

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4060361号
(P4060361)

(45) 発行日 平成20年3月12日(2008.3.12)

(24) 登録日 平成19年12月28日(2007.12.28)

(51) Int.Cl. F I
C O 7 K 14/705 (2006.01) C O 7 K 14/705
C O 7 K 1/20 (2006.01) C O 7 K 1/20

請求項の数 5 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願平9-526949	(73) 特許権者	オーソーマクニール・フアーマシユーチカル・インコーポレーテッド
(86) (22) 出願日	平成9年1月22日(1997.1.22)		アメリカ合衆国ニュージャージー州08869-0602ラリタン・ユーエスルートナンバー202
(65) 公表番号	特表2001-507670(P2001-507670A)		
(43) 公表日	平成13年6月12日(2001.6.12)	(74) 代理人	弁理士 小田島 平吉
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/000932		
(87) 国際公開番号	W01997/027219	(74) 代理人	弁理士 小田嶋 平吾
(87) 国際公開日	平成9年7月31日(1997.7.31)	(72) 発明者	ミドルトン, スチーブン・エイ
審査請求日	平成16年1月16日(2004.1.16)		アメリカ合衆国ニュージャージー州08822フレミントン・ゲイツヘッドドライブ2
(31) 優先権主張番号	60/010,469		
(32) 優先日	平成8年1月23日(1996.1.23)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/022,129		
(32) 優先日	平成8年7月18日(1996.7.18)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エリトロポエチン結合タンパク質の精製及び使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

微生物細胞発酵物からのエリトロポエチン結合タンパク質(E B P)の精製方法であって、

- a) 発酵物から微生物細胞を集め、
- b) 集めた微生物細胞に十分な量の溶解バッファーを添加して未精製ライセートを生成し、
- c) 未精製ライセートから不溶性タンパク質を集め、
- d) 不溶性タンパク質を可溶化バッファーで可溶化し、
- e) 工程d)の可溶化したタンパク質を好適な再生バッファーで再生することにより再生タンパク質を生成し、
- f) 工程e)の再生タンパク質を疎水性相互作用クロマトグラフィ-基質と接触させ、
- g) 疎水性相互作用クロマトグラフィ-基質から活性型E B Pを溶出し、そして集め、
- h) 工程g)からの活性型E B Pをサイズ排除クロマトグラフィ-基質と接触させ、そして、
- i) 工程h)のサイズ排除クロマトグラフィ-基質から活性型E B Pを溶出し、そして集めること

により純粋なE B Pを生成する、
 工程を含んでなる、上記精製方法。

【請求項2】

10

20

j) 工程 i) の生成物の場合によっては濃縮し、そして / または製薬学的に受容しうる担体中にダイアフィルトレーションし、

k) 場合によってはタンパク質生成物を滅菌する
工程をさらに含んでなる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

微生物が大腸菌である、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

工程 b) の溶解溶液が、全体として 0.31 となる溶液に、51mg の割合のフッ化フェニルメチルスルホニル、600mg の割合の卵白リゾチーム、1mM $MgCl_2$ および 12,500 ユニットの割合のベンゾナーゼを含有する 10mM $Tris-HCl$, pH 7.5, 150mM $NaCl$ の EBP 溶解バッファーである、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

サイズ排除クロマトグラフィ - 基質が高速サイズ排除クロマトグラフィ - 基質である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

赤血球の生産及び成熟をもたらす血液学的プロセスは、腎臓で主として合成される糖タンパク質ホルモンのエリトロポエチン (EPO) の制御下にある (Krantz, S. B. (1991) *Erythropoietin. Blood* 77, 419 - 434 に概説される)。市販されているヒト EPO は、組み換え DNA 技術により製造され、組み換え体ヒト EPO (rhEPO) として知られている。rhEPO は、SDS-PAGE により測定される場合、約 36,000 ダルトンの分子量を有する。タンパク質バックボーンの分子量は、18,398 ダルトンであり、これは、全体の分子が大量にグリコシル化されていることを示す。炭水化物残基は、インビボでの生物学的活性のために重要である。多数の他の増殖因子と異なり、赤血球系細胞に対する EPO の特異性は、安全で有効な治療タンパク質としてのその開発をもたらしている。EPO の医学的利点は、慢性腎不全、癌の化学療法及び自己前献血 (autologous predonation of blood) に関係する貧血症の治療において十分に確立されている。EPO 治療の長期的性質のために、経口投与される「第二世代」の分子があることが望ましい。

EPO とそのレセプターの相互作用の構造的基礎を理解することは、経口貧血薬のような新薬の設計を促進する。薬剤の発見の伝統的な方法は、レセプター - リガンド相互作用の構造的基礎についての情報を利用して分子モデルを開発するしようと試みる合理的 (rational) 設計方法により補足されている。これらのモデルは、次に、治療に役立つ可能性がある分子を設計するために用いられる。これら 2 つの方法は相補的であり、治療標的の 3 次元構造に関する情報を得る能力に依存する。EPO 及びそのレセプターを製造する能力並びにタンパク質の機能に対する構造変化の影響を評価する能力は、仮説の分子モデルを試験するための手段を与え、薬剤設計の構造活性関係データベースの設立に寄与する。

EPO の生物学的作用は、細胞膜結合レセプターとの相互作用を通してある程度もたらされるようであり、レセプターは以前にクローン化されている (Jones, S. S., D'Andrea, A. D., Haines, L. L. 及び Wong, G. G. (1990) *Human erythropoietin receptor: Cloning, expression, and biological characterization, Blood* 76, 31 - 35; Noguchi, C. T., Kyung, S. B., Chin, K., Wada, Y., Schechter, A. N. 及び Hankins, W. D. (1991) *Cloning of the human erythropoietin receptor gene, Blood* 78, 2548 - 2556; Maouche, L., Tournamille C., Hattab, C., Boffa, G., Carton J. - P. 及び Chretien, S. (1991) *Cloni*

ng of the gene encoding the human erythropoietin receptor. Blood 78, 2557 - 2563]。現在、EPOレセプター(EPOR)とEPOの結合の物理的性質にかなりの関心が持たれており、この型の相互作用の分析のための新しい技術は、ホルモン結合タンパク質とも呼ばれる可溶性レセプターの作製である(Langer, J. A. (1990) Soluble ligand-binding fragments of polypeptide receptors in basic and applied research, Pharmaceutical Technology 14, 46 - 66)。この方法は、レセプターの細胞外ドメインをコードする適当な発現ベクターを作製し、続いてそのタンパク質を生産し、精製することを含む。これらの可溶性レセプターフラグメントは、膜結合レセプターを可溶化するために必要な溶剤を含まない状態で用いることができるので、いったん活性型で得られると、多数のアッセイ形態において有用であり、NMRまたはX線結晶学のような生物物理学的研究において向上した有用性を有する。IL-1及びIL-4を初めとするこの型のいくつかのレセプターフラグメントは、ホルモンの生物学的作用を中和するために働き、治療に役立つ可能性があると思われる(Maliszewski, C. R. 及び Fanslow, W. C. (1990) Soluble receptors for IL-1 and IL-4: Biological activity and therapeutic potential, Trends in Biotech 8, 324 - 329)。

以前の報告は、真核細胞及びバクテリアにおけるタンパク質発現を利用するヒト及びネズミのEPO結合タンパク質(EBP)の生産及び精製のための系の開発を略述しているが、限られた収量である(Harris, K. W., Mitchell, R. A. 及び Winkelman, J. C. (1992) Ligand Binding Properties of the Human Erythropoietin Receptor Extracellular Domain Expressed in E. coli. J. Biol. Chem. 267, 15205 - 15209; Yet, M. - G 及び Jones, S. S. (1993) The Extracytoplasmic Domain of the Erythropoietin Receptor Forms a Monomeric Complex with Erythropoietin. Blood 82, 1713 - 1719; Nagao, M., Masuda, S., Abe, S., Ueda, M. 及び Sasaki, R. (1992) Production and ligand-binding characteristics of a soluble form of the murine erythropoietin receptor, Biochem. Biophys. Res. Comm. 188, 888 - 897)。

EPOレセプター活性化の機構は、2つのEPOレセプター分子の二量化にあることが示唆されており、これは、シグナル変換の次の工程を生じる[Watowich, S. S., Yoshimura, A., Longmore, G. D., Hilton, D. J., Yoshimura, 及び Lodish, H. F., Homodimerization and constitutive activation of the erythropoietin receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences 89, 2140 - 2144 (1992)]。可溶性EPOレセプター[Johnson, D. L., Middleton, S. A., McMahon, F., Barbone, F., Kroon, D., Tsao, E., Lee, W. H., Mulcahy, L. S. 及び Jolliffe, L. K., Refolding, Purification and Characterization of Human Erythropoietin Binding Protein Produced in Escherichia coli, Protein Expression and Purification 7 104 - 113 (1996)]は、構造決定及び生産の容易さに関係する利点を有するが、レセプタ

10

20

30

40

50

一の二量化の前以て形成された鑄型ではないようである。EPOレセプターに結合し、これを活性化する場合のあるペプチドまたは小分子の探索において、そのような前以て形成された二量化の鑄型は、そのような活性を有する分子の発見、検出及び記述のための非常に有益な道具である。レセプター-Ig融合分子の使用は、そのような鑄型を提供し、そしてアッセイ形態により、与えられた分子または化合物の非生産的及び生産的二量化複合体を検出する能力に関する情報を与える。

発明の要約

組み換え体宿主細胞の発酵からの非常に純粋なヒトEPO結合タンパク質(EBP)の新規な製造方法が本明細書に開示される。記述される本発明の方法は、EPO(リガンド)結合というEPOレセプターの生物学的特性を保持する非常に純粋な非グリコシル化EBPを製造する。また、本発明の非常に純粋なEPOは、擬似リガンド(ligand mimetics)の設計、発見及び生成、リガンド結合のインヒビターの設計、発見及び生成、リガンド結合のアゴニスト、アンタゴニスト及び他のモジュレーターの設計、発見及び生成、並びにEBP-リガンド相互作用部位の正確な特性化を可能にする結晶構造の生成を初めとするがこれらに限定されない、多種多様な薬剤発見技術においても有用である。また、EBP-リガンド相互作用部位の正確な特性化は、擬似リガンドの設計、発見及び生成、リガンド結合のインヒビターの設計、発見及び生成、並びにリガンド結合のアゴニスト、アンタゴニスト及び他のモジュレーターの設計、発見及び生成にも有用である。

EBPは、組み換え体宿主において融合タンパク質としても生産される。EBP融合タンパク質は、さらなるアミノ酸配列に共有結合的に連結したEBPアミノ酸配列を含んでなる。このさらなるアミノ酸配列は、EBPの検出、精製、定量、抗原性またはあらゆる他の所望される機能のための手段を与えることができる。特に、さらなるアミノ酸配列が免疫グロブリンの重鎖またはその一部である融合タンパク質としてEBPを生産することができる。本発明のEBP-Igは、EBP及びIgG重鎖分子のヒンジ領域を含むIgG重鎖の一部の融合タンパク質である。このEBP-Igも、擬似リガンドの設計、発見及び生成、リガンド結合のインヒビターの設計、発見及び生成、並びにリガンド結合のアゴニスト、アンタゴニスト及び他のモジュレーターの設計、発見及び生成を初めとするがこれらに限定されない、多種多様な薬剤発見技術において有用である。

そのような薬剤発見技術におけるEBP及びEBP-Igの使用方法も本明細書に開示される。

【図面の簡単な説明】

図1．大腸菌におけるEBPの発現のために用いるプラスミドベクターが示される。

図2．パネルA及びB．EBPの発現及び精製試験の試料の還元(パネルA)及び非還元(パネルB)10-20% SDS-PAGEが示される。

図3、パネルA、B、C及びD：EBPの「活性」型の検出の実例が示される。

図4、パネルA、B、C及びD．HIC及び分取サイズ排除クロマトグラフィーによる精製後のEBPの純度及び活性の実例が示される。

図5、パネルA及びB．C-4逆相HPLCによるEPO-EBP複合体の化学量論の実例が示される。

図6、パネルA及びB．固定されたEBPに対する平衡EPO結合及び質量スペクトル分析が示される。

図7、パネルA及びB．天然のEPOレセプターを結合した細胞への $[^{125}\text{I}]$ EPO結合に対するEBPの競合が示される。

図8、パネルA及びB．異なるペプチドリガンドにより二量化されたEBPタンパク質の架橋が、非還元条件(パネルA)及び還元条件(パネルB)下でのSDS-PAGEにより示される。

発明の詳細な説明

本発明は、微生物発酵からのエリトロポエチン結合タンパク質(EBP)の精製方法に関する。また、本発明は、EBP自体、並びに薬剤の設計及び発見技術におけるその使用に

10

20

30

40

50

も関する。本発明のE B Pは、エリトロポエチンに結合し、細胞結合レセプターとの相互作用にエリトロポエチンを利用できなくするので、治療に役立つものとしても有用である。

本発明は、融合タンパク質の形態のE B Pにも関する。E B Pを融合タンパク質として組み換え体宿主細胞で生産することができ、またはE B Pを組み換え体宿主細胞から単離し、精製し、次に別のタンパク質もしくはペプチドと化学的に反応させてE B Pとそのタンパク質もしくはペプチドの間に共有結合を形成することができる。E B P融合タンパク質は、さらなるアミノ酸配列に共有結合したE B Pアミノ酸配列を含んでなる。さらなるアミノ酸配列は、E B Pの検出、精製、定量、結合、抗原性またはあらゆる他の所望される機能のための手段を与えることができる。特に、さらなるアミノ酸配列が免疫グロブリンの重鎖またはその一部である融合タンパク質としてE B Pを生産することができる。本発明のE B P - I gは、E B P及びI g G重鎖分子のヒンジ領域を含むI g G重鎖の一部のそのような組み換え体として生産される融合タンパク質である。本発明のE B P - I gも、エリトロポエチンに結合し、細胞結合レセプターとの相互作用にエリトロポエチンを利用できなくするので、治療に役立つものとして有用である。E B P - I gは、擬似リガンドの設計、発見及び生成、リガンド結合のインヒビターの設計、発見及び生成、並びにリガンド結合のアゴニスト、アンタゴニスト及び他のモジュレーターの設計、発見及び生成を初めとするがこれらに限定されない、多種多様な薬剤発見技術において有用である。

本明細書に用いられるE B Pという用語は、膜固定ドメイン及び細胞質ドメインのかなりの部分を欠くが、リガンド結合ドメイン及びエリトロポエチンを結合する能力を保持するE P Oレセプターの型をいう。本明細書に用いられるE B P - I gという用語は、ヒンジ領域を含む免疫グロブリン重鎖、並びに膜固定ドメイン及び細胞質ドメインのかなりの部分を欠くが、リガンド結合ドメイン及びエリトロポエチンを結合する能力を保持するE P Oレセプターの型であるE B Pを含んでなる組み換え体として生産される融合タンパク質をいう。本明細書に用いられる擬似E P Oという用語は、E P Oレセプターに結合し、E P Oレセプターが介在するシグナル変換の次の工程をもたらす化合物をいう。

本発明の方法は、一般的に微生物発酵を用いる使用のために適している。酵母を含む真菌細胞及び大腸菌を含むバクテリア細胞を初めとするがこれらに限定されない多種多様な微生物細胞が本発明の方法における使用のために好適であることは、当業者にとって容易に明らかである。好ましい微生物発酵は、単離され、精製されるE B PまたはE B P融合タンパク質をコードしているプラスミドを保有する細胞のバクテリア発酵である。好ましいバクテリア発酵は、単離され、精製されるE B PまたはE B P融合タンパク質を発現する大腸菌の発酵である。大腸菌発酵以外のバクテリア発酵が本発明における使用のために好適であることは、当業者にとって容易に明らかである。利用するバクテリアの生育のために適したあらゆる液体培地中で微生物発酵を増大することができる。

本発明の方法により単離され、精製されるE B PまたはE B P融合タンパク質をあらゆる好適なE B PをコードするDNA配列から発現することができる。E B PをコードするDNA配列は、E P OレセプターをコードするDNAに由来することができ、これはそれ自体、E P Oレセプターを発現する細胞系または細胞型に由来する。

レセプター - I g融合分子は、2つのレセプターサブユニットを二量化することができる分子の発見及び記述のために特によく適していると思われる。可溶性レセプター内またはこれに結合したエピトープに対する抗体を用いることにより、レセプター - I g融合分子を置換することができ、これは、2つの可溶性レセプター分子の密接な会合を可能にする。この目的のために、化学結合により、または組み換え体として融合タンパク質を生産することにより、エピトープを可溶性レセプターに結合することができる。多種多様なエピトープが使用に適しており、ポリヒスチジンエピトープ、赤血球凝集素、グルタチオン、及びマルトース結合タンパク質を含むが、これらに限定されない。また、これらの系に本来備わっている柔軟性により、多量化複合体の検出及び分析も可能である。これらの系は、エリトロポエチンレセプターの使用に限定されず、シグナル伝達カスケードにおいて同種及び異種のレセプターの二量化並びに多量化の両方の方式を用いるレセプターにおいて

10

20

30

40

50

同様に有用であると思われる。異種の多量化の場合、2種以上の可溶性レセプターまたは可溶性レセプター-Ig融合分子の混合物を利用することができる。レセプター-Ig融合タンパク質を用いることの他の利点は、タンパク質の再生(refolding)工程を必要としない哺乳類細胞発現及び分泌、組み換え体宿主細胞からの融合タンパク質のアフィニティー精製、並びに利用できる免疫グロブリン重鎖の既知の機能及び構造特性を含むが、これらに限定されない。

細胞当たり高コピー数または細胞当たり低コピー数であることができる各種プラスミドにEBPをコードするDNA配列またはEBP-IgをコードするDNA配列を含むことができる。また、これらのプラスミドは、実質的にあらゆる大きさのものであることができる。組み換え体宿主細胞においてEBPまたはEBP-Igの発現をもたらすEBPコードDNA配列またはEBP-IgコードDNA配列を含有する実質的にあらゆるプラスミドを本発明の方法に用いることができることは、当業者にとって容易に明らかである。

適当なプロモーター及び他の適切な転写調節要素を含んでいる発現ベクターに分子クローニングし、そして原核生物または真核生物の宿主細胞に導入して組み換え体タンパク質を生産することにより、本明細書に記述される方法により得られるクローン化されたEBPコードDNA及びEBP-IgコードDNAを組み換え体として発現することができる。そのような操作のための技術は、Maniatis、T.、Fritsch、E.F.、Sambrook、J.；Molecular Cloning：A Laboratory Manual、第二版(Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、New York、1989)に完全に記述されており、当該技術分野においてよく知られている。

発現ベクターは、適切な宿主におけるクローン化された遺伝子のコピーの転写及びそれらのmRNAの翻訳のために必要とされるDNA配列として本明細書で定義される。大腸菌を初めとするバクテリア、藍藻、植物細胞、昆虫細胞、酵母細胞を初めとする真菌細胞、及び動物細胞のような各種宿主において真核生物の遺伝子を発現するためにそのようなベクターを用いることができる。

特別に設計されたベクターは、バクテリア-酵母またはバクテリア-動物細胞またはバクテリア-真菌細胞またはバクテリア-無脊椎動物細胞のような宿主間のDNAの往復を可能にする。適切に構築された発現ベクターは、宿主細胞における自己複製のための複製起点、選択マーカー、限られた数の有用な制限酵素部位、高コピー数の潜在能力及び活性のあるプロモーターを含まなければならない。プロモーターは、RNAポリメラーゼをDNAに結合させ、RNA合成を開始させるDNA配列として定義される。強力なプロモーターは、高頻度でmRNAを開始させるものである。発現ベクターは、クローニングベクター、修飾したクローニングベクター、特別に設計したプラスミドまたはウイルスを含むことができるが、これらに限定されない。

バクテリア細胞において組み換え体のEBPまたはEBP-Igを発現するために各種バクテリア発現ベクターを用いることができる。組み換え体EBP発現のために好適である可能性がある市販されているバクテリア発現ベクターは、pETベクター(Novagen)、pRSET、pTrcHis及びpTrxFusベクター(Invitrogen)、pQEベクター(Qiagen)、pFLAGベクター(Eastman Kodak International Biotechnologies Inc.)、pPROEXTM-1(商標)(Life Technologies、Inc.)、pKKベクター(Clontech)、pPL-Lambda(Pharmacia)及びpCalベクター(Stratagene)を含むがこれらに限定されない。

酵母のような真菌細胞において組み換え体のEBPまたはEBP-Igを発現するために各種真菌細胞発現ベクターを用いることができる。組み換え体のEBPまたはEBP-Ig発現のために好適である可能性がある市販されている真菌細胞発現ベクターは、pYES2(Invitrogen)、Pichia発現ベクター(Invitrogen)及びpYEUra3(Clontech)を含むが、これらに限定されない。

昆虫細胞において組み換え体のEBPまたはEBP-Igを発現するために各種昆虫細胞

10

20

30

40

50

発現ベクターを用いることができる。EBPまたはEBP-Igの組み換え体発現のために好適である可能性がある市販されている昆虫細胞発現ベクターは、pBlueBacII (Invitrogen)、pFastBac1 (Life Technologies, Inc.)、pBacPAKベクター (Clontech) 及びpAcベクター (PHARMINGEN) を含むが、これらに限定されない。

哺乳類細胞において組み換え体のEBPまたはEBP-Igを発現するために各種哺乳類発現ベクターを用いることができる。組み換え体のEBPまたはEBP-Ig発現のために好適である可能性がある市販されている哺乳類発現ベクターは、pMAMneo (Clontech)、pcDNA3 (Invitrogen)、pMC1neo (Stratagene)、pXT1 (Stratagene)、pSG5 (Stratagene)、EBO-pSV2-neo (ATCC 37593)、pBPV-1 (8-2) (ATCC 37110)、pdBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224)、pRSVgpt (ATCC 37199)、pRSVneo (ATCC 37198)、pSV2-dhfr (ATCC 37146)、pUCTag (ATCC 37460)、1ZD35 (ATCC 37565) 及びpEe12 (Celltech) を含むが、これらに限定されない。発現のために好適である可能性があり、市販されている哺乳類種由来の細胞系は、CV-1 (ATCC CCL 70)、COS-1 (ATCC CRL 1650)、COS-7 (ATCC CRL 1651)、CHO-K1 (ATCC CCL 61)、3T3 (ATCC CCL 92)、NIH/3T3 (ATCC CRL 1658)、HeLa (ATCC CCL 2)、C127I (ATCC CRL 1616)、BS-C-1 (ATCC CCL 26)、MRC-5 (ATCC CCL 171)、L細胞、HEK-293 (ATCC CRL 1573) 及びNS0 (ECACC 85110503) を含むが、これらに限定されない。

組み換え体宿主細胞における発現のためにEBPまたはEBP-IgをコードするDNAを発現ベクターにクローン化することができる。組み換え体宿主細胞は、大腸菌のようなバクテリア、酵母のような真菌細胞、ショウジョウバエ及びカイコに由来する細胞系を含むがこれらに限定されない昆虫細胞、並びに哺乳類細胞及び細胞系を初めとするがこれらに限定されない、原核生物または真核生物のものであってもよい。

形質転換、トランスフェクション、プロトプラスト融合、リポフェクション及びエレクトロポレーションを初めとするがこれらに限定されない多数の技術のいずれによっても、発現ベクターを宿主細胞に導入することができる。発現ベクターを保有している細胞をクローンとして増殖し、EBPタンパク質を生産するかどうかを決定するために個々に分析する。EBPを発現する宿主細胞クローンの同定は、抗-EBPでの免疫学的反応性及び宿主細胞に付随するEBP活性の存在を初めとするがこれらに限定されない、いくつかの方法により実施することができる。同様に、EBP融合タンパク質を発現する宿主細胞クローンの同定は、抗-EBP抗体での免疫学的反応性及び宿主細胞に付随するEBP活性の存在、並びに融合タンパク質の非EBP部分に特異的な抗体での免疫学的反応性、及び融合タンパク質の非EBP部分の宿主細胞に付随する他の活性を初めとするがこれらに限定されない、いくつかの方法により実施することができる。

遺伝暗号は縮重しているので、特定のアミノ酸をコードするために1種以上のコドンを用いることができ、従って、一組の類似したDNAオリゴヌクレオチドのいずれによってもアミノ酸配列をコードすることができる。この組の一つのメンバーだけがEBP配列と同一であるが、これは、適切な条件下で、ミスマッチを含んだDNAオリゴヌクレオチドの存在下でさえEBP DNAにハイブリダイズすることができる。別の条件下で、ミスマッチのDNAオリゴヌクレオチドは、EBP DNAになおハイブリダイズすることができ、EBPをコードするDNAの同定及び単離を可能にする。

特定のアミノ酸をコードする各種コドンにかなりの量の重複があることが知られている。それ故、本発明は、同じアミノ酸の最終的な翻訳をコードする別のコドンを含むEBPコードDNA配列にも関する。本明細書の目的のために、1個以上の置換されたコドンを保有する配列は、縮重変異体として定義される。また、本発明の範囲内に含まれるものは、

10

20

30

40

50

発現されるタンパク質の根本的な物理特性を実質的に変えないDNA配列または翻訳タンパク質のいずれかの突然変異である。例えば、ロイシンの代わりにバリン、リシンの代わりにアルギニン、またはグルタミンの代わりにアスパラギンの置換は、ポリペプチドの機能に変化を生じない可能性がある。さらに、当該技術分野でよく知られている技術を用いる部位特異的突然変異生成による天然に存在するグリコシル化部位の改変は、特定の部位でもはやグリコシル化されないタンパク質の生産をもたらすことができる。そのように修飾されたEBPが本発明の範囲内のEBP変異体であることは、当業者にとって容易に明らかである。

天然に存在するペプチドの特性と異なる特性を有するペプチドをコードするように、ペプチドをコードするDNA配列を改変することができることは知られている。DNA配列を改変する方法は、部位特異的突然変異生成を含むが、これに制限されない。改変される特性の例は、基質に対する酵素またはリガンドに対するレセプターの親和性の変化を含むがこれらに限定されない。

本明細書に用いられる場合、EBPの「機能的誘導体」は、EPO結合のEBP生物学的活性に実質的に類似した（機能または構造のいずれかの）生物学的活性を保有するタンパク質である。「機能的誘導体」という用語は、EBPの「フラグメント」、「変異体」、「縮重変異体」、「類似体」及び「同族体」を含む、または「化学的誘導体」と考えられる。「フラグメント」という用語は、EBPのあらゆるポリペプチドサブセットをさすことを意味する。「変異体」という用語は、全EBP分子またはそのフラグメントのいずれかに構造及び機能において実質的に類似した分子をさすことを意味する。両方の分子が実質的に類似した構造を有する場合、または両方の分子が類似した生物学的活性を有する場合、分子はEBPに「実質的に類似する」。従って、2つの分子が実質的に類似した活性を有する場合、これらの分子の片方の構造がもう片方に見いだされない場合でさえ、またはこれら2つのアミノ酸配列が同一でない場合でさえ、これらは変異体であるとみなされる。「類似体」という用語は、全EBP分子またはそのフラグメントのいずれかに機能において実質的に類似した分子をいう。

本明細書に用いられる場合、EBP-Igの「機能的誘導体」は、EPO結合というEBP-Igの生物学的活性に実質的に類似した（機能または構造のいずれかの）生物学的活性、及びEBPリガンドが結合した時に二量体を形成する能力を保有するタンパク質である。「機能的誘導体」という用語は、EBP-Igの「フラグメント」、「変異体」、「縮重変異体」、「類似体」及び「同族体」を含む、または「化学的誘導体」と考えられる。「フラグメント」という用語は、EBP-Igのあらゆるポリペプチドサブセットをさすことを意味する。「変異体」という用語は、全EBP-Ig分子またはそのフラグメントのいずれかに構造及び機能において実質的に類似した分子をさすことを意味する。両方の分子が実質的に類似した構造を有する場合、または両方の分子が類似した生物学的活性を有する場合、分子はEBP-Igに「実質的に類似する」。従って、2つの分子が実質的に類似した活性を有する場合、これらの分子の片方の構造がもう片方に見いだされない場合でさえ、またはこれら2つのアミノ酸配列が同一でない場合でさえ、これらは変異体であるとみなされる。「類似体」という用語は、全EBP-Ig分子またはそのフラグメントのいずれかに機能において実質的に類似した分子をいう。

本発明のEBP及びEBP-Igは、擬似リガンドの設計、発見及び生成、リガンド結合のインヒビターの設計、発見及び生成、リガンド結合のアゴニスト、アンタゴニスト及び他のモジュレーターの設計、発見及び生成、並びにEBP-リガンド相互作用部位の正確な特性化を可能にする結晶構造の生成を初めとするがこれらに限定されない、多種多様な薬剤発見技術において有用である。擬似EPOである化合物は、DNA、RNA、ペプチド、タンパク質、または非タンパク質の有機分子であってもよい。本発明は、擬似EPO及びインビボでEPOのレセプターへの結合を調節する他の化合物を設計し、同定するための方法にも関する。これらの活性を調節する化合物は、DNA、RNA、ペプチド、タンパク質、または非タンパク質の有機分子であってもよい。EPOレセプターをコードするDNAもしくはRNAの発現、またはEPOレセプタータンパク質の機能を高めるまた

10

20

30

40

50

は減じることにより、化合物は調節することができる。各種アッセイにより、EPOレセプターをコードするDNAもしくはRNAの発現、またはEPOレセプタータンパク質の機能を調節する化合物を検出することができる。アッセイは、発現または機能に変化があるかどうかを測定するための簡単な「イエス/ノー」アッセイであってもよい。試験試料の発現または機能を標準試料の発現または機能のレベルと比較することにより、アッセイを定量的に実施してもよい。この方法により同定されるモジュレーターは、治療薬として有用である。

EPOレセプターに結合し、これを活性化する分子または化合物（擬似EPO）を同定するための本発明の方法は、そのような活性を有する分子の設計、発見、検出及び特性化のために前以て形成された二量化鑄型を利用する。本明細書に用いられる前以て形成された二量化鑄型という用語は、十分に物理的に接近して拘束される2個以上の同種または異種の潜在的な結合ドメインを有する溶液中に存在する分子をいう。一般的に、レセプター-Ig融合分子の使用はそのような鑄型をもたらし、与えられた分子または化合物の非生産的及び生産的二量化複合体を生じる能力に関する情報を与える。生産的レセプター二量化複合体は、通例、シグナル変換及びそれに続く細胞の反応を引き出すことができる分子構造を有し、一方、非生産的レセプター二量化は、通例、シグナル変換及びその結果の次の細胞の反応を促進する特定のレセプター構造を欠いたレセプターの二量化をもたらす。レセプター-Ig融合物は、一般的に、組み換え技術により生産される、免疫グロブリン重鎖の一部に融合した与えられたレセプターの特定のリガンド結合ドメインに相当し、これは、次に自己結合して2つのレセプターリガンド結合ドメインを有する分子を生じる。EBP-Igは、そのようなレセプター-Ig融合物の一つであり、生産的または非生産的EPOレセプター二量化を生じることができる分子及び化合物を同定するための有用な前以て形成された二量化鑄型である。生産的EPOレセプター二量化を生じる分子及び化合物は擬似EPOである可能性があり、一方、非生産的EPOレセプター二量化を生じる分子及び化合物はEPOレセプターアンタゴニストである可能性がある。生産的EPOレセプター二量化複合体は、シグナル変換及び細胞増殖を引き出すことができる分子構造を有し、一方、非生産的レセプター二量化は、シグナル変換及びその結果の増殖を促進する特定のレセプター構造を欠いたレセプター二量化をもたらす。

製薬学的に受容しうる担体の混合によるような既知の方法に従って、EBP、EBPのモジュレーター、EBP-Igのモジュレーター及び/またはEPOレセプター活性のモジュレーターを含有する製薬学的に有用な組成物を調合することができる。そのような調合の担体及び方法の例は、Remington's Pharmaceutical Sciencesに見いだすことができる。有効な投与のために適した製薬学的に受容しうる組成物を形成するために、そのような組成物は、有効量のペプチドもしくはタンパク質、DNA、RNA、またはモジュレーターを含む。

組み換え体宿主細胞におけるEBPの発現の後に、EBPを回収して活性型のEBPを生じることができる。EBP発現プラスミドを保有している微生物細胞を発酵培地から集めて細胞ペーストまたはスラリーを生じる。遠心分離またはマイクロ濾過(microfiltration)を初めとするがこれらに限定されない、液体培地から細胞を集めるためのあらゆる常法が適している。

集めた細胞を好適な溶解バッファーで溶解する。遠心分離またはマイクロ濾過のような当該技術分野で知られている常法により、不溶性タンパク質を可溶性タンパク質から分離する。EBPは、細胞ライセートの可溶性及び不溶性タンパク質画分のいずれかまたは両方に存在する可能性がある。

以下に記述する系において生産されるEBPは、不溶性タンパク質として蓄積し、次にこれを回収し、再生してこのタンパク質の活性型を得る。本発明は不溶性のEBPタンパク質に限定されず、組み換え体宿主細胞において生産される可溶性のタンパク質も本発明の使用に適していることは、当業者にとって容易に明らかである。また、多種多様な発現ベクター及び宿主細胞を本発明で用いることができること、及び発現されるEBPをシグナル配列を含むまたはこれを欠くように作製することができることも、当業者にとって容易

10

20

30

40

50

に明らかである。さらに、シグナル配列を含む及び含まないE B Pを含んでなる発現されたE B Pの混合物からE B Pを精製するために本発明の精製方法を用いることができる。不溶性タンパク質画分を集め、適当な可溶化バッファーで可溶化する。可溶化したタンパク質を上記のように再び不溶性タンパク質から分離し、可溶性E B Pタンパク質画分を集める。当該技術分野で知られている常法により、適当な再生バッファー中で適当な時間の間インキュベーションすることにより、可溶化したタンパク質を巻き戻す。次に、巻き戻ったタンパク質を適当な疎水性相互作用クロマトグラフィー基質を用いて疎水性相互作用クロマトグラフィーに供する。適当な疎水性相互作用クロマトグラフィー基質の例は、オクチル-セファロース、ブチル-セファロース、フェニル-セファロース (Pharmacia) のようなアルキルもしくは芳香族置換のシリカもしくはポリマーに基づく樹脂；エチル-、プロピル-、ブチル-、フェニル-、ヘキシル-、オクチル、デシル-、ドデシル-、フェニルブチルアミン-もしくはフェニル置換ビーズ製アガロース (Supleco)；またはフェニルもしくはブチルトヨパールを含むがこれらに限定されず、フェニル-トヨパール650Mが好ましい。適当な溶出バッファーを用いてタンパク質を疎水性相互作用カラムから溶出する。本明細書に記述される方法により測定される活性型E B Pを含んでいる画分を集める。活性型E B Pは、カラムから溶出される最初の主要なタンパク質ピークに主に見いだされる。活性型E B Pを含んでいるカラム画分を集め、適当な高速サイズ排除クロマトグラフィー (HP-SEC) 基質を用いるHP-SECに供する。適当なHP-SEC基質は、セファクリル (Sephacryl)、セファロース (Sephadex)、スーパーデックス (Superdex) 及びセファデックス型樹脂 (Sephadex Sized Resins) を初めとする多孔性シリカ及びポリマーゲル濾過媒質；トヨパール (Toyopearl) HW、プロゲル (Progel) TSK (Supelco) を含むがこれらに限定されず、Bio-Sil SEC-250 (BioRad) またはTosoHaas G3000SWが好ましい。E B P活性を含むHP-SECカラムの画分を集め、これは、E P Oを結合する非常に純粋なE B Pに相当する。この非常に純粋なE B Pは、本明細書に記述される用途のために適している。E B Pの純度のレベルを変えることにより、本明細書に記述される用途のために適する可能性のあるE B Pが生じることは、当業者にとって容易に明らかである。

再生混合物からのE B Pの最初の回収は、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて実施してもよい。好適なバッファー中の増加する塩濃度勾配を用いると、2つの主要なタンパク質の吸収ピークの溶出をもたらし、最初の主要なピークが、活性型E B Pを含んでいる。好適な陰イオン交換媒質は、TSK-5w-DEAE、DEAEセファロース、QAEセファロースまたはDEAEセファロースを初めとするDEAEまたはQAEの機能的修飾を有する置換されたポリマーまたは非多孔性樹脂を含むがこれらに限定されず、DEAEセファロースファーストフロー (DEAE Sepharose Fast Flow) が好ましい。このようにして回収された活性型E B Pを高速サイズ排除クロマトグラフィー (HP-SFC) によりさらに精製することができる。

本明細書に記述される方法を用いる大腸菌で生産されたE B Pの再生は、持続するが、一時的なタンパク質再生中間体を同定し、これは、結局、活性型タンパク質に戻る。24時間の再生混合物から精製される活性タンパク質は、リガンド結合測定において7日間再生されたものと同じであり、これは、再生の期間に関係なく、タンパク質の単一の活性型のみがこれらの方法により精製されたという結論を支持する。HP-SFC試験により、この中間体は、活性型のタンパク質の約二倍の質量のタンパク質に相当する保持時間を有し、活性型のタンパク質より大きい液体力学容量を有すると思われることが示されている。これは、二量体の再生中間体またはタンパク質の2つの予想されるドメインの片方のみが再生されて増加した液体力学容量をもたらししている中間体の関与を示すことができる。

本明細書に記述される可溶性リガンド結合ドメインは、E P O反応性細胞系を投与量に依存して中和することにより検出されるように、E P Oの増殖特性を中和する。本発明のE B P及びE B P-Igのような、E P Oを中和する能力を有する分子は、赤白血病及び多

10

20

30

40

50

血症のようなEPO反応性増殖性疾患の治療における用途を有する可能性がある。また、インビボでEPOを中和するためにEBPを用いることもできる。さらに、本発明のEBP-Igは、この分子の免疫グロブリン重鎖部分から生じる向上した薬理学的特性を有する可能性がある。

本発明の方法及び生成物により、薬剤の設計及び発見、治療に役立つものとして、そしてNMR及び結晶学による構造研究のためを含むがこれらに限定されない、各種の用途に適する可能性のある活性型の非グリコシル化EBPを生成できる。バクテリアにおけるタンパク質の生産は、異核NMR試験のために必要である安定な炭素及び窒素アイソトープを容易に取り込むことができ、哺乳類細胞培養により生産される場合にタンパク質のグリコシル化により生じる異質性の潜在的複雑化要因を制限する。特に、本発明のEBPの精製方法により、結晶増殖のために好適な純度であり、それにより結晶学研究を可能にするタンパク質が生成される。

10

本発明のEBP-Igを生成するために、ヒトエリトロポエチンレセプター(EBP)のN末端の225アミノ酸をIgG1ヒト免疫グロブリン重鎖の一部に融合した。免疫グロブリン重鎖の部分は、重鎖のヒンジ領域を保持し、前以て形成された二量化誘型であるEBP-Ig分子を生じる。免疫グロブリン重鎖の部分は、別の重鎖分子と共有結合のジスルフィド結合を形成する能力を保持しているので、EBP-Igと称するこの分子は前以て形成された二量化誘型であり、この場合、2つのEBP-Ig分子は、2つの免疫グロブリン重鎖分子のようにジスルフィド結合を介して共有結合的に二量化されるようになることができる。

20

本発明のEBP-Igは、EBPをコードするDNA及び免疫グロブリン重鎖分子の所望する部分をコードするDNAを含有する発現プラスミドの構築により組み換え体として生産される。本発明のEBP-Igは、IgG1クラスの免疫グロブリンの重鎖を利用するが、EBP-Igの機能的同等物であるタンパク質を生成するために、他のクラスの免疫グロブリンの重鎖も本発明の方法における使用のために適していることは、当業者にとって容易に明らかである。本発明の方法における使用のために好適である他の免疫グロブリン重鎖分子は、免疫グロブリンIgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM及びIgEに由来する重鎖を含むが、これらに限定されない。

発現プラスミドを発現のために組み換え体宿主細胞に導入し、組み換え体として生産される生物学的に活性のあるタンパク質を宿主細胞から回収する。本発明のEBP-Igの発現のために各種発現プラスミドが好適であることは、当業者にとって容易に明らかである。EBP-Igの好ましい発現プラスミドはpSG5及びpEe12を含むが、これらに限定されない。

30

また、本発明のEBP-Igの発現のために各種宿主細胞が好適であることも、当業者にとって容易に明らかである。好ましい宿主細胞は、生物学的に活性のある組み換え体抗体分子またはそれらの一部を生産することができる細胞である。最も好ましい宿主細胞は哺乳類細胞であり、最も好ましい哺乳類細胞は、NS0細胞である。NS0細胞は、生物学的に活性のある組み換え体抗体分子を生産するそれらの能力が既知であるので、最も好ましい細胞である。さらに、NS0細胞は、免疫グロブリンの軽鎖を生産しない。他の哺乳類細胞が、本発明における使用のために好適であり、NS0、COS及びCHC細胞を含むがこれらに限定されないことは、当業者にとって容易に明らかである。

40

組み換え体宿主細胞により生産されるEBP-Igは、宿主細胞から、または宿主細胞によりEBP-Igが分泌された培養培地から精製される。本明細書に開示される薬剤発見方法における使用のために十分な純度のEBP-Igを得るために、多種多様な精製方法を利用することができる。組み換え体宿主細胞におけるEBP-Igの発現の後、EBP-Igタンパク質を回収して活性型のEBP-Igを得ることができる。いくつかのEBP-Igの精製方法が利用でき、使用のために好適であり、EBPに対して本明細書に記述される精製方法を含む。組み換え体の供給源からEBPを精製するために上に記述したように、塩分画、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイト吸着クロマトグラフィー及び疎水性相互作用クロマトグラフィーの各

50

種組み合わせまたは個々の適用により、細胞ライセート及び抽出物から、またはコンディションド培養メディウムから組み換え体 E B P - I g を精製することができる。好ましい方法は、アフィニティークロマトグラフィーを用いることであり、プロテイン G 及びプロテイン A / G が最も好ましい。分子の免疫グロブリン重鎖部分のプロテイン G 及びプロテイン A / G に対する親和性のために、プロテイン G またはプロテイン A / G が有用である。プロテイン A は有用であるが、E B P - I g に対して、より低い容量を有することが見いだされた。

さらに、E B P または E B P - I g の免疫グロブリン重鎖部分に特異的なモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて作製された免疫アフィニティークラムの使用により、組み換え体の E B P または E B P - I g を他の細胞タンパク質から分離することができる。

10

以下の実施例は、本発明を具体的に例示するために与えられるが、しかしながら、これらに本発明を限定しない。

実施例 1

E B P バクテリア発現ベクターの構築

細胞周辺腔に発現を導くために、重複伸長 P C R (Horton、R. M.、Hunt、H. D.、Ho、S. N.、Pulleh、J. K.、及び Pease、L. R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension、Gene 77、61 - 68) により、pel B シグナル配列 (Lei、S. P.、Lin、H. C.、Wang、S. S.、Callaway、J.、及び Wilcox、G. (1987)、Characterization of the Erwinia carotovora pel B gene and its product pectate lyase、J. Bact. 164、4379 - 12; Studier、F. W.、Rosenberg、A. H.、Dunn、J. J.、及び Dubendorff、J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes、Methods Enzymol. 185: 60 - 89) を成熟 h E P O R (Jones、S. S.、D'Andrea、A. D.、Haines、L. L.、及び Wong、G. G. (1990)、Human erythropoietin receptor: Cloning, expression, and biological characterization、Blood 76、31 - 35) の N 末端に融合した。2つの別個の DNA フラグメント、pel B シグナル配列をコードするものと成熟 h E P O R の細胞外ドメインのアミノ酸 1 - 225 をコードするものを P C R により作製した。pel B P C R フラグメントの末端の 16 ヌクレオチドを E B P P C R フラグメントの最初の 16 ヌクレオチドと同一であるように設計し、その結果、これら2つのフラグメントを重複伸長 P C R の鋳型として用いることができた。次のバクテリア発現プラスミドへのクローニングのために、重複伸長 P C R に用いる 5' 及び 3' のプライマーをそれぞれ Nde I 及び BamH I 制限部位を導入するように設計した。さらに、3' プライマーは、成熟 h E P O R のアミノ酸 226 の代わりに終始コドンを導入した。pel B - E B P P C R フラグメントを T7 プロモーター発現ベクター p E T 11 a (Novagen、Inc.、Madison、WI) の Nde I 及び BamH I 部位に連結し、DNA シークエンシングによりその配列を確かめた。

20

30

40

バクテリア発現のために、I P T G 誘導性の lac プロモーターの制御下で染色体上に T7 RNA ポリメラーゼを保有している大腸菌株 B L 21 (D E 3) p L y s S (Studier、F. W.、Rosenberg、A. H.、Dunn、J. J.、及び Dubendorff、J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes、Methods Enzymol. 185: 60 - 89) に p S A M 3 と称する得られた構築物 (図 1) を形質転換した。E B P は、lac オペレーターの調節下の T7 プロモ-

50

ターから発現される。lacリプレッサー (lacI) 及びアンピシリン耐性 (bla) をコードする遺伝子もプラスミドに存在する。典型的には、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリン及び $25\mu\text{g}/\text{mL}$ のクロラムフェニコールを含有する M9ZB 培地 (Studier、F.W. 等、(1990) 上記) で 0.6 ないし 0.9 の OD_{600} まで培養物を生育し、その時点で 1mM の最終濃度の IPTG でタンパク質発現を誘導した。さらに 2 ないし 3 時間インキュベーション後、本明細書に記述されるように、細胞を集め、EBP を単離し、精製した。

発酵

プラスミド pSAM3 で形質転換した親の大腸菌株 BL21 (DE3) pLysS (Studier、F.W. 等 (1990) 上記) (SM4 と称する) を $\text{OD}_{600} = 1.0$ 培養物の 8% グリセロールストック溶液として M9ZB amp/cap 培地 (リットル当たりの M9ZB amp/cap 培地: 10g N-Z-Amine A 、 $100\text{mL } 10\times\text{M9 最少塩類 (Minimal Salts) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO.)}$ 、 5g NaCl 、 1mM MgSO_4 、2% D-グルコース、 100mg アンピシリン及び 25mg クロラムフェニコール) 中で維持した。高密度発酵を 10 リットルの攪拌リットルタンクを備えた CF-3000 ファーマンター (Fermenter) (Chemap Inc., South Plainfield, NJ) で実施した。(リットル当たり) 20g N-Z-アミン A 、 5g NaCl 、 10g M9 最小塩類 、 0.12g MgSO_4 、 0.2g グルコース、 100mg アンピシリン及び 25mg クロラムフェニコールを含有する濃縮 M9ZB 培地を調製し、 $0.22\mu\text{m Milli-Pak 40 (Millipore Corp.)}$ 装置を通して濾過し、ファーマンターにポンプで入れた。pH 6.8 で 37 及び 20% 溶存酸素で培地を平衡化した後、 50mL の形質転換された大腸菌のグリセロールストック (上記参照) をファーマンターに接種した。誘導前に、グルコースの供給 (1 リットルの濃縮 M9ZB 培地に対して 400g のグルコース) により pH を維持した。 25.0 の OD_{600} 値が得られた時に、 1mM の最終濃度に IPTG を添加することによりタンパク質の過剰発現を誘導し、HCl の添加により pH を 6.1 に下げた。誘導期を一晩続けた。集菌時に、 OD_{600} 値は 36 であり、 445g の細胞ペーストが遠心分離により回収された。 6.1 の最終 pH は、倍加時間を非常に遅らせ、細胞増殖速度を制限するために必要な最終 pH は、正確な pH の制御及び厳密な調製により決まる。

構築された発現ベクターは、成熟ヒトエリトロポエチンレセプターの最初の 225 の N 末端残基をコードし、pelB シグナル配列を含み、これは、発現タンパク質を大腸菌の細胞周辺腔へ導いて可溶性の正しく再生された EBP を生じると予想された。可溶性の細胞周辺腔タンパク質調製物及び生育培地のウェスタンブロット分析は、誘導後にこれらの調製物中に存在する低いレベルのタンパク質を示した。SDS-PAGE により分析された培養物の煮沸抽出物は、IPTG での誘導を除いて同一条件下で生育した培養物には存在しない、誘導された培養物に存在する 2 種類の強いタンパク質バンドを示した。小さい方の種類の見かけの分子量は 27kDa と概算され、一方、ゆっくり移動する方の種類は、約 1.5kDa 大きいようであった。分析規模での不溶性タンパク質の回収は、主にこれら 2 種類であると思われるタンパク質の調製物をもたらした。可溶化、再生及び PBS へのバッファー交換後、このタンパク質の N 末端配列分析は、2 種類のタンパク質配列、EPo レセプターの成熟 N 末端配列に予想される最初の 6 アミノ酸に相当するもの、及び N 末端の pelB シグナル配列の最初の 6 アミノ酸を構成するもう一つのものを示した。これらのデータは一緒になって、この発現系が、両方とも不溶性でおそらく封入体に位置する 2 種類のタンパク質型、正しくプロセッシングされたアミノ末端を有する EBP に相当するものとコードした pelB シグナル配列を保持するものの生産をもたらすことを示す。pelB シグナル配列を欠いたプラスミド pSAM3 の変種は、大腸菌株 BL21 (DE3) pLysS において ESP を発現しなかったので、シグナル配列は、この発現系における EBP の生産のために必要であると思われる。EBP の高レベル生産のためにシグナル配列の存在を必要としない他のプラスミド構築物または他の大腸菌株を構築することが

10

20

30

40

50

できる。ompTシグナル配列を用いた別の構築物も、かなりの量の過剰発現された不溶性EBPを生成することが見られている。

シグナル配列が「付いた」及びシグナル配列が「はずれた」EBPの型の配分を変えるさらなる発酵を実施した。最初の制御された発酵試験は、より低い最終pHを有するより多量のプロセシングされたEBPを含む誘導培養物を明らかにした。続いて、完全にプロセシングされたEBPの生産のための実験プロトコルを開発した。最終的な発酵方法は、注意深く制御された酸素レベル及びタンパク質発現の誘導時の培養物の調節されたpHの減少を特徴とする。これは、SDS-PAGE分析の際に約27kDaのみかけの分子量を有するタンパク質種の発現をもたらす(図2、パネルA、レーンB対レーンC)。パネルA(還元)試料は以下の通りであった: A. Pharmacia LMWM; B. 誘導前; C. 誘導後; D. 再生混合物; E. HICプール; F. HP-SECプール(2.5 µg); G. HP-SECプール(5 µg)。パネルB(非還元)試料は以下の通りであった: A. Pharmacia LMWM; B. 再生混合物; C. HICプール; D. HP-SECプール(2.5 µg); E. HP-SECプール(5 µg)。

上記のような「シグナル配列が付いた」及び「シグナル配列がプロセシングされた」物質の混合物として生じるEBPを得るために、厳密性のより低い制御下での発酵を用いてもよい。これらの発酵から得られる不溶性EBPも、本明細書に記述される方法により再生、精製し、正しくプロセシングされたアミノ末端を有する活性型タンパク質を生じることができる。この再生及び精製は、プロセシングされていないシグナル配列を保持するタンパク質型の分離をもたらす。

実施例 2

タンパク質の回収及びタンパク質の再生

不溶性タンパク質の高レベル発現が得られると、活性型タンパク質を得るための封入体の回収及び再生のための条件を探索した。組み換え体タンパク質の再生において考慮される多数の因子に基づいて条件を開発した[Marston, F. A. O. (1986) The purification of eukaryotic polypeptide synthesized in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 240, 1-12; Light, A. (1985) Protein solubility, protein modifications and protein folding, *BioTechniques* 3, 298-306; Schein, C. H. (1990) Solubility as a function of protein structure and solvent components, *Bio/Technology* 8, 308-317]。封入体の回収のためには遠心分離が適切であることが分かり、この封入体は、3.5 Mの濃度の尿素で最も望ましく可溶化されることが見いだされた。この濃度の尿素は、EBPの>90%を効果的に可溶化したが、不溶性画分のいくつかの混入タンパク質を残した。再生の条件に関する初期の実験は、この工程の後に高速-サイズ排除クロマトグラフィー(HP-SEC)を続けることができることを示唆した。HP-SECの使用は、タンパク質の再生の経路が、正しく再生された活性生成物または様々な型のタンパク質凝集体のいずれかに向かって進む場合、分子の容積に基づいて区別する分析技術の使用が、再生プロトコルだけの効率を予想するはずであるという考えに基づいた。それ故、タンパク質の再生過程をWaters 991検出器を備えたWaters 625 HPLCシステムで高速サイズ排除クロマトグラフィー(HP-SEC)により測定した。同様な分離を与えるBioSil SEC-250(7.8 x 300 mm)(BioRad)カラムまたはG-3000 SWXL(7.8 x 300 mm)カラム(Supelco, Bellefonte, PA)で周囲温度で分離を実施した。分析カラムを1 ml/分の流速で10 mMリン酸ナトリウム、pH 7.2、150 mM NaClに平衡化し、220 nmで測定した。10 µgの精製した組み換え体ヒトEPO(1.7 mg/ml、比活性120ユニット/µg)を大量再生溶液の100 µlアリコートへ添加し、これに続くHP-SEC分析により、ピーク移動分析で活性型のタンパク質を検出した。次に、このクロマトグラムをE

P Oの非存在下で実施した大量再生溶液混合物の100 μ l アリコートのクロマトグラフィー分離と比較した。

上記の制御された発酵からの細胞ペーストの一部(74.3 g)を51 mgのフッ化フェニルメチルスルホニル、600 mgの卵白リゾチーム(Calbiochem)、1 mM $MgCl_2$ 及び12,500ユニットのベンゾナーゼ(Benzonase)(EM Science)を含有し、全体でEBP溶解バッファーと称する0.3 lのEBP溶解バッファー(10 mM TRIS-HCl、pH 7.5、150 mM NaCl)に溶解した。この混合物を時々攪拌しながら室温で1.5時間インキュベートした。得られたライセートを12,000 $\times$ gで4で15分間遠心分離した。上清を捨て、ペレットを、0.3 lのTEバッファー(TEバッファー:10 mM TRIS-HCl、pH 7.5、1 mM EDTA、3% NP-40[タンパク質グレード、Calbiochem])の添加後に、1分破碎の超音波処理の適用により分散させた。得られた懸濁液を8,000 $\times$ gで4で15分間遠心分離した。上清を捨て、不溶性タンパク質を0.3 lの水で洗浄した。ペレットを超音波処理(20秒)により再懸濁した。不溶性タンパク質を遠心分離(12,000 $\times$ g、15分、4)により回収した。回収されたタンパク質の湿重量は、洗浄上清をデカントした後で約3.5 gであった。

不溶性タンパク質ペレットをタンパク質のグラム当たり9 mlの可溶化バッファーに再懸濁し(可溶化バッファー:0.1 M TRIS-HCl、pH 8.5、3.5 M尿素、10 mM リシン、10 mMジチオトレイトール)、12,000 $\times$ gで4で15分間遠心分離した。尿素中におそらく存在するアミン反応性シアン酸塩のスカルベンジャーとして作用するためにリシンを添加した[Marston、F.A.O.及びHartley、D.L.(1990) Solubilization of protein aggregates、Methods Enzymol. 182、264-276]。この時点で、都合のよい停止点として回収された上清を4で一晩インキュベートすることができ、または再生工程に続けることができる。可溶化されたタンパク質のOD₂₈₀を可溶化バッファーに対して測定し(21.7 A.U./ml)、30 mlの可溶化タンパク質を再生バッファー(再生バッファー:0.05 M TRIS-HCl、pH 8.5、3 mM EDTA、10 mM リシン、2 mM還元グルタチオン、0.2 mM酸化グルタチオン)で1020 mlに希釈し、4で保存した。再生混合物の最終OD₂₈₀は、0.64であった。

再生混合物を用いた2種類のHP-SEC実験、リガンドを添加するもの及び添加しないものを実施することにより、リガン結合活性の定性評価が可能であった(図3)。不溶性EBPを本明細書に記述されるように可溶化し、4で6日間インキュベートした(図3、パネルA及びB)。図3、パネルAに示されるように、再生混合物のみを分析SECカラムに注入した場合、吸収のピークは約9.5分で見られ、これは、約25,000ダルトンの標準検量分子量に相当する。この値は、EBPの予想される24,724の分子量とよく一致する。この混合物に8.5 μ gのEPOを添加し、続いてクロマトグラフィーで分離すると、EPO-EBP複合体のピークが約8.1分で、そしてEPOのピークが約8.5分で検出された(図3、パネルB、図3、パネルAに示された実験を重ねた)。約9.5分の吸収ピークはほとんど完全になくなり、これは、EPOと相互作用してより大きいみかけの溶液相分子量を有する種を生じることができるEBP型の存在を示している。9.5分のピークのみがEPOと相互作用するようであり、これは、単一の活性型種を示している。10分より後に溶出するピークは、3,000ダルトン未満の分子量に対応した。図3、パネルCは、9.5分の溶出時間のピーク(ピーク2)により明白に示されるように、3.5 M尿素変性剤溶液を0.1 M尿素に希釈したすぐ後に、かなりの量の正しく再生されたタンパク質が見られることを示す。4で24時間のインキュベーション後、図3、パネルDに示されるように、9.5分(ピーク2)の活性タンパク質型及び8.2分(ピーク1)で溶出する種の両方で増加がみられた。これらの型の出現は、6-8分の保持時間を有するより高分子量のタンパク質型から、そして再生混合物中の不溶性タンパク質からであるようである。図3、パネルAに示されるように、8.2分のタンバ

10

20

30

40

50

ク質型は徐々に減少し、吸収は、活性タンパク質ピークに現れる。これらの実験は、再生混合物のアリコートにEPOを添加した際に、 $M_r = 25,000$ のタンパク質の明らかな移動を生じる(図3、パネルA及びB)。 $M_r = 25,000$ のピークのみがEPOの添加時に移動するようであり、これらの分析条件下での単一の活性型種の存在を示している。

再生混合物の時間にわたるHP-SEC試験は、 $M_r = 52,000$ の種が活性型の $M_r = 25,000$ の種にゆっくりと転化するという結果を生じた(図3、パネルAに比較した図3、パネルC、ピーク1及び2[6日の再生期間の後])。再生溶液は、わずかに濁ったままであり、不透明な溶液を生じさせる不溶性のタンパク質が、最初の24時間の再生の間にゆっくりと溶液に入り込み、さらなる活性型及び不活性型タンパク質種を生じさせると考えられた(図3、パネルC及びD)。この準安定性種は、持続することが観察され、そして非還元SDS-PAGE実験は、非常に長い再生工程の間に時間と共に何の違ひも示さなかったため、これらはジスルフィド結合した種と関係しないと思われた。この試験は、4日での持続したインキュベーションが、ピーク1で示される不活性物質からのさらなる活性生成物の蓄積をもたらすことを示唆し(図3、パネルA)、従って、再生工程は、典型的には5-7日間実施した(図3、パネルC対パネルA)。8.2分の分析HP-SEC溶出時間を有するタンパク質(図3、ピーク1)を分取HP-SECにより単離し、SDS-PAGEにより分析した。還元及び非還元の両方の条件下でこのタンパク質は単量体であるようであった。このピークは、結局、数日の再生期間の後に9.5分のピーク(図3、ピーク2)に応じて減少するので(図3、パネルA)、この種は、再生中間体であるかもしれないことが示唆される。

実施例3

タンパク質の精製

6日の再生期間の後に、最終再生混合物を37℃に温め、20mM TRIS-HCl、pH 7.5中の3.5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及びさらなる20mM TRIS-HCl、pH 7.5の添加により1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ に調整した。1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の再生混合物の最終調整容量は、1.5リットルであった。この溶液の分析HP-SEC分析は、再生混合物中のより高分子量の型が、ある程度、溶液から沈殿したことを示した。0.45µmのフィルターを通して濾過した後、この溶液を室温で8ml/分の流速でフェニル-トヨパールTSK 650M(Supelco)のカラム(5cm x 16cm)に供した。このカラムを1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /20mM TRIS-HCl、pH 7.5(バッファーA)で先に平衡化した。カラム添加の完了時に、バッファーAで洗浄することにより、カラム流出物の吸収(280nm)をベースラインまで下げた。カラムに結合したタンパク質を100%バッファーAから開始する20mM TRIS-HCl、pH 7.5(バッファーB)の2000mlの直線勾配、続いて1000mlのバッファーBで溶出した。8ml/分の流速を実験の間中維持した。2分間隔の画分を集めた。2つの主要なピークの吸収、すなわち、80%バッファーB近くのものと及び約200mlの100%バッファーBの後のもので溶出された(図4A)。これらのカラム画分(100µl)の分析HP-SECは、最初の吸収ピークが活性タンパク質を含むことを示し、画分85-102をプールし、限外濾過(Amicon YM-10膜)により濃縮した。回収された物質を次のクロマトグラフィー工程の前に0.45µmのフィルターを通して濾過した。

回収されたプール(22ml、60mgのタンパク質)をPBS、pH 7.5で平衡化したBio-Silプレカラム(7.5 x 21.5mm)の付いたBio-Sil SEC-250カラム(21.5 x 600mm、BioRad)で4ml/分でHP-SECに供した。4.5mlの注入を実施し、全プールを5回のクロマトグラフィー実験で分離した。1分の画分を集め、各実験からの活性画分(画分40-42)をプールし、Centriprep10装置(Amicon)で限外濾過により濃縮した(図4B)。回収されたプール(23ml、2.04mg/ml、46mg)をHP-SEC EPO結合分析(以下参照)により活性を、そして非還元及び還元SDS-PAGE分析(図2参

10

20

30

40

50

照)により純度を分析した。SDS-PAGEゲル(10-20%勾配SDS-PAGEプレート、84 x 70 x 1.0mm、Integrated Separation Systems、Natick、MA)をクーマシーブリリアントブルーR-250で染色した。

分析HP-SEC時に、このタンパク質は、高分子量凝集物の痕跡なしに9.5分の溶出時間を有する単一種として現れる(図4、パネルC)。クロマトグラフィー分離の前に過剰のEPOと混合すると、9.5分で見られたEBPは、約8.2分の保持時間を有する複合体に転化される(図4、パネルCに示される実験とかさねた図4、パネルD)。過剰より低いレベルでEPOを添加した場合、8.5分のEPOピークの完全な消失が見られ、8.2分の複合体のピークは残る。外見上均質なタンパク質への再生工程から、33%の全体的な収率で、細胞湿重量1グラム当たり約0.6mgの活性タンパク質の最終的なEBPの回収収量が見られた。表1に、大腸菌からの再生されたEBPの精製の結果が示される。

表1

画分	全タンパク質 (mg)	活性EBP ¹ (mg)	収率 (%)
再生混合物	195	138	100
HIC	60	58	42
SEC	46	46	33

注記：74. 3グラムの細胞(湿重量)から開始した。

1-活性タンパク質の%に基づいて、SECピーク面積から計算

した。

実施例4

EPO-EBP複合体の調製及び化学量論測定

HP-SECでEPO-EBP複合体を単離し、そして以下に記述するようにC-4逆相クロマトグラフィーでこの混合物内のタンパク質の比率を見積もることにより、結合複合体のEBP及びEPOの化学量論をさらに調べた。EPO及びEBPの検出器反応の標準曲線(図5、パネルA)を作製し、これは、各量の検体で3回の異なる分析試験で、誤差棒で示されるような低いレベルの反復誤差(1.0 S.D.)を有する直線の検出器反応を示した。図5、パネルBは、C-4分析の前にHP-SECにより精製された2つの異なるロットのEPO-EBP複合体の分析結果を含む。これらのデータは、本明細書に記述されるHP-SECデータと合わせて、EPO-EBP複合体の1:1の比率を示す。

以下のようにして複合体を得た。5mgのEPO及び12mgのEBP(過剰のEBP)を含む溶液を上記の方法により分取HP-SECに供した。最初に溶出するタンパク質ピーク(EPO-EBP複合体)を集め、C-4逆相HPLCによる分析に供した。簡潔に言えば、4.6 x 250mmのカラム(YMC-PACK、C4-AP、300A)を0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)を含有する水/アセトニトリル(80%/20%)で平衡化し、EPO-EBP複合体のアリコート1ml/分の流速で注入した。5分洗浄した後、0.1%TFAを含む20-100%アセトニトリルの直線勾配を20分にわたって用い、220nmで実験を測定した。これらの条件下で、EBP及びEPOは、ベースライン分離で、それぞれ14.1及び15.1分で溶出する。各タンパク質の標準曲線を定め、これは、検出器反応が50ないし500pmolの範囲にわたって直線である

ことを示した。複合体の各タンパク質のピーク面積を標準曲線と比較して複合体のEPO及びEBPの比率を決定した。

実施例 5

アミノ酸分析並びにN-末端及びペプチドフラグメントのアミノ酸配列分析

420H加水分解機(hydrolyzer)(Applied Biosystems、Foster City、CA)で標準的な技術により精製したEBPの溶液のアミノ酸分析を実施し、内部標準を用いてアミノ酸含有量を概算した。これらのデータを用いて、アミノ酸分析のために用いたタンパク質溶液の吸収に基づいて、280nmで57,500のEBPのモル吸収係数(2.3吸収ユニット/mg)を算出した。次に、この値を用いてEBP濃度を概算した。最初は、42,760の計算された吸収係数(Gill、S.C.及びvon Hippel、P.H.(1989)Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Anal. Biochem. 182、319-326)を用いたが、後にこれは結合滴定実験で間違っていることが示された。

10

標準的な気相エドマン分解化学を用いて2090E連続微量シーケンシングシステム(Integrated Micro-Sequencing System)(Porton Instruments、Fullerton、CA)でEBPのアミノ末端配列を決定した。反復収率は、85%より高かった。

ペプチドマッピングのために、PBS中約50µgのEBPを300µlの0.05M TRISバッファー、pH 8.5に添加した。この溶液に、水中1mg/mlのTPCK-トリプシン(Worthington、Freehold、NJ)2µlを添加し、この混合物を37℃で16時間インキュベートした。25µlのトリフルオロ酢酸で消化をクエンチし、混合物を0.45µmの膜フィルターを通して濾過した。消化産物をDynamax C-18 5ミクロン 300Åカラム(Rainin Instrument Co.、Woburn、MA)でHPLCにより分析し、1.0ml/分で、50分にわたって0-42%アセトニトリル/0.1%TFA、続いて10分にわたって同じバッファーの42-70%の勾配で溶出した。215nmの吸収ピークとして溶出する物質の画分を集め、スピードバック(Speedvac)で溶媒を留去した。これらのペプチドを上記のようにシーケンスした。

20

30

回収された物質の結合容量を測定し、タンパク質の同一性及び構造の完全性を確かめるために、いくつかのさらなる試験を実施した。これらは、N末端配列分析、TOF質量分析法及びEBPのリガンド結合容量を測定するために考案されたアッセイ形態を含んだ。N末端配列分析は、10サイクルの間予想されるN末端配列のみを示し(上記参照)、タンパク質の同一性を確認した。いくつかの内部トリプシンペプチドの配列分析も、タンパク質の予想される直線配列及び1-2、3-4の成分(principle)ジスルフィド結合パターンを確認した。

実施例 6

質量分析法

回収されたタンパク質の質量を確認するために、シナピン酸(sinapinic acid)基質及びウシカルボニックアンヒドラーゼ内部質量標準を用いて、Laser MAT装置(Finnigan-MAT、San Jose、CA)で基質補助(matrix-assisted)レーザー-脱着イオン化TOF質量分析法を実施した。図6、パネルBにEBPのMALDI/TOF質量スペクトルが示され、これは24,732ダルトンの分子イオン(MH+)を示す。カルボニックアンヒドラーゼイオン(CA+)の質量中心を装置の基準化のために用いた。EBP(MH2++)及びカルボニックアンヒドラーゼ(CA++)の二荷電イオンもこのスペクトルで明らかである。EBPの24,732の質量中心分子量は、24,724の計算される平均分子量によく類似し、タンパク質の同一性及び正しいカルボキシ末端欠失の両方を確証する。

40

実施例 7

50

E B P ビーズの調製及び平衡結合定数の測定 (スキッチャード分析)

上記の方法により製造された E B P は、1 個の遊離ジスルフィドリル基を保有し、これをリガンドの溶液相結合に影響を及ぼさずに修飾することができる。平衡結合分析用に E B P を固定化するために、この知識を E B P のアガロースビーズへの共有結合的接着のために拡張した。スルホリンク (S u l f o l i n k) ビーズ (P i e r c e C h e m i c a l C o.、R o c k f o r d、I L) のヨードアセチル活性化化学は遊離チオールに特異的であり、この結合が容易に可逆的ではないことを保証する。E B P - スルホリンクビーズを以下のようにして作製した。すなわち、スルホリンクゲル懸濁液 (10 ml) を結合バッファー (40 ml : 50 mM T R I S、pH 8.3、5 mM E D T A) と混合し、ゲルを沈降させた。上清を除き、結合させる E B P (結合バッファー中 0.3 - 1 mg / ml) を洗浄したビーズに直接添加した。この混合物を室温で 30 分間穏やかに揺すり、ビーズを室温で 1 時間沈降させた。上清を除いて保存し、ビーズを 20 ml の結合バッファーで 2 回洗浄した。これらの洗浄液を同様に保持した。次に、非結合部位をブロックするためにビーズを室温で 30 分間 20 ml の 0.05 M システインで処理した。最後に、ビーズを 50 ml の 1 M N a c l、次いで 30 ml の P B S で洗浄し、20 ml の P B S に再懸濁し、4 で保存した。最初の E B P 溶液の OD_{280} を反応上清及び 2 回の 20 ml 洗浄液に回収された全 OD_{280} と比較することにより、ビーズに共有結合した E B P の量を測定した。典型的には、用いた E B P の 40 - 60 % がビーズと結合したままである。

個々の反応チューブに E B P ビーズ (50 μ l) を添加することにより、結合アッセイを開始した。0.3 - 30 nM の [125 I] E P O (N E N R e s e a r c h P r o d u c t s、B o s t o n M A、100 μ Ci / μ g) を含むチューブで全結合を測定した。非特異的結合の測定のために、対応する [125 I] E P O 濃度の 1000 倍過剰のレベルで非標識 E P O を添加した。結合バッファー (P B S / 0.2 % B S A) で各反応容量を 500 μ l にした。これらのチューブを穏やかに揺らしながら室温で 5 時間 (平衡の樹立のために適当であると実験的に決定された期間) インキュベートした。5 時間後、各反応混合物をガラスウールを詰めた 1 ml のピペットチップに通した。チューブを 1 ml の洗浄バッファー (P B S / 5 % B S A) で洗浄し、この容量及びさらに 2 回の 1 ml 洗浄液をピペットチップに通し、遊離 E P O 濃度の測定のために集めた。放射性標識の各濃度で過剰のコールド E P O 実験から非特異的結合を測定し、全結合から引いて特異的結合を計算した。図 6、パネル A は平衡結合データを表し、挿入物は、パネル A のデータセットの一次変換 (スキッチャード) であり、5 nM $\pm$ 2 の K_d を示す。

実施例 8

エリトロポエチンレセプター競合結合分析

精製された E B P の増加する量を一定量の [125 I] E P O 及び E P O R 保有細胞に添加することにより、全細胞に基づく結合アッセイを実施した。過剰の E P O (1 μ M) の添加により非特異的結合を測定し、データ分析の前にこれを引いた。5 回のアッセイから概算された IC_{50} 及び K_i は、それぞれ 1.7 ± 1 nM 及び 0.94 ± 0.5 nM であると測定された。無傷の細胞表面 E P O レセプターと [125 I] E P O の結合に対する E B P の競合により、約 1.7 nM $\pm$ 1 の IC_{50} が得られた (図 7、パネル A)。簡潔に言えば、この実験を以下のように実施した。TF-1 細胞 (K i t a m u r a、T.、T a n g e、T.、T e r a s w a、T.、C h i b a、S.、K u w a k i、T.、M i y a g a w a、K.、P i a o、Y. - F.、M i y a z o n o、K.、U r a b e、A. 及び T a k a k u、F. (1989) E s t a b l i s h m e n t a n d c h a r a c t e r i z a t i o n o f a u n i q u e h u m a n c e l l l i n e t h a t p r o l i f e r a t e s d e p e n d e n t l y o n G M - C S F、I L - 3 o r e r y t h r o p o i e t i n. J. C e l l P h y s i o l. 140、323 - 334) を R P M I 1640、10 % ウシ胎仔血清、1 % L - グルタミン、1 % ペニシリン、0.1 % ストレプトマイシン及び 1 ユニット / ml の I L - 3 (G e n z y m e、C a m b r i d g e、M A) で維持した。[125 I] E P O を上記のように N

EN Research Productsから購入した。1段階レセプター結合アッセイ法を用いて競合結合試験を実施した。簡潔に言えば、対数増殖期の中間のTF-1細胞を含む培地を遠心分離し、細胞ペレットを 4×10^7 細胞/mlで結合バッファー(RPMI 1640、0.2% BSA、0.02% アジ化ナトリウム)に再懸濁した。EBPからの競合の存在下または非存在下で、無傷の細胞に対するEPOの結合をアッセイするために、 4×10^6 細胞、 $[^{125}\text{I}]$ EPO(典型的には80 pM)及びEBPを混合し、これらを二重に150 μL の最終容量内に含んだ。インキュベーションを1.5 mlのポリプロピレンチューブ中10 で一晩実施した。インキュベーション期間の最後に、結合混合物の120 μL アリコートにSarstedt RIAチューブ中の10% ショ糖のクッション300 μL 上に重ねた。細胞を微量遠心器で1分間ペレットにし、これらのチューブをすぐにドライアイス浴中に置いて中身をすばやく凍結した。チューブの底の先端を切り取るにより、細胞及び結合したリガンドを集め、ガンマカウンターで放射能を定量するためにこれらを12 x 75 mm試験管に移した。London-2(London Software、Chagrin Falls、OH)をデータの編集整理のために用いた。

10

実施例 9

細胞増殖中和アッセイ

ネズミのEPOレセプターを発現するEPO依存性の系である細胞系FDC-P1/ERを増殖し、以前に記述されたように維持した(Carroll、M. P.、Spivak、J. L.、McMahon、M.、Weich、N.、Rapp、U. R.及びMay、W. S. 1991. Erythropoietin induces Raf-1 activation and Raf-1 is required for erythropoietin-mediated proliferation. J. Biol. Chem. 266、14964-14969)。これらの細胞を10%の熱不活性化ウシ胎仔血清及び10ユニット/mlの組み換え体ヒトEPOを含有するRPMI 1640培地(Gibco)で維持した。増殖アッセイの阻害のために、FDC-P1/ER細胞を定常期まで生育し、遠心分離し、RPMI 1640培地(EPO無し)で洗浄し、EPOを欠いた培地で一晩培養した。各アッセイ点を3重で96ウェルのU底組織培養プレートでアッセイを設定した。各ウェルは、 4×10^4 細胞、0.5ユニット/mlのEPO及び各量の(培地中の)EBPを0.2 mlの最終容量で含んだ。プレートを37 で約48時間インキュベートし、その後、細胞を1 μCi /ウェルの $[^3\text{H}]$ チミジン(20 Ci/mmol、Dupont-NEN)で37 で6時間パルス標識した。Tomtec細胞収集器(harvester)を用いて細胞をガラス繊維フィルター上に集めた。LKB Betaplate 1205シンチレーションカウンターを用いてシンチラント(scintillant)でフィルターをカウントした。本明細書に記述される可溶性リガンド結合ドメインは、EPO反応性細胞系のFDC-P1/ERにおけるEPOの増殖反応を投与量に依存して中和することにより検出されるように、EPOの増殖特性を中和した。図7、パネルBに、EPO依存性細胞増殖のEBPによる阻害を示す。IC₅₀は、5 nM $\pm$ 1であると概算された。

20

30

本明細書に示される実施例は、一緒になって、本明細書に記述されるように製造される再生されたEBPが非常に活性があり、CHO細胞で生産されたEBPの1 nMの平衡結合定数(Yet、M. - G及びJones、S. S. (1993) The Extracytoplasmic Domain of the Erythropoietin Receptor Forms a Monomeric Complex with Erythropoietin. Blood 82、1713-1719)及び別のバクテリア発現系からの少量の正しく再生されたバクテリアで発現されたEBP-GST融合タンパク質(Harris、K. W.、Mitchell、R. A.、及びWinkelman、J. C. (1992) Ligand Binding Properties of the Human Erythropoietin Receptor Extracellular Domain Expressed in E. coli. J. B

40

50

iol. Chem. 267、15205 - 15209) とよく相関するが、高純度であること、融合タンパク質ではないこと、グリコシル化されていないこと、そして高収量で生産され、精製されることを初めとする利点を有することを示唆する。

実施例 10

ペプチド合成

一般的に、Applied Biosystems モデル 430A 及び 431A ペプチド合成機でメリフィールド固相ペプチド合成方法論を用いて、本明細書に記述される環式擬似 EPO ペプチドの全てを合成した。酸脱保護 (50% トリフルオロ酢酸 / 50% ジクロロメタン) 及び中和 (5% ジイソプロピルエチルアミン / N-メチルピロリドン) 工程後に、保護された BOC (t-ブトキシカルボニル) アミノ酸誘導体をヒドロキシベンゾトリアゾールエステルとして結合した。全長のペプチド-樹脂が得られるまで、酸脱保護、中和及び結合工程を繰り返した。完成した樹脂に結合したペプチドを 50% TFA で処理し、遊離 N 末端のペプチド-樹脂が得られた。側鎖の保護基を除去し、液体 HF-アニソール (容量で 10%) で -6 で 90 分間処理することによりペプチドを樹脂から切断した。次に、冷エチルエーテで遊離ペプチドを沈殿した。残っているスカベンジャー (アニソール) を除くために、さらにエーテル洗浄を実施した。次に、乾燥したペプチド-樹脂を 50% HOAc に抽出し、水で希釈し、凍結乾燥した。この未精製ペプチドを 0.1% TFA / アセトニトリルに懸濁することによりシステインを酸化し、続いて 1 mg / ml のペプチド濃度に水で希釈し、澄んだ溶液 (典型的には、30 - 50% AcN / 水) が得られた。約 8.0 の pH が得られるまでこのペプチド溶液に固体の重炭酸アニモニウムを添加した。攪拌したペプチド溶液にフェリシアン化カリウムを淡黄色の溶液が持続するまで滴下しながら添加した。酸化生成物の形成に関してこのペプチド溶液を分析逆相 HPLC により測定した。環式ペプチドは、典型的には、Vydac C18 カラムで還元開始物質の後に溶出した。環化反応時間は、特定のペプチド配列により、RT で 20 分から 18 時間まで変わった。精製前に、Bio-Rad AG 2-X8 陰イオン交換樹脂 (塩化物型) を黄色のペプチド溶液に添加して酸化剤 (鉄) を除いた。陰イオン交換樹脂を濾過により除き、ペプチド溶液の容量に等しい水の容量で洗浄した。合わせた濾過液を分取 HPLC カラム (Vydac C18) に添加し、0.1% TFA を含む水-アセトニトリル勾配を用いて 90 - 95% 純度の標的ペプチドを単離した。クロマトグラフィー中に顕著な直鎖ペプチドも得られた (典型的には、還元ペプチドが所望する環式ペプチドに接近して溶出した) 場合、フェリシアン化カリウムでの酸化工程を繰り返して還元された (?) 標的ペプチドの全体的な収量を最大にした。高純度の所望するペプチドを含んでいる分取クロマトグラフィーから集められた画分をプールし、凍結乾燥した。各合成の最終生成物を純度 (通常、> 95%) に関して分析 HPLC で、分子量に関してイオン-スプレー質量分析法で、そしてペプチド含有量に関してアミノ酸分析で特性化した。全ての環式ペプチド調製物は、エルマン試薬を用いると遊離スルフィドリル基に関して陰性であった。本明細書に開示される試験に用いるペプチドを表 2 に示す。

10

20

30

表 2

擬似 E P O ペプチド及び誘導体

RWJ#	(x)	ペプチド配列 *
61233		GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG [配列番号 : 1]
61279		YSCHFGPLTWVCK [配列番号 : 2]
61177		SCHFGPLTWVCK [配列番号 : 3]
62021	3,5- ジブロモ -tyr	GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG [配列番号 : 4]
61718		GGLYACHMGPMPTWVCQPLRG [配列番号 : 5]

* 全てのペプチドは、分子内ジスルフィド結合を介して環状であり、
C 末端でアミド化されている。

ペプチドの競合結合アッセイを本明細書に記述するように実施した。個々のペプチドを DMSO に溶解して 1 mM のストック溶液を調製した。全ての (2 重の) 反応チューブは、全部で 500 μ L の結合バッファー (PBS / 0.2% BSA) 中に 50 μ L の EBP ビーズ、0.5 nM [125 I] EPO [NEN Research Products, Boston, 100 μ Ci / μ g) 及び 0 - 500 μ M のペプチドを含んだ。DMSO に対するアッセイの感度の試験は、25% までの濃度の DMSO (V / V) が結合に対して有害な影響を及ぼさないことを示したので、全てのペプチドアッセイチューブで DMSO の最終濃度を検出できる影響のない値である 2.5% に調整した。大過剰の非標識 EPO (1000 nM) を含有するチューブを含むことにより、各個々のアッセイで非特異的結合を測定した。ペプチドを添加しない最初のアッセイ点を各アッセイに含んで全結合を測定した。結合混合物を穏やかに揺らしながら室温で一晩インキュベートした。次に、マイクロ - カラム (Micro - column) (Isolab, Inc.) を用いてビーズを集め、3 ml の洗浄バッファー (PBS / 5% BSA) で洗浄した。洗浄したビーズを含んでいるカラムを 12 x 75 mm のガラス管中に置き、結合した放射能レベルをガンマカウンターで測定した。非特異的結合を修正した後、結合した [125 I] EPO の量をコントロール (全体 = 100%) 結合のパーセンテージとして表し、ペプチド濃度に対してプロットした。IC₅₀ を EBP ビーズに対する [125 I] EPO の結合を 50% 減少する検体の濃度として定義した。

実施例 11

EPO 依存性細胞増殖アッセイ

天然のヒト EPO レセプターを発現する EPO 依存性の系である細胞系 FDC - P1 / h ER を候補ペプチドの擬似 EPO 活性を測定するために用いた。この細胞系は EPO 依存性の細胞増殖を示し、アッセイを以下のように実施した。細胞を 10% 熱不活性化ウシ胎仔血清及び 10 ユニット / ml の組み換え体ヒト EPO を含んでいる RPMI 1640 培地 (Gibco / BRL) 中で維持した。細胞増殖アッセイのために、細胞を定常期まで生育し、遠心分離し、RPMI 1640 培地 (EPO 無し) で洗浄し、EPO を欠いた培地で 24 時間培養した。

24 時間で細胞を数え、800,000 細胞 / ml に再懸濁し、40,000 細胞 / ウェルで分配した。各ペプチドのストック溶液 (DMSO 中 10 mM) を調製し、1 x 10⁻¹⁰ M から 1 x 10⁻⁵ M の最終濃度に 3 重に分配し、0.2 ml の最終容量に調整した。0.1% (V / V、最大) 未満の最終 DMSO 濃度は、細胞毒性または刺激作用を有さ

10

30

40

50

ないことが示された。標準EPO投与量反応曲線を各アッセイシリーズを用いて作製した。37で42時間(2回の細胞倍加)のインキュベーション後、1 μ Ci/ウェルの[³H]チミジンを添加し、インキュベーションを6時間続け、この時点で細胞を集め、カウントし、細胞増殖の尺度として[³H]チミジンの取り込みを評価した。結果を組み換え体EPOで得られた最大活性の半分を生じるために必要なペプチドの量として表し、これらを表3に示す。

実施例12

擬似EPOペプチドによるEBPの二量化

非水溶性の同一二官能基スルフィドリル反応性架橋試薬のDPDPB(1,4-ジ-[2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ブタン、Pierce Chemical Co.、Rockford, IL)を用いた試験のためにペプチドが介在するレセプターの二量化を安定化した。全ての反応及びコントロールは、最終濃度4.4%のDMSO及び0.007% TFAを含み、DPDPB(1.1mM)、400 μ Mのペプチドリガン、75 μ lのPBS、pH 7.5の存在下または非存在下でEBP(22 μ M)をインキュベートした。これらの試料を室温で4時間インキュベートし、4で12時間保存し、その後SDS-PAGE(10-20%勾配ゲル、Integrated Separations Systems、Natick, MA)により還元及び非還元条件下で分析した。二量体生成物の目視検出に基づいて、結果を陽性、弱く陽性、痕跡(trace)または陰性として表3に示す。

実施例13

EBP-Ig発現ベクターの構築

IgGを保有するプラスミドpSG5209IgG1[Alegre, M. L., Peterson, L. J., Xu, D., Sattar, H. A., Jeyeraiah, D. R., Kowalkowski, K., Thistlethwaite, J. R., Zivin, R. A., Jolliffe, L. K., Bluestone, J. A. A non-activating "humanized" anti-CD3 monoclonal antibody retains immunosuppressive properties in vivo Transplantation 57:1537-1543(1994)]を制限酵素Pst1及びBsiHKA1(BsiHKA1は、Pst1と合致するDNA末端を生じる)で消化してIgG1定常領域のDNAフラグメントを単離した。単離したIgG1フラグメントを制限酵素Pst1で消化したプラスミドpSG5p35sigにサブクローン化した。プラスミドpSG5p35sigは、B72.3シグナル配列[Whittle, N., Adair, J., Lloyd, C., Jenkins, L., Devine, J., Schlom, J., Raubitschek, A., Colcher, D., Bodmer, M. Expression in COS cells of a mouse/human chimaeric B72.3 antibody Prot. Engin. 1:499(1987)]を含む。IgG1定常領域を正しい方向で保有しているバクテリアクローンを制限酵素消化分析により確かめた。

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)並びに末端に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー: 5'GCATCTGCAGCG CCCCCGCCGAATCTTCCGGAC[配列番号7]及び3'TCACTCTGCAGAGTCCAGGTC GCTAGGCGTCA G[配列番号8]を用いてEBP DNAを増幅した。これらのプライマーは、pSG5p35sigプラスミドへのクローニングを容易にするために5'末端に設計されたPst1制限酵素部位を有した。EBP DNAを精製し、IgG1からの定常領域を保有するプラスミドpSG5p35sigに連結した。バクテリアへの形質転換後に、PCRを用いてEBPを保有するクローンを同定し、選択したクローンからプラスミドDNAを精製した。自動化DNAシーケンサー(Applied Biosystems Inc.)を用いてDNA配列を確かめた。

pSG5p35中のEBP-Ig融合構築物(EBP-Ig野生型と称する)を部位特異

的突然変異生成により修飾してIgのヒンジ領域に3個の突然変異アミノ酸を含む第二の構築物を作製した。EBP/Ig連結部のアミノ酸配列は、野生型構築物のIgヒンジの5'部分から読んでSer-Ala-Glu-Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys[配列番号9]である。このアミノ酸配列をSer-Ala-Glu-Pro-Ser-Ser-Ser-Asp-Ser[配列番号10]に変え、得られた構築物をEBP-Ig3Sと称した。

pSG5p35sigEBP-Ig構築物は、哺乳類細胞で一時的な発現が可能である。野生型または3SEBP-Igのいずれかで形質転換された安定な細胞系を樹立するために、EBP-Ig融合物をpSG5p35sigプラスミド構築物からサブクローン化し、プラスミドpEE12[Celltech Limited、Berkshire、UK]に連結した。

10

NS0発現細胞系の樹立

EBP-ヒトIgG1-pEE12構築物(3S突然変異体及び野生型)をNS0マウス骨髓腫細胞にトランスフェクトすることにより、EBP-Ig融合タンパク質を発現する安定に形質転換された細胞系を得た。優性選択マーカー遺伝子であるグルタミンシンターゼ(GS)を用いて、トランスフェクトされた細胞の選択を実施した。

NS0マウス骨髓腫細胞系(Celltech、Ltd.)は、NS-1由来のサブクローンであり、細胞内軽鎖を発現しない。これらの細胞をグルタミン及び10%FBSを添加したDMEM培地で培養した。トランスフェクションのための調製において、これらの細胞を対数増殖期で集め、PBSで洗浄した。最終細胞ペレットを3.6mlのPBSで 2.5×10^7 細胞/mlの最終濃度に再懸濁した。全工程の間、細胞を氷上で保持した。

20

トランスフェクトするDNA(EBP-IgG-3S、EBP-IgG-野生型)をトランスフェクションの前に制限消化により直鎖型に転化した。DNA及びNS0細胞を以下のように示した順序、すなわち、48 μ l(30 μ g)EBP-IgG-3SDNA、312 μ l dd H₂O、40 μ l 10X PBS及び400 μ l NS0細胞または68 μ (45 μ g)EBP-IgG-野生型DNA、292 μ l dd水、40 μ l 10X PBS及び400 μ l NS0細胞で0.4cmのBioRad Gene Pulse rキュベットに合わせた。コントロールのキュベットは、400 μ l 1X PBS及び400 μ l NS0細胞を含んだ。

30

トランスフェクションをエレクトロポレーションにより以下のように実施した。すなわち、1X PBSバッファ中の細胞及びDNAを短い高電圧パルスにさらし、DNAの導入を容易にする細胞膜内の一時的な微小孔の形成を誘導した。NS0細胞及びDNAの懸濁液を穏やかに混合し、氷上で5分間インキュベートした。キュベットをBioRad Gene Pulser中に置き、3 μ F(電気容量)及び1.5V(電圧)の設定で2回の連続電気パルスを与えた。エレクトロポレーション後、キュベットを5分間氷に戻した。次に、この懸濁液を前以て温めた生育培地に希釈し、各DNA構築物に対して(7)96ウェルプレートに配分した。DNAを含まずにエレクトロポレーションを実施した細胞を含むコントロールプレートも同時に調製して自然突然変異体の存在を測定した。プレートを5%CO₂の37 $^{\circ}$ Cインキュベーター中に置いた。

40

GS遺伝子によりコードされるグルタミンシンターゼは、グルタメートをグルタミンに転化する酵素である。NS0細胞は、不十分なレベルの内因性GS遺伝子発現のために、生育のためにグルタミンを必要とする。DNA構築物において、この遺伝子は、pEE12ベクター上に位置する。GS遺伝子を取り込むトランスフェクト細胞は、グルタミンに非依存性になる。GS遺伝子をゲノムに組み込んでいない細胞は、グルタミン依存性のままであり、グルタミンを含まない培地で生存しない。エレクトロポレーションの約18時間後に、全てのプレートにグルタミンを含まない選択培地を与え、認識できるコロニーが現れるまでインキュベートした。

トランスフェクションの約3週後に、識別でき肉眼で見えるコロニーが観察された。ELISAアッセイを用いて、EBP-Ig融合タンパク質の発現に関してこれらを選別した

50

。このアッセイにおいて、マイクロタイタープレートをやぎ抗 - ヒト Fc ポリクローナル抗体で被覆した。これらのウェルに組織培養試料を添加し、インキュベートして複合体を形成させた。次に、モノクローナル抗 - ヒト EBP 抗体を添加し、インキュベートし、続いて西洋わさびペルオキシダーゼに結合したヤギ抗 - マウス IgG 抗体を添加した。さらにインキュベーションした後、o - フェニレンジアミン (OPD) 基質を検出のために添加した。EBP - Ig 発現に関して陽性の試験試料は、黄色ないし橙色の変化を示す。色の強度は、存在する特定のタンパク質の量に比例する。コロニーを含んでいるウェルからの組織培養上清を 1 : 10 または 1 : 40 希釈で選別した。最も多量の免疫グロブリンを生産している細胞を含むウェルを選別し、さらなる分析のために増やした。

顕著な EBP - Ig を生産している細胞をさらに選択するために、96 時間の生育期間の後にタンパク質の生産を定量した。組織培養フラスコに 10 ml の選択培地中 2×10^5 細胞 / ml を接種し、37、5% CO₂ で 96 時間インキュベートした。この期間の最後に、アリコートを取り、細胞濃度及び力価を測定した。生産の評価を 96 時間当たりの $\mu\text{g} / \text{ml}$ として計算した。2 種の高生産体、3A5 (3S 突然変異体) 及び 4H3 (野生型) は、それぞれ、 $29 \mu\text{g} / \text{ml}$ 及び $23 \mu\text{g} / \text{ml}$ の値を与えた。これらの 2 系統を増やし、凍結し、続いて限界希釈によりサブクローン化した。サブクローニングの約 3 週後に、単一細胞クローンを 1 : 100 希釈で ELISA により選別した。各系統に 1 つの高生産サブクローンを選択し、96 時間の生産に関して評価し、凍結した。ELISA 値は、 $281 \mu\text{g} / \text{ml} / 96 \text{ 時間}$ (3A5G1) 及び $123 \mu\text{g} / \mu\text{l} / 96 \text{ 時間}$ (4H3H12) であった。

大規模生産のために、サブクローン 3A5G1 (3S 突然変異体) 及び 4H3H12 (野生型) からの細胞を 850 cm^3 のコーニングローラーボトル (Corning roller bottle) に増やした。3A5G1 では、全部で 22 のローラーボトルを CDR - 3 無血清培地中ボトル当たり 4×10^7 の細胞を接種した。細胞系 4H3H12 では、全部で 23 のボトルを CDR - 3 無血清培地中ボトル当たり 4×10^7 の細胞を接種した。ボトルを 10% CO₂ で満たし、37 で 14 日間インキュベートした。コンディションドメディウムを集め、遠心分離し、精製のための調製において滅菌濾過した。

実施例 14

EBP - Ig の精製

EBP - Ig (3S 突然変異体) を生産する NS0 細胞からのコンディションドメディウム (4.5 リットル) を PBS で 1 : 2 に希釈し、1.5 リットルのバッチで、PBS で先に平衡化した 100 ml のプロテイン G カラム (Pharmacia) にポンプで添加した。添加後に、カラムの出口での OD₂₈₀ がベースラインに戻るまでカラを PBS で洗浄した。20 mM クエン酸ナトリウム、pH 3.0 を用いて結合したタンパク質をバッチ方式で溶出し、タンパク質を含有する画分をプールした。これらの画分の pH を 1 M TRIS 塩基の添加により 7.0 に調整した。コンディションドメディウムの全容量を処理するためにこの工程を 3 回繰り返し、3 回の実験からの物質をプールした。4.5 リットルの開始物質からの全収量は、約 440 mg (約 $0.1 \text{ mg} / \text{ml}$) であった。予備実験で、EBP - Ig に対するプロテイン A の低い容量が示されたので、プロテイン G をアフィニティー媒質として用いた。

実施例 15

EBP - Ig フラッシュプレート EPO 放射性リガンド結合アッセイ

本明細書に記述されるようなヒト EPO レセプターの N 末端の 225 アミノ酸及び Ig 重鎖を機能的に連結した組み換え体遺伝子構築物を発現するように作製された NS0 細胞のコンディションドメディウムからアフィニティークロマトグラフィーにより EBP - Ig 融合タンパク質を精製した。ビオチン及びストレプトアビジンの相互作用は、アッセイプロトコールにおいて有用な試薬を捕捉し、効果的に固定するために頻繁に用いられており、ここでは、EBP - Ig を捕捉し、固定するための簡単な方法としてこれを用いている。まず、EBP - Ig をビオチンのアミン反応性誘導体で無作為に修飾してビオチニル化 - EBP - Ig を生成する。ストレプトアビジンで被覆したプレートの使用により、シン

チラントを染み込ませた被覆ウェル (Flashプレート、NEN-Dupont) の表面にビオチニル化 EBP-Ig を捕捉できる。リガンド結合ドメインに [^{125}I] EPO が結合すると、特定の距離の要求が満たされ、放射性リガンドにより出されるエネルギーに反応してシンチラントは光を出すように誘導される。結合していない放射性リガンドは、放射性崩壊からのエネルギーがシンチラントから遠すぎるので、測定できるシグナルを生じない。生じた光の量を定量してリガンド結合の量を概算した。この特定のアッセイ形態は、パッカードトップカウントマイクロプレートシンチレーション (Packard Top Count Microplate Scintillation) カウンターの多数ウェルプレート能力のために適していた。放射性リガンドとの競合結合により検出されるシグナルの量を減少することができる化合物、ペプチドまたはタンパク質を同定した。

10

ビオチニル化 EBP-Ig (3S 突然変異体) を以下のように調製した。EBP-Ig (3 ml、OD₂₈₀ 2.9) をセントリプレップ (Centriprep) 10 限外濾過装置を用いて 50 mM 重炭酸ナトリウム、pH 8.5 に交換した。交換したタンパク質の最終容量は 1.2 ml であった (OD₂₈₀ 2.6、約 2 mg の全タンパク質に相当する)。NHS-LC-ビオチン (Pierce) の 4 mg/ml 溶液 10 μl を添加し、この反応混合物を暗闇で氷上に 2 時間置いた。セントリプレップ 10 装置で反応バッファーを PBS に交換することにより、未反応のビオチンを除き、タンパク質試薬を等分し、-70 で保存した。各個々の結合ウェル (200 μl) は、1 $\mu\text{g/ml}$ の最終濃度のビオチニル化 EBP-Ig、0.5 nM の [^{125}I] EPO (NEN Research Products, Boston、100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) 及び (100% DMSO 中の 10 mM ストックからの) 0 - 500 μM の試験ペプチドを含んだ。全てのウェルを 5% の最終 DMSO 濃度に調整した。全てのアッセイ点を 3 重に実施し、各実験で、非標識 EPO の標準曲線を 2000、62、15、8、4 及び 0 nM の最終濃度で実施した。全ての添加を実施した後、これらのプレートを接着性表面封印剤で被覆し、室温で暗闇に一晚置いた。次の日に、検体によるシグナルのクエンチを制限するために全ての液体をウェルから吸引し、パッカードトップカウントマイクロプレートシンチレーションカウンター (Packard TOPCOUNT Microplate Scintillation Counter) でプレートをカウントした。非特異的結合 (NSB) を 2000 nM EPO のウェルの平均 CPM として、そして全結合 (TB) を非標識 EPO を添加しないウェルの平均として算出した。修正した全結合 (CTB) を $TB - NSB = CTB$ として計算した。CTB を 50% まで減少する試験ペプチドの濃度を IC₅₀ として報告した。典型的には、非標識 EPO の IC₅₀ 値は、約 2 - 7 nM であった。これらの結果を表 3 に示す。

20

30

実施例 16

蛍光偏光擬似ペプチドリガンド結合アッセイ

蛍光偏光 (FP) は、2 つの分子の会合または解離時に生じる分子の容積の変化に関する情報を与えることができる有用な技術である。顕著に大きい方の分子に対する親和性を有する小さい方の分子を蛍光で標識する場合、観察される蛍光偏光値は、結合時に著しく増加し、定量することができる。逆に、この複合体に非蛍光競合分子を添加する場合、蛍光偏光値の減少を予想することができる [Checovich、W. J.、Bolger、R. E. 及び Burke、T. Fluorescence polarization - a new tool for cell and molecular biology、Nature 375、254 - 256 (1995)]。3 ml の PBS に可溶化した 10 mg のペプチドを 1 ml の DMSO に溶解した 17.9 mg のフルオレセインイソチオシアネート (100 μl アリコートで添加した) で処理することにより、RWJ 61718 をフルオレセインレポーター基で標識した。RWJ 61718 は、単一のアミン (N 末端) を含み、1:1 の標識の取り込みが予想された。この混合物を氷上に置き、この溶液は、1.0 ml の DMSO の添加により透明になった。4 で 34 時間のインキュベーション後に、フルオレセイン標識した RWJ 61718 を逆相 HPLC により単

40

50

離した。全反応混合物を0.1%トリフルオロ酢酸(TFA; 移動相A)で1:2に希釈し、C-18逆相分取カラム(Vydac #218tp54)に8ml/分でポンプで添加し、0-100%の移動相B(0.7% TFAを含有するアセトニトリル)の90分の直線勾配で溶出した。530nmで蛍光生成物を含んでいる画分を集め(励起波長488nm、発光波長530nm)、凍結乾燥した。EBP-Igの存在下でFPの変化を測定することにより、60分近く(約60%の移動相B)で溶出する高い蛍光のピークが所望する生成物であると決定した。

レセプターリガンドとしてフルオレセイン標識したRWJ 61718を用いた競合FPアッセイを、蛍光偏光マイクロタイターシステム(Fluorescence Polarization Microtiter System)(Jolley Conso 10
lтин)を用いて以下のように確立した。各種濃度の試験ペプチド及びEBP-Ig(3S突然変異体、0.025mg/ml)を90μlのPBS中で室温で1時間インキュベートし、Dynatech Microfluorプレート96ウェルプレートに分配した。各ウェルにフルオレセイン-RWJ 61718を2.5μMの最終濃度に添加し(0.1% TFA中10μl)、続いて暗闇で室温でさらに1時間インキュベートした。8.0の装置電圧設定でミリ偏光(millipolarization)(mP)の値を得た。標識したペプチド及びPBSのみを含むウェルからベースラインのペプチド値を測定した。標識したペプチド及びEBP-Igのみを含む試験ウェルで全mPの読み取りを測定した。mP値のペプチド濃度に依存する競合減少を測定し、IC₅₀値を計算した。これらの結果を表3に示す。 20

表3

RWJ 番号	EBP ピーズ結合 IC ₅₀ (μM)	EBP-Ig 結合 IC 50 (μM)	FDCP-P1- hER ED50 (μM)	DPDPB 架橋	FP/EBP- Ig IC ₅₀ (μM)
61233	5	1	0.1	陽性	0.5
61279	70	60	8	陽性	6
61177	90	500	不活性	陰性	不活性
61718	3	0.1	0.1	陽性	0.35
62021	150	400	不活性	弱く 陽性	5

本明細書に記述される(表2)擬似EPOペプチド及びこれらの誘導体を、レセプターとの相互作用の形態を理解するために、そしてEPOレセプターに結合し、活性化するリガンドを発見するための確固たる方法を樹立するために、多数の異なるアッセイ系で分析した。細胞増殖試験(表3)は、どのペプチドがEPOレセプターを活性化する能力を有する 40
かを示し、そしてDPDPB架橋試験は、溶液中でEBPの二量化に必須であるペプチド決定基を特定した(図8)。EBPピーズでのレセプター-リガンド競合結合試験は面上に固定したレセプターを有し、従って、二量化が物理的に考えられず、与えられた競合物の単量体レセプターに対して作用する能力を測定するとみなされるかもしれない。逆に、各EBP-Ig分子は2個のリガンド結合ドメインを含むので、リガンドに依存するレセプターの二量化を検出するための前以て形成された鑄型に相当する。異なるアッセイ形態で、放射性標識したEPO及びフルオレセイン-RWJ 61718のように構造的に異なるリガンドを使用することは、競合物のレセプター結合特性の完全な概要に関する多様な情報を与える。例えば、RWJ 61233は、細胞増殖試験において擬似EPOとして機能し、EBP-ピーズ及びEBP-Ig結合アッセイの両方で同様なレベルで競合 50

し、D P D P B 架橋試験及びフルオレセイン - R W J 6 1 7 1 8 を標識リガンドとして使用する F P / E B P - I g アッセイで陽性であった。基本的に、R W J 6 1 2 7 9 及び R W J 6 1 7 1 8 のような増殖能力を有するペプチドは、アッセイ系の全てにおいて同様に作用する。

R W J 6 1 1 7 7 のような増殖能力のないペプチドは、架橋能力（レセプターの二量化）が不十分である可能性があり、F P - E B P - I g アッセイでは不活性であるが、E B P ビーズ及び E B P - I g 結合アッセイでは著しく異なる値（90 対 500 μ M）を与える。逆に、R W J 6 2 0 2 1 のような増殖能力はないが、いくつかの架橋能力を有するペプチドは、F P / E B P - I g では非常に効率のよい競合物として機能するが、E B P - ビーズ及び E B P - I g 結合アッセイでは非常に不十分であり、競合物の作用が、標識

10

したリガンドの性質により決まることを示す。
F P に基づくアッセイでのように生産的及び非生産的二量化の両方を検出するために、各種リガンドと共に E B P - I g を用いることができ、そのようなものとして、レセプターアンタゴニスト及びアゴニストの発見及び記述のために特に有用である。これは、生産的及び非生産的二量化の両方を検出するために他のレセプター - I g 融合物を用いることができることを示唆する。他のそのようなレセプター - I g 融合物の例は、成長因子、サイトカイン、ニューロトロフィン、インターロイキン及びインターフェロンに結合するレセプターを含むが、これらに限定されない。

【図 1】

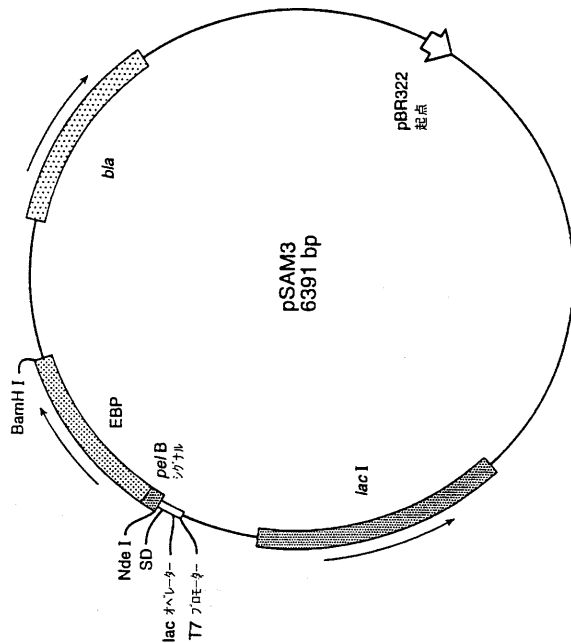
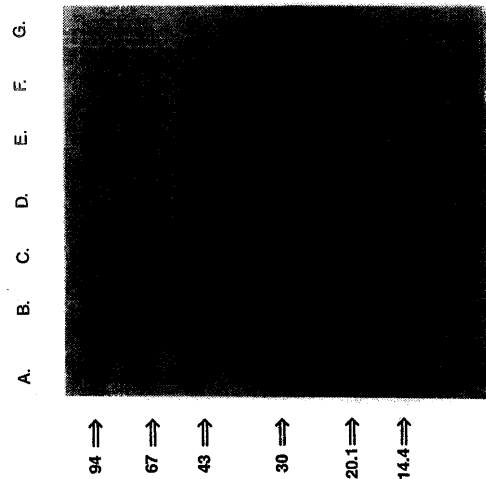


FIG. 1

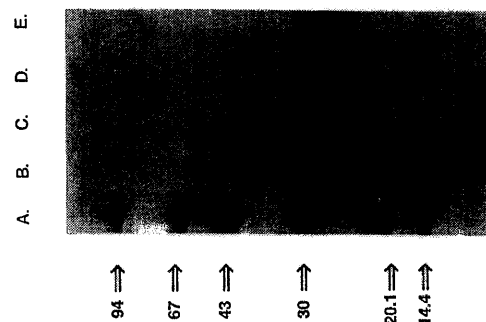
【図 2 A】

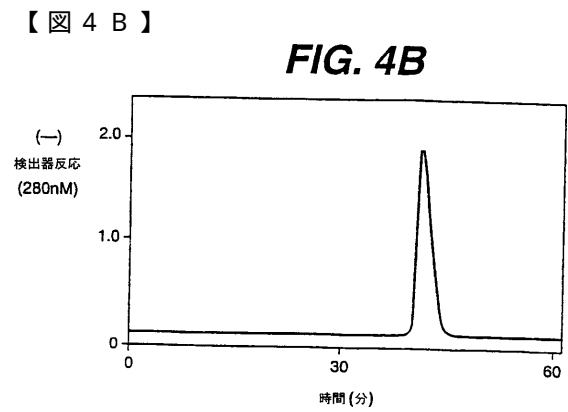
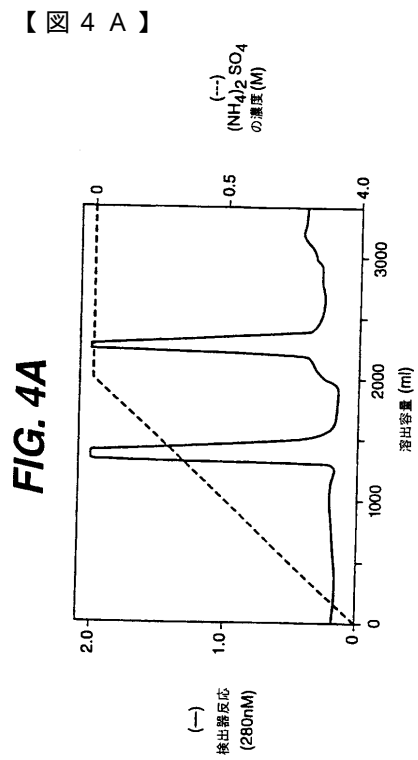
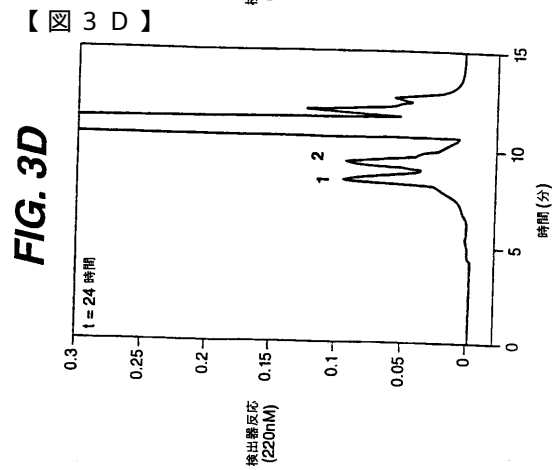
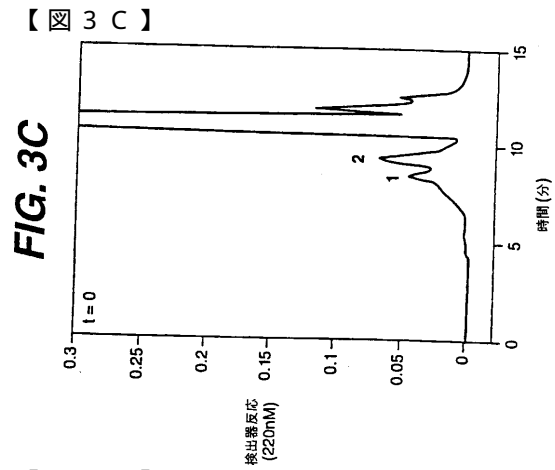
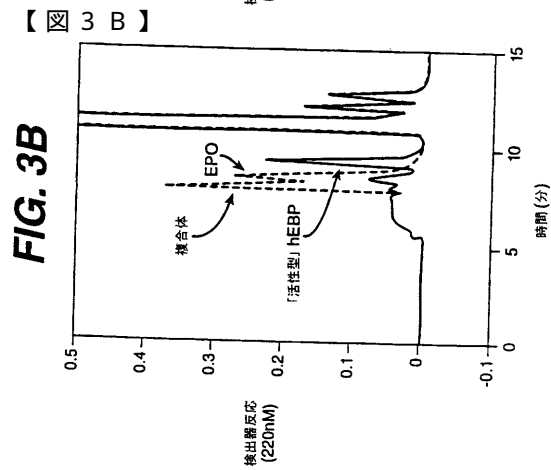
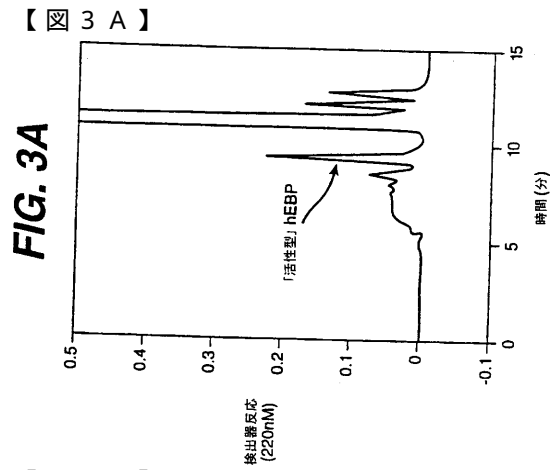
FIG. 2A



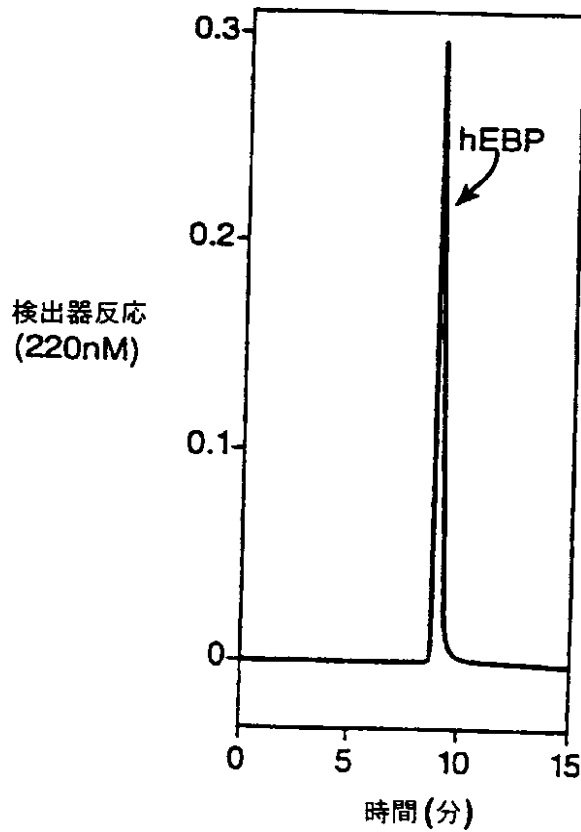
【図 2 B】

FIG. 2B

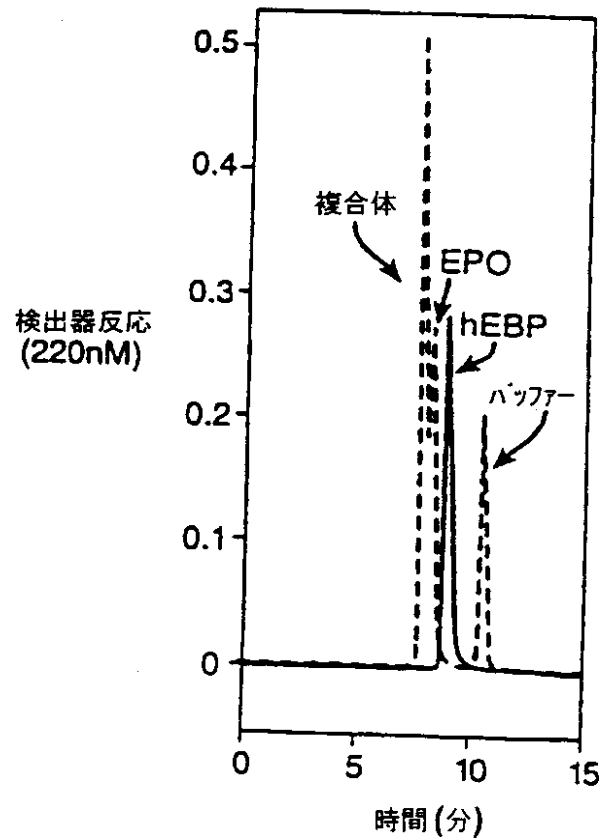




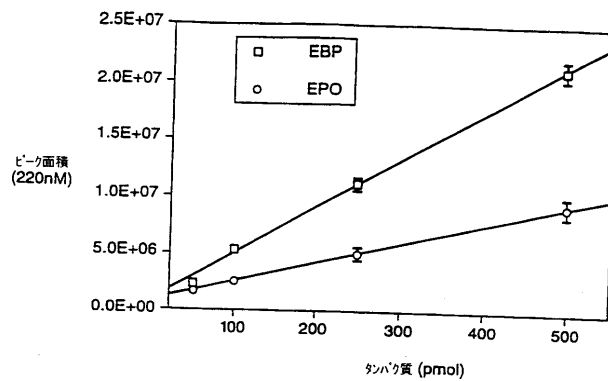
【図 4 C】

FIG. 4C

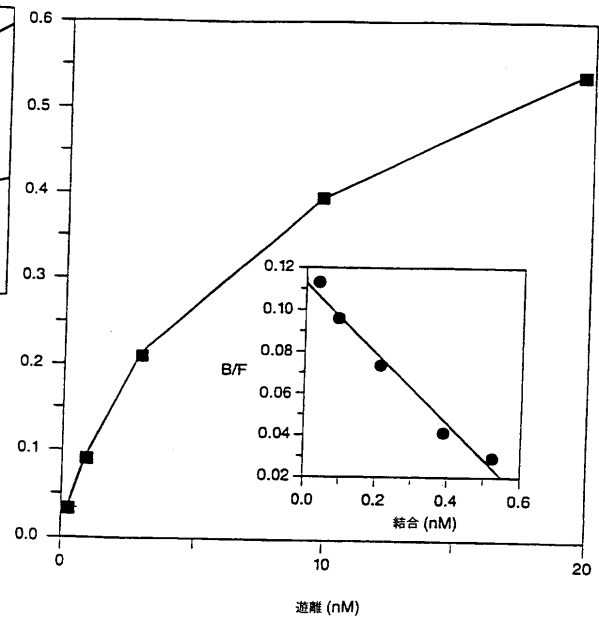
【図 4 D】

FIG. 4D

【図 5 A】

FIG. 5A

【図 6 A】

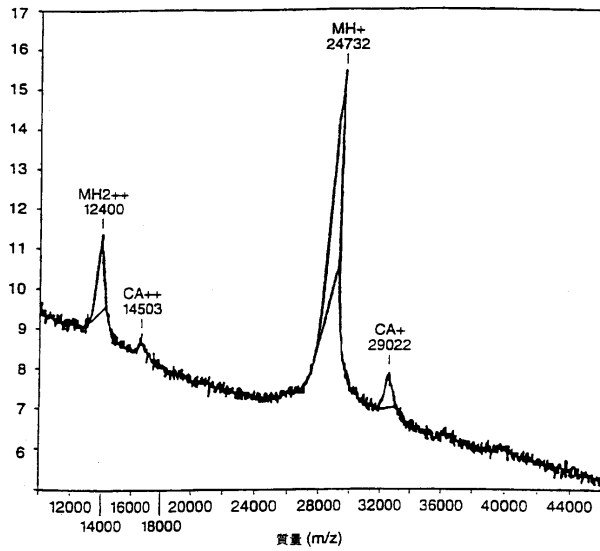
FIG. 6A

【図 5 B】

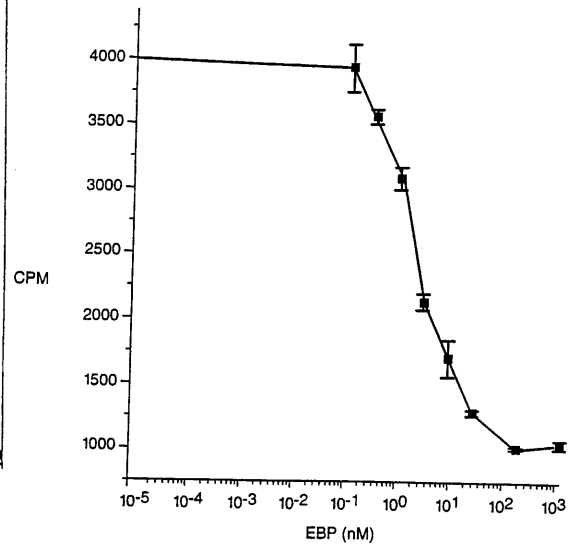
FIG. 5B

複合体	EPO (pmol)	EBP (pmol)	比率
C#1	208	178	1.17 : 1
C#2	340	307	1.11 : 1

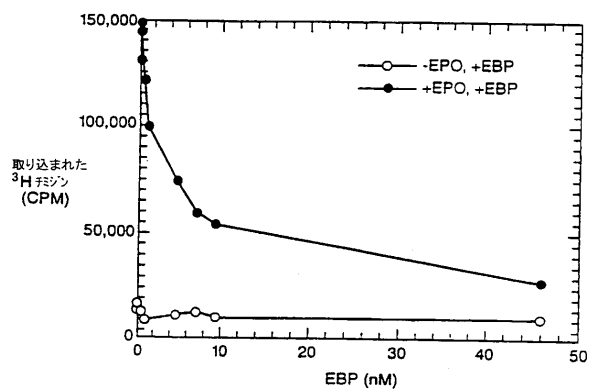
【図 6 B】

FIG. 6B

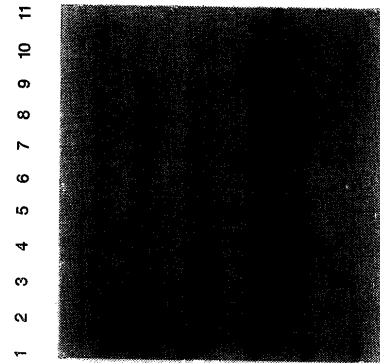
【図 7 A】

FIG. 7A

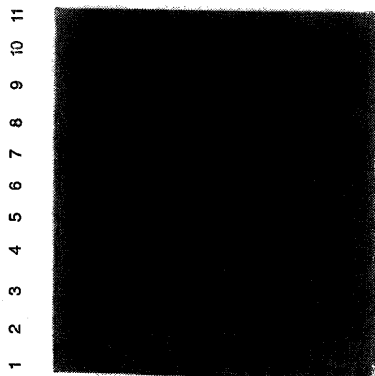
【図 7 B】

FIG. 7B

【図 8 B】

FIG. 8B

【図 8 A】

FIG. 8A

フロントページの続き

- (72)発明者 ジョンソン, ダナ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 8 9 7 2 アツパーブラツクエディ・ロンリーコティジロード 1
3 4 3
- (72)発明者 マクマホン, フランク・ジェイ
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 8 9 ホワイトハウスステーション・メンロドライブ 3
- (72)発明者 マルカヒー, リンダ・エス
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 6 7 ヤードレイ・ナンシーロード 5 6 1
- (72)発明者 ジョリフィー, リンダ・ケイ
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 5 0 2 ベルミード・ダベンポートウェイ 1 6

審査官 深草 亜子

- (56)参考文献 Blood, 1 9 9 3 年, Vol.82, p.1713-1719
Methods in Enzymology, 1 9 9 0 年, Vol.182, p.264-276
J.Biol.Chem., 1 9 9 2 年, Vol.267, p.15205-15209
Biochem.Biophys.Res.Comm., 1 9 9 4 年, Vol.200, p.482-488

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
C07K 14/705
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN)