

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3906314号

(P3906314)

(45) 発行日 平成19年4月18日(2007.4.18)

(24) 登録日 平成19年1月26日(2007.1.26)

(51) Int. Cl.	F I	
C O 7 K 14/52 (2006.01)	C O 7 K 14/52	Z N A
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
請求項の数 21 (全 76 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願平7-527676	(73) 特許権者	ジェネンテク・インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成7年4月6日(1995.4.6)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(65) 公表番号	特表平9-512427		80-4990、サウス サンフランシ
(43) 公表日	平成9年12月16日(1997.12.16)		スコ、ディーエヌエイ ウェイ 1
(86) 国際出願番号	PCT/US1995/004467	(73) 特許権者	ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシ
(87) 国際公開番号	W01995/029237		ティ・オブ・カリフォルニア
(87) 国際公開日	平成7年11月2日(1995.11.2)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
審査請求日	平成14年1月23日(2002.1.23)		07-5200、オークランド、12
(31) 優先権主張番号	08/233,609		ティーエイチ フロア、フランクリン
(32) 優先日	平成6年4月25日(1994.4.25)		トリート 1111
(33) 優先権主張国	米国(US)	(74) 代理人	弁理士 園田 吉隆
(31) 優先権主張番号	08/286,304		
(32) 優先日	平成6年8月5日(1994.8.5)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 カルジオトロフィンおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(a)又は(b)の単離されたポリペプチド:

(a) 配列番号: 3に示されるアミノ酸配列を持つポリペプチド、又は

(b) (a)のポリペプチドにおいて1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは挿入されたアミノ酸配列を持ち、かつ心臓筋細胞肥大性活性、及び／又は神経栄養活性を持つポリペプチド。

【請求項2】

以下の(a)又は(b)の単離されたポリペプチド:

(a) 配列番号: 8に示されるアミノ酸配列を持つポリペプチド、又は

(b) (b)のポリペプチドにおいて1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは挿入されたアミノ酸配列を持ち、かつ心臓筋細胞肥大性活性、及び／又は神経栄養活性を持つポリペプチド。

【請求項3】

還元性SDS-PAGE上で分子量約21-23kDを有する請求項1又は2のポリペプチド。

【請求項4】

請求項1又は2のポリペプチドに結合することのできる単離された抗体。

【請求項5】

請求項4の抗体を産生するハイブリドーマ細胞系列。

10

20

【請求項 6】

請求項 4 の抗体を請求項 1 又は 2 のポリペプチドを含有することが推測される試料または細胞と接触させ、結合が起きたか否かを検出することを含む、前記ポリペプチドの検出法。

【請求項 7】

請求項 4 の抗体を結合したカラムに請求項 1 又は 2 のポリペプチドの混合物を通過させ、前記ポリペプチドを含む分画を回収することを含む、前記ポリペプチドの精製方法。

【請求項 8】

請求項 1 又は 2 のポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

【請求項 9】

10

以下のヌクレオチド配列を持つ核酸分子：

(a) 配列番号：1に示すヌクレオチド配列を持つ核酸、又は

(b) (a) の核酸配列を持つ核酸にストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ該核酸がコードするポリペプチドが心臓筋細胞肥大性活性、及び／又は神経栄養活性を持つ核酸。

【請求項 10】

以下のヌクレオチド配列を持つ核酸分子：

(a) 配列番号：6に示すヌクレオチド配列を持つ核酸、又は

(b) (a) の核酸配列を持つ核酸にストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ該核酸がコードするポリペプチドが心臓筋細胞肥大性活性、及び／又は神経栄養活性を持つ核酸。

20

【請求項 11】

さらに核酸分子に作動可能に結合するプロモーターを含む請求項 8 の核酸分子。

【請求項 12】

標識されたものである請求項 8 の核酸分子。

【請求項 13】

請求項 8 の核酸分子を含むベクター。

【請求項 14】

そのベクターで形質転換した宿主細胞が認識する制御配列に作動可能に結合している請求項 8 の核酸分子を含む発現ベクター。

30

【請求項 15】

請求項 8 の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項 16】

請求項 15 の宿主細胞を培養することを含む請求項 1 又は 2 のポリペプチドをコードする核酸分子を前記ポリペプチドの生産のために使用する方法。

【請求項 17】

請求項 1 又は 2 のポリペプチドを宿主細胞から回収する請求項 16 の方法。

【請求項 18】

請求項 1 又は 2 のポリペプチドを宿主細胞培養培地から回収する請求項 16 の方法。

【請求項 19】

40

宿主細胞に請求項 9 又は 10 の核酸分子を含む発現ベクターを遺伝子移入する請求項 16 の方法。

【請求項 20】

請求項 8 ないし 10 の核酸分子を被験試料核酸とハイブリダイズさせ、C H F 核酸の存在を決定することを含む被験試料中における C H F 核酸分子の存在を決定する方法。

【請求項 21】

請求項 8 の核酸分子を用いて被験試料中で核酸ポリメラーゼ連鎖反応をプライミングすることを含む核酸被験試料の増幅法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

50

この発明は心不全の処置における心機能調節および神経学的疾患の処置における神経機能調節のための心臓肥大因子（カルジオトリフィンとも呼ばれる）に関する。

発明の背景

心不全は約300万人の米国人が罹患し、毎年約40万人に発症している。最近ではこれが米国における主な入院診断の一つである。急性心筋梗塞を含む急性心臓病の管理における最近の進歩は結局慢性心臓病に進行する患者人口の拡大を招いている。

心不全の最近の療法は一次的にはアンギオテンシン転換酵素（ACE）阻害剤と利尿剤の使用を指向している。ACE阻害剤は心不全における生存を延長する一方、最終段階心不全に向けた進行を遅らせ、ACE阻害剤を投与されている患者の多数が機能的に第III級心不全を持っている。さらに、ACE阻害剤は心不全患者の60%以上では症状緩和ができず、心不全による死亡の約15～20%しか減少しないことが确实と思われる。心移植はドナー心臓の入手可能性により限定される。さらに、ジゴキシンを除いて、筋変力作用陽性剤の長期的投与には、たとえば不整脈惹起、突然死、その他の有害副作用のような生存に関わる副作用を伴わない有用な薬剤はない。これら現用療法の欠陥は別の治療的手法に対する必要性を示唆する。

広範なデータは心不全初期における病理学的心筋肥大は心室の拡張、壁張力／ストレスの増加、心筋細胞の長さ対幅の増加、および随伴する心臓の性能および機能の減弱に特徴付けられて、有害であり得ることを示唆する。研究によれば、生理学的または代償性肥大の活性化は心不全には有益であり得る。実際、ACE阻害剤の効果は心臓の負荷を除くことを意図するのみでなく、心筋層内の局所的レニン-アンギオテンシン系に関連すると予想される病理学的肥大性反応を阻止することも意図されている。

分子生物学的水準では心臓は筋細胞および周囲の非筋細胞と呼ばれる支持細胞の合胞体として機能する。非筋細胞は本質的に線維芽細胞／間葉細胞であるが、それらは内皮細胞および平滑筋細胞も包含する。実際、筋細胞は成人心筋層量の殆どを構成するが、心臓中に存在する細胞数全体の約30%であるに過ぎない。生体内で心筋細胞と近接した関係の故に、非筋細胞は筋細胞成長および／または発育に影響を与えることができる。この相互作用は細胞-細胞接触を通じて直接にまたはパラクリン因子の生産を経て間接に介在しうる。このような生体内での関係は、非筋細胞数とそれによって相互作用している細胞外マトリックスとの双方が心筋層肥大においておよび損傷および梗塞に反応して増加するので重要である。これらの変化は異常な心筋層機能に関連している。

心臓の筋細胞は出生直後から分割不能である。それ以上の成長は各細胞の肥大を通じて起きる。筋細胞肥大の細胞培養モデルが開発されて心臓筋細胞肥大の機序に対する理解を深めた。Simpsonなど、Circ. Res.、51巻：787～801頁（1982年）；Chienなど、FASEB・J.、5巻：3037～3046頁（1991年）。培養心臓筋細胞の研究は殆どが非筋細胞の夾雑を最小化するように設計されている。例えば、SimpsonとSavion、Circ. CRes.、50巻：101～116頁（1982年）；Libby、J. Mol. Cell. Cardiol.、16巻：803～811頁（1984年）；Iwakiなど、J. Biol. Chem.、265巻：13809～13817頁（1990年）参照。

Shubaitaなど、J. Biol. Chem.、265巻：20555～20562頁（1990年）は肥大反応を活性化できる、たとえばエンドセリン-1のような、ペプチド由来成長因子を確認するための培養モデルの有用性を記載した。Longなど、Cell・Regulation、2巻：1081～1095頁（1991年）は心臓筋細胞の培養中での成長に関する心臓非筋細胞の影響を研究した。筋細胞肥大性成長は非筋細胞数を漸増した高密度培養においておよび非筋細胞数を漸増した共培養において促進された。筋細胞の寸法に及ぼす非筋細胞のこの効果は非筋細胞培養物により調整された血漿不含培地によって再現できた。この培養物中の主な筋細胞成長促進活性はヘパリン結合性であった。この成長因子の諸性質を心筋層に存在することが知られている線維芽細胞成長因子（FGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、腫瘍壊死因子-アルファ（TNF- α ）、およびトランスフォーミング成長因子-ベータ1（TGF- β 1）を包含する種々の成

10

20

30

40

50

長因子と比較した。Longなどの成長因子は他の公知成長因子よりも大きく、およびPDGFを除くこれら成長因子全部のものとは異なるヘパリンーセファロース溶離特性を持つことが見出された。さらに、これはPDGF特異性抗体によっては中和されなかった。著者はこれが心臓筋肉細胞の成長および発達に重要なパラクリン関係を規定することを提唱した。

鬱血性心不全のような心不全治療改善への要求があるのみでなく、神経学的疾患に有効な処置を提供することにも要求がある。インスリン様成長因子、神経成長因子、脳由来神経栄養因子、ニューロトロフィン-3、-4、-5、および毛様体神経栄養因子のような神経栄養因子がニューロンの生存を強化する、例えば筋萎縮性軸索硬化症、アルツハイマー病、発作、てんかん、ハンチントン病、パーキンソン病、および末梢性神経障害のような神経変性病のようなものの処置のための潜在的方法として提唱されている。これらの目的に別の療法を加えて提供することは望ましいものである。

それ故、本発明の目的の一つは鬱血性心不全のような心不全の予防および／または処置、殊に生理学的な型の肥大の促進または病理学的な型の肥大の阻止、および末梢性神経障害のような神経学的疾患の予防および／または処置のための改善された療法を提供することである。

このような療法で使用するための心臓肥大因子ポリペプチドおよびそれに対する拮抗剤の新規な群を確認することが別の目的の一つである。

このようなポリペプチドをコードする核酸を提供し、この核酸を組換え細胞培養物中でポリペプチドを生産するために使用することがさらに別の目的である。

さらに別の目的はそれらのアミノ酸配列変異体および共有結合誘導体を含む、このようなポリペプチドの誘導体および修飾型を提供することである。

別の目的の一つはこのようなポリペプチドに対する抗体を作成するための抗原を製造し、ならびにそれらと結合することのできる抗体を得ることである。

例えば発現クローニングおよびそのポリペプチドの精製において、発現クローニングから分離されたクローンの評価において、およびそのようなポリペプチドに対する拮抗剤の確認において、使用できる新規肥大性検定法を提供することがさらに別の目的である。

本発明のこれらおよびその他の目的は本明細書の全体を考慮すれば当業者には明白である。

発明の要約

本明細書に開示する心臓肥大因子（CHF）の発現クローニングおよび蛋白質精製を可能にする試験管内新生児ラット心臓肥大性検定法を開発した。毎週1000個の試料処理能力を持ち、試料必要量が100 μ Lまたはそれ以下と小さいこの検定法は今までに公表されている方法を使用しては不可能だったと思われる発現クローニングと蛋白質精製とを可能にした。それ故、態様の一つでは本発明は：（イ）インスリン、トランスフェリン、およびアプロチニンを含むダルベッコの修正イーグル培地（DMEM）／F-12培地のmL当り約7.5 $\times 10^4$ 細胞密度の筋細胞懸濁液を96ウェルプレートにプレーティング（植え付ける）すること；

（ロ）細胞を培養すること；

（ハ）被験試料（CHFを含むと推測されるような）を培養した細胞に添加すること；

（ニ）細胞を被験試料とともに培養すること；および

（ホ）被験試料が肥大性活性を持つかどうか決定すること

を含む被験試料を肥大性活性について検定する方法を提供する。

この検定法とは別に、本発明は、ラットCHFポリペプチドを除く、分離したCHFポリペプチドを提供する。このCHFポリペプチドは好ましくは実質的に均一であって、グリコシル化体でも非グリコシル化体であってもよく、天然配列ポリペプチド、ポリペプチド断片、変異体ポリペプチド、およびキメラ体ポリペプチドから構成される群から選択しうる。これに加えて、CHFポリペプチドは哺乳類から分離されたポリペプチド、組換え手法で作ったポリペプチド、および合成的手法で作ったポリペプチドから構成される群から選択しうる。さらにこのCHFポリペプチドはヒトのものであるポリペプチドおよびヒト

10

20

30

40

50

中で非免疫原性であるポリペプチドから構成される群から選択しうる。

別の側面では、分離されたC H Fポリペプチドは図1に示す翻訳C H F配列と少なくとも75%のアミノ酸配列同一性を共有する。別の側面では、このポリペプチドは成熟ヒトC H Fであって図5に示す翻訳C H F配列を持つ。

さらに別の側面では、本発明は中程度にストリンジェントな条件下に図1に提供する核酸配列とハイブリッド形成をする配列を持つ核酸がコードする分離されたポリペプチドを提供する。好ましくはこのポリペプチドは生物学的に活性である。

その他の側面では、本発明は異種ポリペプチドに融合したC H Fからなるキメラ体を提供する。

さらに別の側面では、本発明は生物学的に活性なC H Fと医薬的に許容しうる担体とを含むか、または免疫原性ポリペプチドに融合した生物学的に活性なC H Fを含む組成物を提供する。

その他の側面では、本発明はC H Fに結合することのできる分離された抗体、およびこの抗体をC H Fを含有することが推測される試料または細胞と接触させることおよびもし結合が起きたらE L I S Aのようなもので検出することを含む試験管内または生体内でC H Fを検出する方法を提供する。

さらに別の側面では、本発明は抗体を結合したカラムにC H Fの混合物を通過させ、C H Fを含む画分を回収することを含むC H Fの精製法を提供する。

他の側面では、本発明はC H Fをコードする分離された核酸分子、この核酸分子を含むベクター、好ましくはこのベクターで形質転換された宿主細胞が認識する制御配列に作動可能に結合する核酸分子を含む発現ベクター、哺乳類および細菌の宿主細胞を含むこの核酸分子を含む宿主細胞、およびこの核酸分子を含む宿主細胞を培養することによってC H Fを生産するためにC H Fをコードする核酸分子を使用する方法を包含する。好ましくは、宿主細胞に遺伝子移入してC H F核酸を発現させてC H Fを宿主細胞培養物から回収するか、もしも分泌されていれば、培養培地から回収する。

さらに別の側面では、本発明は図1または図5に示す読み取り枠の核酸配列を含む分離された核酸分子を提供する。本発明はラットC H Fを除外した分離された核酸分子であって、

(イ) 図1または図5に示すC H F遺伝子のコード領域のヌクレオチド配列を含むc D N Aクローン；

(ロ) (イ)のクローンとストリンジェントな条件下にハイブリッド形成をすることのできるD N A配列；および

(ハ) 天然C H Fポリペプチドの生物学的性質を持つポリペプチドをコードする(イ)または(ロ)のD N A配列のうちのいずれかの遺伝子変異体から構成される群から選択したものも提供する。

本発明は図1または図5に提供するD N A配列に中程度にストリンジェントな条件下にハイブリッド形成することのできる配列を持つ分離されたD N A分子であって、ラットC H Fを除く生物学的に活性なC H Fポリペプチドをコードするものも提供する。

さらに別の側面ではC H F核酸分子を被験試料と接触させることおよびハイブリッド形成が起きたかどうか決定することを含むか、またはC H F核酸分子を被験試料核酸にハイブリッド形成することおよびC H F核酸の存在を決定することを含む、被験試料中のC H F核酸分子の存在を決定する方法を提供する。

さらに別の側面では、本発明はC H F核酸分子と被験試料との核酸ポリメラーゼ連鎖反応をプライムすることを含む核酸被験試料を増幅する方法を提供する。

さらに別の側面では、本発明はC H F拮抗剤および前記肥大性検定法における被験試料として細胞上清液を使用することおよびこの検定法が示すC H Fの肥大性活性に拮抗する分子を検索することを含むその拮抗剤の確認法を提供する。

さらに別の側面では、本発明はこのような処置を要する哺乳類に治療的有效量の、C H FまたはC H F拮抗剤を医薬的に許容される担体中に含む、医薬的組成物を投与することを含む心不全、筋変力疾患または不整脈疾患に罹患しているかその危険を持つ哺乳類を処置

10

20

30

40

50

する方法を提供する。

本発明はまたこのような処置を必要とする哺乳類に医薬的に許容される担体中のC H Fを含む治療的有效量の医薬組成物を投与することを含む神経学的疾患に罹患しているか、その危険を持つ哺乳類を処置する方法を提供する。

付加的な態様において、本発明は標識C H F、好ましくは放射能標識C H F、を細胞受容体検定法中で使用すること、細胞にC H Fを結合させること、または標識C H Fを使用して受容体を含む細胞を濃縮すること、を含むC H Fに対する受容体を確認する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

図1 Aおよび1 BはマウスC H F・DNAクローンのヌクレオチド配列（センスおよびアンチセンス鎖）（配列番号：1および2）および演繹されたアミノ酸配列（配列番号3）を描写する。27位にある下線の相補ヌクレオチドは全長クローンを得るために使用したもう一つのマウスC H Fクローンの開始点を示す。

図2はマウスC H Fクローン（c h f. 781）の翻訳アミノ酸配列（配列番号3）とヒト毛様体神経栄養因子（h u m c n t f）のアミノ酸配列（配列番号4）を並列比較して配列同一性の程度を示す。

図3は新生児心臓肥大検定法によるフェニルエフリン（標準曲線）および293細胞遺伝子移入に対する心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）放出のグラフを示す。

図4はCNTF標準（円）、C H F・DNA遺伝子移入293細胞からの培地（三角）、および対照DNA遺伝子移入293細胞からの培地（四角）を使用する毛様体神経栄養因子（CNTF）標準（ng/mL）または遺伝子移入293細胞調整培地（検定容積の逆数）の関数として毛様体神経節ニューロンの生存（細胞数で測定）のグラフを示す。

図5 Aおよび5 BはヒトC H F・DNAクローンのヌクレオチド配列（センスおよびアンチセンス鎖）（配列番号6および7）および演繹したアミノ酸配列（配列番号8）を示す。

図6はヒトC H Fクローンの翻訳されたアミノ酸配列（h u m c t 1）（配列番号8）をマウスC H Fクローンの翻訳されたアミノ酸配列（c h f. 781）（配列番号3）と並列して配列同一性の程度を示す。

好適な態様の詳細な記載

I. 定義

一般に、下記の語句は発明の詳細な説明、実施例および請求項で使用するときには指摘する定義を持つ。

「C H F」（または「心臓肥大性因子」または「カルジオトロフィン」または「カルジオトロフィン-1」）は本明細書では図1のポリペプチド配列または図5に示すヒトの均等物を含む天然起源ポリペプチドの生物学的性質（下記）の少なくとも一つを有するポリペプチド配列であると定義する。これにはラットのC H F同族体、すなわちラット種からのC H Fは包含しない。この定義は本明細書記載のマウス胚様体のような天然C H F源からまたは、ラットを除き、ヒトを含む別の動物種のような別の源から分離したポリペプチドのみならず、組換え法または合成法で製造したポリペプチドにも及ぶ。これにはその機能的誘導体、アレル、アイソフォーム、および同族体を含む変異体型も包含する。

「C H F断片」は天然起源成熟全長C H F配列の一部であって、アミノ酸残基または炭水化物ユニット1個またはそれ以上を欠失させたものである。除去するアミノ酸残基はポリペプチドのN-末端またはC-末端または中間を含むいかなる場所にあってもよい。断片はC H Fと共通の生物学的性質の少なくとも1種を共有する。典型的には、C H F断片はアミノ酸残基少なくとも10、15、20、25、30、または40個の、マウス胚様体から分離されたC H FまたはヒトC H Fを含む、哺乳類から分離されたC H Fの配列と同一の逐次的配列を持つ。

本明細書で定義する「C H F変異体」または「C H F配列変異体」は組換え細胞培養物からまたは図1に記載する演繹された配列を持つマウス胚様体から得たC H F、または図5に記載するヒト均等物と100%以下の配列同一性を持つ以下に定義する生物学的に活性

10

20

30

40

50

なCH Fを意味する。通常、生物学的に活性なCH F変異体はマウス胚様体から分離したCH Fまたは成熟ヒトCH F（図1および図5参照）のアミノ酸配列との間に少なくとも約70%、好ましくは少なくとも75%、さらに好ましくは少なくとも約80%、さらにより好ましくは約85%、もっと好ましくは少なくとも約90%、および最も好ましくは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を持つ。

「キメラCH F」は全長CH Fまたはその断片1個またはそれ以上が第2の蛋白質またはその断片1個またはそれ以上に融合または結合したものを含むポリペプチドである。このキメラは生物学的性質の少なくとも1つをCH Fと共有する。第二の蛋白質は典型的にはサイトカイン、成長因子、または成長ホルモンのようなホルモン、IGF-I、またはたとえばCNTF、神経成長因子（NGF）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、ニューロトロフィン-3（NT-3）、ニューロトロフィン-4（NT-4）、ニューロトロフィン-5（NT-5）、その他のような神経栄養因子である。

10

「分離されたCH F」、「高度に精製されたCH F」および「実質的に均質なCH F」は互換的に使用され、CH F源から精製したか、組換えまたは合成的方法で製造したCH Fであって、（1）スピニングカップ配列決定装置または商業的入手可能な最高のアミノ酸配列決定装置またはこの出願の出願日において公表されている方法により修飾したものを使用して、N-末端または中間のアミノ酸配列のアミノ酸残基少なくとも15および好ましくは20アミノ酸残基を得るため、または（2）クーマジーブルーまたは好ましくは銀染色を使用する非還元または還元条件下のSDS-PAGEによる均質性まで、夾雑ペプチドまたは蛋白質が不含となっているCH Fを意味する。ここでは、均質性は他の源泉蛋白質の約5%より少ない夾雑を意味する。

20

「生物学的性質」は「CH F」または「分離されたCH F」いずれかと関連して使用する時は、心筋層肥大、筋変力作用、抗不整脈、または神経栄養活性を持つか、または直接または間接にCH F（天然または変性の立体配座に関わらず）またはその断片に起因したまたはそれが機能する生体内効果器または抗原機能または活性を持つことを意味する。この効果器機能には受容体結合および担体結合活性、CH Fの作動または拮抗、特に複製、DNA制御機能、他種成長因子の生物学的活性の調節、受容体活性化、不活化、アップおよびダウンレギュレーション、細胞成長または分化、その他の増殖シグナルの伝達を包含する。しかしながら、効果器機能には天然CH Fに対して作成される抗体と交差反応することのできるエピトープまたは抗原部位の保有は含まない。

30

「抗原機能」は図1に示す配列を持つか、図5に示す配列を持つヒトの相同体を含む他種哺乳類天然CH Fである、天然CH Fに対して作成される抗体と交差反応することのできるエピトープまたは抗原部位の保有を意味する。CH Fポリペプチドの主な抗原機能はマウス胚様体から分離したCH Fまたはそのヒト相同体に対して作成した抗体に少なくとも約 10^6 L/モルの親和性をもって結合することである。通常、このポリペプチドは親和性少なくとも約 10^7 L/モルで結合する。最も好ましくは、抗原的に活性なCH Fポリペプチドは前記効果器機能の一つを持つCH Fに対して作成された抗体に結合するポリペプチドである。「生物学的活性」を定義するために使用する抗体はフロインドの完全アジュバント中の組換え細胞培養または胚様体から分離したCH Fを製剤化し、この製剤を皮下注射し、抗CH F抗体の力価が安定するまでこの製剤を腹腔内注射して免疫反応をブースト（追加免疫）して作成したウサギのポリクローナル抗体である。

40

「生物学的に活性」は「CH F」または「分離したCH F」に関連して使用する時は、CH Fポリペプチドが肥大性、筋変力作用、抗不整脈、または神経栄養活性を示すか、またはマウス胚様体から分離したかまたは本明細書記載の組換え細胞培養により製造したCH Fの効果器機能を共有するもの、およびそれに加えて抗原機能を持ちうる（必須ではない）ことを意味する。本明細書のCH FまたはCH Fポリペプチドの主な効果器機能は、たとえば、特異なプレーティング培地および密度を使用し、好ましくはクリスタルバイオレット染色を読取るために使用する本明細書記載の心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）放出により、または筋細胞肥大検定により測定される心臓の成長または肥大活性に影響を与えることである。CH F（またはCH F拮抗剤）の所期の機能は生理学的肥大型（有

50

益)を増加させ、病理学的肥大を減少させることである。これに加え、本明細書のCH Fは、より正常な電気生理学的表現型を促進することによって、抗不整脈機能を発揮することが期待される。本明細書CH FまたはCH Fポリペプチドの他の主な効果器機能はCNT F活性に関する検定でのニワトリ毛様体神経節ニューロンの増殖刺激である。

抗原的に活性のCH FはCH Fの抗原的機能を有し、およびそれに加えて効果器機能を持っていたてもよい(必須ではない)ポリペプチドとして定義する。

好適な態様において、抗原的に活性なCH FはCH Fに結合することのできる抗体に少なくとも約 10^6 L/モルの親和性で結合するポリペプチドである。通常、このポリペプチドは少なくとも約 10^7 L/モルの親和性で結合する。CH Fに結合することのできる分離された抗体はそれが存在しうる天然環境の成分に確認され、分離された抗体である。最も好ましくは、抗原的に活性なCH Fは天然の立体配座においてCH Fに結合することのできる抗体に結合するポリペプチドである。天然立体配座におけるCH Fは天然に発見されるCH Fであって、例えば非還元的、非変性的サイジングゲル上での移動によって測定するとCH Fの三次元的構造を実質的に修飾するカオトロップ剤、熱またはその他の処理によって変性されていないものである。この測定で使用する抗体はフロイントの完全アジュバント中の非ウサギ種からの天然CH Fを製剤化し、この製剤を皮下注射し、抗CH F抗体力価が安定化するまでこの製剤を腹腔内注射することにより免疫反応をブーストして作成したウサギのポリクローナル抗体である。

CH F配列に関する「アミノ酸配列同一性百分率」はここでは、各配列を並列比較し、配列同一性百分率を最大にするために必要なら間隔を導入し、配列同一性の部分として如何なる保存的置換をも考慮せずに、図1に記載する演繹アミノ酸配列を持つマウス胚様体から分離したCH F配列中または図5に記載する演繹ヒトCH Fアミノ酸配列中の残基と同一な、候補配列中のアミノ酸残基の百分率として定義する。CH F配列へのN-末端、C-末端または中間での延長、欠失、または挿入は配列同一性または相同性に影響を与えないものと解釈すべきである。かくして、同一配列を持つと考えられる生物学的に活性なCH Fポリペプチドの例にはブレブローCH F、ブローCH Fおよび成熟CH Fを包含する。

「CH Fの微量配列決定」は適当な標準的操作法のいずれによってもその操作法が十分に敏感であれば達成しうる。この方法の一つにおいて、SDSゲルまたは最終的なHPLC段階から得られる高度に精製したポリペプチドは120 Aフェニルヒダントイン(PTH)アミノ酸分析装置を装着した470 A型Applied・Biosystems社の気相配列決定装置を使用する直接的自動エドマン分解(フェニルイソチオシアネート)法によって配列決定される。これに加えて化学的(たとえば、CNBr、ヒドロキシルアミン、または2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸)または酵素的(たとえば、トリプシン、クロストリパイン、またはスタフィロコッカスのプロテアーゼ)な消化およびそれに続く断片の精製(たとえば、HPLC)によって得られるCH F断片は同様にして配列決定しうる。PTHアミノ酸はChromPerfect(商品名)データシステム(Justice・Innovations社、パロアルト、CA)を使用して分析される。配列の解釈はVAX11/785 Digital・Equipment社の電算機上でHenzelなど、J. Chromatography、404巻:41~52頁(1987年)に記載のようにして実行される。要すればHPLC画分を5~20% SDS-PAGE上で電気泳動し、PVDF膜(ProBlott、AIB、フォスター市、CA)上に電気転写し、クーマジーブリリアントブルーで染色しうる。Matsuridara、J. Biol. Chem.、262巻:10035~10038頁(1987年)。この染色で確認される特定の蛋白質をプロットから切り出し、前記気相配列決定機によりN-末端配列決定を行う。中間の蛋白質配列については、HPLC画分を真空下に乾燥し(Speed Vac)、適当な緩衝液に再懸濁し、シアノーゲンブロミド、Lys特異的な酵素Lys-C(Wako・Chemicals社、リッチモンド、VA)またはAsp-N(Boehringer・Mannheim、インディアナポリス、IN)で消化する。消化後、得られたペプチドを混合物としてまたはC4カラム上で0.1%トリフルオロ酢酸(

10

20

30

40

50

T F A) 中プロパノール勾配で溶離するH P L C分割の後に気相配列決定する。

「分離されたC H F 核酸」は逐次的ヌクレオチド塩基16個またはそれ以上、好ましくは20個またはそれ以上を含むR N AまたはD N Aであって、生物学的に活性なC H Fまたはその断片をコードするものであって、このR N AまたはD N Aに相補的であるか、このR N AまたはD N Aにハイブリッド形成し、中程度にストリンジェントな条件下に安定して結合するものである。このR N AまたはD N Aは通常は天然起源中では共存する汚染源核酸少なくとも一種を含有せず、好ましくは他のいかなる哺乳類R N AまたはD N Aも実質的に含まない。「通常は天然起源中では共存する汚染源核酸少なくとも一種を含有せず」という用語はその核酸が起源または天然細胞内に存在するが、異なる染色体部位にあるか、またはそうでなければ起源細胞内に正常には存在しない核酸配列に結合している場合をも包含する。分離されたC H F 核酸の例はマウスC H FまたはヒトC H Fとは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは85%、さらにより好ましくは90%、および最も好ましくは95%の配列同一性を共有し、生物学的に活性なC H FをコードするR N AまたはD N Aである。

10

「制御配列」は発現に関する時には、特定の宿主生物中でコード配列に作動可能に結合する、配列の発現に必要なD N A配列を意味する。原核生物について適切である制御配列は、例えばプロモーター、要すればオペレーター配列、リボソーム結合部位、およびおそらくまだ不十分にしか理解されていない他の配列を含む。真核生物細胞はプロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを利用することが知られている。

「作動可能に結合」は核酸に関して言及する時にはその核酸が他の核酸配列と機能的な関係に位置することを意味する。例えば、もしそのポリペプチドの分泌に関与するプレ蛋白質として発現されるなら、プレ配列または分泌リーダーのためのD N AがポリペプチドのためのD N Aに作動可能に結合しており、もしそれが配列の転写に影響を与えるならプロモーターまたはエンハンサーはコード配列に作動可能に結合しており；または、もし翻訳を促進するように配置されているなら、リボソーム結合部位はコード配列に作動可能に結合している。一般的に、「作動可能に結合」は結合されるD N A配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接し、かつ読み枠内にある。しかしながら、エンハンサーは近接していなくてもよい。結合は好都合な制限部位での連結によって達成される。そのような部位が存在しなければ、常法に従って合成的オリゴヌクレオチド・アダプターまたはリンカーを使用する。

20

30

「外来性」は要素について言及する時には、その細胞にとって外来であるか、または細胞にとって相同的ではあるが宿主細胞核酸内では通常は存在しない位置にある核酸配列を意味する。

「細胞」、「細胞系列」および「細胞培養物」はここでは互換的に使用され、この記載はその細胞または細胞系列の全プロゲニー（子孫）を包含する。そこで、例えば「形質転換体」および「形質転換された細胞」のような用語は初代の対象細胞および継代数にかかわらずそれから誘導した培養物を包含する。全プロゲニーは意識的あるいは不作為的な突然変異に起因して、D N A含量について正確に同一でなくてもよいことも理解されている。最初に形質転換した細胞で検定したものと同一機能または生物学的活性を持つ突然変異プロゲニーは包含される。別の意味を意図する場合には、その前後の文章で明らかとなろう。

40

「プラスミド」は自律的に複製し、独立の複製開始点を有する環状D N A分子であって、ここでは小文字「p」を先行し、および／または大文字および／または数字を続けて命名する。ここでは出発プラスミドは商業的に入手可能か、限定なく公共的に入手可能であるか、またはこれらの入手可能なプラスミドから公表された操作に従って構築できる。これに加えて、他の均等なプラスミドが当分野では公知であって、当業者には明白であろう。

「制限酵素消化」はD N Aについて言及する時には、D N A内部のホスホジエステル結合のD N A配列中のある位置または部位のみに作用する酵素による触媒的切断を意味する。このような酵素は「制限エンドヌクレアーゼ」と呼称される。各制限エンドヌクレアーゼは二重鎖の対称を示す「制限部位」と呼ばれる特定のD N A配列を認識する。本明細書で

50

使用する種々の制限酵素は商業的に入手可能であって、酵素供給者が確立したそれらの反応条件、補助因子、およびその他の要件を使用する。制限酵素は通常、最初に各制限酵素を得た微生物を表す大文字に続いて他の字からなる略号、次に特定の酵素を示す数字によって命名する。一般に、プラスミドまたはDNA断片約1 µgを酵素約1～2単位とともに緩衝液約20 µL中で使用する。特定の制限酵素に対する適当な緩衝液および基質量は製造者が指定している。37℃で約1時間のインキュベーションを通常用いるが、供給者の指示書に従って変化させうる。インキュベーションの後に、フェノールおよびクロロホルムで抽出して蛋白質またはポリペプチドを除去し、消化した核酸をエタノールでの沈殿によって水性画分から回収する。制限酵素による消化に続いて、末端5'-ホスフェートの細菌アルカリホスファターゼ加水分解をしてDNA断片の制限分解末端2個が「環化」または制限部位での他種DNA断片の挿入を妨げる閉鎖環形成を防止する。別段の言及がない限り、プラスミドの消化の後で5'-末端脱リン酸化は行わない。Sambrookなど、分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）（ニューヨーク、Cold Spring Harbor Laboratory Press社、1989年）の1.56～1.61章に記載のように脱リン酸化の操作および試薬は常法のものである。

制限消化からの特定DNA断片の「回収」または「分離」は消化物のポリアクリルアミドまたはアガロースゲル上での電気泳動による分離、既知分子量のマーカーDNA断片と移動度を比較する所望断片の確認、所望の断片を含むゲル部位の取り出し、およびDNAからゲルを分離することを意味する。この操作は一般に公知である。例えばLawnなど、Nucleic Acids Res.、9巻：6103～6114頁（1981年）およびGoeddelなど、Nucleic Acids Res.、8巻：4057頁（1980年）参照。

「サザン分析」または「サザンブロッティング」は公知の標識オリゴヌクレオチドまたはDNA断片へのハイブリッド形成によって確認するDNAまたはDNA含有組成物制限エンドヌクレアーゼ消化物中のDNA配列存在確認法の一つである。サザン分析は典型的にはDNA消化物のアガロースゲルでの電気泳動的分離、電気泳動的分離後のDNAの変性、および前記Sambrookらの9.37～9.52章に記載のような放射能標識、ビオチン化、または酵素標識プローブでの分析のためにするニトロセルロース、ナイロンまたはその他の適当な膜担体へのDNAの転写を含む。

「ノーザン分析」または「ノーザンブロッティング」は、たとえばオリゴヌクレオチド、DNA断片、cDNAまたはその断片、またはRNA断片のような、既知プローブにハイブリッド形成するRNA配列を確認するために使用する方法である。このプローブは³²Pのような放射性同位元素、またはビオチン化、または酵素により標識する。分析すべきRNAは通常アガロースまたはポリアクリルアミドゲル上で電気泳動的に分離し、ニトロセルロース、ナイロンまたはその他の適当な膜に移し、前記Sambrookらの7.39～7.52章に記載のような当分野でよく公知の標準的技術を使用してプローブでハイブリッド形成する。

「連結」は核酸断片2個の間にホスホジエステル結合を形成する工程である。断片2個の連結のためには、両断片の末端を互いに適合させなければならない。ある場合には、両末端をエンドヌクレアーゼ消化後に直接的に適合させる。しかしながら、まず最初にエンドヌクレアーゼ消化後に共通に生成する互い違い切断末端を平滑末端に転換して、それらを連結に適合させる必要もありうる。両末端を平滑にするためには、DNAを適当な緩衝液中、DNAポリメラーゼIのクレノフ断片またはT4・DNAポリメラーゼ約10単位と共にデオキシリボヌクレオチド三リン酸4種の存在下に15℃で少なくとも15分間処理する。このDNAを次にフェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製する。相互に連結すべきDNA断片のおよそ等モル量を溶液中加入する。溶液にもまたATP、連結緩衝液、およびT4 DNAリガーゼのようなリガーゼをDNA 0.5 µg当り約10単位含有させる。もしそのDNAを連結してベクターとするならば、そのベクターをまず適当な制限エンドヌクレアーゼで消化してリネアライズ（線状化）する。線状化した

断片を次に細菌アルカリホスファターゼまたは子ウシ小腸ホスファターゼで処理して連結段階での自己連結を防止する。

細胞からのDNAの「調製」は宿主細胞の培養物からプラスミドDNAを分離することを意味する。DNA調製のために通常に使用する方法は前記Sambrookらの1.25～1.33章に記載のようなプラスミドの大量—および少量生産法である。DNAの調製後、たとえば前記Sambrookらの1.40章に記載のような当分野でよく公知の方法により精製できる。

「オリゴヌクレオチド」は、たとえば1988年5月4日に発行された欧州特許266032またはFroehlerなど、Nucleic·Acids·Res.、14巻：5399～5407頁（1986年）に記載のデオキシヌクレオシドH—ホスフォネート中間体を経由するような固相技術を使用する、たとえばホスホトリエステル、ホスファイトまたはホスホロアミダイト化学のような公知法により化学的に合成した短い、単鎖または二重鎖のポリデオキシヌクレオチドである。さらに別の方法は次に記載するポリメラーゼ連鎖反応およびその他の自動プライマー法および固体支持体上のオリゴヌクレオチド合成を包含する。これらの方法は全てEngelsなど、Angew. Chem. Int. Ed. Engl.、28巻：716～734頁（1989年）に記載がある。これらの方法はその遺伝子の全核酸配列が既知であるか、またはコード鎖に相補的な核酸の配列が入手できれば使用される。そうでなければ、もし標的アミノ酸配列が公知であれば、各アミノ酸残基に対する公知で好適なコード残基を使用して可能性のある核酸配列を推測しうる。オリゴヌクレオチドは次にポリアクリルアミドゲルで精製される。

「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」は核酸、RNAおよび／またはDNAの特定の微量な断片を1987年7月28日に発行された米国特許第4683195号に記載のようにして増幅する操作または技術を示す。一般に、所望の領域の両末端からの配列またはそれを越える配列情報がオリゴヌクレオチドプライマーを設計するのに必要であり、これらのプライマーは増幅すべき鋳型の反対側の鎖に対して配列が同一であるかまたは類似する。両プライマーの5'—末端ヌクレオチドは増幅される物質の末端と一致しうる。PCRを使用すれば特定のRNA配列、全ゲノムDNAからの特定DNA配列、および全細胞RNAから転写されたcDNA、バクテリオファージまたはプラスミド配列その他を増幅できる。一般的に、Mullisなど、Cold·Spring·Harbor·Symp. Quant. Biol.、51巻：263頁（1987年）；Erllich編、PCR技術（PCR·Technology）、（Stockton出版社、NY、1989年）参照。ここで使用するPCRは核酸被験試料の増幅のための核酸ポリメラーゼ反応法の一つであって、プライマーとして既知の核酸および核酸ポリメラーゼを増幅のためまたは核酸の特定の切片を発生するための使用を含むものであるが、しかし唯一の例ではないものであると考えられる。

「ストリンジェント条件」は（1）例えば0.015M—NaCl／0.0015M—クエン酸ナトリウム／0.1%NaDodSO₄（SDS）を50℃で使用するような低いイオン強度および高温度を洗浄のために採用するか、または（2）ハイブリッド形成の間に、例えば0.1%ウシ血清アルブミン含有50%（v／v）ホルムアミド／0.1% Ficoll／0.1%ポリビニルピロリドン／750mM—NaClを含有するpH6.5の50mM—燐酸ナトリウム緩衝液、75mM—クエン酸ナトリウムを42℃で使用する、ホルムアミドのような変性剤を採用するものである。他例の一つは50%ホルムアミド、5×SSC（0.75M—NaCl、0.075M—クエン酸ナトリウム）、50mM—燐酸ナトリウム（pH6.8）、0.1%ピロ燐酸ナトリウム、5×デンハルト溶液、超音波処理鮭精子DNA（50μg／mL）、0.1%SDS、および10%デキストラン硫酸の42℃での使用と0.2×SSCおよび0.1%SDS中で42℃での洗浄の使用である。

「中程度にストリンジェント条件」は前記Sambrookらに記載されており、前記のストリンジェント条件よりもストリンジェントの弱い洗浄溶液およびハイブリッド形成条件（たとえば温度、イオン強度、およびSDS%）の使用を包含する。中程度にストリン

10

20

30

40

50

ジェント条件の一例は、たとえば、20%ホルムアミド、5×SSC (150mM-NaCl、15mM-クエン酸三ナトリウム)、50mM-リン酸ナトリウム (pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%デキストラン硫酸および20mg/mL切断変性鮭精子DNAからなる溶液中で37℃で一夜インキュベーションし、続いてフィルターを1×SSC中で約37~50℃で洗浄するような条件である。熟練した当業者はプローブ長などのような因子に応じて必要となる温度、イオン強度、その他を調節する方法を認識するものである。

「抗体」(Abs)および「免疫グロブリン」(Igs)は同一の構造的特徴を持つ糖蛋白質である。抗体は特定の抗原に対して結合特異性を示すが、免疫グロブリンは抗体および抗原特異性を持たない抗体その他の抗体様分子も含む。後者の種類のポリペプチドは、

10

「天然の抗体および免疫グロブリン」は通常約150000ダルトンのヘテロ四量体の糖蛋白質であって、同一の軽鎖(L)2個および重鎖(H)2個から構成されている。各軽鎖は重鎖に共有ジスルフィド結合1個によって結合するが、種々の免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間ではジスルフィド結合の数は異なる。各重鎖および軽鎖は規則的間隔のある鎖内ジスルフィド橋複数を持つ。各重鎖は一端では可変ドメイン(V_H)とそれに続く多数の定常ドメインを持つ。各軽鎖は一端に可変ドメイン(V_L)と他端に定常ドメインを持つ；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインに並び、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインに並んでいる。特定のアミノ酸残基が軽鎖と重鎖の可変ドメイン間の中間面(インターフェイス)を形成していると信じられている(Clothiaなど、J

20

Mol. Biol.、186巻:651~663頁[1985年];NovotnyとHaber、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82巻:4592~4596頁[1985年])。用語「可変」は抗体間で可変ドメインのある部分の配列が顕著に相違し、特定の抗体のその特定の抗原に対する結合と特異性とに利用される事実を示す。しかしながら、この可変性は抗体の可変ドメイン全体に均等に分布しているのではない。これは軽鎖および重鎖双方の可変ドメイン中の相補性決定領域(CDR)または超可変領域と呼ばれるセグメント3個に集中している。可変ドメインの中でより高度に保存された部分は枠組領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖と軽鎖の可変ドメインは各々FR領域4個を含み、主としてβ-シート立体構造をとっており、CDR3個を結合して、場合によりβ-シート構造の一部

30

を形成してβ-シート構造を結合するループを形成する。各鎖のCDRはFR領域により近接して維持され、他鎖のCDRとともに抗体の抗原結合部位形成に寄与する(Kabatなど、「免疫学的に重要な蛋白質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」、第5版、National Institute of Health、ベセスダ、MD[1991年]参照)。定常ドメインは直接的には抗体を抗原に結合することには関与しないが、しかし、たとえば抗体依存性細胞障害性への抗体の関与のような、種々の効果器機能を示す。抗体のパパイン消化は、各々単一の抗原結合部位を有する「Fab」断片と呼ばれる同一の抗原結合断片2個および容易に結晶化する性能を反映する名称で呼ばれる残りの「Fc」断片を産生する。ペプシン処理では抗原結合部位2個を持ち、まだ抗原と交差結合することのできるF(ab')₂断片を与える。

40

「Fv」は完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は重鎖1個および軽鎖1個の可変ドメインの強固な非共有結合的な会合により構成される二量体から構成される。各可変ドメインのCDR3個が相互に作用して抗原結合部位をV_H-V_L二量体の表面に決定するのはこの立体配置である。結局、CDR6個が抗体に抗原結合特異性を与える。しかしながら、結合部位全体よりも親和性は低いが、単一の可変ドメイン(または抗原に特異的なCDR3個のみを含むFvの半分)でさえ抗原を認識し、結合する性能を持つ。

Fab断片は軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第一定常ドメイン(CH1)も含有する。

Fab'断片は重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に抗体のヒンジ領域からのシステイ

50

ン1個またはそれ以上を含む少数の残基が付加されている点でF a b断片とは相違する。本明細書でF a b' - S Hは定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を持つF a b'を示す記号である。F (a b')₂抗体断片は最初は相互の間にヒンジシステインを持つ一対のF a b'断片として製造された。抗体断片のその他の化学的結合も知られている。

いずれかの種の脊椎動物から得た抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」はそれらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）およびラムダ（λ）と呼ばれる明瞭に区別される2種のタイプのいずれか一方に分類される。

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して免疫グロブリンは数種に分類できる。免疫グロブリンには主な5種類：I g A、I g D、I g E、I g GおよびI g Mがあって、これらの中でいくつかはさらにサブクラス（アイソタイプ）：たとえば、I g G-1、I g G-2、I g G-3、I g G-4、I g A-1およびI g A-2、に分類される。免疫グロブリンの種類に対応する重鎖定常ドメインは各々α、δ、ε、γおよびμと呼ばれる。免疫グロブリンの各クラスのサブユニット構造および3次元立体的構造はよく知られている。

用語「抗体」は最広義に使用し、単一のモノクローナル抗体（作動性および拮抗性抗体を含む）およびポリエピトープ特異性を持つ抗体組成物も包含する。

用語「モノクローナル抗体」はここでは実質的に均質な抗体の集団、すなわち微量に含まれる可能性のある天然起源突然変異を例外としてその集団を構成する各抗体が同一であるもの、から得た抗体を示す。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位を指向する。さらにその上に、典型的には種々の決定基（エピトープ）を指向する種々の抗体を含有する通常の（ポリクローナル）抗体製品とは対照的に、モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基を指向する。その特異性に加えて、モノクローナル抗体はハイブリドーマ培養により合成され、他の免疫グロブリンを夾雑物として含まない点が有利である。

ここに、モノクローナル抗体は、起源の種または免疫グロブリンのクラス、またはサブクラス分類、ならびに抗体断片（たとえば、F a b、F (a b')₂、およびF v）に関わらず、それらが所望の生物学的活性を示す範囲内において、定常ドメイン（たとえば、「ヒト化」抗体）を持つ抗C H F抗体の可変ドメイン（超可変ドメインを含む）をスプライスすること、または重鎖を持つ軽鎖、または他種からの鎖を持つ1種の鎖、または異種蛋白質との融合、によって製造されたハイブリッドおよび組換え抗体を含む。[たとえばC a b i l l yなど、米国特許第4 8 1 6 5 6 7 ; M a g eとL a m o y i、「モノクローナル抗体生産技術および応用 (M o n o c l o n a l · A n t i b o d y · P r o d u c t i o n · T e c h n i q u e s · a n d · A p p l i c a t i o n s)」中、79~97頁 (M a r c e l · D e k k e r社、ニューヨーク、1987年) 参照]。

そこで、修飾語「モノクローナル」は実質的に均質な抗体集団から得た抗体の性質を示すものであり、その抗体の生産に特定の方法を必要とすると解釈すべきものではない。例えば、本発明で使用するモノクローナル抗体はK o h l e rとM i l s t e i nがN a t u r e、256巻：495頁（1975年）に最初に記載したハイブリドーマ法によっても、または組換えDNA法（前記C a b i l l yなど）によっても生産しうる。

本明細書のモノクローナル抗体には、重鎖および／または軽鎖の一部が特定の種に由来するかまたは特定の抗体分類またはサブ分類に属する抗体の対応する配列と同一であるか相同であり、一方、鎖の残りの部分は他の種に由来するかまたは他の抗体分類またはサブ分類に属する抗体の対応する配列と同一であるか相同である抗体、ならびにそのような抗体の断片であって、所期の生物学的活性を持つもの（C a b i l l yなど、前出；M o r r i s o nなど、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、81巻：6851~6855頁 [1984年]）である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）を特に包含する。

非ヒト（たとえばマウス）抗体の「ヒト化」型は非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含有する特定のキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその断片（たとえばF v、F a b、F a b'、F (a b')₂、その他抗体の抗原結合サブ配列のような）

10

20

30

40

50

である。殆どの部分でヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であって、レシピエントの相同性決定領域（C D R）からの残基が所期の特異性、親和性および性能を持つ、たとえばマウス、ラット、またはウサギのような非ヒト種（ドナー抗体）のC D Rからの残基に置換されているものである。ある例では、ヒト免疫グロブリンのF v 枠組残基を対応する非ヒト残基に置換する。さらにその上、ヒト化抗体はレシピエントの抗体にも導入されたC D Rまたは枠組配列にも存在しない残基を含みうる。これらの修正は抗体の性能を調整して最適化するために行われる。一般に、ヒト化抗体は実質的に少なくとも1個、典型的には2個の可変ドメイン全てを含むものであって、そこにおいてはC D R領域の全部または実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、F R領域の全部または実質的に全部がヒトの免疫グロブリンのコンセンサス配列である。ヒト化抗体は最適には免疫グロブリン定常領域（F c）、典型的にはヒト免疫グロブリンのもの、の少なくとも一部分を含む。さらに詳細な事項はJ o n e s など、N a t u r e、3 2 1 巻：5 2 2～5 2 5 頁（1 9 8 6 年）；R e i c h m a n n など、N a t u r e、3 3 2 巻：3 2 3～3 2 9 頁（1 9 8 8 年）；およびP r e s t a、C u r r. O p. S t r u c t. B i o l.、2 巻：5 9 3～5 9 6 頁（1 9 9 2 年）を参照。

10

「ヒトに非免疫原的」は、医薬的に許容しうる担体中の医薬的有效量のそのポリペプチドをヒトの適当な組織と接触した時に、適当な潜在期間（たとえば8から14日）の後にそのポリペプチドの第二の投与に際して、そのポリペプチドに対する過敏性または耐性が証明されないことを意味する。

「神経学的疾患」は末梢性ニューロンおよび中枢神経系からのニューロンの双方を含むニューロンの疾患を示す。このような疾患の例は、たとえば末梢性神経障害（運動および感覚）、筋萎縮性軸索硬化症（A L S）、アルツハイマー病、パーキンソン病、発作、ハンチントン病、てんかん、のような神経変性疾患のすべて、およびたとえば糖尿病性網膜炎、網膜ジストロフィー、および乳児期悪性大理石骨病、セロイドー脂褐素沈着症、または胆汁鬱滞に起因する網膜変性、または光変性、外傷、軸索切断、神経毒性－興奮性変性または虚血性ニューロン変性に起因する網膜変性のような網膜に関する眼科学的疾患を含む。

20

「末梢性神経障害」は末梢神経系に影響する疾患を示し、最も多くは運動、感覚運動、または自律神経機能不全の一つまたは組合せとして現れる。末梢性神経障害により現れる広範な形態学的変化は同様に広範な原因数に独特に由来する。例えば、末梢性神経障害は遺伝的に獲得し、全身病から由来し、または毒薬により導入できる。これに限定するものではないが、例としては四肢感覚運動神経障害または、たとえば胃腸管運動性低下または膀胱アトニーのような自律神経障害を包含する。全身性疾患に起因する神経障害の例にはポリオ後症候群を含み、遺伝的神経障害の例はシャルコットマリーートゥース病、レフスム病、無βーリポ蛋白血症、タンジェ病、クラッペ病、異染色性白質萎縮症、ファブリー病、およびデジェリンーソッタ症候群を含み；および毒薬に起因する神経障害の例はビンクリスチンのような化学療法剤による処置に起因するものを包含する。

30

「心不全」とは心臓が代謝している組織の要求に必要な速度で血液を送らない心機能の異常性を示す。心不全は、たとえば鬱血性心不全、心筋梗塞、および頻脈性不整脈のような広範な病的状態を包含する。

40

「処置」は治療的処置および予防的または防止的手段の両方を示す。処置を要するものは既にその病気を持つものならびにその病気になる傾向があるかまたはその病気を予防すべきものを包含する。

治療の目的である「哺乳類」は哺乳類に分類される動物全てを示し、ヒトまたは、たとえばイヌ、ウマ、ネコ、ウシ、その他のような家畜および農場の動物、および動物園、スポーツ、ペットの動物を包含する。好ましくは、本明細書の哺乳類はヒトである。

ここで使用する「ACE阻害剤」はアンギオテンシンI からアンギオテンシンII への転換を妨げるアンギオテンシン転換酵素阻害性薬剤を示す。ACE阻害剤は全身性の血管抵抗を低下させ、循環の鬱血を軽減するので鬱血性心不全に有効でありうる。ACE阻害剤はこれらに限定するものではないが、商品名アクプリル（キナプリル）、アルテース（ラ

50

ミプリル)、カポテン(カプトプリル)、ロンテシン(ベナゼプリル)、モノプリル(フォシノプリル)、プリニビル(リシノプリル)、バソテック(エナラプリル)およびゼストリル(リシノプリル)を包含する。ACE阻害剤の一例は商標カポテンの下に販売されている。一般名でカプトプリルと呼ばれるこのACE阻害剤は、化学的には1-[(2S)-3-メルカプト-2-メチルプロピオン]-L-プロリンと命名されている。

II. 本発明の実施態様

1. CHFポリペプチド

この発明の好適なポリペプチドは筋細胞肥大性およびCNTF検定法でニワトリ毛様体ニューロンの発育を促進する生物学的性質を持つ実質的に均質なCHFポリペプチドである。さらに好適なCHFは肥大性、抗不整脈、筋変力作用および神経学的活性を持つ分離された哺乳類蛋白質である。この発明の最も好適なポリペプチドは肥大性、抗不整脈、筋変力作用、および神経学的活性を持つマウスおよびヒトのCHFであってそれらの断片も包含する。要すれば、これらマウスおよびヒトCHFはグリコシル化を欠く。

10

この発明の別の好適ポリペプチドは生物学的に活性なCHF変異体であって、図1のマウスCHFとの間に少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、さらに好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも85%、さらにもっと好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは95%(すなわち、各々70~100%、75~100%、80~100%、85~100%、90~100%および95~100%配列同一性)のアミノ酸配列同一性を示すアミノ酸配列を持つ。それとは別に、好適な生物学的に活性なCHF変異体は図5のヒトCHFとの間に少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、さらに好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも85%、さらにもっと好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは95%(すなわち、各々70~100%、75~100%、80~100%、85~100%、90~100%および95~100%配列同一性)のアミノ酸配列同一性を示すアミノ酸配列を持つ。

20

マウス胚様体からクローニングしたCHFは次の性質を持つ。

(1)還元SDS-PAGEで測定すると分子量約21~23kDを持つ。

(2)CNTFニワトリ毛様体ニューロン検定および筋細胞肥大性およびANP放出肥大性検定において陽性の活性を示す。

さらに好適なCHFポリペプチドはゲノムDNAまたはcDNAがコードするもので、図1に記載したマウスCHFのアミノ酸配列または図5に記載したヒトCHFのアミノ酸配列を持つものである。

30

この発明のその他の好適な天然起源の生物学的に活性なCHFポリペプチドはプレプロCHF、プロCHF、プレーCHF、成熟CHF、およびそのグリコシル化変異体を包含する。

さらに別の好適なこの発明のポリペプチドにはCHF配列変異体およびキメラCHFを包含する。通常は、好適なCHF配列変異体は生物学的に活性なCHF変異体であって、ヒトまたはマウスのCHFと少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、さらに好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも85%、さらにもっと好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは95%のアミノ酸配列同一性を示すアミノ酸配列を持つ。好適なCHF変異体の例はC-末端ドメインでのCHF変異体であって、塩基性または二塩基性アミノ酸残基(たとえば、RまたはK)の1個またはそれ以上が非塩基性アミノ酸残基(たとえば親水性、中性、酸性、芳香性、gly、proその他)で置換されたものである。

40

他の例示的好適CHF配列変異体の一つは「ドメインキメラ」であって、N-末端残基がおよそ図2に示すように並んでいるヒトのCNTF残基の全部ではないが、1個またはそれ以上で置換されているものである。この態様では、CHFキメラは図2に示す並列に対応する位置においてCHF配列にヒトCNTF配列からの個々の残基または残基のブロックが付加するか、置換している。例えば、CHFの対応するセグメントに相同的でないCNTFのセグメント1個またはそれ以上が置換することができる。この「CHF-CNTFドメインキメラ」には肥大性/抗不整脈/筋変力作用/神経栄養的を混合した生物学的

50

活性を持つことが意図されている。

この発明のその他の好適なポリペプチドにはマウス胚様体から分離したC H Fの配列または対応するヒトC H Fの配列と同一な少なくとも10、15、20、25、30、または40アミノ酸残基、好ましくは約10～150残基の逐次的配列を持つC H F断片を包含する。他の好適なC H F断片は精製C H Fの化学的または酵素的な加水分解または消化の結果として生産されたものを包含する。

本発明の別の側面の一つはC H F分子の精製法であって、精製すべきC H F分子を含有するC H F源と固定化した受容体または抗体ポリペプチドとを精製すべきC H F分子が固定化した受容体または抗体ポリペプチドに選択的に吸着する条件下に接触させ、固定化担体を洗浄して非吸着物質を除き、および精製すべき分子を吸着している固定化した受容体または抗体ポリペプチドから溶離緩衝液で溶離することを含む。C H Fを含有する源は胚様体細胞懸濁液でありうる。

10

あるいは、C H Fを含有する源は組換え細胞培養物であって、この場合、培養培地または細胞分解物のいずれかの中のC H F濃度は一般に原形質またはその他天然源中におけるよりも高濃度である。この場合、前記の免疫親和性法は、使用はできるが、普通は必要ではなく、この分野で公知のさらに慣例的な蛋白質精製法を採用しうる。略述すれば、実質的に均質なC H Fを提供するための好適な精製法は：粒状破碎物を、例えば遠心分離または限外濾過などで除去し；要すれば蛋白質プールを商業的に入手できる蛋白質濃縮濾過装置で濃縮し；およびその後ろに夾雑している可溶性蛋白質およびポリペプチドからC H Fを適当な精製手段の例である次の操作法：免疫親和性またはイオン交換カラム上の分画；エタノール沈降；逆相H P L C；たとえばD E A Eのようなシリカまたはカチオン交換樹脂上のクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；S D S - P A G E；硫酸アンモニウム沈降；T o y o p e a r lおよびM O N O - QまたはM O N O - Sクロマトグラフィー；例えばセファデックスG - 75を使用するゲル濾過；I g Gのような夾雑物質を除去するためのC H Fを結合するカラムおよびプロテインAセファロースカラム上のクロマトグラフィー、で精製することからなる。天然および組換えC H F双方のための好適な精製方式はB u t y l ・ T o y o p e a r lカラムに続いて、M O N - Qカラムおよび逆相C 4カラムを以下に記載のように使用する。

20

他の好適な態様において、この発明はC H Fに結合することのできる分離された抗体を提供する。好適な分離された抗C H F抗体はモノクローナルである（K o h l e r と M i l s t e i n、N a t u r e、256巻：495～497頁[1975年]；C a m p b e l l、「生化学および分子生物学における実験技術（L a b o r a t o r y ・ T e c h n i q u e s ・ i n ・ B i o c h e m i s t r y ・ a n d ・ M o l e c u l a r ・ B i o l o g y）」、B u r d o nら編、13巻、E l s e v i e r ・ S c i e n c e ・ P u b l i s h e r s、アムステルダム[1985年]；およびH u s eなど、S c i e n c e、246巻：1275～1281頁[1989年]）。分離された好適な抗C H F抗体は少なくとも約 10^6 L／モルの親和性でC H Fに結合するものである。より好ましくは、この抗体は少なくとも約 10^7 L／モルの親和性でC H Fに結合するものである。最も好ましくは、この抗体は前記効果器機能の一つを持つC H Fに対して作成される。

30

C H Fに結合することのできる分離された抗体は、要すれば第2のポリペプチドに融合しうるし、またその抗体またはその融合物は固定化したC H Fポリペプチドについて前記した源からC H Fを分離し、精製するために使用しうる。この発明態様のさらに好適な側面では、本発明は抗体をC H Fを含有すると推測される試料、好ましくは血清試料、と接触させること、および結合が起きたかどうかを検出することからなる試験管内または生体内でC H Fを検出する方法を提供する。

40

本発明はさらにC H Fまたはその断片をコードする分離された核酸分子であって、その核酸分子が検出可能な構造で標識されていても無標識でもよいもの、およびC H Fをコードする配列を持つ核酸分子に相補的な、またはストリンジェント条件または中程度にストリンジェントな条件下にハイブリッド形成する配列を持つ核酸分子を提供する。好適なC H F核酸は生物学的に活性なC H FをコードするR N AまたはD N Aであって、マウスまた

50

はヒトのCHFとの間に少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは95%の配列同一性を持つ。

さらに好適な分離された核酸分子は(イ)哺乳類CHF遺伝子のコード領域に基づくDNA(たとえば、図1または図5に提供するヌクレオチド配列またはその断片からなるDNA)；(ロ)少なくとも中程度にストリンジェントな条件下に(イ)のDNAにハイブリッド形成することのできるDNA；および(ハ)遺伝子コードの縮重性の結果として(イ)または(ロ)に規定するDNAに対して縮重関係にあるDNA；から選択した生物学的に活性なCHFをコードするDNA配列である。ここに記載する新CHFはそのDNAが図1または図5のDNA(またはその断片)と低ストリンジェント度ないし中程度にストリンジェントな条件下にハイブリッド形成しうる、適切な配列同一性を持つ一群のリガンドの一員でありうるということが意図されている。そこで、この発明の別の側面は低度ないし中程度にストリンジェントな条件下にCHFポリペプチドをコードするDNAにハイブリッド形成するDNAを包含する。

好ましくは、この核酸分子はCHFをコードするcDNAであり、さらに、ベクターで形質転換した宿主が認識する制御配列にこのcDNAが作動可能に結合しているものである複製可能なベクターを包含する。この側面は、さらにこのベクターで形質転換した宿主細胞および、CHFをコードするcDNAを形質転換宿主細胞の培養物中に発現させることおよび宿主細胞培養物からCHFを回収することを含む、CHF製造のためのcDNAの使用法も包含する。この様式で製造したCHFは好ましくは実質的に均一なマウスまたはヒトCHFである。

本発明はさらに、哺乳類に治療的有効量のCHFを投与することを含む、心不全、不整脈、筋変力性、または神経学的疾患を持つ哺乳類を処置する好適な方法を包含する。要すれば、このCHFは、鬱血性心不全の場合にはたとえばカプトプリルのようなACE阻害剤と、または、その他の型の心不全または心臓疾患の場合にはその他の心筋栄養、抗不整脈、または筋変力剤と、または神経学的疾患の場合には、たとえば、IGF-I、CNTF、NGF、NT-3、BDNF、NT-4、NT-5などのような神経栄養性分子と、組合せて投与される。

2. 天然配列CHFおよび変異体の調製

以下の議論は殆どCHF核酸を含むベクターで形質転換した細胞を培養して、細胞培養物からこのポリペプチドを回収することによるCHFの生産に関する。さらに、1991年5月16日に発行されたWO91/06667に提供されるようにこの発明のCHFが相同的組換えにより生産しうることも概観する。略述すれば、この方法は内在性CHF遺伝子を含む初代哺乳類細胞(たとえば、もし所期のCHFがヒトのものであればヒトの細胞)を増幅可能な遺伝子(たとえばジヒドロ葉酸還元酵素[DHFR]または下記のその他のもの)およびCHF遺伝子の増幅を提供するためのCHF遺伝子のコード領域の座におけるDNA配列と相同的な少なくとも150bpの長さのフランキング領域少なくとも1個を含む構築物(すなわちベクター)で形質転換することを包含する。この増幅可能な遺伝子はCHF遺伝子の発現を妨害しない部位になければならない。この形質転換は構築物が相同的に初代細胞のゲノムに組込まれて増幅可能領域が決定するように実行される。

構築物を含有する初代細胞を次に構築物中に存在する増幅可能遺伝子または他のマーカーによって選択する。マーカー遺伝子の存在により宿主ゲノム中への構築物組込と存在を確認する。第二宿主で選択するので、初代細胞をこれ以上に選択することは不要である。所望なら、相同的組換えの存在をPCRを利用して得た増幅DNA配列を配列決定するか、または正確な相同的組込体からのDNAが存在し、このような断片を含有する細胞のみを展開する時には、適当な長さのPCR断片を測定することにより決定することができる。また、所望ならば、選択した細胞を、この時点で細胞に適当な増幅剤(増幅遺伝子がDHFRであればメトトレキセートのようなもの)でストレスをかけることにより標的遺伝子の多重コピーが得られる様に増幅してもよい。しかしながら、下記の第二の形質転換後まで増幅段階を行わないのが好ましい。

10

20

30

40

50

選択段階後、全増幅可能領域を含むのに十分な大きさがあるゲノムDNA部分を選択した初代細胞から分離する。第二の哺乳類発現宿主細胞を次にこれらゲノムDNA部分で形質転換し、クローニングし、および増幅可能な領域を含むクローンを選択する。初代細胞の中で増幅してなければ、増幅可能領域を次に増幅剤によって増幅する。最後に、CHFを含む増幅可能領域の多重コピーを含有する第二の発現宿主細胞を育成させて遺伝子を発現させ、蛋白を調製する。

A. CHFをコードするDNAの分離

CHFをコードするDNAはCHF mRNAを有し、それを検出可能な濃度で発現すると信じられる組織から製造したcDNAライブラリーから調製する。このmRNAは、例えば、7日間分化した胚様体から適切に調製する。CHF遺伝子はゲノムライブラリーから、または完全なヌクレオチドまたはアミノ酸配列が既知であると仮定して前記の試験管内オリゴヌクレオチド合成によって得ることができる。

目的遺伝子またはそれがコードする蛋白質を確認するように設計したプローブでライブラリーを検索する。cDNA発現ライブラリーについて適切なプローブは、たとえば：CHFを認識して特異的に結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体；同一または相違する種からのCHF cDNAの既知のまたは推測上の部分をコードする長さの約20～80塩基のオリゴヌクレオチド；および／または同一または類似の遺伝子をコードする相補的または相同的cDNAまたはその断片など、を包含する。ゲノムDNAライブラリーを検索するのに適当なプローブは、これに限定するものではないが、オリゴヌクレオチド、cDNA、または同一または類似の遺伝子をコードするその断片、および／または相同的ゲノムDNAまたはその断片、を包含する。選択したプローブによるcDNAまたはゲノムライブラリーの検索は前記Sambrookらの10～12章に記載のような標準的操作を使用して実施する。

CHFをコードする遺伝子を分離するための別法の一つは前記Sambrookらの14章に記載のようなPCR法を使用することである。この方法はCHFにハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドプローブの使用を必要とする。オリゴヌクレオチドの選択方針を次に記載する。

この発明を実施する好適な方法は様々な組織、好ましくは哺乳類の分化した胚様体および胎盤、心臓、および脳細胞系列の組織、からのcDNAライブラリーを検索するために注意深く選択したオリゴヌクレオチド配列を使用するものである。さらに好ましくは、ヒト胚様体、胎盤、心臓および脳のcDNAライブラリーをオリゴヌクレオチドプローブで検索する。

プローブとして選択するオリゴヌクレオチド配列は十分な長さを持ち、十分に明確であって、偽陽性を最小にするものであるべきである。実際のヌクレオチド配列は通常保存性または高度に相同性のヌクレオチド配列に基づく。オリゴヌクレオチドは1個所またはそれ以上の個所で縮重していてもよい。優先的コドンの使用が知られていない種からのライブラリーを検索する場合には、縮重オリゴヌクレオチドの使用は殊に重要なものでありうる。

このオリゴヌクレオチドは検索すべきライブラリー中のDNAにハイブリッド形成した際に検出できるように標識しなければならない。標識の好適な方法は当分野でよく知られているポリヌクレオチドキナーゼで³²P-標識ATPを使用してオリゴヌクレオチドを放射能標識するものである。しかしながら、オリゴヌクレオチドを標識するにはこれに限定するものではないがビオチン化または酵素標識を包含する他の方法も使用する。

殊に興味深いものは全長ポリペプチドをコードするCHF核酸である。好適な数種の態様において、この核酸配列は天然のCHFシグナル配列を包含する。全蛋白質コード配列を持つ核酸は選択したcDNAまたはゲノムライブラリーを、最初は本明細書に記載する演繹されたアミノ酸配列を使用して検索し、また、要すれば前記Sambrookらの7.79章に記載のような通常のプライマー延長法を使用して前駆体を検出し、cDNAに逆転写されなかったmRNAの中間体をプロセッシングすることによって得られる。

B. 天然CHFのアミノ酸配列変異体

天然 C H F のアミノ酸配列変異体は適切なヌクレオチド変化を天然 C H F の D N A に導入するか、または所期 C H F ポリペプチドの試験管内合成によって調製される。このような変異体には、例えばマウス C H F について図 1 に、またヒト C H F について図 5 に示したアミノ酸配列内の残基からの欠失、挿入または置換を包含する。欠失、挿入および置換の組合せはいずれも所望の性質を有する最終構築物に到達するために行う。この発明の範囲からは C H F のラット同族体である C H F 変異体またはポリペプチド配列が除外される。アミノ酸変化は、たとえばグリコシル化部位の位置数を変更するような、天然 C H F の翻訳後過程も変更しうる。

天然 C H F のアミノ酸配列変異体の設計では、突然変異部位および突然変異の性質は修正すべき C H F の性質に依存する。例えば C H F 拮抗剤または超作動剤の候補は最初は C H F および成長ホルモン (G H) / サイトカイン受容体ファミリーの一員、特に C N T F および白血病阻害因子 (L I F) に結合する他のリガンド中の同一または高度に保存性である部位に配置することによって選択する。この突然変異のための部位は個々にまたは一連のものとして修飾できる。たとえば (1) 最初に保存性アミノ酸を選択し、次に達成した結果に依存してさらに選択を進めて置換すること、(2) 標的残基を除去すること、(3) 同一または異なる分類の残基を存在する部位の隣に挿入すること、または 1 ~ 3 の組合せ。

突然変異誘発のための好適な位置である天然 C H F ポリペプチドのある残基または領域を確認するための有用な方法の一つは「アラニン走査突然変異誘発」と呼ばれ、C u n n i n g h a m と W e l l s 、 S c i e n c e 、 2 4 4 巻 : 1 0 8 1 ~ 1 0 8 5 頁 (1 9 8 9 年) が記載している。ここで一残基または標的残基群を確認し (たとえば、a r g 、 a s p 、 h i s 、 l y s および g l u のような荷電残基)、中性またはマイナス荷電アミノ酸 (最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン) で置換して細胞の中または外側の周囲の水性環境とアミノ酸との相互作用に影響を与える。置換に対して機能的な感受性を示したドメインを次にその置換部位でまたはそれに向けてさらにまたは別の変異を導入することによって改良する。そこで、アミノ酸配列変異を導入するための部位は予め決定する一方、突然変異の性質そのものは予備的に決める必要はない。例えば、所定の部位における突然変異の様式を最適化するために、アラニン走査またはランダム突然変異誘発を標的コドンまたは標的領域で行い、生成した C H F 変異体を所期活性の最適な組合せについて検索する。

アミノ酸配列変異体の構築での主たる基本的変化には：突然変異部位の位置と突然変異の性質との 2 種がある。図 1 または図 5 の配列からの変異体があり、これらは天然に存在するアレル (これは天然の C H F D N A を操作する必要がない) か、あるいは天然に存在しないアレルまたは変異体に到達するためにこの D N A を突然変異することによって製造した予定した突然変異体である。一般に、選択した突然変異の位置と性質は修飾すべき C H F の性質に依存する。

アミノ酸配列欠失は一般に約 1 から 3 0 残基にわたり、より好ましくは約 1 から 1 0 残基であり、通常隣接するものである。隣接する欠失は通常は偶数の残基について行われるが、単数または奇数の欠失もこの範囲内である。C H F の活性を修飾するための欠失は C H F とヒト C H F アミノ酸配列に対する配列同一性の殆どを共有する G H / サイトカイン受容体ファミリーに結合するその他のリガンドとの間で相同性の低い領域に導入しうる。G H / サイトカイン受容体ファミリーに結合する他のリガンドの受容体結合部位の一つと実質的相同性領域内の C H F からの欠失は C H F の生物学的活性をより顕著に修飾する可能性があるらしく思われる。逐次的欠失の数は影響されるドメイン、たとえばベータプリーツシートまたはアルファ螺旋など C H F 三次構造を保存するように選択する。

アミノ酸配列挿入は長さ 1 残基から 1 0 0 残基またはそれ以上を含むポリペプチドの範囲にわたるアミノ酸および／またはカルボキシル末端融合、ならびに単数または複数アミノ酸残基の配列内部挿入を含む。配列内部挿入 (すなわち、成熟 C H F 配列内部への挿入) は一般に約 1 から 1 0 残基、より好ましくは 1 から 5、最も好ましくは 1 から 3 残基にわたりうる。挿入は好ましくは残基偶数について行うが、しかしこれは必須ではない。末

10

20

30

40

50

端挿入の例はN-末端メチオニル残基を持つ成熟CHF、組換え細胞培養での成熟CHF直接生産の人工生成物、および組換え宿主から成熟CHFの分泌を促進するための異種N-末端シグナル配列の成熟CHF分子のN-末端への融合を包含する。このようなシグナル配列は一般に意図する宿主細胞種から得られ、それ故、それに同種的である。適当な配列には大腸菌ではSTIIまたはIPP、酵母についてはアルファ因子、および哺乳類細胞についてはヘルペスgDのようなウイルスシグナルを包含する。

天然CHF分子のその他の挿入変異体にはたとえばβ-ラクタマーゼのような細菌ポリペプチドなど免疫原ポリペプチドまたは大腸菌trp座がコードする酵素または酵母蛋白質の、天然CHFのN-またはC-末端への融合、および1989年4月6日発行のWO89/02922に記載のような、たとえば免疫グロブリン定常領域（またはその他免疫グロブリン領域）、アルブミン、またはフェリチンのような半減期の長い蛋白質とのC-末端融合を包含する。

10

変異体の第3群はアミノ酸置換変異体である。この変異体は天然CHF分子のアミノ酸残基少なくとも1個が除去され、その場所に異なる残基を挿入したものである。置換的突然変異誘発のために最大の興味がある部位は天然CHFの活性部位として知られる部位および既知の同族体中に見られるアミノ酸が側鎖の嵩高さ、電荷、または親水性の面で実質的に異なるが、しかし種々の動物CHF種内の選択した部位において高度な配列同一性がある部位か、あるいはGH/サイトカイン受容体ファミリーおよび新規CHFに結合する既知リガンドに見られるアミノ酸が嵩高さ、電荷、または親水性の面で実質的に異なるが、しかし種々の動物リガンド同族体（たとえば、全動物CNTF分子間）の選択した部位において高度な配列同一性があるものである。この解析は心臓肥大、抗不整脈、筋変力作用、および神経栄養因子の活性の分化に關与する残基を目立たせ、これらの部位における変異体は活性に影響を与えるものとなろう。

20

興味あるその他の部位は種々の種から得られるCHFの特定の残基において全動物種のCHFおよび他のGH/サイトカイン受容体ファミリー分子に結合するリガンドの間で同一のものであって、これらの酵素に共通の生物学的活性を達成するための重要性をこの一致の程度が示唆する。これらの部位、特に少なくとも3個の同様に保存された部位の配列内にあるもの、は比較的保存性のある様式で置換される。このような保存性のある置換は好適な置換との表題の下に表1に列記する。もしそのような置換が生物学的活性の変化を招くなら、さらに表1の例示的置換に割付けたもの、またはアミノ酸のクラスに関連して以下に記載するような実質的な変化を導入して生成物を検索する。

30

表1

本来の残基	例示的置換	好適な置換	
Ala (A)	val; leu; ile	val	
Arg (R)	lys; gln; asn	lys	
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln	
Asp (D)	glu	glu	10
Cys (C)	ser	ser	
Gln (Q)	asn	asn	
Glu (E)	asp	asp	
Gly (G)	pro	pro	
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu	20
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile	
Lys (K)	arg; gln; asn	arg	
Met (M)	leu; phe; ile	leu	30
Phe (F)	leu; val; ile; ala	leu	
Pro (P)	gly	gly	
Ser (S)	thr	thr	
Thr (T)	ser	ser	
Trp (W)	tyr	tyr	
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe	40
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu	

天然CHFの機能または免疫学的同一性における実質的な修飾は（イ）置換の領域内においてポリペプチド骨格の構造、例えばシートまたはラセン立体配座、（ロ）標的部位における分子の電荷または親水性、または（ハ）側鎖の嵩高さの維持に及ぼす効果において顕著に異なる置換を選択することにより達成される。天然起源の残基はその側鎖に共通な性質に基づいて数群に分類される：

（1）親水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile、

10

20

30

40

50

- (2) 中性親水性：c y s、s e r、t h r、
- (3) 酸性：a s p、g l u、
- (4) 塩基性：a s n、g l n、h i s、l y s、a r g、
- (5) 鎖の向きに影響する残基：g l y、p r o、および
- (6) 芳香性：t r p、t y r、p h e。

非保存置換はこれら分類の構成員一つを他のものに交換する必要がある。このような置換残基も保存置換部位または、より好ましくは残余の（非保存）部位に導入しうる。

本発明の一態様において、分子中に存在するプロテアーゼ切断部位を不活性化するのが好ましい。これらの部位はコードされたアミノ酸配列を観察することによって特定でき、トリプシンの場合は、たとえばアルギニルまたはリジニル残基に変換する。プロテアーゼ切断部位が決まったら、標的残基を他の残基、好ましくはたとえばグルタミンのような塩基性残基またはセリンのような親水性残基に置換することによって；またはその残基を欠失することによって；またはその残基の直後にプロリル残基を挿入することによって；これらを蛋白分解的切断に対して不活性化する。

別の態様では開始シグナル配列のメチオニル残基以外のいずれかのメチオニル残基またはそれらメチオニル残基から約3残基N-またはC-末端側に存在するいずれかの残基を他の残基に（好ましくは表1に従って）置換するかまたは除去する。あるいは、その部位に隣接して約1～3残基を挿入する。

天然CHFの固有の立体配座の維持に関与しないどのシステイン残基も一般にはセリンに置換して分子の酸化に対する安定性を改善し、また異常な交差結合を防止する。

天然CHFのアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は当業界で公知の様々な方法によって製造される。これらの方法は、これに限定するものではないが、天然源からの分離（天然起源アミノ酸配列変異体の場合）、またはオリゴヌクレオチド媒介（または部位指向）突然変異誘発、PCR突然変異誘発、および以前に調製した変異体または天然CHFの非変異体版のカセット突然変異誘発を包含する。

オリゴヌクレオチド媒介突然変異誘発は天然CHF DNAの置換、欠失および挿入変異体の調製には好適な方法である。この技術はA d e l m a nなど、DNA、2巻：183頁（1983年）に記載のように当分野でよく公知である。略述すれば、CHFの無変化または天然DNA配列を含むプラスミドまたはバクテリオファージの単鎖型であるDNA鋳型に所期の突然変異をコードするオリゴヌクレオチドをハイブリッド形成することによって、天然CHF DNAを変更する。ハイブリッド形成後、DNAポリメラーゼを使用してオリゴヌクレオチドプライマーを挿入し、天然CHF DNAに選択した変化をコードする鋳型の第2相補鎖全体を合成する。

一般に、長さ少なくとも25ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを使用する。最適なオリゴヌクレオチドは突然変異をコードするヌクレオチドの両側に鋳型に全く相補的な12から15ヌクレオチドを持つ。これはオリゴヌクレオチドが単鎖DNA鋳型分子に正しくハイブリッド形成することを保証する。このオリゴヌクレオチドはC r e aなど、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、75巻：5765頁（1978年）が記載するような当業界で公知の技術を使用して容易に合成される。

このDNA鋳型はバクテリオファージM13ベクター（商業的に入手可能なM13mp18およびM13mp19が適当である）か、またはV i e r aなど、M e t h . E n z y m o l .、153巻：3頁（1987年）が記載する単鎖ファージ複製開始点を含むベクターかから誘導したベクターによって作成できる。そこで、突然変異すべきDNAをこれらベクターに挿入して単鎖鋳型を作成しうる。単鎖鋳型の調製法は前記S a m b r o o kらの4.21～4.41章に記載がある。

あるいは、単鎖DNA鋳型は2重鎖プラスミド（またはその他の）DNAを標準的技術を使用して変性することによって作成できる。

天然DNA配列の変更（例えば、アミノ酸配列変異体を作成するため）には、オリゴヌクレオチドを単鎖鋳型に適当な条件下にハイブリッド形成する。次に、通常はDNAポリメラーゼIのクレノフ断片であるDNA重合酵素を添加し、オリゴヌクレオチドを合成用プ

10

20

30

40

50

ライマーとして使用して鋳型の相補鎖を合成する。こうして、DNA鎖の一つが天然CHFの突然変異型をコードし、他の鎖（元来の鋳型）が天然の変更のないCHF配列をコードするように形成したヘテロ二重ラセン分子を形成する。このヘテロ二重ラセン分子を次に通常はたとえば大腸菌JM101のような原核生物である適当な宿主細胞に形質転換する。細胞が成長した後、それらをアガロース板に置き、³²Pで放射能標識したオリゴヌクレオチドプライマーを使用して検索して突然変異したDNAを含む細菌コロニーを検出する。突然変異した領域を取り、一般に適当な宿主の形質転換に典型的に採用する型の発現ベクターである、適当なベクターに入れて蛋白質を生産する。

直前に記載した方法はプラスミドの両鎖が突然変異を含むものであるホモ二重ラセン分子が形成されるようにも修正しうる。この修正法は以下の通りである：

単鎖オリゴヌクレオチドをアニールして前記のような単鎖鋳型とする。デオキシリボヌクレオチド3種、すなわちデオキシリボアデノシン（dATP）、デオキシリボグアノシン（dGTP）およびデオキシリボチミジン（dTTP）の混合物をdCTP-（aS）と呼ばれる修正チオデオキシリボシトシン（Amersham社から入手できる）と混合する。この混合物を鋳型-オリゴヌクレオチド複合体に添加する。この混合物にDNAポリメラーゼを添加すると、突然変異した塩基以外は鋳型と同一なDNA鎖が作成される。これに加えて、このDNAの新鎖はdCTPの代わりにdCTP-（aS）を含み、制限エンドヌクレアーゼ消化から保護する。

この二重鎖ヘテロ二重ラセンの鋳型鎖を適当な制限酵素でニックした後に鋳型鎖をExoIIIヌクレアーゼまたは他の適当なヌクレアーゼで消化して、突然変異誘発すべき部位を含む領域をパストできる。この反応を次に停止して部分的に単鎖である分子を残す。次にDNAポリメラーゼをデオキシリボヌクレオチドトリホスフェート4種全部、ATP、およびDNAリガーゼの存在下に使用して完全な二重鎖DNAホモ二重ラセンを形成する。このホモ二重ラセン分子で次に前記大腸菌JM101のような適当な宿主細胞を形質転換する。

置換するアミノ酸1個またはそれ以上を持つ天然CHFのDNAでコードした突然変異体は数種の方法の一つで作成する。もしアミノ酸がポリペプチド鎖内で互いに近接して存在するなら、それらは所期のアミノ酸置換全部をコードするオリゴヌクレオチド1個を使用して同時に突然変異しうる。しかしながら、もしもアミノ酸が互いにある距離をおいて位置する（約10アミノ酸またはそれ以上離れている）なら、所期の変化全部をコードする単一なオリゴヌクレオチドを作成するのはより困難である。その代わりに、別の二法の一つを採用しうる。

第一の方法では置換すべきアミノ酸のための別のオリゴヌクレオチドを作成する。これらオリゴヌクレオチドを次に同時に単鎖鋳型DNAにアニールすれば、鋳型から合成された第二の鎖は所期のアミノ酸置換全部をコードする。

もう一つの方法は所期の突然変異体を生産するために二回またはそれ以上の突然変異誘発を含む。第一回は単一突然変異体について記載したものである：野生型DNAを鋳型に使用し、第一の所期アミノ酸置換をコードするオリゴヌクレオチドをこの鋳型にアニールして、ヘテロ二重ラセンDNA分子を作成する。突然変異誘発の第二回では第一回の突然変異誘発で製造した突然変異体DNAを鋳型として使用する。こうして、この鋳型は既に突然変異1個またはそれ以上を含有する。次に、付加的な所期アミノ酸置換をコードするオリゴヌクレオチドをこの鋳型にアニールし、得られる第1および第二回突然変異誘発の双方をコードするDNAの鎖を得る。得られたこのDNAを第三回の突然変異誘発では鋳型とし、さらに反復して使用できる。

PCR突然変異誘発も天然CHFのアミノ酸変異体を作るために適当である。下記の議論はDNAについて行うが、この技術はRNAへも応用できると理解される。PCR技術は一般に次の操作を示す（前記Erlich、R. Higuchiによる章、61～70頁参照）：PCRで微量の鋳型DNAを使用する時には、鋳型DNAの対応する領域とは配列がすこし異なるプライマーを使用して鋳型とはプライマーが鋳型とは異なる位置のみで配列が異なっている鋳型とは異なる比較的多量の特定のDNA断片を生産する。プラスミ

10

20

30

40

50

ドDNAへの突然変異の導入には、プライマーの一つを突然変異の位置を重複するように、また突然変異を含有するように設計する；他のプライマーの配列はプラスミドの対立鎖配列の延長と同一でなければならないが、しかしこの配列はプラスミドDNAに沿うどの場所に配置することもできる。しかしながら、最後にプライマーによって結合されたDNAの全増幅領域を容易に配列決定できるように第二のプライマーの配列が第一のものから200ヌクレオチド以内に配置することが望ましい。前記のようなプライマー対を使用するPCR増幅はプライマーが特定する突然変異の位置および、鋳型コピーはいくらか誤差を伴うので可能性としては他の位置でも、相違するDNA断片の集団を与える。

もし鋳型対生成物物質の比率が極端に低ければ、大多数の生成物DNA断片は所期の突然変異を含有している。この生成物質を使用してプラスミド内の対応する領域を置換し、これを標準的DNA技術を使用するPCRの鋳型として役立てる。離れた位置での突然変異は第二突然変異プライマーを使用するか、または異なる突然変異プライマーでの第2PCRを行い、得られるPCE断片2種をベクターに三（またはそれ以上）部分ライゲーションで同時に結合することによって導入する。

PCR突然変異誘発の特定の実施例では、鋳型プラスミドDNA（1μg）を増幅すべき領域外のプラスミドDNA内に独特な認識部位を持つ制限エンドヌクレアーゼで消化することによってリネアライズする。この物質の100ngをデオキシヌクレオチドトリリン酸4種を含むPCR緩衝液を含むPCR混合物に添加し、GeneAmp（商標）キット（Perkin-Elmer・Cetus社、ノーウォーク、CTおよびエマリービル、CAから入手）に入れて、各オリゴヌクレオチドプライマー25pmolに加えて最終容積50μLとした。反応混合物に35μLの鉱物油を重積した。反応混合物を100℃で5分間変性し、氷上に暫時置き、次にThermus・aquaticus（Taq）DNAポリメラーゼ（5単位/mL、Perkin-Elmer・Cetus社）を油層の下に添加した。次に反応混合物を次のように設定したDNAサーマルサイクラー（Perkin-Elmer・Cetus社から購入）に注入した：

55℃2分間、

72℃30秒間、

次に下記を19サイクル：

94℃30秒間、

55℃30秒間、および

72℃30秒間。

プログラムの最後に反応バイアルをサーマルサイクラーから取り出し、水層を新しいバイアルに移し、フェノール／クロロホルム（50：50容）で抽出し、エタノール沈降し、DNAを標準的操作によって回収する。続いて、この物質をベクターに挿入するための適当な処理を行う。

変異体を調製するもう一つの方法はカセット突然変異誘発であってWellsなど、Gene、34巻、315頁（1985年）に記載の技術に基づく。出発物質はプラスミド（またはその他のベクター）であって、突然変異すべき天然CHF DNAを含有する。突然変異すべき天然CHF DNA中のコドンを確認する。確認された突然変異部位の各末端には独特の制限エンドヌクレアーゼ部位が存在しなければならない。そのような制限部位が存在しなければ、前記オリゴヌクレオチド媒介突然変異誘発法を使用して、それらを天然CHF DNA中の適当な位置に導入しうる。制限部位をプラスミドに導入した後、そのプラスミドをこれらの部位で切断してリネアライズする。制限部位の間のDNAの配列をコードするが、所期の突然変異を含有する二重鎖オリゴヌクレオチドを標準的操作を使用して合成する。この鎖2個を別々に合成し、次に標準的技術を使用してハイブリダイズする。この二重鎖オリゴヌクレオチドをカセットと呼称する。このカセットはプラスミドに直接連結できるようにリネアライズしたプラスミドの両端と適合する3'および5'末端を持つように設計される。このプラスミドはここで天然CHFから突然変異したCHF DNA配列を含有する。

C. 複製可能なベクターへの核酸の挿入

10

20

30

40

50

C H Fをコードする核酸（例えばc D N AまたはゲノムD N A）を複製可能なベクターに挿入してさらにクローニング（D N Aの増幅）または発現を行う。多数のベクターが利用可能であり、適当なベクターの選択は1）増幅またはD N A発現に使用するかどうか、2）そのベクターに挿入すべき核酸の大きさ、および3）そのベクターで軽質転換すべき宿主細胞、に依存する。各ベクターはその機能（D N Aの増幅またはD N Aの発現）および適合する宿主細胞に応じて様々な成分を含有する。このベクター成分は一般にこれに限定するわけではないが次の1個またはそれ以上を含有する：シグナル配列、複製開始点、マーカー遺伝子1個またはそれ以上、エンハンサー要素、プロモーター、および転写終結配列。

(i) シグナル配列成分

この発明のC H Fは直接的に製造されうるのみでなく、異種ポリペプチド、好ましくは成熟蛋白質またはポリペプチドのN-末端において特異的な切断部位を持つシグナル配列またはその他ポリペプチドであるもの、との融合物としても製造しうる。一般に、このシグナル配列はベクターの成分でありうるが、ベクターに挿入されたC H F D N Aの一部でもありうる。選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され、処理される（すなわち、シグナルペプチダーゼにより切断される）ものであるべきである。天然C H Fシグナル配列を認識も処理もしない原核生物宿主細胞については、シグナル配列は原核生物シグナル配列、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、l p p、または熱安定エンテロトキシンI I リーダーから構成される群から選択したもの、によって置換される。酵母分泌については、天然シグナル配列は、たとえば酵母インベルターゼリーダー、酵母アルファ因子リーダー（サッカロミセスおよびクライベロマイセス α -因子リーダを含む；後者は1991年4月23日発行の米国特許第5010182に記載されている）、酵母酸性ホスファターゼリーダー、マウス唾液腺アミラーゼリーダー、カルボキシペプチダーゼリーダー、酵母B A R 1 リーダー、H u m i c o l a · l a n u g i n o s a リパーゼリーダー、C . a l b i c a n s グルコアミラーゼリーダー（1990年4月4日発行の欧州特許362179）、または1990年11月15日公開のW O 9 0 / 1 3 6 4 6 に記載のシグナルでありうる。哺乳類細胞発現においては天然ヒトシグナル配列（すなわち、生体内で正常にはヒト細胞からの天然C H Fの分泌を指向するC H F プレ配列）が満足すべきものであるが、たとえば他種動物C H Fからのシグナル配列、他のG H / サイトカイン受容体ファミリーの構成員に結合するリガンドからの配列、および同一または関連種の分泌ポリペプチドからのシグナル配列、ならびに、例えば単純ヘルペスウイルスのg Dシグナルなどのウイルス分泌リーダーのような他の哺乳類シグナル配列も適当でありうる。

このような前駆体領域のためのD N Aは読み取り枠内で成熟C H FをコードするD N Aに連結させる。

(i i) 複製開始点成分

発現およびクローニングベクターは双方とも選択した宿主細胞1種またはそれ以上においてベクターに複製を可能にする核酸配列を含有する。一般にクローニングベクターにおいてはこの配列はベクターに宿主の染色体D N Aとは独立な複製を可能にするが、複製開始および自律的複製配列を包含する。そのような配列は様々な細菌、酵母およびウイルスについてよく公知である。プラスミドp B R 3 2 2からの複製開始点は殆どのグラム陰性細菌に対して適切であり、2 μ プラスミドの開始点は酵母に対して適切であり、また種々のウイルスの開始点（S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V、またはB P V）は哺乳類細胞中のクローニングベクター用に有用である。一般に、複製開始点成分は哺乳類の発現ベクターには不要である（S V 4 0の開始点が典型的に使用されうるが、この理由は早期プロモーターを含有することのみによる）。

殆どの発現ベクターは「シャトル」ベクター、すなわち、それらは少なくとも1群の生物内で複製できるが、発現用に他生物への遺伝子移入もできる。例えば、大腸菌内である種のベクターをクローニングすると、同じベクターを、宿主細胞の染色体から独立して複製することができないにもかかわらず、発現のために酵母または哺乳類の細胞に遺伝子移入

10

20

30

40

50

できる。

DNAは宿主ゲノムに挿入することによっても増幅しうる。これは、例えばバチルス[®]のゲノムDNAに見られる配列に相補的なDNA配列をベクターに導入することによって、宿主としてバチルス属菌を使用して容易に達成される。このベクターによるバチラス菌の遺伝子移入はゲノムとの相同的な組換えおよびCHF DNAの挿入を招く。しかしながら、CHFをコードするゲノムDNAの回収には、CHF DNAを切断するに要する制限酵素消化が必要なので、外因的に複製したベクターのそれよりも複雑である。

(i i i) 選択遺伝子成分

発現およびクローニングベクターは選択マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含むべきである。この遺伝子は選択培養培地内に生育する形質転換宿主細胞の生存または生育に必要な蛋白質をコードする。選択遺伝子を含むベクターで形質転換されていない宿主細胞はこの培養培地内では生存しない。典型的な選択遺伝子は (イ) たとえば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートまたはテトラサイクリンなどの抗生物質またはその他毒物に対する耐性を与える、(ロ) 栄養要求性欠如を与える、または (ハ) たとえば、バチラス菌に対するD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子など、複合培地から得られない限界的栄養を供給する、蛋白質をコードする。

選択様式の一例は宿主細胞の生長を休止する薬剤を使用する。これらの細胞は異種遺伝子で成功裏に形質転換されれば薬剤耐性を与える蛋白質を生産するので選択状況下で生存する。そのような主たる選択の例では薬剤ネオマイシン (Southernなど、J. Molec. Appl. Genet.、1巻: 327頁 [1982年])、ミコフェノール酸 (Mulliganなど、Science、209巻: 1422頁 [1980年])、またはハイグロマイシン (Sugdenなど、Mol. Cell. Biol.、5巻: 410~413頁 [1985年]) を使用する。これら3例は真核生物制御下に細菌遺伝子を採用し、適当な薬剤、各々G418またはネオマイシン (ゲネチシン)、xgpt (ミコフェノール酸)、またはハイグロマイシンに対する耐性を与える。

哺乳類細胞に対する適当な選択可能マーカーの別の例は、たとえばDHFRまたはチミジンキナーゼのようなCHF核酸を摂取する能力のある細胞の確認を可能にするものである。哺乳類細胞形質転換体をマーカーを摂取することにより形質転換体のみが独特に生存に適応する選択圧下に置く。選択圧は培地中の選択剤の濃度を十分に变化させて、そこで選択遺伝子とCHFをコードするDNAとの両方の増幅を導くような条件にして形質転換体を培養することによって与える。増幅は生育に必須な蛋白質の生産用に要求の大きい遺伝子が組換え細胞の逐次的世代の染色体の中で直列に反復することによる過程である。増幅されたDNAからのCHF合成量は増加する。遺伝子増幅のその他の例はメタロチオネイン-Iおよび-I I、好ましくは霊長類のメタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなどを包含する。

例えば、CHF R選択遺伝子で形質転換した細胞はまず形質転換体全部をDHFRの競合的拮抗剤であるメトトレキセート (Mtx) を含有する培養培地内で培養して確認する。野生型DHFRを採用する時は適当な宿主細胞はUrlaubとChasin、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77巻: 4216頁 (1980年) に記載されたように調製され、培養されたDHFR活性を欠損するチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞系列である。次に濃度を変えてメトトレキセートを形質転換した細胞と接触させる。これでDHFR遺伝子の多重コピーの合成および、同時にCHFをコードするDNAのような発現ベクターを含む他種DNAの多重コピーを招来する。この増幅技術はたとえばATCC・CCL61・CHO-K1のようなそうでなければ適当な宿主について例えば、もしMtxに高度に耐性のある突然変異DHFR遺伝子が採用されれば (欧州特許第117060) 内在性DHFRが存在しても使用できる。

あるいは、CHF、野生型DHFR蛋白質、および、たとえばアミノグリコシド・3-ホスホトランスフェラーゼ (APH) のようなもう一つの選択マーカーをコードするDNA配列で形質転換したか共形質転換した宿主細胞 (殊に内在性DHFRを含む野生型宿主) は、たとえばカナマイシン、ネオマイシン、またはG418などアミノグリコシド抗生物

10

20

30

40

50

質のような選択マーカー用選択剤を含有する培地内での細胞生育により選択できる。米国特許第4965199参照。

酵母中で使用するために適当な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7中に存在するtrp1遺伝子である（Stinchcombなど、Nature、282巻：39頁[1979年]；Kingsmanなど、Gene、7巻：141頁[1979年]；またはTschemperなど、Gene、10巻：157頁[1980年]）。trp1遺伝子は、例えばATCC44076またはPEP4-1（Jones、Genetics、85巻：12頁[1977年]）トリプトファン中で生長する能力を欠いている酵母の突然変異株に対する選択マーカーを提供する。酵母宿主細胞ゲノム中のtrp1損傷の存在はトリプトファン不在下での生育による形質転換の検出に対して有効な環境を提供する。同様にLeu2-欠損酵母株（ATCC20622または38626）はLeu2遺伝子を持つ既知のプラスミドによって補充される。

これに加えて、1.6μm環状プラスミドpKD1から誘導されるベクターはクライベロマイセス酵母の形質転換に使用できる。Bianchiなど、Curr. Genet.、12巻：185頁（1987年）。最近、ウシ組換えキモシンの大量生産用発現系がK. lactisについて報告された。Van・den・Berg、Bio/Technology、8巻：135頁（1990年）。クライベロマイセス工業株による成熟組換えヒト血清アルブミンの分泌のための安定な多重コピー発現ベクターも開示されている。Fleerなど、Bio/Technology、9巻：968～975頁（1991年）。

(iv) プロモーター成分

発現およびクローニングベクターは通常宿主生物により認識され、CHF核酸に作動可能に結合するプロモーターを含有する。プロモーターは構造遺伝子の出発コドンから上流（5'）（一般に約100から1000bp以内）に位置する非翻訳配列であって、たとえばCHF核酸配列のような作動可能に結合している特定の核酸配列の転写と翻訳を制御する。そのようなプロモーターは典型的には誘導可能および構成的の2種に分類される。誘導プロモーターはそれが制御するDNAからの転写レベルの向上をある種の培養条件、たとえば栄養の存在または不在または温度変化など、に反応して開始するプロモーターである。現在、様々な潜在的宿主細胞によって認識される多数のプロモーターがよく知られている。

これらのプロモーターは、源泉DNAから制限酵素消化によってプロモーターを取り、分離したプロモーター配列をベクターに挿入することによりCHFをコードするDNAに作動可能に結合させる。天然CHFプロモーター配列および異種プロモーター多数の双方ともCHF DNAの増幅および／または発現を指向して使用しうる。しかしながら、一般に天然CHFプロモーターと比較して組換え的に製造したCHFのより大きい転写とより高い収率を与えるので、異種プロモーターが好適である。

原核生物宿主に使用する適当なプロモーターにはβ-ラクタマーゼおよび乳糖プロモーター系（Changなど、Nature、275巻：615[1978年]；およびGoeddelなど、Nature、281巻：544頁[1979年]）、アルカリホスファターゼ、トリプトファン（trp）プロモーター系（Goeddel、Nucleic Acids Res.、8巻：4057頁[1980年]および欧州特許36776）、およびtacプロモーターのようなハイブリッドプロモーター（deBoerなど、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、80巻：21～25頁[1983年]）を包含する。しかしながら、他の既知細菌プロモーターも適当である。それらヌクレオチド配列は公表され、リンカーまたはアダプターを使用して必要な制限部位を供給して、熟練した研究者がそれらをCHFをコードするDNAに作動可能に連結することを可能にしている（Siebenlistなど、Cell、20巻：269頁[1980年]）。細菌系での使用のためのプロモーターもCHFをコードするDNAに作動可能に結合するシャイン-ダルガルノ（S. D.）配列を含む。

真核生物に対するプロモーターは公知である。真核生物遺伝子はほとんど全てが転写が開始する部位から約25から30塩基上流に位置するATが豊富な領域を持つ。多数の遺伝

10

20

30

40

50

子の転写開始点から70から80塩基上流に見られるもう一つの配列はC X C A A T領域であって、ここにXは如何なるヌクレオチドでもありうる。ほとんどの真核生物遺伝子の3'末端にはA A T A A A配列が存在し、これはコード配列の3'末端へのポリAテイル付加のシグナルでありうる。これら配列は全てが真核生物発現ベクターに適切に挿入される。

酵母宿主での使用のために適当なプロモーター配列の例には3-ホスホグリセレートキナーゼ用プロモーター(H i t z e m a nなど、J. B i o l. C h e m.、255巻:2073頁[1980年])またはその他の、たとえばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素、ヘキソキナーゼ、焦性ブドウ酸脱カルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルベートキナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼのような解糖酵素(H e s sなど、J. A d v. E n z y m e · R e g.、7巻:149頁[1968年];およびH o l l a n d、B i o c h e m i s t r y、17巻:4900頁[1978年])を包含する。

生長条件により制御される転写に付加的な利点を持つ誘導プロモーターであるその他の酵母プロモーターはアルコール脱水素酵素2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝関連分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素、およびマルトースおよびガラクトースの利用を司る酵素プロモーター領域である。酵母発現で使用するために適当なベクターおよびプロモーターはさらにH i t z m a nなど、欧州特許73657に記載がある。酵母のエンハンサーも酵母プロモーターと共に用いるのが有利である。

哺乳類宿主細胞のベクターからのC H F転写は、宿主細胞系に適合するプロモーターである限り、たとえばポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス(1989年7月5日発行の英国特許第2211504)、アデノウイルス(アデノウイルス2のような)、ウシパピローマウイルス、トリザルコーマウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、および最も好ましくはサルウイルス40(SV40)などのウイルスのゲノムから、異種哺乳類プロモーター、たとえばアクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーターなどから、熱ショックプロモーターから、および正常にはC H F配列に関連するプロモーターから、得られたプロモーターによって制御される。SV40ウイルスの早期および後期プロモーターはSV40の制限断片として容易に得られ、これにはSV40ウイルス複製開始点も含む。F i e r sなど、N a t u r e、273巻:113頁(1978年);M u l l i g a nとB e r g、S c i e n c e、209巻:1422~1427頁(1980年);P a v l a k i sなど、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A、78巻:7398~7402頁(1981年)。ヒトのサイトメガロウイルス即時型プロモーターはH i n d I I I E制限断片として容易に取得できる。G r e e n a w a yなど、G e n e、18巻:355~360頁(1980年)。ウシのパピローマウイルスをベクターとして使用する哺乳類宿主中での発現DNA系は米国特許第4419446に開示されている。この系の修飾は米国特許第4601978に記載がある。サル細胞内での免疫インターフェロンをコードするcDNAの発現についてはG r a yなど、N a t u r e、295巻:503~508頁(1982年);単純ヘルペスウイルスからのチミジンキナーゼプロモーター制御下におけるマウス細胞内でのヒトのβ-インターフェロンcDNA発現についてはR e y e sなど、N a t u r e、297巻:598~601頁(1982年);マウスおよびウサギ細胞培養中でのヒトのインターフェロンβ1遺伝子の発現についてはC a n a a n iとB e r g、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A、79巻:5166~5170頁(1982年);およびプロモーターとしてラウス肉腫ウイルスの長末端反復を使用するCV-1サル腎臓細胞、ニワトリ胚線維芽細胞、チャイニースハムスター卵巣細胞、ヒラ細胞、およびマウスN I H-3 T 3細胞内での細菌C A T配列の発現についてはG o r m a nなど、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A、79巻:6777~6781頁(1982年)を参照。

(v) エンハンサーエレメント成分

10

20

30

40

50

高等真核生物によるこの発明のCHFをコードするDNAの転写は、しばしばベクターにエンハンサーを挿入することによって増大する。エンハンサーは転写を増大すべきプロモーターに作用する通常は約10から300bpのDNAのシス作用性エレメントである。エンハンサーは相対的に方向および位置に依存せず、転写ユニットの5' (Laiminsなど、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、78巻: 993頁[1981年]) および3' (Luskyなど、Mol. Cell. Bio.、3巻: 1108頁[1983年])、イントロンの中 (Banerjiなど、Cell、33巻: 729頁[1983年])、ならびにコード配列自体の内部 (Osborneなど、Mol. Cell. Bio.、4巻: 1293頁[1984年]) に見出されている。哺乳類遺伝子には多数のエンハンサー配列が今では公知である (グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテインおよびインスリン)。しかしながら、通常真核生物細胞ウイルスからのエンハンサーを使用する。この例には複製開始点後期側SV40エンハンサー (bp100~270)、サイトメガロウイルス早期プロモーターエンハンサー、複製開始点後期側ポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーを包含する。真核生物プロモーターの活性化用エンハンサーエレメントに関してはYaniv、Nature、297巻: 17~18頁 (1982年) も参照。エンハンサーはベクターにCHFコード配列の5' または3' 位でスプライスしうるが、好ましくはプロモーターから5' の部位に位置させる。

10

(v i) 転写終結成分

真核生物宿主細胞 (酵母、カビ、昆虫、植物、動物、ヒト、その他の多細胞生物からの有核細胞) 中で使用する発現ベクターは転写の終結とmRNA安定化に必要な配列も包含する。このような配列は通常真核生物またはウイルスDNAまたはcDNAの非翻訳領域の5'、時には3' から入手できる。これらの領域はCHFをコードするmRNAの非翻訳部分内のポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを包含する。

20

(v i i) ベクターの構築および分析

前記の成分1個またはそれ以上を含む適当なベクターの構築には標準的な連結技術を採用する。必要なプラスミドを作成するように、分離したプラスミドまたはDNA断片を切断し、仕立て、および所期の型に再連結する。

構築したプラスミド中の正確な配列を確認する分析のために、連結混合物を用いて大腸菌K12の294株 (ATCC31446) を形質転換し、適当ならば成功した形質転換体をアンピシリンまたはテトラサイクリン耐性によって選択する。形質転換体からのプラスミドを調製し、制限エンドヌクレアーゼ消化によって分析するか、および/またはMessingなど、Nucleic Acids Res.、9巻: 309頁 (1981年) の方法またはMaxamなど、Meth. Enzymol.、65巻: 499頁 (1980年) の方法によって配列決定する。

30

(v i i i) 一時的発現ベクター

CHFをコードするDNAの哺乳類細胞で一時的発現を提供する発現ベクターはこの発明の実施において殊に有用である。一般に、一時的発現ではその宿主細胞が発現ベクターのコピー多数を蓄積するように宿主細胞中で効果的に複製でき、次に、その発現ベクターがコードする所期ポリペプチドを高濃度で合成することのできる発現ベクターを使用する。前記Sambrookらの16.17~16.22。適当な発現ベクターおよび宿主細胞を含む一時的発現系は、クローニングしたDNAがコードするポリペプチドの好都合な陽性確認法ならびにそのようなポリペプチドの所期の生物学的または生理学的性質についての迅速な検索法を与える。こうして、一時的発現系は生物学的に活性な天然CHFの同族体および変異体の確認の目的のために、本発明には殊に有用である。

40

(i x) 脊椎動物細胞ベクターの適例

組換え脊椎動物細胞培養中でCHFの合成への適応に適するその他の方法、ベクター、および宿主細胞についてはGethingなど、Nature、293巻: 620~625頁 (1981年); Manteiなど、Nature、281巻: 40~46頁 (1979年); 欧州特許117060; および欧州特許117058に記載がある。CHFの哺

50

乳類細胞培養生産のために殊に有用なプラスミドはpRK5（欧州特許307247）またはpSVI6B（1991年6月13日発行のWO91/08291）である。pRK5の誘導体pRK5B（Holmesなど、Science、253巻：1278～1280〔1991年〕）はこのような発現に殊に適当である。

D. 宿主細胞の選択および形質転換

ここで、ベクターのクローニングまたは発現のために適当な宿主細胞は前記の原核生物、酵母または高等真核生物細胞である。この目的のために適当な原核生物はたとえばグラム陰性またはグラム陽性生物のようなユーバクテリア、例えば大腸菌、エンテロバクター、エルウィニア、クレブシエラ、プロテウスなどエシエリチア属、*Salmonella typhimurium*などサルモネラ属、*Serratia marcescens*のようなセラチア属およびシゲラ属のような腸内細菌科ならびに*B. subtilis*および*B. licheniformis*（たとえば1989年4月12日発行のDD266710に開示の*B. licheniformis*・41P）のようなバチルス属、緑膿菌のようなシュードモナス属、およびストレプトマイセス属を包含する。好適な大腸菌クローニング宿主の一つは大腸菌294（ATCC31446）であるが、大腸菌B、大腸菌X1776（ATCC31537）、大腸菌DH5α、および大腸菌W3110（ATCC27325）も適当である。これらの例は例示であって、限定的なものではない。W3110株は組換えDNA生成物発酵用の普通の宿主株なので、殊に好適な宿主または親宿主である。宿主細胞は蛋白質分解酵素の分泌が最低であるのが好ましい。例えば、W3110株を修正して宿主内在性の蛋白質をコードするする遺伝子について遺伝子的突然変異を行いうるが、そのような宿主の例は完全遺伝子型tonAΔを持つ*E. coli* W3110・1A2株、完全遺伝子型tonAΔ・ptr3を持つ*E. coli* W3110・9E4株、完全遺伝子型tonAΔ・ptr3・phoAΔE15・Δ（argF-lac）169・ΔdegP・ΔompT・kan^rを持つ*E. coli* W3110・27C7株（ATCC55244）、完全遺伝子型tonA・ptr3・phoAΔE15・Δ（argF-lac）169・ΔdegP・ΔompT・Δrbs7・ilvG・kan^rを持つ*E. coli* W3110・37D6株、非カナマイシン耐性degP欠失突然変異37D6株である*E. coli* W3110・40B4株、および1990年8月7日に発行された米国特許第4946783に開示の周縁プロテアーゼ突然変異体を持つ*E. coli*株を包含する。これとは別に、試験管内クローニング法、たとえばPCRまたはその他の核酸ポリメラーゼ反応が適している。

原核生物に加えて糸状菌または酵母のような真核生物微生物もCHFをコードするベクター用の適当なクローニングまたは発現宿主である。*Saccharomyces cerevisiae*またはパン酵母は下等真核生物宿主微生物の中で最も普通に使用される。しかしながら、他の属、種、および株の多数が同様に利用でき、本発明に有用であり、たとえば*Schizosaccharomyces pombe*（BeachとNurse、Nature、290巻：140頁〔1981年〕；1985年5月2日発行の欧州特許139383）；クライベロミセス属宿主（米国特許第4943529；Fleerなど、前出）たとえば*K. lactis*（MW98-8C、CBS683、CBS4574；Louvencourtなど、J. Bacteriol.、737頁〔1983年〕）、*K. fragilis*（ATCC12424）、*K. bulgaricus*（ATCC16045）、*K. wickerhamii*（ATCC24178）、*K. waltii*（ATCC56500）、*K. drosophilae*（ATCC36906；Van・den・Bergなど、前出）、*K. thermotolerans*および*K. marxianus*；*Yarrowia*（欧州特許第402226）；*Pichia pastoris*（欧州特許183070；Sreekrishnaなど、J. Basic Microbiol.、28巻：265～278頁〔1988年〕）；カンジダ属；*Trichoderma reesia*（欧州特許244234）；*Neurospora crassa*（Caseなど、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、76巻：5259～5263頁〔1979年〕）；シュワニオミセス属たとえば*Schwannio*

myces · occidentalis (1990年10月31日発行の欧州特許394538) ; および糸状菌たとえばノイロスポラ、ペニシリウム、トリボクラジウム (1991年1月10日発行のWO91/00357) 、およびアスペルギルス属宿主たとえば *A. nidulans* (Ballanceなど、*Biochem. Biophys. Res. Commun.*、112巻: 284~289頁 [1983年] ; Tilburnなど、*Gene*、26巻: 205~221頁 [1983年] ; Yeltonなど、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、81巻: 1470~1474頁 [1984年]) および *A. niger* (KellyとHynes、*EMBO · J.*、4巻: 475~479頁 [1985年]) を包含する。

CHF生産用に適当な宿主細胞は多細胞生物に由来する。そのような宿主細胞には複雑な処理ができ、グリコシル化活性がある。原理的には、脊椎動物または無脊椎動物のいずれからであっても、高等真核生物細胞培養は使用可能である。無脊椎生物細胞の例には植物および昆虫細胞を包含する。たとえば *Spodoptera · frugiperda* (イモムシ) 、*Aedes · aegypti* (蚊) 、*Aedes · albopictus* (蚊) 、*Drosophila · melanogaster* (ミバエ) および *Bombyx · mori* のようなバキュロウイルス科の株と変種および対応する複製できる昆虫宿主細胞が確認されている。たとえば Luckow など、*Bio/Technology*、6巻: 47~55頁 (1988年) ; Miller など、「遺伝子工学 (*Genetic · Engineering*) 」、Setlow, J. K. など編、8巻: (Plenum · Publishing 社、1986年) 、277~279頁 ; および Meada など、*Nature*、315巻: 592~594頁 (1985年) 参照。遺伝子移入用にたとえば、*Autographa · californica · NPV* の L-1 変異体および *Bombyx · mori · NPV* の Bm-5 株などの種々のウイルス株が公共的に入手可能で、これらウイルスは、殊に *Spodoptera · frugiperda* 細胞の遺伝子移入用に本発明用ウイルスとして使用しうる。

綿、トウモロコシ、馬鈴薯、大豆、ペチュニア、トマト、および煙草の植物細胞培養は宿主として使用できる。典型的には、予め CHF DNA を含ませるように処理した細菌 *Agrobacterium · tumefaciens* 株とインキュベーションすることによって植物細胞に遺伝子移入する。植物細胞培養物の *A. tumefaciens* とのインキュベーションの間に、CHF をコードする DNA は植物細胞宿主に移行して遺伝子移入し、適当な条件下で CHF DNA を発現する。これに加え、たとえばノバリン合成酵素プロモーターおよびポリアデニル化シグナル配列のような植物細胞に適合する制御およびシグナル配列も入手可能である。Depicker など、*J. Mol. Appl. Gen.*、1巻: 561頁 (1982年) 。これに加え、T-DNA 780 遺伝子の上流から分離した DNA セグメントは組換え DNA 含有植物組織中の植物発現遺伝子の転写水準を活性化または向上することができる。1989年7月21日発行の欧州特許321196。

しかしながら、最も注目を引くのは脊椎動物細胞であって、培養中での脊椎動物細胞の増殖 (組織培養) は近年では日常的操作になっている (「組織培養 (*Tissue · Culture*) 」、Academic · Press 社、Kruse と Patterson 編 [1973年]) 。有用な哺乳類宿主細胞系列の例は SV40 で形質転換したサル腎臓 CV1 細胞系列 (COS-7、ATCC · CRL1651) ; ヒト胚腎臓系列 (293 または懸濁培養での生育用にサブクロニングした 293 細胞、Graham など、*J. Gen. Virol.*、36巻: 59頁 [1977年]) ; 幼若ハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC · CCL10) ; チャイニーズハムスター卵巣細胞 / -DHFR (CHO、Urlaub と Chasin、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、77巻: 4216頁 [1980年]) ; マウスのセルトリ細胞 (TM4、Mather、*Biol. Reprod.*、23巻: 243~251頁 [1980年]) ; サル腎臓細胞 (CV1、ATCC · CCL70) ; アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、ATCC · CRL1578) ; ヒト頸部癌細胞 (HELA、ATCC · CCL2) ; イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC · CCL34) ; バッファローラット肝臓細胞 (BRL3A、ATCC

10

20

30

40

50

・CRL1442) ; ヒト肺細胞 (W138、ATCC・CCL75) ; ヒト肝細胞 (Hep・G2、HB8065) ; マウス乳癌細胞 (MMT060562、ATCC・CRL51) ; TRI細胞 (Matherなど、Annals・NY. Acad. Sci.、383巻: 44~68頁 [1982年]) ; MRC5細胞 ; FS4細胞 ; およびヒト肝癌系列 (Hep・G2) である。

宿主細胞にこの発明の前記発現またはクローニングベクターを遺伝子移入して好適に形質転換し、プロモーターを誘発するために適当なように修正した通常の栄養培地中で培養し、形質転換体を選択し、または所期配列をコードする遺伝子を増幅する。

遺伝子移入は宿主細胞が発現ベクターを取り込むことであって、いずれかのコード配列が実際に発現するかどうかには関わらない。当業者には、たとえばCaPO₄および電気穿孔法など、多数の遺伝子移入法が公知である。遺伝子移入の成功は一般に宿主細胞でこのベクターが作動した兆候が起きた時に認識される。

形質転換は生物体へのDNAの導入であって、そのDNAが染色体外要素としてまたは染色体への挿入によって複製可能であることを意味する。使用する宿主に応じ、形質転換はその細胞に適する標準的技術を使用して行う。実質的細胞壁障壁を持つ原核生物その他の細胞には前記Sambrookらの1.82章に記載の塩化カルシウムを採用するカルシウム処理または電気穿孔法が一般的に使用される。ある種の植物細胞の形質転換用にはShawなど、Gene、23巻: 315頁 (1983年) および1989年6月29日発行のWO89/05859に記載のようにAgrobacterium・tumefaciensによる感染が使用される。これに加え、1991年1月10日発行のWO91/00358に記載のように植物は超音波処理を使用して遺伝子移入しうる。

このような細胞壁を持たない哺乳類細胞ではGrahamとvan・der・Eb、Virology、52巻: 456~457頁 (1978年) の磷酸カルシウム沈降法が好適である。哺乳類細胞宿主系形質転換の一般的側面はAxelが1983年8月16日発行の米国特許第4399216に記載している。酵母への形質転換は典型的にはVan・Solingenなど、J. Back、130巻: 946頁 (1977年) およびHsiaなど、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)、76巻: 3829頁 (1979年) の方法に従って実施される。しかしながらDNAを細胞に導入するその他の方法、たとえば核微注入法、電気穿孔法、無傷細胞との細菌原形質融合、ポリブレン、ポリオルニチンなどポリカチオン、などのようなものも使用しうる。哺乳類細胞を形質転換するための種々の技術についてはKeownなど、Methods・in・Enzymology、185巻: 527~537頁 (1990年) およびMansourなど、Nature、336巻: 348~352頁 (1988年) を参照。

E. 宿主細胞の培養

この発明のCHFポリペプチドを生産するために使用する原核生物細胞は一般的にSambrookなど、前出、に記載のような適当な培地中で培養する。

この発明のCHFを生産するために使用する哺乳類宿主細胞は種々の培地中で培養しうる。たとえばHamのF-10 (Sigma)、F-12 (Sigma)、最小必須培地 ([MEM]、Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、ダルベッコの修正イーグル培地 ([D-MEM]、Sigma)、およびD-MEM/F-12 (Gibco・BRL) のような商業的に入手可能な培地は宿主細胞を培養するために適当である。これに加え、例えばHamとWallace、Methods・in・Enzymology、58巻: 44頁 (1977年) ; BarnesとSato、Anal. Biochem.、102巻: 255頁 (1980年) ; 米国特許第4767704 ; 4657866 ; 4927762 ; 5122469 ; または4560655 ; 米国再発行特許第30985 ; WO90/03430 ; またはWO87/00195に記載された培地のいずれかも宿主細胞用の培養培地として使用しうる。これら培地はいずれも必要に応じてホルモンおよび/またはその他の成長因子 (たとえばインスリン、トランスフェリン、アプロチニン、および/または内皮成長因子 [EGF] のような)、塩 (たとえば塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、および磷酸塩のような)、緩衝液 (HEPESのような)、ヌク

10

20

30

40

50

レオシド（たとえばアデノシンおよびチミジンのような）、抗生物質（ゲンタマイシン（商標）薬剤のような）、微量元素（通常マイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機化合物と定義される）、およびブドー糖または均等なエネルギー源を添加しうる。その他の必要な添加物も当業者公知の適当な濃度で含有しうる。たとえば温度、pH、その他のような培養条件は発現用に選択した宿主細胞について前に使用されたもので、通常の当業者には明白である。

一般に、哺乳類細胞培養物の試験管内生産性を最大にするための原理、実験計画および実用技術は「哺乳類細胞バイオテクノロジー：実用的手法（Mammalian・Cell・Biotechnology：a・Practical・Approach）」、M. Butler編、（IRL・Press社、1991年）に見出すことができる。

10

本開示に示す宿主細胞は試験管内培養中ならびに宿主動物内の細胞も含む。

F. 遺伝子増幅／発現の検出

遺伝子増幅および／または発現は、例えば本明細書が提供する配列に基づいて常用のザンブロット、mRNAの転写を定量するノーザンブロット（Thomas、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77巻；5201～5205頁〔1980年〕）、ドットブロット（DNA分析）、または適当に標識したプローブを使用する原位置ハイブリッド形成、などによって試料中で直接に測定しうる。種々の標識、最も通常には放射性同位元素、殊に³²P、を採用しうる。しかしながら、たとえばポリヌクレオチドへの導入のためのビオチン修飾ヌクレオチドを使用するようなその他の技術も採用しうる。次にビオチンはアビジンまたは抗体への結合部位として役立ち、たとえばこれを放射性核種、蛍光基、酵素、その他のような広範な標識でラベルしうる。これとは別にDNA二重ラセン、RNA二重ラセンおよびDNA-RNA二重ラセンまたはDNA-蛋白質二重ラセンを含む特定の二重ラセンを認識できる抗体を採用しうる。次に抗体を標識し、表面に二重ラセンが形成すればその二重ラセンに結合する抗体の存在が検出できるようにして、二重ラセンが表面に結合するところでの検定を実施する。

20

遺伝子発現は、これとは別に、たとえば組織切片の免疫組織化学的染色および遺伝子生産物発現を直接的に定量するための細胞培養物または体液の検定のような免疫学的方法により測定しうる。免疫組織化学的染色技術では、典型的には脱水および固定により細胞試料を作成し、続いて結合する遺伝子生産物に特異的な標識抗体と反応させる。通常この標識は、たとえば酵素標識、蛍光標識、化学発光標識、その他のように可視的に検出可能なものである。本発明での使用に適当な、殊に高感度の染色技術はHsuなど、Am. J. Clin. Path.、75巻：734～738頁（1980年）に記載されている。

30

免疫組織化学染色および／または試料液の検定用に有用な抗体はモノクローナルかポリクローナルかであって、哺乳類体内で産生しうる。抗体は天然CHFポリペプチドに対してまたは本明細書第4章記載のDNA配列に基づく合成ペプチドに対して好都合に作成しうる。

G. CHFポリペプチドの精製

CHFは好ましくは培養培地から分泌ポリペプチドとして回収されるが、分泌シグナルなしに直接生産した時には宿主細胞溶菌液からも回収しうる。

ヒト起源以外の組換え細胞内でCHFを産生する時には、CHFはヒト起源蛋白質またはポリペプチドを全く含まない。しかしながら、CHFに関して実質的に均質な製品を得るための細胞蛋白質またはポリペプチドからCHFを精製することが必要である。第一段階で、宿主細胞または溶菌断片のいずれもの粒状破碎物を、例えば遠心分離または限外濾過などにより除去し；要すれば蛋白質を商業的に入手可能な蛋白質濃縮濾過で蛋白質を濃縮し；続いて、免疫親和性クロマトグラフィー、イオン交換カラム分画（たとえば、DAE Aまたはカルボキシメチルまたはスルホプロピル基を含むマトリックス上の）、ブルーセファロース、CMブルーセファロース、MONO-Q、MONO-S、レンチルレクチンセファロース、WGAセファロース、コンAセファロース、Ether・Toyopearl、Butyl・Toyopearl、Phenyl・ToyopearlまたはプロテインAセファロース上のクロマトグラフィー、SDS-PAGEクロマトグラ

40

50

フィー、シリカクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、逆相HPLC（たとえば脂肪族基付加シリカゲル）、たとえばセファデックス分子篩またはサイズ排除クロマトグラフィーを使用するゲル濾過、CHFを選択的に結合するカラム上のクロマトグラフィー、およびエタノールまたは硫酸アンモニウム沈降から選択した工程1回またはそれ以上によってCHFをその他不純物から分離する。前記工程のいずれにもプロテアーゼ阻害剤を添加してプロテイン分解を防止しうる。適当なプロテアーゼ阻害剤の例にはフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）、リューコペプチン、ペプスタチン、アプロチニン、4-（2-アミノエチル）-ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩-ペプスタチン、キモスタチン、およびベンズアミジンを包含する。

好適な精製方式は関連クローンを遺伝子移入した細胞の培養培地を1.5M-NaClに調整し、Butyl・Toyopearl（商品名）カラムに装填することを含む。このカラムをNaCl含有トリス〔ヒドロキシメチルアミノ〕メタン塩酸塩（Tris-HCl）、pH7.5で洗浄し、活性を10mM-Zwittergent（商品名）3~10界面活性剤を含むTRIS-HCl、pH7.5で溶離する。活性の極大を150mM-NaCl、pH8.0に調整してMONO-Q迅速フローカラムに入れる。このカラムをNaClおよびオクチルグルコシドを含むTRIS-HCl、pH8.0で洗浄する。活性は流過した画分中に見られる。活性物質は次に0.1%TFA、10%アセトニトリル中の逆相C4カラムに入れ、0.1%TFAから80%までの勾配で溶離する。活性はゲル濾過カラム上で約15~30kDaに分画される。分割と回収にはグアニジン-HClのようなカオトロップ剤が必要であると予期される。

残基が欠失、挿入、または置換したCHF変異体は天然CHFと同様な方式でその変異によって起きる実質的な変化を配慮して回収される。例えばCHFと、たとえば細菌またはウイルスの抗原など、その他のプロテインまたはポリペプチドとの融合物の製造は精製を促進する；この抗原に対する抗体を含む免疫親和性カラムを融合ポリペプチドを吸着するために使用できる。たとえばウサギのポリクローナル抗-CHFカラムのような免疫親和性カラムをそれに残りの免疫エピトープ少なくとも1個に結合することによってCHF変異体を吸着するために採用できる。前記定義のプロテアーゼ阻害剤も精製の間のプロテイン分解を防止するために有用でありうるし、また、抗生物質も偶発的な夾雑物の生育を防止するために添加しうる。熟練した当業者は天然CHFに対して適当な精製法は、組換え細胞培養中での生産に際してCHFまたはその変異体の性質における変化に起因する修正が必要でありうることを認識するものである。

H. CHFポリペプチドの共有結合修飾体

CHFポリペプチドの共有結合修飾体はこの発明の範囲に含まれる。天然CHFと天然CHFのアミノ酸配列変異体との双方とも共有結合的に修飾しうる。この発明の範囲内にある共有結合的修飾の一型は変異体CHF断片の製品である。40アミノ酸残基までの変異体CHF断片は化学合成または全長または変異体CHFポリペプチドの酵素的または化学的切断によって好都合に産生できる。CHFまたはその断片の他の型の共有結合的修飾は分子にCHFまたはその断片の標的アミノ酸残基を選択した側鎖またはN-またはC-末端残基と反応することのできる有機誘導化試薬と反応させることにより導入される。

システイニル残基は最も普通には、たとえばクロロ酢酸またはクロロアセトアミドのような、 α -ハロ酢酸（および対応するアミン）と反応させてカルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を得る。システイニル残基はプロモトリフルオロアセトン、 α -ブロモ- β -（5-イミドゾイル）プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジサルファイド、メチル・2-ピリジルジサルファイド、p-クロロマーキュリベンゾエート、2-クロロマーキュリー-4-ニトロフェノール、またはクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールとの反応によっても、誘導体化される。

ヒスチジル残基はpH5.5~7.0でピロ炭酸ジエチルとの反応で誘導体化される。この試薬は相対的にヒスチジル側鎖に特異的である。パラ-ブロモフェナシルブロミドも有用である。この反応は好ましくはpH6.0の0.1M-ナトリウムカコジレート中で行

10

20

30

40

50

う。

リジニルおよびアミノ末端残基はコハク酸またはその他カルボン酸の無水物と反応する。これら試薬での誘導体化にはリジニル残基の荷電を逆転する効果がある。 α -アミノ含有残基用のその他の適当な試薬は、たとえばメチルピコリンイミデートのようなイミドエステル、ピリドキサルホスフェート、ピリドキサル、水素化クロロボロン、トリニトロベンゼンスルホン酸、*O*-メチルイソ尿素、2, 4-ペンタンジオンおよびグリオキシレートとのトランスアミナーゼ触媒反応を包含する。

アルギニル残基は常用の試薬1種または数種との反応で修飾され、その中にはフェニルグリオキサール、2, 3-ブタンジオン、1, 2-シクロヘキサンジオンおよびニンヒドリンがある。アルギニン残基の誘導体化には、グアニジン官能基の pK_a が高いため、反応をアルカリ性条件中で行うことが必要である。さらに、これら試薬はリジン基ならびにアルギニンのイプシロン-アミノ基とも反応しうる。

チロジル残基の特異的修飾はチロジル残基にスペクトル標識を導入する特異的な関心から芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によって行われうる。最も通常には、*N*-アセチルイミダゾールおよびテトラニトロメタンを使用して*O*-アセチルチロジル種および3-ニトロ誘導体をそれぞれ形成する。チロジル残基を ^{125}I または ^{131}I を使用して放射能免疫検定用の標識蛋白質を製造するためにヨード化するが、前記クロラミンT法が適当である。

カルボキシル側基（アスパルチルまたはグルタミル）はカルボジイミド（ $R-N=C=N-R'$ ）との反応により選択的に修飾される。ここに、 R および R' はたとえば1-シクロヘキシル-3-（2-モルホリニル-4-エチル）カルボジイミドまたは1-エチル-3-（4-アゾニア-4, 4-ジメチルペンチル）カルボジイミドのように異なるアルキル基である。さらにその上、アスパルチルおよびグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニルおよびグルタミニル残基に変換される。

双官能性試薬での誘導体化は抗-CHF抗体を精製するための方法またはその逆の方法で使用するために、CHFを水不溶性支持マトリックスまたは表面に交差結合するために有用である。通常使用する交差結合剤には、たとえば、1, 1-ビス（ジアゾアセチル）-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、*N*-ヒドロキシサクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸とのエステル、3, 3'-ジチオビス（サクシンイミジルプロピオネート）のようなジサクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、およびビス-*N*-マレイミド-1, 8-オクタンのような二官能性マレイミド、などを包含する。メチル-3-[（*p*-アジドフェニル）ジチオ]プロピオイミデートのような誘導化試薬は光活性化可能な中間体を与え、それは光の存在下に交差結合を形成することができる。その他に、反応性の非水溶性マトリックス、たとえばシアノーゲンプロミド活性化炭水化物および米国特許第3 9 6 9 2 8 7；3 6 9 1 0 1 6；4 1 9 5 1 2 8；4 2 4 7 6 4 2；4 2 2 9 5 3 7；および4 3 3 0 4 4 0に記載の反応性基質は蛋白質固定化に利用される。

グルタミニルおよびアスパラギニル残基はしばしば脱アミノ化されておのおの対応するグルタミルおよびアスパルチル残基となる。これらの残基は中性または塩基性条件下に脱アミノ化される。これら残基の脱アミド化型はこの発明の範囲内に含まれる。

その他の修飾はプロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリルまたはスレオニル残基にあるヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖にある α -アミノ基のメチル化（T. E. Creighton, 「蛋白質：構造および分子の性質（Proteins: Structure and Molecular Properties）」、W. H. Freeman社、サンフランシスコ、79～86頁[1983年]）、*N*-末端アミンのアセチル化および*C*-末端カルボキシル基のアミド化を包含する。この発明の範囲内に含まれるCHFポリペプチドのもう一つの型の共有結合的修飾にはこのポリペプチドの天然グリコシル化パターンを変更することを含む。ここに、変更は天然CHFに見られる炭水化物基1個またはそれ以上を除去し、および／または天然CHFには存在しないグリコシル化部位1個またはそれ以上を追加することを意味する。

ポリペプチドのグリコシル化は典型的にはN-結合かまたはO-結合である。N-結合は炭水化物基がアスパラギン残基の側鎖に付加することを示す。トリペプチド配列：アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニン（ここにXはプロリン以外のアミノ酸である）はアスパラギン側鎖への炭水化物基の酵素的付加のための認識配列である。そこで、これらトリペプチド配列のいずれかのポリペプチドにおける存在はグリコシル化の可能性ある部位を構成する。O-結合グリコシル化は、糖であるN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの一つが、最も普通にはセリンまたはスレオニンであるヒドロキシアミノ酸に結合することを示すけれども5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンも使用しうる。

CHFポリペプチドへのグリコシル化部位の結合は、前記のトリペプチド配列（N-結合グリコシル化部位のための）1個またはそれ以上を含むようにアミノ酸配列を変更することによって好都合に達成される。この変更は天然CHF配列にセリンまたはスレオニン残基1個またはそれ以上の付加または置換（O-グリコシル化部位への）することによっても行いうる。容易にするには天然CHFアミノ酸配列を好ましくはDNA水準で、殊に天然CHFポリペプチドをコードするDNAを所期アミノ酸に翻訳されるコドンを作成するように予め選択した塩基で突然変異することによって変更する。DNA突然変異は2B項に前記した方法を用いて行いうる。

CHFポリペプチド上の炭水化物基の数を増加する別の方法の一つはグリコシドの化学的または酵素的なポリペプチドへの結合である。これらの操作はN-またはO-結合グリコシル化について、グリコシル化性能を持つ宿主細胞内でポリペプチドの生産を要しない点で有利である。使用する結合様式に依存して、糖は（イ）アルギニンおよびヒスチジン、（ロ）遊離カルボキシル基、（ハ）システインにあるような遊離スルフヒドリル基、（ニ）セリン、スレオニン、またはヒドロキシプロリンにあるような遊離ヒドロキシル基、（ホ）フェニルアラニン、チロジンまたはトリプトファンにあるような芳香族基、または（ヘ）グルタミンのアミド基、に付加しうる。これらの方法は1987年9月11日発行WO 87/05330およびAplinとWriston、CRC・Crit. Rev. Biochem.、259~306頁（1981年）に記載がある。

CHFポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は化学的または酵素的に達成しうる。化学的脱グリコシル化にはトリフルオロメタンスルホン酸化合物または均等な化合物とポリペプチドとの接触を要する。この処理では結合糖（N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン）以外の殆どまたは全ての糖を切断するが、ポリペプチドは無傷のままに残す。化学的脱グリコシル化はHakimuddinなど、Arch. Biochem. Biophys.、259巻：52頁（1987年）およびEdgeなど、Anal. Biochem.、118巻：131頁（1981年）に記載がある。ポリペプチド上の炭水化物基の酵素的切断はThotakuraなど、Meth. Enzymol.、138巻：350頁（1987年）に記載のように種々のエンドーおよびエキソグリコシダーゼの使用により達成できる。

可能性あるグリコシル化部位でのグリコシル化はDuskinなど、J. Biol. Chem.、257巻：3105頁（1982年）に記載のようにツニカマイシン化合物の使用で防止しうる。ツニカマイシンは蛋白質-N-グリコシド結合の形成を阻害する。

CHFの共有結合修飾の他の型は、米国特許第4640835；4496689；4301144；4670417；4791192または4179337にある様式で、たとえばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンなど、種々の非蛋白質ポリマーへのCHFポリペプチドの結合を含む。

CHFはまた、例えばコアセルベーション技術または界面重合（例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンミクロカプセルおよびポリ[メチルメタクリレート]マイクロカプセル）により、コロイド性薬剤送達系中（例えばリポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）またはマクロエマルジョン中に製造したマイクロカプセル中に捕捉しうる。このような技術は「レミントンの薬剤科学（Remington's・Pharmaceutical・Science

10

20

30

40

50

e)」、16版、Oslo, A. 編、(1980年)に開示されている。

CHF製剤はまた放射性ヨード、酵素、フルオロフォア、スピン標識、その他で標識した時にはCHFのための検定(たとえば放射免疫検定、酵素結合免疫検定、または放射能受容体検定における標準品として使用するためにCHFを標識することによって)における標準品としての抗体の作成において、親和性精製技術において、および競合型受容体結合検定において有用である。

変異体CHFの性質を予測するのは困難なことが多いので、最適変異体を選択するためには得られる変異体の検索は意義があるものである。心臓肥大、抗不整脈、筋変力作用、または神経栄養性の強化、CHF拮抗作用の存在、発現水準の向上、酸化安定性、高濃度分泌性能、その他を検索できる。例えば、所与抗体への親和性のようなCHF分子の免疫学的性質の変化、たとえば競合型免疫検定法により測定される。変異体はその肥大性、抗不整脈性、筋変力性、および神経栄養性の活性が同じ検定で天然CHFで観察される対応する活性(例えば、下記実施例中に記載する肥大および神経栄養性の検定を使用して)と比較することによって低下または強化における変化を検定する。たとえば酸化還元性または熱安定性、親水性、プロテイン分解の受け易さ、またはキャリアーとのまたは多重体への会合性向のような、蛋白質またはポリペプチドの性質の潜在的修飾の他のものは当分野でよく公知の方法によって検定される。

I. CHF拮抗剤

CHFへの拮抗剤はCHFのための予測される受容体ファミリー(CNTF、LIF、およびオンコスタチンM受容体サブファミリーを包含するGH/サイトカイン受容体ファミリー)を使用することによって製造できる。即ち、受容体をファミリーから発現用にクローニングし;次に受容体の可溶性型を、細胞外ドメインを確認し膜貫通ドメインから切断することによって製造できる。可溶性型受容体を次に拮抗剤として使用するか、または受容体を使用してCHF活性に拮抗する小さい分子を検索できる。

これとは別に、図1に示すマウス配列または図5に示すヒト配列を使用して、拮抗剤として作用する天然CHFの変異体を製造する。GH/サイトカイン受容体ファミリーはリガンド上に結合部位2個を持つことが知られているのでCHFの受容体結合部位は結合性研究で決定でき、また、分子が拮抗剤として作用するようにそれらの一つを標準技術(欠失またはラジカル置換)で除去することができる。本明細書記載の拮抗作用は肥大性および神経栄養性を含む数種の方法によって決定できる。

J. 肥大性検定

肥大性活性を検定するためには、好ましくは縮小検定を使用する。この検定法では使用する培地は細胞を血清不含の低密度プレーティングで生存させる。この培地に直接プレーティングすると、少数細胞が除けるように洗浄段階を省略できる。プレーティング密度は重要である:少数細胞の多くとその生存率が減少し;多数細胞の多くおよび筋細胞が自己誘導肥大を開始する。

これに含まれる段階は:

(イ) 96ウェルのプレートに、少なくともインスリン、トランスフェリン、およびアプロチニンを添加したD-MEM/F-12培地中の筋細胞懸濁液を、細胞密度約 7.5×10^4 細胞/mLでプレーティングする;

(ロ) 細胞を培養する;

(ハ) 検定すべき物質(CHFを含むと推測されるような)を添加する;

(ニ) 細胞を物質とともに培養する;および

(ホ) 肥大性を測定する。

この培地には別の要素、たとえば細胞の長期生存を確保するEGFのようなものを添加できるが、しかしそのような添加は必須ではない。D-MEM/F-12培地はGibco・BRL、Gaithersburg、MDから入手でき、下記培地の一つからなる:

10

20

30

40

	11320	11321	11350	11531	12400	12500
成 分	1x液体	1x液体	1x液体	1x液体	粉末	粉末
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)

アミノ酸：

L-アラニン	4.45	4.45	4.45	4.45	4.45	4.45
L-アルギニン-HCl	147.50	147.50	147.50	147.50	147.50	147.50
L-アスパラギン-H ₂ O	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50
L-アスパラギン酸	6.65	6.65	6.65	6.65	6.65	6.65
L-システイン-HCl-H ₂ O	17.56	17.56	17.56	17.56	17.56	17.56
L-シスチン-2HCl	31.29	31.29	31.29	31.29	31.29	31.29
L-グルタミン酸	7.35	7.35	7.35	7.35	7.35	7.35
L-グルタミン	365.00	365.00	365.00	365.00	365.00	365.00
グリシン	18.75	18.75	18.75	18.75	18.75	18.75
L-ヒスチジン-HCl-H ₂ O	31.48	31.48	31.48	31.48	31.48	31.48
L-イソロイシン	54.47	54.47	54.47	54.47	54.47	54.47
L-ロイシン	59.05	59.05	59.05	59.05	59.05	59.05
L-リジン-HCl	91.25	91.25	91.25	91.25	91.25	91.25
L-メチオニン	17.24	17.24	17.24	17.24	17.24	17.24
L-フェニルアラニン	35.48	35.48	35.48	35.48	35.48	35.48
L-プロリン	17.25	17.25	17.25	17.25	17.25	17.25
L-セリン	26.25	26.25	26.25	26.25	26.25	26.25
L-スレオニン	53.45	53.45	53.45	53.45	53.45	53.45
L-トリプトファン	9.02	9.02	9.02	9.02	9.02	9.02
L-チロジン-2Na-2H ₂ O	55.79	55.79	55.79	55.79	55.79	55.79
L-バリン	52.85	52.85	52.85	52.85	52.85	52.85

無機塩：

CaCl ₂	116.60	116.60	116.60	116.60	116.60	116.60
CuSO ₄ -5H ₂ O	0.0013	0.0013	0.0013	0.0013	0.0013	0.0013

10

20

30

40

Fe (NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
Fe SO ₄ ·7H ₂ O	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	
K C l	311.80	311.80	311.80	311.80	311.80	311.80	
M g C l ₂	28.64	28.64	28.64	28.64	28.64	28.64	
M g S O ₄	48.84	48.84	48.84	48.84	48.84	48.84	
N a C l	6999.5	6999.50	6999.50	6999.50	6999.5	6999.5	10
	0				0	0	
N a H C O ₃	2438.0	2438.00	2438.0	2438.00	- -	- -	
	0						
N a H ₂ P O ₄ ·H ₂ O	62.50	62.50	62.50	- -	62.50	62.50	
N a ₂ H P O ₄	71.02	71.02	71.02	- -	71.02	71.02	
Z n S O ₄ ·7H ₂ O	0.432	0.432	0.432	0.432	0.432	0.432	20

他の成分：

D-グルコース	3151.0	3151.00	3151.00	3151.00	3151.0	3151.0	
	0				0	0	
H E P E S	- -	- -	3574.50	3574.50	3574.5	- -	
					0		
N a ヒポキサンチン	2.39	2.39	2.39	2.39	2.39	2.39	30
リノレイン酸	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	
リポ酸	0.105	0.105	0.105	0.105	0.105	0.105	
フェノールレッド	8.10	8.10	8.10	8.10	8.10	8.10	
プトレシン·2H ₂ O	0.081	0.081	0.081	0.081	0.081	0.081	
ピルビン酸ナトリウム	55.00	55.00	55.00	55.00	55.00	55.00	40

ビタミン類：

ビオチン	0.0035	0.0035	0.0035	0.0035	0.0035	0.0035	
D-パントテン酸 C a	2.24	2.24	2.24	2.24	2.24	2.24	
コリン 塩化物	8.98	8.98	8.98	8.98	8.98	8.98	
葉酸	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	

i-イノシトール	12.60	12.60	12.60	12.60	12.60	12.60
ナイアシンアミド	2.02	2.02	2.02	2.02	2.02	2.02
ピリドキサル-HC1	2.00	- -	2.00	- -	2.00	2.00
ピリドキシン-HC1	0.031	2.031	0.031	2.031	0.031	0.031
リボフラビン	0.219	0.219	0.219	0.219	0.219	0.219
チアミン-HC1	2.17	2.17	2.17	2.17	2.17	2.17
チミジン	0.365	0.365	0.365	0.365	0.365	0.365
ビタミンB ₁₂	0.68	0.68	0.68	0.68	0.63	0.68

10

好適な肥大性検定法は次の通り：

(イ) ウシ血清を含む培地、好ましくは4%ウシ胎児血清添加D-MEM/F-12培地を、好ましくはウェルをこの培地と約8時間37℃でインキュベーションした、96ウェル組織培養プレートにプレコートする；

(ロ) 培地を除く；

(ハ) 7.5×10^4 細胞/mLのインスリン、トランスフェリン、およびアプロチニン添加D-MEM/F-12培地の筋細胞懸濁液を内側の60ウェルにプレーティングする；

20

(ニ) 筋細胞を少なくとも24時間培養する；

(ホ) 被験物質を添加する；

(ヘ) 細胞を被験物質とともに培養する（好ましくは約24～72時間、より好ましくは約48時間）；次いで

(ト) 肥大を、好ましくはクリスタルバイオレット染色で、測定する。

好ましくは段階（ハ）で使用する培地は血清不含であって、ペニシリン/ストレプトマイシン（pen/strep）およびグルタミンを含有する。最も好ましくは、この培地はD-MEM/F-12を100mL、トランスフェリン100μL（10mg/mL）、インスリン20μL（5mg/mL）、アプロチニン50μL（2mg/mL）、pen/strepを1mL（JRH・Biosciences・No. 59602-77P）、L-グルタミン1mL（200mM）を含有する。

30

試料必要量が100μLまたはそれ以下と小さく、1週間1000試料の検定性能が発現クロニングおよび蛋白質精製を可能にするが、これは現在までの方法を使用しては実現不能であろう。

肥大性用の検定法の別の一つは心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）放出をラットANP受容体A-IgG融合蛋白質への¹²⁵I-ラットANPの結合に対する競合を測定する検定法によって測定することを含む。使用に適するこの方法はChamowなど、Biochemistry、29巻：9885～9891頁（1990年）が記載したCD4-IgG融合蛋白質を使用してgp120を測定するために使用した方法と類似している。

40

K. 神経栄養性検定

ここではLeung、Neuron、8巻：1045～1053頁（1992年）に記載された毛様体神経節神経栄養性活性用検定法が適当である。略述すれば、毛様体神経節をE7-E8ニワトリ胚から切り出し、トリプシン-EDTA（Gibco15400-13）中で解離し、37℃で15分間燐酸塩緩衝食塩水で10倍に希釈する。神経節をトリプシンがなくなるまで成育培地（10%ウシ胎児血漿、1.5mM-グルタミン、ペニシリン100μg/mLおよびストレプトマイシン100μg/mL添加高グルコースD-MEM）で3回洗浄し、次に成育培地1mL中で緩やかにかきまぜて単細胞懸濁液とする。成育培地5mL中のこの細胞混合物を100mm組織培養皿に入れ、4時間37℃の

50

孵卵器中でインキュベーションしてニューロンを濃縮する。この時間の間に非ニューロン性細胞は優先的に皿に付着し、インキュベーションの終期にはニューロンは浮遊して緩やかに洗浄できる。濃縮したニューロンを次に予めコラーゲンで被覆した96ウェルのプレートに入れてプレATINGする。各ウェルに細胞1000～2000個をプレATINGして、試験すべきCHF希釈物とともに最終容積を100から250μLとする。37℃で2～4日インキュベーションした後に、生存細胞を生体色素メタロチオネイン(MTT)を用いて染色して生体細胞数を評価する。ウェルに5分の1容のMTT(Sigma・M2128)5mg/mLを添加する。37℃で2～4時間インキュベーション後、生存細胞(濃紫色沈殿物で満たされたもの)を倍率100×の位相顕微鏡によって計数する。

10

3. CHFの使用および治療的組成物および投与

CHFには生体内で、心不全、不整脈または筋変力疾患および/または末梢性神経障害およびその他の運動ニューロンまたはCNTFが活性なニューロンに関連する神経学的疾患を持つ哺乳類(動物またはヒト)の処置のための薬剤として用途があると信じられる。

例えば、CHFは、ACE阻害剤が採用できないか、または有効でない症例で鬱血性心不全の処置に有用でありうる。場合によってはCHFをACE阻害剤を含む他剤と組合せるか、協同して鬱血性心不全を治療するために投与する。

投与すべきACE阻害剤の有効量は、もし採用するなら、医師または獣医師の裁量による。薬剤の投与および調節は鬱血性心不全の最適管理を達成するように行われ、および理想的には利尿剤またはジギタリスの使用および低血圧および腎障害のような状態を考慮に入れる。用量はさらに使用する阻害剤の型および処置すべき特定患者のような因子に依存する。典型的には採用する量はACE阻害剤がCHFなしに投与される時に使用される用量と同じ用量とする。

20

そこで、例えばエナラプリルの試験用量を5mgとし、患者が許容するなら、次にこれを1日1回用量10～20mgに上げる。他の例として、カプトプリルはヒトの患者に最初は試験用量6.25mgを経口投与し、次にこの用量を患者が許容するなら、25mg1日2回(BID)または1日3回(TID)まで、後に50mgBIDまたはTIDまで増量しうる。許容水準は血圧の低下が低血圧の徴候を伴うかどうかを決定して評価する。もし処方するなら、用量は100mgBIDまたはTIDまで増加しうる。カプトプリルは活性成分としてヒドロクロロサイアザイドと組合せてカプトプリルが腸に達するまで保護する腸溶または遅延放出被覆を持つpH安定化コアとして製剤化される。カプトプリルは錠剤またはカプセル剤として投与用に入手できる。カプトプリルその他のACE阻害剤に関する用量、投与、処方、および配合禁忌についての議論は「Physicians・Desk・Reference」、Medical・Economics・Data・Production社、Montvale、NJ、2314-2320頁(1994年)に見出すことができる。

30

CHFはまた天然または腫瘍壊死因子誘導死に対して膠突起神経膠細胞を保護する試験管内での膠突起神経膠細胞の発生、成熟および生存の点で、星状神経膠細胞の生存および分化および2型星状神経膠細胞誘導の点で、およびラット中枢神経系(CNS)の小神経膠細胞による低親和性神経成長因子およびCD-4の組換え生産の刺激の点で潜在的に有用である。

40

CHFはまた脱神経した骨格筋に栄養効果を与える点で潜在的に有用である。これに加え、白血病阻害因子、オンコスタチンM、および毛様体神経栄養因子に対する低親和性受容体を遺伝子移入した造血細胞の増殖反応および結合性を持つこと、インターロイキン-6受容体に結合することによって肝実質細胞中のフィブリノーゲン遺伝子発現を制御すること、マウス胚癌細胞に栄養作用を持つこと、内因性熱発物質になること、およびヒトのIMR32神経芽細胞腫に有糸分裂促進剤効果を持つことが期待される。

これに加え、CHFは培養ラット交感神経ニューロンの神経成長因子への反応を強化すること、発育中のラットにおいて運動ニューロンとその標的筋肉を維持すること、生体内で運動神経ニューロンの発芽を誘導すること、試験管内で新生児ラットの皮質脊髄ニューロ

50

ンの生存を促進すること、生体内で成熟ラットの黒質ドパミン作動性ニューロンの変性を防止すること、海馬錐体ニューロンの興奮毒性損傷に対する感受性の閾値を変化すること、成熟ラットCNSでニューロンの変性を防止し、低親和性NGF受容体の生産を促進すること、および胎児ラット海馬培養物中のニューロン生存を強化することが期待される。これらの活性はCHFによる末梢神経障害（運動および感覚）、ALS、アルツハイマー病、パーキンソン病、発作、ハンチントン病、および、例えば網膜に関する眼科疾患を含む全神経変性疾患の治療に翻訳される。

CHFは、たとえば、CNTF、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、およびNT- α のような神経栄養因子とともに神経学的疾患の付随的治療としても有用でありうる。

CHFをコードする核酸は組織特異的型分類の診断剤として有用でありうる。例えば、切片上ハイブリッド形成、ノーザンおよびサザンブロッティング、およびPCR分析のような操作はCHFをコードするDNAおよび／またはRNAが評価すべき細胞型内に存在するかどうかを決定するために使用できる。

分離したCHFポリペプチドは未知量のCHFを含む試料に対する標準または対照として定量的診断検定法で使用しうる。

心不全および神経学的疾患の処置のためのCHF治療剤は貯蔵のためには所期純度を持つCHFを、要すれば生理学的に許容される担体、添加剤、または安定化剤（前記レミントンの薬剤科学）と混合して、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形に製造される。許容される担体、添加剤または安定化剤は採用する用量および濃度においてレシピエントに対して非毒性であって、燐酸塩、クエン酸、その他の有機酸のような緩衝剤；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量ポリペプチド（約10残基以下）；血漿アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンのような蛋白質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジンのようなアミノ酸；グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む単糖類、二糖類、その他の炭水化物；EDTAのようなキレート剤；マンニトールまたはソルビトールのような糖アルコール；ナトリウムのような塩形成対イオン；および／またはトウイーン、プルロン、またはポリエチレングリコール（PEG）のような非イオン性界面活性剤を包含する。

生体内投与に使用するCHFは無菌でなければならない。これは凍結乾燥および再構築の前または後に無菌濾過膜を通して濾過することによって容易に達成される。通常ではCHFは凍結乾燥型または溶液中に貯蔵する。

治療用CHF組成物は一般に無菌アクセスポートを持つ容器、例えば皮下注射針によって穴あけできる蓋を持つ静脈注射溶液バッグまたはバイアルに入れる。

CHFまたはCHF抗体投与経路はたとえば静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内、または病巣内経路など、または下記の持続放出系による注射または点滴など、既知の方法に従うものである。CHFは点滴するかまとめた注射で連続的に投与される。CHF抗体は同様に投与するか、または血流またはリンパに投与する。

持続放出製剤の適例はこの蛋白質を含む固体親水性ポリマーの半透明マトリックスであって、たとえばフィルムまたはマイクロカプセルに成形したものを包含する。持続放出マトリックスの例にはポリエステル、ヒドロゲル（たとえば、Langerなど、J. Biomed. Master. Res.、15巻：167～277頁[1981年]およびLangerなど、Chem. Tech.、12巻、98～105頁[1982年]に記載のあるポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3773919、欧州特許58481）、L-グルタミン酸およびガンマエチル-L-グルタメートとの共重合体（Sidmanなど、Biopolymers、22巻：547～556頁[1983年]）、非分解性エチレン-酢酸ビニル（Langerなど、前出）、分解性乳酸-グリコール酸共重合体、たとえばルプロンデポ（商品名）（乳酸-グリコール酸共重合体および酢酸ロイプロライドの注射用微小球）など、およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許133988）を包含する。

エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸のようなポリマーは100日以上にわた

10

20

30

40

50

る分子の放出を可能にするが、ある種のヒドロゲルは蛋白質をもっと短期間放出する。カプセル化された時、蛋白質は体内に長期間残存し、37℃で湿気に接触する結果として変性または凝集して生物学的活性損失および免疫原性の変化が起こりうる。合理的な方策は関与する機序に依存した蛋白質安定化について工夫できる。例えば、もし凝集機序が分子間チオージスルフィド交換によるS-S結合形成にあることが発見されれば、安定化はスルフィドリル残基修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、含湿量制御、適当な添加剤の使用、および特定ポリマーマトリックス組成物の開発により達成される。

持続放出CHF組成物はリポソーム捕捉CHFも包含する。CHFを含有するリポソームはそれ自体公知の方法：DE 3 2 1 8 1 2 1；Epsteinなど、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82巻：3688～3692頁（1985年）；Hwangなど、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77巻：4030～4034頁（1980年）；欧州特許52322；欧州特許36676；欧州特許88046；欧州特許143949；欧州特許142641；日本特許出願83-118008；米国特許第4485045および4544545；および欧州特許102324；で製造する。正常にはリポソームは小さい（約200～800オングストローム）単層型でリピド含量はコレステロール約30モル%より大であって、選択する比率は最適CHF療法に適合させる。

治療に採用すべきCHFの有効量は、例えば治療対象、投与経路、および患者の条件などに依存する。それ故、治療者にとって薬剤を力価検定して、最適な治療効果を得るに必要なように投与経路を修正することが必要となる。典型的な日用量は前記因子に依存して1日当たり約1μg/kgから100mg/kg患者体重またはそれ以上までの範囲にわたり、好ましくは約10μg/kg/日から10mg/kg/日である。典型的には臨床医は用量が心臓または神経不全の治療に所望の効果を達成するまでCHFを投与する。例えば、この量は心室収縮力を増大し、末梢性血管抵抗を減弱し、心不全患者における同様に重大な状態を軽快または処置する。この療法の進捗は通常の検定法で容易に監視される。

4. CHF抗体の製造

(i) 出発物質および製法

免疫グロブリン(Ig)およびそのある種の変異体は公知であり、多くは組換え細胞培養によって調製されてきた。例えば、米国特許第4745055；欧州特許256654；欧州特許120694；欧州特許125023；欧州特許255694；欧州特許266663；WO88/03559；Faulknerなど、Nature、298巻：286頁（1982年）；Morrison、J. Immunol.、123巻：793頁（1979年）；Koehlerなど、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77巻：2197頁（1980年）；Rasoなど、Cancer Res.、41巻：2073頁（1981年）；Morrisonなど、Ann. Rev. Immunol.、2巻：239頁（1984年）；Morrison、Science、229巻：1202頁（1985年）；およびMorrisonなど、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81巻：6851頁（1984年）；を参照。再結合免疫グロブリン鎖も公知である。例えば米国特許第4444878；WO88/03565；および欧州特許68763および記載の文献参照。本発明のキメラにおける免疫グロブリン部分はIgG-1、IgG-2、IgG-3、またはIgG-4サブタイプ、IgA、IgE、IgDまたはIgM、から得られうるが、好ましくはIgG-1、またはIgG-3から得られる。

(ii) ポリクローナル抗体

CHFポリペプチドまたはCHF断片へのポリクローナル抗体は一般にCHFまたはCHF断片およびアジュバントの皮下(sc)または腹腔内への多回注射によって動物中に作成する。CHFまたは標的アミノ酸配列を含む断片を免疫すべき種に免疫原性である蛋白質、たとえばキーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシのサイログロブリン、または大豆トリプシン阻害剤などに双官能または誘導化剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホサクシンイミドエステル（システイン残基経由の複合）、N-ヒドロキシサ

10

20

30

40

50

クシンイミド（リジン残基経由）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、 SOCl_2 、または $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ （ここにRおよび R^1 は異なるアルキル基である）などを使用して複合させることは有用でありうる。

CHFポリペプチドまたはCHF断片、免疫原性複合体、または誘導体に対して動物を免疫するには、ペプチドまたは複合体（各々ウサギまたはマウス）1mgまたは1 μg をフロインドの完全アジュバント3容と混合し、その溶液を多部位に皮内注射する。1月後、初回量の1/5から1/10量のフロインド完全アジュバント中のペプチドまたは複合体を多部位に皮下注射して動物をブースト（追加免疫）する。7から14日後、動物から採血し、血清をCHFまたはCHF断片抗体力価について検定する。動物を力価が安定するまでブーストする。好ましくは、同じCHFまたはCHF断片の複合体であるが異なる蛋白質におよび/または異なる交差結合試薬により複合した複合体で動物をブーストする。複合体は融合蛋白質として組換え細胞培養物中でも製造できる。明礬のような凝集剤も免疫反応を強化するために適切に使用される。

(iii) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は実質的に均質な抗体の集団、すなわち集団を構成する個々の抗体が微量に存在するかも知れない天然起源の突然変異を除いて一致しているもの、から得られる。そこで、修飾語「モノクローナル」は異なる抗体の混合物ではないという抗体の性質を示す。

例えば、本発明のCHFモノクローナル抗体はKohlerとMilstein、Nature、256巻：495頁（1975年）が最初に記載したハイブリドーマ法を使用するか、組換えDNA法（Cabillyなど、前出）により製造しうる。

ハイブリドーマ法では、マウスまたはハムスターのようなその他の適当な宿主動物を前記のように免疫して免疫に使用したCSFまたはCSF断片に特異的に結合する抗体を製造するか、製造することができるリンパ球を作成する。あるいは、リンパ球は試験管内で免疫しうる。次にポリエチレングリコールのような適当な融合剤を使用してリンパ球を骨髓腫細胞と融合してハイブリドーマ細胞を形成する（Goding、「モノクローナル抗体：原理と実際（Monoclonal Antibodies: Principles and Practice）」、59～103頁[Academic Press、1986年]）。

こうして製造したハイブリドーマ細胞を好ましくは非融合親骨髓腫細胞の成長または生存を阻止する物質1種またはそれ以上を含有する適当な培養培地中に接種し、成育させる。例えば、もし親骨髓腫細胞がヒポキサンチン・グアニン・ホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPRRT）を欠失するなら、典型的にはハイブリドーマ用の培養培地にはHGPRT欠損細胞の成長を阻害する物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを添加する（HAT培地）。

好適な骨髓腫細胞は効率的に融合し、選択した抗体産生細胞の安定な高水準の抗体産生を維持し、およびHAT培地のような培地に感受性のあるものである。これらの中で、好適な骨髓腫細胞系列は、たとえばSalk Institute Cell Distribution Center、サンジエゴ、カリフォルニア州、米国、から入手可能なMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍から誘導されるもの、およびAmerican Type Culture Collection、ロックビル、メリーランド州、米国から入手可能なSP-2細胞のようなマウス骨髓腫細胞系列である。

ハイブリドーマ細胞を成育させる培養培地はCHFに対するモノクローナル抗体の生産について検定する。好ましくはハイブリドーマ細胞によって生産されるモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降反応または、たとえばラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）のような試験管内結合検定法により決定する。

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunsonとPollard、Anal. Biochem.、107巻：220頁（1980年）のScatchard分析などによって決定できる。

10

20

30

40

50

ハイブリドーマ細胞が所望の特異性、親和性および／または活性を持つ抗体を生産することを確認した後、クローンを制限希釈法によりサブクローニングして標準法によって成長させる（G o d i n g、前出）。この目的に適当な培養培地には、例えばD－MEMまたはRMP I－1640培地を包含する。これに加えて、ハイブリドーマ細胞は動物中で生体内腹水腫瘍としても成長させうる。

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体を培養培地、腹水液、または血清から常法による免疫グロブリン精製操作、例えばプロテインA－セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析または親和性クロマトグラフィーのよ

うな操作、により適切に分離する。
本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは常法操作（たとえば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することのできるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）を使用して容易に分離し、配列決定される。本発明のハイブリドーマ細胞はこのDNAの好適な源として役立つ。一旦分離すれば、このDNAを発現ベクター中に入れ、次にこれを、たとえば普通は免疫グロブリン蛋白質を生産しない大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または骨髓腫細胞など宿主細胞に遺伝子移入して組換え宿主細胞内にモノクローナル抗体を合成させる。抗体をコードするDNAの細菌中での組換え発現に関する綜説文献にはSkerraなど、Curr. Opinion・in・Immunol.、5巻：256～262頁（1993年）およびPluckthun、Immunol. Revs.、130巻：151～188頁（1992年）を包含する。

DNAは、例えば相同的なマウス配列の代わりにヒトの重鎖および軽鎖の定常ドメインのコード配列を置換するか（Morrisonなど、Proc. Natl. Acad. Sci.、81巻：6851頁〔1984年〕）、または免疫グロブリンのコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドについてのコード配列全部または一部を共有結合的に結合することによって修飾しうる。このような様式で、本発明の抗－CHFモノクローナル抗体の結合特異性を持つ「キメラ」または「ハイブリッド」抗体を製造する。

典型的にはそのような非免疫グロブリンポリペプチドを本発明抗体の定常ドメインの代わりに置換するか、またはそれらを本発明抗体の抗原結合部位の一つの可変ドメインの代わりに置換してCHFに特異性を持つ抗原結合部位1個および異なる抗原に対する特異性を持つ別の抗原結合部位を含有するキメラ二価抗体を作成する。

キメラまたはハイブリッド抗体または試験管内で交差結合剤が関与するものを含む合成蛋白質化学の既知方法を使用して製造しうる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用してまたはチオエーテル結合を形成してイムノトキシンを構築しうる。この目的の適当な試薬の例にはイミノチオレートおよびメチルー4－メルカプトブチルイミデートを包含する。診断的応用のためには、本発明の抗体を典型的には検出可能な基で標識する。この検出可能な基は直接的または間接的に検出可能なシグナルを作ることのできるものであることができる。例えば、検出可能な基は³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、または¹²⁵Iのような放射性同位元素；たとえばフルオレッセインイソチオシアネート、ロダミン、またはルシフェリンのような蛍光または化学発光化合物；たとえば¹²⁵I、³²P、¹⁴C、³Hなどの放射性同位元素標識；たとえばアルカリホスファターゼ、ペーターガラクトシダーゼ、またはセイヨウサビペルオキシダーゼのような酵素でありうる。

Hunterなど、Nature、144巻：945頁（1962年）；Davidなど、Biochemistry、13巻：1014頁（1974年）；Painなど、J. Immunol. Meth.、40巻：219頁（1981年）；およびNygren、J. Histochem. and・Cytochem.、30巻：407頁（1982年）に記載された方法を包含する検出可能な基に対する抗体を別々に複合するための当分野の公知方法を採用しうる。

本発明の抗体は、たとえば競合的結合検定法、直接的または間接的なサンドウィッチ検定法および免疫沈降検定法のような、いずれの公知検定法にも採用しうる。Zola、「モノクローナル抗体：技術便覧（Monoclonal・Antibodies：A・Ma

10

20

30

40

50

n u a l · o f · T e c h n i q u e s」、147～158頁（C R C ・ P r e s s 社、1987年）。

競合的結合検定法は被験試料被分析物（C H F）と競合して所定量の抗体と結合する標識標準（C H Fまたはその免疫学的に反応性の部分でありうる）の性能に依存する。被験試料中のC H Fの量は抗体に結合することになる標準品の量に逆比例する。結合してくる標準品の量を迅速に決定するためには、一般に、抗体に結合する標準品および被分析物を結合せずに残っている標準品と被分析物から分離しうるように、抗体を競合の前または後に固定化する。

サンドウィッチ検定法は検出すべき蛋白質（C H F）の異なる免疫原部分またはエピトープに結合することのできる抗体2個の使用を含む。サンドウィッチ検定法では、被験試料被分析物を固体担体上に固定化された第一の抗体に結合し、その後に、第二の抗体を被分析物に結合して不溶性の三成分複合体を形成する。D a v i dとG r e e n e、米国特許第4376110。第二抗体自体を検出可能な基で標識する（直接サンドウィッチ検定）か、または検出可能な基で標識した抗免疫グロブリン抗体を使用して測定（間接サンドウィッチ検定）しうる。例えば、サンドウィッチ検定法の一型はE L I S A検定法であって、ここでは検出可能な基は酵素（たとえば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ）である。

（i v）ヒト化抗体

非ヒト抗体をヒト化する方法は当分野でよく公知である。一般に、ヒト化抗体は非ヒト起源から導入されたアミノ酸残基1個またはそれ以上を持つ。これらの非ヒトアミノ酸残基はしばしば「輸入」残基と呼ばれ、典型的には「輸入」可変ドメインから取られる。ヒト化は本質的にW i n t e rおよびその協力者の方法（J o n e sなど、N a t u r e、321巻：522～525頁〔1986年〕；R i e c h m a n nなど、N a t u r e、332巻：323～327頁〔1988年〕；V e r h o e y e nなど、S c i e n c e、239巻：1534～1536頁〔1988年〕）に従って、嚙歯類のC D RまたはC D R配列をヒトの抗体の対応する配列に置換することによって実行できる。それ故に、このような「ヒト化」抗体はキメラ抗体であり（C a b i l l yなど、前出）、そこでは実質的に無傷のヒト可変ドメインより小さいものが非ヒト種からの対応する配列によって置換されている。実際的に、ヒト化抗体は典型的にはヒト抗体であって、そこではC D R残基のいくつかおよびおそらくF R残基のいくつかが嚙歯類抗体中の類似部位からの残基によって置換されている。

ヒト化抗体を作成するために使用すべきヒト可変ドメインの選択は軽鎖および重鎖の双方とも抗原性を削減するためには非常に重要である。いわゆる「最適」法に従って、嚙歯類抗体の可変ドメインの配列を公知ヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対して検索する。嚙歯類のものに最近似のヒト配列を次にヒト化抗体用のヒトのフレームワーク（F R）として許容する（S i m sなど、J . I m m u n o l .、151巻：2296頁〔1993年〕；C l o t h i aとL e s k、J . M o l . B i o l .、196巻：901頁〔1987年〕）。別法の一つは軽鎖または重鎖にある特定のサブグループに属するヒト抗体全部のコンセンサス配列から誘導した特殊なフレームワークを使用する。同じフレームワークを数種の異なるヒト化抗体に使用しうる（C a r t e rなど、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、89巻：4285頁〔1992年〕；P r e s t aなど、J . I m m u n o l .、151巻：2623頁〔1993年〕）。

抗体を抗原への高親和性その他の好ましい生物学的性質を保持したままヒト化することはさらに重要である。この目的を達するため、好適な方法に従えば、ヒト化抗体は親配列およびヒト化配列の三次元モデルを使用する親配列および種々の概念的なヒト化生成物の分析の過程により製造される。三次元免疫グロブリンモデルは普通に入手可能で、当業者は精通している。選択した免疫グロブリン配列候補の推測上の三次元立体配座構造を描写し、表示するコンピュータープログラムが入手できる。これらの画像を検討すると免疫グロブリン配列候補の官能性における残基の推測上の役割、すなわち抗原に結合する免疫グロブリン候補の性能に影響を与える残基の解析、を分析できる。こうして、F R残基をコンセンサスおよび輸入配列から選択して結合して標的抗原への親和性向上のような抗体の所

10

20

30

40

50

期特性に到達するようにする。一般に、CDR残基は直接的におよび最も実質的に抗原結合に与える影響に關与している。

(v) ヒトの抗体

ヒトのモノクローナル抗体はハイブリドーマ法により作成できる。ヒトのモノクローナル抗体生産のためのヒト骨髓腫およびマウスーヒトヘテロ骨髓腫細胞系列は、例えばKozbor、J. Immunol.、133巻：3001頁（1984年）；Brodeurなど、「モノクローナル抗体製造技術および応用（Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications）」、51～63頁（Marcel Dekker社、ニューヨーク、1987年）；およびBoernerなど、J. Immunol.、147巻：86～95頁（1991年）に記載がある。

10

今日では免疫によって内因性免疫グロブリン生産なしにヒト抗体の全レパートリーを作成することのできるトランスジェニック動物（たとえば、マウス）も生産できる。例えば、キメラおよび生殖系列突然変異マウスにおける抗体重鎖結合領域（J_H）遺伝子の同型接合欠失が内在性抗体生産の完全阻害を招くことが報告されている。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配置をそのような生殖系列突然変異マウスに移転すると抗原チャレンジに際してヒト抗体を生産を招くであろう。たとえばJakobovitsなど、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻：2551頁（1993年）；Jakobovitsなど、Nature、362巻：255～258頁（1993年）；Bruggemannなど、Year in Immunol.、7巻：33頁（1993年）参照

20

これとは別に、ファージディスプレイ（phage display）技術（McCaffertyなど、Nature、348巻：552～553頁〔1990年〕）もヒト抗体および抗体断片を試験管内で非免疫化ドナーからの免疫グロブリン可変ドメイン（V）遺伝子レパートリーから産生するため使用できる。この技術に従えば、抗体のVドメイン遺伝子を、たとえばM13またはfdのような繊維状バクテリオファージの主または微量コート蛋白質いずれかの遺伝子にフレーム内クローニングして、ファージ粒子表面上の機能的抗体断片として表示させる。繊維状粒子はファージゲノムの単鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能的性質に基づく選択はこれらの性質を示す抗体をコードする遺伝子の選択を招来する。こうしてファージはB細胞の性質をいくつか模倣することになる。ファージのディスプレイは種々の様式で行われる；これに関する綜説については、たとえばJohnson・Kevin・S.とChiswell, David・J.、Current Opinion in Structural Biology、3巻：564～571頁（1993年）を参照。V遺伝子セグメントの起源数種をファージディスプレイに使用できる。Clacksonなど、Nature、352巻：624～628頁（1991年）は免疫マウスの脾臓から誘導したV遺伝子の小ランダム組合せライブラリーから得た抗オキサゾロン抗体の多数のアレイを分離した。非免疫ヒトドナーからV遺伝子レパートリーを構築でき、そして抗原（自己抗原を含む）のアレイ多数に対する抗体を本質的には、Marksなど、J. Mol. Biol.、222巻：581～597頁（1991年）またはGriffithなど、EMBO・J.、12巻：725～734頁（1993年）が記載した技術に従って分離できる。

30

40

天然の免疫反応においては抗体遺伝子は高率で突然変異を蓄積する（体細胞高突然変異）。導入される変化のいくつかは高親和性を与え、高親和性表面免疫グロブリンを表示するB細胞は次の抗原チャレンジまでの間に優先的に複製され、分化する。この天然の過程を「連鎖シャッフリング」（Marksなど、Bio/Technology、10巻：779～783頁〔1992年〕）として知られる技術を採用して模倣できる。この方法ではファージディスプレイによって得られる〔プライマリー〕なヒト抗体の親和性を重鎖および軽鎖のV領域遺伝子を非免疫ドナーから得たVドメイン遺伝子の天然起源変異体（レパートリー）のレパートリーと逐次交換することによって改善できる。この技術でnM範囲の親和性を持つ抗体または抗体断片を産生できる。非常に大きいファージ抗体レパート

50

リーを作成する方策がWaterhouseなど、Nucleic Acids Res.、21巻：2265～2266頁（1993年）に記載されている。

ヒトの抗体が嚙歯類の抗体と類似の親和性および特異性を持っている時は、遺伝子シャッフリングを嚙歯類抗体からヒト抗体を誘導するためにも使用できる。「エピトープインプリント法（epitope imprinting）」とも呼ばれるこの方法に従えば、ファージディスプレイ技術によって得た嚙歯類抗体の重鎖または軽鎖のVドメイン遺伝子をヒトVドメイン遺伝子レパートリーと交換して嚙歯類-ヒトキメラを作成する。抗原についての選択で機能的抗原結合部位、すなわち結合相手選択を支配（imprint）するエピトープ、を復元できるヒト可変が分離される。この過程を反復して残りの嚙歯類ドメイン置換すると、ヒト抗体が得られる（1993年4月1日発行のPCT・WO93/06213）。従来のCDR移植による嚙歯類抗体のヒト化とは相違して、この技術は嚙歯類起源のフレームワークまたはCDR残基を持たない完全なヒト抗体を提供する。

10

(vi) 双特異性抗体

双特性抗体は好ましくはヒトのまたはヒト化モノクローナル抗体であって、抗原少なくとも2種に対する結合特性を持つ。本件の場合、結合特異性の一つはCHFに対するもので、他の一つは他のいずれかの抗原、好ましくはGH/サイトカイン受容体ファミリー構成員に結合する他のリガンド、に対する。例えば、CHFおよび神経栄養因子または異なる二型のCHFポリペプチドに特異的に結合する双特異性抗体は本発明の範囲内にある。

双特異性抗体の製法は当業界では公知である。伝統的に、双特異性抗体の組換え製造は重鎖2種が異なる特異性を持つ免疫グロブリン重鎖-軽鎖ペア2種の共発現に基づいている（MilsteinとCuello、Nature、305巻：537～539頁[1983年]）。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダムな分類の故に、これらハイブリドーマ（quadroma）は異なる抗体分子10種の混合物を生産する可能性があり、その中で1種のみが正しい双特異性構造を持つ。通常親和性クロマトグラフィー工程で行う正しい分子の精製はかなり面倒で、生成物の収率が低い。同様な操作法が1993年5月13日発行のWO93/08829およびTraunckerなど、EMBO・J.、10巻：3655～3659頁（1991年）に開示されている。

20

別の好ましい手法に従えば、所期の結合特異性（抗体-抗原結合部位）を持つ抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合する。この融合は、好ましくは少なくともヒンジ、CH2、およびCH3領域を包含する免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。軽鎖結合に必要な部位を含む重鎖第一定常領域（CH1）を融合物の一つに存在させることは好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物および、所望ならば、免疫グロブリン軽鎖、をコードするDNAを別の発現ベクターに挿入して適当な宿主生物中に共遺伝子移入する。これで構築で使用するポリペプチド3種の不均等な比率が最適収率を与える態様においてポリペプチド断片3種の相互比率を調製するために大きな柔軟性が提供される。しかしながら、ポリペプチド少なくとも2種の等比率産生が高収率を与える時または比率が別段の意味を持たない時には発現ベクターの一つへのポリペプチド鎖2種または全3種のコード配列を挿入することも可能である。この手法の好適な態様では、双特異性抗体は一方のアームに第一の結合特異性を持つハイブリッド免疫グロブリン重鎖および別のアームにハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖ペア（第2結合特異性を提供する）から構成される。この非対称構造は双特異性分子の半分だけにある免疫グロブリン軽鎖の存在が迅速な分離方法を提供するので、所期の双特異性化合物を望まない免疫グロブリン鎖結合物から分離し易くすることが見出されている。

30

40

双特異性抗体作製についてさらに詳細については、例えばSureshなど、Methods in Enzymol.、121巻：210頁（1986年）参照。

(vii) ヘテロ複合抗体

ヘテロ複合抗体も本発明の範囲内にある。ヘテロ複合抗体は共有結合的に結合した抗体2個から構成される。このような抗体は、例えば望まない細胞を免疫系細胞のターゲットにするため（米国特許第4676980）およびHIV感染症の処置のために（WO91/00360；WO92/00373；および欧州特許03089）提案されている。ヘテ

50

ロ複合抗体は好都合な交差結合法を使用して製造される。適当な交差結合剤は当業界でよく知られており、米国特許第4676980に多数の交差結合技術とともに開示されている。

5. C H F 抗体の使用

C H F 抗体はC H F に対する診断検定、たとえば特定の細胞、組織または血清中での生産など、において有用である。抗体は前記C H F におけると同じ様式で標識し、および／または不溶解性マトリックス上に固定化する。受容体結合検定法の一態様において、C H F 全部または選択したC H F 複数に結合する抗体組成物を不溶性マトリックスに固定化し、被験試料を固定化抗体組成物に接触させてC H F 全部を吸着し、次に固定化したC H F を予め決めたC H F に対して特異的であるように個々に別個の蛍光団その他のような独特の標識によって認識される各C H F に特異的な抗体複数と接触させる。各独特の標識の存在および／または量を決定することによって、各C H F の相対的比率および量を決定できる。

10

本発明の抗体は患者を受動的に免疫するためにも有用である。

C H F 抗体は組換え細胞培養物または天然起源からC H F を親和性精製するためにも有用である。ラットC H F と検出可能に交差反応しないC H F 抗体はC H F をこの蛋白質不含有まで精製できる。

C H F およびその抗体を診断的に検定する適当な方法それ自体はよく公知である。下記実施例に記載する候補C H F を試験してそれが肥大性、抗不整脈、筋変力作用または神経栄養活性を持つかどうかを見るための生物検定法に加えて、競合的、サンドウィッチおよび立体的阻害免疫検定技術も有用である。競合的およびサンドウィッチ法は相分離工程を方法の肝要な部分として採用し、一方では立体的阻害検定は単一反応混合物中で行う。検定すべき物質の分子量によってはある種の方法が好ましいが、基本的には同じ操作を使用してC H F およびC H F 結合性物質を検定する。それ故、抗原か抗体かの状態にかかわらずなく、ここに試験すべき物質を被分析物と称し、被分析物に結合する蛋白質は、それらが抗体、細胞表面受容体または抗原のいずれでも結合相手と名付ける。

20

C H F またはその抗体のに対する分析法は全て次の試薬1種またはそれ以上を使用する：標識被分析物類似体、固定化被分析物類似体、標識結合相手、固定化結合相手、および立体的複合体。標識した試薬は「トレーサー」とも呼ばれる。

使用する標識（これはプローブとして使用するためのC H F 核酸を標識するためにも有用である）は被分析物およびその結合相手との結合を妨害せずに検出を可能とする機能である。免疫検定で使用するための標識多数が公知で、その例には直接検出できる、たとえばフルオロクローム、化学発光、および放射能標識のようなもの、ならびに、たとえば検出のためには反応するか誘導されなければならない酵素のようなものを包含する。このような標識の例には放射性同位体元素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、¹³¹I；希土類キレートまたはフルオレッセインとその誘導体のような蛍光団；ロダミンとその誘導体；ダンシル；ウンベリフェロン；たとえばホタルおよび細菌ルシフェラーゼ（米国特許第4737456）；ルシフェリン；2，3-ジヒドロフタラジンジオン；マレエート脱水素酵素；ウレアーゼ；セイヨウワサビペルオキシダーゼ（H R P）のようなペルオキシダーゼ；アルカリホスファターゼ；β-ガラクトシダーゼ；グルコアミラーゼ；リゾチーム；たとえばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、グルコース-6-ホスフェート脱水素酵素のようなサッカライドオキシダーゼ；色素前駆体を酸化するために過酸化水素を使用する、たとえばH R P、ラクトペルオキシダーゼまたはマイクロペルオキシダーゼのような、酵素と共にウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼのようなヘテロ環オキシダーゼ；ビオチン／アビジン；スピン標識；バクテリオファージ標識；安定な遊離ラジカル；その他を包含する。

30

当業者は本発明に採用されうる適当な他の標識を知ることとなろう。C H F、その抗体または断片の結合は、当業者に普通に知られている標準的技術を使用して達成される。例えば、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビスイミデート、ビスジアゾ化ベンジジン、その他の結合試薬は前記の蛍光、化学発光および酵素標識でポリペプチドに目印

40

50

を付けるために使用しうる。例えば米国特許第3940457（蛍光分析）および第3645090（酵素）；Hunterなど、Nature、144巻：945頁（1962年）；Davidなど、Biochemistry、13巻：1014～1021頁（1974年）；Painなど、J. Immunol. Methods、40巻：219～230頁（1981年）；Nygren、J. Histochem. and Cytochem.、30巻：407～412頁（1982年）；O'Sullivanなど、「酵素免疫検定での使用のための酵素-抗体複合の製造法（Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay）」、J. J. LangoneとH. van Vunakis編「酵素学における方法（Methods in Enzymology）」、73巻中、147～166頁（Academic Press社、ニューヨーク、NY、1981年）；Kennedyなど、Clin. Chim. Acta、70巻：1～31頁（1976年）；およびSchursなど、Clin. Chim. Acta、81巻：1～40頁（1970年）を参照。最後の文献に記載の結合技術はグルタルアルデヒド法、過ヨード酸法、ジマレイミド法、およびm-マレイミドベンジル-N-ヒドロキシサクシンイミドエステル法である。

本発明の実施においては、酵素標識は好適な態様である。全ての着想可能な検定法での標識として使用するためにある一つの酵素が理想的であることはない。その代わり、特定の検定系にはどの酵素が適するかを決定しなければならない。酵素選択に重要な判断基準は純粋な酵素のターンオーバー数（単位時間毎に酵素当たり生成物に転換される基質分子の数）、酵素製品の純度、生成物検出感度、酵素反応検出の容易さと速度、試験液中妨害因子および酵素様活性の不在、酵素およびその複合の安定性、酵素とその複合体の入手可能性および経費、その他である。本発明の検定法における好適な標識として使用される酵素に包含されるものの中には、アルカリホスファターゼ、HRP、ペーターガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、マレー脱脱水素酵素、およびグルコース-6-ホスフェート脱水素酵素がある。ウレアーゼがさらに好適な酵素標識の中にあるのは、殊に容易にその活性が裸眼で見える発色団pH指示薬の故である。

ある種の検定法には試薬の固定化が必要である。固定化は結合相手を溶液内に遊離して溶存している被分析物から分離することを意図する。この便利さは結合相手または被分析物類似体のどちらかを検定操作の前に水不溶性のマトリックスまたは表面に吸着することにより（Bennichなど、米国特許第3720760）、共有結合することにより（例えば、グルタルアルデヒド交差結合を使用して）、または相手または類似体を後に、たとえば免疫沈降することによって不溶化することにより達成される。

別の検定法で競合的またはサンドウィッチ検定と呼ばれるものはよく確立されて商業的診断企業では広く使用されている。

競合的検定はトレーサー類似体が共通の結合相手にある限定された数の結合部位で被験試料被分析物と競合する性能に依存する。結合相手は一般に競合前または後に不溶化され次にその結合相手に結合したトレーサーと被分析物を非結合トレーサーおよび被分析物から分離する。この分離はデカンテーションにより（結合相手を予め不溶化した時）、または遠心分離により（結合相手を競合反応後に沈降した時）達成する。被験試料被分析物の量はマーカー物質の量により測定した結合トレーサーの量に対して逆比例する。被分析物既知量での用量-作用曲線を作製して試験結果と比較して被験試料内に存在する被分析物の量を定量的に決定する。マーカーとして検出可能な酵素を使用する時、これら検定法はELISA系と呼ばれる。

「均質（homogeneous）」検定と呼ばれる別種の競合的検定法は相分離を要しない。ここでは、酵素と被分析物との複合体を形成し、抗被分析物が被分析物に結合すると、抗被分析物の存在が酵素活性が変わるように使用する。この場合、CHFまたはその免疫学的に活性な断片を有機的双官能的架橋でペルオキシダーゼのような酵素に複合する。抗CHFの結合が標識の酵素活性を阻害または強化するようにして複合物を抗CHFと共に使用するよう選択する。この方法自体はEMITの名で広く実用されている。

立体的複合体は均質検定の立体障害法で使用する。この複合体はハプテンに対する抗体が抗被分析物と同時に複合体と結合することができないようにして、低分子量ハプテンを小さい被分析物と共有結合的に結合することによって合成する。この検定操作では被験試料中に存在する被分析物は抗被分析物と結合し、その際、抗ハプテンを複合体に結合して、たとえばハプテンが蛍光物質である時には蛍光の変化など、複合体ハプテンの性質を変化させる。

サンドウィッチ検定はC H FまたはC H F抗体の測定では、殊に有用である。逐次的なサンドウィッチ検定法において、固定化した結合相手を使用して被験試料被分析物を吸着し、被験試料を洗浄により除去し、結合した被分析物を使用して標識した合相手を吸着し、および結合した物質を次に残余のトレーサーから分離する。結合したトレーサー量は被験試料被分析物に直接的に比例する。「同時的」サンドウィッチ検定では、被験試料は標識した結合相手を添加する前には分離しない。抗C H Fモノクローナル抗体を抗体の一つとして、およびポリクローナル抗C H F抗体を他方として使用する逐次的サンドウィッチ検定はC H F活性について試験するために有用である。

以上は単なる例示的なC H Fおよび抗体の診断的検定法である。これらの被分析物の測定について現在または今後開発される他の方法は前記生物検定法を含めて本範囲内に包含する。

次の実施例は例示のために記載するものであって、限定のためではない。明細書中の引用文献は全て参考のために明示的に引用したものである。

実施例 I

C H Fの確認および試験管内活性

A. 発現クローニングした物質のための検定

肥大性について使用する検定法は、一般的には次の通りに記載される新生児ラット心臓肥大性の試験管内検定法である。：

1. 筋細胞懸濁液の調製

筋細胞懸濁液の製造はChienなど、J. Clin. Invest.、75巻：1770～1780頁（1985年）およびIwakiなど、前出に略記された方法に基づく。生後1～2日のSprague-Dawleyラット仔心臓から得た心室を取り、三分割した。細断した心室を一連のコラゲナーゼ処理により消化した。得られた単一細胞懸濁液を非連続的Percol勾配上で精製して95%純度の筋細胞懸濁液を得た。

2. 筋細胞のプレーティングおよび培養

発表されている筋細胞のプレーティングと培養方法2種は次の通り：（1）Longなど（前出）は細胞懸濁液をMEM/5%ウシ血清中で30分間、前プレーティングした。次に、付着しなかった筋細胞を、インスリン、トランスフェリン、BrdU、およびウシ血清アルブミン添加血清不含MEM中、35mm組織培養皿にmL当り 7.5×10^4 細胞の密度でプレーティングした。（2）Iwakiなど（前出）はD-MEM/199/5%ウマ血清/5%ウシ胎児血清中の細胞懸濁液を10cm組織培養皿にmL当り 3×10^5 細胞でプレーティングした。24時間培養後、細胞を洗浄して血清不含D-MEM/199中でインキュベーションした。

この発明では、小型検定での試験性能を増大するためにこれらの細胞をプレーティングし、培養するため異なるプロトコルを開発した。96ウェル組織培養プレートをD-MEM/F12/4%ウシ胎児血清と37℃で8時間プレコートする。この培地を去り、細胞懸濁液を内側のウェル60個中にインスリン、トランスフェリン、およびアプロチニン添加D-MEM/F-12の1mL当り 7.5×10^4 細胞でプレーティングする。この培地は典型的にはペニシリン/ストレプトマイシンのような抗生物質およびグルタミンを含有させる。この培地はこれら細胞を血清不含のこの低プレーティング密度で生存させる。細胞を24時間培養した後に、試験物質を直接ウェルに添加する。

3. 肥大性の読取り

アルファアドレナリン作動剤またはエンドテリンで刺激後、培養物中の新生児ラットの心筋層細胞は生体内での鬱血性心不全で見られる細胞サイズが増大することおよび個々の収

10

20

30

40

50

これに加えて96ウェルプレートから適量を取り、ANFまたはANPの放出のような反 10
応の蛋白質マーカー発現を監視した。

ポリ(A)⁺RNAを7日マウス肺様体から分離した(AvivとLeder、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、69巻:1408~1412頁[1972年]; Cathalaなど、DNA、2巻:329~335頁[1983年])。胚葉体は多能胚幹細胞(ES)の分化により形成される(Doetschmanなど、J. Embryol. Exp. Morphol.、87巻:27~45頁[1985年])。この胚幹細胞系列ES-D3(ATCC・CRL1934)をLIF(Williamsなど、Nature、336巻:684~687頁[1988年])を含む培地中では非分化状態に維持する。この培地はD-MEM(高グルコース)、1%グルタミン、0.1mM-2-メルカプトエタノール、ペニシリン-ストレプトマイシン、15%熱不活化ウシ胎児血清および15ng/mLマウスLIFを含有していた。これらの細胞をLIF不含で20%熱不活化ウシ胎児血清を含有する同じ培地中の懸濁培養液中に入れると(0日)、それらは凝集し、胚様体と呼ばれる多細胞構造に分化した。培養8日目までに搏動する原基心臓様構造を構造の一部に形成する。分化しつつあるES細胞を血清不含培地(D-MEM/F-12、1%グルタミン、ペニシリン-ストレプトマイシン、0.03%ウシ血清アルブミン添加)に変えて24時間蓄積させることによってこの胚様体をCHF活性の産生について評価した。検定の前に調整した培地を3-K限外濾過膜(Amicon)で10倍濃縮し、検定培地に対して透析した。3日目から開始して24時間調整した培地は肥大性スコア4.5~5.5を示し、6日目から開始すると5.5~7.5を示した。

5' - GCGGCCGCGAGCTCGAATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTT (配列番号5)

発現ライブラリーはポリ (A) ⁺ RNA 1 μg、ベクタープライマー 5 μg、および Amersham社の試薬を使用して構築した。第一および第二鎖合成および T4-DNAポリメラーゼ充填反応後、ゲル電気泳動によって 500 bp より大きい挿入について物質をサイジングし、リンカーを付加しない平滑末端連結法により環化した。連結物を使用して大腸菌 DH5α を電気穿孔法により形質転換した。ポリ (A) ⁺ RNA 1 μg から二重鎖 cDNA 499 ng を作成した。cDNA 17 ng を連結し、3.3 ng を形質転換して 780000 クローンを得たが、その 83 % が平均サイズ 1470 bp を持つ挿入物を持っていた。

50

遺伝子移入した。DNA 2 μ g を使用して6ウェル皿の ~ 200000 細胞に遺伝子移入した。細胞を血清不含検定培地 2 mL 中で4日間インキュベーションした。この培地は 100 mL の D-MEM/F-12、トランスフェリン 100 μ L (10 mg/mL) 100 μ L、インスリン (5 mg/mL) 20 μ L、アプロチニン (2 mg/mL) 50 μ L、pen/strep (JRH・Biosciences・No. 59602-77P) 1 mL、および L-グルタミン (200 mM) 1 mL から構成されていた。遺伝子移入および発現の効率はアルカリホスファターゼの分泌型を発現するプラスミドの DNA 0.2 μ g を加えて観察した (Tate など、FASEB・J.、4 巻: 227 $\sim$ 231 頁 [1990 年])。

各遺伝子移入プールからの調整培養培地 100 μ L を最終容積 200 μ L 中で肥大性について検定した。あるプールでは調整培地を検定前に Centricon・3・micro concentrators (商品名: Amicon 社) で 4 $\sim$ 5 倍濃縮した。1000 $\sim$ 15000 クローンの 19 プール、1000 $\sim$ 5800 クローンの 359 プール、および 75 $\sim$ 700 クローンの 723 プールを遺伝子移入し、肥大性活性を検定した。これらの 1172 プールの中で 2 個が陽性であった。プール 437 (187 クローンのプール) および プール 781 (700 クローンのプール) はスコア 4 を与えた。プール 437 からの純粋クローン (pchf. 437. 48 と命名) を徐々に減数する陽性プールのクローンを単一クローンが得られるまで反復する再遺伝子移入によって分離した。プール 781 からの純粋クローン (pchf. 781 と命名) はクローン pchf. 437. 48 からの挿入物へのコロニーハイブリッド形成法によって分離した。

クローン pchf. 781 の挿入物の配列は図 1 (配列番号 1、2、および 3: それぞれヌクレオチド鎖 2 個およびアミノ酸配列) に示す。クローン pchf. 437. 48 の挿入物の配列は塩基 27 (下線部分) から開始するクローン 781 に一致する。

クローン pchf. 781 の第一読み取り枠 (図 1 の翻訳参照) はアミノ酸 (MW = 21.5 kDa と翻訳される) 203 個の蛋白質をコードする。この蛋白質はシステイン残基 1 個および N-結合グリコシル化可能部位 1 個を営むが、親水性 N-末端分泌シグナル配列はない。クローン pchf. 781 の 3'-非翻訳領域は b1 (bp $\sim$ 895 $\sim$ 1015) と称される通常のマウス反復配列を包含する。7 日目の胚様体ポリ (A)⁺RNA とのクローン pchf. 781 からのプローブとのハイブリッド形成は $\sim$ 1.4 kb の単一バンドを示し、これは cDNA クローンからの挿入物のサイズが大体同じである。

コードされた配列は Dayhoff データベース中の既知蛋白質配列のいずれとも高度 (>35% アミノ酸同一性) な類似はない。しかしながら、これは、CNTF、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-11 (IL-11)、LIF および オンコスタチン M (OSM) (Bazan、Neuron、7 巻: 197 $\sim$ 208 頁 [1991 年]) を含む遠い関連性のある蛋白質のファミリーに対して程度の低い類似性を示す。マウス CHF はマウス LIF にアミノ酸同一性 24% を持ち (Rose と Todaro、WO 93/05169)、ヒト CNTF にアミノ酸同一性 21% (McDonald など、Biochim. Biophys. Acta、1090 巻: 70 $\sim$ 80 頁 [1991 年]) を持つ。マウス CHF とヒト CNTF との配列比較については図 2 参照。CNTF、IL-6、IL-11、LIF、および OSM は GH/サイトカイン受容体ファミリーに属する gp130 を含む関連受容体シグナル蛋白質を使用する (Kishimoto など、Cell、76 巻: 253 $\sim$ 262 頁 [1994 年])。CHF と同様に CNTF は N-末端分泌シグナル配列を持たない。

C. クローンの性質および活性

クローン pchf. 781 が CHF をコードすることを証明するために、293 細胞の遺伝子移入と試験管内 SP6 転写/翻訳結合系の使用との双方によって発現研究を行った。pchf. 781-遺伝子移入 293 細胞によって産生した蛋白質の³²S-メチオニンおよびシステイン標識 (ベクター遺伝子移入細胞と比較) は調整培地は約 21.8 kDa の標識蛋白質を含み、細胞抽出物は 22.5 kDa の蛋白質を示した。これら遺伝子移入からの調整培地は 1:4 の希釈率で前記検定法を使用する心臓肥大性についてスコア 6 を示

10

20

30

40

50

した。非標識遺伝子移入からの調整培地は1:1希釈率で形態学的スコア5.5~6.5を示した。

これら検定は心臓肥大性-ANP放出の第二測定も陽性であった。図3参照。この検定は¹²⁵I-ラットANPのラットANP受容体A-IgG融合蛋白質への結合についての競合の測定によって行った。この方法はCD4-IgG融合蛋白質を使用するgp120の測定(Chamowなど、Biochemistry、29巻:9885~9891頁[1990年])と類似している。略述すれば、マイクロタイタープレートの各ウェルをラット抗ヒトIgG抗体(2μg/mL)100μLで一夜4℃で被覆した。0.5%ウシ血清アルブミン添加磷酸塩緩衝食塩水で洗浄後、ウェルを3ng/mLラットANP受容体A-IgG100μL(ヒトANP受容体A-IgG(Bennettなど、J. Biol. Chem.、266巻:23060~23067頁[1991年])と同様な方法で製造し、精製したもの)と24℃で1時間インキュベーションした。ウェルを洗浄し、ラットANP標準品または試料50μLとともに24℃で1時間インキュベーションした。次に¹²⁵I-ラットANP(Amersham社)50μLを添加してさらに1時間インキュベーションした。ウェルを洗浄し、計数して結合競合の程度を測定した。試料中のANP濃度をラットANP標準曲数と比較して決定した。

クローンpchf.781のSP6-結合試験管内転写/翻訳(Promega社からの物質)で行った蛋白質の³⁵S-メチオニン標識は22.4kDaの標識蛋白質を示した。この標識翻訳生成物は1:200の希釈率で心臓肥大性検定で陽性(形態学的スコア5~6)であった。この22.4kDa標識バンドが肥大性活性の原因であることを証明するために、標識翻訳生成物を逆相C4カラム(Synchromapak・RO-4-4000)を10%アセトニトリル、0.1%TFA中で平衡させ、アセトニトリル勾配で溶離した。標識蛋白質のピークと肥大性活性のピークとはこのカラムから~55%アセトニトリルで同時に溶離した。

心臓筋細胞肥大性活性は既にラット心線維芽細胞から部分的に精製されて報告されている。Longなど、前出。さらに本明細書のCHFの性質を研究するため、ラット心線維芽細胞を培養した。初代培養からの調整培地は本発明の試験管内新生児ラット心臓肥大性検定で心臓肥大性活性を持つ。クローンpchf.781のコード領域断片でプローブ(ハイブリッド形成は5~SSC、20%ホルムアミド、42℃で最終洗浄は0.2×SSC、50℃)した時、これら培養物から分離したラット線維芽細胞mRNAのプロットハイブリッド形成では1.4kbに明瞭なバンドを示した。

D. 因子の精製

クローンpchf.781またはヒトのクローンで遺伝子移入した細胞によって調整した培養培地を1.5M-NaClに調節し、Toyopearl(商品名)Butyl-650Mカラムに入れる。このカラムを10mM-TRIS-HCl、pH7.5、1M-NaClで洗浄し、10mM-TRIS-HCl、pH7.5、10mM-Zwittergent(商品名)3-10で活性を溶離する。活性のピークを150mM-NaCl、pH8.0に調節し、MONO-Q・Fast・Flowカラムに入れる。このカラムを10mM-TRIS-HCl、pH8.0、150mM-NaCl、0.1%オクチルグルコシドで洗浄すると、活性は流過画分に見出される。次に活性物質を0.1%TFA、10%アセトニトリル中の逆相C4カラムに入れ、0.1%TFAから80%までの勾配で溶離する。活性はゲル濾過カラム上で約15~30kDaに分画される。分別と回収のためにはグアニジン-HClのようなカオトロブ剤が必要であると予期される。

実施例 I I

生体内肥大活性試験

A. 正常ラット

実施例 I の精製CHFがたとえば血圧、心拍数、全身血管抵抗、収縮性、心拍力、集中または遅延肥大、左心室収縮期圧、左心室平均圧、左心室拡張終期圧、心拍出量、拍動係数、組織学的パラメーター、心室サイズ、壁圧、その他のような循環器パラメーターに及ぼす効果を正常ラットで観察するために試験する。

10

20

30

40

50

B. 圧過負荷マウスモデル

精製CHFを肺動脈を狭窄して右心室不全を起こした圧過負荷マウスモデルでも試験する。

C. RVネズミ機能不全モデル

心室機能不全のレトロウイルスマウスモデルを精製CHFを試験するために使用でき、dP/dt、駆出率および容量を前記肥大性検定法で検定できる。このモデルでは、マウスの肺動脈を狭窄して肺肥大および肺不全を作成する。

D. トランスジェニックマウスモデル

筋肉アクチンプロモーター-I GF-I 融合遺伝子を持つトランスジェニックマウスは筋障害または心不全の兆候なしに心筋および骨格筋の肥大を示す。さらに、I GF-I 遺伝子標的マウスは心室筋肉収縮蛋白質遺伝子の顕著な発現低下を含む心臓（ならびに骨格）筋肉発生欠陥を示す。これらモデル2種で精製CHFを試験する。

この他に壊死を伴わない拡張心筋障害および心機能障害の遺伝子起因モデルをトランスジェニックおよび遺伝子標的マウス（MLC-rasマウス；異型接合I GF-I-欠損マウスの大動脈バンディング）で開発できる。

E. ラットの心筋梗塞後モデル

ナトリウム利尿ペプチド産生においてヒト鬱血性心不全の予報であるラットの心筋梗塞後モデルで精製CHFを試験する。特定的には雄性Sprague-Dawleyラット（Charles・River・Breeding・Laboratories社、8週齢）を術前少なくとも1週間装置に順化する。ラットは粒状のラット餌および水を自由摂取させ、明るい温度制御室内で飼育する。

1. 冠状動脈結紮

心筋梗塞をGreenenなど、J. Appl. Physiol.、91巻：92～96頁（1987年）およびButtrickなど、Am. J. Physiol.、260巻：11473～11479頁（1991年）に記載のようにして左冠状動脈の結紮により発生させる。ラットをペントバルビタールナトリウム（60mg/kg、腹腔内）で麻酔し、気管切開で挿管し、人工呼吸器（Harvard・Apparatus社、モデル683）で通気する。左側開胸後、左冠状動脈の根元から約2mmのところを7-0絹縫合糸で結紮する。シャム動物に縫合糸を冠状動脈の下を通過させ、次に除去する以外は同じ操作を行う。ラットは全て米国心臓協会によって1984年11月11日に採用された「研究用動物の使用に関する米国心臓協会の立場」に準拠して取扱う。結紮の4から6週後、ラットの心筋梗塞は心不全まで進行する。

臨床的患者では、心筋梗塞または冠状動脈疾患は心不全の最も普通の原因である。このモデルにおける鬱血性心不全はヒトの患者多数における鬱血性心不全に合理的に類似している。

2. 心電図

術後1週間目に、梗塞の進行を記録するために軽度のメトファン麻酔下に心電図を取る。この研究の結紮ラットを前胸部導線を通る病的Q波の深さと持続に従ってサブグループに群分けする。Buttrickなど、前出；Klonerなど、Am. Heart・J.、51巻：1009～1013頁（1983年）。これで梗塞寸法の大体の推測値を与え、大小の梗塞の分布がCHFまたはCHF拮抗剤および基剤で処置した結紮ラットの間で相違しないことを保証する。精密な梗塞サイズ測定で確認する。

3. CHFまたはCHF拮抗剤の投与

術後4週間目に、CHFまたはCHF拮抗剤（10μg/kgから10mg/kg、1日2回、15日間）または食塩水基剤を結紮ラットおよびシャム対照に皮下注射する。処置の間、1週2回体重を測定する。CHFまたはCHF拮抗剤は基剤としての食塩水または水に溶かして投与する。

4. カテーテル装着

CHF、CHF拮抗剤、または基剤で13日間処置後、ラットをペントバルビタールナトリウム（50mg/kg、腹腔内）で麻酔する。カテーテル（PE50と結合したPE1

10

20

30

40

50

0) にヘパリン-食塩水溶液 (50/U/mL) を満たし、右大腿動脈を通して動脈圧および心拍数を測定するために腹部大動脈に入れる。第2のカテーテル (PE50) を右頸静脈を通して右心房圧の測定および食塩水注入のために右心房に挿入する。左心室圧および収縮性 (dP/dt) 測定のために、第3カテーテル (PE50) を右頸動脈を通して左心室に挿入する。温度希釈法による心排出量測定のために、サーミスターカテーテル (Lyons Medical Instrument 社、Sylmar, CA) を大動脈弓に挿入する。全カテーテルを頸の後ろで皮下を通るステンレス鋼線でまとめて、次に固定する。カテーテル挿入に続いて、ラット全部を個室に入れる。

5. 血行力学的測定

カテーテル装着1日後、サーミスターカテーテルをマイクロコンピューター系 (Lyons Medical Instrument 社) で操作して心排出量を測定し、他のカテーテル3個をGrass Model 7 ポリグラフ (Grass Instrument 社、クインシー、MA) を装着したCP-10型圧力伝達器 (Century Technology 社、クインシー、MA) に連結する。平均動脈圧 (MAP)、心収縮期圧 (SAP)、心拍数 (HR)、右心房圧 (RAP)、左心室収縮期圧 (LVSP)、左心室平均圧 (LVMP)、左心室拡張後期圧 (LVEP)、および左心室最高 (dP/dt) を意識下の非拘束ラットで測定する。

心排出量の測定には室温で等張食塩水0.1 mLを頸静脈カテーテルを通して一時に注入する。温度希釈曲線をVR-16 simultaneous 記録器 (Honeywell 社、NY) で監視、心排出量 (CO) 計数値をマイクロコンピューターによって得る。拍動容積 (SV) = CO/HR ; 心指数 (CI) = CO/BW ; 全身血管抵抗 (SVR) = MAP/CI 。

これらの血行力学的パラメーターの測定後、血液1 mLを動脈カテーテルを通して採取する。血清を分離し、 -70°C で貯蔵してCHF濃度および所望ならば種々の生化学的パラメーターを測定する。

この実験の最後にラットをペントバルビタールナトリウム (60 mg/kg) で麻酔し、KCl (1M) の心房内注射により心臓を拡張期で停止させる。心臓を取出し、心室から心房と大管を切取る。心室を重量測定して10%緩衝ホルマリン中に固定する。

実験操作は全部研究開始前にGenentech社の実験動物管理および使用委員会の承認を受ける。

6. 梗塞寸法の測定

右心室の壁を左心室から切離す。左心室を頂部から底部に向けて4つに分断する。5 μm 切片を取り、Massonのトリクローム染剤で染色して装着する。梗塞および非梗塞左心室の心内膜および心外膜の周縁をDigital Image Analyzerのプランイメーターで測定する。スライス全4個の梗塞した周縁および左心室周縁を心外膜および心内膜表面各々別々に集計し、合計値を各表面について梗塞した周縁の左心室周縁に対する比率として表示する。

これら比率2個を平均して梗塞サイズ百分率として表示する。

7. 統計的分析

結果は平均値±標準誤差として表現する。変動の二元および一元分析 (ANOVA) を行って群間でのパラメーターにおける相違を評価する。次に差の有意性をNewman-Keuls法を使用してpost-hoc分析する。

$p < 0.05$ を有意とする。

8. 結果

CHFまたはCHF拮抗剤または基剤で処置する前および後の平均体重は実験群の間で相違するとは期待されない。結紮ラットの梗塞寸法は基剤処置群とCHFまたはCHF拮抗剤処置群との間で異なるとは期待されない。

結紮ラットに対するCHFまたはCHF拮抗剤の前記用量における投与は基剤処置シャム対照と結紮ラット対照とで観察されるものよりも心室収縮の増大と末梢血管抵抗の低下によって心臓肥大を改善すると期待される。この期待される結果はCHFまたはCHF拮抗

10

20

30

40

50

剤の投与は鬱血性心不全での心機能を改善することを証明する。しかしながら、シャムラットではCHFまたはCHF拮抗剤投与はおそらく動脈圧および末梢血管抵抗をわずかに低下させる以外はこの用量では心機能を有意に変化させるとは期待されない。

本明細書のラットのデータはウマ、ウシ、ヒト、その他の哺乳類に認められた獣医学的および臨床的手法に従って哺乳類の体重について補正すれば外挿しうるものと期待するのは合理的である。標準的実験計画および手法を使用して、獣医または臨床医は処置すべき哺乳類に最高の効果を達成するためにCHFまたはCHF拮抗剤の用量、投与の計画および形態を調節することができる。ヒトもこの方式で反応するものと信じられる。

実施例 I I I

拡張心筋症の臨床処置案

10

A. 処置方針

CHFまたはCHF拮抗剤初期用量10～150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の患者自己投与を提案する。副作用があれば用量を削減する。再評価時に有益な結果がなくて限定する副作用がなければ、用量を増加する。同時的投薬（たとえばACE阻害剤としてのカプトプリルおよび利尿剤）は研究医師の裁量により調節する。最大用量を8週間投与後、CHFまたはCHF拮抗剤の投与を停止し、類似の無処理期間後（またはプラセボ）に再評価を行う。

B. 編入判断基準

もし次の判断基準に適合すれば患者を考慮の対照とする：

－拡張心筋症（DCM）。コントラスト心室造影術または2D超音波心臓検査術で左心室（LV）の無動症／運動障害の孤立領域を含まない突発性DCM、または虚血性DCM。
LV拡張終期ディメンジョン（EDD） $> 3.2\text{ cm}/\text{m}^2$ BSAまたは2D超音波心臓検査法でEDV $> 82\text{ mL}/\text{m}^2$ 、超音波心臓検査法でLVの部分的短縮 $< 28\%$ 、または排出率（コントラスト心室造影または放射核種血管造影） < 0.49 を含む収縮期機能障害の証拠。

20

－兆候。ジゴキシン、利尿剤および血管拡張剤（ACE阻害剤）に少なくとも1ヶ月安定なニューヨーク心臓協会のIII級または最高運動 $\text{VO}_2 16\text{ mL}/\text{kg}/\text{分}$ （年齢で調整）。

－現在ACE阻害剤治療中。

－左心室容積と重量を推測できる適当な超音波心臓検査の「ウインドウ」。

－投与計画に従ってCHFまたはCHF拮抗剤を自己投与し、信頼性をもって追跡評価のために戻ってくる能力。

30

－患者およびその初診医師の参加への同意。

－除外判断基準適合の不在。

C. 除外判断基準

次のいずれかの理由があれば患者を考慮の対照から除外する。

－心臓弁疾患に由来する拡張心筋症（手術可否にかかわらない）、特定の処置可能病因（脱離が試みられていないアルコールを含む）、または手術可能な冠状動脈疾患。

－特定の腰痛または閉塞性末梢性血管症による運動制限。

－慢性閉塞性肺疾患。

－糖尿病またはグルコース許容性の障害。

40

－手根トンネル症候群の症歴、または検査でのティネル徴候陽性の証拠。

－腎臓結石の病歴。

－変形性関節症の徴候。

－侵襲性の血行力学的監視を伴う一連の自転車エルゴメトリー（下記のような）への同意または参加の不能。

－活性な悪性腫瘍。

D. 患者評価

1) 主な評価点；ベースライン；ピーク後安定なCHFまたはCHF拮抗剤用量を8週間継続；投与停止後のアフターイコール期。

－患者は実際の処理開始後2日から3日入院させ、毎日体重および電解質、燐、BUN、

50

クレアチニン、およびグルコースを含む試験データを採集することになる。これに続いて臨床検査センターの階でさらに2日か3日毎日観察を受ける。

i. 体力測定。

ii. 徴候評価点数 (Kelly など、Amer. Heart・J.、119 巻: 111 1 頁 [1990 年])。

iii. 臨床検査項目: CBC; 電解質 (Mg^{+2} および Ca^{+2} を含む); BUN: クレアチニン; 磷; 空腹時グルコースおよび脂質特性 (全コレステロール、HDL-C、LDL-C、トリグリセリド); 肝機能検査 (AST、ALT、アルカリフォスファターゼ、全ビリルビン); 全蛋白質; アルブミン; 尿酸; および CHF。

iv. 2D、M-モード、およびドップラー超音波心臓検査: 乳頭筋の水準における拡張期および収縮期のディメンション; 先端2室および4室視点からの面積測定で評価した拍出率測定値、Simpson 則の方法による収縮期および拡張期推測容積、および推測上の左心室量; 僧帽弁流入特性 (IVRT、ピークE、ピークA、徐脈時間、A波時間)、および肺静脈流動プロファイル (収縮期流動面積、拡張期流動面積、逆時間、および速度) のドップラー評価; を含む。

v. 休息および運動時血行力学および経皮挿入した肺動脈および動脈カテーテルでの自転車エルゴメトリーを使用する酸素消費測定。感知した運動水準を Borg スケールで記録し、肺動脈の収縮期、拡張期および平均圧ならびに動脈圧および肺毛細管ウェッジ圧を運動負荷の段階毎に、動脈および混合静脈酸素含有量とともに測定して心排出量を算出する。

vi. 脂肪および脂肪のない身体量ならびに骨格筋強度と持久力の評価。

2) 中間評価点: 毎週

i. 体力測定。

ii. 徴候点のスコア。

iii. 臨床検査データ: 電解質、BUN、クレアチニン、磷、空腹時グルコース、ソマトメジン-C、および CHF。

E. 可能性のある利点

1) 満足状態感覚の改善。

2) 運動許容の増加。

3) 筋力および脂肪のない身体量の増加。

4) 全身血管抵抗の減少。

5) 心臓性能の強化。

6) 相補的心筋肥大の強化。

実施例 IV

試験管内神経栄養活性の試験

毛様体神経節神経栄養活性用の検定を Leung、Neuron、8 巻、1045~1053 頁 (1992 年) にしたがって実行した。略述すれば、E7-E8 ニワトリ胚から毛様体神経節を切離し、トリプシン-EDTA (Gibco・15400-013) で分離し、磷酸緩衝食塩水中で 37°C で 15 分間 10 倍に希釈した。神経節をトリプシン不含になるまで生育培地 (10% ウシ胎児血清、1.5 mM-グルタミン、ペニシリン 100 μ g/mL、およびストレプトマイシン 100 μ g/mL 添加高グルコース D-MEM) で 3 回洗浄し、次に生育培地 1 mL 中で緩やかにかきまぜて単細胞懸濁液とした。生育培地 5 mL 中のこの細胞混合物を 100 mm 組織培養皿上にプレーティングし、37°C で 4 時間組織培養インキュベーターに置いてニューロンを濃縮した。この間に非ニューロン細胞は優先的に皿に付着し、インキュベーション終期にはニューロンは緩やかに洗浄される。

濃縮されたニューロンを次に予めコラーゲンで被覆した 96 ウェルプレートにプレーティングした。各ウェルに細胞 1000 から 2000 個を入れ、実施例 I の pchf. 781-遺伝子移入 293 細胞からの調整培地で希釈して最終容積 100 から 250 μ L とした。細胞を対照としての遺伝子移入 293 調整培地とともに、および比較としての CNTF

10

20

30

40

50

標準とともに入れた。37℃で2～4日間のインキュベーション後に、生体色素メタロチオネイン(MTT)を使用して生存細胞を染色して生存細胞数を評価した。MTT(Sigma・M2128)5mg/mLの5分の1容をウェルに添加した。37℃で2～4時間インキュベーション後に、生存細胞(濃紫色沈降物で満ちている)を100×の位相差顕微鏡で計数した。

この検定結果を図4に示す。pchf.781遺伝子移入(三角)は遺伝子移入293調整培地の検定容積の逆数の増加と共にニューロンの生存(細胞数で測定)を増加することを認識できる。これはCNTF標準(円)のパターンと類似し、調整培地の検定容積の関数としては生存数の増加を示さない対照遺伝子移入(四角)とは対照的である。これはCHFはCNTFで観察されるものと同様な効果を持ち、神経栄養剤として有用であることを示す。

10

実施例V

ヒトCHF(ヒトのカルジオトロフィン-1[CT-1]とも呼ばれる)をコードするmRNAの源泉をマウスCHF・cDNAクローンからのプローブで成人組織数種からポリ(A)+RNAを検索して確認した。心臓、骨格筋、結腸、卵巣、および前立腺は20%ホルムアミド、5×SSC、42℃で180bpのマウスCHFプローブ(19bp5'の開始ATGからアミノ酸50まで)でブロットハイブリッド形成させ、0.25×SSC、52℃で最終洗浄すると1.8kbバンドを示した。同じプローブおよび条件(最終洗浄55℃)でヒト心臓cDNAライブラリー(Clontech社)を検索することによってヒトのCT-1をコードするクローンを分離した。

20

クローン11個を100万個から選択した。このクローン数種のEcoRI挿入物をプラスミドベクターにサブクローニングし、そのDNA配列を決定した。

クローンh5からのDNA配列(配列番号6および配列番号7:センスおよびアンチセンス鎖)を図5に示すが、これはコード領域全部を包含する。クローンh5(pBSSK+.hu.CT1.h5)は1994年7月26日にAmerican·Type·Culture·CollectionにATCC第75841として寄託された。h6と命名された他のクローンのDNA配列はクローンh5のものと重複領域内では一致した。クローンh6はクローンh5の塩基47から始まり、さらにクローンh5の3'に521塩基まで伸長する。図6から明らかなように、ヒトCT-1(配列番号8)のコードする蛋白質に配列はマウスCHF配列(配列番号3)に79%同一であって、前者を「humct1」、後者を「pchf.781」と命名する。

30

クローンh5がコードするヒトCT-1が、生物学的に活性であることを証明するために、EcoRI断片を哺乳類発現ベクターpRK5(欧州特許307247)の独特なEcoRI部位にクローニングしてプラスミドpRK5.hu.CT1を得た。このプラスミドをヒト293細胞に遺伝子移入し、細胞を血清不含培地に3～4日間維持した。この培地を次に心臓筋細胞肥大性に対してマウスCHFについて前記したようにして検定した。遺伝子移入した293調整培地はこの検定で明らかに活性であった(1:20希釈で肥大性スコア5.5)。

材料の寄託

次のプラスミドをAmerican·Type·Culture·Collection、12301·Parklawn·Drive・ロックビル、MD、米国(ATCC)に寄託した。

40

プラスミド

ATCC寄託番号

寄託日

pBSSK+.hu.CT1.h5 75841 1994年7月26日

この寄託は特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規定およびその下にある諸規則(ブダペスト条約)に従って行われた。これは寄託物の増殖可能培養物の維持を寄託日から30年間保証する。この寄託物は関連する米国特許の発行または米国または外国特許の公開のいずれか早い方が行われた後には、ATCCはブダペスト条約の規定およびGenentech社とATCCとの契約の下に寄託物培養物の子孫につい

50

て公共に対する永続的な無限定な入手可能性を保証し、米国特許法 1 2 2 条および特許商標庁長官の規則（米国特許庁公報 8 8 6 巻 6 3 8 項を参照する 3 7 C F R 1 . 1 4 条を含む）に従って米国特許商標庁長官が決定する者に対する寄託物の子孫の入手可能性を保証する。

本出願の譲受者はもし寄託したプラスミドの培養物が適当な条件下に培養した時に死滅するか、紛失するか破壊されたら、通告があればプラスミドを同じプラスミドの別物と迅速に交換することに合意している。寄託プラスミドの入手可能性を各政府がその特許法による権限で与える権利を侵害する本発明の実施を承諾するものと理解してはならない。

前記明細書は当業者に本発明を実施させるに十分であると考ええるものである。寄託した態様は本発明のある側面の単なる一例示であり、機能的に均等な構築物はいずれもこの発明の範囲内にあることが意図されているので、本発明は寄託された構築物による範囲に限定されるものではない。本材料を寄託したことは本明細書記載がその最適態様を含む本発明のいずれかの側面を実施するために不適当であるとの告白を構成するものではなく、またそれが提示する特定の例示に請求項の範囲を限定すると理解してはならない。実際、本開示および記載に加えて当業者にとって本発明の種々の修飾は前記記載から明白であり、本発明の種々の修飾は添付する請求項の範囲内に入るものである。

配 列 表

(1) 一般的情報：

(i) 出願人：

(A) ジェネンテック・インコーポレイテッド

(ii) 発明の名称：カルジオトロフィンおよびその使用

(iii) 配列の数：8

(iv) 連絡先：

(A) 宛名：ジェネンテック・インコーポレイテッド

(B) 通り：ポイント・サン・ブルーノ・ブルバード 4 6 0 番

(C) 市：サウス・サン・フランシスコ

(D) 州：カリフォルニア

(E) 国：アメリカ合衆国

(F) Z I P：9 4 0 8 0

(v) コンピューター解読書式：

(A) 媒体型：5 . 2 5 インチ，3 6 0 Kb フロッピーディスク

(B) コンピューター：I B M P C 適合

(C) オペレーティング・システム：P C - D O S / M S - D O S

(D) ソフトウェア：patin(ジェネンテック)

(vi) 本出願のデータ：

(A) 出願番号：

(B) 出願日：

(C) 分類：

(vii) 優先権主張出願のデータ：

(A) 出願番号：0 8 / 2 3 3 6 0 9

(B) 出願日：1 9 9 4 年 4 月 2 5 日

(viii) 弁理士／代理人情報

(A) 氏名：ハサク，ジャネット・イー

(B) 登録番号：2 8 , 6 1 6

(C) 参照／整理番号：8 9 4 P 1 P C T

(ix) 電話連絡先情報：

(A) 電話番号：4 1 5 / 2 2 5 - 1 8 9 6

(B) ファックス番号：4 1 5 / 9 5 2 - 9 8 8 1

(C) テレックス：9 1 0 / 3 7 1 - 7 1 6 8

(2) 配列番号 1 の情報：

- (i) 配列の特徴：
- (A) 長さ：1 3 5 2 塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (xi) 配列：配列番号 1：

GGATAAGCCT GGGGCCAGCA TGAGCCAGAG GGAGGGAAGT CTGGAAGACC 50
 ACCAGACTGA CTCCTCAATC TCATTCTAC CCCATTTGGA GGCCAAGATC 100
 CGCCAGACAC ACAACCTTGC CCGCCTCCTG ACCAAATATG CAGAACAAC 150
 TCTGGAGGAA TACGTGCAGC AACAGGGAGA GCCCTTTGGG CTGCCGGGCT 200
 TCTCACCACC GCGGCTGCCG CTGGCCGGCC TGAGTGGCCC GGCTCCGAGC 250
 CATGCAGGGC TACCGGTGTC CGAGCGGCTG CGGCAGGATG CAGCCGCCCT 300
 GAGTGTGCTG CCCGCGCTGT TGGATGCCGT CCGCCGCCGC CAGGCGGAGC 350
 TGAACCCGCG CGCCCCGCGC CTGCTGCGGA GCCTGGAGGA CGCAGCCCGC 400
 CAGGTTCGGG CCCTGGGCGC CGCGGTGGAG ACAGTGCTGG CCGCGCTGGG 450
 CGCTGCAGCC CGCGGGCCCG GGCCAGAGCC CGTCACCGTC GCCACCCTCT 500
 TCACGGCCAA CAGCACTGCA GGCATCTTCT CAGCCAAGGT GCTGGGGTTC 550
 CACGTGTGCG GCCTCTATGG CGAGTGGGTG AGCCGCACAG AGGGCGACCT 600
 GGGCCAGCTG GTGCCAGGGG GCGTCGCCTG AGAGTGAATA CTTTTTCTTG 650
 TAAGCTCGCT CTGTCTCGCC TCTTTGGCTT CAAATTTTCT GTCTCTCCAT 700
 CTGTGTCTG TGTGTTCTTG GGCTGTCCCT ATCTTTCTGC ATTTGTGTGG 750
 TCTCTCTCTT CTGCTCTCCT CTCTGCAGGG AGCTTCTTTT TTCCAACAGT 800
 TTCTCGTTTT GTCTCTCTCC AGTCTTGAAC ACTTTTGTCT CCGAGAGGTC 850
 TCTTTTGTG TCCTGTCTC TTGGTTCTTT CTTTGCTTG TGTGCTGCTT 900
 GCTTGCTTGT TGTGAGACA GGGTCTCACC ATATAGCTCT GGATGGCCTG 950
 GAACTTGCTA TGTAGGCCAG GCTGGCCTCC AGCTCATAGA GATCCACTTG 1000
 CCTCCGACTC CCAATTTCCC CATCTGTCTC CCTGTGATCC ATATGGGTAT 1050
 GTGTAACCTT TACTTTGTCT CATGGAGGTG ACAATTTTTC TCCCTTCAGT 1100
 TTCTTTGTTT TTTACTGACC AGAAAAGTGC CTAATTGTCC CCTGGTGGCA 1150
 AGGCCATTCA CCTTAGGACC TTCCCACCAG TTCCTTTGTA GGCAAAATCCC 1200
 TCCCCCTTG AGGTCCTTCC CTTTCATACC GCCCTAGGCT GGTCAATGGA 1250
 GAGAGAAAGG CAGAAAAACA TCTTTAAAGA GTTTTATTTG AGAATAAATT 1300
 AATTTTGTG AATAAAATGT TTAACAATAA AACTAACTT TTATGAAAAA 1350

AA 1352

(2) 配列番号2の情報:

10

20

30

40

50

- (i) 配列の特徴：
- (A) 長さ：1 3 5 2 塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (xi) 配列：配列番号 2：

CCTATTCGGA CCCCGGTCTG ACTCGGTCTC CCTCCCTTCA GACCTTCTGG 50
TGGTCTGACT GAGGAGTTAG AGTAAGGATG GGGTAAACCT CCGGTTCTAG 100
GCGGTCTGTG TGTGGAACG GGC GGAGGAC TGGTTTATAC GTCTTGTTGA 150
AGACCTCCTT ATGCACGTCG TTGTCCCTCT CGGGAAACCC GACGGCCCGA 200
AGAGTGGTGG CGCCGACGGC GACCGGCCGG ACTCACC GGG CCGAGGCTCG 250
GTACGTCCCG ATGGCCACAG GCTCGCCGAC GCCGTCCTAC GTCGGCGGGA 300
CTCACACGAC GGGCGCGACA ACCTACGGCA GGC GGCGGCG GTCCGCCTCG 350
ACTTGGGCGC GCGGGGCGCG GACGACGCCT CGGACCTCCT GCGTCGGGCG 400
GTCCAAGCCC GGGACCCGCG GCGCCACCTC TGTACGACC GGC GCGACCC 450
GCGACGTCGG GCGCCCGGGC CCGGTCTCGG GCAGTGGCAG CCGTGGGAGA 500
AGTGCCGGTT GTCGTGACGT CCGTAGAAGA GTCGGTTCCA CGACCCCAAG 550
GTGCACACGC CGGAGATACC GCTCACCAC TCGGCGTGTC TCCCCTGGA 600
CCCGGTCGAC CACGGTCCCC CGCAGCGGAC TCTCACTTAT GAAAAAGAAC 650
ATTCGAGCGA GACAGAGCGG AGAAACCGAA GTTTAAAAGA CAGAGAGGTA 700
GACACAGGAC ACACAAGAAC CCGACAGGGA TAGAAAGACG TAAACACACC 750
AGAGAGAGAA GACGAGAGGA GAGACGTCCC TCGAAGAAAA AAGGTTGTCA 800
AAGAGCAAAA CAGAGAGAGG TCAGAACTTG TGA AACAGA GGCTCTCCAG 850
AGAAAAACAA AGGAACAGAG AACCAAGAAA GAAACGAACG AACGAACGAA 900
CGAACGAACA ACAACTCTGT CCCAGAGTGG TATATCGAGA CCTACCGGAC 950
CTTGAACGAT ACATCCGGTC CGACCGGAGG TCGAGTATCT CTAGGTGAAC 1000
GGAGGCTGAG GGTAAAGGG GTAGACAGAG GGACACTAGG TATACCCATA 1050
CACATTGGGA ATGAAACAGA GTACCTCCAC TGTAAAAAG AGGGAAGTCA 1100
AAGAAACAAG AAATGACTGG TCTTTTCACG GATGAACAGG GGACCACCGT 1150
TCCGGTAAGT GGAATCCTGG AAGGGTGGTC AAGGAAACAT CCGTTTAGGG 1200
AGGGGGAAC TCCAGGAAGG GAAAGTATGG CGGGATCCGA CCAGTTACCT 1250
CTCTCTTTCC GTCTTTTGT AGAAATTCT CAAAATAAAC TCTTATTAA 1300
TTAAAAACAT TTATTTTACA AATTGTTATT TTGATTGAA AATACTTTTT 1350
TT 1352

(2) 配列番号3の情報:

10

20

30

40

50

- (i) 配列の特徴：
- (A) 長さ：203 アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (xi) 配列：配列番号3：

Met Ser Gln Arg Glu Gly Ser Leu Glu Asp His Gln Thr Asp Ser
 1 5 10 15

Ser Ile Ser Phe Leu Pro His Leu Glu Ala Lys Ile Arg Gln Thr
 20 25 30

His Asn Leu Ala Arg Leu Leu Thr Lys Tyr Ala Glu Gln Leu Leu
 35 40 45

Glu Glu Tyr Val Gln Gln Gln Gly Glu Pro Phe Gly Leu Pro Gly
 50 55 60

Phe Ser Pro Pro Arg Leu Pro Leu Ala Gly Leu Ser Gly Pro Ala
 65 70 75

Pro Ser His Ala Gly Leu Pro Val Ser Glu Arg Leu Arg Gln Asp
 80 85 90

Ala Ala Ala Leu Ser Val Leu Pro Ala Leu Leu Asp Ala Val Arg
 95 100 105

Arg Arg Gln Ala Glu Leu Asn Pro Arg Ala Pro Arg Leu Leu Arg
 110 115 120

Ser Leu Glu Asp Ala Ala Arg Gln Val Arg Ala Leu Gly Ala Ala
 125 130 135

Val Glu Thr Val Leu Ala Ala Leu Gly Ala Ala Ala Arg Gly Pro
 140 145 150

10

20

30

40

Gly Pro Glu Pro Val Thr Val Ala Thr Leu Phe Thr Ala Asn Ser

155

160

165

Thr Ala Gly Ile Phe Ser Ala Lys Val Leu Gly Phe His Val Cys

170

175

180

10

Gly Leu Tyr Gly Glu Trp Val Ser Arg Thr Glu Gly Asp Leu Gly

185

190

195

Gln Leu Val Pro Gly Gly Val Ala

200

203

(2) 配列番号4の情報:

20

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 200 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号4:

Met Ala Phe Thr Glu His Ser Pro Leu Thr Pro His Arg Arg Asp

1

5

10

15

30

Leu Cys Ser Arg Ser Ile Trp Leu Ala Arg Lys Ile Arg Ser Asp

20

25

30

Leu Thr Ala Leu Thr Glu Ser Tyr Val Lys His Gln Gly Leu Asn

35

40

45

Lys Asn Ile Asn Leu Asp Ser Ala Asp Gly Met Pro Val Ala Ser

50 55 60

Thr Asp Gln Trp Ser Glu Leu Thr Glu Ala Glu Arg Leu Gln Glu

65 70 75

Asn Leu Gln Ala Tyr Arg Thr Phe His Val Leu Leu Ala Arg Leu

80 85 90

10

Leu Glu Asp Gln Gln Val His Phe Thr Pro Thr Glu Gly Asp Phe

95 100 105

His Gln Ala Ile His Thr Leu Leu Leu Gln Val Ala Ala Phe Ala

110 115 120

20

Tyr Gln Ile Glu Glu Leu Met Ile Leu Leu Glu Tyr Lys Ile Pro

125 130 135

Arg Asn Glu Ala Asp Gly Met Pro Ile Asn Val Gly Asp Gly Gly

140 145 150

30

Leu Phe Glu Lys Lys Leu Trp Gly Leu Lys Val Leu Gln Glu Leu

155 160 165

Ser Gln Trp Thr Val Arg Ser Ile His Asp Leu Arg Phe Ile Ser

170 175 180

40

Ser His Gln Thr Gly Ile Pro Ala Arg Gly Ser His Tyr Ile Ala

185 190 195

Asn Asn Lys Lys Met

200

(2) 配列番号5の情報:

50

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：50塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号5：

GCGGCCGCGA GCTCGAATTC TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT 50

(2) 配列番号6の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：1018塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号6：

GTGAAGGGAG CCGGGATCAG CCAGGGGCCA GCATGAGCCG GAGGGAGGGA 50

AGTCTGGAAG ACCCCCAGAC TGATTCCTCA GTCTCACTTC TTCCCCACTT 100

GGAGGCCAAG ATCCGTCAGA CACACAGCCT TGCGCACCTC CTCACCAAAT 150

ACGCTGAGCA GCTGCTCCAG GAATATGTGC AGCTCCAGGG AGACCCCTTC 200

GGGCTGCCCA GCTTCTCGCC GCCGCGGCTG CCGGTGGCCG GCCTGAGCGC 250

CCCGGCTCCG AGCCACGCGG GGCTGCCAGT GCACGAGCGG CTGCGGCTGG 300

ACGCGGCGGC GCTGGCCGCG CTGCCCCCGC TGCTGGACGC AGTGTGTCGC 350

CGCCAGGCCG AGCTGAACCC GCGCGCGCCG CGCCTGCTGC GCCGCCTGGA 400

GGACGCGGCG CGCCAGGCCC GGGCCCTGGG CGCCGCCGTG GAGGCCTTGC 450

TGGCCGCGCT GGGCGCCGCC AACC GCGGGC CCCGGGCCGA GCCCCCGCC 500

GCCACCGCCT CAGCCGCCTC CGCCACCGGG GTCTTCCCCG CCAAGGTGCT 550

GGGGCTCCGC GTTTGCGGCC TCTACCGCGA GTGGCTGAGC CGCACCGAGG 600

GCGACCTGGG CCAGCTGCTG CCCGGGGGCT CGGCCTGAGC GCCGCGGGGC 650

AGCTCGCCCC GCCTCCTCCC GCTGGGTTCC GTCTCTCCTT CCGCTTCTTT 700

GTCTTTCTCT GCCGCTGTCG GTGTCTGTCT GTCTGCTCTT AGCTGTCTCC 750

ATTGCCTCGG CCTTCTTTGC TTTTGTGGG GGAGAGGGGA GGGGACGGGC 800

AGGGTCTCTG TCGCCCAGGC TGGGGTGCAG TGGCGCGATC CCAGCACTGC 850

AGCCTCAACC TCCTGGGCTC AAGCCATCCT TCCGCCTCAG CTCCCCAGC 900

AGCTGGGACT ACAGGCACGC GCCACCACAG CCGGCTAATT TTTTATTTAA 950

TTTTTTGTAG AGACGAGGTT TCGCCATGTT GCCCAGGCTG GTCTTGAACT 1000

CCGGGGCTCA AGCGATCC 1018

10

20

30

40

50

(2) 配列番号7の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 1018塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号7:

```
CACTTCCCTC GGCCCTAGTC GGTCCCCGGT CGTACTCGGC CTCCCTCCCT 50
TCAGACCTTC TGGGGGTCTG ACTAAGGAGT CAGAGTGAAG AAGGGGTGAA 100
CCTCCGGTTC TAGGCAGTCT GTGTGTCGGA ACGCGTGGAG GAGTGGTTTA 150
TGCGACTCGT CGACGAGGTC CTTATACACG TCGAGGTCCC TCTGGGGAAG 200
CCCGACGGGT CGAAGAGCGG CGGCGCCGAC GGCCACCGGC CGGACTCGCG 250
GGGCCGAGGC TCGGTGCGCC CCGACGGTCA CGTGCTCGCC GACGCCGACC 300
TGCGCCGCCG CGACCGGGCG GACGGGGGCG ACGACCTGCG TCACACAGCG 350
GCGGTCCGGC TCGACTTGGG CGCGCGCGGC GCGGACGACG CGGCGGACCT 400
CCTGCGCCGC GCGGTCCGGG CCCGGGACCC GCGGCGGCAC CTCCGGAACG 450
ACCGGCGCGA CCCGCGGCGG TTGGCGCCCG GGGCCCGGCT CGGGGGGCGG 500
CGGTGGCGGA GTCGGCGGAG GCGGTGGCCC CAGAAGGGGC GGTTCACGA 550
CCCCGAGGCG CAAACGCCGG AGATGGCGCT CACCGACTCG GCGTGGCTCC 600
CGCTGGACCC GGTCGACGAC GGGCCCCCGA GCCGGACTCG CGGCGCCCCG 650
TCGAGCGGGG CGGAGGAGGG CGACCCAAGG CAGAGAGGAA GGCGAAGAAA 700
CAGAAAGAGA CGGCGACAGC CACAGACAGA CAGACGAGAA TCGACAGAGG 750
TAACGGAGCC GGAAGAAACG AAAAACACCC CCTCTCCCCT CCCCTGCCCC 800
TCCCAGAGAC AGCGGGTCCG ACCCCACGTC ACCGCGCTAG GGTCGTGACG 850
TCGGAGTTGG AGGACCCGAG TTCGGTAGGA AGGCGGAGTC GAAGGGGTCTG 900
TCGACCCTGA TGTCCGTGCG CGGTGGTGTC GGCCGATTAA AAAATAAATT 950
AAAAAACATC TCTGCTCCAA AGCGGTACAA CGGGTCCGAC CAGAACTTGA 1000
```

GGCCCCGAGT TCGCTAGG 1018

(2) 配列番号8の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 201アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号8:

Met Ser Arg Arg Glu Gly Ser Leu Glu Asp Pro Gln Thr Asp Ser

1

5

10

15

Ser Val Ser Leu Leu Pro His Leu Glu Ala Lys Ile Arg Gln Thr

20

25

30

His Ser Leu Ala His Leu Leu Thr Lys Tyr Ala Glu Gln Leu Leu

35

40

45

Gln Glu Tyr Val Gln Leu Gln Gly Asp Pro Phe Gly Leu Pro Ser

50

55

60

10

Phe Ser Pro Pro Arg Leu Pro Val Ala Gly Leu Ser Ala Pro Ala

65

70

75

Pro Ser His Ala Gly Leu Pro Val His Glu Arg Leu Arg Leu Asp

80

85

90

20

Ala Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Pro Leu Leu Asp Ala Val Cys

95

100

105

Arg Arg Gln Ala Glu Leu Asn Pro Arg Ala Pro Arg Leu Leu Arg

110

115

120

30

Arg Leu Glu Asp Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Leu Gly Ala Ala

125

130

135

Val Glu Ala Leu Leu Ala Ala Leu Gly Ala Ala Asn Arg Gly Pro

140

145

150

40

Arg Ala Glu Pro Pro Ala Ala Thr Ala Ser Ala Ala Ser Ala Thr

155

160

165

Gly Val Phe Pro Ala Lys Val Leu Gly Leu Arg Val Cys Gly Leu

170

175

180

Tyr Arg Glu Trp Leu Ser Arg Thr Glu Gly Asp Leu Gly Gln Leu

185

190

195

Leu Pro Gly Gly Ser Ala

200 201

10

【図 1 A】

FIG. 1A

1 GGATAAGCCT GGGGCCAGCA TGAGCCAGAG GGAGGGAAGT CTGGAAGACC
 CCTATTTCGGA CCCCAGTCTG ACTCGGCTCTC CCTCCCTTCA GACCTTCTGG
 1 M S Q R E G S L E D H

51 ACCAGACTGA CTCTCAATC TCATTCTCTAC CCCATTGGA GGCCAAGATC
 TGGTCTGACT GAGGAGTTAG AGTAAGGATG GGGTAAACCT CCGGTTCTAG
 12 Q T D S S I S F L P H L E A K I

101 CGCAGACAC ACAACCTTGC CCGCCTCCTG ACCAAATATG CAGAACAAC
 GCGGTCTGTG TGTGGAACG GCGGAGGAC TGGTTTATAC GTCTTGTGA
 28 R Q T H N L A R L L T K Y A E Q L

151 TCTGGAGGAA TACGTGCAGC AACAGGGAGA GCCCTTTGGG CTGCCGGGCT
 AGACCTCCTT ATGCACGTG TGTGCTCTCT CCGGAAACCC GACGGCCCGA
 45 L E E Y V Q Q Q G E P F G L P G F

201 TCTCACCACC GCGGCTGCCG CTGGCCGGCC TGAGTGGCCC GGCTCCGAGC
 AGAGTGTGGG CGCCGACGCG GACCGGCCGG ACTCACCAGG CCGAGGCTCG
 62 S P P R L P L A G L S G P A P S

251 CATGCAGGGC TACCGGTGTC CGAGCGGCTG CGGCAGGATG CAGCCGCCCT
 GTACGTCCCG ATGGCCACAG GCTCGCCGAC CCGCTCTTAC GTCCGGCGGA
 78 H A G L P V S E R L R Q D A A A L

301 GAGTGTGCTG CCGCGCTGCT TGGATGCCGT CCGCCGCGCG CAGGCGGAGC
 CTCACACGAC GGGCGCGACA ACCTACGGCA GCGGCGCGCG GTCCGCTCG
 95 S V L P A L L D A V R R R Q A E L

351 TGAACCCGCG CGCCCCGCGC CTGCTGCGGA GCCTGGAGGA CGCAGCCCGC
 ACTTGGGCGC GCGGGGCGCG GACGACGCTC CGGACCTCCT GCGTCGGGCG
 112 N P R A P R L L R S L E D A A R

401 CAGGTTGCGG CCCTGGGCGC CGCGGTGGAG ACAGTGTCTG CCGCGCTGGG
 GTCCAAGCCC GGGACCCGCG GCGCCACCTC TGTACGACG GCGCGGACCC
 128 Q V R A L G A A V E T V L A A L G

451 CGCTGCAGCC CGCGGGCCCG GGCCAGAGCC CGTACCCTGC GCCACCTCT
 GCGACGTCGG GCGCCCGGGC CCGTCTCGG CGAGTGGCAG CGGTGGGAGA
 145 A A A R G P G P E P V T V A T L F

501 TCACGSCCAA CAGCACTGCA GGCATCTTCT CAGCCAAGGT GCTGGGGTTC
 AGTGCCGGTT GTCTGACGT CCGTAGAGA GTCGGTTCCA CGACCCCAAG
 162 T A N S T A G I F S A K V L G F

551 CACGTGTGCG GCCTCTATGG CGAGTGGGTG AGCCGACAG AGGGCGACCT
 GTGCACACCG CGGAGATACC GCTCACCAC TCGGCTGTG TCCCGCTGGA
 178 H V C G L Y G E W V S R T E G D L

601 GGGCCAGCTG GTGCCAGGGG GCGTGCCTG AGAGTGAATA CTTTTCTTG
 CCGGCTCGAC CACGCTCCCC CGCAGCGGAC TCTCACTTAT GAAAAAGAAC
 195 G Q L V P G G V A O

【図 1 B】

FIG. 1B

651 TAAGCTCGCT CTGTCTCGCC TCTTTGGCTT CAAATTTTCT GTCTCTCCAT
 ATTCGAGCGA GACAGAGCGG AGAAACCGAA GTTTAAAAAG CAGAGAGGTA

701 CTGTGTCTTG TGTGTTCTTG GGTGTCTCTC ATCTTCTGTC ATTTGTGTGG
 GACACAGGAC ACACAAGAAC CCGACAGGGA TAGAAAGACG TAAACACACC

751 TCTCTCTCTT CTGCTCTCCT CTCTGACGGG AGCTTCTTTT TTCCAACAGT
 AGAGAGAGAA GACGAGAGGA GAGACGTCCC TCGAAGAAAA AAGGTTGTCA

801 TTCTCGTTTT GTCTCTCTCC AGTCTTGAAC ACTTTTGTCT CCGAGAGGTC
 AAGAGCAAAA CAGAGAGAGG TCAGAACTTG TGAACACAGA GGCTCTCCAG

851 TCTTTTGTGT TCCTGTCTCT TGGTTCCTTT CTCTGTCTGC TTGCTTGCTT
 AGAAAAACAA AGGAACAGAG AACCAAGAAA GAAACGAACG AACGAACGAA

901 GCTTGTCTGT TGTGAGACA GGGTCTCACC ATATAGCTCT GGATGGCCTG
 CGAACGAACA ACAACTCTGT CCCAGAGTGG TATATCGAGA CCTACCGGAC

951 GAACCTTGCTA TGTAGGCCAG CTGGGCTCTC AGCTCATAGA GATCCACTTG
 CTGAAACGAT ACATCCGGTC CGACCGGAGG TCGAGTATCT CTAGGTGAAC

1001 CCTCCGACTC CCAATTTCCC CATCTGTCTC CCTGTGATCC ATATGGGTAT
 GGAGGCTGAG GGTAAAGGG GTAGACAGAG GGACACTAGG TATACCCATA

1051 GTGTAACCCCT TACTTTGTCT CATGGAGGTG ACAATTTTTC TCCCTTCAGT
 CACATTGGGA ATGAACAGA GTACCTCCAC TGTAAAGAG AGGGAAGTCA

1101 TTCTTTGTTC TTTACTGACC AGAAAAGTGC CTACTTGTCC CCTGGTGGCA
 AAGAAACAAG AATGACTGG TCTTTTCACG GATGAACAGG GGACCCCGT

1151 AGGCCATTCA CCTTAGGACC TTCCACCAG TTCTTTGTA GGCAATCCC
 TCCGTAAGT GGAATCCTG AAGGGTGTGC AAGGAACAT CCGTTTAGGG

1201 TCCCTCTTTG AGTCTCTTCC CTTCATACC GCCTAGGCT GGTCAATGGA
 AGGGGGAAG TCCAGGAAGG GAAAGTATGG CCGGATCCGA CCAGTTACCT

1251 GAGAGAAAGG CAGAAAAACA TCTTTAAAGA GTTTTATTG AGAATAAAT
 CTCTCTTTCC GTCTTTTGT AGAAATTTCT CAAAATAAAC TCTTATTAA

1301 AATTTTGTGA AATAAAATGT TTAACAATAA AACTAAACTT TTATGAAAA
 TTAAAAACAT TTATTTTACA AATGTATTAT TTGATTGAA AATACTTTT

1351 AA (ポリA)
 TT

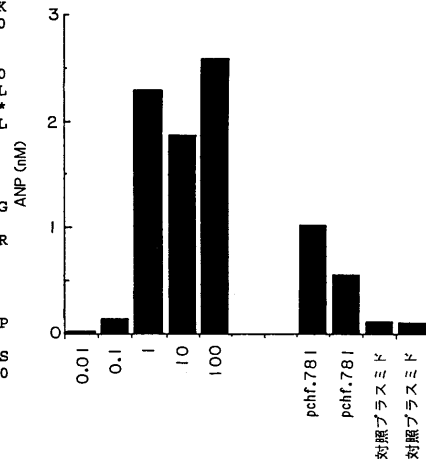
【図 2】

FIG. 2

chf.781 MSQREGSLEDHQTDSSISFLPHLEAKIRQTHNLARLLTKYAEQLLEEVQ
 humcntf MAFTEHSPLPHRRDLCSRSIWLARKIRSDLTALTESYVK
 chf.781 QQGEFFGLPGFSPPLRLPLAGLSGPAPSHAGLPVSERLRQDAALSVLPAL
 humcntf HQGLNKNINLDSADGMPVA---STDQWSELTEAERLQENLQAYRTFHL
 chf.781 LD-AVRRRQAEINPRAPRLRSLEDAARQVRALGAAVETVLAALGAAARG
 humcntf LARLLEDQOVHFTPTTEGDFHQAIHTLLQVAAFAYQIEELMILLEYKIPR
 chf.781 PGPEPVTVAITLFTANSTAGIFSAKVLGFHVCGLYGEWVSRTEGDLGQLVP
 humcntf NEADGMPINV-----GDGGLFEKKLWGLKVLQELSQWTVRSIHDL-RFIS
 chf.781 GGVAO
 humcntf SHQTGIPARGSHYIANNKKM

【図 3】

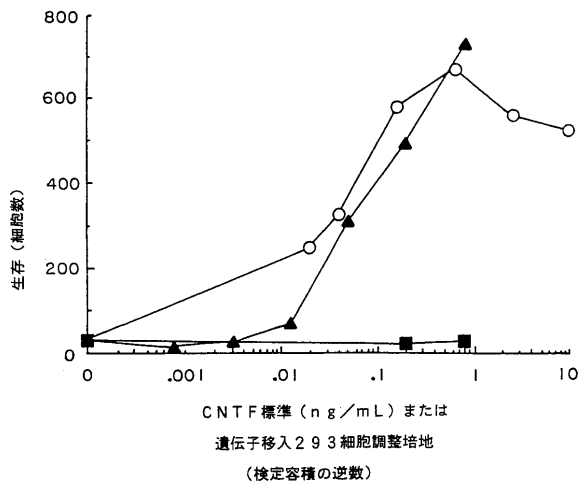
FIG. 3



フェニルエフリン (μM) 遺伝子移入 293
標準曲線

【図 4】

FIG. 4



【図 5 A】

FIG. 5A

1 GTGAAGGGAG CCGGATCAG CCAGGGGCCA GCATGAGCCG GAGGGAGGGA
 CACTTCCCTC GGCCCTAGTC GGTCCCCGGT M S R R E G
 51 AGTCTGGAAG ACCCCAGAC TGATTCCTCA GTCTCACTTC TTCCCACTT
 TCAGACCTTC TGGGGGTCTG ACTAAGGAGT CAGAGTGAAG AAGGGGTGAA
 7 S L E D P Q T D S S V S L L P H L
 101 GGAGGCCAAG ATCCGTCAGA CACACAGCCT TGCACACCTC CTCACCAAT
 CCTCCGGTTC TAGGCAGTCT GTGTGTCGGA ACGCGTGGAG GAGTGGTTTA
 24 E A K I R Q T H S L A H L L T K Y
 151 ACGCTGAGCA GCTGCTCCAG GAATATGTGC AGCTCCAGGG AGACCCCTTC
 TGCAGCTCGT CGACGAGGTC CTTATACACG TCGAGGTCCC TCTGGGGAAG
 41 A E Q L L Q E Y V Q L Q G D P F
 201 GGGCTGCCCA GCTTCTCGCC GCCGCGGCTG CCGGTGGCCG GCCTGAGCGC
 CCCGACGGGT CGAAGAGCGG CGGCGCCGAC GGCCACCGGC CGGACTCGCG
 57 G L P S F S P P R L P V A G L S A
 251 CCCGCTCCG AGCCACGCGG GGCTGCCAGT GCACGAGCGG CTGCGGCTGG
 GGGCCGAGGC TCGGTGCGCC CCGAGGTCA CGTGCTCGCC GACGCCGACC
 74 P A P S H A G L P V H E R L R L D
 301 ACGCGGCGGC GCTGGCCGCG CTGCCCCGCG TGCTGGACGC AGTGTGTGCG
 TCGCGCCGCG CGACCGGCGC GACGGGGGCG ACGACTCGCG TCACACAGCG
 91 A A A L A A L P P L L D A V C R
 351 CGCCAGGCGC AGCTGAACCC GCGCGCGCGC CGCCTGCTGC GCCGCTTGA
 GCGGTCCGCG TCGACTTGGG CGCGCGCGGC GCGGACGACG CGGCGGACCT
 107 R Q A E L N P R A P R L L R R L E
 401 GGACGCGCGC CGCCAGGCCG GGGCCCTGGG CGCGCCGCTG GAGGCTTGC
 CCTGCGCCGC GCGGTCCGCG CCCGGGACCC GCGGCGGCAC CTCCGGAACG
 124 D A A R Q A R A L G A A V E A L L
 451 TGGCGCGCTG GGGCGCGCGC AACCGCGGCG CCCGGGCGGA GCCCCCGGCC
 ACCGGCGCGA CCCGCGGCGG TTGGCGGCGG GGGCCCGGCT CGGGGGGCGG
 141 A A L G A A N R G P R A E P P A

【図 5 B】

FIG. 5B

501 GCCACCGCCT CAGCCGCCTC CGCCACCGGG GTCTTCCCCG CCAAGGTGCT humct1
CGGTGGCGGA GTCGGCGGAG GCGGTGGCCC CAGAAGGGGC GGTTCACGA
157 A T A S A A S A T G V F P A K V L chf.781

551 GGGGCTCCGC GTTTGCGGCC TCTACCGCGA GTGGCTGAGC CGCACCGAGG humct1
CCCCGAGGCG CAAACGCCGG AGATGGCGCT CACCGACTCG GCGTGGCTCC chf.781
174 G L R V C G L Y R E W L S R T E G

601 GCGACCTGGG CCAGCTGCTG CCGGGGGGCT CGGCCTGAGC GCCGCGGGGC humct1
CGCTGGACCC GGTGACGAC GGGCCCCGA GCCGACTCG CGCGCCCCG chf.781
191 D L G Q L L P G G S A O

651 AGCTCGCCCC GCCTCCTCCC GCTGGGTTC GTCTCTCCTT CCGCTTCTTT humct1
TCGAGCGGGG CGGAGGAGGG CAGCCCAAGG CAGAGAGAA GCGGAAGAAA chf.781

701 GTCTTTCTCT GCGCTGTCTG GTGTCTGTCT GTCTGCTCTT AGCTGTCTCC
CAGAAAGAGA CGGCGACAGC CACAGACAGA CAGACGAGAA TCGACAGAGG

751 ATTGCCTCGG CCTTCTTTGC TTTTGTGGG GGAGAGGGGA GGGGACGGGC
TAACGGAGCC GGAAGAAACG AAAAACACCC CCTCTCCCT CCCCTGCCCG

801 AGGGTCTCTG TCGCCCAGGC TGGGGTGAG TGGCGGATC CCAGCACTGC
TCCAGAGAC AGCGGGTCCG ACCCCACGTC ACCGCGCTAG GGTCTGACG

851 AGCCTCAACC TCCTGGGCTC AAGCCATCCT TCGCCTCAG CTTCCCCAGC
TCGGAGTTGG AGGACCCGAG TTCGGTAGGA AGCGGAGTC GAAGGGGTCTG

901 AGCTGGGACT ACAGGCACGC GCCACCACAG CCGGCTAATT TTTTATTTAA
TCGACCTGA TGTCCGTGCG CGGTGTGTCT GGCCTAATA AAAATAAATT

951 TTTTGTGTAG AGACGAGGTT TCGCCATGTT GCCCAGGCTG GTCTTGAAT
AAAAACATC TCTGCTCCAA AGCGGTACAA CGGGTCCGAC CAGAACTTGA

1001 CCGGGGCTCA AGCGATCC
GGCCCCGAGT TCGCTAGG

【図 6】

FIG. 6

1 MSRRREGSLEDPQTDSSVSLPHLEAKIRQTHSLAHLTKYAEQLLQEYVQLQG
** ***** **
1 MSQRREGSLEDHQTDSSISFLPHLEAKIRQTHNLARLLTKYAEQLLEEVQGG

54 DPFGLPSFSPRLPVAGLSAPAPSHAGLPVHERLRLDAAALALPPLDAVCR

54 EPFGLPGFSPRLPLAGLSGPAPSHAGLPVSERLRQDAAALSVLPALLDAVRR

107 RQAEINPRAPRLRRLEDAARQARALGAAVEALLAALGAANRGPRAEPPAATA

107 RQAEINPRAPRLRSLEDAARQVRALGAAVETVLAALGAAARGPGPEPVTAT

160 --SAASATGVFPAKVLGLRVCGLYREWLSRTEGDLQQLPGGSA
* * * * *
160 LFTANSTAGIFS AKVLGFHVCGLYGEWVSRTEGDLQQLVPGGVA

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
C 1 2 R	1/91	(2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
			C 1 2 R 1:91

(74)代理人

弁理士 小林 義教

(72)発明者 ベイカー, ジョフレ

アメリカ合衆国94018カリフォルニア州 エル・グラナダ、アベニュー・カブリロ239番

(72)発明者 チェン, ケネス

アメリカ合衆国92037カリフォルニア州 ラ・ジョラ、カレ・ベラ・クルズ6232番

(72)発明者 キング, キャスリーン

アメリカ合衆国94044カリフォルニア州 パシフィカ、カーメル・アベニュー239番

(72)発明者 ペニカ, ダイアン

アメリカ合衆国94010カリフォルニア州 バーリンゲイム、ホール・ドライブ2417番

(72)発明者 ウッド・ウィリアム

アメリカ合衆国94402カリフォルニア州 サン・マテオ、タリータウン・ストリート1400番

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 Proc.Natl.Acad.Sci.USA,February 1995,Vol.92,p.1142-1146

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

BIOSIS/CA/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/Geneseq