

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 292787

(P2001 - 292787A)

(43)公開日 平成13年10月23日(2001.10.23)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	ZNA		C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47			16/18	
			C 1 2 N 1/15	
			1/19	
			1/21	

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 16数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 59155(P2001 - 59155)

(22)出願日 平成13年3月2日(2001.3.2)

(31)優先権主張番号 09/517225

(32)優先日 平成12年3月2日(2000.3.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 591186073

ロシュ ダイアグノスティックス コーポ
レーション

アメリカ合衆国 46250 - 0457 インディア
ナ州 インディアナポリス ハーグ ロー
ド 9115

(72)発明者 ホンシャ シュ

アメリカ合衆国 94552 カリフォルニア州
カストロ ヴァレー,キャニオン コート
3838 エヌ.

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト赤血球分化関連因子

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 ヒト赤血球分化関連因子 (hEDRF)、hEDRFを
コードするポリヌクレオチド、hEDRFに特異的な抗体、
並びにそれらの使用方法の提供。

【解決手段】 ヒト赤血球前駆体から得られた特定のア
ミノ酸配列と同一であるが、マウス由来相同体のアミノ
酸配列とは同一でない、少なくとも5個の連続したアミ
ノ酸を含むポリペプチド。該ポリペプチドをコードする
ポリヌクレオチド及び該ポリペプチドに対する特異的な
抗体を使用した分析方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2に示される連続したアミノ酸と同一であるが、配列番号4に示される連続したアミノ酸とは同一でない、少なくとも5個の連続したアミノ酸を含むポリペプチド。

【請求項2】 配列番号2に示される連続したアミノ酸と同一である、少なくとも8個の連続したアミノ酸を含むポリペプチド。

【請求項3】 配列番号2のアミノ酸15~102に対して少なくとも約65%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項2記載のポリペプチド。

【請求項4】 配列番号2に示される配列に対して少なくとも約65%の同一性を有するポリペプチド。

【請求項5】 配列番号2に示される配列に対して少なくとも約85%の相同性を有するポリペプチド。

【請求項6】 配列番号2のアミノ酸15~102に対して65%の同一性を有するポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドの相補体。

【請求項7】 配列番号1に示される連続したヌクレオチドと同一である、少なくとも25個の連続したポリヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド、または該単離されたポリヌクレオチドの相補体。

【請求項8】 配列番号1の少なくとも約100個の連続したヌクレオチドが少なくとも約90%の同一性を有する請求項7記載の単離されたポリヌクレオチド、または該単離されたポリヌクレオチドの相補体。

【請求項9】 配列番号2のアミノ酸15~102に対して65%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項10】 配列番号2に示される配列に対して少なくとも約65%の同一性を有するポリペプチドの生産方法であって、宿主細胞中で該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現させることを含む、前記方法。

【請求項11】 ヒト被験者におけるヒト赤血球分化関連因子(hEDRF)の発現の検出方法であって、以下のステップ:

a) 被験者からDNAもしくはRNAを含有するサンプルを取得し、そして場合により該DNAもしくはRNAを増幅するステップ、

b) 前記DNAもしくはRNAを請求項11記載のポリヌクレオチドと接触させるステップ、および

c) 前記ポリヌクレオチドを検出するステップ、を含む、前記方法。

【請求項12】 配列番号2に示される配列に対して少なくとも約65%の同一性を有するポリペプチドに特異的な抗体。

【請求項13】 ヒト被験者におけるヒト赤血球分化関連因子(hEDRF)の検出方法であって、以下のステップ:

a) 被験者からタンパク質を含むサンプルを取得するステップ、

b) 前記タンパク質を、配列番号2に示される配列に対して少なくとも約65%の同一性を有するポリペプチドに特異的な抗体と接触させるステップ、および

c) 結合した抗体を検出するステップ、を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、赤血球またはその前駆体において生じるポリヌクレオチドおよびポリペプチドに関し、特に、新規タンパク質であるヒト赤血球分化関連因子(human erythroid differentiation related factor: hEDRF)、hEDRFをコードするポリヌクレオチド、hEDRFに特異的な抗体、ならびにこれらの使用に関する。

【0002】

【従来の技術】成熟赤血球になるまでの赤血球系経路の過程に沿った細胞の分化は、ヒト恒常性にとって重要である。多くのヒトの疾患は赤血球の異常な減少に関係しており、赤血球の発生を促進させることが有効である。他のヒト疾患は、血液細胞またはその前駆体の異常増殖に関係する。このような異常な現象が起こる場所を突き止める、またはこれを修正するための新しい試薬を得ることは有益である。

【0003】

赤血球系細胞は、脊椎動物の発生中に一連の異なる部位で確立された少数の多能性造血幹細胞から生じる。胎児性赤血球系細胞の産生はまず、卵黄囊の血島で起こる。ここで産生された細胞(「原始」赤血球細胞と呼ばれる)は核を有し、発生中に一時的にしか存在しない。発生の進行につれて赤血球系細胞産生の主要部位は肝臓に引き継がれる。肝臓で産生された赤血球系細胞は、「確定性(definitive)」赤血球系細胞と呼ばれ、これは、哺乳動物では、脱核して胎児性赤血球を生じる。出生の少し前に、赤血球形成(erythropoiesis)の主要部位は、その永久的な場である骨髄に移行する。

【0004】

確定性赤血球は、全ての血液細胞の源である多能性幹細胞からの1つの分化経路の最終産物である。多能性幹細胞はCFU-S(脾コロニー形成単位)を生じ、このCFU-SはCFU-GEMM(混合コロニー形成単位)を生じる。CFU-GEMMからはBFU-Eが派生し、赤血球分化経路に託される。発生経路において、次はCFU-Eであり、その次は前赤芽球である。この前赤芽球は、組織学的染色に基づいて識別される一連のタイプの赤芽球を生じる。赤芽球は網状赤血球を生じ、これは脱核して赤血球になる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】赤血球分化経路における細胞に関連する新しい因子が発見された。約102個のアミノ酸からなるオープンリーディングフレーム(OR

F)を含む赤血球前駆体からメッセンジャーRNAを得た。このORFによりコードされるタンパク質を、ヒト赤血球分化関連因子(hEDRF)と名付けた。本発明は、hEDRFおよびhEDRF関連ポリペプチド、このようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびにhEDRFタンパク質およびmRNAならびにそれを産生する細胞の位置付けおよび正体を検出するのに使用することができる試薬を提供する。

【0006】

【課題を解決するための手段】1つの実施形態において、本発明はhEDRFポリペプチドを提供する。本発明により提供されるhEDRFポリペプチドには、プロ-hEDRF(即ち配列番号2のアミノ酸1~102)、およびそのプロセシングされた形態(例えば配列番号2のアミノ酸6~102、12~102、13~102、14~102、および15~102)、ならびにhEDRFに関連するポリペプチドが含まれる。この実施形態のポリペプチドは、マウス相同体mEDRFではなくhEDRF配列に示される連続するアミノ酸と同じ少なくとも約5個の連続するアミノ酸からなるセグメントを含み得る。この実施形態はさらに、プロ-hEDRFおよび/またはそのプロセシングされた形態に対して少なくとも約65%の同一性および/または85%の類似性を有するポリペプチドを含む。

【0007】他の実施形態において、本発明は、hEDRFおよびhEDRF関連ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。例としては、hEDRF cDNA中の配列と同じ少なくとも約25個の連続したヌクレオチドを含む、および/または本発明のポリペプチドのうちの1つをコードする、ポリヌクレオチドがある。また本発明には、配列番号1の配列(特に配列番号1のヌクレオチド113~418)を含むhEDRFをコードするDNAまたはRNAとハイブリダイズする単離されたポリヌクレオチドおよびその相補体も含まれる。本発明のポリヌクレオチドは、(例えばヒト赤血球系細胞において)mRNAレベルでhEDRFの発現を検出するために、またはhEDRFもしくはhEDRF関連ポリペプチドを産生するために、使用することができる。

【0008】他の実施の形態には、本発明のポリヌクレオチドを含む組換え宿主細胞、および本発明のポリヌクレオチドを含む発現構築物を含む組換え宿主細胞が包含される。

【0009】本発明の他の実施形態は、hEDRFおよび本発明の他のポリペプチドに特異的な抗体を提供する。これらの抗体は、(例えば対象となるヒトから採取したサンプル中のhEDRFを検出/定量するために)例えば対応する抗原を分離または検出するために使用することができる。

【0010】

【発明の実施の形態】発明を実施するための最良の形態
本発明者らは、赤血球系分化経路中の細胞を豊富に含むヒト組織を用いて作製したcDNAライブラリーから新規な

cDNAを単離した(配列番号1)。オープリーディングフレーム(ORF)の幾つかのマップが図1に表されている。ORF1~3は順方向であり、ORF4~6はアンチセンス方向である。ORF2は、102個のアミノ酸からなるタンパク質をコードし、このORFによりコードされるタンパク質を、ヒト赤血球分化関連因子すなわちhEDRF(配列番号2)と名付けた。

【0011】図2は、コンピュータアルゴリズムMacVector™(Version 6.0, Oxford Molecularより入手)により予測した、翻訳されたhEDRFアミノ酸配列における特徴を表す。N末端近くには多くの潜在的なシグナルペプチダーゼ切断部位がある。また、該配列に沿ってcAMP依存性PKリン酸化部位およびカゼインキナーゼ部位があり、またC末端近くにはジンクフィンガーモチーフもある。

【0012】本発明は、hEDRFに関連するポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体、ならびにこれらの使用を包含する。以下の節でさらに詳しく記載する。

【0013】定義

「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は交換して使用可能であり、任意の長さのヌクレオチドからなるポリマー形態、つまりデオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドまたはその類似体を指す。これに含まれるものとしては、遺伝子、遺伝子断片、mRNA、tRNA、rRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐状ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、単離されたDNAおよびRNA、核酸プローブ、ならびにプライマーが挙げられる。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド(メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体等)を含み得る。修飾は、該ポリマーの構築の前または後に行うことができる。ヌクレオチドの配列中には、非ヌクレオチド成分が間に介在していてもよい。本明細書中で使用されるポリヌクレオチドという用語は、二本鎖または一本鎖分子のどちらも指す。特に指定または必要がない限り、本発明(ポリヌクレオチド)の実施形態は、二本鎖形態、および該二本鎖形態を形成することが分かっているまたは予測されている2つの相補的な一本鎖形態のうちの各々、の両方を包含する。

【0014】「ハイブリダイゼーション」とは、1以上のポリヌクレオチドが反応してこれらのヌクレオチド残基の塩基間の水素結合により安定化された複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック型塩基対、フーグスティーン型塩基対、または他の配列特異的様式によって起こり得る。ハイブリダイゼーション反応は、より広範な方法(例えばPCR増幅の開始など)における1ステップを構成しうる。

【0015】ハイブリダイゼーション反応は、異なる「ストリンジェンシー」条件下で行うことができる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーを高め

る条件は広く知られている（例えばSambrookら、以下を参照されたい）。ストリンジェンシーを高める条件の例は以下のとおりである：インキュベーション温度を25、37、50 および68；バッファー濃度を10×SSC、6×SSC、1×SSC、0.1×SSC（SSCは0.15M NaClおよび15mMクエン酸緩衝液）および他のバッファー系を使用したこれらの同等物；ホルムアミド濃度を0%、25%、50%および75%；インキュベーション時間を5分～24時間；洗浄ステップを1、2、またはそれ以上の回数；洗浄インキュベーション時間を1、5または15分間；および10 洗浄液を6×SSC、1×SSC、0.1×SSCまたは脱イオン水；とする。

【0016】ポリヌクレオチドの「安定な二本鎖（duplex）」または生化学的反応において任意の2以上の成分の間で形成された「安定な複合体」とは、その二本鎖または複合体の形成からその後の検出までの間持続するほど十分長持ちする二本鎖または複合体を指す。該二本鎖または複合体の成分は、可逆的または非可逆的に会合していてもよいが、この会合は、形成時から検出時までの間にどのような条件が存在してもまたは導入されても耐え得るものでなければならない。

【0017】ポリヌクレオチド「プローブ」は、ハイブリダイゼーション反応により目的のサンプル中に潜在する標的ポリヌクレオチドを検出するための試薬である。「プライマー」は、目的のサンプル中の鋳型ポリヌクレオチドにハイブリダイズしてその鋳型の増幅を促進する、遊離3'側OH基を一般に有するオリゴヌクレオチドである。

【0018】「宿主細胞」とは、遺伝的に改変された、または外来ポリヌクレオチド（例えば細菌プラスミドまたは組換えベクターなど）の導入により遺伝的に改変することができる、原核細胞または真核細胞を指す。遺伝的に改変された細胞を指す場合、この用語は、実際に改変された細胞およびその子孫の両方を指す。

【0019】「遺伝的な改変」とは、遺伝子エレメントを有糸分裂または減数分裂以外の方法により細胞中に導入するプロセスを指す。遺伝的な改変は、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿法、ポリヌクレオチド-リポソーム複合体との接触、あるいはDNAもしくはRNAウイルスまたはウイルスベクターを用いた導入または感染等の任意の既知のプロセスにより、組換えプラスミドまたは他のポリヌクレオチドで細胞をトランスフェクトすることによって行うことができる。改変された細胞の子孫によって遺伝的に継承され得る遺伝的改変が導入されている場合、その細胞は「遺伝継承可能に改変された」という。好ましくは、遺伝子成分がその細胞中の染色体またはミニ染色体中に導入される。

【0020】「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は本明細書中において交換可能な形で使用され、任意の長さのアミノ酸からなるポリ

マーを指す。このポリマーは修飾されたアミノ酸を含んでも良く、線状または分岐状であってもよく、またその中に非アミノ酸が介在するものであってもよい。またこの用語は、天然または介入（例えばジスルフィド結合形成、グルコシル化、リピド化、アセチル化、リン酸化など）により修飾されたアミノ酸ポリマーも包含する。

【0021】「融合ポリペプチド」は、その配列中に天然で生じるのとは異なる位置に領域を含むポリペプチドである。この領域は、通常は別々のタンパク質の中に存在するものであって該融合ポリペプチド中において一緒にされたもの、または同じタンパク質内に通常存在するが該融合ポリペプチドにおいて新しい配置になっているものであってもよい。

【0022】本明細書中で使用される「抗体」という用語は、イムノグロブリン分子、または特定の抗原に特異的に結合する能力を有するイムノグロブリン分子のフラグメントを意味する。抗体は免疫学科学の当業者に周知である。本明細書中で使用される「抗体」という用語は、完全な抗体分子のみでなく、抗原結合能を保持する抗体分子のフラグメントも意味する。このようなフラグメントも当業者には周知であり、in vitroおよびin vivoの両方で通常使用される。特に、本明細書中で使用される「抗体」という用語は、任意のアイソタイプ（IgA、IgG、IgE、IgD、IgM）の完全なイムノグロブリン分子のみでなく、周知の活性（すなわち抗原結合性）を有するフラグメントF(ab')₂、Fab、Fv、scFv、Fd、V_HおよびV_Lも意味する。抗体断片については例えば“Immunoch emistry in Practice”（JohnstoneおよびThorpe編、1996；Blackwell Science）、p.69を参照されたい。「抗体」という用語はさらに、一本鎖抗体、CDRを移植した抗体、ダイアボディ（diabodies）、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびFab発現ライブラリーを含む。またこの用語は、本発明の抗体および他のポリペプチドまたはポリペプチドの一部（「融合相手」）を含む融合ポリペプチドも含む。融合相手の例には、生物学的応答調節剤、リンフォカイン、サイトカインおよび細胞表面抗原が含まれる。「抗体活性」とは、イムノグロブリンの可変領域の中に位置する抗原結合部位を介して、他の潜在的な抗原よりも特定の抗原に優先的に結合する抗体の能力を指す。

【0023】「単離された」ポリヌクレオチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体または他の物質とは、天然の形態でその物質と共に存在するまたはその物質が得られた原料の中に存在する他の成分の一部または全てが除去または低減された、物質の調製物である。従って例えば、単離されたポリペプチドは、そのポリペプチドを原料混合物から濃縮するための精製技術を用いて調製することができる。濃縮は、絶対的な基準（例えば溶液の一定体積あたりの重量等）に基づいて測定することもできるし、またその原料混合物中に存在する第2の潜在的干

渉物質 (potentially interfering substance) に対して相対的に測定することもできる。濃縮は2、10、100および1000倍と増えるほど好ましい。また物質は、(化学合成または組換え発現などによる)人工的なアセンブリーの方法により単離された状態で提供することもできる。

【0024】反応に使用されるポリヌクレオチド(例えばハイブリダイゼーション反応で使用されるプローブ、PCRで使用されるプライマー、または医薬品調剤中に存在するポリヌクレオチドなど)は、他の物質よりも意図する標的により高頻度で、より速く、またはより長い時間、ハイブリダイズまたは反応する場合は、「特異的」または「選択的」であるという。同様に、抗体は、少なくとも1つの抗原認識部位を介して他の物質よりも意図する標的に、より高頻度で、より速く、またはより長い時間結合する場合は、「特異的」または「選択的」であるという。

【0025】臨床的または生物学的「サンプル」は、被験体から得られるin vitro処置(診断テスト等)において有用な様々なサンプルタイプを包含することが理解されよう。この定義は、外科手術、生検、または検死で得られる固体組織サンプル、および液体サンプル(例えば血液、髄液、骨髄穿刺液、羊水穿刺により得た液およびこのような採集物から得た様々な画分(subfractions)、濃縮物または可溶化抽出物等)を包含する。「個体」または「被験体」とは、無脊椎動物、特に哺乳動物種のメンバー(家畜用動物、娯楽用動物および霊長類(特にヒト)等)を指す。

【0026】本明細書中で使用される「含む」という用語およびその同義語は、包括的な意味で使用される。つまり、「包含する」という用語およびそれに対応する同義語と同等の意である。

【0027】「hEDRF」は、本明細書における開示の中で記載されるように、ヒト赤血球分化関連因子である。hEDRFおよびこれをコードするcDNAを作製および使用するために記載される方法は、本発明の他のペプチドおよびポリヌクレオチドにも適宜適用することができることが理解されよう。

【0028】本明細書中において、特に複数であることを記載していないものについて、文脈的に明らかに単数を意味しているもの以外は、複数も含むことに留意されたい。

【0029】一般技術

本発明の試薬のアセンブリーおよび実施は、分子遺伝学、細胞生物学、生化学、免疫学および臨床医学の従来技術と本明細書中に開示された手法および方法とを組み合わせ用いる。適用される一般的な技法は、当業者が実施できる範囲内であり、標準的な参考文献(特に以下のもの)に説明されている。

【0030】分子遺伝学および細胞生物学の方法は、

“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 第2版(Sambrookら、1989); “Oligonucleotide Synthesis”(M.J.Gait編、1984); “Animal Cell Culture”(R.I. Freshney編、1987); “Methods in Enzymology”シリーズ(Academic Press, Inc.); “Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells”(J.M. Miller & M. P. Calos編、1987); “Current Protocols in Molecular Biology”および“Short Protocols in Molecular Biology、第3版”(F.M. Ausubelら編、1987 & 1995); および“Recombinant DNA Methodology II”(R. Wuら、Academic Press 1995)に記載されている。本明細書中に記載される試薬、クローニングベクター、および様々なタイプの遺伝子操作用のキットは、BioRad、Stratagene、InvitrogenおよびClonTech等から市販されている。

【0031】ペプチドの合成および操作の方法は、“Solid Phase Peptide Synthesis”(J.M. Stewart & J.D. Young、1984); “Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach”(E. Atherton & R.C. Sheppard、1989); “The Chemical Synthesis of Peptides”(J. Jones, International Series of Monographs on Chemistry vol. 23, 1991); および“Solid Phase Peptide Synthesis”, (G. Barany & R.B. Merrifield, Chapter 1 of “The peptides”, 1979); および“Bioconjugate Techniques”(G.T. Hermanson, 1996)に記載されている。

【0032】抗体の作製、精製および改変、ならびにイムノアッセイの設計および実施に用いられる一般的技術については、Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir & C.C. Blackwell編); Current Protocols in Immunology (J.E. Coliganら編、1991); David Wild編、The Immunoassay Handbook (Stockton Press NY, 1994); ならびにR. Masseyeff, W.H. AlbertおよびN.A. Staines編、Methods of Immunological Analysis (Weinheim: VCH Verlags GmbH, 1993)を参照されたい。

【0033】本発明のポリヌクレオチドおよびそれらの使用

本発明は、hEDRFのヒトmRNA配列(配列番号1)に関連するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、およびその相補体を提供する。ヒトの該配列はマウスの相同物の配列(配列番号3に示され、GenBank受託番号AF060220として入手可能)とは異なる。また、hEDRFおよびアミノ酸暗号の縮重の範囲内の本発明の他のポリペプチド(ポリヌクレオチドの相補体を含む)をコードするポリヌクレオチドも提供される。

【0034】本発明の特定のポリヌクレオチドは、配列番号1に含まれる配列と全く同一であるか、または部分的に同一である少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む。部分的に同一な領域は、一般には少なくとも10ヌクレオチドであり、少なくとも25、50、100もしくは400ヌ

クレオチド長（順により好ましくなる）でありうる。配列間で比較される領域の同一性の程度は、典型的には少なくとも50%であり、また約70%、80%、90%、95%もしくは100%の順でより好ましい。好ましくは、2つのポリヌクレオチド配列間の同一性は、BLAST (Altschulら、1990、J. Mol. Biol. 215(3): 403-410)、特にBLASTN2を利用して算出される。BLASTおよびBLASTN2は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) により提供され、デフォルトパラメータ（例えば、マトリックス 0 BLOSUM62、一致に対して+1、不一致に対して-2、開始および延長ギャップペナルティはそれぞれ5および2、ギャップx_ドロップオフ50、ならびに文字列の長さ10）を利用するものである。同一性の程度についてポリヌクレオチド間で比較を行う場合には、相補鎖が容易に作製されることが暗に理解され、そして比較されるポリヌクレオチド間の同一性の程度を最大化するセンス鎖またはアンチセンス鎖を選択または推測する。

【0035】本発明のポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド（特に以下に記載する約50ヌクレオチド長のもの）は、本開示に提供される配列データを使用して化学合成により適切に調製することができる。約50ヌクレオチド長よりも長い2本鎖ポリヌクレオチドは、化学合成法、すなわち所望の配列のセグメントに対応するオリゴヌクレオチドを合成し、次に該オリゴヌクレオチドをアニーリングしてさらに長い分子を形成させることによって調製することもできる。この方法は、所望のポリヌクレオチドが天然に存在するhEDRF配列と数個以上のヌクレオチドが異なる場合（例えば、ポリヌクレオチドが細菌などの非ヒト細胞において好ましいコドンの使用を利用するように設計される場合）に好ましい。トリエステル法およびホスファイト法を含むいくつかの合成法が当技術分野で公知である。一般的にポリヌクレオチドの化学合成には、合成ポリヌクレオチドの伸長している末端を脱保護し、続いて付加する保護化残基を化学的に結合させるといった反復サイクルが含まれる。好ましい方法においては、ポリヌクレオチドをモノヌクレオシドホスホルアミダイト結合単位を用いた固相合成法により調製する。例えば、Beaucageら (Tetra. Lett. 22: 1859, 1981)、Kumarら (J. Org. Chem. 49: 4905)、および米国特許第4,415,732号を参照のこと。

【0036】ポリヌクレオチドは分子生物学の手法により取得することも可能である。最も好適なのは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術を使用して本発明のポリヌクレオチドを取得する。本開示中に示される配列データを使用して、目的の配列にまたがるポリヌクレオチドプライマーを設計する。mRNAもしくはcDNA鋳型は、hEDRFをコードするmRNAを、好ましくは有意なレベルで発現することが知られているまたは予測される供与源から選択する。適切な組織の供給源には、ヒト骨髄、ヒト胎児肝臓、および循環系前駆細胞などのあらゆる赤血球産生を

行う部位もしくは供与源が含まれる。PCR技術は当技術分野で公知であり、一般的に鋳型がmRNAの場合には、1以上のプライマーセットと、逆転写酵素もしくはDNAポリメラーゼなどの重合用触媒（特に、熱に安定なポリメラーゼ酵素）を使用して、cDNAを合成し、次に鋳型cDNAから目的の配列の複製コピーを作製することが含まれる。当技術分野に公知のように、PCR法を利用して本発明に包含される変異ポリヌクレオチドを生成することもできる。PCRについての方法は、例えば米国特許第4,683,195号および第4,683,202号に教示されている。

【0037】本発明のポリヌクレオチドは、従来のクローニング法により単離してもよい。このアプローチによって、本発明のポリヌクレオチドをcDNAもしくはゲノムライブラリーから単離し得る。当技術分野で公知のように、本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズするように設計された標識ポリヌクレオチドプローブを用いてcDNA (hEDRFを、好ましくは有意なレベルで産生すると知られているもしくは予想される組織由来のもの) またはゲノムライブラリーを分析する。プローブにハイブリダイズするDNAインサートを含むクローンを、選択、精製、および切断して、本発明のポリヌクレオチドを遊離させる。

【0038】機能タンパク質のコード領域を有する本発明のポリヌクレオチドは、かかるタンパク質を組換え発現法により産生させるために使用し得る。これについては以下の節に記載する。かかるポリヌクレオチドはまた、それによりコードされるタンパク質が治療薬である場合には治療用途の可能性も有する。したがって本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含む発現構築物、ならびにかかる発現構築物を含む宿主細胞もまた包含する。

【0039】本発明の特定のポリヌクレオチドは、分化経路における細胞に關与するhEDRFをコードするmRNAにハイブリダイズする能力を有するため重要である。これによって、目的の被験体からmRNAを含むサンプルを取得し、場合により該mRNA (もしくはmRNAから得られたcDNA) を増幅し、そして次にhEDRFをコードする配列が存在するかどうかを判定することにより、hEDRFの発現を判定することが可能になる。この目的に好ましいポリヌクレオチドは、該サンプルに存在するhEDRFをコードするDNAもしくはRNAと、該サンプルに存在する他のDNAもしくはRNAより優先して、安定なハイブリッドを形成する。

【0040】hEDRFをコードする配列を検出するための1つの方法は、hEDRFをコードするmRNAもしくはかかるmRNAから得られたcDNAと特異的にハイブリダイズするプローブを使用することである。当業者であれば、標的配列をより適切に区別する場合に、より長い一致配列を有するポリヌクレオチドが好ましいことを理解するだろう。該配列が長くなるほど、鎖1つ当たり多くの標識部分を組み込むことができ、またそれを特異的に同定するために標的に対して厳密に同一である必要も無い。しかしな

がら、一般的に該配列が短くなるほど、より多くの組織に影響するようになり、またハイブリダイゼーション速度論的にもさらに迅速になる。通常プローブは、標識、またはハイブリダイゼーション反応の前もしくはその後、標識が結合し得る手段を含む。標識を結合するための手段には、アビジンもしくはストレプトアビジンと結合するビオチン部分、抗ハプテン抗体と結合するハプテン、および特に、相補配列を有する試薬ポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチド配列（場合により分枝状もしくはフォーク状）が含まれ、いずれも最大限に標識の結合を導くものである。適切な標識には、放射性同位体、蛍光色素、化学発光性化合物、染料、およびタンパク質（酵素など）が含まれる。プローブを使用して単離されたmRNAもしくはDNAのプロット中の特定の配列を検出し得る。またプローブを使用してin situにおいて特定の配列を局在化することもできる。

【0041】サンプル中のhEDRFをコードする配列を検出するための他の方法は、該コード配列に特異的なプライマーを使用して、PCR反応において該配列を増幅することである。PCRプライマーとしての使用に好ましいオリゴヌクレオチドは、好ましくは10~100ヌクレオチド長であり、より典型的には15~50ヌクレオチド長である。ネステッドプライマーは特異性のさらなるレベルを提供し得る。サンプル間の比較の際には、増幅されたDNA量を元のサンプルの鋳型hEDRF配列の量と関連させる。

【0042】本発明のポリペプチド

本発明は、配列番号2に対して同一、部分的に同一、または相同的なアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。ヒトの配列は、配列番号4に示されるマウスの相同物の配列とは異なる。2つの配列の比較を図3に示す。

【0043】hEDRFの翻訳後プロセッシングには、シグナルペプチダーゼもしくは他のタンパク質分解性プロセッシング酵素による分泌シグナルの切断が含まれ得る。いくつかの潜在的なシグナルペプチダーゼ切断部位は、該タンパク質配列に存在し、発達段階およびhEDRFタンパク質を産生する細胞の種類に従って選択的に使用され得る。したがって本発明は、配列番号2の残基1~102、6~102、12~102、13~102、14~102、および15~102を含むポリペプチド、ならびに所望の活性を有するその他の断片を包含する。種々の組織および発達段階由来の成熟hEDRFのN末端の同定は、当業者により慣例的に決定され得る。一般的に成熟hEDRFは、残基33より上流からの合成断片に対して生じさせた抗体を用いたアフィニティー単離法により、可溶化、溶解、または破壊されたヒト組織源から単離される。続いてシグナルペプチダーゼ切断部位は、N末端アミノ酸配列決定および/または質量分析法により決定され得る。

【0044】本発明の特定のポリペプチドには、配列番号2に含まれる配列に対して同一または相同的な少なくとも1つのアミノ酸配列が含まれる。この同一または相

同な領域は、一般的に少なくとも約5、8、10、15、25、もしくは100アミノ酸長（順に好ましさが増す）である。配列間で比較される領域の同一性の程度は、典型的には少なくとも65%、80%、90%、95%もしくは100%であり、この順に好ましさが増す。あるいは、配列間の比較される領域の相同性の程度は、典型的には少なくとも85%、90%、95%もしくは100%であり、この順に好ましさが増す。特に好ましくは、hEDRFの成熟もしくは分泌形態に含まれる配列に対して厳密に同一もしくは相同な領域を有するポリペプチドである。同一性および相同性の判定は、好ましくはBLAST (Altschulら、1990、J. Mol. Biol. 215(3): 403-410)、特にBLASTP2を利用して行う。BLASTおよびBLASTP2は、National Center for Biotechnology Information (NCBI)により提供され、デフォルトパラメータ（例えば、マトリックス 0 BLOSUM62、ギャップ開始および延長ペナルティはそれぞれ11および1、ギャップx_ドロップオフ50、ならびに文字列の長さ3）を利用するものである。BLASTP2は、インターネットを介してアクセス可能である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。「連続した」アミノ酸を意味する場合を除いて、場合により配列はアライメントの改善のため合理的な数のギャップまたは挿入を含み得る。

【0045】本発明には、天然に存在するhEDRFのアミノ酸とは1つ以上のアミノ酸が異なるタンパク質が含まれる。いくつかのアミノ酸置換はさらに容易に許容される。例えば、疎水性側鎖、芳香族側鎖、極性側鎖、正もしくは負電荷を有する側鎖、または炭素原子を2つ以下含む側鎖を有するアミノ酸の、類似した特性の側鎖を有する他のアミノ酸による置換は、2つの配列の相同性を妨害することなく生じ得るものである。相同性領域の決定方法、および相同性の程度のスコアリング方法は公知である。例えば、Altschulら（前掲）を参照のこと。十分に許容可能な配列の相違は、「保存的置換」と呼ばれ、非保存的置換よりも好ましいものである。好ましい配列は、受容体-リガンド結合のアフィニティーおよび特異性、特異的抗体との反応性、ならびにX線結晶構造などの判断基準による、基準ポリペプチドの機能性を保存している。

【0046】本発明のポリペプチドは、当技術分野で公知の任意の方法により調製することができ、該方法には、限定するものではないが、天然源からの精製、化学合成、無細胞翻訳系もしくは宿主細胞における該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現が含まれる。約30以下のアミノ酸長である短いポリペプチドは、配列データから化学合成により都合よく調製される。好ましい方法は、C末端アミノ酸を固相に結合し、ペプチドをN末端に向かって伸長させる、固相合成法である。該方法には、固相上の伸長しているタンパク質を脱保護し、そして次のアミノ酸を結合するステップの反復が含まれる。付加するアミノ酸を、F-Moc、Boc、Dde、トリ

チルなどの基によりカルボキシ以外を保護し、固相ペプチド以外との反応を防止する。付加の後、アミノ基を適切な試薬を用いて脱保護し、このサイクルを反復して行う。ペプチドが完成した後で、アミノ酸側鎖を脱保護し、ペプチドを樹脂から切断する。一般的には、H. Dugas, C. Penney, Bioorganic Chemistry, Springer-Verlag, New York, pp54-92 (1981)を参照のこと。

【0047】ポリペプチドは長いほど、適切な組換え発現系を用いてより都合よく調製される。該組換え発現系では、本発明のポリペプチドをコードするコード鎖DNA 10 配列を適切なプロモーターと機能し得る形で連結し、それを発現ベクター中に挿入し、そして適切な宿主細胞にトランスフェクトする。次にその宿主細胞を、該タンパク質の転写および翻訳を可能にする条件下で培養し、続いて該タンパク質を回収および精製する。Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)、またはCurrent Protocols in Molecular Biology (1989)および補遺を参照のこと。

【0048】本発明のタンパク質は、直接発現により、またはさらに大きな融合タンパク質の一部として、その後後に所望の部分の酵素的もしくは化学的切断を行うことにより作製し得る。本発明のタンパク質は、完全長形態（すなわち配列番号2の1~102）、プロセッシングを受けた形態（配列番号2の6~102、12~102、13~102、14~102、および15~102）またはそれらの断片でありうる。特定の部位でポリペプチドを切断する（トリプシンなど）か、またはペプチド鎖のアミノ末端もしくはカルボキシ末端からペプチドを消化する（ジアミノペプチダーゼなど）、種々のペプチダーゼが公知である。さらに、特定の化学物質（臭化シアンなど）はポリペプチド鎖を特定の部位で切断する。Carter P., Site Specific Proteolysis of Fusion Proteins, 「Protein Purification: From Molecular Mechanismsto Large Scale Processes」中第13章, American Chemical Soc., Washington, D.C. (1990)を参照のこと。

【0049】一般的には、本発明のタンパク質（または他の配列に融合した本発明のタンパク質）をコードするポリヌクレオチドを、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して適切な組換えDNA発現ベクター中に挿入する。制限エンドヌクレアーゼ部位は、天然に存在する部位であってもよいし、または当業者に公知の任意の方法（部位特異的突然変異誘発、PCRまたはポリヌクレオチドへのリンカー/アダプターのライゲーション）により導入された合成部位であってもよい。あるいはポリヌクレオチドは、都合のよい制限酵素部位を組み込むおよび/または意図する宿主細胞についてコドン使用法を最適化するよう設計された合成配列であってもよい。使用する特定のエンドヌクレアーゼは、使用しようとする親発現ベ 50

クターの制限エンドヌクレアーゼ切断パターンにより決定される。制限部位の選択は、制御配列とコード配列が適正な配向をとり、適切なインフレーム読み取りおよびタンパク質の発現が達成されるように行われる。

【0050】前記ポリヌクレオチドを任意の適切な発現ベクター中に挿入し得る。発現ベクターは、いくつかの形態で作成され、限定するものではないが、プラスミド、コスミド、酵母人工染色体（YAC）、およびウイルスベクターが含まれる。一般的に発現ベクターは、ベクターを増殖させる生物において少なくとも活性であり、また組換え宿主細胞においても活性であることが多い自律的複製部位を含む。また発現ベクターは典型的に、形質転換細胞において表現型選択を提供し得るマーカー配列、例えば、陽性選択マーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子（bla, tet^r, もしくはhyg^rなど）または栄養要求性を相補する遺伝子（trpもしくはDHFRなど））および/あるいは陰性選択マーカー（例えば、単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ）を含む。発現ベクターはまた、転写開始および転写終止に必要な配列（例えば、プロモーター、シャイン・ダルガーノ配列、リボソーム結合部位、転写終止部位）を含み、また場合により転写をモジュレートする配列（例えば、SV40エンハンサーもしくはlacリプレッサー）を含んでもよく、また必要であればプロセッシングを指令する配列、例えばイントロンもしくはポリアデニル化部位を含んでもよい。

【0051】本発明のポリヌクレオチドを、正しい配向と発現ベクターの転写制御配列との関係で発現ベクター中に挿入し、プロモーターおよびリボソーム結合部位からの転写を可能にする。そのどちらも、タンパク質が発現される宿主細胞において機能性である必要がある。転写制御配列は、好ましくは誘導性である（すなわち、培養条件を変更することによりモジュレートされる。例えば大腸菌のlacオペロンまたは哺乳動物細胞のメタロチオネインプロモーターなど）。そのような発現ベクターの例としては、Belagajeらのも米国特許第5,304,493号に記載のプラスミドがある。該参考文献に記載のA-C-Bプロインスリンをコードする遺伝子は、制限酵素NdeIおよびBamHIによりプラスミドpRB182から除去され得る。本発明のタンパク質をコードする遺伝子は、NdeI/BamHI制限断片カセットにおいてプラスミド骨格に挿入し得る。

【0052】微生物宿主は通常、本発明のタンパク質の組換え発現に好ましく、一般的に使用される任意の微生物宿主を使用し得るが、それには、W3110（原栄養性、ATCC番号27325）などの大腸菌、枯草菌、および、サルモネラ・チフィムリウム（*Salmonella typhimurium*）またはセラチア・マルセスカン（*Serratia marcescans*）などの他の腸内細菌科、ならびに種々のシュードモナス種が含まれる。他には、真核生物宿主細胞を使用し得るが、それにはサッカロミセス・セレピシエ（*Saccharomy*

ces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンブ(Schizosaccharomyces pombe)などの酵母、ならびにさらに高等な真核生物、例えば真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞(Sf9など)、および哺乳動物細胞(COS、CHOなど)が含まれる。

【0053】完全な発現構築物を、CaCl₂トランスフェクション法、Ca₂PO₄トランスフェクション法、ウイルス形質導入法、脂質媒介型トランスフェクション法、エレクトロポレーション法、弾道(ballistic)トランスフェクション法などの当技術分野で公知の任意の適切な方法により組換え宿主細胞中に導入する。発現構築物の導入後、一般的には組換え宿主細胞を、発現構築物の存在についての選択に適切な条件下で培養(例えば、bla含有発現構築物を有する細菌宿主についてはアンピシリンの存在下で培養)するか、あるいは任意の適切な手段(例えば、hEDRF特異的抗体を用いた蛍光活性化セルソーター(FACS))によりタンパク質の発現について選択してもよい。

【0054】選択および適切な単離手法(例えば、再画線培養または限界希釈クローニング)の後、組換え宿主細胞を当技術分野に公知の任意の適切な技術を使用して製造規模で培養する。発現ベクター中のプロモーター/エンハンサーが誘導性である場合には、培養が適当な細胞密度に達した後にタンパク質の発現が誘導されるが、そうでない場合には細胞は回収に適した密度に達するまで増殖させる。本発明の組換えタンパク質の回収は、当業者には明らかなように、組換え宿主細胞、発現構築物、および本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの正確な性質に応じて行う。分泌型タンパク質をもたらす発現構築物に関しては、通常は培養器から培地を除去することにより該タンパク質を回収するが、タンパク質の細胞内蓄積を引き起こす発現構築物では、一般的には細胞を回収し溶解させ、発現されたタンパク質を遊離することが必要である。

【0055】細菌発現系において高レベルで発現されるタンパク質は、高レベルで過剰発現されたタンパク質を含有する顆粒もしくは封入体に凝集する特徴を有する。該タンパク質凝集物を、例えば強力な変性溶液(グアニジニウム-HClなど)を、可能であれば還元剤(ジチオトレイトール(DTT)など)と共に使用して可溶化して、所望のタンパク質産物の精製および単離をさらに提供する。可溶化したタンパク質を「再折りたたみ」反応後に活性形態で回収する。この反応には一般的に変性剤濃度の低下および酸化剤の添加が含まれる。一般的にタンパク質の再折りたたみに適用可能と考えられるプロトコルは当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第4,511,502号、第4,511,503号、および第4,512,922号に開示されている。

【0056】本発明のタンパク質は、以下に記載する抗体の製造に利用し得る。

【0057】本発明のタンパク質は、目的の医薬化合物を同定するスクリーニングアッセイにおいても有用である。本発明のタンパク質を、好ましくは「一次」スクリーニングとして使用して、hEDRFに結合する化合物についてのスクリーニングにより、さらなる特性決定のための化合物を同定する。

【0058】抗体

本発明は、hEDRFおよび本明細書に開示される他のポリペプチドに特異的な抗体を提供する。

【0059】本発明のポリクローナル抗体は、典型的にはhEDRFまたは本発明のポリペプチドの1種を免疫原形態で哺乳動物宿主に投与することにより生成させる。本発明のポリペプチドは、油中水型浸液などのアジュバントと共に、特に、最初の投与に関してはフロイント完全アジュバントと共に、そして追加免疫に関してはフロイント不完全アジュバントと共に投与することが好ましい。典型的には調製物を種々の部位に投与し、また典型的には少なくとも4週間のクールにわたって2回以上の投与を行う。血清を採取し、特異的抗体の存在について試験する。

【0060】本発明のモノクローナル抗体はいくつかの異なる技術により調製し得る。ハイブリドーマ技術については、一般的にHarrowおよびLane(1988)、米国特許第4,491,632号、第4,472,500号、および第4,444,887号、ならびにMethods in Enzymology, 73B: 3(1981)が参照されている。伝統的なモノクローナル抗体技術には、前段落に記載のように免疫された動物から回収した抗体産生細胞の不死化およびクローニングが含まれる。該細胞は、例えば、非産生性ミエロマとの融合、エプスタインバーウイルスによる感染、または発癌性DNAによる形質転換により不死化し得る。処理した細胞をクローン化し、培養して、所望の特異性を有する抗体を産生するクローンを選択する。特異性の試験は、いくつかの技法により、例えばイムノアッセイにおいて免疫化抗原を検出試薬として用いて、培養上清に対して行う。続いて選択クローンからのモノクローナル抗体の供給を、大量の培養上清から精製してもよいし、または該クローンを注射した宿主動物の適切に調製された腹水液から精製してもよい。

【0061】モノクローナル抗体を得るための他の方法には、イムノコンピテント細胞もしくはウイルス粒子と本発明のタンパク質とを接触させることが含まれる。これに関連して「イムノコンピテント」とは、細胞もしくは粒子が、さらなる遺伝子再構成を行うことなく抗原に特異的な抗体を発現しているかまたは発現することができ、かつ抗原の提示によって細胞混合物から選択され得ることを意味する。イムノコンピテント真核細胞は、免疫化哺乳動物ドナーから採取してもよいし、または免疫していないドナーから採取し、免疫原および免疫刺激増殖因子の存在下で培養することによりin vitroで予備刺

激してもよい。所望の特異性を有する細胞は、特異的クローンの増殖は起こるが非特異的クローンの増殖は起こらない培養条件下において免疫原と接触させて選択し得る。イムノコンピテントファージは、それらの表面上に免疫グロブリン可変領域セグメントを発現するように構築してもよい。Marksら、New Engl. J. Med. 335: 730, 1996; 国際特許出願番号94/13804号、92/01047号、90/02809号; ならびにMcGuinnessら、Nature Biotechnol. 14: 1149, 1996を参照のこと。所望の特異性を有するファージは、例えば、固相に結合させたhEDRF (もしくは

【0062】抗体は、硫酸アンモニウム沈降法、弱い陰イオン交換樹脂 (DEAEなど) 上でのイオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、およびゲル濾過クロマトグラフィーなどの慣用の生化学分離手法を組み合わせて行って、血清、細胞上清、溶解物、もしくは腹水液から精製し得る。

【0063】得られた抗体は、hEDRFと反応する能力のみではなく、診断目的のサンプル中に存在する潜在的な交差反応性物質との低い交差反応性についてもスクリーニングまたは精製するのが好ましい。必要であれば、該交差反応性物質を用いて、または目的のタンパク質について枯渇させた細胞集団からの抗原抽出物を用いて、不必要な活性をポリクローナル抗血清から吸着して除去してもよい。

【0064】特定の抗体が結合するエピトープは、フラグメントを取得し、抗体が結合する能力を試験することによりマッピングし得る。例えば、完全な配列を含み、そして8残基が重複している、12アミノ酸の連続したペプチドを調製する。該ペプチドは、GenosysのSPOTS(商標)キットを製造業者の指示に従って使用して、F-Moc化学作用によりナイロン膜支持体上で調製し得る。次に調製された膜を抗体で被覆し、洗浄し、そして - ガラクトース結合抗ヒトIgGで被覆する。試験は基質であるX-galを添加して開始する。陽性染色は、抗体により認識された抗原フラグメントを示す。続いて該フラグメントを使用して、目的のエピトープを認識する他の抗体を得ることができる。同じエピトープを認識する2種の抗体は、標準イムノアッセイにおいて結合に関して競合する。

【0065】本発明の抗体の特定の好ましい実施形態には、抗体e9またはe11のV_Hおよび/またはV_Lを含有する抗体が含まれる。さらに好ましい抗体には、抗体e9またはe11由来の1つ以上の相補性決定領域 (CDR) を含有する抗体が含まれる。抗体e9およびe11は、実施例2に記載のようにヒトscFvライブラリーから単離された。e9およびe11の配列を図4および図5に示し、それぞれの図においてCDRは四角で囲ってある。

【0066】抗体は、例えば、当技術分野で公知の任意

のイムノアッセイにおいて抗体を使用することにより、ヒト被験者由来のサンプル中における本発明のタンパク質の存在を判定するために使用し得る。典型的には、かかる方法には、被験者からサンプルを取得し、抗体 - 抗原複合体の形成が可能な条件下において該サンプル中のタンパク質と抗体とを接触させ、そして形成された複合体を判定することが含まれる。これは、液相イムノアッセイまたは免疫組織化学的染色法において抗体を使用することにより行い得る。イムノアッセイは、複合体化した抗体を過剰な試薬から分離する分離型のアッセイである。一例としてはサンドウィッチアッセイまたは沈降アッセイがあり、それは抗原を1種の抗体を用いて捕捉または沈降させ、そして放射性標識 (¹²⁵Iなど) または酵素標識 (アルカリ性ホスファターゼなど) を有する第2抗体を使用して検出するものである。あるいは、試薬混合物中で形成された抗原 - 抗体複合体を、物理化学的特性により、例えばゲル濾過法により分離してもよい。イムノアッセイはまた、第1抗体に対する抗原の結合によって測定可能なシグナル (色の変化など) が提供される、均一系タイプであってもよい。特に強力な均一系のアッセイ系は、米国特許第4,708,929号に記載のクローン化酵素ドナーイムノアッセイ (CEDIA(登録商標)) である。免疫組織化学法には、組織サンプルの切片を特異的な抗体で被覆し、洗浄し、そして次に組織中の抗原に結合したあらゆる抗体を検出することが含まれる。これは、例えば、適切な標識を有する抗免疫グロブリン試薬で被覆することにより行われる。続いて組織中の抗原の位置は、顕微鏡レベルで標識検出法により決定し得る。

【0067】ヒト被験者におけるhEDRFの検出もしくは定量は、赤血球細胞の同定もしくは定量を所望する場合であればいつでも実施し得る。

【0068】免疫組織化学的レベルにおけるhEDRFの定量は、新規赤血球細胞の産生に寄与する組織部位の可能性を評価する点に価値があり得る。

【0069】本発明の抗体はまた、固相もしくは液相イムノアフィニティー法により、ヒト組織もしくは組換え源からhEDRFおよび他のペプチドを精製するために使用し得る。典型的な方法においては、抗体をCNBr活性化セファロース (登録商標) などの固相に結合させる。ペプチド源を固相抗体と接触させ、そして固相を洗浄して混入物質を除去する。次にペプチドを、1M KSCNまたは0.1M グリシンバッファー、pH2.5などの適切な溶出溶剤を使用して回収する。

【0070】

【実施例】実施例1: hEDRFの発現パターン

hEDRFの発現パターンを種々のハイブリダイゼーション技法により研究した。完全なクローン (345-7aと称する) をハイブリダイゼーション試験に使用した。

【0071】ノーザンブロットングを使用して、hEDRF発現の組織分布を決定した。RNAをいくつかの供与源

(いくつかの事例では、供与源のプール)から単離し、アガロースゲル上で分離し、ニトロセルロースにトランスファーした。プロットは、ランダムプライミング法で作製した³²P標識345-7aにより、標準ハイブリダイゼーション法および洗浄条件を用いて検出した。

【0072】図6は、代表的なノーザンプロットを示す。レーンは、左から右へ順に、RNA分子量マーカー、ブランク、成体肝臓RNA (AL2/3)のプール、16週齢の胎児肝臓RNAのプール、成体骨髄RNA (BM7)のプール、溶解サンプルから調製した成体末梢血RNA (PBA3)のプール、非溶解サンプルから調製した成体末梢血RNA (PBA1)のプール、10~12週齢の胎児肝臓由来の胎児血RNAのプール、および満期産の胎盤由来のRNAプールをローディングしたものである。胎児肝臓および肝臓由来の胎児血のレーンにおける強力なシグナル、ならびに成体骨髄からのシグナルに留意されたい。このことは、発現パターンが赤血球細胞と関連したことを示している。

【0073】実施例2: hEDRFに対する抗体

精製された345-7aペプチド: (NH₂-Asn-Tyr-Tyr-Arg-Gln-Gln-Val-Thr-Gly-Glu-Pro-Gln-Glu-Arg-Asp-Lys-Ala-Leu-Gln-Glu-Leu-Arg-Gln-Glu-Leu-Asn-Thr-Leu-Ala-Asn-Pro-Phe-Leu-Ala-Lys-Tyr-Arg-Asp-Phe-Leu-Lys-Ser-His-Glu-Leu-Pro-Ser-His-COOH、配列番号9)を使用して、天然ヒトscFvライブラリーからhEDRFに特異的な抗体を選択した。該ライブラリーは、Griffithsら(1993, EMBO J. 12(2): 725-734)に記載のGriffin.1であった。

【0074】345-7aペプチドを、EZ-Link NHS-エステルビオチン化キット(Pierce, #21420)を製造業者の指示に従って使用して、ペプチド1つ当りビオチン分子3個のレベルでビオチン化した。このビオチン化ペプチドを、抗体選択用試薬として使用するためにストレプトアビジン被覆磁性粒子(M-280, Dynal)に結合させた。1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含有する1mlのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中にて、200μlの磁性粒子を100μgのビオチン化345-7aペプチドと共に室温にて1時間インキュベートした。0.05% Tween 20を含有するPBSを用いてペプチド/ストレプトアビジン被覆磁性粒子を3回洗浄することにより未結合ペプチドを除去した。抗体選択用試薬を100μlのPBSに再懸濁した。

【0075】500μlの抗体ライブラリー(5×10¹² pfu)を、200μlの未結合ストレプトアビジン磁性粒子と共にインキュベートして、該粒子と結合するウイルス粒子を吸着して取り出した。粒子を取り出し、そして抗体選択用試薬と共に吸着したファージを振とうしながら2時間インキュベートすることにより選択の第1ラウンドを行った。(ファージが結合した)抗体選択用試薬は、磁性アフィニティーにより溶液から分離し、20回洗浄した(0.05% Tween 20を含有するPBS中)。付着したファージは、100μlの100mMトリエチルアミン中で5分間インキ

ュベートすることにより抗体選択用試薬から溶出し、磁性粒子から分離し、そして20μlの1M Tris, pH7.4を添加して中性化した。ファージ溶液を使用して大腸菌TG1細胞に感染させ、それをアンピシリン含有培地上で平板培養した。コロニー数を計数し、次に選択したファージのプールは、プレートからかき取り、得られた培養物をアンピシリンおよびグルコース含有2×YT培地中で1時間インキュベートし、続いてヘルパーファージM13K07の存在下でさらに1時間インキュベートし、次にその培養物をアンピシリンおよびカナマイシンを含有(50μg/ml)する10容量の2×YTで希釈し、そして30にて16~18時間インキュベートすることにより増幅させた。培養上清中のファージは、氷上で30分間にわたり1/5容量の20%ポリエチレングリコール(PEG)、2.5M NaClの添加によって沈殿した。沈殿したファージを遠心分離(10,000×gにて20分間)を行って回収し、続いてPBS中に再懸濁してファージ濃縮原液を作成した。

【0076】選択の第2ラウンドは、ストレプトアビジンと結合するファージの選択を最小限に抑えるアビジン磁性粒子を使用して、増幅されたファージに対して行った。増幅後、ファージを再びストレプトアビジン磁性粒子を使用する選択の第3ラウンドにかけた。

【0077】選択の第3ラウンドからの個々のコロニーは、ストレプトアビジン被覆プレートに結合させたビオチン化345-7aペプチドを用いたELISAアッセイで試験した。ストレプトアビジン被覆96ウエルプレートはPierceから入手し、そして1μg/mlビオチン化374-7aペプチドと共にインキュベートした。個々のファージクローンを、アンピシリンおよびグルコース含有2×YT中で単一コロニーを2時間インキュベートし、ヘルパーファージを添加し、続いて感染した細胞をアンピシリンおよびカナマイシン含有2×YT中で30にて一晚増殖させることにより、96ウエルプレート中で増殖させた。各ウエル中で150μlのファージ上清を2時間インキュベートした(345-7aペプチドで被覆されていないプレートは対照として扱った)。ファージ上清とのインキュベート後、ウエルをPBSで洗浄し、そして西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合抗M13抗体(Sigma)と共に1時間インキュベートし、続いて色素産生基質である2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS, Sigma)による顕色を行って検出した。

【0078】陽性クローンはまず、PCR/制限フィンガープリント分析法により分析した。ベクター骨格配列に対し特異的なPCRプライマーを使用して、ELISAにおいて試験し、陽性であったファージそれぞれからDNAを増幅し、そして増幅されたDNAを制限酵素BstN1により消化した。2つの異なるクローンをこの手法により同定し、e9およびe11と命名した。2つの別個のクローンそれぞれからの代表的なファージにより、この2つのクローンの異なる部分のscFv遺伝子の可変領域の完全なDNAの配列決

定を行った。

【0079】e9およびe11を、溶液中の345-7aの結合について試験した。e9およびe11 scFvを、ベクターにより提供されるscFv上のHis₆タグを介してニッケル充填NTAアガロースビーズに吸着させた。該ビーズを洗浄し、次に10μg/ml 345-7aペプチドを含有する溶液中でインキュベートし、次いで再度洗浄した。結合した345-7aペプチドをローダミン標識ストレプトアビジンを用いて検出した。e9およびe11吸着ビーズの両方が345-7aペプチドと結合した。

【0080】e11を、そのVH遺伝子、次いでVL遺伝子を連続的にFab発現ベクターVDOX-1にクローニングすることにより、scFvから組換えFabに変換した。Fab e11は、上述の溶液結合アッセイにより測定されたように345-7a結合活性を保持していた。

【0081】Fab e11を細胞および組織に対する結合について試験した。18週齢のヒト胎児肝臓由来の胎児肝臓細胞を固定させずに、またはCaltag LaboratoriesのFix & Permキット(#GAS003)を製造業者の指示に従って用いて固定/浸透化させて、e11Fab (10μg/ml) と共に、または抗トランスフェリン (-Tfr) Fabと共にインキュベートした。結合をローダミン標識第2抗体により検出した。e11は固定/浸透化細胞のみを標識し、このことはe11が細胞質タンパク質に対し特異的であることを示している。-Tfr Fabは、細胞表面タンパク質を示す斑点状染色パターンを有し、固定していない細胞および固定/浸透化細胞の両方を標識した。

【0082】本明細書に記載した全ての刊行物および特許出願を、その個々の刊行物もしくは特許出願それぞれが明示的かつ個々に参照により組み入れられるのと同様に、参照により本明細書に組み入れる。

【0083】本発明を本明細書において完全に記載したが、本明細書に示された記載が例示を意図するものであり、本発明を限定するものではないことが理解されるだろう。当業者であれば、添付した特許請求の範囲の精神*

*から逸脱することなく改変を組み入れ得ることを容易に理解するだろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒト組織から得たクローニングしたcDNAのマップであり、hEDRFのコード領域と共に示した図である。

【図2】hEDRFのタンパク質配列(配列番号2)を、コンピュータアルゴリズムにより予測される潜在的な対象となる幾つかの特徴と共に表す。上のパネルは潜在的なシグナルペプチダーゼ切断部位を示し、下のパネルは潜在的な機能的モチーフを示す。

【図3】マウス相同体(配列番号4)と比較したhEDRFのタンパク質配列(配列番号2)の比較である。これらの相同体間で同一の残基は、ピリオド(.)で表す。これらの配列は約63%同一である。

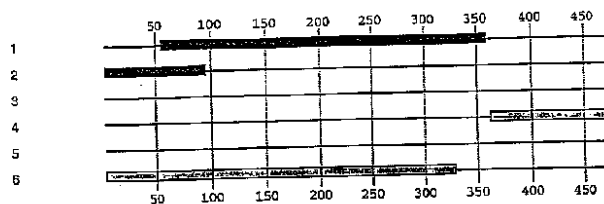
【図4】抗-hEDRF抗体e9のヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列(配列番号5~6)を示す。ヌクレオチド配列には位置番号を付与してある。

【図5】抗-hEDRF抗体e11のヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列(配列番号7~8)を示す。ヌクレオチド配列には位置番号を付与してある。

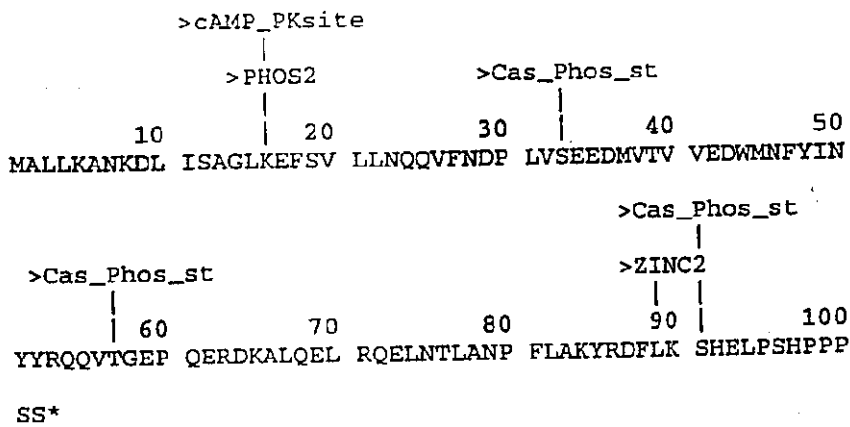
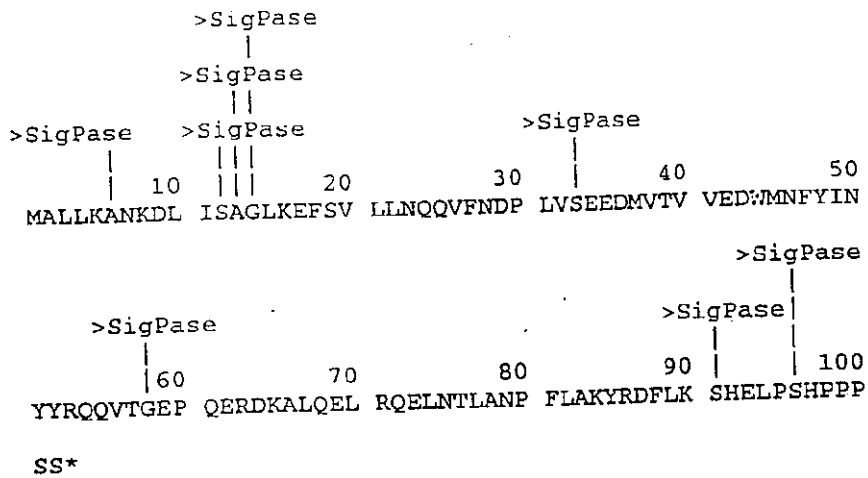
【図6】選択した組織の、hEDRF発現についてプローブしたノーザンプロットの模写を示す。左から右に向かって、RNA分子量マーカー、ブランク、成人肝臓RNAのプール(AL2/3)、16週齢胎児肝臓RNAのプール、成人骨髄RNAのプール(BM7)、細胞溶解サンプルから調製した成人末梢血RNAのプール(PBA3)、非細胞溶解サンプルから調製した成人末梢血RNAのプール(PBA1)、10~12週齢胎児肝臓に由来する胎児血液RNAのプール、および満期胎盤(term placenta)に由来するRNAのプールを、レーンにローディングした。

【図7】hEDRFの完全ヒトcDNAを、hEDRFタンパク質をコードする第2オープンリーディングフレーム(ORF2)の翻訳と共に示す。3つ連続したアスタリスク(「***)は、停止コドンを示す。

【図1】



【図2】



【図3】

		10	20	30	40	50	
ヒト	EDRF:	MALLKANKDL	ISAGLKEFSV	LLNQQVFNDP	LVSEEDMVTV	VEDWMNFYIN	
マウス	EDRF:	..PFQS....	L.T.I...N.	..D....D..	.I.....I.	..H..V.L.T.	
		60	70	80	90	100	
ヒト	EDRF:	YYRQQVTGEP	QERDKALQEL	RQELNLANP	FLAKYRDFLK	SHELPSHPPP	SS
マウス	EDRF:	..KKL.H..Q	E.Q.R.MT.F	Q...S..GWQT...	..K.P..NTLF	..

【図4】

e 9 配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 gaggtcagctgggtgagctctggggagggttgggtacagctggcaggctccctgagactctcctgtgcagcctctggattccaccttggatgattatgcc
 E V Q L Y E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A>

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 tgcactgggtccggcaagctccagggaggcctggagtggtctcggattatgtagtggatagctatgtagctatgtagctctgtaggggagc
 M H W V R Q A P G K G L E W V S G I S W N S G S I G Y A D S V K G R>

VH

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 attcaccatctccagagcaacgcccaggaaactcctgtatctgcaatgcaacagactgagagctgaggacacggccgtgtattactgtccagagagagt
 F T I S R D N A K N S L Y L Q M N R L R A E D T A V Y Y C A R E S>

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 tctgatttggagctcaatgtgacttggggccaaggtaccctggctcaccgtctcgggtggtaggggggttcaggaggaggtgacttggcggtagtgcar
 S D L E S N V T W G Q G T L V T V S S G G G G S G G G S G G S A>

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 ttgatgttgatgactcagctctccactctccctgcccgtcccccggaggccggcctccatctcctgagggtcagtcagagcctcctgcatagta
 L D Y V N T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L L H S N>

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 aggatcactatctggatgggtacctgcagagggcaggcagctctcagagctcctgatttgggttcaatcgggctccggggccctgacagg
 G Y N Y L D W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R A S G Y P D R>

VL

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 ttcagtgagtgatcaggcaacagatttcaactgaactcagcagagtgaggctgaggatggtgggtttattactgctgagcagctcacaactc
 F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C M Q A L Q T>

710 720 730 740
 cctctcttaccctcggccnaggaccagctgggaatccaaagt
 P S L T F G Q G T K L E I K R>

ボックス内の領域は CDR を示す

【図5】

e 11 配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 tccaggtgacagctgggtgagctctggggagggttgggtacagctggcaggctccctgagactctcctgtgcagcctctggattccaccttggatgattatg
 S Q V Q L V Q S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F D D Y>

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 tcalgkactgggtccggcaagctccagggaggcctggagtggttccaggtattagtggaatagtggttagcataggctatgtagcactctgtaggg
 A M H W V R Q A P G K G L E W V S G I S W N S G S I G Y A D S V K G>

VH

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 cagattcaccatctccagagcaacgcccaggaaactcctgtatctgcaatgcaacagactgagagctgaggacacggctgtgtattactgttccagagatctg
 R F T I S R D N A K N T L Y L Q M T L R V E D T A V Y Y C S R D L>

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 gggggagacagatgactcctgaggcagggaacctgggtcaccgtctcctcaggtggaggcaggttcaggcggagggtggtctgagggtggcggatcagct
 G G A D D S W G Q G T L V T V S S G G G G S G G G G S G G G S Q>

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 ctgctctgactcagcctcgtcaggtgctcgggtctcctggcagctcagtcaccatctcctgcaactggaaccagcagtgatggtgggttataactatgt
 S A L T Q P R S V S G S P G Q S V T I S C T G T S S D V G G Y N Y V>

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 ttcctggatcnaecagcaccaggcaaggccccaaactatgattatagggtcagtaactcggccccaggggctcctgtagctctcctgggtccag
 S W Y Q Q H P G K A P K L M T Y E V S N R P P E Y P D R F S G S K>

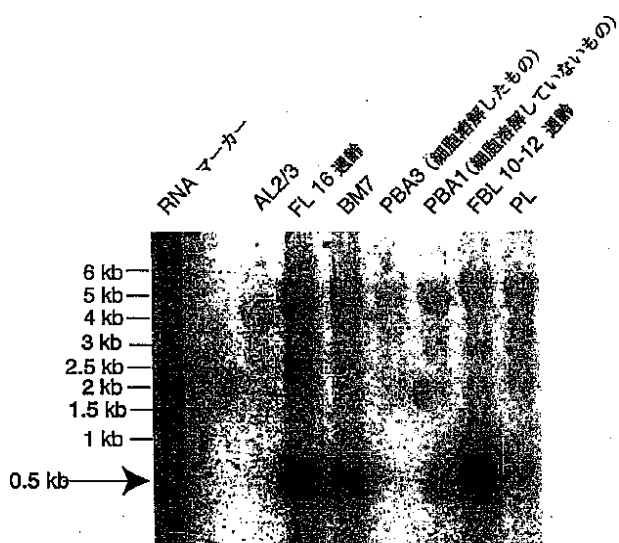
VL

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 tctggcaacagcctcctgncactcctgggtcctcagactgagnacgggtgattatnntgcaactcotatacaagcggcagcnccttatgtctctcg
 S G N T A S L X I S G L Q T E X E G D Y X C S S Y T S S S X Y Y F>

710 720
 gaactgggaccagctgaccgtcctaggt
 G T G T K L T V L G>

ボックス内の領域は CDR を示す

【図6】



【図7】

```

ggcacgagctgacacttgactccttgactacatctatagcttggcacagagagattcacgc
MetAlaLeu
accctcaagagtgtgggtgagacatatacagcctgtagacctgaaggcagatggctctt
LeuLysAlaAsnLysAspLeuIleSerAlaGlyLeuLysGluPheSerValLeuLeuAsn
cttaaggccaataaggatctcatttccgcaggattgaaggagttcagcgttctgctgaat
GlnGlnValPheAsnAspProLeuValSerGluGluAspMetValThrValValGluAsp
cagcaggtcttcaatgatcctctcgtctctgaagaagacatggtgactgtggtggaggac
TrpMetAsnPheTyrIleAsnTyrTyrArgGlnGlnValThrGlyGluProGlnGluArg
tggatgaacttctacatcaactattacaggcagcaggtgacaggggagccccaagagcga
AspLysAlaLeuGlnGluLeuArgGlnGluLeuAsnThrLeuAlaAsnProPheLeuAla
gacaaggetctgcaggagcttcggcaagagctgaacactctggccaacccttctctggcc
LysTyrArgAspPheLeuLysSerHisGluLeuProSerHisProProProSerSer***
aagtacagggacttctgaagtctcatgagctcccaggtcaccaccgcctctctctag
ctcagggaccagccctctctctctgagaaactctgaccttcatgtccttaggctgtgct
cctgccactctaccctgacacctcaataaagaccagtgctggttttgttgactaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 1/21		C 1 2 P 21/02	C
5/10		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P 21/02		G 0 1 N 33/53	D

C 1 2 Q 1/68
G 0 1 N 33/53
// C 1 2 P 21/08

C 1 2 P 21/08
C 1 2 N 15/00 Z N A A
5/00 A

(72)発明者 ウォルター マホニー
アメリカ合衆国 94510 カリフォルニア
州 ベニシア, ウェスト エイチ ストリ
ート 794

(72)発明者 パウラ シューラー
アメリカ合衆国 94510 カリフォルニア
州 ベニシア, ウェスト エイチ ストリ
ート 794

(72)発明者 ウィリアム ディー . ハリマン
アメリカ合衆国 94501 カリフォルニア
州 アラメダ, バーバース ポイント ロ
ード 2861

专利名称(译)	人红细胞分化因子		
公开(公告)号	JP2001292787A	公开(公告)日	2001-10-23
申请号	JP2001059155	申请日	2001-03-02
[标]申请(专利权)人(译)	罗氏诊断公司		
申请(专利权)人(译)	罗氏诊断公司		
[标]发明人	ホンシャシユ ウォルターマホニー パウラシューラー ウィリアムディーハリマン		
发明人	ホンシャ シユ ウォルター マホニー パウラ シューラー ウィリアム ディー.ハリマン		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47 C07K14/575 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68		
CPC分类号	C07K14/575		
FI分类号	C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/53.D C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/CA04 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA03 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	09/517225 2000-03-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(带更正) 解决的问题: 提供人类红系分化相关因子(hEDRF), 编码hEDRF的多核苷酸, hEDRF特异的抗体及其使用方法。包含至少5个连续氨基酸的多肽, 该氨基酸与从人红细胞前体获得的特定氨基酸序列相同, 但与小鼠来源的同源物的氨基酸序列不同。使用编码该多肽的多核苷酸和对该多肽特异的抗体的分析方法。

