(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3662250号
(P3662250)
(45)発行日　平成17年6月22日(2005.6.22)　(24)登録日　平成17年4月1日(2005.4.1)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C07K 14/705	C07K	14/705	
A61K 38/00	A61P	7/02	
A61P 7/02	A61P	37/02	
A61P 37/02	C12P	21/00	C
C12N 15/09	C12N	15/00	A

請求項の数 25　(全 35 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平6-505581
(86)(22)出願日　平成5年8月6日(1993.8.6)
(65)公表番号　特表平8-501773
(43)公表日　平成8年2月27日(1996.2.27)
(86)国際出願番号　PCT/US1993/007406
(87)国際公開番号　WO1994/003603
(87)国際公開日　平成6年2月17日(1994.2.17)
審査請求日　平成12年1月4日(2000.1.4)
(31)優先権主張番号　927,099
(32)優先日　平成4年8月7日(1992.8.7)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　500183858
アヴァント　イムノセラピューティクス,インコーポレーテッド
アメリカ合衆国　０２１９４　マサチューセッツ州、ニードハム、フォース　アベニュー　１１９
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100099128
弁理士　早川　康

最終頁に続く

(54)【発明の名称】可溶性補体受容体１の新規なグリコフォーム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

１つまたはそれ以上の複合オリゴ糖構造を含む、精製された可溶性補体受容体１（sCR1）糖タンパク質であって、１つまたはそれ以上の該構造が構造あたり平均１個またはそれ以上の末端シアル酸残基を含有する、上記の糖タンパク質。

【請求項２】

sCR1糖タンパク質から成る組成物であって、クロマトフォーカシングにより測定して5.1より低いかまたはこれに等しい等電点pIを有する主要なsCR1グリコフォームを示す、上記の組成物。

【請求項３】

sCR1糖タンパク質から成る組成物であって、該組成物中のsCR1の実質的に全部が１つまたはそれ以上の複合オリゴ糖構造を含み、該オリゴ糖構造の少なくとも40％がオリゴ糖構造あたり１個またはそれ以上の末端シアル酸残基を含有する、上記の組成物。

【請求項４】

前記組成物中のsCR1糖タンパク質の実質的に全部が１つまたはそれ以上の複合オリゴ糖構造を含み、該オリゴ糖構造の少なくとも69％がオリゴ糖構造あたり１個またはそれ以上の末端シアル酸残基を含有する、請求項３に記載の組成物。

【請求項５】

sCR1糖タンパク質から成る組成物であって、該組成物中のsCR1糖タンパク質の全部が0.25より大きいかまたはこれに等しいシアル酸対マンノースのモル比を有するsCR1糖タンパク

質の集団を形成している、上記の組成物。
【請求項６】
前記組成物中の全sCR1糖タンパク質の少なくとも40%がクロマトフォーカシングにより測定して5.1より低いかまたはこれに等しい等電点を示す、請求項２に記載の組成物。
【請求項７】
前記組成物中の全sCR1糖タンパク質の少なくとも75%がクロマトフォーカシングにより測定して5.1より低いかまたはこれに等しい等電点を示す、請求項６に記載の組成物。
【請求項８】
in vitro補体媒介溶血阻害アッセイで測定して、脱グリコシル化sCR1の少なくとも25%の機能的補体阻害活性を有する、請求項１に記載の糖タンパク質。
【請求項９】
in vitro補体媒介溶血阻害アッセイで測定して、脱グリコシル化sCR1の少なくとも25%の機能的補体阻害活性を有する、請求項２、３、４または５に記載の組成物。
【請求項１０】
前記sCR1糖タンパク質のタンパク質バックボーンが、膜貫通領域の最初のアラニン残基まで（このアラニン残基を含む）のLHR－Ａ、LHR－Ｂ、LHR－Ｃ、LHR－Ｄ、SCR29、およびSCR30の領域を含有する、請求項１に記載の糖タンパク質。
【請求項１１】
前記sCR1糖タンパク質のタンパク質バックボーンが、膜貫通領域の最初のアラニン残基まで（このアラニン残基を含む）のLHR－Ａ、LHR－Ｂ、LHR－Ｃ、LHR－Ｄ、SCR29、およびSCR30の領域を含有する、請求項２、３、４または５に記載の組成物。
【請求項１２】
治療に有効な量の精製されたsCR1糖タンパク質および医薬上許容される担体または賦形剤を含有する、不適切な補体活性化と関連した疾患または障害を治療するための医薬組成物であって、該sCR1糖タンパク質が１つまたはそれ以上の複合オリゴ糖構造を含み、１つまたはそれ以上の該構造が構造あたり平均１個またはそれ以上の末端シアル酸残基を含有する、上記の医薬組成物。
【請求項１３】
治療に有効な量の精製されたsCR1糖タンパク質および医薬上許容される担体または賦形剤を含有する、不適切な補体活性化と関連した疾患または障害を治療するための医薬組成物であって、該組成物中のsCR1糖タンパク質がクロマトフォーカシングにより測定して5.1より低いかまたはこれに等しい等電点pIを有する主要なsCR1グリコフォームを示す、上記の医薬組成物。
【請求項１４】
治療に有効な量の精製されたsCR1糖タンパク質および医薬上許容される担体または賦形剤を含有する、不適切な補体活性化と関連した疾患または障害を治療するための医薬組成物であって、該組成物中のsCR1糖タンパク質の実質的に全部が１つまたはそれ以上の複合オリゴ糖構造を含み、該オリゴ糖構造の少なくとも40%がオリゴ糖構造あたり１個またはそれ以上の末端シアル酸残基を含有する、上記の医薬組成物。
【請求項１５】
治療に有効な量の精製されたsCR1糖タンパク質および医薬上許容される担体または賦形剤を含有する、不適切な補体活性化と関連した疾患または障害を治療するための医薬組成物であって、該組成物中のsCR1糖タンパク質の実質的に全部が１つまたはそれ以上の複合オリゴ糖構造を含み、該オリゴ糖構造の少なくとも69%がオリゴ糖構造あたり１個またはそれ以上の末端シアル酸残基を含有する、上記の医薬組成物。
【請求項１６】
治療に有効な量のsCR1糖タンパク質を含有する、不適切な補体活性化と関連した疾患または障害を治療するための医薬組成物であって、該組成物中のsCR1糖タンパク質の全部が0.25より大きいかまたはこれに等しいシアル酸対マンノースのモル比を有するsCR1糖タンパク質の集団を形成している、上記の医薬組成物。

【請求項１７】
治療に有効な量の血栓溶解剤をさらに含有する、請求項12に記載の医薬組成物。
【請求項１８】
治療に有効な量の血栓溶解剤をさらに含有する、請求項13に記載の医薬組成物。
【請求項１９】
治療に有効な量の血栓溶解剤をさらに含有する、請求項14に記載の医薬組成物。
【請求項２０】
治療に有効な量の血栓溶解剤をさらに含有する、請求項15に記載の医薬組成物。
【請求項２１】
治療に有効な量の血栓溶解剤をさらに含有する、請求項16に記載の医薬組成物。
【請求項２２】
前記血栓溶解剤が次の群：
（ａ）プラスミノーゲンアクチベーターまたはその変異型；
（ｂ）アニソイル化プラスミノーゲン－ストレプトキナーゼ－アクチベーター複合体；
（ｃ）一本鎖ウロキナーゼ；
（ｄ）二本鎖ウロキナーゼ；および
（ｅ）ストレプトキナーゼ；
から選ばれる、請求項17、18、19、20または21に記載の医薬組成物。
【請求項２３】
炎症または不適切な補体活性化と関連した疾患または障害を治療する方法であって、かかる治療を必要としている非ヒト被験体に、請求項１に記載の精製sCR1糖タンパク質または請求項２、３、４または５に記載のsCR1組成物を含有する薬剤を投与することを含む、上記の方法。
【請求項２４】
血栓症を治療する方法であって、かかる治療を必要としている非ヒト被験体に、請求項１に記載の精製sCR1糖タンパク質または請求項２、３、４または５に記載のsCR1組成物を含有する薬剤を投与することを含む、上記の方法。
【請求項２５】
血栓症を治療する方法であって、かかる治療を必要としている非ヒト被験体に、請求項１に記載の精製sCR1糖タンパク質または請求項２、３、４または５に記載のsCR1組成物および、次の群：
（ａ）プラスミノーゲンアクチベーターまたはその変異型；
（ｂ）アニソイル化プラスミノーゲン－ストレプトキナーゼ－アクチベーター複合体；
（ｃ）一本鎖ウロキナーゼ；
（ｄ）二本鎖ウロキナーゼ；および
（ｅ）ストレプトキナーゼ；
から選ばれる血栓溶解剤を含有する薬剤を投与することを含む、上記の方法。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
本発明は、可溶性補体受容体１型（sCR1）の新規なグリコフォーム（glycoform）、ならびに補体活性を伴う疾患および種々の炎症および免疫疾患の診断ならびに治療におけるその使用に関する。本発明はまた、前記グリコフォームを生産し、検出し、精製する方法を提供する。
発明の背景
補体系
正常血清中のグロブリンの約10％を占める補体系は、外来抗原に対する免疫系の応答において重要な、多くの異なるタンパク質から構成されている。補体系はその一次成分が断片化されるときに活性化され、その断片が、単独でまたは他のタンパク質と一緒になって、別の補体タンパク質を活性化してタンパク質加水分解カスケードをもたらす。補体系の活性化は、血管透過性の増加、食細胞の化学走性、炎症細胞の活性化、外来粒子のオプソニ

ン化作用、細胞の直接的殺傷、および組織の損傷へと導く。補体系の活性化は抗原－抗体複合体（古典経路）が引き金となるか、または、例えば病原細菌の細胞壁に存在するリポ多糖（第二経路）が引き金となり得る。

膜結合補体受容体１型

補体受容体１型（CR1）は赤血球、単球／マクロファージ、顆粒球、Ｂ細胞、一部のＴ細胞、脾臓の濾胞樹状細胞、および糸球体の有足細胞の膜に存在している。CR1は補体成分C3bおよびC4bと結合することから、C3b/C4b受容体とも呼ばれている。CR1の構造的機構および一次配列は知られている（Klicksteinら,1987,J.Exp.Med.165:1095－1112,Klicksteinら,1988,J.Exp.Med.168:1699－1717;Hourcadeら,1988,J.Exp.Med.168:1255－1270）。これは60～70個のアミノ酸を含有する30のショートコンセンサスリピート（short consensus repeat:SCR）から構成されている。各SCRにおいて、平均65個のアミノ酸のうち29個が保存されている。各SCRはジスルフィド架橋を介して三次元三重ループ構造を形成すると示唆されており、ジスルフィド結合中に第３と第１の、そして第４と第２の半システインを有する。さらに、CR1は７つのSCRの４つのロング相同リピート（long homologous repeat:LHR）として配列される。翻訳後に除かれるリーダー配列に続いて、CR1分子は、C4b結合ドメインを含む大半のＮ末端LHR－Ａと、これに続くC3b結合ドメインを含む２つのリピートLHR－ＢおよびLHR－Ｃと、大半のＣ末端LHR－Ｄと、これに続く２つの追加のSCR、25残基の推定上の膜貫通領域および43残基の細胞質尾部とから構成される。

CR1はこのSCR相同により特徴づけられるタンパク質スーパーファミリーのメンバーである。C3/C4結合機能を有するスーパーファミリーの一部のメンバーとして、CR2、C4結合タンパク質、Ｈ因子、Ｂ因子、およびC2を挙げることができ、一方、この機能を欠くタンパク質としてはインターロイキン－２受容体、β２グリコプロテインＩ、C1r、ハプトグロビンα鎖、およびXIII b因子を挙げることができる。

CR1は糖タンパク質で、その推定アミノ酸配列は細胞外領域に25の潜在的なＮ結合グリコシル化部位（アミノ酸共通配列NXSまたはNXT）をもつことが知られている。利用可能な部位のうち６～８部位のみがオリゴ糖と結合していると報告された（Sim,1985,Biochem.J.232:883）。CR1の非グリコシル化形態はツニカマイシンの存在下で生産されたことがあり、iC3への結合低下を示した（Lublinら,1986,J.Biol.Chem.261:5736）。この糖タンパク質のＮ末端はブロックされているらしい。

これまでに、４つの異なるCR1の対立形質またはアロタイプが同定されており、大きさが30～50kDa増加する点で異なっている。これらのアロタイプの遺伝子頻度はヒト集団において相違する（Holerら,1987,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:2459－2463）。Ｆ（またはＡ）アロタイプは４つのLHRから構成され、約250kDaの分子量をもつ。より大きいＳ（またはＢ）アロタイプは分子量が約290kDaで、LHR－Ｂの5'半分とLHR－Ａの3'半分とのキメラである第５のLHRを含み、第３のC3b結合部位をもつと想定される（Wongら,1989,J.Exp.Med.169:847）。最も小さいF'（またはＣ）アロタイプは、LHR－Ｂと１つのC3b結合部位の欠失により生じたらしく、全身性エリテマトーデス（SLE）の患者に多く見られる（Van Dyneら,1987,Clin.Exp.Immunol.68:570;Dykmanら,1983,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:1698）。

可溶性補体受容体１型

天然に存在する可溶性形態のCR1は、正常な個体と一部のSLE個体の血漿中に検出された（Yoonら,1985,J.Immunol.134:3332－3338）。その特性は構造的にも機能的にも赤血球の（細胞表面）CR1の特性に似ている。Hourcadeら（1988,J.Exp.Med.168:1255－1270）も、分泌型のCR1をもたらすと想定されたヒトCR1転写単位中に別のポリアデニル化部位を見いだした。この末端切断型（truncated）配列によりコードされるmRNAはCR1の最初の8.5のSCRを含み、C4b結合ドメインを含有する約80kDaのタンパク質をコードする。この末端切断型配列に対応するcDNAをCOS細胞にトランスフェクトして発現させたところ、それは予期されたC4b結合活性を示したが、C3bと結合しなかった（Krynchら,1989,FASEB J.3:A368）。Krychらも、いくつかのヒト細胞系において想定されたものに類似したmRNAを見いだし、C4b結合活性を有する末端切断型の可溶性CR1がヒトにおいて合成されうると予想した。

また、いくつかの可溶性CR1断片が、発現すべきDNAから膜貫通領域を除去することにより組換えDNA法によって作製された（Fearonら,Intl.Patent Publ.WO 89/09220,10/5/89;Fearonら,Intl.Patent Publ.WO 91/05047,4/18/91）。可溶性CR1断片は機能的に活性で、C3bおよび／またはC4bと結合し、これらが含む領域に応じてＩ因子の補因子活性を示した。かかる構築物は好中球の酸化的バースト（oxidative burst）、補体媒介溶血、C3aおよびC5aの生産といった補体活性化の結果をin vitroで阻害した。可溶性構築物のsCR1/pBSCR1cも逆受身アルサス反応においてin vivo活性を示し（Fearonら,1989,1991,前掲;Yehら,1991,J.Immunol.146:250）、虚血後の心筋炎症および壊死を抑制し（Fearonら, 前掲;Weismanら,Science,1990,249:146－151）、移植後の生存率を高めた（Pruitt & Bollinger,1991,J.Surg.Res 50:350;Pruittら,1991 Transplantation 52:868）。さらに、ベクターsCR1/pBSCR1cの可溶性産物とｐ－アニソイル化ヒトプラスミノーゲン－ストレプトキナーゼ－アクチベーター複合体（APSAC）との同時処方がsCR1/pBSCR1cの産物単独と同様の抗溶血活性をもたらし、補体阻害剤sCR1と血栓溶解剤との併用が可能であることを示した（Fearonら, 前掲）。

1989年10月５日に公開された国際特許公開番号WO 89/09220および1991年４月18日に公開されたWO 91/05047をここに参考としてそのまま組み入れることにする。

発明の概要

本発明は、可溶性補体受容体１タンパク質（sCR1）の新規なグリコフォーム、ならびに補体活性を伴う疾患および種々の炎症および免疫疾患の治療におけるその使用に関する。

本発明者らは、ある種の生産条件のもとで、sCR1の新規なグリコフォームが得られ、これらは顕著な機能活性を保持しつつ血液からの持続的クリアランスの望ましい性質を示すことを見いだした。長期の機能的半減期は単純なボーラス用量の投与を可能にし、in vivo効力に寄与する。

本発明者らは、特定のsCR1グリコフォームを分離し、富化するために多様な精製法を適用した。かくして、本発明は、１つ以上の複合オリゴ糖構造（１つ以上の該構造が平均して１個以上のシアル酸残基で終わっている）を含有する可溶性補体受容体１（sCR1）糖タンパク質分子を提供する。

１つの実施態様において、sCR1糖タンパク質の調製物が提供され、該分子は１つ以上の複合オリゴ糖構造を含み、該オリゴ糖構造の少なくとも40％が平均して少なくとも１個の末端シアル酸残基を含有する。好ましくは、該分子は１つ以上の複合オリゴ糖構造を含み、その少なくとも70％が平均して少なくとも１個の末端シアル酸残基を含有する。

１つの態様では、sCR1調製物は、主要なグリコフォームがクロマトフォーカシングにより測定して5.1より低いかまたはこれに等しい等電点pIを示し、ノイラミニダーゼ処理後にはこのpIが増加する、sCR1糖タンパク質分子を含有する。

他の態様では、sCR1調製物は、糖タンパク質中のシアル酸対マンノースのモル比が0.25より大きいかまたはこれに等しいsCR1糖タンパク質を含有する。

好ましくは、本発明によるsCR1調製物は、脱グリコシル化sCR1の少なくとも25％の機能的補体阻害活性を有する。

本発明の分子または調製物の好ましい態様において、sCR1糖タンパク質のタンパク質バックボーンはLHR－Ａ、LHR－Ｂ、LHR－Ｃ、LHR－Ｄ、SCR29、およびSCR30（膜貫通領域の最初のアラニン残基までで、このアラニン残基を含む）を含有する。

本発明はまた、治療上有効な量の上記のようなsCR1糖タンパク質分子および医薬上許容される担体または賦形剤を含有する医薬組成物に関する。１つの態様では、医薬組成物は治療上有効な量の血栓溶解剤をさらに含有する。

好ましくは、血栓溶解剤は次の群から選ばれる：

（ａ）プラスミノーゲンアクチベーターまたはその変異型；

（ｂ）アニソイル化プラスミノーゲン－ストレプトキナーゼ－アクチベーター複合体（APSAC）；

（ｃ）一本鎖ウロキナーゼ；

（ｄ）二本鎖ウロキナーゼ；

（ｅ）ストレプトキナーゼ；
（ｆ）第１の二本鎖プロテアーゼの１つの鎖を第２の二本鎖プロテアーゼの１つの鎖に結合させた繊維素溶解活性ハイブリッドタンパク質であって、前記第１または第２のプロテアーゼの少なくとも一方が繊維素溶解活性を示すことから、前記ハイブリッドタンパク質が繊維素溶解活性に不可欠な触媒部位（除去しうる遮断基でブロックされていてもよい）を有するもの；および
（ｇ）可逆的にブロックされたin vivo繊維素溶解酵素であって、該酵素の繊維素溶解活性に不可欠な触媒部位が、加水分解の擬一次速度定数がpH7.4の等張水溶液中37℃で10^{-6}/秒～10^{-3}/秒の範囲となるような速度で加水分解により除去しうる基でブロックされているもの。

本発明はまた、炎症または不適当な補体活性化に関連した疾患または障害の治療方法を提供し、該方法は、かかる治療を必要とする患者に治療上有効な量の上記のようなsCR1医薬組成物を投与することから成っている。
また、血栓症の治療方法も提供され、該方法は、かかる治療を必要とする患者に有効量のsCR1医薬組成物、好ましくは血栓溶解剤を含有する上記のような医薬組成物を投与することから成っている。
上記方法において、患者はヒトであることが好ましい。
本発明は、さらに、上記のようなsCR1糖タンパク質またはsCR1調製物の生産方法に関し、該方法は、
（ａ）オリゴ糖鎖をシアリル化する能力がある培養下の哺乳動物宿主細胞において、sCR1のタンパク質バックボーンをコードするDNA分子を、細胞の生育が栄養素の供給によって制限されない条件下で発現させ、そして
（ｂ）培養物からsCR1糖タンパク質を単離する、
ことから成っている。
好ましい態様において、この方法は、
（ｃ）段階（ｂ）で得られた物質からシアル酸含有分子を単離する段階をさらに含んでいる。
上記方法において、好適な培養条件は流動床バイオリアクター、ホローファイバーバイオリアクター、ローラーボトル培養または攪拌タンクバイオリアクターシステムを含み、後者の２つのシステムには細胞マクロキャリアを備えたものと、備えていないものがある。
上記細胞培養物のsCR1糖タンパク質産物はアフィニティー、サイズ排除、イオン交換および／または疎水的相互作用クロマトグラフィーによって精製することができる。シアル酸含有分子の富化はカチオン－またはアニオン－交換樹脂を用いるHPLCまたはイオン交換ソフトゲルクロマトグラフィーにより行うことが好ましく、その際、より酸性の画分を集める。また、シアル酸含有分子はクロマトフォーカシングやレクチンアフィニティークロマトグラフィーによっても単離することができる。
哺乳動物宿主細胞は、好ましくは、発現されたsCR1糖タンパク質中のオリゴ糖の実質的なシアリル化を確実にするに足るレベルでシアリルトランスフェラーゼを発現する能力を有するものである。適当な宿主細胞としてはCHO細胞系があり、DUX B11細胞系が好ましい。

略号および定義

APSAC＝アニソイル化プラスミノーゲン－ストレプトキナーゼ－アクチベーター複合体
PI＝等電点
HPLC＝高性能液体クロマトグラフィー
IH50％＝溶血の50％阻止をもたらす濃度
SRBC＝ヒツジ赤血球
EIA＝酵素イムノアッセイ
w/v＝重量／容量比
v/v＝容量／容量比
kDa＝キロダルトン
ELISA＝酵素結合免疫吸着検定法

gu＝グルコース単位
SDS－PAGE＝ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動
グリコフォーム＝炭水化物含量、クロマトグラフ挙動および／または電荷によって特徴づけられる、本発明の可溶性CR1糖タンパク質のような等タンパク質の種
TP10HD＝LHR－Ａ、LHR－Ｂ、LHR－Ｃ、LHR－Ｄ、SCR29、SCR30領域（膜貫通領域の最初のアラニン残基までで、このアラニン残基を含む）を含有する特定の可溶性CR1構築物;TP10HDはプラスミドpBSCR1c中のCR1コード配列に相当する（Fearonら，国際特許公開No.WO 89/09220,1989年10月５日）
TP10HD－CC＝流動床灌流バイオリアクターで培養した細胞から産生され、本明細書中に記載する組合せクロマトグラフィーにより精製されたTP10HD
TP10HD－CCW＝分離用HPLCカチオン交換クロマトグラフィーにより単離された弱カチオン型のTP10HD－CC
TP10HD－CCS＝分離用HPLCカチオン交換クロマトグラフィーにより単離された強カチオン型のTP10HD－CC
TP10HD－CX＝ホローファイバーバイオリアクターで培養した細胞から産生され、HPLCカチオン交換クロマトグラフィーにより精製されたTP10HD（Fearonら，前掲）
TP10HD－CXD＝ｎ－グリカナーゼにより酵素的に脱グリコシル化されたTP10HD－CX

【図面の簡単な説明】

図１は、異なる方法で精製されたTP10HD調製物の分析用HPLCの結果を示す280nmでの一連の吸光度トレーシングである。TP10HDグリコフォームの存在を実証するために、Hydropore－SCX HPLC精製法の変法を採用した。
パネルA:アフィニティークロマトグラフィーにより精製されたTP10HD物質は多数のグリコフォームを含み、主要なグリコフォームは強カチオン性であった（すなわち、約125mMのNAClで溶出した）。
パネルB:組合せクロマトグラフィーにより精製されたTP10HD物質は多数のグリコフォームを含み、弱カチオン性対強カチオン性グリコフォームの濃度比は70:30から80:20の範囲であった。
パネルC:HPLCカチオン交換クロマトグラフィーにより精製されたTP10HDは強カチオン性グリコフォームのみを含んでいた。
図２は、50～250mMのNaCl勾配を用いたＳ－SepharoseカラムからのTp10HDの溶出プロフィールを示す。プール１およびプール２に対応するピークを示してある。流速を2ml/分とした。チャート速度は0.25cm/分とした。感度は280nmのフルスケールで0.2吸光度単位であった。
図３は、図２のＳ－Sepharoseカラムから溶出された物質のSDS－PAGEゲルパターンを示す。レーン1:高分子量標品；レーン５および8:S－Sepharoseプール１（それぞれ2.4μｇ）；レーン６および9:S－Sepharoseプール２（それぞれ5.0および6.7μｇ）
図４は、TP10HD－CCW（右のパネル）およびTP10HD－CCS（左のパネル）からのオリゴ糖鎖の４つのラジオエレクトロフォーレトグラムを示す。下段の２つのパネルはノイラミニダーゼ処理後のパターンを示す。
図５は、TP10HD－CCS（Ａ）およびTP10HD－CCW（Ｂ）からのオリゴ糖鎖の大きさおよび相対割合を示す２つのクロマトグラムである。
図６は、TP10HD－CC（上）およびTP10HD－CX（下）に関するクロマトフォーカシングカラムからのトレーシングを示す。

好ましい実施態様の詳細な説明

本発明は、可溶性補体受容体１タンパク質（sCR1）の新規なグリコフォーム、ならびに補体活性を伴う疾患および種々の炎症および免疫疾患の診断ならびに治療におけるその使用に関する。
本明細書では、可溶性補体受容体１（sCR1）は30の細胞外SCRドメインをすべて含有するヒトCR1の可溶性形態として定義される。
sCR1およびその調製方法は、国際特許公開WO 89/09220（1989年10月５日）およびWO 91/0

5047（1991年４月18日）に記載されている。好ましくは、sCR1物質は、組換えチャイニーズハムスター卵巣（CHO）DUX B11細胞を流動床灌流バイオリアクターで培養することにより調製される（上記WO 91/05047を参照）。好ましい面では、プラスミドpBSCR1c/pTCSgptを保有するCHO細胞系DUX B11（ATCC受託番号CRL 10052）を使用することができる。
本発明のsCR1グリコフォームはその炭水化物含量、クロマトグラフ挙動および／または電荷により特徴づけられる。従って、本発明は次のものを提供する：
（１）１個またはそれ以上のシアル酸残基で終わる複合オリゴ糖を含有するsCR1;
（２）クロマトフォーカシングにより測定して等電点pI≦5.1を有し、ノイラミニダーゼ処理後にはこのpIが増加するsCR1;
（３）オリゴ糖の少なくとも40％が１個またはそれ以上のシアル酸残基で終わる複合オリゴ糖を含有するsCR1調製物；
（４）オリゴ糖構造の少なくとも70％がシアル酸を末端基とする分子である、好ましくはオリゴ糖構造を含有するsCR1調製物；
（５）シアル酸対マンノースのモル比が≧0.25であるsCR1調製物；および
（６）非グリコシル化sCR1の少なくとも25％の機能的抗補体活性を有する好適なsCR1グリコフォームおよび調製物。
好ましい糖タンパク質は、自然界でヒト糖タンパク質中に存在するオリゴ糖に類似した、またはこれと同一のオリゴ糖を含有するものである。この種のオリゴ糖を含むsCR1調製物の利点としては、ヒトに投与した際にそれらが免疫原となる危険性が比較的低い点を挙げることができる。
本発明のsCR1グリコフォームおよび調製物はその機能活性によっても特徴づけられる。かくして、それらは下記のものを含むがこれらに限らないsCR1分子に関連した活性のいずれか１つまたはそれ以上を示すことが好ましい：
（１）単量体および／または高分子C3bおよび／またはC4bもしくはC4maと結合すること；
（２）補体活性化血清におけるC3aまたはC5a生産の阻害；
（３）Ｉ因子の補因子活性；
（４）補体誘導好中球酸化的バーストの阻止；および
（５）補体媒介溶血の阻止。

培養、精製およびsCR1グリコフォームの富化

本発明のsCR1グリコフォームおよび調製物は、組換えsCR1コード化DNAを発現する細胞を、流動床バイオリアクター、ホローファイバーバイオリアクター、ローラーボトル培養または攪拌タンクバイオリアクターシステム（後者の２つのシステムには細胞マイクロキャリアを備えたものと、備えていないものがある）を含むがこれらに限らない種々の細胞培養条件下で生育させることにより調製し得る。
本発明のsCR1グリコフォームは、sCR1をコードするかまたはsCR1の断片をコードするDNAを哺乳動物宿主細胞内で発現させることにより得られる。哺乳動物宿主細胞は、好ましくは、１個以上の末端シアル酸残基を有するオリゴ糖鎖を含有するsCR1グリコフォームの生産をもたらす機能的シアリルトランスフェラーゼを発現する能力のあるものである。本発明に適した宿主細胞としてはCHO細胞系があり、DUX B11細胞系が好ましい。
細胞の培養条件は希望するレベルのシアリル化を達成するように選ばれる。シアリル化の程度に影響を及ぼすプロセスパラメーターには酸素レベルとグルコースレベルが含まれる。細胞密度、時間、温度のような貯蔵条件もシアリル化に影響する。
複合オリゴ糖構造あたり２個またはそれ以上のシアル酸残基を含むsCR1グリコフォームはin vivoで比較的長いクリアランス速度を有する。かくして、調製物のクリアランス速度は調製物の全体的なシアリル化度によって広範囲に操作することができる。血清（または血漿）クリアランスに対する炭水化物含量の影響は機能活性に弱く関係している。つまり、脱グリコシル化は速やかな血漿クリアランスをもたらすが、in vitro機能活性の最小限の増強へ導くだけである。
これら培養物により産生されたsCR1グリコフォーム発現産物は、常套手段を使って、例えばアフィニティー、サイズ排除、イオン交換および／または疎水的相互作用クロマトグラ

フィー（HIC）により精製することができる。アフィニティークロマトグラフィーを用いる場合には、いくつかのCR1特異的抗体が利用される（Changelianら,1985,J.Immunol.134:1851）。

HICカラムの調製には多くのマトリックスを利用することができ、最も広く用いられているものはアガロースである。シリカや有機ポリマー樹脂も使用し得る。有用な疎水性リガンドとして約２～10個の炭素原子を有するアルキル基（例えば、ブチル、プロピル、オクチル）またはアリール基（例えば、フェニル）を挙げることができるが、これらに限らない。ゲルおよびカラム用の慣用のHIC製品は、フェニル－SEPHAROSE▲R▼、フェニル－SEPHAROSE▲R▼CL－4B、オクチル－SEPHAROSE▲R▼FFおよびフェニル－SEPHAROSE▲R▼FF（スウェーデン、ウプサラ、Pharmacia LKB AB）;TOYOPEARL Butyl 650M（Fractogel TSK Butyl－650）またはTSK－GELフェニル－5PW（日本、東京、Tosoh Corporation）；アルキル基が２～10個の炭素原子を含有するアルキル－アルガロース（イスラエル、レホボット、Miles－Yeda）；およびBakerbond WP－HI－プロピル（ニュージャージー州フィリップスバーグ、J.T.Baker）という商品名で商業的に入手可能である。

また、通常の化学を用いて希望のHICカラムを調製することもできる。例えば、Er－el,Z.ら，Biochem.Biophys.Res.Comm.49:383（1972）;Ulbrich,V.ら，Coll.Czech.Chem.Commum.9:1466（1964）を参照されたい。どのゲルを選ぶかは当業者が決めることができる。一般に、タンパク質とHICリガンドとの相互作用の強さはアルキルリガンドの鎖長とともに増加するが、大抵の分離には約４～８個の炭素原子を有するリガンドが適している。HICカラムへのタンパク質の吸着は高い塩濃度によって促進されるが、実際の濃度はタンパク質の性質および所定のHICリガンドに応じて広範囲にわたって変化しうる。一般的に、約0.75～2Mの硫酸アンモニウムまたは約１～4MのNaClの塩濃度が有効である。

溶出は、段階的であろうと勾配の形であろうと、いろいろな方法で、例えば、（ａ）塩濃度を変えることにより、（ｂ）溶媒の極性を変えることにより、または（ｃ）界面活性剤を添加することにより、達成し得る。

HICは他のタンパク質精製法と組み合わせて使用するとき特に有用である。

イオン交換クロマトグラフィーに関して当分野で公知であるように、アニオン性またはカチオン性支持体を形成するために種々のアニオンまたはカチオン置換基がマトリックスに結合される。アニオン交換置換基としてはジエチルアミノエチル（DEAE）、４級アミノエチル（QAE）および４級アミン（Ｑ）基が挙げられる。カチオン交換置換基としてはカルボキシメチル（CM）、スルホエチル（SE）、スルホプロピル（SP）、ホスフェート（Ｐ）およびスルホネート（Ｓ）が挙げられる。市販されているイオン交換材料には次のものが含まれる：セルロース系イオン交換樹脂、例えばDE23、DE32、DE52、CM－23、CM－32およびCM－52（英国ケント、メイドストーン、Whatman Ltd.）;SEPHADEXをベースとした架橋イオン交換体、例えばDEAE－、QAE－、CM－およびSP－SEPHADEX▲R▼ならびにDEAE－、Ｑ－、CM－およびＳ－SEPHAROSE▲R▼（Pharmacia AB）;DEAE－およびCM－誘導体化エチレングリコール／メタクリレートコポリマー、例えばTOYOPEARL DEAE－650SおよびTOYOPEARL CM－650S（ペンシルバニア州フィラデルフィア、Toso Haas Co.）。

サイズ排除またはゲル濾過クロマトグラフィーは分子の大きさに基づいて分離するものである。好ましいマトリックス材料は化学的に不活性で、硬質で、高度に多孔質の材料である。大規模法の場合は、全体的な流速を確立する上で硬さが最も重要となる。最近開発された硬さの増したゲルが好ましく、例えば、SEPHACRYL▲R▼、ULTROGEL▲R▼、FRACTOGEL▲R▼、SUPEROSE▲R▼およびTOYOPEARL HW系列マトリックス（Toso Haas）がある。

本発明の所望のsCR1グリコフォームは、カチオン－またはアニオン－交換樹脂を用いるHPLCまたはイオン交換ソフトゲルクロマトグラフィーによってシアル酸含有分子について富化することができ、その際、より酸性の画分を集める。sCR1グリコフォームを分離するのに適したマトリックスはＳ－Sepharoseである。全タンパク質精製法の初期段階でＳ－Sepharoseクロマトグラフィーにかけると、所望のsCR1グリコフォームを他のグリコフォームから分離することができ、残りの精製段階をこのグリコフォームに対して行う。これとは別に、下記の実施例Ｖに示すように、多段階タンパク質精製法の終わりに、グリコフォー

ムを分離するように設計された追加のＳ－Sepharose精製段階を行ってもよい。
また、特定のsCR1グリコフォームはレクチンアフィニティークロマトグラフィーやクロマトフォーカシングによっても選択することができる。
sCR1グリコフォームの複合炭水化物部分は、必要に応じて、炭水化物の通常の分析法により容易に分析することができる。かくして、例えば、当分野で公知のレクチンブロッティングのような技法を使うと、低割合の末端マンノースまたは他の糖（例えば、ガラクトース）を分析し得る。シアル酸によるモノ－、ジ－、トリ－、またはテトラ－アンテナリー（antennary）オリゴ糖の末端化は、無水ヒドラジンまたは酵素的方法を使ってタンパク質から糖を放出させ、イオン交換またはサイズ排除クロマトグラフィーもしくは当分野で公知の他の方法を用いてオリゴ糖を分画化することにより、確認することもできる。グリコフォームの同一性についての別の試験では、シアル酸を除くためのノイラミニダーゼ処理の前と後にpIを測定する。ノイラミニダーゼ処理後のpIの増加はそのグリコフォームにシアル酸が存在することを示すものである。

CR1グリコフォームの治療用途

本発明のsCR1グリコフォームおよび調製物は、表１に挙げた疾患および障害を含むがこれらに限らない、多くの補体媒介または補体関連疾患および障害の治療もしくは診断において有用である。

表　1

補体が関与する疾患および障害

神経障害

多発性硬化症

発作

ギラン・バレー症候群

外傷性脳障害

パーキンソン病

不適当なまたは望ましくない補体活性化の障害

血液透析合併症

超急性同種移植拒絶反応

異種移植拒絶反応

インターロイキン－２治療中のＩＬ－２誘導毒性

炎症疾患

自己免疫病の炎症

クローン病

成人呼吸窮迫症候群

火傷を含む熱傷または凍傷

虚血後再灌流状態

心筋梗塞

バルーン血管形成

心肺バイパスまたは腎臓透析におけるポンプ後症候群

腎臓虚血

感染症または敗血症

免疫複合障害および自己免疫病

慢性関節リウマチ

全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）

ＳＬＥ腎炎

増殖性腎炎

糸球体腎炎

溶血性貧血

重症筋無力症

不適当な補体活性化または炎症と関連した疾患または障害の治療方法では、かかる治療を必要としている患者に、治療上有効な量のsCR1グリコフォームまたは調製物を投与する。患者はヒトであることが好ましい。

疾患または障害を治療するためのsCR1グリコフォームの有効量は、0.01～100mg/kg、好ましくは0.1～10mg/kgの用量範囲である。

sCR1グリコフォームまたは調製物は、投与のために、適当な医薬組成物または治療用組成物に製剤化すべきである。こうした組成物は、一般に、治療上有効な量のsCR1グリコフォームまたは調製物および医薬上許容される賦形剤または担体（例えば、食塩水、緩衝溶液、ブドウ糖、水）を含有する。また、組成物は糖（マンノースおよびマンニトールを含む）のような安定化剤、および注射組成物用の局所麻酔剤（例えば、リドカイン）を含んでいてもよい。

補体活性化を阻止し、同時に血栓溶解治療を施すために、本発明は、治療上有効な量の血栓溶解剤をさらに含有する組成物を提供する。血栓溶解剤の有効量は0.01～10mg/kg、好ましくは0.1～5mg/kgの用量範囲である。好ましい血栓溶解剤としては、ストレプトキナーゼ、ヒト組織型プラスミノーゲンアクチベーター、およびウロキナーゼ分子とその誘導体、断片または結合体を挙げることができるが、これらに限らない。血栓溶解剤は、例えばプラスミンに結合されたウロキナーゼ（EP－Ａ－0152736）、水溶性ポリマーに結合された繊維素溶解酵素（EP－Ａ－0183503）といったハイブリッド分子（EP－Ａ－0297882およびEP 155387）を形成するために他の作用剤に融合されるかまたは可逆的に結合される１つ以上の鎖を含みうる。血栓溶解剤はまた、プラスミノーゲンアクチベーターのミューテインであってもよい（EP－Ａ－0207589）。好ましい態様において、血栓溶解剤は、米国特許第4,285,932号に記載されるような、可逆的にブロックされたin vivo繊維素溶解酵

素であり得る。最も好ましい酵素は、米国特許第4,808,405号に記載されるような、ｐ－アニソイルプラスミノーゲン－ストレプトキナーゼアクチベーター複合体であり、EMINASEという商標名でSmithKline Beecham Pharmaceuticalsから販売されている（一般名はアニストレプラーゼで、APSACとも呼ばれる;Monkら,1987,Drugs 34:25－49）。
補体活性化の阻止または上記のような併用治療に適する治療用組成物は、顕著な機能活性を保持しつつ血液からの持続的クリアランスを示す本発明の新規なsCR1グリコフォームまたは調製物を含有する。このような持続する機能的半減期は単純なボーラス用量の投与を可能にし、in vivo効力に寄与する。治療用組成物中の好ましい補体活性化阻害剤は、例えば、次のようなsCR1グリコフォームまたは調製物を含有する：
（１）１個またはそれ以上のシアル酸残基で終わる複合オリゴ糖を含有するsCR1グリコフォーム；
（２）クロマトフォーカシングにより測定して等電点pI≦5.1を有し、そのpIがノイラミニダーゼ処理に感受性である調製物；
（３）複合オリゴ糖の少なくとも40％が１個またはそれ以上のシアル酸残基で終わる複合オリゴ糖を含有するsCR1調製物；または
（４）シアル酸対マンノースのモル比が≧0.25であるsCR1調製物。
より好ましくは、治療上有効なsCR1グリコフォームおよび調製物は少なくとも70％のシアル酸を末端基とする分子を含有し、かつ非グリコシル化sCR1の少なくとも25％の抗補体活性をもつべきである。治療用組成物のさらに好ましい治療上有効な補体活性化阻害剤は、自然界でヒト糖タンパク質中に存在するものに類似したまたはこれと同一のオリゴ糖を含有すべきである。
本発明の別個のまたは併用治療組成物の投与経路としては標準的な経路、例えば静脈内注射またはボーラス注射を挙げることができる。有効な補体遮断剤と血栓溶解剤を一緒に、または連続的に任意の順序で投与してもよい。
本発明はまた、ヒトまたはヒト以外の動物の血栓状態、特に急性心筋梗塞の治療方法を提供する。この方法は、かかる治療を必要とするヒトまたは動物に、有効量の本発明によるsCR1グリコフォームまたは調製物および有効量の血栓溶解剤を投与することから成っている。
また、ヒトや動物の血栓状態を治療するための医薬の製造における本発明のsCR1グリコフォームまたは調製物および血栓溶解剤の使用も提供される。前記方法および使用は以前（国際特許公開WO 91/05047、参考としてここに組み入れる）に記載されたとおりに行うことができる。
本発明は、さらに、ヒトまたはヒト以外の動物の成体呼吸窮迫症候群（ARDS）の治療方法を提供する。この方法は、患者に有効量の本発明によるsCR1グリコフォームまたは調製物を投与することから成っている。
また、本発明は、有効量の本発明によるsCR1グリコフォームまたは調製物を投与することにより、移植を受けるヒトまたはヒト以外の動物において超急性同種移植または異種移植拒絶反応を遅らせる方法を提供する。
本発明について一般的に説明してきたが、以下の実施例を参照することにより本発明はさらに理解しやすくなるだろう。実施例は例示するためのものであって、特に明記しないかぎり、本発明を制限するものではない。

実施例１

TP10HD調製物の製造ならびに精製

組織培養の調整培地から調製したTP10HDを、アフィニティクロマトグラフィー;HPLCである（あるいはHPLCでない）カチオン交換クロマトグラフィー；ならびにカチオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、およびサイズ排除クロマトグラフィーの組み合わせによって精製した。

調整培地の起源

A.ホローファイバーバイオリアクター

sCR1遺伝子の生成物であるTP10HD（Fearon et al.,1989,1991、上掲）を発現する組換えC

HO DUX B11細胞を、分子量のカットオフ値が30,000DaであるモデルIV－Lのカートリッジ（セル－ファーム・セル・カルチャー・システムI（Cell－Pharm Cell Culture System I）、CDメディカル（CD Medical）、米国フロリダ州マイアミレークス（Miami Lakes,FL））を利用して、ホローファイバーバイオリアクターの適当な生育培地、たとえば、グルタミン（ギブコ（GIBCO）、米国ニューヨーク州グランドアイランド（Grand Island,NY））ならびに1－10%ウシ胎仔血清（ハイクローン・ラボラトリーズ社（HyClone Laboratories,Inc.）、米国ユタ州ローガン（Logan,UT））を加えたCHO－1完全培地システム（ベントレックス・ラボラトリーズ社（Ventrex Laboratories,Inc.）、米国メイン州ポートランド（Portland,ME）に接種し、製造業者の指示にしたがって操作した。合成されたTP10HDは、生育培地中へと分泌され、この分泌物は分子量が約200kDaと高いので、リアクターのカートリッジの細胞コンパーメント中に保持された。1－3日間隔で、細胞コンパートメントの調整培地を取り出し、混入している細胞ならびに細胞残渣を遠心分離によって取り除き、透明となった調整培地を使い捨てのプラスチック製実験容器に入れ、精製を行うまで、2－8℃に保持した。こうした条件下で、調整培地は、500μg/ml以下のTP10HDを含有していた。

B.ローラーボトル細胞培養

TP10HDを発現する組換えCHO DUX B11細胞を、ローラーボトルの適当な生育培地、たとえば、グルタミン（ギブコ、米国ニューヨーク州グランドアイランド）、ウシ血清アルブミン、ヒトトランスフェリン、ならびにウシインシュリン（ペンタックス－マイルズ社（Pentex－Miles Inc.）、米国イリノイ州カンカキー（Kankakee,IL）；インタージェン（Intergen）、米国ニューヨーク州パーチェス（Purchase,NY））を加えたHams F12とDMEM（JHRバイオサイエンス社（JHR Bioscience,Inc.）、米国ペンシルバニア州デンバー（Denver,PA））の混合物から製造した無血清培地に接種した。3日ほどたって、培地の色が桃色から黄色に変化して培養が確立されたことが示唆されたら、約10mlのコラーゲンマイクロキャリア（ベラックス社（Verax Corporation）、米国ニューハンプシャー州レバノン（Lebanon,NH））を新鮮な培地とともに加えた。3日間隔で、1/2の培地（約150ml）を交換した。調整培地から、細胞ならびに細胞残渣を濾過によって取り除き、透明となった調整培地を使い捨てのプラスチック製実験容器に入れ、精製を行うまで、－70℃以下で保存した。こうした条件下で、調整培地は、約15μg/mlのTP10HDを含有していた。

C.流動床灌流バイオリアクター

TP10HDを発現する組換えCHO DUX B11細胞を、流動床灌流バイオリアクター（システムS200（System S200）およびシステムS2000（System S2000）、ベラックス社、米国ニューハンプシャー州レバノン）の適当な生育培地、たとえば、グルタミン（ギブコ、米国ニューヨーク州グランドアイランド）、ウシ血清アルブミン、ヒトトランスフェリン、ならびにウシインシュリン（ペンタックス－マイルズ社、米国イリノイ州カンカキー；インタージェン、米国ニューヨーク州パーチェス）を加えたHams F12とDMEM（JHRバイオサイエンス社、米国ペンシルバニア州デンバー）の混合物から製造した無血清培地に接種し、バイオリアクターを、製造業者の指示にしたがって操作した。約2日間隔で、集まった調整培地を、バイオリアクターのハーベスト槽から取り出し、細胞ならびに細胞残渣を濾過によって取り除き、分子量のカットオフ値が50kDaあるいは100kDaである限外濾過膜（ミリポア社（Millipore Corp.）、米国マサチューセッツ州ベッドフォード（Bedford,MA））を通して限外濾過することによって10倍から100倍に濃縮した。濃縮した調整培地をプラスチック製実験容器に入れ、精製を行うまで、－70℃以下で保存した。こうした条件下で、濃縮調整培地は、900μg/ml以上のTP10HDを含有していた。

精製方法

A.アフィニティクロマトグラフィー

ホローファイバーバイオリアクターで得た調整培地を、モノクローナル抗体（mAb）アフィニティ樹脂を使用して精製した。モノクローナル抗体YZ1は、天然のヒトCR1（Changelian,PS et al.,J.Immunol.134:1851,1985;Wong,W.et al.,J.Immunol.Methods,82:303－313,1985）の細胞外部分のエピトープを同定するものである。このモノクローナル抗体を、

製造業者（（バイオラッド社（BioRad Corporation）、米国カリフォルニア州リッチモンド（Richmond,CA））の指示にしたがってアフィゲル－10（Affigel－10）に結合させて、ウシ血清由来の混入物を含有している調整培地から、既に記載されているようにして（Yoon et al.、上掲）、TP10HDを特異的に単離しうるアフィニティマトリックスを得た。簡単に説明すると、調整培地をアフィニティマトリックスとともに、緩やかにかきまぜながら、４℃で一晩インキュベートした。この混合物をクロマトグラフィーのカラムに注ぎ、10mM HEPES、0.1M NaClの緩衝液（pH7）で十分に洗浄して、非特異的に結合している物質をマトリックスからすべて取り除いた。マトリックスから、20mMリン酸ナトリウム、0.7M NaClの緩衝液（pH12）で、TP10HDを取り除き、得られたカラム分画中のタンパク質の存否を、市販の検定（バイオラッド社、米国カリフォルニア州リッチモンド）で調べた。タンパク質を含有している分画をプールし、リン酸緩衝液（pH7.2－7.4）に対して４℃で透析した。調製物中のTP10HDの存否は、TP10HDに対して特異的なイムノアッセイによって確認した。この手順によって、４－20％の線形勾配SDS－PAGEによって純度が90％以上であると推定されるTP10HDの調製物が得られた。

B.組合せクロマトグラフィー

ローラーボトルの培地あるいは流動床灌流バイオリアクターの培地から得た調整培地を、一連のクロマトグラフィー工程で処理した。調整培地を1NのHClで酸性とし、pHを5.2－5.5まで下げた。酸性とする間に培地が不透明となったので、0.45ならびに0.2μｍの膜を通して濾過を行い、透明とした。酸性とし、透明とした調整培地を、リン酸ナトリウム（0.02M）、塩化ナトリウム（0.06M）の緩衝液（pH5.5）で平衡化しておいたカチオン交換カラムのＳ－セファロース（Ｓ－Sepharose）（ファルマシア・ファインケミカルス（Pharmacia Fine Chemicals）、米国ニュージャージー州ピスキャッタウェイ（Piscataway,NJ））に加えた。試料を加えた後、出発緩衝液によるカラムの洗浄を、吸収が基準線に戻るまでつづけた。こうした条件下では、TP10HDのグリコフォームがいずれも樹脂に結合したのに対し、組織培養液から混入したタンパク質の大半はカラムに結合せず、カラムを通過した。TP10HDは、リン酸ナトリウム（0.02M）、塩化ナトリウム（0.50M）の緩衝液（pH8.0）を用いてカラムから溶出させた。280nmでの吸収によって、TP10HD含有プールの溶出を監視した。

Ｓ－セファロースの溶出液を硫酸アンモニウムと混合して、最終濃度を0.8－0.9Mとし、リン酸ナトリウム（0.1M）、硫酸アンモニウム（0.9M）の緩衝液（pH7.0）で平衡化しておいた疎水性相互作用カラムであるブチル－セファロース（Butyl－Sepharose）（ファルマシア・ファインケミカルス、米国ニュージャージー州ピスキャッタウェイ）に加えた。試料を加えた後、出発緩衝液によるカラムの洗浄を、吸収が基準線に戻るまでつづけた。こうした条件下では、TP10HDのグリコフォームがいずれも樹脂に結合したのに対し、混入タンパク質はカラムに結合せず、カラムを通過した。TP10HDは、リン酸ナトリウム（0.1M）の緩衝液（pH7.0）を用いてカラムから溶出させた。溶出緩衝液から硫酸アンモニウムを除去すると、TP10HDが樹脂から取り除かれる。280nmでの吸光度によって、TP10HD含有プールの溶出を監視した。

ブチル－セファロースの溶出液を、リン酸緩衝液（リン酸ナトリウム（0.01M）、塩化ナトリウム（0.15M））（pH7.2－7.4）で平衡化しておいたサイズ排除カラムであるセファクリルＳ－300（Sephacryl S－300）（ファルマシア・ファインケミカルス、米国ニュージャージー州ピスキャッタウェイ）に加えた。試料を加えた後、吸光度によって、TP10HD含有プールの溶出を監視した。カラムの排除体積の直後に溶出した物質を集め、TP10HDに対して特異的な酵素イムノアッセイによって、精製TP10HDの量を測定した。この分画を－70℃以下で凍結保存した。このプロトコールによって、４－20％の線形勾配SDS－PAGEによって純度が90％以上であると推定されるTP10HDの調製物が得られた。

結論

変異したsCR1のDNAを発現し、TP10HDと称するsCR1タンパク質を産生する組換えCHO DUX B11細胞の培養を、実験室条件下で、たとえばホローファイバーバイオリアクターあるいはローラーボトルを用いて行ったり、大規模培養条件下で、たとえば流動床灌流バイオ

リアクターを用いて行ったりして、分泌TP10HDを含有する調整培地を得ることができる。分泌された組換えタンパク質は、いくつかのプロトコール、特に、アフィニティクロマトグラフィー；カチオン交換HPLC;あるいはイオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、およびサイズ排除クロマトグラフィーの組み合わせによって単離して、精製調製物を得ることができる。

実施例II

TP10HD調製物に特徴的な分子の差異の特定

各種の条件で生成され、複数の過程で精製されたTP10HD調製物は、さまざまな程度にグリコシル化されたポリペプチドバックボーンを有している。

手順

４－20%のSDS－PAGEで調べたところ、実施例Ｉに記載したようにしてカチオン交換HPLCによって単離したTP10HD調製物と、組合せクロマトグラフィーによって単離した調製物とでは、みかけの分子量が異なっていることがわかった。カチオン交換HPLCによって調製した物質の分子量は約30kDaであり、クロマトグラフィーを用いた方法で調製した物質より分子量が低かった。双方の調製物を、製造業者（ジェンザイム社（Genzyme Corporation）、米国マサチューセッツ州ボストン（Boston,MA）、下記の実施例VIを参照のこと）の記載通りにｎ－グリカナーゼで消化して、脱グリコシル化したところ、分子量は、TP10HD分子に対するポリペプチド鎖の理論上の分子量寄与分である約200kDaに相当する値まで低減した。

結論

こうした結果から、相異なる細胞培養条件で生成し、複数の精製計略によって単離したTP10HD分子は、同様のポリペプチド鎖から構成されているものの、そのグリコシル化の程度にはバラツキがあり、その結果、分子量に測定可能な差異が生じていることが立証された。このことによって、炭水化物の組成が互いに異なるTP10HDの各種のグリコフォームが存在していることが、まずもって示唆された。

実施例III

TP10HDに各種のグリコフォームが存在していることのさらなる例証

HPLCでの分析によって、（ａ）ホローファイバーバイオリアクター、（ｂ）マイクロキャリアを備えたローラーボトル、あるいは（ｃ）流動床灌流バイオリアクターといった相異なる条件のいずれかで、調整培地からのTP10HDの生成を行い、そして、カチオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、およびサイズ排除クロマトグラフィーの組み合わせ、あるいはアフィニティクロマトグラフィーのいずれかによって精製を行った場合には、TP10HDが各種のグリコフォームの混合物から構成されていることが示された。

分析方法

いくつかの相異なる手順によって精製したTP10HDの試料を、リン酸ナトリウム（20mM）、塩化ナトリウム（30mM）の緩衝液（pH7.0）に対して透析し、0.2μｍの膜を通して濾過した。10×100mmのハイドロポア－SCX（Hydropore－SCX）HPLCカラム（レイニン・インストラメント社、（Rainin Instrument Company）、米国カリフォルニア州エメリービル（Emeryville,CA））を、透析に用いたのと同じ緩衝液で平衡化し、試料を2ml/分で加え、出発緩衝駅を用いたカラムの洗浄を、吸収が基準線に戻るまでつづけた。緩衝液のNaCl濃度を50mMまで上昇させたところ、弱カチオン性と規定されるTP10HDのグリコフォームが樹脂から溶出した。吸収が基準線に戻った後に、50－250mMの線形のNaCl勾配で、強カチオン性のグリコフォームが溶出した。結果を図１に示す。

試料をこうした条件で加えた場合には、いずれのグリコフォームのTP10HDも樹脂に結合した。吸収されず、カラムを素通りした物質は、以下の規準、すなわち、（ａ）紫外スペクトルの光を吸収したこと、（ｂ）タンパク質を検出する化学検定で反応性でなかったこと、（ｃ）SDS－PAGE上の物質を可視化する際に使用されるタンパク質特異的染料に対して反応性でなかったこと、及び（ｄ）TP10HD特異的イムノアッセイで反応性でなかったことに基づいて、タンパク質ではなく、TP10HDではない混入物質、おそらくは細胞性DNAであ

ることが示された。
試料を加えた後、緩衝液のNaCl濃度を50mMまで上昇させたところ、弱カチオン性のグリコフォームであると規定されるTP10HD分子が樹脂から溶出した。弱カチオン性のグリコフォームとして溶出した物質は、いずれも、特異的なイムノアッセイで、TP10HDであると特定することができた。最後に、NaClの濃度を線形に上昇させることによって、さらに強固に結合しているタンパク質を樹脂から溶出させた。NaCl濃度を約125mMとしたところで、強カチオン性のグリコフォームであると定義されるTP10HD分子が樹脂から溶出した（図１）。強カチオン性のグリコフォームとして溶出した物質は、いずれも、特異的なイムノアッセイで、TP10HDであると特定することができた。
アフィニティクロマトグラフィーによって精製したTP10HD
アフィニティクロマトグラフィーによって精製したTP10HD物質を、HPLCカチオン交換法によって分析したところ、この物質は、複数のグリコフォームを含んでいた。図1Aに示す吸収の軌跡から、主要なグリコフォームが強カチオン性であること（すなわち、約125mMのNaClで溶出していること）が立証された。
組合せクロマトグラフィーによって精製したTP10HD
流動床灌流バイオリアクター由来の物質を、HPLCカチオン交換法によって分析したところ、この物質は、複数のグリコフォームのTP10HDを含んでいた。（弱カチオン性のグリコフォーム）対（強カチオン性のグリコフォーム）の濃度比は、70:30から80:20の範囲であった（図1B）。ローラーボトルの培養由来の物質も、複数のグリコフォームのTP10HDを含んでおり、（弱カチオン性のグリコフォーム）対（強カチオン性のグリコフォーム）の濃度比は、76:24であった。
HPLCカチオンクロマトグラフィーによって精製したTP10HD
この物質は、強カチオン性のグリコフォームのTP10HDのみを含有していた（図1C）。すでに開示されているように（国際特許公開WO89/09220及びWO91/05047;Weisman,HF et al.,Science 249:146,1990;Yeh,CG et al.,J.Imunol.146:250,1991）、この方法によって単離された物質は、ヒトsCR1タンパク質のインビトロならびにインビボでの機能的特性を示した。
結論
こうした結果から、カチオン交換クロマトグラフィーによって区別しうる複数のTP10HDのグリコフォームが、流動床灌流バイオリアクター由来の調整培地、ローラーボトルの培地、ならびにホローファイバーバイオリアクター由来の調整培地中に存在するものの、各種起源培地中の各種のグリコフォームの割合は、有意に異なっている可能性があることが示された。
実施例IV
弱カチオン性ならびに強カチオン性のグリコフォームを有する精製調製物の単離
弱カチオン性ならびに強カチオン性のグリコフォームを有する調製物を、HPLCによって調製することが可能である。
方法
21.4mm×100mmの、スルホプロピルで置換したイオン交換樹脂カラム（ハイドロポア－SCX（Hydropore－SCX）、レイニン・インストルメント社、米国カリフォルニア州エメリービル）で分取用HPLCを実施した。カラムを、20mMリン酸ナトリウム、30mM NaClの緩衝液（pH7.0）中で平衡化させた。上述したようにして組合せクロマトグラフィーで精製したTP10HDの試料を、平衡化に使用したのと同一の緩衝液に対する透析を行ってから使用した。
試料を加えた後、同一緩衝液によるカラムの展開を、代表的には20分間つづけて、非特異的に結合したタンパク質を樹脂から洗い落とした。緩衝液を、20mMリン酸ナトリウム、50mM NaClの緩衝液（pH7.0）に変更し、代表的にはさらに20分間、弱カチオン性のグリコフォームがすべてカラムから溶出してしまうまで展開をつづけた。最後に、50－250mMの線形勾配のNaClの緩衝液（20mMリン酸ナトリウム、pH7.0）を使用して、カラムの展開を終了した。強カチオン性のグリコフォームは、代表的には、約125mMのNaClでカラムから溶出した。

結果
調製に際しては、代表的には、約100mgのTP10HDを含有する125mlの試料を、カラムに加えた。弱カチオン性のグリコフォーム（TP10HD－CCW）、ならびに強カチオン性のグリコフォーム（TP10HD－CCS）に対応する分画を、上述したようにしてプールし、TP10HDの量を、TP10HDに対して特異的なイムノアッセイで測定した。
結論
インビトロおよびインビボでの機能についての研究、ならびに生化学的分析を行うのに十分な量の複数のグリコフォームのTP10HDが単離された。
実施例Ｖ
TP10HDを精製した後の、Ｓ－セファロースを用いたカチオン交換クロマトグラフィーによるTP10HDのグリコフォームの分離
上述したHPLCカチオン交換精製のプロトコールによって、TP10HDのグリコフォームは、２つの分画（たとえば、図1Bを参照のこと）、すなわち、「ピーク２」と称する左側から２つ目のピーク（より重度にグリコシル化された物質）と、最も右側のピークである「ピーク３」（より軽度にグリコシル化された物質）に分離された。当初のプロトコールは、HPLCカチオン交換カラムとして、レイニン・インストルメント社から購入したハイドロポア－SCXを使用して開発されたものである。しかし、このクロマトグラフィー工程の結果には、長時間が経過すると、バラツキが生じてくることが観察された。こうしたバラツキは、このHPLC用カラムの使用ならびに貯蔵条件でのカラムの使用可能期間が限定されていることによるものであると考えた。
したがって、本発明の発明者は、時間が経過してもバラツキを生じることなく再現が可能な、sCR1グリコフォームを分離するためのもっと別の精製方法を見いだすべく研究を行った。調べるにあたっては、他の多くの供給業者が販売しているHPLC用カラムの評価を行うのではなく、通常のカチオン樹脂であるＳ－セファロース・ファースト・フロー（Ｓ－Sepharose Fast Flow）樹脂（ファルマシア）を選んだ。この樹脂を選んだのは、まず、Ｓ－セファロースの官能基が、上述のハイドロポア－SCXカラムの官能基と同じであるからである。これらの樹脂の唯一のちがいは、担持するマトリックスが、Ｓ－セファロースではアガロースであるのに対し、SCXでは、シリカ系の充填剤を親水性の重合体層で覆ったものであることにある。
充填寸法が2.5×1.8cmのＳ－セファロースと、インラインのUA－６紫外線モニター（イスコ（Isco））を使用して、2.5cmのコンテス－フレックス（Kontes－Flex）カラムを調製した。
この研究で調べるTP10HD物質は、流動床灌流バイオリアクター（ベラックスシステムS200、上掲）を使用することによって生成し、タンパク質濃度は5.5mg/mlであった。濃縮調整培地から得たTP10HD物質は、まず、一連の精製工程で処理してから、この研究に使用した（1992年３月24日に出願された、Gail Folena－Wassermanらの「タンパク質の精製」（米国特許出願第07/857,022号、同一譲受人）を参照のこと。この文献の全体を、参考として、本明細書に組み込むものとする。）。
まず、粗培養液を、Ｓ－セファロースでのカチオン交換クロマトグラフィーに供し、20mMリン酸ナトリウム、500mM NaClの緩衝液（pH7.0）で溶出させた。溶出したタンパク質を硫酸アンモニウムで沈殿させ、再度溶解し、100mMリン酸ナトリウムへの0.8M $(NH_4)_2SO_4$ 溶液（pH7.0）で平衡化しておいた、疎水性相互作用クロマトグラフィーの担体であるブチル－トヨパール（butyl－TOYOPEARL）カラムに吸着させた。目的物質は、100mMリン酸ナトリウムへの0.7M $(NH_4)_2SO_4$ 溶液（pH7.0）で溶出した。溶出液を、アニオン交換の担体でもあるDEAE－トヨパール（DEAE－TOYOPEARL）に吸着させ、溶出させ、担体としてトヨパールCM650S（TOYOPEARL CM650S）を使用する２回目のカチオン交換クロマトフラフィー工程に供した。50mMのMES/MES.Naへの線形勾配の０－250mMのNaCl溶液（pH5.5）５カラム容量で、タンパク質を溶出させ、1/10容量の0.5Mの二塩基リン酸Naで中和した。次に、トヨパールCMの生成物を、あらかじめ10mMリン酸ナトリウム、0.9%（w/v）NaCl（pH7）で平衡化しておいたトヨパールHW65S（TOYOPEARL HW65S）のカラムでのサイズ排除クロマ

トグラフィーに供した。生成物のピークの全体を集め、濃縮して貯蔵した。TP10HD物質は、これで、本研究で調べうる状態となったわけである。
Ｓ－セファロースによる分画に際しては、以下の緩衝液を使用した。平衡化および洗浄用緩衝液－20mMリン酸Na、30mM NaCl、pH5.2。洗浄用緩衝液２および緩衝液Ａ－20mMリン酸Na、50mM NaCl、pH7.0。緩衝液Ｂ－20mMリン酸Na、250mM NaCl、pH7.0。
試料である1.5mlの精製TP10HD（8.25mgのタンパク質）を、あらかじめpH5.2に平衡化しておいたＳ－セファロースカラムに加えた。次に、溶出液が基準線の読み（A_{280}）を示すまで、カラムを洗浄した。次に、カラムを2.5ベッド容量の洗浄用緩衝液２で洗浄した。線形勾配（10ベッド容量）の緩衝液Ａならびに緩衝液Ｂ（50－250mM NaCl）を、カラムに加えた。溶出したTP10HD分画を、紫外線吸収にもとづいて、単一のプールとして集めた。A280による各分画のタンパク質濃度の測定を、１％溶液に対する吸光計数Ｅ（１％/280）として$10cm^{-1}$を使用して行った。

結果

結果を図２および３に示す。プール１と称する、図1Bの「ピーク２」に対応する図２の小さい方のピークは、加えた試料の２％に相当した。プール２と称する、（図1Bの「ピーク３」に対応する）図２の大きい方のピークは、加えた試料の約89％に相当した。
この２つのプールについて、SDS－PAGEを実施した。結果を図３に示す。プール１の物質の方が、プール２の物質より、SDS－PAGEでの分子量が大きかった。

結論

以上の結果から、TP10HDの２つの主要なグリコフォームの分画を再現性をもって分離するうえで、Ｓ－セファロースを使用した、HPLCではないカチオン交換クロマトグラフィーによる方法が有用な手段であり、この方法は、さきに述べたHPLCでSCXカラムを用いた方法より好適であるとの結論に達した。この精製工程は、上記のように、調整培地からTP10HDを複数の工程で精製した後に単離することもできる。また、複数の工程からなる精製過程のうち、最初のＳ－セファロースの工程を、各種のグリコフォームの分離に使用して、分離されたグリコフォームを、それぞれ、さらに精製することも可能である。

実施例VI

sCR1グリコフォームの薬物動態学的研究

異なるグリコフォーム調製物の血漿薬物動態学的半減期および／またはクリアランス速度を測定した。弱カチオン性グリコフォームは、強カチオン性グリコフォームに比べ、増大した血漿半減期および／またはより低い全クリアランス速度を示した。そして、両方のグリコフォームとも、酵素によって脱グリコシル化したグリコフォーム調製物に比べ、有意により大きい血漿半減期および／またはより低い全クリアランス速度を示した。

材料および方法

A.研究材料の供給源

種々のTP10HD調製物（TP10HD－CX、TP10HD－CC、TP10HD－CCW、TP10HD－CCSおよびTH10HD－CXD）の定義については、前述の「定義」の分節を参照されたい。試験材料は、実施例１に記述した方法で精製した。

B.薬物動態学的研究

９つの異なる薬物動態学的研究を下記の表２に掲げる。

表２

研究番号	材料	動物種
1	ＴＰ１０ＨＤ－ＣＸ	ラット
2	ＴＰ１０ＨＤ－ＣＸ	ウサギ
3	ＴＰ１０ＨＤ－ＣＣ	ブタ
4	ＴＰ１０ＨＤ－ＣＣ	ラット
5	ＴＰ１０ＨＤ－ＣＣＷ	ラット
6	ＴＰ１０ＨＤ－ＣＣＷ	ウサギ
7	ＴＰ１０ＨＤ－ＣＣＳ	ラット
8	ＴＰ１０ＨＤ－ＣＣＳ	ウサギ
9	ＴＰ１０ＨＤ－ＣＸＤ	ラット

C.研究材料のヨウ素化

研究１、２、４、５、７および９では、クロラミン－Ｔ法によるヨウ素化を行なった。リン酸ナトリウム緩衝液（0.5M,pH7.6,50μｌ）を、1mCiの供給されたままの$Na-^{125}I$（New England Nuclear,Boston,MA）に加えた。TP10HDのサンプルを典型的には100μｌにつき100μｇ（研究５＝69μg;研究７＝34μg;研究９＝91μｇ）加え、次に50μｌの新たに調製したクロラミン－Ｔの15mg/ml溶液を加えた。反応混合物を60秒間強く振とうした。メタ重亜硫酸ナトリウム（50μｌ、15mg/ml）およびヨウ化ナトリウム（100μｌ、10mg/ml）を連続的にピペットで反応バイアルに加えた。この反応混合物を0.1%ウシ血清アルブミン（Shigma Chemical Company,St.Louis,MO）を含有するリン酸緩衝溶液（pH7.2～7.4）で前平衡化したPD10カラム（Pharmacia Fine Chemicals,Piscataway,NJ）に通した。0.5mlの画分を10個集め、２μｌのアリコートを直接、および100μｌの0.1%ウシ血清アルブミン溶液ならびに1mlの20%トリクロロ酢酸と混合後に、計測した。０℃で１時間インキュベーションした後、放射能を伴なう酸沈降可能なタンパク質を1000xgで10分間遠心にかけて回収し、シンチレーションカウンティングにより定量した。酸沈降物中に全放射能の＞90%を含有する画分を後の使用のためプールした。

研究６および８では、ヨードゲン（iodogen）法（Frakerら、1978,Biochem Biophys Res Commun 80;849）によってヨウ素化を行なった；研究６では^{125}I置換の平均的度合は0.56原子／タンパク質分子で、比活性が22.7kBq/mgであり、研究８では^{125}I置換の平均的度合は0.76原子／タンパク質分子で、比活性は29.5kBq/mgであった。

D.投与溶液の調製

研究1:放射性ヨウ素化TP10HD－CXを精製非標識TP10HD－CXと混合して、16～25x10^6cpmの放射性標識TP10HD－CXを含有する、1mg/kgの全TP10HD用量を投与するのに好適な投与液を調製した。

研究2:放射性ヨウ素化TP10HD－CX（約５%w/w）を精製非標識TP10HD－CXと混合し、0.1M Hepesおよび0.15M NaClを含有する緩衝液pH7.4中に1mg/mlのTP10HD－CXを含有する投与液を調製した。

研究3:供給されたままのTP10HD－CCを、最終用量1mg/kgまで投与した。

研究4:放射性ヨウ素化TP10HD－CCを精製非標識TP10HD－CCと混合して、約20x10^6cpmを含有する、1mg/kgまたは3mg/kgの全TP10HD用量を投与するのに好適な投与液を調製した。

研究5:放射性ヨウ素化TP10HD－CCWを精製非標識TP10HD－CCWと混合して、約20x10^6cpmを含有する、1mg/kgの全TP10HD用量を投与するのに好適な投与液を調製した。

研究６および8:放射性ヨウ素化TP10HD－CCWを約１％w/wまで加えたほかは、研究２に記述した通り。
研究7:放射性ヨウ素化TP10HD－CCSを精製非標識TP10HD－CCSと混合して、約20x10^{6}cpmを含有する、1mg/kgの全TP10HD用量を投与するのに好適な投与液を調製した。
研究9:放射性ヨウ素化TP10HD－CXDを精製非標識TP10HD－CXDと混合して、約20x10^{6}cpmを含有する、1mg/kgの全TP10HD用量を投与するのに好適な投与液を作製した。
E.プロトコール
研究１、４、５、７および９では、試験材料を４匹のスプラーグ－ドーリー（Sprague－Dawley）ラット（雄２匹、雌２匹）に静脈注射した。注射の１、３、５、10、20、30、45および60分後に血液サンプルを眼窩後部の血管叢より採取し、放射能を測定した。追加の注入後血液サンプルを注射の２、３および４時間後に（研究４）、および120分後に（研究５）に採取した。残りの血液サンプルの血漿画分を、さらに分析するために保持した。
血漿サンプルは、以下の測定により残留試験材料について分析した。
（１）全残留放射能
（２）TCAによって沈降させた放射性標識材料のパーセンテージ
（３）SDSの存在下で酸沈降可能なタンパク質の残留放射能；および
（４）エンザイムイムノアッセイにおいてTP10HDとして免疫学的に同定可能な材料
放射性同位体データは、血液または血漿1mlあたりの全cpmとして、また理論的時間ゼロ値のパーセンテージとして量的に表わした。薬物動態学的半減期は、放射能分析データより計算した。
研究２では、試験材料を１群５匹の雄ダッチ（Dutch）ウサギ（約1kg）２群に1mg/kgの用量で静脈注射した。血液サンプル（2ml）を投与直前に、および投与の５、10、20、45、60、120および180分後に耳動脈より採取し、ヘパリンと混合した（最終濃度25μg/ml）。放射能はシンンチレーションカウンティングによりアリコートを測定した。また、2000xgで５分間遠心にかけて得た血漿は、－40℃で保存した。
血漿サンプルは、in vitro機能アッセイであるヒト補体による抗体塗布ヒツジ赤血球（SRBC）溶血の阻害によって、残留試験材料を分析した。薬物動態学的半減期は、残留機能活性の力価より計算した。
研究３では、試験材料は頸動脈カニューレを介して体重4.5～6.1kgの子ブタに静注した。血液サンプルは、あらかじめ埋め込んでおいた頸静脈カニューレを経て、リチウムヘパリンを最終濃度15単位/mlで含有する注射器に取った。注入前サンプル（10ml）をゼロ時間に採取し、注入後サンプル（1.0ml）を注入の５、10、15、30、45、60、120、180、240、300、360分後および24時間後に採取した。抗凝血化血液サンプルを約3000rpmで４℃で５分間遠心にかけ、血小板に乏しい血漿をアリコートに分割し、－70℃またはそれ以下で保存した。
血漿サンプルは、ヒト補体ではなくブタ補体を用いて、上記のようなにin vitro機能アッセイにより、残留試験材料について分析した。薬物動態学的半減期は、残留機能活性の力価より計算した。
研究６および８では、試験材料を５匹のダッチウサギ（約1kg）からなる１群に1mg/kgの用量で静脈注射した。血液サンプル（1ml）を投与直前に、および投与の５、10、20、30、60、120および180分後に耳動脈より採取し、ヘパリンと混合し、トリクロロ酢酸を用いて沈降させた後シンチレーションカウンティングによりアリコートの放射能を測定した。
血漿サンプルは、TP10HDに特異的なエンザイムイムノアッセイ（EIA）により残留試験材料を分析した。薬物動態学的半減期は、放射能分析およびイムノアッセイの両方のデータより計算した。
F.N－グリカナーゼ処理
研究９では、Ｎ－結合オリゴ糖鎖の除去をＮ－グリカナーゼ消化によって行なった。これは製造者の指示に従って実施された（Genzyme Corporation,Boston,MA）。典型的には、58μｇのTP10HD－CXを10.5単位のＮ－グリカナーゼと共に18時間、37℃で、0.2Mリン酸ナトリウムを含有するpH8.6の緩衝液中でインキュベートした。

C.酸沈降
トリクロロ酢酸による沈降を以下のように実施した：血漿（20μｌ）に、0.13M　トリス　HCl、４％SDS、10％グリセロールを含有するpH6.8の緩衝液450μｌ、次に30μｌのウシ胎児血清および500μｌの20％トリクロロ酢酸を逐次加えて沈降させた。各添加の後、試験管を強く混ぜ、72時間４℃でインキュベートした。1000xgで10分間遠心にかけて、沈降可能なタンパク質のペレットを回収し、上清を分離して廃棄し、残留放射能をシンチレーションカウンティングにより測定した。
H.エンザイムイムノアッセイ
市販されているアッセイを利用した（Cellfree^{TM} CD35,T Cell Diagnostics,Inc.Cambridge,MA）。簡単に述べると、ポリクローナルウサギ抗TP10HD抗体を塗布したポリスチレンビーズを、希釈した試験サンプルおよび西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ポリクローナルウサギ抗TP10HD抗体と同時にインキュベートした。インキュベーション後、ビーズを反応混合物より取り出し、非特異的に結合した物質を洗い落とし、次に適切な希釈度の基質の存在下でインキュベートした。硫酸を添加して発色を停止させ、TP10HD濃度の指標として吸光度（光学濃度）を測定した。
H.溶血アッセイ
チオエステル基をアミド化し、また内因性補体成分C3およびC4を不活性化するため、ウサギ血漿サンプルを56℃で１時間、メチルアミン（12.5mM）の存在下で加熱した。この処置は、TP10HDの活性に重大な影響を与えることなく、試験サンプルにおける内因性ウサギ補体活性を消失させた。次ぎに、試験サンプルを0.1M　Hepes,0.15M　NaClを含有する緩衝液pH7.4で1:50に希釈し、アッセイを行なった。
ウサギ抗SRBC抗体（Diamedix,Miami,FL）で前感作したSRBCを、Ｖ底マイクロタイターウエル（Costar,Cambridge,MA）において、適切な希釈度の試験血漿および補体供給源としての希釈されたヒト血清のアリコートと混合した。37℃で１時間インキュベーションした後、未溶解赤血球を遠心によりペレット化し、上清を対応する平底マイクロウエル（Costar,Cambridge,MA）に移し、415nmにおける吸光度を測定した。抗体を塗布したSRBCの補体媒介溶血の阻害は、試験サンプルの存在下における吸光度の減少として測定された。既知量のTP10HDを用いた標準曲線を使って、アッセイの結果が時間に対する血漿中に残留するTP10HD（mg/ml）として表されるように、アッセイをキャリブレートすることができる。
研究3.溶血アッセイ
TP10HD－CCの注入に先だって、各ブタから溶血アッセイのためのサンプル希釈物および補体供給源として使用される血漿を採取した。試験サンプルは0.1M　Hepes,0.15M　NaClを含有する緩衝液pH7.4で最低1:50に希釈した。より大きい希釈度については、試験サンプルをすでに同じ緩衝液で1:50に希釈した注入前血漿で希釈し、それによって最終血漿濃度を1:50に維持した。この希釈度で、上記のように、溶血の程度はヒト補体による溶血と等価であった。他の操作は上に記述した通りである。既知量のTP10HDを用いた標準曲線を使って、アッセイの結果が時間に対する血漿中に残留するTP10HD（mg/ml）として表されるように、アッセイをキャリブレートことができる。
結果
薬物動態学的研究の結果は、表３～７に示されている。ラットを用いた研究１、４、５、７および９については、血中からの^{125}I－TP10HD－CX、^{125}I－TP10HD－CC、^{125}I－TP10HD－CCW、^{125}I－TP10HD－CCSおよび^{125}I－TP10HD－CXDのクリアランスをそれぞれ測定した。全血（約300μｌ）を各ラットの後部眼窩血管叢より採取した。それぞれの時点からの100μｌサンプル２個を計測し、グループごとに平均し、cpm/mlに標準化した。各時点からのサンプルをSDSの存在下でTCAを用いて沈降させ、計測し、グループごとに平均し、cpm/mlに標準化した。クリアランスは、^{125}I－標識材料の全TCA－沈降可能カウントおよびEIAによって測定された。表３に示す結果は、各研究における、短いα相半減期とより長いβ相半減期をもつ２相からなるクリアランスパターンを示している。

表３

２相クリアランスプロフィール

研究番号	動物	試験材料	α相（分）	β相（分）
1	ラット	TP10HD-CX	４．３	１６７
2	ウサギ	TP10HD-CX	９－１１	
3	ブタ	TP10HD-CC	８．３	３６０
4	ラット	TP10HD-CC		
		(1mg/kg)	９．２	１８１．１
		(3mg/kg)	９．８	２６７．１
5	ラット	TP10HD-CCW	１２．２１	１００
6	ウサギ	TP10HD-CCW	8	２１６
7	ラット	TP10HD-CCS	６．６４	１３３
8	ウサギ	TP10HD-CCS	6	２１６
9	ラット	TP10HD-CXD	＜１	６．１

表４

ウサギにおけるＴＰ１０ＨＤ－ＣＸの

血清薬物動態学（研究２）

測定	単位	１群	２群
血清半減期	分	9.1±1.4	11.1±1.2
分布量	ml/kg	67.0±9.0	44.6±3.7
ピーク（t=0）濃度	μg/ml	16.5±2.4	23.7±1.7
全クリアランス	ml/ 分/kg	5.8±1.2	2.9±0.1

表５

ブタにおけるＴＰ１０ＨＤ－ＣＣの

血清薬物動態学（研究３）

測定	単位	平均（動物８匹）
血清半減期、α相	分	8.3
血清半減期、β相	分	363
分布量、α相	ml/kg	36
分布量、β相	ml/kg	73
ピーク（t=0）濃度	μg/ml	29.3
全クリアランス	ml/分/kg	0.24

投与の24時間後に採取した血漿サンプルは、対照レベルと区別のつかないTP10HD－CCレベルを示した。クリアランス速度、コンパートメント（compartment）容量、速度定数および半減期に関する薬物動態学的パラメーターは、各ブタについてのデータを２および３コンパートメントモデルに合わせて調整して得た。統計的分析は、一部のブタについては３－コンパートメントモデルの方がよく適合するが、別のブタについては２－コンパートメントモデルの方がよく適合することを示した。すべてのブタについて複雑なデータを避けるため、このデータは２－コンパートメントモデルを使って処理した。平均半減期はα相については8.3分、およびβ相については６時間であることが分かった。これらの相は与えられた投与量のそれぞれ69%および31%に相当し、投与量の約1/3がゆっくりと清浄化された。

この研究はTP10HD－CC調製物が顕著な２相クリアランスパターンを示し、そこではβ相がα相よりもはるかに遅いことを実証した。これらの結果は、ある種のものが非常にゆっくり除去される、グリコフォーム集団の示差的クリアランスと一致している。

研究６の結果は下の表６に要約されている。

表６

ウサギにおけるＴＰ１０ＨＤ－ＣＣＷの

血清薬物動態学（研究６）

測定	単位	放射能分析 データ	イムノアッセイ データ
血清半減期、α相	分	7.8±0.5	14
清浄化された 投与量(%)、α相		30.9±1.5	30
血清半減期、β相	分	216.6±18.8	376
清浄化された 投与量(%)、β相		69.1±1.9	70
分布量、α相	ml/kg	56.2±1.0	
分布量、β相	ml/kg	22.6±1.9	
ピーク（t=0）濃度	μg/ml	17.8±0.3	
全クリアランス	ml/分/kg	0.26±0.02	0.1

放射能分析によって測定されたTP10HD－CCWの薬物動態学的半減期は、α相については約８分、β相については約216分であった。全投与量の約30%が速いα相の間に清浄化され、全投与量の約70%がより長いβ相の間に清浄化された。このグリコフォームの全クリアランス速度は0.26ml/分/kgで、β相のコンパートメント容量は約23ml/kgであった。
研究８の結果は下の表７に要約されている。

表７

ウサギにおけるＴＰ１０ＨＤ－ＣＣＳの

血清薬物動態学（研究８）

		放射能分析	イムノアッセイ
測定	単位	データ	データ
血清半減期、α相	分	6.0±0.4	10
清浄化された 投与量(%)、α相		74.5±1.4	73
血清半減期、β相	分	216.5±36.8	76
清浄化された 投与量(%)、β相		25.5±1.5	27
分布量、α相	ml/kg	69.8±4.8	
分布量、β相	ml/kg	162.0±13.9	
ピーク（t=0）濃度	μg/ml	14.6±1.0	
全クリアランス	ml/分/kg	0.85±0.12	1.24

放射能分析によって測定されたTP10HD－CCSの薬物動態学的半減期は、α相については約６分、β相については約216分であった。全投与量の約75%が速いα相の間に清浄化され、全投与量の約25%がより長いβ相の間に清浄化された。このグリコフォームの全クリアランス速度は0.85ml/分/kgで、β相のコンパートメント容量は約162ml/kgであった。

研究９では、放射能分析によって測定されたTP10HD－CXDの薬物動態学的半減期は、α相については＜１分、β相については6.1分であった。

要約

上記の結果は、TP10HDの精製調製物はクリアランス速度の異なる複数のグリコフォームを含有することを示す。そのような差異はグリコシル化のバラツキによるものである、という結論は以下の結果と一致する：

（１）精製TP10HD調製物の脱グリコシル化は、共通の分子量を有する分子を生じ、すべてのTP10HD調製物のポリペプチド鎖が同一であることを証明する；

（２）脱グリコシル化TP10HDは、急速に清浄化される；そして

（３）増大したグリコシル化による比較的大きい分子量を特徴とするTP10HD調製物（例えば、TP10HD調製物CCおよびCCW）は、グリコシル化の度合がより低いため比較的低い分子量を有する調製物（例えば、調製物CXおよびCCS）に比べ、より長い血漿半減期および／またはより低い全クリアランス速度を示す。

研究６および８の結果の比較から、調製物TP10HD－CCWとTP10HD－CCSの間の主要な差異は、２相のクリアランスを特徴づける半減期にあるのではなく、緩慢に清浄化される材料の比率（高比率のTP10HD－CCW）にあることがわかる。

以下に示すように、詳細な炭水化物分析は、TP10HDグリコフォーム間の差異がグリコシル化の度合、オリゴ糖鎖の組成、および末端オリゴ糖炭水化物残基の本体によることを例証する。

実施例VII

TP10HDの複数のグリコフォームの末端オリゴ糖残基の決定

TP10HDの末端オリゴ糖残基の決定は、弱カチオン性グリコフォームがより高いレベルのシアリル化を示すことを実証した。

方法

TP10HD調製物の末端炭水化物構造を評価した。各調製物のサンプル（１μｇ）を、市販のドットブロット（Dot－Blot）装置（Bio－Rad,Richmond,CA）を使用してニトロセルロース膜に固定した。糖タンパク質の末端オリゴ糖残基を同定する市販のグリカン示差キット（Boehringer Mannheim Biochemicals,Indianapolis,IN）を製造者の指示にしたがって使用した。このキットは、５個のジゴキシゲニン－レクチンプローブを含有する。すなわち、ガランタス・ニバリス（Galanthus nivalis）アグルチニン（GNA）；サンブカス・ニグラ（Sambucus nigra）アグルチニン（SNA）；マーキア・アムレンシス（Maackia amurensis）アグルチニン（MAA）；ピーナツアグルチニン（PNA）およびダツラ・ストラモニウム（Datura stramonium）アグルチニン（DSA）である。

簡単に述べると、各TP10HD調製物の多数サンプルをジゴキシゲニン－レクチン複合体を用いて検索した。レクチンを変えることによってプローブの特異性が変更され、多様な炭水化物残基の検出が可能となる。結合後、プローブはアルカリフォスファターゼ結合ヒツジ抗ジゴキシゲニンFab'試薬を用いたジゴキシゲニンエピトープの検出によって可視化された。基質の添加後５分以内に発色が起った。

結果は表８に要約される。

表８

ＴＰ１０ＨＤの複数のグリコフォームの末端オリゴ糖残基

	レクチン				
	ＧＮＡ	ＳＮＡ	ＤＳＡ	ＭＡＡ	ＰＮＡ
炭水化物特異性	末端 Man	NeuAc α(2-6) Gal	Gal β(1-4) GlcNAc	NeuAc α(2-3) Gal	Gal β(1-3) GlcNac
TP10HD-CX	＋	－	－	－	－
TP10HD-CC	－	－	＋	＋	－
TP10HD-CXD	－	－	－	－	－
TP10HD-CCW	－	－	±	＋	－
TP10HD-CCS	＋	－	±	±	－

略語：Ｇａｌ、ガラクトース；Ｍａｎ、マンノース；ＧｌｃＮＡｃ、Ｎ－アセチルグルコサミン；ＮｅｕＡｃ、５－Ｎ－アセチルノイラミン酸＝シアル酸

TP10HD－CXはGNAレクチンとのみ反応し、この調製物が末端マンノース残基をもつことを示した。TP10HD－CXDは、予想された通り、どのプローブとも反応せず、Ｎ－グリカナーゼ処理がオリゴ糖鎖を除去してしまったことを示した。TP10HD－CCWはMAAと強く、またDSAと弱く反応し、末端シアル酸α（2,3）ガラクトースおよびガラクトースβ（1,4）Ｎ－アセチルグルコサミン構造を示した。TP10HD－CCSはGNAと強く反応し、末端マンノース残

基の優勢を示し、またMAAおよびDSAと弱く反応して、TP10HD－CCWによる交差汚染を示唆した。

結論

これらの結果は、精製TP10HDグリコフォームが異なるオリゴ糖構造を提示することを実証する。すなわち、弱カチオン性グリコフォームTP10HD－CCWは末端シアル酸によって特徴づけられ、強カチオン性グリコフォームTP10HD－CXおよびTP10HD－CCSは末端マンノース残基によって特徴づけられる。これらの知見は、末端シアル酸残基の存在は、より緩慢な血漿クリアランスに帰着すること、または末端マンノース残基は細胞性炭水化物受容体へのTP10HDのより高い結合レベルをもたらし、より速い血漿クリアランスに帰着することを示唆する。

実施例VIII

TP10HDのオリゴ糖炭水化物組成および構造の決定

実施例IIに記載のように調製したTP10HDのオリゴ糖の炭水化物組成および構造の決定は、よりカチオン性の強いTP10HDグリコフォームのシアル酸含量が、弱カチオン性グリコフォームのそれよりも低いことを示した。急速な血漿クリアランスはオリゴ糖鎖にシアル酸がほとんど、または全くないこと、および（推論によれば）マンノースまたはガラクトース受容体へのタンパク質の近づき安さに関連付けられる。緩慢な血漿クリアランスは、１つまたはそれ以上の末端シアル酸残基に関連していた。

TP10HDグリコフォームの単糖組成

A.試験材料の供給源

TP10HDを上記実施例ＩおよびＶに記載のように単離し、弱カチオン性グリコフォームTP10HD－CCWおよび強カチオン性グリコフォームTP10HD－CCSに分割した。

B.方法

以下の工程を用いて分析を実施した：

1.緩慢液の塩類をすべて除去するための、サンプル（約270～280mg）の脱イオン水に対する透析、およびそれに続く凍結乾燥。

2.無水ヒドラジンを用いた無傷のオリゴ糖鎖の放出。

3.個々の単糖をＯ－メチル誘導体として遊離させるための、無傷なオリゴ糖鎖の無水メタノール性HClによる処理。

4.任意の一次アミノ基のＮ－アセチル化

5.ペル－Ｏ－トリメチルシリルメチルグリコシドを生じさせるための誘導体化（derivatization）。

6.CP－SIL8カラムを用いた毛管GLC（気－液クロマトグラフィー）による、これら誘導体の分離。

7.公知の標準品と比較したGLCの保持時間および質量分析による個々のグリコシド誘導体の同定。

8.内部標準品（13－Ｏ－メチル－Ｄ－グルコース）を用いたFIDによる各誘導体の定量。

C.結果

２つのTP10HDグリコフォームにおける各単糖の相対的モル含量を下の表９に示す。

表９

２つのＴＰ１０ＨＤグリコフォームにおける

単糖の相対的モル含量

単糖	TP10HD-CCS	TP10HD-CCW
フコース	１．０＊	１．０
ガラクトース	３．０	３．４
マンノース	５．４	４．１
Ｎ－アセチルグルコサミン	８．２	７．５
シアル酸	０．９	１．３
グルコース	ＮＤ	ＮＤ
Ｎ－アセチルガラクトサミン	ＮＤ	ＮＤ
キシロース	ＮＤ	ＮＤ

＊数値はフコース（＝１．０）に対して表わしてある。ＮＤ＝検出されない。

D.TP10HD－CCとの比較

以下のTP10HD、すなわち先に記述したようにホローファイバーバイオリアクターで産生されたTP10HD（TP10HD－CX）、分画されたグリコフォームTP10HD－CCWおよびTP10HD－CCS、および流動床バイオリアクターで産生された未分画材料（TP10HD－CC）の間に存在するかもしれない単糖組成における何らかの差異を特徴付けるため、これら材料のバッチを別の分析的方法を用いて比較した。

中性糖およびアミノ糖を、パルス電流測定検出と組み合わせた高速アニオン交換クロマトグラフィー（HPAE－PAD Carbohydrate System,Dionex Corp.）により測定した。糖を20%（v/v）トリフルオロ酢酸中100℃６時間の加水分解により放出させ、加水分解物を凍結乾燥により、またはスピードーバック（Speed－Vac）（Savant Instruments）を用いて乾燥した。残留物を１%酢酸ナトリウム３水和物溶液に溶解し、HPLC－AS6カラムでAnumulaら、［Anal.Biochem.195:269－280（1991）］が記述するように分析した。サンプルは４回反復して分析を行なった。

シアル酸は、別途、Yaoら［Anal.Biochem.179:332－335（1989）］の直接比色定量法により３回の反復実験で測定した。

結果を下の表10に示す。

表１０

ＴＰ１０ＨＤバッチおよびグリコフォームにおける

各単糖の相対的モル含量

	TP10HD-CX		TP10HD-CCS	TP10HD-CC			TP10HD-CCW	
ﾊﾞｯﾁ 番号	R	V		G020	K002	H115	H118	
糖								
ﾌｺｰｽ	0.7*	0.9	0.5	0.4	0.6	0.7	0.6	0.5
ｶﾞﾗｸﾄｰｽ	0.9	1.3	1.6	1.9	2.1	2.3	2.2	2.1
ﾏﾝﾉｰｽ	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
ｸﾞﾙｺｻﾐﾝ	3.5	4.1	3.5	3.9	4.3	4.1	4.0	4.0
ｼｱﾙ 酸	0.2	0.4	0.7	1.7	1.6	1.3	1.1	1.6
ｼｱﾙ 酸/ﾏﾝﾉｰｽ比	0.08	0.15	0.24	0.56	0.54	0.42	0.38	0.53

＊結果はマンノース（＝３）に対して表してある。

このアッセイにおけるグルコサミン含量は、先に用いたアッセイにおけるＮ－アセチルグルコサミン含量に等しい。

結論

グリコフォームTP10HD－CCWおよびTP10HD－CCの単糖組成は、Ｎ－結合タンパク質置換部位の近くでフコシル化されかつトリ－マンノースコアを含有する、シアル酸を末端に持つモノー、バイーおよびトリアンテナリー（触角状）複合オリゴ糖によくみられる。以下のように結論することができる。すなわち、グリコフォームTP10HD－CCWは、グリコフォームTP10HD－CCSより有意に高い比率のシアル酸および／またはより低い比率のマンノースを含有する。ガラクトースおよび（Ｎ－アセチル）－ガラクトサミン含量の相違はおそらく重要ではない。TP10HD－CXのシアル酸／マンノース比は、この材料（上記Fearonらに記述されている）がグリコフォームTP10HD－CCSに似ており、TP10HD－CCWおよびTP10HD－CCとは異なることを示している。後者は、上に示した他のデータと一致して、主として弱カチオン性グリコフォームからなるようである。

これらの結果は、より緩慢な血漿クリアランス（TP10HD－CCW）がより高いシアル酸含量またはシアル酸／マンノース比（＞0.25）と相互に関連していることを示す。相対的に低いマンノース含量は、この材料におけるより高度の分枝（つまり、バイーおよびトリアンテナリー構造体がより多い）をも反映しているかもしれない。

実施例IX

TP10HDグリコフォームから放出されたオリゴ糖の電荷およびサイズ分布分析

各グリコフォームサンプル（0.6mg）からヒドラジン分解により複合オリゴ糖を放出させた。オリゴ糖鎖を還元的トリチウム化により放射性標識した。荷電オリゴ糖をアルカリ条件下の高電圧紙電気泳動にかけ、ピークを検出し、トリチウムラジオグラフィーにより定量した。オリゴ糖鎖をアルトロバクター・ウレアファシエンス（Arthrobacter ureafacie

ns）ノイラミニダーゼで処理してシアル酸を除去し、電気泳動を繰り返した。
放射性標識脱シアリル化（すなわち中性）オリゴ糖鎖を、BioGel P4、400メッシュ、2m x 15mm（BioRad Corporation,Richmond,CA）を用いたサイズ排除クロマトグラフィーに以下のようにかけた。クロマトグラフィーは、水中で55℃で流量0.2ml/分で実施した。サンプルを、内部標準品としてのデキストランの非標識部分酸性加水分解物と混合した。放射性標識グリコフォームのオリゴ糖鎖を、インラインフローラジオアイソトープモニター（in－line flow radioisotope monitor）により検出し、オリゴ糖標準品をインライン示差屈折計により検出した。以下に述べる結果では、各オリゴ糖の流体力学的量は見掛けグルコース単位（gu）として表され、数値はオリゴ糖アルジトールに直接隣接しているグルコースオリゴマー間の立方スプライン（spline）内挿法により決定した。
図４は、ノイラミニダーゼ処理の前および後におけるTP10HD－CCWおよびTP10HD－CCSのラジオエレクトロフォーレトグラムを比較する。どちらの場合にも、ノイラミニダーゼ処理はすべての標識オリゴ糖鎖を中性にし、陰性電荷がすべてシアル酸に起因することを示した。
グリコフォームTP10HD－CCSにおいては、約64％のオリゴ糖鎖は最初中性で、残りは単一のシアル酸単位に対応する移動度を有していた。グリコフォームTP10HD－CCW由来のオリゴ糖鎖については、はるかに高い比率（69％）の酸性オリゴ糖が存在し、そのうちの40～50％が２個またはそれ以上のシアル酸残基に対応する移動度を有していた。グリコフォームTP10HD－CCW由来のオリゴ糖鎖の約31％のみがノイラミニダーゼ処理前に中性であった。
サイズプロフィール分析によって調べられた脱シアリル化グリコフォームオリゴ糖鎖のサイズを下の表11に示す。

表１１

脱シアリル化グリコフォームオリゴ糖鎖の
サイズプロフィール分析

TP10HD-CCW	TP10HD-CCS
20.1*	20.0
17.3	17.3
15.0	15.0
14.0	14.0
12.8	12.7
11.5	11.6
10.4	10.5
9.3	9.3
3.0	3.0

＊数値はグルコース単位（ｇｕ）で示されている。

このように、グリコフォームから誘導されたオリゴ糖鎖はサイズが非常に似ていた。しかし、図５に示されるように、種々のサイズの相対的比率は異なっていた。TP10HD－CCWはT

P10HD－CCSに比べ、大きいサイズのオリゴ糖鎖、特に主要な15guオリゴ糖をより高い比率で含有し、14guのオリゴ糖はより低い比率で含有した。

結論

電荷分布データからは、さらに、TP10HD－CCWによって示された高いシアル酸含量と緩慢な血漿クリアランスとの相関関係を確認できる。２つのグリコフォームについて、酸性および中性オリゴ糖鎖の相対的比率は、急速におよび緩慢に血漿から清浄化された試験材料の比率と類似していた（実験例VI参照）。これは、主要なＮ－結合オリゴ糖鎖が１個またはそれ以上のシアル酸残基を有する糖タンパク質分子は血漿からゆっくり清浄化されるであろうことを示唆する。他方、中性オリゴ糖鎖は、いまだに不明なメカニズムによって急速な血漿クリアランスと関連づけられている。

オリゴ糖鎖のサイズプロフィール単独では、複合オリゴ糖鎖の精巧な構造の明確な同定ができない。しかし、組成およびサイズのデータは両方とも、トリマンノースコア（すなわちバイアンテナリー）を含有し、末端ガラクトースが様々にシアリル化され、また様々にフコシル化されている主要構造体と一致する。付加的可能性は、３個のGal単位をもつトリアンテナリー構造を生じるための、さらなる分枝を含む。サイズプロフィール自体は、緩慢な血漿クリアランスに関連した主要構造タイプを何ら示唆しないことは明らかである。

緩慢な血漿クリアランスは、少数の上記タイプのコア構造体のシアリル化の度合とのみ相互に関連しているのである。

実施例Ｘ

弱カチオン性TP10HDグリコフォームのpIは強カチオン性グリコフォームのpIよりも低い

高度にシアリル化されたグリコフォームのpIは、軽度にシアリル化されたグリコフォームのpIよりも低くなる。

方法

クロマトフォーカシングは、イオン交換カラムおよび異なるpHの両性緩衝液から生成したpH勾配を用いて、等電点pIに従ってタンパク質のイソフォームを分離する方法である。この実験では、7.1～4.0のpH勾配を用いて、TP10HD調製物の分析を行った。クロマトグラフ樹脂はMono P,Hr5/5（ニュージャージー州ピスカタウェイ、Pharmacia Fine Chemicals）であり、出発緩衝液は飽和イミノ二酢酸でpH7.1に滴定した0.025M Bis/Trisであり、溶離剤は水で1:10（v/v）に希釈してHClでpH4.0に調整したポリバッファー７－４（ニュージャージー州ピスカタウェイ、Pharmacia Fine Chemicals）であり、洗浄緩衝液は2MのNaCl水溶液であった。実験条件は、7.1～4.0単位の線状pH勾配が得られるように選択した。

結果

この実験の結果を図６にまとめてある。TP10HD－CXの主要量のイソフォームは約6.0～5.7のpIを有し、pI5.0以下の物質が少量存在する。TP10HD－CC調製物では、pI5.7イソフォームが少量成分で、主要量のイソフォームは5.1～4.8のpIを有していた。ピークの積分は、TP10HD－CC調製物の約40％がpI＜4.9であることを示唆する。TP10HD－CX調製物に含まれるpI＜4.9の物質はごく少量であるので、この調製物中の低pI物質の割合を正確に評価することはできなかった。

結論

TP10HD－CXはTP10HD－CCよりも高い平均pIを有することがわかり、翻訳後に誘導される酸性基の含量が比較的低いことと一致する。しかし、２つのTP10HD調製物間にはイソフォームのプロフィールにおいて若干の重複が存在した。低いpI（pI＜4.9）を有するTP10HD－CCのパーセンテージはブタ血漿から得られるクリアランスの遅い物質のパーセンテージと関連していた（実施例VI参照）。これらの結果は、より高レベルの末端シアル酸残基を有するグリコフォームがより低いpIを示すという、実施例VIIIに記載した知見と合致する。

実施例XI

TP10HDグリコフォームの機能活性:in vitro補体媒介溶血の阻害

種々のTP10HDグリコフォームは、以下に示した結果により示されるように、アッセイの信頼区間内で匹敵するin vitro抗溶血機能活性を有する。

方法

溶血阻害アッセイは、補体源としてのヒト血清の存在下でウサギポリクローナル抗体により感作されたSRBCの溶解を阻止するTP10HDの溶液の能力に基づいており、上記の実施例VIに記載してある。

活性は標準アッセイ条件下で溶血の50％阻害（IH_{50}）をもたらすTP10HDの濃度として表される。50％阻害をもたらすTP10HDまたはTP10HDグリコフォームの濃度が低ければ低いほど、この調製物の効力は強くなる。7.8～1000ng/mlのTP10HDまたはTP10HDグリコフォームの希釈範囲を各試料につき検討した。

結果

TP10HD－CXは20±7ng/mlの典型的IH_{50}を示し、一方、TP10HD－CCの値はこれより高く、約50±3ng/mlであった。このことは、弱カチオン性高度シアリル化グリコフォームを多量に含有する調製物の効力が強カチオン性グリコフォームより約２倍低いことを示唆している。TP10HD－CCWは44ng/mlの典型的IH_{50}を有し、一方、TP10HD－CCSは27ng/mlの範囲のIH_{50}値を有していた。これらの結果は、非分画化調製物TP10HD－CXおよびTP10HD－CCの値と一致する。脱グリコシル化はIH_{50}をTP10HD－CXの80ng/mlからTP10HD－CXDの40ng/mlへと低下させた。

結論

このアッセイのアッセイ内バラツキは15～20％の範囲内であり、従って、IH_{50}値の２倍差の有意性は判断が難しいが、４倍またはそれ以上の変化は有意であると考えられる。かくして、TP10HD－CC、TP10HD－CCWおよびTP10HD－CCSがこのアッセイにおいて効力が異なると結論づける根拠は何もない。これらグリコフォームの増大したグリコシル化またはシアリル化は、in vivo血漿半減期を著しく増加させるものの、溶血阻害でのin vitro効力に対しては大きな影響を及ぼさないことが明らかである。

プラスミドpBSCR1c/pTCSgptを担持するチャイニーズ・ハムスター卵巣（CHO）細胞系DUX B11は、1989年３月23日にメリーランド州ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）に寄託され、受託番号CRL 10052を指定された。

上で引用した文献はすべて参考としてここに組み入れるものとする。

本発明について詳しく説明してきたので、当業者は、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、また、不当な実験を行うことなく、広範囲の均等なパラメーター、濃度および条件のもとで本発明を実施し得るだろう。

本発明を特定の実施態様に関連させて説明してきたが、更なる修飾が可能であることが理解されよう。本出願は、一般には本発明の原理に従う本発明のあらゆる変更、使用または改作を包含するものであり、本発明が属する分野において公知のまたは通常のプラクティスに含まれかつ請求の範囲に記載される本質的特徴にあてはまる本開示からの逸脱をも包含するものである。

【図２】

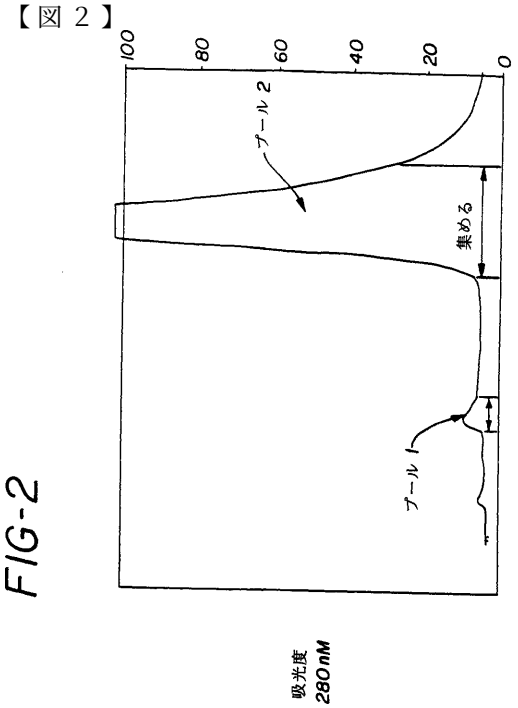
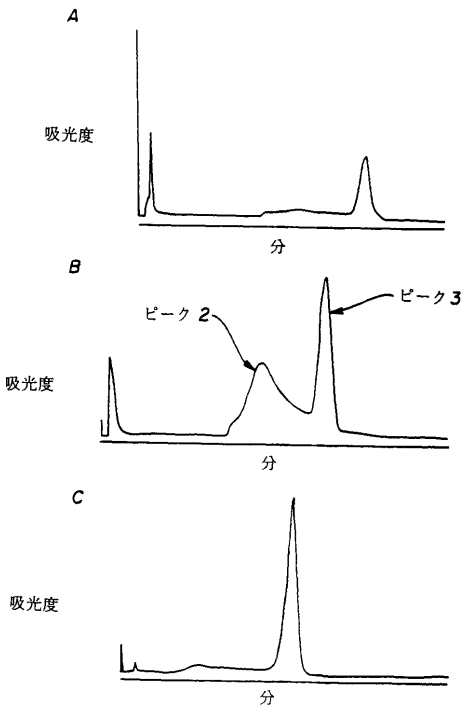


FIG-2

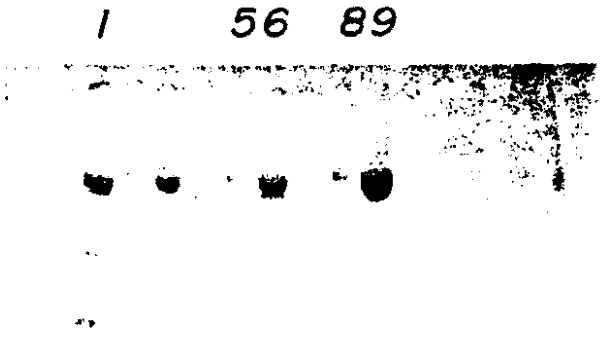
【図１】

FIG-1



【図３】

FIG-3



【図４】

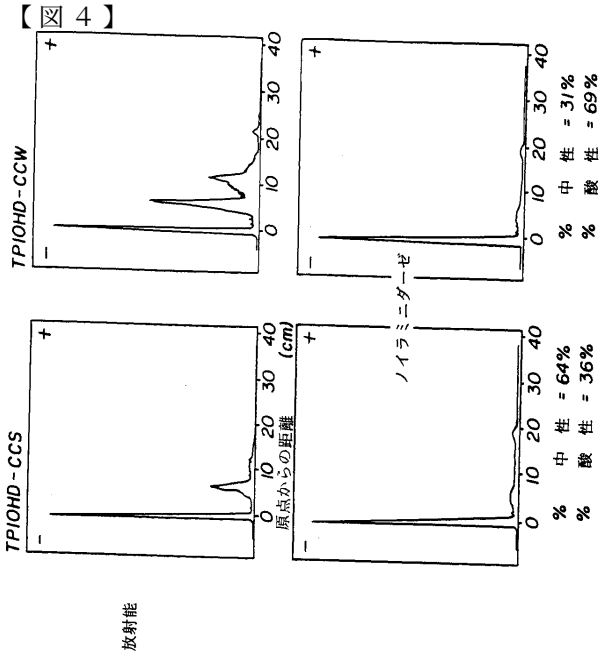
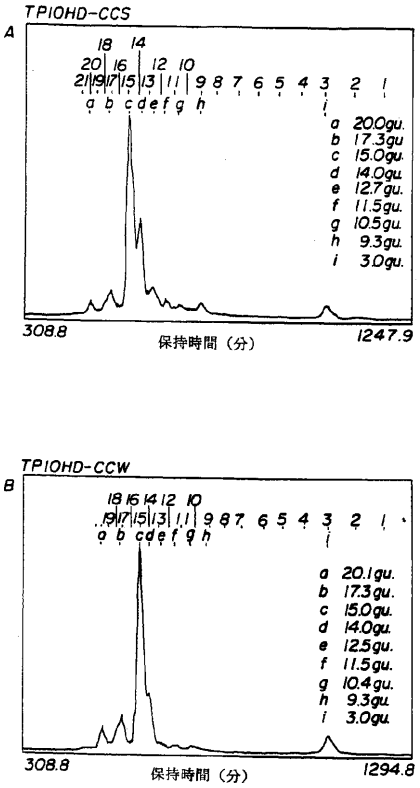
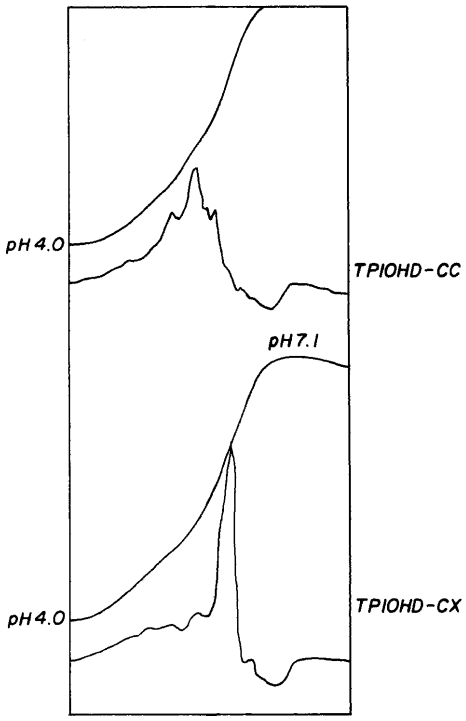


FIG-4

【図５】
FIG-5



【図６】
FIG-6



フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7] F I
C１２P 21/00 A６１K 37/02

(72)発明者 マーシュ，ヘンリー シー．ジュニア
アメリカ合衆国 ０１８６７ マサチューセッツ州 リーディング，ハイ ストリート ２１８番地
(72)発明者 スミス，リチャード エイ．ジー．
イギリス国 ケイティー１８ ５エックスキュー エプソン サリー，ユー ツリー ボトム ロード，グレイト バーフ（番地なし）
(72)発明者 イエ，チャン－ジン グレイス
アメリカ合衆国 ０２１５８ マサチューセッツ州 ニュートン，アダムズ ストリート ２９８番地
(72)発明者 リフター，ジョン
アメリカ合衆国 ０２１８１ マサチューセッツ州 ウェルズレイ，ベレア ロード ２３番地
(72)発明者 フリーマン，アン マリー
イギリス国 ケイティー１８ ５エックスキュー エプソン サリー，ユー ツリー ボトム ロード，グレイト バーフ（番地なし）
(72)発明者 ゴッセリン，マイケル エル．
アメリカ合衆国 ０２１５１ マサチューセッツ州 レヴィア，フランクリン ストリート １０５番地

審査官 佐久 敬

(56)参考文献 特表平０４－５０１５０２（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９２／１０２０５（WO，Ａ１）
国際公開第９１／０５０４７（WO，Ａ１）
J.Immunol.(1985),Vol.134,No.5,p.3332-3338
SCIENCE(1990),Vol.249,p.146-151

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
C07K 1/00 - 19/00
C12N 15/00 - 15/90
C12P 1/00 - 41/00
A61P 7/00 - 7/12
A61P 37/00 - 37/08
PubMed
BIOSIS/WPI(DIALOG)
CA(STN)