

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5654989号  
(P5654989)

(45) 発行日 平成27年1月14日 (2015. 1. 14)

(24) 登録日 平成26年11月28日 (2014. 11. 28)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

G O 1 N 33/53 (2006. 01)

G O 1 N 33/53 Z N A D

G O 1 N 33/533 (2006. 01)

G O 1 N 33/533

請求項の数 9 (全 58 頁)

(21) 出願番号	特願2011-519076 (P2011-519076)	(73) 特許権者	511019546
(86) (22) 出願日	平成21年7月20日 (2009. 7. 20)		フィブロスタチン ソシエダ リミターダ
(65) 公表番号	特表2011-528559 (P2011-528559A)		FIBROSTATIN, SOCIEDA
(43) 公表日	平成23年11月24日 (2011. 11. 24)		D LIMITADA
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/005258		スペイン国 E-46005 バレンシア
(87) 国際公開番号	W02010/009856		セー/ コンデ デ アルテア 8-7
(87) 国際公開日	平成22年1月28日 (2010. 1. 28)	(74) 代理人	100068755
審査請求日	平成24年7月9日 (2012. 7. 9)		弁理士 恩田 博宣
(31) 優先権主張番号	61/082, 741	(74) 代理人	100105957
(32) 優先日	平成20年7月22日 (2008. 7. 22)		弁理士 恩田 誠
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100142907
(31) 優先権主張番号	61/085, 211		弁理士 本田 淳
(32) 優先日	平成20年7月31日 (2008. 7. 31)	(72) 発明者	サウス、ファン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		スペイン国 E-46005 バレンシア
			コンデ デ アルテア 8 7アー
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グッドパスチャー抗原結合タンパク質およびその検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液中を循環する 77kD グッドパスチャー抗原結合タンパク質 (GPBP) を検出する方法であって、

(a) GPBP 結合分子の 77kD GPBP に対する選択的結合を促進する条件下で、前記 77kD GPBP に結合する前記 GPBP 結合分子と血漿試料とを接触させること

、

(b) 非結合 GPBP 結合分子、血漿、またはそれら両方を除去すること、および

(c) 前記 GPBP 結合分子と、前記血漿試料中の前記 77kD GPBP との間の複合体形成を検出すること、を含む方法。

【請求項 2】

前記 77kD GPBP は、配列番号 4 によるアミノ酸配列を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記 GPBP 結合分子が抗体を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記方法は、ヒト血漿からの天然の循環する 77kD GPBP を検出することを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記検出することは、ELISA、免疫蛍光法、フローサイトメトリー、およびクロマ

トグラフィからなる群から選択される技術を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記血漿試料は、自己免疫疾患を有すると疑われるヒト対象から得られる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記自己免疫疾患は、グッドパスチャー症候群および免疫複合体型糸球体腎炎からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記方法は、自己免疫疾患を有すると疑われるヒト対象の診断に使用される、請求項 6 または 7 に記載の方法。

10

【請求項 9】

尿グッドパスチャー抗原結合タンパク質 (GPBP) を検出する方法であって、  
 (a) 77 kD GPBP または 91 kD GPBP に対する GPBP 結合分子の選択的結合を促進する条件下で、前記 77 kD GPBP または 91 kD GPBP に結合する前記 GPBP 結合分子と尿試料とを接触させること、  
 (b) 非結合 GPBP 結合分子を除去すること、および  
 (c) 前記尿試料中の前記 77 kD GPBP または 91 kD GPBP と、前記 GPBP 結合分子との間の複合体形成を検出すること、  
 を含む方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はグッドパスチャー抗原結合タンパク質に関する。

【背景技術】

【0002】

(相互参照)

本出願は、米国特許仮出願番号 61 / 082741 (2008 年 7 月 22 日付で出願) 及び 61 / 085211 (2008 年 7 月 31 日付で出願) の利益を主張し、どちらの出願もその全体を本明細書に援用する。

30

(背景技術)

基底膜コラーゲン IV の 3 鎖の非コラーゲン様 (NC1) ドメイン [3 (IV) NC1] のコンフォメーションは、一部分においてリン酸化に依存している。グッドパスチャー抗原結合タンパク質 (GPBP) (特許文献 1 および 2) は、その超分子集合の間の 3 (IV) NC1 ドメインの構造異性化を触媒し、その結果、基底膜で複数の 3 (IV) NC1 配座異性体を生成し安定化させる、新規な非従来型のタンパク質キナーゼである。GPBP レベルの上昇は、グッドパスチャー (「GP」) 疾患に関与する自己免疫反応をもたらす、非耐性化 3 (IV) NC1 配座異性体の産生と関連する。GP 患者において、IV 型コラーゲン 3 鎖の非コラーゲン様 C 末端ドメイン (NC1) (「グッドパスチャー抗原」又は「GP 抗原」) に対する自己抗体は、急速進行性糸球体腎炎および多くの場合に肺出血を引き起こし、これは GP 症候群の 2 つの基本的な臨床症状である。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】WO 00 / 50607

【特許文献 2】WO 02 / 061430

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

GPBP の同定は、自己免疫疾患、癌、タンパク質の誤った折りたたみが関与する障害

50

、および異常なアポトーシスを治療するための化合物の同定法を提供し、これらの障害の可能性のある治療法も提供する。従って、新規 G P B P アイソフォームの同定は、少なくともこれらの分野において有利であろう。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 5 】

第 1 の態様において、本発明は、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる 9 0 % 又はそれより高い純度の単離ポリペプチド ( 9 1 k D G P B P ) を提供する。

第 2 の態様において、本発明は、一般式 X - 配列番号 2 ( X は検出可能なポリペプチドである ) を有する実質的に精製された組換え型ポリペプチドを提供する。この態様の好ましい一実施形態において、検出可能なポリペプチドは、蛍光ポリペプチド及び結合対のポリペプチドメンバーからなる群から選択される。別の態様において、本発明は、本発明のこの第 2 の態様のポリペプチドをコードする実質的に精製された核酸を提供する。

【 0 0 0 6 】

第 3 の態様において、本発明は、配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリペプチド ( 9 1 k D G P B P ) をコードする実質的に精製された核酸を提供する。好ましい一実施形態において、実質的に精製された核酸は、配列番号 1 の核酸、又はその m R N A 産物からなる。

【 0 0 0 7 】

第 4 の態様において、本発明は、本発明の任意の態様の実質的に精製された核酸を含む組換え型発現ベクターを提供する。

第 5 の態様において、本発明は、本発明の組換え型発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。

【 0 0 0 8 】

第 6 の態様において、本発明は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する実質的に精製されたポリペプチド ( 9 1 k D G P B P ) 又は配列番号 4 を含む実質的に精製されたポリペプチド ( 7 7 k D G P B P ) を提供し、この場合、配列番号 2 又は配列番号 4 のポリペプチドは、3 0 5 - 3 4 4 番目のアミノ酸残基 G G P D Y E E G P N S L I N E E E F F D A V E A A L D R Q D K I E E Q S Q S E K ( 配列番号 1 0 ) ( 番号付けは 7 7 k D G P B P 内の位置に基づく ) に直接的及び / 又は間接的に関与する 1 以上の翻訳後修飾 ( P T M ) を有する。好ましい一実施形態において、1 以上の P T M は共有結合 P T M を含む。別の好ましい実施形態において、1 以上の P T M は、3 0 5 - 3 4 4 番目のアミノ酸 ( 配列番号 1 0 ) 内に共有結合 P T M を含む。好ましい一実施形態において、1 以上の P T M は、3 2 0 - 3 2 7 番目の残基 ( E E F F D A V E 、配列番号 5 ) に直接的及び / 又は間接的に関与する。別の好ましい実施形態において、1 以上の P T M は、3 2 0 - 3 2 7 番目の残基 ( E E F F D A V E 、配列番号 5 ) 内に 1 以上の共有結合 P T M を含む。この態様の様々な好ましい実施形態において、実質的に精製されたポリペプチドは、配列番号 2 ( 9 1 k D G P B P ) 又は配列番号 4 ( 7 7 k D G P B P ) のアミノ酸配列を有するか、またはこれからなる。

【 0 0 0 9 】

第 7 の態様において、本発明は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する実質的に精製されたポリペプチド ( 9 1 k D G P B P ) 又は配列番号 4 を含む実質的に精製されたポリペプチド ( 7 7 k D G P B P ) を提供し、この場合、配列番号 2 又は配列番号 4 のポリペプチドは、3 7 1 - 3 9 6 番目の残基 P Y S R S S S M S S I D L V S A S D D V H R F S S Q ( 配列番号 9 ) ( 番号付けは 7 7 k D G P B P 内の位置に基づく ) に直接的及び / 又は間接的に関与する 1 以上の P T M を含む。好ましい一実施形態において、1 以上の P T M は、共有結合 P T M を含む。別の好ましい実施形態において、1 以上の P T M は、アミノ酸 3 7 1 - 3 9 6 ( 配列番号 9 ) 内に共有結合 P T M を含む。好ましい一実施形態において、1 以上の P T M は、直接的及び / 又は間接的に 3 8 8 - 3 9 2 残基 ( D D V H R 、配列番号 6 ) に関与する。別の好ましい実施形態において、1 以上の P T M は、3 8 8 - 3 9 2 残基 ( 配列番号 6 ) 内に 1 以上の共有結合 P T M を含む。別の好ましい実施形

10

20

30

40

50

態において、ポリペプチドは、305 - 344 番目のアミノ酸残基 G G P D Y E E G P N S L I N E E E F F D A V E A A L D R Q D K I E E Q S Q S E K (配列番号 10) (番号付けは 77 k D G P B P 内の位置に基づく) に直接的及び / 又は間接的に関与する 1 以上の P T M をさらに含み、好ましくは 1 以上の P T M は共有結合 P T M を含み、なお一層好ましくは 1 以上の P T M は、アミノ酸 305 - 344 (配列番号 10) 内に共有結合 P T M を含む。別の好ましい実施形態において、1 以上の P T M は、直接的又は間接的に 320 - 327 番目の残基 (E E F F D A V E、配列番号 5) に関与する。別の好ましい実施形態において、1 以上の P T M は、320 - 327 番目の残基 (E E F F D A V E、配列番号 5) 内に 1 以上の共有結合 P T M を含む。この態様の様々な好ましい実施形態において、実質的に精製されたポリペプチドは、配列番号 2 (91 k D G P B P) 又は配列番号 4 (77 k D G P B P) のアミノ酸配列を有するか、またはこれからなる。

10

#### 【0010】

第 8 の態様において、本発明は、本発明の第 6 又は第 7 の態様のポリペプチドと選択的に結合する、実質的に精製されたモノクローナル抗体を提供する。

第 9 の態様において、本発明は、配列番号 2 のポリペプチドと特異的に結合するが、配列番号 4 のポリペプチドとは結合しない、実質的に精製されたモノクローナル抗体を提供する。好ましい一実施形態において、モノクローナル抗体は、アミノ酸配列 D G W K G R L P S P L V L L P R S A R C (配列番号 7) 内のエピトープと結合する。

#### 【0011】

第 10 の態様において、本発明は、血液中を循環するグッドパスチャー抗原結合タンパク質 (G P B P) を検出する方法であって、

20

(a) G P B P 結合分子の G P B P に対する選択的結合を促進する条件下で、G P B P 結合分子と血漿試料を接触させること、

(b) 非結合 G P B P 結合分子を除去すること、および

(c) G P B P 結合分子と血漿試料中の G P B P との間の複合体形成を検出すること、を含む方法を提供する。

#### 【0012】

第 11 の態様において、本発明は、尿グッドパスチャー抗原結合タンパク質 (G P B P) を検出する方法であって、

(a) 尿試料を G P B P 結合分子と、G P B P 結合分子の G P B P に対する選択的結合を促進する条件下で接触させること、

30

(b) 非結合 G P B P 結合分子を除去すること、および

(c) 尿試料中の G P B P 結合分子と G P B P との間の複合体形成を検出すること、を含む方法を提供する。

#### 【0013】

第 12 の態様において、本発明は、天然の 77 k D G P B P を単離する方法であって、

(a) 血漿試料を硫酸アンモニウム沈殿させること、

(b) 硫酸アンモニウム沈殿した血清試料に対してイオン交換クロマトグラフィ (I E C) を実施すること、

40

(c) 天然の 77 k D G P B P を含む I E C 画分を同定すること、

(d) 天然の 77 - G P B P を含む I E C 画分をゲル濾過クロマトグラフィ (G F C) すること、および

(e) 天然の 77 k D G P B P を含む G F C 画分を同定すること、を含む方法を提供する。

#### 【0014】

第 13 の態様において、本発明は、天然の 91 k D G P B P を単離する方法であって、

(a) 尿試料を塩析沈殿すること、

(b) 塩析タンパク質試料に対してダブルイオン交換クロマトグラフィ (I E C) を実施

50

すること、および

(c) 天然の 91 kD GPBP を含む IEC 画分を同定すること、を含む方法を提供する。

#### 【0015】

第14の態様において、本発明は、天然の GPBP アイソフォームを単離する方法であって、

(a) 血漿試料又は尿試料を、天然の GPBP と選択的に結合する GPBP 結合分子を含むイムノアフィニティークラムに通すこと、

(b) イムノアフィニティークラムから血漿又は尿試料からの非結合タンパク質を洗い流すこと、および

(c) 前記カラムから天然の GPBP アイソフォームを溶出させること、を含む方法を提供する。

#### 【0016】

好ましい一実施形態において、これらの方法は、例えば、以下の実施例においてさらに詳細に開示するように、天然の 77 kD GPBP 及び天然の 91 kD GPBP を、それぞれ血漿及び尿から実質的に精製するために使用できる。別の好ましい実施形態において、GPBP 結合分子は GPBP 抗体を含む。別の好ましい実施形態において、抗体は本発明の新規モノクローナル抗体を含む。別の好ましい実施形態において、溶出ステップは、変性溶出緩衝液の使用を含む。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0017】

【図1】COL4A3BPは、77 kDa、91 kDa 及び 120 kDa のポリペプチドをコードする。Aにおいて、FLAG標識 GPBP 又は GPBP 26 / CERT (10 - 20 ng) を、示された抗体を用いたウェスタンブロットによって分析した。Bにおいて、細胞抽出物 (50 µg) をAにおけるのと同様に分析した。Cにおいて、対照細胞 (-) から又は pc - n4 ' を発現する細胞からの抽出物 (10 µg) をAにおけるのと同様に分析した。Dにおいて、非トランスフェクト細胞 (-) から又は示された siRNA 発現プラスミドでトランスフェクトされた細胞からの抽出物 (50 µg) をAにおけるのと同様に分析した。グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) をローディング対照および siRNA 特異性として使用した。mAb e26 と天然又は組換え型ポリペプチドとの反応性は、GPBP pep1 (20 µM) を抗体阻害ペプチドとして使用する場合に完全に消失した (非図示)。この図及び以下の図において、数字及び線分又は矢印は、それぞれ、MW標準又は反応性ポリペプチドのサイズ (kDa) 及び位置を示す。この図および以下の図に示す結果は、少なくとも2つの独立した実験を代表するものである。

【図2】91 kDa 及び 120 kDa の GPBP ポリペプチドは、mRNA 非標準翻訳開始の産物である。Aは、示されたプラスミドを構築するために使用した cDNA の略図である。Bにおいて、細胞抽出物 (10 µg) (エキソビボ) 又は示されたプラスミド構築物を発現する個々の転写 / 翻訳混合物 (インビトロ) を、mAb e26 (エキソビボ) を用いたウェスタンブロット又はフルオログラフィー (インビトロ) によって分析した。非トランスフェクト細胞からの溶解物 (エキソビボ) 又はプラスミドを含まない混合物 (インビトロ) を対照として使用した。Cにおいて、GPBP の N 末端オープン・リーディング・フレーム (ORF) の配列 (配列番号 15) を 1 文字コードで表示し、対応する mRNA ヌクレオチド配列 (配列番号 14) を大文字で表示する。灰色および黒色の文字は、それぞれ 5' - UTR 及び ATR を示す。枠で囲んだのは、標準及び非標準翻訳開始のコドン及び残基である。Ab24 によって標的とされるペプチド配列を灰色で強調する。右側の負の数は、標準翻訳開始部位 (AUG 又は Met, +1) からのコドン又は残基の位置を意味する。Dにおいて、示された位置に終止コドンの有さないか (-) 又は有する、示されたプラスミド構築物を発現しない細胞 (対照) 又は発現する細胞からの抽出物 (10 µg) を、示された抗体を用いたウェスタンブロットによって分析した。Eにおいて

10

20

30

40

50

、部分的に精製された細胞抽出物(50 µg)を、示された反応種及び非反応性F(ab)<sub>2</sub>Ab20(Cont)を用いたウェスタンブロットによって分析した。

【図3】91 kDa及び120 kDaのGPBPアイソフォームは不溶性膜結合ポリペプチドである。Aにおいて、無傷細胞を、GPBP-Alexa Fluor 647抗体(GPBP-AF647)とともに、GPBP pep1又は等モル量の非関連性ペプチド(Cont pep)及び生細胞のミトコンドリア染色のためのローダミン123の存在下でインキュベートし、共焦点顕微鏡法によって分析した。スケールバーは21 µMである。Bにおいて、細胞を分離し、ビオチニル化GPBP抗体の非存在下(対照)又は存在下(GPBP)でブロッキング溶液とともにインキュベートした。細胞表面結合抗体は、ストレプトアビジン-FITC及びフローサイトメトリーを用いて検出した。対照として、平行培養物(parallel culture)を同じ抗体とともにGPBP pep1の存在下(GPBP+GPBP pep1)又は等モル量の非関連性ペプチドの存在下(GPBP+Cont pep)でインキュベートし、同様に分析した。Cにおいて、同様の量(10 µg)の示された細胞画分を、示されたタンパク質の抗体を用いたウェスタンブロットにより分析した。本発明者等は、細胞区画マーカーとして：ミトコンドリアについてはピルビン酸デヒドロゲナーゼ(PDH)、リソソームについてはカテプシンD、ミクロソームについてはプリオンタンパク質(PrP)、および核及びサイトゾルについては核因子カッパB(p65)を使用した。GPBP及びGPBP 26/CERT検出のために、本発明者等は、mAb e26及びmAb 14をそれぞれ使用した。本発明者等は、サイトゾルにおいて77 kDaのGPBPの発現を検出しなかったので、この区画におけるmAb 14反応性は、GPBP 26/CERTに起因すると考えることができる。

【図4】77 kDaのGPBPアイソフォームは、培養細胞においてIV型コラーゲンと相互作用する。Aにおいて、HEK293又はHEK293-FLAG-3(IV)細胞を架橋し、溶解させ、FLAG抽出した。50マイクログラムの細胞溶解物(インプット)又は対応するFLAG-免疫沈降物質(IP FLAG)を、逆架橋(reversed cross-link)し、クマシーブルー染色又はGPBP rを用いたウェスタンブロットによって分析した。FLAG-免疫沈降物(矢印)中の主な特異的ポリペプチドを切除し、MALDI/TOF/TOF質量分析法によって同定した。Bにおいて、HEK293(-)又はHEK293-FLAG-3(IV)(+)細胞を、pcDNA3(-)又はpc-n4'(+)でトランスフェクトし、架橋し、処理し、示された抗体を用いたウェスタンブロットによりAにおけるのと同様に分析した。

【図5】77 kDaのGPBPの細胞外区画への排出。Aにおいて、HeLa細胞を示されたプラスミド構築物でトランスフェクトし、示されたタンパク質を標準的間接免疫蛍光法によって可視化した。DNAを、核視覚化のために4'-6'-ジアミノ-2-フェニルインドール(DAPI)で染色した。原倍率×400。BおよびCにおいて、示されたプラスミド構築物(溶解物)を発現する細胞由来の抽出物(10 µg)または対応する培地由来のFLAG-免疫沈降物(培地IP)を、示された抗体を用いたウェスタンブロットによって分析した。

【図6】91 kDa GPBPは、培養細胞における77 kDa GPBP分泌を調節する。Aにおいて、組換え91 kDa GPBPを発現するか(c8)又は発現しない(c19)2つの独立したクローン由来の抽出物(10 µg)を、天然の91 kDa GPBPとあまり反応しないmAb 14抗体を用いたウェスタンブロットによって分析した(図1B)。Bにおいて、同じクローンをpc-FLAG-GPBPでトランスフェクトし、細胞抽出物(溶解物)又は対応する培地由来のFLAG-免疫沈降物(培地IP)を、示された抗体を用いたウェスタンブロットによって分析した。c8と類似した組換え91 kDaのGPBPのレベルを発現する独立したHEK293クローンであるc14を分析すると、同様の結論が得られた(非図示)。

【図7】GPBPではなくGPBP 26/CERTがスフィンゴミエリナーゼ細胞処理に対して感受性である。Aにおいて、HeLa細胞を示されたプラスミド構築物でトラン

10

20

30

40

50

スフェクトし、スフィンゴミエリナーゼで処理するか(+)又は処理せず(-)、溶解させ、FLAG-免疫沈降させ、FLAG抗体(bSMase)を用いたウェスタンブロットによって分析した。未処理細胞由来の免疫沈降物をホスファターゼとともにインキュベートするか(+)又はインキュベートせず(-)、同様に分析した(Pase)。本発明者等は8-12%勾配ゲル及び広範囲電気泳動(extensive electrophoresis)を用いてGPBP 26/CERTのリン酸化型及び脱リン酸化型を分離し、ウェスタンブロット及びデンシトメトリーによってそれらの相対的存在量を推定した。Bにおいて、Aにおけるのと同じ細胞をメタノール/アセトンによって固定し、抗FLAG-FITC抗体(緑)及びDAPI(青)で二重標識し、直接免疫法によって分析した。原倍率×400。

10

【図8】循環する77kDa GPBPのレベルは、グッドパスチャー患者及び免疫複合体系球体腎炎の動物モデルにおいて上方調節される。Aにおいて、イムノアフィニティークロマトグラフィーによってグッドパスチャー患者血漿交換から単離された物質を、GPBP特異性抗体の存在下(GPBP)又は非存在下(対照)でのウェスタンブロットによって分析した。Bは、組換えGPBPを用いて示された物質および方法におけるのと同様に実施したELISAから得られた標準曲線を表すプロットである。C及びDは、同様のELISAによって測定された任意単位(A.U.)での蛍光強度(I.F.)の散布図である。健常なドナー(対照)、グッドパスチャー患者(GP)、および示された月齢のNZWマウスから得た血清を1:10に希釈した。血清の非存在下での蛍光をバックグラウンドと見なし、個々の値から差し引いた。どちらの系においても、 $P < 0.001$ であった。線分は、各系の平均を表し、円は個々の試料の平均値を表す。A-Dにおいて、GPBP<sub>r</sub>は捕捉抗体であり、GPBP<sub>a</sub>bは検出抗体であった。

20

【図9】mAb 14の結合部位は、GPBPのFFATモチーフに位置する。Aにおいて、1文字コードで表されているのは、GPBP(残基316-333)(配列番号8)におけるFFATモチーフ及びフランキング領域の一次構造並びにGPBP<sub>FFAT</sub>(配列番号29)におけるホモロガスな領域であり、図中、点線はFFATモチーフ(枠中)内の欠失残基を示す。Bにおいて、示されたタンパク質を発現する細胞抽出物(10μg)を、示された抗体を用いたウェスタンブロットによって分析した。

【図10】組換えGPBP発現は、サイトゾルにおけるGPBPポリペプチドの蓄積を誘発する。細胞を示されたプラスミド構築物でトランスフェクトし、トランスフェクションの一日後に集め、実施例1の物質および方法で示されたように分別に付し、示された抗体を用いて図3Cにおけるのと同様にウェスタンブロットによって分析した。矢印及び数字は、異なるGPBPポリペプチドの位置及びM<sub>r</sub>(kDa)を示す。120kDaポリペプチドは、主にリソソーム分画において見いだされ、少量でミクロソーム分画において見いだされ、このことは分泌経路において生じた91kDaの共有結合修飾型であることをさらに示唆する。さらに観察されることとしては、サイトゾル中に存在する91kDaポリペプチドに対してmAb e26が示す比較的低い反応性(ポリペプチドがサイトゾル又はミクロソーム中に存在する場合、mAb e26をmAb 14反応性と比較する-150,000×g)が挙げられる。

30

【図11】細胞外77kDa GPBPは、mAb e26とあまり反応しない。pc-FLAG-GPBPでトランスフェクトされた細胞を溶解させ、対応する培地をFLAG-免疫沈降に付した。同様の量の細胞抽出物(溶解物)又は免疫沈降物(培地IP)を、示された抗体を用いたウェスタンブロットによって分析した。

40

【図12】化学的技術を用いて血漿試料から単離されたGPBPのウェスタンブロット分析。約1.25mLのヒト血漿から部分的に精製されたGPBP(実施例2を参照)を、HRP標識mAb N27を用いて還元条件下でウェスタンブロットにより分析した。矢印及び数字は、反応性ポリペプチドの位置及び推定M<sub>r</sub>を示す。

【図13】イムノアフィニティークロマトグラフィーを用いて対照ドナーの尿から単離されたGPBP。250ミリリットルの対照ドナーからの尿(あらかじめ遠心分離によって精製し、Trisで中和)を、200μgのウサギポリクローナル抗GPBP抗体と結合さ

50

せたセファロース4Bの1mLカラム上にかけた。カラムを30mLのTBSで洗浄し、結合物質をGentle Immunopure (商標) Elution Buffer (Pierce)で溶出させた。溶出された物質をTBSに対して透析し、GPBP特異性ニワトリポリクローナル抗体 (GPBPch) 及びHRP標識抗ニワトリIgY (二次抗体) を用いたウェスタンブロットによってさらに分析した。二次抗体で同じ物質をロードした対照レーンを染色することによって、抗体特異性を確認した (Cont)。線分と数字又は矢印と数字は、それぞれ、MW標準 (左) 又はGPBPポリペプチド (右) の位置とサイズ (kDa) を示す。

【図14】尿試料中のGPBPを検出するための間接ELISA。尿中で希釈した組換えGPBP及び7人のドナー (1-7) からの尿試料をELISAプレート上に一夜4でコーティングした。プレートをPBS中3%BSAでブロックし、GPBP特異性ニワトリポリクローナル抗体 (GPBPch) 及びHRP標識抗ニワトリIgY (二次抗体) を用いて免疫検出を実施した。Amplex UltraRed試薬 (Invitrogen) を用いてプレートを発色した。Aには、示されたGPBP濃度対蛍光強度 (F.I.) (任意単位 (A.U.)) で表示) のlog-logスケールでの散布図を表す。Bには、均等目盛上にプロットされた示された濃度およびそれらの各F.I.値を用いて計算した線形回帰線を表し、これを用いてDでGPBP試料濃度を決定した。Cには、二次抗体 (Cont)、非特異的ニワトリIgY及び二次抗体 (IgY)、又はGPBPch及び二次抗体 (GPBPch) を用いてドナー試料を分析して得られた生データを表す。Dにおいて、表は、Bで得られた曲線を用いた対応する変換データを示す。

【図15】尿試料の塩析及びイオン交換クロマトグラフィ。遠心分離によって精製した400ミリリットルの尿を0.85MのNaClに一夜4で加え、10.000×gで30分間4にて遠心分離に付した。その後の分析に採用するために、上清の試料 (Spt 0.85M NaCl) を4で保存した。結果として得られたペレットを50mMのTris (pH7.5) 中に溶解させ、同緩衝液に対して透析し、0.7mLのCM樹脂で抽出し、非結合物質を0.5mLのDEAE樹脂でさらに抽出した。CM樹脂を1MのNaCl、50mMのTris (pH7.5) で溶出し (CM、1M NaCl)、DEAE樹脂を続いて0.35MのNaCl、50mMのTris (pH7.5) (DEAE、0.35M NaCl) 及び1MのNaCl、50mMのTris (pH7.5) (DEAE、1M NaCl) で溶出した。DEAE抽出の上清 (Spt CM/DEAE) を有する等量の各試料を、GPBP特異性ニワトリポリクローナル抗体及びHRP標識抗ニワトリIgY (GPBPch) を用いたウェスタンブロットによって分析した。非特異的反応性ポリペプチドを、HRP標識抗ニワトリIgY (Cont) のみを用いて平行分析を染色することによって同定した。線分と数字又は矢印と数字は、それぞれ、MW標準 (左) 又は抗GPBP抗体と特異的に反応し、Spt CM/DEAEにおいてのみ検出されたポリペプチド (右) の位置及びサイズ (kDa) を示す。

【図16】個々のN1-N28モノクローナル抗体を用いてHEK293細胞において産生された細胞内及び細胞外FLAG-GPBPのウェスタンブロット分析。上側の合成画像では、組換えFLAG-GPBPを発現するHEK293細胞からの全タンパク質抽出物10µgを、N1-N28抗体 (1-28) を用いたウェスタンブロットに付した。完全長組換えGPBPポリペプチドを表す約77kDaの主なポリペプチドと、低Mr (45-77kDa) の誘導ポリペプチドの変動し得る存在が観察された。下側の合成画像では、同じ抗体を、HEK293細胞を発現するFLAG-GPBPの培地から抗FLAG免疫沈降によって精製された細胞外組換えGPBP (77kDaのポリペプチド) に対して分析した (Revert et al., 2008 J. Biol. Chem. 283:30246-55)。完全長FLAG-GPBPポリペプチドを表す主なポリペプチド約77kDaが、二次抗体 (抗マウスIgG) と反応し免疫沈降性抗体 (マウス抗FLAG IgG) からの誘導産物であると思われる低Mrの少量の非特異的ポリペプチド (Conj) とともに検出された (非図示)。特に別段の記載がない限り、このウェスタンブロット及びその後のウェスタンブロットにおいて、1-28はN1-N28であり

10

20

30

40

50



、抗マウス - H R P 及び化学発光を発色目的で使用した。

【図 1 7】N 1 - N 2 7 モノクローナル抗体を用いた H E K 2 9 3 細胞抽出物のウェスタンブロット分析。5 0 μ g の H E K 2 9 3 細胞抽出物を、示された抗体を用いたウェスタンブロットによって分析した。抗体は、4 つの異なる G P B P 関連ポリペプチド、すなわち 7 7 k D a の標準的ポリペプチド、4 5 k D a の断片、8 8 k D a のバンド、及び 9 1 k D a のポリペプチド ( m A b e 2 6 によっても標的とされる ) を認識した。矢印によって示されるポリペプチドは、二次抗体 ( 抗マウス I g G H R P 標識 ) によって認識され、したがって G P B P 産物ではない。8 8 k D a のポリペプチドの起源は未知であるが、その M<sub>r</sub> は、これが 7 7 k D a の標準的ポリペプチドのリン酸化型であることを示唆する。

10

【図 1 8】G P B P 欠失変異体のクローニング。A において、G P B P ( 配列番号 4 ) の一次構造に関して、標準的 P C R 及び組換え D N A 手順によって得られた 1 3 の 3 ' 末端 F L A G - G P B P c D N A 欠失変異体 ( 1 - 1 3 ) の C 末端 ( 折れ曲がった矢印 ) を示す。B においては、欠失変異体 7 ( 上側の枠 ) 及び 8 ( 下側の枠 ) の C 末端領域を含む G P B P の配列を示す。各レーンにおいて、最後の残基の数字を表示する。1 は残基 2 8 5 - 3 0 4 が欠失した F L A G - G P B P 欠失変異体であり、同様に 2 - 4 変異体は、それぞれ残基 3 0 5 - 3 2 4、3 2 5 - 3 4 4 及び 3 4 5 - 3 6 4 が欠失している ( 配列番号 3 0 - 3 3 )。太字配列 ( 配列番号 8 ) のペプチドは、G P B P と結合する m A b 1 4 と有効に競合し、配列 A l a A l a V a l を下線の残基の代わりに含む G P B P 変異体は m A b 1 4 と反応しなかった。C において、個々の p C D N A 3 - F L A G - G P B P 1 ( 1 ) - p C D N A 3 - F L A G - G P B P 4 ( 4 ) でトランスフェクトされた H E K 2 9 3 細胞のタンパク質抽出物を、S D S - P A G E 及び示された抗体を用いたウェスタンブロットによって分析した。同様の結果が、領域 7 - 8 : N 4、N 7、N 9、N 1 1、N 1 4、N 2 5、N 2 7、N 2 8 ( N 2 2 と同様 ) ; 及び N 2、N 3、N 5、N 1 0、N 1 2、N 1 3 ( N 8 と同様 ) で表 1 に含まれる残りの抗体について得られた。N 1 6 抗体はマッピングしなかった。

20

【図 1 9】9 1 k D G P B P の配列 ( 配列番号 2 ) を示す。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 8】

本明細書で言及される全ての参照文献は、全体として参照することによって本明細書に組み込まれる。本出願内で、特に別段の記載がない限り、利用される技術は、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l ( S a m b r o o k , e t a l . , 1 9 8 9 , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s ) , G e n e E x p r e s s i o n T e c h n o l o g y ( M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , V o l . 1 8 5 , e d i t e d b y D . G o e d d e l , 1 9 9 1 . A c a d e m i c P r e s s , S a n D i e g o , C A ) , “ G u i d e t o P r o t e i n P u r i f i c a t i o n ” i n M e t h o d s i n E n z y m o l o g y ( M . P . D e u t s h c e r , e d . , ( 1 9 9 0 ) A c a d e m i c P r e s s , I n c . ) ; P C R P r o t o c o l s : A G u i d e t o M e t h o d s a n d A p p l i c a t i o n s ( I n n i s , e t a l . 1 9 9 0 . A c a d e m i c P r e s s , S a n D i e g o , C A ) , C u l t u r e o f A n i m a l C e l l s : A M a n u a l o f B a s i c T e c h n i q u e , 2 <sup>n</sup> d E d . ( R . I . F r e s h n e y . 1 9 8 7 . L i s s , I n c . N e w Y o r k , N Y ) , G e n e T r a n s f e r a n d E x p r e s s i o n P r o t o c o l s , p p . 1 0 9 - 1 2 8 , e d . E . J . M u r r a y , T h e H u m a n a P r e s s I n c . , C l i f t o n , N . J . ) , および A m b i o n 1 9 9 8 C a t a l o g ( A m b i o n , A u s t i n , T X ) などのいくつかの周知の参照文献のいずれかに見いだすことができる。

30

40

【0 0 1 9】

本明細書で用いられる場合、数詞を限定しない対象は、文脈で別段の明示の記載がない

50

限り、複数の対象を包含する。本明細書で用いられる「及び」は、別段明示の記載がない限り、「又は」と交換可能に用いられる。

【0020】

本出願で用いられる場合、「天然のタンパク質」という用語は、任意の翻訳後修飾（PTM）を有する、細胞によって自然に生産されるタンパク質を意味し、非変性タンパク質、又は変性タンパク質（たとえば、実質的に精製され、1以上の変性剤に付されて、たとえばSDS-PAGEゲルにかけられた、天然に生産されたタンパク質）を包含する。

【0021】

本出願で用いられる場合、「実質的に精製されたポリペプチド」とは、ポリペプチドが、そのインビボ細胞環境から分離されたことを意味する。単離されたポリペプチドが、ポリアクリルアミド、アガロース、およびクロマトグラフィ試薬などのゲル剤（gel agent）をも実質的に含まないことがさらに好ましい。

【0022】

文脈で別段の明示の記載がない限り、本発明の一態様に関して開示された実施形態を、本発明の他の態様および本発明の他の態様でも用いることができ、開示された他の実施形態との組み合わせで用いることができる。

【0023】

第1の態様において、本発明は、配列番号2のアミノ酸配列からなる90%又はそれより高い純度の単離されたポリペプチド（91kDa GPBP）を提供する。本発明者らは、WO2004/070025において先に提案された91kDaのGPBPの仮定された配列が正しくないことを見出し、本願で天然の91kDaのタンパク質を単離し、その正しいアミノ酸配列を見出し、これを配列番号2で示す。図19は、91kDa GPBPの配列を示し、太字の筆記体で下線付きの形態で、NからC末端まで、それぞれAb24、mAb14及びmAb e26のエピトープを含むアミノ酸残基を示す。標準的77kDa GPBP（配列番号4）の最初の残基（Met）を、図中では太字かつ枠で囲んで強調している。このように、91kDa及び77kDaのGPBPは、強調した「Met」残基からタンパク質の末端までのアミノ酸配列において一致する。以下で示す様に、本発明者らは、GPBPのmRNAが標準的（AUG）及び非標準（ACG）翻訳開始を受けて、それぞれ77kDa及び91kDaの2つの一次ポリペプチドを生成する有力な証拠を得た。この研究から得られる結果は、両生成物が分泌経路に入ることも裏付ける。しかし、77kDaが細胞外区画に達し、可溶性免疫沈降性形態で存在するのに対して、91kDaは、細胞膜と結合して主に不溶性のままであり、細胞膜の外面に到達する可能性が高い。この証拠は、120kDaのGPBPアイソフォームが91kDaのGPBPの共有的誘導産物であり（すなわち唯一の違いが翻訳後修飾である）、したがって91kDaのポリペプチドのアミノ酸配列を共有することを裏付ける。したがって、本明細書において用いられる場合、「91kDa GPBP」という用語は、91kDa及びその翻訳後修飾、たとえばこれらに限定されるものではないが、120kDaのGPBP、並びに91kDa及び120kDaのGPBPの凝集体を包含する。本発明は、91kDa GPBPが血漿及び尿において可溶性形態で存在することのさらなる証拠を提供し、91kDa GPBPが細胞膜から放出され得ることを明らかにする。本発明のこの態様のポリペプチドを、たとえば91kDa GPBPに対する抗体を産生するために使用することができ、GPBP活性を妨害する化合物の同定の標的として使用することができ、これによって、グッドパスチャー症候群をはじめとする様々な障害の有用な治療法となる。

【0024】

したがって、本発明者らのデータは、mRNA選択的翻訳開始は、分泌経路、細胞膜及び細胞外区画を包含する複数の場所へGPBPを向かわせる方法であるという概念を裏付ける。

【0025】

本発明のこの態様及び他のポリペプチド態様並びに実施形態において、ポリペプチドを用いて、たとえば、血清又は尿中に存在する天然のGPBPの異なるアイソフォームを検

10

20

30

40

50

出するための特異抗体を生成させることができ、これらはしたがって、たとえば自己免疫疾患及び他の障害の診断薬として使用することができる。本発明のポリペプチドは、たとえば、以下でさらに詳細に議論するように、様々な特定種類の天然のGPBPアイソフォームを阻害するための候補化合物を同定するため、並びにたとえば自己免疫及びタンパク質の誤った折りたたみが関与する障害を治療するための候補化合物を同定するための手段としても用いることができる。

#### 【0026】

本明細書で用いられる場合、「90%又はそれより高い純度」とは、夾雑タンパク質が単離されたポリペプチドの10%以下、様々な好ましい実施形態においては、単離されたポリペプチドの9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、又は0.5%以下を構成することを意味する（たとえば、配列番号2のアミノ酸配列からなる91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は99.5%、もしくはそれより高い純度の単離されたポリペプチド）。単離されたポリペプチドがポリアクリルアミド及びアガロースなどのゲル剤も実質的に含まないことがさらに好適である。さらなる好ましい実施形態において、単離されたポリペプチドは、溶液中で、凍結して、または乾燥粉末として存在する。好ましい一実施形態において、この第1の態様の単離されたポリペプチドは、場合によって、これらに限定されるものではないが、蛍光標識又は放射性標識をはじめとする検出可能な非ポリペプチド標識で標識される。

#### 【0027】

第2の態様において、本発明は、一般式 X - 配列番号2（Xは検出可能なポリペプチドである）を有するか、またはこれからなる実質的に精製された組換え型ポリペプチドを提供する。この態様において、91kD GPBP（配列番号2）の正しいアミノ酸配列は、検出可能なポリペプチドとの融合タンパク質として発現される。本発明のこの態様のポリペプチド、たとえば、91kD GPBPを細胞においてトラックするために用いたり、GPBP活性を妨害する化合物を同定するための検出可能な標的として用いたりすることができ、これによってグッドパスチャー症候群はじめとする様々な障害の有用な治療法となる。この態様において用いられる場合、「組換え型ポリペプチド」とは、検出可能なポリペプチドが、GPBP由来でないか、又はGPBP mRNAから発現されず、したがってヘテロローガスな検出可能なペプチドを正しい91kD GPBPポリペプチドと融合させることを意味する。本明細書において用いられる場合、「検出可能なポリペプチド」は、検出でき、したがって組換え型ポリペプチドの検出を可能にする、任意のヘテロローガスなペプチドである。好ましい一実施形態において、検出可能なポリペプチドは蛍光タンパク質を含む。当該技術分野で公知の任意の蛍光タンパク質を本発明で 사용할ことができる。たとえば、生物発光において刺胞動物のエネルギー伝達アクセプターとして作用する刺胞動物の緑色蛍光タンパク質は、蛍光指示薬における使用に好適な蛍光タンパク質である。緑色蛍光タンパク質（「GFP」）は、緑色に発光するタンパク質であり、青色蛍光タンパク質（「BFP」）は、青色に発光するタンパク質である。GFPは、北西太平洋クラゲ（オワンクラゲ（*Aequorea victoria*））、ウミシイタケ（レニラ・レニホルミス（*Renilla reniformis*））、及びフィアリジウム・グレガリウム（*Phialidium gregarium*）から単離された。Ward, W. W., et al., *Photochem. Photobiol.*, 35:803-808 (1982); 及び Levine, L. D., et al., *Comp. Biochem. Physiol.*, 72B:77-85 (1982) を参照。有用な励起及び発光スペクトルを有する様々なオワンクラゲ関連GFPは、オワンクラゲ由来の天然に存在するGFPのアミノ酸配列を修飾することによって改変されてきた。Prasher, D. C., et al., *Gene*, 111:229-233 (1992); Heim, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91:12501-04 (1994); U.S. Ser. No. 08/337,915 (1994年11月10日付で出願); 国際出願PCT/US95/14692 (1995年11月10日付で出願)

；及びU.S. Ser. No. 08/706,408(1996年8月30日付で出願)を参照。GFPのcDNAは、多くの他のタンパク質をコードするものと連結させることができ、結果として得られる融合物は、一般的に蛍光性であり、パートナータンパク質の生化学的特性を保有する。Cubitt, A. B., et al., Trends Biochem. Sci. 20:448-455(1995)を参照。突然変異生成の研究によって、シフトした励起または発光波長を有するGFP変異体が産生された。Heim, R. & Tsien, R. Y. Current Biol. 6:178-182(1996)を参照。好適な対、たとえばブルーシフトしたGFP変異体P4-3(Y66H/Y145F)及び改善された緑色変異体S65Tは、それぞれ蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)のドナー及びアクセプターとしての働きをすることができる。Tsien, R. Y., et al., Trends Cell Biol. 3:242-245(1993)を参照。

10

#### 【0028】

この第2の態様の別の好ましい実施形態において、検出可能なポリペプチドは、非GPBPエピトープを含み、これに対する抗体は商業的に入手可能であり、たとえば、これらに限定されるものではないが、FLAG(Sigma Chemical, St. Louis, MO)、myc(9E10)(Invitrogen, Carlsbad, CA)、6-His(Invitrogen; Novagen, Madison, WI)、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、及びHA(ヘマグルチニン)(Boehringer Mannheim Biochemicals)である。

20

#### 【0029】

本発明の第2の態様の実施形態の全てにおいて、単離されたポリペプチドは、好ましくは検出可能なポリペプチドと配列番号2のポリペプチド間にリンカー配列をさらに含む得る。この実施形態において、リンカーは、GPBPの一部でないか、またはGPBPMRNAによってコードされない。このようなリンカーは、任意の所望の長さのものであってよく、好ましくは存在するならば1-20アミノ酸、さらに好ましくは存在するならば1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、又は1-2アミノ酸である。たとえば、検出可能なポリペプチド及び91kD GPBP配列を最適に配置するため、及び検出可能なポリペプチドの除去を可能にするためにプロテアーゼ認識部位の特異的配列を含めるために、リンカーを用いることができる。本発明の第2の態様の実施形態の全てにおいて、単離されたポリペプチドは、N末端メチオニン残基又は異なる細胞及び細胞外区画へポリペプチドを送達するためのペプチド配列などの、発現に必要な任意の追加の残基をさらに含むことができる。

30

#### 【0030】

本発明の実質的に精製されたポリペプチドは、当業者に公知の任意の方法によって作製することができるが、好ましくは本明細書で提供される教唆に基づいた組換え手段によって作製される。たとえば、本明細書で開示される興味のあるコード領域は、組換え型発現ベクター中にクローンすることができ、次いでこれを用いて、宿主細胞によるタンパク質産生のために宿主細胞をトランスフェクトすることができる。

40

#### 【0031】

第3の態様において、本発明は、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド(91kD GPBP)をコードする実質的に精製された核酸を提供する。実質的に精製された核酸配列は、RNA又はDNAを含み得る。本明細書において用いられる場合、「実質的に精製された核酸」は、ゲノム又はcDNA配列においてこれらの通常の周囲の核酸配列から取り出されたものである。このような実質的に精製された核酸配列は、これらに限定されるものではないが、polyA配列、修飾Kozak配列、並びにエピトープタグ、排出シグナル、及び分泌シグナル、核局在化シグナル、及び細胞膜局在化シグナルをコードする配列をはじめとする、コードされたタンパク質の発現及び/又は精製を促進するために有用な追加の配列を含んでもよい。好ましい一実施形態において、実質的に精製さ

50

れた核酸コード領域は、配列番号1の核酸、又はそのmRNA産物からなる。別の好ましい実施形態において、本発明は、本発明の第二の態様において議論するように、一般式X - 配列番号2を含むか、またはこれからなる実質的に精製された組換え型ポリペプチドの任意の実施形態のポリペプチドをコードする、実質的に精製された核酸を提供する。

【0032】

第4の態様において、本発明は、プロモータと機能的に連結された本発明のいずれかの態様の実質的に精製された核酸を含む組換え型発現ベクターを提供する。「組換え型発現ベクター」は、核酸コード領域又は遺伝子と、遺伝子産物の発現を行うことができる任意のプロモータとを機能的に連結するベクターを含む。哺乳動物系において、開示された核酸配列の発現を行うために用いられるプロモータ配列は、構成的（これらに限定されるものではないが、CMV、SV40、RSV、アクチン、EFをはじめとする様々なプロモータのいずれかによって決定される）であっても、又は誘導的（これらに限定されるものではないが、テトラサイクリン、エクジソン、ステロイド反応性をはじめとする多くの誘導性プロモータのいずれかによって促進される）であってもよい。原核細胞のトランスフェクションに用いられる発現ベクターの構築も当該技術分野において周知であり、したがって、標準的技術によって行うことができる。（たとえば、Sambrook, Fritsch, and Maniatis, in: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Gene Transfer and Expression Protocols, pp. 109 - 128, ed. E. J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N. J.）、及びAmbion 1998 Catalog (Ambion, Austin, TXを参照)。発現ベクターは、エピソードとして、又は宿主染色体DNA中へ組込むことによるかのいずれかで、宿主生物において複製可能でなければならない。好ましい実施形態において、発現ベクターはプラスミドを含む。しかし、本発明は、ウイルスベクターなどの等しい機能を果たす他の発現ベクターを含むことが意図される。

【0033】

第5の態様において、本発明は、本明細書で開示された組換え型発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を提供し、この場合、宿主細胞は、原核生物又は真核生物のいずれかであり得る。細胞は一時的又は安定してトランスフェクトすることができる。このような発現ベクターの原核生物及び真核生物細胞中へのトランスフェクションは、これらに限定されるものではないが、標準的細菌形質転換、リン酸カルシウム共沈、エレクトロポレーション、又はリポソーム介在性、DEAEデキストラン介在性、ポリカチオン介在性若しくはウイルス介在性トランスフェクションをはじめとする当該技術分野で公知の任意の技術によって行うことができる。（たとえば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2<sup>nd</sup> Ed. (R. I. Freshney, 1987, Liss, Inc. New York, NY)を参照。

【0034】

第6の態様において、本発明は、配列番号2 (91kD GPBP) 又は配列番号4 (77kD GPBP) のアミノ酸配列を有する実質的に精製されたポリペプチドを提供し、この場合、配列番号2又は配列番号4のポリペプチドは、305 - 344番目のアミノ酸残基GGPDYEEGPNSLINEEFFDAVEAALDRQDKIEEQSQSEK (配列番号10) (番号付けは77kD GPBP内の位置に基づく) に直接的及び/又は間接的に関与する1以上の翻訳後修飾 (PTM) を有する。以下の実施例で開示するように、本発明者らは、天然の77kD及び91kD GPBPの第1の精製法を提供し、77kD及び91kD GPBPの組換え型と結合する既存のモノクローナル抗体は、精製された天然物とは結合しないことを確認し、77kD GPBPの組換え型と天

然型間及び 91 kD GPBP の組換え型と天然型間に存在する構造的な違いを検証した。本発明のこの態様のポリペプチドを、例えば天然の GPBP 型に対する抗体を産生するために使用することができ、また天然の GPBP 活性を妨害する化合物を同定するための標的として使用することができ、これによってグッドパスチャー症候群をはじめとする様々な障害の有用な治療法となる。好ましい一実施形態において、1 以上の PTM は、共有結合 PTM を含む。別の好ましい実施形態において、1 以上の PTM は、305 - 344 番目のアミノ酸（配列番号 10）内に共有結合 PTM を含む。好ましい一実施形態において、1 以上の PTM は、直接的及び / 又は間接的に 320 - 327 番目の残基（EEFFDAVE、配列番号 5）に關与する。別の好ましい実施形態において、1 以上の PTM は、320 - 327 番目の残基（EEFFDAVE、配列番号 5）内に共有結合 PTM を含む（番号付けは 77 kD GPBP 内の位置に基づく）。別の好ましい実施形態において、1 以上の PTM は、残基 320、321、及び / 又は 327 において存在するもう一つの PTM を含み、最も好ましくはこれらの残基で存在する 1 以上の PTM は、共有結合 PTM を含む。この態様の実施形態のいずれかのさらなる好ましい実施形態において、實質的に精製されたポリペプチドは、配列番号 2（91 kD GPBP）又は配列番号 4（77 kD GPBP）からなるアミノ酸配列を有する。

10

#### 【0035】

本明細書で用いられる場合、「翻訳後修飾」（PTM）という用語は、タンパク質の翻訳後のタンパク質の構造における修飾を意味する。好ましい一実施形態において、PTM は、これらに限定されるものではないが、カルボキシル化、メチル化、シトルリン化、リン酸化、グリコシル化、及び非定型イソアスパルチルの形成をはじめとする官能基の付加を含む。別の好ましい実施形態において、PTM は異性化を含み、構造変化に至る。

20

#### 【0036】

本明細書で用いられる場合、「直接的に」とは、PTM が特定の残基内で起こることを意味し、一方、「間接的に」とは、PTM が特定の残基の外側で起こるが、前記残基内の構造変化をもたらすことを意味する。

#### 【0037】

本開示の教唆に基づいた、配列番号 2 又は配列番号 4 の共有結合的に修飾されたポリペプチドを作製するのに好適な任意の方法、たとえば本明細書で開示される GPBP の天然源からの単離、及び GPBP の組換え産生とそれに続くアミノ酸残基の関連領域内の好適な共有結合修飾（当業者に公知の標準的方法使用）を用いることができる。

30

#### 【0038】

第 7 の態様において、本発明は、配列番号 2（91 kD GPBP）又は配列番号 4（77 kD GPBP）のアミノ酸配列を有する實質的に精製されたポリペプチドを提供し、この場合、配列番号 2 又は配列番号 4 のポリペプチドは、371 - 396 番目の残基 PYSRSSSMSSIDLVSASDDVHRFSSQ（配列番号 9）（番号付けは 77 kD GPBP 内の位置に基づく）を直接的及び / 又は間接的に含む 1 以上の PTM を含む。以下の実施例で開示するように、本発明者らは、天然の 77 kD 及び 91 kD GPBP の第 1 精製法を提供し、77 kD 及び 91 kD GPBP の組換え型と結合する既存のモノクローナル抗体は、精製された天然の 77 kD 及び 91 kD GPBP 型と結合しないことを確認し、77 kD 及び 91 kD GPBP の組換え型と天然型との間に存在する構造の違いを検証した。本発明のこの態様のポリペプチドを、たとえば、天然の GPBP に対する抗体を産生するために使用することができ、また天然の GPBP 活性を妨害する化合物を同定するための標的として用いることができ、これらを、グッドパスチャー症候群をはじめとする様々な障害の有用な治療法とする。好ましい一実施形態において、1 以上の PTM は、共有結合 PTM を含む。別の好ましい実施形態において、1 以上の PTM は、アミノ酸 371 - 396（配列番号 9）内に共有結合 PTM を含む。好ましい一実施形態において、1 以上の PTM は、直接的又は間接的に 388 - 392 番目の残基（DDVHR、配列番号 6）を有する。別の好ましい実施形態において、1 以上の PTM は、残基 388 - 392（配列番号 6）内に 1 以上の共有結合 PTM を含む。別の好ましい実

40

50

施形態において、ポリペプチドは、直接的又は間接的に320-327番目の残基(E E F F D A V E、配列番号5)を有する1以上のPTMをさらに含む。さらなる好ましい実施形態において、残基320-327内の1以上のPTMは、共有結合PTMである。この態様の様々な好ましい実施形態において、実質的に精製されたポリペプチドは、配列番号2(91kD G P B P)又は配列番号4(77kD G P B P)からなるアミノ酸配列を有する。配列番号2又は配列番号4の共有結合的に修飾されたポリペプチドを作製するための任意の好適な方法、例えば本明細書で開示されるG P B Pの天然源からの単離、及びG P B Pの組換え産生とそれに続くアミノ酸残基の関連領域内の好適な共有結合修飾(当業者に公知の標準的方法を使用)を用いることができる。

#### 【0039】

第8の態様において、本発明は、本発明の第6または第7の態様の実質的に精製されたポリペプチドと選択的に結合する実質的に精製されたモノクローナル抗体を提供する。先に開示したように、本発明者らは、実質的に精製された場合に既存のG P B P特異性モノクローナル抗体と結合しない天然の77kDa及び91kD G P B P種をはじめて単離した。たとえば、既存のモノクローナル抗体は、E L I S Aにおいて血漿又は尿試料中のG P B Pを検出せず、血漿又は尿G P B Pの精製に使用することもできない。したがって、本発明のモノクローナル抗体は、たとえば、尿又は血漿中のG P B P検出のためのE L I S Aに基づく分析及び血漿又は血清からのG P B Pの精製に有用である。本発明者らは、本明細書において、これらの天然の77kD G P B P及び天然の91kD G P B P種が翻訳後修飾され、これらのPTMの少なくとも一部は、実質的に精製された天然のG P B Pを既存のモノクローナルG P B P抗体に対して非反応性にするをさらに証明する。本発明のこの態様のモノクローナル抗体の例を以下の実施例に記載する。

#### 【0040】

本発明の「モノクローナル抗体」は、これらに限定されるものではないが、標準的モノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル、キメラモノクローナル、及びこれらの断片をはじめとする任意の種類モノクローナル抗体であり得る。

#### 【0041】

本明細書において用いられる場合、「実質的に精製された」とは、記載されたモノクローナル抗体が、実質的に精製された試料中、抗体の少なくとも80%を構成することを意味し、さらに好ましくは、少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上を構成することを意味する。

#### 【0042】

本明細書で用いられる場合、「選択的に結合する」とは、当業者には十分に理解されるように、1以上の他の生体分子、構造、細胞、組織などではなく、天然のG P B Pエピトープに対してG P B Pモノクローナル抗体を優先的に結合させることを意味する。

#### 【0043】

モノクローナル抗体は、脾臓細胞を動物から得ることによって産生することができる[Kohler and Milstein, Nature 256, 495-497(1975)を参照]。一例を挙げれば、興味のあるモノクローナル抗体(mAb)は、近交系マウスを天然の77kD G P B P、天然の91kDのG P B P、又はその抗原断片(これらに限定されるものではないが、PTM含有ペプチドE E F F D A V E(配列番号5)、D D V H R(配列番号6)、L I N E E E F F D A V E A A L D R Q(配列番号8)、P Y S R S S S M S S I D L V S A S D D V H R F S S Q(配列番号9)、及びG G P D Y E E G P N S L I N E E E F F D A V E A A L D R Q D K I E E Q S Q S E K(配列番号10)を有するか、またはこれらからなる1以上のエピトープを包含する)で免疫化することによって調製される。したがって、さらに好ましい実施形態において、モノクローナル抗体は、PTM含有E E F F D A V E(配列番号5)、D D V H R(配列番号6)、L I N E E E F F D A V E A A L D R Q(配列番号8)、P Y S R S S S M S S I D L V S A S D D V H R F S S Q(配列番号9)、及びG G P D Y E E G P N S L I N E E E F F D A V E A A L D R Q D K I E E Q S Q S E K(配列番号10)からなる群から選択

される 1 以上の P T M を含む 1 以上のエピトープを結合する。さらなる好ましい実施形態において、1 以上の P T M は共有結合 P T M である。別の好ましい実施形態において、モノクローナル抗体は、残基 3 2 0、3 2 1、及び / 又は 3 2 7 ( 番号付けは 7 7 k D G P B P に基づく ) において存在する 1 以上の P T M ( 好ましくは、共有結合 P T M ) を有するエピトープと結合する。

#### 【 0 0 4 4 】

一実施形態において、マウスを I P 又は S C 経路により、免疫反応を引き起こすために十分な量及び間隔で免疫化する。マウスに第 0 日に初回予防接種をし、約 3 - 約 3 0 週間休ませる。免疫化されたマウスを、静脈内 ( I V ) 経路により 1 回以上ブースター免疫化する。当該技術分野で公知の標準的手順によって免疫化されたマウスから脾臓を取り出すことによって、抗体陽性マウスからリンパ球を得る。脾臓リンパ球を適切な融合パートナーと、安定なハイブリドーマの形成を可能にする条件下で混合することによって、ハイブリドーマ細胞を生成させる。抗体産生細胞及び融合パートナー細胞をポリエチレングリコール中、約 3 0 % - 約 5 0 % の濃度で融合させる。融合したハイブリドーマ細胞を、当該技術分野で公知の手順により、ヒポキサンチン、チミジン及びアミノプテリンを添加したダルベッコの修飾イーグル培地 ( D M E M ) 中で成長させることによって選択する。上清液を成長陽性ウェルから集め、固相イムノラジオアッセイ ( i m m u n o r a d i o a s s a y ) などのイムノアッセイにより抗体産生についてスクリーンする。抗体陽性ウェルからのハイブリドーマ細胞を、Mac P h e r s o n , S o f t A g a r T e c h n i q u e s , i n T i s s u e C u l t u r e M e t h o d s a n d A p p l i c a t i o n s , K r u s e a n d P a t e r s o n , E d s . , A c a d e m i c P r e s s , 1 9 7 3 の軟寒天技術などの技術によってクローニングする。

#### 【 0 0 4 5 】

「ヒト化モノクローナル抗体」とは、マウスモノクローナル抗体などの非ヒトモノクローナル抗体から誘導されるモノクローナル抗体を意味する。あるいは、ヒト化モノクローナル抗体は、親の非ヒトモノクローナル抗体の抗原結合特性を保持するか、または実質的に保持するが、ヒトに投与された場合に親のモノクローナル抗体と比較して減少した免疫原性を示すキメラ抗体から誘導することができる。たとえば、キメラモノクローナル抗体は、ヒト及びネズミ抗体断片、一般的にヒト定常及びマウス可変領域を含み得る。ヒト化モノクローナル抗体は、これらに限定されるものではないが、( 1 ) 非ヒトモノクローナル抗体からの相補性決定領域をヒトフレームワーク及び定常領域上にグラフトすること ( 「ヒト化」 ) 、及び ( 2 ) 非ヒトモノクローナル抗体可変ドメインを移植するが、表面残基の置換によってヒト様表面でこれらを「覆う」こと ( 「被覆 ( v e n e e r i n g ) 」 ) をはじめとする当該技術分野で公知の様々な方法を用いて調製することができる。これらの方法は、たとえば、J o n e s e t a l . , N a t u r e 3 2 1 : 5 2 2 - 5 2 5 ( 1 9 8 6 ) ; M o r r i s o n e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , U . S . A . , 8 1 : 6 8 5 1 - 6 8 5 5 ( 1 9 8 4 ) ; M o r r i s o n a n d O i , A d v . I m m u n o l . , 4 4 : 6 5 - 9 2 ( 1 9 8 8 ) ; V e r h o e y e r e t a l . , S c i e n c e 2 3 9 : 1 5 3 4 - 1 5 3 6 ( 1 9 8 8 ) ; P a d l a n , M o l e c . I m m u n . 2 8 : 4 8 9 - 4 9 8 ( 1 9 9 1 ) ; P a d l a n , M o l e c . I m m u n o l . 3 1 ( 3 ) : 1 6 9 - 2 1 7 ( 1 9 9 4 ) ; 及び K e t t l e b o r o u g h , C . A . e t a l . , P r o t e i n E n g . 4 ( 7 ) : 7 7 3 - 8 3 ( 1 9 9 1 ) で開示されている。

#### 【 0 0 4 6 】

モノクローナル抗体を、従来技術を用いて断片化することができ、断片を全抗体についてと同じ方法で有用性についてスクリーンすることができる。たとえば、F ( a b ' ) <sub>2</sub> 断片は、抗体をペプシンで処理することによって生成させることができる。結果として得られる F ( a b ' ) <sub>2</sub> 断片を処理して、ジスルフィドブリッジを還元して F a b ' 断片を生成させることができる。F a b 断片は、I g G 抗体をパインで処理することによって得ることができ、F ( a b ' ) 断片は、I g G 抗体のペプシン消化を用いて得ることがで



きる。F ( a b ' ) 断片は、下記の F a b ' をチオエーテル結合又はジスルフィド結合によって結合させることによって生成させることができる。F a b ' 断片は、F ( a b ' ) 2 のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断することによって得られる抗体断片である。F a b ' 断片は、F ( a b ' ) 2 断片をジチオトレイトールなどの還元剤で処理することによって得ることができる。抗体断片ペプチドは、組換え細胞でのかかるペプチドをコードする核酸の発現によって生成させることもできる（たとえば、E v a n s e t a l . , J . I m m u n o l . M e t h . 1 8 4 : 1 2 3 - 3 8 ( 1 9 9 5 ) を参照）。たとえば、F ( a b ' ) 2 断片の一部をコードするキメラ遺伝子は、H 鎖の C H 1 ドメイン及びヒンジ領域をコードする D N A 配列と、それに続く翻訳終止コドンを含んで、このような切断された抗体断片分子を得ることができる。

10

#### 【 0 0 4 7 】

モノクローナル抗体断片の例としては、( i ) F a b 断片（本質的に V L 、 V H 、 C L 及び C H 1 ドメインからなる一価断片）、( i i ) F ( a b ) 2 及び F ( a b ' ) 2 断片（ヒンジ領域でジスルフィドブリッジにより結合した 2 つの F a b 断片を含む二価断片）、( i i i ) 本質的に V H 及び C H 1 ドメインからなる F d 断片；( i v ) 本質的に抗体の単一アームの V L 及び V H ドメインからなる F v 断片、( v ) 本質的に V H ドメインからなる d A b 断片（W a r d e t a l . , ( 1 9 8 9 ) N a t u r e 3 4 1 : 5 4 4 - 5 4 6 ）；並びに ( v i ) 1 以上の単離された C D R 又は機能的パラトープが挙げられる。

20

#### 【 0 0 4 8 】

抗体反応を生じさせるために、免疫原を典型的には非経口投与用の薬剤的に許容される担体と配合する。このような許容されるアジュバントとしては、これらに限定されるものではないが、フロインド完全、フロインド不完全、ミョウバン沈殿物（a l u m - p r e c i p i t a t e ）、コリネバクテリウム・パルバム（C o r y n e b a c t e r i u m p a r v u m ）及び t R N A を含む油中水エマルジョンが挙げられる。ポリペプチドの濃度並びにビヒクル及び他の成分の選択をはじめとする、かかる組成物の処方、当該分野の技術範囲内である。

#### 【 0 0 4 9 】

第 9 の態様において、本発明は、配列番号 2 のポリペプチドと特異的に結合するが、配列番号 4 のポリペプチドとは結合しない実質的に精製されたモノクローナル抗体を提供する。本発明のこのようなモノクローナル抗体は、これらに限定されるものではないが、尿又は血漿中の G P B P 検出のための E L I S A に基づく分析をはじめとする分析において、91 k D G P B P を 77 k D G P B P と識別するのに有用である。このようなモノクローナル抗体は、前記開示の方法を用い、配列番号 2 のポリペプチドにおいて存在するが配列番号 4 においては存在しないペプチド免疫源を使用して生成させることができる。このような免疫原は、抗体反応を生じさせるために好適な任意の長さを有するものであってよい。一実施形態例において、モノクローナル抗体を、D G W K G R L P S P L V L L P R S A R C（配列番号 7）を有するか、またはこれからなる免疫源に対して生成させる。このように、この実施形態において、モノクローナル抗体は、アミノ酸配列 D G W K G R L P S P L V L L P R S A R C（配列番号 7）内のエピトープと結合する。かかる抗体 A b 24 の例を以下で開示する。

30

40

#### 【 0 0 5 0 】

さらなる態様において、本発明は、本発明の第 8 又は第 9 の態様のモノクローナル抗体を発現する単離されたハイブリドーマ細胞を提供する。

本発明は、前述および以下で開示するような、本発明の抗体を作製する方法も提供する。

#### 【 0 0 5 1 】

第 10 の態様において、本発明は、循環するグッドパスチャー抗原結合タンパク質（G P B P）を検出する方法であって、

( a ) 血漿試料を、G P B P と結合する G P B P 結合分子と、G P B P 結合分子の G P B

50

Pに対する選択的結合を促進する条件下で接触させること、  
(b) 非結合GPBP結合分子を除去すること、および  
(c) GPBP結合分子と血漿試料中のGPBPとの間の複合体形成を検出すること、を含む方法を提供する。

【0052】

「血漿試料」とは、血漿、つまり血液の液体成分を意味し、たとえば、全血を遠心分離して血液細胞を除去することによって調製される。本明細書において用いられる場合、血漿試料は、血液凝固因子が除去された血清試料も含む。

【0053】

第11の態様において、本発明は、尿グッドパスチャー抗原結合タンパク質(GPBP)を検出する方法であって、

(a) 尿試料を、GPBPと結合するGPBP結合分子と、GPBP結合分子のGPBPに対する選択的結合を促進する条件下で接触させること、  
(b) 非結合GPBP結合分子を除去すること、および  
(c) 尿試料におけるGPBP結合分子とGPBPとの間の複合体形成を検出すること、を含む方法を提供する。

【0054】

尿試料は容易に得られ、尿中の検体測定は、当該技術分野で周知である。

「GPBP結合分子」は、1以上の他の生体分子、構造、細胞、組織等ではなく、GPBPと選択的に結合するペプチド又は核酸分子である。かかるGPBP結合分子の実施形態例としては、これらに限定されるものではないが、抗体、アプタマー、又は基質が挙げられる。本明細書において用いられる場合、「GPBP基質」は、GPBP、又はGPBP結合活性を保持するその断片と結合するGPBP生物活性の標的である。かかるGPBP基質としては、これらに限定されるものではないが、I-20(配列番号16)、GPBP相互作用タンパク質(GIP)(配列番号17-21)、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)およびその誘導体(配列番号22-25)、プリオンタンパク質(PrP)(配列番号26)、IV型コラーゲン3鎖NC1ドメイン(3(IV)NC1)(配列番号27)、及びアルツハイマー病ペータペプチド(A<sub>1-42</sub>)(配列番号28)が挙げられる。これらの基質のGPBP結合を証明する文献例は、米国特許第6,579,969号、第7,147,855号、及び第7,326,768号(その全体が本明細書において参照することによって組み込まれる)において見いだすことができる。

【0055】

下記実施例で開示されるように、本発明者らは、160kD、91kD、77kD、70kD、66kD、60kD、58kD、56kD、53kD、50kD、46kD、35kD及び34kDのGPBPアイソフォームをはじめとするGPBPの循環型および尿型、並びにその様々な凝集体を見いだした。したがって、第10及び第11の態様において、「GPBP」という用語は、これらに限定されるものではないが、77kD GPBP及び91kD GPBP、並びに160kD、60kD、58kD、56kD、53kD、50kD、46kD、35kD及び34kDの低分子量及び高分子量GPBPアイソフォーム、並びにその凝集体をはじめとする、GPBP選択的抗体と反応する全てのGPBPアイソフォームを意味する。

【0056】

「血漿試料」又は「尿試料」は、任意の好適な対象、好ましくは、これらに限定されるものではないが、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、又は家畜(ウシ、ヒツジなど)をはじめとする哺乳動物から得ることができる。最も好ましい実施形態において、血漿試料又は尿試料は、これらに限定されるものではないが、グッドパスチャー症候群及び/又は免疫複合体型糸球体腎炎をはじめとする自己免疫疾患を有することが疑われるヒト対象などのヒト対象から得られる。本明細書で開示されるように、本発明者らはヒト血漿から天然の循環する77kD GPBPを単離し、グッドパスチャー患者及び免疫複合体型糸球体腎炎の動物モデルにおいて増大したレベルを観察し、GPBP分泌がインビボで起こることを証明

10

20

30

40

50

し、G P B P の血清学的及び尿測定 of 臨床的有用性を明らかにした。

【 0 0 5 7 】

抗体は、前記のようなポリクローナル、モノクローナル、又はヒト化モノクローナルに関係なく任意の選択的 G P B P 抗体であり得るが、モノクローナル抗体が好ましい。一実施形態において、本発明の第 8 又は第 9 の態様の抗体を用いる。本発明の第 1 0 及び第 1 1 の態様の方法は、7 7 k D G P B P 又は 9 1 k D G P B P などの特異的 G P B P アイソフォームの分析を含み得、これらの実施形態において、これらに限定されるものではないが、本明細書で開示される選択的抗体をはじめとする、7 7 k D G P B P に関して選択的であるか、又は 9 1 k D G P B P に関して選択的である抗体を使用できる。最も好ましい実施形態において、本発明の第 1 0 及び第 1 1 の態様の方法において用いられる抗体は、本明細書で開示されるものなどの天然の G P B P アイソフォームと結合するものである。

10

【 0 0 5 8 】

抗体、アプタマー又は基質などの G P B P 結合分子の、血漿又は尿試料中の G P B P に対する結合を促進するために適した条件は、本明細書における教唆及び下記実施例に基づいて当業者が決定できる。例えば、抗体 - 抗原結合は、多くの場合、疎水性相互作用に依存し（いわゆる疎水結合）、したがってモル範囲などの高い塩濃度を用いて、非特異結合を還元し、特異的抗原 - 抗体結合を増大させることができる。場合によって、これらに限定されるものではないが、非結合又は緩く結合した血清タンパク質、高濃度血清タンパク質の結合を還元するための非特異結合の阻害剤、G P B P アイソフォームを含むことが知られている対照試料及び / 又は G P B P アイソフォームと結合しないことが知られている負の対照を除去するための 1 以上の洗浄ステップ、及び / 又は G P B P を有しない（例えば G P B P が欠失している）ことが知られている血清又は尿試料の包含をはじめとするさらなるステップを含めて、選択性及び特異性を増進してもよい。

20

【 0 0 5 9 】

本発明のこれらの第 1 0 及び第 1 1 の態様を用いて、これらに限定されるものではないが、E L I S A、免疫蛍光法、及びクロマトグラフィ（例えば側方流動分析であり、この分析では、抗体を表面上に固定し、血漿又は尿タンパク質を標識し、血漿又は尿中の G P B P に対する抗体の結合を可能にするために適した条件下で表面上を流動させる）をはじめとする標準的技術によって、血漿又は尿試料中の G P B P の存在について試験するのに使用することができる。一実施形態において、フローサイトメトリーとあわせて機能性ビーズ（B e c t o n D i c k i n s o n t e c h n o l o g y）を使用し、この技術は、生体液又は細胞 / 組織抽出物中のタンパク質のレベルを測定するための新たな方法である。特に、蛍光マトリックスで作られたビーズを 1 以上の特異的 G P B P 抗体でコーティングし、血漿試料と混合し、フィコエリトリンで標識された検出抗体とともにさらにインキュベートする。最後に、ビーズをフローサイトメトリープログラムによって分析し、このプログラムは、マトリックス蛍光発光及びフィコエリトリン発光による検体のレベルの測定値にしたがってビーズを選択する。3 0 までの異なる種類のビーズを同時に検出することができ、血球計算器によって判別することができる。この方法は、G P B P 抗体でコーティングされた特異的ビーズ種を他の検体の結合ペプチド（すなわち、自己抗体）でコーティングされた別のビーズ種と混合でき、同時に測定できるので、高感度及び性能と多様性とを兼ね備える。様々な検体の測定は、G P B P 測定の可能性を向上させることができる。一実施形態において、この技術は、（1 または複数の）G P B P アイソフォームの存在又は非存在のみを決定し得る。あるいは、この技術は定量的であってよく、試料中の興味のあるタンパク質又はペプチドの相対量についての情報を提供する。定量的目的に関しては、E L I S A が好ましい。

30

40

【 0 0 6 0 】

免疫複合体形成の検出は、標準的検出技術によって行うことができる。たとえば、免疫複合体の検出は、標識された抗体又は二次抗体を使用することによって行うことができる。標識の選択を包含するこのような方法は、当業者に公知である。（H a r l o w 及び L

50

ane、上記を参照)。あるいは、抗体を検出可能な物質と結合させることができる。「結合した」という用語は、検出可能な物質が抗体と物理的に結合していることを意味するために用いられる。好適な検出可能な物質としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質及び放射性物質が挙げられる。好適な酵素の例としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。好適な補欠分子族の例としては、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンが挙げられる。好適な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライド又はフィコエリトリンが挙げられる。発光物質の一例としては、ルミノールが挙げられる。好適な放射性物質の例としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 又は $^3\text{H}$ が挙げられる。

10

#### 【0061】

前述のように、本発明者らは、グッドパスチャー患者及び免疫複合体型系球体腎炎の動物モデルにおいて増大したレベルを観察し、GPBP分泌がインビボで起こることを証明し、GPBPの血清学的測定の臨床的有用性を明らかにした。従って、本発明のこの態様の方法は、たとえば、これらに限定されるものではないが、IgAネフロパシー、全身性紅斑性狼瘡及びグッドパスチャー疾患からなる群から選択される系球体腎炎を包含する)、炎症、及びERストレス介在性障害、並びに薬剤耐性癌をはじめとする、対照におけるGPBP介在性障害を検出するために用いることができる。これらの実施形態において、方法は、試験血清又は尿試料中で検出されるGPBPレベルを対照、例えば「正常」レベルのGPBPを有することが知られている血清若しくは尿試料からの対照、又は血清を得た対象からの血清若しくは尿中のGPBPについてあらかじめ測定された正常値と比較することを含む。様々な実施形態において、対照によって、組換えGPBP又は基準値を用いて標準曲線が得られる。血清又は尿試料中のGPBPの量の対照との比較において、対象に対して血清又は尿試料中のGPBPにおける増加(好ましくは、標準的統計分析技術を用いた統計的に有意な増加)は、1以上の前記障害の存在、又は1以上の障害の発症の危険性の増大を示し、これらは全て増大したGPBP発現と相関する。

20

#### 【0062】

増大したGPBP発現がIgAネフロパシー、免疫複合関連系球体腎炎を誘発すること、増大したGPBP発現がグッドパスチャー症候群発症と密接に関連すること、及び増大したGPBP発現が、タンパク質の間違った折りたたみを誘発し、ERストレス介在性細胞死を誘発する化学療法剤に対する癌細胞の耐性に関与することが先に開示されている。本発明の方法は従って、GPBPの存在に関する血清学的又は尿試験によってこれらの障害を診断する方法を提供する。従って、この方法は、1以上の抗体介在性障害(これらに限定されるものではないが、IgAネフロパシー、全身性紅斑性狼瘡及びグッドパスチャー疾患からなる群から選択される系球体腎炎を包含する)、炎症、ERストレス介在性障害、及び薬剤耐性癌に罹っているか、罹る危険性があるかのいずれかの個体を特定する。非制限的一実施形態において、当該方法は、化学療法レジメンの開始前又は開始後のいずれかの癌患者を試験するために用いることができ、GPBPの増大した血清レベルについて陽性と出た患者は、薬剤耐性腫瘍を有する危険性が増大しているか、または彼らの腫瘍が薬剤耐性を発現し得る危険性が増大し、担当医はこれらを考慮して適切な治療法の選択肢を評価することができる。さらに、このような患者は、薬剤耐性腫瘍を発現する潜在的な危険性をモニタリングするために、GPBPの血清又は尿レベルについて定期的試験を受けることができる。同様に、IgAネフロパシー、全身性紅斑性狼瘡及びグッドパスチャー疾患からなる群から選択される系球体腎炎を発症する危険性があると考えられるか、又はすでに発症していることが疑われる患者を、GPBPの血清又は尿レベルについて試験することができる。さらなる実施形態は、本明細書における教唆に基づいて当業者には明らかになるであろう。

30

40

#### 【0063】

50

G P B Pは、循環する分子であり、G B M（糸球体基底膜）は糸球体濾過障壁の主成分であり、したがって糸球体におけるG P B P蓄積は、局所産生から起こり得るが、ほかの場所で産生された循環するG P B Pの隔離（sequestration）からも起こり得、尿中の増大したG P B Pにも反映され得る。局所的過剰産生は、一次抗体介在性糸球体腎炎の原因となり得、一方、増大した循環レベルは、この病理の二次形態を誘導し得、おそらくは腎移植に際する疾患再発に関与する。従って、別の実施形態において、循環又は尿G P B Pのレベルの定量化は、一次抗体介在性糸球体腎炎と二次抗体介在性糸球体腎炎の識別、及び腎移植の臨床的モニタリングに有用である。

#### 【0064】

さらなる実施形態において、G P B P測定を他の検体の分析と組み合わせると、当該方法により前記障害において識別診断又は予後診断を実施することが可能になる。非制限的一例において、本発明者等は一部のI g Aネフロパシー患者が抗基底膜自己抗体を産生することを見いだした。これらの循環する自己抗体は、I V型コラーゲンのNC1ドメインを認識する。これらの抗体価の測定は、疾患の進行のモニタリング又は異なるI g Aネフロパシー患者の識別又はこれらの患者における予後診断の実施に役立つ可能性がある。抗ssDNA、抗ヌクレオソーム自己抗体及びG P B Pレベルを測定することにより、全身性紅斑性狼瘡を診断することができるが、一次I g Aネフロパシーと全身性紅斑性狼瘡に続発するI g Aネフロパシーとを区別することもできる。様々なさらなる実施形態において、I g Aの糸球体堆積と関連してDonadio and Grande（2002）N Engl J Med 347, 738 - 748において記載されている原発性疾患の診断に用いられる任意の測定を、二次I g Aネフロパシー患者における識別診断のためのG P B P血漿又は尿検出のための本発明の方法と併せて用いることができる。

#### 【0065】

別の実施形態において、標準曲線の基準としてのG P B Pの正常値は、血漿中では約1 ng/ml - 10 ng/mlであり、尿中では約0.2 ng/ml - 1.5 ng/mlであり、一方、グッドパスチャー患者は正常値を少なくとも2倍超え、他の実施形態においては、正常値を少なくとも3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、又はそれ以上超える。

#### 【0066】

第12の態様において、本発明は、天然のG P B Pアイソフォームを単離する方法であって、

- (a) 血漿試料を硫酸アンモニウム沈殿させること、
- (b) 硫酸アンモニウム沈殿した血清試料に対してイオン交換クロマトグラフィ（IEC）を実施すること、
- (c) 天然のG P B Pアイソフォームを含むIEC画分を同定すること、
- (d) 天然のG P B Pアイソフォームを含むIEC画分をゲル濾過クロマトグラフィ（GFC）すること、および
- (e) 天然のG P B Pアイソフォームを含むGFC画分を同定すること、を含む方法を提供する。

#### 【0067】

好ましい一実施形態において、これらの方法を用いて、たとえば、下記実施例においてさらに詳細に開示されるように、天然の77 kD G P B Pを血漿から実質的に精製することができる。

#### 【0068】

第13の態様において、本発明は、天然のG P B Pアイソフォームを単離する方法であって、

- (a) 尿試料を塩析すること、
- (b) 塩析したタンパク質試料に対してダブルイオン交換クロマトグラフィ（IEC）を実施すること、および
- (c) 天然のG P B Pアイソフォームを含むIEC画分を同定すること、を含む方法を提供する。

## 【 0 0 6 9 】

本明細書で用いられる場合、「ダブルイオン交換クロマトグラフィ」とは、ステップ(c)の前に2回連続して別個のイオン交換クロマトグラフィステップを実施することを意味する。IEC技術の実施形態例は当該技術分野において周知であり、以下の実施例で開示されるものを包含する。

## 【 0 0 7 0 】

好ましい実施形態において、これらの方法を用いて、下記実施例でさらに詳細に開示される様に、天然の91kD GPBPを尿から実質的に精製することができる。

第14の態様において、本発明は、天然のGPBPアイソフォームを単離する方法であって、

(a) 血漿試料又は尿試料を、天然のGPBPと選択的に結合するGPBP結合分子を含むアフィニティークラムに通すこと、

(b) 血漿又は尿試料からの非結合タンパク質をアフィニティークラムから洗い流すこと、および

(c) カラムから天然のGPBPアイソフォームを溶出させること、を含む方法を提供する。

## 【 0 0 7 1 】

好ましい実施形態において、これらの方法を用いて、以下の実施例でさらに詳細に開示されるように、例えば血漿及び尿からの天然の77kD GPBP及び天然の91kD GPBPを実質的に精製することができる。別の好ましい実施形態において、GPBP結合分子はGPBP抗体を含む。別の好ましい実施形態において、抗体は本発明の新規モノクローナル抗体を含む。別の好ましい実施形態において、溶出ステップは変性溶出緩衝液の使用を含む。

## 【 0 0 7 2 】

本発明の第12、第13、および第14の態様の精製法の詳細を下記実施例で記載する。

## 【 実施例 1 】

## 【 0 0 7 3 】

## 概要

グッドパスチャー抗原結合タンパク質(GPBP)は、基底膜のIV型コラーゲンの非従来型Ser/Thrキナーゼである。最近になって、本発明者等は、GPBPが、過剰発現された場合にIV型コラーゲン崩壊及び糸球体基底膜における免疫複合体の堆積を誘発する細胞外タンパク質であることを示した(参考文献4)。本明細書では、本発明者らは、標準的(77kDa)及び非標準(91kDa)mRNA翻訳開始によって少なくとも2つのGPBPアイソフォームを細胞が発現したことを示す。77kDaのポリペプチドは、IV型コラーゲンと相互作用し、可溶性形態として細胞外区画において局在した。91kDa及び誘導された120kDaポリペプチドは、細胞膜と結合し、細胞外区画において77kDaのポリペプチドのレベルを調節した。FFATモチーフ及び26-残基Serリッチな領域は、77kDaポリペプチドの排出に必要であった。次に26-残基Serリッチな領域を除去すると、先に認識されたGPBPアイソフォーム(GPBP 26/CERT)が得られ、これはサイトゾルであり、GPBPとは対照的にスフィンゴミエリナーゼ細胞処理に対して感受性であった。これらのデータ及び先のデータは、COL4A3BPをタンパク質分泌のマルチ区画プログラムに関連付け(すなわち、IV型コラーゲン)、このプログラムは：1)リン酸化及びタンパク質分子/超分子組織の調節(GPBP)、並びに2)細胞小器官間セラミド輸送及び血漿膜へのタンパク質カーゴ輸送(cargo transport)の調節(GPBP 26/CERT)を有する。最後に、本発明者らは、ヒト血漿から循環する77kDa GPBPを単離し、グッドパスチャー患者及び免疫複合体型糸球体腎炎の動物モデルにおいて増大したレベルを観察し、GPBP分泌がインビボで起こることを証明し、GPBPの血清学的測定の臨床的有用性を明らかにした。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 4 】

## 序文

グッドパスチャー抗原結合タンパク質 ( G P B P ) は、 I V 型コラーゲンの 3 鎖の非コラーゲン性 1 ( N C 1 ) ドメイン [ 3 ( I V ) N C 1 ] をリン酸化する ( 1 )。このドメインは、系球体基底膜 ( G B M ) コラーゲンの分子及び超分子組織における中枢構造であり、グッドパスチャー疾患における系球体腎炎に關与する自己抗体の標的でもある ( 2 )。増大した G P B P 発現は、グッドパスチャー疾患をはじめとする自己免疫の発症機序に關連し ( 3 )、また G B M コラーゲン崩壊及び I g A 抗体の堆積の誘発と關連する ( 4 )。これらの觀察は、 G P B P が G B M コラーゲン構成を調節し、その発現が異常に上昇する場合に I V 型コラーゲンベースの抗体が關与する系球体腎炎を誘発することを示唆する ( 3、4 )。 C O L 4 A 3 B P は、これらの病的状態では外見上調節されない G P B P 2 6 (より豊富で活性の低い選択的にスプライスされた G P B P 変異体であり、26 - 残基 S e r リッチな領域が欠失したもの) もコードする ( 3 )。

10

## 【 0 0 7 5 】

G P B P は、 N 末端プレクストリン相同 ( P H ) ドメイン、 S e r - X a a - Y a a 領域、二分核定位シグナル、コイルドコイルドメイン、酸性トラック中 2 つのフェニルアラニン ( F F A T ) モチーフ及び C 末端ステロイド産生急性調節關連脂質伝達 ( S T A R T ) ドメインをはじめとする複数の構造要素を含む。さらなる構造特性としては、自己相互作用及びリン酸化のモチーフが挙げられる ( 1、3、5、6 )。 P H ドメインは、真核生物においてのみ存在する、様々な十分に保存されていない構造を含み、この構造は、ホスホイノシチドとの相互作用によって細胞膜へのタンパク質ターゲティングに關与することが提案されている ( 7 )。いくつかのタンパク質キナーゼを包含する様々なタンパク質は P H ドメインを含む ( 8 )。 F F A T モチーフは、小胞關連膜タンパク質關連タンパク質 ( V A P ) の貫膜サイトゾルドメインとの相互作用によってタンパク質を E R へと向かわせ ( 9 )、 V A P は小胞体 ( E R ) におけるタンパク質折りたたみのホメオスタシスの維持及び細胞膜へのタンパク質カーゴ輸送の調節に關与することが提案されている ( 10、11 )。 S T A R T ドメインは、セラミド、リン脂質及びステロールをはじめとする脂質と結合し、異なる生理的及び病理的機能を有する様々なタンパク質において存在するモジュールである ( 12、13 )。

20

## 【 0 0 7 6 】

最近のレポートは、 F F A T モチーフ及び P H ドメインを、それぞれ G P B P ポリペプチドの E R 及びゴルジ装置に対する結合と關係付けている。これらの細胞小器官に対する結合は、 S T A R T ドメインが E R からセラミドを捕捉し、これをゴルジ装置へ送達することを可能にすると仮定されている。これらの觀察に基づいて、 G P B P ポリペプチドは、非小胞サイトゾルセラミド輸送体として記載され、 C E R T<sub>L</sub> ( G P B P ) 及び C E R T ( G P B P 2 6 ) と新たに命名された ( 5、14 )。しかし、これらの著者の結論は、天然のタンパク質の細胞内分布に關連する正確なデータなしに出され、基底膜に關連した G P B P の顕著な発現を示す免疫化学的証拠を全く無視している ( 3 )。最近のレポートは、 C E R T 依存性セラミド輸送が、ホスホリパーゼ A 2 の動員並びにトランスゴルジ網でのタンパク質キナーゼ D の動員及び活性化に重要であり、従って最終的に、プロスタグランジン産生及びタンパク質エクソサイトーシスをそれぞれ調節することを示している ( 6、15 )。

30

40

## 【 0 0 7 7 】

免疫組織化学的証拠は、 G P B P が主に細胞外であるが、様々な細胞内部位に局在化する可能性があることを示唆する ( 3、4 )。タンパク質分布は、タンパク質機能に關して非常に情報価値があり、したがって、 G P B P の生物学的機能を理解するためにさらなる研究が必要であった。本明細書では、本發明者らは G P B P についての m R N A の翻訳が、いくつかのポリペプチドを生成させ、そのうちのいずれもサイトゾルでは有意に発現されなかったことを示す。一方、現在の研究は、 G P B P が分泌経路に入り、 I V 型コラーゲンと相互作用する証拠を提供する。さらに、本發明者らは、26 - 残基 S e r リッチな

50

領域の選択的エクソンスプライシングによる除去は、タンパク質をサイトゾルに局在化させることを示し、G P B P 26 / C E R T が G P B P の可溶性細胞内型であることを明らかにした。本データは、選択的エクソンスプライシング及び翻訳開始が、C O L 4 A 3 B P の産物がマルチ区画生物学的プログラムを調整することが期待される異なる場所へこれらを行かわせる方法であることを示唆する。様々な証拠は、後のものが、基底膜コラーゲン構成 ( G P B P ) ( 1、3、4 ) 並びに細胞膜への小胞タンパク質カーゴ輸送を調節する細胞小器官間セラミド輸送 ( G P B P 26 / C E R T ) のリン酸化及び調節を包含することを裏付ける ( 6、14 )。最後に、本発明者らは、77 k D a G P B P が、抗体介在性糸球体腎炎 (すなわち、グッドパスチャー疾患及び免疫複合体型糸球体腎炎) の臨床的マーカーとして使用できる血清学的成分であることを示す。

10

## 【 0 0 7 8 】

## 物質及び方法

## 血清試料の処理

マウス及びヒト血液試料を人体研究及び動物実験機関ガイドラインにしたがって得た。本発明者等は、あらかじめ特徴付けし ( 4 )、健康な若年 ( 4 ヶ月 ) 及び I g A 免疫複合体関与を受けた老年 ( 7 ヶ月 ) であるニュージーランドホワイト ( N Z W ) マウスから得た血清を使用した。ヒト血漿交換及び対照又はグッドパスチャー患者由来の血清を標準的手順にしたがって得た。

## 【 0 0 7 9 】

## 抗体及び組換えタンパク質

切断された組換え G P B P アイソフォーム及び合成ペプチドを用いて、本発明者らは G P B P / G P B P 26 特異性マウスモノクローナル抗体 14 ( m A b 14 ) のエピートプ ( 1 ) を F F A T モチーフにマッピングした ( 図 9 )。マウス m A b e 26 は G P B P に特徴的な 26 残基 ( G P B P p e p 1 ) に対して産生され、したがって G P B P 26 / C E R T と反応しなかった ( 図 1 A )。ヒトモノクローナル F ( a b )<sub>2</sub> 断片を、G P B P の選択的に翻訳された領域 ( A T R ) である合成ペプチドを用いて組換え F ( a b )<sub>2</sub> 発現ライブラリから単離した ( 図 2 C ) ( A n t i b o d y s b y D e s i g n , M o r p h o S y s A G )。反応性 F ( a b )<sub>2</sub> 断片を、ウェスタンブロットおよび予想される A T R を発現する組換えタンパク質を用いてさらに特徴付けした ( 非図示 )。最も反応性の高い F ( a b )<sub>2</sub> 断片 ( A b 24 ) を用いて天然の G P B P ポリペプチドを特徴付けし、最も反応性の低い F ( a b )<sub>2</sub> 断片 ( A b 20 ) をこれらの研究において負の対照として使用した。先に報告された ( 4 ) 免疫精製ニワトリポリクローナル G P B P 特異性抗体 ( G P B P ) を、フローサイトメトリーにおいて使用するためにビオチニル化するか、又は直接免疫蛍光法のために A l e x a F l u o r 647 ( I n v i t r o g e n ) で標識した。G P B P および G P B P 26 / C E R T について特異的なポリクローナル抗体は、標準的手順にしたがって G S T - F L A G - G P B P ( 1 ) で免疫化したウサギにおいて ( G P B P r ) 又は特異的合成ペプチドで免疫化されたニワトリにおいてのいずれかで産生され、A b c a m から購入した ( G P B P a b )。G P B P r における特異抗体を、S e p h a r o s e - C N B r ( S i g m a ) と結合した組換え F L A G - G P B P ( 下記参照 ) を用いてアフィニティー精製した。グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ検出のために、本発明者らは E r w i n K n e c h t によって提供されたマウスモノクローナル抗体を使用した。カルレギュリン ( c a l r e g u l i n )、p 65 又はカテプシン D に対して特異的なポリクローナル抗体は S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y I n c から得、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ ( P D H ) に対して特異的なものは M o l e c u l a r P r o b e s から得た。P r P ( クローン 3 F 4 ) 又は g o l g i n - 97 に対して特異的なモノクローナル抗体は、それぞれ C l o n t e c h および M o l e c u l a r P r o b e s から得た。F L A G を検出するために、本発明者らは、ウェスタンブロット分析に関しては F L A G / M 2 又は F L A G / M 2 - ホースラディッシュペルオキシダーゼ ( H R P ) ( S i g m a ) および免疫蛍光法 ( A b c a m ) に関してはニワトリ抗体 ( F L A G ) 又はヤギ抗体 ( F

20

30

40

50



LAG - FITC)を使用した。Alexa Fluor (登録商標) 488 - ストレプトアビジンはMolecular Probesから得、二次抗体はPromega (抗マウス及び抗ウサギHRP複合体)、Jackson ImmunoResearch (抗ヒトF(ab)<sub>2</sub> - HRP) 及びSigma (抗ニワトリHRP並びに他のFITC及びTRITC複合体) から得た。組換えFLAG - GPBP及びFLAG - GPBP 26を、すでに記載されているようにして、メタノール資化酵母 (*Pichia pastoris*) において発現させ、アフィニティー精製した (1、3)。

#### 【0080】

##### プラスミド構築物

pc - n4'、GPBP mRNAの5'非翻訳領域 (UTR) 及びコーディング配列を有するcDNAを発現するpcDNA3 (Invitrogen) 誘導構築物の産生が報告されている (1)。pc - n4' から誘導されるプラスミドは、pc - GPBP - Met (5' UTRが欠失した欠失変異体)、及びpc - n4' - Mmut (標準的AUG (Met) 翻訳開始がGGA (Gly) で置換された構築物) を含んでいた。GPBPのコーディング配列と融合したFLAG配列を発現するpc - FLAG - GPBPの産生は、すでに報告されており (1)、FFATモチーフにおいて欠失を有するpc - FLAG - GPBP<sub>FFAT</sub> (図9) を得るために使用された。pc - FLAG - GPBP 26は、GPBP 26のコード領域と融合したFLAG配列を発現し、pc - FLAG - GPBPと同様に産生される。ATRの原因となる開始部位を決定するために、本発明者等は、iMet位置の上流のオープン・リーディング・フレーム (ORF) における様々な位置で終止コドンを導入することによってpc - n4' 及びpc - n4' - Mmut変異体を産生した。GPBP又はGPBP / GPBP 26について特異的な低分子干渉mRNA (siRNA) の一時的発現のためにpSilencer (商標) 2.1 - U6<sub>hygro</sub> (Ambion) を用いた。対応する誘導構築物及びcDNA標的配列は: pSi - GPBP / GPBP 26 - 2、ACAGAGTATGGCTGCAGAG (配列番号11); pSi - GPBP / GPBP 26 - 3、GTACTTTGATGCCCTGTGCT (配列番号12); pSi - GPBP - 1、GCCCTATAGTCGCTCTTCC (配列番号13) であった。標的配列及びプラスミド構築物の選択は、供給者の勧告に基づいた。siRNA発現プラスミドの効率を、細胞組換え発現系において評価した (非図示)。これらの研究における対照プラスミド (pSi - 対照) は、ヒト細胞において発現されないタンパク質である、緑色蛍光タンパク質のmRNAを標的とするために設計された。全変異体は、標準的PCRに基づく突然変異生成によって産生され、クローニングされた全てのcDNAクローンの忠実性を、ヌクレオチドシーケンシングにより確認した。

#### 【0081】

##### 細胞培養及びトランスフェクション

HEK - 293又はHeLa細胞をそれぞれ、2 mMのL - グルタミン、10% (v/v) ウシ胎仔血清及びペニシリン (100 U/ml) / 硫酸ストレプトマイシン (0.1 mg/ml) を添加したダルベッコの修飾イーグル培地またはイーグル最小必須培地を用いて、37℃、加湿5% CO<sub>2</sub>環境中で成長させた。特に記載しない限り、この研究で使

#### 【0082】

ProFectin Mammalian Transfection System - Calcium Phosphate (Promega) 又はLipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用し、供給者の勧告に従って、トランスフェクションを16 - 24時間実施した。免疫蛍光研究のために、細胞を24穴プレート中、ポリ - L - リシンでコーティングされたカバーガラス上に播種した。必要があれば、HEK293細胞をpc - n4' - Mmutでトランスフェクトし、G418 (Invitrogen) で15日間選択した。耐性細胞を制限希釈によってさらにクローニングし、多くの個々のクローンにおける91 kDa GPBPの発現を細胞抽出物のウェスタン

プロット分析によって測定した(下記参照)。上昇したレベル(c 8、c 14)又は低下したレベル(c 19)の91 kDaを発現するクローンを機能研究において使用した。

#### 【0083】

##### インビトロ転写及び翻訳

本発明者らは、TNT(登録商標)T7 Coupled Reticulocyte Lysate System(Promega)を用いて、供給者の勧告にしたがって約1 µgのプラスミドのインビトロ転写/翻訳を実施した。タンパク質合成を評価するために、[S<sup>35</sup>]メチオニンを混合物に添加し、標識されたポリペプチドをSDS-PAGE及びフルオログラフィーによって同定した。手短に言えば、電気泳動後、ゲルを45%メタノール及び7.5%酢酸で1時間固定した。続いて、ゲルを、ジメチルスルホキシドで30分間、そしてジメチルスルホキシド中22.5%の2,5-ジフェニルオキサゾールでさらに30分間、2回処理した。最後に、ゲルを水で平衡化し、乾燥し、-70

10

#### 【0084】

##### 細胞抽出物及び細胞分画

細胞抽出物を得るために、成長培地を氷冷リン酸緩衝塩溶液(PBS)ですすぎ、氷床上、25 mMのTris-HCl(pH 7.5)、150 mMのNaCl、0.5%のTriton X-100、1 mMのフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)及び10 µg/mlのロイペプチンで均質化した。混合物を500 × gで10分間遠心分離することによって精製し、タンパク質濃度を測定し、-70 で保存した。

20

#### 【0085】

細胞下分画のために、90%コンフルエンスの培養物をPBS中に集め、遠心分離に付した(500 × gで10分間)。細胞ペレットを250 mMのスクロース、10 mMのPBS(pH 7.5、10 µg/mlのロイペプチンを含む)、1 mMのPMSF中に分散させ、ガラス製乳棒を用いてDounce均質化(20ストローク)で破壊した。細胞ホモジネートを連続遠心分離(sequential centrifugation)によって徐々に精製して、異なる細胞画分を得た。核及び破壊されていない細胞を500 × gで10分間遠心分離することによって集めた。上清を7,000 × gで10分間遠心分離することによってさらに精製して、ミトコンドリア/リソソーム画分を得た。最後に、上清を150,000で1時間遠心分離することによって精製して、ミクロソーム分画を得、これは細胞膜の断片、すなわち、小胞体、細胞膜及び分泌小胞(ペレット)並びにサイトゾル画分(上清)を有する。全てのステップは0-4 で実施し、Protein Assay試薬(Bio-Rad)を用いてタンパク質濃度を測定した。

30

#### 【0086】

いくつかの目的で、500 × gの上清をリソース-Q FPLCカラムにかけ、結合物質を10 mMのTris-HCl(pH 8.0)中0から1 MのNaCl勾配で溶出させた。細胞GPBPの大部分を含む0.55-0.6 MのNaCl画分をエタノールで沈殿させ、ウェスタンブロット分析用の部分的に精製されたGPBPとして使用した。

#### 【0087】

##### エキソビボ架橋、スフィンゴミエリナーゼ処理及びFLAG-免疫沈降

40

エキソビボ架橋に関して、本発明者らは、本質的にすでに記載されているようにして得られた排出可能なヒト 3 (IV) NC1ドメイン(BM40-FLAG-3 (IV) NC1)を発現するHEK293-FLAG-3 (IV)細胞を使用した(1、16)。細胞を、150 mmプレート中(天然のGPBP)又は6穴プレート中(組換えGPBP)のいずれかで70-90%コンフルエンスまで成長させた。トランスフェクションの48時間後又は細胞が指示されたコンフルエンスに達したら、架橋を行った。手短に言えば、細胞をPBSですすぐことによってRTにし、1%ホルムアルデヒドを含む培地とともに10分間インキュベートした。架橋反応を、PBS(pH 7.4)中125 mMのGly-HClで10分間RTにて急冷した。氷冷PBSですすぐことによって細胞を4にし、処理を4 で続けた。細胞を、1又は5 ml(6穴又は150 mmプレート)の抽

50

出緩衝液 [ 16 mM の T r i s - H C l ( p H 7 . 5 ) 、 160 mM の N a C l 、 2 mM のエチレンジアミン四酢酸 ( E D T A ) 、 1 . 1 % の T r i t o n X - 100 、 0 . 01 % の S D S 、 10  $\mu$  g / m l のロイペプチン、 1 mM の P M S F ] で 30 分間溶解させ、 500  $\times$  g で 10 分間遠心分離して、細胞片を除去し、そして上清を、 50 又は 250  $\mu$  l ( 6 穴又は 150 mm プレート ) の F L A G - アフィニティーゲルの 50 % スラリーで、穏やかに揺らしながら一夜抽出した。ビーズを遠心分離によって集め、 1 mL の抽出緩衝液で 2 回、 T r i s 緩衝塩溶液 ( T B S 、 50 mM の T r i s - H C l ( p H 7 . 5 ) 、 150 mM の N a C l ) で 1 回洗浄した。タンパク質を 25 又は 125  $\mu$  l ( 6 穴又は 150 mm プレート ) の F L A G ペプチドの T B S 中 100  $\mu$  g / m l 溶液で R T にて 2 回溶出させた。溶出した試料を電気泳動試料緩衝液 ( 2 X ) とともに 15 分間沸騰させて逆架橋させ、 S D S - P A G E 及びクマシーブルー染色又はウェスタンブロットのいずれかによってさらに分析した。

10

#### 【 0088 】

必要があれば、 p c - F L A G - G P B P 又は p c - F L A G - G P B P 26 でトランスフェクトした H e L a 細胞を、すでに記載したようにして ( 5 ) セレウス菌 ( B a c i l l u s c e r e u s ) スフィンゴミエリナーゼ ( S i g m a ) で処理するか、または処理せず、細胞をメタノール / アセトンで固定し、そして直接免疫蛍光法 ( 下記参照 ) によって分析するか又は 10 mM の T r i s - H C l ( p H 7 . 5 ) 、 150 mM の N a C l 、 0 . 5 % の T r i t o n X - 100 、 1 mM の E D T A 、 50 mM の N a F 、 1 mM のオルトバナジウム酸ナトリウム、 10  $\mu$  g / m l のロイペプチン、 1 mM の P M S F 中で溶解させ、遠心分離 ( 500  $\times$  g で 10 分間 ) によって精製し、 F L A G - 免疫沈降に使用した ( 前記参照 ) 。未処理細胞からの免疫精製物質を分割し、半分を 5 U /  $\mu$  l の P P a s e ( N e w E n g l a n d B i o l a b s ) で 30 にて 30 分間、供給者の勧告にしたがって処理した。全試料を、抗 F L A G 抗体を用いたウェスタンブロットによってさらに分析した。

20

#### 【 0089 】

いくつかの実験に関しては、細胞を 150 mm プレート中で成長させ、 F L A G 標識タンパク質をコードするプラスミド構築物 20  $\mu$  g でトランスフェクトし、さらに 2 日間新鮮な培地中で培養した。20 ミリリットルの培地を本質的に前述のようにして F L A G - 免疫沈降に使用した。

30

#### 【 0090 】

##### フローサイトメトリー

細胞をやさしく分離し、培地中に分散させた。細胞表面上の非特異性抗体結合部位を、非関連 m A b を含むマウス腹水 ( ブロッキング溶液 ) でブロックした。細胞を続いてブロッキング溶液中、阻害ペプチド ( G P B P p e p 1 ) 若しくは非関連性合成ペプチドを含むか又は含まないピオチニル化 G P B P の存在下或いは非存在下でインキュベートした。細胞を A l e x a F l u o r ( 登録商標 ) 488 - ストレプトアビジンとともにブロッキング溶液中でインキュベートし、 C y t o m i c s F C 500 流動血球計数器 ( B e c k m a n C o u l t e r ) でさらに分析して、蛍光発光を測定した。未処理の新鮮な細胞を基準として使用し、前方及び側方散乱を測定して、細胞統合性を評価した。全てのインキュベーションは R T で 1 時間であった。

40

#### 【 0091 】

##### 固定細胞を用いた直接及び間接免疫蛍光法

細胞をトランスフェクトし、 - 20 で 10 分間冷却されたメタノール - アセトン ( 1 / 1 ) で固定した。続いて、細胞をブロッキング溶液 ( P B S 中で 1 : 2 に希釈されたウサギ血清 ) とともに 30 分間 R T でインキュベートし、一次抗体 ( ブロッキング溶液中 20  $\mu$  g / m l ) とともに 2 時間 37 にて加湿チャンバー中でインキュベートし、続いて二次抗体 ( ブロッキング溶液中 1 : 200 ) とともに 1 時間 R T でインキュベートした。細胞をマウント液 ( D A K O ) 中 D A P I ( 1 . 25  $\mu$  g / m l ) で染色し、 S p o t カメラ及びソフトウェア・バージョン v 2 . 2 ( D i a g n o s t i c I n s t r u m e

50

nts)と組み合わせたAxioskop-2 plus顕微鏡(Carl Zeiss)で可視化した。いくつかの実験に関しては、細胞をトランスフェクトし、固定し、FLAG-FITCとともにインキュベートし、前述のように可視化した。非トランスフェクト細胞を負の対照として使用した。

#### 【0092】

##### 生細胞の直接免疫蛍光法

細胞をガラス底のマイクロウェルディッシュ(MatTek Corp)上で培養し、約50%コンフルエンスに達したら、培地を捨て、 $10\mu\text{g/ml}$ のGPBP-Alexa Fluor 647と過剰のGPBP pep1又は等モル量の非関連性合成ペプチドを生細胞のミトコンドリア染色のためのローダミン123(Invitrogen)とともに含む新鮮な培地と交換した。蛍光の生細胞分析を、Leica TCS SP2倒立共焦点顕微鏡を用いて実施した。細胞は全てのステップにおいて37、加湿5%CO<sub>2</sub>環境中で維持した。

#### 【0093】

##### 質量分析法

各タンパク質バンドをクマシーブルー染色されたゲルから切除し、変色させ、ゲル中トリプシン消化(in-gel trypsin digest)し、遠心分離した。1マイクロリットルの上清を乾燥し、 $1\mu\text{l}$ のマトリックス溶液(a-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸、Sigma製)中に再懸濁させ、試料プレートに塗布し、乾燥し、質量分析計中に導入した。トリプシン消化ペプチドをMALDI/TOF/TOF質量分析法(4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems)によって分析した。集められたデータを、GPSソフトウェア(Applied Biosystems)を用いて分析し、タンパク質を、検索エンジンMASCOT v2.0(Matrix Science)を用いて識別した。

#### 【0094】

##### 循環するGPBPのヒト血漿からの単離

10ミリリットルのグッドパスチャー患者からの血漿交換を、5mgの共有結合したGPBP<sub>r</sub>を含むSephacrose-CNBr(Sigma)カラム(1ml床)にかけた。カラムを、0.05%のTween 20(TBST)を有する20mlのTBSで洗浄し、Gentle-Immunopure溶出緩衝液(Pierce)で溶出させた。溶出物をTBSに対して透析し、Microcon YM-3(Millipore)を用いて濃縮し、GPBP<sub>a</sub>bを用いたウェスタンブロットによってさらに分析した。

#### 【0095】

##### 血液中を循環するGPBPレベルの推定

マイクロタイタープレートの各ウェルを一夜GPBP<sub>r</sub>(TBS中 $2\mu\text{g/ml}$ )でコーティングし、ブロッキング緩衝液(PBS中3%BSA)とともに2時間さらにインキュベートした。組換えGPBP及び血清試料をウシ胎仔血清中で希釈し、2連で2時間インキュベートした。プレートを次に、GPBP<sub>a</sub>b(TBS中1:5,000)とともに、そして抗ニワトリHRP結合(TBS中1:20,000)とともにそれぞれ1時間インキュベートした。コーティング(4)を除くすべてのステップはRTであり、ステップごとにウェルをTBSTでよく洗浄した。最後に、Amplex UltraRed試薬(Invitrogen)(約568/581nmの励起/発光最大値)を用いてVictor 2マイクロタイタープレートリーダー(PerkinElmer)で検出を実施した。標準曲線の直線部分が、0.5-10ng/mlの組換えGPBPで見られた。本発明者らはMann-Whitney試験を用いて、系統間の違いを評価した。<0.05のP値を有意と見なした。Prism4.0ソフトウェア(GraphPad Software, San Diego, CA)を計算に用いた。

#### 【0096】

SDS-PAGE及びウェスタンブロット分析-還元条件下で、標準的手順にしたがい、抗体検出のために化学発光(Amersham Pharmacia Biotech

10

20

30

40

50

を用いて実施した。

#### 【0097】

##### 結果

COL4A3BPは77kDa、91kDa及び120kDaのポリペプチドをコードする

GPBP及びGPBP 26を同定するために、本発明者らは2つの異なるモノクローナル抗体、すなわち、mAb14(GPBP及びGPBP 26を認識することがすでに報告されている(1))、並びにmAb e26(GPBPを除く26-残基Serリッチな領域に対して産生された新規モノクローナル抗体)を使用した(図1A)。GPBP欠失変異体及び合成ペプチドを用いて、本発明者らはmAb14エピトープをFFATモチーフに位置づけ、したがって、この抗体はFFATモチーフが欠失したGPBP変異体(GPBP<sub>FFAT</sub>)と反応しなかった(図9)。

10

#### 【0098】

細胞抽出物のウェスタンブロット分析によって、mAb14が主に約77kDaの見かけの分子量( $M_r$ )を有する1つのポリペプチドを認識し<sup>(1)</sup>、一方、mAb e26は約91kDa及び120kDaの $M_r$ の2つのポリペプチドと反応することが明らかになった(図1B)。わずかな変動し得る反応性も、mAb e26を含む約77kDa、60kDa、50kDa及び32kDaのポリペプチドに対して、及びmAb14を含む91kDa及び120kDaのポリペプチドに反発して観察された(非図示)。本発明者らは、同様の反応性分子種を、HEK293(図1B)、ヒト線維芽細胞、HeLa、hTERT-RPE及びhTERT-BJ1細胞をはじめとする多くの培養したヒト細胞において見いだした(非図示)。

20

#### 【0099】

COL4A3BP産物をさらに特徴付けするために、本発明者らは、天然のmRNA及び組換えmRNAの発現を比較した(図1C)。このために、pc-n4'(COL4A3BPの5'UTR及びコーディング配列を有する構築物)(1、17)を培養細胞における一時的遺伝子発現分析で使用した。pc-n4'の発現によって、mAb e26により検出される約77kDa、91kDa及び120kDaの3つのポリペプチドを得た。対照的に、約77kDa及び91kDaのポリペプチドだけがmAb14と顕著に反応した。驚くことに、組換え溶解物において最も顕著なmAb e26反応性ポリペプチド(77kDa)(すでに報告されているmRNA産物(1))は、重要な天然のカウンターパートを有していなかった。本発明者らは、mAb14が120kDaの組換え型ポリペプチドとよりも91kDaの組換え型ポリペプチドと比較的強力に反応することも観察した。

30

#### 【0100】

天然のポリペプチドの起源をさらに究明するために、本発明者らは、COL4A3BPについて特異的な低分子干渉RNA(sRNA)を使用した(図1D)。3つの天然のポリペプチド全ての発現は、これらのsRNAを発現する場合に減少したが、GPBP及びGPBP 26/CERTの両方について特異的なsRNAは、77kDaのポリペプチドの発現を減少させるのにより有効であり、一方、GPBP特異性sRNAは、91kDa及び120kDaのポリペプチドの発現をより有効に減少させた(pSi-GPBP/GPBP 26-3及びpSiGPBP-1を比較)。まとめると、本発明者らのデータは、COL4A3BPの主な細胞産物は、GPBP 26/CERT(77kDa)並びに91kDa及び120kDaの従来認識されていないGPBPアイソフォームを含み、後者は、一貫したmAb14結合を防止する修飾FFATモチーフを有する可能性が高いことを示唆していた。GPBP特異性sRNAを用いる場合の77kDaポリペプチドの細胞レベルにおける減少は、このポリペプチドがmAb e26と有意な反応性を示さないもので、さらなる調査を必要とする(図1B)。

40

#### 【0101】

主な細胞GPBPアイソフォームは非標準mRNA翻訳開始から得られる

50

細胞GPBPアイソフォームの起源をさらに明確にするために、本発明者らは、5' UTR - 欠失又はiMetからGlyへの置換からなるmRNA変異体を発現する(p c - n 4')誘導構築物を生成させ(図2A)、これらをタンパク質発現分析で使用した(図2B)。細胞において、5' UTR - 欠失mRNAである構築物(p c - GPBP - Met)は、77 kDaのポリペプチドのみを産生し、iMetからGlyへの置換である構築物(p c - n 4' - Mmut)は、91 kDa及び120 kDaのポリペプチドのみを発現した(図2B、エキソピボ)。しかし、無細胞翻訳系において、p c - GPBP - Metは77 kDa GPBPポリペプチドも発現するが、p c - n 4' Mmutは91 kDaのポリペプチドのみを生成し、120 kDaのポリペプチドの有意な発現は観察されなかった(図2B、インピトロ)。これらのデータは、GPBP mRNAが(1つ若しくは複数の)非標準翻訳開始部位を5' UTR中に含み、これは91 kDa及び120 kDaのポリペプチドをもたらす、一方、77 kDaのポリペプチドは標準翻訳開始の産物であることを示していた。さらに、本発明者らのデータは、91 kDaが非標準翻訳開始の主要生成物であり、120 kDaのポリペプチドは、細胞膜のない無細胞系において発現できない翻訳後誘導産物であることを示唆していた。

10

#### 【0102】

さらなる非標準翻訳開始を特徴付けするために、すでに認識されている(1)GPBP mRNAの5' UTRにおいて存在するORF(図2C)を、p c - n 4' Mmutにおける各位置で終止コドンを導入することによって中断し、細胞タンパク質発現をウェスタンブロットによって分析した(図2D)。終止コドン-83(本来ACG、トレオニン)で有する構築物は、91 kDa及び120 kDaのポリペプチドを発現しなかったが、終止コドン-84(本来GCG、アラニン)で有する構築物は2つのポリペプチドを発現し、選択的翻訳開始部位をコドン-83に位置づけた(図2Cにおいて枠で囲ったThr)。p c - n 4'の-83終止変異体を分析した場合に、同じ結論が得られた(図2D)。

20

#### 【0103】

非標準翻訳開始も91 kDa及び120 kDaの内因性GPBPポリペプチドが原因であることを確認するために、予想されるATRである合成ペプチドと特異的に反応するヒトF(ab)<sub>2</sub>断片(Ab24)(図2Cにおいて網がけした配列)を、部分的に精製されたGPBPポリペプチドのウェスタンブロット分析に使用した(図2E)。予想通り、Ab24は91 kDa及び120 kDaの2つのポリペプチドと特異的に反応し、これらのポリペプチドはmAb e26によっても認識され、このことは、天然のGPBPポリペプチドが非標準翻訳産物に特徴的なATRを含んでいることを示唆した。

30

#### 【0104】

91 kDa及び120 kDaのGPBPアイソフォームは不溶性膜結合ポリペプチドである

91 kDa GPBPアイソフォームは、SecretomeP 2.0 Server(18, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>)を用いて分析すると、非古典的分泌タンパク質であり、PSORT II Prediction(<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>)を用いて分析すると、ミトコンドリア(60.9%)、核(26.1%)、細胞骨格(8.7%)及び分泌系の小胞(4.3%)中に局在化することが予想された。したがって、これらの理論的考察から、非標準翻訳開始から得られるGPBPアイソフォームが、分泌経路を包含する細胞小器官中に入る非サイトゾルポリペプチドであることが示唆された。

40

#### 【0105】

これらの予想を評価するために、無傷生細胞をGPBPとともにインキュベートし、抗体結合検出のための直接免疫蛍光法及びフローサイトメトリーによって分析した(図3A及び3B)。興味深いことに、GPBPは特異的に生細胞と結合した。その理由は、抗体の結合がGPBPである合成ペプチド(GPBP pep1)によって効率的に消失す

50

るが、非関連性ポリペプチド (Cont pep) によっては消失しなかったからである。これらのデータは、細胞GPBPアイソフォームが細胞膜の外部表面に存在することを示唆する。

#### 【0106】

GPBPの細胞内分布をさらに特徴付けするために、細胞を破壊し、細胞下分画及びウェスタンブロット分析に付した(図3C)。予想通り、91kDa及び120kDaのGPBPアイソフォームは可溶性物質として検出されなかったが、ミトコンドリア-リソソーム及びミクロソーム画分と主に結合して見いだされた。核画分におけるGPBPの存在が、これらのタンパク質又はこの画分を含む非破壊細胞及び/又はミトコンドリアの核発現を実際に反映するかどうかは明らかではない。対照的に、mAb14と反応し、mAb 10  
e26と顕著な反応性を示さない約77kDaのポリペプチドが、150,000×gで1時間試料を遠心分離した後に可溶物として単独で検出された(サイトゾル)。

#### 【0107】

これらのデータは、91kDa及び120kDaの天然のGPBPポリペプチドは細胞膜と結合して不溶性で発現され、一方、77kDaの天然のGPBP 26/CERTポリペプチドは細胞質において可溶性で発現されることが示唆された。

#### 【0108】

77kDa GPBPはIV型コラーゲンと相互作用する可溶性細胞外タンパク質である。

従来のレポートは、77kDa GPBPがIV型コラーゲンと相互作用することを示唆した(1、3、4)。このことを、BM40-FLAG-3(IV)NC1(ヒト3(IV)NC1の組換え排出可能な形態)(16)を発現するか、または発現しない細胞のエキソビポ架橋及びFLAG-免疫沈降とそれに続く免疫沈降物のSDS-PAGE分析によってさらに評価した(図4A)。FLAG特異性抗体はFLAG-3(IV)NC1及びGPBP又はGPBP 26/CERTのいずれかである77kDaのポリペプチド<sup>(2)</sup>(ウェスタン)を、タンパク質折りたたみ及びERホメオスタシス維持に関与する2つのER常在性シャペロンであるGrp78及びGrp94(クマシー)とともに効率よく沈殿させた(19、20)。GPBPが実際にERにおいてFLAG-3(IV)と相互作用することさらに判定するために、BM40-FLAG-3(IV)NC1を発現するか又は発現しない細胞をpc-n4'でトランスフェクトし、同様に分析した(図4B)。FLAG抗体は、FLAG-3(IV)NC1を発現する細胞から77kDa GPBPを効率的に沈殿させたが、対照細胞からは沈殿させず、このことにより、77kDa GPBPアイソフォームが分泌経路中に入り、FLAG-3(IV)NC1と相互作用することが示唆される。

#### 【0109】

一次構造分析により、77kDa GPBPポリペプチドの細胞質局在化が予想された(未公表の観察結果)。しかし、インビトロ(1、3)、エキソビポ(図4)及びインビポ(4)研究は、77kDa GPBPアイソフォームがIV型コラーゲンと結合し、リン酸化させることを示唆した。さらに、組換え発現研究により、77kDa GPBPポリペプチドが最も顕著なポリペプチドであることが明らかになったが、有意なレベルの天然のカウンターパートは細胞内で検出されなかった(図1)。まとめると、これらの観察結果は、標準的GPBPが、非古典的分泌を受けるサイトゾルポリペプチドであることを示唆した。

#### 【0110】

GPBPが分泌されるかどうかを調査するために、本発明者らはまずFLAG標識GPBPをHeLa細胞において発現させ、FLAG特異性抗体を用いて細胞内組換えタンパク質分布を分析した(図5A)。FLAG-GPBPはカルレギュリン(ER常在性タンパク質)と広範囲にわたって共存し、このことは、GPBP 26/CERTについて記載されるように(21、22)、FLAG-GPBPがFFAT-VAP相互作用によってERと結合することを示唆する。したがって、本発明者らは、FLAG-GPBP<sub>FF</sub>

10

20

30

40

50

AT (FFATモチーフを含まないFLAG-GPBP変異体)を発現し、同様に分析した。FFATモチーフの欠失はGPBPのERへの分布を防止した。というのも、このタンパク質がgolgin-97(ゴルジ装置常在性タンパク質)と広範囲にわたって共存することが判明したからである(図5A)。HEK293細胞において研究を行うと、同じ結論が得られた(非図示)。本発明者らのデータは、組換えGPBPが、その排出のためにFFATモチーフによりVAPと結合したサイトゾルタンパク質であり、FFAT-相互作用が損なわれた場合にのみ、タンパク質はゴルジ装置と結合する可能性を有するという概念と一致した。FLAG-GPBP又はFLAG-GPBP<sub>FFAT</sub>を培養細胞において発現し、免疫沈降及びウェスタンブロット分析によって培地を続けて分析することによって、このことを研究した(図5B)。興味深いことに、FLAG特異性抗体は、組換えタンパク質を、FLAG-GPBPを発現する培地から効率的に免疫沈降させ、FLAG-GPBP<sub>FFAT</sub>を発現する細胞の培地からは免疫沈降させず、このことから、ERに対するFFATが関与する結合は77kDa GPBP分泌に必須であることが明らかになった。

#### 【0111】

GPBP<sub>26/CERT</sub>は、FFAT依存的方法でERとも結合する(21、22)；しかし、本発明者らは、サイトゾルにおいてGPBP<sub>26/CERT</sub>及び細胞外区画において77kDa GPBPを見だし、このことは、GPBPに限定されるSerリッチな26-残基領域もGPBP分泌について重要であることを裏付ける。これを同様にFLAG標識77kDa GPBP又はGPBP<sub>26/CERT</sub>を発現する培養物において研究した(図5C)。予想通り、26-残基Serリッチな領域の存在は、FLAG-GPBP<sub>26</sub>が培地において顕著に発現されないならば、タンパク質分泌に重要であった。

#### 【0112】

91kDa GPBPは、細胞外区画における77kDa GPBPレベルを調節するこの証拠は、77kDa及び91kDaの両GPBPアイソフォームは分泌経路中に入るが、91kDaが膜と結合したままであるのに対して、77kDa GPBPは細胞外区画中に可溶性であることを裏付ける。本発明者らは、91kDa GPBPが77kDa GPBPの細胞外レベルを調節するかどうかを研究した。これは、組換え91kDa GPBPを異なるレベルに発現する各細胞系におけるFLAG-GPBPの組換え発現(図6A)とそれに続く対応する培地のFLAG-免疫沈降及びウェスタンブロットによる免疫沈降物の分析によって行った(図6B)。興味深いことに、組換え91kDa GPBPの発現の増加は、培地におけるFLAG-GPBPのレベルの増加と関連し、このことは、91kDa GPBPが77kDa GPBPの細胞外区画への分泌を誘発したことを示唆する。

#### 【0113】

77kDa GPBPはスフィンゴミエリナーゼでの細胞処理に対して感受性でない組換え発現研究によっても、77kDa GPBPは、FFATモチーフが突然変異するとゴルジ装置への転移を受ける、ERと関連したサイトゾルポリペプチドであることが示された(図5A)。したがって、本発明者らは、77kDa GPBPが、GPBP<sub>26/CERT</sub>について先に報告されている様に、スフィンゴミエリナーゼ細胞処理に反応して脱リン酸化及びゴルジ装置への転移を受けるかどうかを疑問に思った(5)。これらの研究のために、FLAG標識GPBP又はGPBP<sub>26/CERT</sub>を発現する細胞をセレウス菌スフィンゴミエリナーゼ(bSMase)で処理し、興味のある細胞内タンパク質をFLAG-免疫沈降及びウェスタンブロットによって分析した(図7A)。すでに指摘されているように(1、5)、両組換えタンパク質をリン酸化し、一般的ホスファターゼ(PPase)での処理によってそれらのM<sub>r</sub>を同様の程度まで減少させた(上及び下の矢印)。しかし、スフィンゴミエリナーゼ細胞処理は、各組換えタンパク質について異なる結果をもたらし、FLAG-GPBP<sub>26/CERT</sub>は低M<sub>r</sub>までシフトしたのに対して(上および中央の矢印)、顕著なM<sub>r</sub>シフトはFLAG-GPBPについて



は観察されなかった。このことは、スフィンゴミエリナーゼ処理によって引き起こされるスフィンゴミエリンの細胞レベルにおける減少が、FLAG-GPBP 26/CERTの脱リン酸化を誘発するが、FLAG-GPBPのリン酸化状態に顕著な影響を及ぼさなかったことを示唆する。予想通り、細胞の免疫蛍光法分析によって、スフィンゴミエリナーゼ処理は、FLAG-GPBPの細胞内分布を著しく変更することなく、FLAG-GPBP 26/CERTのゴルジ装置への転移を促進したことが明らかになった(図7B)。

#### 【0114】

77kDa GPBPの血液循環レベルは、グッドパスチャー患者及び免疫複合体型系球体腎炎の動物モデルにおいて上方調節される

証拠は、インビボの可溶性タンパク質がイムノアフィニティークロマトグラフィーによって最初に研究され、血液循環するヒト77kDa GPBPが単離された際に、77kDa GPBPが分泌されたことを示唆した(図8A)。標準的治療手段によって、高レベルのGPBPを発現することが予想されるグッドパスチャー患者から得た血漿交換を使用した(3)。予想通り、本発明者らは、アフィニティークラムから溶出された物質において1つの77kDaポリペプチドを同定し、これはGPBP特異性抗体と反応し、このことは、77kDa GPBPがインビボで分泌され、ヒト血漿の成分であることを示唆する。アフィニティー精製を実証し、かつ77kDa GPBPのレベルをさらに正確な方法で決定するために、本発明者らは、ヒト組換えGPBPを捕捉し、検出するためにアフィニティークロマトグラフィーで用いられた同じ抗体を利用するELISAを開発した(図8B)。本発明者らは、このELISAを使用して、対照及び抗体介在性系球体腎炎を表す試料における循環する77kDa GPBPレベルを推定した(図8C、D)。ELISAは、組換えGPBPを測定する場合、0.5ngから10ng/mlの間で直線範囲を示し(図8B)、グッドパスチャー患者において対照個体におけるよりも比較的多くの循環する77kDa GPBPを検出した(図8C)。本発明者らは、若年(4ヶ月)及び高齢(7ヶ月)NZWマウスを比較した場合に、同様の結果を得(図8D)、GPBP依存性IgA免疫複合体型系球体腎炎を発症し、狼瘡になりやすい自己抗体産生を発現したマウス種では7ヶ月の月齢で始まった(4)。

#### 【0115】

##### 考察

ここで、本発明者らは、GPBPのmRNAが標準的(AUG)及び非標準(ACG)翻訳開始を経て、それぞれ77kDa及び91kDaの2つの主要ポリペプチドを生成するという有力な証拠を得た。本研究からの結果はまた、両生成物が分泌経路に入ることを裏付ける。しかし、77kDaが細胞外区画に達し、可溶性免疫沈降性形態で存在するのに対して、91kDaおよびその誘導120kDaポリペプチドは、細胞膜と結合して、主に不溶性のままであった。ACGでの翻訳開始及び非標準翻訳開始を使用して、タンパク質を選択的細胞区画へ向かわせることが、他のヒト遺伝子について記載されている(23、24)。従来の証拠(21、22)に基づいて、ERに対するFFAT介在性GPBP結合(図5)はVAPによって起こり、したがってFFAT-VAP相互作用がER中へのGPBP転移の根底にある分子機構に関与することが予想される。さらに、本発明者らは、すでに報告された、選択的にスプライスされたGPBP 26/CERTが、細胞質において主に可溶性のままであるGPBP変異体であることも示す。このように、本発明者らのデータは、mRNA選択的翻訳開始及びエクソンスプライシングが、サイトソル、分泌経路、細胞膜及び細胞外区画をはじめとする複数の位置へGPBPを向かわせるための方法であるという考えを裏付ける。さらに、先の観察結果では、GPBPはヒト精原細胞の核(1)並びにラット肝臓のミトコンドリア及びリソソームで見いだされ(未発表の観察結果)、このことは、GPBPの分布が実質的に偏在し、したがって、その生物学的プログラムはいくつかの区画において機能することが予想されることを示唆する。

#### 【0116】

肺動脈内皮細胞由来のヒトGPBP cDNAが報告されている(GenBank受入番

10

20

30

40

50

号 A K 0 9 6 8 5 4 )。興味深いことに、A K 0 9 6 8 5 4 は選択的標準翻訳開始部位 ( i M e t ) を有し、これは、9 1 k D a ポリペプチドの O R F を上流に 4 5 残基延長する。本発明者らは、H E K 2 9 3 細胞においても、肝臓、腎臓、脳、筋肉、膵臓、ケラチノサイト、リンパ球及び H e L a 細胞をはじめとする多くの他のヒト組織においても、A K 0 9 6 8 5 4 m R N A 発現についての証拠を見いだせなかった ( 非図示 )。それでも、本明細書で報告される非標準翻訳開始産物と類似した M<sub>r</sub> を有する標準的 m R N A 翻訳開始によって産生される G P B P アイソフォーム ( すなわち、A K 0 9 6 8 5 4 ) の存在は排除できなかった。

#### 【 0 1 1 7 】

一次構造分析から、非標準的に翻訳された G P B P 産物は分泌経路に入ることが予想される。いくつかの観察結果、すなわち、1) 非標準 G P B P アイソフォームは細胞膜と結合する分子種であること ( 図 3 ) ; 2) 非標準 G P B P アイソフォームは細胞における主な G P B P 種 ( 図 1 ) 及び無傷生細胞の外表面と結合した G P B P 特異性抗体であること ( 図 3 ) ; 3) 1 2 0 k D a のポリペプチドは、翻訳が細胞膜のない無細胞系で起こる場合に、m R N A から発現されないこと ( 図 2 ) ; 及び 4) 9 1 k D a G P B P アイソフォームは細胞外区画で 7 7 k D a G P B P のレベルを調節すること ( 図 6 ) が、この予想を裏付けている。総合すると、これらの観察結果は、9 1 k D a のポリペプチドが非標準翻訳開始の主要生成物であるという概念を裏付ける。このアイソフォームは、分泌経路に入り、ここで共有結合修飾を受けて 1 2 0 k D a のポリペプチドを産生し、膜に結合したままで、細胞膜の外表面に達する。9 1 k D a G P B P が 7 7 k D a G P B P の細胞外レベルを調節する機構はまだわかっていない。

#### 【 0 1 1 8 】

本発明者らは、発現が異常に高まる場合 ( すなわち、一時的遺伝子発現 )、G P B P ポリペプチドがサイトゾルにおいて蓄積することを観察し ( 図 1 0 )、E R 中への G P B P 輸送が飽和過程であることが明らかになった。興味深いことに、これらの発現条件下で、m A b e 2 6 は、細胞外区画の中にある場合、サイトゾル 7 7 k D a ポリペプチドについて、このアイソフォームよりも高い反応性を示した ( 図 1 0 及び 1 1 )。さらに、m A b 1 4 は、天然の 9 1 k D a G P B P とよりも組換え体と比較的反応し、天然又は組換え 1 2 0 k D a 産物と顕著に反応しなかった ( 図 1 )。これらの観察結果はすべて、2 6 - 残基 S e r リッチな領域 ( m A b e 2 6 ) 及び F F A T モチーフ ( m A b 1 4 ) が分泌経路において共有結合修飾を受けることを示唆している。これらのデータは、特定の調節 ( 生理的又は病理学的 ) 状況下で、G P B P はサイトゾルにおいて可溶性ポリペプチドとして発現され得ることも意味する。最後に、9 1 k D a G P B P 2 6 / C E R T が内因的に発現されるかどうか、及び G P B P 2 6 / C E R T が分泌を受けずに E R 中へ輸送され得るかどうかは明らかではない。

#### 【 0 1 1 9 】

G P B P 2 6 / C E R T を表すサイトゾル 7 7 k D a ポリペプチドの発現レベルは、G P B P 特異性 s i R N A を発現する細胞において有意に減少した ( 図 1 D )。このことは、s i R N A が p r e - m R N A も標的とするか、または G P B P の m R N A がある程度 G P B P 2 6 m R N A の前駆体であるかのいずれかであることを示唆する。本発明者らは、組換え G P B P を発現する細胞が、少量の組換え G P B P 2 6 / C E R T も発現することを見いだした ( 未発表の観察結果 )。このことにより、成熟 G P B P m R N A は、E R ストレスシグナルに反応して X B P 1 について報告されているのと同様に、非古典的プロセッシングに付されることが明らかになる ( 2 5 )。あるいは、共有結合的に修飾された 2 6 - 残基 S e r リッチな領域を有する G P B P 種であって G P B P 2 6 / C E R T とともに移動するものも、この観察を説明できる。

#### 【 0 1 2 0 】

いくつかの証拠、すなわち :

1) 7 7 k D a G P B P は、インビボでリン酸化される部位 ( 1 ) で 3 ( I V ) N C 1 ドメインと結合し、リン酸化する非従来型 S e r / T h r キナーゼであること ( 2 6

10

20

30

40

50

);

2) 77 kDa GPBPは細胞外区画において可溶性(図5及び図8)又はGBMコラーゲンと結合し(4)、かつ培養細胞のサイトゾルにおいて有意なレベルで発現されないことが主に判明していること(図1及び3);

3) 細胞GPBPアイソフォームは細胞膜の外表面で局在化すること(図3);

4) 91 kDa GPBPアイソフォームは細胞膜と結合し(図3)、77 kDa GPBPアイソフォームの細胞外レベルを調節すること(図6);

5) 3(IV)NC1ドメインは独自の構造的多様化を受け、少なくとも2つの異なる構造アイソフォーム(配座異性体)が基底膜に集まること(27);

6) 77 kDa GPBPの発現の増大が、IV型コラーゲンの四次構造を混乱させ、このことは、上昇したGPBPレベルが3(IV)NC1ドメインの構造多様化プログラム(三次構造)を妨害することを示唆する(4);

7) GPBPの血清レベルの増加は、IV型コラーゲンに基づく糸球体腎炎と関連すること(図8);

8) FFATモチーフは77 kDa GPBP分泌の構造的要件であり(図5)、VAPは、ERにおける適切なタンパク質折りたたみのためのホメオスタシス維持に重要であること(10);

9) ERに存在し、タンパク質の誤った折りたたみに対する細胞反応を調節するGrp78及びGrp94シャペロンは(18、19)、FLAG-3(IV)及び77 kDa GPBPと結合すること(図4);

10) COL4A3BP発現の増加は、タンパク質の誤った折りたたみ及びERストレス介在性細胞死を誘発する化学療法剤に対する癌細胞の耐性に関与することが判明したと(28);

11) 細胞のスフィンゴミエリナーゼでの処理は、脱リン酸化を誘発せず、77 kDa GPBPの細胞内分布も変えないこと(図7);

12) タンパク質キナーゼDはGPBPをリン酸化するが、GPBP 26/CERTと同じ程度までではないこと(6);

13) ノックダウン及び救済実験により、GPBP及びGPBP 26/CERTがセブラフィッシュにおける胚発生の中に様々な生物学的機能を果たすことが明らかになること(29);並びに

14) GPBPは、分泌経路において内腔/細胞外側から膜に対して固定されるタンパク質RTN3及びRTN4と相互作用すること(30)は、GPBPが、サイトゾルにおける細胞小器官間セラミド輸送ではなく、ERにおけるタンパク質折りたたみ及び細胞外区画における超分子組織を調節することを裏付ける。

#### 【0121】

26-残基Serリッチな領域が欠失したGPBPもVAPと結合する(21、22);しかし、セラミド吸収は、VAPとの結合の次に起こり、続いて、タンパク質はゴルジ装置へと向かい、ここでセラミドは放出され、タンパク質エクソサイトーシスが誘発される(6、14)。したがって、リン酸塩転移及びセラミド輸送は分子戦略であってよく、これによってCOL4A3BPはタンパク質分泌を調節する(すなわち、IV型コラーゲン)。これと一致して、VAPも細胞膜へのタンパク質カーゴ輸送の調節に重要であることが示された(11)。

#### 【0122】

様々な証拠は、COL4A3BPが、抗体介在性障害(3、4)、炎症(15)、ERストレス介在性疾患(10)及び薬剤耐性癌(28)を診断及び治療する方法の魅力的な標的であることを裏付ける。しかし、これらの結論を裏付ける観察結果は、今では解釈し直す必要があるかもしれない。その理由は、多くが、異なる細胞区画で発現される異なる遺伝子産物(すなわち、GPBP及びGPBP 26/CERT)間の区別ができない手段(すなわち、siRNA又は抗体)を用いて得られ、刺激に反応して異なって調節されるからである(3)。したがって、本研究は、GPBPの様々なアイソフォームが細胞内

10

20

30

40

50

で産生されるメカニズムを明らかにすることによって、これを理解するための重要な助けとなる。

#### 【 0 1 2 3 】

さらに、血液循環するヒト 77 kDa GPBP を同定することによって、本発明者らは、GPBP 分泌もインビボで生物学的に関連するという有力な証拠を提供する。血液循環する 77 kDa GPBP のレベルが免疫複合体型系球体腎炎のマウスモデルにおける GPBP 系球体発現及び発症と相関するという発見は、GPBP の血清学的測定が臨床状況で関連することを示唆する。これと一致して、グッドパスチャー患者における循環する GPBP の上方調節を示す本研究は、これらの結論を裏付け、GPBP がこれらの患者において過剰発現されるという従来の観察結果を実証する ( 3、31 )。

10

#### 【 0 1 2 4 】

これらおよび従来の発見は、GPBP が I V 型コラーゲン分泌及び超分子組織を促進することを裏付ける。したがって、GPBP は、適切な GBM 集合に重要であり、異常な GPBP 蓄積は、GBM 破壊を誘発し、IgA 免疫複合体を堆積させる ( 4 )。我々の知る限りでは、GPBP 発現の増加、GBM 解離及び免疫複合体の堆積は、腎疾患の根底にある新規メカニズムである。類似のメカニズムがヒト発症において機能するかどうかは明らかではないが、GBM 破壊及び電子密度の高い物質の蓄積の超構造的証拠は、IgA ネフロパシー及びループス腎炎にかかった患者において報告されている ( 32、33 )。さらに、GPBP 発現の増加は、I V 型コラーゲンの四次構造の強化を低下させる可能性があり、これによってエピトープ暴露、免疫系の活性化及びグッドパスチャー疾患における自己抗体結合を促進する ( 34 )。後の仮定と一致して、グッドパスチャー患者は循環する GPBP レベルの増加を示し、GPBP 発現がグッドパスチャー組織において上方調節されるという従来の観察結果を裏付ける ( 3、31 )。GPBP は、循環する分子であり、GBM は系球体濾過障壁の主成分であり、したがって、系球体における病原性 GPBP 蓄積は、局所産生から起こり得るが、ほかの場所で産生された循環する GPBP の隔離からも起こり得る。局所的過剰産生は一次抗体介在性系球体腎炎の主な原因となり得るのに対して、循環するレベルの増加はこの病理の二次形態を誘発し得、おそらくは腎移植による疾患再発に関与する。したがって、循環する GPBP レベルの定量化は、一次抗体介在性系球体腎炎と二次抗体介在性系球体腎炎との識別において、及び腎移植の臨床的モニタリングに重要であり得る。

20

30

#### 実施例 1 の参考文献

1. Raya, A., Revert, F., Navarro, S., and Saus, J. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 12 642-12649
2. placeCityHudson, B. G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M., and Neilson, E. G. (2003) *N. Engl. J. Med.* 348, 2543-2556
3. Raya, A., Revert-Ros, F., Martinez-Martinez, P., Navarro, S., Rosello, E., Veites, B., Granero, F., Forteza, J., and Saus, J. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 40 392-40399
4. Revert, F., Merino, R., Monteagudo, C., Macias, J., Peydro A., Alcacer, J., Muniesa, P., Marquina, R., Blanco, M., Iglesias, M., Revert-Ros, F., Merino, J., and Saus, J. (2007) *Am. J. Pathol.* 171, 1419-1430
5. Kumagai, K., Kawano, M., Shinkai-Ouchi, F., Nishijima, M., and Hanada, K. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 17758-17766
6. Fugmann, T., Hausser, A., Schoeffler, P., Schmid, S., Pfizenmaier, K., and Ol ayioye, M. A. (2007) *J. Cell Biol.* 178, 15-22
7. Lemmon, M. A., and placeCityFer guson, K. M. (2000) *Biochem J.* 350, 1-18
8. Dowler, S., Currie, R. A., placeCityCampbell, D. G., Deak, M., Kular, G., Downes, C. P., and Alessi, D. R. (2000) *Biochem. J.* 351, 19-31
9. Loewen, C. J. R., Roy, A., and Levine, T. P. (2003) *EMBO J.* 22, 2025-2035
10. Kanekura, K., Nishimoto, placeI., Aiso, S., and Matsuoka, M. (2006) *J. Biol.* 50

40

Chem. 281, 30223-30233

11. Wyles, J. P., McMaster, C. R., and Ridgway, N. D. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 29908-29918
12. Soccio, R. E. and Breslow, J. L. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 22183-22186
13. Alpy, F., and Tomasetto, C. (2005) *J. Cell Sci.* 118, 2791-2801
14. Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., and Nishijima, M. (2003) *Nature* 426, 803-809
15. Lamour, N. F., Stahelin, R. V., Wijesinghe, D. S., Maceyka, M., Wang, E., Allegood, J. C., Merrill, A. H. Jr., Cho, W., Chalfant, C. E. (2007) *J. Lipid Res.* 48, 1293-1304 10
16. Netzer, K. O., Leinonen, A., Boutaud, A., Borza, D. B., Todd, P., Gunwar, S., Langeveld, J. P., and Hudson, B. G. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 11267-11274
17. Granero, F., Revert, F., Revert-Ros, F., Lainez, S., Martinez-Martinez, P., and Saus, J. (2005) *FEBS J.* 272, 5291-5305
18. Bendtsen, D. J., Jensen, J. L., Blom, N., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004) *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 349-356
19. Yang, Y., and Li, Z. (2005) *Mol. Cells.* 20, 173-182
20. Ni, M., and Lee, A. S. (2007) *FEBS Lett.* 581, 3641-3651
21. Perry, R. J., and Ridgway, N. D. (2006) *Mol. Biol. Cell.* 17, 2604-2616
22. Kawano, M., Kumagai, K., Nishijima, M., and Hanada, K. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 30279-30288 20
23. Peabody, D. S. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 5031-5035
24. Touriol, C., Bornes, S., Bonnal, S., Audigier, S., Prats, H., Prats, A.C., and Vagner, S. (2003) *Biol. Cell.* 95, 169-178
25. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001) *Cell* 107, 881-891
26. Revert, F., Penades, J. R., Plana, M., Bernal, D., Johansson, C., Itarte, E., Cervera, J., Wieslander, J., Quinones, S., and Saus, J. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 13254-13261
27. Calvete, J. J., Revert, F., Blanco, M., Cervera, J., Tarrega, C., Sanz, L., Revert-Ros, F., Granero, F., Perez-Paya, E., placeCityHudson, B. G., and Saus, J. (2006) *Proteomics* 6, S237-S244 30
28. Swanton, C., Marani, M., Pardo, O., Warne, P. H., Kelly, G., Sahai, E., Elustondo, F., Chang, J., Temple, J., Ahmed, A. A., Brenton, J. D., Downward, J., and Nicke, B. (2007) *Cancer Cell* 11, 498-512
29. Granero-Molto F., Sarmah, S., O'Rear, L., Spagnoli, A., Abrahamson, D., Saus, J., placeCityHudson, B.G., and Knapik, E.W. (2008) *J. Biol. Chem.* Apr 18. [Epub ahead of print]
30. Rual, J. F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Berriz, G. F., Gibbons, F. D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., Klitgord, N., Simon, C., Boxem, M., Milstein, S., Rosenberg, J., Goldberg, D. S., Zhang, L. V., Wong, S. L., Franklin, G., Li, S., Albala, J. S., Lim, J., Fraughton, C., Llamasas, E., Cevik, S., Bex, C., Lamesch, P., Sikorski, R. S., Vandenhaute, J., Zoghbi, H. Y., Smolyar, A., Bosak, S., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Cusick, M. E., Hill, D. E., Roth, F. P., and Vidal, M. (2005) *Nature* 437, 1173-1178 40
31. Saus, J (2002) "Methods and reagents for treating autoimmune disorders" Utility Patent Application serial n PCT/EP02/01010. Publication No. WO 02/061430
32. Haas M. "IgA Nephropathy and Henoch-Schoenlein Purpura Nephritis". *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. Edited by Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG. placeCityPhiladelphia, Lippincott Williams & Wilkins Publishers 2007, p 50

p. 423-486

33. Balow, J.E., Boumpas, D. T., and Austin III, H.A. "Systemic Lupus Erythematosus and the kidney". Systemic Lupus Erythematosus. Edited by Lahita RG. placeCitySan Diego, Academic Press, 1999, pp. 657-685

34. Borza, D. B., Bondar, O., Colon, S., Todd, P., Sado, Y., Neilson, E. G., and Hudson, B. G. (2005) J. Biol. Chem. 280, 27147-27154

#### 脚注

(1) 77 kDa ポリペプチドは、GPBP 26 / CERT のリン酸化 (高) 及び脱リン酸化 (低) 型を表す二重項として分割することができる (5)。

【0125】

(2) 77 kDa GPBP の分泌は、分泌経路における天然の 77 kDa GPBP のレベルを推定するためのこの抗体の使用を除いて、mAb e26 との反応性の損失と関連した (図11)。

【0126】

#### 略語

使用する略語は次のとおりである： 3 (IV) NC1 : IV型コラーゲンの 3 鎖の NC1 ドメイン、ATR : 選択的翻訳領域、CERT 及び CERT<sub>L</sub> : セラミド輸送タンパク質の短鎖及び大型アイソフォーム、COL4A3BP : GPBP (CERT<sub>L</sub>) 及び GPBP 26 (CERT) をコードする遺伝子 (コラーゲン IV 3 - 結合タンパク質と命名されたもの)、EDTA : エチレンジアミン四酢酸、ER : 小胞体、FFAT : 酸性トラック中の 2 つのフェニルアラニン、GBM : 糸球体基底膜 ; GPBP 及び GPBP 26 : グッドパスチャー抗原結合タンパク質の大型及び短鎖の選択的にスプライスされた変異体、HRP : ホースラディッシュペルオキシダーゼ、mAb : モノクローナル抗体、NC1 : 非コラーゲン様 - 1 ドメイン、ORF : オープン・リーディング・フレーム、NZW : ニュージーランドホワイト、PBS : リン酸緩衝塩溶液、PH : プレクストリン相同、RT : 室温、SDS - PAGE : ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動、START : ステロイド産生急性調節関連脂質伝達、UTR : 非翻訳領域 ; VAP : 小胞関連膜タンパク質関連タンパク質。

【実施例 2】

【0127】

ヒト血漿からの GPBP の同定および単離

ここでは、本発明者らはヒト血漿のタンパク質分別のための古典的な化学的方法を使用し、ヒト血漿中の循環する複数の三次及び四次 GPBP 構造を同定した。データは、77 kDa GPBP 及び低分子量の誘導種が、単離され部分的に精製された GPBP 四次構造から血漿を再構成することによって決定される主な GPBP 循環アイソフォームであることも示す。

【0128】

物質及び方法

GPBP を、50 mL の凍結対照血漿から、塩析、イオン交換クロマトグラフィ及びゲル濾過の組み合わせを用いて精製した。

【0129】

凍結によって沈殿したタンパク質を、まず 8200 × g、10 分間 4 °C での血漿遠心分離によって除去した。血漿 GPBP の精製についての特異性はわからないので、タンパク質をもとの試料から、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 飽和度を増大させて (20%、40%、60% 及び 80%) 連続して沈殿させた。連続沈殿は、8200 × g で 10 分間 4 °C にて遠心分離することによって実施し、沈殿を 50 mM の Tris - HCl (pH 7.5) 5 mL 中に溶解させた。3.5 kDa カットオフのメンブレンバッグを用いて 50 mM の Tris - HCl (pH 7.5) に対して透析することにより、タンパク質混合物を脱塩した。(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沈殿の最終上清を同様に透析し、沈殿プロセスによって得られる最終画分として精製するためにさらに使用した。

## 【0130】

塩析によって得られる画分を、次いでH i T r a p Q - セファロースアニオン交換カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィ ( I E C ) によって分析した。カラムをまず緩衝液A ( 5 0 m M の T r i s / H C l ( p H 7 . 5 ) 、 2 0 m M の N a C l ) で平衡化し、各試料をさらに添加し、1 0 体積の緩衝液Aで洗浄した。結合タンパク質を緩衝液Aから緩衝液B ( 5 0 m M の T r i s / H C l ( p H 7 . 5 ) 、 1 M の N a C l ) への勾配で溶出し、0 . 6 m L の画分中に集めた。G P B P 物質を含むI E C 画分を、G P B P 特異性ビオチニル化N 2 7 モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットによって検出した。G P B P 含有I E C 画分をプールし、0 . 5 m l に濃縮し、続いてS u p e r d e x ( 商標 ) 2 0 0 1 0 / 3 0 0 C L を用いたゲル濾過クロマトグラフィに付した。このプロセスでは、カラムをまずT B S ( 5 0 m M の T r i s / H C l ( p H 7 . 5 ) 、 1 5 0 m M の N a C l ) で平衡化し、試料をカラム中に注入し、タンパク質をサイズによって分離した。ゲル濾過画分を、ビオチニル化N 2 7 モノクローナル抗体を用いたG P B P 物質の検出のためにウェスタンブロットによって分析した。G P B P 含有画分をプールし、8 0 % アセトンで沈殿させ、5 0 m M の T r i s - H C l ( p H 7 . 5 ) 、 8 M 尿素中に再懸濁させた。結果として得られた混合物 ( それぞれは連続 ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> 沈殿によって得られる異なる初期画分に対応する ) を、天然の血漿タンパク質組成を忠実に再構成するために等しい割合でプールした。最終プールの試料を、H R P 標識N 2 7 モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットに付した。

10

## 【0131】

20

## 結果

結果として得られるウェスタンブロットにおいて、本発明者らは7 7 k D a、7 0 k D a、6 6 k D a、5 8 k D a、5 6 k D a 及び 5 3 k D a の主なG P B P アイソフォームを観察した。図1 2 においてウェスタンブロットで有意な量で表されない追加のポリペプチドが存在し、これらは精製プロセス中に実施されたウェスタンブロットによって同定された。これらは、約3 6 8 k D a の [ 2 0 % ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> ] のポリペプチド、4 0 k D a、1 1 0 k D a、1 2 0 k D a 及び 3 1 1 k D a の [ 4 0 % ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> ]、並びに9 1 k D a、1 4 6 k D a、1 7 1 k D a 及び 3 0 0 k D a のポリペプチド [ 6 0 % ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> ] を含んでいた ( データは非図示 )。最後に、各G P B P 四次構造を表す、ゲル濾過分析における各クロマトグラフィピークのサイズも評価した。特に、本発明者らは、1 4 0 0 k D a 及び 9 2 0 k D a ( 2 0 % ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> 沈殿中 )、3 1 0 k D a 及び 1 4 5 k D a ( 4 0 % ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> 沈殿中 )、9 2 0 k D a、4 2 0 k D a、2 7 0 k D a、及び 1 2 5 k D a ( 6 0 % ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> 沈殿中 ) ; 6 6 k D a ( 8 0 % ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> 沈殿中 ) ; 並びに 9 1 k D a ( 8 0 % ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> 飽和で可溶性形態 ) のG P B P 凝集体を見いだした。

30

## 【0132】

## 結論

1 . 多くの異なる四次構造に集合した複数の循環G P B P アイソフォームが存在する。  
2 . 主な循環G P B P アイソフォームは、すでに認識されている7 7 k D a 及び低M<sub>r</sub>の誘導ポリペプチドを含む。

40

## 【実施例3】

## 【0133】

## ヒト尿からのG P B P 単離及び定量化

ここでは、本発明者らは、G P B P が、簡単な免疫学に基づく方法 ( すなわち、E L I S A ) によって測定でき、かつ化学的方法および免疫化学的方法によって単離できる、尿の通常の成分であることを示す。証拠は、9 1 k D a のポリペプチド及び誘導ポリペプチドが主な尿G P B P 産物であることを示す。

## 【0134】

## イムノアフィニティークロマトグラフィによる尿G P B P の単離

G P B P を、G P B P 特異性ウサギポリクローナル抗体をロードしたセファロース4 B

50

を用いて対照ドナーの尿より抽出した。カラム結合物質を溶出させ、G P B P 特異性ニワトリポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロットによって分析した(図13)。広範囲のMWを示す多くのポリペプチドが、イムノアフィニティー精製された試料においてG P B P 特異性抗体で検出された。91 kDaのポリペプチドは、低MWの他の誘導ポリペプチド(46 kDa及び50 kDa) [Juan Saus, Fernando Revert and Francisco Revert-Ros "Novel Good pasture antigen-binding protein isoforms and protein misfolded-mediated disorders" PCT/EP04/01074 y WO2004/070025]とともにヒト尿中で最も豊富なG P B P 物質であることが判明した。

10

#### 【0135】

特に、250ミリリットルの対照ドナー由来の尿(遠心分離によってあらかじめ精製し、T r i s で中和)を、200 µgのウサギポリクローナル抗G P B P 抗体を結合させた1 mLのセファロース4Bのカラムにかけた。カラムを30 mLのT B S で洗浄し、結合物質をG e n t l e I m m u n o p u r e E l u t i o n B u f f e r (P i e r c e)で溶出した。溶出された物質をT B S に対して透析し、G P B P 特異性ニワトリポリクローナル抗体(G P B P c h)及びH R P 標識抗ニワトリI g Y (二次抗体)を用いたウェスタンブロットによってさらに分析した(図13)。抗体特異性は、二次抗体を含む同じ物質を加えた対照レーン(C o n t)を染色することによって確認した。線分と数字又は矢印と数字は、それぞれMW標準(左)又はG P B P ポリペプチド(右)の位置及びサイズ(k D a)を示す。

20

#### 【0136】

E L I S A による尿G P B P の測定

尿中のタンパク質濃度は低い(通常80 µg / mL未満)ので、7人のドナーから得られた試料を用いて間接E L I S Aを試みた。このために、プレートを尿試料でコーティングし、G P B P 特異性ニワトリポリクローナル抗体およびH R P 標識抗ニワトリI g Y (二次抗体)を用いて免疫検出を実施した。ヒト尿中で希釈されたヒト組換えG P B P を用いて標準曲線を同様に得た。G P B P は全てのドナーにおいて検出され、それぞれの場合でバックグラウンド(非特異的I g Yを用いて測定したF . I .)を差し引くことによって各濃度を決定した(図14)。全てのドナーは検出可能なレベルのG P B P を示し、ドナー3は尿中で異常に上昇したG P B P 濃度を示した。

30

#### 【0137】

特に、尿中で希釈された組換えG P B P 及び7人のドナーから得られた尿試料(1 - 7)をE L I S A プレート上に一夜4 でコーティングした。プレートをP B S 中3 % B S A でブロックし、G P B P 特異性ニワトリポリクローナル抗体(G P B P c h)及びH R P 標識抗ニワトリI g Y (二次抗体)を用いて免疫検出を実施した。A m p l e x U l t r a R e d 試薬(I n v i t r o g e n)をプレート発色のために使用した(図14)。Aにおいて、示されたG P B P 濃度対蛍光強度(F . I .)(任意単位(A . U .)で表示)のlog - logスケールでの散布図を示す。Bにおいて、示された濃度及びそれらの各F . I . 値を均等目盛でプロットしたものをを用いて計算した線形回帰線を表し、これを用いてDにおいてG P B P 試料濃度を決定した。Cにおいて、二次抗体(C o n t)、非特異的ニワトリI g Y 及び二次抗体(I g Y)、又は G P B P c h 及び二次抗体(G P B P c h)を用いてドナー試料を分析して得られた生データを示す。Dにおいて、表は、Bにおいて得られた曲線を用いた対応する変換データを示す。

40

#### 【0138】

本発明者らは、血清/血漿試料について使用したサンドイッチE L I S A 法を用いてT B S 希釈尿に関してG P B P を測定した場合に、同様の濃度値を得た(データは非図示)。

#### 【0139】

塩析及びイオン交換クロマトグラフィによる尿G P B P 単離

50



イムノアフィニティー及びE L I S A法を検証し、どのG P B P種がドナー3において増大したかを確認するために、本発明者らは、古典的な化学的精製法を用いて、この尿からのG P B P精製を試みた。これらには、塩析及びダブルイオン交換クロマトグラフィ[カルボキシメチルセルロース(C M)及びジエチルアミノエチルセルロース(D E A E)]、並びに各精製ステップを代表する異なる物質のウェスタンブロット分析(図15)が含まれていた。G P B P特異性ニワトリポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット分析によって、G P B P物質のほとんどが塩によって沈殿し、C M又はD E A Eのいずれとも結合しないことが明らかになった。91kDaの主なG P B Pペプチドが、有意量の77kDa G P B Pポリペプチドとごく微量の60kDa及び50kDaのG P B P関連ポリペプチドとともに検出された。

10

#### 【0140】

イムノアフィニティー及びE L I S A法を検証し、どのG P B P種がドナー3において増加したかを確認するために、本発明者らは、古典的な化学的精製法を用いてこの尿からのG P B P精製を試みた。400ミリリットルの遠心分離によって精製した尿を0.85MのNaClに一夜4で添加し、10,000×gで30分間4にて遠心分離した。上清の試料(S p t 0.85M NaCl)を、後の分析で採用するために4で保存した。結果として得られるペレットを50mMのTris(pH7.5)中に溶解させ、同緩衝液に対して透析し、0.7mLのC M樹脂で抽出し、非結合物質を0.5mLのD E A E樹脂でさらに抽出した。C M樹脂を1MのNaCl、50mMのTris(pH7.5)(C M、1MのNaCl)で溶出させ、D E A E樹脂を続いて0.35MのNaCl、50mMのTris(pH7.5)(D E A E、0.35M NaCl)及び1MのNaCl、50mMのTris(pH7.5)(D E A E、1M NaCl)で溶出させた。D E A E抽出の上清を含む等量の各試料(S p t C M / D E A E)を、G P B P特異性ニワトリポリクローナル抗体及びH R P標識抗ニワトリIgY(G P B P c h)を用いたウェスタンブロットによって分析した。非特異的反応性ポリペプチドは、H R P標識抗ニワトリIgYのみを用いた平行分析(C o n t)を染色することによって同定された。線分と数字又は矢印と数字は、それぞれ、MW標準(左)又は抗G P B P抗体と特異的に反応し、S p t C M / D E A Eでのみ検出されるポリペプチド(右)の位置及びサイズ(kDa)を示す(図15)。G P B P特異性ニワトリポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット分析によって、G P B P物質のほとんどが塩によって沈殿し、C MまたはD E A Eのいずれとも結合しないことが明らかになった。91kDaの主なG P B Pポリペプチドが、有意量の77kDa G P B Pポリペプチド及びごく微量の60kDa及び50kDaのG P B P関連ポリペプチドとともに検出された。

20

30

#### 【0141】

##### 結論

1) G P B Pポリペプチドは、尿から、アフィニティークロマトグラフィによるか、又は塩析とそれに続くイオン交換クロマトグラフィによるかのいずれかで単離することができる。

#### 【0142】

2) 尿中のG P B Pレベルは、間接的E L I S A又はサンドイッチE L I S Aのいずれかによって特異的抗G P B P抗体を用いて評価することができる。

40

3) 尿中で見いだされる主なG P B Pポリペプチドは91kDaである。

#### 【実施例4】

#### 【0143】

G P B Pを標的とするモノクローナル抗体の産生及び特徴付け

すでに報告されたG P B P中のm A b 14及びm A b e 26エピトープを分泌の間に翻訳後修飾に付す(R e v e r t e t a l . 2008 J B i o l . C h e m . 283:30246-55)。したがって、これらのモノクローナル抗体は、ヒト血漿中に存在する循環するG P B Pアイソフォームと顕著に反応しなかった。このことにより、単離及びヒト血漿におけるG P B P循環レベルの推定のために、ポリクローナル抗体に基づ

50

く免疫学的方法の使用が推奨された（実施例 1 を参照）。ここで、本発明者らは、ポリクローナル抗体に基づく方法よりも信頼性の高い、血漿中の G P B P の免疫学的検出のための新規 G P B P 特異性モノクローナル抗体の産生及び特徴付けを報告する。

#### 【 0 1 4 4 】

G P B P に対する新規モノクローナル抗を産生するハイブリドーマの増殖及び冷凍保存  
間接 E L I S A 及び酵母において作製された組換え G P B P を使用して、本発明者らは、28 の独立したハイブリドーマクローン（N 1 - N 2 8 ）を得、単離し、これらは抗 G P B P モノクローナル抗体を産生した。クローンを、20 % ウシ胎仔血清（F B S ）を添加したダルベッコの修飾イーグル培地（D M E M ）中で増殖させ、F B S 中 10 % D M S O 中で凍結させ、液体窒素中で保存した。保存前に、各クローンから 10 m L の培地を集め、4 で 0 . 0 1 % アジ化ナトリウムとともに保存し、さらなる抗体特徴付けのために使用した（下記参照）。

10

#### 【 0 1 4 5 】

H E K 2 9 3 細胞において発現された組換え及び天然の G P B P アイソフォームを用いた新規モノクローナル抗体のウェスタンブロット特徴付け

28 のハイブリドーマのそれぞれ由来の抗体は、大腸菌（E . c o l i i ）において産生された組換え G P B P （25 n g ）と反応した（データは非図示）。N 2 0 及び N 2 1 を除いて、残りの抗体の全ては細胞内組換え G P B P とも反応した（図 1 6 ）。11 のモノクローナル抗体（N 4 、N 5 、N 7 、N 1 1 、N 1 2 、N 1 3 、N 1 4 、N 2 2 、N 2 5 、N 2 7 及び N 2 8 ）は同様に細胞内及び細胞外組換え G P B P のどちらも認識した。7 の抗体（N 1 、N 6 、N 1 7 、N 1 8 、N 1 9 、N 2 4 及び N 2 6 ）は細胞内 G P B P を標的とし、細胞外 G P B P は標的としなかったが、残りの抗体（N 2 、N 3 、N 8 、N 9 、N 1 0 、N 1 5 、N 1 6 及び N 2 3 ）は細胞外組換え G P B P との比較的低い反応性を示した（図 1 6 ）。

20

#### 【 0 1 4 6 】

H E K 2 9 3 細胞からのタンパク質抽出物を使用して、本発明者等は、18 のモノクローナル抗体 [ N 2 、N 3 、N 4 、N 5 、N 7 、N 8 、N 9 、N 1 0 、N 1 1 、N 1 2 、N 1 3 、N 1 4 、N 1 5 、N 1 6 、N 2 2 、N 2 5 、N 2 7 （図示）及び N 2 8 （非図示） ] が天然の細胞内 77 k D a G P B P アイソフォームを認識することを確認した。18 の抗体のうちの 11 [ N 4 、N 5 、N 1 0 、N 1 1 、N 1 2 、N 1 3 、N 1 4 、N 1 6 、N 2 5 、N 2 7 （図示）及び N 2 8 （非図示） ] も、細胞において存在することがすでに報告されている 45 k D a の G P B P アイソフォームを標的とした [ J u a n S a u s 、 F e r n a n d o R e v e r t a n d F r a n c i s c o R e v e r t - R o s “ N o v e l G o o d p a s t u r e a n t i g e n - b i n d i n g p r o t e i n i s o f o r m s a n d p r o t e i n m i s f o l d e d - m e d i a t e d d i s o r d e r s ” W O 2 0 0 4 / 0 7 0 0 2 5 ] 。抗体 N 4 、N 7 、N 1 1 、N 1 4 及び N 2 7 は約 88 k D a のさらなる G P B P 関連ポリペプチドも認識し、これらは 77 k D a の標準的ポリペプチドのリン酸化型であり得る（R a y a e t a l 1999 J . B i o l C h e m . 274、12642 - 12649）。N 2 6 抗体は 91 k D a ポリペプチドを認識し、これは、m A b e 26 の標的である最近特徴付けされた 91 k D a G P B P アイソフォーム（R e v e r t e t a l . 2008 J . B i o l . C h e m . 283：30246 - 55）とともに移動した（図 1 7 ）。G P B P アイソフォーム（天然又は組換え）を検出するための新規モノクローナル抗体の相対的有効性を推定し、表 2 にまとめる。

30

40

#### 【 0 1 4 7 】

N 1 - N 2 8 モノクローナル抗体に関するエピトープマッピング

このために、本発明者等は、G P B P の各 C 末端欠失変異体である 13 の異なる c D N A 構築物を産生した（図 1 8 A ）。各構築物を H E K 2 9 3 細胞トランスフェクションのために使用し、対応する細胞抽出物をウェスタンブロットによって分析して、各抗体結合を評価した。28 の新規モノクローナル抗体のうち 17 が欠失変異体 8 を認識したが、変

50

異体 7 は認識しなかった (表 1) ; 抗体の残りは、N 末端を標的とするか、又はウェスタンブロット分析において反応性がないのでエピトープは確認されないかのいずれかであった。抗体の大部分は欠失変異体 8 と反応し、欠失変異体 7 と反応しなかったので、本発明者等は、欠失変異体 7 及び 8 の C 末端間に含まれる配列である合成ペプチドを用いて各エピトープマッピングをさらに試みた。驚くべきことに、本発明者等はこれらの 40 残基に対する抗体の反応性を確認できず、これらのペプチドは G P B P 抗体結合と競合し得なかった。データは、適切なエピトープ集合のために G P B P N 末端領域を必要とする高免疫原性である領域が存在していたことを示唆した。このことを、F L A G - G P B P 内部欠失変異体 ( 1 - 4 ) を産生することによって調査し、この場合、示された各 20 残基配列のみを除去した (図 18 B)。欠失変異体 1 - 4 は、2 回の連続した P C R 及び 10 対応する欠失を導入するための特異的プライマーを用いた標準的手順によって得られた (図 18 B)。興味深いことに、全ての抗体は 2 及び 3 内部欠失 F L A G - G P B P 変異体と反応しなかったが、1 及び 4 変異体と反応した (図 18 C)。データは、G P B P の残基 305 - 344 によって表される配列 (G G P D Y E E G P N S L I N E E E F F D A V E A A L D R Q D K I E E Q S Q S E K、配列番号 10) が高免疫原エピトープクラスターと一致することを示す。一貫して、すでに特徴付けされた m A b 14 は、F A T T モチーフでこの領域と反応することが判明した (R e v e r t e t a l . 2008 J . B i o l . C h e m . 283 : 30246 - 55)。

【0148】

モノクローナル抗体の分類

これは、エピトープマッピング及びウェスタンブロット分析における天然又は組換え細胞内若しくは細胞外 G P B P アイソフォームのいずれかとの反応性を考慮して実施した (表 1)。

【0149】

10

20

【表 1】

領域	群	モノクローナル番号	GPBPとのウェスタンブロット反応性					
			組み換え体 (77kDa)		天然 (kDa)			
			溶解物	培地	91	88	77	45
7-8	1a	4, 11, 14, 27	+++	+++	-	+	+++	++/+
	1b	7, 22 (~mAb14)	+++	+++	-	+(7)/-(22)	+++	-
	2	5, 10, 12, 13, 16, 25, 28	+++	++/ ±(10,15,16)	-	-	++(5,10,12)/+	++
	3	2, 3, 8, 9	++	±	-	-	+/-	±/-
<7	4	15, 23	++	+	-	-	±	-
<4	5	1, 18, 19, 24, 26	++	-	+(26)	-	-	-
?	6	6, 17	+/-	-	-	-	-	±/-
?	7	20, 21	±(6)/-	-	いくつかのポリペプチドが標的とされる			

表1. 28個のモノクローナル抗体の分類。「領域」欄中の数字は、分析で使した様々な欠失変異体を意味する(図18、上側の合成画像を参照)。たとえば、領域7~8は、抗体が変異体8を認識するが、変異体7は認識しないことを示し、領域<7とは、エピトープが変異体7のC末端に関してN末端であることを意味する。

## 【0150】

組換えGPBPを発現するHeLa細胞の間接免疫蛍光法分析によるN1 - N28モノクローナル抗体の特徴付け

HeLa細胞をpcDNA3-FLAG-GPBPでトランスフェクトし、さらに24時間培養し、メタノール/アセトン(50%-50%)で固定した。固定後、細胞をPBS中3%BSA(ブロッキング溶液)でブロックし、ブロッキング溶液中で1:2に希釈された表示抗体(培地)とともにインキュベートした。続いて、細胞をPBSで洗浄し、FITC-標識抗マウスIgGとともにインキュベートし、再度洗浄し、倒立蛍光顕微鏡を用いてマウントし、観察した。40×対物レンズを用い、同じ露光時間及びゲインを使用して画像を取得した。N6を除く全ての抗体は、異なる反応性を有する、HeLa細胞において発現されたFLAG-GPBPを認識し、この目的に関して最も反応性の高い抗体は、N13、N14、N15、N16、N21、N22及びN26であった(相対的検出有効性については表2を参照)。反応性抗体のうち、N28を除く全ては、GPBPに特徴的な網状分散パターン(小胞体でのGPBPの局在化の結果)を示した(Rever et al. 2008 J. Biol. Chem. 283:30246-55)。

## 【0151】

HeLa細胞の間接免疫蛍光法分析によるN1 - N28モノクローナル抗体の特徴付け  
HeLa細胞をクリスタルスライド上に播種し、培養し、前述のように処理し、40×対物レンズ及び1.63の画像増幅を用いて倒立蛍光顕微鏡で分析した。N26を除いて、全ての抗体は、合成画像の左に示される抗体N27によって産生されたものと同様の小胞体分布を示した。一部の細胞はゴルジ装置に典型的な核周囲及び限局性強化も示した(白色矢印)。N26によって明らかになったパターンは、核及び核周囲断続クラスター(perinuclear punctuate cluster)を有するすでに記載

された網状分布と、細胞膜の線形修飾を混ぜ合わせたものである。N 2 6を除いて、全ての抗体は、組換えG P B Pポリペプチドについて記載された小胞体分布のみを明らかにした。抗体N 2 6は、網状パターンを産生することとは別に、細胞膜を装飾し、断続的核周囲及び核蓄積を証明した。H e L a細胞において内因性G P B P物質を検出するための最良の抗体は、N 5、N 1 2、N 1 6、N 2 1、N 2 6及びN 2 7であった(表2を参照)。

#### 【0152】

パラフィン包埋ヒト腎臓組織の免疫組織化学的分析によるN 1 - N 2 8モノクローナル抗体の特徴付け

各モノクローナル抗体を、パラフィン包埋ヒト腎臓試料の標準的免疫組織化学的分析に使用した。全ての反応性抗体は、主に尿細管及び集合管を染色し、メサンギウム細胞、有足細胞、メサンギウムマトリックス及び毛細血管壁で糸球体内も著しく染色した。後の場合では、内皮表面では直線的パターンであり、毛細血管壁内では粒様分布であった。毛細血管壁において、免疫染色は頻度が低く、N 5、N 6、N 7、N 8、N 1 0及びN 2 6がこれらのために最良の抗体であった。免疫組織化学的技術を用いてより良好なG P B P検出をもたらす抗体は、N 5、N 6、N 7、N 8、N 9、N 1 0、N 1 2、N 2 6及びN 2 7であった(表2を参照)。

#### 【0153】

N 1 - N 2 8モノクローナル抗体がサンドイッチE L I S A分析においてG P B Pを捕捉する能力の評価

サンドイッチE L I S A分析用の各抗体を選択するために、あらかじめ抗マウス抗体でコーティングしたE L I S Aプレートを使用して、培地からのモノクローナル抗体と、評価される組換え及び天然G P B Pを捕捉するそれらの能力とを結びつけた。抗マウスコーティングされたE L I S Aプレートに、示された抗体のハイブリドーマからの培地又は抗G A P D Hハイブリドーマからの培地(c o n t)を添加した。続いて、プレートをP B S中3% B S Aでブロックし、示された濃度のF B S中で希釈した組換えG P B Pとともに、又はF B S(ブランク)とともにインキュベートした。結合G P B Pは、ニワトリポリクローナル抗G P B P及びH R P標識抗ニワトリI g Yで検出された。蛍光試薬(A m p l e x)を用いて発色させた。

#### 【0154】

a) ヒト組換えG P B Pの捕捉分析。全ての抗体は効率よくF L A G - G P B Pを捕捉し、N 5、N 6、N 8、N 1 0、N 1 1、N 1 2、N 1 5、N 1 6、N 2 0、N 2 3、N 2 6、N 2 7およびN 2 8が、10 ng / mlのF L A G - G P B Pを含むF B SからF L A G - G P B Pを捕捉する最良の効率を示した(表2)

b) ヒト循環G P B P(血漿)の捕捉分析。抗マウスコーティングされたE L I S Aプレートをロードし、前述のようにブロックし、F B S中で1:10に希釈されたグッドパスチャー患者ヒト血漿(登録番号M 0 4 9)又はF B S単独(ブランク)とともにさらにインキュベートした。28の抗体のうちの9(N 3、N 5、N 9、N 1 0、N 1 1、N 1 2、N 1 3、N 2 6及びN 2 7)が効率的にヒト血漿からのG P B Pを捕捉した(表2)

#### 【0155】

##### 結論

本発明者らは、E L I S A、免疫蛍光法及び免疫組織化学的方法による天然のG P B P検出のための新規モノクローナル抗体を提供する。

#### 【0156】

【表 2】

	recGPBP		ウイスタンブロット				IF		IHC	捕捉抗体	
	細胞内	細胞外	45	77	88	91	rec	nat		rec	(サンドイッチELISA) 天然(血清)
N1	++	-	-	-	-	-	+	+/-	+/-	++	-
N2	+++	+	-	+/-	-	-	+++	+/-	+/-	+/-	-
N3	+++	+	-	+	-	-	++	+/-	+	++	+
N4	++++	++++	+	++++	+	-	++	+/-	+	+	-
N5	++++	+++	++	++	-	-	++	++	++	+++	++
N6	+	-	-	-	-	-	+/-	+/-	++	+++	-
N7	++++	++++	-	++++	+	-	++	+/-	++	+	-
N8	+++	++	-	+/-	-	-	+++	+/-	++	++	+/-
N9	+++	++	-	+/-	-	-	+++	+/-	++	++	+
N10	+++	+	++	+++	-	-	++	+/-	++	++	+
N11	++++	++++	++	++++	++	-	++	+/-	++	+++	++
N12	+++	+++	+++	+++	-	-	++	++	+++	+++	+++
N13	+++	+++	+	+	-	-	+++	+/-	+	++	++
N14	++++	++++	+	++++	++	-	+++	+/-	+	++	-
N15	+++	++	-	+/-	-	-	+++	+/-	+/-	+++	-
N16	++++	++	+	++	-	-	+++	++	+	+++	-
N17	+	-	-	-	-	-	+	+/-	+/-	+/-	-
N18	++	-	-	-	-	-	++	+/-	+/-	+/-	+/-
N19	+++	-	-	-	-	-	+	+/-	+/-	+/-	-
N20	-	-	-	スミア	-	-	++	+/-	+	++	+/-
N21	-	-	-	スミア	-	-	+++	++	+	+	-
N22	+++	+++	-	+++	-	-	+++	+/-	+/-	+	-
N23	+++	+	-	-	-	-	++	+/-	+/-	++	+/-
N24	++	-	-	スミア	-	-	++	+	+	+	+/-
N25	+++	++	++	+	-	-	++	+/-	+/-	+	-
N26	++	-	-	-	-	++	+++	++	++	++	++
N27	+++	+++	++	+++	++	-	++	++	++	+++	++
N28	+++	+++	++	+	-	-	+	+/-	+	++	+/-

表2. ウイスタンブロット、免疫蛍光法 (IF) 及び免疫組織化学 (IHC) における検出抗体として、及びサンドイッチELISAにおける捕捉抗体としての28モノクローナル抗体の相対的有効性のまとめ。

10

20

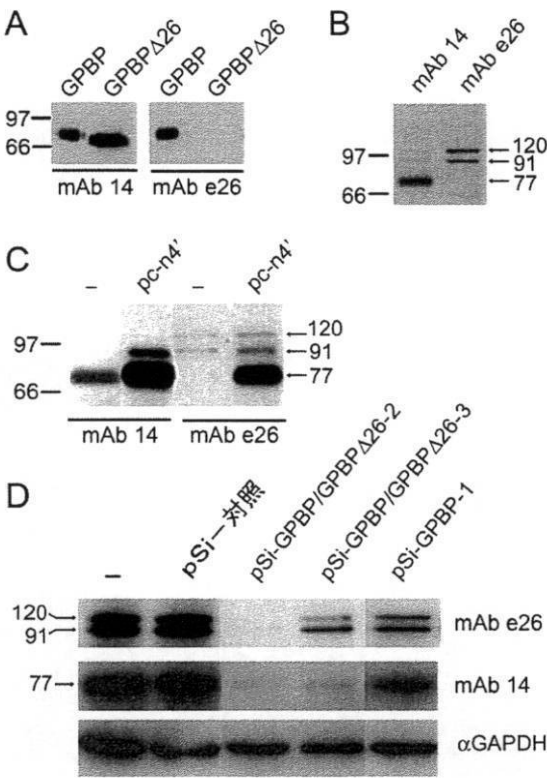
30

40

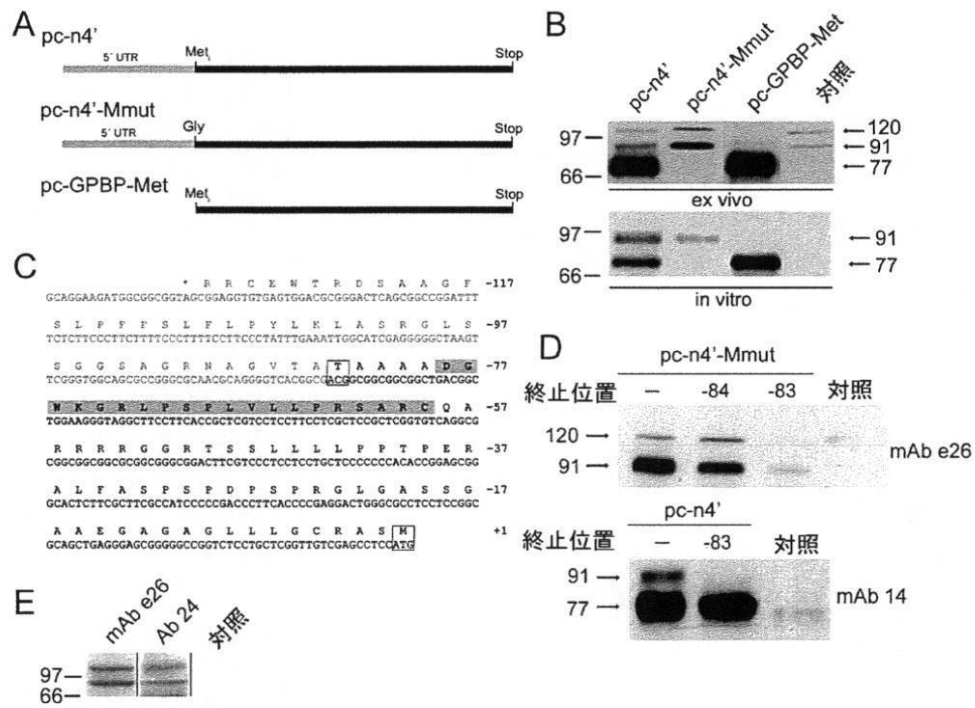
【 図 1 9 】

TAAAA**DOWNGRLEPLVILLPSARCQ**ARRRGGRTSSLLLLLFTPERALFASFSDFSPRGLGASSGAAE  
GAGAGILLCCRA**MS**QWQSNSSSEEDPESGPPVERCVLSKWTNWIHGWDQDPVFLKNNALSYTKS  
EDETGYGCRGSICLSKAVITPHDFDECFDISVNSVWYLRQDPDHRQOWIDALEQHKTESGYGSESSL  
RRHGSMDLVSGAGGYGATSTSSFEKKGHSLEKLAEMETTRDILCRQVDTLQKYTDACADAVSKDELQRD  
KVVEDDEDDFTTTRSDGDFLSTNGNKEKLFPHVTPKGINIDFKGEAITFKATTAGILATLSHCIELMV  
KREDSQKRLDKETEKRRTEEAYKNAMTELKKSHFGGPDYEEGPNLSLINE**EEFFDAVE**ALDRQDKIE  
EQSQSEKVLHWFTSLFSGDAFSSVGTTHRFVQKPYSRSSSMSSIDLVSAS**DDVHRE**SSQVEEMVQNHMTY  
SLQVGGDANQLVVEEGEMKYRREVEENGIVLDPLKATHAVKGYTGHEVCNTIENWVQVRSNDETTIEN  
FHVETLADNAIITVQTHKRWPFASQRDVILSVIRKIPALTENDPETWVCNPSVDHDSAPLNNRCVRA  
KINVAMICOTLVSPPEGNQDISRONILCKITYVANVNPGGWAFASVLRVAKREYKFLKRETSYVQEXT  
AGKPILF

【 図 1 】

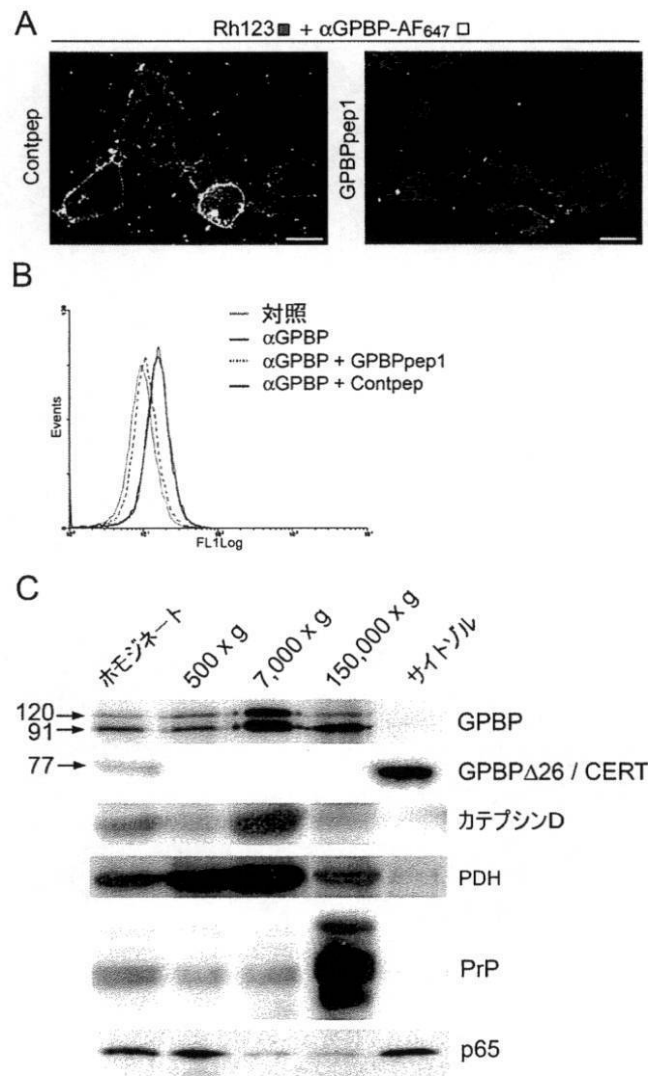


【図2】

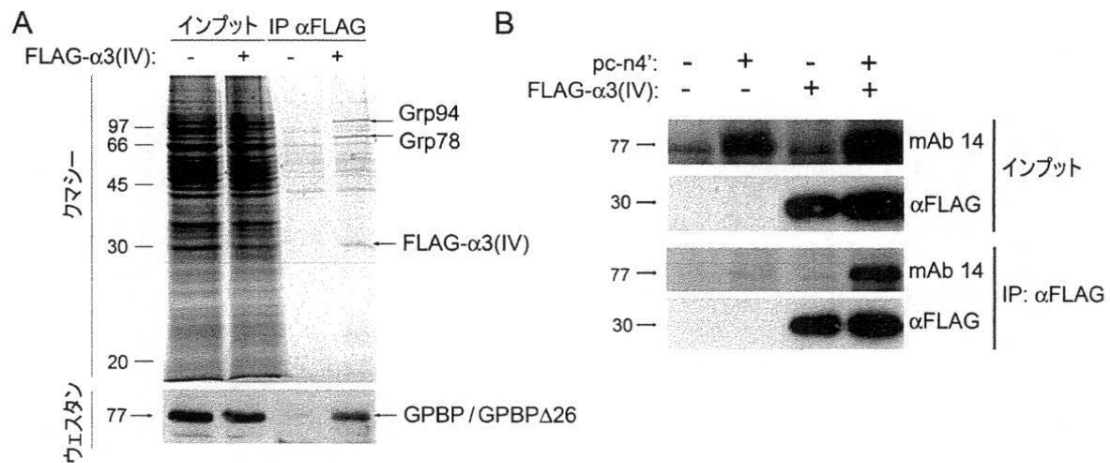




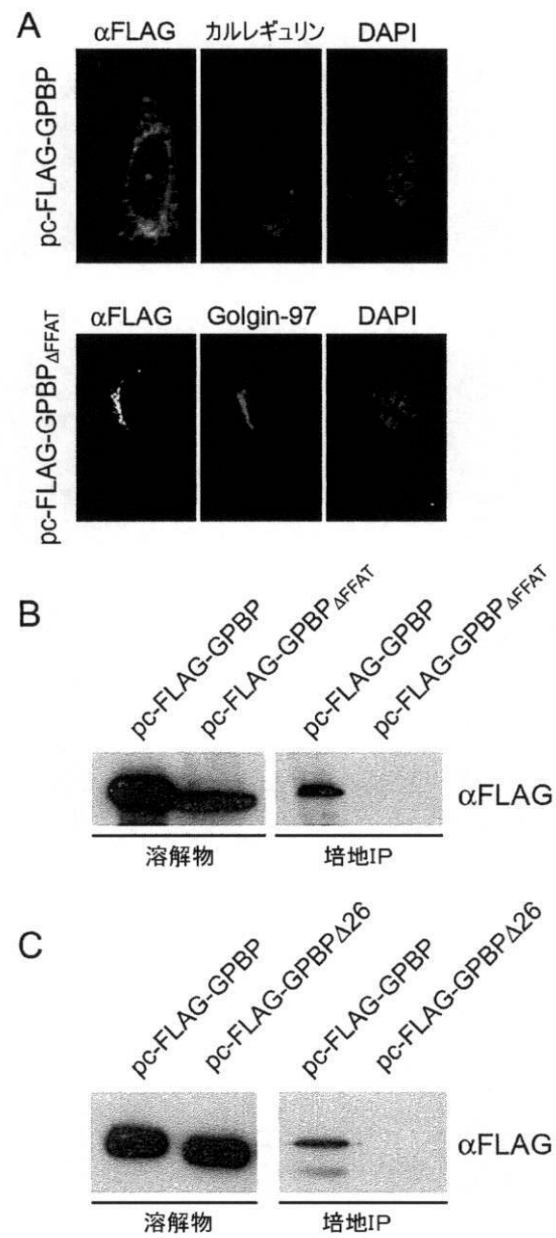
【 図 3 】



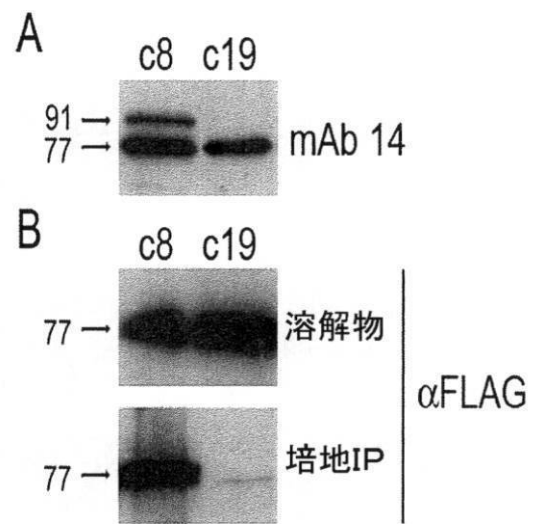
【 図 4 】



【図5】



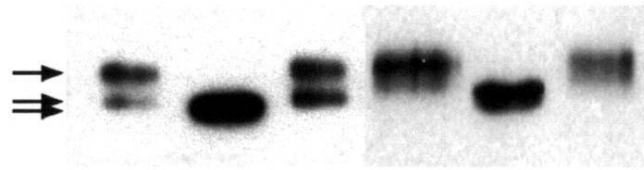
【図 6】



【 図 7 】

**A**

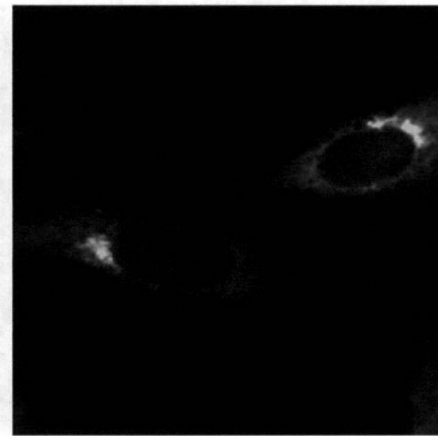
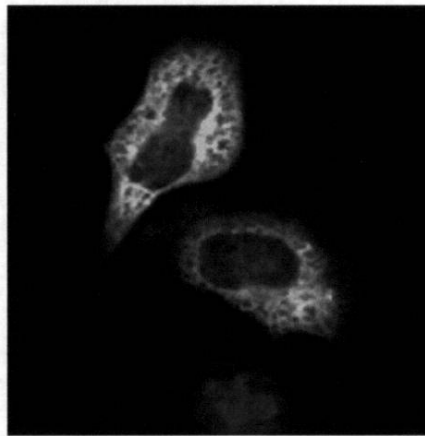
bSMase:	-	-	+	-	-	+
$\lambda$ PPase:	-	+	-	-	+	-



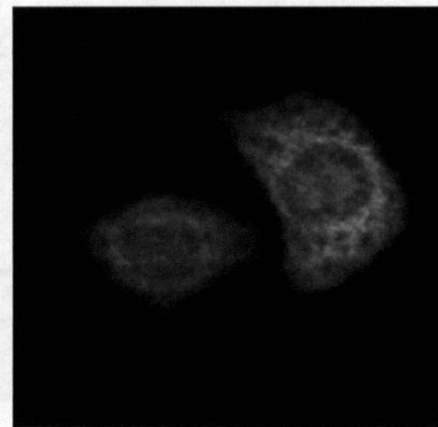
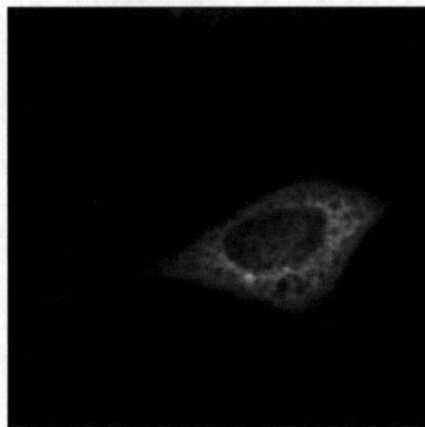
pc-FLAG-GPBP $\Delta$ 26    pc-FLAG-GPBP

**B**

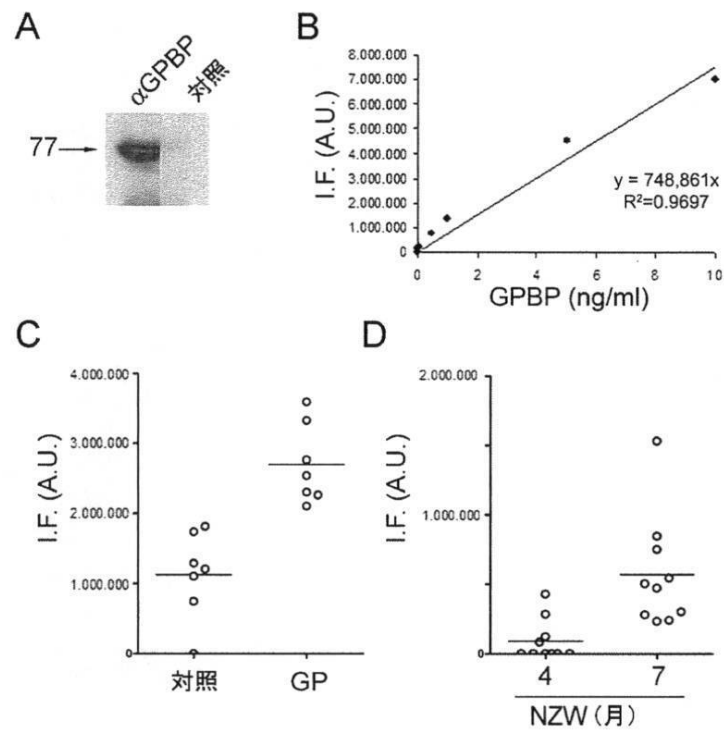
bSMase:	-	+
---------	---	---

pc-FLAG-GPBP $\Delta$ 26

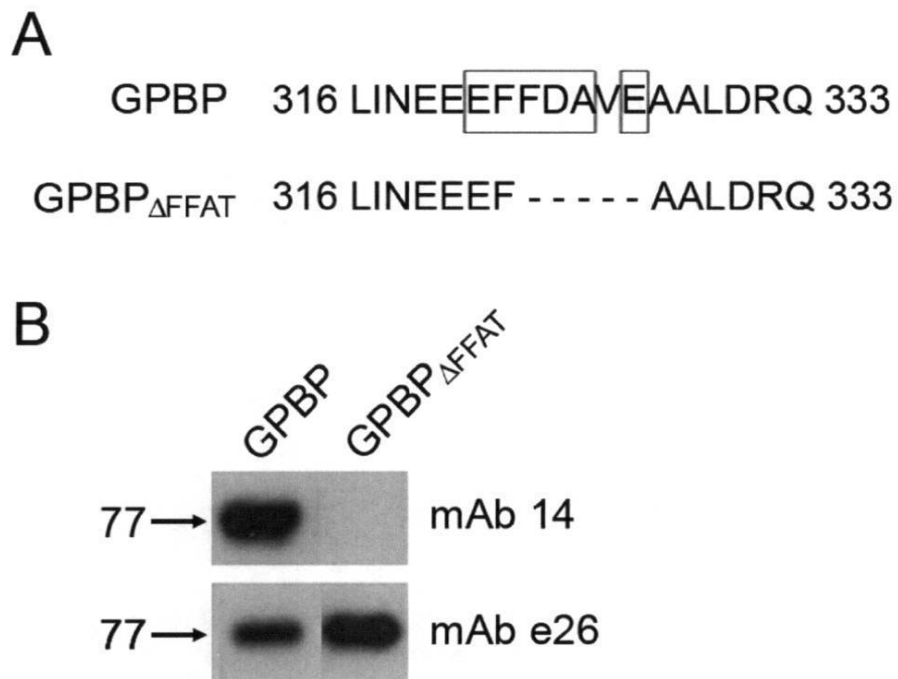
pc-FLAG-GPBP



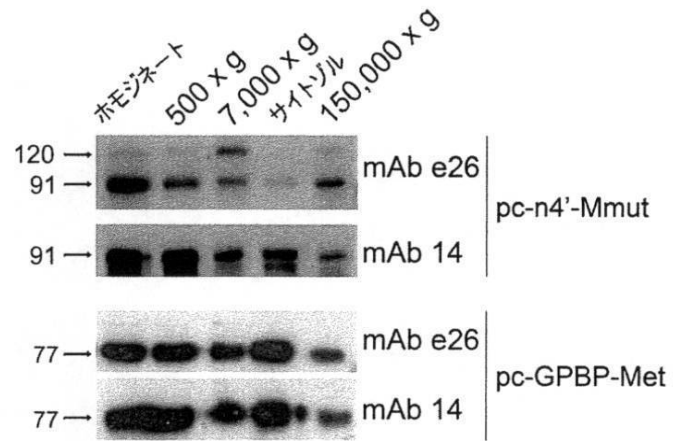
【 図 8 】



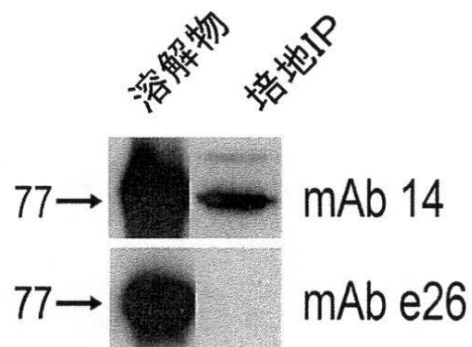
【 図 9 】



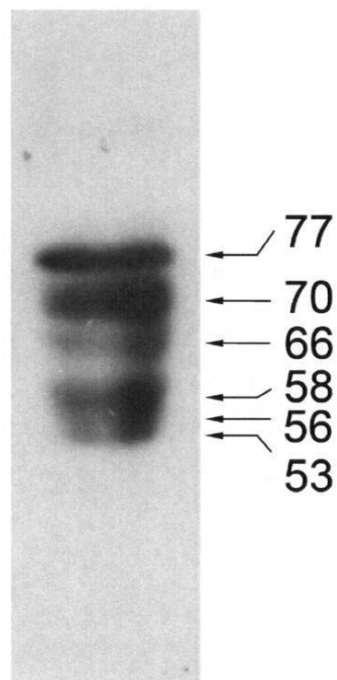
【図 10】



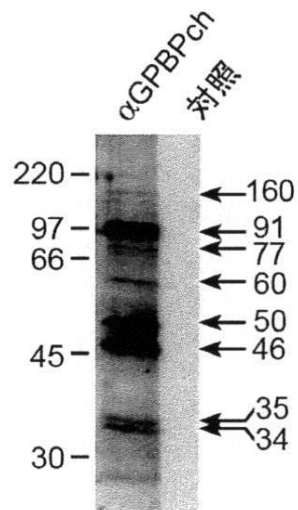
【図 11】



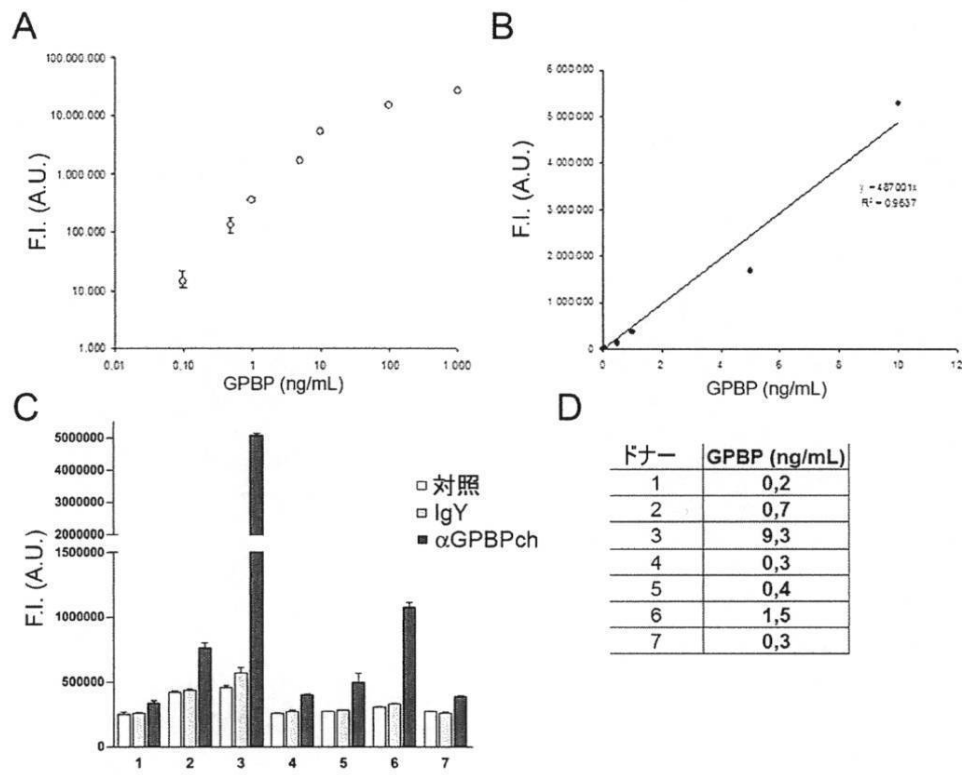
【図 12】



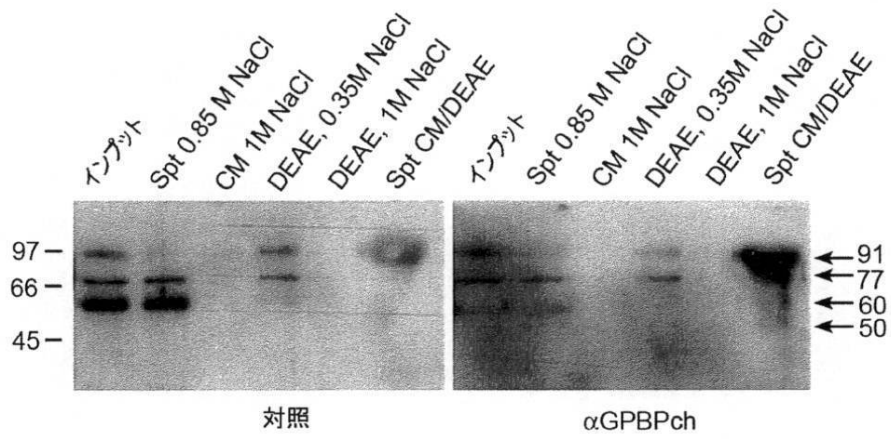
【図13】



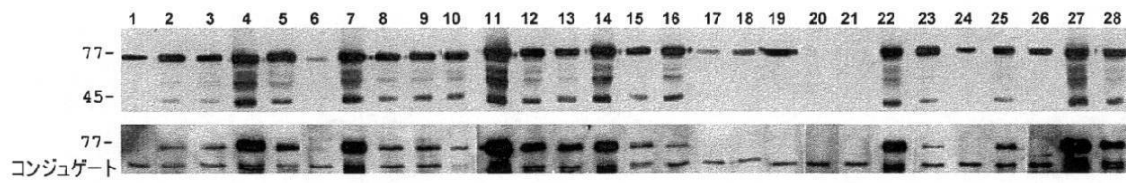
【図14】



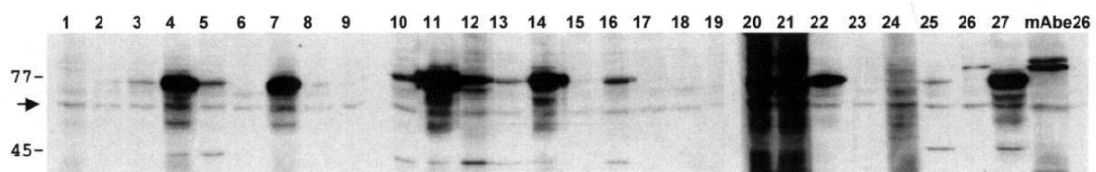
【図 15】



【図 16】



【図 17】





【図 18】

A

```

MSDNQSWNSSGSEEDPETESGPPVERCGVLSKWTNYIHGWQDRWVVLKNNALSYKSEDE 60
TEYGCRGSICLSKAVITPHDFDECRFDISVNDVWYLRAQDPDHRQQWIDAIEQHKTESG 120
YGSESSLRRHGSMVSLVSGASGYSATSTSSFKKGHSLREKLAEMETFRDILCRQVDTLQK 180
YFDACADAVSKDELQRDKVVEDDEDDFPTTRSDGDFLHSTNGNKEKLFPHVTPKGINGID 240
FKGEAITFKATTAGILATLSHCIELMVKREDWQKRLDKETEKKRTEEAYKNAMTELKK 300
KSHFGGPDYEEGPNSLINEEEFFDAVEAALDRQDKIEEQSQSEKVRHLHWPTSLPSGDAFS 360
SVGTHRFVQKPYSRSSSMSSIDLVSASDDVHRFSSQVEEMVQNHMTYSLQDVGGDANWQL 420
VVEEGEMKVYRREVEENGIVLDPIKATHAVKGVGTGHEVCNYFWNVVDVRNDWETTIENTFHV 480
VETIADNAIIYYQTHKRVWPASQRDVLYLSVIRKIPALTENDPETWIVCNFSVDHDSAPL 540
NNRCVRKINVAMICQTLVSPPEGNQEISRDNILCKITYVANVNPGGWAPASVLRVAKR 600
EYPKFLKRFTSYVQEKTAGKPILF 624

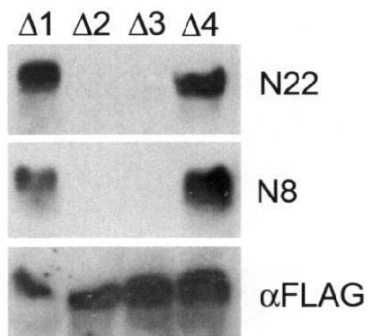
```

Diagram A shows a protein sequence with 13 numbered arrows indicating specific regions or domains. The sequence is aligned with residue numbers 60 to 624.

B

7	R R T E E A Y K N A M T E L K K K S H F	304	Δ1
	G G P D Y E E G P N S L I N E E E F F D	324	Δ2
8	A V E A A L D R Q D K I E E Q S Q S E K	344	Δ3
	V R L H W P T S L P S G D A F S S V G T	364	Δ4

C



【配列表】

0005654989000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 レベルト、フェルナンド

スペイン国 E - 4 6 1 1 3 バレンシア モンカダ 4 3 セー / ルイス ビベス

審査官 森井 文緒

(56)参考文献 特表 2 0 0 3 - 5 2 5 0 2 3 ( J P , A )

国際公開第 2 0 0 4 / 0 7 0 0 2 5 ( W O , A 1 )

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

G 0 1 N 3 3 / 5 3

PubMed

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

U n i P r o t / G e n e S e q

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q