

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 503040

(P2003 - 503040A)

(43)公表日 平成15年1月28日(2003.1.28)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/745	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/745		16/18	4 B 0 6 4
16/18		16/36	4 H 0 4 5
16/36		19/00	
19/00		C 1 2 P 21/02	C

審査請求 有 予備審査請求 (全 27数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 505944(P2001 - 505944)

(86)(22)出願日 平成12年6月27日(2000.6.27)

(85)翻訳文提出日 平成13年2月28日(2001.2.28)

(86)国際出願番号 PCT/US00/17609

(87)国際公開番号 W001/000237

(87)国際公開日 平成13年1月4日(2001.1.4)

(31)優先権主張番号 60/141,699

(32)優先日 平成11年6月30日(1999.6.30)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 シグマ - アルドリッチ・カンパニー
SIGMA - ALDRICH CO.

アメリカ合衆国62249イリノイ州ハイランド
、ウエスト・モンロー・ストリート509番

(72)発明者 マーク・ゴールドフォード
アメリカ合衆国63011ミズーリ州ポールウィ
ン、ピターフィールド・ドライブ704番

(72)発明者 マーク・エクス・トリスコット
アメリカ合衆国63021ミズーリ州ポールウィ
ン、ガバナーズ・コート461番

(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 合成ペプチド免疫原およびそれに対する抗体

(57)【要約】

第二種由来の類似タンパク質と異なるアミノ酸配列を有する第一種由来の標的タンパク質のためのペプチド免疫原の選択法を提供する。本方法は、該類似タンパク質からの配列が少なくとも1アミノ酸異なる、親水性の標的タンパク質由来のペプチド断片を選択することを含む。担体分子とコンジュゲートした、選択された免疫原を用いて作製される抗体も提供する。本方法により作製される、ヒト組織因子と交差反応しないウサギ組織因子に対する抗体も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 第一種 (species) と第二種とで異なるアミノ酸配列を含む、第一種由来標的タンパク質のペプチド免疫原の選択方法であって、

(a) 領域の長さが5～50アミノ酸であり、親水性値が0以上の、第一種由来標的タンパク質のアミノ酸配列のペプチド領域を同定し、

(b) 第一種と第二種の間にもホモロガスでないアミノ酸を少なくとも1個有する、工程(a)で同定した領域由来のペプチド免疫原を選択することを含む方法

。

【請求項2】 親水性値が0.2以上である請求項1記載の方法。

【請求項3】 二種間の相同性のレベルが75%以下である請求項1記載の方法。

【請求項4】 二種間の相同性のレベルが60%以下である請求項1記載の方法。

【請求項5】 第一種および第二種がヒト、ウサギ、およびマウスから成る群から選ばれる請求項1記載の方法。

【請求項6】 ペプチド免疫原が第一種と第二種の間にもホモロガスでないアミノ酸を少なくとも3個有する請求項1記載の方法。

【請求項7】 標的タンパク質が組織因子である請求項1記載の方法。

【請求項8】 標的タンパク質がウサギ組織因子である請求項1記載の方法

。

【請求項9】 標的タンパク質がヒト組織因子である請求項1記載の方法。

【請求項10】 第一種と第二種の間で異なるアミノ酸を含む、第一種の標的タンパク質に特異的な抗体の製造法であって、

(a) 請求項1記載の方法により標的タンパク質のペプチド免疫原を選択し、

(b) 該ペプチド免疫原を合成し、

(c) 該ペプチド免疫原を免疫原性担体分子とコンジュゲートさせてペプチド-担体抗原を作製し、

(d) 該抗原に対する抗体を製造することを含む方法。

【請求項11】 該ペプチド免疫原が組換えDNA法により合成される請求

項10記載の方法。

【請求項12】 該ペプチド免疫原が化学的固相法を用いて合成される請求

項10記載の方法。

【請求項13】 免疫原性担体分子がキーホールリンペットヘモシアニンである請求項10記載の方法。

【請求項14】 抗体が単一特異的である請求項10記載の方法。

【請求項15】 抗体がモノクローナル抗体である請求項14記載の方法。

【請求項16】 抗体がポリクローナルである請求項10記載の方法。

【請求項17】 抗体がマウス、ヤギ、ウサギ、またはヒツジを用いて作製される請求項16記載の方法。

【請求項18】 抗体がヤギを用いて作製される請求項17記載の方法。

【請求項19】 請求項10記載の方法により製造される抗体。

【請求項20】 長さが5～50アミノ酸であり、親水性値が0以上であり、第二種由来の組織因子とホモローガスでないアミノ酸を少なくとも1個有する第一種由来の組織因子細胞外領域由来の配列からなるペプチド。

【請求項21】 親水性値が0.2以上である請求項20記載のペプチド。

【請求項22】 二種間の相同性が75%以下である請求項20記載のペプチド。

【請求項23】 二種間の相同性が60%以下である請求項20記載のペプチド。

【請求項24】 該ペプチドが第二種由来の組織因子とホモローガスでないアミノ酸を少なくとも3個有する請求項20記載のペプチド。

【請求項25】 第一種がヒト、ウサギ、およびマウスからなる群から選ばれる請求項20記載の方法。

【請求項26】 第一種がウサギであり、第二種がマウスである請求項25記載のペプチド。

【請求項27】 第一種がヒトであり、第二種がマウスである請求項25記載のペプチド。

【請求項28】 36I-42N、49L-63K、84T-95S、12

4 T - 1 3 3 K、1 5 7 R - 1 6 4 K、1 7 4 L - 1 7 9 K、1 9 0 V - 2 0 2 E、2 0 5 T - 2 1 4 R、および2 4 3 R - 2 5 3 Eからなる群から選ばれる請求項26記載のペプチド。

【請求項29】 該ペプチドが8 4 T - 9 5 Sまたは1 9 0 V - 2 0 2 Eである請求項28記載のペプチド。

【請求項30】 3 7 Q - 4 4 D、8 4 E - 9 5 E、1 2 4 N - 1 3 5 R、1 5 8 W - 1 6 9 K、1 7 6 L - 1 8 1 K、1 9 4 P - 2 0 4 D、および2 0 8 E - 2 1 6 Eからなる群から選ばれる請求項27記載のペプチド。

【請求項31】 8 4 E - 9 5 E、1 2 4 N - 1 3 5 R、1 5 8 W - 1 6 9 K、または1 9 4 P - 2 0 4 Dである請求項30記載のペプチド。

【請求項32】 請求項20記載のペプチドとコンジュゲートした免疫原性担体分子を含む抗原。

【請求項33】 該担体分子がキーホールリンペットヘモシアニンである請求項32記載の抗原。

【請求項34】 請求項32記載の抗原に対して作製される抗体。

【請求項35】 抗体が単一特異的である請求項34記載の抗体。

【請求項36】 抗体がモノクローナル抗体である請求項35記載の抗体。

【請求項37】 抗体がポリクローナル抗体調製物の部分である請求項34記載の抗体。

【請求項38】 抗体がマウス、ヤギ、ウサギ、またはヒツジ由来である請求項37記載の抗体。

【請求項39】 抗体がヤギ由来である請求項38記載の抗体。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、一般的には、種間でアミノ酸の変動性を有する標的タンパク質に対する抗体を製造するためのペプチド免疫原の選択法に関する。より詳細には、本発明は、ペプチド免疫原を選択し、哺乳動物組織因子に対する種特異的抗体を製造する方法、ならびに該方法により製造される抗体に関する。

【0002】**(関連技術の説明)**

タンパク質抗原に対する抗体は多年にわたり多くの研究や診断目的に用いられてきた。抗体は、免疫原性担体（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン [KLH]）とコンジュゲートしたタンパク質の小ペプチド部分（5～50アミノ酸）を注射することによりタンパク質の特異領域に対して製造することができる。免疫動物は該ペプチドを免疫原性担体のエピトープとして認識するであろう。この方法は全タンパク質の注射を含む、より一般的な方法より有利である。例えば、この方法では、抗体試薬を、目的とするタンパク質の、予測される特異的ドメインと結合させることができる。これら抗ペプチド抗体は目的とするタンパク質の構造/機能試験におけるエピトープマッピング、免疫組織化学的局在、およびイムノアフィニティ精製に有用である。本発明の目的とするある特定のタンパク質は哺乳動物組織因子である。

【0003】

組織因子（TF）は、凝固（血液凝固）に重要な役割を果たす貫膜糖タンパク質である。正常な凝固は血管内皮が損傷する時に始まる。損傷した血管内皮はTFを血漿に曝露し、TFをセリンプロテアーゼチモーゲン、第VII因子と結合させる。第VII因子に対するTFの結合、次いで第VIIa因子の活性化は、凝固開始の最初の工程である。次いで、構造変化とCa²⁺架橋形成によりTF/FVIIaコンプレックスを第X因子と結合させ、第X因子を活性化することができる。活性化第X因子は、プロトロンビンを活性化セリンプロテアーゼであるトロンビンに変換する。トロンビンはフィブリノーゲンをフィブリンに変換する。最終的に、フ

ィブリン繊維が互いに結合し、血餅や、さらなる出血を防ぐ血小板 - フィブリンネットワークを形成する。

【0004】

マウス、ウサギ、およびヒト間のTFタンパク質のアミノ酸配列は高度に保存されている。Pawashe et al., 1991, *Thromb.Haemost.*66:315。TFの結晶構造は、第VII因子に対する結合部位を含む広範なドメイン間インターフェース領域を有する2つの免疫グロブリン様ドメインからなる。Harlos et al., 1994, *Nature* 370:662。

【0005】

TFは、種々の組織、例えば心筋細胞、腎糸球体、表皮の顆粒層、中咽頭および膈の上皮、ならびに腸、膀胱、呼吸器粘膜、および身体と環境の組織関門（バリア）に発現する。Ruf et al., 1994, *FASEB J.* 8:385。組織因子は種々の感染性、循環器系、および新生物疾患の病因にも関係がある。例えば過剰な凝固は卒中や虚血を生じ、組織の梗塞を引き起こす。急性骨髄芽球性白血病は、TFを発現することが知られており、血小板の急速な消費と、フィブリン重合の崩壊による過剰出血を特徴とする疾患である播種性血管内凝固（DIC）が生じる（同上）。したがって、TFをより理解することにより、研究者は凝固を制御するためのより効果的な療法を計画することができる。そのような制御によりこれらおよび他の疾患に罹患した患者で考えられる合併症を軽減することができる。

【0006】

TFに対する種々の抗体が作製されている。これら抗TF抗体のほとんどは全TFタンパク質に対して作製された。例えば、天然の第VII因子 - アフィニティ精製ヒトTFに対するモノクローナル抗体を用い、TFの細胞外ドメインの基本領域について研究がなされた。Magdolen et al., 1998, *Biological Chemistry* 379:157。他の抗体はヒトおよびウサギ由来の精製または組換えTFに対して作製された。例えば、Taylor et al., 1991, *Circulatory Shock* 33:127; Morissey et al., 1988, *Thrombosis Res.* 52:247; Pawashe et al., 1994, *Circulation Res.*74:56; 米国特許第5,223,427号参照。しかしながら、TFのような膜結合タンパク質は、特に、その天然のホールドされた構造で精製することが難しい。

別の方法では、組換えウサギTFを発現するネズミ培養細胞を注射したマウスからモノクローナル抗体が作製された。Speidel et al., 1995, Circulation 92:3323。

TFに対する抗ペプチド抗体が作製されている。ある場合には、TFが第VII因子に結合するのを阻害することができるヒトTF領域に対するポリクローナル抗体が作製された。Ruf et al., 1991, Biochem. J. 278:729。別の場合には、ヒトTFのC末端細胞質ドメインに対する抗ペプチドモノクローナル抗体が作製された。Carson et al., 1992, Blood Coagulation and Fibrinolysis 3:779。

【0007】

種間で広範囲の相同性を有するTFのようなタンパク質に対して作製した抗体は、種特異性を示すとは予想されないであろう。これについては、ヒト組織因子に対するモノクローナル抗体がヒトTFと交差反応し、これを阻害するTFを用いる例が示されている。Taylor et al., 1991, Circulation Shock 33:127。これは、例えば、抗体を病気の診断に用い、2つの病原性種を区別する必要がある場合に問題となるであろう。脊椎動物間で広範囲の配列相同性を有するTFのようなタンパク質は、それが誘導すると予測される抗体の範囲も限られる。目的とする種由来のタンパク質と免疫動物中の同じタンパク質間の配列差がほとんどないため、免疫動物の免疫系は、注射したタンパク質のホモローガスな領域を「自己」エピトープと認識し、注射された動物の類似タンパク質とホモローガスでない、注射したタンパク質の免疫支配(immunodominant)領域に対する抗体を産生するだけである。例えば、全ヒトTFに対するネズミモノクローナル抗体は、マウスTFと同じでないヒトTFの領域に対してのみ産生されよう。例えば、構造-機能研究のためにTFタンパク質の多くの領域に対する抗体を所望する場合は、失望する結果になる。したがって、種特異性があり、脊椎動物タンパク質のいくつかの領域について所望される、種間で広範囲のアミノ酸相同性を示すタンパク質に対する抗体を作製するための改良法が必要である。

【0008】

(発明の要約)

本発明の目的は、種特異的抗体を確実に製造するために、免疫原として用いる

標的タンパク質のペプチドを決定する方法を提供することである。本発明のより具体的な目的は、種特異的な抗体を製造するための免疫原として用いる組織因子の領域を決定する方法を提供することである。本発明の別の目的は、上記方法に用いる組織因子に対する抗体を提供することである。

したがって、簡単には、本発明は、第一種と第二種間で異なるアミノ酸配列を含む、第一種の標的タンパク質のペプチド免疫原を選択する方法を目的とする。本方法は、(a)領域の長さが5～50アミノ酸である、親水性値が0以上の、第一種由来標的タンパク質のアミノ酸配列のペプチド領域を同定し、(b)第一種と第二種間にホモローガスでないアミノ酸を少なくとも1個有する、工程(a)で同定された領域からペプチド免疫原を選択することを含む。

【0009】

本発明は、第一種と第二種間で異なるアミノ酸配列を含む、第一種の標的タンパク質に特異的な抗体の製造法も目的とする。本方法は、上記方法により標的タンパク質のペプチド免疫原を選択し、該ペプチド免疫原を合成し、該ペプチド免疫原と免疫原性担体分子をコンジュゲートしてペプチド-担体抗原を作製し、該抗原に対する抗体を産生することを含む。

さらに、本発明は上記方法により作製された抗体に関する。

さらに、本発明は、領域の長さが5～50アミノ酸であり、親水性値が0以上の、第二種由来の組織因子とホモローガスでないアミノ酸を少なくとも1個有する、第一種の組織因子細胞外領域由来の配列からなるペプチドを目的とする。

本発明は、領域の長さが5～50アミノ酸であり、親水性値が0以上の、第二種由来の組織因子とホモローガスでないアミノ酸を少なくとも1個有する、第一種の組織因子細胞外領域由来の配列からなるペプチドとコンジュゲートした免疫原性担体分子を含む抗原、および該抗原に対する抗体も目的とする。

【0010】

略号および定義

本発明の理解を促すために、本明細書で用いている多くの用語を以下に定義する。

本明細書で用いている「TF」は組織因子を意味する。

本明細書で用いている用語「種 - 特異的」は、抗体を説明するのに用いるときは抗体がある種のタンパク質と結合するが別の種と同じタンパク質とは結合しないことを表す。第一種由来のタンパク質と結合する（または「反応する」もしくは「認識する」）が第二種由来の同じタンパク質とは結合しないタンパク質は、第二種由来のタンパク質とは「交差反応」しないので、第一種由来のタンパク質に種 - 特異的であるという。

本明細書で用いている「抗原」は、抗体を作製する大分子である。抗原は通常、脊椎動物に注射され、次いで、抗原領域（「エピトープ」）に対する抗体の産生が誘導される。

【0011】

本明細書で用いている用語「免疫原」は、抗体を得ようとする抗原部分である。免疫原は、抗原のエピトープであってもよく、いくつかのエピトープからなっているてもよい。より詳細には、用語「免疫原」は、本明細書において、抗原の免疫原部分に対する抗体を誘導するために免疫原性担体分子とコンジュゲートしている目的のタンパク質由来のペプチドを意味するのに用いられる。

本明細書で用いている用語「親水性（の）」は、アミノ酸について用いる場合は、極性および/または荷電側鎖を有するアミノ酸を表す。親水性アミノ酸には、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラテート（aspartate）（すなわち、アスパラギン酸）、グルタメート（すなわち、グルタミン酸）、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが含まれる。本明細書で用いている用語「親水性値」または「親水性指数値」は、各アミノ酸に割り当てられた3.0 ~ -3.4の数値（ここで、大きい数はより親水性である）を意味する。親水性値は、Hopp et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 76:3824、の方法を用いて計算する。6アミノ酸に関するこれら値の移動親水性平均を上記のごとくHopp et al.の方法を用いて計算した。

【0012】

本明細書で用いている用語「疎水性（の）」は、アミノ酸について用いる場合は、非極性側鎖を有するアミノ酸を表す。疎水性アミノ酸には、バリン、ロイシン、システイン、およびメチオニンが含まれる。3つの疎水性アミノ酸は芳香族側

鎖を有する。したがって、用語「芳香族(の)」はアミノ酸に用いる場合、3つの芳香族疎水性アミノ酸、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンを表す。

【0013】

(発明の詳細な説明)

本明細書で引用した各参考文献の内容は本明細書の一部を構成する。核酸の分子操作に関する本明細書に開示した方法は当業者に知られている。一般的には、Fredrick M. Ausubel et al.(1995),「Short Protocols in Molecular Biology」、John Wiley and Sons、およびJoseph Sambrook et al.(1989),「Molecular Cloning, A Laboratory Manual」、第二版、Cold Spring Harbor Laboratory Press参照(これらの内容は本明細書の一部を構成する)。

本発明は、第二種と異なるアミノ酸配列を有する第一種由来の標的タンパク質からなるペプチド免疫原を選択する方法を目的とする。免疫原は、該ペプチドを含む標的タンパク質の領域に対する抗体を誘導するために選択される。該方法は以下の工程を含む:(a)標的タンパク質のアミノ酸配列の親水性を分析し、親水性の、例えば、Hopp et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:3824の方法を用いて0以上の値を有する5~50アミノ酸長の領域を同定し、(b)標的タンパク質の親水性アミノ酸領域を第二種と同じタンパク質由来の同じ領域と比較し、第一種と第二種の間でホモローガスでないアミノ酸を少なくとも1個有する領域をペプチド免疫原として選択する。次に、免疫原と免疫原性担体分子をコンジュゲートし、次いで選択した免疫原に対する抗体を作製する。該免疫原に対して得られる抗体は、一般に、第二種と同じタンパク質には結合しない。

【0014】

本発明の方法は、目的とする種の標的タンパク質のアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列を有する別の種の類似タンパク質が存在する、目的とする種のあらゆる標的タンパク質に対する抗体の製造に応用することができる。限定されるものではないが、脊椎動物、無脊椎動物、原生動物、細菌、真菌、および植物を含むあらゆる原核生物、真核生物、またはウイルス供給源由来のタンパク質が含まれる。

。

標的タンパク質および第二種由来類似タンパク質のアミノ酸配列は、種々の供給源、例えば、公表された物質、およびタンパク質シーケンシング（例えば、Edman分解（degradation））から得ることができる。アミノ酸配列は、公表された供給源からか、または既知の方法により兩種由来の標的タンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、開始コドンを決定することにより得ることができる標的タンパク質をコードする遺伝子から推定することもできる。

【0015】

親水性の標的タンパク質領域は、疎水性領域より抗原性が高い傾向があるので利用される。親水性ペプチド領域は標的タンパク質の外部表面に位置する傾向もあるため、抗体反応を誘導しやすく、*in situ*試験、例えば免疫細胞化学的研究において抗体に暴露されやすい。免疫原を生成するのに親水性ペプチドを用いることは、疎水性ペプチドより水性溶液に対する可溶性が高いという利点もある。これは、該ペプチドと担体タンパク質のコンジュゲート法をより簡単にし、好ましいコンジュゲーション法とする。さらに、親水性ペプチドを含む抗原は疎水性ペプチドを含む抗原より可溶性が高く、前者の抗原を用いる免疫法をより簡単にする。

【0016】

親水性分析により、該タンパク質の極性部分、好ましくはヘキサペプチドの移動平均の測定値が得られる。組織因子の親水性エピトープはHopp et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:3824の方法により決定することができる。コンピュータソフトウェア、例えばMacVector (International Biotechnologies, Inc.) も標的タンパク質の親水性を分析するのに利用可能である。個々のアミノ酸の親水性値が - 3.4 (トリプトファン) ~ 3.0 (リジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、およびアルギニン) の範囲であるHoppの方法を用い、該ペプチドの長さについて平均ヘキサペプチド親水性値を平均することにより親水性を決定するのが好ましい。親水性0以上のペプチドを選んでよい。好ましいペプチドは親水性0.2以上である。

【0017】

標的タンパク質中の目的領域から親水性ペプチドを選択し、次いで、核ペプチ

ドの配列を第二種由来の同じタンパク質の類似配列と比較する。この比較を行うため、標的タンパク質および第二種由来の同じタンパク質のアミノ酸配列を3次元構造類似性により一列に並べることが好ましい。2つの配列間の構造的類似性は、多くのコンピュータプログラムにより決定することができる推定3次元構造を比較するか、または既知の方法により該タンパク質両方の結晶構造を決定することにより決定することができる(TFの結晶構造については、例えば、Harlos et al., 1994, Nature 370:662参照)。しかしながら、3次元構造の類似性は、一般的には、ミスマッチを最小にするためある配列と他の配列にギャップを導入し、2つのタンパク質の配列を一列に並べることにより確かめられる。この作業は多くの良く知られたコンピュータプログラムにより行うこともできる(例えば、Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389参照)。マウス、ウサギ、およびヒトTFのそのような配置については図1参照。

【0018】

候補親水性ペプチドの一列に並べた配列の配列相同性を比較する。本発明によれば、標的タンパク質と第二種由来の類似タンパク質の間にホモローガスでないアミノ酸を少なくとも1個有するペプチドを免疫原に用いて良い。好ましくは、候補親水性ペプチドは標的タンパク質と第二種由来の類似タンパク質の間にホモローガスでないアミノ酸を少なくとも3個有する。候補親水性ペプチドのホモローガスでないアミノ酸は該ペプチド鎖中で連続していても、連続していなくてもよい。好ましくは、該2ペプチド間の相同性は75%以下である。より好ましくは、該2ペプチド間の相同性は60%以下である。2ペプチド配列間の配列相同性が低下するにつれ、第一種の該タンパク質の免疫原から生じる抗体の種特異的特性は増加し、それにより該抗体が第二種の同じタンパク質と交差反応する可能性が低下する。

【0019】

ペプチド免疫原を選択し、次いで、担体分子とのコンジュゲーションに備えてそれを合成する。該ペプチドの合成は、あらゆる好都合な方法、例えば、適切な組換え宿主細胞、例えば、E. coli中の、該ペプチドをコードする核酸配列を翻訳し、常套的方法(例えば逆相HPLC)により該ペプチドを精製すること

ができる。しかしながら、該ペプチドは化学的方法、好ましくは固相法を用いて合成するのが好ましい。このための好ましい方法には、Fmoc化学を用いる (Fields et al., 1990, Int. J. Pept. Protein Res. 35:161; Wellings et al., 1997, Meth. Enzymol. 289:44)。好ましくは、該ペプチドは、架橋試薬を用いて担体とカップリングさせるのに適した末端アミノ酸残基を含むものを選択するか、またはこの目的のために末端にさらにアミノ酸残基を含めて合成する。そのようなアミノ酸の例は、ビス-ジアゾベンジジン (BDB) 活性化担体についてはチロシン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド・塩酸 (EDC) 活性化担体についてはアスパラギン酸、グルタミン酸、もしくは遊離カルボキシ末端、またはm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロスクシンアミド (MBS) 活性化担体についてはシステインである。システインとMBS担体活性化が好ましい。

【0020】

ペプチド免疫原を合成し、次いで、それを担体分子とコンジュゲートする。該担体は好ましくは抗原性、可溶性タンパク質である。好ましくは、第一種または第二種中の抗原と結合する抗体を誘導しない担体を選択する。好ましい担体はキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) である。

あるいはまた、多抗原性ペプチド戦略に従うため、該ペプチド免疫原を樹脂-ポリリジン担体とコンジュゲートすることができる。例えば、McClellan et al., 1991, J. Immunol. Meth. 137:149。

抗体産生はペプチド免疫原と担体分子のコンジュゲートにより達成される。このコンジュゲーションは、担体、例えば、BDB、EDC、もしくは好ましくはMBSを活性化し、次いで該ペプチドを加えることにより進行させるのが好ましい。

【0021】

次に、該抗原は免疫原と結合する抗体を製造するのに用いられる。抗体は単一特異的抗体であってよい。単一特異的抗体は、例えばGalfré et al., 1977, Nature 266:550の方法により作製されるモノクローナル抗体であってよい。あるいはまた、該単一特異的抗体は、例えば、Lowman et al., 1991, Biochemistry 30

: 10832の方法により作製される組み換え抗体であってよい。

該抗体はポリクローナル抗体でもあり得る。ポリクローナル抗体は、哺乳動物、例えば、マウス、ヤギ、ヒツジ、またはウサギをペプチド - 担体抗原で免疫し、次いで該動物から血清を単離し、ポリクローナル抗体を含む抗血清を得ることにより製造することができる。

【0022】

該抗体は、好ましくは、例えば、ELISA、赤血球凝集、蛍光抗体の組織への結合、イースタンブロット、または適切なあらゆる他の方法により、該抗体の、免疫原および標的タンパク質との結合能を測定することにより特徴づけられる。本発明の方法により作製される組織因子抗体は、例えば、第一種および第二種または他種由来の組み換えおよび/または天然のTF、および免疫原に対する反応性について試験することができる。

本発明のペプチド抗原、免疫原、および抗体は種々の用途に用いることができる。他の用途として、該ペプチド抗原を用いて上記のごとく抗体を精製することができる。本発明の合成ペプチドを用いて上記のごとく抗体特異性を試験することができる。該抗原を阻害アッセイに用いることもできる。例えば、TF由来ペプチドを、例えばトロンボプラスチンアッセイに加え、該ペプチドがTF機能を阻害することができるかを検討することができる。このような研究は、TFの構造と機能の特徴づける助けとなる。

【0023】

本発明の抗体の用途には、標的タンパク質の免疫組織化学的局在、イムノアフィニティ精製、および構造/機能試験におけるエピトープマッピングが含まれる。例えば、抗TF抗体をトロンボプラスチンアッセイに用い、該抗体がTF機能を阻害することができるかどうかについて検討することができる。これら抗体はTFの他の局面、例えば、TF/基質複合体の特徴を試験するのに用いることもできる。

本発明の抗体は、特に抗体が別の種由来の抗原と交差反応しないことが求められる、抗原の診断的アッセイに用いることもできる(例えば、食物中の特定の細菌のアッセイ)。

【0024】

(実施例)

実施例1

ウサギおよびヒト組織因子に対するペプチド免疫原の同定

ウサギ、ヒト、およびマウス組織因子の配列は記載されている (Pawashe et al., 1991, *Thromb Haemost.* 66:315)。親水性分析は、Hopp et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:3824の方法を用いて行った。分析はExcelコンピュータスプレッドシートプログラムの移動平均関数を用いて行った。簡単には、ウサギおよびヒト配列の各アミノ酸を3.0 ~ 3.4の値に割り当てた(ここで、大きい数字の親水性が大きい)。各ヘキサペプチドの移動親水性平均を確立した。次に、ヘキサペプチド平均の平均(mean)親水性平均(average)を、主要な陽性(positive)ヘキサペプチド平均を有するタンパク質の領域について確立した。平均ヘキサペプチド平均が0.2以上の領域をさらに評価する候補免疫原として選択した。図2および3はこれら候補免疫原を示す。

次に、候補免疫原のマウス配列に対する相同性を評価した。図1に、ヒトおよびウサギ配列をマウス配列と一列に並べた。次に、候補ヒトおよびウサギ免疫原を一列に並べたマウス配列と比較し、類似のマウス配列とホモロガスでないアミノ酸を3個以上有する免疫原を選択した。

選択した免疫原は、3またはそれ以上のミスマッチを有する、図2および3の候補免疫原として示した。ウサギTF由来候補免疫原10個のうち8個、およびヒトTF由来候補免疫原11個のうち8個。それら免疫原はすべて抗TF抗体を製造するのに有用である。しかしながら、最も有効な免疫原は、より高い平均親水性値と多数のミスマッチを有するものであろう。

【0025】

実施例2

ウサギ組織因子に対するポリクローナル抗体の産生および特性

ポリクローナル抗体をウサギTFの2領域に対して作製した。該分子の推定上の上端の方向に向かって、ドメイン1Fとドメイン1Gを繋ぐループに位置する84位~95位の12残基ペプチドTTGFPEEPPFRN(84T-95S

) (Harlos et al., 1994, Nature 370:662) は、最もアミノ酸のミスマッチが多い候補免疫原であることが証明された(図2)。ジスルフィド結合により拘束された2F-2Gグループ内に位置する190位~202位の13残基ペプチドVIPSRKRKRKQRSPE(190V-202E)は、最も高い親水性指数を有する(図2)。E値100のBLASTP検索エンジン(engine)により分析すると、両ペプチドはウサギTF配列と比べて独特である。これら2ペプチドは標準的FMOC化学を用いて合成された。カルボキシ末端にさらにシステインを加えた。次に、該ペプチドを標準的方法によりMBS活性化KLHとコンジュゲートした。各ペプチド免疫原について、ヤギ3頭をペプチド-KLH抗原で免疫した。次に、ヤギから回収した抗血清について、非コンジュゲートペプチド、ウサギ組換えTF、ヒト組換えTF、およびウサギ脳アセトン粉末(RBAP)のTriton抽出物をコート抗原とするマイクロタイタープレートフォーマットを用いて免疫反応性を試験した。該プレートをウサギ抗ヤギIgGアルカリホスファターゼコンジュゲートでプローブした。

【0026】

各抗血清は、それぞれのペプチド免疫原に対する特異的免疫反応性を示した。抗血清はすべてウサギ組換えTFと交差反応した。各ペプチドに対する2つの抗血清は、RBAP抽出物中の天然ウサギTFとの反応性も示した。

本発明の他の特性、目的、および利点は当業者に明らかであろう。本明細書中の説明および例示は当業者に本発明、その原理、およびその実際的応用を熟知させることを意図している。当業者は、本発明を、個々の用途の要求に最もよく適合するように多くの形に適合させ、適用することができよう。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Goldford, Marc
 Triscott, Mark X

5 <120> SYNTHETIC PEPTIDE IMMUNOGENS AND ANTIBODIES THERETO
 <130> sgmd8340.1
 <140>
 <141>
 <150> 60/141,699
 10 <151> 1999-06-30
 <160> 11
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 86
 15 <212> PRT
 <213> Rabbit
 <400> 1
 Ala Asp Thr Thr Gly Arg Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser Thr Asn
 1 5 10 15
 20 Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Ser Ile Asp Ile Ile Val
 20 25 30
 Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Arg Leu Glu Asn Trp Lys Ser Lys Cys
 35 40 45
 25 Phe Leu Thr Ala Glu Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Val Val Lys
 50 55 60
 Asp Val Gly Gln Thr Tyr Met Ala Arg Val Leu Ser Tyr Pro Ala Arg
 65 70 75 80
 Asn Gly Asn Thr Thr Gly
 85

30 <210> 2
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Rabbit
 <400> 2
 35 Phe Pro Glu Glu Pro Pro Phe Arg Asn Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr
 1 5 10 15
 Leu Asp Thr His Leu Gly Gln Pro Thr Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val
 20 25 30

Gln Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser
 35 40 45

Lys Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile
 50 55 60

5 Val Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro
 65 70 75 80

Ala Gly Asn

<210> 6
 10 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 6
 15 Val Glu Ser Thr Gly Ser
 1 5

<210> 7
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Human

20 <400> 7
 Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu
 1 5 10 15

 Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly
 20 25 30

25 Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg
 35 40 45

 Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile
 50 55 60

30 Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala
 65 70 75 80

 Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu His
 85 90 95

 Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg
 100 105 110

35 Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu Cys Met Gly Gln Gln Lys Gly Glu
 115 120 125

 Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile
 130 135 140

Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile Ser Leu
 145 150

<210> 8
 <211> 22
 5 <212> PRT
 <213> Human

<400> 8
 Ile Ile Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu Asn
 1 5 10 15

10 Ser Pro Leu Asn Val Ser
 20

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> Mouse

<400> 9
 Gly Ile Pro Glu Lys
 1 5

<210> 10
 20 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 10
 25 Ala Phe Asn Leu Thr Trp Ile Ser Thr Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu
 1 5 10 15

Trp Gln Pro Lys Pro Thr Asn Tyr Thr Tyr Thr Val Gln Ile Ser Asp
 20 25 30

Arg Ser Arg Asn Trp Lys Asn Lys Cys Phe Ser Thr Thr Asp Thr Glu
 35 40 45

30 Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val Lys Asp Val Thr Trp Ala Tyr Glu
 50 55 60

Ala Lys Val Leu Ser Val Pro Arg Arg Asn Ser Val His Gly Asp Gly
 65 70 75 80

35 Asp Gln Leu Val Ile Asn Gly Glu Glu Pro Pro Phe Thr Asn Ala Pro
 85 90 95

Lys Phe Leu Pro Tyr Arg Asp Thr Asn Leu Gly Gln Arg Val Ile Gln
 100 105 110

Gln Phe Glu Gln Gln Gly Arg Lys Leu Asn Val Val Val Lys Asp Ser
 115 120 125

```

Leu Thr Leu Val Arg Lys Asn Gly Thr Phe Leu Thr Leu Arg Gln Val
 130                               135                               140

Phe Gly Lys Asp Leu Gly Tyr Ile Ile Thr Tyr Arg Leu Gly Ser Ser
145                               150                               155                               160

5  Thr Gly Lys Lys Thr Asn Ile Thr Asn Thr Asn Glu Phe Ser Ile Asp
                               165                               170                               175

Val Glu Glu Gly Val Ser Tyr Cys Phe Phe Val Gln Ala Met Ile Phe
                               180                               185                               190

10 Ser Arg Lys Thr Asn Gln Asn Ser Pro Gly Ser Ser Thr Val Cys Thr
                               195                               200                               205

Glu Asn Trp Ser Lys Phe Leu Gly Glu Thr Leu Ile Ile Val Gly Ala
210                               215                               220

Val Val Leu Leu Ala Thr Ile Phe Ile Ile Leu Leu Ser Ile Ser Leu
225                               230                               235                               240

15

<210> 11
<211> 19
<212> PRT
<213> Mouse

20 <400> 11
   Cys Lys Arg Arg Lys Asn Arg Ala Gly Gln Lys Gly Lys Asn Thr Pro
     1                               5                               10                               15

   Ser Arg Leu

```

【図面の簡単な説明】

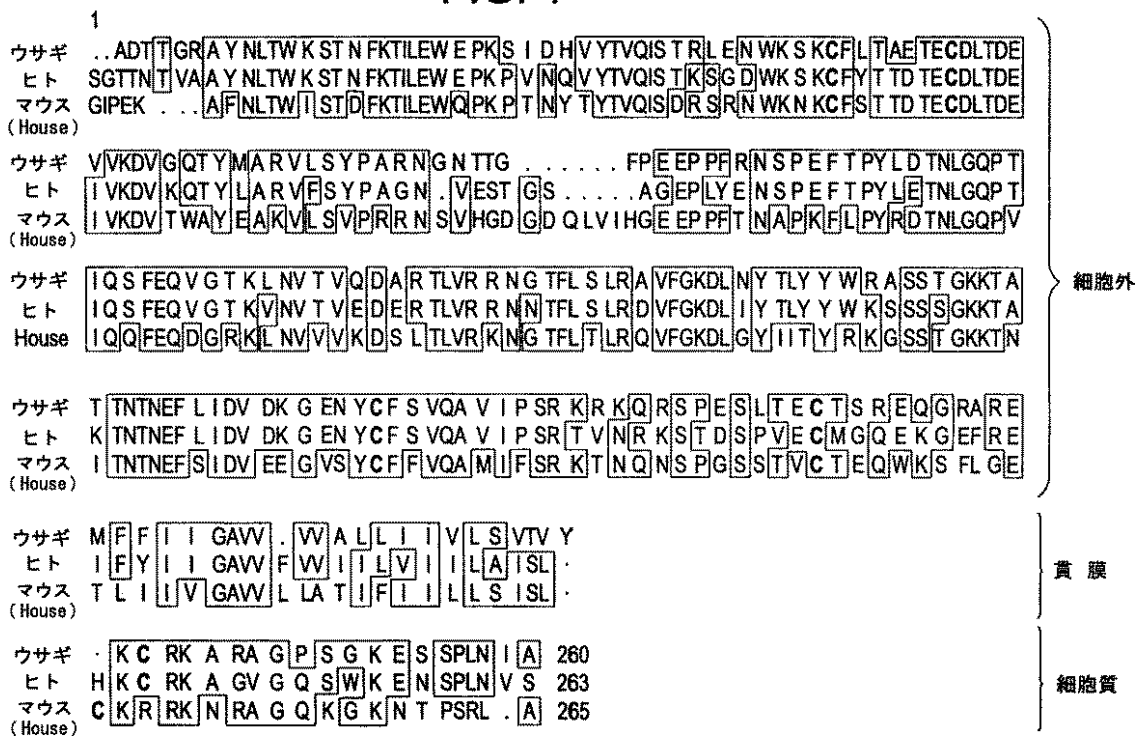
【図1】 ウサギ、ヒト、およびマウス組織因子タンパク質の配列相同性を比較した図である。図はPawashe et al., 1991, Thromb.Haemost. 66:315から引用した。

【図2】 本発明の方法を用いて選択したウサギ組織因子由来の候補免疫原性ペプチドのリストである。

【図3】 本発明の方法を用いて選択したヒト組織因子由来の候補免疫原性ペプチドのリストである。

【図1】

FIG. 1



【図2】

FIG. 2

ウサギ組織因子親水性の計算値
(.. \ tp 1 \ ntf-親水性.xls)

親水性分析による推定抗原決定基。 T. Hopp & K. Woods, PNAS 78(6):3824-28, 1981、の方法。ヘキサペプチドの移動平均。

マウスTF配列に対する相同性について分析した高親水性領域

(Pawashe et al., Thrombosis and Hemostasis 66(3):315-320, 1991)

およびヒトTFの結晶構造中の位置 (Harlos et al., Nature 370:662, 1994)

免疫原の候補ペプチド。最良の候補ペプチド (全長、親水性、相同性の欠如、分子中の位置)、太字。

全体的H平均：ヘキサペプチド平均はこのペプチド領域に対するものである。

#ミスマッチ：このペプチド領域におけるマウス配列と異なるウサギ配列のアミノ酸位置の#

TFのペプチド領域	全体的H平均	aaの#	#ミスマッチ	ホモロジーガス%	コメント
21L - 26K	0.688	6	1	83%	
36I - 42N	0.493	7	3	57%	
49L - 63K	0.752	15	4	73%	
84T - 95S	0.483	12	5	58%	マウスと最も異なる。 Msも余分に6 aaを持つ。 上端ループに位置 (ドメイン1F&G接続ループ)。
124T - 133K	0.495	10	5	50%	
157R - 164K	0.673	8	2	75%	
174L - 179K	1.044	6	3	50%	
190V - 202E	1.310	13	6	54%	非常に高いH値と低い相同性。 ドメイン2中のジスルフィドループF&G内に包含。
205T - 214R	1.185	10	7	30%	システインを含む。
243R - 253E	0.820	11	4	64%	最後のシステイン後の細胞質ドメインの10aa。

【図3】

FIG. 3

ヒト組織因子免疫原性ペプチド

(.. \tp 1 \hu ntf-親水性.xls)

親水性分析による推定抗原決定基。T. Hopp & K. Woods, PNAS 78(6):3824-28, 1981、の方法。ヘキサペプチドの移動平均。

マウスTF配列に対する相同性について分析した高親水性領域

(Pawashe et al., Thrombosis and Hemostasis 66(3):315-320, 1991)

およびヒトTFの結晶構造中の位置 (Harlos et al., Nature 370:662, 1994)

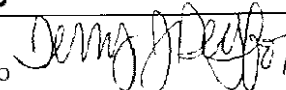
免疫原の候補ペプチド。太字の候補ペプチドは免疫に用いた86T-95Sおよび190V-202Eウサギ組織因子ペプチドに対応する。

全体的H平均：ヘキサペプチド平均はこのペプチド領域に対するものである。

#ミスマッチ：このペプチド領域におけるマウス配列と異なるヒト配列のアミノ酸位置の#

TFのペプチド領域	全体的H平均	aaの#	#ミスマッチ	ホモロジーガス%	コメント
23L - 28K	0.486	6	1	83%	VII結合には 22I, 24E
37Q - 44D	0.658	8	4	50%	VII結合には 37Q (44D, 45W)
51Y - 66D	0.799	16	1	94%	VII結合には 58D, 60T
84E - 95E	0.250	12	9	25%	マウスと最も異なる。 Msも余分に6aaを持つ。 上端ループに位置(ドメイン1F&G接続ループ)。
124N - 135R	0.943	12	4	67%	VII結合には 133L, 135R
158W - 169K	0.800	12	4	67%	157Y, 158W, 165K, 166K X活性化に重要な残基
176L - 181K	1.044	6	3	50%	
194P - 204D	0.865	11	7	36%	ドメイン2中のジスルフィド ループF&G内に包含。
208E - 216E	1.009	9	6	33%	システインを含む。
241S - 247K	0.748	7	2	71%	細胞質ドメイン
251G - 256E	0.5417	6	5	17%	細胞質ドメイン

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/17609
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 39/385; C12P 21/00; C07K 16/00, 17/00; G01N 33/48 US CL : 424/193.1, 435/70.21; 530/387.1, 388.1, 391.1; 702/19 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/193.1, 435/70.21; 530/387.1, 388.1, 391.1; 702/19 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HARLOS et al. Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor. NATURE. 25 August 1994, Vol. 370, pages 662-666, see entire article.	7, 9, 20, 25
A	HOPP, T.P. Use of Hydrophilicity Plotting Procedures to Identify Protein Antigenic Segments and Other Interaction Sites. METHODS IN ENZYMOLOGY. 1989, Vol. 178, pages 571-585, see entire article.	1-39
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 08 SEPTEMBER 2000		Date of mailing of the international search report 18 OCT 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer MARIANNE DIBRINO  Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/17609

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

STN (EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, CAPLUS, SCISEARCH), WEST 2.0

search terms: hydrophilicity, target protein(s), first species, peptide immunogen(s), peptide(s), proteins, tissue factor, Goldford, Marc and Triscott, Mark

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト(参考)
C 1 2 N 15/02		C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/02		G 0 1 N 33/53	D
	21/08	33/577	B
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	Z N A A
	33/577		C
F タ-ム(参考)	4B024 AA11 BA31 BA43 CA02 GA11		
	HA15		
	4B064 AG27 CA10 DA13		
	4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA13		
	BA14 BA15 BA16 BA17 BA18		
	BA19 BA42 CA40 DA76 DA86		
	EA50 FA10 FA71 FA74		

专利名称(译)	合成肽免疫原和抗体		
公开(公告)号	JP2003503040A	公开(公告)日	2003-01-28
申请号	JP2001505944	申请日	2000-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	西格玛-奥吉奇公司		
申请(专利权)人(译)	西格玛 - Aldrich公司		
[标]发明人	マークゴールドフォード マークエックス・トリスコット		
发明人	マーク・ゴールドフォード マーク・エックス・トリスコット		
IPC分类号	G01N33/53 A61P37/02 C07K14/705 C07K14/745 C07K16/18 C07K16/36 C07K16/40 C07K19/00 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/577		
CPC分类号	A61P37/02 C07K14/70596 C07K14/745 C07K16/36 C07K16/40		
FI分类号	C07K14/745 C07K16/18 C07K16/36 C07K19/00 C12P21/02.C C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/577. B C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.C		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA43 4B024/CA02 4B024/GA11 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/BA42 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA10 4H045/FA71 4H045/FA74		
优先权	60/141699 1999-06-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种从具有与第二物种的相似蛋白质不同的氨基酸序列的第一物种中选择靶蛋白的肽免疫原的方法。该方法包括从亲水性靶蛋白中选择肽片段，该亲水性靶蛋白的序列与相似蛋白的序列至少相差一个氨基酸。还提供了用结合了载体分子的所选免疫原产生的抗体。还提供了通过该方法制备的与人组织因子不交叉反应的兔组织因子抗体。

