACGGGCAGCAGTGGAAGTCAAGAGCAGT TACACCTGCGAGGTCACGGACGAGGGGAGCACCGTG ACGAAGACAGTGAAGCCCTCAGAGTGTTCTTAG （配列番号49）	GQPKSAPSVTLFPPSTEELSTNKATVV CLINDFYPGSVNVVWKADGSTINQNVK TTQASKQSNSKYAASSYLTLTGSEWKS KSSYTCEVTHEGSTVTKTVKPSECS* （配列番号48）	AY734681		

種名	Ig領域		塩基配列	アミノ酸配列	GenBank Accession No.	IMGT Database	Reference
ブタ(学名：*Sus scrofa*)	ブタIg重鎖定常領域(CH1~CH3)	IgG1^{a}	GCCCCCAAGACGGCCCCATCGGTCTACCCTCTGGCCCCCTGCGGCAGGGACACGTCTG GCCCTAACGTGGCCTTGGGCTGCCTGGCCTCAAGCTACTTCCCCGAGCCAGTGACCATG ACCTGGAACTCGGGCGCCCTGACCAGTGGCGTGCATACCTTCCCATCCGTCCTGCAGCC GTCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCGGCCAGCAGCCTGTCCAGCA AGAGCTACACCTGCAATGTCAACCACCCGGCCACCACCACCAAGGTGGACAAGCGTGTT GGAACAAAGACCAAACCACCATGTCCCATATGCCCAGGCTGTGAAGTGGCCGGGCCCTC GGTCTTCATCTTCCCTCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCAGACCCCCGAGG TCACGTGCGTGGTGGTGGACGTCAGCAAGGAGCACGCCGAGGTCCAGTTCTCCTGGTAC GTGGACGGCGTAGAGGTGCACACGGCCGAGACGAGACCAAAGGAGGAGCAGTTCAACAG CACCTACCGTGTGGTCAGCGTCCTGCCCATCCAGCACCAGGACTGGCTGAAGGGGAAGG AGTTCAAGTGCAAGGTCAACAACGTAGACCTCCCAGCCCCCATCACGAGGACCATCTCC AAGGCTATAGGGCAGAGCCGGGAGCCGCAGGTGTACACCCTGCCCCCACCCGCCGAGG AGCTGTCCAGGAGCAAAGTCACCGTAACCTGCCTGGTCATTGGCTTCTACCCACCTGAC ATCCATGTTGAGTGGAAGAGCAACGGACAGCCGGAGCCAGAGGGCAATTACCGCACCAC CCCGCCCCAGCAGGACGTGGACGGCACCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTCGCGGTGCACA AGGCAAGATGGGACCATGGAGAAACATTTGAGTGTGCGGTGATGCACGAGGCTCTGCAC AACCACTACACCCAGAAGTCCATCTCCAAGACTCAGGGTAAATGA (配列番号51)	APKTAPSVYPLAPCGRDTSGPNVALG CLASSYFPEPVTMTWNSGALTSGVHT FPSVLQPSGLYSLSSMVTVPASSLSS KSYTCNVNHPATTTKVDKRVGTKTKP PCPICPGCEVAGPSVFIFPPKPKDTLMI SQTPEVTCVVVDVSKEHAEVQFSWYV DGVEVHTAETRPKEEQFNSTYRVVSV LPIQHQDWLKGKEFKCKVNNVDLPAPI TRTISKAIGQSREPQVYTLPPPAEELS RSKVTVTCLVIGFYPPDIHVEWKSNGQ PEPEGNYRTTPPQQDVDGTFFLYSKL AVDKARWDHGETFECAVMHEALHNHY TQKSISKTQGK* (配列番号50)	U03781	http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=Pig&group=IGHC	Butler J.E. et al., Immunogenetics 61(3): 209–230 (2009). PMID: 19048248 Kacskovics I. et al., J. Immunol. 153(8): 3565–3573 (1994). PMID: 7930579
		IgG1^{b}	GCCCCCAAGACGGCCCCATCGGTCTACCCTCTGGCCCCCTCCGGCAGGGACGTGTCTG GCCCTAACGTGGCCTTGGGCTGCCTGGCCTCAAGCTACTTCCCCGAGCCAGTGACCGTG ACCTGGAACTCGGGCGCCCTGACCAGTGGCGTGCACACCTTCCCATCCGTCCTGCAGCC GTCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCGGCCAGCAGCCTGTCCAGCA AGAGCTACACCTGCAATGTCAACCACCCGGCCACCACCACCAAGGTGGACAAGCGTGTT GGAATACACCAGCCGCAAACATGTCCCATATGCCCAGGCTGTGAAGTGGCCGGGCCCTC GGTCTTCATCTTCCCTCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCAGACCCCCGAGG TCACGTGCGTGGTGGTGGACGTCAGCAAGGAGCACGCCGAGGTCCAGTTCTCCTGGTAC GTGGACGGCGTAGAGGTGCACACGGCCGAGACGAGACCAAAGGAGGAGCAGTTCAACAG CACCTACCGTGTGGTCAGCGTCCTGCCCATCCAGCACCAGGACTGGCTGAAGGGGAAGG AGTTCAAGTGCAAGGTCAACAACGTAGACCTCCCAGCCCCCATCACGAGGACCATCTCC AAGGCTATAGGGCAGAGCCGGGAGCCGCAGGTGTACACCCTGCCCCCACCCGCCGAGG AGCTGTCCAGGAGCAAAGTCACGCTAACCTGCCTGGTCATTGGCTTCTACCCACCTGAC ATCCATGTTGAGTGGAAGAGCAACGGACAGCCCGAGCCAGAGAACACATACCGCACCAC CCCGCCCCAGCAGGACGTGGACGGGACCTTCTTCCTGTACAGCAAACTCGCGGTGGACA AGGCAAGATGGGACCATGGAGACAAATTTGAGTGTGCGGTGATGCACGAGGCTCTGCAC AACCACTACACCCAGAAGTCCATCTCCAAGACTCAGGGTAAATGA (配列番号53)	APKTAPSVYPLAPCGRDVSGPNVALG CLASSYFPEPVTVTWNSGALTSGVHT FPSVLQPSGLYSLSSMVTVPASSLSS KSYTCNVNHPATTTKVDKRVGIHQPQ TCPICPGCEVAGPSVFIFPPKPKDTLMI SQTPEVTCVVVDVSKEHAEVQFSWYV DGVEVHTAETRPKEEQFNSTYRVVSV LPIQHQDWLKGKEFKCKVNNVDLPAPI TRTISKAIGQSREPQVYTLPPPAEELS RSKVTLTCLVIGFYPPDIHVEWKSNGQ PEPENTYRTTPPQQDVDGTFFLYSKL AVDKARWDHGDKFECAVMHEALHNH YTQKSISKTQGK* (配列番号52)	U03778		
		IgG2^{a}	GCCCCCAAGACGGCCCCATCGGTCTACCCTCTGGCCCCCTGCAGCAGGGACACGTCTG GCCCTAACGTGGCCTTGGGCTGCCTGGCCTCAAGCTACTTCCCCGAGCCAGTGACCGTG ACCTGGAACTCGGGCGCCCTGTCCAGTGGCGTGCATACCTTCCCATCCGTCCTGCAGCC GTCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCGGCCAGCAGCCTGTCCAGCA AGAGCTACACCTGCAATGTCAACCACCCGGCCACCACCACCAAGGTGGACAAGCGTGTT GGAACAAAGACCAAACCACCATGTCCCATATGCCCAGCCTGTGAATCACCAGGGCCCTC GGTCTTCATCTTCCCTCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACACCCCAGG TCACGTGCGTGGTGGTTGATGTGAGCCAGGAGAACCCGGAGGTCCAGTTCTCCTGGTAC GTGGACGGCGTAGAGGTGCACACGGCCCAGACGAGGCCAAAGGAGGAGCAGTTCAACAG CACCTACCGCGTGGTCAGCGTCCTACCCATCCAGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGG AGTTCAAGTGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCCCCCATCACAAGGATCATCTCC AAGGCCAAAGGGCAGACCCGGGAGCCGCAGGTGTACACCCTGCCCCCACACGCCGAGG AGCTGTCCAGGAGCAAAGTCAGCATAACCTGCCTGGTCATTGGCTTCTACCCACCTGAC ATCGATGTCGAGTGGCAAAGAAACGGACAGCCGGAGCCAGAGGGCAATTACCGCACCAC CCCGCCCCAGCAGGACGTGGACGGGACCTACTTCCTGTACAGCAAGTTCTCGGTGGACA AGGCCAGCTGGCAGGGTGGAGGCATATTCCAGTGTGCGGTGATGCACGAGGCTCTGCAC AACCACTACACCCAGAAGTCTATCTCCAAGACTCCGGGTAAATGA (配列番号55)	APKTAPSVYPLAPCSRDTSGPNVALG CLASSYFPEPVTVTWNSGALSSGVHT FPSVLQPSGLYSLSSMVTVPASSLSS KSYTCNVNHPATTTKVDKRVGTKTKP PCPICPACESPGPSVFIFPPKPKDTLMI SRTPQVTCVVVDVSQENPEVQFSWYV DGVEVHTAQTRPKEEQFNSTYRVVSV LPIQHQDWLNGKEFKCKVNNKDLPAPI TRIISKAKGQTREPQVYTLPPHAEELS RSKVSITCLVIGFYPPDIDVEWQRNGQ PEPEGNYRTTPPQQDVDGTYFLYSKF SVDKASWQGGGIFQCAVMHEALHNHY TQKSISKTPGK* (配列番号54)	U03779		
		IgG2^{b}	GCCCCCAAGACGGCCCCATTGGTCTACCCTCTGGCCCCCTGCGGCAGGGACACGTCTG GCCCTAACGTGGCCTTGGGCTGCCTGGCCTCAAGCTACTTCCCCGAGCCAGTGACCGTG ACCTGGAACTCGGGCGCCCTGACCAGTGGCGTGCATACCTTCCCATCCGTCCTGCAGCC GTCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCGGCCAGCAGCCTGTCCAGCA AGAGCTACACCTGCAATGTCAACCACCCGGCCACCACCACCAAGGTGGACAAGCGTGTT GGAACAAAGACCAAACCACCATGTCCCATATGCCCAGCCTGTGAATCGCCAGGGCCCTC GGTCTTCATCTTCCCTCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACACCCCAGG TCACGTGCGTGGTAGTTGATGTGAGCCAGGAGAACCCGGAGGTCCAGTTCTCCTGGTAC GTGGACGGCGTAGAGGTGCACACGGCCCAGACGAGGCCAAAGGAGGAGCAGTTCAACAG CACCTACCGCGTGGTCAGCGTCCTGCCCATCCAGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGG AGTTCAAGTGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCCCCCATCACAAGGATCATCTCC AAGGCCAAAGGGCAGACCCGGGAGCCGCAGGTGTACACCCTGCCCCCACACGCCGAGG AGCTGTCCAGGAGCAAAGTCAGCATAACCTGCCTGGTCATTGGCTTCTACCCACCTGAC ATCGATGTCGAGTGGCAAAGAAACGGACAGCCGGAGCCAGAGGGCAATTACCGCACCAC CCCGCCCCAGCAGGACGTGGACGGGACCTACTTCCTGTACAGCAAGTTCTCGGTGGACA AGGCCAGCTGGCAGGGTGGAGGCATATTCCAGTGTGCGGTGATGCACGAGGCTCTGCAC AACCACTACACCCAGAAGTCTATCTCCAAGACTCCGGGTAAATGA (配列番号57)	APKTAPLVYPLAPCGRDTSGPNVALG CLASSYFPEPVTVTWNSGALTSGVHT FPSVLQPSGLYSLSSMVTVPASSLSS KSYTCNVNHPATTTKVDKRVGTKTKP PCPICPACESPGPSVFIFPPKPKDTLMI SRTPQVTCVVVDVSQENPEVQFSWYV DGVEVHTAQTRPKEEQFNSTYRVVSV LPIQHQDWLNGKEFKCKVNNKDLPAPI TRIISKAKGQTREPQVYTLPPHAEELS RSKVSITCLVIGFYPPDIDVEWQRNGQ PEPEGNYRTTPPQQDVDGTYFLYSKF SVDKASWQGGGIFQCAVMHEALHNHY TQKSISKTPGK* (配列番号56)	U03780		
		IgG3	GCCTACAACACAGCTCCATCGGTCTACCCTCTGGCCCCCTGTGGCAGGGACGTGTCTGA TCATAACGTGGCCTTGGGCTGCCTTGTCTCAAGCTACTTCCCCGAGCCAGTGACCGTGA CCTGGAACTCGGGTGCCCTGTCCAGAGTCGTGCATACCTTCCCATCCGTCCTGCAGCCG TCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGCATGGTGATCGTGGCGGCCAGCAGCCTGTCCACCCT GAGCTACACGTGCAACGTCTACCACCCGGCCACCAACACCAAGGTGGACAAGCGTGTTG ACATCGAACCCCCCACACCCATCTGTCCCGAAATTTGCTCATGCCCAGCTGCAGAGGTC CTGGGAGCACCGTCGGTCTTCCTCTTCCCTCCAAAACCCAAGGACATCCTCATGATCTC CCGGACACCCAAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAGGAGGCTGAAGTCC AGTTCTCCTGGTACGTGGACGGCGTACAGTTGTACACGGCCCAGACGAGGCCAATGGAG GAGCAGTTCAACAGCACCTACCGCGTGGTCAGCGTCCTGCCCATCCAGCACCAGGACTG GCTGAAGGGGAAGGAGTTCAAGTGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCTTTCCCCCATCA CGAGGACCATCTCCAAGGCTACAGGGCCGAGCCGGGTGCCGCAGGTGTACACCCTGCC CCCAGCCTGGGAAGAGCTGTCCAAGAGCAAAGTCAGCATAACCTGCCTGGTCACTGGCT TCTACCCACCTGACATCGATGTCGAGTGGCAGAGCAACGGACAACAAGAGCCAGAGGGC AATTACCGCACCACCCCGCCCCAGCAGGACGTGGATGGGACCTACTTCCTGTACAGCAA GCTCGCGGTGGACAAGGTCAGGTGGCAGCGTGGAGACCTATTCCAGTGTGCGGTGATGC ACGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCATCTCCAAGACTCAGGGTAAATGA (配列番号59)	AYNTAPSVYPLAPCGRDVSDHNVALG CLVSSYFPEPVTVTWNSGALSRVVHT FPSVLQPSGLYSLSSMVIVAASSLSTL SYTCNVYHPATNTKVDKRVDIEPPTPI CPEICSCPAAEVLGAPSVFLFPPKPKD ILMISRTPKVTCVVVDVSQEEAEVQFS WYVDGVQLYTAQTRPMEEQFNSTYRV VSVLPIQHQDWLKGKEFKCKVNNKDLL SPITRTISKATGPSRVPQVYTLPPAWE ELSKSKVSITCLVTGFYPPDIDVEWQS NGQQEPEGNYRTTPPQQDVDGTYFLY SKLAVDKVRWQRGDLFQCAVMHEALH NHYTQKSISKTQGK (配列番号58)	EU372658		
		IgG4^{a}	ACCTTCCCATCCGTCCTGCAGCCGTCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGCATGGTGACCGT GCCGGCCAGCAGCCTGTCCAGCAAGAGCTACACCTGCAATGTCAACCACCCGGCCACCA CCACCAAGGTGGACAAGCGTGTTGGAACAAAGACCAAACCACCATGTCCCATATGCCCA GCCTGTGAAGGGCCCGGGCCCTCGGCCTTCATCTTCCCTCCAAAACCCAAGGACACCCT CATGATCTCCCGGACCCCCAAGGTCACGTGCGTGGTGGTAGATGTGAGCCAGGAGAACC CGGAGGTCCAGTTCTCCTGGTACGTGGACGGCGTAGAGGTGCACACGGCCCAGACGAGG CCAAAGGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACCGCGTGGTCAGCGTCCTGCCCATCCAGCA CCAGCACTGGCTGAACGGGAAGGAGTTCAAGTGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAG CCCCCATCACAAGGATCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGACCCGGGAGCCGCAGGTGTAC ACCCTGCCCCCACCCACCGAGGAGCTGTCCAGGAGCAAAGTCACGCTAACCTGCCTGGT CACTGGCTTCTACCCACCTGACATCGATGTCGAGTGGCAAAGAAACGGACAGCCGGAGC CAGAGGGCAATTACCGCACCACCCCGCCCCAGCAGGACGTGGACGGGACCTACTTCCTG TACAGCAAGCTCGCGGTGGACAAGGCCAGCTGGCAGCGTGGAGACACATTCCAGTGTGC GGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCATCTTCAAGACTCCGG GTAAATGA (配列番号61)	TFPSVLQPSGLYSLSSMVTVPASSLS SKSYTCNVNHPATTTKVDKRVGTKTK PPCPICPACEGPGPSAFIFPPKPKDTL MISRTPKVTCVVVDVSQENPEVQFSW YVDGVEVHTAQTRPKEEQFNSTYRVV SVLPIQHQDWLNGKEFKCKVNNKDLP APITRIISKAKGQTREPQVYTLPPPTEE LSRSKVTLTCLVTGFYPPDIDVEWQRN GQPEPEGNYRTTPPQQDVDGTYFLYS KLAVDKASWQRGDTFQCAVMHEALH NHYTQKSIFKTPGK* (配列番号60)	U03782		
		IgG4^{b}	GCCCCCAAGACGGCCCCATCGGTCTACCCTCTGGCCCCCTGCGGCAGGGACGTGTCTG GCCCTAACGTGGCCTTGGGCTGCCTGGCCTCAAGCTACTTCCCCGAGCCAGTGACCGTG ACCTGGAACTCGGGCGCCCTGACCAGTGGCGTGCACACCTTCCCATCCGTCCTGCAGCC GTCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCGGCCAGCAGCCTGTCCAGCA AGAGCTACACCTGCAATGTCAACCACCCGGCCACCACCACCAAGGTGGACAAGCGTGTT GGAATACACCAGCCGCAAACATGTCCCATATGCCCAGCCTGTGAAGGGCCCGGGCCCTC GGCCTTCATCTTCCCTCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCAAGG TCACGTGCGTGGTGGTTGATGTGAGCCAGGAGAACCCGGAGGTCCAGTTCTCCTGGTAC GTGGACGGCGTAGAGGTGCACACGGCCCAGACGAGGCCAAAGGAGGAGCAGTTCAACAG CACCTACCGCGTGGTCAGCGTCCTGCTCATCCAGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGG AGTTCAAGTGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCCCCCATCACAAGGATCATCTCC AAGGCCAAAGGGCAGACCCGGGAGCCGCAGGTGTACACCCTGCCCCCACCCACCGAGG AGCTGTCCAGGAGCAAAGTCACGCTAACCTGCCTGGTCACTGGCTTCTACCCACCTGAC ATCGATGTCGAGTGGCAAAGAAACGGACAGCCGGAGCCAGAGGGCAATTACCGCACCAC CCCGCCCCAGCAGGACGTGGACGGGACCTACTTCCTGTACAGCAAGCTCGCGGTGGACA AGGCCAGCTGGCAGCGTGGAGACACATTCCAGTGTGCGGTGATGCACGAGGCTCTGCAC AACCACTACACCC (配列番号63)	APKTAPSVYPLAPCGRDVSGPNVALG CLASSYFPEPVTVTWNSGALTSGVHT FPSVLQPSGLYSLSSMVTVPASSLSS KSYTCNVNHPATTTKVDKRVGIHQPQ TCPICPACEGPGPSAFIFPPKPKDTLMI SRTPKVTCVVVDVSQENPEVQFSWYV DGVEVHTAQTRPKEEQFNSTYRVVSV LLIQHQDWLNGKEFKCKVNNKDLPAPI TRIISKAKGQTREPQVYTLPPPTEELSR SKVTLTCLVTGFYPPDIDVEWQRNGQ PEPEGNYRTTPPQQDVDGTYFLYSKL AVDKASWQRGDTFQCAVMHEALHNH YT (配列番号62)	EU372554		

（ブタ続き）

		IgG5[a]	GCCCCCAAGACGGCCCCATCGGTCTACCCTCTGGCCCCCTGCAGCAGGGACACGTCTG GCCCTAACGTGGCCTTGGGCTGCCTGGTCTCAAGCTACTTCCCCGAGCCAGTGACCGTG ACCTGGAACTCGGGCGCCCTGACCAGTGGCGTGCACACCTTCCCATCCGTCCTGCAGCC GTCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCGGCCCACAGCTTGTCCAGCA AGCGCTATACGTGCAATGTCAACCACCCAGCCACCAAAACCAAGGTGGACCTGTGTGTT GGACGACCATGTCCCATATGCCCAGGCTGTGAAGTGGCCGGGCCCTCGGTCTTCATCTT CCCTCCAAAACCCAAGGACATCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACGTGCGTGG TGGTGGACGTCAGCAAGGAGCACGCCGAGGTCCAGTTCTCCTGCTACGTGGACGGCGAA GAGGTGCACACGGCCGAGACGAGGCCAAAGGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACCGCGT GGTCAGCGTCCTGCCCATCCAGCACGAGGACTGGCTGAAGGGGAAGGAGTTCGAGTGCA AGGTCAACAACGAAGACCTCCCAGGCCCCATCACGAGGACCATCTCCAAGGCCAAAGGG GTGGTACGGAGCCCGGAGGTGTACACCCTGCCCCCACCCGCCGAGGAGCTGTCCAAGA GCATAGTCACGCTAACCTGCCTGGTCAAAAGCATCTTCCCGNCTTTCATCCATGTTGAGT GGAAAATCAACGGAAAACCAGAGCCAGAGAACGCATATCGCACCACCCCGCCTCAGGAG GACGAGGACAGGACCTACTTCCTGTACAGCAAGCTCGCGGTGGACAAGGCAAGATGGGA CCATGGAGAAACATTTGAGTGTGCGGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACCC AGAAGTCCATCTCCAAGACTCAGGGTAAATGA (配列番号65)	APKTAPSVYPLAPCSRDTSGPNVALG CLVSSYFPEPVTVTWNSGALTSGVHT FPSVLQPSGLYSLSSMVTVPAHSLSS KRYTCNVNHPATKTKVDLCVGRPCPI CPGCEVAGPSVFIFPPKPKDILMISRTP EVTCVVVDVSKEHAEVQFSWYVDGEE VHTAETRPKEEQFNSTYRVVSVLPIQH EDWLKGKEFECKVNNEDLPGPITRTIS KAKGVVRSPEVYTLPPPAEELSKSIVT LTCLVKSIFPPFIHVEWKINGKPEPENA YRTTPPQEDEDRTYFLYSKLAVDKAR WDHGETFECAVMHEALHNHYTQKSIS KTQGK* (配列番号64)	EU372657		
		IgG5[b]	GCCTACAACACAGCTCCATCGGTCTACCCTCTGGCCCCCTGTGGCAGGGACGTGTCTGA TCATAACCTGGCCTTGGGCTGCCTGGTCTCAAGCTACTTCCCCGAGCCAGTGACCGTGA CCTGGAACTGGGGCGCCCAGACCAGTGGCGTGCACACCTTCCCATCCGTCCTGCAGCCG TCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGCACGGTGACCGTGCCGGCCCACAGCTTGTCCAGCAA GTGCTTCACGTGCAATGTCAACCACCCGGCCACCACCACCAAGGTGGACCTGTGTGTTG GAAAAAAGACCAAGCCTCGATGTCCCATATGCCCAGGCTGTGAAGTGGCCGGGCCCTCG GTCTTCATCTTCCCTCCAAAACCCAAGGACATCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGT CACGTGCGTGGTGGTGGACGTCAGCAAGGAGCACGCCGAGGTCCAGTTCTCCTGGTACG TGGACGGCGAAGAGGTGCACACGGCCGAGACGAGACCAAAGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACTTACCGCGTGGTCAGCGTCCTGCCCATCCAGCACCAGGACTGGCTGAAGGGGAAGGA GTTCGAGTGCAAGGTCAACAACGAAGACCTCCCAGGCCCCATCACGAGGACCATCTCCA AGGCCAAAGGGGTGGTACGGAGCCCGGAGGTGTACACCCTGCCCCCACCCGCCGAGGA GCTGTCCAAGAGCATAGTCACGCTAACCTGCCTGGTCAAAAGCTTCTTCCCGCCTTTCAT CCATGTTGAGTGGAAAATCAACGGAAAACCAGAGCCAGAGAACGCATACCGCACCACCC CGCCCCAGGAGGACGAGGACGGGACCTACTTCCTGTACAGCAAGTTCTCGGTGGAAAAG TTCAGGTGGCACAGTGGAGGCATCCACTGTGCGGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCA CTACACCC (配列番号67)	AYNTAPSVYPLAPCGRDVSDHNVALG CLVSSYFPEPVTVTWNWGAQTSGVHT FPSVLQPSGLYSLSSTVTVPAHSLSSK CFTCNVNHPATTTKVDLCVGKKTKPR CPICPGCEVAGPSVFIFPPKPKDILMIS RTPEVTCVVVDVSKEHAEVQFSWYVD GEEVHTAETRPKEEQFNSTYRVVSVL PIQHEDWLKGKEFECKVNNEDLPGPIT RTISKAKGVVRSPEVYTLPPPAEELSK SIVTLTCLVKSFFPPFIHVEWKINGKPE PENAYRTTPPQEDEDGTYFLYSKFSVE KFRWHSGGIHCAVMHEALHNHYT (配列番号66)	EU372656		
		IgG6[a]	GCCCCCAAGACGGCCCCATCGGTCTACCCTCTGGCCCCCTGCGGCAGGCACAGCTCTG GCCCTAACGTGGCCTTGGGCTGCCTGGCCTCAAGCTACTTCCCCGAGCCAGTGACCCTG ACCTGGAACTCGGGCGCCCTGACCAGTGGCGTGCATACCTTCCCGATCCGTCCTGCAGCC GTCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCGGCCAGCAGCCTGTCCAGCA AGAGCTACACCTGCAATGTCAACCACCCGGCCACCACCACCAAGGTGGACCTGTGTGTT GGACGACCATGTCCCATATGCCCAGCCTGTGAAGGGCCCGGGCCCTCGGTCTTCATCTT CCCTCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACACCCCAGGTCACGTGCGTGG TGGTAGATGTGAGCCAGGAAAACCCGGAGGTCCAGTTCTCCTGGTATGTGGACGGTGTA GAGGTGCACACGGCCCAGACGAGGCCAAAGGAGGCGCAGTTCAACAGCACCTACCGTGT GGTCAGCGTCCTGCCCATCCAGCACGAGGACTGGCTGAAGGGGAAGGAGTTCGAGTGCA AGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCCCCCATCACAAGGATCATCTCCAAGGCCAAAGGG CCGAGCCGGGAGCCGCAGGTGTACACCCTGTCCCCATCCGCCGAGGAGCTGTCCAGGA GCAAAGTCAGCATAACCTGCCTGGTCACTGGCTTCTACCCACCTGACATCGATGTCGAG TGGAAGAGCAACGGACAGCCGGAGCCAGAGGGCAATTACCGCACCACCCCGCCCCAGC AGGACGTGGACGGGACCTACTTCCTGTACAGCAAGCTCGCGGTGGACAAGGCCAGCTGG CAGCGTGGAGACCCATTCCAGTGTGCGGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACAC CC (配列番号69)	APKTAPSVYPLAPCGRDTSGPNVALG CLASSYFPEPVTLTWNSGALTSGVHT FPSVLQPSGLYSLSSMVTVPASSLSS KSYTCNVNHPATTTKVDLCVGRPCPI CPACEGPGPSVFIFPPKPKDTLMISRT PQVTCVVVDVSQENPEVQFSWYVDG VEVHTAQTRPKEAQFNSTYRVVSVLPI QHEDWLKGKEFECKVNNKDLPAPITRII SKAKGPSREPQVYTLSPSAEELSRSKV SITCLVTGFYPPDIDVEWKSNGQPEPE GNYRTTPPQQDVDGTYFLYSKLAVDK ASWQRGDPFQCAVMHEALHNHYT (配列番号68)	EU372655		
		IgG6[b]	GCCCCCAAGACGGCCCCATCGGTCTACCCTCTGGCCCCCTGCGGCAGGGACACGTCTG GCCCTAACGTGGCCTTGGGCTGCCTGGCCTCAAGCTACTTCCCCGAGCCAGTGACCGTG ACCTGGAACTCGGGCGCCCTGACCAGTGGCGTGCACACCTTCCCATCCGTCCTGCAGCC GTCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGCACGGTGACCGTGCCGGCCAGGAGCTCGTCCAGAA AGTGCTTCACGTGCAATGTCAACCACCCGGCCACCACCACCAAGGTGGACCTGTGTGTT GGACGACCATGTCCCATATGCCCAGCCTGTGAAGGGAACGGGCCCTCGGTCTTCATCTT CCCTCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACGTGCGTGG TGGTAGATGTGAGCCAGGAAAACCCGGAGGTCCAGTTCTCCTGGTACGTGGACGGCGAA GAGGTGCACACGGCCGAGACGAGGCCAAAGGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACCGTGT GGTCAGCGTCCTGCCCATCCAGCACCAGGACTGGCTGAAGGGAAAGGAGTTCGAGTGCA AGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCCCCCATCACAAGGATCATCTCCAAGGCCAAAGGG CCGAGCCGGGAGCCGCAGGTGTACACCCTGTCCCCATCCGCCGAGGAGCTGTCCAGGA GCAAAGTCAGCATAACCTGCCTGGTCACTGGCTTCTACCCACCTGACATCGATGTCGAG TGGAAGAGCAACGGACAGCCGGAGCCAGAGGGCAATTACCGCTCCACCCCGCCCCAGGA GGACGAGGACGGGACCTACTTCCTGTACAGCAAACTCGCGGTGGACAAGGCGAGGTTGC AGAGTGGAGGCATCCACTGTGCGGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCATCTCCAAGACT (配列番号71)	APKTAPSVYPLAPCGRDTSGPNVALG CLASSYFPEPVTVTWNSGALTSGVHT FPSVLQPSGLYSLSSTVTVPARSSSRK CFTCNVNHPATTTKVDLCVGRPCPIC PACEGNGPSVFIFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSQENPEVQFSWYVDGEE VHTAETRPKEEQFNSTYRVVSVLPIQH QDWLKGKEFECKVNNKDLPAPITRISK AKGPSREPQVYTLSPSAEELSRSKVSI TCLVTGFYPPDIDVEWKSNGQPEPEG NYRSTPPQEDEDGTYFLYSKLAVDKA RLQSGGIHCAVMHEALHNHYTQKSISK T (配列番号70)	EU372653		
	ブタIg軽鎖定常領域	Ig kappa (CK) variant 1			FP312898	http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=Pig&group=IGLC	Schwartz J.C. et al.,Immunogenetics, 64, 303-311 (2012). PMID: 22109540
		Ig kappa (CK) variant 2			CU694848		
		Ig lambda (CL) variant 1			CU467689	http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=Pig&group=IGKC	
		Ig lambda (CK) variant 2			CU467599		

種名	Ig領域		塩基配列	アミノ酸配列	GenBank Accession No.	IMGT Database	Reference
スイギュウ（学名：*Bubalus bubalis*）	スイギュウIg重鎖定常領域（CH1~CH3）	IgG1?	GAGGGGGGTGCAGACGTTCCGGGGCGTCGTTCAGTCC TCGGGGTCTAGTCTGTCAGCAGCACGGTGACCGGGG CGGCCAGGGCCACAAAAAGCCAGACCTTCACCTGCAA CGTAGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAG GGTGTTGTTCCCCCATGCAGACCGAAACCCTGTGATTG CTGCCCACCCCCTGAGCTCCCCGGAGGACCCTGTGTC TTCATCTTCCCACCAAAACCCAAGGACACCCTCACAAT CTCTGGAACTCCTGAGGTCACGTGTGTGGTGGTGGAC GTGGGCCACGATGACCCCGAGGTGAAGTTCTCCTGGT TCGTGGATGGATGTGGAGGTAAACACAGCCAGGAGGAA GCCAAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACCGGGTG GTCAGCGCCCTGCCCATCCAGCACCAACCAGTGGACTG GAGGAAAGGAGTTCAAGTGCAAGGTCTACAATGAAGGC CTGCCAGCCCCCATCGTCAGGACCATCTCCAGGAGCA AAGGGCAGCCCCGAGAGCCCACAGGTGTACGTCCTGCC CCCAGCCCAGGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC ATCACTTGCATGGTCAAGGCTTCTACCCAGACTACAT CGCCGTAGAGTGGCAGAAAGATGGGCAGCCTGAGTCA GAGGACAAATATGGCAGGACGCCGGCCCAGGTGGACA GCGATGGCTCCTACTTCCTGTACAGCAAGCTCACGGGT GAACAAGAACAGCTGGCAAGAAGGAGGCGCCTACACG TGTGTAGTGATGCATGAGGC （配列番号73）	SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSTVTAPAS ATKSQTFTCNVAHPASSTKVDKAVVP PCRPKPCDCCPPPELPGGPSVHIFPPK PKDTLTISGTPEVTCVVVDVGHDDPEV KFSWFVDDVEVNTASTKPREEQFNSTY RVVSALPIQHNDWTGGKEFKCKVYNEG LPAPIVRTISRTKGQAREPQVYVLAPP QDELSKSTVSITCMVTGFYPDYIAVEW QKDGQPESEDKYGTTPPQLDSDGSYF LYSRLRVNKNSWQEGGAYTCVVMHE （配列番号72）	NW_00569090 3	登録なし	なし
		IgG2?	GCCTCCATCACAGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGACTTC TTGGCCGCGGGGAAAGGTCCAGCTCGACCGTGACCCTG GGCTGCCTGGTCTGCAGCTACATGCCCGAGCCGGTGA CGGTCAACTGGAAGTCGGGTCCCCTGAAGACCGCCGT GGACAGCTTGCCGGCCGTCCTTGAGTCCTCTGGGGTC TACTCTCTCAGCAGCACGGTCACCGTGCCCTCCAGCAG CCACAAAAAGCCAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCAC CCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACACGGCTGTTGGGT TCTCCAGTGACTGCTGCAAGTTTCCTAAGCCTTGTGTG AGGGGACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCGAAACCCAA AGACACCTCATGATCACGGAAATCCCCGAGGTCACAT GTGTGGTGGTGGACGTGGGCCGGGATAACCCCGAGGT GCAGTTCTCCTGGTTCGTGGGTGATGTGGAGGTGCAC ACGGGCAGGTCGAAGCCGAGAGAGGAGCAGTTCAACA GCACCTACCGCGTGGTCAGCGCCTCCCCATCGACCA CAATGAGTGGACTGAAGCAAAGGAGTTCAAGTCCAAG GTCAACAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGTGAGGA CCATCTCCAGGACCAAAGGGCAGGGCCGGGAGCCGCA GGTGTACGTCCTGGCCCCACCCCAGGAAGAGCTCAGC AAAAGCACGGTCAGGGTCACTTGCATGGTCACTGGCTT CTACCCAGACATCATCGCCGTAGAGTGGCATAGAGACC GGCAGGCTGAGTCGGAGGACAAGTACCGGCACGACCCC GCCCCAGGTGGACAGGGATGGCTCCTACTTCCTGTAC AGCAGGCTCAAGGTGAACAAGAACAGCTGGCAAGAAG GAGGCGCCTACACGTGTGTAGTGATGCATGAGGC （配列番号75）	ASTTAPKVYPLTSCRGETSSSTVTLGC LVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSTVTAPASATKSQT FTCNVAHPASSTKVDTAVGFSSDCCK PKPCVRGPSVFIFPPKPKDTLMITGNP EVTCVVVDVGRDNPEVQFSWFVGDVE VHTGRSKPREFQFNSTYRVVSTLPIQH NDWTGGKEFKCKVNNKGLPAPIVRTIS RTKGQAREPQVYVLAPPQEELSKSTVS VTCMVTGFYPDYIAVEWHRDRQAESD KYRTTPPQLDSDGSYFLYSRLKVNKNS WQEGGAYTCVVMHE （配列番号74）	NW_00576614 3		
		IgG3?	GCGTGGACCACAGGCCCGAAAGTGTACCCTCTGGCAT GGAGCTGCGGGGACAGGTCCAGCTCCACGGTGACCCT GGGCTGCCTGGTCTCCACGTACATGCCCGAGCCGGTG ACCGTGACCTGGAACTCGGGTGCCCTGAAGAACGGCG TGCACACGTTCCCGGCCGTCCTGCAGTCCTCCGGGCT CTACTCTCTCAGCAGCATGGTGACCATGCCCACCAGCA CCGCAGGAACCCAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCA CCCGGCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGCGGGTTGAGT GCAAGGCATCCGGTCCGAAGACACCAGAGACACCTA TCCATCCTGTAAAACCCCCAACCCAGGAGCCCAGAGAT GAAAAGACACCCTGCCAGTGTCCCAAATGCCCAGAACC TCTGGGAGGACTGTCTGTCTTCATCTTCCCACCGAAAC CCAAGGACACCCTCACAATCTCTGGAACGCCCGAAGGT CACGTGTGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCC GAAGTGCAGTTCTCCTGGTTCGTGGATGACGTGGAGG TGCACACAGACCAGGATGAAGCCAAGAGAGGAGCAGTT CAACAGCACCTACCGCGTGGTCAGCGCCGTGCCCATC CAGCACCAGGACTGGCTGGGGGAAAGGAGTTCAAGT GCAAGGTCAACAACAAAGGCCTCCCGGCCCCCATCGGT GAGGACCATCTCCAGGACCAAAGGGCAGGCCCGGGAG CCACAGGTGTATGTCCTGGCCCCACCCCGGGAAGAGC TCAGCAAAAGCACGGTCAGCCTCACCTGCCTAATCACC GGCTTCTACCCAGAAGAGGTAGACGTGGAGTGGCAGA GAAATGGGCAGCCTGAGTCAGAGGACAAGTACCACAC GACCCCACCCGAGCTGGACGCTGACGGCTCCTACTTC CTGTACAGCAGGCTGAGGGTGAACAGGAGGAGGTGGG AGGAAGGAGACGAOTACAGGTGTGCAGTGATGOATGAA GGTTACGGAATGACTAGAAAGAGAAGGOGATGTGGAG CTCTCCGGGTAAATGA （配列番号77）	ASTTAPKVYPLASSCGDTSSSTVTLGC LVSSYMPEPVTVTWNSGALKNGVHTF PAVRQSSGLYSLSSMVTMPTSTAGTQ TFTCNVAHPASSTKVDTAVTARHPVP KTPETPIHPVKPPTQEPRDEKTPCQCP KCPEPLGGLSVFIFPPKPKDTLTISGTP EVTCVVVDVGQDDPEVQFSWFVDDVE VHTARTKPREEQFNSTYRVVSALPIQH QDWLREKEFKCKVNNKGLPAPIVRTISR TKGQAREPQVYVLAPPREELSKSTLSL TCLITGFYPEEVDVEWQRNGQPESEDK YHTTPPQLDADGSYFLYSRLRVNRSSW QEGDHYTCAVMHEALRNHYKEKPISRS PGK* （配列番号76）	NW_00578420 6		
	スイギュウIg軽鎖定常領域（CL）	Ig lambda?	CAGCCCAAGTCCGGCACCCTCAGTCACCCTGTTCCCAC CCTCCACGGAGGAGCTCAGGGCCAACAAGGCCACCCT GGTGTGTCTCATCAGCGACTTCTACGCCGGGTAGCATGA CCGTGGCAAGGAGGCAGACGGCAGCACCATCACCCG GAAGTGGAGACACCCCGGGCTCCAAACAGCAGCAAC AGCAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGG GCAGCGAGTGGAAATCGAAAGGCAGTTACAGCTGCGA GGTCACGCACGAGGGGAGCACCGTGACAAAGACAGTG AAGCCCTCAGAGTGTTCTTAG （配列番号79）	QPKSAPSVTLFPPSTEELSANKATLVC LISDFYPGSMTVARKADGSTITRNVETT RASKQSNSKYAASSYLSLTGSEWKSKG SYSCEVTHEGSTVTKTVKPSECS* （配列番号78）	NW_00569078 6	登録なし	なし

種名	Ig領域		塩基配列	アミノ酸配列	GenBank Accession No.	IMGT Database	Reference
ヒト（学名：*Homo sapiens*）	ヒトIg重鎖定常領域（CH1~CH3）	IgG4 variant 1	GAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCATCATGCCCA GCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTG TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC GTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTA ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAATGA （配列番号14）	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFR YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK* （配列番号12）	K01316	http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=human&group=IGHC	Ellison J. et al., DNA, 1, 11-18 (1981). PMID: 6299662
		IgG4 variant 2	GAGTCCAAATATGGTCCCCCGTGCCCATCATGCCCA GCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTG TTCCCCCCAAAAGCCAAGGACACTCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC GTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCGTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTA ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAATGA （配列番号81）	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK* （配列番号80）	AJ001363		Brusco A. et al., Eur. J. Immunogenet., 25, 349-355 (1998). PMID: 9805657
		IgG4 variant 3	GGAGCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTG TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACGTGGGTGGTGGTGGACGTG AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC GTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAATGA （配列番号83）	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG K* （配列番号82）	AJ001364		
	ヒトIg終鎖定常領域	Ig kappa (CK)	ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC AAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACG CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG （配列番号13）	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* （配列番号11）	X96754	http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=human&group=IGKC	Gil.

種名	重領域		塩基配列	アミノ酸配列	GenBank Accession No.	IMGT Database	Reference
ウシ（学名：Bos taurus）	ウシ重鎖定常領域（CH1～CH3）	IgG1 variant 1	GCCTCCACCAAGGGCCCGAAGGTCTACCCTCTCGAGTTC TTGCTGCGGGGACAAGTCCAGCTCCACCGTGACCCTG GGGTGCCTGGTCTCCAGCTACATGCCCGAGCCGGGTGA CCGTGACCTGGAACTCCGGGTGCCCTGAAGACCGGGGT GCAGACCTTCCCGCCTGTCCTTCAGTCCTCCGGGCTG TACTCTCTGAGCAGCATGGTGACCGTGCCCGGCAGCA CCTCAGCAGCAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCACCC GCCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGACCGTTGAGCCC ACATGCAAACCATCAACCCTGTGACTGTTGCCCACCCCC TGAGCTCCCCGGAGGAGCCTCTGTGTCTTCATCTTCCCAC CCAAAGCCAAGGATGACCTCATGATCTCGCGGACCCCC CGAGGTCACGTGTGTGGTGGTGGACGTGGGCCACGAT GACCCCGAGGTGAAGTTCTCCTGGTTCGTGGACGACG TGGAGGTAAACACAGCCACGACCGAAGCCGAGAGAGGA GCAGTTCAACAGCACCTACCGCGTGGTCAGCGCCCTG CCATCCAGCACCAGGACTGGACTGAGGAAAGGAGT TCAAGTGCAAGGTCCACAACAAGGCCTCCCGGCCCG CATCGTGAGGACCATCTCCAGGACCAAAGGGCCGGCC CGGGAGCCGGAGGTGTATGTCCTGGCCCACCCCAGG AAGAGCTCAGCAAAAGCACGGTCAGCCTCACCTGCAT GGTCACCAGCTTCTACCCAGACTACATCGCCGTGGAGT GGCAGAGAACGGGCAGCCTGAGTCCGACGACAAGTA CGGCACGACCCCCCCCCAGCTGGACGCCGACAGCTCC TACTTCCTGTACAGCAAGCTCAGGGTGGACAAGAACAG CTGGCAGGAAGGAGACACCTACACGTGTGTGGTGATG CACGAGGCCCTGCACAATCACTACACGCAGAAGTCCA CCTCTAAGTCTGCGGGTAAATGA （配列番号92）	ASTTAPKVYPLSSCCGDKSSSTVTLGC LVSSYVMPEPVTVTWNSGALKSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSMVTVPSSTSGQT FTCNVAHPASSTKVDKAVDPTCKPSP CDCCPPPELPGGPSVFIFPPKPKDTLTI SGTPEVTCVVVDVGHDDPEVKFSWFV DDVEVNTATTKPREEQFNSTYRVVSAL PIQHQDWTGGKEFKCKVHNEGLPAPIV RTISRTKGPAREPQVYVLAPPQEELSK STVSLTCMVTSFYPDYIAVEWQRNGQP ESEDKYGTTPPQLDADGSYFLYSKLRV QRNSWQEGDTYTCVVMHEALHNHYTQ KSTSKSAGK* （配列番号84）	X62916	https://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=bovine&group=IGHC	Symons D.B. et al., J. Immunogenet., 14, 273-283 (1987). PMID: 3141517 Symons D.B. et al., Mol. Immunol., 26, 841-850 (1989). PMID: 2513487 Kacskovics I. and Butler J.E., Mol. Immunol., 33, 189-195 (1996). PMID: 8848449 Rabbani H. et al., Immunogenetics, 48, 326-331 (1997). PMID: 9218838 Saini S.S. et al., Scand. J. Immunol., 56, 22-8 (2002). PMID: 12121764
		IgG3 variant 2	GCCTCCACCAAGGGCCCGAAGGTCTACCCTCTCGAGTTC TTGCTGCGGGGACAAGTCCAGCTCCACCGTGACCCTG GGCTGCCTGGTCTCCAGCTACATGCCCGAGCCGGGTGA CCGTGACCTGGAACTCCGGGTGCCCTGAAGACCGGGGT GCACACCTTCCCGCCGTCCTTCAGTCCTCCGGGGCTG TACTCTCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCCGGCAGCA CCTCAGCAGCAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCACCC GCCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGACCGTTGAGCCC ACATGCAAACCATCAACCCTGTGACTGTTGCCCACCCCC TGAGCTCCCCGGAGGAGCCTCTGTGTCTTCATCTTCCCAC CCAAAGCCAAGGATGACCTCATGATCTCGCGGACCCCC CGAGGTCACGTGTGTGGTGGTGGACGTGGGCCACGAT GACCCCGAGGTGAAGTTCTCCTGGTTCGTGGACGACG TGGAGGTAAACACAGCCACGACCGAAGCCGAGAGAGGA GCAGTTCAACAGCACCTACCGCGTGGTCAGCGCCCTG CCATCCAGCACCAGGACTGGACTGAGGAAAGGAGT TCAAGTGCAAGGTCCACAACAAGGCCTCCCGGCCCG CATCGTGAGGACCATCTCCAGGACCAAAGGGCCGGCC CGGGAGCCGGAGGTGTATGTCCTGGCCCACCCCAGG AAGAGCTCAGCAAAAGCACGGTCAGCCTCACCTGCAT GGTCACCAGCTTCTACCCAGACTACATCGCCGTGGAGT GGCAGAGAACGGGCAGCCTGAGTCCGACGACAAGTA CGGCACGACCCCCCCCCAGCTGGACGCCGACAGCTCC TACTTCCTGTACAGCAAGCTCAGGGTGGACAAGAACAG CTGGCAGGAAGGAGACACCTACACGTGTGTGGTGATG CACGAGGCCCTGCACAATCACTACACGCAGAAGTCCA CCTCTAAGTCTGCGGGTAAATGA （配列番号93）	ASTTAPKVYPLSSCCGDKSSSTVTLGC LVSSYVMPEPVTVTWNSGALKSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSMVTVPSSTSGQT FTCNVAHPASSTKVDKAVDPTCKPSP CDCCPPPELPGGPSVFIFPPKPKDTLTI SGTPEVTCVVVDVGHDDPEVKFSWFV DDVEVNTATTKPREEQFNSTYRVVSAL PIQHQDWTGGKEFKCKVHNEGLPAPIV RTISRTKGPAREPQVYVLAPPQEELSK STVSLTCMVTSFYPDYIAVEWQRNGQP ESEDKYGTTPPQLDADGSYFLYSKLRV QRNSWQEGDTYTCVVMHEALHNHYTQ KSTSKSAGK* （配列番号85）	X16701 M25278		
		IgG3 variant 3	GCCTCCACCAAGGGCCCGAAAGTCTACCCTCTCGAGTTC TTGCTGCGGGGACAAGTCCAGCTCCACCGTGACCCTG GGCTGCCTGGTCTCCAGCTACATGCCCGAGCCGGGTGA CCGTGACCTGGAACTCCGGGTGCCCTGAAGACCGGGGT GCACACCTTCCCGCCGTCCTTCAGTCCTCCGGGGCTG TACTCTCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCCGGCAGCA CCTCAGCAGCAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCACCC GCCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGACCGTTGAGCCC ACATGCAAACCATCAACCCTGTGACTGTTGCCCACCCCC TGAGCTCCCCGGAGGAGCCTCTGTGTCTTCATCTTCCCAC CCAAAGCCAAGGATGACCTCATGATCTCGCGGACCCCC CGAGGTCACGTGTGTGGTGGTGGACGTGGGCCACGAT GACCCCGAGGTGAAGTTCTCCTGGTTCGTGGACGACG TGGAGGTAAACACAGCCACGACCGAAGCCGAGAGAGGA GCAGTTCAACAGCACCTACCGCGTGGTCAGCGCCCTG CCATCCAGCACCAGGACTGGACTGAGGAAAGGAGT TCAAGTGCAAGGTCCACAACAAGGCCTCCCGACCCCG CATCGTGAGGACCATCTCCAGGACCAAAGGGCCGGCC CGGGAGCCGGAGGTGTATGTCGTGGCCCACCCCAGG AAGAGCTCAGCAAAAGCACGGTCAGCCTCACCTGCAT GGTCACCAGCTTCTACCCAGACTACATCGCCGTGGAGT GGCAGAGAATGGGCAGCCTGAGTCCAGAGGACAAGTA CGGCACGACCCCTCCCCAGCTGGACGCCGACGGCTCC TACTTCCTGTACAGCAGGCTCAGGGTGGACAGGAAGA GCTGGCAGGAAGGAGAACACCTACACGTGTGTGGTGAT CGAGGAGGCCCTCCACAATCACTACACGCAGAAGTCC ACCTCTAAGTCTGCGGGTAAATGA （配列番号94）	ASTTAPKVYPLASSCGDTSSSTVTLGC LVSSYVMPEPVTVTWNSGALKSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSMVTVPASSSQGT FTCNVAHPASSTKVDKAVGVSIDCSKC HNQPGVREPSVFIFPPKPKDTLMITGTP EVTCVVVNVGHDNPEVQFSWFVDDVE VHTARSKPREGQFNSTYRVVSALPIQH QDWTGGKEFKCKVNNKGLSAPIVRSIR SKGPAREPQVYVLDPPKEELSKSTLSV TCMVTGFYPEDVAVEWQRNRQTESED KYRTTPPVLDTDRSYFLYSKLRVDRNS WQEGDAYTCVVMHEALHNHYMQKSTS KSAQK* （配列番号87）	S82407		
		IgG2 variant 1	GCCTCCACCAAGGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGGGAT CCAGCTGCGGAGACACATCCAGCTCCACCGTGACCCT GGGCTGCCTGGTCTCCAGCTACATGCCCGAGCCGGTG ACCGTGACCTGGAACTCCGGCTGCCCTGAAGAGCGGCG TGCACACCTTCCCGCCGTCCTTCAGTCCTCCGGGCT CTACTCTCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCCGCCAGC AGCTCAGGACAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCACC CGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAGCGTGTTGGGT CTCCATTGACTGCTCCAAGTGTCATAACCAGCCTTGCG TGAGGGAACCATCTGTGTTCATCTTCCCACCGAAACCC AAAGAGACCGTGATGATCACAGGAACGGCCGAGTCA CCGTGTCTGATGGTGAACGTGGGCCACGATACCGCCGA GGTGCAGTTCTCCTGGTTCGTGGATGACGTGGAGGTG CACACGGCCAGGTCGAAGCCAAGAGAGGAGCAGTTCA ACAGCACGTACCGCGTGGTCAGCGCCCTGCCCATCCA GCACCAGGACTGGACTGAAGGAAAGGAGTTCAAGTGC AAGGTCAACAACAAAGGCCTCCCGGCCCCCATCGTGA GGATCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGGGAGCC CCAGGTGTATGTCCTGCCACCCAAGGAAGAGCTC AGCAAAAGCAGCGTCACCGTGACCTGCATGGTCACGG GCTTCTACCCAGACATCGACGTGGAGTGGCAGAG AAACGGGCAGCCTGAGTCCGAGGACAAGTACCGCACG ACCCCGCCCCAGCTGGACGCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCAGGGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCGGGTAAATGA （配列番号95）	ASTTAPKVYPLASSCGDTSSSTVTLGC LVSSYVMPEPVTVTWNSGALKSGVSIDCSKC HNQPGVREPSVFIFPPKPKDTLMITGTP EVTCVVVNVGHDNPEVQFSWFVDDVE VHTARSKPREGQFNSTYRVVSALPIQH QDWTGGKEFKCKVNNKGLSAPIVRSIR SKGPAREPQVYVLDPPKEELSKSTLSV TCMVTGFYPEDVAVEWQRNRQTESED KYRTTPPVLDTDRSYFLYSKLRVDRNS WQEGDAYTCVVMHEALHNHYMQKSTS KSAQK* （配列番号87）	S82407		

		IgG2 variant 2	GCCTCCACCACAGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGAGTTCTTGCTGCGGGGACAAGTCCAGCTCCACCGTGACCCTGGGCTGCCTGGTGTCCAGCTACATGCCCGAGCCGGTGACCGTGACGTGGAACTGGGGTGCGCTGAAGAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCCGTCCTTCAGTCCTCCGGGCTCTACTCTCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCCGGCAGCACCTCAGGACAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGGCTGTTGGGGTCTCCAGTGACTGCTCCAAGCCTAATAACCAGCATTGCGTGAGGGAACCATCTGTCTTCATCTTCCCACCGAAACCCAAAGACACCCTGATGATCACAGGAAGGCCCGAGGTCACGTGTGTGGTGGTGAACGTGGGCCACGATAACCCCGAGGTGCAGTTCTCCTGGTTCGTGGACGACGTGGAGGTGCACACGGCCAGGACGAAGCCGAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGCGTGGTCAGCGCCCTGCCCATCCAGCACCAGGACTGGACTGGAGGAAAGGAGTTCAAGTGCAAGGTCAACATCAAAGGCCTCTCGGCCTCCATCGTGAGGATCATCTCCAGGAGCAAAGGGCCGGCCCGGGAGCCGCAGGTGTATGTCCTGGACCCACCCAAGGAAGAGCTCAGCAAAAGCACGGTCAGCGTCACCTGCATGGTCATCGGCTTCTACCCAGAAGATGTAGACGTGGAGTGGCAGAGAGACCGGCAGACTGAGTCGGAGGACAAGTACCGCACGACCCCGCCCCAGCTGGACGCCGACCGCTCCTACTTCCTGTACAGCAAGCTCAGGGTGGACAGGAACAGCTGGCAGAGAGGAGACACCTACACGTGTGTGGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACATGCAGAAGTCCACCTCTAAGTCTCCGGGTAAATGA （配列番号96）	ASTTAPKVYPLSSCCGDKSSSTVTLGCLVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSMVTVPGSTSGQTFTCNVAHPASSTKVDKAVGVSSDCSKPNNQHCVREPSVFIFPPKPKDTLMITGTPEVTCVVVNVGHDNPEVQFSWFVDDVEVHTARTKPREEQFNSTYRVVSALPIQHQDWTGGKEFKCKVNIKGLSASIVRIISRSKGPAREPQVYVLDPPKEELSKSTVSVTCMVIGFYPEDVDVEWQRDRQTESEDKYRTTPPQLDADRSYFLYSKLRVDRNSWQRGDTYTCVVMHEALHNHYMQKSTSKSAGK* （配列番号88）	M36946 (X06703)		
		IgG2 variant 3	GCCTCCACCACAGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGAGTTCTTGCTGCGGGGACAAGTCCAGCTCGGGGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCTCCAGCTACATGCCCGAGCCGGTGACCGTGACCTGGAACTCGGGTGCCCTGAAGAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCCGTCCTTCAGTCCTCGGGGCTCTACTCTCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCCGCCAGCAGCTCAGGAACCCAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGGCTGTTGGGGTCTCCAGTGACTGCTCCAAGCCTAATAACCAGCATTGCGTGAGGGAACCATCTGTCTTCATCTTCCCACCGAAACCCAAAGACACCCTGATGATCACAGGAACGCCCGAGGTCACGTGTGTGGTGGTGAACGTGGGCCACGATAACCCCGAGGTGCAGTTCTCCTGGTTCGTGGACGACGTGGAGGTGCACACGGCCAGGACGAAGCCGAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGCGTGGTCAGCGCCCTGCCCATCCAGCACCAGGACTGGACTGGAGGAAAGGAGTTCAAGTGCAAGGTCAACATCAAAGGCCTCTCGGCCTCGATCGTGAGGATCATCTCCAGGAGCAAAGGGCCGGCCCGGGAGCCGCAGGTGTATGTCCTGGACCCACCCAAGGAAGAGCTCAGCAAAAGCACGGTCAGCCTCACCTGCATGGTCATCGGCTTCTACCCAGAAGATGTAGACGTGGAGTGGCAGAGAGACCGGCAGACTGAGTCGGAGGACAAGTACCGCACGACCCCGCCCCAGCTGGACGCCGACCGCTCCTACTTCCTGTACAGCAAGCTCAGGGTGGACAGGAACAGCTGGCAGAGAGGAGACACCTACACGTGTGTGGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACATGCAGAAGTCCACCTCTAAGTCTGCGGGTAAATGA （配列番号97）	ASTTAPKVYPLSSCCGDKSSSGVTLGCLVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSMVTVPASSSGTGTFTCNVAHPASSTKVDKAVGVSSDCSKPNNQHCVREPSVFIFPPKPKDTLMITGTPEVTCVVVNVGHDNPEVQFSWFVDDVEVHTARTKPREEQFNSTYRVVSALPIQHQDWTGGKEFKCKVNIKGLSASIVRIISRSKGPAREPQVYVLDPPKEELSKSTVSLTCMVIGFYPEDVDVEWQRDRQTESEDKYRTTPPQLDADRSYFLYSKLRVDRNSWQRGDTYTCVVMHEALHNHYMQKSTSKSAGK* （配列番号89）	X16702 (M25279)		
		IgG3 variant 1	GCCTCCACCACAGCCCCGGAAAGTCTACCCTCTGGCATCCAGCTGCGGAGACACATCCAGCTGCACCGTGAGCCTGGGCTGCCTGGTCTCGAGCTACATGCCGGAGCCGGTGACCGTGACCTGGAACTCGGGTGGCCTGAAGAGCGGCGTGGACACCTTGCCGGCCGTCCGGCAGTCCTCTGGGCTGTACTCTCTCAGCAGCATGGTGACTGTGCCCGGCAGCAGCTCAGAAACCCAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGGCTGTCACTGCAAGGCGTCCAGTCCCGACGACGCCAAAGACAACTATCCCTCCTGGAAAACCCACAACCCCAAAGTCTGAAGTTGAAAAGACACCCTGCCAGTGTTCCAAATGCCCAGAACCTCTGGGAGGACTGTGTGTGTTCATCTTCCCACCGAAACCCAAGGACACCCTCACAATCTCGGGAACGCCCGAGGTCACGTGTGTGGTGGTGGACGTGGGCCAGGATGACCCCGAGGTGCAGTTCTCCTGGTTCGTGGACGACGTGGAGGTGCACACGGCCAGGACGAAGCCGAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACCGCGTGGTCAGCGCCCTGCGCATCCAGCACCAGGACTGGCTGCAGGGAAAGGAGTTCAAGTGCAAGGTCAACAACAAAGGCCTCCCGGCCCCCATTGTGAGGACCATCTCCAGGACCAAAGGGCAGGCCCGGGAGCCGCAGGTGTATGTCCTGGCCCCACCCCGGGAAGAGCTCAGCAAAAGCACGCTCAGCCTCACCTGCCTGATCACCGGTTTCTACCCAGAAGAGATAGACGTGGAGTGGCAGAGAAATGGGCAGCCTGAGTCGGAGGACAAGTACCACACGACCGCACCCCAGCTGGATGCTGACGGCTCCTACTTCCTGTACAGCAAGCTCAGGGTGAACAAGAGCAGCTGGCAGGAAGGAGACCACTACACGTGTGCAGTGATGCACGAAGCTTTAGGGAATCACTACAAAGAGAAGTCCATCTCGAGGTCTCCGGGTAAATGA （配列番号98）	ASTTAPKVYPLASSCGDTSSSTVTLGCLVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTFPAVRQSSGLYSLSSMVTVPASSSETQTFTCNVAHPASSTKVDKAVTARRPVPTTPKTTIPPGKPTTPKSEVEKTPCQCSKCPEPLGGLSVFIFPPKPKDTLTISGTPEVTCVVVDVGQDDPEVQFSWFVDDVEVHTARTKPREEQFNSTYRVVSALRIQHQDWLQGKEFKCKVNNKGLPAPIVRTISRTKGQAREPQVYVLAPPREELSKSTLSLTCLITGFYPEEIDVEWQRNGQPESEDKYHTTAPQLDADGSYFLYSKLRVNKSSWQEGDHYTCAVMHEALRNHYKEKSISRSPGK* （配列番号90）	U63638		
		IgG3 variant 2	GCCTCCACCACAGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGGCATCCCGCTGCGGAGACACATCCAGCTCCACCGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCTCCAGCTACATGCCCGAGCCGGTGACCGTGACCTGGAACTCGGGTGCCCTGAAGAGTGGCGTGCACACCTTCCCGGCCGTGCTTCAGTCCTCCGGGCTGTACTCTCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCCGCCAGCACCTCAGAAACCCAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGGCTGTCACTGCAAGGCGTCCAGTCCCGACGACGCCAAAGACAACCATCCCTCCTGGAAAACCCACAACCCAGGAGTCTGAAGTTGAAAAGACACCCTGCCAGTGTTCCAAATGCCCAGAACCTCTGGGAGGACTGTCTGTCTTCATCTTCCCACCGAAACCCAAGGACACCCTCACAATCTCGGGAACGCCCGAGGTCACGTGTGTGGTGGTGGACGTGGGCCAGGATGACCCCGAGGTGCAGTTCTCCTGGTTCGTGGACGACGTGGAGGTGCACACGGCCAGGACGAAGCCGAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACCGCGTGGTCAGCGCCCTGCGCATCCAGCACCAGGACTGGCTGCAGGGAAAGGAGTTCAAGTGCAAGGTCAACAACAAAGGCCTCCCGGCCCCCATTGTGAGGACCATCTCCAGGACCAAAGGGCAGGCCCGGGAGCCGCAGGTGTATGTCCTGGCCCCACCCCGGGAAGAGCTCAGCAAAAGCACGCTCAGCCTCACCTGCCTGATCACCGGTTTCTACCCAGAAGAGATAGACGTGGAGTGGCAGAGAAATGGGCAGCCTGAGTCGGAGGACAAGTACCACACGACCGCAGCCCAGCTGGATGCTGACGGCTCCTACTTCCTGTACAGCAGGCTCAGGGTGAACAAGAGCAGCTGGCAGGAAGGAGACCACTACACGTGTGCAGTGATGCATGAAGCTTTACGGAATCACTACAAAGAGAAGTCCATCTCGAGGTCTCCGGGTAAATGA （配列番号99）	ASTTAPKVYPLASRCGDTSSSTVTLGCLVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSMVTVPASTSETQTFTCNVAHPASSTKVDKAVTARRPVPTTPKTTIPPGKPTTQESEVEKTPCQCSKCPEPLGGLSVFIFPPKPKDTLTISGTPEVTCVVVDVGQDDPEVQFSWFVDDVEVHTARTKPREEQFNSTYRVVSALRIQHQDWLQGKEFKCKVNNKGLPAPIVRTISRTKGQAREPQVYVLAPPREELSKSTLSLTCLITGFYPEEIDVEWQRNGQPESEDKYHTTAPQLDADGSYFLYSRLRVNKSSWQEGDHYTCAVMHEALRNHYKEKSISRSPGK* （配列番号91）	U63639		

	ウシIg軽鎖定常領域（CL）	Ig lambda	CAGCCCAAGTCCCCACCCTCGGTCACCCTGTTCCCGCCCTCCACGGAGGAGCTCAACGGCAACAAGGCCACCCTGGTGTGTCTCATCAGCGACTTCTACCCGGGTAGCGTGACCGTGGTCTGGAAGGCAGACGGCAGCACCATCACCCGCAACGTGGAGACCACCCGGGCCTCCAAACAGAGCAACAGCAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGAGCAGCGACTGGAAATCGAAAGGCAGTTACAGCTGCGAGGTCACGCACGAGGGGAGCACCGTGACGAAGACAGTGAAGCCCTCAGAGTGTTCTTAG （配列番号101）	QPKSPPSVTLFPPSTEELNGNKATLVCLISDFYPGSVTVVWKADGSTITRNVETTRASKQSNSKYAASSYLSLTSSDWKSKGSYSCEVTHEGSTVTKTVKPSECS* （配列番号100）	X62917	登録なし	Chen L. et al., Vet. Immunol. Immunopathol., 124, 284-294 (2008), PMID: 18538861

配列番号４、３、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、１２、８０、８２、８４～９１、１００、１０２及び１１のアミノ酸配列においては、1若しくは複数個（例えば、５個以下、多くても１０個程度）のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されてもよく、これらの変異が導入されても、Ig重鎖又は軽鎖の定常領域としての機能を有しうる。

[0042] ヒトIgG1の定常領域は野生型ではADCC活性およびCDC活性を持つが、特定の部分にアミノ酸置換や欠損を加えることにより、それらの活性を低下させられることが知られている。ヒト以外の動物において、ヒトIgG4に相当する免疫グロブリンの定常領域が同定されていない場合、ヒトIgG1に相当する免疫グロブリンの当該領域に変異を加え、ADCC活性およびCDC活性を低下させたものを使用することができる。

[0043] 本発明は、(a’）QSLLYSENQKDY（配列番号３７）のアミノ酸配列を有するCDR1、WATのアミノ酸配列を有するCDR2及びGQYLVYPFT（配列番号３８）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖をコードするDNAと、(b’）GYTFTSNF（配列番号３９）のアミノ酸配列を有するCDR1、IYPEYGNT（配列番号４０）のアミノ酸配列を有するCDR2及びASEEAVISLVY（配列番号４１）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖をコードするDNAとを含む、人工遺伝子DNAを提供する。また、本発明は、QSLLYSENQKDY（配列番号３７）のアミノ酸配列を有するCDR1、WATのアミノ酸配列を有するCDR2及びGQYLVYPFT（配列番号３８）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖をコードするDNA（(a’)のDNA）も提供する。さらに、本発明は、GYTFTSNF（配列番号３９）のアミノ酸配列を有するCDR1、IYPEYGNT（配列番号４０）のアミノ酸配列を有するCDR2及びASEEAVISLVY（配列番号４１）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖をコードするDNA（(b’)のDNA）も提供する。

[0044] (a) QSLLYSENQKDY（配列番号３７）のアミノ酸配列を有するCDR1、WATのアミノ酸配列を有するCDR2及びGQYLVYPFT（配列番号３８）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖、(b) GYTFTSNF（配列番号３９）のアミノ酸配列を有するCDR1、IYPEYGNT（配列番号４０）のアミノ酸配列を有するCDR2及びASEEAVISLVY（配列番号４１）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域とラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖については、上述した。(a')のDNAは(a)のL鎖をコードするDNA（遺伝子）であり、(b')のDNAは(b)のH鎖をコードするDNA（遺伝子）であり、(a')のDNAと(b')のDNAとを含む人工遺伝子DNAは、市販の合成機を用いて合成することができる。人工遺伝子DNAには、制限酵素認識部位、KOZAK配列、ポリA付加シグナル配列、プロモーター配列、イントロン配列などを付加してもよい。

[0045] また、本発明は、前記人工遺伝子DNAを含むベクターも提供する。

[0046] ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、ｐＢＲ３２２，ｐＢＲ３２５，ｐＵＣ１２，ｐＵＣ１３）、枯草菌由来のプラスミド（例、ｐＵＢ１１０，ｐＴＰ５，ｐＣ１９４）、酵母由来プラスミド（例、ｐＳＨ１９，ｐＳＨ１５）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス，ワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫病原ウイルスなどを用いることができる。後述の実施例では、pDC6（日本国特許第5704753号、US Patent 9096878、EU Patent 2385115、Hong Kong (China) patent HK1163739、Australia Patent 2009331326）を用いた。

[0047] ベクターには、プロモーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリＡ付加シグナル、イントロン配列、選択マーカー、SV40複製オリジンなどを付加してもよい。

[0048] さらに、本発明は、前記ベクターにより形質転換された宿主細胞も提供する。この宿主細胞を培養し、培養物から抗体を採取することにより、抗PD-L1抗体を製造することができる。よって、本発明は、前記宿主細胞を培養し、培養物から抗PD-L1抗体を採取することを含む、抗体の製造方法も提供する。

本発明の抗体の製造方法において、L鎖をコードするDNAとH鎖をコードするDNAを含む人工遺伝子DNAを組み込んだベクターを宿主細胞にトランスフェクションしてもよいし、L鎖をコードするDNAを組み込んだベクターとH鎖をコードするDNAを組み込んだベクターを宿主細胞にコトランスフェクションしてもよい。

[0049] 宿主細胞としては、細菌細胞（例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、枯草菌など）、真菌細胞（例えば、酵母、アスペルギルスなど）、昆虫細胞（例えば、S2細胞、Sf細胞など）、動物細胞（例えば、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、3T3細胞、BHK細胞、HEK293細胞など）、植物細胞などを例示することができる。このうち、ジヒドロ葉酸還元酵素欠損細胞であるCHO-DG44細胞(CHO-DG44(dhfr-/-))が好ましい。

[0050] 組換えベクターを宿主に導入するには、Molecular Cloning 2nd Edition, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989に記載の方法（例えば、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、トランスフェクション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、エレクロトポレーション法、形質導入法、スクレープローディング法、ショットガン法など）または感染により行うことができる。

[0051] 形質転換体を培地で培養し、培養物から本発明の抗PD-L1抗体を採取することができる。抗体が培地に分泌される場合には、培地を回収し、その培地から抗体を分離し、精製すればよい。抗体が形質転換された細胞内に産生される場合には、その細胞を溶解し、その溶解物から抗体を分離し、精製すればよい。

[0052] 培地としては、OptiCHO培地、Dynamis培地、CD CHO培地、ActiCHO培地、FortiCHO培地、Ex-Cell CD CHO培地、BalanCD CHO培地、ProCHO 5培地、Cellvento CHO-100培地などを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。

[0053] 培地のｐＨは培養する細胞により異なるが、一般的にはｐＨ６．８～７．６、多くの場合ｐＨ７．０～７．４が適当である。

[0054] 培養する細胞がCHO細胞である場合、CHO細胞の培養は当業者に公知の方法を用いて行うことができる。例えば、通常、気相のCO_2濃度が0－40%、好ましくは、2－10%の雰囲気下、30－39℃、好ましくは37℃程度で、培養することが可能である。

[0055] 適当な培養期間は、通常１日～３か月であり、好ましくは１日～３週間である。

[0056] 抗体の分離及び精製は、公知の方法により行うことができる。公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度の差を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

[0057] 本発明の抗PD-L1抗体は、動物用又はヒト用の抗体医薬として利用することができる。よって、本発明は、上記の抗PD-L1抗体を有効成分として含む、医薬組成物を提供する。

[0058] 本発明の医薬組成物は、がん及び／又は感染症の予防及び／又は治療に用いることができる。がん及び／又は感染症としては、腫瘍性疾患（例えば、悪性黒色腫、肺がん、胃がん、腎臓がん、乳がん、膀胱がん、食道がん、卵巣がん等）、白血病、ヨーネ病、アナプラズマ病、細菌性乳房炎、真菌性乳房炎、マイコプラズマ感染症（例えば、マイコプラズマ性乳房炎、マイコプラズマ性肺炎など）、結核、小型ピロプラズマ病、クリプトスポリジウム症、コクシジウム症、トリパノソーマ病及びリーシュマニア症などを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。

[0059] 本発明の抗PD-L1抗体をPBSなどの緩衝液、生理食塩水、滅菌水などに溶解し、必要に応じてフィルターなどで濾過滅菌した後、注射により被験動物（ヒトも含む）に投与するとよい。また、この溶液には、添加剤（例えば、着

色剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、溶解補助剤、安定化剤、保存剤、酸化防止剤、緩衝剤、等張化剤、pH調節剤など）などを添加してもよい。投与経路としては、静脈、筋肉、腹腔、皮下、皮内投与などが可能であり、また、経鼻、経口投与してもよい。

[0060] 本発明の抗PD-L1抗体の投与量、投与の回数及び頻度は、被験動物の症状、年齢、体重、投与方法、投与形態などにより異なるが、例えば、通常、成獣一匹当たり0.1～100mg/kg体重、好ましくは、1～10mg/kg体重を、少なくとも１回、所望の効果が得られる頻度で投与するとよい。

[0061] 本発明の医薬組成物は、単独で用いてもよいが、外科手術、放射線療法、がんワクチンなど他の免疫療法や分子標的治療薬と組み合わせて用いてもよい。これにより、相乗効果が期待できる。

実施例

[0062] 以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

〔実施例１〕ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体

1.序論

免疫抑制受容体Programmed death 1 (PD-1) とそのリガンドであるProgrammed death ligand 1 (PD-L1)は過剰な免疫応答を抑制し、免疫寛容に深く関連している因子として京都大学、本庶 佑氏らによって同定された分子である。腫瘍における免疫抑制に関与していることも近年明らかにされている。本実施例では、イヌ腫瘍疾患に対する新規治療法の樹立を目的にイヌPD-1およびPD-L1の結合を阻害可能なラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体(4G12)の可変領域遺伝子と、イヌ免疫グロブリン(IgG4)の定常領域遺伝子を組み合わせたキメラ抗体遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣細胞(Chinese hamster ovary cell:CHO細胞)を培養増殖させて得たラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12を作製し、in vitro及びin vivoの効果を確認した。

[0063] 2.材料および方法

2.1ウシPD-L1モノクローナル抗体産生細胞

ウシPD-L1遺伝子配列を同定し(Ikebuchi R, Konnai S, Shirai T, Sunden Y, Murata S, Onuma M, Ohashi K.Vet Res. 2011 Sep 26;42:103.)、その遺伝子情報より組換えウシPD-L1を作製した。同組換えタンパク質をラットに免疫しラット抗ウシPD-L1抗体を得た(Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K.Immunology. 2014 Aug;142(4):551-61.この論文に後にイヌキメラ抗体の可変領域となるクローン4G12が掲載されている)。

[0064] 2.2完全長イヌPD-1およびPD-L1遺伝子の同定

イヌPD-1およびPD-L1 cDNA全長を決定するために、まずThe National Center for Biotechnology Information (NCBI) に既に登録されているイヌのPD-1およびPD-L1の予想塩基配列 (GenBank accession number; XM_543338およびXM_541302) から遺伝子のオープンリーディングフレーム (ORF) 内部を増幅するようにプライマー (cPD-1 inner FおよびR、cPD-L1 inner FおよびR) を設計しPCR法を行った。得られた増幅産物について、常法に従いキャピラリーシーケンサーにより塩基配列を決定した。さらに完全長PD-1およびPD-L1 cDNAの塩基配列を決定するために、上記で決定したイヌPD-1およびPD-L1 cDNA配列を基にプライマー (cPD-1 5´GSPおよび3´GSP、cPD-L1 5´GSPおよび3´GSP) を設計し、それぞれ5´ RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends および3´ RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen社) を用いて5´および3´RACE法を行った。5´および3´RACE法により得られた目的とする遺伝子断片は上記の方法にしたがって塩基配列を決定した (Maekawa N, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Adachi M, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. PLoS One. 2014 Jun 10;9(6):e98415.) 。

プライマー (cPD-1 inner F) : AGGATGGCTCCTAGACTCCC (配列番号２１)

プライマー (cPD-1 inner R) : AGACGATGGTGGCATACTCG (配列番号２２)

プライマー (cPD-L1 inner F) : ATGAGAATGTTTAGTGTCTT (配列番号２３)

プライマー (cPD-L1 inner R) : TTATGTCTCTTCAAATTGTATATC (配列番号２４

）

プライマー（cPD-1 5´GSP）：GTTGATCTGTGTGTTG（配列番号２５）

プライマー（cPD-1 3´GSP）：CGGGACTTCCACATGAGCAT（配列番号２６）

プライマー（cPD-L1 5´GSP）：TTTTAGACAGAAAGTGA（配列番号２７）

プライマー（cPD-L1 3´GSP）：GACCAGCTCTTCTTGGGGAA（配列番号２８）

[0065] 2.3　イヌPD-1およびPD-L1発現COS-7細胞の構築

イヌPD-1-EGFPおよびPD-L1-EGFP発現プラスミドを作製するため、合成したビーグルPBMC由来cDNAを鋳型に、5´末端側に制限酵素XhoIおよびBamHI（PD-1)、BglIIおよびEcoRI（PD-L1）認識部位を付加して設計したプライマー（cPD-1-EGFP FおよびR、cPD-L1-EGFP FおよびR）を用いてPCRを行った。得られたPCR産物をXhoI（Takara社）およびBamHI（Takara社）（PD-1）、BglII（New England Biolabs社）およびEcoRI（Takara社）（PD-L1）により処理した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics社）を用いて精製し、同様の制限酵素処理を行ったpEGFP-N2 vector（Clontech社）を用いてクローニングを行った。得られた目的の発現プラスミドはQIAGEN Plasmid Midi kit（Qiagen社）を用いて抽出し、実験に供するまで-30℃で保存した。以降、作製した発現プラスミドをpEGFP-N2-cPD-1あるいはpEGFP-N2-cPD-L1と表記した。

プライマー（cPD-1-EGFP F）：CCGCTCGAGATGGGGAGCCGGCGGGGGCC（配列番号２９）

プライマー（cPD-1-EGFP R）：CGCGGATCCTGAGGGGCCACAGGCCGGGTC（配列番号３０）

プライマー（cPD-L1-EGFP F）：GAAGATCTATGAGAATGTTTAGTGTC（配列番号３１）

プライマー（cPD-L1-EGFP R）：GGAATTCTGTCTCTTCAAATTGTATATC（配列番号３２）

[0066] 5×10^4/cm2のCOS-7細胞を6穴プレートに継代し、10% 非働化牛胎仔血清、0.01% L-グルタミンを含むRPMI 1640培地にて37° C、5% CO2存在下で一晩培養

した。pEGFP-N2-cPD-1、pEGFP-N2-cPD-L1、あるいは陰性対照としてpEGFP-N2 0.4 μg/cm2をLipofectamine 2000 試薬（Invitrogen社）を用いて、COS-7細胞にそれぞれ導入し48時間培養した（cPD-1-EGFP発現細胞およびcPD-L1-EGFP発現細胞)。作製した発現細胞におけるイヌPD-1およびPD-L1の発現を確かめるために、倒立型共焦点レーザー顕微鏡 LSM700（ZEISS社）により、Enhanced green fluorescent protein（EGFP）の細胞内局在を可視化した(Maekawa N, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Adachi M, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. PLoS One. 2014 Jun 10;9(6):e98415.)。

[0067] 2.4 組換えイヌPD-1、PD-L1およびCD80の構築

イヌPD-1、PD-L1およびCD80の予想アミノ酸配列より推定された細胞外領域を増幅するように5´末端側にNheIあるいはEcoRV（PD-1およびPD-L1）の認識配列を付加したプライマー（cPD-1-Ig FおよびR、cPD-L1-Ig FおよびR）、または5´末端側にEcoRVあるいはKpnI（CD80）の認識配列を付加したプライマー（cCD80-Ig FおよびR）を設計した。合成したビーグルPBMC由来cDNAを鋳型にPCRを行い、PCR産物をNheI（Takara社）およびEcoRV（Takara社)、またはEcoRV（Takara社)およびKpnI（New England Biolabs社)によって処理した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics社）を用いて精製し、同様の制限酵素処理を行ったpCXN2.1-Rabbit IgG Fc vector（Niwa et al., 1991; Zettlmeissl et al.,1990; 順天堂大学大学院医学研究科教授　横溝岳彦　先生より分与されたものを当研究室で改変）を用いて、クローニングを行った。発現プラスミドはQIAGEN Plasmid Midi kit（Qiagen社）によって精製し、実験に供するまで-30°Cにて保存した。以降、作製した発現プラスミドをそれぞれpCXN2.1-cPD-1-Ig、pCXN2.1-cPD-L1-IgあるいはpCXN2.1-cCD80-Igと表記した。

プライマー（cPD-1-Ig F）：CGCGGCTAGCATGGGGAGCCGGCGGGGGCC（配列番号３３）

プライマー（cPD-1-Ig R）：CGCGGATATCCAGCCCCTGCAACTGGCCGC（配列番号３

４）

プライマー（cPD-L1-Ig F）：CGCGGCTAGCATGAGAATGTTTAGTGTCTT（配列番号３５）

プライマー（cPD-L1-Ig R）：CGCGGATATCAGTCCTCTCACTTGCTGGAA（配列番号３６）

プライマー（cCD80-Ig F）：CGCGGATATCATGGATTACACAGCGAAGTG（配列番号１１２９）

プライマー（cCD80-Ig R）：CGGGGTACCCCAGAGCTGTTGCTGGTTAT（配列番号１３０）

[0068] これらの発現ベクターをExpi293F細胞（Life Technologies社）へトランスフェクションし、組み換えIg融合タンパク質を含む培養上清を得た。産生した組み換えタンパク質は上清よりAb Capcher Extra（プロテインA変異体、ProteNova社）を用いて精製を行い、PD-MidiTrap G-25（GE Healthcare社）を用いてバッファーをリン酸緩衝生理食塩水（PBS; pH 7.4）に置換し、実験に供するまで-30°Cにて保存した（cPD-1-I、cPD-L1-IgおよびcCD80-Ig)。タンパク質の濃度はPierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific社)により定量し、以後の実験に用いた。

[0069] 2.5 イヌPD-L1に交差反応を示すラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体の同定

イヌPD-L1に交差反応を示すラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体を同定するため、2.1で作製した抗ウシPD-L1抗体を用いてフローサイトメトリーを行った。2×10^{5}-1×10^{6}個の細胞に対し、10 μg/mlの抗ウシPD-L1抗体を室温で30分間反応させ、洗浄した後にAllophycocyanine標識抗ラットIgヤギ抗体(Beckman Coulter社）を用いて抗ウシPD-L1抗体の検出を行った。解析にはFACS Verse（Becton, Dickinson and Company社）を用いた。陰性対照抗体として、ラットIgG2a（κ）アイソタイプコントロール（BD Biosciences社）、ラットIgG1（κ）アイソタイプコントロール（BD Biosciences社）、ラットIgM（κ）アイソタイプコントロール（BD Biosciences社）を使用した。なお、

すべての洗浄操作および抗体の希釈には、10% 非働化ヤギ血清加PBSを使用した(Maekawa N, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Adachi M, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. PLoS One. 2014 Jun 10;9(6):e98415. ウシPD-L1モノクローナル抗体3種：4G12; Rat IgG2a（κ）、5A2; Rat IgG1（κ）、および6G7; Rat IgM（κ)を使用した論文)。

[0070] 2.6 ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体樹立のための可変部位の選定試験

以下、イヌPD-L1に交差反応を示したラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体10クローンのうち4G12; Rat IgG2a（κ）、5A2; Rat IgG1（κ）、および6G7; Rat IgM（κ)を選抜し、これらの抗体がイヌPD-1/PD-L1結合を阻害するか検討した。すなわち、イヌPD-1-Ig(2.4で作製)を平底96穴プレート上に固層化し、1% BSAおよび0.05% Tween20を含むPBSにてブロッキング操作を行った。Lightning-Link Biotin Conjugation Kit (Innova Biosciences社) を用いてビオチン化したイヌPD-L1-Ig(2.4で作製)を、各濃度（0、2.5、5、10 μg/ml）のラット抗ウシPD-L1抗体4G12、5A2および 6G7と37° Cで30分間反応させた後、プレートに添加し、cPD-L1-IgのcPD-1-Igに対する結合をNeutravidin-HRP (Thermo Fisher Scientific社) および TMB one component substrate (Bethyl Laboratories社)を用いた発色反応により定量した。ラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体4G12および6G7は良好なイヌPD-1/PD-L1結合阻害活性を示したが、5A2は結合阻害活性を持たなかった。（図１）

[0071] 2.7 ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体発現ベクターの作製(図２）

以下、2.6の選定試験によってイヌPD-1/PD-L1結合に対し良好な阻害活性を示した(図１)ラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体：4G12および6G7をラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体の可変部とし、2種類のラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体を樹立した。

ラット抗ウシPD-L1抗体4G12および6G7を産生するハイブリドーマより可変領域(重鎖および軽鎖)遺伝子を同定した。さらに、当該ラット抗体重鎖および軽鎖可変領域配列を既知のイヌ抗体の重鎖IgG4の定常領域および軽鎖ラムダ鎖の定常領域と結合させた遺伝子配列を作成し、コドン最適化を行ったの

ち（配列番号９及び１０（アミノ酸配列）、配列番号１９及び２０（コドン最適化後ヌクレオチド配列））、NotI制限酵素認識配列、KOZAK配列、キメラ抗体軽鎖配列、ポリA付加シグナル配列（PABGH）、プロモーター配列（PCMV）、SacI制限酵素認識配列、イントロン配列（INRBG）、KOZAK配列、キメラ抗体重鎖配列、XbaI制限酵素認識配列を上記の順で配置するように遺伝子合成を行った。合成した遺伝子鎖を、発現用ベクターpDC6（北海道大学　人獣共通感染症リサーチセンター　鈴木　定彦　教授より分与）のクローニングサイト（PCMV下流、INRBGとPABGHの間にあるNotIおよびXbaI制限酵素認識配列）へ制限酵素認識配列を利用して上記の順で配置するように組み込み（図２）、ラット-イヌキメラ抗PD-L1抗体発現ベクターを構築した。この発現ベクターをExpi293F細胞（Life Technologies社）へトランスフェクションし、キメラ抗体を含む培養上清を得た。上清よりAb Capcher Extra（プロテインA変異体、ProteNova社）を用いて精製を行い、さらにゲル濾過クロマトグラフィーにより精製を行った。10%アクリルアミドゲルを用いて非還元条件下にてSDS-PAGEを行い、Quick-CBB kit（和光純薬工業社）により染色を行った後、蒸留水中で脱色を行った。プロテインA精製のみでは夾雑タンパク質が認められたが、ゲル濾過クロマトグラフィー精製をすることで純度の高い精製抗体を得た（図３）。得られた精製抗体はフローサイトメトリーを用いてイヌPD-L1発現細胞に特異的に結合することを確認した（データは示さず）。該キメラ抗体２種のイヌPD-1/PD-L1結合阻害活性を2.6に示した方法により検討した結果、ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12は元となったラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体4G12と同様の結合阻害活性を示したが、ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c6G7では結合阻害能が明らかに減弱した(図４)。よって治療用抗体としてラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体4G12の可変領域配列（配列番号２及び１（アミノ酸配列）、配列番号１６及び１５（コドン最適化後ヌクレオチド配列））を組込んだラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12を選定した。c4G12のL鎖のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列（コドン最適化後）を配列番号９及び１９に、H鎖のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列（コド

ン最適化後）を配列番号１０及び２０に示す。

[0072] 2.8 ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12の発現

2.7で使用したラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12発現pDC6ベクターをジヒドロ葉酸還元酵素欠損細胞であるCHO-DG44細胞（CHO-DG44(dfhr-/-)）へトランスフェクションし、高発現クローンをドットブロット法により選抜した。さらに60 nMのメトトレキサート（Mtx）を含む培地で負荷をかけることにより遺伝子増幅処理を行った。遺伝子増幅終了後のラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12安定発現細胞（クローン名：4.3F1）を、Mtxを含まないOpti-CHO培地へ移し、14日間の振盪培養を行った（125 rpm, 37℃, 5% CO2）。トリパンブルー染色により細胞生存率を算出した（図５）。ELISA法により培養上清中のキメラ抗体産生量を定量した（図５）。14日目の培養上清を10,000 gで10分間遠心し、細胞を除いた後、0.22 μmのフィルターを通し、抗体の精製ステップに進んだ。

なお、培地をDynamis培地に替え、適切なFeedを行うことで、抗体産生量が従来のおよそ2倍に向上した（データは示さず）。

[0073] 2.9. ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12の精製

上記の方法により準備した培養上清は、Ab Capcher Extra (ProteNova社)を用いて精製した。レジンへの結合はオープンカラム法を用い、平衡化バッファーおよび洗浄バッファーとしてPBS pH7.4を使用した。溶出バッファーにはIgG Elution Buffer (Thermo Scientific社）を、中和バッファーには1M Trisを使用した。精製した抗体はAmicon Ultra-15 (50 kDa、Millipore社)を用いて限外濾過法により濃縮と、PBSへのバッファー置換を行った。0.22 μmのフィルターを通し、各実験に使用した。

[0074] 2.10. ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12の精製の確認(図６)

精製した抗体の純度を確かめるため、SDS-PAGEおよびCBB染色により抗体タンパク質の検出を行った。SuperSep Ace 5-20% (Wako社）グラジエントゲルを用い、ラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体4G12およびラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12を還元条件下および非還元条件下にて電気泳動した。Qui

ck-CBB kit（和光純薬工業社）により染色を行った後、蒸留水中で脱色を行った。抗体に相当する分子量の位置にバンドが見られ、夾雑タンパク質のバンドは視認されなかった。

[0075] 2.11. ラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体4G12およびラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12のcPD-L1-Hisに対する結合親和性の測定

イヌPD-L1の予想アミノ酸配列より推定された細胞外領域を増幅するように5´末端側にNheI認識配列を付加したプライマー（cPD-L1-His F）と、5´末端側にEcoRV認識配列および6xHisタグ配列を付加したプライマー（cPD-L1-His R）を設計した。合成したビーグルPBMC由来cDNAを鋳型にPCRを行い、PCR産物をNheI（Takara社）およびEcoRV（Takara社)によって処理した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics社）を用いて精製し、同様の制限酵素処理を行ったpCXN2.1 vector（Niwa et al., 1991; 順天堂大学大学院医学研究科教授　横溝　岳彦　先生より分与）を用いて、クローニングを行った。発現プラスミドはQIAGEN Plasmid Midi kit（Qiagen社）によって精製し、実験に供するまで-30°Cにて保存した。以降、作製した発現プラスミドをpCXN2.1-cPD-L1-Hisと表記した。

プライマー（cPD-L1-His F）：CGCGGCTAGCATGAGAATGTTTAGTGTCTT（配列番号１３１）

プライマー（cPD-L1-His R）：CGCGGATATCTTAATGGTGATGGTGATGGTGAGTCCTCTCACTTGCTGG（配列番号１３２）

[0076] 発現ベクターをExpi293F細胞（Life Technologies社）へトランスフェクションし、組み換えタンパク質を含む培養上清を得た。産生した組み換えタンパク質は上清よりTALON Metal Affinity Resin（Clontech社）を用いて精製を行い、Amicon Ultra-4 Ultracel-3（Merck Millipore社)を用いてバッファーをPBSに置換し、実験に供するまで4°Cにて保存した（cPD-L1-His)。タンパク質の濃度はPierce BCA Protein Assay Kit（Thermo Fisher Scientific社)により定量し、以後の実験に用いた。

生体分子相互作用測定器(Biacore X100)を用いて、ラット抗ウシPD-L1モノ

クローナル抗体4G12およびラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12のcPD-L1-Hisに対する結合親和性（Avidity）を評価した。すなわち、抗ヒスチジン抗体をCM5センサーチップに固定し、cPD-L1-Hisをキャプチャした後に、モノクローナル抗体をアナライトとして添加することで特異的結合を観察した。両抗体とも特異的結合を示し、Avidityはほぼ同等であった（表１）。また、同様にcPD-L1-Hisに対するイヌPD-1-IgおよびCD80-IgのAvidityを測定したところ、ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12と比べ明らかに結合親和性が低かった（表１）。

[0077] 表１．各抗体および組み換えタンパク質のイヌPD-L1-Hisに対する結合親和性

	ka ($\times 10^6$/Ms)	kd ($\times 10^{-3}$/s)	KD (nM)
4G12	2.42±0.10	4.54±0.19	1.88±0.06
c4G12	3.14±0.19	7.19±0.26	2.30±0.07
cPD-1			25.4±4.89
cCD80			24.3±0.89

[0078] 2.12. ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12のイヌPD-1/PD-L1結合およびCD80/PD-L1結合阻害活性(図７)

イヌPD-1-Ig、PD-L1-IgおよびCD80-Ig（前述）を用いて、抗PD-L1抗体によるイヌPD-1/PD-L1結合およびCD80/PD-L1結合阻害試験を行った。イヌPD-1-IgあるいはCD80-Igを平底96穴プレート上に固層化し、2.6で行った手順に従い各濃度（0、2.5、5、10 μg/ml）のラット抗ウシPD-L1抗体4G12あるいはラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12と反応させたイヌPD-L1-Igの結合量を評価した。キメラ抗体化による結合阻害活性の変化は認められなかった。

[0079] 2.13. ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12のイヌ免疫担当細胞活性化効果（図８）

イヌPBMCをスーパー抗原であるStaphylococcal Enterotoxin B（SEB）刺激化で3日間培養し、ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12の添加によるサイトカイン産生量の変化をDuoset ELISA canine IL-2 or IFN-γ（R&D systems社)を用いて ELISA法により定量した。ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12は

イヌPBMCからのIL-2およびIFN-γ産生量を増大させた。また同様に、SEB刺激2日目の培養液中に核酸アナログであるEdUを添加し2時間培養後、その取り込みをClick-iT Plus EdU flow cytometry assay kit (Life Technologies社)を用いてフローサイトメトリーにより定量したところ、イヌCD4+またはCD8+リンパ球におけるEdU取り込みがラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12添加により亢進し、細胞増殖能の上昇が認められた。

[0080] 2.14. イヌへの接種試験に用いる腫瘍罹患犬の選抜

本治療法は腫瘍にPD-L1が発現している場合により効果が見込まれるため、免疫組織化学染色法によりイヌ腫瘍部におけるPD-L1発現解析を行った。ホルムアルデヒド固定し、パラフィン包埋した腫瘍組織をミクロトームで4 μm厚に薄切し、シランコーティングスライドグラス（松浪硝子工業社）に貼付・乾燥させた後、キシレン・アルコールで脱パラフィン処理を行った。クエン酸バッファー｛クエン酸（和光純薬工業社）0.37 g、クエン酸3ナトリウム2水和物（キシダ化学社）2.4 g、蒸留水1000 ml｝に浸漬しながらマイクロウェーブにて10分間抗原賦活化処理を行い、ニチレイ自動免疫染色装置により染色を行った。前処理として、0.3% 過酸化水素を含むメタノール溶液に室温で15分間浸漬した後、PBSで洗浄し、抗ウシPD-L1モノクローナル抗体を添加して室温で30分反応させた。PBSで洗浄後、ヒストファインシンプルステインMAX-PO (Rat)（ニチレイバイオサイエンス社）を添加し室温で30分間反応させた後，3，3´-diaminobenzidine tetrahydrocholrideで発色し，光学顕微鏡を用いて観察した。腫瘍細胞がPD-L1陽性であった口腔内メラノーマおよび未分化肉腫罹患犬を以下の接種試験（臨床試験）に用いた。抗ウシPD-L1モノクローナル抗体は、ラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology. 2014 Aug;142(4):551-61.)より樹立した。

[0081] 2.15. イヌへの接種試験

臨床試験においてイヌに接種するラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12に

ついては、夾雑物や重合体タンパク質を除去する目的で、2.8で示した手順により得た培養上清からMabSelect SuRe LX（GE Healthcare社）を用いたアフィニティークロマトグラフィー精製を行った後、BioScale CHT20-I prepacked column（Bio-Rad社)を用いてハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー精製を行った。アグリゲイトを含むフラクションはさらにHiScreen Q-Sepharose HP prepacked column（GE Healthcare社)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー精製を行った。

(1)安全性試験：イヌ(ビーグル、避妊雌、13歳、体重 およそ10 kg)に樹立したラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12 2 mg/kgを2週間間隔で全3回点滴静注した。アナフィラキシー他、臨床上問題となるような副作用は観察されなかった。

(2)臨床試験1：PD-L1陽性である口腔内メラノーマ（図９A）再発犬（ミニチュアダックスフンド、雄、11歳、体重 およそ7.5 kg）に樹立したラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12　2 mg/kgあるいは5 mg/kgを2週間間隔で22回点滴静注した。治療開始10週時点で顕著な腫瘍の縮小が認められ、治療開始34週時点ではさらなる縮小が確認された（図１０）。44週間の観察期間中、リンパ節や肺への転移も認められなかった。ベースライン時と比較して、30%以上の腫瘍長径の減少をPR（部分奏功）と定義すると、16-20週時点および34週以降でPRの基準を満たしていた（図１１）。

(3)臨床試験2：原発巣がPD-L1陽性であり（図９B）、全身の筋肉内に複数の転移巣のある未分化肉腫罹患犬（ウエストハイランドホワイトテリア、去勢雄、12歳、体重およそ8 kg）にラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12　5 mg/kgを2週間間隔で2回点滴静注した。治療開始3週時点で明らかな腫瘍の退縮が認められた（図１２）。

(4)臨床試験3：原発巣を外科手術で摘出した口腔内メラノーマ罹患犬（ビーグル、避妊メス、11歳、体重およそ10 kg）に対し、ラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12　2 mg/kgあるいは5 mg/kgを2週間間隔で9回点滴静注した。治療開始18週時点で複数の肺転移巣が消失した（図１３）。

(5)臨床試験4：肺転移のある口腔内メラノーマ罹患犬4頭にラット－イヌキメラ抗PD-L1抗体c4G12　2 mg/kgあるいは5 mg/kgを2週間間隔で点滴静注した。観察期間中に明らかな腫瘍の縮小は見られなかったが、肺転移が確認されてからの生存期間は対照群（抗体非投与、ヒストリカルコントロール群：n = 15）と比べ長い傾向にあったため（図１４）、抗体投与により生存期間が延長された可能性がある。

[0082] 2.16. 抗PD-L1抗体のCDR解析

NCBI IGBLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) を用いて、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12の相補性決定領域（CDR）を決定した。結果を図１５に示す。

[0083] 〔実施例２〕抗PD-L1抗体の他の動物種への応用

1.1. ヒツジ、ブタおよびスイギュウPD-L1遺伝子の同定

ヒツジ、ブタおよびスイギュウPD-L1 cDNA コーディング領域（CDS）全長を決定するために、まずヒツジ、ブタおよびウシPD-L1遺伝子の塩基配列（GenBank accession number; XM_004004362、NM_001025221およびXM_613366）から遺伝子のCDS全長を増幅するプライマー（ovPD-L1 CDS FおよびR、poPD-L1 CDS FおよびR、buPD-L1 CDS F1, R1, F2およびR2）を設計しPCR法を行った。得られた増幅産物について、常法に従いキャピラリーシーケンサーにより塩基配列を決定した（Mingala CN, Konnai S, Ikebuchi R, Ohashi K. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2011 Jan;34(1):55-63.　スイギュウPD-L1遺伝子を同定した論文）。

プライマー（ovPD-L1 CDS F）：ATGAGGATATATAGTGTCTTAACAT（配列番号１０９）

プライマー（ovPD-L1 CDS R）：TTACGTCTCCTCAAAATGTG（配列番号１１０）

プライマー（poPD-L1 CDS F）：ATGAGGATATGTAGTATCTTTACAT（配列番号１１１）

プライマー（poPD-L1 CDS R）：TTACGTCTCCTCAAATTGTGT（配列番号１１２）

プライマー（buPD-L1 CDS F1）：ATGAGGATATATAGTGTCTT（配列番号１１３）

プライマー（buPD-L1 CDS R1）：GCCACTCAGGACTTGGTGAT（配列番号１１４）

プライマー（buPD-L1 CDS F2）：GGGGGTTTACTGTTGCTTGA（配列番号１１５）

プライマー（buPD-L1 CDS R2）：TTACGTCTCCTCAAATTGT（配列番号１１６）

[0084] 1.2. ヒツジPD-1、ヒツジPD-L1、ブタPD-1およびブタPD-L1発現COS-7細胞の構築

ヒツジPD-1、ヒツジPD-L1、ブタPD-1およびブタPD-L1発現プラスミドを作製するため、合成したヒツジまたはブタPBMC由来cDNAを鋳型に、5´末端側に制限酵素BglIIおよびSmaI（ヒツジPD-1)、HindIIIおよびSmaI（ブタPD-1)、またはXhoIおよびSmaI（ヒツジおよびブタPD-L1）認識部位を付加して設計したプライマー（ovPD-1-EGFP FおよびR、ovPD-L1-EGFP FおよびR、poPD-1-EGFP FおよびR、またはpoPD-L1-EGFP FおよびR）を用いてPCRを行った。得られたPCR産物をBglII（Takara社）およびSmaI（Takara社）（ヒツジPD-1）、HindIII（Takara社）およびSmaI（Takara社）（ブタPD-1)、XhoI（Takara社）およびSmaI（Takara社）（ヒツジおよびブタPD-L1）により処理した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics社）を用いて精製し、同様の制限酵素処理を行ったpEGFP-N2 vector（Clontech社）に導入し、クローニングを行った。発現プラスミドはFastGene Xpress Plasmid PLUS Kit（NIPPON Genetics社）を用いて抽出し、実験に供するまで-30℃で保存した。以降、作製した発現プラスミドをpEGFP-N2-ovPD-1、pEGFP-N2-ovPD-L1、pEGFP-N2-poPD-1あるいはpEGFP-N2-poPD-L1と表記した。

プライマー（ovPD-1-EGFP F）：GAAGATCTATGGGGACCCCGCGGGCGCCG（配列番号１１７）

プライマー（ovPD-1-EGFP R）：GACCCGGGGAGGGGCCAGGAGCAGTGTCC（配列番号１１８）

プライマー（ovPD-L1-EGFP F）：CCGCTCGAGATGAGGATATATAGTGTCT（配列番号１１９）

プライマー（ovPD-L1-EGFP R）：ATCCCGGGCGTCTCCTCAAAATGTGTAG（配列番号１２０）

プライマー（poPD-1-EGFP F）：ACTAAGCTTATGGGGACCCCGCGGG（配列番号１２１）

プライマー（poPD-1-EGFP R）：ACTCCCGGGGAGGGGCCAAGAGCAGT（配列番号１２２）

プライマー（poPD-L1-EGFP F）：CCGCTCGAGATGAGGATATGTAGTATCTT（配列番号１２３）

プライマー（poPD-L1-EGFP R）：ATCCCGGGCGTCTCCTCAAATTGTGTATC（配列番号１２４）

5×10^4/cm^{2}のCOS-7細胞を6穴プレートに継代し、10% 非働化牛胎仔血清、0.01% L-グルタミンを含むRPMI 1640培地にて37° C、5% CO2存在下で一晩培養した。pEGFP-N2-ovPD-1、pEGFP-N2-ovPD-L1、pEGFP-N2-poPD-1、pEGFP-N2-poPD-L1、あるいは陰性対照としてpEGFP-N2 0.4 μg/cm^{2}をLipofectamine 2000試薬（Invitrogen社）を用いて、COS-7細胞にそれぞれ導入し48時間培養した（ovPD-1-EGFP発現細胞、ovPD-L1-EGFP発現細胞、poPD-1-EGFP発現細胞およびpoPD-L1-EGFP発現細胞）。作製した発現細胞におけるヒツジPD-1、ヒツジPD-L1、ブタPD-1およびブタPD-L1の発現を確かめるために、倒立型共焦点レーザー顕微鏡 LSM700（ZEISS社）もしくはオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000（KEYENCE社）により、EGFPの細胞内局在を可視化した。

[0085] 1.3. 組換えヒツジPD-L1およびブタPD-L1の構築

ヒツジPD-L1またはブタPD-L1の予想アミノ酸配列より推定された細胞外領域を増幅するように5´末端側にNheIあるいはEcoRVの認識配列を付加したプライマー（ovPD-L1-Ig FおよびR、またはpoPD-L1-Ig FおよびR）を設計した。合成したヒツジまたはブタPBMC由来cDNAを鋳型にPCRを行い、そのPCR産物をNheI（Takara社）およびEcoRV（Takara社）によって処理した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics社）を用いて精製し、同様の制限酵素処理を行ったpCXN2.1-Rabbit IgG Fc vector（Niwa et al., 1991; Zettlmeissl et al.,1990 ; 順天堂大学大学院医学研究科教授　横溝　岳彦　先生より分与されたものを当研究室で改変）に導入し、クローニングを行った。

発現プラスミドはFastGene Xpress Plasmid PLUS Kit (NIPPON Genetics社) によって精製し、実験に供するまで-30°Cにて保存した。以降、作製した発現プラスミドをpCXN2.1-ovPD-L1-IgあるいはpCXN2.1-poPD-L1-Igと表記した。

プライマー (ovPD-L1-Ig F) : GACGCTAGCATGAGGATATATAGTGTCT (配列番号１２５)

プライマー (ovPD-L1-Ig R) : GCTCTGATATCCCTCGTTTTTGCTGGAT (配列番号１２６)

プライマー (poPD-L1-Ig F) : GACGCTAGCATGAGGATATGTAGTATCTT (配列番号１２７)

プライマー (poPD-L1-Ig R) : AGCTTGATATCCCTCTTTCTTGCTGGATC (配列番号１２８)

7.5×10^7個のExpi293F細胞 (Life technologies社) に30 μgのpCXN2.1-ovPD-L1-Ig、またはpCXN2.1-poPD-L1-IgをExpifectamin (Life technologies社) を用いて導入し、6日間振盪培養を行って培養上清を回収した。Fc融合組換えタンパク質を含む培養上清は、Ab-Capcher Extra (ProteNova社) を用いてFc融合組換えタンパク質を精製した。精製後、PD-10 Desalting Column (GE Healthcare社) によりバッファーをPBS (pH 7.4) に置換し、実験に供するまで-30°Cにて保存した (ovine PD-L1-Ig) 。精製後ovine PD-L1-Igおよびporcine PD-L1-Igの濃度はRabbit IgG ELISA Quantitation Set (BETHYL社) を用いて測定した。ELISAの各洗浄操作にはAuto Palte Washer BIO WASHER 50 (DS Pharma Biomedical社) を使用し、吸光度の測定にはMicroplate Reader MTP-650FA (コロナ電気社) を使用した。

[0086] 1.4. ヒツジ、ブタPD-L1に対するラット抗ウシPD-L1抗体4G12の反応性

ヒツジおよびブタPD-L1にラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体が交差反応することをフローサイトメトリー法により確認した。ヒツジ、ブタPD-L1-EGFP発現COS-7細胞を10% 非働化ヤギ血清加PBSを用いて室温で15分間ブロッキングし、10 μg/mlのラット抗ウシPD-L1抗体4G12を室温で30分間反応させ、

洗浄した後にAllophycocyanine標識抗ラットIgヤギ抗体（Beckman Coulter社）を室温で30分間反応させた。解析にはFACS Verse（BD Biosciences社）を用いた。陰性対照抗体として、ラットIgG2a（κ）アイソタイプコントロール（BD Biosciences社）を使用した。なお、すべての洗浄操作および抗体の希釈には、1% ウシ血清アルブミン加PBSを使用した。

実験結果を図１６で示す。ラット抗ウシPD-L1抗体4G12は、ヒツジ、ブタのPD-L1に結合することが確認された。

[0087] 1.5. スイギュウの白血球に対するラット抗ウシPD-L1抗体4G12の反応性

スイギュウ（Bubalus bubalis; アジアスイギュウ）の末梢血をACKバッファーで溶血し、白血球を分離した。10%非働化ヤギ血清加PBSを用いて室温で15分間ブロッキングし、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12・Peridinin-chlorophyll-protein complex/cyanin 5.5標識抗ウシCD14抗体（mouse IgG1, CAM36A, VMRD社）・抗ウシCD11b抗体（mouse IgG2b, CC126, AbD Serotec社）を室温で30分間反応させた。洗浄後、Allophycocyanine標識抗ラットIgヤギ抗体（Beckman Coulter社）・Fluorescein isothiocyanate標識抗マウスIgG2bヤギ抗体（Beckman Coulter社）を室温で30分間反応させた。解析にはFACS Calibur（BD Biosciences社）を用いた。陰性対照抗体として、ラットIgG2a（κ）アイソタイプコントロール（BD Biosciences社）を使用した。なお、すべての洗浄操作および抗体の希釈には、10%非働化ヤギ血清加PBSを使用した。

実験結果を図１７で示す。ラット抗ウシPD-L1抗体4G12は、スイギュウの血中マクロファージ（CD14+CD11b+細胞）に強く結合した。また、スイギュウのリンパ球（CD14-CD11b-細胞）に対して、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12は弱く結合した。この結合性の違いは、マクロファージとリンパ球におけるPD-L1の発現量を反映していると思われる。

[0088] 1.6. ラット抗ウシPD-L1抗体4G12によるヒツジまたはブタPD-1/PD-L1の結合阻害試験

ヒツジPD-1-EGFP発現COS-7細胞およびヒツジPD-L1-Ig組換えタンパク質、またはブタPD-1-EGFP発現COS-7細胞およびブタPD-L1-Ig組換えタンパク質を

用いて、ラット抗ウシPD-L1抗体（4G12）によるヒツジまたはブタのPD-1/PD-L1結合阻害試験を行った。各濃度（0, 1, 5, 10, 20, 50 μg/ml）のラット抗ウシPD-L1抗体4G12をあらかじめヒツジPD-L1-Ig（終濃度1 μg/ml）またはブタPD-L1-Ig（終濃度5 μg/ml）と37℃で30分間反応させ、その後2×10^5 個のヒツジPD-1-EGFP発現COS-7細胞、またはブタPD-1-EGFP発現COS-7細胞へそれぞれ37℃で30分間反応させた。洗浄後、Alexa Fluor 647標識抗ウサギIgG(H+L)ヤギF(ab')2 （Life Technologies社）により細胞表面に結合したヒツジPD-L1-IgまたはブタPD-L1-Igを検出した。解析にはFACS Verse（BD Biosciences社）を用いた。陰性対照抗体として、ラットIgG2a（κ）アイソタイプコントロール（BD Biosciences社）を使用した。抗体非添加時のPD-L1-Ig結合細胞の割合を100%とし、各濃度におけるPD-L1-Ig結合細胞の割合を相対値として表した。

その結果、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12は、ヒツジPD-1/PD-L1およびブタPD-1/PD-L1の結合を濃度依存的に阻害できることが示された（図１８）。

[0089] 〔実施例３〕

１．序論

免疫抑制受容体Programmed death 1 (PD-1) とそのリガンドであるProgrammed death ligand 1 (PD-L1)は過剰な免疫応答を抑制し、免疫寛容に深く関連している因子として京都大学、本庶 佑氏らによって同定された分子である。腫瘍における免疫抑制に関与していることも近年明らかにされている。本実施例では、ウシの感染症に対する新規治療法の樹立を目的にウシPD-1およびPD-L1の結合を阻害可能なラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体(4G12)の可変領域遺伝子と、ウシ免疫グロブリン(IgG1、ただし、 ADCC活性を抑制するために、CH2ドメインのFcγ受容体予想結合部位に変異を加えた。図１９参照。アミノ酸番号及び変異: 250 E→P, 251 L→V, 252 P→A, 253 G→deletion, 347 A→S, 348 P→S; Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology 2014 Aug; 142(4):551-561.)の定常領域遺伝子を組み合わせたキメラ抗体遺伝子を導入したチ

ャイニーズハムスター卵巣細胞(Chinese hamster ovary cell:CHO細胞)を培養増殖させて得たラットーウシキメラ抗ウシPD-L1抗体ch4G12を作製し、in vitro及びin vivoの効果を確認した。

[0090] ２．材料および方法

ウシPD-1およびPD-L1発現細胞の構築

ウシPD-1遺伝子 (GenBank accession number AB510901; Ikebuchi R, Konnai S, Sunden Y, Onuma M, Ohashi K. Microbiol. Immunol. 2010 May; 54(5):291-298.)、ウシPD-L1遺伝子 (GenBank accession number AB510902; Ikebuchi R, Konnai S, Shirai T, Sunden Y, Murata S, Onuma M, Ohashi K. Vet. Res. 2011 Sep. 26; 42:103.) についてcDNA全長の塩基配列を決定し、その遺伝子情報よりウシPD-1またはPD-L1膜発現細胞を作製した。まず、ウシPD-1またはPD-L1発現プラスミドを作製するため、合成したウシPBMC 由来cDNA を鋳型として、5´末端側に制限酵素NotIおよびHindIII (ウシPD-1)、NheIおよびXhoI (ウシPD-L1) 認識部位を付加したプライマー (boPD-1-myc FおよびR、boPD-L1-EGFP FおよびR) を用いてPCR を行った。得られたPCR 産物をNotI (Takara社) およびHindIII (Takara社; ウシPD-1)、NheI (Takara社) およびXhoI (Takara社; ウシPD-L1) により処理した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics 社) を用いて精製し、同様の制限酵素処理を行ったpCMV-Tag1 vector (Agilent Technologies社; ウシPD-1) またはpEGFP-N2 vector (Clontech社; ウシPD-L1) へ導入し、クローニングを行った。得られた目的の発現プラスミドはQIAGEN Plasmid Midi kit (Qiagen 社) 用いて抽出し、実験に供するまで-30℃で保存した。以降、作製した発現プラスミドをpCMV-Tag1-boPD-1またはと表記する。

プライマー (boPD-1-myc F) : ATATGCGGCCGCATGGGGACCCCGCGGGCGCT (配列番号１３３)

プライマー (boPD-1-myc R) : GCGCAAGCTTTCAGAGGGGCCAGGAGCAGT (配列番号１３４)

プライマー (boPD-L1-EGFP F) : CTAGCTAGCACCATGAGGATATATAGTGTCTTAAC (配

列番号１３５）

プライマー（boPD-L1-EGFP R）：CAATCTCGAGTTACAGACAGAAGATGACTGC（配列番号１３６）

[0091] 以下の手順に従い、ウシPD-1膜発現細胞を作製した。まず、4×10^6 個のCHO-DG44 細胞に2.5 μg のpCMV-Tag1-boPD-1をLipofectamine LTX（Invitrogen社）を用いて導入した。48 時間後、G418（Enzo Life Science社）800 μg/ml、GlutaMAX supplement（Life technologies 社） 20 ml/l、10% Pluronic F-68（Life technologies 社）18 ml/l を含むCD DG44 培地（Life technologies 社）へ培地交換し、セレクションを行った。得られた発現細胞をラット抗ウシPD-1抗体5D2 と室温で反応させ、洗浄後、抗ラットIgGマイクロビーズ標識抗体（Miltenyi Biotec社）と室温でさらに反応させた。Auto MACS（Miltenyi Biotec社）を用いてウシPD-1を高発現する細胞を分離し、さらに純度を高めるため同様の手順で再分離を行った。作製した発現細胞について限界希釈法によりクローニングを行い、ウシPD-1高発現CHO DG44細胞を得た（ウシPD-1発現細胞）。

[0092] 以下の手順に従い、ウシPD-L1膜発現細胞を作製した。まず、4×10^6 個のCHO-DG44 細胞に2.5 μg のpEGFP-N2-boPD-L1あるいは陰性対照としてpEGFP-N2をLipofectamine LTX（Invitrogen社）を用いて導入した。48 時間後、G418（Enzo Life Science社）800 μg/ml、GlutaMAX supplement（Life technologies 社）20 ml/l、10% Pluronic F-68（Life technologies 社）18 ml/l を含むCD DG44 培地（Life technologies 社）へ培地交換し、セレクションを行うと同時に限界希釈法によりクローニングを行った（ウシPD-L1発現細胞）。作製した発現細胞におけるウシPD-L1 の発現を確かめるために、倒立型共焦点レーザー顕微鏡LSM700（ZEISS 社）により、EGFPの細胞内局在を可視化した。

[0093] 可溶性ウシPD-1およびPD-L1の構築

以下の手順に従い、ウシPD-1-Ig発現プラスミドを構築した。ウシPD-1（GenBank accession number AB510901）のシグナルペプチドおよび細胞外領域を

既知のウシIgG1（GenBank accession number X62916）の定常領域Fc部分と結合させた遺伝子配列を作成し、CHO細胞にコドンの最適化を行った後、制限酵素（NotI）認識配列、KOZAK配列、ウシPD-1シグナルペプチド配列、ウシPD-1遺伝子細胞外領域配列、ウシIgG1 Fc領域配列、制限酵素（XbaI）認識配列を上記の順で配置するように遺伝子合成を行った。なお、ウシIgG1はADCC活性を抑制するために、CH2ドメインのFcγ受容体予想結合部位に変異を加えた（変異挿入箇所: 185 E→P, 186 L→V, 187 P→A, 189 G→deletion, 281 A→S, 282 P→S; Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology 2014 Aug; 142(4):551-561. この論文のFigure 2にPD-1-Igのアミノ酸配列、変異挿入箇所が掲載されている）。合成した遺伝子鎖をNotI（Takara社）およびXbaI（Takara社）によって処理した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics 社）を用いて精製し、同様の制限酵素処理を行った発現用ベクターpDN11（北海道大学　人獣共通感染症リサーチセンター　鈴木　定彦　教授より分与）のクローニングサイト（PCMV下流、INRBGとPABGHの間にあるNotIおよびXbaI制限酵素認識配列）へ組み込み、ウシPD-1-Ig発現ベクターを構築した。発現プラスミドはQIAGEN Plasmid Midi kit（Qiagen 社）によって精製し、実験に供するまで-30°Cにて保存した。以降、作製した発現プラスミドをpDN11-boPD-1-Igと表記する。

[0094] 以下の手順に従い、ウシPD-L1-Ig発現プラスミドを構築した。ウシPD-L1（GenBank accession number AB510902）のシグナルペプチドおよび細胞外領域を増幅するように、5´末端側に制限酵素NheIおよびEcoRV認識部位を付加したプライマー（boPD-L1-Ig FおよびR）を設計した。合成したウシPBMC由来cDNAを鋳型にPCRを行い、PCR産物をNheI（Takara社）およびEcoRV（Takara社）によって処理した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics社）を用いて精製し、同様の制限酵素処理を行ったpCXN2.1-Rabbit IgG1 Fc vector（Niwa et al., 1991; Zettlmeissl et al., 1990; 順天堂大学大学院医学研究科教授　横溝　岳彦　教授より分与されたものを改変 ）に導入

し、クローニングを行った。発現プラスミドはQIAGEN Plasmid Midi kit (Qiagen 社) またはFastGene Xpress Plasmid PLUS Kit (NIPPON Genetics社) によって精製し、実験に供するまで-30°Cにて保存した。以降、作製した発現プラスミドをpCXN2.1-boPD-L1-Igと表記する。

プライマー (boPD-L1-Ig F) : GCTAGCATGAGGATATATAGTGTCTTAAC (配列番号１３７)

プライマー (boPD-L1-Ig R) : GATATCATTCCTCTTTTTTGCTGGAT (配列番号１３８)

[0095] 以下の手順に従い、可溶性ウシPD-1-Ig発現細胞を作製した。4×10^6 個のCHO-DG44 細胞に2.5 μg のpDN11-boPD-1-IgをLipofectamine LTX (Invitrogen 社) を用いて導入した。48 時間後、G418 (Enzo Life Science社) 800 μg/ml、GlutaMAX supplement (Life technologies 社) 20 ml/lを含むOptiCHO AGT培地 (Life technologies 社) へ培地交換し、3週間培養してセレクションを行った。得られた細胞株の培養上清中のFc 融合組換えタンパク質の濃度は抗ウシIgG F(c) ウサギポリクローナル抗体 (Rockland社) を用いたELISA法を用いて測定し、Fc 融合組換えタンパク質を高発現する細胞株の選別を行った。得られた高発現細胞株はG418 を含まない培地に移し、14日間振盪培養を行って培養上清を回収した。Fc 融合組換えタンパク質を含む培養上清は、Centricon Plus-70 (Millipore 社) を用いて限外濾過した後に、Ab-Capcher Extra (ProteNova 社) を用いてFc 融合組換えタンパク質を精製した。精製後、PD-10 Desalting Column (GE Healthcare 社) によりバッファーをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.4) に置換し、実験に供するまで-30° C にて保存した (ウシPD-1-Ig) 。精製後のウシPD-1-Ig の濃度は抗ウシIgG F(c) ウサギポリクローナル抗体 (Rockland社) を用いたELISA法により測定した。ELISA の各洗浄操作にはAuto Plate Washer BIO WASHER 50 (DS Pharma Biomedical 社) を使用し、吸光度の測定にはMicroplate Reader MTP-650FA (コロナ電気社) を使用した。

[0096] 以下の手順に従い、可溶性ウシPD-L1-Ig発現細胞を作製した。7.5×10^7 個

のExpi293F 細胞（Life Technologies 社）に30 μg のpCXN2.1-boPD-L1-IgをExpifectamine（Life Technologies社）を用いて導入し、7 日間振盪培養を行って培養上清を回収した。培養上清からAb-Capcher Extra（ProteNova社；ウシPD-L1-Ig）を用いて組換えタンパク質を精製した。精製後、PD Mini Trap G-25（GE Healthcare 社）によりバッファーをPBS（pH 7.4）に置換し、実験に供するまで-30°C にて保存した（ウシPD-L1-Ig）。精製後のウシPD-L1-Igの濃度はRabbit IgG ELISA Quantitation Set（Bethyl 社）を用いて測定した。ELISA の各洗浄操作にはAuto Plate Washer BIO WASHER 50（DS Pharma Biomedical社）を使用し、吸光度の測定にはMicroplate Reader MTP-650FA（コロナ電気社）を使用した。

[0097] ラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体産生細胞の作製

ウシPD-L1-Ig（Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology 2014 Aug.; 142(4):551-561. この論文に記載した方法でウシPD-L1-Igを作製し、免疫に使用した）をラットの足蹠に免疫し、腸骨リンパ節法を用いてハイブリドーマを樹立して、ラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ 4G12株を得た。ラット抗ウシPD-L1モノクローナル抗体の樹立法については、以下の非特許文献にその詳細が記載されている（Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Vet. Res. 2013 Jul. 22; 44:59; Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology 2014 Aug.; 142(4):551-561）。

[0098] ラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体発現ベクターの作製

ラット抗ウシPD-L1抗体4G12を抗体可変領域としてウシIgG1およびウシIgλの抗体定常領域を融合させた、ラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体ch4G12を樹立した。

[0099] まず、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12を産生するハイブリドーマより可変領域（重鎖および軽鎖）の遺伝子をそれぞれ同定した。次に、当該ラット抗体それぞれの重鎖および軽鎖可変領域配列を既知のウシIgG1（重鎖；GenBank Acc

ession number X62916を改変）およびウシIgλ（軽鎖; GenBank Accession number X62917）の定常領域と結合させた遺伝子配列を作成し、コドン最適化を行った（ラットーウシキメラ抗ウシPD-L1 抗体ch4G12：配列番号１０５および１０６（アミノ酸配列）、配列番号１０７および１０８（コドン最適化後ヌクレオチド配列））。なお、ウシIgG1にはADCC活性を抑制するために、CH2ドメインのFcγ受容体予想結合部位に変異を加えた（図１９参照。アミノ酸番号及び変異: 250 E→P, 251 L→V, 252 P→A, 253 G→deletion, 347 A→S, 348 P→S; Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology 2014 Aug; 142(4):551-561.）。そして、NotI制限酵素認識配列、KOZAK配列、キメラ抗体軽鎖配列、ポリA付加シグナル配列（PABGH）、プロモーター配列（PCMV）、SacI制限酵素認識配列、イントロン配列（INRBG）、KOZAK配列、キメラ抗体重鎖配列、XbaI制限酵素認識配列を上記の順で配置するように遺伝子を人工的に合成した。合成した遺伝子鎖をNotI（Takara社）およびXbaI（Takara社）によって処理した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics 社）を用いて精製し、同様の制限酵素処理を行った発現プラスミドpDC6（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター鈴木定彦教授より分与）のクローニングサイト（PCMV下流、INRBGとPABGHの間にあるNotIおよびXbaI制限酵素認識配列）へ導入し、クローニングを行った（図２０）。得られた目的の発現プラスミドはQIAGEN Plasmid Midi kit（Qiagen 社）用いて抽出し、実験に供するまで-30℃で保存した。以降、作製した発現プラスミドをpDC6-boPD-L1ch4G12と表記する。

[0100] ラット-ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体の発現

pDC6-boPD-L1ch4G12を、ジヒドロ葉酸還元酵素欠損細胞であるCHO-DG44 細胞（CHO-DG44（$dfhr^{-/-}$））へ導入した。48 時間後、GlutaMAX supplement（Life technologies 社）20 ml/lを含むOptiCHO AGT培地（Life technologies 社）へ培地交換し、3週間培養して発現細胞のセレクションおよび限界希釈法によるクローニングを行った。次に、抗ウシIgG F(c) ウサギポリクローナル抗

体（Rockland社）を用いたドットブロット法およびELISA法により培養上清に含まれるキメラ抗体の濃度を測定し、高発現クローンを選抜した。さらに、選抜したラット-ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体高発現クローンに対して、60 nM のメトトレキサート（Mtx）を含む培地で負荷をかけることにより遺伝子増幅処理を行った。以上のようにして樹立したラット-ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体安定発現細胞を、Mtx を含まないOpti-CHO AGT 培地へ移し、14 日間の振盪培養を行った（125 rpm, 37℃, 5% CO_2）。抗ウシIgG F(c) ウサギポリクローナル抗体（Rockland社）を用いたELISA法を用いて、培養上清中のキメラ抗体産生量を定量した。ELISA の各洗浄操作にはAuto Plate Washer BIO WASHER 50（DS Pharma Biomedical 社）を使用し、吸光度の測定にはMicroplate Reader MTP-650FA（コロナ電気社）を使用した。14 日目の培養上清を10,000 g で10 分間遠心して細胞を除いた後、遠心上清をSteritop-GP 0.22 μmフィルター（Millipore社）に通して滅菌し、精製に供するまで4° C にて保存した。

[0101] ラット-ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体の精製

上記の方法により準備した培養上清から、Ab Capcher Extra（ProteNova社）を用いて各キメラ抗体を精製した。レジンへの結合はオープンカラム法を用い、平衡化バッファーおよび洗浄バッファーとしてPBS（pH 7.4）を使用した。溶出バッファーにはIgG Elution Buffer（Thermo Fisher Scientific社）を、中和バッファーには1M Tris（pH 9.0）を使用した。精製した抗体は、PD-10 Desalting Column（GE Healthcare 社）およびAmicon Ultra-15（50 kDa、Millipore社）を用いて、PBS（pH 7.4）へのバッファー置換および濃縮を行った。精製したキメラ抗体は、0.22 μm シリンジフィルター（Millipore社）を通して滅菌し、実験に供するまで4° C にて保存した。

[0102] ラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体の精製純度の確認（図２１）

精製したラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体の純度を確かめるため、SDS-PAGE およびCBB 染色により抗体タンパク質の検出を行った。10% アクリルアミドゲルを用いて、精製したラット－ウシキメラ抗体を還元条件下（2-メル

カプトエタノール（Sigma-Aldrich社）により還元）および非還元条件下にて電気泳動した。Quick-CBB kit（和光純薬工業社）により染色を行った後、蒸留水中で脱色を行った。結果を図２１に示す。還元条件では25kDaおよび50kDa、非還元条件では150kDaの想定される位置にバンドが確認された。

[0103] ラット-ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体の結合特異性（図２２）

ラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体がウシPD-L1発現細胞（前述）に特異的に結合することをフローサイトメトリー法により確認した。まず、ウシPD-L1発現細胞に対してラット抗ウシPD-L1抗体4G12またはラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1 抗体ch4G12を室温で30分間反応させた。洗浄後、APC標識抗ラットIgヤギ抗体（SouthernBiotech社）またはAlexa Fluor 647標識抗ウシIgG（H+L）ヤギF(ab')2（Jackson ImmunoResearch社）を室温で30分間反応させた。陰性対照抗体として、ラットIgG2a(κ）アイソタイプコントロール（BD Biosciences社）またはウシIgG1抗体（Bethyl社）を使用した。洗浄後、細胞表面に結合した各ラット抗体またはラット－ウシキメラ抗体をFACS Verse（BD Biosciences社）により検出した。なお、すべての洗浄操作および抗体の希釈には、1% ウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich社）を加えたPBSを使用した。

[0104] 実験結果を図２２に示す。ラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体ch4G12は、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12と同様にウシPD-L1発現細胞に結合することが示された。

[0105] ラット-ウシキメラ抗PD-L1 抗体のウシPD-1/PD-L1 結合阻害活性

(1) ウシPD-L1発現細胞と可溶性ウシPD-1 の結合阻害試験（図２３）

ウシPD-L1発現細胞（前述）およびウシPD-1-Ig（前述）を用いて、抗ウシPD-L1 抗体によるウシPD-1/PD-L1 結合阻害試験を行った。まず、2×10^5個のウシPD-L1 発現細胞を各濃度（0, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10 μg/ml）のラット抗ウシPD-L1抗体4G12 またはラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1 抗体ch4G12と室温で30分間反応させた。陰性対照抗体として、ラットIgG2a(κ）アイソタイプコントロール（BD Biosciences社）またはウシIgG1抗体（Bethyl社）を使用した。洗浄後、Lightning-Link Type A Biotin Labeling Kit（Inno

va Biosciences社）を用いてビオチン標識したウシPD-1-Ig を終濃度2 μg/ml となるよう添加し、室温でさらに30分間反応させた。さらに洗浄後、APC標識ストレプトアビジン（BioLegend社）により細胞表面に結合したウシPD-1-Ig を検出した。解析にはFACS Verse（BD Biosciences社）を用いた。なお、すべての洗浄操作および抗体の希釈には、1% ウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich社）を加えたPBSを使用した。抗体非添加時のウシPD-1-Ig結合細胞の割合を100%とし、各抗体濃度におけるウシPD-1-Ig結合細胞の割合を相対値として表した。

[0106] 実験結果を図２３に示す。ラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体ch4G12は、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12と同様にウシPD-1/PD-L1の結合を濃度依存的に阻害できることが示された。

[0107] (2) ウシPD-1発現細胞と可溶性ウシPD-L1 の結合阻害試験（図２４）

ウシPD-1発現細胞（前述）およびウシPD-L1-Ig（前述）を用いて、抗ウシPD-L1 抗体によるウシPD-1/PD-L1 結合阻害試験を行った。まず、96穴プレートに終濃度（0, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10 μg/ml）のラット抗ウシPD-L1抗体4G12 またはラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1 抗体ch4G12と、終濃度1 μg/mlのウシPD-L1-Igを添加し、室温で30分間反応させた。この混合液を2×10^5個のウシPD-1 発現細胞と室温で30分間反応させた。陰性対照抗体として、ラットIgG2a(κ）アイソタイプコントロール（BD Biosciences社）またはウシIgG1抗体（Bethyl社）を使用した。洗浄後、Alexa Fluor 647 標識抗ウサギIgG（H+L）ヤギF(ab')2（Life Technologies社）を室温で30分間反応させ、細胞表面に結合したウシPD-L1-Ig を検出した。解析にはFACS Verse（BD Biosciences社）を用いた。なお、すべての洗浄操作および抗体の希釈には、1% ウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich社）を加えたPBSを使用した。抗体非添加時のウシPD-L1-Ig結合細胞の割合を100%とし、各抗体濃度におけるウシPD-L1-Ig結合細胞の割合を相対値として表した。

[0108] 実験結果を図２４に示す。ラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体ch4G12は、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12と同様にウシPD-1/PD-L1の結合を濃度依存的に阻

害できることが示された。

[0109] ラット-ウシキメラ抗ウシPD-L1 抗体を用いた生物活性試験

(1) 細胞増殖への影響（図２５）

ラット－ウシキメラ抗PD-L1 抗体によるウシPD-1/PD-L1 結合阻害がリンパ球を活性化することを確かめるため、細胞増殖を指標として生物活性試験を行った。健常牛の末梢血から分離したウシPBMCを10×10^6個/mlとなるようにPBSに懸濁し、Carboxyfluorescein succinimidyl ester（CFSE）を用いて室温で20分間反応させた。10% 非働化ウシ胎仔血清（Cell Culture Technologies社）、抗生物質（ストレプトマイシン200 μg/ml、ペニシリン200 U/ml）（Life Technologies社）、0.01% L-グルタミン（Life Technologies社）を含むRPMI 1640培地（Sigma-Aldrich社）で2回洗浄した後、抗ウシCD3マウス抗体（WSU Monoclonal Antibody Center社）と4℃で30分間反応させた。洗浄後、抗マウスIgG1マイクロビーズ（Miltenyi Biotec社）と4℃で15分間反応させ、autoMACS（登録商標） Pro（Miltenyi Biotec）を用いてCD3陽性T細胞を分離した。分離したCD3陽性T細胞に、抗ウシCD3マウス抗体（WSU Monoclonal Antibody Center社）および抗ウシCD28マウス抗体（Bio-Rad社）を添加し、10 μg/mlのラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1 抗体ch4G12存在下または非存在下で、ウシPD-L1発現細胞と共培養した（CD3陽性T細胞：ウシPD-L1発現細胞＝10：1）。抗体のコントロールには、血清由来ウシIgG（Sigma-Aldrich社）を使用し、PD-L1発現細胞のコントロールには、pEGFP-N2を導入したEGFP発現細胞を用いた。6日後、細胞を回収し、抗ウシCD4マウス抗体および抗ウシCD8マウス抗体（Bio-Rad社）と室温で30分間反応させた。抗体の標識にはZenon Mouse IgG1 Labeling Kits（Life Technologies社）またはLightning-Link Kit（Innova Biosciences社）を用いた。解析にはFACS Verse（BD Biosciences社）を用いた。培養後の洗浄操作および抗体の希釈には、1% ウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich社）を加えたPBSを使用した。

[0110] 実験結果を図２５に示す。ウシPD-L1発現細胞との共培養により、CD4陽性およびCD8陽性T細胞の増殖が有意に抑制された。ラット－ウシキメラ抗ウシP

D-L1抗体ch4G12は、CD4陽性T細胞において、この抑制を阻害することが示された。

[0111] (2) IFN-γ産生量への影響（図２６）

ラット－ウシキメラ抗PD-L1 抗体によるウシPD-1/PD-L1 結合阻害がリンパ球を活性化することを確かめるため、IFN-γ産生量を指標として生物活性試験を行った。BLV感染牛の末梢血から分離したウシPBMCを4×10^6個/mlとなるように10% 非働化ウシ胎仔血清（Cell Culture Technologies社）、抗生物質（ストレプトマイシン200 μg/ml、ペニシリン200U/ml）（Life Technologies社）、0.01% L-グルタミン（Life Technologies社）を含むRPMI 1640培地（Sigma-Aldrich社）に懸濁した。PBMCに10 μg/mlのラット抗ウシPD-L1抗体4G12 またはラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1 抗体ch4G12、2% BLV感染ヒツジ胎仔腎細胞（FLK-BLV）培養上清を添加し、37℃, 5% CO_2条件下で6日間培養した。コントロール抗体には、血清由来ラットIgG（Sigma-Aldrich社）および血清由来ウシIgG（Sigma-Aldrich社）を用いた。6日後、培養上清を回収し、Bovine IFN-γ ELISA Kit（BETYL社）を用いてIFN-γ産生量を定量した。ELISA の各洗浄操作にはAuto Plate Washer BIO WASHER 50（DS Pharma Biomedical社）を使用し、吸光度の測定にはMicroplate Reader MTP-650FA（コロナ電気社）を使用した。

[0112] 実験結果を図２６に示す。ラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1抗体ch4G12は、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12と同様にBLV抗原に対するウシPBMCのIFN-γ応答を上昇させることが示された（n = 10）。

[0113] ラット抗ウシPD-L1抗体のCDR解析

NCBI IGBLAST（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/）を用いて、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12の相補性決定領域（CDR）を決定した。結果を図１９に示す。

[0114] 牛への接種試験

BLV実験感染牛（ホルスタイン種、雄、7ヶ月齢、体重267 kg）に樹立したラット－ウシキメラ抗ウシPD-L1 抗体ch4G12約260 mg（1 mg/kg）を点滴静注し

た。感染牛から経時的に採血を行い、密度勾配遠心法によりPBMCを分離した。

(1) BLV抗原に対するT細胞の細胞増殖応答（図２７）

ウシPBMCをPBSに懸濁し、CFSEを用いて室温で20分間反応させた。10% 非働化ウシ胎仔血清（Cell Culture Technologies社）、抗生物質（ストレプトマイシン200 μg/ml、ペニシリン200 U/ml）（Life Technologies社）、0.01% L-グルタミン（Life Technologies社）を含むRPMI 1640培地（Sigma-Aldrich社）で2回洗浄した後、同培地で4×10^6個/mlに調整した。PBMCに2% BLV感染ヒツジ胎仔腎細胞（FLK-BLV）培養上清を添加し、37℃, 5% CO2条件下で6日間培養した。コントロールには、2% BLV非感染ヒツジ胎仔腎細胞（FLK）培養上清を用いた。6日後、PBMCを回収し、抗ウシCD4マウス抗体、抗ウシCD8マウス抗体および抗ウシIgMマウス抗体（Bio-Rad社）と4℃で20分間反応させた。抗体の標識にはZenon Mouse IgG1 Labeling Kits（Life Technologies社）またはLightning-Link Kit（Innova Biosciences社）を用いた。解析にはFACS Verse（BD Biosciences社）を用いた。なお、すべての洗浄操作および抗体の希釈には、1% ウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich社）を加えたPBSを使用した。

[0115] 実験結果を図２７に示す。抗体投与により、CD4陽性T細胞のBLV特異的な細胞増殖応答が投与前に比べ増加した。

[0116] (2) BLVプロウイルス量の変化（図２８）

分離したウシPBMCからWizard DNA Purification kit（Promega社）を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAの濃度は、Nanodrop 8000 Spectrophotometer（Thermo Fisher Scientific社）を用いて測定した吸光度（260 nm）を基準として定量した。PBMC中のBLVプロウイルス量を測定するため、Cycleave PCR Reaction Mix SP（TaKaRa社）およびウシ白血病ウイルス検出用 Probe/Primer/Positive control（TaKaRa社）を用いてリアルタイムPCRを行った。測定にはLightCycler480 System II（Roche Diagnosis社）を用いた。

[0117] 実験結果を図２８に示す。BLVプロウイルス量は、試験期間終了まで投与前

に比べて有意に減少した。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

[0118] 本発明の抗PD-L1抗体は、動物のがんや感染症の予防及び/又は治療に利用できる。

配列表フリーテキスト

[0119] ＜配列番号１＞

配列番号１は、ラット抗ウシPD-L1抗体のL鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

MESQTHVLISLLLSVSGTYGDIAITQSPSSVAVSVGETVTLSCKSSQSLLYSENQKDYLGWYQQKPGQTPKPLIYWATNRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLIISSVQAEDLADYYCGQYLVYPFTFGPGTKLELK

＜配列番号２＞

配列番号２は、ラット抗ウシPD-L1抗体のH鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

MGWSQIILFLVAAATCVHSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTSNFMHWVKQQPGNGLEWIGWIYPEYGNTKYNQKFDGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCASEEAVISLVYWGQGTLVTVSS

＜配列番号３＞

配列番号３は、イヌ抗体のL鎖定常領域のアミノ酸配列を示す。

QPKASPSVTLFPPSSEELGANKATLVCLISDFYPSGVTVAWKASGSPVTQGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPDKWKSHSSFSCLVTHEGSTVEKKVAPAECS

＜配列番号４＞

配列番号４は、イヌ抗体のH鎖定常領域のアミノ酸配列を示す。

ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSTVTVPSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVPKESTCKCISPCPVPESLGGPSVFIFPPKPKDILRITRTPEITCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQPREQQFNSTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIGLPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSPKELSSSDTVTLTCLIKDFFPPEIDVEWQSNGQPEPESKYHTTAPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDTFTCAVMHEALQNHYTDLSLSHSPGK

＜配列番号５＞

配列番号５は、ラット抗ウシPD-L1抗体のL鎖可変領域のヌクレオチド配列を示す。

ATGGAATCACAGACGCATGTCCTCATTTCCCTTCTGCTCTCGGTATCTGGTACCTATGGGGACATTGCG
ATAACCCAGTCTCCATCCTCTGTGGCTGTGTCAGTAGGAGAGACGGTCACTCTGAGCTGCAAGTCCAGT
CAGAGTCTTTTATACAGTGAAAACCAAAAGGACTATTTGGGCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGACT
CCTAAACCCCTTATCTACTGGGCAACCAACCGGCACACTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGTAGTGGA
TCCGGGACAGACTTCACTCTGATCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCTGATTATTACTGTGGG
CAGTACCTTGTCTATCCGTTCACGTTTGGACCTGGGACCAAGCTGGAACTGAAA

配列番号５のヌクレオチド配列のコドン最適化後ヌクレオチド配列を＜配列番号１５＞に示す。

ATGGAATCTCAAACTCATGTTTTGATTTCATTACTTCTGAGTGTTTCCGGAACCTACGGTGATATCGCT
ATCACTCAATCTCCCTCCTCTGTTGCTGTGTCTGTGGGCGAAACCGTTACCCTGTCCTGCAAGTCCAGT
CAGTCTCTTCTCTACTCCGAGAATCAAAAGGACTACCTGGGCTGGTACCAACAGAAGCCCGGCCAGACC
CCAAAGCCACTGATATACTGGGCAACCAACAGGCACACCGGAGTGCCCGACAGGTTCACAGGCAGTGGA
TCTGGCACCGACTTTACCTTGATCATTTCAAGCGTGCAGGCTGAAGATCTGGCCGACTACTACTGTGGT
CAGTATCTGGTGTATCCTTTCACTTTCGGGCCAGGGACAAAATTGGAATTGAAG

＜配列番号６＞

配列番号６は、ラット抗ウシPD-L1抗体のH鎖可変領域のヌクレオチド配列を示す。

ATGGGATGGAGCCAGATCATCCTCTTTCTGGTGGCAGCAGCTACATGTGTTCACTCCCAGGTACAGCTG
CAGCAATCTGGGGCTGAATTAGTGAAGCCTGGGTCCTCAGTGAAAATTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTAC
ACCTTCACCAGTAACTTTATGCACTGGGTAAAGCAGCAGCCTGGAAATGGCCTTGAGTGGATTGGGTGG
ATTTATCCTGAATATGGTAATACTAAGTACAATCAAAAGTTCGATGGGAAGGCAACACTCACTGCAGAC
AAATCCTCCAGCACAGCCTATATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGT
GCAAGTGAGGAGGCAGTTATATCCCTTGTTTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

配列番号６のヌクレオチド配列のコドン最適化後ヌクレオチド配列を＜配列番号１６＞に示す。

ATGGGTTGGTCTCAAATTATCTTGTTTTTGGTTGCTGCAGCCACTTGTGTTCATTCTCAGGTGCAGCTG
CAACAAAGCGGCGCAGAACTGGTGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAAATATCTTGTAAGGCCAGCGGATAT
ACTTTCACCTCCAATTTCATGCATTGGGTCAAACAGCAGCCCGGCAACGGACTCGAGTGGATCGGCTGG
ATCTACCCCGAGTATGGCAACACAAAATATAACCAAAAATTTGATGGAAAGGCTACCCTGACTGCCGAT
AAGTCCTCCAGCACCGCATACATGCAACTCTCCTCCCTGACCTCCGAGGATAGCGCTGTCTACTTCTGT
GCTTCCGAAGAGGCTGTCATATCCTTGGTCTATTGGGGCCAAGGAACTCTGGTGACCGTCTCATCT

＜配列番号７＞

配列番号７は、イヌ抗体のL鎖定常領域のヌクレオチド配列を示す。

CAGCCCAAGGCCTCCCCCTCGGTCACACTCTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCGGCGCCAACAAGGCC
ACCCTGGTGTGCCTCATCAGCGACTTCTACCCCAGCGGCGTGACGGTGGCCTGGAAGGCAAGCGGCAGC
CCCGTCACCCAGGGCGTGGAGACCACCAAGCCCTCCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGC
TACCTGAGCCTGACGCCTGACAAGTGGAAATCTCACAGCAGCTTCAGCTGCCTGGTCACGCACGAGGGG
AGCACCGTGGAGAAGAAGGTGGCCCCCGCAGAGTGCTCTTAG

配列番号７のヌクレオチド配列のコドン最適化後ヌクレオチド配列を＜配列番号１７＞に示す。

CAGCCCAAAGCCTCTCCCAGCGTCACCCTCTTCCCACCTTCCAGTGAGGAGCTGGGGGCAAACAAAGCC
ACTTTGGTGTGTCTCATCTCCGATTTTTACCCCTCCGGGGTCACAGTCGCATGGAAGGCCTCCGGATCC
CCTGTGACACAGGGAGTGGAGACAACAAAACCTAGCAAGCAGAGTAACAATAAGTATGCCGCCTCAAGC
TATCTCAGCCTTACTCCTGATAAGTGGAAGTCACATAGCAGTTTTAGTTGCCTCGTAACACATGAGGGT
TCAACTGTGGAGAAAAAAGTAGCTCCAGCTGAGTGCTCATGA

＜配列番号８＞

配列番号８は、イヌ抗体のH鎖定常領域のヌクレオチド配列を示す。

GCCTCCACCACGGCCCCCTCGGTTTTCCCACTGGCCCCCAGCTGCGGGTCCACTTCCGGCTCCACGGTG
GCCCTGGCCTGCCTGGTGTCAGGCTACTTCCCCGAGCCTGTAACTGTGTCCTGGAATTCCGGCTCCTTG
ACCAGCGGTGTGCACACCTTCCCGTCCGTCCTGCAGTCCTCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGCACGGTG
ACAGTGCCCTCCAGCAGGTGGCCCAGCGAGACCTTCACCTGCAACGTGGTCCACCCGGCCAGCAACACT
AAAGTAGACAAGCCAGTGCCCAAAGAGTCCACCTGCAAGTGTATATCCCCATGCCCAGTCCCTGAATCA
CTGGGAGGGCCTTCGGTCTTCATCTTTCCCCCGAAACCCAAGGACATCCTCAGGATTACCCGAACACCC

GAGATCACCTGTGTGGTGTTAGATCTGGGCCGTGAGGACCCTGAGGTGCAGATCAGCTGGTTCGTGGAT
GGTAAGGAGGTGCACACAGCCAAGACGCAGCCTCGTGAGCAGCAGTTCAACAGCACCTACCGTGTGGTC
AGCGTCCTCCCCATTGAGCACCAGGACTGGCTCACCGGAAAGGAGTTCAAGTGCAGAGTCAACCACATA
GGCCTCCCGTCCCCCATCGAGAGGACTATCTCCAAAGCCAGAGGGCAAGCCCATCAGCCCAGTGTGTAT
GTCCTGCCACCATCCCCAAAGGAGTTGTCATCCAGTGACACGGTCACCCTGACCTGCCTGATCAAAGAC
TTCTTCCCACCTGAGATTGATGTGGAGTGGCAGAGCAATGGACAGCCGGAGCCCGAGAGCAAGTACCAC
ACGACTGCGCCCCAGCTGGACGAGGACGGGTCCTACTTCCTGTACAGCAAGCTCTCTGTGGACAAGAGC
CGCTGGCAGCAGGGAGACACCTTCACATGTGCGGTGATGCATGAAGCTCTACAGAACCACTACACAGAT
CTATCCCTCTCCCATTCTCCGGGTAAATGA

配列番号８のヌクレオチド配列のコドン最適化後ヌクレオチド配列を＜配列番号１８＞に示す。

GCTAGCACAACCGCTCCCTCCGTTTTTCCCCTCGCCCCATCCTGCGGGTCAACCAGCGGATCCACCGTC
GCTCTGGCTTGTCTGGTGTCAGGATACTTCCCCGAGCCTGTCACCGTTTCTTGGAATAGCGGCAGCCTT
ACTTCCGGCGTGCATACCTTCCCTAGCGTGCTTCAGTCCTCCGGTCTGTATTCCCTCAGCTCCACCGTA
ACTGTCCCAAGCTCAAGGTGGCCCTCTGAGACATTTACCTGCAATGTGGTCCATCCTGCTTCAAATACC
AAAGTGGACAAGCCCGTCCCAAAAGAGTCTACCTGCAAATGTATCAGTCCTTGTCCCGTGCCCGAGTCT
CTGGGCGGACCCTCAGTCTTTATCTTCCCACCCAAGCCAAAGGACATATTGCGCATTACACGGACACCC
GAAATCACCTGTGTTGTGTTGGATCTCGGCCGGGAAGATCCTGAGGTGCAGATTAGTTGGTTTGTTGAT
GGCAAGGAGGTGCACACAGCAAAAACACAGCCCAGAGAACAGCAGTTCAACAGTACTTATAGAGTAGTG
AGTGTGTTGCCTATAGAGCATCAGGACTGGCTGACAGGCAAAGAATTCAAATGTAGGGTTAACCACATT
GGCCTCCCTAGTCCAATCGAGAGGACAATCTCTAAAGCCCGAGGCCAGGCTCATCAGCCTTCTGTGTAC
GTTCTGCCTCCTAGTCCTAAGGAACTGTCTTCTTCAGACACAGTAACACTCACTTGCCTGATTAAGGAC
TTTTTTCCTCCAGAGATTGATGTGGAATGGCAGTCTAACGGGCAGCCAGAGCCAGAATCTAAGTACCAC
ACTACTGCACCACAGCTGGATGAGGATGGGTCTTACTTCCTGTACAGTAAGCTGAGTGTGGACAAGTCT
CGATGGCAGCAGGGGGATACTTTTACTTGCGCAGTAATGCACGAAGCATTGCAGAACCACTACACTGAC
CTGTCACTTAGTCACTCACCAGGGAAGTAA

＜配列番号９＞

配列番号９は、ラット抗ウシPD-L1抗体のL鎖可変領域とイヌ抗体のL鎖定常領

域とからなるキメラL鎖のアミノ酸配列を示す。

MESQTHVLISLLLSVSGTYGDIAITQSPSSVAVSVGETVTLSCKSSQSLLYSENQKDYLGWYQQKPGQT
PKPLIYWATNRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLIISSVQAEDLADYYCGQYLVYPFTFGPGTKLELKQPKAS
PSVTLFPPSSEELGANKATLVCLISDFYPSGVTVAWKASGSPVTQGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLT
PDKWKSHSSFSCLVTHEGSTVEKKVAPAECS

＜配列番号１０＞

配列番号１０は、ラット抗ウシPD-L1抗体のH鎖可変領域とイヌ抗体のH鎖定常領域とからなるキメラH鎖のアミノ酸配列を示す。

MGWSQIILFLVAAATCVHSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTSNFMHWVKQQPGNGLEWIGW
IYPEYGNTKYNQKFDGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCASEEAVISLVYWGQGTLVTVSSA
STTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSTVT
VPSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVPKESTCKCISPCPVPESLGGPSVFIFPPKPKDILRITRTPE
ITCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQPREQQFNSTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIG
LPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSPKELSSSDTVTLTCLIKDFFPPEIDVEWQSNGQPEPESKYHT
TAPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDTFTCAVMHEALQNHYTDLSLSHSPGK

＜配列番号１９＞

ラット抗ウシPD-L1抗体のL鎖可変領域とイヌ抗体のL鎖定常領域とからなるキメラL鎖のヌクレオチド配列（コドン最適化後ヌクレオチド配列）を示す。

ATGGAATCTCAAACTCATGTTTTGATTTCATTACTTCTGAGTGTTTCCGGAACCTACGGTGATATCGCT
ATCACTCAATCTCCCTCCTCTGTTGCTGTGTCTGTGGGCGAAACCGTTACCCTGTCCTGCAAGTCCAGT
CAGTCTCTTCTCTACTCCGAGAATCAAAAGGACTACCTGGGCTGGTACCAACAGAAGCCCGGCCAGACC
CCAAAGCCACTGATATACTGGGCAACCAACAGGCACACCGGAGTGCCCGACAGGTTCACAGGCAGTGGA
TCTGGCACCGACTTTACCTTGATCATTTCAAGCGTGCAGGCTGAAGATCTGGCCGACTACTACTGTGGT
CAGTATCTGGTGTATCCTTTCACTTTCGGGCCAGGGACAAAATTGGAATTGAAGCAGCCCAAAGCCTCT
CCCAGCGTCACCCTCTTCCCACCTTCCAGTGAGGAGCTGGGGGCAAACAAAGCCACTTTGGTGTGTCTC
ATCTCCGATTTTTACCCCTCCGGGGTCACAGTCGCATGGAAGGCCTCCGGATCCCCTGTGACACAGGGA
GTGGAGACAACAAAACCTAGCAAGCAGAGTAACAATAAGTATGCCGCCTCAAGCTATCTCAGCCTTACT
CCTGATAAGTGGAAGTCACATAGCAGTTTTAGTTGCCTCGTAACACATGAGGGTTCAACTGTGGAGAAA

AAAGTAGCTCCAGCTGAGTGCTCATGA

＜配列番号２０＞

配列番号２０は、ラット抗ウシPD-L1抗体のH鎖可変領域とイヌ抗体のH鎖定常領域とからなるキメラH鎖のヌクレオチド配列（コドン最適化後ヌクレオチド配列）を示す。

ATGGGTTGGTCTCAAATTATCTTGTTTTTGGTTGCTGCAGCCACTTGTGTTCATTCTCAGGTGCAGCTG
CAACAAAGCGGCGCAGAACTGGTGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAAATATCTTGTAAGGCCAGCGGATAT
ACTTTCACCTCCAATTTCATGCATTGGGTCAAACAGCAGCCCGGCAACGGACTCGAGTGGATCGGCTGG
ATCTACCCCGAGTATGGCAACACAAAATATAACCAAAAATTTGATGGAAAGGCTACCCTGACTGCCGAT
AAGTCCTCCAGCACCGCATACATGCAACTCTCCTCCCTGACCTCCGAGGATAGCGCTGTCTACTTCTGT
GCTTCCGAAGAGGCTGTCATATCCTTGGTCTATTGGGGCCAAGGAACTCTGGTGACCGTCTCATCTGCT
AGCACAACCGCTCCCTCCGTTTTTCCCCTCGCCCCATCCTGCGGGTCAACCAGCGGATCCACCGTCGCT
CTGGCTTGTCTGGTGTCAGGATACTTCCCCGAGCCTGTCACCGTTTCTTGGAATAGCGGCAGCCTTACT
TCCGGCGTGCATACCTTCCCTAGCGTGCTTCAGTCCTCCGGTCTGTATTCCCTCAGCTCCACCGTAACT
GTCCCAAGCTCAAGGTGGCCCTCTGAGACATTTACCTGCAATGTGGTCCATCCTGCTTCAAATACCAAA
GTGGACAAGCCCGTCCCAAAAGAGTCTACCTGCAAATGTATCAGTCCTTGTCCCGTGCCCGAGTCTCTG
GGCGGACCCTCAGTCTTTATCTTCCCACCCAAGCCAAAGGACATATTGCGCATTACACGGACACCCGAA
ATCACCTGTGTTGTGTTGGATCTCGGCCGGGAAGATCCTGAGGTGCAGATTAGTTGGTTTGTTGATGGC
AAGGAGGTGCACACAGCAAAAACACAGCCCAGAGAACAGCAGTTCAACAGTACTTATAGAGTAGTGAGT
GTGTTGCCTATAGAGCATCAGGACTGGCTGACAGGCAAAGAATTCAAATGTAGGGTTAACCACATTGGC
CTCCCTAGTCCAATCGAGAGGACAATCTCTAAAGCCCGAGGCCAGGCTCATCAGCCTTCTGTGTACGTT
CTGCCTCCTAGTCCTAAGGAACTGTCTTCTTCAGACACAGTAACACTCACTTGCCTGATTAAGGACTTT
TTTCCTCCAGAGATTGATGTGGAATGGCAGTCTAACGGGCAGCCAGAGCCAGAATCTAAGTACCACACT
ACTGCACCACAGCTGGATGAGGATGGGTCTTACTTCCTGTACAGTAAGCTGAGTGTGGACAAGTCTCGA
TGGCAGCAGGGGGATACTTTTACTTGCGCAGTAATGCACGAAGCATTGCAGAACCACTACACTGACCTG
TCACTTAGTCACTCACCAGGGAAGTAA

＜配列番号１１＞

配列番号１１は、ヒト抗体のL鎖定常領域のアミノ酸配列を示す。

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

＜配列番号１２＞

配列番号１２は、ヒト抗体(IgG4 variant 1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

＜配列番号１３＞

配列番号１３は、ヒト抗体のL鎖定常領域のヌクレオチド配列を示す。

ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCT
GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC
CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

＜配列番号１４＞

配列番号１４は、ヒト抗体(IgG4 variant 1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

TCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACC
AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC
GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAG
GTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCATCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGG
GGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTG
GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC

CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTC
CCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCC
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGG
AATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTG
TCTCTGGGTAAATGA

＜配列番号２１～３６＞

配列番号２１～３６は、順に、プライマーcPD-1 inner F、cPD-1 inner R、cPD-L1 inner F、cPD-L1 inner R、cPD-1 5´GSP、cPD-1 3´GSP、cPD-L1 5´GSP、cPD-L1 3´GSP、cPD-1-EGFP F、cPD-1-EGFP R、cPD-L1-EGFP F、cPD-L1-EGFP R、cPD-1-Ig 、cPD-1-Ig R、cPD-L1-Ig F及びcPD-L1-Ig Rのヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号３７＞

配列番号３７は、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12のL鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列（QSLLYSENQKDY）を示す。

＜配列番号３８＞

配列番号３８は、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12のL鎖可変領域のCDR3のアミノ酸配列（GQYLVYPFT）を示す。

＜配列番号３９＞

配列番号３９は、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12のH鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列（GYTFTSNF）を示す。

＜配列番号４０＞

配列番号４０は、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12のH鎖可変領域のCDR2のアミノ酸配列（IYPEYGNT）を示す。

＜配列番号４１＞

配列番号４１は、ラット抗ウシPD-L1抗体4G12のH鎖可変領域のCDR3のアミノ酸配列（ASEEAVISLVY）を示す。

＜配列番号４２＞

配列番号４２は、ヒツジ抗体(IgG1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号４３＞

配列番号４３は、ヒツジ抗体(IgG1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号４４＞

配列番号４４は、ヒツジ抗体(IgG2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号４５＞

配列番号４５は、ヒツジ抗体(IgG2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号４６＞

配列番号４６は、ヒツジ抗体のL鎖（Ig kappa(CK)）定常領域のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号４７＞

配列番号４７は、ヒツジ抗体のL鎖（Ig kappa(CK)）定常領域のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号４８＞

配列番号４８は、ヒツジ抗体のL鎖（Ig lambda(CL)）定常領域のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号４９＞

配列番号４９は、ヒツジ抗体のL鎖（Ig lambda(CL)）定常領域のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号５０＞

配列番号５０は、ブタ抗体(IgG1^{a})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号５１＞

配列番号５１は、ブタ抗体(IgG1^{a})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号５２＞

配列番号５２は、ブタ抗体(IgG1^{b})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号５３＞

配列番号５３は、ブタ抗体(IgG1^{b})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号５４＞

配列番号５４は、ブタ抗体(IgG2^{a})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号５５＞

配列番号５５は、ブタ抗体(IgG2^{a})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号５６＞

配列番号５６は、ブタ抗体(IgG2^{b})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号５７＞

配列番号５７は、ブタ抗体(IgG2^{b})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号５８＞

配列番号５８は、ブタ抗体(IgG3)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号５９＞

配列番号５９は、ブタ抗体(IgG3)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号６０＞

配列番号６０は、ブタ抗体(IgG4^{a})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を

示す。

＜配列番号６１＞

配列番号６１は、ブタ抗体(IgG4^{a})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号６２＞

配列番号６２は、ブタ抗体(IgG4^{b})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号６３＞

配列番号６３は、ブタ抗体(IgG4^{b})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号６４＞

配列番号６４は、ブタ抗体(IgG5^{a})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号６５＞

配列番号６５は、ブタ抗体(IgG5^{a})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号６６＞

配列番号６６は、ブタ抗体(IgG5^{b})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号６７＞

配列番号６７は、ブタ抗体(IgG5^{b})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号６８＞

配列番号６８は、ブタ抗体(IgG6^{a})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号６９＞

配列番号６９は、ブタ抗体(IgG6^{a})のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号７０＞

配列番号７０は、ブタ抗体(IgG6^b)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号７１＞

配列番号７１は、ブタ抗体(IgG6^b)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号７２＞

配列番号７２は、スイギュウ抗体(IgG1と推定される)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号７３＞

配列番号７３は、スイギュウ抗体(IgG1と推定される)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号７４＞

配列番号７４は、スイギュウ抗体(IgG2と推定される)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号７５＞

配列番号７５は、スイギュウ抗体(IgG2と推定される)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号７６＞

配列番号７６は、スイギュウ抗体(IgG3と推定される)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号７７＞

配列番号７７は、スイギュウ抗体(IgG3と推定される)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号７８＞

配列番号７８は、スイギュウ抗体のL鎖 (Ig lambdaと推定される) 定常領域(CL)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号７９＞

配列番号７９は、スイギュウ抗体のL鎖（Ig lambdaと推定される）定常領域(CL)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号８０＞

配列番号８０は、ヒト抗体(IgG4 variant 2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号８１＞

配列番号８１は、ヒト抗体(IgG4 variant 2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号８２＞

配列番号８２は、ヒト抗体(IgG4 variant 3)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号８３＞

配列番号８３は、ヒト抗体(IgG4 variant 3)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号８４＞

配列番号８４は、ウシ抗体(IgG1 variant 1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号８５＞

配列番号８５は、ウシ抗体(IgG1 variant 2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号８６＞

配列番号８６は、ウシ抗体(IgG1 variant 3)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号８７＞

配列番号８７は、ウシ抗体(IgG2 variant 1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号８８＞

配列番号８８は、ウシ抗体(IgG2 variant 2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミ

ノ酸配列を示す。

＜配列番号８９＞

配列番号８９は、ウシ抗体(IgG2 variant 3)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号９０＞

配列番号９０は、ウシ抗体(IgG3 variant 1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号９１＞

配列番号９１は、ウシ抗体(IgG3 variant 2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号９２＞

配列番号９２は、ウシ抗体(IgG1 variant 1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号９３＞

配列番号９３は、ウシ抗体(IgG1 variant 2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号９４＞

配列番号９４は、ウシ抗体(IgG1 variant 3)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号９５＞

配列番号９５は、ウシ抗体(IgG2 variant 1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号９６＞

配列番号９６は、ウシ抗体(IgG2 variant 2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号９７＞

配列番号９７は、ウシ抗体(IgG2 variant 3)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号９８＞

配列番号９８は、ウシ抗体(IgG3 variant 1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号９９＞

配列番号９９は、ウシ抗体(IgG3 variant 2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号１００＞

配列番号１００は、ウシ抗体のL鎖定常領域（ウシIg lambda, GenBank: X62917）のアミノ酸配列を示す。

QPKSPPSVTLFPPSTEELNGNKATLVCLISDFYPGSVTVVWKADGSTITRNVETTRASKQSNSKYAASSYLSLTSSDWKSKGSYSCEVTHEGSTVTKTVKPSECS

＜配列番号１０１＞

配列番号１０１は、ウシ抗体のL鎖定常領域（ウシIg lambda, GenBank: X62917）のヌクレオチド配列を示す。

CAGCCCAAGTCCCCACCCTCGGTCACCCTGTTCCCGCCCTCCACGGAGGAGCTCAACGGCAACAAGGCCACCCTGGTGTGTCTCATCAGCGACTTCTACCCGGGTAGCGTGACCGTGGTCTGGAAGGCAGACGGCAGCACCATCACCCGCAACGTGGAGACCACCCGGGCCTCCAAACAGAGCAACAGCAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGAGCAGCGACTGGAAATCGAAAGGCAGTTACAGCTGCGAGGTCACGCACGAGGGGAGCACCGTGACGAAGACAGTGAAGCCCTCAGAGTGTTCTTAG

配列番号１０１のヌクレオチド配列のコドン最適化後ヌクレオチド配列を＜配列番号１０４＞に示す。

CAGCCTAAGAGTCCTCCTTCTGTAACACTCTTTCCCCCCTCTACCGAGGAACTCAACGGCAATAAAGCTACCTTGGTTTGCCTTATTTCTGATTTCTACCCCGGGTCTGTGACCGTGGTGTGGAAAGCTGATGGGTCCACCATTACTCGGAATGTGGAAACCACCCGGGCTTCTAAGCAGTCCAACTCTAAATACGCAGCATCCTCCTATTTGAGTCTTACTAGTAGTGACTGGAAGTCAAAGGGTAGTTACAGTTGCGAAGTCACACATGAAGGTTCAACAGTGACAAAGACAGTCAAGCCCTCAGAGTGCTCATAG

＜配列番号１０２＞

配列番号１０２は、ウシ抗体のH鎖定常領域（ウシIgG1, GenBank: X62916を

改変）のアミノ酸配列を示す。変異箇所に下線を引いた。アミノ酸番号および変異：113E→P, 114L→V, 115P→A, 116G→deletion, 209A→S, 210P→S

ASTTAPKVYPLSSCCGDKSSSTVTLGCLVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSMV
TVPGSTSGQTFTCNVAHPASSTKVDKAVDPTCKPSPCDCCPPPPVAGPSVFIFPPKPKDTLTISGTPEV
TCVVVDVGHDDPEVKFSWFVDDVEVNTATTKPREEQFNSTYRVVSALRIQHQDWTGGKEFKCKVHNEGL
PSSIVRTISRTKGPAREPQVYVLAPPQEELSKSTVSLTCMVTSFYPDYIAVEWQRNGQPESEDKYGTTP
PQLDADSSYFLYSKLRVDRNSWQEGDTYTCVVMHEALHNHYTQKSTSKSAGK

＜配列番号１０３＞

配列番号１０３は、ウシ抗体のH鎖定常領域（ウシIgG1, GenBank: X62916を改変）のヌクレオチド配列（コドン最適化後）を示す。

GCTAGCACAACTGCTCCTAAGGTGTACCCCCTGAGCTCTTGCTGCGGCGACAAGTCTAGCAGCACCGTG
ACCCTCGGATGCCTCGTCAGCAGCTATATGCCTGAGCCAGTTACAGTGACATGGAATTCTGGTGCCCTT
AAGTCCGGCGTCCATACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCCTCTGGCCTGTACAGTTTGTCCTCTATGGTG
ACAGTACCCGGTTCCACCTCCGGACAGACCTTTACCTGTAATGTGGCTCATCCCGCCTCCTCCACAAAG
GTGGATAAGGCTGTTGACCCTACCTGTAAACCCAGTCCATGCGACTGCTGTCCCCCCCCTCCAGTTGCC
GGACCCTCAGTCTTTATTTTCCCACCCAAACCCAAAGACACCCTGACAATCTCTGGAACACCAGAAGTC
ACCTGCGTCGTCGTGGATGTGGGCCACGACGATCCTGAGGTAAAATTCTCATGGTTCGTCGACGATGTG
GAAGTGAATACAGCTACTACAAAACCTCGCGAAGAGCAGTTTAACTCTACCTATCGAGTGGTTTCTGCT
TTGCGGATTCAGCATCAGGATTGGACAGGCGGCAAAGAGTTTAAATGTAAAGTCCATAACGAGGGACTT
CCTTCTAGTATCGTGCGCACTATCAGTAGAACTAAAGGGCCTGCTCGGGAACCTCAGGTGTACGTCCTG
GCACCTCCACAGGAAGAGCTGAGTAAGTCTACAGTTTCTCTGACTTGTATGGTAACATCTTTTTATCCA
GATTACATCGCAGTTGAATGGCAGAGGAACGGGCAGCCAGAGAGTGAGGATAAGTACGGGACTACTCCA
CCACAGCTGGACGCAGACTCAAGTTACTTCCTGTACTCAAAGCTGAGGGTTGACAGAAACTCATGGCAG
GAGGGGGACACTTACACTTGCGTAGTTATGCACGAGGCACTTCACAACCACTACACTCAGAAGAGTACT
TCAAAGAGTGCAGGGAAGTAA

＜配列番号１０５＞

配列番号１０５は、ラット抗ウシPD-L1抗体のL鎖可変領域とウシ抗体のL鎖定常領域とからなるキメラL鎖のアミノ酸配列を示す。

MESQTHVLISLLLSVSGTYGDIAITQSPSSVAVSVGETVTLSCKSSQSLLYSENQKDYLGWYQQKPGQT
PKPLIYWATNRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLIISSVQAEDLADYYCGQYLVYPFTFGPGTKLELKQPKSP
PSVTLFPPSTEELNGNKATLVCLISDFYPGSVTVVWKADGSTITRNVETTRASKQSNSKYAASSYLSLT
SSDWKSKGSYSCEVTHEGSTVTKTVKPSECS

＜配列番号１０６＞

配列番号１０６は、ラット抗ウシPD-L1抗体のH鎖可変領域とウシ抗体のH鎖定常領域（ウシIgG1, GenBank: X62916を改変）とからなるキメラH鎖のアミノ酸配列を示す。

MGWSQIILFLVAAATCVHSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTSNFMHWVKQQPGNGLEWIGW
IYPEYGNTKYNQKFDGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCASEEAVISLVYWGQGTLVTVSSA
STTAPKVYPLSSCCGDKSSSTVTLGCLVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSMVT
VPGSTSGQTFTCNVAHPASSTKVDKAVDPTCKPSPCDCCPPPPVAGPSVFIFPPKPKDTLTISGTPEVT
CVVVDVGHDDPEVKFSWFVDDVEVNTATTKPREEQFNSTYRVVSALRIQHQDWTGGKEFKCKVHNEGLP
SSIVRTISRTKGPAREPQVYVLAPPQEELSKSTVSLTCMVTSFYPDYIAVEWQRNGQPESEDKYGTTPP
QLDADSSYFLYSKLRVDRNSWQEGDTYTCVVMHEALHNHYTQKSTSKSAGK

＜配列番号１０７＞

ラット抗ウシPD-L1抗体のL鎖可変領域とウシ抗体のL鎖定常領域とからなるキメラL鎖のヌクレオチド配列（コドン最適化後ヌクレオチド配列）を示す。

ATGGAATCTCAAACTCATGTTTTGATTTCATTACTTCTGAGTGTTTCCGGAACCTACGGTGATATCGCT
ATCACTCAATCTCCCTCCTCTGTTGCTGTGTCTGTGGGCGAAACCGTTACCCTGTCCTGCAAGTCCAGT
CAGTCTCTTCTCTACTCCGAGAATCAAAAGGACTACCTGGGCTGGTACCAACAGAAGCCCGGCCAGACC
CCAAAGCCACTGATATACTGGGCAACCAACAGGCACACCGGAGTGCCCGACAGGTTCACAGGCAGTGGA
TCTGGCACCGACTTTACCTTGATCATTTCAAGCGTGCAGGCTGAAGATCTGGCCGACTACTACTGTGGT
CAGTATCTGGTGTATCCTTTCACTTTCGGGCCAGGGACAAAACTCGAGCTCAAACAGCCTAAGAGTCCT
CCTTCTGTAACACTCTTTCCCCCCTCTACCGAGGAACTCAACGGCAATAAAGCTACCTTGGTTTGCCTT
ATTTCTGATTTCTACCCCGGGTCTGTGACCGTGGTGTGGAAAGCTGATGGGTCCACCATTACTCGGAAT
GTGGAAACCACCCGGGCTTCTAAGCAGTCCAACTCTAAATACGCAGCATCCTCCTATTTGAGTCTTACT
AGTAGTGACTGGAAGTCAAAGGGTAGTTACAGTTGCGAAGTCACACATGAAGGTTCAACAGTGACAAAG

ACAGTCAAGCCCTCAGAGTGCTCATAG

＜配列番号１０８＞

ラット抗ウシPD-L1抗体のH鎖可変領域とウシ抗体のH鎖定常領域（ウシIgG1, GenBank: X62916を改変）とからなるキメラH鎖のヌクレオチド配列（コドン最適化後ヌクレオチド配列）を示す。

ATGGGGTGGTCCCAGATTATATTGTTCCTCGTCGCCGCCGCCACTTGCGTACACAGCCAAGTGCAACTT
CAACAAAGCGGTGCAGAACTGGTAAAGCCCGGTAGCTCTGTGAAAATATCCTGTAAAGCCAGTGGCTAC
ACATTTACCAGCAACTTTATGCACTGGGTGAAGCAACAGCCCGGAAATGGCTTGGAGTGGATTGGCTGG
ATCTATCCCGAATATGGTAACACCAAGTATAATCAGAAGTTCGACGGTAAGGCCACCCTCACCGCCGAT
AAGTCATCCTCCACCGCCTATATGCAGCTCAGCAGCCTGACCAGCGAGGATTCCGCTGTGTACTTCTGT
GCCAGCGAAGAGGCTGTGATCTCATTGGTGTATTGGGGACAGGGCACCCTCGTCACCGTGTCCAGCGCT
AGCACAACTGCTCCTAAGGTGTACCCCCTGAGCTCTTGCTGCGGCGACAAGTCTAGCAGCACCGTGACC
CTCGGATGCCTCGTCAGCAGCTATATGCCTGAGCCAGTTACAGTGACATGGAATTCTGGTGCCCTTAAG
TCCGGCGTCCATACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCCTCTGGCCTGTACAGTTTGTCCTCTATGGTGACA
GTACCCGGTTCCACCTCCGGACAGACCTTTACCTGTAATGTGGCTCATCCCGCCTCCTCCACAAAGGTG
GATAAGGCTGTTGACCCTACCTGTAAACCCAGTCCATGCGACTGCTGTCCCCCCCCTCCAGTTGCCGGA
CCCTCAGTCTTTATTTTCCCACCCAAACCCAAAGACACCCTGACAATCTCTGGAACACCAGAAGTCACC
TGCGTCGTCGTGGATGTGGGCCACGACGATCCTGAGGTAAAATTCTCATGGTTCGTCGACGATGTGGAA
GTGAATACAGCTACTACAAAACCTCGCGAAGAGCAGTTTAACTCTACCTATCGAGTGGTTTCTGCTTTG
CGGATTCAGCATCAGGATTGGACAGGCGGCAAAGAGTTTAAATGTAAAGTCCATAACGAGGGACTTCCT
TCTAGTATCGTGCGCACTATCAGTAGAACTAAAGGGCCTGCTCGGGAACCTCAGGTGTACGTCCTGGCA
CCTCCACAGGAAGAGCTGAGTAAGTCTACAGTTTCTCTGACTTGTATGGTAACATCTTTTTATCCAGAT
TACATCGCAGTTGAATGGCAGAGGAACGGGCAGCCAGAGAGTGAGGATAAGTACGGGACTACTCCACCA
CAGCTGGACGCAGACTCAAGTTACTTCCTGTACTCAAAGCTGAGGGTTGACAGAAACTCATGGCAGGAG
GGGGACACTTACACTTGCGTAGTTATGCACGAGGCACTTCACAACCACTACACTCAGAAGAGTACTTCA
AAGAGTGCAGGGAAGTAA

＜配列番号１０９～１３２＞

配列番号１０９～１３２は、順に、プライマーovPD-L1 CDS F、ovPD-L1 CDS

R、poPD-L1 CDS F、poPD-L1 CDS R、buPD-L1 CDS F1、buPD-L1 CDS R1、buPD-L1 CDS F2、buPD-L1 CDS R2、ovPD-1-EGFP F、ovPD-1-EGFP R、ovPD-L1-EGFP F、ovPD-L1-EGFP R、poPD-1-EGFP F、poPD-1-EGFP R、poPD-L1-EGFP F、poPD-L1-EGFP R、ovPD-L1-Ig F、ovPD-L1-Ig R、poPD-L1-Ig F、poPD-L1-Ig R、cCD80-Ig F、cCD80-Ig R、cPD-L1-His F及びcPD-L1-His Rのヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号１３３～１３８＞

配列番号１３３～１３８は、順に、プライマーboPD-1-myc F, boPD-1-myc R, boPD-L1-EGFP F, boPD-L1-EGFP R, boPD-L1-Ig F, boPD-L1-Ig Rのヌクレオチド配列を示す。

請求の範囲

[請求項1] (a)QSLLYSENQKDY（配列番号３７）のアミノ酸配列を有するCDR1、WATのアミノ酸配列を有するCDR2及びGQYLVYPFT（配列番号３８）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖と、(b)GYTFTSNF（配列番号３９）のアミノ酸配列を有するCDR1、IYPEYGNT（配列番号４０）のアミノ酸配列を有するCDR2及びASEEAVISLVY（配列番号４１）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域とラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖とを含む、抗PD-L1抗体。

[請求項2] L鎖可変領域とH鎖可変領域がラットに由来する請求項１記載の抗体。

[請求項3] L鎖可変領域がラット抗ウシPD-L1抗体のL鎖可変領域であり、H鎖可変領域がラット抗ウシPD-L1抗体のH鎖可変領域である請求項２記載の抗体。

[請求項4] L鎖可変領域が配列番号１のアミノ酸配列を有し、H鎖可変領域が配列番号２のアミノ酸配列を有する、請求項３記載の抗体。

[請求項5] ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域が、Lambda鎖又はKappa鎖の定常領域のアミノ酸配列を有する請求項１～４のいずれかに記載の抗体。

[請求項6] ラット以外の動物抗体のH鎖定常領域が、ヒトのIgG4に相当する免疫グロブリンの定常領域のアミノ酸配列を有する請求項１～５のいずれかに記載の抗体。

[請求項7] ラット以外の動物がウシであり、ウシ抗体のH鎖定常領域が、ADCC活性及び/又はCDC活性を低下させる変異が導入されたものである請求項１～５のいずれかに記載の抗体。

[請求項8] ラット以外の動物がイヌであり、イヌ抗体のL鎖定常領域が、Lambda鎖の定常領域のアミノ酸配列を有し、かつ、イヌ抗体のH鎖定常領域が、ヒトのIgG4に相当する免疫グロブリンの定常領域のアミノ酸配列を有する請求項６記載の抗体。

[請求項9] ウシ抗体のL鎖定常領域が、Lambda鎖の定常領域のアミノ酸配列を有

し、かつ、ウシ抗体のH鎖定常領域が、ADCC活性及び/又はCDC活性を低下させる変異が導入されたものである請求項７記載の抗体。

[請求項10] イヌ抗体のL鎖定常領域が配列番号３のアミノ酸配列を有し、イヌ抗体のH鎖定常領域が配列番号４のアミノ酸配列を有する請求項８記載の抗体。

[請求項11] ウシ抗体のL鎖定常領域が配列番号１００のアミノ酸配列を有し、ウシ抗体のH鎖定常領域が配列番号１０２のアミノ酸配列を有する請求項９記載の抗体。

[請求項12] L鎖２本とH鎖２本の４本鎖構造を持つ請求項１～１１のいずれかに記載の抗体。

[請求項13] 請求項１～１２のいずれかに記載の抗体を有効成分として含む、医薬組成物。

[請求項14] がん及び／又は感染症の予防及び／又は治療のための請求項１３記載の医薬組成物。

[請求項15] がん及び／又は感染症が、腫瘍性疾患、白血病、ヨーネ病、アナプラズマ病、細菌性乳房炎、真菌性乳房炎、マイコプラズマ感染症（例えば、マイコプラズマ性乳房炎、マイコプラズマ性肺炎など）、結核、小型ピロプラズマ病、クリプトスポリジウム症、コクシジウム症、トリパノソーマ病及びリーシュマニア症からなる群より選択される請求項１４記載の医薬組成物。

[請求項16] (a’）QSLLYSENQKDY（配列番号３７）のアミノ酸配列を有するCDR1、WATのアミノ酸配列を有するCDR2及びGQYLVYPFT（配列番号３８）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖をコードするDNAと、(b’）GYTFTSNF（配列番号３９）のアミノ酸配列を有するCDR1、IYPEYGNT（配列番号４０）のアミノ酸配列を有するCDR2及びASEEAVISLVY（配列番号４１）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域とラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖をコードするDNAとを含む、人工

遺伝子DNA。

[請求項17] 請求項１６記載の人工遺伝子DNAを含むベクター。

[請求項18] 請求項１７記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

[請求項19] 請求項１８記載の宿主細胞を培養し、培養物から抗PD-L1抗体を採取することを含む、抗体の製造方法。

[請求項20] QSLLYSENQKDY（配列番号３７）のアミノ酸配列を有するCDR1、WATのアミノ酸配列を有するCDR2及びGQYLVYPFT（配列番号３８）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖をコードするDNA。

[請求項21] GYTFTSNF（配列番号３９）のアミノ酸配列を有するCDR1、IYPEYGNT（配列番号４０）のアミノ酸配列を有するCDR2及びASEEAVISLVY（配列番号４１）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖をコードするDNA。