

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-43502

(P2004-43502A)

(43) 公開日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/47	C07K 14/47 ZNA	4C084
A61K 38/00	A61P 7/04	4H045
A61P 7/04	A61P 11/00	
A61P 11/00	A61P 19/00	
A61P 19/00	A61P 25/00	
審査請求 有 請求項の数 9 O L (全 10 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-358317 (P2003-358317)	(71) 出願人	595123069
(22) 出願日	平成15年10月17日 (2003.10.17)		ビーエーエスエフ アクチェンゲゼルシャ フト
(62) 分割の表示	特願2002-13319 (P2002-13319) の分割		ドイツ連邦共和国 デー-67056 ル ートビヒシャフェン (番地なし)
原出願日	平成2年5月4日 (1990.5.4)	(74) 代理人	100061815
(31) 優先権主張番号	P3915072.0		弁理士 矢野 敏雄
(32) 優先日	平成1年5月9日 (1989.5.9)	(74) 代理人	100094798
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 山崎 利臣
(31) 優先権主張番号	P3922089.3	(74) 代理人	100099483
(32) 優先日	平成1年7月5日 (1989.7.5)		弁理士 久野 琢也
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100114890
			弁理士 アイゼル・フェリックス=ライ ンハルト
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規蛋白質及びこれを使用した薬剤の製法

(57) 【要約】

【課題】 TNF の作用を中和することのできる蛋白質の提供

【解決手段】 最初のグリコシル化された形で分子量約42000ダルトンを有し、N-末端にアミノ酸配列；

Xaa Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
Thr Cys Arg Leu Arg Glu

[式中、Xaaは、水素原子、フェニルアラニン基(Phe)又はアミノ酸配列；Ala Phe、Val Ala Phe、Gln Val Ala Phe、Ala Gln Val Ala Phe、Pro Ala Gln Val Ala Phe又はLeu Pro Ala Gln Val Ala Pheを表す]を有する蛋白質、及びこの蛋白質の作用を強く低下させることなく、アミノ酸又はペプチドの好適な置換、欠失又は付加により又はグリコシド基を変化させることにより得られるムテインにより解決する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

S D Sゲル電気泳動で測定する際に分子量約42000ダルトンを有し、かつN - 末端にアミノ酸配列；

X a a T h r P r o T y r A l a P r o G l u P r o G l y S e r
T h r C y s A r g L e u A r g G l u

[式中、X a a は、水素原子、フェニルアラニン基 (P h e) 又はアミノ酸配列； A l a P h e、V a l A l a P h e、G l n V a l A l a P h e、A l a G l n V a l A l a P h e、P r o A l a G l n V a l A l a P h e 又は L e u P r o A l a G l n V a l A l a P h e を表す] を有する T N F - 抑制作用を有する蛋白質の T N F - 抑制作用を強く低下させることなく、アミノ酸又はペプチドの好適な置換、欠失又は付加により又はグリコシド基を変化させることにより得られるムテイン。 10

【請求項2】

a . オリジナルなグリコシル化形で S D Sゲル電気泳動で測定する際に約42000ダルトンの分子量を有し、

b . 特異的に T N F を結合し、

c . トリプシンにより分解されず、かつ

d . 発熱患者の尿から又は卵巣ガン患者の腹水液から、逆浸透又は限外濾過、および次いでイオン交換クロマトグラフィーおよび T N F 親和性カラム上での親和性クロマトグラフィーにより単離される； 20

N - 末端にアミノ酸配列；

X a a T h r P r o T y r A l a P r o G l u P r o G l y S e r
T h r C y s A r g L e u A r g G l u

[式中、X a a は、水素原子、フェニルアラニン基 (P h e) 又はアミノ酸配列； A l a P h e、V a l A l a P h e、G l n V a l A l a P h e、A l a G l n V a l A l a P h e、P r o A l a G l n V a l A l a P h e 又は L e u P r o A l a G l n V a l A l a P h e を表す] を有する T N F - 抑制作用を有する蛋白質、及びこの蛋白質の T N F - 抑制作用を強く低下させることなく、アミノ酸又はペプチドの好適な置換、欠失又は付加により又はグリコシド基を変化させることにより得られるムテイン。 30

【請求項3】

脱グリコシル化された形の請求項1又は2記載の蛋白質。

【請求項4】

そのムテインがその蛋白質の T N F - 抑制作用を強く低下させることなく、アミノ酸又はペプチドの付加により又はグリコシド基を変化させることにより得られる請求項1から3までのいずれか1項記載の蛋白質。

【請求項5】

ムテインがN末端配列にアミノ酸配列；

X a a T h r P r o T y r A l a P r o G l u P r o G l y S e r 40
T h r C y s A r g L e u A r g G l u

[式中、X a a は前記のものを表す] を有する、請求項4記載の蛋白質。

【請求項6】

S D Sゲル電気泳動で測定する際に分子量約42000ダルトンを有し、N - 末端にアミノ酸配列；

X a a T h r P r o T y r A l a P r o G l u P r o G l y S e r
T h r C y s A r g L e u A r g G l u

[式中、X a a は、水素原子、フェニルアラニン基 (P h e) 又はアミノ酸配列； A l a P h e、V a l A l a P h e、G l n V a l A l a P h e、A l a G l n V a l A l a P h e、P r o A l a G l n V a l A l a P h e 又は L e 50

u Pro Ala Gln Val Ala Pheを表す]を有するTNF - 抑制作用を有する蛋白質を製造する方法において、発熱患者の尿又は卵巣ガン患者の腹水液の濃縮、および引き続くこのようにして得られた残分のイオン交換クロマトグラフィーおよび親和性クロマトグラフィーによる精製からなるTNF - 抑制作用を有する蛋白質の製法。

【請求項7】

得られたTNF - 抑制作用を有する蛋白質を更に、TNF - 抑制作用を強く低下させることなく、アミノ酸又はペプチドの好適な置換、欠失又は付加により又はグリコシド基の変化により、変化させることからなる請求項6記載の製法。

【請求項8】

請求項1から5までのいずれか1項記載の蛋白質を含有する、体液中のTNF の濃度が上昇している疾患を治療するための薬剤。

10

【請求項9】

疾患がアレルギー、自己免疫病、リュウマチ性疾患、ショック肺、炎症性の骨疾病、血液凝固障害、又は移植後の合併症である請求項8記載の薬剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規の蛋白質及びその製造に関する。

【背景技術】

20

【0002】

TNF (Tumor-Nekrose-Factor)は、生物学的活性において広いスペクトルを有する公知の蛋白質である。これは、種々の悪性及び非悪性の細胞種に影響を与え、敗血症ショック及び組織損傷並びに腎剥離、移植、ショック肺及び脳性マラリアでは、重要な役割を果たす(Lymphokines 1987 Vol.14; Pharmaceutical Res.5, 129(1988); Science 234, 470(1986); Nature 330, 662(1987); J. Exp. Med. 166, 1132(1987); Science 237, 1210(1987); J. Exp. Med. 166, 1280(1987))。

【非特許文献1】Lymphokines 1987 Vol.14

【非特許文献2】Pharmaceutical Res.5, 129(1988)

30

【非特許文献3】Science 234, 470(1986)

【非特許文献4】Nature 330, 662(1987)

【非特許文献5】J. Exp. Med. 166, 1132(1987)

【非特許文献6】Science 237, 1210(1987)

【非特許文献7】J. Exp. Med. 166, 1280(1987)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

抗体を用いてTNF の作用を中和させることができることは、公知である(欧州特許第260610号明細書)。しかしながらこの抗体は、人特有の物質ではないので、人への使用の際に免疫反応を引き起こしうる。

40

【課題を解決するための手段】

【0004】

ところで、人に起因し、TNF の作用を中和することのできる蛋白質が発見された。

【0005】

本発明の目的は、分子量約42000ダルトン及びN - 末端にアミノ酸配列;

Xaa Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
Thr Cys Arg Leu Arg Glu

[式中、Xは、水素原子、フェニルアラニン基(Phe)又はアミノ酸配列; Ala Phe、Val Ala Phe、Gln Val Ala Phe、Ala Gln V

50

a l A l a P h e、P r o A l a G l n V a l A l a P h e 又は L e u
P r o A l a G l n V a l A l a P h e を表す] を有する蛋白質及びそのムテ
イン (Muteine) である。

【 0 0 0 6 】

ムテインとは、プロテイン鎖中のアミノ酸又はペプチドの好適な交換、欠失又は添加により得られ、これらの処置により新規の蛋白質の作用が著しく弱められることはない蛋白質である。ムテインは、グリコシド基の変形によっても得ることができる。

【 0 0 0 7 】

ここに記載の新規蛋白質は酸性特性を有し、その等電点は、pH 2 ~ 5 である。これは、特異的に T N F と結合し、トリプシンによる消化は、困難であるか又は不可能である 10

【 0 0 0 8 】

新規蛋白質は、例えば熱のある、即ち体温が約 38 以上の患者の尿から単離することができる。このために尿を先ず濃縮し、これは、例えば逆浸透又は限外濾過により行うことができる。このようにして得られた透析残分を、引き続いてイオン交換 - 及び親和性クロマトグラフィーにより精製する。

【 0 0 0 9 】

この蛋白質は、卵巣癌の患者の人間の腹水液からも得られる。

【 0 0 1 0 】

蛋白質の精製は公知法、例えば親和性 - 又はイオン交換クロマトグラフィーにより行うことができる。 20

【 0 0 1 1 】

そうして得られた蛋白質は、アミノ酸配列中の N - 末端で不均一である。アミノ酸は 7 個まで欠けていて良い。そのような不均一性は、身体特有の蛋白質の場合には異例ではなく、例えば - インターフェロンの場合にも現われる。

【 0 0 1 2 】

エンドグリコシダーゼを用いての処理により、この蛋白質は、S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動でのその走行特性を変え、このことは、糖基の離脱に起因する。

【 0 0 1 3 】

前記蛋白質は、尿及び腹水液中に 1 ~ 1 0 0 μ g / l の濃度で存在する。この蛋白質を 30
、薬学上の目的のために大量に提供するために、公知の遺伝子工学的的方法 (Maniatis, T. et al: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 1982 参照) を利用した。この目的のためには、先ず新規蛋白質に関する遺伝情報を確認し、相応する核酸を単離すべきである。そのために、純粋蛋白質をジチオトレイトールで還元し、ついで遊離の S H - 基の誘導化のためにヨードアセトアミドを添加し、引き続きそうして処理された蛋白質をブロムシアン、続いてトリプシンを用いて小さいペプチドに開裂させる。ペプチドの分離は、逆相クロマトグラフィーにより行う。この精製されたペプチドのうち 1 個の N - 末端シーケンシングは、配列: V a l P h e C y s T h r L y s を示した。更にこの蛋白質は、次の 3 個の他のペプチド配列を有する: G l y V a l
T y r T h r S e r、I l e C y s T h r C y s A r g P r o G l y 40
T y r 及び P r o G l y T h r G l u T h r S e r A s p V a l V a l
C y s L y s P r o C y s A l a P r o G l y T h r P h e S e
r X a b T h r T h r S e r S e r A s p I l e C y s A r g P r
o (ここで X a b は、おそらくグリコシル化されている、未知のアミノ酸である)。

【 0 0 1 4 】

存在するペプチド配列は、相応するオリゴヌクレオチドの合成により、人間のゲノムからの又は相応する c - D N A - バンク (Bank) からの遺伝子の明白な同定を、配列特異的なフィルターハイブリッド形成により可能とする。

【 0 0 1 5 】

次いでそうして得られた蛋白質に関する遺伝情報は、表現のために、公知法により種々 50

の宿主細胞、例えば真核細胞、酵母、枯草菌又は大腸菌中にもたらされ、かつそのようにして蛋白質を得ることができる。その際、真核細胞中にグリコシル化された形の蛋白質が生じる。

【0016】

アミノ酸又はペプチドの交換、欠失又は添加により新規蛋白質から誘導されるムテインは、有利に遺伝子工学的的方法により製造される。

【0017】

新規蛋白質は、良好なTNF - 抑制作用を示し、従って体液中のTNF 濃度が高まる疾病、例えば敗血症ショックの治療のために使用することができる。更にこれらは、次の疾病に使用できる：アレルギー、自己免疫病、リュウマチ性疾患、ショック肺、炎症性の骨疾病、血液凝固障害、火傷並びに移植後の合併症。

10

【実施例】

【0018】

例1

TNF - 抑制作用の測定

TNF の生物学的活性をマウス細胞系L929(J.Biol.Chem.260, 2345(1985))及び人間細胞系MCF7の溶解(Lyse)により測定した。TNF 抑制作用の測定の実験の際に、TNF の濃度を、細胞の少なくとも50%が溶解するように選択した。

【0019】

TNF 結合蛋白質を有する上澄を、1:2ステップ(Schritt)で、微量滴定プレート中で希釈した。この溶液(0.05ml)に人間 - もしくはマウス - TNF (120pg/ml)各々0.05mlを添加した。引き続いてアクチノマイシンD 2µg/mlを含有する媒体0.1ml中のL929 - 細胞 50000の添加を行った。ふ化器中で37 で20~24時間のインキュベーションの後に、細胞を固定し、クリスタルヴァイオレットで着色した。TNF - 結合蛋白質の不在下で、TNF 及びLT(リンフォトキシン)は、細胞を溶かした。これらは着色の間にすすぎ落した。TNF - 結合蛋白質を有する上澄の保護効果は、残存する完全な細胞の着色性により示された。

20

【0020】

細胞毒性作用の抑制は、人間 - TNF にたいしても、少々弱いが人間 - LTにたいしてもみられるが、マウス - TNF ではみられなかった。

30

【0021】

例2

尿からの蛋白質単離

熱(38)のある患者から集めた尿40lを、透析残分流の容量が2.5lに濃縮されるまで、ヘモフロウ F60濾筒(Hemoflow^(R) F60 Patrone; Fa.Fresenius)を通して濾過させた。

【0022】

引き続いてこの透析残分に、洗浄のために20mM燐酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)各々2.5lを4回添加し、かつ濾過を各々出発容量の2.5lになるまで続けた。

40

【0023】

そうして得られた一連の蛋白質、茶色に着色された透析残分を、ファルマツィア社のS - セファローズ(S-Sepharose^(R); Fa.Pharmacia:カラム: = 5cm、l = 17cm)を介してクロマトグラフィーにかけた。カラムは、装入の前に、20mM燐酸ナトリウム緩衝液、pH5.5(=緩衝液I)10カラム容量(SV)で平衡させ、透析残分を装入した。緩衝液I 3SVで後洗浄し、20mM燐酸ナトリウム緩衝液、pH6.5(=緩衝液II)3SVで溶出させると、有価生成物が得られた。

【0024】

更に精製するために、このフラクションを、緩衝液III(20mM燐酸ナトリウム、40mMNaCl、pH7.2)10SVで平衡させたTNF - 親和性カラム(例4、

50

= 1.5 cm、l = 10 cm) 上に注いだ。装入後に緩衝液 III 3 SV で後洗浄し、カラムでの溶出による TNF - 結合蛋白質フラクションを、0.58% 酢酸及び 140 mM NaCl からなる緩衝液 IV 40 ml で洗浄した。

【0025】

純粋蛋白質の単離のために、TNF - 親和性カラムの溶出液をモノ Q - カラム HR 5 / 5 (MONO Q-Saeule HR5/5 ; Fa.Pharmacia) で分離した。そのために先ず溶出液を 0.1 n NaOH で pH 12.0 に調節した。

【0026】

カラムを 20 mM 磷酸ナトリウム緩衝液、pH 12.0 (緩衝液 V) 11 SV で平衡させた。pH を調整した TNF - 親和性カラム溶出液 10 ml を装入し、緩衝液 V 4.4 SV で洗浄した。引き続き 20 mM 磷酸ナトリウム、pH 7.5 で溶出させた。 10

【0027】

不純物を更に除去するために、0.1 N HCl で pH 2.0 に調節された 20 mM 酢酸緩衝液 (緩衝液 VI) 7 SV でモノ Q - カラムを洗浄した。

【0028】

その後、カラムを 20 mM 酢酸 5 ~ 6 SV、20 mM NH₄Cl - 緩衝液、pH 2.0 (0.1 n HCl で調整、緩衝液 VII) で更に溶出させた。1 ~ 2 SV により不純物を含む 280 nm で UV - 活性なバンド (Band) を溶出させ、更に 1 ~ 2 SV により新規蛋白質を溶出させた。純粋蛋白質の更なる量は、100 mM NaCl に調整された緩衝液 VI 11 ~ 2 SV の後溶出により達成されうる。 20

【0029】

蛋白質は、そうしてゲル電気泳動の純度 > 90% で得られた。尿 1 l から蛋白質約 1 ~ 10 µg を得ることができる。

【0030】

例 3

人間の腹水液からの蛋白質単離

卵巣癌の患者の穿刺液として得られる、少し混濁した稀液性の腹水液 2.5 l を 3000 g で 30 分間遠心分離機にかけた。上澄を 10% 磷酸で pH 7.2 に調整し、グルタルジアルデヒドで架橋された TNF - セファローズ (Sepharose^(R)) - カラム (= 1.5 cm、l = 3 cm ; 例 4 参照) 上に添加した。このカラムを緩衝液 III 50 ml で平衡させ、かつ装入後、緩衝液 III 150 ml で後洗浄した。TNF - 結合蛋白質を緩衝液 IV 30 ml で溶出させた。 30

【0031】

更に精製するために、溶出液を 10% HCl で pH 3.0 に調整し、20 mM 酢酸 (pH 3.0) で平衡させたクロマトグラフィカラム (Mono S HR 5/5, Fa.Pharmacia) 上に注いだ。装入後、20 mM 酢酸 (pH 3.0) 10 ml で後洗浄し、引き続き TNF - 結合蛋白質を 20 mM 酢酸 (pH 3.0) 6 部及び 50 mM 磷酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) 4 部からなる緩衝液混合物 4 ml を用いる溶出により溶出させた。溶出液の pH 値を制御し、場合によっては pH 6.5 に後調整した。

【0032】

この溶出液を磷酸ナトリウム緩衝液 pH 6.0 (緩衝液 VIII) で平衡させたクロマトグラフィカラムモノ Q HR 5 / 5 上に注いだ。各々緩衝液 VIII 6 ml 及び 20 mM 酢酸、5 mM NaCl、pH 2.2 6 ml で洗浄後に、20 mM 酢酸、150 mM NaCl、pH 2.0 (緩衝液 IX) 6 ml を用いて蛋白質をカラムから溶出させた。 40

【0033】

この溶出液の同定により、これが、(N - 末端配列の不均一を除き) 例 2 により得られた蛋白質と同じものであることが判明した。

【0034】

例 4

TNF - 親和性カラムの製造

a) BrCN - セファロースでのTNFのカップリング

BrCN - セファロース (BrCN-Sepharose^(R); Fa. Pharmacia) 7.5 g を水 30 ml 中に懸濁させた。膨潤時間 30 分後に BrCN - セファロース (BrCN-Sepharose^(R)) - ゲル懸濁液を先ず 1 mM HCl - 溶液 500 ml で、次いで 0.1 M NaHCO₃、0.5 M NaCl、pH 8.3 で洗浄した。

【0035】

緩衝液 (0.1 M NaHCO₃、0.5 M NaCl、pH 8.3) 41 ml 中に溶かされた TNF 136 mg を、このゲル懸濁液に添加した。反応バッチを室温で 2 時間振り混ぜ、かつ TNF - セファロース (TNF-Sepharose^(R)) を 3000 U / 分で遠心分離した。ゲル物質を緩衝液 40 ml で洗浄した。

10

【0036】

上澄の蛋白質測定からカップリング収率 > 90% が得られた。

【0037】

BrCN - セファロース (BrCN-Sepharose^(R)) の過剰の活性基のブロッキングのために、ゲル懸濁液に緩衝液 (0.1 M NaHCO₃、0.5 M NaCl、1 M エタノールアミン、pH 8.3) 40 ml を添加し、引き続いて室温で 1 時間振り混ぜ、次いでエタノールアミンを緩衝液 (0.1 M NaHCO₃、0.5 M NaCl、pH 8.3) 3 × 40 ml を用いて洗い流した。

【0038】

b) グルタルジアルデヒドを用いる TNF - セファロース (TNF-Sepharose^(R)) の架橋

20

a) により製造された TNF - セファロース (TNF-Sepharose^(R)) ゲル懸濁液 20 ml を緩衝液 (20 mM 磷酸ナトリウム、140 mM NaCl、pH 8.0) 25 ml で 2 度洗浄した。この懸濁液を同じ緩衝液 40 ml 中に入れ、25% グルタルジアルデヒド溶液 1.6 ml を添加した。室温で 1 時間振り混ぜた後に、懸濁液を遠心分離させ、緩衝液 (20 mM 磷酸ナトリウム、140 mM NaCl、1 M エタノールアミン、pH 8.0) 25 ml を添加した。再び 1 時間振り混ぜ、引き続いて TNF - セファロース (TNF-Sepharose^(R)) 懸濁液をクロマトグラフィーカラム (= 1.5 cm、l = 10 cm) 中に充填した。

【0039】

30

このカラムは、緩衝液 (20 mM 磷酸ナトリウム、140 mM NaCl、pH 7.2) 100 ml 及び 0.58% 酢酸 + 140 mM NaCl 50 ml で洗浄後に親和性クロマトグラフィーのために使用可能であった。

【0040】

例 5

蛋白質の同定

a) 分子量及び純度

分子量及び純度の測定のために、例 2 もしくは 3 により得られた蛋白質 2 µg に、還元性及び非還元性条件下で、15% SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動を施した (Nature 227,680(1970))。公知の一連の標準蛋白質との比較により、両方の方法による新規蛋白質が、クマシーブルーでの着色後に、分子量約 42000 ダルトンの均一なバンドであることが判明した。

40

【0041】

他のバンドを認識することはできなかった。従ってこの蛋白質の純度は、90% でありうる。

【0042】

この蛋白質は、明白な青 - 紫に着色されたバンドとして確認される。

【0043】

b) N - 末端シーケンシング

例 2 により得られた蛋白質 10 µg (250 pmol) を気相シーケンサーを用いて

50

N - 末端で数回シーケンシングした。

【0044】

N - 末端配列分析は、同類の副配列の出現に基づき、N - 末端アミノ酸配列の不均一性を示唆した。次の主配列を確認した：

配列 1 a

P h e T h r P r o T y r A l a P r o G l u P r o G l y S e r
T h r C y s A r g L e u A r g G l u。

その他に、気相シーケンシングではN - 末端でアミノ酸6個が延長された

配列 2 a

L e u P r o A l a G l n V a l A l a P h e T h r P r o T y r 10
A l a P r o G l u P r o G l y S e r T h r C y s A r g L e u
A r g G l u

及びN - 末端でアミノ酸1個が減少された

配列 3 a

T h r P r o T y r A l a P r o G l u P r o G l y S e r T h r
C y s A r g L e u A r g G l u が確認された。

【0045】

同様に例3の蛋白質中では次の主配列が確認された：

配列 1 b

L e u P r o A l a G l n V a l A l a P h e T h r P r o T y r 20
A l a P r o G l u P r o G l y S e r T h r C y s A r g L e u
A r g G l u (約 1 0 %)

配列 2 b

P r o A l a G l n V a l A l a P h e T h r P r o T y r A l a
P r o G l u P r o G l y S e r T h r C y s A r g L e u A r g
G l u (約 4 5 %)

配列 3 b

A l a G l n V a l A l a P h e T h r P r o T y r A l a P r o
G l u P r o G l y S e r T h r C y s A r g L e u A r g G l u

(約 4 5 %)。

30

【0046】

d) トリプシンでの処理

新規蛋白質 20 μ g を pH 8.5 で次のように処理した：

1. 0.1 M NaHCO₃ - 緩衝液 pH 8.5 中に溶かしたトリプシン 0.5 μ g の添加；37 で16時間のインキュベーション
2. 0.1% SDS - 0.1 M NaHCO₃ - 緩衝液 pH 8.5 中に溶かしたトリプシン 0.5 μ g の添加；SDS - 含有率 0.1% まで溶液を調整；37 で16時間のインキュベーション。

【0047】

このように処理された蛋白質を、15% SDS - ポリアクリルアミド電気泳動で、出発蛋白質と比較して分析した。蛋白質の減成は、確認できなかった。 40

【0048】

例 6

脱グリコシル化

例2により得られたモノQ - 溶出液 (0.1 mg / 蛋白質 ml) 0.1 ml を 1 M NaOH で pH 7.2 に調整した。引き続きグリコペプチダーゼ F (Fa.Boehringer Mannheim) 10 単位を添加した。37 で6時間のインキュベーション後に、更に酵素10単位を添加した。更に反応時間16時間後にバッチ 50 μ l を凍結乾燥させ、15% SDS - ゲル中で未処理の蛋白質と比較して分析した。酵素で処理された蛋白質は、未処理の試料と比較すると、約 3 kD 小さい分子量を示した。更にバッチ 25 μ l を、例1に記載の 50

ように、TNF 抑制作用に関して検査した。TNF 抑制作用は、糖分の脱離後にも完全に保持されていた。

【0049】

例7

抗体製造

例2及び3で単離された蛋白質を、ポリクロナル抗体の製造のためにイエウサギに注射した。抗体の反応性及び特異性をELISAを用いて検査した。そのためにELISA-プレート(ELISA-Platte; Fa.Costar)を、抑制剤 - もしくは対照蛋白質 $1 \mu\text{g} / 0.05 \text{ M}$ 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.6) 1 ml の溶液で被覆し、非特異性結合を1% BSA / PBSで飽和させ、かつ種々の希釈血清と共にインキュベートした。結合された抗体の検査をビオチニル化された抗 - ウサギ - IgG及びストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ並びにTMB - 基質を用いて行った。個々のインキュベーションの間に各々0.05% トウイーン (^(R) Tween) - 20 / PBSで3回洗浄した。2 M H_2SO_4 を用いる停止の後に、450 nmにおける光学密度を測定した。

10

【0050】

例8

体液中の蛋白質検出

種々の体液中のTNF 結合蛋白質の検出のために、サンドイッチ - ELISA (sandwich-ELISA) を使用した。そのためにELISA - プレート(ELISA-Platte; Fa.Costar)をTNF ($5 \mu\text{g} / 0.05 \text{ M}$ 炭酸ナトリウム緩衝液 pH 9.6 1 ml) で被覆した。1% BSA / PBSで飽和させた後、検査すべき試料、例えばリウマチ患者の髄液と共にインキュベートした。検出を、例7に記載の抗 - 抑制剤 - 抗体及びビオチニル化された抗 - ウサギ - IgG / ストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ / TMB - 基質を用いて行った。個々のインキュベーションの間に各々0.05% トウイーン (^(R) Tween) - 20 / PBSで3回洗浄した。2 M H_2SO_4 の添加後に、450 nmにおける吸光を測定した。

20

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 1/18	C 0 7 K 1/18	
C 0 7 K 1/22	C 0 7 K 1/22	
	A 6 1 K 37/02	
(74)代理人 230100044		
弁護士 ラインハルト・アインゼル		
(72)発明者 ハンス - ゲオルク レマイレ		
ドイツ連邦共和国 デー - 6 7 1 6	ディルムシュタイン	フローマースハイマー エック 7
(72)発明者 ハイנטツ ヒレン		
ドイツ連邦共和国 デー - 6 7 3 3	ハスロツホ	マックス - ブランク - シュトラーセ 1 7
(72)発明者 アッヒム メラー		
アメリカ合衆国 マサチューセッツ	0 1 8 9 0	ウィンチェスター キャリッジ レイン 3
(72)発明者 ロタール ダウム		
ドイツ連邦共和国 デー - 6 7 0 1	オッターシュタット	ライアーシュトラーセ 2 5
(72)発明者 トーマス デルパー		
ドイツ連邦共和国 デー - 6 7 1 9	ピッサースハイム	ルイトポルトシュトラーセ 3
(72)発明者 トーマス ズプコフスキ		
ドイツ連邦共和国 デー - 6 7 0 4	ムッターシュタット	ルッフハイマー シュトラーセ 1
F ターム(参考) 4C084 AA02 AA06 AA07 BA02 BA08 BA22 BA23 BA44 CA18 NA14		
ZA022 ZA532 ZA592 ZA962 ZB072 ZB112 ZB132 ZB152		
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA53 CA40 EA20 GA23 GA26 HA05		