

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3668242号
(P3668242)

(45) 発行日 平成17年7月6日(2005.7.6)

(24) 登録日 平成17年4月15日(2005.4.15)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09
A 6 1 K 38/00
A 6 1 K 39/395
A 6 1 P 1/02
A 6 1 P 1/04

C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 1/02
A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 3/10

請求項の数 21 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-8944 (P2004-8944)	(73) 特許権者	592124573
(22) 出願日	平成16年1月16日(2004.1.16)		ジェネティックス・インスティテュート・リ
(62) 分割の表示	特願平6-511208の分割		ミテッド・ライアビリティ・カンパニー
原出願日	平成5年10月22日(1993.10.22)		GENETICS INSTITUTE,
(65) 公開番号	特開2004-194664 (P2004-194664A)		LLC
(43) 公開日	平成16年7月15日(2004.7.15)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州021
審査請求日	平成16年1月16日(2004.1.16)		40, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク
(31) 優先権主張番号	07/965,662		・ドライブ 87
(32) 優先日	平成4年10月23日(1992.10.23)	(74) 代理人	100062144
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 青山 稔
(31) 優先権主張番号	08/112,608	(74) 代理人	100081422
(32) 優先日	平成5年8月26日(1993.8.26)		弁理士 田中 光雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100106518
前置審査			弁理士 松谷 道子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規P-セレクトインリガンド蛋白

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号：1のアミノ酸1ないしアミノ酸402のアミノ酸配列により特徴づけられるP-セレクトインリガンド蛋白質、またはP-セレクトインに結合しうる該P-セレクトインリガンド蛋白質の断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項2】

配列番号：1のアミノ酸1ないしアミノ酸310のアミノ酸配列により特徴づけられる可溶性P-セレクトインリガンド蛋白質、またはP-セレクトインに結合しうる該可溶性P-セレクトインリガンド蛋白質の断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項3】

配列番号：1のアミノ酸42ないしアミノ酸402のアミノ酸配列により特徴づけられる成熟P-セレクトインリガンド蛋白質、またはP-セレクトインに結合しうる該成熟P-セレクトインリガンド蛋白質の断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項4】

配列番号：1のアミノ酸42ないしアミノ酸310のアミノ酸配列により特徴づけられる可溶性成熟P-セレクトインリガンド蛋白質、またはP-セレクトインに結合しうる該可溶性成熟P-セレクトインリガンド蛋白質の断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項5】

配列番号：3に記載されたアミノ酸配列によって特徴付けられるP-セレクトインリガ

ド蛋白質、またはP - セレクチンに結合しうる該P - セレクチンリガンド蛋白質の断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項6】

P - セレクチンリガンド蛋白質、またはP - セレクチンに結合しうる該P - セレクチンリガンド蛋白質の断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、該核酸分子またはその相補物が緊縮条件下で配列番号：1のDNA配列とハイブリダイゼーションしうるものである、核酸分子。

【請求項7】

P - セレクチンリガンド蛋白質、またはP - セレクチンに結合しうる該P - セレクチンリガンド蛋白質の断片をコードするヌクレオチド配列が発現制御配列に作動可能に連結されている、請求項1、2、3、4または6のいずれか1項に記載の核酸分子。

10

【請求項8】

請求項7に記載の核酸分子で形質転換された宿主細胞。

【請求項9】

哺乳動物細胞であることを特徴とする請求項8に記載の宿主細胞。

【請求項10】

(a)請求項8または請求項9に記載の宿主細胞を適当な培養培地中で培養し；次いで、
(b)該培養培地から該P - セレクチンリガンド蛋白質を精製することを特徴とするP - セレクチンリガンド蛋白質の製法。

【請求項11】

(a)請求項4に記載のDNA、(1,3 / 1,4)フコシルトランスフェラーゼをコードするDNA、および対形成塩基性アミノ酸変換酵素をコードするDNAで宿主細胞を共形質転換し、ここに各DNAは発現制御配列に作動可能に連結されており；

(b)該宿主細胞を適当な培養培地中で培養し；次いで、

(c)該培養培地から可溶性の成熟P - セレクチンリガンド蛋白質を精製することを特徴とする可溶性の成熟P - セレクチンリガンド蛋白質の製法。

20

【請求項12】

配列番号：1のアミノ酸1ないしアミノ酸402に記載されたアミノ酸配列により特徴付けられるP - セレクチンリガンド蛋白質であって、他の哺乳動物蛋白質を実質的に含まないものであるP - セレクチンリガンド蛋白質。

30

【請求項13】

配列番号：1のアミノ酸42ないしアミノ酸310に記載されたアミノ酸配列により特徴付けられるP - セレクチンリガンド蛋白質であって、他の哺乳動物蛋白質を実質的に含まず、成熟P - セレクチンリガンド蛋白質の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含まないものであるP - セレクチンリガンド蛋白質。

【請求項14】

(a) P - セレクチン蛋白質と、配列番号：1のアミノ酸1ないしアミノ酸402に記載されたアミノ酸配列、配列番号：1のアミノ酸42ないしアミノ酸402に記載されたアミノ酸配列、配列番号：1のアミノ酸42ないしアミノ酸310に記載されたアミノ酸配列、および配列番号：3に記載されたアミノ酸配列よりなる群から選択されるアミノ酸配列によって特徴付けられるP - セレクチンリガンド蛋白質とを合わせ、該組合せが第一結合混合物を形成し；

40

(b) 第一結合混合物におけるP - セレクチン蛋白質および該P - セレクチンリガンド蛋白質の間の結合量を測定し；

(c) 化合物とP - セレクチン蛋白質およびP - セレクチンリガンド蛋白質とを合わせて第二の結合混合物を形成させ；

(d) 第二の結合混合物における結合量を測定し；次いで、

(e) 第一結合混合物の結合量と第二結合混合物の結合量とを比較し；ここに、該化合物は、第二結合混合物の結合量が減少した場合に、P - セレクチンにより媒介される細胞間接着を阻害できる

50

ことを特徴とするP-セレクチンにより媒介される細胞間接着の阻害剤を同定する方法。

【請求項15】

請求項12記載のP-セレクチンリガンド蛋白質と特異的に反応する抗体を含む組成物であって、P-セレクチンに結合でき、P-セレクチンにより媒介される細胞間接着の阻害剤として作用する薬剤をスクリーニングするために用いられる組成物。

【請求項16】

請求項13記載のP-セレクチンリガンド蛋白質と特異的に反応する抗体を含む組成物であって、P-セレクチンに結合でき、P-セレクチンにより媒介される細胞間接着の阻害剤として作用する薬剤をスクリーニングするために用いられる組成物。

【請求項17】

(a) 配列番号：1のアミノ酸42からアミノ酸56まで；
 (b) 位置46、48または51のいずれかまたはすべてにおいて硫酸化されたチロシンを有する、配列番号：1のアミノ酸43からアミノ酸56まで；または
 (c) 配列番号：1のアミノ酸238からアミノ酸248まで
 から選択されるアミノ酸配列により特徴づけられるP-セレクチンリガンド蛋白質の断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項18】

さらに免疫グロブリンのFc部分を含む、請求項1ないし6または17のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項19】

免疫グロブリンがIgGである請求項18記載の核酸分子。

【請求項20】

P-セレクチンリガンド蛋白質、またはP-セレクチンに結合しうる該P-セレクチンリガンド蛋白質の断片をコードするヌクレオチド配列が発現制御配列に作動可能に連結されている、請求項18または19に記載の核酸分子。

【請求項21】

単離P-セレクチンリガンド蛋白質またはその断片であって、該蛋白質が請求項1ないし6または17ないし19のいずれか1項に記載の核酸によりコードされており、該P-セレクチンリガンド蛋白質またはその断片がP-セレクチンに結合しうるものである、単離P-セレクチンリガンド蛋白質またはその断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、白血球の内皮細胞への接着を阻害することによって作用する抗炎症性物質の分野に関する。さらに詳しくは、本発明は、「P-セレクチン」として知られている哺乳動物接着性蛋白質についての新規リガンドに指向される。

【背景技術】

【0002】

炎症の間、白血球は血管内皮細胞に接着し、内皮細胞下組織に侵入するが、これは、セレクチンまたはLEC-CAMクラスの蛋白質が標的細胞上のリガンドへ特異的に結合することによって媒介される相互反応である。また、かかるセレクチン-媒介細胞接着は血栓性障害および寄生虫病でも起こり得るし、また、腫瘍細胞の転移性拡張において関与し得る。

セレクチン蛋白質はN-末端レクチン様ドメイン、表皮成長因子様ドメイン、および結合性蛋白質に相補的な相同性の領域によって特徴付けられる。かくして、これまで、3種のヒト・セレクチン蛋白質；E-セレクチン（以前のELAM-1）、L-セレクチン（以前のLAM-1）およびP-セレクチン（以前のPADGEMまたはGMP-140）が同定されている。E-セレクチンはサイトカインによる活性化の数時間後に内皮細胞によって誘導され、好中球と内皮細胞との間のカルシウム依存相互性作用を媒介する。L-

10

20

30

40

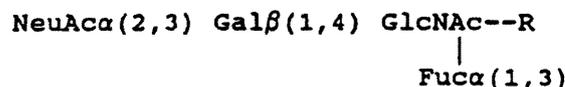
50

セレクチンは白血球の帰する受容体であって、P - セレクチンは活性化されると血小板の細胞表面に迅速に出現し、好中球または単球の血小板に対するカルシウム依存性接着を媒介する。また、P - セレクチンは内皮細胞のウェibel - パラダ (Weibel-Palade) 体でも見い出されており、これらの小胞からのその放出に際し、P - セレクチンはヒスタミンまたはトロンピン刺激内皮細胞への好中球の初期結合を媒介する。

【0003】

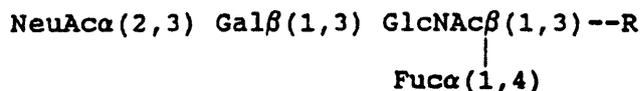
セレクチンは標的細胞の表面に存在するリガンドとの特異的相互作用を通じて接着を媒介すると信じられている。一般に、セレクチンのリガンドは少なくとも部分的には炭水化物部位を含む。例えば、E - セレクチンは末端構造：

【化1】



を有する炭水化物に結合し、また、末端構造：

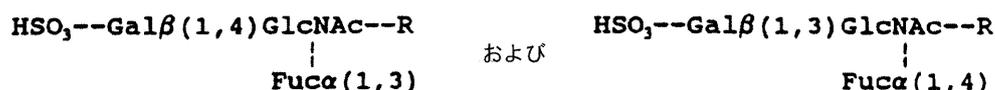
【化2】



[式中、Rは炭水化物鎖の残部である]

を有する炭水化物にも結合する。これらの炭水化物は公知の血液型抗原であって、各々、通常、シアル化 Lewis^x 抗原およびシアル化 Lewis^x という。内皮細胞の表面上にシアル化 Lewis^x 抗原が単独で存在すると、E - セレクチン発現細胞への結合を促進するのに十分であろう。また、E - セレクチンは末端構造；

【化3】



を有する炭水化物にも結合する。

E - セレクチンに関しては、各セレクチンは種々の親和性を持つ一定の範囲の炭水化物に結合するようである。また、セレクチン媒介接着事象の強度(結合親和性)は炭水化物の密度および細胞表面上のセレクチンの密度に依存するであろう。

【0004】

P - セレクチンは Lewis^x 血液型抗原の非シアル化形を含有する炭水化物に結合するが、シアル化 Lewis^x に対してより高い親和性を有する。また、P - セレクチンは、脂質抽出によって骨髓細胞および腫瘍細胞から単離された、異種3 - 硫酸化ガラクトシルセラミドであるスルファチドを認識する。しかしながら、P - セレクチンを担持する細胞の、P - セレクチンリガンドを担持する細胞への結合は、リガンド担持細胞がプロテアーゼで処理された場合は排除され、これは、P - セレクチンリガンドが糖蛋白質であり得ることを示す。

P - セレクチンについての2つの推定糖蛋白質リガンドが最近同定されており、そのうち1つは部分的に精製されている(非特許文献1参照)。しかしながら、これらの糖蛋白質のアミノ酸組成もアミノ酸配列も開示されていない。

【非特許文献1】ムーア(Moore)ら、ジャーナル・オブ・セリユラー・バイオロジー(J. Cell. Biol.) 118, 445 - 456 (1992)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

10

20

30

40

50

上記事情に鑑みると、新規 P - セレクチンリガンドをコードする DNA を得て、それによりコードされる新規 P - セレクチンリガンド蛋白を得ることが本発明の課題である。さらに、新規 P - セレクチンリガンド蛋白およびそれをコードする DNA を含有する、P - セレクチンにより媒介される細胞間接着に起因する疾病を治療するための医薬組成物を得ること、かかる細胞間接着の阻害剤を同定するためのアッセイを開発すること等も本発明の課題である。

【課題を解決するための手段】

【0006】

1 の具体例において、本発明は、P - セレクチンリガンド蛋白質をコードする単離された DNA 配列を含み、該蛋白質は配列番号：1 のアミノ酸 1 ないしアミノ酸 402 に記載したアミノ酸配列によって特徴付けられる組成物を提供する。また、可溶性 P - セレクチンリガンド蛋白質をコードする単離された DNA 配列を含み、該蛋白質は配列番号：1 のアミノ酸 1 ないしアミノ酸 310 に記載されたアミノ酸配列によって特徴付けられる組成物が提供される。さらに、本発明は、成熟 P - セレクチンリガンド蛋白質をコードする単離された DNA 配列を含み、該蛋白質は配列番号：1 のアミノ酸 42 ないしアミノ酸 402 に記載されたアミノ酸配列によって特徴付けられる組成物を提供する。もう 1 つの具体例において、本発明は、可溶性成熟 P - セレクチンリガンド蛋白質をコードする単離された DNA 配列を含み、該蛋白質は配列番号：1 のアミノ酸 42 ないしアミノ酸 310 に記載されたアミノ酸によって特徴付けられる組成物を提供する。もう 1 つの具体例において、本発明は、P - セレクチンリガンド蛋白質をコードする単離された DNA 配列を含み、該蛋白質は配列番号 3 に記載されたアミノ酸配列によって特徴付けられる組成物を提供する。さらに、本発明は、本発明の単離された DNA 配列のいずれか 1 つを含む発現ベクターからなり、該 DNA 配列は発現対照配列に作動可能に連結した組成物；前記 DNA 配列のいずれか 1 を含有する発現ベクターで形質転換した宿主細胞；および

(a) 本発明の DNA 配列のいずれか 1 つを含有する発現ベクターで形質転換した宿主細胞を適当な培地中で培養し、

(b) 該培地からの P - セレクチンリガンド蛋白質を精製することを特徴とする、P - セレクチンリガンド蛋白質の製法を提供する。

【0007】

もう 1 つの具体例において、本発明は、配列番号：1 のアミノ酸 21 ないしアミノ酸 402 に記載したアミノ酸配列によって特徴付けられる蛋白質からなり、該蛋白質が実質的に他の哺乳動物蛋白質を含まない組成物を提供する。さらに、本発明は、配列番号：1 のアミノ酸 21 ないしアミノ酸 310 に記載されたアミノ酸配列によって特徴付けられる可溶性 P - セレクチンリガンド蛋白質を含み、該蛋白質は他の哺乳動物蛋白質を実質的に含まず、また、もう 1 つの具体例において、本発明は、配列番号：1 のアミノ酸 1 ないしアミノ酸 402 に記載されたアミノ酸配列によって特徴付けられる P - セレクチンリガンド蛋白質を含み、該蛋白質は他の哺乳動物蛋白質を実質的に含まない。また、本発明は、配列番号：1 のアミノ酸 42 ないしアミノ酸 402 に記載されたアミノ酸配列によって特徴付けられる成熟 P - セレクチンリガンド蛋白質を含み、該蛋白質が他の哺乳動物蛋白質を実質的に含まない組成物を提供する。さらに、配列番号：1 のアミノ酸 42 ないしアミノ酸 310 に記載されたアミノ酸配列によって特徴付けられる可溶性成熟 P - セレクチンリガンド蛋白質を含み、該蛋白質は他の哺乳動物蛋白質を実質的に含まない組成物が提供される。もう 1 つの具体例において、本発明は、配列番号 3 に記載されたアミノ酸配列によって特徴付けられる蛋白質を含む組成物を提供する。

【0008】

なおさらにもう 1 つの具体例において、本発明は、P - セレクチンリガンド蛋白質について特異的な抗体を含む組成物を提供する。

もう 1 つの具体例において、本発明は、

(a) P - セレクチン蛋白質を、配列番号：1 のアミノ酸 1 ないしアミノ酸 402 に記載されたアミノ酸配列、配列番号：1 のアミノ酸 42 ないしアミノ酸 402 に記載された

10

20

30

40

50

アミノ酸配列、配列番号：1のアミノ酸42ないしアミノ酸310に記載されたアミノ酸配列、および配列番号3に記載されたアミノ酸配列よりなる群から選択されるアミノ酸配列によって特徴付けられるP-セレクチンリガンド蛋白質とを組み合わせ、ここに、該組合せは第1の結合混合物を形成し、

(b) 該第1の結合混合物中のP-セレクチン蛋白質とP-セレクチンリガンド蛋白質との間の結合の量を測定し、

(c) 化合物を、P-セレクチン蛋白質およびP-セレクチンリガンド蛋白質とを組み合わせ第2の結合混合物を形成し、

(d) 第2の結合混合物中の結合の量を測定し、次いで、

(e) 第1の結合混合物中の結合の量を第2の結合混合物中の結合の量と比較すること
を特徴とし、 10

ここに、該化合物は、第2の結合混合物中の結合の量の減少が起こる場合に、P-セレクチン媒介細胞間接着を阻害できることを特徴とするP-セレクチン媒介細胞間接着の阻害剤を同定する方法を提供する。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、新規P-セレクチンリガンドをコードするDNA、およびそれによりコードされる新規P-セレクチンリガンド蛋白質が提供される。さらに、新規P-セレクチンリガンド蛋白質およびそれをコードするDNAを含有する、P-セレクチンにより媒介される細胞間接着に起因する疾病を治療するための医薬組成物、かかる細胞間接着の阻害剤
を同定するためのアッセイ等も提供される。 20

【発明を実施するための最良の形態】

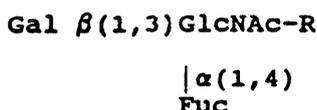
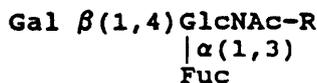
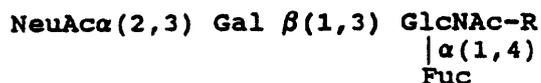
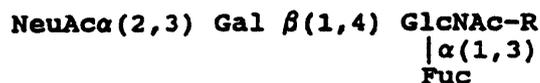
【0010】

本発明者らは、まず、ヒト内皮細胞および血小板上のP-セレクチンについてのリガンドとして作用する蛋白質をコードする新規DNAを同定し、単離した。P-セレクチンリガンド蛋白質の完全なアミノ酸配列(すなわち、成熟ペプチド+リーダー配列)は、配列番号：1のアミノ酸1ないしアミノ酸402に記載されたアミノ酸配列によって特徴付けられる。疎水性分析および公知の切断パターンとの比較は、20ないし22個のアミノ酸のシグナル配列、すなわち、配列番号1のアミノ酸1ないし20またはアミノ酸1ないし22を予測させる。P-セレクチンリガンド蛋白質は配列番号1のアミノ酸38-41に
おいてPACE(対となった塩基性アミノ酸変換酵素)切断部位(-Arg-Asp-Arg-Arg-)を含有する。本発明の成熟P-セレクチンリガンド蛋白質は配列番号：1のアミノ酸42ないしアミノ酸402に記載されたアミノ酸配列によって特徴付けられる。P-セレクチンリガンド蛋白質の可溶性形態は配列番号1のアミノ酸21ないし310を含有することによって特徴付けられる。成熟P-セレクチンリガンド蛋白質のもう1つの可溶性形態は配列番号：1のアミノ酸42ないしアミノ酸310に記載されたアミノ酸配列によって特徴付けられる。P-セレクチンリガンド蛋白質の可溶性形態は、さらに、室温にて水性溶液に溶解することによって特徴付けられる。勿論、これらの蛋白質をコードする配列番号1に記載された対応するDNA配列も本発明に包含される。 30

【0011】

本発明のP-セレクチンリガンドは、以下の末端炭水化物； 40

【化4】



10

【式中、Rは、P - セレクチンリガンド蛋白質または該P - セレクチンリガンド炭水化物に共有結合した脂質部位いずれかに直接共有結合した炭水化物鎖の残部である。さらに、本発明のP - セレクチンリガンド糖蛋白質は硫酸化されるか、あるいは翻訳後に修飾されている。COSおよびCHO細胞で発現されるごとく、全長P - セレクチンリガンド蛋白質（配列番号1のアミノ酸1ないし402または配列番号1のアミノ酸42ないし402）は、非還元性SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって示されるごとく220 kDの見掛けの分子量を有するホモダイマー蛋白質である。

20

配列番号1のP - セレクチンリガンド蛋白質の3つの領域は、細胞外ドメイン（配列番号1の約アミノ酸21ないし310）、膜貫通ドメイン（配列番号1の約アミノ酸311ないし332）、および細胞内、細胞質ドメイン（配列番号1の約アミノ酸333ないし402）である。細胞外ドメインは、Asn残基65、111および292で開始する潜在的N - 連結糖鎖付加の3つのコンセンサストリペプチド部位（Asn - X - Ser - Thr）を含む。さらに、細胞外ドメインは、残基46、48および51においてチロシン硫酸化の3つの潜在的な部位を含有する。残基55 - 267からなる領域は、10のアミノ酸コンセンサス配列Ala - Thr / Met - Glu - Ala - Gln - Thr - Thr - X - Pro / Leu - Ala / Thr（式中、XはPro、Ala、Gln、GluまたはArgであり得る）の15のデカマー反復のサブドメインを含めた、高パーセントのプロリン、セリンおよびスレオニンを含有する。これらのごとき領域は高度にO - グリコシル化された蛋白質が特徴的である。

30

【0012】

P - セレクチンリガンド蛋白質をコードする遺伝子および（1, 3 / 1, 4）フコシルトランスフェラーゼ（以下、3 / 4 FTという）をコードする遺伝子で共トランスフェクトされたCOSまたはCHO細胞は、その表面にP - セレクチンを発現するCHO細胞に結合できるが、その表面にP - セレクチンを発現していないCHO細胞に結合することができない。P - セレクチンに結合するためには、精製された形態またはCHO細胞の表面で発現されている形態において、P - セレクチンリガンド蛋白質をコードする遺伝子を、3 / 4 FTをコードする遺伝子で共トランスフェクトしなければならない。というのは、他の不存在下におけるいずれかの遺伝子のトランスフェクションはP - セレクチン結合活性をなくするか、あるいは実質的に減少させるからである。本発明のP - セレクチンリガンド蛋白質のP - セレクチンへの結合は、EDTAによってまたはP - セレクチンに特異的な中和モノクローナル抗体によって阻害できる。本発明のP - セレクチンリガンド蛋白質のP - セレクチンへの結合は、P - セレクチンについて特異的な中和モノクローナル抗体またはイソタイプ対照によっては阻害されない。これらの結果は、本発明のP - セレ

40

50

クチンリガンド蛋白質の結合特異性を特徴付ける。

【0013】

本発明の目的では、蛋白質が、実施例4のCHO-P-セレクトイン結合アッセイにおけるごとく細胞表面に存在するP-セレクトインに、あるいは例えば実施例4のキメラP-セレクトイン-IgG1蛋白質がペトリ皿に付着するごとく、もう1つの表面に付着するP-セレクトインにカルシウム依存的に結合する場合は、「P-セレクトインリガンド蛋白質活性」を有するものと定義される。すなわち、本明細書中では、「P-セレクトインリガンド蛋白質」、もしくは「P-セレクトインリガンド糖蛋白質」もしくは単に「P-セレクトインリガンド」と言い換える。

【0014】

本発明のP-セレクトインリガンド蛋白質の糖鎖付加状態は、実施例5(C)に詳細に記載され、sPSL.T7と命名するP-セレクトインリガンド蛋白質の可溶性キメラ形態を用いて調べた。3/4FTで共トランスフェクトしたCOS細胞から生じたsPSL.T7蛋白質は、実施例6(C)に詳細に記載するごとく翻訳後グリコシル化によって大いに修飾されている。かくして、そのうち少なくともいくつかはシアル化されているN-およびO-連結オリゴ糖鎖は共に本発明のP-セレクトインリガンド蛋白質上に存在すると考えられる。

【0015】

また、本発明のP-セレクトインリガンド蛋白質はE-セレクトインにも結合することができる。sPSL.T7をコードするDNAおよび3/4FT-コードするDNAで共トランスフェクトしたCOS細胞からの条件培地は、プラスチック製マイクロタイタープレートのウェルに被覆した場合、E-セレクトインを発現するCOS細胞がプレートへ結合するのを引き起こす。しかしながら、E-セレクトインを発現していないCHO細胞はかかるプレートに結合しない。E-セレクトインを発現するCHO細胞の、sPSL.T7をコードするDNAおよび3/4FTをコードするDNAで共トランスフェクトしたCOS細胞からの条件培地で被覆したマイクロタイタープレートへの結合は、EDTAまたはE-セレクトインにつき特異的な中和抗体に存在化でなくされる。sPSL.T7 DNAのみでトランスフェクトしたCOS細胞からの条件培地は、マイクロタイタープレートのウェルに被覆された場合、E-セレクトインを発現するCHO細胞の結合を引き起こさない。これらの理由で、本発明のP-セレクトインリガンド蛋白質は、P-セレクトイン媒介細胞間接着に加え、E-セレクトイン媒介細胞間接着の阻害剤として有用であると考えられる。

【0016】

P-セレクトインと相互作用できる、またはP-セレクトイン媒介細胞間接着を阻害できるP-セレクトインリガンド蛋白質の断片も本発明に含まれる。かかる断片は配列番号1のアミノ酸21ないし54(低頻度のセリンおよびスレオニン残基を有するP-セレクトインリガンド蛋白質の領域)；配列番号1のアミノ酸55ないし127(アスパラギン連結糖付加についての2つのコンセンサス配列(Asn-X-Ser/Thr)に加えて、高頻度のプロリン、セリンおよびスレオニンを有する)；もう1つのより大きい断片である配列番号1のアミノ酸128ないし267(高頻度のプロリン、セリンおよびスレオニンを有し、かつ以下の10のアミノ酸コンセンサス配列：Ala-(Thr/Met)-Glu-Ala-Gln-Thr-Thr-(Pro/Arg/Gln/Ala/Glu)-(Leu/Pro)-(Ala/Thr)の15反復を含む)(この大きな断片内のより小さい断片もまたP-セレクトインと相互作用し、またはP-セレクトイン-媒介細胞間接着の阻害剤として作用する能力を保持し得る)；アスパラギン連結糖鎖付加についてのコンセンサス配列を含有し、配列番号1のアミノ酸268ないし308を含む領域；配列番号1のアミノ酸309ないし333によって表される蛋白質の疎水性領域1；およびアミノ酸334ないし402のP-セレクトインリガンド蛋白質の両親媒性領域を含む。さらなる断片は配列番号1のアミノ酸43ないしアミノ酸56を含み、アミノ酸46、アミノ酸48および/またはアミノ酸51において1個またはそれ以上の硫酸化チロシンを持つ。P-セレクトインリガンド蛋白質の断片は線状形態であるか、あるいは、例えばここに引用して

10

20

30

40

50

本明細書の一部とみなすエイチ・ユー・サラゴビ (H. U. Saragovi)ら、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology) 10、773 - 778 (1992) およびアール・エス・マクドウェル (R. S. McDowell)ら、ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ (J. Amer. Chem. Soc.) 114、9245 - 9253 (1992) に記載されているごとき公知の方法によって環化することができる。本発明の目的では、「P - セレクチンリガンド蛋白質」へのすべての言及はP - セレクチンに結合できる断片も含む。

【0017】

かかる断片は、免疫グロブリンのごときキャリアー分子に融合させて、P - セレクチンリガンド結合部位の価数を増加させることができる。例えば、配列番号1のアミノ酸42ないしアミノ酸295の断片のごとき、P - セレクチンリガンド蛋白質の可溶性形態は、「リンカー」配列を通じて、免疫グロブリンのFc部分に融合させることができる。P - セレクチンリガンド蛋白質の二価形態については、かかる融合は、実施例5(D)および配列番号6におけるごとく、IgG分子のFc部分に対して行うことができる。他の免疫グロブリンのイソタイプを用いてかかる融合を生じさせることもできる。例えば、P - セレクチンリガンド蛋白質 - IgM融合は本発明のP - セレクチンリガンド蛋白質のデカ価形態を生じるであろう。

10

【0018】

後記する実施例に詳細に記載するごとく、本発明のP - セレクチンリガンド蛋白質は、最初、発現クローニングアプローチによって得られた(クラーク (Clark)、米国特許第4,675,285号)。cDNAライブラリーはヒト前骨髄細胞系HL60から構築した(エス・ジェイ・コリンズ (S.J. Collins)ら、ネイチャー (Nature) 270、347 - 349 (1977)、ATCC番号CCL240)。このライブラリーを3/4FTをコードするDNAでCOS細胞に共トランスフェクトし、トランスフェクト体を、P - セレクチンの細胞外部分およびヒトIgG 1モノクローナル抗体のFc部分を含むキメラ分子への結合につきスクリーニングした。キメラP - セレクチンに結合した共トランスフェクト体はP - セレクチンリガンド蛋白質をコードするcDNAが豊富であった。このスクリーニングプロセスを数回繰り返して、P - セレクチンリガンド蛋白質をコードするcDNAについてのプラスミド集団を豊富とした。第2のクローニング段階では、該豊富化プラスミド集団を3/4FT遺伝子で再度COS細胞に共トランスフェクトし、細胞表面でP - セレクチンを発現する蛍光標識CHO細胞系への結合につきスクリーニングした。単一のcDNAクローンはこのアプローチから得られ、pMT21:PL85と命名した。該pMT21:PL85プラスミドは1992年10月16日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託し、受託番号ATCC69096が付与された。

20

30

本発明の1つの新規DNAを配列番号1に記載する。本発明の該DNAは種々の形態のP - セレクチンリガンド蛋白質をコードできる。例えば、1つの具体例において、本発明のDNA配列は、配列番号: 1のアミノ酸1ないしアミノ酸402に記載したアミノ酸配列を有する完全なP - セレクチンリガンド蛋白質をコードする。もう1つの具体例において、本発明のDNA配列は、シグナル配列を欠き、配列番号: 1のアミノ酸21ないしアミノ酸402に記載したアミノ酸配列によって特徴付けられるP - セレクチンリガンド蛋白質の形態をコードする。さらにもう1つの具体例において、本発明のDNA配列は、配列番号: 1のアミノ酸42ないしアミノ酸402に記載したアミノ酸配列によって特徴付けられる成熟P - セレクチンリガンド蛋白質をコードする。本発明のDNA配列のもう1つの具体例は、配列番号: 1のアミノ酸1ないしアミノ酸310に記載したアミノ酸配列によって特徴付けられるP - セレクチンリガンド蛋白質の可溶性形態をコードする。また、本発明のDNAは、成熟P - セレクチンリガンド蛋白質の可溶性形態をコードする配列に具体化され、該蛋白質はアミノ酸42ないしアミノ酸310の反列番号1に記載されたアミノ酸配列によって特徴付けられる。本発明のDNAは、さらに、シグナル配列を欠くP - セレクチンリガンド蛋白質の可溶性形態をコードするDNAに具体化され、該蛋白質は配列番号: 1のアミノ酸21ないしアミノ酸310に記載されたアミノ酸配列によって特徴付けられる。本発明のDNAは他のヒトDNAとの関連はなく、かくして、単離され

40

50

たDNAとして特徴付けられる。前記にて詳細に記載したごとく、P-セレクチンと相互作用するP-セレクチンリガンド断片をコードするDNAも本発明に含まれる。

【0019】

P-セレクチンリガンド蛋白質mRNA転写体の発現は、P-セレクチンリガンド蛋白質cDNAプローブを用いるノーザン分析によって、種々のヒト細胞系(HL-60、THP-1、U937)において、およびヒト単球および多形核白血球で観察されている。これらの細胞系のすべてにおいて、2.5kbの主要転写体が観察された。ほぼ4kbの従たる種はHL60およびU937細胞系で、および多形核白血球で観察された。対照的に、P-セレクチンリガンドmRNA発現はヒト肝芽細胞腫細胞系He p G 2で検出された。

10

【0020】

本発明のP-セレクチンリガンド蛋白質は単一コピーの遺伝子によってコードされ、サザンブロット分析によって測定されたごとく、マルチ遺伝子ファミリーの一部ではない。本発明のP-セレクチンリガンド蛋白質のゲノミック形態は、5'非翻訳領域のヌクレオチド54に位置する約9kbの大きいイントロンを含有する。多形白血球および単球において、本発明のP-セレクチンリガンド蛋白質は配列番号3に記載されたDNA配列によってコードされる。この具体例において、P-セレクチンリガンド蛋白質は16の反復領域を含有する。本発明の単離されたDNAは、対応して、配列番号3に記載されたDNA配列に具体化され、プラスミドpPL85R16に含有され、これは、1993年10月22日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、受託番号75577が付されている。

20

【0021】

本発明は配列番号：1として記載される単離されたDNAまたは配列番号：3として記載される単離されたDNAの対立遺伝子変種も包含し、すなわち、P-セレクチンリガンドの活性を有する蛋白質もコードする、配列番号：1または配列番号：3として記載される単離されたDNAの天然に生じた別の形態を含有する。本発明には、緊縮(例えば65にて4xSSCまたは50%ホルムアミドおよび42にて4xSSC)、または緩和(50にて4xSSCまたは42にて30-40%のホルムアミド)条件下で配列番号：1として記載されるDNAまたは配列番号：3で記載されるDNAにハイブリダイズする単離されたDNAも含有され、これらはP-セレクチンリガンド活性を有する。P-セレクチンリガンド蛋白質をコードするが遺伝暗号の縮重のために配列番号：1で記載されるDNAまたは配列番号：3で記載されるDNAとは異なり、かつP-セレクチンリガンド蛋白質活性を有する単離されたDNA配列も本発明に含有される。P-セレクチンリガンド活性、半減期および産生レベルを増大する点突然変異または誘導された修飾により引き起こされた配列番号：1で記載されるDNAまたは配列番号：3で記載されるDNAの変種も本発明に含有される。本発明の目的のために、「配列番号：1のDNA」に対する本明細書中のすべての言及は、配列番号：1で記載される特異的なDNA配列に加えて、配列番号：1の成熟したP-セレクチンリガンド蛋白質をコードするDNA配列；P-セレクチンに結合可能な配列番号：1のP-セレクチンリガンド蛋白質の断片をコードするDNA配列；配列番号：1のP-セレクチンリガンド蛋白質の可溶性形をコードするDNA配列；配列番号：1のDNA配列の対立遺伝子変種；配列番号：1のDNA配列にハイブリダイズし、P-セレクチンリガンド蛋白質活性を有する蛋白質をコードするDNA類；遺伝子コードの縮重のために配列番号：1のDNAと異なるDNA類；および上記で記載される配列番号：1のDNA配列の変種を含有する。同様に、「配列番号：3」に対する本明細書中のすべての言及は、配列番号：3で記載される特異的なDNA配列に加えて、配列番号：3の成熟したP-セレクチンリガンド蛋白質をコードするDNA配列；P-セレクチンに結合可能な配列番号：3のP-セレクチンリガンド蛋白質の断片をコードするDNA配列；配列番号：3のP-セレクチンリガンド蛋白質の可溶性形をコードするDNA配列；配列番号：3のDNA配列の対立遺伝子変種；配列番号：3のDNA配列にハイブリダイズし、P-セレクチンリガンド蛋白質活性を有する蛋白質をコードするD

30

40

50

NA類；遺伝子コードの縮重のために配列番号：3のDNAと異なるDNA類；および上記で記載される配列番号：3のDNA配列の変種を含有する。

【0022】

P-セレクトインリガンド蛋白質の可溶形をコードするDNAは、P-セレクトインリガンド蛋白質の細胞膜内及び細胞質ドメインをコードする領域を欠失させおよび/または停止コドン細胞外ドメインのカルボキシ末端アミノ酸コドンの3'側に誘導した修飾されたDNAの発現により調製し得る。例えば、疎水性分析により、配列番号：1で記載されるP-セレクトインリガンド蛋白質が配列番号：1のアミノ酸311から332で構成される膜貫通ドメインおよび配列番号：1のアミノ酸333から402で構成される細胞質ドメインを有することを予言する。上記のように記載された修飾されたDNAは、当該分野で公知の部位特異的変異誘発法または適当なオリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ鎖反応を含む標準的分子生物学的方法により作成される。種々の可溶性P-セレクトインリガンド蛋白質をコードする数種のDNAを生産する方法が実施例5に記載されている。

10

【0023】

本発明の単離されたDNAはP-セレクトインリガンドを遺伝子組換え的に生産するために、カウフマン(Kaufman)ら、ヌクレック・アシズ・リサーチ(Nucleic Acids Res.)19、4485-4490(1991)に開示されているpMT2またはpED発現ベクターのごとき発現制御配列に作動可能に連結し得る。多くの適当な発現制御配列が当該分野で公知である。遺伝子組み換え蛋白質の発現の一般的方法も公知であってアール・カウフマン(R. Kaufman)のメソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)185、537-566(1990)に例示されている。本明細書中に定義されるように「作動可能に連結する」とは、連結されたDNA/発現制御配列により形質転換された(トランスフェクトされた)宿主細胞によりP-セレクトインリガンド蛋白質が発現されるような方法で本発明の単離されたDNAと発現制御配列の間に酵素的または化学的に共有結合を形成するように結合することを意味する。

20

【0024】

対合するアミノ酸配列(例えば、-Lys-Arg- および -Arg-Arg-)のカルボキシル側で前駆体ペプチドを切断して成熟蛋白質を得るいくつかの内部蛋白質分解酵素が公知である。このような酵素は一般的に対合した塩基性アミノ酸変換酵素またはPACEとして公知であり、成熟ペプチドの遺伝子組換え的生産におけるそれらの使用はWO92/09698および米国特許第07/885,972号に開示されており、引用して本明細書の一部とする。酵素のPACEファミリーは組換え宿主細胞中での前駆体ポリペプチドの蛋白質分解のプロセッシングの効率を増加することが公知である。上記で言及したように、本発明のP-セレクトインリガンド蛋白質はこのようなPACE切断部位を有する。

30

【0025】

本発明の可溶性成熟P-セレクトインリガンド蛋白質は本明細書中に記載されるようないかなる可溶性P-セレクトインリガンド蛋白質をもコードするDNA配列またはWO92/09698および米国特許第07/885,972号に記載され引用して本明細書の一部としているPACEをコードするDNA配列を含有する宿主細胞によってまたは、配列番号：5のDNA配列を用いて生産され得る。このような宿主細胞は可溶性P-セレクトインリガンド蛋白質DNA及びPACEDNAをそれぞれ含有する別々の発現ベクターの共トランスフォーメーションまたは連続したトランスフォーメーションの結果として生じたDNAを含有する。3/4FTをコードする第三のDNAもまたP-セレクトインリガンド蛋白質及びPACEをそれぞれコードするDNAによって共トランスフォーメーションされる。あるいはまた、宿主細胞は可溶性P-セレクトインリガンド蛋白質DNAおよびPACEDNAの双方を含有する単一の発現ベクターのトランスフォーメーションの結果として生じたDNAを含有していてもよい。このような発現ベクターの構築は分子生物学の通常の技術のレベルにある。共トランスフォーメーション及びトランスフォーメーションの方法

40

50

もまた公知である。

【0026】

PACEをコードする多くのDNA配列が公知である。例えば、フリンとして公知であるPACEの一つの形をコードするDNAがエイ・エム・ダブリュー・ファン・デン・オウウェランド(A. M. W. van den Ouweland)らの、ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Nucl. Acids Res.)18、664(1990)に開示されており、ここに引用して本明細書の一部とする。PACESOLとして公知であるPACEの可溶性形をコードするcDNAは、配列番号:5に記載されている。他の形のPACEをコードするDNAもまた存在し、このようないかなるPACEをコードするDNAも、PACEがP-セレクチンリガンド蛋白質を38-41のアミノ酸の部分で切断可能な限り、本発明の可溶性成熟P-セレクチンリガンド蛋白質を生産するのに用いることができる。好ましくは、PACEの可溶性形をコードするDNAは本発明の可溶性成熟P-セレクチンリガンド蛋白質を生産するのに用いられる。

10

【0027】

別々または一緒に、P-セレクチンリガンド蛋白質およびPACEの可溶性形をコードするDNAはPACEで切断された可溶性P-セレクチンリガンド蛋白質を組み換え的に生産するために、上記で述べたpMT2またはpED発現ベクターを含有するような発現制御配列に作動可能に連結し得る。付加的な適当な発現制御配列は当該分野で公知である。下記の実施例3(C)および3(D)は本発明の可溶性成熟したP-セレクチンリガンド蛋白質を生産する方法を記載する。

20

【0028】

多数の細胞の型がP-セレクチンリガンド蛋白質の発現のための適当な宿主細胞として作用する。適当な宿主細胞は機能的なP-セレクチンリガンド蛋白質に特徴的な炭水化物側鎖を付けることが可能である。このような能力は天然に生じたか、化学的突然変異により誘導されるか、グリコシル化酵素をコードするDNA配列を含有する適当な発現プラスミドによる宿主細胞のトランスフェクションによる、宿主細胞中での適当なグリコシル化酵素の存在のおかげで生じ得る。

宿主細胞は、例えば、サルCOS細胞、チャイニーズ・ハムスター卵巣(CHO)細胞、ヒト腎臓293細胞、ヒト表皮A431細胞、ヒトColo205細胞、3T3細胞、CV-1細胞、他の形質転換された霊長類の細胞系統、通常二倍体細胞、一次組織、一次外植体、ヒーラ細胞、マウス・L細胞、BHK、U937、またはHaK細胞のイン・ビトロの培養由来の細胞株を含有する。

30

【0029】

P-セレクチンリガンド蛋白質はまた本発明の単離されたDNAおよび、1つまたはそれ以上の、適当なグリコシル化酵素をコードするDNAと、1つまたはそれ以上の昆虫発現ベクター中の適当な制御配列に、作動可能に連結し、昆虫発現システムを働かせることにより生産され得る。バキュロウイルス/昆虫細胞発現システムのための材料と方法は、例えば、インビトロゲン(Invitrogen)、サンディエゴ(San Diego)、カリフォルニア(California)、アメリカ合衆国(U. S. A.)からのキット(ザ・マックスバック^R・キット(the MaxBac^R kit)として商業的に入手可能であり、このような方法はサマーズ(Summers)とスミス(Smith)の、テキサス・アグリカルチュラル・エクスペリメント・ステーション・ブラティン(Texas Agricultural Experiment Station Bulletin)1555(1987)(これを引用して本明細書の一部とする)に記載されているように、当該分野でよく知られている。P-セレクチンリガンド蛋白質の可溶性形はまた適当な単離されたDNAを用いて昆虫細胞中で生産することができる。PACEの形をコードするDNAは、P-セレクチンリガンド蛋白質のPACEで切断された形を生産するために、さらに昆虫宿主細胞中で共発現され得る。

40

【0030】

あるいはまた、P-セレクチンリガンド蛋白質を酵母のごとき下等な真核生物において、または細菌のごとき原核生物において生産し得る。潜在的に適当な酵母の株はサッカロ

50

マイセス・セレビスエー (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベロマイセス (*Kluyveromyces*) 株、カンディダ (*Candida*)、またはヘテロロガスな蛋白質を発現可能ないかなる酵母の株も含む。潜在的に適当な細菌の株はエスヒェリキア・コーライ (*Escherichia coli*)、バシルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*)、サルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*)、またはヘテロロガスな蛋白質を発現可能ないかなる細菌の株をも含む。もし P - セレクチンリガンド蛋白質が酵母または細菌で作られれば、グリコシル化された P - セレクチンリガンド蛋白質を得るために、蛋白質部分の適当な部位に適当な炭水化物を付けることが必要である。このような共有結合の接着は公知の化学的または酵素的方法を用いて成し遂げることができる。

10

【0031】

本発明の P - セレクチンリガンド蛋白質は、例えば、P - セレクチンリガンド蛋白質をコードする DNA 配列を含有する体細胞または生殖細胞により特徴づけられるトランスジェニック雌ウシ、ヤギ、ブタ、またはヒツジの乳として、トランスジェニック動物の生産物としても発現し得る。

【0032】

本発明の P - セレクチンリガンド蛋白質は P - セレクチン結合糖蛋白質を発現するのに必要な培養条件下で、形質転換された宿主細胞を培養することにより調製し得る。得られた発現された糖蛋白質を次いで培養培地または細胞抽出液から精製することができる。本発明の P - セレクチンリガンド蛋白質の可溶性形はレンチル・レクチン - セファロース (*Lentil lectin-Sepharose*^R) のアフィニティークロマトグラフィーに付して精製することができ、続いて 0.5 M - メチル - マンノシドで溶出する。溶出した可溶性 P - セレクチンリガンド蛋白質は次いでさらに精製することができ、0 - 70% 硫酸アンモニウム沈澱のステップにより濃縮することができる。蛋白質を次いで回収し、再懸濁し、さらに TSK G4000SWXL のサイズ排除クロマトグラフィーにより精製される。他の方法として、本発明の P - セレクチンリガンド蛋白質の全長形は発現している細胞からの全膜画分を調製し、膜をトリトン X - 100 のような非イオン性界面活性剤で抽出することにより精製し得る。界面活性剤抽出物は次いで固定化された P - セレクチンからなるアフィニティークラムを通り過ぎ、P - セレクチンリガンド蛋白質はカラムから 0.1% の界面活性剤を含有する緩衝液中の 10 mM EDTA により溶出することができる。ア

20

30

【0033】

他の方法として、本発明の P - セレクチンリガンド蛋白質は、例えばアミコン (*Amicon*) またはミリポア・ペリコン (*Millipore Pellicon*) 限外濾過ユニットのような商業的に入手可能な蛋白質濃縮フィルターを用いて濃縮できる。濃縮ステップに続き、濃縮物はゲル濾過媒体のごとき精製マトリックスに付すことができる。他の方法として、アニオン交換樹脂は、例えば、ペンダント・ジエチルアミノエチル (DEAE) 基を有するマトリックスまたは基質に用いることができる。マトリックスはアクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロースまたは普通に蛋白質精製に用いられる他の形であり得る。他の方法として、カチオン交換ステップを用いることができる。適当なカチオン交換体はスルホプロピルまたはカルボキシメチル基を含む種々の不溶性のマトリックスを含む。スルホプロピル基が好ましい (例えば、S - セファロース^R (*Sepharose*^R) カラム類)。培養上清からの P - セレクチンリガンド蛋白質の精製は、コンカナバリン A - アガロース、ヘパリン - トヨオパール^R またはシバクロンブルー 3GA セファロース^R のごときアフィニティークラムによるもう 1 つまたはそれ以上のカラムステップを含むか；またはフェニルエーテル、ブチルエーテル、またはプロピルエーテルのごとき樹脂を用いた疎水相互作用クロマトグラフィー；または免疫親和性クロマトグラフィーを含む。

40

50

【 0 0 3 4 】

最終的に、例えば、ペンダントメチルまたは他の脂肪族基を有する疎水性の R P - H P L C 媒体を用いる 1 またはそれ以上の逆相高速液体クロマトグラフィーが、さらに P - セレクチンリガンド蛋白質を精製するために用いることができる。前述の精製ステップのいくつかまたは全てが、種々の組み合わせで、実質的に同質の単離された組換え蛋白質を供給するために用いることができる。次いで精製された P - セレクチンリガンド蛋白質は実質的に他の哺乳類の蛋白質を含まず、本発明に関しては、「単離された P - セレクチンリガンド蛋白質」として定義される。

【 0 0 3 5 】

単離された P - セレクチンリガンド蛋白質は P - セレクチンにより媒介された細胞間接着により特徴づけられる症状の処置において有用であり得る。そのような状態は、制限なしに、心筋梗塞、細菌またはウイルス感染、転移性状態、関節炎のごとき炎症性異常、急性呼吸困難症候群、喘息、気腫、遅れた形の過敏性反応、全身エリマトーデス、やけどまたは凍傷のごとき温度による傷害、自動免疫甲状腺炎、実験性アレルギー脳髄脊髄炎、多数の硬化症、外傷に対する二次的な多数の臓器障害症候群、糖尿病、レナード (Renaud's) 症候群、好中球性皮膚病 (スウィート (Sweet) 症候群)、炎症性の腸の病気、グレーブ (Grave) 病、腎糸球体腎炎、歯肉炎、歯周病、溶血性尿毒性症候群、潰瘍性大腸炎、クローン (Crohn) 病、壊死性全腸炎、潰瘍性の輸血に関する症候群、サイトカイン誘導の毒性のごときものを含む。単離された P - セレクチンリガンド蛋白質は臓器移植において、移植のための臓器を調製するためと臓器移植の拒絶を抑えるためにも有用である。単離された P - セレクチンリガンド蛋白質は血液透析またはロイコフォレシス (leucopheresis) の患者を治療するのに用いることができる。付加的には、単離された P - セレクチンリガンド蛋白質は抗 - 転移剤として用いることができる。単離した P - セレクチンリガンド蛋白質はそれ自体 P - セレクチンにより媒介される細胞間接着の阻害剤として用いることができるし、P - セレクチンにより媒介される細胞間接着の阻害剤を設計するのに用いることもできる。本発明は、単離された P - セレクチンリガンド蛋白質を含む医薬組成物ならびに単離された P - セレクチンリガンド蛋白質を用いる治療の治療方法または使用の双方を含有する。

【 0 0 3 6 】

細胞から精製されるかまたは、組換え的に生産された、単離された P - セレクチンリガンド蛋白質は、医薬的に許容される担体と組み合わせた場合に医薬組成物として用いることができる。このような組成物には、P - セレクチンリガンド蛋白質および担体に加え、希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、安定剤、可溶化剤、ならびに他の当該分野でよく知られた物質を含ませることができる。「医薬的に許容される」とは、活性成分 (類) の生物学的活性の効率に影響しない毒性のない物質を意味する。担体の特質は投与の経路に依存するであろう。本発明の医薬組成物はサイトカイン類、リンホカイン類、または M - C S F、G M - C S F、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 10、I L - 11、I L - 12、G - C S F、M e g - C S F、幹細胞ファクター、およびエリトロポエチンをも含有する。医薬組成物はプラスミノゲンアクチベーターまたはファクター V I I I のごとき血栓溶解性または抗 - 血栓症ファクターを含有させることができる。医薬組成物はさらに他の抗 - 炎症剤を含有する。このような付加的なファクターおよび/または薬剤は単離された P - セレクチンリガンド蛋白質に相乗的效果を生み出すかまたは単離された P - セレクチンリガンド蛋白質により引き起こされる副影響を最小限にするために医薬組成物のなかに含有することができる。逆に言えば、単離された P - セレクチンリガンド蛋白質は、サイトカイン、リンホカイン、他の造血ファクター、血栓溶解または抗 - 血栓症ファクター、もしくは抗 - 炎症剤による副作用を最小限にするための具体的なサイトカイン、リンホカイン、他の造血ファクター、血栓溶解もしくは抗 - 血栓症ファクター、または抗 - 炎症剤の処方中に含有することができる。

【 0 0 3 7 】

10

20

30

40

50

本発明の医薬組成物は他の医薬上許容される担体に加え、ミセルとして集合して存在する脂肪、不溶性の単分子層、液晶、水溶液中のラメラ層のごとき両親媒性の薬剤と共に、単離されたP-セレクトインリガンド蛋白質が結合しているリポソームの形の中にある。リポソームの処方調製は、制限なしに、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リソロイシン、リン脂質、サポニン、胆汁酸のごときものを含有する。このようなリポソーム処方の調製は、例えば、米国特許第4,235,871号；米国特許第4,501,728号；米国特許第4,837,028号；米国特許第4,737,323号の中において開示されているように当該分野の技術の範囲内であり、これらすべてを引用して本明細書の一部とする。

【0038】

本明細書で用いられるように、「治療学的有効量」という用語は、例えば、P-セレクトインにより媒介される細胞接着またはこのような状態の治癒の増加速度によって特徴づけられる有意義な患者の利益を示すのに十分な医薬組成物または方法の、各活性成分の全体量を意味する。一つだけ投与される、個々の活性成分を適用する場合には、この用語はその成分のみに言及する。組み合わせて適用される場合は、この用語は、連続してあるいは同時に投与されても、治療効果に帰する活性成分の組み合わせられた量に言及する。

【0039】

本発明の治療方法または使用を実行するために、P-セレクトインにより媒介される病気の状態の哺乳類に、単離したP-セレクトインリガンド蛋白質の治療学的有効量を投与した。単離されたP-セレクトインリガンド蛋白質は単一または、サイトカイン、リンホカイン、もしくは他の造血ファクターを用いる治療のごとき他の治療と組み合わせて、本発明の方法に従い投与することができる。一つまたはそれ以上のサイトカイン、リンホカイン、または他の造血ファクターと共投与する場合は、単離されたP-セレクトインリガンド蛋白質は、サイトカイン(類)、リンホカイン(類)、他の造血ファクター(類)、血栓溶解または抗-血栓ファクターと同時にまたは連続して投与することができる。もし連続して投与されるとすれば、治療している医師はサイトカイン(類)、リンホカイン(類)、他の造血ファクター(類)、血栓溶解または抗-血栓症ファクターと組み合わせられた単離されたP-セレクトインリガンド蛋白質の投与の適当な順番を決定するであろう。

【0040】

医薬組成物においてまたは本発明の方法を実行するための単離されたP-セレクトインリガンド蛋白質の投与は、経口摂取、吸入、または経皮、皮下、もしくは静脈内注射のごとき種々の通常の方法において行うことができる。患者への静脈内投与が好ましい。

単離されたP-セレクトインリガンド蛋白質の治療学的有効量が経口で投与される場合、単離されたP-セレクトインリガンド蛋白質は錠剤、カプセル剤、散剤、溶液またはエリキシルであるであろう。錠剤の形で投与される場合、本発明の医薬組成物は付加的にゼラチンのような固体の担体又はアジュバントを含有することができる。錠剤、カプセル剤、および散剤は、約5ないし95%の単離されたP-セレクトインリガンド蛋白質を含有するが、好ましくは25ないし90%の単離されたP-セレクトインリガンド蛋白質を含有する。液体の形で投与される場合、水、石油、およびピーナッツ油、ミネラルオイル、大豆油、または胡麻油のごとき動物または植物起源の油、もしくは合成油のような液体の担体が添加されてよい。医薬組成物の液体形はさらに生理的食塩溶液、デキストロースまたは他の糖類の溶液、またはエチレングリコール、プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコールのようなグリコール類を含有する。液体の形で投与する場合、該医薬組成物は単離されたP-セレクトインリガンド蛋白質の重量にして0.5ないし90%を含有し、好ましくは単離されたP-セレクトインリガンド蛋白質の1ないし50%を含有する。

【0041】

単離されたP-セレクトインリガンド蛋白質の治療学上有効量が静脈内、経皮または皮下注射により投与される場合、単離されたP-セレクトインリガンド蛋白質は発熱物質を含まない、非経口で許容される水溶液の形であるであろう。pH、等張性、安定性のごときものを考慮した、このような非経口で許容される蛋白質溶液の調製は、当該分野の技術の範

10

20

30

40

50

圈内である。静脈内、経皮、または皮下の注射のための好ましい医薬組成物は、単離されたP - セレクチンリガンド蛋白質に加えて、塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、デキストロース注射液、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射液、乳酸で処理したリンガー注射液のごとき等張ビヒクル、または当該分野で公知の他のビヒクルを含ませるべきである。本発明の医薬組成物は安定剤、保存料、緩衝液、酸化防止剤、もしくは当該分野で公知の他の付加物も含ませることができる。本発明の医薬組成物における単離されたP - セレクチンリガンド蛋白質の量は、治療されるべき状態の性質および重症度に依存し、患者が経験した以前の治療の性質に依存するであろう。突極的には、治療している医師は各患者を治療するための単離されたP - セレクチンリガンド蛋白質の量を決定するであろう。最初に、治療している医師は単離されたP - セレクチンリガンド蛋白質の低い用量を投与し、患者の反応を観察するであろう。単離されたP - セレクチンリガンド蛋白質のさらに多くの用量が、患者にとって最適の治療効果が得られるまで投与され、その時点で該用量はそれ以上増加しない。本発明の方法を実行するために用いられる種々の医薬組成物は、単離されたP - セレクチンリガンド蛋白質を体重1 kg 当たり約0.1 μ g ないし約100 mg 含有するべきであるということが予想されるであろう。

10

【0042】

本発明の単離されたP - セレクチンリガンド蛋白質はP - セレクチンリガンド蛋白質と特異的に反応するまたはP - セレクチンに媒介される細胞接着を阻害するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を得るために動物を免疫するためにも用いることができる。このような抗体は全P - セレクチンリガンド蛋白質を免疫原として用いるか、可溶性の成熟したP - セレクチンリガンド蛋白質のようなP - セレクチンリガンド蛋白質の断片を用いることにより得られる。P - セレクチンリガンド蛋白質のより小さい断片は、以下に記載される断片のように、動物を免疫するために用いることもできる：配列番号：1のアミノ酸42ないし56、または配列番号：1のアミノ酸127ないしアミノ酸138。付加的なペプチド免疫原は、アラニン残基をペプチドのアミノ末端に添加した配列番号：1のアミノ酸238ないしアミノ酸248からなる。もう一つのペプチド免疫原は硫酸化されたチロシンを46、48または51のいずれかまたは全ての位置に有する配列番号：1のアミノ酸43ないしアミノ酸56からなる。ペプチド免疫原は付加的にはカルボキシル末端にシステイン残基を有し、鍵穴カサガイ・ヘモシアニン(KLH)のごとき部分抗原に結合する。付加的なペプチド免疫原はチロシン残基を硫酸化されたチロシン残基と置換することにより生じる。このようなペプチドを合成する方法は、例えば、アール・ピー・メリフィールド(R. P. Merrifield)の、ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ(J. Amer. Chem. Soc.)、85、2149 - 2154 (1963)；ジェイ・エル・クルステナンスキー(J. L. Krstenansky)ら、F E B S・レターズ(Lett.)211、10 (1987)にあるように、当該分野で公知である。

20

30

【0043】

P - セレクチンリガンド糖蛋白質またはP - セレクチンリガンド糖蛋白質に特徴的な複雑な炭水化物基に結合するモノクローナル抗体は炎症の病気および数種の癌の免疫検出のための診断薬剤として使用することができる。小さい細胞の肺がん腫のごときいくつかの癌細胞は、P - セレクチンリガンド蛋白質の検出可能なレベルを発現することができる。癌細胞によるP - セレクチンリガンド蛋白質のこの異常な発現はこれらの細胞の転移において役割を演ずる。

40

P - セレクチンリガンド糖蛋白質、あるいはP - セレクチンリガンド糖蛋白質に対し特徴的な複雑な炭水化物に結合するモノクローナル抗体を中和することは双方の炎症の病気に対し有用な治療でもあり、P - セレクチンリガンド蛋白質の異常な発現が含まれている癌のいくつかの形の治療においてもまた有用な治療である。これらの中和しているモノクローナル抗体はP - セレクチンリガンド蛋白質のセレクチンに媒介される細胞間接着機構を阻害することができる。P - セレクチンリガンド蛋白質の結合を阻害することにより、白血球の不適當な炎症の部位への接着はなくなるか顕著に減少する。癌細胞または白血病

50

細胞の例のように、P - セレクチンリガンド蛋白質に対するモノクローナル抗体を中和することは、P - セレクチンリガンド蛋白質により媒介される癌細胞の転移の広がりを検出または予防する際に有用である。加えて、これらの細胞に結合するモノクローナル抗体は、抗体に依存する細胞媒介細胞毒性 (ADCC) を目的とし、次いで癌細胞を除去するのに助ける。P - セレクチンリガンド蛋白質と反応するヒト・抗体はその生殖細胞系統中の遺伝子をコードするヒト・免疫グロブリンを含有するトランスジェニック動物中で生産し得る。下記の実施例 7 は P - セレクチンリガンド蛋白質断片に特異的なウサギポリクローナル抗体の生産を記載する。

【 0 0 4 4 】

本発明の P - セレクチンリガンド蛋白質は P - セレクチンリガンド蛋白質に結合可能であって、次いで P - セレクチンにより媒介される細胞間接着の阻害剤として作用する薬剤を探索するために用いることもできる。固定化されているかいないかにかかわらず、望む結合蛋白質を用いた結合アッセイは当該分野でよく知られており、本発明の P - セレクチンリガンド蛋白質を用いたこの目的のために使用することができる。適当な探索アッセイは、下記の実施例 3 に示されるように細胞に基づいてよい。他の方法として、精製した蛋白質に基づく探索アッセイはこのような薬剤を同定するために用いることができる。例えば、P - セレクチンリガンド蛋白質は精製された形で担体上に固定化され、精製した P - セレクチンへの結合を潜在的阻害剤の存在下または非存在下で測定することができる。適当な結合アッセイは他の方法として、本発明の P - セレクチンリガンド蛋白質の可溶性形と共に担体上に固定化された精製された P - セレクチンを用いることができる。

【 0 0 4 5 】

いかなる P - セレクチンリガンド蛋白質も上述の探索アッセイにおいて用いることができる。例えば、配列番号：1 のアミノ酸 1 からアミノ酸 4 0 2 で記載される全長の P - セレクチンリガンド蛋白質を、阻害剤を探索するために用いることができ；あるいは配列番号：1 のアミノ酸 4 2 からアミノ酸 4 0 2 で記載される成熟した P - セレクチンリガンド蛋白質は阻害剤を探索するために用いることができ、または配列番号：1 のアミノ酸 4 2 からアミノ酸 3 1 0 で記載される可溶性の成熟した P - セレクチンリガンド蛋白質は阻害剤を探索するために用いることができる。他の方法として、配列番号：3 のアミノ酸 1 からアミノ酸 4 1 2 で記載される P - セレクチンリガンド蛋白質、あるいは配列番号：3 のアミノ酸 4 2 からアミノ酸 4 1 2 で記載される P - セレクチンリガンド蛋白質の成熟した形、または配列番号：3 のアミノ酸 4 2 からアミノ酸 3 2 0 で記載される可溶性の成熟した P - セレクチンリガンド蛋白質は本発明に関する細胞間接着の阻害剤を探索するために用いることができる。

【 0 0 4 6 】

このような探索アッセイにおいて、第一の結合混合物を、P - セレクチンおよび P - セレクチンリガンド蛋白質を結合させることにより形成し、第一の結合混合物の結合の量 (B_0) を測定する。第二の結合混合物は P - セレクチン、P - セレクチンリガンド蛋白質、および探索されるべき薬剤の化合物を組み合わせることによりまた形成し、第二の結合混合物の結合の量 (B) を測定する。第一および第二の結合混合物の結合量を、例えば、 B / B_0 の計算を行うことにより比較する。

化合物または薬剤が、第一の結合混合物と比較して、第二の結合混合物の結合における減少が観察されるかどうかによって、P - セレクチンにより媒介される細胞間接着を阻害できることが考慮される。結合混合物の処方と最適化は当該技術のレベルの範囲内であり、このような結合混合物は結合を増大するかまたは最適化するのに必要な緩衝液または塩も含有し、付加的な制御アッセイは本発明の探索方法内に含めることができる。

【 0 0 4 7 】

P - セレクチンリガンド蛋白質の P - セレクチンへの結合活性を少なくとも約 1 0 %、好ましくは 5 0 % またはそれ以上減少させることが見いだされた化合物はこのように同定され、次いで、E - セレクチンおよび L - セレクチンへの結合活性のアッセイ、およびイン・ピボアッセイを含めた他のセレクチン結合アッセイによって二次的に探索された。こ

10

20

30

40

50

これらの手段によって、抗・炎症薬剤として適当で有り得るセレクチンにより媒介される細胞間接着に対する阻害活性を有する化合物を同定することができる。

【実施例1】

【0048】

P - セレクチンリガンド蛋白質遺伝子のクローニング

A . H L 6 0 c D N A ライブラリーの構築

P - セレクチンリガンドの発現クローニングのために H L 6 0 c D N A ライブラリーを構築した。ポリ A⁺ RNA を、ファースト・トラック・mRNA 単離キット (Fast Track mRNA Isolation Kit) (インビトロゲン (Invitrogen); San Diego (サンディエゴ), CA (カリフォルニア)) を使い、ヒト・前骨髄細胞系統 H L 6 0 の全体の RNA から単離した (エス・ジェイ・コリンズ (S. J. Collins) ら、上記)。二本鎖 c D N A をポリ A⁺

RNA 画分から合成し E c o R I アダプター (5' - A A T T C C G T C G A C T C T A G A G - 3', 5' - C T C T A G A G T C G A C G G - 3') により平滑末端で結合した。c D N A を発現ベクター p M T 2 1 (アール・カウフマン (R. Kaufman) ら、J. Mol. Cell. Biol. 9, 946 - 958 (1989)) に連結し、これを E c o R I エンドヌクレアーゼと子ウシ胸腺アルカリホスファターゼと共に連続してインキュベートしゲルにより精製した。結合により生じた生成物を 2 μ l のアリコートでコンピテントなイー・コリ (E. coli) D H 5 細胞に電気穿孔し、10 mM M g C l₂、10 mM M g S O₄、および 2% グリセロールを追加した 1 m l の S O B 培地 [ジェイ・サムブルック (J. Sambrook) ら、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning): ア・ラボラトリー・マニュアル (A Laboratory Manual)、ニューヨーク (New York)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、p 1. 90 (1989)] 中で 37 °C において 1 時間成育させた。ライブラリーをより小さなサブセットに分けるために、細菌懸濁液の各 1 m l ずつからのアリコートをアンピシリンの存在下アガープレートにプレートし、1 m l 当たりのコロニー数を計算した。各コロニーが 1 つの c D N A を表しているとする、600,000 クローンが生じ、プール当たり約 16,000 クローンのサブセットに分けられた。38 プールの各々をアンピシリンの存在下 L 培地中で一晩成育させ、プラスミドを C s C l 勾配により精製した。

【0049】

B . P - セレクチンリガンド蛋白質遺伝子の探索

第一段階として、実施例 4 (A) の L E C - 1 結合アッセイを、H L 6 0 c D N A ライブラリーをより分けそれにより興味のあるプラスミドを富ませるために使用した。各 H L 6 0 c D N A ライブラリープールの 6 μ g を、2 μ g の 3 / 4 F T 遺伝子と共に C O S 細胞に共トランスフェクトした。トランスフェクション後約 45 時間で、C O S 細胞を 37 °C で 15 分間 1 m M E G T A 中でインキュベートし、続いて細胞リフターで削り取るによりプレートから持ち上げた。細胞を 1 m M カルシウムを含有するハンクス (Hanks) 緩衝食塩溶液 (H B S S) 中で二回洗浄した。細胞は 4 m l の H B S S 中に再懸濁された。再懸濁されトランスフェクトされた C O S 細胞は実施例 4 (A) に記載される L E C - 1 結合アッセイを用いて探索された。

粘着した C O S 細胞からのプラスミドはハーツ (Hirts) 抽出物 [ビィ・ハーツ (B. Hirts)、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.) 26, 365 - 369 (1967)] から得られ、次いで増幅のためにイー・コリ (E. coli) D H 5 細胞中に電気穿孔した。プラスミドの富まされた集団は C s C l 勾配で精製され 3 / 4 F T 遺伝子 (実施例 2) と共に C O S 細胞中に再トランスフェクトされた。トランスフェクション、探索、およびプラスミド増幅の工程を、L E C - 1 で覆われたプレートに結合したプールが視覚的に検出できるまで全部で 3 回繰り返した。陽性のプラスミドプールは続いてサブセットにこわされた。これは陽性プールからのハーツ抽出物をイー・コリ D H 5

細胞に電気穿孔し、上記のごとく m l 当たりのコロニー数を定量することを含んだ。種々のプールの大きさが、アンピシリンの存在下アガープレート上のコロニーの前もって決定した数を数えることにより作られた。二連のプレートを、ニトロセルロースリフトを行

い新しいアガープレート上でフィルターを保存することにより調製した。二連のプレートを陽性だと決定されるあらゆるプールからの個々または群のコロニーかを選択するための対照プレートとして使用した。

クローニングの第二段階において、COS細胞をサブライブラリープールおよび3/4 FT遺伝子で、探索の第一段階で用いたのと同じ方法により共トランスフェクトした。トランスフェクト後48時間で、トランスフェクトされた細胞を実施例4(B)の蛍光CHO:P-セレクトインアッセイを用いて探索した。上記のように陽性のプールは最終的に個々のコロニーが探索され陽性のコロニーが同定されるまで更に小分けされた。この方法を用い、一つの陽性のクローンであるpMT21:PL85がP-セレクトインリガンド蛋白質をコードすることが見いだされた。pMT21:PL85に含まれるP-セレクトインリガンドのDNA配列は配列ID番号:1に記載されており、pMT21:PL85にコードされるP-セレクトインリガンド蛋白質の結合特性は以下の実施例4(C)に記載されている。

【実施例2】

【0050】

1, 3/1, 4フコシルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニング

1, 3/1, 4フコシルトランスフェラーゼ遺伝子(3/4 FT)をPCRにより全体のヒト染色体DNA(クロンテック・ラボラトリーズ(Clontech Laboratories))からクローンした。センスオリゴヌクレオチドプライマーはXbaI部位および遺伝子の5'末端を含み(5'-TAGCATACGCTCTAGAGCATGGATCCCCCTGGGTGCA-3')、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドプライマーはEcoRI部位と遺伝子の3'末端を含んでいた(5'-CCGGAATTCTCAGGTGAACCAAGCCGC-3')。PCR産物を続いてXbaIとEcoRIで消化し、標準的なゲル精製法により精製した。この遺伝子はベクターpMT3Sv2ADA(アール・カウフマン(R. Kaufmann))、メソツズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)、上記)に連結され、これも連続してXbaIとEcoRIで消化し、標準的なゲル精製法により精製した。コンピテントなHB101細胞(Biorad)はこの連結産物により形質転換されアンピシリンの存在下アガープレートにプレートした。アンピシリン耐性のトランスフォーマントのニトロセルロースフィルターリフトは遺伝子中央のヌクレオチド領域506-530に相補的な放射能標識されたオリゴヌクレオチド(5'-AAGTATCTGTCCAGGGCTTCCAGGT-3')でプローブされた。

プラスミドDNAのミニプレップを12の陽性クローンから調製した。精製したDNAを次いでEcoRIとXbaIで適当な大きさのインサートを含む正しいクローンを同定するために消化した。このクローン(pEA.3/4 FT)を次いで大きいスケールで成育させCsCl密度勾配のバンドにより単離した(ジェイ・サムブルック(J. Sambrook)ら、上記)。DNA配列決定は3/4遺伝子の同一性を確実にした。遺伝子の機能性は以下の細胞-細胞結合アッセイにより評価された。COS-1サル細胞[(クローンM6;エム・ホロビッツ(M. Horwitz)ら、モル・アブル・ゼネット(Mol. Appl. Genet.)、2:147-149、(1983)]を、DEAEデキストランを用い3/4 FTでトランスフェクトし、続いてDMSOショック処理およびクロロキンインキュベーションをした[エル・ソムペイラック(L. Sompeyrac)およびケイ・ダナ(K. Dana)ら、プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンシズ(Proc. Natl. Acad. Sci.)、78:7575-7578(1981);エム・ロパタ(M. Lopata)ら、ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Nucleic Acids Res.)、12:5707-5717、(1984);エイチ・ルースマン(H. Luthman)およびジー・マグヌソン(G. Magnuson)、ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Nucleic Acids Res.)、11:1295-1308、(1983)]。トランスフェクトされたCOS細胞を懸濁しE-セレクトインを発現しているCHOラインへの結合を定量した[ジー・ラルセン(G. Larsen)ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)267:11104-11110、(1992)]。このアッセイにより3/4 FT細胞でトランスフェクトされた細胞は

10

20

30

40

50

細胞表面にシアル酸化された Lewis^x エピトープを発現し得ることが確認された。

【実施例 3】

【0051】

LEC11 細胞中での P - リガンドの発現

A . LEC11 細胞中での P - セレクチンリガンドの発現

機能性 P - セレクチンリガンド蛋白質が S L e^x が陽性のチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞系統 LEC11 (キャンベル・シー (Campbell, C.) およびスタンレー・ピー (Stanley, P.) の、セル (Cell) 35 : 303 - 309 (1983) 参照) において以下のように発現された ; P - セレクチンリガンド蛋白質遺伝子を含有するプラスミド (pMT21 : PL85、実施例 1) の約 8 μg を、LEC11 細胞中にトランスフェクトした。トランスフェクト後 68 時間で、細胞を 2.5 mM 酪酸ナトリウムで 4 時間処理した。細胞は 6 - CFD でラベルした CHO : P - セレクチン細胞結合アッセイ (実施例 4、セクション B) を用いて決定されたように、細胞は P - セレクチンの接着を観察された。対照的に、LEC11 細胞のみでも、対照のプラスミドでトランスフェクトした LEC11 細胞でもどちらも P - セレクチンによる接着を引き起こした。

10

【0052】

B . COS 細胞中の可溶性 P - セレクチンリガンドの発現

COS 細胞を 8 μg の pED . s P S L . T 7 (実施例 5 C 参照) および 4 μg の、実施例 2 の pEA . 3 / 4 FT プラスミド、8 μg の pED . s P S L . T 7 のみ、もしくは 8 μg のプラスミドベクター pMT21) および 4 μg の pEA . 3 / 4 FT 遺伝子でトランスフェクトした。トランスフェクト後 45 時間で、細胞を PBS 中で 2 回洗浄し、2 mM L - グルタミン、100 U / ml ペニシリンおよび 100 μg / ml ストレプトマイシンを添加した、血清を含まない DHEM ・ マイナス ・ フェノール ・ レッド (JRH (バイオサイエンシズ (Biosciences)) 中で 37 °C で一晩インキュベートした。フッ化フェニルメチルスルホニル、アプロチニンおよび Na₃ をそれぞれ終濃度 1 mM、2 μg / ml および 0.02 % になるように添加し、調節された培地を遠心して全てのデブリを除去した。

20

免疫沈澱の実験のために、ラベルした可溶性 P - セレクチンリガンド蛋白質は COS 細胞を pED . s P S L . T 7 および pEA . 3 / 4 FT で共トランスフェクトすることにより生産した。トランスフェクト後 45 時間で、COS 細胞を 5 時間 250 μCi / ml の ³⁵S - メチオニン (NEN) でラベルし培地を回収した。s P S L . T 7 蛋白質の発現は抗 - T 7 抗体による免疫沈降により確認された。

30

【0053】

C . COS 細胞における PACE - 切断 P - セレクチンリガンドの発現

実施例 5 (C) の pED . s P S L . T 7 プラスミド、実施例 2 の pEA . 3 / 4 FT cDNA、および配列番号 5 に記載の PACE cDNA を含有するプラスミドで COS 細胞を共トランスフェクトした。pED . s P S L . T 7 プラスミドおよび pEA . 3 / 4 FT プラスミドのみを用いて、平行して対照を共トランスフェクトした。45 時間後に、これらのトランスフェクトした COS 細胞からの条件培地をプラスチック皿上に被覆し、CHO : P - セレクチン細胞 (実施例 4) への結合を測定した。PACE で共発現させた P - セレクチンリガンドを含有する培地で被覆した皿では、PACE で共発現させなかった P - セレクチンリガンドを含有する培地に比して、結合した CHO : P - セレクチン細胞の約 2 倍の上昇が観察された。PACE で同時トランスフェクションからの精製 s P S L . T 7 蛋白質の N - 末端アミノ酸配列決定により、全てのリガンドが PACE コンセンサス部位 (配列番号 : 1 のアミノ酸 38 - 41) で切断されていることが示された。共トランスフェクトした COS 細胞を ³⁵S - メチオニンで放射線標識し、続いて SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびオートラジオグラフィに付すと、両方の共トランスフェクションにおいて同等量の P - セレクチンリガンドが分泌されていることが示された。

40

【0054】

50

D. CHO細胞におけるP-セレクトインリガンド蛋白質の発現

P-セレクトインリガンド蛋白質の全長形態(アミノ酸1-402)を、CHO(DUKX)細胞系(ウルラウブ(Urlaub)およびカシン(Chasin)、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・イン・ユーエスエイ(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)第77巻、4216-4220頁(1980年))で以下のごとく発現させた: 約25 μ gのpMT21:PL85プラスミドおよび約8 μ gの(pEA.3/4FTをEcoIおよびXbaIで制限酵素消化し、得られた断片をpEDプラスミドに挿入することにより作製した)pED.3/4FTを、リン酸カルシウム法を用いて、CHO(DUKX)細胞に共トランスフェクトさせた。トランスフェクト細胞を、メトトレキセートに対する耐性につき選択した。2週間後に、塩化クロム(III)法(ゴディング, ジェイ・ダブリュ(Godding, J.W.)), ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(J. Immunol. Methods)第10巻:61-66頁(1976年))により作製した抗SLe^x抗体(CSLEX-1、米国特許第4,752,569号)とヒツジ赤血球細胞(sRBC)との複合体を用いることにより、SLe^x発現につき、個々のコロニーを以下のごとく選択した: 洗浄液が透明になるまでsRBCを0.15MのNaClで洗浄し、次いで、0.15MのNaCl中でsRBCの50%懸濁液を調製した。0.01%の塩化クロム(III)溶液1mlをボルテックス攪拌しつつ、50 μ gのCSLEX-1を含有するsRBC懸濁液0.2mlに滴下した。37にて30分間インキュベートした後に、10mlのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)溶液を該反応液に滴下した。10mlのPBSに再懸濁する前に、該複合体を一回洗浄した。トランスフェクト細胞を含有するプレートにPBSで洗浄し、次いで、3mlのPBSおよび1mlのsRBC/CSLEX-1コンジュゲートを各プレートに添加した。陽性コロニーは、トランスイルミネーター上で赤色を呈し、これを10%ウシ胎児血清を含むアルファ培地に拾い上げた。2週間後に、2、10、25、100、250nM濃度のメトトレキセートを用いて、該コロニーを段階的増幅に付した。得られた安定な細胞系をCD-PSGL-1(R3.4)と命名した。P-セレクトインリガンド蛋白質の発現は、実施例7(A)の抗-P-セレクトインリガンド蛋白質ポリクローナル抗体を用いた免疫沈降実験により確認した。実施例4(A)のごとくLEC-1への結合につきトランスフェクトされた細胞をアッセイすることにより、CD-PSGL-1(R3.4)細胞系により産生されるP-セレクトインリガンド蛋白質の機能性を試験した。

アデノシン・デアミナーゼ選択下にて、配列番号5に記載したPACEコードcDNAをすでに発現している安定なCHO-PACE系において、該sPSL.T7蛋白質を発現させた(カウフマン(Kaufman)ら、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・イン・ユーエスエイ(PNAS(USA)第83巻:3136-3140頁(1986年))。リン酸カルシウム法を用いて、該psPSL.T7プラスミド(25 μ g)およびpED.3/4FTプラスミド(8 μ g)をCHO-PACE細胞に共トランスフェクトさせた。メトトレキセートに対する耐性につきトランスフェクト細胞を選択し、sRBC/CSLEX-1複合体に結合した個々のコロニーを拾い上げた。培養2週間後に、該コロニーを前記の段階的増幅に付した。得られた安定な細胞系を、CP/PSL-T7(R4.1)と命名した。sPSL.T7蛋白質の発現は、T7特異的モノクローナル抗体または実施例4(A)のLEC-1・キメラを用いる標準的な免疫沈降法により確認した。同様に、pMT21:PL85およびpED.3/4FTをCHO-PACE系に共トランスフェクトさせることにより、P-セレクトインリガンド蛋白質の全長形態(アミノ酸42-402)を発現する安定な細胞系を得た。

実施例5(B)のsPSL.Q蛋白質および実施例5(D)のsPSL.Fc蛋白質を発現する安定な細胞系は以下のごとく構築した:

プラスミドpED.sPSL.Q(25 μ g)またはsED.sPSL.Fc(25 μ g)を、約25 μ gの前記pED.3/4FTプラスミドと前記配列番号5のPACEcDNAならびにネオマイシン抵抗性遺伝子を含む約20 μ gのプラスミドとで、リン酸カルシウム法を用いてCHO(DUKX)細胞中に共トランスフェクトさせた。メトトレキセートおよびG418抗生物質の耐性につきトランスフェクトした細胞を選択した。約2週間後に、s

10

20

30

40

50

RBC/CSLEX-1複合体の結合性を用いて、SLe^x発現につき個々のコロニーをスクリーニングした。陽性コロニーをG418培地に1mg/ml濃度で拾い上げた。培養2-3週間後に、段階的選択のメトトレキサートで該細胞を増幅させた。得られた安定な細胞系は、各々、CD-sPSL.Q(R8.2)およびCD-sPLS.Fc(R8.1)と命名した。sPSL.QおよびsPSL.Fc蛋白質の発現は、実施例7(A)の抗P-セレクトインリガンド蛋白質ポリクローナル抗体を用いる標準的な免疫沈降法により確認した。

【実施例4】

【0055】

P-セレクトイン-媒介細胞間接着のアッセイ

A. LEC-1結合アッセイ

公知の方法(アルッホ(Aruffo)ら、セル(Cell)第67巻、35-41頁(1991年))を用いてヒトIgG₁(LEC-1)のFc部位に結合させたキメラ型P-セレクトインをコードするDNAを構築し、dhfr CHO細胞(CHO DUKX)に安定にトランスフェクトして、高レベルのキメラLEC-1蛋白質を産生させ、以下に記載する結合アッセイに用いるためそれを精製した。ペトリ皿を、最初に抗-ヒトIgG₁ Fcポリクローナル抗体、次いで、LEC-1で被覆した。この方法により、キメラ分子のP-セレクトイン部位が該プレートの表面に示されるようにLEC-1構築体を方向付けた。HL60細胞の方向付けたLEC-1に対する接着を、カルシウムの存在および不存在下で定量した。HL60接着がカルシウム依存性であることが示され、これにより、HL60細胞上のそのリガンドに対するP-セレクトインの機能的な結合を該キメラ分子が有することが確認された。HL60細胞の方向付けたLEC-1への結合は、P-セレクトインに対する中和モノクローナル抗体の遮断によっても示され、P-セレクトイン結合の特異性を証明している。

【0056】

B. 蛍光CHO-P-セレクトイン結合アッセイ

P-セレクトインリガンド遺伝子および3/4FT遺伝子で共トランスフェクトしたCOS細胞の表面に結合してクラスターを形成できる蛍光標識CHO:P-セレクトイン細胞系(ラーゼン(Larsen)ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)第267巻、11104-11110頁(1992年))を、このアッセイは用いる。該CHO:P-セレクトイン細胞を、DME培地中の1%ウシ胎児血清中に 1.5×10^6 個の細胞/mlで懸濁し、6-カルボキシフルオレセイン二酢酸(6-CFD)を最終濃度100μg/mlで添加することにより標識した。37℃にて15分間インキュベートした後に、該細胞を培地中で洗浄し、 1×10^5 個の細胞/mlで再懸濁させた。5mlの該標識細胞を、アッセイすべき各洗浄済みCOSTランスフェクト細胞含有プレートに添加し、室温にて10分間インキュベートした。非接着性細胞は、培地での4回の洗浄によって除去した。次いで、接着性CHO:P-セレクトイン細胞のロゼットにつき、該プレートを蛍光顕微鏡により検鏡した。

【0057】

C. 放射線標識CHO:P-セレクトイン細胞を用いた定量的接着アッセイ

スクリーニングの初期段階で用いたのと同じの方法により、実施例1のpMT21:P L85プラスミドおよび実施例2のpEA.3/4FTプラスミドでCOS細胞を共トランスフェクトさせた。対照として、COS細胞をpMT21:P L85単独、またはpEA.3/4FT単独、あるいはインサートを含有しない同様のプラスミド(「モック(mock)」)でトランスフェクトした。

トランスフェクション24時間後に、該トランスフェクトした細胞をトリプシン処理し、コースター6-ウェル組織培養プレートに撒いた。CHO:P-セレクトイン細胞は、公知方法を用いて³H-チミジンで16時間標識し、1%BSAを含有する培地中(対照); 1%のBSA、5mMのEDTAおよび5mMのEGTAを含有する培地; 1%のBSAおよび10μg/mlの中和抗P-セレクトイン・モノクローナル抗体ならびに、1%のBSAおよび非-中和抗-P-セレクトイン・モノクローナル抗体を含有する培地中で、0.5

10

20

30

40

50

$\times 10^6$ 個の細胞/ml、4 にて30分間前インキュベートさせた。次いで、トランスフェクトしたCOS細胞を含有するウェルに該前インキュベート細胞を添加した。10分間のインキュベーションの後に、培地を4回交換することにより非結合細胞を除去した。該結合CHO:P-セレクチン細胞は、トリプシン処理によって放出させ、シンチレーション計測によって定量した。

P-セレクチンリガンドおよび3/4FTで共トランスフェクトしたCOS細胞は、COSモック細胞に比して約5.4倍高いCHO:P-セレクチン細胞の結合を誘導した；EGTAおよびEDTA存在下のアッセイは、モック・トランスフェクトCOS細胞のレベルに対する結合を低下させた。同様に、中和抗-P-セレクチン抗体でのインキュベーションも特異的な結合を消失させたが、非-中和抗体は何等影響を有しなかった。それに対して、P-セレクチンリガンド単独でトランスフェクトしたCOS細胞に対するCHO:P-セレクチンの結合は、EDTAおよびEGTA、または抗-P-セレクチン抗体の存在下または不存在下の双方におけるモック・トランスフェクトCOSに対する結合と統計的に差がなかった。3/4FT単独でトランスフェクトしたCOS細胞に対するCHO:P-セレクチン細胞の結合は、モック・トランスフェクトCOSより約2倍高かったが、EDTAおよびEGTAの存在または不存在によっては影響されなかった。

【実施例5】

【0058】

可溶性P-セレクチンリガンドの構築

実施例IのHL60細胞からのcDNAライブラリーを生成させるのに用いるEcoRIアダプターは、pMT21:PL85プラスミド中に位置されるよう、配列番号：1の最初の丁度5'側にXbaI制限サイト(TCTAGA)を含有する。PSLの可溶性形態を生成させるために、該pMT:21PL85プラスミドをXbaIおよび(配列番号：1のヌクレオチド944以後を切断する)HincIIで制限酵素消化した。バリン295についてのコドンまでの、およびそれを含むリガンドの、コードされた細胞外セグメントの全てを含有するかく生成した約950bpの断片を単離し、以下のセクションAないしDに記載するP-セレクチンリガンド蛋白質の可溶性形態をコードするDNAを生成させるのに用いた。

【0059】

A.p.s.P.S.L.O.Cの構築

該断片を精製し、Asn296-Cys310のコドンを再生し、かつCys310の直後に新規の終始コドンを導入した二本鎖合成オリゴヌクレオチドDNAと共に、哺乳動物発現ベクターpEDに、XbaIおよびEcoRI部位の間に連結された。該オリゴヌクレオチドの配列は以下の通りである：

【化5】

5'-AACTACCCAGTGGGAGCACCCAGACCACATCTCTGTGAAGCAGTGCTAG

5'-AATTCTAGCACTGCTTCACAGAGATGTGGTCTGGTGCTCCCACTGGGTAGTT

得られたプラスミドはpED.s.P.S.L.Q.Cと命名し、該プラスミドから発現される蛋白質をs.P.S.L.Q.Cと命名した。

【0060】

B.p.s.P.S.L.Oの構築

該断片を精製し、Asn296ないしGln309のコドンを再生し、かつGln309の直後に新規の終始コドンを導入した二本鎖合成オリゴヌクレオチドDNAと共に、pEDプラスミド(カウフマン(Kaufman)ら、1991年)に、XbaIおよびEcoRIサイトの間に連結させた。該オリゴヌクレオチドの配列は以下の通り：

【化6】

5'-AACTACCCAGTGGGAGCACCCAGACCACATCTCTGTGAAGCAGTAG

5'-AATTCTACTGCTTCACAGAGATGTGGTCTGGTGCTCCCACTGGGTAGTT

10

20

30

40

50

得られたプラスミドは p E D . s P S L . Q と命名し、該プラスミドから発現される該蛋白質を s P S L . Q . と命名した。

【 0 0 6 1 】

C . p s P S L . T 7 の構築

ファージ T 7 の主要カプシド蛋白質由来のエピトープを含有する 1 4 個のアミノ酸をコードするオリゴヌクレオチドを合成し、該エピトープ「タグ (t a g) 」と該ベクター配列由来のさらなる 3 2 個のアミノ酸との C - 末端融合物を生成させた。配列：

【 化 7 】

5' - CTAGACCCGGGATGGCATCCATGACAGGAGGACAACAAATGGTAGGCCGTAG および

5' - AATTCTACGGCCTACCCATTTGTTGTCCTCCTGTCATGGATGCCATCCCGGGT

10

を有する 2 個のオリゴヌクレオチドを二本鎖化し、哺乳動物発現プラスミド p E D の大きな X b a I - E c o R I 断片と連結させた。得られたプラスミド p E D . T 7 を、 X b a I および S m a I で制限酵素消化し、前記の 9 5 0 b p の X b a I - H i n c I I 断片に連結させて、プラスミド p E D . s P S L . T 7 を得た。 p E D . s P S L . T 7 の発現から得られる該蛋白質を s P S L . T 7 と命名した。

【 0 0 6 2 】

D . 可溶性 P - セレクチンリガンド - I g G F c キメラの構築

ヒト・免疫グロブリン I g G 1 の F c 部位に融合させた可溶性の P - セレクチンリガンド蛋白質の細胞外形態をコードするプラスミド DNA は、以下のごとく構築した：該哺乳動物発現ベクター p E D . F c は、唯一の X b a I 制限部位を介してアミノ末端からヒンジ領域をコードする配列を融合させることができる新規なリンカー配列を有するヒト I g G 1 の F c 領域をコードする配列を含有する。3 個の断片の連結を行った： p E D . F c を X b a I で制限酵素消化させ、線状形態にてゲル精製した。前記の p M T 2 1 : P L 8 5 からの 9 5 0 b p の断片は第二断片を含む。第三断片は、以下の配列：

【 化 8 】

5' - CTGCGGCCGCGAGT

5' - CTAGACTGCGGCCGCGAG

20

30

を有するアニール化させた合成オリゴヌクレオチド DNA よりなる。

該連結生成物を、プラスミド DNA として増幅させ、正確な立体配置を有する個々のクローンを DNA 配列決定により同定した。該プラスミドは、 p E D . P S L . F c と命名した。得られた可溶性 P - セレクチンリガンド / F c 融合蛋白質の

DNA コード領域を配列番号： 6 に示す。

【 実施例 6 】

【 0 0 6 3 】

発現した P - セレクチンリガンドの特徴付け

A . C O S 細胞上に発現された全長 P - セレクチンリガンド蛋白質の結合の特徴付け

実施例 2 の p E A . 3 / 4 F T プラスミドおよび実施例 1 の

p M T 2 1 : P L 8 5 プラスミドでの C O S 細胞の共トランスフェクトにより、 C H O : P - セレクチン細胞に特異的結合する C O S 細胞を得る。この結合は、 p E A . 3 / 4 F T おおび p M T 2 1 : P L 8 5 で共トランスフェクトさせた場合にのみ認められた；いずれかのプラスミド単独の使用では、 C H O : P - セレクチン細胞に結合しない C O S 細胞を生成した。 P - セレクチンを発現していない親 C O S (D U K X) と、 p E A . 3 / 4 F T おおび p M T 2 1 : P L 8 5 で共トランスフェクトした C O S 細胞との間に結合は認められなかった。該共トランスフェクト C O S 細胞と C H O : P - セレクチン細胞との間の結合は、 E D T A おおび E G T A のごとき二価イオンのキレート剤に敏感であり、このことは、 P - セレクチン媒介細胞接着の C a ²⁺ 依存性と一致する。中和抗 - P - セレクチン・モノク

40

50

ローナル抗体が、CHO:P-セレクチン細胞と、pEA.3/4FTおよびpMT21:PL85で共トランスフェクトさせたCOS細胞との間の結合を遮断する一方、非-中和抗P-セレクチン・モノクローナル抗体は、該結合に何等影響を有さなかった。該抗体の結果は、P-セレクチンの機能性ドメインが、COS細胞表面上に発現されているP-セレクチンリガンド蛋白質への結合に必要であることを示している。

【0064】

B. COS細胞に発現される全長P-セレクチンリガンドの電気泳動的特徴付け

共トランスフェクトしたCOS細胞の活性剤抽出物は以下のごとく調製した：共トランスフェクト45時間後に、約 1.5×10^7 個の細胞を5mlの溶解緩衝液(10mMのピペリジン-N,N'-ビス[2-エタンスルホン酸](PIPESES)、pH7.5、100mMのKCl、3mMのMgCl₂、1mMのベンズアミジン、0.5μg/mlのロイペプチン、0.75μg/mlのペプスタチン、1mMのエチルマレイミドおよび1μg/mlのアプロチニン)に懸濁し、超音波により溶解した。低速遠心(500×g、10分間)により細胞夾雑物を除去し、超遠心(100,000×g、60分間)により膜画分を採取した。高速の膜ペレットを抽出緩衝液(1mMの3-[N-モルホリノ]プロパンスルホン酸)(MOPSS)、pH7.5、0.1MのNaCl、0.02%のNaN₃、1%のセジット^R(Thesit^R)(シグマ社(Sigma)、1mMのベンズアミジン、0.5μg/mlのロイペプチン、0.75μg/mlのペプスタチン、1mMのエチルマレイミド、および1μg/mlのアプロチニン)に再懸濁した。次いで、試料をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付し、以下のごとくニトロセルロース・プロットに移行させた：活性剤抽出物のアリコットを1%SDS付加緩衝液に懸濁し、8-16%ポリアクリルアミドゲル(還元)または6%ゲル(非還元)上に負荷する前に、100℃にて5分間加熱し、ラエムリ緩衝液系(Laemmli buffer system)で電気泳動に付した。プロットは、イモビロン-P^Rトランスファー膜(Immobilon-P^R transfer membrane)を用いて調製した。該プロットを10mMのMOPSS、pH7.5、0.1MのNaCl、0.02%のNaN₃、1mMのMgCl₂、1mMのCaCl₂、および10%の脱脂ミルク中に4℃にて一晩浸漬した。プロットを、脱脂ミルクを含有しない前記緩衝液中で1回濯ぎ、プロッティング緩衝液(10mMのMOPSS、pH7.5、0.1MのNaCl、1%の牛血清アルブミン、0.05%のセジット、1mMのMgCl₂、1mMのCaCl₂)中で室温にて30分間インキュベートした。

次いで、該プロットを以下のごとくP-セレクチンに対するプローブとした：50ngのP-セレクチン/Fcキメラを、プロッティング緩衝液中の3μCiの¹²⁵I-プロテインAと室温にて30分間、前インキュベートした。この時点で、該前インキュベーション混合物にさらなる補形薬(例えば、EDTA、EGTA、モノクローナル抗体)を添加して、P-セレクチンリガンドへの該キメラの結合に対するそれらの効果を評価できる。次いで、該前-インキュベート混合物を、(前記のごとく調製した)該プロットと室温にて60分間インキュベートし、続いて該プロットを(牛血清アルブミンを含有しない)同一のプロッティング緩衝液で4回洗浄した後、風乾し-70℃にてオートラジオグラフィに付した。

非還元条件下では、この技術において、共トランスフェクトしたCOS細胞から調製した膜抽出物につき、2本のバンドが認められた。濃い方のバンドが約220kDの分子量と見積もられるよう移動した一方、薄い方のバンドは約110kDの分子量で移動した。還元条件下で、約110kDの分子量で単一バンドのみが観察されたことは、非還元条件下では、該P-セレクチンリガンドがホモダイマーとして存在することを示している。該還元モノマーのおよその分子量が該cDNAクローン(45kD)の予想アミノ酸配列から想定されるよりも大きいことは、該発現蛋白質が大きく翻訳後修飾を受けていることを示している(実施例6(C)参照)。P-セレクチン/Fcキメラの特異性は、非特異的なIgG₁プローブが該プロット上にバンドを得られなかったという観察結果により確認された。さらに、該P-セレクチン/Fcキメラの該プロットに対する結合は、EDTA、EGTA、および中和抗-P-セレクチン・モノクローナル抗体により中断された。該pEA.3/4FTおよびpMT21:PL85プラスミドで共トランスフェクトしたCOS細胞の膜抽

10

20

30

40

50

出物からのみ、該プロット上に特異的なバンドが認められた。対照トランスフェクト細胞 (pEA.3/4FTまたはpMT21:PL85単独)からの膜抽出物では、プロット上に観察できるバンドが得られなかった。

【0065】

C. P-セレクトインリガンド蛋白質の糖付加

組換えP-セレクトインリガンド上に共有的に結合している炭水化物の存在およびP-セレクトインへの結合におけるその役割は以下のごとく検証した:実施例5(C)のpED.sPSL.T7プラスミドおよび実施例2のpEA.3/4FTプラスミドでCOS細胞を共トランスフェクトさせた。48時間後に、該細胞を³⁵S-メチオニンで標識した。200μlの³⁵Sメチオニン-標識sPSL.T7条件培地を、2mMのCaCl₂および1mg/mlの牛血清アルブミン(BSA)の存在下にて、5μgのLEC-1と共にインキュベートした。4にて2時間回転撹拌させた後に、プロテインA-セファロース・ビーズ(ファルマシア社(Pharmacia))を4にて1時間添加し、遠心によりペレットとし、2mMのCaCl₂および1mg/mlのBSAを含有するトリス緩衝化セーライン(20mMのTris-HCl、150mMのNaCl、pH7.5、以後TBSとする)中で2回洗浄した。次いで、該ペレットを再懸濁し、ノイラミニダーゼ(ストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*))、O-グリカナーゼおよびN-グリカナーゼ(全てゲンザイム社(Genzyme)から入手)で以下のごとく処理した。全てのグリコシダーゼ消化は、37にて一晩行った。ノイラミニダーゼ消化については、50μlの2-(N-モルホリノ)-エタンスルホン酸(MES)緩衝液、pH6.5(カルバイオケム社(Calbiochem))および0.1%のSDS中に該ペレットを再懸濁して95にて5分間加熱し、次いで、ペレットとした。1.4%のn-オクチル B-D-グルコピラノシド(OGP)、10mMの酢酸カルシウム、20mMのカコジル酸ナトリウムおよび2.5mMのPMSF、最終pH7.0を含むよう該上清を修飾した。8μlのノイラミニダーゼを最終濃度1単位/mlで添加した。ノイラミニダーゼ/O-グリカナーゼ消化については、前記のごとく試料を調製し、該ノイラミニダーゼと共に、該O-グリカナーゼも最終濃度0.1単位/mlで添加した。N-グリカナーゼ消化について、54μlのMES緩衝液および1%のSDS中に該ペレットを再懸濁し、95にて5分間加熱し、次いで、ペレットとした。0.2Mのリン酸ナトリウム、3.5%のOGP、および2.5mMのPMSF、最終pH8.5を含むよう該上清を修飾した。N-グリカナーゼを最終濃度12単位/mlで添加し、前記のごとくインキュベートした。

sPSL.T7に対するグリコシダーゼ処理の効果は、2種の方法によって評価した。これに関しては、各消化蛋白質試料を2つの等量画分に分けた。実施例7(A)の該P-セレクトイン・ポリクローナル抗体で1画分を沈殿させ、電気泳動移動度に消化の効果を示した。実施例4(A)の該LEC-1キメラで他の画分を沈殿させ、消化後に残存しているP-セレクトインリガンド結合活性を評価した。該免疫沈降試料は、還元条件下のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびオートラジオグラフィーにより分析した。

グリコシダーゼ処理無しでは、オートラジオグラフィーにより各沈殿に(110kDの分子量で)相当のバンドが現れた。P-セレクトインリガンド蛋白質をノイラミニダーゼで処理した場合、抗-P-セレクトインリガンド・ポリクローナル抗体沈殿は移動度においてわずかに低下し、これはシアル酸残基の除去と一致する。LEC-1により沈殿させたP-セレクトインリガンド蛋白質量は、ノイラミニダーゼ処理後にわずかに低下し、これはP-セレクトイン/P-セレクトインリガンド相互作用におけるシアル酸の役割と一致する。P-セレクトインリガンド蛋白質をノイラミニダーゼおよびO-グリカナーゼの双方で処理した場合において、抗-P-セレクトインリガンド・ポリクローナル抗体で沈殿させた後に電気泳動移動度を実質的な上昇が認められたことは、多数のO-連結オリゴ糖鎖が除去されたことを示している。しかしながら、P-セレクトインリガンド蛋白質からのO-連結オリゴ糖の除去は完全ではないようである。なぜなら、該電気泳動移動度が、配列番号:1に記載したアミノ酸配列から予想されるごとき、分子量38kDの蛋白質に相当しなかったためである。該ノイラミニダーゼ/O-グリカナーゼ消化P-セレクトインリガンド蛋白質がLEC-1にほとんど結合しないことも、さらに、該P-セレクトイン/P-セレクトインリガンド相互作用

用におけるオリゴ糖の役割を示している。精製 P-セレクトインリガンドを N-グリカナーゼで処理すると電気泳動移動度がわずかに上昇することは、N-連結糖化に対するいくつかの共通サイトが占有されていることを実証している。L E C - 1 により沈殿させた P-セレクトインリガンド蛋白質量がわずかに低下することは、シアル化および O-結合糖化のごとき顕著ではないが、N-連結糖化も P-セレクトイン/P-セレクトインリガンド相互作用に寄与していることを示している。

【実施例 7】

【0066】

P-セレクトインリガンドの特異的なポリクローナル抗体

A. ウサギ抗-P-セレクトインリガンド蛋白質/マルトース結合蛋白質融合蛋白質ポリクローナル抗体

10

該抗-P-セレクトインリガンド・ポリクローナル抗体は、イー・コリ (*E. coli*) で生成させた融合蛋白質でウサギを免疫することにより生成した。該融合蛋白質は、マルトース結合蛋白質に枠で融合させた P-セレクトインリガンドのアミノ末端の 1/3 (配列番号: 1 のアミノ酸 1 ないし 110) よりなる (マイナ, シィ・ブイ (Maina, C. V.) ら、ジーン (Gene) 第 7 4 巻、365-373 頁 (1988 年); リッグス, ピィ (Riggs, P.) 「分子生物学における最近のプロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」エフ・エム、アウセベル (F. M. Ausubel) ら編、グリネ・アソシエーツ/ウィリー・インターサイエンス (Greene Associates/Wiley Interscience) (ニュー・ヨーク (New York)、1990 年、第 16.6 章)。本明細書で用いた条件下では、該融合蛋白質抗体は該 P-セレクトインリ

20

【0067】

B. ポリクローナル・ウサギ抗-s P S L . T 7 蛋白質

本発明の可溶性形態 (s P S L . T 7 ; 実施例 5 (C) 参照) を、以下のスキームに従って明らかな均質性に精製した: s P S L . T 7 (実施例 5 (C))、3/4 F T (実施例 2)、および (配列番号: 5 に記載の) P A C E の可溶性形態をそれぞれコードする 3 つのプラスミドで C O S 細胞をトランスフェクトした。72 時間後に、該条件培地を採取し、組換え s P S L . T 7 を以下のごとく精製した。

条件培地を、50 mM の M O P S 、 150 mM の N a C l 、 0.5 mM の C a C l ₂ および 0.5 mM の M g C l ₂ 、 p H 7.2 で 2 倍希釈し、同一緩衝液で平衡させたレンチル・レクチン-セファロース 4 B カラムに適用した。カラムを流した後に、280 nm の光吸収が安定なベースラインに落ちるまで、該カラムを同一の緩衝液で洗浄した。次いで、該カラムを、0.5 M の -メチル-マンノシドおよび 0.3 M の N a C l に調整した同一の緩衝液で溶出させた。組換え s P S L . T 7 は、この溶出緩衝液の 5-15 カラム容量にわたり採取した。次いで、4 にて、1 l のカラム溶出液当たり 472 g の硫酸アンモニウムを添加することにより、該レンチル・レクチン溶出液を 0-70% 硫酸アンモニウム沈殿に付した。30 分間攪拌された後に、該沈殿を最小容量の T B S (20 mM の T r i s - H C l

30

、150 mM の N a C l 、 p H 7.5) に再懸濁し、T B S 中に平衡させた T S K G 4 0 0 0 S W X L ゲル濾過カラムに適用した。該カラム上の流速は 0.5 ml / 分であって、ガード・カラムを用いた。< 250 μ l のアリコットにおいて、該再懸濁硫酸アンモニウム・ペレットを該カラムに注射し、画分をウエスタン分析を伴う S D S - P A G E により分析した。s P S L . T 7 を含有する画分を保存し、次いで、ウサギの免疫に用いた。

40

s P S L . T 7 に対する抗体は、抗原初回免疫および続く 3 ヶ月にわたるブースター処理による標準的な様式で生成させた。詳細には、50 μ g の (0.1% の S D S と混合し、100 にて 10 分間加熱することにより変性させた) s P S L . T 7 をフロイント不完全アジュバントと混合し、皮下的に 5 箇所注射することにより初回免疫を行った。25 μ g の (0.1% の S D S と混合し、100 にて 10 分間加熱することにより変性させた) [3 回目以降には 12.5 μ g の] s P S L . T 7 をフロイント不完全アジュバントと混合し、2 週間毎に皮下的に 2 箇所注射することにより 2 回目 (およびそれ以降全ての) ブース

50

ト処理を行った。2週間毎に試験採血を行い抗体力価をモニターした。該抗体力価が安定なレベルに達したら、さらに大用量の採血を行い、全血清画分を調製した。このポリクローナル抗体調製物を用いて、実施例4の記載に類似した様式にてCHO:P-セレクチン細胞に対するHL60細胞の特異的な結合を阻害した。

このアッセイには、マイクロタイター・プレートの底部に平板したCHO細胞に結合する(BCECFAM; 2', 7'-ビス-(2-カルボキシメチル)-5-(および-6)-カルボキシフルオレセイン, アセトキシメチルエステルで標識した)蛍光-標識HL60細胞を用いる。該標識HL60細胞を、ポリクローナル抗体を含有する血清または前-免疫血清と共に4にて30分間、前インキュベートした。次いで、該細胞を洗浄し、CHO:P-セレクチン細胞と共に10分間インキュベートした。次いで、該プレートを洗浄し、蛍光マイクロタイター・プレート・リーダーで蛍光を読んだ。本アッセイを用いると、1:15希釈の抗-sPSSLT7ポリクローナル血清が、HL60細胞がCHO:P-セレクチンに結合するのを本質的に完全に阻害する結果となった。CHO:P-セレクチンに対するHL60結合の実証可能な阻害は、1:150の血清希釈においてでさえ認められた。前-免疫血清は、CHO:P-セレクチンにHL60細胞が結合するのに何等影響を有さなかった。

【産業上の利用可能性】

【0068】

本発明の新規P-セレクチンリガンドをコードするDNA、およびそれによりコードされる新規P-セレクチンリガンド蛋白は、P-セレクチンにより媒介される細胞間接着に起因する疾病を治療するための医薬組成物、かかる細胞間接着の阻害剤を同定するためのアッセイ等に利用できる。

【配列表】

[0003668242000001.app](#)

10

20

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

F I

A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 5/14	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 35/04	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00	B
G 0 1 N 33/566	A 6 1 K 37/02	

(74)代理人 100116311

弁理士 元山 忠行

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(72)発明者 グレン・アール・ラーセン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 1 7 7 6、サドベリー、メイナード・ファーム・ロード1 1
2番

(72)発明者 ダイアン・エス・サコ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 3 0、ボストン、ジャマイカ・ウェイ・ナンバー6・5
0番

(72)発明者 シャオ - チア・チャン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 5 9、ニュートン・センター、コモンウェルス・パーク
・ウエスト5 9番

(72)発明者 ギールトルイーダ・エム・ベルドマン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 1 7 7 6、サドベリー、ウッドミアー・ドライブ6 0番

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 J.Cell Biol., Vol. 118, No. 2 (1992. Jul.) p. 445-456

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed