

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-166924

(P2006-166924A)

(43) 公開日 平成18年6月29日(2006.6.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 6 3
C O 7 K 14/71 (2006.01)	C O 7 K 14/71	4 B O 6 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 107 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-19882 (P2006-19882)	(71) 出願人	596168317
(22) 出願日	平成18年1月27日 (2006.1.27)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願平7-524743の分割		GENENTECH, INC.
原出願日	平成7年3月17日 (1995.3.17)		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
(31) 優先権主張番号	08/215, 139		0-4990・サウス・サン・フランシス
(32) 優先日	平成6年3月18日 (1994.3.18)		コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	08/286, 846		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成6年8月5日 (1994.8.5)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	08/359, 705	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成6年12月20日 (1994.12.20)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト t r k 受容体および神経栄養因子インヒビター

(57) 【要約】

【課題】 神経栄養因子の生物学的活性の有効なインヒビターを提供すること。

【解決手段】 (a) 天然の配列のヒト t r k B または t r k C ポリペプチド (b) 天然の配列のヒト t r k B または t r k C ポリペプチドと少なくとも 95% のアミノ酸配列の同一性を有し、天然のヒト t r k B または t r k C ポリペプチドの生物学的特性を示し、かつヒトにおいて非免疫原性であるポリペプチド、および (c) 天然のヒト t r k B または t r k C ポリペプチドの生物学的特性を示し、かつヒトにおいて非免疫原性である (a) または (b) のポリペプチドの断片よりなる群から選択されるポリペプチドのアミノ酸配列を含む、単離したヒト t r k B または t r k C ポリペプチド。

【選択図】 無し

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

実施例に記載のポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の技術分野)

本発明は、ヒト *trk* 受容体に関する。本発明はさらに、神経栄養因子インヒビターおよび神経栄養因子の生物学的活性の抑制方法に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

神経栄養因子またはニューロトロフィンは、神経系の発達および維持に重要な役割を果たしている小さな塩基性タンパク質のファミリーである。このファミリーの成員の中で最初に同定され、おそらく最もよく理解されているのは神経成長因子 (NGF) であり、これは末梢神経系の知覚ニューロンおよび交感ニューロンを発達させるうえで顕著な作用を有する (レビ・モンタルチニ (Levi-Montalcini, R.) およびアンジェレッティ (Angelletti, P. U.), *Physiol. Rev.* 48、534 ~ 569 [1968]; テーネン (Thoenen, H.) ら、*Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 109、145 ~ 178 [1987])。 20

【0003】

NGF、およびマウス顎下腺からのホモログ (成熟した活性形はしばしば α -NGF または 2.5S NGF と呼ばれる) を含む多数の動物ホモログは長い間知られていたが、類似の機能を有し連続的に関連するが区別されるポリペプチドが同定されたのは最近になってからであった。

【0004】

一番目は脳由来神経栄養因子 (BDNF) と呼ばれる (現在はニューロトロフィン - 2 (NT-2) と呼ばれる) 因子であり、このものはレイブロック (Leibrock, J.) らによりクローニングされ配列決定されている (*Nature* 341、149 ~ 152 [1989])。この因子は最初ブタの脳から精製されたが (バード (Bard, T. A.) ら、*EMBO J.* 1、549 ~ 553 [1982])、NGF との相同性が明らかになったのはその cDNA がクローニングされ配列決定されてからであった。NGF と BDNF (NT-2) との全アミノ酸配列の同一性は約 50% である。この知見からレイブロックらは、構造および機能的特性を共通して有する神経栄養因子のファミリーの成員が BDNF および NGF に限られる理由はないと考えた。 30

【0005】

実際、 α -NGF および BDNF に密接に関連する別の神経栄養因子がその後発見されている。幾つかの研究グループは、最初ニューロン性因子 (neuronal factor) (NF) と呼ばれ、現在はニューロトロフィン - 3 (NT-3) と呼ばれている神経栄養因子を同定した (アーンフォアズ (Ernfors) ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87、5454 ~ 5458 (1990); ヘーン (Höhn) ら、*Nature* 344、339 [1990]; メゾンピエール (Maisonpiere) ら、*Science* 247、1446 [1990]; ローゼンタール (Rosenthal) ら、*Neuron* 4、767 [1990]; ジョーンズ (Jones) およびライヒャルト (Reichardt)、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87、8060 ~ 8064 (1990); カイショウ (Kai sho) ら、*FEBS Lett.* 266、187 [1990])。NT-3 は α -NGF および BDNF (NT-2) とアミ 40

【0006】

【数 1】

Sci. USA 87、5454 ~ 5458 (1990); ヘーン (Höhn) ら、*Nature* 344、339 [1990]; メゾンピエール (Maisonpiere) ら、*Science* 247、1446 [1990]; ローゼンタール (Rosenthal) ら、*Neuron* 4、767 [1990]; ジョーンズ (Jones) およびライヒャルト (Reichardt)、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87、8060 ~ 8064 (1990); カイショウ (Kai sho) ら、*FEBS Lett.* 266、187 [1990])。NT-3 は α -NGF および BDNF (NT-2) とアミ 50

ノ酸の約50%が共通する。ニューロトロフィン-4およびニューロトロフィン-5 (NT-4およびNT-5) が該ファミリーに最近加えられた (1994年11月15日に発行された米国特許第5,364,769号; ハルブック (Hallbook, F) ら、Neuron 6、845~858 [1991]; バークマイアー (Berkmeier, L. R.) ら、Neuron 7、857~866 [1991]; イプ (Ip) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89、3060~3064 [1992])。上記バークマイアーらにより最初に記載された哺乳動物分子はその後ゼノプス (Zenopus) NT-4 のホモログであることがわかり、通常、NT-4/5 と呼ばれる。

【0007】

ニューロトロフィンは、他のポリペプチド性の成長因子と同様、標的細胞の細胞表面上の受容体と相互作用することにより作用を及ぼす。現在の本発明者らの知見によると、2種類の膜貫通糖タンパク質がニューロトロフィンの受容体として働いている。平衡結合研究によれば、ニューロトロフィン応答性のニューロンは、NGF、BDNFおよびNT-3に 2×10^{-9} MのKDにて結合する共通の低分子量 (65~80 kDa) で低親和性の受容体 (LNGFR) ($p75^{NTR}$ または $p75$ と呼ばれる) と、高分子量 (130~150 kDa) で高親和性 (KDが 10^{-11} M) の受容体 (受容体チロシンキナーゼのtrkファミリーの成員である) とを有することが示された。

【0008】

最初のtrk受容体ファミリーの成員であるtrkAは、トロポミオシン配列の触媒ドメインへの転座によって引き起こされた癌遺伝子の形質転換の結果として最初同定された。その後の研究により、trkAはNGFのシグナル変換受容体 (signal transducing receptor) として同定された。その後、2つの他の関連する受容体、すなわちマウスおよびラットのtrkB (クライン (Klein) ら、EMBO J. 8、3701~3709 [1989]; ミドルマス (Middlemas) ら、Mol. Cell. Biol. 11、143~153 [1991]; 1991年11月6日に公開されたEP455,460号) およびブタ、マウスおよびラットのtrkC (ランバレ (Lamballe) ら、Cell 66、967~979 [1991]; 1993年1月13日に公開されたEP522,530号) がtrk受容体ファミリーの成員として同定された。これらtrk受容体の構造は極めて類似しているが、交互のスプライシングにより該ファミリーの複雑さは増大し、2つの知られた形態のtrkA、3つの知られた形態のtrkB (2つは機能性のチロシンキナーゼドメインを有しない) および少なくとも4つの形態のtrkC (幾つかは機能性のチロシンキナーゼドメインを有せず、2つはチロシンキナーゼドメインに小さな挿入を有する) が出現する。このことは図1にまとめて示してある。

【0009】

$p75$ 受容体およびtrk受容体の役割は反対である。trk受容体チロシンキナーゼは特定のニューロトロフィンに結合特異性を付与するうえで重要な役割を果たすことが一般に受け入れられているが、NT-3にのみ結合する (しかしながら、他のニューロトロフィンには結合しない) と報告されているtrkC発現細胞とは対照的に、trkAを発現する細胞株はNGFのみならずNT-3およびNT-4/5にも結合し (しかしながら、BDNFには結合しない)、trkBを発現する細胞はBDNF、NT-3、NT-4、およびNT-4/5に結合する (しかしながら、NGFには結合しない)。さらに、交互のスプライシング事象により生じる種々の形態のtrk受容体は異なる細胞内シグナル伝達経路を活性化することができ、それゆえ、おそらくインビボで異なる生理学的機能を媒体することがモデル系で示されている。所定のtrk受容体を発現する細胞が $p75$ の不在でニューロトロフィンに低または高親和性で結合するかどうかは明らかでない (ミーキン (Meakin) およびシューター (Shooter)、Trends Neurosci. 15、323~331 [1992])。

【0010】

種々の細胞株を用いた研究の刊行された結果は混乱しており、 $p75$ がニューロトロフ

10

20

30

40

50

インの応答性に本質的であるかまたは重要でないかいずれかであることを示唆している。p 75のみを発現する細胞株はNGF、BDNF、NT-3、およびNT-4に平衡時に同様の低親和性にて結合するが、結合速度定数は顕著に異なっている。その結果、p 75結合はすべてのニューロトロフィンの共通する性質であるが、p 75受容体はリガンド識別においても何らかの役割を果たしているかもしれないことが示唆されている(ロドリゲス-テバー(Rodriguez-Tebar)ら、EMBO J. 11、917~922[1992])。p 75受容体単独でニューロトロフィンの生物学的活性を媒体しうるかどうかは明らかでない。trk受容体は従来より生物学的に有意の神経栄養因子受容体と考えられてきたが、trkA発現を欠くメラノーマ細胞でNGFがなおおそらくp 75により生物学的挙動の顕著な変化をもたらしうることが最近示されている(ヘルマン(Herrmann)ら、Mol. Biol. Cell 4、1205~1216[1993])。最近、デービーズ(Davies)らは(Neuron 11、565~574[1993])、p 75遺伝子にヌル変異(null mutation)を有するトランスジェニックマウスのモデルにおいてニューロトロフィンへの胚ニューロンの生存応答を媒体するうえでのp 75の役割を調べた研究の結果を報告している。彼らは、p 75がNGF依存性の皮膚知覚ニューロンのNGFへの感受性を高めることを見いだした。

【0011】

ニューロトロフィンは、末梢および中枢ニューロンの、区別されるが重複するセットに作用を示す。これら作用は、発達しつつあるニューロンの生存を確実にするうえで決定的な役割を果たすものから(知覚ニューロンおよび交感ニューロンにおけるNGF)ニューロンの形態に対して比較的微妙な作用を及ぼすもの(プルキンエ細胞に対するNT-3)まである。これら作用は、ある種の神経変性疾患の治療のためにニューロトロフィンを使用するに際して関心がもたれてきた。ニューロトロフィンはまた炎症性疼痛の媒体にも影響を及ぼし、ある種の悪性腫瘍において過剰発現される。従って、ニューロトロフィンの生物学的活性のインヒビターは、疼痛の薬物療法や癌治療における化学療法剤として治療学的可能性を有する。

【0012】

種々のヒトの病理学的状態におけるtrkおよびニューロトロフィン作用の役割をより一層理解するため、ヒトtrkBおよびtrkCタンパク質を同定および単離し、とりわけどの形態のtrkBおよびtrkCがヒトで発現されているかを決定することが有用であろう。科学的小および治療学的な可能性とは別に、かかるヒトtrk受容体タンパク質はヒト神経栄養因子の精製、およびtrkBおよび/またはtrkCに結合しうるニューロトロフィンの上昇レベルまたは減少レベルに関連する種々のヒトの病理学的状態の診断に有用であろう。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

神経栄養因子の生物学的活性の有効なインヒビターを提供することがさらに望まれる。かかるインヒビターは、神経栄養因子に関連する病理学的状態の診断および治療に有用であろう。

【課題を解決するための手段】

【0014】

(発明の要約)

本発明によって、以下が提供される。

【0015】

(項目1) (a)天然の配列のヒトtrkBまたはtrkCポリペプチド
(b)天然の配列のヒトtrkBまたはtrkCポリペプチドと少なくとも95%のアミノ酸配列の同一性を有し、天然のヒトtrkBまたはtrkCポリペプチドの生物学的特性を示し、かつヒトにおいて非免疫原性であるポリペプチド、および
(c)天然のヒトtrkBまたはtrkCポリペプチドの生物学的特性を示し、かつヒト

において非免疫原性である (a) または (b) のポリペプチドの断片よりなる群から選択されるポリペプチドのアミノ酸配列を含む、単離したヒト t r k B または t r k C ポリペプチド。

【 0 0 1 6 】

(項目 2) チロシンキナーゼドメインを有する項目 1 のポリペプチド。

【 0 0 1 7 】

(項目 3) チロシンキナーゼドメインを欠如した項目 1 のポリペプチド。

【 0 0 1 8 】

(項目 4) 機能的な膜貫通ドメインを有する項目 1 のポリペプチド。

【 0 0 1 9 】

(項目 5) 機能的な膜貫通ドメインを欠如した項目 1 のポリペプチド。

10

【 0 0 2 0 】

(項目 6) 天然の配列のヒト t r k B または t r k C ポリペプチドの免疫グロブリン様ドメインであるか、またはストリンジェント条件下で天然の配列の t r k B または t r k C ポリペプチドの免疫グロブリン様ドメインをコードする D N A の相補鎖にハイブリダイズすることができる D N A によってコードされる項目 1 のポリペプチド断片。

【 0 0 2 1 】

(項目 7) 該免疫グロブリン様ドメインが、天然の配列の t r k B または t r k C の第二の免疫グロブリン様ドメインである、項目 6 のポリペプチド断片。

【 0 0 2 2 】

(項目 8) 配列番号 : 2 に提示するアミノ酸配列の 1 ~ 7 9 1 までのアミノ酸を含む項目 1 のポリペプチド。

20

【 0 0 2 3 】

(項目 9) アミノ酸残基 4 3 6 ~ 7 9 1 までを、アミノ酸配列 F V L F H K I P L D G で置換した項目 8 のポリペプチド。

【 0 0 2 4 】

(項目 1 0) 配列番号 : 2 に提示するアミノ酸配列のアミノ酸残基 3 9 9 ~ 4 2 3 までを欠如しているか、または不活化している項目 8 または項目 9 のポリペプチド。

【 0 0 2 5 】

(項目 1 1) グリコシル化していない項目 8 のポリペプチド。

30

【 0 0 2 6 】

(項目 1 2) 配列番号 : 6 に提示するアミノ酸配列の 1 ~ 8 0 8 までのアミノ酸を含む項目 1 のポリペプチド。

【 0 0 2 7 】

(項目 1 3) アミノ酸残基 4 9 8 ~ 8 0 8 までを配列番号 : 8) に示すアミノ酸配列で置換した項目 1 2 のポリペプチド。

【 0 0 2 8 】

(項目 1 4) 配列番号 : 6 に提示するアミノ酸配列の 3 7 1 ~ 3 7 9 位までのアミノ酸残基 E S T D N F I L F を欠如している項目 1 2 または項目 1 3 のポリペプチド。

【 0 0 2 9 】

(項目 1 5) 配列番号 : 6 に提示するアミノ酸配列の 6 8 1 ~ 6 9 4 位までのアミノ酸残基 L F N P S G N D F C I W C E を欠如している項目 1 2 のポリペプチド。

40

【 0 0 3 0 】

(項目 1 6) 配列番号 : 6 に提示するアミノ酸配列のアミノ酸残基 3 9 9 ~ 4 2 2 までを欠如している項目 1 2 ~ 1 5 のいずれか 1 のポリペプチド。

【 0 0 3 1 】

(項目 1 7) グリコシル化していない項目 1 2 のポリペプチド。

【 0 0 3 2 】

(項目 1 8) a) 配列番号 : 2 に提示するアミノ酸配列におけるアミノ酸残基約 2 7 0 ~ アミノ酸残基約 3 3 4 まで、

50

b) 配列番号：6 に提示するアミノ酸配列におけるアミノ酸残基約 282 ~ アミノ酸残基約 345 まで、および

c) a) または b) のポリペプチドをコードする核酸の相補鎖にストリンジェント条件下でハイブリダイズすることができる核酸によりコードされるよりなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【0033】

(項目19) 免疫グロブリンアミノ酸配列に共有結合した t r k A の第二の免疫グロブリン様ドメインを含むポリペプチド。

【0034】

(項目20) 該免疫グロブリンアミノ酸配列が免疫グロブリン定常ドメインをコードする項目19のポリペプチド。 10

【0035】

(項目21) 項目1のポリペプチドに特異的に結合することができる抗体。

【0036】

(項目22) 項目21の抗体を産生するハイブリドーマ細胞株。

【0037】

(項目23) 項目1のポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離した核酸分子。

【0038】

(項目24) 項目19のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、単離した核酸分子。 20

【0039】

(項目25) 形質転換した宿主細胞により認識される調節配列に作動可能に連結した項目23の核酸分子を含む発現ベクター。

【0040】

(項目26) 形質転換した宿主細胞により認識される調節配列に作動可能に連結した項目24の核酸分子を含む発現ベクター。

【0041】

(項目27) 項目25のベクターで形質転換した宿主細胞。

【0042】

(項目28) 項目26のベクターで形質転換した宿主細胞。 30

【0043】

(項目29) 項目1のヒト t r k B または t r k C ポリペプチドをコードする核酸分子の使用方法であって、形質転換した宿主細胞によって認識される調節配列に作動可能に連結した該核酸分子を含むベクターで形質転換した培養宿主細胞中で該核酸分子を発現させ、ついで該コードポリペプチドを宿主細胞から回収することを特徴とする方法。

【0044】

(項目30) 項目1のヒト t r k B または t r k C ポリペプチドを産生する方法であって、該ポリペプチドをコードする核酸を含む細胞の DNA 中に、転写に影響を及ぼすに十分な近接および方向にて転写制御要素を挿入することを特徴とする方法。 40

【0045】

(項目31) ヒト t r k B または t r k C ポリペプチドの存在を決定する方法であって、該ポリペプチドをコードする DNA を試験試料核酸とハイブリダイズさせ、ついでヒト t r k B または t r k C ポリペプチド DNA の存在を決定することを特徴とする方法。

【0046】

(項目32) ヒト t r k B または t r k C ポリペプチドをコードする核酸により核酸ポリメラーゼ反応をプライミングすることを特徴とする、核酸試験試料を増幅する方法。

【0047】

(項目33) 天然のヒト t r k B または t r k C ポリペプチドの抗体アンタゴニスト。

【0048】

(項目34) ヒト t r k B または t r k C ポリペプチドの全部または一部を含むポリペプチドをコードする核酸配列または関連核酸配列の検出方法であって、該核酸配列の少なくとも一部に特異的に結合する検出可能なマーカーに該核酸配列を接触させ、ついでそのように結合したマーカーを検出することを特徴とする方法。

【0049】

本発明は、ヒトからの天然にみられる形態の t r k B 受容体および t r k C 受容体の同定、クローニングおよび配列決定、およびノーザンおよびインシトゥハイブリダイゼーション分析による種々の組織中の発現パターンの決定となった成功した研究に基づいている。本発明はさらにヒト t r k C 受容体において行った構造 - 機能突然変異誘発研究に基づいており、この研究の結果、受容体結合および / または生物学的活性に必要な領域が同定された。本発明はさらに、ヒト t r k 受容体の細胞外ドメインの免疫グロブリンキメラ (イムノアドヒェン (i m m u n o a d h e s i n)) としての発現が、対応する天然の受容体の結合特異性を保持しその同族ニューロトロフィンの生物学的活性を阻止しうる可溶性分子を導くという実験的知見に基づいている。

10

【0050】

一つの側面において、本発明は、

- (a) 天然配列のヒト t r k B または t r k C ポリペプチド、
- (b) 天然配列のヒト t r k B または t r k C ポリペプチドと少なくとも 95 % のアミノ酸配列の同一性を有し、天然のヒト t r k B または t r k C ポリペプチドの生物学的特性を示し、かつヒトにおいて非免疫原性であるポリペプチド、および
- (c) 天然のヒト t r k B または t r k C ポリペプチドの生物学的特性を示し、かつヒトにおいて非免疫原性である (a) または (b) のポリペプチドの断片よりなる群から選ばれた単離ヒト t r k B または t r k C ポリペプチドに関する。

20

【0051】

他の側面において、本発明は、上記ヒト t r k B または t r k C ポリペプチドのいずれかに特異的に結合しうる抗体、およびかかる抗体を産生するハイブリドーマ細胞株に関する。

【0052】

さらに他の側面において、本発明は、上記で定義するヒト t r k B または t r k C ポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離核酸分子に関する。

30

【0053】

別の側面において、本発明は、形質転換した宿主細胞により認識される調節配列に作動可能に連結された上記核酸分子を含む発現ベクターに関する。

【0054】

さらに別の側面において、本発明は、上記発現ベクターで形質転換された宿主細胞に関する。

【0055】

異なる側面において、本発明は、上記で定義するヒト t r k B または t r k C ポリペプチドをコードする核酸分子の使用方法であって、形質転換した宿主細胞により認識される調節配列に作動可能に連結された該核酸分子を含むベクターで形質転換された培養宿主細胞中で該核酸分子を発現させ、ついで該コードポリペプチドを宿主細胞から回収することを経験とする方法に関する。

40

【0056】

本発明はさらに、上記で定義するヒト t r k B または t r k C ポリペプチドを産生する方法であって、該ポリペプチドをコードする核酸を含む細胞の D N A 中に、転写に影響を及ぼすに十分な近接および方向にて転写制御要素を挿入することを経験とする方法に関する。

【0057】

本発明はまた、ヒト t r k B または t r k C ポリペプチドの存在を決定する方法であっ

50

て、かかるポリペプチドをコードするDNAを試験試料の核酸とハイブリダイズさせ、ついでヒトtrkBまたはtrkCポリペプチドDNAの存在を決定することを特徴とする方法をも提供する。

【0058】

異なる側面において、本発明は、上記で定義するヒトtrkBまたはtrkCポリペプチドをコードする核酸に核酸ポリメラーゼ反応をプライミングする(priming)ことを特徴とする、核酸試験試料の増幅方法に関する。

【0059】

本発明はまた、上記で定義する天然のヒトtrkBまたはtrkCポリペプチドのアンタゴニストに関する。

10

【0060】

別の態様において、本発明は、(a)上記で定義するヒトtrkBまたはtrkCポリペプチド、(b)天然のヒトtrkBまたはtrkCポリペプチドのアンタゴニスト、または(c)(a)または(b)のポリペプチドに特異的に結合する抗体を薬理学的に許容しうる担体とともに含む医薬組成物に関する。

【0061】

さらに別の側面において、本発明は、免疫グロブリン配列に結合した、天然の神経栄養因子に結合しうるtrk受容体アミノ酸配列を含む、キメラポリペプチドに関する。特別の態様において、このキメラポリペプチドは、免疫グロブリン配列に結合した、天然の神経栄養因子に結合しうるtrk受容体アミノ酸配列の融合体を含む、イムノアドヒーションである。trk受容体は好ましくはヒトの受容体であり、融合は免疫グロブリンの定常ドメイン配列、さらに好ましくは免疫グロブリン重鎖の定常ドメイン配列との間で行われる。特定の態様において、2つのtrk受容体-免疫グロブリン重鎖融合体の会合(たとえば、ジスルフィド結合による共有結合により)の結果、ホモ二量体の免疫グロブリン様構造となる。免疫グロブリン軽鎖はさらに、ジスルフィド結合した該二量体のtrk受容体-免疫グロブリンキメラの一方または両者と会合してホモ三量体またはホモ四量体構造を生成してよい。

20

【0062】

別の側面において、本発明は、天然の神経栄養因子に結合しうるtrk受容体アミノ酸配列および異なる結合配列を有する2特異的な分子に関する。特別の態様において、かかる2特異的な分子は、免疫グロブリン配列への異なる結合配列の融合体に共有結合した免疫グロブリン配列への、神経栄養因子に結合しうるtrk受容体アミノ酸配列の融合体からなるイムノアドヒーションである。異なる結合配列は、たとえば同じまたは異なる神経栄養因子に結合しうる異なるtrk受容体アミノ酸配列であってよく、または第一のtrk受容体アミノ酸配列が結合する神経栄養因子を発現するタイプの細胞上の決定基を認識してよい。

30

【0063】

好ましい態様において、各結合配列は免疫グロブリン重鎖の定常ドメイン配列に融合し、これら2つの融合体はジスルフィド結合してヘテロ二量体構造を提供する。免疫グロブリン軽鎖が免疫グロブリン様分子の一方のアームまたは両方のアームにおける結合配列-免疫グロブリン定常ドメイン融合体と会合して、ジスルフィド結合したヘテロ三量体またはヘテロ四量体構造を提供してもよい。

40

【0064】

本発明はさらに、上記モノ特異的または2特異的なイムノアドヒーションまたは本発明の範囲内の他の2特異的なポリペプチドのキメラ鎖をコードする核酸、かかる分子をコードするDNAを含む発現ベクター、形質転換した宿主細胞、および形質転換宿主細胞を培養することによる該分子の製造方法に関する。

【0065】

別の側面において、本発明は、精製しようとする神経栄養因子に結合しうるtrk受容体アミノ酸配列の免疫グロブリン配列への融合体からなるイムノアドヒーション上に吸着さ

50

せることによる神経栄養因子の精製方法に関する。t r k 受容体配列は、精製しようとする神経栄養因子の採取源と同じ種のものであるのが好ましい。

【0066】

さらに別の側面において、本発明は、ヒト t r k B または t r k C タンパク質のすべてまたは一部を含むポリペプチド分子をコードする核酸配列または関連核酸配列の検出方法であって、該核酸配列の少なくとも一部に特異的に結合する検出可能なマーカーに該核酸配列を接触させ、ついでそのように結合したマーカーを検出することを特徴とする方法に関する。

【0067】

神経栄養因子の過剰発現または過小発現を特徴とする病理学的状態の診断方法は、該神経栄養因子を含む生物学的試料を該神経栄養因子に結合しうる検出可能に標識した t r k 受容体ポリペプチドと接触させ、ついでそのように結合したマーカーを検出することを特徴とする。

【0068】

本発明はさらに、薬理的に許容しうる担体とともに、上記モノ特異的または2特異的なキメラポリペプチドの治療学的または予防学的有効量を含む医薬組成物に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0069】

(発明の詳細な記載)

(A. 定義)

「ニューロトロフィン」および「神経栄養因子」なる語およびそれらの文法的変形は互換的に用いられており、神経成長因子 (NGF) および連続的に関連するホモログを含むポリペプチドのファミリーをいう。NGF、脳由来成長因子 (BDNF、NT-2 としても知られる)、ニューロトロフィン-3 (NT-3)、およびニューロトロフィン-4 およびニューロトロフィン-5 (NT-4/5) が現在までにこのファミリーの成員として同定されている。

【0070】

「ニューロトロフィン」および「神経栄養因子」なる語には、天然の採取源から精製されたか、組換えDNA技術の方法、化学的合成、またはこれらまたは他の方法との組み合わせにより合成されたかに拘わらず、いずれかの(ヒトまたは非ヒト)動物種の天然のニューロトロフィン、およびその機能性の誘導体が含まれる。「天然」または「天然配列」の神経栄養因子またはニューロトロフィンは、天然にみられる切断されたおよび変異体の形態および天然にみられる対立遺伝子変異体を含む、ヒトまたは非ヒト動物種において天然に存在するニューロトロフィンのアミノ酸配列を有する。

【0071】

「t r k」、「t r k ポリペプチド」、「t r k 受容体」およびそれらの文法的変形は互換的に用いられており、少なくとも一つの天然の神経栄養因子に結合しうる、受容体チロシンキナーゼスーパーファミリーのポリペプチドをいう。このファミリーに現在のところ同定されている成員は、t r k A (p140^{t r k A})、t r k B、および t r k C であるが、この定義は、この受容体ファミリーの成員として将来同定されるかもしれないポリペプチドを本質的に含む。「t r k」、「t r k ポリペプチド」および「t r k 受容体」なる語は、このファミリー内の特定の成員を示す接辞大文字(たとえば、A、B または C)の有無に拘わらず、完全長の受容体、その切断された形態および変異体の形態(別の仕方のスプライシングおよび/または挿入により生じるものなど)、および天然にみられる対立遺伝子変異体、並びにかかる受容体の機能性の誘導体を含む、いずれかの動物(たとえば、ヒト、マウス、ウサギ、ブタ、ウマなど)からの「天然」または「天然配列」の受容体(これら用語は互換的に用いられる)を含む。

【0072】

それゆえ、「天然」または「天然配列」のヒト t r k B または t r k C ポリペプチドは、完全長の天然ヒト t r k B および t r k C、完全長の天然ヒト t r k B および t r k C

10

20

30

40

50

の切断されたチロシンキナーゼ (TK) ドメインの欠失した (スプライスされた) 形態、および完全長または切断された天然ヒト *trkC* の挿入変異体 (該挿入は TK ドメイン内かまたは細胞外ドメイン内にある)、および将来同定されるかもしれない他の天然にみられるヒト *trkB* または *trkC* ポリペプチドを含む、ヒトにおいてみられるあらゆる形態の *trkB* または *trkC* 受容体のアミノ酸配列を有する。動物種にみられる *trk* ポリペプチドと比較したヒト *trk* ポリペプチドの種々の同定形態の図表を図 4 に示す。シグナル配列が先行した後、完全長の天然 *trkA*、*trkB* および *trkC* 受容体の細胞外ドメインは、種々の他のタンパク質において同定された相同なまたは他の仕方で類似の構造との関連で定められた 5 つの機能性ドメインを有する (図 11 参照)。これらドメインは、成熟 *trk* 受容体のアミノ酸配列の N 末端から、1) ヒト *trkA* の 1 位のアミノ酸から約 32 位のアミノ酸、ヒト *trkB* の 1 位のアミノ酸から約 36 位のアミノ酸、およびヒト *trkC* の 1 位のアミノ酸から約 48 位のアミノ酸にわたる第一のシステインに富むドメイン; 2) *trkA* 中の約 33 位のアミノ酸から約 104 位のアミノ酸、*trkB* 中の約 37 位のアミノ酸から約 108 位のアミノ酸、および *trkC* 中の約 49 位のアミノ酸から約 120 位のアミノ酸にわたるロイシンに富むドメイン; 3) *trkA* 中の約 105 位のアミノ酸から約 157 位のアミノ酸、*trkB* 中の約 109 位のアミノ酸から約 164 位のアミノ酸、および *trkC* 中の約 121 位のアミノ酸から約 177 位のアミノ酸にわたる第二のシステインに富むドメイン; 4) *trkA* 中の約 176 位のアミノ酸から約 234 位のアミノ酸、*trkB* 中の約 183 位のアミノ酸から約 239 位のアミノ酸、および *trkC* 中の約 196 位のアミノ酸から約 257 位のアミノ酸にわたる第一の免疫グロブリン様ドメイン; および 5) *trkA* 中の約 264 位のアミノ酸から約 330 位のアミノ酸、*trkB* 中の約 270 位のアミノ酸から約 334 位のアミノ酸、および *trkC* 中の約 288 位のアミノ酸から約 351 位のアミノ酸にわたる第二の免疫グロブリン様ドメインとして示されている。「天然」または「天然配列」のヒト *trkB* または *trkC* なる語は、これら受容体のいずれかの形態の天然にみられる対立遺伝子変異体を含む。ヒト *trkB* の 433 位のアミノ酸は M または V として種々に決定されていることが注目される。両配列とも本発明の範囲に本質的に包含される。

10

20

30

40

50

【0073】

天然ポリペプチドの「機能性誘導体」とは、天然のポリペプチドと共通の定性的な生物学的特性を有する化合物をいう。神経栄養因子の機能性誘導体は、天然の (ヒトまたは非ヒト) 神経栄養因子と共通の定性的な生物学的特性を有する化合物である。同様に、*trk* 受容体の機能性誘導体は、天然の (ヒトまたは非ヒト) *trk* 受容体と共通の定性的な生物学的特性を有する化合物である。「機能性誘導体」には、対応する天然のポリペプチドと共通する生物学的活性を有することを条件として、いずれかの動物種 (ヒトを含む) からの天然のポリペプチドの断片、および天然 (ヒトおよび非ヒト) ポリペプチドおよびその断片の誘導体を含むが、これらに限られるものではない。

【0074】

「断片」は、成熟した天然の神経栄養因子または *trk* 受容体ポリペプチドの配列内の領域を含む。*trk* 受容体の好ましい断片には、完全長の天然または変異体 *trk* 受容体の少なくとも第二の免疫グロブリン様ドメインが含まれる。

【0075】

「誘導体」なる語は、天然ポリペプチドのアミノ酸配列およびグリコシル化変異体、および共有結合修飾をいうものとして用いられ、一方、「変異体」なる語は、この定義内でアミノ酸配列およびグリコシル化変異体をいう。

【0076】

「機能性誘導体」の定義との関連における「生物学的特性」は、1) 天然のポリペプチド (たとえば、ニューロトロフィンまたは *trk* 受容体) の少なくとも一つのエピトープとの免疫学的交差反応性か、または 2) 天然のポリペプチド (たとえば、ニューロトロフィンまたは *trk* 受容体) と定性的に共通する少なくとも一つの接着、制御またはエフェクター機能の所持として定義される。

【 0 0 7 7 】

好ましくは、機能性誘導体は、天然のポリペプチドと少なくとも約 65 % のアミノ酸配列の同一性、さらに好ましくは約 75 % のアミノ酸配列の同一性、さらに一層好ましくは少なくとも約 85 % のアミノ酸配列の同一性、最も好ましくは少なくとも約 95 % のアミノ酸配列の同一性を有するポリペプチドである。本発明との関連においては、天然配列のヒト t r k B または t r k C ポリペプチドの機能性誘導体は、好ましくは、その同族ヒト受容体と少なくとも約 95 % のアミノ酸配列の同一性を示し、ヒトにおいて免疫原性でないか、またはかかる天然受容体と少なくとも約 95 % のアミノ酸配列の同一性を示し、ヒトにおいて免疫原性でない天然ヒト t r k B または t r k C 受容体またはポリペプチドの断片である。天然の完全長の t r k 受容体の断片は、リガンド結合および/または生物学的活性に必要な細胞外ドメイン内のドメインを保持しているのが好ましい。上記で検討したように、タンパク質の t r k ファミリーの細胞外ドメインは 5 つのドメイン、すなわち第一のシステインに富むドメイン、ロイシンに富むドメイン、第二のシステインに富むドメイン、および 2 つの免疫グロブリン様ドメインから構築されている。機能性誘導体には、天然の t r k 受容体の少なくとも第二の免疫グロブリン様ドメイン、または天然の t r k 受容体の第二の免疫グロブリン様ドメインと少なくとも約 95 % の配列同一性を示す配列が含まれ、その際、t r k 受容体は好ましくは t r k B または t r k C である。

10

【 0 0 7 8 】

アミノ酸配列の同一性またはホモロジーは、本明細書において、配列を整列させ必要ならギャップを導入して最大のホモロジーパーセントを達成するが保存的な置換は配列同一性の一部とは考えないようにした後、対応する天然のポリペプチド配列の残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。N 末端または C 末端における伸長および挿入はいずれも同一性またはホモロジーを減少させるものとは考えられないであろう。

20

【 0 0 7 9 】

本明細書において使用する免疫学的に交差反応性であるとは、候補（ポリ）ペプチドが、知られた活性な分子に対して産生されたポリクローナル抗体または抗血清との活性を有する対応する天然のポリペプチドの定性的な生物学的活性を競合的に抑制しうることを意味する。かかる抗体および抗血清は、ヤギやウサギなどの動物にたとえば完全フロイントアジュバント中の知られた天然の神経栄養因子または t r k 受容体を皮下注射し、ついで不完全フロイントアジュバント中にてブースター腹腔内または皮下注射する通常の方法により調製する。

30

【 0 0 8 0 】

本発明との関連における「単離」核酸またはポリペプチドは、核酸またはポリペプチドの動物またはヒト採取源中に存在する混入核酸またはポリペプチドから同定および分離された核酸またはポリペプチドである。核酸またはポリペプチドは、以下の診断アッセイの検討のところで記載しさらに定義する標識を用い、診断またはプローブの目的のために標識することができる。

【 0 0 8 1 】

「単離ヒト t r k B および t r k C ポリペプチド」なる語および文法的なその変形は、該ポリペプチドを単離したヒトその他の採取源中に存在する混入ポリペプチドから分離されたヒト t r k B および t r k C ポリペプチド（上記定義による）、および少なくとも一つの天然の神経栄養因子に結合する定性的能力を保持しヒトにおいて免疫原性でない限りにおいて、かかる天然配列ポリペプチドの断片、アミノ酸配列変異体、グリコシル化変異体および誘導体をいう。かかる単離ヒト t r k B および t r k C ポリペプチドは、天然の完全長のヒト t r k B および t r k C 受容体、天然にみられる切断された形態および別の仕方のスプライシングおよび天然にみられる対立遺伝子により生じるアミノ酸（挿入）変異体を含む、天然配列のヒト t r k B および t r k C を含む。天然配列の t r k B または t r k C ポリペプチドのアミノ酸配列変異体は、その天然対応物と少なくとも約 95 % のホモロジー、さらに好ましくは少なくとも約 98 % のホモロジーを示し、ヒトに対して非

40

50

免疫原性である。最も好ましくは、単離された天然のヒト t r k B および t r k C ポリペプチドの定義におけるアミノ酸配列変異体は、チロシンキナーゼドメインの全天然配列および天然にみられるスプライスされたヒト t r k B または t r k C ポリペプチドにおいて認められる挿入を保存している。この定義にはさらに、少なくとも一つの天然の神経栄養因子に結合する定性的な能力を保持している限りにおいて、上記天然ポリペプチドの断片およびそのアミノ酸配列変異体並びにそのグリコシル化変異体および誘導体を含む。

【 0 0 8 2 】

一般に、「アミノ酸配列変異体」とは、参照（たとえば、天然配列）ポリペプチドと比較した場合にアミノ酸配列に若干の相違を有する分子をいう。アミノ酸の変化は、天然のアミノ酸配列の置換、挿入、欠失またはかかる変化の所望な組み合わせであってよい。

10

【 0 0 8 3 】

置換変異体は、天然配列中の少なくとも一つのアミノ酸残基が除去され、その同じ位置に異なるアミノ酸が挿入されたものである。置換は単一であってよく、その場合は分子中のただ一つのみのアミノ酸が置換され、または複数であってよく、その場合は2またはそれ以上のアミノ酸が同分子中で置換される。

【 0 0 8 4 】

挿入変異体は、天然のアミノ酸配列中の特定の位置にあるアミノ酸のすぐ隣に1またはそれ以上のアミノ酸が挿入されたものである。アミノ酸のすぐ隣とは、該アミノ酸の - カルボキシルまたは - アミノ官能基のいずれかに結合されることを意味する。

【 0 0 8 5 】

欠失変異体は、天然アミノ酸配列中の1またはそれ以上のアミノ酸が除去されたものである。通常、欠失変異体は該分子の特定領域中で1または2以上のアミノ酸が欠失されるであろう。

20

【 0 0 8 6 】

「グリコシル化変異体」は、対応する天然のポリペプチドとは異なるグリコシル化プロフィールを有するポリペプチドをいうのに使用される。ポリペプチドのグリコシル化は、一般にN - 結合またはO - 結合のいずれかである。N - 結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合をいう。トリペプチド配列、アスパラギン - X - セリンおよびアスパラギン - X - トレオニン（式中、Xはプロリン以外のアミノ酸）は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合の認識配列である。O - 結合グリコシル化とは、糖のN - アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースの一つのヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはトレオニンへの結合をいうが、5 - ヒドロキシプロリンまたは5 - ヒドロキシリシンもまたO - 結合グリコシル化に関与しうる。天然の対応物と比較して変異体または断片中に存在する炭水化物部分の位置および/または性質におけるいかなる相違も本発明の範囲に包含される。

30

【 0 0 8 7 】

天然ポリペプチドのグリコシル化パターンの決定は、H P A E クロマトグラフィー [ハーディー (Hardy, M. R.) ら、Anal. Biochem. 170、54 ~ 62 (1988)]、グリコシル結合組成を決定するメチル化分析 [リンドバーグ (Lindberg, B.)、Meth. Enzymol. 28、178 ~ 195 (1972)]、ワエー (Waeghe, T. J.) ら、Carbohydr. Res. 123、281 ~ 304 (1983)]、NMRスペクトル、マススペクトルなどを含むよく知られた分析化学技術により行うことができる。

40

【 0 0 8 8 】

「共有結合誘導体」は、有機のタンパク質性または非タンパク質性の誘導体化剤による天然ポリペプチドまたはその断片の修飾、および翻訳後修飾を含む。共有結合修飾は、一般に選択された側鎖または末端残基と反応しうる有機誘導体化剤と標的アミノ酸残基を反応させるか、または選択された組換え宿主細胞中で機能する翻訳後修飾の動力化メカニズム (harnessing mechanism) により導入される。ある種の翻訳後修飾は、発現されたポリペプチドに対する組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミン

50

およびアスパラギン残基は、しばしば、翻訳後に脱アミド化されて対応グルタミン酸およびアスパラギン酸になる。別の場合には、これら残基は穏やかな酸性条件下で脱アミド化される。これらいずれの形態の残基も本発明の *trk* 受容体ポリペプチド中に存在している。他の翻訳後修飾としては、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリン、チロシンまたはトレオニン残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖の γ -アミノ基のメチル化が挙げられる [クレイトン (T. E. Creighton)、*Proteins: Structure and Molecular Properties*、フリーマン、サンフランシスコ、79~86頁(1983)]。

【0089】

「コードするDNA配列」、「コードするDNA」および「コードする核酸」なる語は、デオキシリボ核酸の鎖に沿ったデオキシリボヌクレオチドの順序または配列をいう。これらデオキシリボヌクレオチドの順序はポリペプチド鎖に沿ったアミノ酸の順序を決定する。このようにDNA配列はアミノ酸配列をコードする。

10

【0090】

「複製可能な発現ベクター」および「発現ベクター」なる語は、その中に一片の外来DNAが挿入された通常二本鎖の一片のDNAをいう。外来DNAは、宿主細胞中に天然にはみられない異種DNAとして定義される。ベクターは適当な宿主細胞中に外来または異種DNAを移すのに用いる。いったん宿主細胞に入ったら、ベクターは宿主の染色体DNAとは独立に複製することができ、ベクターおよびその挿入(外来)DNAの幾つかのコピーが生成する。加えて、ベクターは外来DNAをポリペプチドに翻訳するのを可能にするのに必要な要素を含有している。かくして外来DNAによりコードされるポリペプチドの多くの分子を速やかに合成することができる。

20

【0091】

「調節配列」なる語は、特定の宿主生物中において作動可能に連結されたコード配列の発現に必要なDNA配列をいう。原核生物に適した調節配列は、たとえば、プロモーター、任意にオペレーター配列、リボソーム結合部位、およびおそらく他の未だよく理解されていない配列を含む。真核生物細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーを利用することが知られている。

【0092】

核酸は、それが他の核酸配列と機能的な関係に置かれた場合に「作動可能に連結した」といわれる。たとえば、プレ配列または分泌リーダーは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合に該ポリペプチドのDNAに作動可能に連結している；プロモーターまたはエンハンサーは、それがコード配列の転写をさせる場合に該コード配列に作動可能に連結している；またはリボソーム結合部位は、それが翻訳を容易にするような位置にある場合にコード配列に作動可能に連結している。一般に、「作動可能に連結した」とは、連結されたDNA配列が近接しており(contiguous)、分泌リーダーの場合には近接しておりかつ読み取り枠にある。しかしながら、エンハンサーは近接している必要はない。連結は都合のよい制限部位におけるライゲーションにより行う。そのような部位が存在しない場合は、常法に従って合成のオリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを用いる。

30

40

【0093】

本発明との関連における「細胞」、「細胞株」および「細胞培養」なる表現は互換的に用いられ、これらはすべて子孫を含む。それゆえ、「形質転換体」および「形質転換された(宿主)細胞」なる語は、初代の対象細胞および継代の数とは無関係に該細胞に由来する培養を含む。すべての子孫は、ゆっくりとしたまたは偶然による突然変異のためにDNAの内容が正確に同一ではないかもしれないことも理解される。最初に形質転換した細胞に対してスクリーニングして同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫は包含される。異なる表示を意図する場合も文脈から明らかであろう。

【0094】

「外因性」要素は、本明細書において、細胞にとって外来性の核酸、または細胞にとっ

50

て同種ではあるが通常みられない宿主細胞核酸内の位置にある核酸を意味するものと定義される。

【0095】

抗体 (Ab) および免疫グロブリン (Ig) は、同じ構造特性を有する糖タンパク質である。抗体は特定の抗原に対する結合特異性を示すが、免疫グロブリンは抗体と抗原特異性を欠く他の抗体様分子との両方を含む。後者のポリペプチドは、たとえば、リンパ系により低レベルで産生され、ミエローマにより増加レベルで産生される。

【0096】

天然の抗体および免疫グロブリンは、通常、2つの同一の軽 (L) 鎖および2つの同一の重 (H) 鎖からなる約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は重鎖に一つの共有ジスルフィド結合により連結されるが、ジスルフィド結合の数は免疫グロブリンの異なるイソタイプの重鎖により変わる。各重鎖および軽鎖はまた、規則的な空間を隔てた鎖内のジスルフィド架橋を有する。各重鎖はその一端に可変ドメイン (V_H) を有し、それに続いて幾つかの定常ドメインを有する。各軽鎖は一端に可変ドメイン (V_L) を有し、他端に定常ドメインを有する；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一の定常ドメインと並列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと並列する。特別のアミノ酸残基が軽鎖および重鎖の可変ドメイン間の界面を形成していると思われる [クロチア (Clothia) ら、J. Molec. Biol. 186、651~663 (1985)；ノボトニー (Novotny) およびヘイバー (Haber)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82、4592~4596 (1985)]。

【0097】

可変性は抗体の可変領域内に均等に分布しているわけではない。それは、軽鎖および重鎖可変領域の両方において相補性決定領域 (CDR) または超可変領域とよばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインにおいて一層高度に保存された部分はフレームワーク (FR) とよばれる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、大体においてシート構造をとる4つのFRが、ある場合には該シート構造の一部を形成しながら該シート構造を連結するループを形成する3つのCDRにより連結されてなる。各鎖中のCDRはFR領域によって極めて近接して保持され、他方の鎖からのCDRとともに抗体の抗原結合部位の形成に寄与する [カバット (Kabatt, E. A.) ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest ナショナル・インスティテュート・オブ・ヘルス (National Institute of Health)、ベセスダ、メリーランド (1987)]。定常ドメインは抗体の抗原への結合には直接関与しないが、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与などの種々のエフェクター機能を示す。

【0098】

抗体をパイン消化すると、それぞれ単一の抗原結合部位を有するFabフラグメントとよばれる2つの同一の抗原結合断片、および残りの「Fc」フラグメント (その名称は容易に結晶化する能力を反映している) が生成する。ペプシン処理をすると、2つの抗原結合部位を有し、なお抗原と架橋しうる $F(ab')_2$ フラグメントが得られる。

【0099】

「Fv」は、完全な抗原認識および結合部位を含有する最小の抗体断片である。この領域は、一つの重鎖可変ドメインと一つの軽鎖可変ドメインとが緊密に非共有会合した二量体からなる。各可変ドメインの3つのCDRが相互作用して $V_H - V_L$ 二量体の表面上に抗原結合部位を定めるのはこのような立体配置においてである。集合的に、6つのCDRが該抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン (すなわち抗原に特異的な3つのCDRのみからなるFvの半分) であっても、完全な結合部位に比べると低い親和性においてではあるが抗原を認識および結合する能力を有する。

【0100】

Fabフラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第一定常ドメイン (C_{H1}) を含む。Fab'フラグメントは、重鎖 C_{H1} ドメインのカルボキシル末端に抗体の

10

20

30

40

50

ヒンジ領域からの1またはそれ以上のシステインを含む幾つかの残基が付加しているところがF a bフラグメントと異なる。F a b' - S Hは、本明細書において定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を有するF a b'をいう。F (a b')₂抗体フラグメントは、相互間にヒンジシステインを有する一対のF a b'フラグメントとして元々生成された。抗体断片の他の化学的カップリングも知られている。

【0101】

脊椎動物種からの抗体(免疫グロブリン)の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてカッパおよびラムダ()とよばれる2つの明らかに区別されるタイプの一つが割り当てられうる。

【0102】

重鎖の定常領域のアミノ酸配列に基づき、免疫グロブリンは異なるクラスに割り当てられうる。5つの主要な免疫グロブリンのクラス: I g A、I g D、I g E、I g GおよびI g Mが存在し、これらのうち幾つかはさらにサブクラス(イソタイプ)、たとえばI g G - 1、I g G - 2、I g G - 3、およびI g G - 4; I g A - 1およびI g A - 2に分けられる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖の定常領域は、それぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、および μ とよばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造および三次元立体配置はよく知られている。I g A - 1およびI g A - 2は、通常、二量体かまたは一層大きなポリマーの形態にあるI g Aの単量体サブクラスである。消化管中の免疫細胞は主としてポリマー性のI g A(二量体および一層大きなポリマーを含むポリ-I g Aともよばれる)を生成する。かかるポリ-I g Aは、「ジョイニング」または「J」鎖とよばれるジスルフィド結合したポリペプチドを含み、5つのサブユニットからなるJ含有ポリマー性I g M(ポリ-I g M)とともに腺上皮を輸送されうる。

【0103】

「抗体」なる語は最も広い意味で使用され、特に、単一の抗 t r kモノクローナル抗体(アゴニストおよびアンタゴニスト抗体を含む)およびポリエピトープ特異性を有する抗 t r k抗体組成物を包含する。

【0104】

本明細書において「モノクローナル抗体」なる語は、実質的に均質な抗体の集団、すなわち該集団を構成する個々の抗体が天然において最小量で存在するかもしれない可能な突然変異の他は同一であるものから得られた抗体をいう。モノクローナル抗体は、単一の抗原部位に対して向けられており、高度に特異的である。さらに、異なる決定基(エピトープ)に向けられた異なる抗体を典型的に含む通常の(ポリクローナル)抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に向けられている。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は他の免疫グロブリンが混入することのないハイブリドーマ培養により合成される。

【0105】

本明細書においてモノクローナル抗体は、定常ドメインによる抗 t r k抗体の可変(超可変を含む)ドメインのスプライシング(たとえば、「ヒト化」抗体)、または重鎖による軽鎖のスプライシング、または他の種からの鎖による一方の種からの鎖のスプライシング、または種の起源または免疫グロブリンクラスもしくはサブクラスとは無関係に異種タンパク質との融合により生成されるハイブリッド抗体および組換え抗体、並びに所望の生物学的活性を示す限りにおいて抗体断片(たとえば、F a b、F (a b')₂、およびF v)を含む[キャビリー(C a b i l l y)ら、米国特許第4,816,567号;メージ(M a g e)およびラモイ(L a m o y i)、M o l e c u l a r A n t i b o d y P r o d u c t i o n T e c h n i q u e s a n d A p p l i c a t i o n s、79~97頁(マーセル・デッカー(M a r c e l D e k k e r, I n c.))、ニューヨーク、1987)参照]。

【0106】

それゆえ、「モノクローナル」という修飾語が付されている場合は、抗体の実質的に均質な集団から得られた抗体の特性を意味するものとし、特定の方法によって抗体を産生さ

10

20

30

40

50

せる必要があるものではない。たとえば、本発明に従って用いるモノクローナル抗体は、コーラー（Kohler）およびミルシュテイン（Milstein）によって最初に記載されたハイブリドーマ法（Nature 256: 495（1975））により作製することができ、または組換えDNA法〔キャピラーら、上掲〕により作製することができる。

【0107】

「ヒト化」形態の非ヒト（たとえばマウス）抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する配列を最小で含む特定のキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその断片（Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ または抗体の他の抗原結合性のサブ配列など）である。ヒト化抗体の殆どの部分はヒト免疫グロブリン（受容体の抗体）であり、そのうち受容体の相補性決定領域（CDR）からの残基が所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト種（供与体の抗体）のCDRからの残基によって置換されている。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク（FR）残基が対応する非ヒト残基によって置換されている。さらに、ヒト化抗体は受容体の抗体にも移入したCDRまたはフレームワーク配列にも認められない配列を含んでいてよい。これら修飾は、抗体の性能をさらに洗練させ最適化するために行う。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、一般には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、その際、CDR領域のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、FR領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリンの共通配列のFR領域であろう。ヒト化抗体はまた、最適には、一般にはヒト免疫グロブリンからのものである免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部を含むであろう。

【0108】

ハイブリダイゼーションは「ストリンジェントな条件」下で行うのが好ましいが、これは（1）洗浄に低イオン強度および高温、たとえば50℃にて0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを使用すること、または（2）ハイブリダイゼーションの間、ホルムアミドなどの変性剤、たとえば50%（v/v）ホルムアミドを0.1%血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.5）（750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを含む）とともに42℃で使用することを意味する。他の例は、42℃における50%ホルムアミド、5×SSC（0.75MNaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH6/8）、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×デンハルト溶液、超音波処理したサケ精子DNA（50μg/ml）、0.1%SDS、および10%デキストラン硫酸の使用が挙げられ、洗浄は42℃にて0.2×SSCおよび0.1%SDS中で行う。

【0109】

（B. term受容体をコードするDNAの単離）

本発明の目的のためには、trk受容体をコードするDNAは、trk受容体mRNAを有し、これを検出可能なレベルで発現すると思われる組織から調製したcDNAライブラリーから得ることができる。たとえば、実施例に記載してあるようなヒト脳のcDNAライブラリーはtrkBおよびtrkC受容体cDNAの良好な採取源である。trk受容体遺伝子はまたヒトゲノムコスミドライブラリーなどのゲノムライブラリーから得ることもできる。

【0110】

trk受容体の同定は、既知の基準（その一つは、配列は偽陽性が最小となるように十分な長さを有し十分に明白でなければならないことである）に従って既知のtrk配列（ヒトtrkA配列、マウスtrkB配列またはマウスまたはブタtrkC配列）から選択した標識オリゴヌクレオチド配列によりヒトまたは他の哺乳動物のcDNAまたはゲノムライブラリーをプローブすることにより最も都合よく行われる。典型的に、約30～50塩基を有する³/₂P-標識オリゴヌクレオチドが、とりわけ該オリゴヌクレオチドがメチオニンまたはトリプトファンの1またはそれ以上のコドンを含む場合には十分である。単

離核酸は、核酸の採取源からの他のポリペプチドをコードする混入核酸から同定および分離されたDNAであろう。

【0111】

trk受容体をコードする遺伝子を単離するための別の手段は、1987年7月28日に発行された米国特許第4,683,195号、サンプルック(Sambrook)らのモレキュラー・クローニング:ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、ニューヨーク、1989の14章、またはカレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology)、オースベル(Ausubel)ら編、グリーン・パブリッシング・アソシエーツ・アンド・ウイリー・インターサイエンス(Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)、1991に記載されているように、また実施例に説明するように、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を用いることである。

10

【0112】

他の別法は、エンジェルス(Engels)およびウールマン(Uhlmann)により記載された方法(Agnew, Chem. Int. Ed. Engl. 28, 716 (1989))の一つを用い、trk受容体をコードする遺伝子を化学的に合成することである。これら方法には、トリエステル法、ホスファイト法、ホスホルアミダイト法およびH-ホスホネート法、PCRおよび他のオートプライマー(auto primer)法、固相支持体上のオリゴヌクレオチド合成が挙げられる。

20

【0113】

(C. 天然trk受容体または受容体断片のアミノ酸配列変異体)

天然trk受容体およびtrk受容体断片のアミノ酸配列変異体は、天然のまたは変異体のtrk受容体DNA中に適当なヌクレオチド変化を導入することにより、または所望のポリペプチドのインビトロ合成によって、当該技術分野で知られた方法により調製される。アミノ酸配列変異体を構築するうえで2つの主要な変数が存在する:すなわち、変異部位の位置および変異の性質である。trk受容体をコードするDNA配列の操作を必要としない天然にみられる対立遺伝子を例外として、trk受容体のアミノ酸配列変異体は、DNAを変異させて天然にはみられない対立遺伝子かまたはアミノ酸配列の変異体となるようにすることにより構築するのが好ましい。一般に、変異は天然のtrk受容体の細胞外ドメイン内に生成されるであろう。神経栄養因子のシグナル変換にとって重要と思われる部位または領域が、ニューロトロフィンの生物学的活性のインビトロ研究のために選択されるであろう。ついで、かかる位置にある部位を、たとえば、(1)保存的な選択をまず置換し、ついで得られた結果に応じて一層劇的な選択を置換すること、(2)標的残基を欠失させること、または(3)該位置の部位に隣接して同じまたは異なるクラスの残基を挿入すること、または選択肢(1)~(3)の組み合わせにより、系列的に修飾されるであろう。

30

【0114】

一つの便利な方法は「アラニンスキャニング(alanine scanning)」とよばれるものである(カニングガム(Cunningham)およびウエルズ(Wells)、Science 244, 1081~1085 [1989])。この方法では、残基または標的残基の群がアラニンまたはポリアラニンにより同定され置換される。ついで、このようなアラニン置換に対して機能的感受性を示したドメインを、アラニン置換の部位にてまたは該部位に対してさらなるまたは他の置換を導入することにより洗練する。

40

【0115】

所望の変異を同定した後、trk受容体変異体をコードする遺伝子を上記化学的合成法により得ることができる。

【0116】

さらに好ましくは、trk受容体アミノ酸配列変異体をコードするDNAは、それ以前

50

に調製した変異体または t r k 受容体の非変異体をコードする D N A の部位特異的突然変異誘発により調製する。部位特異的突然変異誘発は、所望の変異をコードする特定のオリゴヌクレオチド配列並びに十分な数の隣接ヌクレオチドを使用して、横切る欠失ジャンクションの両側上に安定な二本鎖を形成するに十分なサイズおよび配列の複雑さのプライマー配列を提供することにより、t r k 受容体変異体を生成することを可能にする。典型的に、約 20 ~ 25 ヌクレオチドの長さのプライマーが好ましく、配列のジャンクションの両側上の約 5 ~ 10 残基が変えられる。一般に、部位特異的突然変異誘発の技術は、エデルマン (E d e l m a n) らの D N A 2、183 (1983) などの刊行物により例示されるように、当該技術分野でよく知られている。認識されるであろうように、部位特異的突然変異誘発法は一般に一本鎖および二本鎖の両形態で存在するファージベクターを用いる。部位特異的突然変異誘発に有用な典型的なベクターには、たとえばメッシング (M e s s i n g) らにより開示されているように (サード・クリーブランド・シンポジウム・オン・マクロモレキュールズ・アンド・リコンビナント D N A (T h i r d C l e v e l a n d S y m p o s i u m o n M a c r o m o l e c u l e s a n d R e c o m b i n a n t D N A)、ウォルトン (A . W a l t o n) 編、エルセビエ、アムステルダム (1981))、M13 ファージなどのベクターが含まれる。このファージベクターおよび他のファージベクターは市販されており、その使用は当業者によく知られている。M13 由来のベクターを用いた D N A 断片中のオリゴデオキシリボヌクレオチド指定の部位特異的突然変異誘発の構築のための用途範囲の広い効率的な手順が、ゾラー (Z o l l e r , M . J .) およびスミス (S m i t h , M .) により刊行されている (N u c l e i c A c i d s R e s . 10、6487 ~ 6500 [1982])。また、一本鎖ファージの複製起点を有するプラスミドベクター (ベイラ (V e i r a) ら、M e t h . E n z y m o l . 153、3 [1987]) を用いて一本鎖 D N A を得ることもできる。別法として、適当な D N A 断片をインビトロで合成し、これを当該技術分野で知られた P C R 法により増幅することによりヌクレオチド置換を導入する。

【 0 1 1 7 】

一般に、部位特異的突然変異誘発を行うには、まずその配列内に関連タンパク質をコードする D N A 配列を含む一本鎖ベクターを得る。所望の変異配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーを、たとえばクレア (C r e a) らの方法 (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 75、5765 (1978)) により一般に化学的に調製する。ついで、このプライマーを上記一本鎖のタンパク質配列含有ベクターにアニールさせ、大腸菌ポリメラーゼ I のクレノウ断片などの D N A 重合酵素に供して変異含有鎖の合成を完成させる。かくして、一方の鎖が元々の非変異配列をコードし、第二の鎖が所望の変異を有するヘテロ二本鎖が生成する。ついで、このヘテロ二本鎖ベクターを用いて J P 101 細胞などの適当な宿主細胞を形質転換し、変異配列の組み合わせを有する組換えベクターを含むクローンを選択する。その後、変異領域を除去し、タンパク質産生のための適当な発現ベクター中に入れる。

【 0 1 1 8 】

P C R 法はまた、t r k 受容体のアミノ酸配列変異体を生成させるために用いることもできる。少量の鋳型 D N A を P C R の出発物質として用いる場合は、鋳型 D N A 中の対応領域とはわずかに異なる配列を有するプライマーを用い、該プライマーが該鋳型と異なる部位のみ鋳型と異なる比較的大量の特定 D N A 断片を得ることができる。プラスミド D N A 中に変異を導入するため、プライマーの一方を該変異の位置に重複するように、および該変異を含有するように設計する；他のプライマーの配列はプラスミドの反対鎖の配列と同一でなければならないが、この配列は該プラスミド D N A に沿っていずれの場所に位置してもよい。しかしながら、最終的にこれらプライマーによって境界を定められた D N A の全増幅領域を容易に配列決定することができるよう、第二のプライマーの配列は第一のプライマーの配列から 200 ヌクレオチド内に位置しているのが好ましい。上記のようなプライマーのペアを用いた P C R 増幅の結果、該プライマーにより特定された変異部位、および鋳型コピーが若干誤りを犯すのでおそらく他の位置にて異なる D N A 断片の集団

が得られる。

【0119】

生成物に対する鋳型の比率が極めて低いならば、生成物のDNA断片の大部分は所望の変異を導入している。この生成物を用い、PCRの鋳型として働いたプラスミド中の対応領域を標準DNA法を用いて置換する。変異体の第二のプライマーを用いるか、または異なる変異体プライマーを用いて第二のPCRを行い、得られた2つのPCR断片をベクター断片に3（またはそれ以上）部分ライゲーションにて同時にライゲートすることにより、別々の位置に変異を同時に導入することができる。

【0120】

PCR突然変異誘発の特別の例において、鋳型プラスミドDNA（1 μg）中の増幅しようとする領域の外側に唯一の制限部位を有する制限エンドヌクレアーゼで消化することにより該プラスミドを線状にする。この物質のうち10 ngを、PCR緩衝液（4つのデオキシヌクレオチド三リン酸を含有しジーンアンプ（Gene Amp（登録商標））キット（パーキン・エルマー・シータス（Perkin-Elmer Cetus）、ノーウオーク、コネチカットおよびエメリビル、カリフォルニアから入手した）中に入れてある）、および各25ピコモルのオリゴヌクレオチドプライマーを50 μlの最終容量で含有するPCR混合物に加える。この反応混合物に35 μlの鉱油を重層する。反応液を100にて5分間変性させ、氷上にしばらく置き、ついで1 μlのテルムス・アクアチクス（Thermus aquaticus）（Taq）DNAポリメラーゼ（5単位/1）（パーキン・エルマー・シータス、ノーウオーク、コネチカットおよびエメリビル、カリフォルニアから購入）を鉱油層の下に加える。ついで、反応混合物を下記の通りプログラムされたDNAサーマルサイクラー（パーキン・エルマー・シータスから購入）中に挿入する。

【0121】

55 で2分
72 で30秒、ついで以下のサイクルを19サイクル：
94 で30秒
55 で30秒および
72 で30秒。

【0122】

上記プログラムの終了時に反応バイアルをサーマルサイクラーから除き、水性相を新たなバイアルに移し、フェノール/クロロホルム（50：50容量）で抽出し、エタノール沈殿し、DNAを標準手順により回収する。この物質をその後、ベクター中に挿入するための適当な処理に供する。

【0123】

変異体の調製のための他の方法であるカセット突然変異誘発は、ウエルズ（Wells）らにより記載された技術[Gene 34、315（1985）]に基づく。出発物質は変異させようとするtrk受容体DNAを含むプラスミド（またはベクター）である。変異させようとするtrk受容体内のコドン进行を同定する。同定した変異部位の両側には唯一の制限エンドヌクレアーゼ部位が存在していなければならない。そのような制限部位が存在しない場合には、上記オリゴヌクレオチド媒体突然変異誘発法を用いて該制限部位をtrk受容体内の適当な位置に導入することによって生成させる。制限部位がプラスミド中に導入された後、これら部位にてプラスミドを切断して線状にする。該制限部位間に該DNAの配列をコードするが所望の変異を含む二本鎖オリゴヌクレオチドを標準法を用いて合成する。2つの鎖が別々に合成され、ついでこれらを標準法を用いて一緒にハイブリダイズする。この二本鎖オリゴヌクレオチドはカセットとよばれる。このカセットは、プラスミドに直接ライゲートすることができるように、3'末端および5'末端が線状化したプラスミドの末端と整合すべく設計してある。このプラスミドは、いまや変異したtrk受容体DNA配列を含む。

【0124】

10

20

30

40

50

加えて、天然または変異体の t r k 受容体またはその断片のアミノ酸配列を作製するうえでいわゆるファージミド提示法も有用であるかもしれない。この方法は、(a) 変異させようとする受容体をコードする第一の遺伝子、天然または野生型のファージコートタンパク質の少なくとも一部をコードする第二の遺伝子(該第一の遺伝子および該第二の遺伝子は異種である)、該第一の遺伝子および該第二の遺伝子に作動可能に連結した転写調節要素を含む複製可能な発現ベクターを構築し、それによって融合タンパク質をコードする遺伝子融合を生成させ、(b) 該第一の遺伝子内の 1 またはそれ以上の選択された部位で該ベクターを突然変異させ、それによって関連するプラスミドのファミリーを生成させ、(c) これらプラスミドで適当な宿主細胞を形質転換し、(d) これら形質転換した宿主細胞をファージコートタンパク質をコードする遺伝子を有するヘルパーファージで感染させ、(e) これら形質転換し感染した宿主細胞を、該プラスミドの少なくとも一部を含み宿主を形質転換しうる組換えファージミド粒子を生成するのに適当な条件下で培養し、その際、該条件は再少量以上のファージミド粒子が該粒子の表面上に 1 を越えるコピーの該融合タンパク質を提示するように調節されており、(f) これらファージミド粒子を適当な抗原と接触させてファージミド粒子の少なくとも一部が該抗原に結合するようにさせ、ついで(g) 結合したファージミド粒子を結合しなかったファージミド粒子から分離することを含む。工程(d) から(g) は 1 回からそれ以上繰り返すことができる。この方法において好ましくは、プラスミドを転写調節要素の厳重な制御下におき、培養条件を、ファージミド粒子の表面上に 1 を越えるコピーの融合タンパク質を提示するファージミド粒子の量または数が約 1 % 未満となるように調節する。また、1 を越えるコピーの融合タンパク質を提示するファージミド粒子の量が単一コピーの融合タンパク質を提示するファージミド粒子の量の 1 0 % 未満であるのが好ましい。該量は 2 0 % 未満であるのが最も好ましい。この方法においては一般に、該発現ベクターはさらに該ポリペプチドの各サブユニットをコードする DNA に融合した分泌シグナル配列をさらに含み、転写調節要素はプロモーター系であろう。好ましいプロモーター系は、l a c Z、_p L、t a c、T 7 ポリメラーゼ、トリプトファン、およびアルカリホスファターゼプロモーターおよびこれらの組み合わせから選ばれる。また、この方法は、通常、M 1 3 K 0 7、M 1 3 R 4 0 8、M 1 3 - V C S、および P h i X 1 7 4 から選ばれるヘルパーファージを用いるであろう。好ましいヘルパーファージは M 1 3 K 0 7 であり、好ましいコートタンパク質は M 1 3 ファージ遺伝子 I I I コートタンパク質である。好ましい宿主は大腸菌であり、大腸菌のプロテアーゼ欠失株である。

【 0 1 2 5 】

上記および類似の突然変異誘発技術の詳細は、たとえば、サンプルックらの上掲文献、およびカレント・プロトコール・イン・モレキュラー・バイオロジー、オースベルら編などの一般的な教科書に記載されている。

【 0 1 2 6 】

アミノ酸置換変異体は、天然の受容体分子中の少なくとも一つのアミノ酸残基が除去され、その場所に異なる残基が挿入されたものである。置換突然変異誘発において大いに興味をもたれる部位は、シグナル変換および/またはリガンド結合に重要であると同定された部位、および種々の種からの天然の t r k 受容体にみられるアミノ酸が、側鎖のかさばり、電荷および/または疎水性に関して実質的に異なっている部位を含む。実施例からも明らかであろうように、ヒト t r k C 受容体の第二の免疫グロブリン様ドメインはニューロトロフィン結合に主として関わるものとして同定されている。この領域内での置換は(他のアミノ酸変化のように)、t r k 受容体のニューロトロフィン結合能に有意の影響を及ぼすと思われる。個々の t r k 受容体の結合特異性および該受容体によって媒体される多様な生物学的活性に主として関わるアミノ酸は、上記突然変異誘発法の組み合わせにより同定することができる。種々の t r k 受容体を互いに区別するアミノ酸の少なくとも一部は、その細胞外領域の第二の免疫グロブリン様ドメイン内に存在すると思われる。一方の t r k 受容体においてリガンド特異性に関わると同定された領域を他方の t r k 受容体のリガンド結合ドメインで置換することによって t r k 受容体変異体を生成することが可

能である。

【0127】

興味のもたれる他の部位は、種々の種からの天然の t r k 受容体の特定の残基が同一であるものである。これら位置は t r k 受容体の生物学的機能にとって重要であるかもしれない。突然変異誘発によってさらに重要な部位は、t r k 受容体ファミリーの種々の成員間で共通するモチーフを含む。

【0128】

天然に存在するアミノ酸は共通する側鎖の特性に基づいてグループに分けられる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン；
- (2) 中性、疎水性：システイン、セリン、トレオニン；
- (3) 酸性：アスパラギン酸、グルタミン酸；
- (4) 塩基性：アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リシン、アルギニン；
- (5) 鎖の方向に影響を及ぼす残基：グリシン、プロリン；および
- (6) 芳香族：トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン。

【0129】

保存的な置換は一つのグループ内の成員を同じグループ内の他の成員と交換することを含み、一方、非保存的な置換はこれらクラスの一つの成員を他のクラスの成員と交換することを含むであろう。天然の t r k 受容体またはその断片の神経栄養因子結合領域内における非保存的な置換によって得られる変異体は、得られる変異体の生物学的特性が有意に変化することが期待され、その結果、その同族の神経栄養因子の生物学的特性を阻止する、すなわち対応する天然の神経栄養因子の生物学的作用のアンタゴニストとなるか、または対応する天然の t r k 受容体を上回るシグナル伝達能となるかもしれない。種々の種および/または t r k 受容体ファミリーの種々の受容体において保存されているアミノ酸位置は、もしも目的が生物学的活性を保持することであるなら、一般に相対的に保存的な仕方

【0130】

アミノ酸欠失は一般に、約 1 ~ 30 残基、より好ましくは約 1 ~ 10 残基の範囲であり、典型的には隣接するものである。欠失はシグナル変換および/またはリガンド結合に直接には関与しない領域中に導入することにより、t r k 受容体の生物学的活性を修飾してよい。シグナル変換および/またはリガンド結合に直接関与する領域からの欠失は一層有意に変異 t r k 受容体の生物学的活性の修飾をもたらすであろうし、t r k 受容体アンタゴニストを生成するかもしれない。連続的な欠失の数は、影響を受けるドメインにおいて t r k 受容体の三次元構造を保持すべく選択されるであろう。

【0131】

1 を越える神経栄養因子に対する結合ドメインを組み合わせ、従って 1 を越える神経栄養因子の生物学的活性をシグナル伝達する能力を有する t r k 受容体変異体を構築することが可能である。かかる変異体は、t r k 受容体の配列中に他の t r k 受容体のニューロトロフィン結合ドメインを挿入することによって作製することができる。たとえば、天然の t r k B および t r k C 受容体は、t r k A 受容体の天然のリガンドである N G F には認めうる程度で結合しない。t r k B または t r k C 受容体中に t r k A 受容体の N G F 結合配列を挿入すると、(それぞれ、天然の t r k B および t r k C 受容体の天然のリガンドに加えて) N G F に結合する t r k B または t r k C 受容体変異体を得られる。同様に、天然にみられる t r k B 受容体は B D N F および N T 4 / 5 には結合するが N G F または N T - 3 には認めうるほどには結合しない。それゆえ、t r k B 受容体中に t r k C の N T - 3 結合配列を挿入すると、B D N F、N T 4 / 5 および N T - 3 に結合しうる変異体受容体を得られる。得られた受容体変異体は一層広範囲の生物学的活性のスペクトルを媒体することができ、その応用および治療学に新生面を開くであろう。

【0132】

アミノ酸挿入はまた、長さが 1 残基から数百またはそれ以上の残基を含むポリペプチド

にいたるアミノ - および / またはカルボキシル - 末端での融合、並びに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。配列内挿入（すなわち、t r k 受容体アミノ酸配列内の挿入）は、一般に約 1 ~ 10 残基、より好ましくは 1 ~ 5 残基、さらに好ましくは 1 ~ 3 残基の範囲であってよい。末端挿入の例としては、N 末端メチオニル残基を有する t r k 受容体、細菌組換え宿主細胞培養中での直接発現の人工産物、および組換え宿主細胞からの成熟 t r k 受容体の分泌を容易にするための t r k 受容体分子の N 末端への異種 N 末端シグナル配列の融合が挙げられる。かかるシグナル配列は、一般に意図する宿主細胞種から得られ、それゆえ同種であろう。適当な配列としては、大腸菌に対する S T I I または I p p、酵母に対するアルファ因子、および哺乳動物細胞に対するヘルペス g D などのウイルスシグナルが挙げられる。

10

【0133】

天然 t r k 受容体分子の他の挿入変異体としては、該受容体の N - または C - 末端への免疫原性ポリペプチド、たとえば - ラクタマーゼや大腸菌の t r p 遺伝子座によりコードされる酵素などの細菌性ポリペプチド、または酵母タンパク質の融合、および免疫グロブリン領域（好ましくは免疫グロブリンの定常領域）、アルブミン、またはフェリチンなどのような長い半減期を有するタンパク質の C - 末端融合が挙げられる（1989 年 4 月 6 日に公開された W O 89 / 02922 に記載されているように）。

【0134】

変異体 t r k 受容体の特性を前以て予測することはしばしば困難であるので、最適の変異体を選択するためのある種のスクリーニングが必要であろうことが理解されるであろう

20

【0135】

（D . クローニングベヒクル中への D N A の挿入）

天然または変異体の t r k 受容体をコードする核酸が得られたら、これを一般にさらにクローニング（D N A の増幅）するため、または発現のために複製可能な発現ベクター中にライゲートする。

【0136】

発現ベクターおよびクローニングベクターは当該技術分野でよく知られており、1 またはそれ以上の選択された宿主細胞中で複製することを可能にする核酸配列を含んでいる。適当なベクターの選択は、1) D N A 増幅かまたは D N A 発現のいずれに用いるのか、2) ベクター中に挿入すべき D N A のサイズ、および 3) ベクターで形質転換すべき宿主細胞に依存するであろう。各ベクターは、その機能（D N A の増幅かまたは D N A の発現か）およびそれが適合する宿主細胞に応じて種々の成分を含む。これらベクター成分としては、一般に下記のうちの 1 またはそれ以上が挙げられるが、これらに限られるものではない：シグナル配列、複製起点、1 またはそれ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、および転写終結配列。

30

【0137】

（i）シグナル配列成分

一般に、シグナル配列はベクターの成分であってよく、またはベクター中に挿入される t r k 受容体の一部であってよい。天然の t r k 受容体は、ポリペプチドの翻訳後プロセシングにより開裂されて成熟 t r k 受容体を生成したときの該ポリペプチドのアミノ末端（該 D N A の 5 ' 末端）にシグナル配列を含む。しかしながら、天然の t r k 受容体は細胞外ドメインと細胞質ドメインとの間に膜接着ドメイン（m e m b r a n e a n c h o r i n g d o m a i n）を含むため、宿主細胞から分泌されない。それゆえ、分泌形態の t r k 受容体を生成するには、膜接着ドメイン（膜貫通ドメインともよばれる）を通常欠失させるかまたは他の仕方では不活化させる（たとえば、点変異によって）。一般に、細胞質ドメインもまた膜接着ドメインとともに欠失させる。切断された（または膜貫通ドメインが不活化された）t r k 受容体変異体は、該切断された変異体をコードする D N A がアミノ末端のシグナル配列を保持している限りにおいて該細胞から分泌されうる。

40

【0138】

50

本発明の範囲には、天然のシグナル配列が欠失され、異種のシグナル配列で置換された t r k 受容体が含まれる。選択される異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識されプロセッシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼにより開裂される）ものでなければならない。

【0139】

天然の t r k 受容体シグナル配列を認識およびプロセッシングしない原核宿主細胞に対しては、該シグナル配列を、たとえばアルカリホスファターゼリーダー、ペニシリナーゼリーダー、l p p リーダー、または熱安定なエンテロトキシン I I リーダーよりなる群から選ばれた原核細胞のシグナル配列で置換する。酵母での分泌には、天然の t r k 受容体シグナル配列を酵母のインベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー、または酸性ホスファターゼリーダーで置換する。哺乳動物細胞での発現においては、天然のシグナル配列でよいが、他の哺乳動物シグナル配列が適当なこともある。

10

【0140】

(i i) 複製起点成分

発現ベクターおよびクローニングベクターの両者とも、1またはそれ以上の選択された宿主細胞中での複製を可能とする核酸配列を含む。一般に、クローニングベクターでは、この配列は宿主染色体と独立に複製することを可能とする配列であり、複製起点および自律複製配列を含む。かかる配列は、種々の細菌、酵母およびウイルスについてよく知られている。よく知られた p B R 3 2 2 からの複製起点が大抵のグラム陰性細菌に適しており、2 μ プラスミド起点が酵母に適しており、種々のウイルス起点（S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V または B P V）が哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。複製起点は哺乳動物発現ベクターには必要でない（S V 4 0 起点は、それが初期プロモーターを含むことのみによって一般に用いられる）。大抵の発現ベクターは「シャトル」ベクターである、すなわち少なくとも一つのクラスの生物において複製することができるが、発現のために他の生物中にトランスフェクションすることができる。たとえば、ベクターを大腸菌中にクローニングし、ついで、宿主細胞染色体とは独立に複製することができないときでも同ベクターを酵母または哺乳動物細胞中に発現のためにトランスフェクションする。

20

【0141】

D N A はまた、宿主ゲノム中に挿入することによりクローニングされる。このことは、たとえばバシラス（B a c i l l u s）種を宿主として用い、バシラスのゲノム D N A にみられる配列と相補的な D N A 配列をベクター中に含めることにより容易に行うことができる。バシラスをこのベクターでトランスフェクションすると、該ゲノムと所望の異種ポリペプチドをコードする D N A の挿入配列との相位的組換えとなる。しかしながら、ゲノム D N A の回収は外来的に複製したベクターよりも複雑なものとなる。なぜなら、コードされたポリペプチド分子を切り出すのに制限酵素消化が必要であるからである。

30

【0142】

(i i i) 選択遺伝子成分

発現ベクターおよびクローニングベクターは、選択遺伝子（選択マーカーともよばれる）を含んでいなければならない。これは、ベクターにより形質転換された宿主細胞の生存または増殖に必要なタンパク質をコードする遺伝子である。この遺伝子の存在により、該ベクターを欠失した宿主細胞が形質転換した宿主に対して増殖または生殖に関して有利でないことが確実になる。典型的な選択遺伝子は、（a）抗生物質や他の毒素、たとえばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートまたはテトラサイクリンに対する耐性を付与するタンパク質、（b）栄養要求欠乏を補足するタンパク質、または（c）複合培地から利用できない不可欠な栄養素を供給するタンパク質をコードし、たとえば桿菌の D - アラニンラセマーゼをコードする遺伝子である。

40

【0143】

選択スキームの一例は、宿主細胞の増殖を阻止する薬剤を利用するものである。異種遺伝子で首尾よく形質転換された細胞は薬剤耐性を付与するタンパク質を発現し、それゆえ

50

選択レジメンを生き残る。かかる主要な選択の例では、薬剤のネオマイシン [サザーン (Southern) ら、J. Molec. Appl. Genet. 1、327 (1982)]、マイコフェノール酸 [マリガン (Mulligan) ら、Science 209、1422 (1980)]、またはハイグロマイシン [サジェン (Sudgen) ら、Mol. Cell. Biol. 5、410~413 (1985)] を利用する。上記3つの例では、それぞれ適当な薬剤である G418 またはネオマイシン (ジェネチシン)、xgpt (マイコフェノール酸)、またはハイグロマイシンに対する耐性を付与すべく真核細胞制御下に細菌遺伝子を用いる。

【0144】

哺乳動物細胞に適した選択マーカーの他の例は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) またはチミジンキナーゼである。かかるマーカーは、所望の核酸を取り込むのにコンピテントな細胞の同定を可能にする。哺乳動物細胞の形質転換体を、マーカーの取り込みにより形質転換体のみが生存可能なように適合した選択圧下におく。選択圧の負荷は、形質転換体を培地中の選択剤の濃度が連続的に変化する条件下で培養し、それによって選択遺伝子および所望のポリペプチドをコードする DNA の両方の増幅へ導くことにより行う。増幅は、増殖に不可欠のタンパク質の産生のために一層要求される遺伝子が組換え細胞の継続的な世代の染色体内に直列に反復されるプロセスである。増幅した DNA からは増加量の所望のポリペプチド (trk 含有キメラポリペプチドかまたはそのセグメント) が合成される。

【0145】

たとえば、DHFR 選択遺伝子で形質転換された細胞は、ヒポキサンチン、グリシン、およびチミジンを欠く培地中ですべての形質転換体を培養することにより最初に同定される。この場合に適した宿主細胞は、ウアラウブ (Urlaub) およびチェイシン (Chasin) により記載されたようにして (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77、4216 (1980)) 調製および増殖した DHFR 活性を欠くチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株である。とりわけ有用な DHFR は、MTX に高度に耐性の変異体 DHFR である (EP 117, 060 号)。この選択剤は、内生の DHFR の存在の如何にかかわらず、他の面では適当ないかなる宿主、たとえば ATCC No. CCL 61 CHO-K1 に用いることができる。ついで、それぞれ DHFR および所望のポリペプチドをコードする DNA が該 DHFR を不活化する剤 (メトトレキセート、すなわち MTX) に暴露することにより増幅される。その後のラウンドの一層高濃度の MTX 中で増殖しうる細胞のみを選択することにより、細胞が一層 DHFR を必要とする (従って、すべての外来 DNA を増幅させる) ことが確実になる。別法として、所望のポリペプチドをコードする遺伝子、野生型 DHFR をコードする遺伝子、および neo 遺伝子などの他の選択マーカーを同時に形質転換した宿主は、G418 などの選択マーカーのための選択剤を用いて同定することができ、ついで内生の DHFR を有する野生型宿主中でメトトレキセートを用いて選択および増殖することができる (米国特許第 4, 965, 199 号をも参照)。

【0146】

酵母中で使用するのに適した適当な選択遺伝子は酵母プラスミド YRp7 中に存在する trp1 遺伝子である (スティンチコム (Stinchcomb) ら、1979、Nature 282: 39; キングスマン (Kingman) ら、1979、Gene 7: 141; またはチェンパー (Tschemper) ら、1980、Gene 10: 157)。trp1 遺伝子は、トリプトファン中で増殖する能力を欠く酵母の変異体株、たとえば ATCC No. 44076 または PEP4-1 (ジョーンズ (Jones)、1977、Genetics 85: 12) に選択マーカーを提供する。ついで、酵母宿主細胞中の trp1 領域の存在は、トリプトファンの不在中で増殖させることにより形質転換を検出するための有効な環境を提供する。同様に、leu2 欠失酵母株 (ATCC 20, 622 または 38, 626) は、leu2 遺伝子を有する既知のプラスミドにより補足される。

10

20

30

40

50

【0147】

(iv) プロモーター成分

クローニングベクターと違って発現ベクターは、宿主生物によって認識され所望のポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結したプロモーターを含んでいなければならない。プロモーターは構造遺伝子（一般に約100～1000bp内）の開始コドンの上流に位置する非翻訳配列であり、その制御下に核酸の転写および翻訳を制御する。プロモーターは典型的に誘導性および構成的の2つのクラスに分けられる。誘導性プロモーターは、培養条件の変化、たとえば栄養素の存在または不在または温度の変化に応答して、その制御下にDNAからの増加したレベルの転写を開始するプロモーターである。現時点では種々の可能な宿主細胞により認識される多数のプロモーターがよく知られている。これらプロモーターは、その由来する遺伝子から制限酵素消化により除去し、ついで発現すべきポリペプチドの開始コドンの5'側に挿入することにより、所望のポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結される。このことは、trk受容体のゲノムプロモーターを使用できないということではない。しかしながら、一般に異種プロモーターは天然のtrk受容体プロモーターに比べて発現されるtrk受容体の一層大きな転写および一層高い収量が得られるであろう。

10

【0148】

原核細胞宿主に使用するのに適したプロモーターとしては、-ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系（チャング（Chang）ら、Nature 275:615（1978）；およびゴッデル（Goeddel）ら、Nature 281:544（1979））、アルカリホスファターゼ、トリプトファン（trp）プロモーター系（ゴッデルら、Nucleic Acids Res., 8:4057（1980）およびEP出願公開第36,776号）およびtacプロモーター（ドウ・ベール（H. de Boer）ら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 80:21~25（1983））などのハイブリッドプロモーターが挙げられる。しかしながら、他の知られた細菌プロモーターも適している。それらのヌクレオチド配列は刊行されており、それにより当業者は必要な制限部位を供給するためにリンカーまたはアダプターを用い、これらプロモーターをtrkをコードするDNA（ジーベンリスト（Siebenlist）ら、Cell 20:269（1980））に作動可能に連結することができる。細菌系に用いるプロモーターはまた、trkをコードするDNAに作動可能に連結したシャインーダールガーノ（S. D.）配列をも含むであろう。

20

30

【0149】

酵母宿主に用いるのに適したプロモーター配列としては、3-ホスホグリセリン酸キナーゼのプロモーター（ヒッツェマン（Hitzeman）ら、J. Biol. Chem. 255:2073（1980））、またはエノラーゼ、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼおよびグルコキナーゼなどの他の解糖酵素のプロモーター（ヘス（Hess）ら、J. Adv. Enzyme 7:149（1978）；およびホルランド（Holland）、Biochemistry 17:4900（1978））が挙げられる。

40

【0150】

増殖条件により制御される転写のさらなる利点を有する誘導性プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関与する分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、およびマルトースおよびガラクトースの利用に関わる酵素のプロモーター領域である。酵母発現に使用するのに適したベクターおよびプロモーターはヒッツェマンらのEP73,657Aにさらに記載されている。酵母のエンハンサーもまた酵母プロモーターとともに有利に使用できる。

【0151】

50

プロモーター配列は真核細胞について知られている。本質的にすべての真核細胞の遺伝子は、翻訳が開始される部位の約25～30塩基上流の位置にATに富む領域を有する。多くの遺伝子の転写の開始部位から70～80塩基上流にみられる他の配列はCXCATA(Xはいずれかのヌクレオチドである)領域である。大抵の真核細胞遺伝子の3'末端にはAATAA配列が存在し、これはコード配列の3'末端へのポリAテールの付加のシグナルであるかもしれない。これら配列はすべて哺乳動物の発現ベクター中に適当に挿入される。

【0152】

哺乳動物宿主細胞中でのベクターからのtrk受容体の転写は、プロモーターが宿主細胞系と適合しうることを条件として、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス(1989年7月5日公開のUK2, 211, 504)、アデノウイルス(アデノウイルス2など)、ウシバピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましくはシミアンウイルス40(SV40)などのウイルスのゲノムから得られたプロモーター、異種哺乳動物プロモーター、たとえばアクチンプロモーターや免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーター、およびtrk受容体配列に通常付随するプロモーターにより制御されうる。

【0153】

SV40ウイルスの初期および後期プロモーターは、SV40ウイルスの複製起点を含むSV40制限断片として都合よく得られる[ファイヤーズ(Fiers)ら、Nature 273:113(1978)、マリガン(Mulligan)およびバーク(Berg)、Science 209、1422～1427(1980);パブラキス(Pavlakakis)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:7398～7402(1981)]。ヒトサイトメガロウイルスの即時(immediate)初期プロモーターはHindIII制限断片として都合よく得られる[グリーンアウェイ(Greenaway)ら、Gene 18、355～360(1982)]。ベクターとしてウシバピローマウイルスを用いた哺乳動物宿主中でのDNAの発現系が米国特許第4,419,446号に開示されている。この系の変法は米国特許第4,601,978号に記載されている。ヒト免疫インターフェロンをコードするcDNAのサル細胞中での発現に関してはグレイ(Gray)らのNature 295、503～508(1982)をも参照;単純ヘルペスウイルスからのチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞中でのヒト-インターフェロンcDNAの発現に関してはレイズ(Reyes)らのNature 297、598～601(1982)を参照;培養マウスおよびウサギ細胞中でのヒトインターフェロン1遺伝子の発現に関してはカナニ(Canaan)およびバーク、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79、5166～5170(1982)を参照;およびラウス肉腫ウイルスの長末端リピート(long terminal repeat)を用いたCV-1サル腎臓細胞、ニワトリ胚線維芽細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、ヒーラ細胞、およびマウスHIN-3T3細胞中での細菌CAT配列の発現に関してはゴーマン(Gorman)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79、6777～6781(1982)を参照。

【0154】

マウスtrk受容体をクローニングする際に使用する実際のプラスミドはマウスの3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルル補酵素Aレダクターゼ遺伝子のプロモーター[ゴーチエ(Gautier)ら、Nucleic Acids Res. 17、8389(1989)]を含んでおり、一方、発現クローニングに際して使用したりポータープラスミド[pUMS(GT)8-Tac]は人工的な多量体化したtrkの受容体誘導性(recepto-inducible)プロモーター要素[マクドナルド(McDonald)ら、Cell 60、767～779(1990)]を含んでいた。

【0155】

(v) エンハンサー要素成分

高等真核細胞による本発明のtrk受容体をコードするDNAの転写は、ベクター中に

10

20

30

40

50

エンハンサー配列を挿入することによりしばしば増加する。エンハンサーはプロモーター上に作用してその転写を増加させる、通常、約10～300bpのDNAのシス作用性要素である。エンハンサーは転写ユニットの5'側[ライミンス(Laimins)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78、993(1981)]および3'側[ラスキー(Lasky)ら、Mol. Cell. Biol. 3、1108(1983)]、イントロン内[パネルジ(Banerji)ら、Cell 33、729(1983)]並びにコード配列自身の内部[オズボーン(Osborne)ら、Mol. Cell. Biol. 4、1293(1984)]に認められ、方向および位置に関して比較的独立である。現在、多くのエンハンサー遺伝子が哺乳動物遺伝子(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテインおよびインスリン)から知られている。しかしながら、一般に、真核細胞ウイルスからのエンハンサーが使用されるであろう。例としては、複製起点の後期側上のSV40エンハンサー(bp100～270)、サイトメガロウイルスの初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側上のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。真核細胞プロモーターの活性化のためのエンハンサー要素に関しては、ヤニブ(Yaniv)、Nature 297、17～18(1982)をも参照。エンハンサーはtrk受容体DNAの5'側または3'側の位置にてベクター中にスプライスされるが、プロモーターの5'側の部位に位置するのが好ましい。

10

【0156】

(vi) 転写終結要素

20

真核細胞宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、または他の多細胞生物からの有核細胞)で使用する発現ベクターはまた、転写の終結およびmRNAの安定化に必要な配列をも含むであろう。かかる配列は、真核細胞またはウイルスのDNAまたはcDNAの5'側、場合によっては3'側の非翻訳領域から普通に利用できる。これら領域は、trk受容体をコードするmRNAの非翻訳部分中のポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。3'非翻訳領域はまた転写終結部位を含む。

【0157】

上記1またはそれ以上の要素、所望のコード配列および調節配列を含む適当なベクターの構築には、標準的なライゲーション法を用いる。単離したプラスミドまたはDNA断片を開裂し、テーリングし、必要なプラスミドを生成するのに望ましい形態に再ライゲートする。

30

【0158】

構築したプラスミド中で配列が正しいことを確認するための分析のため、ライゲーション混合物を用いて大腸菌K12株294(ATCC31,446)を形質転換し、首尾よくいった形質転換体を必要に応じてアンピシリンまたはテトラサイクリン耐性により選択する。これら形質転換体からのプラスミドを調製し、制限エンドヌクレアーゼ消化により分析し、および/またはメッシングらの方法(Nucleic Acids Res. 9、309(1981))かまたはマクサムらの方法(Methods in Enzymology 65、499(1980))により配列決定する。

【0159】

40

本発明を実施するに際して特に有用なものは、trk受容体をコードするDNAの哺乳動物細胞中での一過性発現を提供する発現ベクターである。一般に、一過性の発現ベクターは、宿主細胞が多くのコピーの発現ベクターを蓄積し、そのことが今度は該発現ベクターによってコードされる所望のポリペプチドを高レベルで合成すべく、宿主細胞中で効率的に複製しうる発現ベクターの使用を含む。適当な発現ベクターおよび宿主細胞を含む一過性の系は、クローンDNAによりコードされるポリペプチドの便利で明確な同定、並びに所望の生物学的または生理学的特性についての該ポリペプチドの迅速なスクリーニングを可能にする。それゆえ、一過性の発現系は、trk受容体の類似体および変異体を同定する目的のために本発明において特に有用である。

【0160】

50

組換え脊椎動物細胞培養中で *trk* 受容体の合成に適合させるのに適した他の方法、ベクターおよび宿主細胞は、ゲッチング (Gettling) ら、*Nature* 293、620~625 (1981)；マンテル (Mantel) ら、*Nature* 281、40~46 (1979)；レビンソン (Levinson) ら、EP 117, 060 および EP 117, 058 に記載されている。*trk* 受容体の哺乳動物細胞培養発現に特に有用なプラスミドは *pRK5* (EP 307, 247) である。

【0161】

(E. 宿主細胞の選択および形質転換)

本発明においてベクターをクローニングおよび発現するのに適した宿主細胞は、上記原核細胞、酵母または高等真核細胞である。適当な原核細胞としては、グラム陰性またはグラム陽性生物、たとえば、大腸菌または桿菌が挙げられる。好ましいクローニング宿主は大腸菌 294 (ATCC 31, 446) であるが、大腸菌 B、大腸菌 X 1776 (ATCC 31, 537)、大腸菌 W 3110 (ATCC 27, 325)、シュードモナス種、またはセラチア・マルセサンス (*Serratia Marcescans*) などの他のグラム陰性またはグラム陽性原核細胞も適している。

【0162】

原核細胞に加えて、繊維状真菌または酵母などの真核微生物も本発明のベクターの適当な宿主である。サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) やその他の普通のパン酵母は、低級の真核宿主微生物の中でも最も普通に用いられている。しかしながら、サッカロミセス・ポンベ (*S. pombe*) [ビーチ (Beach) およびナース (Nurse)、*Nature* 290、140 (1981)]、クルイペロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*) [ルーベンコート (Louvencourt) ら、*J. Bacteriol.* 737 (1983)]；ヤロウイア (*Yarrowia*) (EP 402, 226)；ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) (EP 183, 070)、トリコデルマ・レーシア (*Trichoderma reesia*) (EP 244, 234)、ニューロスポラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) [ケース (Case) ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76、5259~5263 (1979)]；およびアスペルギルス (*Aspergillus*) 宿主、たとえば、アスペルギルス・ニジュラン (*A. nidulans*) [バランス (Balance) ら、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112、284~289 (1983)]；チルバーン (Tilburn) ら、*Gene* 26、205~221 (1983)；イエルトン (Yelton) ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81、1470~1474 (1984)] およびアスペルギルス・ニガー (*A. niger*) [ケリー (Kelly) およびハインズ (Hynes)、*EMBO J.* 4、475~479 (1985)] などの他の多くの属、種および株は普通に入手でき、本発明に使用できる。

【0163】

適当な宿主細胞はまた多細胞生物に由来してもよい。かかる宿主細胞は、プロセッシング活性およびグリコシル化活性を複合しうる。原則として、脊椎動物培養が無脊椎動物培養にかかわらず、いかなる高等真核細胞培養も利用できるが、ヒトなどの哺乳動物からの細胞が好ましい。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞および昆虫細胞が挙げられる。スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) (イモムシ)、エデス・エジプティ (*Aedes aegypti*) (蚊)、エデス・アルボピクツス (*Aedes albopictus*) (蚊)、ドロソフィラ・メラノガスター (*Drosophila melanogaster*) (ショウジョウバエ)、およびボンビクス・モリ (*Bombyx mori*) 宿主細胞などの宿主から数多くのバクテリオファグ株および変異体および対応する許容しうる昆虫宿主細胞が同定されている。ルッコウ (Luckow) ら、*Bio/Technology* 6、47~55 (1988)；ミラー (Miller) ら、ジェネティック・エンジニアリング (*Genetic Engineering*)、セットロウ (Setlow, J. K.) ら編、Vol. 8 (プレナム・パ

10

20

30

40

50

プリシング、1986)、277~279頁;およびマエダ(Maeda)ら、Nature 315、592~594(1985)参照。かかるウイルス株は、種々、公的に利用可能であり(たとえば、アウトグラフィ・カリフォルニカ(Autographa californica)NPVのL-1変異体)、かかるウイルスはとりわけスポドプテラ・フルギペルダ細胞のトランスフェクションのために本発明によるウイルスとして使用できる。

【0164】

綿、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト、およびタバコの植物細胞培養を宿主として利用することができる。一般に、trk受容体DNAを含むように前以て操作しておいた細菌アグロバクテリウム・チュメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)のある株とともにインキュベートすることにより植物細胞をトランスフェクションする。植物細胞培養をアグロバクテリウム・チュメファシエンスとともにインキュベートする間に、trk受容体をコードするDNAは該植物細胞宿主に移され、トランスフェクションされて適当な条件下でtrk受容体DNAを発現するようになる。加えて、ノパリンシンターゼプロモーターやポリアデニル化シグナル配列などの植物細胞と適合しうる調節配列およびシグナル配列も利用できる。デピッカー(Depicker)ら、J. Mol. Appl. Gen. 1、561(1982)。加えて、T-DNA780遺伝子上流から単離したDNAセグメントは、組換えDNAを含有する植物組織での植物発現可能な遺伝子の転写レベルを活性化または増加させる。1989年6月21日に公開されたEP321,196を参照。

【0165】

しかしながら、脊椎動物細胞での関心が最も高く、培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は、それ自体よく知られている。ティッシュ・カルチャー(Tissue Culture)、アカデミック・プレス、クルーズ(Kruse)およびパターソン(Patterson)編(1973)参照。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40により形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7、ATCC CRL1651);ヒト胚腎臓細胞株[293または浮遊培養での増殖用にサブクローニングした293細胞、グラハム(Graham)ら、J. Gen. Virol. 36、59(1977)];ベビーハムスター腎臓細胞9BHK、ATCC CCL10);チャイニーズハムスター卵巣細胞/ - DHFR [CHO、ウアラウブおよびチェイシン、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77、4126(1980)];マウスセルトリ細胞[TM4、マザー(Mather)、Biol. Reprod. 23、243~251(1980)];サル腎臓細胞(CV1 ATCC CCL70);アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76、ATCC CRL-1578);ヒト頸部癌腫細胞(HELA、ATCC CCL2);イヌ腎臓細胞(MDCK、ATCC CCL34);バッファローラット肝臓細胞(BRL3A、ATCC CRL1442);ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL75);ヒト肝臓細胞(HepG2、HB8065);マウス乳腫瘍(MMT060562、ATCC CCL51);TRI細胞[マザーら、Annals N. Y. Acad. Sci. 383、44068(1982)];MRC5細胞;FS4細胞;およびヒト肝癌細胞株(HepG2)である。好ましい宿主細胞はヒト胚腎臓293およびチャイニーズハムスター卵巣細胞である。

【0166】

本発明の目的のために特に好ましい宿主細胞は、trk受容体を産生する脊椎動物細胞である。

【0167】

宿主細胞を上記発現またはクローニングベクターでトランスフェクションおよび好ましくは形質転換し、プロモーターを誘導すべくまたは増幅遺伝子を含む形質転換体を選択すべく適当に改変した通常の栄養培地中で培養する。

【0168】

(F. 宿主細胞の培養)

10

20

30

40

50

本発明の t r k 受容体ポリペプチドを産生するのに用いた原核生物細胞を、サンプルブックの上掲文献に一般に記載されているようにして適当な培地中で培養する。

【 0 1 6 9 】

哺乳動物細胞は種々の培地中で培養することができる。ハム F 1 0 (H a m ' s F 1 0) (シグマ)、最小必須培地 (M E M、シグマ)、R P M I - 1 6 4 0 (シグマ)、およびダルベッコの変性イーグル培地 (D M E M、シグマ) などの市販の培地が宿主細胞を培養するのに適している。加えて、ハム (H a m) およびウォレス (W a l l a c e)、M e t h . E n z y m o l . 5 8、4 4 (1 9 7 9) ; バーンズ (B a r n e s) およびサトー (S a t o)、A n a l . B i o c h e m . 1 0 2、2 5 5 (1 9 8 0)、米国特許第 4, 7 6 7, 7 0 4 号 ; 4, 6 5 7, 8 6 6 ; 4, 9 2 7, 7 6 2 ; または 4, 5 6 0, 6 5 5 ; W O 9 0 / 0 3 4 3 0 ; W O 8 7 / 0 0 1 9 5 または U S P a t . R e . 3 0, 9 8 5 号に記載されたいずれの培地も宿主細胞の培地として使用できる。これら培地には、必要に応じ、ホルモンおよび / または他の成長因子 (インスリン、トランスフェリン、または上皮成長因子など)、塩類 (塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩など)、緩衝液 (H E P E S など)、ヌクレオシド (アデノシンおよびチミジンなど)、抗生物質 (ゲンタマイシン (登録商標) 薬剤など)、微量元素 (マイクロモルの範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物として定義される)、およびグルコースまたは等価なエネルギー源を添加することができる。他の必要な添加物もまた、当業者に知られた適当な濃度で含まれていてよい。温度、p H などの培養条件は、クローニングまたは発現のために選択された宿主細胞とともに用いたものが適しており、当業者には明らかであろう。

【 0 1 7 0 】

本開示において言及する宿主細胞は、インビトロ細胞培養における細胞並びに宿主動物または植物中の細胞を包含する。

【 0 1 7 1 】

本発明の t r k 受容体は、相同的組換えにより、または t r k 受容体をコードする D N A をすでに含む細胞中に導入した調節要素を利用した組換え製造法により製造しうる。

【 0 1 7 2 】

(G . 遺伝子増幅 / 発現の検出)

遺伝子増幅および / または発現は、試料中で直接、たとえば、本明細書に提供する配列に基づき、適当に標識したプローブを用いて、m R N A の転写を定量する通常のサザンブロッティング、ノーザンブロッティング [トーマス (T h o m a s)、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 7 7、5 2 0 1 ~ 5 2 0 5 (1 9 8 0)]、ドットブロッティング (D N A 分析)、またはインシトゥハイブリダイゼーションにより測定することができる。種々の標識を用いることができるが、最も普通には放射性同位元素、とりわけ ^{32}P を用いる。しかしながら、ポリヌクレオチド中に導入するためのピオチン修飾ヌクレオチドを用いるなどの他の技術も用いることができる。該ピオチンは、ついでアビジンまたは抗体への結合部位として働き、該アビジンまたは抗体は放射性核種、蛍光、酵素などの広範囲の種々の標識で標識されていてよい。別法として、D N A 二本鎖、R N A 二本鎖、および D N A - R N A 混成二本鎖または D N A - タンパク質二本鎖を含む特定の二本鎖を認識しうる抗体を用いることができる。これら抗体は今度は標識することができる。表面上で二本鎖が生成したときに該二本鎖に結合した抗体の存在を検出するように、該二本鎖が結合する該表面上でアッセイを行うことができる。

【 0 1 7 3 】

遺伝子発現はまた、別のやり方として、遺伝子産物の発現を直接定量するための組織切片の免疫組織化学的染色および細胞培養液または体液のアッセイなどの免疫学的方法によっても測定することができる。免疫組織化学的染色法では、細胞試料を一般に脱水および固定によって調製し、ついで遺伝子産物に特異的な標識抗体と反応させる。その際、該標識は、酵素標識、蛍光標識、ルミネセンス標識などの、通常、視覚的に検出しうるものである。本発明に用いるのに適した特に感度の高い染色法は、フセ (H s e) らの A m . J

. Clin. Pharm. 75、734～738 (1980) に記載されている。

【0174】

免疫組織化学的染色および/または試料液のアッセイに有用な抗体はモノクローナルまたはポリクローナルのいずれであってもよく、いずれの動物においても調製しうる。都合のよいことには、抗体は天然の t r k 受容体ポリペプチドに対して、または以下にさらに詳細に記載するように本明細書により提供される DNA 配列に基づいた合成ペプチドに対して産生させることができる。

【0175】

(H . t r k 受容体の精製)

t r k 受容体は細胞培養の培地から分泌ポリペプチドとして回収するのが好ましいが、分泌シグナルとともにまたは分泌シグナルなしで膜接着ドメインを含む形態で直接発現される場合には宿主細胞溶解液から回収することもできる。

【0176】

t r k 受容体がヒト由来のもの以外の組換え細胞中で発現される場合には、t r k 受容体はヒト由来のタンパク質またはポリペプチドを完全に含まない。しかしながら、t r k 受容体に関して実質的に均質な調製物を得るため、組換え細胞タンパク質またはポリペプチドから t r k 受容体を精製することが必要である。第一の工程として、培地または溶解液を遠心分離にかけて微細な細胞破砕物を除去する。ついで、膜および可溶性タンパク質のフラクションを分離する。ついで、t r k 受容体が膜に結合しているか否かにより、t r k 受容体を可溶性タンパク質フラクションから、または培養溶解液の膜フラクションから精製することができる。下記手順は適当な精製手順の例である：イムノアフィニティークラムまたはイオン交換カラム上での分画化；エタノール沈殿；逆相 H P L C ；シリカまたは D E A E などの陽イオン交換樹脂上のクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；S D S - P A G E ；硫酸アンモニウム沈殿；たとえば、セファデックス G - 75 を用いたゲル濾過；および I g G などの混入物を除去するためのプロテイン A セファロースカラム。

【0177】

残基が欠失、挿入および/または置換された t r k 受容体の機能性の誘導体も、かかる変更により引き起こされた特性の実質的な変化を考慮に入れたうえで天然の受容体鎖と同じ仕方で回収する。たとえば、他のタンパク質またはポリペプチド、たとえば細菌やウイルス抗原との t r k 受容体の融合は精製を容易にする；該抗原に対する抗体を含むイムノアフィニティークラムを用いて該融合体を吸着させることができる。ウサギポリクローナル抗 t r k 受容体抗体カラムなどのイムノアフィニティークラムを用い、少なくとも一つの残留する免疫エピトープに結合させることにより t r k 受容体変異体を吸着させることができる。フェニルメチルスルホニルフルオリド (P M S F) などのプロテアーゼインヒビターもまた精製の間のタンパク質加水分解を抑制するのに有用であり、外来混入物の増殖を防ぐために抗生物質を含有させることもできる。当業者であれば、天然の t r k 受容体に適した精製法が、組換え細胞培養中で発現された t r k 受容体またはその変異体の特性の変化を補償するための修飾を必要とすることを理解するであろう。

【0178】

(I . t r k 受容体の共有結合修飾)

t r k 受容体の共有結合修飾は本発明の範囲に包含される。かかる修飾は、伝統的に、t r k 受容体の標的アミノ酸残基を選択した部位または末端残基と反応しうる有機誘導体化学剤と反応させるか、または選択した組換え宿主細胞中で機能する翻訳後修飾の動力化メカニズムにより導入される。得られる共有結合誘導体は、生物学的活性に重要な残基の同定、t r k 受容体のイムノアッセイ、または組換え体のイムノアフィニティー精製のための抗 t r k 受容体抗体の調製に向けられたプログラムに有用である。たとえば、ニンヒドリンとの反応後のタンパク質の生物学的活性の完全な不活化は、その活性に少なくとも一つのアルギニンまたはリシン残基が必須であることを示唆しており、その後、修飾アミノ酸残基を含むペプチド断片を単離することにより、選択された条件下で修飾された個々の

残基を同定する。かかる修飾は当業者の行いうる範囲内であり、不当な実験なしで行うことができる。

【0179】

システイン残基は、最も普通にクロロ酢酸やクロロアセトアミドなどの - ハロアセテート（および対応するアミン）と反応してカルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を与える。システイン残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、 - プロモ - （5 - イミドゾイル）プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、N - アルキルマレイミド、3 - ニトロ - 2 - ピリジルジスルフィド、メチル2 - ピリジルジスルフィド、p - クロロメルクリベンゾエート、2 - クロロメルクリ - 4 - ニトロフェノール、またはクロロ - 7 - ニトロベンゾ - 2 - オキサ - 1, 3 - ジアゾールとの反応により誘導体化される。

10

【0180】

ヒスチジン残基はジエチルピロカーボネートとの pH 5.5 ~ 7.0 での反応により誘導体化される。というのは、この試薬はヒスチジンの側鎖に比較的に特異的であるからである。パラ - プロモフェナシルプロマイドもまた有用である；この反応は好ましくは 0.1 M カコジル酸ナトリウム中、pH 6.0 で行う。

【0181】

リシンおよびアミノ末端残基は、無水コハク酸または他の無水カルボン酸と反応させる。これら試薬による誘導体化は、リシン残基の電荷を逆転する効果を有する。 - アミノ含有残基を誘導体化するための他の適当な試薬としては、メチルピコリンイミデートなどのイミドエステル；ピリドキサルリン酸；ピリドキサル；クロロボロハイドライド（chloroborohydride）；トリニトロベンゼンスルホン酸；O - メチルイソ尿素；2, 4 - ペンタンジオン；およびグリオキシル酸とのトランスアミナーゼにより触媒された反応が挙げられる。

20

【0182】

アルギニン残基は1または幾つかの通常の試薬との反応により修飾されるが、それら試薬にはフェニルグリオキサル、2, 3 - ブタンジオン、1, 2 - シクロヘキサンジオン、およびニンヒドリンが含まれる。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の高い pKa のためにアルカリ条件下で反応を行う必要がある。さらに、これら試薬は、アルギニンのイプシロン - アミノ基と同様にリシンの基とも反応するかもしれない。

30

【0183】

チロシン残基の特異的修飾は、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンと反応させることによりチロシン残基中に分光学的標識を導入することに大いなる興味をもって行うことができる。最も普通には、N - アセチルイミドゾールおよびテトラニトロメタンを用い、それぞれ O - アセチルチロシン分子種および 3 - ニトロ誘導体を生成させる。チロシン残基は¹²⁵Iまたは¹³¹Iを用いてヨウ素化してラジオイムノアッセイに使用するための標識タンパク質を調製する。

【0184】

カルボキシル側鎖基（アスパラギン酸またはグルタミン酸）は、1 - シクロヘキシル - 3 - （2 - モルホリニル - 4 - エチル）カルボジイミドや1 - エチル - 3 - （4 - アゾニア - 4, 4 - ジメチルペンチル）カルボジイミドなどのカルボジイミド（R' - N = C = N - R'）と反応させることにより選択的に修飾する。さらに、アスパラギン酸およびグルタミン酸残基はアンモニウムイオンと反応させることによりアスパラギンおよびグルタミン残基に変換される。

40

【0185】

グルタミンおよびアスパラギン残基は対応グルタミン酸およびアスパラギン酸残基にしばしば脱アミド化される。別法として、これら残基は穏やかな酸性条件下で脱アミド化される。これら残基のいずれの形態も本発明の範囲に包含される。

【0186】

他の修飾には、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリン、トレオニンまたはチ

50

ロシン残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化 (クレイトン (T. E. Creighton)、プロテインズ: ストラクチャル・アンド・モレキュラー・プロパティーズ (Proteins: Structural and Molecular Properties)、フリーマン、サンフランシスコ、79~86頁 [1983])、N-末端アミンのアセチル化、および C-末端カルボキシル基のアミド化が含まれる。これら分子はさらに、PCT特許公開第 WO 89/02922 または米国特許第 4,640,835 号; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 または 4,179,337 に記載された方法により、非タンパク質性のポリマー、たとえばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンに共有結合により連結することができる。

10

【0187】

ポリペプチドとの trk 受容体の分子内凝集体の調製並びにアッセイまたはアフィニティー精製に使用するための水不溶性支持体マトリックスまたは表面への trk 受容体の架橋には、2 官能性試薬を用いた誘導体化が有用である。加えて、鎖間架橋の研究は立体配置構造に関する直接的な情報を提供するであろう。普通に用いられる架橋剤としては、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、ホモ 2 官能性イミドエステル、および 2 官能性マレイミドが挙げられる。メチル-3-[(p-アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミデートなどの誘導体化剤は、光の存在下で架橋を生成しうる光活性化中間体を生成する。別法として、臭化シアンで活性化した炭水化物などの反応性の水不溶性マトリックスおよびシステム反応性基体 (米国特許第 3,959,642; 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; 4,055,635; および 4,330,440 に記載) をタンパク質の固定化および架橋に用いる。

20

【0188】

ある種の翻訳後修飾は、発現されたポリペプチドに対する組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミンおよびアスパラギン残基は、しばしば翻訳後に対応するグルタミン酸およびアスパラギン酸残基に脱アミド化される。別のやり方として、これら残基は穏やかな酸性条件下で脱アミド化される。これら残基のいずれの形態も本発明の範囲に包含される。

30

【0189】

他の翻訳後修飾としては、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリン、トレオニンまたはチロシンのヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化 [クレイトン、プロテインズ: ストラクチャー・アンド・モレキュラー・プロパティーズ、フリーマン、サンフランシスコ、79~86頁 (1983)] が挙げられる。

【0190】

他の誘導体には、非タンパク質性のポリマーに共有結合した本発明の新規ペプチドが含まれる。かかる非タンパク質性ポリマーは、通常、親水性の合成ポリマー、すなわち天然には他の仕方ではみられないポリマーである。しかしながら、天然から単離されたポリマーが有用であるように、天然に存在し組換えまたはインビトロ法により製造されるポリマーも有用である。親水性のポリビニルポリマー、たとえばポリビニルアルコールおよびポリビニルピロリドン本発明の範囲に包含される。特に有用なのはポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールなどのポリビニルアルキレンエーテルである。

40

【0191】

trk 受容体は、米国特許第 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 または 4,179,337 に記載された方法により、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンなどの種々の非タンパク質性ポリマーに結合させることができる。

【0192】

50

t r k 受容体は、たとえばコアセルベーション法または界面重合法により調製したマイクロカプセル中、コロイド状のドラッグデリバリーシステム（たとえば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子（*nano-particles*）およびナノカプセル（*nanocapsules*））中、またはマクロエマルジョン中に包括することができる。かかる技術はレミングトンズ・ファーマシューティカル・サイエンスイズ（*Remington's Pharmaceutical Sciences*）、第16版、オソル（*Osol, A.*）編（1980）に開示されている。

【0193】

（J. t r k 受容体のグリコシル化変異体）

天然の t r k 受容体は糖タンパク質である。本発明の分子中に存在するかもしれない天然のアミノ酸配列とは異なるグリコシル化パターンを有する変異体は本発明の範囲に包含される。簡便のため、天然のポリペプチドのグリコシル化パターンにおける変化は、通常、本質的にアミノ酸変異体に関する上記技術を用い、DNA レベルで行う。

【0194】

本発明の分子の t r k 受容体へのグリコシドの化学的または酵素的カップリングもまた、炭水化物置換基の数またはプロフィルを修飾または増加させるために用いることができる。これら手順は、O - 結合（または N - 結合）グリコシル化しうるポリペプチドを製造する必要がないという点で有利である。使用したカップリング態様に応じて、糖を（a）アルギニンおよびヒスチジン、（b）遊離のカルボキシル基、（c）システインのものなどの遊離のヒドロキシル基、（d）セリン、トレオニン、またはヒドロキシプロリンのものなどの遊離のスルフヒドリル基、（e）フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンのものなどの芳香族残基、または（f）グルタミンのアミド基に結合することができる。これらの方法は WO 87 / 05330（1987年9月11日に公開）、およびアブリン（*Applin*）およびリストン（*Wriston*）の *CRC Crit. Rev. Biochem.*、259 ~ 306 頁に記載されている。

【0195】

ポリペプチド上に存在する炭水化物部分はまた化学的または酵素的に除去することができる。化学的な脱グリコシル化は、トリフルオロメタンスルホン酸または等価な化合物に暴露することを要する。この処理の結果、連結糖を除く殆どまたはすべての糖が開裂し、一方でポリペプチドは完全な形で残す。化学的な脱グリコシル化はハキムジン（*Hakimuddin*）らの *Arch. Biochem. Biophys.* 259、52（1987）およびエッジ（*Edge*）らの *Anal. Biochem.* 118、131（1981）に記載されている。炭水化物部分は、トタクラ（*Thotakura*）らの *Meth. Enzymol.* 138、350（1987）に記載されているように、種々のエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼにより除去することができる。グリコシル化は、ダスキ（*Duskin*）らの *J. Biol. Chem.* 257、3105（1982）に記載されているように、ツニカマイシンにより抑制される。ツニカマイシンはタンパク質 - N - グリコシダーゼ結合の生成を阻止する。

【0196】

グリコシル化変異体はまた、組換え製造の適当な宿主細胞を選択することによっても調製できる。たとえば、酵母は哺乳動物系とは有意に異なるグリコシル化を導入する。同様に、天然の t r k 受容体とは異なる種（たとえば、ハムスター、マウス、昆虫、ブタ、ウシまたはヒツジ）または組織（たとえば、肺、肝臓、リンパ節、間充織または表皮）由来の哺乳動物細胞は変異体グリコシル化を導入する能力により日常的にスクリーニングされる。

【0197】

（K. t r k 受容体 - 免疫グロブリンキメラ（イムノアドヒーション））

イムノアドヒーションは、結合タンパク質（通常、受容体、細胞接着分子またはリガンド）の機能性ドメインを免疫グロブリン配列と組み合わせたキメラ抗体様分子である。免疫グロブリン配列は好ましくは（必ずしもそうでなくてよいが）免疫グロブリン定常ドメイ

10

20

30

40

50

ンである。

【0198】

免疫グロブリン(Ig)およびある種の変異体は知られており、その多くは組換え細胞培養において調製されている。たとえば、米国特許第4,745,055;EP256,654;フォークナー(Faulkner)ら、Nature 298:286(1982);EP120,694;EP125,023,モリソン(Morrison)、J.

【0199】

【数2】

Immun. 123:793(1979);ケーラー(Köhler)ら、Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 77:2197(1980);ラソ(Raso)ら、Cancer Res. 41:2073(1981);モリソンら、Ann. Rev. Immunol. 2:239(1984);モリソン、Science 229:1202(1985);モリソンら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851(1984);EP255,694;EP266,663;およびWO88/03559を参照。再
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480
9490
9500
9510
9520
9530
9540
9550
9560
9570
9580
9590
9600
9610
9620
9630
9640
9650
9660
9670
9680
9690
9700
9710
9720
9730
9740
9750
9760
9770
9780
9790
9800
9810
9820
9830
9840
9850
9860
9870
9880
9890
9900
9910
9920
9930
9940
9950
9960
9970
9980
9990
10000

【0200】

適当な免疫グロブリン定常ドメイン配列に結合した受容体配列から構築したキメラ(イムノアドヒーション)は当該技術分野で知られている。文献に報告されたイムノアドヒーションは、T細胞受容体 [ガスコイン(Gascoigne)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936~2940(1987)];CD4 [カポン(Capon)ら、Nature 337:525~531(1989)];トラウネッカー(Trautenecker)ら、Nature 339:68~70(1989)];ゼットマイスル(Zettmeissl)ら、DNA Cell Biol. USA 9:347~353(1990)];バーン(Byrn)ら、Nature 344:667~670(1990)];L-セレクチン(ホーミングレセプター) [ワトソン(Watson)ら、J. Cell Biol. 110:2221~2229(1990)];ワトソン
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360

細胞外ドメインまたはその断片をコードする核酸のC末端を免疫グロブリン定常ドメイン配列のN末端をコードする核酸に融合させるが、N末端融合も可能である。

【0202】

一般に、かかる融合において、コードされたキメラポリペプチドは免疫グロブリン重鎖の定常領域の少なくとも機能的に活性なヒンジ、CH₂およびCH₃ドメインを保持しているであろう。融合はまた、定常ドメインのFc部分のC末端、または重鎖のCH₁の直ぐN末端または軽鎖の対応領域にて行うこともできる。

【0203】

融合を行う正確な位置は重要ではない；特定の部位はよく知られており、trk受容体-免疫グロブリンキメラの生物学的活性、分泌または結合特性を最適にするために選択することができる。

【0204】

幾つかの態様において、trk受容体-免疫グロブリンキメラは、本質的にWO 91/08298に説明されているように、単量体、ヘテロ多量体またはホモ多量体、とりわけ二量体または四量体として組み立てられる。

【0205】

好ましい態様において、trk受容体細胞外ドメイン配列（好ましくは第二の免疫グロブリン様ドメインを含む）を、免疫グロブリン、たとえば、免疫グロブリンG₁（IgG-1）のエフェクター機能を含む抗体のC末端部分（とりわけ、Fcドメイン）のN末端側に融合させる。重鎖定常領域全体をtrk受容体の細胞外ドメイン配列に融合することも可能である。しかしながら、一層好ましくは、パパイン開裂部位（IgGFcを化学的に定める；重鎖定常領域の最初の残基を114として[コベットら、上記文献]残基216、または他の免疫グロブリンの類似の部位）の直ぐ上流のヒンジ領域から開始する配列を融合に用いる。特に好ましい態様において、trk受容体アミノ酸配列を、IgG-1、IgG-2、またはIgG-3重鎖のヒンジ領域およびCH₂およびCH₃またはCH₁、ヒンジ、CH₂およびCH₃ドメインに融合させる。融合を行う正確な部位は重要ではなく、最適部位は日常的な実験により決定することができる。

【0206】

幾つかの態様において、trk受容体-免疫グロブリンキメラは、多量体、とりわけホモ二量体またはホモ四量体として組み立てられる。一般に、これら組み立てられた免疫グロブリンは、知られたユニット構造を有するであろう。基本的な4鎖構造ユニットが、IgG、IgD、およびIgEが存在する形態である。4ユニットは高分子免疫グロブリンでは繰り返される；IgMは一般にジスルフィド結合により一緒にされた基本的な4ユニットの五量体として存在する。IgAグロブリン、および場合によりIgGグロブリンはまた血清中で多量体形態で存在する。多量体の場合、各4ユニットは同じであっても異なってもよい。

【0207】

本発明の範囲に包含される種々の組み立てられたtrk受容体-免疫グロブリンキメラの例を以下に図式的に示す：

(a) A_{C_L} - A_{C_L}；

(b) A_{C_H} - [A_{C_H}、A_{C_L} - A_{C_H}、A_{C_L} - V_HC_H、またはV_LC_L - A_{C_H}]

(c) A_{C_L} - A_{C_H} - [A_{C_L} - A_{C_H}、A_{C_L} - V_HC_H、V_LC_L - A_{C_H}、またはV_LC_L - V_HC_H]

(d) A_{C_L} - V_HC_H - [A_{C_H}、またはA_{C_L} - V_HC_H、またはV_LC_L - A_{C_H}]

(e) V_LC_L - A_{C_H} - [A_{C_L} - V_HC_H、またはV_LC_L - A_{C_H}]

(f) [A - Y]_n - [V_LC_L - V_HC_H]₂

(式中、各Aは同一または異なるtrk受容体のアミノ酸配列を示す；

V_Lは免疫グロブリン軽鎖の可変ドメインである；

10

20

30

40

50

V_H は免疫グロブリン重鎖の可変ドメインである；
C_L は免疫グロブリン軽鎖の定常ドメインである；
C_H は免疫グロブリン重鎖の定常ドメインである；
n は 1 を越える整数である；
Y は共有架橋剤の残基を示す）。

【0208】

簡潔な表示のため、上記構造は基本的な特性のみを示す；上記構造は免疫グロブリンのジョイニング（J）ドメインまたは他のドメインを示していないし、ジスルフィド結合も示していない。しかしながら、かかるドメインが結合活性のために必要な場合には、これらドメインは免疫グロブリン分子中に占める通常の位置にて存在するように構築されるであろう。 10

【0209】

別法として、キメラ重鎖を含む免疫グロブリンが得られるように、免疫グロブリン重鎖配列と軽鎖配列との間に t r k 受容体の細胞外ドメイン配列を挿入することができる。この態様において、ヒンジと C H 2 ドメインとの間かまたは C H 2 ドメインと C H 3 ドメインとの間にて、免疫グロブリンの各アームにおいて免疫グロブリン重鎖の 3' 末端に t r k 受容体配列を融合させる。同様の構築物がフーゲンブーム（H o o g e n b o o m , H . R . ）らの M o l . I m m u n o l . 2 8 , 1 0 2 7 ~ 2 0 3 7 (1 9 9 1) により報告されている。

【0210】

本発明のイムノアドヒーションには免疫グロブリン軽鎖の存在は必要ではないが、免疫グロブリン軽鎖は t r k 受容体 - 免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドに共有結合により会合するか、または t r k 受容体細胞外ドメインに直接融合して存在してよい。前者の場合、一般に免疫グロブリン軽鎖をコードする DNA を t r k 受容体 - 免疫グロブリン重鎖融合タンパク質をコードする DNA と共発現させる。分泌されると、混成の重鎖および軽鎖が共有結合により会合して、2つのジスルフィド結合した免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対を含む免疫グロブリン様構造体が提供される。かかる構造体の調製に適した方法は、たとえば、1989年3月28日に発行された米国特許第4,816,567号に開示されている。 20

【0211】

好ましい態様において、本発明のイムノアドヒーションの構築に使用する免疫グロブリン配列は、I g G 免疫グロブリン重鎖の定常ドメインからのものである。ヒトイムノアドヒーションの場合、ヒト I g G 1 および I g G 3 免疫グロブリン配列を使用するのが好ましい。I g G 1 を使用する主要な利点は、I g G 1 イムノアドヒーションが固定化プロテイン A 上で効率的に精製しうることである。対照的に、I g G 3 の精製にはプロテイン G が必要であるが、これは有意に利用範囲の狭い手段である。しかしながら、特定のイムノアドヒーションの構築のための I g 融合相手の選択に際しては、免疫グロブリンの他の構造的および機能的特性をも考慮すべきである。たとえば、I g G 3 のヒンジは一層長く一層可撓性に富むため、I g G 1 に融合した場合には折り畳まれずまたは適切に機能しない一層大きな「アドヒーション」ドメインを収容することが可能である。他の考慮すべき点は結合価 40 である；I g G イムノアドヒーションは2価のホモ二量体であるのに対し、I g A や I g M のような I g サブタイプは、それぞれ基本的な I g ホモ二量体ユニットの二量体構造または五量体構造を生じる。インビボ適用のために設計した t r k - I g イムノアドヒーションのためには、薬物動態学的特性および F c 領域により特定されるエフェクター機能もまた重要である。I g G 1、I g G 2 および I g G 4 はすべて21日のインビボ半減期を有するが、補体系を活性化する相対的な効力は異なっている。I g G 4 は補体を活性化せず、I g G 2 は I g G 1 に比べて補体活性化が有意に弱い。さらに、I g G 1 とは異なり、I g G 2 は単核細胞または好中球上の F c 受容体には結合しない。I g G 3 は補体活性化が最適であるが、インビボでの半減期は他の I g G イソタイプの約 1 / 3 である。イムノアドヒーションをヒト治療剤として用いるべく設計するに際して考慮すべき他の重要な点は、 50

特定のイソタイプのアロタイプ変異体である。一般に、血清学的に定められたアロタイプの少ないI g G イソタイプが好ましい。たとえば、I g G 1 はわずかに4つのみの血清学的に定められたアロタイプ部位を有し、そのうち2つ(G 1 m および2)はF c 領域に位置している；これら部位のうちの一つであるG 1 m 1 は非免疫原性である。対照的に、I g G 3 には12の血清学的に定められたアロタイプが存在し、そのすべてがF c 領域中に存在する；これら部位のうち3つ(G 3 m 5、11および21)だけが非免疫原性の一つのアロタイプを有する。それゆえ、3イムノアドヒーシンの潜在的な免疫原性は1イムノアドヒーシンの免疫原性よりも大きい。

【0212】

本発明のt r k - I g イムノアドヒーシンを設計するに際して、ニューロトロフィン結合および/または生物学的活性に必要なドメインは欠失させてよい。かかる構造において、折り畳みの間違いを回避するために融合接続(j u n c t i o n)をドメイン間に位置する残基に置くのが重要である。親の免疫グロブリンに関して、有用な接続点は2つの重鎖の間でジスルフィド結合を形成するヒンジのシステインの直ぐ上流である。しばしば用いられる設計において、該分子の「アドヒーシン」(t r k)部分のC末端残基のコドンにI g G 1 ヒンジ領域の配列D K T H T C P P C P のコドンの直ぐ上流に位置させる。

【0213】

イムノアドヒーシンの構築および発現に適した一般法は、上記で(天然または変異体の)t r k 受容体に関して開示したものと同一である。t r k - I g イムノアドヒーシンは、最も都合よくはt r k 部分をコードするc D N A 配列をI g c D N A 配列にインフレームで融合することにより構築される。しかしながら、ゲノムI g 断片への融合を用いることもできる[たとえば、ガスコイン(G a s c o i g n e)ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 84、2936~2940(1987)；アルフォら、C e l l 61、1303~1313(1990)；スタメンコビッチら、C e l l 66、1133~1144(1991)参照]。後者のタイプの融合には発現のためのI g 調節配列の存在が必要である。I g G 重鎖の定常領域をコードするc D N A の単離は、脾臓または末梢血リンパ球に由来するc D N A ライブラリーからの刊行された配列に基づき、ハイブリダイゼーションまたはポリメラーゼ連鎖反応(P C R)法により行うことができる。「アドヒーシン」をコードするc D N A およびイムノアドヒーシンのI g 部分をコードするc D N A を、選択された宿主細胞中での効率的な発現を指令するプラスミドベクター中に直列に挿入する。哺乳動物細胞中に発現するには、p R K 5 ベースのベクター[シャル(S c h a l l)ら、C e l l 61、361~370(1990)]およびC D M 8 ベースのベクター[シード(S e e d)、N a t u r e 329、840(1989)]を用いる。正確な接続は、オリゴヌクレオチド特異的欠失突然変異誘発を用い、設計した接続コドンの間の余分な配列を除去することにより創製することができる[ゾラー(Z o l l e r)およびスミス(S m i t h)、N u c l e i c A c i d s R e s . 10、6487(1982)；カボンら、N a t u r e 337、525~531(1989)]。各半分が所望の接続の各部位に相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いることができる；理想的には、これらオリゴヌクレオチドは36~47量体である。別法として、P C R 法を用いて該分子の2つの部分を適当なベクターにインフレームで接続することができる。

【0214】

t r k - I g イムノアドヒーシンの発現のための宿主細胞株の選択は、主として発現ベクターに依存する。他の考慮すべき点は、必要とするタンパク質の量である。ミリグラムの量が一過性のトランスフェクションによってしばしば産生されうる。たとえば、アデノウイルスE I A で形質転換された293ヒト胚腎臓細胞株をリン酸カルシウム法の変法によりp R K 5 ベースのベクターでトランスフェクションして十分なイムノアドヒーシン発現を行うことができる。C D M 8 ベースのベクターを用いてD E A E - デキストラン法によりC O S 細胞をトランスフェクションすることができる[アルフォら、C e l l 61

10

20

30

40

50

、1303～1313(1990)；ゼットマイスルら、DNA Cell Biol. (US) 9、347～353(1990)]。一層多量のタンパク質の産生を望む場合は、宿主細胞株の安定なトランスフェクションの後にイムノアドヒージョンを発現させることができる。たとえば、pRK5ベースのベクターを、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)をコードしG418に対する耐性を付与する別のプラスミドの存在下でチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞中に導入することができる。G418に対して耐性のクローンを培養中で選択することができる；これらクローンを増加レベルのDHFRインヒビターのメトトレキセートの存在下で増殖させる；DHFRおよびイムノアドヒージョン配列をコードする遺伝子コピーの数が同時に増幅されたクローンを選択する。イムノアドヒージョンがそのN末端に疎水性のリーダー配列を含む場合には、トランスフェクションした細胞によってプロセッシングおよび分泌されやすい。一層複雑な構造のイムノアドヒージョンの発現には、独特に適した宿主細胞を必要とする；たとえば、軽鎖またはJ鎖などの成分は、ある種のエロイマまたはハイブリドーマ細胞宿主によって提供されてよい[ガスコインら、1987、上記文献；マーチン(Martin)ら、J. Virol. 67、3561～3568(1993)]。

10

【0215】

イムノアドヒージョンはアフィニティークロマトグラフィーにより都合よく精製することができる。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は、キメラに用いた免疫グロブリンのFcドメインの種およびイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト1、2、または4重鎖に基づくイムノアドヒージョンを精製するのに用いることができる[リンドマーク(Lindmark)ら、J. Immunol. Meth. 62、1～13(1983)]。プロテインGはすべてのマウスイソタイプおよびヒト3に推奨される[グス(Guss)ら、EMBO J. 5、15671575(1986)]。アフィニティリガンドを結合させるマトリックスは最もしばしばアガロースであるが、他のマトリックスを利用することもできる。制御多孔性ガラス(controlled pore glass)やポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスは一層速い流速を可能とし、一層短い処理時間がアガロースで達成できる。イムノアドヒージョンをプロテインAまたはプロテインGアフィニティカラムに結合させる条件は、完全にFcドメインの特性、すなわちその種およびイソタイプによる。一般に、適切なリガンドを選択すると、非適正化培養液から効率的な結合が直接生じる。イムノアドヒージョンの一つの顕著な特徴は、ヒト1分子の場合、プロテインAに対する結合能が同じFcタイプの抗体に比べて若干減少していることである。結合したイムノアドヒージョンは、酸性pH(3.0またはそれ以上)かまたは穏やかなカオトロップ塩を含む中性pHの緩衝液中で効率的に溶出することができる。このアフィニティークロマトグラフィー工程の結果、>95%の純度のイムノアドヒージョン調製物を得ることができる。

20

30

【0216】

プロテインAまたはプロテインG上のアフィニティークロマトグラフィーの代わりに、またはプロテインAまたはプロテインG上のアフィニティークロマトグラフィーに加えて、当該技術分野で知られた他の方法を用いてイムノアドヒージョンを精製することができる。イムノアドヒージョンは、親チオ性(thiophilic)ゲルクロマトグラフィー[ハッチェンズ(Hutchens)およびポラト(Porath)、Anal. Biochem. 159、217～226(1986)]および固定化金属キレートクロマトグラフィー[アルーマシキ(Al-Mashikhi)およびマカイ(Makai)、J. Dairy Sci. 71、1756～1763(1988)]において抗体と同様に振る舞う。しかしながら、抗体とは対照的に、イオン交換カラム上の振る舞いは等電点によるのみならず、そのキメラ特性のために分子中に存在するかもしれない荷電双極子にもよる。

40

【0217】

所望なら、イムノアドヒージョンは2特異的にできる、すなわち2つの異なるリガンドに向けられるようにすることができる。それゆえ、本発明のイムノアドヒージョンは2つの異

50

なるニューロトロフィンに対する結合特異性を有してよく、またはニューロトロフィンと、該イムノアドヒーション構造の $t r k$ 部分が結合する該ニューロトロフィンを発現する細胞上に特異的に発現された他の決定基とに特異的に結合してよい。2 特異的な分子には、抗体様構造体の一方のアームのキメラ抗体重鎖と、他方のアームのキメラ抗体重鎖 - 軽鎖対とからなる三量体分子が精製の容易さのために有利である。2 特異的なイムノアドヒーションを産生するために伝統的に使用される抗体産生クアドローマ (10 の四量体の混合物を産生する) とは対照的に、三量体イムノアドヒーション構造体の 3 つの鎖をコードする核酸によりトランスフェクションされた細胞はわずかに 3 つの分子の混合物を産生し、この混合物からの所望の生成物の精製は一層容易である。

【0218】

10

(L. $t r k$ 受容体抗体調製物)

(i) ポリクローナル抗体

$t r k$ 受容体に対するポリクローナル抗体は、一般に、 $t r k$ 受容体およびアジュバントの複数の皮下 (s c) または腹腔内 (i p) 注射により動物において産生される。 $t r k$ 受容体または標的アミノ酸配列を含むその断片を、2 官能性または誘導体化試薬、たとえば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル (システイン残基による結合)、N - ヒドロキシスクシンイミド (リシン残基による結合)、グリタルアルデヒド、無水コハク酸、 $S O C l_2$ 、または $R^1 N = C = N R$ (式中、R および R^1 は異なるアルキル基である) を用い、免疫をしようとする種において免疫原性であるタンパク質、たとえばキーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビターにコンジュゲートするのが有用である。

20

【0219】

1 m g または 1 μ g の免疫原性コンジュゲート (それぞれ、ウサギまたはマウスに対して) を 3 容量のフロイントの完全アジュバントと組み合わせ、該溶液を複数部位にて皮下に注射することにより動物を該免疫原性コンジュゲートまたは誘導体に対して免疫する。1 カ月後、動物にフロイントの完全アジュバント中の最初の量の 1 / 5 ~ 1 / 10 の量のコンジュゲートを複数部位にて皮下注射することによりブースター投与する。7 ~ 14 日後、動物から採血し、血清を、抗 $t r k$ 受容体抗体力価についてアッセイする。力価がプラトーに達するまで動物をブースター投与する。好ましくは、動物を同じ $t r k$ 受容体のコンジュゲートだが異なるタンパク質にコンジュゲートした、および / または異なる交差試薬によりコンジュゲートしたものでブースター投与する。コンジュゲートはまた、組換え細胞培養中でタンパク質融合体として製造することもできる。また、免疫応答を促進するためにアルミニウムなどの凝集剤を用いる。

30

【0220】

(i i) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、実質的に均一な抗体の集団、すなわち、天然において最小量で存在する可能性のある変異以外は集団を構成する抗体が同一であるものから得られる。それゆえ、「モノクローナル」なる修飾語は、区別される抗体の混合物でないものとしての抗体の特性を示す。

【0221】

40

たとえば、本発明の抗 $t r k$ 受容体モノクローナル抗体は、ケーラーおよびミルシュテインによって最初に記載されたハイブリドーマ法 (Nature 256 : 495 (1975)) を用いて作製することができ、または組換え DNA 法 [キャビリー (C a b i l l y) ら、米国特許第 4, 816, 567 号] によって作製することができる。

【0222】

ハイブリドーマ法では、マウスや他の適当な宿主動物、たとえばハムスターを上記のようにして免疫して、免疫に用いたタンパク質に特異的に結合するであろう抗体を産生するまたは産生しうるリンパ球を生成させる。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することができる。ついで、ポリエチレングリコールなどの適当な融合剤を用いてリンパ球をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマ細胞を生成する [ゴードینگ (G o d i n

50

g)、モノクローナル・アンティボディーズ：プリンシプルス・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice)、59～103頁 (アカデミックプレス、1986)]。

【0223】

かくして産生されたハイブリドーマ細胞を、未融合の親ミエローマ細胞の増殖または生存を抑制する1またはそれ以上の物質を好ましくは含む適当な培地中に接種し、増殖させる。たとえば、親のミエローマ細胞が酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRTまたはHPRRT) を欠く場合には、ハイブリドーマの培地は一般にヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン (これら物質はHGPRTを欠く細胞の増殖を妨害する) を含むであろう (HAT培地)。

10

【0224】

好ましいミエローマ細胞は、効率的に融合し、選択した抗体産生細胞による抗体の安定な高レベル発現を支持し、HAT培地などの培地に感受性であるものである。これらのうち、好ましいミエローマ細胞株は、ソーグ・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター (Salk Institute Cell Distribution Center) (サンジエゴ、カリフォルニア、米国) から入手可能なMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍からのものや、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ロックビル、メリーランド、米国) から入手可能なSP-2などのマウスミエローマ株である。

【0225】

ハイブリドーマ細胞を増殖させた培地を、trk受容体に対して向けられたモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性を免疫沈降により、またはラジオイムノアッセイ (RIA) や酵素結合抗体免疫吸着アッセイ (ELISA) などのインビトロ結合アッセイにより決定する。

20

【0226】

モノクローナル抗体の結合親和性は、たとえば、マンソン (Munson) およびポラード (Pollard) のスキャッチャード (Scatchard) 分析 (Anal. Biochem. 107: 220 (1980)) により決定することができる。

【0227】

所望の特異性、親和性、および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定した後、これらクローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準法により増殖させる。ゴードینگ (Goding)、モノクローナル・アンティボディーズ：プリンシプルス・アンド・プラクティス、59～104頁 (アカデミックプレス、1986)。この目的に適した培地としては、たとえば、ダルベッコの変性イーグル培地やRPMI-1640培地が挙げられる。加えて、ハイブリドーマ細胞はまた腹水腫瘍として動物中でインビボで増殖させることができる。

30

【0228】

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、たとえば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなどの通常の免疫グロブリン精製手順により、培地、腹水、または血清から適当に分離する。

40

【0229】

本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常法 (たとえば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合しうるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより) を用い、容易に単離および配列決定される。本発明のハイブリドーマ細胞は、かかるDNAの好ましい採取源である。単離されたら、DNAを発現ベクター中に入れ、ついで該発現ベクターをサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、または免疫グロブリンタンパク質を産生しないミエローマ細胞などの宿主細胞中にトランスフェクションして、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体を合成する。DNA

50

配列はまた、たとえば、相同なマウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインのコード配列で置換することにより（モリソンら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81、6851（1984））、または免疫グロブリンのコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全体または部分を共有結合により連結することにより、修飾することができる。このようにして、本発明の抗 t r k モノクローナル抗体の結合特異性を有する「キメラ」または「ハイブリッド」抗体が調製される。

【0230】

典型的に、かかる非免疫グロブリンポリペプチドは本発明の抗体の定常ドメインと置換されるか、または本発明の抗体の一方の抗原結合部位の可変ドメインと置換されて、t r k 受容体に対する特異性を有する一方の抗原結合部位と、異なる抗原に対する特異性を有する他方の抗原結合部位とを含む2価のキメラ抗体を創製する。

10

【0231】

キメラ抗体またはハイブリッド抗体はまた、架橋剤を使用するものを含む合成タンパク質化学において知られた方法を用い、インビトロで調製することもできる。たとえば、ジスルフィド交換反応を用い、またはチオエーテル結合を生成することにより、イムノトキシンを構築することができる。この目的に適した試薬としては、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデートが挙げられる。

【0232】

診断に応用するには、本発明の抗体は典型的に検出可能な部分で標識されるであろう。検出可能な部分とは、検出可能なシグナルを直接または間接に生成しうるものであればいずれであってもよい。たとえば、検出可能な部分は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、または ^{125}I などの放射性同位元素、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、またはルシフェリンなどの蛍光または化学ルミネセンス化合物；ビオチン；放射性同位元素標識、たとえば、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{14}C 、または ^3H 、またはアルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素であってよい。

20

【0233】

抗体を検出可能な部分に別々に連結させるため、ハンター（Hunter）ら、Nature 144：945（1962）；デービッド（David）ら、Biochemistry 13：1014（1974）；ペイン（Pain）ら、J. Immunol. Meth. 40：219（1981）；およびニグレン（Nygren）、J. Histochem. and Cytochem. 30：407（1982）に記載された方法を含む、当該技術分野で知られたいかなる方法も用いることができる。

30

【0234】

本発明の抗体は、競合結合アッセイ、直接および間接サンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイなどの公知アッセイ法のいずれにおいても使用できる。ゾラ、モノクローナル・アンティボディー：ア・マニュアル・オブ・テクニクス（Monoclonal Antibodies：A Manual of Techniques）、147～158頁（CRCプレス、1987）。

【0235】

競合結合アッセイは、限られた量の抗体への結合に対して標識標準（t r k 受容体かまたはその免疫学的に反応性の部分であってよい）が試験試料分析対象物（t r k 受容体）と競合する能力に基づく。試験試料中の t r k 受容体の量は、該抗体に結合した標準の量に反比例する。結合した標準の量の決定を容易にするため、該抗体に結合した標準および分析対象物を結合しないで残った標準および分析対象物から都合よく分離できるように、該抗体を一般に競合の前または後に不溶化する。

40

【0236】

サンドイッチアッセイは、それぞれ、検出すべきタンパク質の異なる免疫原性部分またはエピトープに結合しうる2つの抗体を使用することを含む。サンドイッチアッセイにおいては、試験試料の分析対象物が固相支持体上に固定化した第一の抗体に結合され、その

50

後、第二の抗体が分析対象物に結合し、かくして不溶性の3部分複合体を生成する。デービッドおよびグリーン (Greene)、米国特許第4,376,110号。第二の抗体は、それ自体が検出可能な部分で標識されていてもよいし (直接サンドイッチアッセイ)、または検出可能な部分で標識した抗免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい (間接サンドイッチアッセイ)。たとえば、一つのタイプのサンドイッチアッセイはELISAアッセイであり、この場合は検出可能な部分は酵素である。

【0237】

(iii) ヒト化抗体

非ヒト抗体をヒト化する方法は当該技術分野でよく知られている。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトの採取源から導入された1またはそれ以上のアミノ酸残基をその中に有する。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「インポート (import)」残基と呼ばれ、典型的に「インポート」可変ドメインから取られたものである。ヒト化は本質的にウインター (Winter) および共同研究者の方法 [ジョーンズ (Jones) ら、Nature 321、522~525 (1986); リーチマン (Riechmann) ら、Nature 332、323~327 (1988); ベルヘイエン (Verhoeven) ら、Science 239、1534~1536 (1988)] に従い、ネズミCDRまたはCDR配列でヒト抗体の対応配列を置換することにより行うことができる。従って、かかる「ヒト化」抗体は、実質的に完全なヒト可変ドメイン未満が非ヒト種由来の対応配列により置換されたキメラ抗体である (キャビリー、上掲)。実際には、ヒト化抗体は、典型的に、幾つかのCDR残基およびおそらく幾つかのFR残基がネズミ抗体中の類似部位からの残基により置換されたヒト抗体である。

【0238】

抗体のヒト化は、抗原に対する高親和性および他の好ましい生物学的特性を保持しながら行うことが重要である。この目的を達成するため、好ましい方法に従い、ヒト化抗体は親およびヒト化配列の三次元モデルを用いた親配列および種々の概念的ヒト化産物の分析プロセスにより調製される。三次元免疫グロブリンモデルは当業者には普通に利用でき、よく知られている。選択した候補免疫グロブリン配列のありうる三次元立体構造を明らかにし表示するコンピュータプログラムを利用できる。これら表示を調べると、候補免疫グロブリン配列の機能におけるこれら残基の果たしうる役割の分析、すなわち該候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このように、標的抗原への増加した親和性などの所望の抗体特性が達成されるように、FR残基を共通配列およびインポート配列から選択し組み合わせることができる。一般に、CDRが直接かつ最も実質的に抗原結合への影響に関与している。詳細はPCT特許公報第WO94/04679号参照。

【0239】

(iv) ヒト抗体

ヒトモノクローナル抗体はハイブリドーマ法により作製できる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒトミエローマおよびマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株が、たとえば、コズボー (Kozbor)、J. Immunol. 133、3001 (1984)、およびブロダー (Brodeur) ら、モノクローナル・アンティボディー・プロダクション・テクニック・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies Production Techniques and Applications)、51~63頁 (マーセル・デッカー (Marcel Dekker, Inc.))、ニューヨーク、1987) に記載されている。

【0240】

免疫後に内生の免疫グロブリン産生の不在下でヒト抗体のレパートリーを産生しうるトランスジェニック動物 (たとえば、マウス) を作製することが今や可能である。たとえば、キメラおよび生殖細胞変異体マウスにおける抗体重鎖ジョイニング領域 (J_H) 遺伝子のホモ接合性欠失は内生抗体産生の完全な抑制という結果になることが記載されている。ヒト生殖細胞免疫グロブリン遺伝子アレイをかかると、生殖細胞変異体マウス中に移すと、抗

原攻撃によりヒト抗体が産生される結果となる。たとえば、ジャコボビッツ (J a k o b o v i t s) ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 90、2551~2555 (1993) ; ジャコボビッツら、N a t u r e 362、255~258 (1993) 参照。

【 0 2 4 1 】

別法として、ファージ提示 (p h a g e d i s p l a y) 法 (マッカファーティ (M c C a f f e r t y) ら、N a t u r e 348、552~553 [1990]) を用い、免疫していない供与体からの免疫グロブリン可変 (V) ドメイン遺伝子レパートリーからインビトロでヒト抗体および抗体断片を作製することができる。この技術によれば、抗体のVドメイン遺伝子がM13やfdなどの繊維状バクテリオファージのメジャーまたはマイナーコートタンパク質遺伝子のいずれかの中にインフレームでクローニングされ、該ファージ粒子の表面上に機能的抗体断片として提示される。繊維状粒子はファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能的特性に基づく選択はまた、該特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択という結果となる。それゆえ、ファージはB細胞の幾つかの特性を真似たものとなる。ファージ表示は種々の態様で行うことができる ; その概論には、たとえば、ジョンソン (J o h n s o n) 、ケビン (K e v i n S .) およびチズウエル (C h i s w e l l) 、デービッド (D a v i d J .) 、カレント・オピニオン・イン・ストラクチャル・バイオロジー (C u r r e n t O p i n i o n i n S t r u c t u r a l B i o l o g y) 3、564~571 (1993) を参照。幾つかの入手源のV - 遺伝子セグメントをファージ提示に使用できる。クラックソン (C l a c k s o n) らは、免疫したマウスの脾臓からのV遺伝子の小さなランダム組み合わせライブラリー (s m a l l r a n d o m c o m b i n a t o r i a l l i b r a r y) から抗オキサゾロン抗体の種々のアレイを単離した (N a t u r e 352、624~628 (1991)) 。免疫していないヒトからのV遺伝子のレパートリーの構築および抗原の種々のアレイ (自己抗原を含む) に対する抗体の単離は、本質的にマークス (M a r k s) ら (J . M o l . B i o l . 222、581~597 (1991)) またはグリフィス (G r i f f i t h) ら (E M B O J . 12、725~734 (1993)) によって記載された技術に従って行うことができる。天然の免疫応答においては、抗体遺伝子は高率で突然変異を蓄積する (体細胞超突然変異 (s o m a t i c h y p e r m u t a t i o n)) 。導入された変化の幾つかは一層高い親和性を付与し、高親和性の表面免疫グロブリンを提示するB細胞はその後の抗原攻撃の間に優先的に複製し分化する。この天然のプロセスは、「鎖シャフリング (c h a i n s h u f f l i n g) 」として知られる技術により真似ることができる (マークスら、B i o / T e c h n o l . 10、779~783 [1992]) 。この方法では、ファージ提示により得られた「一次 (p r i m a r y) 」ヒト抗体の親和性は、免疫していない供与体から得られたVドメイン遺伝子の天然にみられる変異体のレパートリーで重鎖および軽鎖V領域遺伝子を順次置換していくことにより改善することができる。この技術はnM範囲の親和性を有する抗体および抗体断片の作製を可能とする。非常に大きなファージ抗体レパートリー (「マザー - オブ - オールライブラリー (t h e m o t h e r - o f - a l l l i b r a r i e s) 」としても知られる) を作製するための戦略がウォーターハウス (W a t e r h o u s e) らによって記載されており (N u c l . A c i d s R e s . 21、2265~2266 (1993)) 、かかる大きなファージライブラリーからの高親和性のヒト抗体の直接の単離はグリフィスらにより報告されている (E M B O J . (1994) 、印刷中) 。遺伝子シャフリング (g e n e s h u f f l i n g) はまた、ネズミ抗体からヒト抗体を由来するのに用いることができ、その際、該ヒト抗体は出発のネズミ抗体と類似の親和性および特異性を有する。「エピトープインプリンティング (e p i t o p e i m p r i n t i n g) 」とも呼ばれるこの方法によれば、ファージ提示法により得られたネズミ抗体の重鎖または軽鎖Vドメイン遺伝子をヒトVドメイン遺伝子のレパートリーで置換してネズミ - ヒトキメラが創製される。抗原の選択は、機能的な抗原結合部位、すなわち相手の選択を支配 (刷り込む) するエピトープを再分類しうるヒト可変の単離という結果となる。このブ

10

20

30

40

50

ロセスを残りのネズミVドメインを置換するために繰り返すと、ヒト抗体が得られる(1993年4月1日に公開されたPCT特許出願第WO93/06213号を参照)。CDR移植によるネズミ抗体の伝統的なヒト化と異なり、この方法は、ネズミ由来のフレームワークもCDR残基もともに有しない完全にヒトの抗体を提供する。

【0242】

(v) 2特異的抗体

2特異的抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナルな、好ましくはヒトまたはヒト化された抗体である。本発明の場合には、これら結合特異性のうちの一つはtrk受容体に対するものであり、他の特異性は他の抗原、好ましくは他の受容体または受容体サブユニットに対するものである。たとえば、trk受容体および神経栄養因子、または2つの異なるtrk受容体に特異的に結合する2特異的抗体は本発明の範囲に包含される。

10

【0243】

2特異的抗体の製造法は当該技術分野で知られている。伝統的に、2特異的抗体の組換え製造は2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の共発現に基づいており、その際、2つの重鎖は異なる特異性を有する(ミルシュテインおよびクエロ(Cue l l o)、Nature 305、537~539(1983))。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の取り合わせがランダムなため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10の異なる抗体分子の潜在的な混合物を産生し、そのうち一つのみが正しい2特異的な構造を有する。正しい分子の精製は通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われるが、かなり面倒であり、生成物の収率は低い。同様の手順がPCT出願公開第WO93/08829(1993年5月13日公開)およびトラウネッカー(Tra u n e c k e r)らのEMBO J. 10、3655~3659(1991)に開示されている。

20

【0244】

異なる一層好ましいアプローチによれば、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗体-抗原結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合する。融合は、少なくとも一部のヒンジ、CH2およびCH3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインと行うのが好ましい。軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)が融合物の少なくとも一つに存在するのが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合体および所望なら免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物中にコトランスフェクションする。このことは、構築において3つのポリペプチド鎖の均等でない比率を使用することが最適の収率を与える態様において、これら3つのポリペプチド断片の相互の比率を調節するうえでの大きな柔軟性を付与する。しかしながら、少なくとも2つのポリペプチド鎖の等比率での発現が高収率の結果となるかまたは比率が特に重要でない場合には、3つのポリペプチドのうちの2つまたはすべてをコードする配列を一つの発現ベクター中に挿入することが可能である。このアプローチの好ましい態様において、2特異的抗体は、一方のアームにおける第一の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖と、他方のアームにおけるハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を付与する)とからなる。このような非対称な構造は、免疫グロブリン軽鎖が2特異的分子の半分の一方にのみ存在することは分離を容易にするので、望まない免疫グロブリン鎖の組み合わせから所望の2特異的化合物を分離するのを容易にすることがわかった。このアプローチは、1994年3月3日に公開されたPCT出願公開第WO94/04690に開示されている。

30

40

【0245】

2特異的抗体の作製に関するさらなる詳細は、たとえば、スレシュ(Suresh)らのMethods in Enzymology 121、210(1986)を参照。

【0246】

(v) ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に包含される。ヘテロコンジュゲート抗体は、共有結合により結合された2つの抗体からなる。かかる抗体は、たとえば、免疫系

50

細胞を所望されていない細胞にターゲティングしたり（米国特許第4,676,980）、HIV感染の治療（PCT出願公開第WO91/00360およびWO92/200373；EP03089）に提唱されている。ヘテロコンジュゲート抗体は、都合のよい架橋法を用いて作製することができる。適当な架橋剤は当該技術分野でよく知られており、多数の架橋法とともに米国特許第4,676,980に開示されている。

【0247】

（M．trk-Igイムノアドヒージンの使用）

（i）リガンド結合

抗体におけるように、イムノアドヒージンのFc領域は精製のみならず捕捉および検出のための便利な取っ手を提供する。このことは、2つの異なる抗Fc抗体を用いたサンドイッチELISAを用いてイムノアドヒージンを定量する（たとえば、トランスフェクションした細胞の上澄み液中で）のに有用である。加えて、Fc取っ手は、trk部分と対応ニューロトロフィンとの相互作用を調べるのを容易にする。たとえば、マイクロタイタープレート結合アッセイ態様を使用でき、その場合、抗Fc抗体を前以てコーティングしたウエル上にイムノアドヒージンを固定化する。このことは、イムノアドヒージンを同族ニューロトロフィンリガンドによる結合にtrk部分が接近できるような方向に配置することになる。ついで、リガンドを加え、固定化イムノアドヒージンとともにインキュベートする。未結合のリガンドを洗浄して除いた後、ニューロトロフィンリガンドが放射性標識してある場合には放射能をカウントすることにより、または抗ニューロトロフィン抗体により結合を定量する。非特異的な結合は、イムノアドヒージンを省くことにより、または関係のない「アドヒージン」部分を有するイソタイプマッチしたイムノアドヒージンを含めることにより決定することができる。このアッセイ態様は、ある種のニューロトロフィンの過小または過剰発現を特徴とする病理学的状態の診断に使用でき、また、trkA、trkBまたはtrkC受容体への種々の神経栄養因子の結合の比較、およびtrk受容体に対する新たなリガンドの発見に向けられた努力、たとえば、合成または天然の有機化合物のライブラリーのスクリーニングにも有用である。

【0248】

（ii）リガンドの同定／単離

trk-Igイムノアドヒージンを使用できる他の領域は、ヒトまたは種々の動物種におけるさらなるニューロトロフィンの探索、およびかかるリガンドの精製である。このアプローチによって現在までに同定されたリガンドとしては、2つのL-セレクチンリガンド、GlyCAM-1およびCD34が挙げられ、これらはL-セレクチン-IgGアフィニティーカラムを用いて同定および単離された（イマイ（Imai）ら、J．Cell．Biol．113、1213～1221（1991）；ワトソンら、J．Cell．Biol．110、2221～2229（1990）；ワトソンら、J．Cell．Biol．1349、164～167（1991）】。

【0249】

（iii）大量の精製可溶性trk受容体の製造

イムノアドヒージンと抗体との構造的類似は、パパインなどのタンパク質加水分解酵素によりイムノアドヒージンを開裂して「アドヒージン」部分を含むFd様の断片を生成することが可能であることを示唆した。イムノアドヒージンの開裂のための一層包括的なアプローチを得るためには、標的配列に高度に特異的なプロテアーゼを用いるべきである。この目的に適したプロテアーゼは、ズブチリシンBPNの遺伝子操作変異体であり、このものは配列AAHYTLを認識し開裂する。この標的配列をtrk-IgG1イムノアドヒージンの支持体ヒンジ領域中に導入すると、Fcドメインとtrkドメインとの間での高度に特異的な開裂が容易となる。イムノアドヒージンはプロテインAクロマトグラフィーにより精製し、固定化された該酵素により開裂される。開裂の結果、2つの生成物、Fc領域およびtrk領域が得られる。これら断片は、プロテインAカラムに2回目通過させてFcを保持し溶出フラクション中に精製trk断片を得ることにより容易に分離することができる。同様のアプローチは、開裂可能な配列を一層下方のヒンジ部に配置するこ

とにより二量体 t r k 部分を得るのに使用できる。

【 0 2 5 0 】

(N . t r k 受容体の使用)

(i) キナーゼ受容体活性化アッセイ

t r k 受容体は、P C T 特許公開第 W O 9 4 / 0 3 1 9 8 に記載されたキナーゼ受容体活性化 (K I R A) アッセイに使用できる。この E L I S A タイプのアッセイは、受容体プロテインチロシンキナーゼ (r P T K、たとえば、t r k 受容体) のキナーゼドメインの自己リン酸化を測定することによるキナーゼ活性化の定性的または定量的測定、並びに選択された r P T K の潜在的なアゴニストまたはアンタゴニストの同定および特徴付けに適している。このアッセイの第一段階は、キナーゼ受容体、たとえば t r k 受容体のキナーゼドメインのリン酸化を含み、その際、該受容体は真核細胞の細胞膜中に存在する。受容体は内生の受容体であってよく、または受容体または受容体構築物をコードする核酸を細胞中に形質転換してよい。典型的に、第一の固相 (たとえば、第一のアッセイプレートのウエル) にかかる細胞 (通常、哺乳動物細胞株) が接着するように該細胞の実質的に均一な集団で該固相をコーティングする。しばしば、細胞は接着性であり、それによって第一の固相に自然に接着する。「受容体構築物」を使用する場合には、それは通常、キナーゼ受容体とフラグ (f l a g) ポリペプチドとの融合からなる。フラグポリペプチドは該アッセイの E L I S A 部分において捕捉試薬、しばしば捕捉抗体により認識される。ついで、チロシンキナーゼ受容体 (たとえば、t r k 受容体) が分析対象物に暴露されるように (または分析対象物と接触するように)、細胞が接着したウエルに分析対象物を加える。このアッセイは、興味のもたれるチロシンキナーゼ受容体 (たとえば、t r k A、t r k B または t r k C) に対するアゴニストおよびアンタゴニストリガンドの同定を可能にする。受容体にアゴニストが結合するのを阻止するアンタゴニストリガンドの存在を検出するためには、受容体結合および活性化の競合的抑制を測定できるように、まず、接着している細胞をアンタゴニストリガンドであると思われるものに暴露し、ついでアゴニストリガンドに暴露する。また、このアッセイは、アゴニストリガンドに結合することによって該アゴニストリガンドが r P T K に結合し活性化する能力を減少または除去するアンタゴニストを同定することができる。かかるアンタゴニストを検出するには、r P T K に対するアンタゴニストと思われるものおよびアゴニストと一緒にインキュベートし、ついで、このリガンド混合物に接着細胞を暴露する。分析対象物への暴露の後、接着細胞を溶解緩衝液 (可溶化界面活性剤を含有する) および穏やかな攪拌により可溶化し、それによって細胞溶解液を放出させ、これを濃縮または清澄化する必要なく直接、アッセイの E L I S A 部分に供することができる。ついで、かくして調製した細胞溶解液はアッセイの E L I S A 段階に容易に供することができる。E L I S A 段階の第一の工程として、第二の固相 (通常、E L I S A マイクロタイタープレートのウエル) を、チロシンキナーゼ受容体または受容体構築物の場合はフラグポリペプチドに特異的に結合する捕捉試薬 (しばしば捕捉抗体) でコーティングする。第二の固相のコーティングは、捕捉試薬が第二の固相に接着するようにして行う。捕捉試薬は一般にモノクローナル抗体であるが、実施例にも記載するようにポリクローナル抗体を用いることもできる。ついで、受容体または受容体構築物が第二の固相に接着する (または捕捉される) ように、得られた細胞溶解液を接着捕捉試薬に暴露または接触させる。ついで、未結合の細胞溶解液を除去するために洗浄工程を行い、捕捉された受容体または受容体構築物を残す。ついで、接着したまたは捕捉された受容体または受容体構築物を、チロシンキナーゼ受容体中のリン酸化されたチロシン残基を同定する抗ホスホチロシン抗体に暴露または接触させる。好ましい態様において、抗ホスホチロシン抗体は、非放射性的の発色試薬の色変化を触媒する酵素に (直接または間接に) コンジュゲートされている。従って、受容体のリン酸化は、その後の試薬の色変化により測定することができる。該酵素は抗ホスホチロシン抗体に直接結合させることができるし、またはコンジュゲート分子 (たとえば、ビオチン) を抗ホスホチロシン抗体にコンジュゲートし、その後、該酵素をコンジュゲート分子を介して抗ホスホチロシン抗体に結合させることができる。最後に、捕捉された受容体または受容体構築物への抗ホスホチロ

10

20

30

40

50

シン抗体の結合を、たとえば発色試薬の色変化により測定する。

【0251】

(ii) 治療学的使用

本発明の *trk B* および *trk C* 受容体ポリペプチド並びにこれら受容体に特異的に結合する抗体（モノ特異的であるか2特異的であるかまたはヘテロコンジュゲート態様である）は、これら受容体の少なくとも一つに結合しうるニューロトロフィンの生物学的活性をシグナル伝達（*signaling*）、促進または阻止するうえで有用である。本発明の *trk - Ig* イムノアドヒーションは、*trk* 受容体とその神経栄養因子リガンドとの相互作用を阻止し、それによってニューロトロフィンの生物学的活性を抑制することがわかった。このアンタゴニスト活性は、内生ニューロトロフィン産生を伴う病理学的状態、たとえば、炎症性の疼痛（*trk A - イムノアドヒーション*；実施例5参照）、膵炎（*trk B - イムノアドヒーション*）、腎臓疾患、肺疾患、心血管疾患（*trk C - イムノアドヒーション*）、種々のタイプの腫瘍（*trk A -*、*trk B -* および *trk C - イムノアドヒーション*）、癲癇における異常な出現（*aberrant sprouting*）、精神病（*trk B -* および *trk C - イムノアドヒーション*）などの治療に有用である。ヒトイムノアドヒーションは、ヒト免疫系によって「外来のもの」と認識される唯一の新規な配列が接続部分のみであるように、該分子の *trk* 部分および *Ig* 部分の両方ともがヒト配列であることに基づくことができる。それゆえ、ヒトイムノアドヒーションはキメラ（ヒト化）抗体とは対照的にヒトにおける免疫原性が最小である。このような減少した免疫原性は、とりわけ複数の投与を必要とする適応症にとって重要な利点である。

10

20

【0252】

本発明の治療用調合物は、所望の程度の純度を有する活性成分を任意の生理学的に許容しうる担体、賦形剤または安定化剤（レミングトンズファーマシューティカルサイエンスィズ、第16版、オソル編（1980））と混合することにより、凍結乾燥調合物または水溶液の形態にて貯蔵のために調製される。許容しうる担体、賦形剤または安定化剤は、使用した投与量または濃度で受容者に非毒性であり、リン酸、クエン酸および他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシンなどのアミノ酸；単糖、二糖、およびグルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTAなどのキレート化剤；マンニトールやソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩を形成する対イオン；およびツイーン、プルロニックまたはPEGなどの非イオン性界面活性剤を含む。

30

【0253】

活性成分はまた、たとえばコアセルベーション法によりまたは界面重合法により調製したマイクロカプセル（たとえば、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）、コロイド状ドラッグデリバリーシステム（たとえば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）、またはマクロエマルジョン中に包括することができる。かかる技術は上記レミングトンズファーマシューティカルサイエンスィズに開示されている。

40

【0254】

インビボ投与に使用する調合物は滅菌する必要がある。このことは、凍結乾燥および再構成の前または後に滅菌濾過膜にて濾過することにより容易に行うことができる。

【0255】

本発明の治療用組成物は、一般に滅菌アクセスポートを有する容器、たとえば静脈内溶液バッグまたは皮下注射針により破碎しうるストッパーを有するバイアル中に入れる。

【0256】

投与経路は公知の方法に従い、たとえば、静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内または病変内経路による注射または注入、局所投与、または除放系にて行う。

50

【0257】

除放調製物の適当な例としては、たとえばフィルムやマイクロカプセルなどの形状製品の形態の半透明ポリマーマトリックスが挙げられる。除放マトリックスは、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919、EP58,481）、L-グルタミン酸とL-グルタミン酸エチルとのコポリマー（シドマン（U. Sidman）ら、1983、「Biopolymers」22（1）：547～556）、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）（ランガー（R. Langer）ら、1981、「J. Biomed. Master. Res.」15：167～277およびランガー、1982、Chem. Tech. 12：98～105）、エチレンビニルアセテート（ランガーら、上掲）またはポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸（EP133,988 A）を含む。除放組成物はまたリポソームを含む。本発明の範囲内の分子を含むリポソームは、それ自体公知の方法により調製される：DE3,218,121A；エプスタイン（Epstein）ら、1985、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」82：3688～3692；ファング（Hwang）ら、1980、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」77.4030～4034；EP52322A；EP36676A；EP88046A；EP143949A；EP142641A；日本特許出願第83-118008；米国特許第4,485,045および4,544,545；およびEP102,324A。通常、リポソームは脂質含量が約30モル%コレステロールを越える小さな（約200～800オングストローム）単ラメラタイプのものであり、選択された比率は最適なNT-4療法に適合されている。

【0258】

治療に用いる本発明の分子の有効量は、たとえば、治療目的、投与経路、および患者の状態に依存するであろう。従って、治療者は最適の治療効果を得るための必要に応じて投与量を滴定し投与経路を変える必要があるであろう。典型的な1日当たりの投与量は、上記因子に依存して約1μg/kgから100mg/kgまたはそれ以上までの範囲である。一般に、臨床医は必要とされる生物学的効果を奏する投与量に達するまで本発明の分子を投与するであろう。この治療の進行は通常のアッセイにより容易にモニターされる。

【0259】

本発明は下記の限定されない実施例によりさらに詳細に説明されるであろう。実施例に記載した実験については、ヒト脳cDNA、ポリ + RNA、ゲノムおよびcDNAライブラリーはクローンテック（Clontech）（パロアルト、カリフォルニア）から入手した。pGEMはプロメガ（Promega）（マジソン、ウイスコンシン）から、制限酵素はニュー・イングランド・バイオラブズ（New England Biolabs）（ビバリー、マサチューセッツ）から入手した。Taqポリメラーゼはパーキン・エルマー（Perkin-Elmer）（ノーウォーク、コネチカット）から入手したが、他のすべての酵素、凍結したコンピテントな大腸菌および組織培養培地はギブコ-BRL（Gibco-BRL）（ライセルスブルク、メリーランド）から購入した。

【実施例】

【0260】

（実施例1）

（ヒトtrkBおよびtrkC受容体のクローニング）

（A. ヒトtrkBおよびtrkCプロンプの生成）

ヒト脳cDNA、ポリA+RNA、ゲノムおよびcDNAライブラリーをクローンテック（パロアルト）から入手した。

【0261】

cDNAライブラリーのプロンプに使用するヒトtrkBおよびtrkC配列の断片を増幅するため、ラットtrkBまたはブタtrkCの公知配列に基づく縮重プライマー（表1参照）を用いたPCRを採用した。PCR反応緩衝液は、10mMトリス（室温にてpH8.4）、2.0mM MgCl₂ および50mM KClからなっていた。すべての反応に「ホットスタート（hotstart）」手順を用い、酵素を含まない試料を9

8 にて10分間インキュベートし、65 に平衡化し、酵素を加えた。ついで、94 にて45秒；60 にて45秒；および72 にて60秒のサイクルを35サイクル行い、最終伸長を72 で10分間行った。

【0262】

この手順により増幅された断片を p G E M ベクター（プロメガ、マジソン、ウイスコンシン）中にサブクロニングし、配列決定した。ついで、公知の t r k B および t r k C 配列と類似の配列を有するクローンから挿入物を切り出し、ゲル精製し、32 P d C T P を用いたランダムプライミングにより標識した。これらを用いて15 cm 皿当たり 5×10^4 プラークにてプレーティングした 10^6 c D N A クローンをプローブし、ニトロセルロース（シュライハヤ・アンド・シュエル（S c h l e i c h e r a n d S c h u e l l ）、キーン、ニューハンプシャー）に2つずつ移し、アルカリ変性し、中和し、80 で2時間焼結した。フィルターを50%ホルムアミド、5 x S S C、5 x デンハルト溶液、20 mM N a P O ₄、p H 7.4、0.1% S D S、および100 μ g / m l サケ精子 D N A 中、42 にて少なくとも4時間プレハイブリダイズし、デンハルト溶液を1 x に下げた同じ条件下で一夜ハイブリダイズした。ついで、フィルターを2 x S S C、0.1% S D S で4回、および0.1 x S S C、0.1% S D S で室温にて2回、および0.1 x S S C、0.1% S D S で42 にて2回、洗浄した。両セットのフィルターで陽性であったクローンをプラーク精製し、挿入物をヘルパー媒体した切り出し（ラムダ D R 2 ライブラリー）かまたは標準的なサブクロニングにより p G E M 中にサブクロニングした。オリゴヌクレオチドプローブをポリヌクレオチドキナーゼを用いて末端標識するか、または D N A ポリメラーゼのクレノウ断片を用いた「充填（f i l l - i n）」反応により標識し、ホルムアミドを35%に減少させた同じ条件下でフィルターにハイブリダイズさせた。t r k B の5'プローブにハイブリダイズするゲノムクローンを S a u 3 a で消化し、得られた断片を B a m H I 切断した M 1 3 m p 1 8 中にサブクロニングした。これらクローンをラムダライブラリーと同様に再スクリーニングし（変性工程なし）、陽性のクローンをプラーク精製し、配列決定した。t r k B および t r k C の完全なコード領域をコードする D N A を標準法を用いて再構築した。

【0263】

（B. ヒト t r k B クローンの特徴付け）

ヒト t r k B のプローブを用いて6つのクローンが得られた。これらを、最初のプローブで得られた配列から設計した P C R およびプライマーを用いてマッピングし、最大の3'および5'伸長を有するクローンを配列決定した。配列分析は、これらクローンがネズミ t r k B と高度に相同なタンパク質をコードしており、全チロシンキナーゼドメインを含み3'ポリA+テールは完全であるが5'末端は明らかに不完全であることを明らかにした。ラット t r k B 配列の5'末端から設計したオリゴヌクレオチドプローブを用い、最初のライブラリー、および引き続き、陽性のクローンが認められなかった4つの他の d T プライミングしたヒト脳ライブラリーを再スクリーニングした。このプローブを用いてランダムプライミングヒト脳ライブラリーをスクリーニングしたところ、4つの陽性クローンが得られた。これらクローンの配列分析は、これらクローンが前記ヒトクローンと重複しているが、ラットと比較すると5'末端のコード領域の17の塩基が依然として失われていた。ついで、ヒトゲノムライブラリーを5'オリゴヌクレオチドプローブでプローブし、ゲノムクローンを単離した。ついで、これらクローンの S a u 3 a 断片を M 1 3 中にサブクロニングし、再スクリーニングし、陽性サブクローンの配列を決定して最終のコード配列を得た。これら c D N A クローンの重複領域から得られたヒト t r k B の最終的なヌクレオチド配列およびそれから導かれたアミノ酸配列を図1に示す。

【0264】

（C. ヒト t r k C クローンの特徴付け）

同様の戦略をヒト t r k C の細胞外ドメインに特異的なプローブを作製するために用い、2つの最初のクローンを得た。これらクローンの両者とも、ブタおよびラットにおいて記載された t r k C の切断形態に対応する配列を含むことがわかった（ランバレら、[1

10

20

30

40

50

992] 上掲; ツォウルファス、[1993] 上掲; バレンズエラら、[1993]、上掲)。なぜなら、該配列は、trkCの完全な細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびTK様配列を含まない短い細胞質ドメインをコードしていたからである。trkCのチロシンキナーゼドメインをコードするクローンを単離するため、ブタtrkCのC末端テールおよびヒトtrkCの細胞間ドメインの膜近傍領域に対応するオリゴヌクレオチドを用いてライブラリーを2回再プローブした。二重陽性クローンが分析され、切断されたtrkCクローンと重複する配列を含み、チロシンキナーゼコード配列をも含むことがわかった。これらクローンの重複領域から得られたヌクレオチド配列およびそれから導かれたアミノ酸を図2に示す。

【0265】

(D. ヒトtrkAのクローニング)

加えて、正確にマッチするプライマーおよび鋳型としてのヒト脳cDNAを用いることによりPCRでヒト脳からtrkAを再クローニングした。得られたクローンを配列決定したところ、以前に刊行された配列との5つの不一致がみられた。これら各領域をそれぞれ幾つかの異なる増幅反応での直接配列決定により調べ、配列決定したクローン中の真の間違いを部位特異的突然変異誘発により修正した。以前に決定された配列とは一つだけ差異が残ったが、これは導かれたアミノ酸配列中の残基300においてセリンからシステインへの変換となるCGのGCへの転位であった。複数の反応で配列決定したこと、およびラットtrkA(ミーキンら、[1992]、上掲)および他のすべての知られたtrk(下記参照)において該システインが保存されていることから、オリジナルの配列が誤り

10

20

【0266】

(E. 結果)

ヒトクローンから得られた配列の吟味およびラットおよびマウスtrkBおよびラットおよびブタtrkCの知られた構造との比較は、配列全体にわたってこれら哺乳動物種間で非常に高度の類似性が存在することを示している。シュナイダーおよびシュバイガー(1991、上掲)によって同定された全構造モチーフは維持されている、すなわち、trkBおよびtrkCの両者について残基31で切り取られると予測された(後にN末端配列分析により確認された; trkイムノアドヒージンの発現を参照)シグナル配列、ロイシンに富むドメインの両側のシステインに富む2つのドメイン、C2タイプの2つのIg様ドメイン、膜貫通ドメイン、および他の公知のチロシンキナーゼとの高い類似性を示すチロシンキナーゼドメイン。trkBおよびtrkCの細胞外ドメインには、それぞれ11および13の潜在的なN結合グリコシル化部位が存在する。種内および種間での知られたtrkの異なる領域の類似性を図3に示す。

30

【0267】

trkBおよびtrkCについて得られた異なるクローンの幾つかの配列分析において、おそらく別の仕方のスプライシングにより生じたと思われる複数の形態が認められた。変異体の形態は、trkCの細胞外ドメイン中への可能な挿入、切断された非TK形態のtrkBおよびtrkC、およびtrkCのTKドメイン内の可能な挿入として観察された。ついで、特異的なオリゴヌクレオチドプローブでのライブラリースクリーニングおよびPCRを用い、異なるヒトtrk中のこれら部位での他の潜在的な変異を探索するために一層系統的な探索を行った。異なるヒトtrk中でみられた異なる形態および他の公知のtrkでみられたものとの比較の図式を図4に示す。

40

【0268】

ヒトtrkCの細胞外ドメイン中には、ラットおよびヒトtrkAにおいて細胞外挿入が記載された部位の近接部位に、ラットおよびブタtrkCと比べて9つのアミノ酸の可能な欠失が存在した(パーカー(Barker)ら、J. Biol. Chem. 268、1510~15157[1993]; 図2)。ヒトtrkC中の該領域のPCR分析は、挿入含有および挿入欠失の両形態に期待される長さに対応する2つのバンドしか示さなかった。ヒトtrkB中の該領域のPCR分析は検出可能な断片長多型を示さなかったが、

50

t r k A 特異的なプライマーを用いた増幅では2つの区別されるバンドが示され、これらをクローニングし配列決定した。潜在的なヌクレオチド挿入は、ラットおよびヒト t r k A において以前に記載されたもの（バーカーら、上掲）と同一のペプチド挿入をコードする1297位でのTCTCTCTCTCTCGCCGGTGGであった。

【0269】

ヒト脳ライブラリーからは、TKドメインをコードしないがその代わりに切断された細胞内ドメインを示す t r k B および t r k C の両クローンが得られた。t r k B では、これはラットで t 1 として（ミドルマスら、[1991]、上掲）マウスでは切断形態として（クライン（Klein）ら、EMBO J. 8、3701~3709 [1989]）以前に同定されたものと同一の435位の後に付加された11の新たなアミノ酸からなっていた。オリゴヌクレオチドでプローブする c D N A ライブラリーを使用したまたは P C R を使用したあらゆる試みも、ラットにおいて t 2 として同定されたもの（ミドルマスら、[1991]、上掲）と類似のヒトからの配列を得ることができなかった。マウスまたはラットのいずれかの脳 c D N A を鋳型として用いた場合には P C R によって t 2 と類似の配列が容易に得られたが、このことは t 2 がラットに特有のものではないこと、および使用した技術は少なくともネズミから t 2 様配列を検出しうることを示していた（データは示していない）。

10

【0270】

t r k C の切断形態は t r k B のものよりも長く、ブタ t r k C において（ランバレら、[1991]、上掲）およびラットにおいて（ツォウルファスら、[1993]、上掲）またはラット t r k C の i c 158 形態として（バレンズエラら、[1993]、上掲）以前に記載されたものと類似していた。この形態は498位から開始する83の付加的なアミノ酸からなり、これらアミノ酸は種間で高度に保存されていた。この範囲において、ただ2つの相違、アスパラギン酸のグルタミン酸への置換およびセリンのプロリンへの置換のみが3つのすべての種において存在した。

20

【0271】

c D N A クローンにおいて得られた t r k C の TKドメインは、サブドメイン V I I と V I I I との間に14のアミノ酸のみかけの挿入を有していた（ハンクス（Hanks）ら、Science 241:42~52 [1988] およびハンクスら、Methods in Enzymol. 200:38~62 [1991]）。この配列はラット t r k C TKドメインでみられた観察された潜在的な挿入と同じ部位に挿入されており、そこでみられた14のアミノ酸挿入と配列が同じである（ハンクスら、[1988]、上掲；バレンズエラら、[1993]、上掲）。ラット t r k C でみられた14のアミノ酸挿入に加え、25（ツォウルファスら、[1993]、上掲）または39（バレンズエラら、[1993]、上掲）のアミノ酸の一層長い挿入が認められている。これら一層長い挿入がヒトでも発現されているかどうかを決定するため、この領域にわたって脳 c D N A を P C R 増幅の鋳型として用いた。これら実験は一貫して、2つのすでに観察されたスプライス型、すなわち14のアミノ酸挿入を有するものと有しないものに対応する長さの2つのバンドを示した。これら2つのバンドのクローニングおよび配列決定により、これらバンドが以前にみられた14のアミノ酸挿入を有する形態と有しない形態との2つの形態に対応することが確かめられた。興味深いことに、挿入不含の形態に対応するバンドは高レベルの t r k C を発現する非神経組織、すなわち精巣からの c D N A を用いた増幅においてのみ認められたので（データは示していない）、このスプライスは組織特異的であった。t r k B TKドメインの同領域に特異的なオリゴヌクレオチドを用いたヒト脳 c D N A の P C R は、この領域における断片長多型の証拠を示さなかった。

30

40

【0272】

（F. 検討）

単一の種内での異なる t r k の間および異なる種の同じ t r k の間での類似性の程度を調べることにより、ある種の一般化が引き出されるかもしれない。3つのヒト t r k 相互間およびこれらとラットからの等価な t r k との比較を、上記シュナイダーおよびシュバ

50

イガー (1 9 9 1) によって定められた異なるドメインについて図 3 に示す。各 t r k はヒトとラットとで極めてよく保存されており、t r k B および t r k C はこれら 2 つの哺乳動物種間で殆ど同一である。t r k B および t r k C の個々のドメインはラットとヒトとの間で少なくとも 8 5 % 類似である。他方、t r k A はヒトとラットとの間の全体的な類似性は極めて高いものの、有意の配列相違の領域を示す。とりわけ、細胞外ドメインにおいては、少なくとも 8 5 % 類似であるのはロイシンに富む領域と第二の I g 様ドメインのみである。このことは、t r k のニューロトロフィン結合ドメインの局在化を意味しているのかもしれない。t r k A の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインは、t r k B および t r k C と同様にラットおよびヒト間で高度に保存されている。ヒトにおいて異なる t r k 間で類似性を比較すると、T K ドメインが異なる t r k 間で最も高度に保存されていることが明らかである。細胞外ドメインのうちでは、この場合も異なるヒト t r k 間で最も類似しているのは第二のシステインに富むドメインとともに第二の I g 様ドメインである。

10

【 0 2 7 3 】

配列の保存とは対照的に、異なってプロセスされた転写物の形態においてヒト t r k と以前に知られている t r k との間に相違が観察された。ネズミにおいては t r k B は少なくとも 2 つの異なる切断された形態を含み、t r k B に対してプローブしたノーザンブロットは多くの転写物サイズの複雑なパターンを示した。本発明者らは、かなり努力したにもかかわらずヒトにおいて t 2 形態の存在を示す証拠を見いだすことはできず、t r k B についてはるかに単純な転写物パターンを観察した。本発明者らはヒトにおける該形態のホモログの存在を除外することはできないが、t 2 の等価物がネズミと同じくらい豊富に発現されることはありそうにないと思われる。

20

【 0 2 7 4 】

t r k の切断形態に対して提唱されている役割の一つは、発現細胞においてニューロトロフィンによるシグナル変換に対し優勢な負の作用 (d o m i n a n t n e g a t i v e i n f l u e n c e) を及ぼすことである (ジング (J i n g) ら、Neuron 9、1 0 6 7 ~ 1 0 7 9 [1 9 9 2])。このことは、ニューロトロフィンで刺激したときに成人脳からの組織でみられるニューロトロフィンシグナル伝達の効率の相対的な欠如と一致する (クヌセル (K n u s e l) ら、J . N e u r o s c i . [1 9 9 4])。なぜなら、切断されない形態に対する切断された形態の比は成人において極めて高いからである。これが切断された t r k の主要な役割であるなら、ヒトにおいて t 2 が見かけ上欠如しているのはますます一層興味深い。というのは、ネズミでは t 2 はニューロンにおいて主として発現されるが t r k B の他の切断形態である t 1 は主として非ニューロン性細胞で発現されることが示されているからである。このような局在化がヒトにも当てはまるなら、t 2 の存在しないヒトニューロンは t r k B の切断形態をネズミに比べてはるかに低レベルで発現する。それゆえ、提唱されている優勢な負の作用はヒトニューロンではネズミほど重要ではないかもしれない。

30

【 0 2 7 5 】

ヒト t r k C と以前に記載された t r k C の転写物との間にもまた相違が存在する。細胞外ドメインにおいて、9 のアミノ酸の挿入を有する形態と有しない形態という 2 つの形態を生じる明らかな別の仕方のスプライシングが存在する。この明らかな挿入部位は、ラット t r k A で以前に特徴付けられた挿入部位と整列する。挿入が 6 アミノ酸であるラット t r k A の 2 つのスプライス形態では、今のところ結合またはシグナル変換における機能的な相違は検出されていないが (バーカー (B a r k e r) ら、J . B i o l . C h e m . 2 6 8、1 5 1 0 ~ 1 5 1 5 7 [1 9 9 3])、おそらく、9 のアミノ酸挿入を有するヒト t r k C 形態では一層大きな相違が存在するであろう。異なってスプライスされた形態の生物学的役割が何であれ、これら形態は極めて種特異的である。なぜなら、本研究においてはヒト t r k B で該位置に挿入の証拠はみられず、これまでの研究ではヒト以外で t r k C 中の挿入は検出されていないからである (バレンズエラら、[1 9 9 3]、上掲；ツォウルファス、[1 9 9 3]、上掲；ランバレら、[1 9 9 1]、上掲)。

40

50

【0276】

本発明者らはまた、ヒト *t r k C* 分子の細胞内部分中におそらく別の仕方のスプライシングによるものと思われる種々の形態の例を見いだした。本発明者らは、共通のチロシキナーゼドメインを全く含有しない *t r k C* の切断形態の存在を観察した。切断形態が非常に短い細胞質テールを有する *t r k B* と異なり、切断されたヒト *t r k C* の細胞質部分は83残基の長さである。加えて、この領域は種間で非常に高程度に保存されており、重要な機能を有するかもしれないこと（おそらく細胞下局在を特定するシグナルとして働く）が示唆されている。

【0277】

ラット *t r k C* で記載されているように、TKドメイン中に挿入を含むヒト *t r k C* の形態が存在する。14および25または39アミノ酸の挿入が可能なラットと異なり、ヒトの該部位には14アミノ酸の挿入のみが可能であると思われる。これら挿入はリガンドの *t r k C* への結合によって誘発されたシグナル伝達カスケードを変調するうえで重要な役割を果たしているように思われる。シグナル変換のアッセイ系として種々の形態の *t r k C* を発現するPC12細胞を用い、TKドメイン中に挿入を有しない *t r k C* の発現が発現細胞に対して神経突起の過剰生育を伴うNT3に対する応答能力を付与し、NT3により誘発された自己リン酸化を引き起こすことが示された。TK挿入を含む *t r k C* を発現する細胞はリガンドにより誘発された自己リン酸化を起こしうるが、神経突起の過剰生育を伴うNT3への応答は起こさない。この点に関してはこれまでのところ種々の挿入の間で何ら相違が記載されていないが、ニューロトロフィン結合に対して多くの下流後遺症（downstream sequelae）が存在し、今日までほとんど全く調べられていない。このプロセッシングは、14残基挿入を有する形態を示す証拠がヒト精巢では観察されていないので組織特異的である。

【0278】

（実施例2）

（ヒト組織における *t r k* 受容体の発現パターン）

（A．ノーザン分析）

ノーザン分析に用いるプローブは、PCRおよび表1に示すプライマーを用いて適当なクローニング鋳型DNA上に標識した。PCR反応は、非標識dCTPの代わりにガンマ32PdCTPを8mCi/ml（3,000Ci/ミリモル）の濃度で用い、反応を20サイクルしか行わなかった他は最初のクローニングと同様にして行った。プローブを導入されなかったヌクレオチドから分離し、5分間沸騰させた後、5×SSPE、10×デンハルト、100μg/mlサケ精子DNA、50%ホルムアミド、および2%SDS中でハイブリダイズさせておいたレーン当たり2μgのポリA+RNAを含むニトラン（Nytran）プロット（クローンテック、パロアルト、カリフォルニア）に加えた。ハイブリダイゼーションを50℃にて同溶液中で行い、ついでプロットをライブラリーフィルターと同様にして洗浄したが最終の洗浄は50℃にて行った。造影プレートを10～20時間暴露した後、フジ（Fujifilm）BAS2000イメージアナライザーを用いてオートラジオグラムを得た。

【0279】

（結果）

ヒト組織での *t r k* の発現パターンおよび転写物サイズをノーザン分析により調べた。*t r k B* のプローブでのハイブリダイゼーションでは、細胞外特異的プローブとTK特異的プローブとの両者にハイブリダイズする6.9kbの転写物、およびTK特異的プローブのみにハイブリダイズする8.1kbの転写物という、明らかに簡単なパターンが得られた。この簡単な結果に基づき、8.1kbの転写物はおそらく完全長（TK含有メッセージ）に対応し、一方、6.9kbの転写物はヒトでみられた単一の切断形態をコードするメッセージに対応する。*t r k C* をクローニングする間に検出された多数の潜在的スプライス変異体から期待されるように、この分子のノーザンプローブは一層複雑なハイブリダイゼーションパターンに導いた。TKドメインに特異的なプローブを用いると11.7

10

20

30

40

50

、7.9および4.9 kbの転写物が検出され、一方、細胞外ドメインプローブを用いると4.4 kbの別の転写物が検出された。

【0280】

調べたヒト組織のうち、trkBおよびtrkCはともに脳において最も豊富に発現された。しかしながら、成人および胎児組織の両方において神経系以外の種々の部位で発現が認められた。TKドメインを含む8.1 kb転写物は、腎臓、骨格筋および脾臓において発現されたが、心臓、脾臓および卵巣では切断形態のみの発現が検出された。胎児組織では、TK含有trkBは脳のみならず腎臓および肺でも認められ、一方、切断されたtrkBは脳、腎臓、肺および心臓で認められた。切断されたtrkB転写物に対するTK含有trkB転写物の比は、成人脳よりも胎児脳ではるかに高いことが明らかであった。

10

【0281】

trkCの最も高い発現レベルは脳においてであったが、神経系以外でも広くtrkCの発現が認められた。成人ではTK含有trkCは腎臓、骨格筋、肺、心臓、小腸、卵巣、精巣、および前立腺で発現され、胎児では最も高い発現は脳、腎臓、肺および心臓においてであった。trkCの切断形態に対応する4.4 kb転写物は、末梢血白血球を除く調べたすべての組織で検出された。trkBの場合と同様に、切断されたtrkCに対するTK含有trkCの比は、成人脳に比べて胎児脳の方が高かった。

【0282】

(検討)

trkBの転写物のノーザンブロットを用いた分析は、ネズミでみられたものに比べて比較的簡単なパターンを示した。このことは、ヒトではtrkBの単一の主要な切断形態のみが存在するという考えと一致する。trkCの分析は、クローンの配列分析で検出された多数の形態と一致して転写物のサイズにおいて一層完全なパターンを示した。ラットtrkCにおいて記載されたような[バレンズエラら、[1993]、上掲]キナーゼプローブとはハイブリダイズするが細胞外プローブとはハイブリダイズしない転写物についての証拠はみられなかった。異なる組織の分析において、trkBおよびtrkC発現の主要な部位は神経系であり、とりわけCNSの領域であった。予期しなかったのは、神経系以外の組織にも広くtrkBおよびtrkCの低レベルの発現がみられることであった。その発現レベルは脳の種々の領域でみられるものに比べると極めて低い、それでもバックグラウンドを越えて明確に検出できた。ある種の組織でみられる発現の幾つかは、該組織にまばらに分散した神経系の要素上での発現によるのかもしれない。たとえば、小腸でのtrkCの発現は、その全部または一部が腸神経系のニューロンによる発現によるものであるかもしれない。このことの最終的な説明は、神経系以外の組織の詳細なインシトゥハイブリダイゼーション分析を待たなければならないであろう。

20

30

【0283】

(B. インシトゥハイブリダイゼーション)

以前に刊行された手順(フィリップス(Phillips)ら、Science 250、290~294[1990])の変法によりインシトゥハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションのための組織は種々の技術により調製した。すべての組織について自己消化の時間は24時間以下であった。全体の非固定胎児をOCT中に埋設し、液体窒素上のペトリ皿中に塊を浮遊させることにより凍結し、クリオスタットの助けをかりて切片にした。切片をスライド(スーパーフロストプラス(superfrost plus)、フィッシャー(Fisher))上に解凍・積載し(thaw-mount)、空気乾燥し、55℃にて10秒間焼結し、使用時まで除湿剤を入れた密封箱中に-70℃にて貯蔵した。成人後根神経節を4%ホルムアルデヒド中に浸漬し、パラフィン切片化または凍結切片化(cryosectioning)のいずれかのために処理した。脳標本は、4%ホルムアルデヒド中に24時間浸漬することにより固定し、ショ糖緩衝液中で24時間凍結保護し(cryoprotected)、ドライアイス上で凍結し、フリージングスライディングマイクロトーム(freezing sliding microtome)上で切断した。切片をリン酸緩衝食塩水中で4℃にて貯蔵し(48

40

50

時間未満)、ゼラチン-埋設 (gelatin-subbed) スライド上に積載し、空気乾燥し、4 で貯蔵した。組織貯蔵の間のすべての組織切片上での水分の凝結を回避すべく注意を払った。

【0284】

ハイブリダイゼーションを行う日に、切片の調製に用いた固定および切片化プロトコールに従って組織切片を種々前処理した。固定化していない組織切片を4%ホルムアルデヒド、1%グルタルアルデヒド(0.1Mリン酸ナトリウム中)中で4にて30秒間浸漬することにより固定し、0.5×SSC(20×SSCは3M NaClおよび0.3Mクエン酸ナトリウムである)中で濯ぎ、プレハイブリダイゼーション溶液中に直接入れた。浸漬-固定化組織の凍結切片を0.1Mリン酸ナトリウム中の4%ホルムアルデヒド中
10
で5分間固定化し、0.5×SSCで濯ぎ、プロテイナーゼK(ベーリンガー-マンハイム; 0.5M NaClおよび10mMトリス、pH8.0中に25μg/ml)を用いて室温にて30分間消化し、濯ぎ、4%ホルムアルデヒド中で再度10分間固定化し、一連のアルコール(0.3%酢酸アンモニウムを含有する50%エタノール; 酢酸アンモニウムを含有する70%エタノール; 100%エタノール; インキュベーション当たり2分間)中で脱水し、同じ一連のエタノールで再度脱水し、プレハイブリダイゼーションの前に0.5×SSC中で再度濯いだ。パラフィン埋設組織については、キシレン中で2回濯ぐ(各2秒間)ことによって脱パラフィンを行い、その後、組織を一連のアルコール溶液(100%エタノールで2回、95%エタノール、70%エタノール; 各2秒間)で再度
20
脱水した。ついで組織切片を4%ホルムアルデヒド中で10秒間固定化し、プロテイナーゼK(25または50μg/ml; 室温または37)で30秒間消化し、濯ぎ、10秒間再度固定化し、プレハイブリダイゼーションの前に0.5×SSC中で再度濯いだ。

【0285】

プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、およびハイブリダイゼーション後のRNAアーゼ処理およびストリンジェンシー洗浄は、すべての組織において以前に記載されたものと同じであった(フィリップスら、1990)。

【0286】

ヒトtrkA、およびtrkBのTK含有形態、およびtrkCに対するプローブを用いたインシトゥハイブリダイゼーションを、種々のプロトコールにより調製した限られた系列の胎児および成人ヒト組織に対して行った。妊娠6週および8週の2つの胎児(新たに凍結)においては、trkAの発現は後根神経節および三叉神経節を含む脳知覚神経節に限られていた。対照的に、trkBおよびtrkCは、知覚神経節で発現されたのみならず発生中の脳および脊髄内でも顕著な発現が認められた。加えて、trkCの発現は発生中の脈管系で観察された。

【0287】

(結果)

発生中の後根神経節内では、6週および8週の胎児からの神経節の両方でtrkCが強く発現された。奇妙なことに、両方の胎児において、trkCを発現する細胞が該神経節の腹側に局在する顕著な傾向がみられた。対照的に、trkA陽性細胞は該神経節の主として脊側に限られていた。成人後根神経節(パラフィン埋設または凍結切片固定化した組織)では、DRGニューロンの垂集団を3つの各trkプローブで標識した。これら3つの各trkに対するプローブで標識した細胞は、神経節でランダムに分布しているように
40
思われた。これらプローブのいずれを用いても非ニューロン性細胞の標識は観察されなかった。

【0288】

成人ヒトの前脳(固定化し凍結切片化した組織)では、trkA発現に対して強く標識された細胞がマネー(Meynert)の基底核中で観察され、尾状核の頭部に分散していた。標識された細胞は大きな直径であり、コリン作動性細胞の予測された外観と同じであった。trkCは、海馬および新皮質中での顕著な発現を含むヒト前脳を通じて広く発現され、標識された細胞はもっぱらニューロン様の形態を有していた。

【0289】

(検討)

ヒト神経系での *trk* ファミリーの成員の発現のインシトゥハイブリダイゼーション分析から、全体的な発現パターンが他の哺乳動物でみられる発現パターンと同様であることが確認された。このことは、正常および病理学的組織のある種の領域中でのヒト *trk* の、異なってスプライスされた形態の発現を詳細に調べる研究の基礎を提供するに違いない。この点で、ヒト組織を入手することが困難であるとしても、死後に種々の仕方に取り扱われる組織においてインシトゥハイブリダイゼーションを行ったことは励みになる。切片を切断して固定化せず、固定化して凍結し、および固定化してパラフィン埋設したが、これらすべての方法は有用な結果を与えた。一つの予期しない知見は、該神経節の明らかな極性であり、*trk A* 細胞が発生中のヒト DRG 神経節の背側において優勢であり、*trk C* を発現する細胞が腹側において優勢であった。このような *trk* 発現の極性は、成人ヒト DRG からの切片またはラット *trk A* および *trk C* プロンプとハイブリダイズしたラット胚では明らかではなかった（データは示していない）。 10

【0290】

(実施例3)

(*trk* イムノアドヒージンの発現)(*A*・*trk* - *Ig* イムノアドヒージンの構築)

タンパク質工学技術を用い、ヒト *trk* を *trk* 細胞外ドメインとヒト *IgG* 重鎖の *Fc* ドメインとのキメラとして発現させた。 *trk* 細胞外ドメインと *IgG* - 1 *Fc* ドメインとのキメラをコードする DNA 構築物を、ヒト *IgG* - 1 の *Fc* 領域クローンを用いて作製した（アシュケナーザーら、*Immuno adhes ins Intern. Rev. Immunol.* 10、219～227 [1993]）。さらに詳しくは、*IgG* - 1 コード配列の採取源は、アスパラギン酸 216（重鎖定常領域の第一の残基をアミノ酸 114 とする（カバットら、*シーケンサイズ・オブ・プロテインズ・オブ・イミューノロジーカル・インタレスト*、第4版 [1987]））（該アミノ酸は重鎖 - 軽鎖結合に関与するシステイン残基の後の *IgG* - 1 ヒンジの第一の残基である）から始まり残基 441 で終わって *IgG* - 1 の *CH2* および *CH3 Fc* ドメインを含むヒト *IgG* - 1 配列に融合した成熟ヒト CD4 タンパク質の残基 1～180 からなるハイブリッドポリペプチドをコードする cDNA 配列を含む CD4 - *IgG* - 1 発現プラスミド pRKC D4 2 Fc 1（カボンら、*Nature* 334、525 [1989]；バーンら、*Nature* 344、667 [1990]）であった。 20 30

【0291】

CD4 コード配列を発現プラスミド pRKC D4₂ Fc₁ から除去し、*IgG* - 1 のアスパラギン酸 216 と *trk A* のバリン 402、*trk B* のトレオニン 422、または *trk C* のトレオニン 413 とのスプライシングにより、該ベクターを *trk* 受容体をコードする DNA に融合した。受容体全体または *IgG* キメラをコードする DNA を、リン酸カルシウムを用いた 293 細胞での一過性発現のために pRKC 中にサブクロニングした（スバ（*Suva*）ら、*Science* 237、893～896 [1987]）。*trk* - *IgG* キメラの精製のため、細胞をトランスフェクションの1日後に血清不含培地に移し、さらに2～3日後に培地を回収した。培地を濾過し、プロテイン A カラム（ハイトラップ（*Hi-Trap*）A、ファルマシア）に結合させ、カラムを PBS で洗浄し、結合したタンパク質を 0.1 M グリシン（pH 3.0）で溶出し、トリス緩衝液で直ちに中和した。1.5 の吸光係数を用いた 280 nm での吸光度により濃度を評価した。SDS - PAGE 分析は、得られたタンパク質が単一の検出バンドであることを示した。 40

【0292】

これら DNA 構築物で一過性にトランスフェクションした細胞は、プロテイン A に結合し、還元 SDS - ポリアクリルアミドゲル上で約 125 kD の分子量にて移動したタンパク質を分泌した。精製 *trk* - *IgG* キメラは、プロテイン A カラム上の1回のアフィニティークロマトグラフィーにおいてならし培地から容易に単離することができた。これら 50

精製タンパク質の配列分析から、予測されたシグナル配列開裂部位およびそれから得られるN末端が確認された(データは示していない)。

【0293】

(B. 結合アッセイ)

これらキメラタンパク質がtrk細胞外ドメインに期待される結合特異性を細胞環境で保持しているか否かを試験するため、ヨウ素化ニューロトロフィンを用いて競合置換アッセイを行った。図5に示す結果から明らかなように、trk-IgGキメラは期待されたニューロトロフィンへの特異的結合を示した。trkA細胞外ドメインを含むキメラはNGFによく結合し、NT3およびNT5には遥かに低い親和性にて結合した。trkBを含むキメラは、BDNFおよびNT5によく結合したがNT3よりもわずかに良好に結合し、NGFに対しては検出しうる結合は殆ど示さなかった。trkCを含むキメラは他のニューロトロフィンに比べてNT3に高度に特異的であった。これら競合置換アッセイで決定されたこれらキメラの好ましいリガンドに対する明らかな親和性は、種々のtrkタンパク質でトランスフェクションし該タンパク質を発現する細胞上の結合部位の大部分で決定されたものの範囲内である。一つの実験において、trkAについて得られたIC50はNGFに対しては62pMでT3に対しては20nM、trkBについて得られたIC50はBDNFに対しては81pM、NT4/5に対しては200pMおよびNT3に対しては18nM、trkCについて得られたIC50はNT3に対して95pMであった。これら試薬を用いて行ったアッセイにおいて、非特異的結合に対する特異的結合の比は極めて高く、通常、少なくとも10/1であった(図5参照)。

10

20

【0294】

trk-IgGキメラがその同族リガンドの生物学的活性を阻止しうるか否かを調べるため、ニューロトロフィンにより誘発された末梢ニューロンの生存を適当なtrk-IgGキメラの存在下でアッセイした。図6から明らかなように、trkA-IgGはNGFの、trkB-IgGはBDNFの、trkC-IgGはNT3の、それぞれ生物学的活性の強力なインヒビターである。すべての場合において、過剰のニューロトロフィンを添加するとこの阻止を排除することができ、trk-IgGキメラが一般にニューロンにとって毒性でないことを示していた。

【0295】

ここで示された結合データは、trk-IgG融合体が細胞中での全受容体の発現によってみられるのと同様の選択性および親和性でニューロトロフィンに結合することを示している。ここで報告した結合アッセイは多数で行うには非常に簡単であり、再現性に優れ、バックグラウンドが低く、天然のtrkの特異性を保持している。これら特質は、変異体ニューロトロフィンの結合特性を分析するうえで極めて価値が高いことがわかった(ラミー(Laramee)ら、突然変異誘発によるNGF-trkAおよびp75受容体相互作用の高解像マッピング(High resolution mapping of NGF-trkA and p75 receptor interactions by mutagenesis))。

30

【0296】

ニューロトロフィンの結合を分析するうえでの有用性に加え、trk-IgGキメラはその同族ニューロトロフィンの生物学的活性の有用なインヒビターである。ここでの実験はすべてインビトロ系で行ったが、予備的な実験はtrkA-IgGがインビボでもNGF活性を抑制しうることを示している(データは示していない)。BDNF、NT3およびNT4/5に対する良好な阻止抗血清を産生することは困難であったので、このことはtrkBキメラおよびtrkCキメラの必要性を満たすであろう。

40

【0297】

ヒトに存在するtrkの形態に関する情報が手に入ったので、正常な状態および疾患状態におけるこれら形態の発現の探査を開始することが可能である。異なる形態のtrkはニューロトロフィンへの応答において異なるおよびしばしば相反するシグナル変換を示しうるので、各trkの形態の全スペクトルの発現レベルに関する知見は必須であろう。加

50

えて、可溶性の形態のヒト *t r k* を利用できることは、内生の生物学的活性の阻止を可能とすることによって、インビボでのニューロトロフィンの生物学の研究を加速させるに違いない。

【 0 2 9 8 】

(実施例 4)

(ヒト *t r k C* の突然変異誘発)

t r k C タンパク質の細胞外ドメインのどのアミノ酸がニューロトロフィン *N T - 3* に対する親和性および特異性を決定するのかを決定するため、突然変異誘発研究を行った。*t r k C* の三次元構造は知られていないが、推定のドメイン組成が提唱された。このモデルによると、タンパク質の *t r k* ファミリーの細胞外ドメインは 5 つのドメインから構築されている。シグナル配列が先行した後、これらドメインは、第一のシステインに富むドメイン、ロイシンに富むドメイン、第二のシステインに富むドメイン、および 2 つの免疫グロブリン様ドメインである。

10

【 0 2 9 9 】

これら *t r k C* 受容体ドメインの機能を調べるため、5 つのドメインをそれぞれ一つずつ欠失した 5 つの *t r k* 変異体 (1 ~ 5) および第二の免疫グロブリン様ドメイン以外はすべてのドメインを欠失した一つの変異体 (6) を構築した。これらの構造は図 7 に示してある。これら変異体に加えて、*N T - 3* に対する残留親和性を決定し *B D N F* 結合の補充を試験するため、5 つのすべてのドメインをそれぞれ対応する *t r k B* 配列と個々に交換した (*s 1* ~ *s 5*)。 *t r k C* キメラおよび *t r k B* キメラを含むすべての *t r k C* 変異体をイムノアドヒージンの形態で調べた。イムノアドヒージンは実施例 3 に記載したプロセスと同様にして構築し、*p R K 5* (*E P 3 0 7* , *2 4 7*) または *p R K 7* ベクターを用いてヒト胎児腎臓細胞株 2 9 3 で発現させた。 *p R K 7* は、*C l a I* と *H i n d I I I* との間のポリリンカー領域中のエンドヌクレアーゼ制限部位の順序が逆になっている他は *p R K 5* と同じである (1 9 9 2 年 4 月 2 8 日発行の米国特許第 5 , 1 0 8 , 9 0 1 参照)。これらタンパク質は血清不含培地中に分泌され、2 0 × に濃縮し、抗 *F c E L I S A* アッセイにより定量した。典型的な発現の結果を図 8 に示す。特定の興味ある変異体、*t r k C*、 6、 5、 *s 5* および *t r k B* を標準プロトコールを用いてプロテイン A 上で均質に精製した。これら変異体の N 末端配列を決定したが、予測したものと同じであった。

20

30

【 0 3 0 0 】

標識 *N T - 3* に結合する能力について、すべての受容体変異体を標準イムノアドヒージン技術を用いた競合置換アッセイにおいて試験した。 5 を除き、すべての融合体およびスワップは依然として *t r k C* と同様の親和性で *N T - 3* に結合することができた。幾つかの変異体 (すなわち、 1、 4、 *s 2*) については全体の結合した標識 *N T - 3* は低かったが、*I C 5 0* 値はすべて *t r k C* の値に近いものであった (図 9 A および 9 B)。最も重要なことに、第二の免疫グロブリン様ドメイン以外はすべてのドメインを欠失した変異体 6 は、*t r k C* の完全長受容体の結合能のほとんどを保持していた。加えて、 5 において該ドメインを欠失させると、*N T - 3* に全く結合することのできない分子となる (図 9 C)。

40

【 0 3 0 1 】

N T - 3 結合と同じタイプのアッセイを用いた競合置換アッセイにおいて、すべての受容体変異体が標識 *B D N F* に結合する能力について試験した。 *t r k C* は *B D N F* に結合できないことに注意しなければならない。一つの変異体以外のすべての変異体が *B D N F* に結合できなかった (図 1 0 A ~ C)。 *B D N F* に結合した唯一の変異体は、*t r k C* の第二の免疫グロブリン様ドメインが *t r k B* のものと交換されたスワップ 5 であった (図 1 0 C)。この変異体は、*t r k B* 完全長受容体と同様に *B D N F* に結合した。

【 0 3 0 2 】

上記結果から、*t r k C* および *t r k B* の機能における第二の免疫グロブリン様ドメインの最重要性が明らかである。このドメイン以外のすべてのドメインを欠失しても *t r k*

50

Cの完全な結合能は本質的に保持された。このドメインを欠失するとNT-3に対するtrkCの結合能は除去された。このドメインを交換すると、trkBと同様の親和性でBDNFに結合しうるtrkC変異体が創製された。

【0303】

(実施例5)

(炎症性疼痛の治療におけるtrkA-IgGイムノアドヒージンの使用)

(A.カラギーナンにより誘発されたラットにおける痛覚過敏の阻止)

カラギーナン(シグマ、ロット#21H0322)単独の2%水溶液または実施例3で調製した15 μ gのtrkA-IgGキメラと組み合わせた水溶液(50 μ l)を4匹の成体雄ウイスターラットの一方の後足に時間0にて注射した。不快な熱刺激に対する引っ込みの潜伏期間(latency of withdrawal)を、その後2時間毎に3回ずつ各後足で測定した。カラギーナン単独を注射した足は2時間以内に明瞭な炎症および痛覚過敏(反対側のコントロールの足と比べて減少した引っ込み潜伏期間)を示した。カラギーナンとともにtrkA-IgGを注射したラットは明瞭な炎症を示したが、反対側のコントロールの足に比べて痛覚過敏の形跡は示さなかった。4時間、6時間および8時間の時点におけるカラギーナン単独とカラギーナンおよびtrkA-IgGとからプールしたデータは、 $p > 0.02$ で有意に異なっていた(図12参照)。

10

【0304】

(B. trkA-IgGイムノアドヒージンは鈍磨に導く)

trkA-IgGイムノアドヒージンを0.5 μ g/時の速度で4匹の成体雄ウイスターラットの一方の後足の背表面の皮膚下に連続注入した。その後、コントロールの足および注入した足の引っ込みの潜伏期間を種々の時点で3回ずつ決定した。注入から5日後、コントロール側と比較したときに注入側の足は顕著な鈍磨を示した。5日後およびその後のすべての時点の引っ込み時間差異は、プールした前注入の時間差異と $p > 0.05$ にて有意に異なっていた(図13参照)。

20

【0305】

(実施例6)

(trkCおよびtrkAの突然変異誘発)

特異的なニューロトロフィン結合にとっての第二の免疫グロブリン様ドメインの重要性をさらに確認するため、さらに幾つかのtrk受容体変異体を構築した。これらのさらなる変異体は、実施例4と同様にイムノアドヒージンの形態で調べた。変異体に関する以下の記載において各trk受容体のアミノ酸残基は、図11に示すシグナル配列の第一のアミノ酸残基から順次番号付けて示してある。

30

【0306】

trkCのVal₂₉₇からThr₄₂₀のアミノ酸配列(第二の免疫グロブリン様ドメインを含む)をtrkAのSer₂₇₇からVal₄₀₂のアミノ酸配列(第二の免疫グロブリン様ドメインを含む)で置換した成熟trk変異体(s5A)を構築した。競合置換アッセイにおいて、trkCではなくtrkAがNGFに高親和性で結合し、s5AキメラはtrkAの親和性(IC₅₀73.9 \pm 8.1pM)に匹敵する親和性(IC₅₀39.3 \pm 1.7pM)でNGFに結合する。¹²⁵I-NGFを用いた飽和結合実験は、trkAおよびs5Aに対してそれぞれ47.1 \pm 12.4および38.6 \pm 8.6pMのK_d値となった(抑制定数(IC₅₀)と結合定数(K_d)との間の一般的な関係は、チェング(Cheng)およびプルソフ(Prusoff)によって以前に記載されている; Biochem. Pharmacol. 22:3099(1973))。これら結果は、trkAのNGF結合特異性にとってtrkAの第二の免疫グロブリン様ドメインが重要であることを示している。

40

【0307】

つぎに、4つの成熟trkA変異体を構築した: trkAのVal₁₉₃からVal₂₈₂のアミノ酸配列を欠失した一つの変異体(4A)、trkAのPro₂₈₅からVal₄₀₂を欠失した他の変異体(5A)、trkAのPro₃₅からSer₂₈₃を

50

欠失した他の変異体 (6 A)、および t r k A の P r o₃₅ から V a l₁₉₃ を欠失した他の変異体 (7 A) である。実施例 4 に記載した t r k C 受容体変異体に関して得られた結果と同様、変異体 5 A における t r k A の第二の免疫グロブリン様ドメインの欠失は N G F 結合が検出されないという結果になったが、このドメイン単独 (変異体 6 A) では天然の t r k A に匹敵する N G F に対する結合親和性が示された。加えて、t r k A の第一の免疫グロブリン様ドメインの欠失 (4 A) は天然の t r k A に比べて約 2 倍だけ N G F に対する親和性を減少させたが、最初の 3 つのドメインを欠失させても (7 A) N G F に対する親和性に何ら影響を及ぼさなかった。t r k A および 6 A の N G F 結合親和性を飽和実験において決定したところ、K d 値は 47.1 ± 12.4 および 155.3 ± 33 p M (約 3.3 倍の差異) であり、t r k A 受容体において N G F との結合相互作用のほとんどが第二の免疫グロブリン様ドメインによるものであることが確認された。しかしながら、飽和結合実験において、5 A 変異体は > 3500 p M と推定される K d 値にて検出しうる特異的結合を示し、N G F との相互作用に影響を及ぼす t r k A ドメイン 1 ~ 4 中の別の要素の存在の可能性が示されたが、6 A 変異体と t r k A との K d 値が類似していることから明らかなように、これら要素の結合への貢献は小さなものであると思われる。

【 0 3 0 8 】

【 数 3 】

表 1

使用	trkA	trkB	trkC
縮重センス		TGCGATATATGTGGTNAARAC SEQ. ID. NO:10	TGGATGCARYINTGGCARGCARCA SEQ. ID. NO:11
縮重アンチ		YTCCTCYTTTCCTTAYTCRTT SEQ. ID. NO:12	CCYTCYTGRTARTAYTCNACGTG SEQ. ID. NO:13
ECI 挿入 センス	CACGTCAACACGGCACTACA SEQ. ID. NO:14	GGAAGGATGAGAAACAGATTCTGC SEQ. ID. NO:15	CATCAATGCCCACTTCCTCAAGG SEQ. ID. NO:16
ECI 挿入 アンチ	AGGTGTTTCGTCTTCTCTCC SEQ. ID. NO:17	GAGATGTGCCGACGGTTGTATC SEQ. ID. NO:18	CACAGTGATAGGAGGTGTGGGA SEQ. ID. NO:19
TK 挿入 センス	GGATGTGCTCCAGGCCCC SEQ. ID. NO:20	GGCAACCCGCCACGGAA SEQ. ID. NO:21	ACGCCAGCCCAAGGTGAG SEQ. ID. NO:22
TK 挿入 アンチ	TAACCACTCCAGCCCTTG SEQ. ID. NO:23	TTGGTGGCTCCAGCGGCAG SEQ. ID. NO:24	AATTGATGACCAAGCCACCA SEQ. ID. NO:25
ブローブ			
ECI センス	GCTCCTCGGACTGCGATGC SEQ. ID. NO:26	ATGTGCGCTGGCCAGGTGGCAT SEQ. ID. NO:27	AAGCTCAACAGCCAGAACCTC SEQ. ID. NO:28
ECI アンチ	CAGCTCTGTGAGGATCCAGCC SEQ. ID. NO:29	CCGACCGGTTTATCAGTGAC SEQ. ID. NO:30	ATGATCTTGGACTCCGACAGG SEQ. ID. NO:31
TK 特異的 センス		CTTGCCCAAGGCATCTCCGGT SEQ. ID. NO:32	ATGTGCAGCACATTAAAGAGGA SEQ. ID. NO:33
TK 特異的 アンチ		TTATACACAGGCTTAAGCCATCCA SEQ. ID. NO:34	AGGAGGCATCCAGCGAATG SEQ. ID. NO:35

【 図面の簡単な説明 】

【 0 3 0 9 】

【 図 1 - 1 】 図 1 は、ヒト t r k B 受容体のヌクレオチド配列 (配列番号 : 1) およびそれから導かれたアミノ酸配列 (配列番号 : 2) を示す。A) チロシンキナーゼドメイン含有 t r k B の配列を示してあり、可能な N 結合グリコシル化部位は囲んであり、予測される膜貫通ドメインは下線を引いてあり、チロシンキナーゼドメインは矢印で挟んである。切断形を生じさせるスプライス部位は、単一の垂線で示してある。B) 別の仕方でスプライスした切断された細胞内ドメインの配列を示す。ヒト t r k B 受容体の切断形のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 4 および 3 として添付してある。

【 図 1 - 2 】 図 1 は、ヒト t r k B 受容体のヌクレオチド配列 (配列番号 : 1) およびそれから導かれたアミノ酸配列 (配列番号 : 2) を示す。A) チロシンキナーゼドメイン含

有 t r k B の配列を示してあり、可能な N 結合グリコシル化部位は囲んであり、予測される膜貫通ドメインは下線を引いてあり、チロシンキナーゼドメインは矢印で挟んである。切断形を生じさせるスプライス部位は、単一の垂線で示してある。B) 別の仕方でスプライスした切断された細胞内ドメインの配列を示す。ヒト t r k B 受容体の切断形のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 4 および 3 として添付してある。

【図 2 - 1】図 2 は、ヒト t r k C 受容体のヌクレオチド配列 (配列番号: 5) およびアミノ酸配列 (配列番号: 6) を示す。A) チロシンキナーゼ含有 t r k C の配列を示してあり、可能な N 結合グリコシル化部位は囲んであり、予測される膜貫通ドメインは下線を引いてあり、チロシンキナーゼドメインは矢印で挟んである。切断形を生じさせるスプライス部位は、単一の垂線で示してある。細胞外ドメインおよびチロシンキナーゼドメイン中の可能な挿入の配列は括弧で挟んである。B) 別の仕方でスプライスした切断された細胞内ドメインの配列を示す。切断されたヒト t r k C 受容体のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 8 および 7 として添付してある。

【図 2 - 2】図 2 は、ヒト t r k C 受容体のヌクレオチド配列 (配列番号: 5) およびアミノ酸配列 (配列番号: 6) を示す。A) チロシンキナーゼ含有 t r k C の配列を示してあり、可能な N 結合グリコシル化部位は囲んであり、予測される膜貫通ドメインは下線を引いてあり、チロシンキナーゼドメインは矢印で挟んである。切断形を生じさせるスプライス部位は、単一の垂線で示してある。細胞外ドメインおよびチロシンキナーゼドメイン中の可能な挿入の配列は括弧で挟んである。B) 別の仕方でスプライスした切断された細胞内ドメインの配列を示す。切断されたヒト t r k C 受容体のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 8 および 7 として添付してある。

【図 3】ラットおよびヒトからの t r k ファミリー成員の種々のドメインの類似性。P A M 2 5 0 マトリックス (デイホフ (Dayhoff) ら、1983) に基づく類似性パーセントを、シュナイダー (Schneider) およびシュバイガー (Schweiger) 、Oncogene 6、1807~1811 (1991) により定められているように、異なる t r k ドメインについて決定した。ヒト t r k A とヒト t r k B (H A - B) 、ヒト t r k A とヒト t r k C (H A - C) 、ヒト t r k B とヒト t r k C (H B - C) 、ヒト t r k A とラット t r k A (H - R A) 、ヒト t r k B とラット t r k B (H - R B) 、およびヒト t r k C とラット t r k C (H - R C) との間で一対毎に比較を行った。

【図 4】ヒトおよび他の哺乳動物 t r k にみられるスプライス形の要約。別の仕方のスプライシングから生じる種々の t r k の形態の模式図を示す。ドメインは上記シュナイダーおよびシュバイガーによる。ラット t r k A (ミーキンら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89、2374~2378 [1992]、バーカー (Barker) ら、J. Biol. Chem. 268、15150~15157 [1993]) 、ラットおよびマウス t r k B (クライン (Klein) ら、EMBO J. 8、3701~3709 [1989] ; クラインら、Cell 61、647~656 [1990] 、ミドルマスら、Mol. Cell. Biol. 11、143~153 [1991]) およびラットおよびブタ t r k C (ランバレら、Cell 66、967~979 [1991] ; バレンズエラ (Valenzuela) ら、Neuron 10、963~974 [1993] ; ツォウルフアス (Tsoulfas) ら、Neuron 10、975~990 [1993]) のデータは文献から再引用してある。上記バレンズエラらにより記載された切断されたラット t r k C の別の形態は明瞭にするため省いてある。

【図 5】t r k - I g G に結合したニューロトロフィンの競合置換。放射性標識したニューロトロフィン (25~35 pM) を、増加濃度の種々の非標識ニューロトロフィンの存在下で t r k - I g G に結合させた。A) t r k A - I g G への標識 N G F の結合。B) t r k B - I g G への標識 B D N F の結合。C) t r k C - I g G への標識 N T 3 の結合。置換は、冷 N G F (黒丸) 、冷 B D N F (白丸) 、冷 N T 3 (黒四角) 、または冷 N T 5 (白四角) で行った。

【図 6】ニューロトロフィンの生物活性を t r k イムノアブソーブションにより阻止する。ニ

10

20

30

40

50

ユーロトロフィン生物活性を、trk イムノアドヒージンの不在下または存在下でニワトリ後根 (A および B) または交感 (C) 神経節ニューロンの生存を測定することにより評価した。図中の記号は図 5 と同じ。

【図 7】trk C 欠失および trk B とのスワップ (swap) の構造。それぞれ、trk C および trk B の構造ドメインを黒色および灰色で示す。

【図 8】trk C 欠失および trk B とのスワップの発現。一つの特定の代表的実験を示す。濃度は抗 Fc ELISA を用いて決定した。trk C 変異体の値は trk C 野生型発現のパーセントとして表してある。

【図 9 - 1】trk C 変異体に結合した NT - 3 の競合置換。増加量の非標識 NT - 3 の存在下で放射性標識した NT - 3 (50 pM) を trk C 変異体に結合させた。(A) trk C の欠失。(B) trk B からの対応配列を有する trk C のドメインスワップ。(C) trk C の Ig - ドメイン 2 の変異体。

10

【図 9 - 2】trk C 変異体に結合した NT - 3 の競合置換。増加量の非標識 NT - 3 の存在下で放射性標識した NT - 3 (50 pM) を trk C 変異体に結合させた。(A) trk C の欠失。(B) trk B からの対応配列を有する trk C のドメインスワップ。(C) trk C の Ig - ドメイン 2 の変異体。

【図 9 - 3】trk C 変異体に結合した NT - 3 の競合置換。増加量の非標識 NT - 3 の存在下で放射性標識した NT - 3 (50 pM) を trk C 変異体に結合させた。(A) trk C の欠失。(B) trk B からの対応配列を有する trk C のドメインスワップ。(C) trk C の Ig - ドメイン 2 の変異体。

20

【図 10 - 1】trk C 変異体に結合した BDNF の競合置換。増加量の非標識 BDNF の存在下で放射性標識した BDNF (50 pM) を trk C 変異体に結合させた。(A) trk C の欠失。(B) trk B からの対応配列を有する trk C のドメインスワップ。(C) trk B からの配列を有する Ig - ドメイン 2 のスワップ。

【図 10 - 2】trk C 変異体に結合した BDNF の競合置換。増加量の非標識 BDNF の存在下で放射性標識した BDNF (50 pM) を trk C 変異体に結合させた。(A) trk C の欠失。(B) trk B からの対応配列を有する trk C のドメインスワップ。(C) trk B からの配列を有する Ig - ドメイン 2 のスワップ。

【図 10 - 3】trk C 変異体に結合した BDNF の競合置換。増加量の非標識 BDNF の存在下で放射性標識した BDNF (50 pM) を trk C 変異体に結合させた。(A) trk C の欠失。(B) trk B からの対応配列を有する trk C のドメインスワップ。(C) trk B からの配列を有する Ig - ドメイン 2 のスワップ。

30

【図 11 - 1】完全長のヒト trk A、trk B および trk C 受容体のアミノ酸配列の比較。コンセンサス配列は囲んである；種々のドメインの境界は垂線で印を付してある (配列番号：9、2 および 6 参照)。

【図 11 - 2】完全長のヒト trk A、trk B および trk C 受容体のアミノ酸配列の比較。コンセンサス配列は囲んである；種々のドメインの境界は垂線で印を付してある (配列番号：9、2 および 6 参照)。

【図 11 - 3】完全長のヒト trk A、trk B および trk C 受容体のアミノ酸配列の比較。コンセンサス配列は囲んである；種々のドメインの境界は垂線で印を付してある (配列番号：9、2 および 6 参照)。

40

【図 12】ラットにおいてカラギーナンにより誘発された痛覚過敏症に対する trk A - IgG イムノアドヒージンの効果。

【図 13】trk A - IgG の注入はラットにおいて鈍磨を引き起こす。

【0310】

(配列表)

【 数 4 】

配 列 表

配列番号 1 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 3 1 9 4 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 :

GGAAGGTTTA AAGAAGAAGC CGCAAAGCGC AGGGAAGGCC TCCCGGCACG 50
 GGTGGGGGAA AGCGGCCGGT GCAGCGCGGG GACAGGCACT CGGGCTGGCA 100
 CTGGCTGCTA GGGATGTCGT CCTGGATAAG GTGGCATGGA CCCGCCATGG 150
 CGCGGCTCTG GGGCTTCTGC TGGCTGGTTG TGGGCTTCTG GAGGGCCGCT 200
 TTCGCCTGTC CCACGTCCTG CAAATGCAGT GCCTCTCGGA TCTGGTGCAG 250
 CGACCCCTCT CCTGGCATCG TGGCATTTCG GAGATTGGAG CCTAACAGTG 300
 TAGATCCTGA GAACATCACC GAAATTTTCA TCGCAAACCA GAAAAGTTA 350
 GAAATCATCA ACGAAGATGA TGTGAAGCT TATGTGGGAC TGAGAAATCT 400
 GACAATTGTG GATTCTGGAT TAAAATTTGT GGCTCATAAA GCATTTCCTGA 450
 AAAACAGCAA CCTGCAGCAC ATCAATTTTA CCCGAAACAA ACTGACGAGT 500
 TTGTCTAGGA AACATTTCGG TCACCTTGAC TTGTCTGAAC TGATCCTGGT 550
 GGGCAATCCA TTTACATGCT CCTGTGACAT TATGTGGATC AAGACTCTCC 600
 AAGAGGCTAA ATCCAGTCCA GACACTCAGG ATTTGTACTG CCTGAATGAA 650
 AGCAGCAAGA ATATTCCCCT GGCAAACCTG CAGATACCCA ATTGTGGTIT 700
 GCCATCTGCA AATCTGGCCG CACCTAACCT CACTGTGGAG GAAGGAAAGT 750
 CTATCACATT ATCCTGTAGT GTGGCAGGTG ATCCGGTTCC TAATATGTAT 800
 TGGGATGTTG GTAACCTGGT TTCCAAACAT ATGAATGAAA CAAGCCACAC 850

10

20

30

40

【 数 5 】

ACAGGGCTCC TTAAGGATAA CTAACATTTT ATCCGATGAC AGTGGGAAGC 900
AGATCTCTTG TGTGGCGGAA AATCTTGTAG GAGAAGATCA AGATTCTGTC 950
AACCTCACTG TGCATTTTGC ACCAACTATC ACATTTCTCG AATCTCCAAC 1000
CTCAGACCAC CACTGGTGCA TTCCATTAC TGTGAAAGGC AACCCAAAAC 1050
CAGCGCTTCA GTGGTTCTAT AACGGGGCAA TATTGAATGA GTCCAATAC 1100
ATCTGTACTA AAATACATGT TACCAATCAC ACGGAGTACC ACGGCTGCCT 1150
CCAGCTGGAT AATCCCACTC ACATGAACAA TGGGGACTAC ACTCTAATAG 1200
CCAAGAATGA GTATGGGAAG GATGAGAAAC AGATTCTGTC TCCTTTCATG 1250
GGCTGGCCTG GAATTGACGA TGGTGCAAC CCAAATTATC CTGATGTAAT 1300
TTATGAAGAT TATGGAAC TGCGGAATGA CATCGGGGAC ACCACGAACA 1350
GAAGTAATGA AATCCCTTCC ACAGACGTCA CTGATAAAAC CGGTGGGAA 1400
CATCTCTCGG TCTATGCTGT GGTGGTGATT GCGTCTGTGG TGGGATTTTG 1450
CCTTTTGGTA ATGCTGTTTC TGCTTAAGTT GGCAAGACAC TCCAAGTTTG 1500
GCATGAAAGG CCCAGCCTCC GTTATCAGCA ATGATGATGA CTCTGCCAGC 1550
CCACTCCATC ACATCTCCAA TGGGAGTAAC ACTCCATCTT CTTCGGAAGG 1600
TGGCCCAGAT GCTGTCAITA TTGGAATGAC CAAGATCCCT GTCATTGAAA 1650
ATCCCCAGTA CTTTGGCATC ACCAACAGTC AGCTCAAGCC AGACACATTT 1700
GTTCAGCACA TCAAGCGACA TAACATTGTT CTGAAAAGGG AGCTAGGCGA 1750
AGGAGCCTTT GGAAAAGTGT TCCTAGCTGA ATGCTATAAC CTCTGTCCTG 1800
AGCAGGACAA GATCTTGGTG GCAGTGAAGA CCCTGAAGGA TGCCAGTGAC 1850
AATGCACGCA AGGACTTCCA CCGTGAGGCC GAGCTCCTGA CCAACCTCCA 1900
GCATGAGCAC ATCGTCAAGT TCTATGGCGT CTGCGTGGAG GCGGACCCCC 1950

10

20

30

40

【数 6】

TCATCATGGT CTTTGAGTAC ATGAAGCATG GGGACCTCAA CAAGTTCCTC 2000
AGGGCACACG GCCCTGATGC CGTGCTGATG GCTGAGGGCA ACCCGCCAC 2050
GGAAGTGAAG CAGTCGCAGA TGCTGCATAT AGCCCAGCAG ATCGCCGCGG 2100
GCATGGTCTA CCTGGCGTCC CAGCACTTCG TGCACCGCGA TTTGGCCACC 2150
AGGAACTGCC TGGTCGGGGA GAACTTGCTG GTGAAAATCG GGGACTTTGG 2200
GATGTCCCGG GACGTGTACA GCACTGACTA CTACAGGGTC GGTGGCCACA 2250
CAATGCTGCC CATTCGCTGG ATGCCTCCAG AGAGCATCAT GTACAGGAAA 2300
TTCACGAAGG AAAGCGACGT CTGGAGCCTG GGGGTCTGT TGTGGGAGAT 2350
TTTCACCTAT GGCAAACAGC CCTGGTACCA GCTGTCAAAC AATGAGGTGA 2400
TAGAGTGTAT CACTCAGGCG CGAGTCCTGC AGCGACCCCG CACGTGCCCC 2450
CAGGAGGTGT ATGAGCTGAT GCTGGGGTGC TGGCAGCGAG AGCCCCACAT 2500
GAGGAAGAAG ATCAAGGGCA TCCATACCCT CCTTCAGAAC TTGGCCAAGG 2550
CATCTCCGGT CTACCTGGAC ATTCTAGGCT AGGGCCCTTT TCCCCAGACC 2600
GATCCTTCCC AACGTACTCC TCAGACGGGC TGAGAGGATG AACATCTTTT 2650
AACTGCCGCT GGAGGCCACC AAGCTGCTCT CCTTCACTCT GACAGTATTA 2700
ACATCAAAGA CTCCGAGAAG CTCTCGAGGG AAGCAGTGTG TACTTCTTCA 2750
TCCATAGACA CAGTATTGAC TTCTTTTGG CATTATCTCT TTCTCTCTTT 2800
CCATCTCCCT TGGTTGTTCC TTTTCTTTT TTTAAATTTT CTTTCTTCTC 2850
TTTTTTTTCG TCTTCCTGC TTCACGATTC TTACCCTTTC TTTTGAATCA 2900
ATCTGGCTTC TGCATTACTA TTAAGTCTGC ATAGACAAAG GCCTTAACAA 2950
ACGTAATTGG TTATATCAGC AGACACTCCA GTTTGCCCAC CACAATAAC 3000
AATGCCTTGT TGTATTCCTG CCTTTGATGT GGATGAAAAA AAGGGAAAAC 3050

10

20

30

40

【数 7 - 1】

AAATATTTCA CTTAAACTTT GTCACCTCTG CTGTACAGAT ATCGAGAGTT 3100
TCTATGGATT CACTTCTATT TATTTATTAT TATTACTGTT CTTATTGTTT 3150
TTGGATGGCT TAAGCCTGTG TATAAAAAA AAAAAAATC TAGA 3194

【数 7 - 2】

配列番号 2 :

(i) 配列の特徴

10

(A) 配列の長さ : 822 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(x i) 配列 :

Met Ser Ser Trp Ile Arg Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu
1 5 10 15
Trp Gly Phe Cys Trp Leu Val Val Gly Phe Trp Arg Ala Ala Phe
20 25 30
Ala Cys Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ala Ser Arg Ile Trp Cys
35 40 45

20

【数 7 - 3】

Ser Asp Pro Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro
 50 55 60
 Asn Ser Val Asp Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Phe Ile Ala Asn
 65 70 75
 Gln Lys Arg Leu Glu Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr
 80 85 90
 Val Gly Leu Arg Asn Leu Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe
 95 100 105
 Val Ala His Lys Ala Phe Leu Lys Asn Ser Asn Leu Gln His Ile
 110 115 120
 Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu Thr Ser Leu Ser Arg Lys His Phe
 125 130 135
 Arg His Leu Asp Leu Ser Glu Leu Ile Leu Val Gly Asn Pro Phe
 140 145 150
 Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Ile Lys Thr Leu Gln Glu Ala
 155 160 165
 Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr Cys Leu Asn Glu Ser
 170 175 180
 Ser Lys Asn Ile Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile Pro Asn Cys Gly
 185 190 195
 Leu Pro Ser Ala Asn Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr Val Glu Glu
 200 205 210
 Gly Lys Ser Ile Thr Leu Ser Cys Ser Val Ala Gly Asp Pro Val
 215 220 225
 Pro Asn Met Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His Met
 230 235 240
 Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile
 245 250 255
 Ser Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn
 260 265 270

10

20

30

40

【数 7 - 4】

Leu Val Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe	
275 280 285	
Ala Pro Thr Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His	
290 295 300	
Trp Cys Ile Pro Phe Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu	
305 310 315	
Gln Trp Phe Tyr Asn Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile	10
320 325 330	
Cys Thr Lys Ile His Val Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys	
335 340 345	
Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr	
350 355 360	
Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr Gly Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser	
365 370 375	20
Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly Ile Asp Asp Gly Ala Asn Pro	
380 385 390	
Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp Tyr Gly Thr Ala Ala Asn	
395 400 405	
Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn Glu Ile Pro Ser Thr	
410 415 420	
Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Leu Ser Val Tyr Ala	
425 430 435	30
Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu Val Met	
440 445 450	
Leu Phe Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met Lys	
455 460 465	
Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro	
470 475 480	
Leu His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu	40
485 490 495	

【数 7 - 5】

Gly Gly Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val			
500	505	510	
Ile Glu Asn Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys			
515	520	525	
Pro Asp Thr Phe Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu			
530	535	540	
Lys Arg Glu Leu Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala			10
545	550	555	
Glu Cys Tyr Asn Leu Cys Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala			
560	565	570	
Val Lys Thr Leu Lys Asp Ala Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe			
575	580	585	
His Arg Glu Ala Glu Leu Leu Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile			
590	595	600	
Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val Glu Gly Asp Pro Leu Ile Met			20
605	610	615	
Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Asn Lys Phe Leu Arg			
620	625	630	
Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala Glu Gly Asn Pro Pro			
635	640	645	
Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile Ala Gln Gln Ile			
650	655	660	30
Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe Val His Arg			
665	670	675	
Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu Leu Val			
680	685	690	
Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr Asp			
695	700	705	
Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met			
710	715	720	40

【数 7 - 6】

Pro Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp
 725 730 735
 Val Trp Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly
 740 745 750
 Lys Gln Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys
 755 760 765
 Ile Thr Gln Gly Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln
 770 775 780
 Glu Val Tyr Glu Leu Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His
 785 790 795
 Met Arg Lys Asn Ile Lys Gly Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu
 800 805 810
 Ala Lys Ala Ser Pro Val Tyr Leu Asp Ile Leu Gly
 815 820 822

10

20

配列番号 3 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 1 8 7 0 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(x i) 配列 :

30

ggaaggttta aagaagaagc cgcaaagcgc agggaaggcc tcccggcacg 50
 ggtgggggaa agcggccggt gcagcgcggg gacaggcact cgggctggca 100
 ctggctgcta gggatgtcgt cctggataag gtggcatgga cccgccatgg 150
 cgcggctctg gggtctctgc tggttggttg tgggtctctg gagggccgct 200
 ttgcctgtc ccacgtcctg caaatgcagt gcctctcgga tctggtgcag 250
 cgacccttct cctggcatcg tggcatttcc gagattggag cctaacagt 300
 tagatcctga gaacatcacc gaaattttca tcgcaaacca gaaaaggtta 350
 gaaatcatca acgaagatga tggtgaagct tatgtgggac tgagaaatct 400

40

【数 7 - 7】

gacaattgtg gattctggat taaaatttgt ggctcataaa gcatttctga 450
 aaaacagcaa cctgcagcac atcaatttta cccgaacaa actgacgagt 500
 ttgtctagga aacatttccg tcaccttgac ttgtctgaac tgatcctggt 550
 gggcaatcca ttacatgct cctgtgacat tatgtggatc aagactctcc 600
 aagaggctaa atccagtcca gacactcagg attgtactg cctgaatgaa 650
 agcagcaaga atattccctt ggcaaacctg cagataccca attgtggtt 700
 gccatctgca aatctggcgg cacctaacct cactgtggag gaaggaaagt 750
 ctatcacatt atcctgtagt gtggcaggtg atccggttcc taatatgtat 800
 tgggatgttg gtaacctggt ttccaaacat atgaatgaaa caagccacac 850
 acagggtccc ttaaggataa ctaacatttc atccgatgac agtgggaagc 900
 agatctcttg tgtggcgga aatctttagt gagaagatca agattctgtc 950
 aacctcactg tgcattttgc accaactatc acatttctcg aatctccaac 1000
 ctgagaccac cactgtgca ttccattcac tgtgaaagge aacccaaaac 1050
 cagegttca gtggttctat aacggggcaa tattgaatga gtccaaatac 1100
 atctgtacta aaatacatgt taccatcac acggagtacc acggtgcct 1150
 ccagctggat aatcccactc acatgaacaa tggggactac actctaatag 1200
 ccaagaatga gtatgggaag gatgagaaac agatttctgc tcacttcatg 1250
 ggctggcctg gaattgacga tgggtcaaac ccaaattatc ctgatgtaat 1300
 ttatgaagat tatggaactg cagcgaatga catcggggac accacgaaca 1350
 gaagtaatga aatcccttcc acagacgtca ctgataaaac cggtcgggaa 1400
 catctctcgg tctatgctgt ggtggtgatt gcgtctgtgg tgggattttg 1450
 ccttttggtt atgctgttcc tgccttaagt ggcaagacac tccaagtttg 1500
 gcatgaaagg ttttgttttg ttccataaga tccactgga tgggtagctg 1550
 aaataaagga aaagacagag aaaggggctg tgggtcttgt tggttgatgc 1600
 tgccatgtaa gctggactcc tgggactgct gttggcttat cccgggaagt 1650
 gctgcttate tggggtttcc tggtagatgt gggcgggtgt tggaggetgt 1700
 actatatgaa gcctgcatat actgtgagct gtgattgggg aacaccaatg 1750
 cagaggtaac tctcaggcag ctaagcagca cctcaagaaa acatgttaaa 1800
 ttaatgcttc tcttcttaca gtagttcaaa taaaaactg aaatgaaatc 1850
 ccattggatt gtacttctct 1870

10

20

30

40

【数 7 - 8】

配列番号 4 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 477 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(x i) 配列 :

Met	Ser	Ser	Trp	Ile	Arg	Trp	His	Gly	Pro	Ala	Met	Ala	Arg	Leu	10
1				5					10					15	
Trp	Gly	Phe	Cys	Trp	Leu	Val	Val	Gly	Phe	Trp	Arg	Ala	Ala	Phe	
				20					25					30	
Ala	Cys	Pro	Thr	Ser	Cys	Lys	Cys	Ser	Ala	Ser	Arg	Ile	Trp	Cys	
				35					40					45	
Ser	Asp	Pro	Ser	Pro	Gly	Ile	Val	Ala	Phe	Pro	Arg	Leu	Glu	Pro	
				50					55					60	20
Asn	Ser	Val	Asp	Pro	Glu	Asn	Ile	Thr	Glu	Ile	Phe	Ile	Ala	Asn	
				65					70					75	
Gln	Lys	Arg	Leu	Glu	Ile	Ile	Asn	Glu	Asp	Asp	Val	Glu	Ala	Tyr	
				80					85					90	
Val	Gly	Leu	Arg	Asn	Leu	Thr	Ile	Val	Asp	Ser	Gly	Leu	Lys	Phe	
				95					100					105	
Val	Ala	His	Lys	Ala	Phe	Leu	Lys	Asn	Ser	Asn	Leu	Gln	His	Ile	
				110					115					120	30
Asn	Phe	Thr	Arg	Asn	Lys	Leu	Thr	Ser	Leu	Ser	Arg	Lys	His	Phe	
				125					130					135	
Arg	His	Leu	Asp	Leu	Ser	Glu	Leu	Ile	Leu	Val	Gly	Asn	Pro	Phe	
				140					145					150	
Thr	Cys	Ser	Cys	Asp	Ile	Met	Trp	Ile	Lys	Thr	Leu	Gln	Glu	Ala	
				155					160					165	
Lys	Ser	Ser	Pro	Asp	Thr	Gln	Asp	Leu	Tyr	Cys	Leu	Asn	Glu	Ser	40

【数 7 - 9】

170	175	180	
Ser Lys Asn Ile Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile Pro Asn Cys Gly			
185	190	195	
Leu Pro Ser Ala Asn Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr Val Glu Glu			
200	205	210	
Gly Lys Ser Ile Thr Leu Ser Cys Ser Val Ala Gly Asp Pro Val			10
215	220	225	
Pro Asn Met Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His Met			
230	235	240	
Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile			
245	250	255	
Ser Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn			
260	265	270	
Leu Val Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe			20
275	280	285	
Ala Pro Thr Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His			
290	295	300	
Trp Cys Ile Pro Phe Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu			
305	310	315	
Gln Trp Phe Tyr Asn Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile			
320	325	330	
Cys Thr Lys Ile His Val Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys			30
335	340	345	
Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr			
350	355	360	
Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr Gly Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser			
365	370	375	
Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly Ile Asp Asp Gly Ala Asn Pro			
380	385	390	
Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp Tyr Gly Thr Ala Ala Asn			40

【数 7 - 1 0】

395	400	405
Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn Glu Ile Pro Ser Thr		
410	415	420
Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Leu Ser Val Tyr Ala		
425	430	435
Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu Val Met		
440	445	450
Leu Phe Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met Lys		
455	460	465
Gly Phe Val Leu Phe His Lys Ile Pro Leu Asp Gly		
470	475	477

【 数 8 】

配列番号 5 :

(i) 配列の特徴

- (A) 配列の長さ : 2 7 1 5 塩基
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

10

(xi) 配列 :

GGATCCGCGT CGGAGATGGA TGTCTCTCTT TGCCCAGCCA AGTGTAGTTT 50
CTGGCGGATT TTCTTGCTGG GAAGCGTCTG GCTGGACTAT GTGGGCTCCG 100
TGCTGGCTTG CCCTGCAAAT TGTGTCTGCA GCAAGACTGA GATCAATTGC 150
CGGCGGCCGG ACGATGGGAA CCTCTTCCCC CTCCTGGAAG GGCAGGATTC 200
AGGGAACAGC AATGGGAACG CCAATATCAA CATCACGGAC ATCTCAAGGA 250
ATATCACTTC CATACACATA GAGAACTGGC GCAGTCTTCA CACGCTCAAC 300
GCCGTGGACA TGGAGCTCTA CACCGGACTT CAAAAGCTGA CCATCAAGAA 350
CTCAGGACTT CGGAGCATTG AGCCCAGAGC CTTTGCCAAG AACCCCCATT 400
TGCGTTATAT AAACCTGTCA AGTAACCGGC TCACCACACT CTCGTGGCAG 450
CTCTTCCAGA CGCTGAGTCT TCGGGAATTG CAGITGGAGC AGAACTTTTT 500
CAACTGCAGC TGTGACATCC GCTGGATGCA GCTCTGGCAG GAGCAGGGGG 550
AGGCCAAGCT CAACAGCCAG AACCTCTACT GCATCAATGC TGATGGCTCC 600
CAGCTTCCTC TCTTCCGCAT GAACATCACT CAGTGTGACC TTCCTGAGAT 650
CAGCGTGAGC CACGTCAACC TGACCGTACG AGAGGGTGAC AATGCTGTIA 700
TCACTTGCAA TGGCTCTGGA TCACCCCTTC CTGATGTGGA CTGGATAGTC 750
ACTGGGCTGC AGTCCATCAA CACTCACCAG ACCAATCTGA ACTGGACCAA 800
TGTTCAATGCC ATCAACTTGA CGCTGGTGAA TGTGACGAGT GAGGACAATG 850
GCTTCACCCCT GACGTGCATT GCAGAGAACG TGGTGGGCAT GAGCAATGCC 900
AGTGTGCCC TCACTGTCTA CTATCCCCCA CGTGTGGTGA GCCTGGAGGA 950

20

30

40

【 数 9 】

GCCTGAGCTG CGCCTGGAGC ACTGCATCGA GTTTGTGGTG CGTGGCAACC 1000
CCCCACCAAC GCTGCACTGG CTGCACAATG GGCAGCCTCT GCGGGAGTCC 1050
AAGATCATCC ATGTGGAATA CTACCAAGAG GGAGAGATTT CCGAGGGCTG 1100
CCTGCTCTTC AACAGCCCA CCCACTACAA CAATGGCAAC TATACCCTCA 1150
TTGCCAAAA CCCACTGGGC ACAGCCAACC AGACCATCAA TGGCCACTTC 1200
CTCAAGGAGC CCTTTCCAGA GAGCACGGAT AACTTTATCT TGTITGACGA 1250
AGTGAGTCCC ACACCTCCTA TCACTGTGAC CCACAAACCA GAAGAAGACA 1300
CTTTTGGGGT ATCCATAGCA GTTGGACTTG CTGCTTTTGC CTGTGTCTCTG 1350
TTGGTGGTTC TCTTCGTCAT GATCAACAAA TATGGTCGAC GGTCCAAATT 1400
TGGAAATGAAG GGTCCCGTGG CTGTCATCAG TGGTGAGGAG GACTCAGCCA 1450
GCCCCACTGCA CCACATCAAC CACGGCATCA CCACGCCCTC GTCACTGGAT 1500
GCCGGGCCCC ACACTGTGGT CATTGGCATG ACTCGCATCC CTGTCAATTGA 1550
GAACCCCCAG TACTTCCGTC AGGGACACAA CTGCCACAAG CCGGACACGT 1600
ATGTGCAGCA CATTAGAGG AGAGACATCG TGCTGAAGCG AGAACTGGGT 1650
GAGGGAGCCT TTGGAAGGT CTTCCTGGCC GAGTGCTACA ACCTCAGCCC 1700
GACCAAGGAC AAGATGCTTG TGGCTGTGAA GGCCCTGAAG GATCCCACCC 1750
TGGCTGCCCC GAAGGATTTC CAGAGGGAGG CCGAGCTGCT CACCAACCTG 1800
CAGCATGAGC ACATTGTCAA GTTCTATGGA GTGTGCGGCG ATGGGGACCC 1850
CCTCATCATG GTCTTTGAAT ACATGAAGCA TGGAGACCTG AATAAGTTCC 1900
TCAGGGCCCA TGGGCCAGAT GCAATGATCC TTGTGGATGG ACAGCCACGC 1950
CAGGCCAAGG GTGAGCTGGG GCTCTCCCAA ATGCTCCACA TTGCCAGTCA 2000
GATCGCCTCG GGTATGGTGT ACCTGGCCTC CCAGCACTTT GTGCACCGAG 2050
ACCTGGCCAC CAGGAACTGC CTGGTTGGAG CGAATCTGCT AGTGAAGATT 2100
GGGGAATTCT GCATGTCCAG AGATGTCTAC AGCACGGATT ATTACAGGCT 2150

10

20

30

40

【数 1 0】

CTTTAATCCA TCTGGAAATG ATTTTGTAT ATGGTGTGAG GTGGGAGGAC 2200
ACACCATGCT CCCCATTCGC TGGATGCCTC CTGAAAGCAT CATGTACCGG 2250
AAGTTCAC TA CAGAGAGTGA TGTATGGAGC TTCGGGGTGA TCCTCTGGGA 2300
GATCTTCACC TATGGAAAGC AGCCATGGTT CCAACTCTCA AACACGGAGG 2350
TCATTGAGTG CATTACCCAA GGTCTGTGTT TGGAGCGGCC CCGAGTCTGC 2400
CCCAAGAGG TGTACGATGT CATGCTGGGG TGCTGGCAGA GGAACACACA 2450
GCAGCGGTTG AACATCAAGG AGATCTACAA AATCCTCCAT GCTTTGGGGA 2500
AGGCCACCCC AATCTACCTG GACATTCTTG GCTAGTGGTG GCTGGTGGTC 2550
ATGAATTCAT ACTCTGTTGC CTCCTCTCTC CCTGCCTCAC ATCTCCCTTC 2600
CACCTCACAA CTCCTTCCAT CCTTGA CTGA AGCGAACATC TTCATATAAA 2650
CTCAAGTGCC TGCTACACAT ACAACACTGA AAAAAGGAAA AAAAAGAAA 2700
AAAAAAAAA ACCGC 2715

10

20

30

40

【数 1 1 - 1】

配列番号 6 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 8 3 9 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(x i) 配列 :

Met Asp Val Ser Leu Cys Pro Ala Lys Cys Ser Phe Trp Arg Ile
 1 5 10 15
 Phe Leu Leu Gly Ser Val Trp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Leu
 20 25 30
 Ala Cys Pro Ala Asn Cys Val Cys Ser Lys Thr Glu Ile Asn Cys
 35 40 45
 Arg Arg Pro Asp Asp Gly Asn Leu Phe Pro Leu Leu Glu Gly Gln
 50 55 60
 Asp Ser Gly Asn Ser Asn Gly Asn Ala Asn Ile Asn Ile Thr Asp
 65 70 75
 Ile Ser Arg Asn Ile Thr Ser Ile His Ile Glu Asn Trp Arg Ser

10

20

【数 1 1 - 2】

80	85	90	
Leu His Thr Leu Asn Ala Val Asp Met Glu Leu Tyr Thr Gly Leu			
95	100	105	
Gln Lys Leu Thr Ile Lys Asn Ser Gly Leu Arg Ser Ile Gln Pro			
110	115	120	
Arg Ala Phe Ala Lys Asn Pro His Leu Arg Tyr Ile Asn Leu Ser			
125	130	135	10
Ser Asn Arg Leu Thr Thr Leu Ser Trp Gln Leu Phe Gln Thr Leu			
140	145	150	
Ser Leu Arg Glu Leu Gln Leu Glu Gln Asn Phe Phe Asn Cys Ser			
155	160	165	
Cys Asp Ile Arg Trp Met Gln Leu Trp Gln Glu Gln Gly Glu Ala			
170	175	180	
Lys Leu Asn Ser Gln Asn Leu Tyr Cys Ile Asn Ala Asp Gly Ser			20
185	190	195	
Gln Leu Pro Leu Phe Arg Met Asn Ile Ser Gln Cys Asp Leu Pro			
200	205	210	
Glu Ile Ser Val Ser His Val Asn Leu Thr Val Arg Glu Gly Asp			
215	220	225	
Asn Ala Val Ile Thr Cys Asn Gly Ser Gly Ser Pro Leu Pro Asp			
230	235	240	
Val Asp Trp Ile Val Thr Gly Leu Gln Ser Ile Asn Thr His Gln			30
245	250	255	
Thr Asn Leu Asn Trp Thr Asn Val His Ala Ile Asn Leu Thr Leu			
260	265	270	
Val Asn Val Thr Ser Glu Asp Asn Gly Phe Thr Leu Thr Cys Ile			
275	280	285	
Ala Glu Asn Val Val Gly Met Ser Asn Ala Ser Val Ala Leu Thr			
290	295	300	
Val Tyr Tyr Pro Pro Arg Val Val Ser Leu Glu Glu Pro Glu Leu			40

【数 1 1 - 3】

305	310	315	
Arg Leu Glu His Cys Ile Glu Phe Val Val Arg Gly Asn Pro Pro			
320	325	330	
Pro Thr Leu His Trp Leu His Asn Gly Gln Pro Leu Arg Glu Ser			
335	340	345	
Lys Ile Ile His Val Glu Tyr Tyr Gln Glu Gly Glu Ile Ser Glu			
350	355	360	10
Gly Cys Leu Leu Phe Asn Lys Pro Thr His Tyr Asn Asn Gly Asn			
365	370	375	
Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Pro Leu Gly Thr Ala Asn Gln Thr			
380	385	390	
Ile Asn Gly His Phe Leu Lys Glu Pro Phe Pro Glu Ser Thr Asp			
395	400	405	
Asn Phe Ile Leu Phe Asp Glu Val Ser Pro Thr Pro Pro Ile Thr			20
410	415	420	
Val Thr His Lys Pro Glu Glu Asp Thr Phe Gly Val Ser Ile Ala			
425	430	435	
Val Gly Leu Ala Ala Phe Ala Cys Val Leu Leu Val Val Leu Phe			
440	445	450	
Val Met Ile Asn Lys Tyr Gly Arg Arg Ser Lys Phe Gly Met Lys			
455	460	465	
Gly Pro Val Ala Val Ile Ser Gly Glu Glu Asp Ser Ala Ser Pro			30
470	475	480	
Leu His His Ile Asn His Gly Ile Thr Thr Pro Ser Ser Leu Asp			
485	490	495	
Ala Gly Pro Asp Thr Val Val Ile Gly Met Thr Arg Ile Pro Val			
500	505	510	
Ile Glu Asn Pro Gln Tyr Phe Arg Gln Gly His Asn Cys His Lys			
515	520	525	
Pro Asp Thr Tyr Val Gln His Ile Lys Arg Arg Asp Ile Val Leu			40

【数 1 1 - 4】

530	535	540
Lys Arg Glu Leu Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala		
545	550	555
Glu Cys Tyr Asn Leu Ser Pro Thr Lys Asp Lys Met Leu Val Ala		
560	565	570
Val Lys Ala Leu Lys Asp Pro Thr Leu Ala Ala Arg Lys Asp Phe		
575	580	585
Gln Arg Glu Ala Glu Leu Leu Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile		
590	595	600
Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Gly Asp Gly Asp Pro Leu Ile Met		
605	610	615
Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Asn Lys Phe Leu Arg		
620	625	630
Ala His Gly Pro Asp Ala Met Ile Leu Val Asp Gly Gln Pro Arg		
635	640	645
Gln Ala Lys Gly Glu Leu Gly Leu Ser Gln Met Leu His Ile Ala		
650	655	660
Ser Gln Ile Ala Ser Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe		
665	670	675
Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Ala Asn		
680	685	690
Leu Leu Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr		
695	700	705
Ser Thr Asp Tyr Tyr Arg Leu Phe Asn Pro Ser Gly Asn Asp Phe		
710	715	720
Cys Ile Trp Cys Glu Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg		
725	730	735
Trp Met Pro Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu		
740	745	750
Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Ile Leu Trp Glu Ile Phe Thr		

10

20

30

40

【数 1 1 - 5】

755	760	765
Tyr Gly Lys Gln Pro Trp Phe Gln Leu Ser Asn Thr Glu Val Ile		
770	775	780
Glu Cys Ile Thr Gln Gly Arg Val Leu Glu Arg Pro Arg Val Cys		
785	790	795
Pro Lys Glu Val Tyr Asp Val Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu		
800	805	810
Pro Gln Gln Arg Leu Asn Ile Lys Glu Ile Tyr Lys Ile Leu His		
815	820	825
Ala Leu Gly Lys Ala Thr Pro Ile Tyr Leu Asp Ile Leu Gly		
830	835	839

10

配列番号 7 :

(i) 配列の特徴

20

(A) 配列の長さ : 1 8 5 8 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(x i) 配列 :

```

ggatccgcgt cggagatgga tgtctctctt tgcccagcca agtgtagttt 50
ctggcggatt ttcttgctgg gaagcgtctg gctggactat gtgggctccg 100
tgctggcttg ccctgcaaat tgtgtctgca gcaagactga gatcaattgc 150
cgccggccgg acgatgggaa cctcttcccc ctcttggaag ggcaggattc 200
agggaacagc aatgggaacg ccaatatcaa catcaaggac atctcaagga 250
atatcacttc catacacata gagaactggc gcagtcttca cacgtcaac 300
gccgtggaca tggagctcta caccggactt caaaagctga ccatcaagaa 350
ctcaggactt cggagcattc agcccagagc ctttgccaag aacccccatt 400
tgcgttatat aaacctgtca agtaaccggc tcaccacaact ctctggcag 450
ctcttcaga cgctgagtct tcgggaattg cagttggagc agaacttttt 500
caactgcagc tgtgacatcc gctggatgca gctctggcag gagcaggggg 550

```

30

40

【数 1 1 - 6】

aggccaaagct caacagccag aacctctact gcataaatgc tgatggctcc 600
 cagcttcctc tcttcgcgat gaacatcagt cagtgtgacc ttctgagat 650
 cagcgtgagc cagctcaacc tgaccgtacg agagggtagc aatgctgtta 700
 tcaacttgcaa tggctctgga tcaccccttc ctgatgtgga ctggatagtc 750
 actgggctgc agtccatcaa cactcaccag accaatctga actggaccaa 800
 tgitcatgcc atcaacttga cgtcggtaga tgtgacgagt gaggacaatg 850
 gcttcacctt gacgtgcatt gcagagaacg tggtagggcat gagcaatgcc 900
 agtggtgccc tcaactgtct ctatccccc cgtgtggtga gcctggagga 950
 gcctgagctg cgcctggagc actgcatcga gttgtggtg cgtggcaacc 1000
 ccccaaccaac gctgcactgg ctgcacaatg ggcagcctct gggggagtcc 1050
 aagatcatcc atgtggaata ctaccaagag ggagagattt ccgagggctg 1100
 cctgtctctt aacaagccca cccactacaa caatggcaac tataacctca 1150
 ttgccaaaaa cccactgggc acagccaacc agaccatcaa tggccacttc 1200
 ctcaaggagc cctttccaga gacacggat aactttatct tgtttgacga 1250
 agtgagtecc acactctcta tcaactgtac ccacaaacca gaagaagaca 1300
 cttttggggt atccatagca gttggaattg ctgcttttgc ctgtgtcctg 1350
 ttggtgggtc tcttcgtcat gatcaacaaa tatggtcgac ggtccaaatt 1400
 tggaatgaag ggctccgtgg ctgtcatcag tggtagggag gactcagcca 1450
 gccactgca ccacatcaac cagggcatca ccagccctc gtcactggat 1500
 gccgggcccg aactgtggt cattggcatg actcgatcc ctgtcattga 1550
 gaacccccag tacttcctc agggacacaa ctgccacaag ccggacacgt 1600
 gggctctttc aaacatagac aatcatggga tattaaactt gaaggacaat 1650
 agagatcate tagtcccatc aactcaatat atatatgagg aacctgaggt 1700
 ccagagtgga gaagtgtctt acccaagtc acatggtttc agagaaatta 1750
 tgttgaatcc aataagcctt ccggacatt ccaagcctct taacctggc 1800
 atctatgttg aggatgtcaa tgtttatttc agcaaaggac gtcatggctt 1850
 ttaaaaac 1858

10

20

30

配列番号 8 :

(i) 配列の特徴

40

(x i) 配列:

Met Asp Val Ser Leu Cys Pro Ala Lys Cys Ser Phe Trp Arg Ile

1 5 10 15

Phe Leu Leu Gly Ser Val Trp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Leu

20 25 30

Ala Cys Pro Ala Asn Cys Val Cys Ser Lys Thr Glu Ile Asn Cys

35 40 45

Arg Arg Pro Asp Asp Gly Asn Leu Phe Pro Leu Leu Glu Gly Gln

50 55 60

Asp Ser Gly Asn Ser Asn Gly Asn Ala Asn Ile Asn Ile Thr Asp

65 70 75

Ile Ser Arg Asn Ile Thr Ser Ile His Ile Glu Asn Trp Arg Ser

80 85 90

Leu His Thr Leu Asn Ala Val Asp Met Glu Leu Tyr Thr Gly Leu

95 100 105

Gln Lys Leu Thr Ile Lys Asn Ser Gly Leu Arg Ser Ile Gln Pro

110 115 120

Arg Ala Phe Ala Lys Asn Pro His Leu Arg Tyr Ile Asn Leu Ser

125 130 135

Ser Asn Arg Leu Thr Thr Leu Ser Trp Gln Leu Phe Gln Thr Leu

140 145 150

Ser Leu Arg Glu Leu Gln Leu Glu Gln Asn Phe Phe Asn Cys Ser

155 160 165

Cys Asp Ile Arg Trp Met Gln Leu Trp Gln Glu Gln Gly Glu Ala

170 175 180

Lys Leu Asn Ser Gln Asn Leu Tyr Cys Ile Asn Ala Asp Gly Ser

185 190 195

10

20

30

40

【数 1 1 - 8】

Gln Leu Pro Leu Phe Arg Met Asn Ile Ser Gln Cys Asp Leu Pro			
200	205	210	
Glu Ile Ser Val Ser His Val Asn Leu Thr Val Arg Glu Gly Asp			
215	220	225	
Asn Ala Val Ile Thr Cys Asn Gly Ser Gly Ser Pro Leu Pro Asp			
230	235	240	
Val Asp Trp Ile Val Thr Gly Leu Gln Ser Ile Asn Thr His Gln			10
245	250	255	
Thr Asn Leu Asn Trp Thr Asn Val His Ala Ile Asn Leu Thr Leu			
260	265	270	
Val Asn Val Thr Ser Glu Asp Asn Gly Phe Thr Leu Thr Cys Ile			
275	280	285	
Ala Glu Asn Val Val Gly Met Ser Asn Ala Ser Val Ala Leu Thr			
290	295	300	
Val Tyr Tyr Pro Pro Arg Val Val Ser Leu Glu Glu Pro Glu Leu			20
305	310	315	
Arg Leu Glu His Cys Ile Glu Phe Val Val Arg Gly Asn Pro Pro			
320	325	330	
Pro Thr Leu His Trp Leu His Asn Gly Gln Pro Leu Arg Glu Ser			
335	340	345	
Lys Ile Ile His Val Glu Tyr Tyr Gln Glu Gly Glu Ile Ser Glu			
350	355	360	30
Gly Cys Leu Leu Phe Asn Lys Pro Thr His Tyr Asn Asn Gly Asn			
365	370	375	
Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Pro Leu Gly Thr Ala Asn Gln Thr			
380	385	390	
Ile Asn Gly His Phe Leu Lys Glu Pro Phe Pro Glu Ser Thr Asp			
395	400	405	
Asn Phe Ile Leu Phe Asp Glu Val Ser Pro Thr Pro Pro Ile Thr			
410	415	420	40

【数 1 1 - 9】

Val Thr His Lys Pro Glu Glu Asp Thr Phe Gly Val Ser Ile Ala
 425 430 435
 Val Gly Leu Ala Ala Phe Ala Cys Val Leu Leu Val Val Leu Phe
 440 445 450
 Val Met Ile Asn Lys Tyr Gly Arg Arg Ser Lys Phe Gly Met Lys
 455 460 465
 Gly Pro Val Ala Val Ile Ser Gly Glu Glu Asp Ser Ala Ser Pro
 470 475 480
 Leu His His Ile Asn His Gly Ile Thr Thr Pro Ser Ser Leu Asp
 485 490 495
 Ala Gly Pro Asp Thr Val Val Ile Gly Met Thr Arg Ile Pro Val
 500 505 510
 Ile Glu Asn Pro Gln Tyr Phe Arg Gln Gly His Asn Cys His Lys
 515 520 525
 Pro Asp Thr Trp Val Phe Ser Asn Ile Asp Asn His Gly Ile Leu
 530 535 540
 Asn Leu Lys Asp Asn Arg Asp His Leu Val Pro Ser Thr His Tyr
 545 550 555
 Ile Tyr Glu Glu Pro Glu Val Gln Ser Gly Glu Val Ser Tyr Pro
 560 565 570
 Arg Ser His Gly Phe Arg Glu Ile Met Leu Asn Pro Ile Ser Leu
 575 580 585
 Pro Gly His Ser Lys Pro Leu Asn His Gly Ile Tyr Val Glu Asp
 590 595 600
 Val Asn Val Tyr Phe Ser Lys Gly Arg His Gly Phe
 605 610 612

10

20

30

配列番号9：

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ：790アミノ酸

40

【数 1 1 - 1 0】

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(x i) 配列：

```

Met Leu Arg Gly Gly Arg Arg Gly Gln Leu Gly Trp His Ser Trp
  1           5           10           15
Ala Ala Gly Pro Gly Ser Leu Leu Ala Trp Leu Ile Leu Ala Ser
           20           25           30
Ala Gly Ala Ala Pro Cys Pro Asp Ala Cys Cys Pro His Gly Ser
           35           40           45
Ser Gly Leu Arg Cys Thr Arg Asp Gly Ala Leu Asp Ser Leu His
           50           55           60
His Leu Pro Gly Ala Glu Asn Leu Thr Glu Leu Tyr Ile Glu Asn
           65           70           75
Gln Gln His Leu Gln His Leu Glu Leu Arg Asp Leu Arg Gly Leu
           80           85           90
Gly Glu Leu Arg Asn Leu Thr Ile Val Lys Ser Gly Leu Arg Phe
           95          100          105
Val Ala Pro Asp Ala Phe His Phe Thr Pro Arg Leu Ser Arg Leu
          110          115          120
Asn Leu Ser Phe Asn Ala Leu Glu Ser Leu Ser Trp Lys Thr Val
          125          130          135
Gln Gly Leu Ser Leu Gln Glu Leu Val Leu Ser Gly Asn Pro Leu
          140          145          150
His Cys Ser Cys Ala Leu Arg Trp Leu Gln Arg Trp Glu Glu Glu
          155          160          165
Gly Leu Gly Gly Val Pro Glu Gln Lys Leu Gln Cys His Gly Gln
          170          175          180
Gly Pro Leu Ala His Met Pro Asn Ala Ser Cys Gly Val Pro Thr
          185          190          195
Leu Lys Val Gln Val Pro Asn Ala Ser Val Asp Val Gly Asp Asp

```

10

20

30

40

【数 1 1 - 1 1】

200	205	210	
Val Leu Leu Arg Cys Gln Val Glu Gly Arg Gly Leu Glu Gln Ala			
215	220	225	
Gly Trp Ile Leu Thr Glu Leu Glu Gln Ser Ala Thr Val Met Lys			
230	235	240	
Ser Gly Gly Leu Pro Ser Leu Gly Leu Thr Leu Ala Asn Val Thr			
245	250	255	10
Ser Asp Leu Asn Arg Lys Asn Leu Thr Cys Trp Ala Glu Asn Asp			
260	265	270	
Val Gly Arg Ala Glu Val Ser Val Gln Val Asn Val Ser Phe Pro			
275	280	285	
Ala Ser Val Gln Leu His Thr Ala Val Glu Met His His Trp Cys			
290	295	300	
Ile Pro Phe Ser Val Asp Gly Gln Pro Ala Pro Ser Leu Arg Trp			20
305	310	315	
Leu Phe Asn Gly Ser Val Leu Asn Glu Thr Ser Phe Ile Phe Thr			
320	325	330	
Glu Phe Leu Glu Pro Ala Ala Asn Glu Thr Val Arg His Gly Cys			
335	340	345	
Leu Arg Leu Asn Gln Pro Thr His Val Asn Asn Gly Asn Tyr Thr			
350	355	360	
Leu Leu Ala Ala Asn Pro Phe Gly Gln Ala Ser Ala Ser Ile Met			30
365	370	375	
Ala Ala Phe Met Asp Asn Pro Phe Glu Phe Asn Pro Glu Asp Pro			
380	385	390	
Ile Pro Asp Thr Asn Ser Thr Ser Gly Asp Pro Val Glu Lys Lys			
395	400	405	
Asp Glu Thr Pro Phe Gly Val Ser Val Ala Val Gly Leu Ala Val			
410	415	420	
Phe Ala Cys Leu Phe Leu Ser Thr Leu Leu Leu Val Leu Asn Lys			40

【数 1 1 - 1 2】

425	430	435	
Cys Gly Arg Arg Asn Lys Phe Gly Ile Asn Arg Pro Ala Val Leu			
440	445	450	
Ala Pro Glu Asp Gly Leu Ala Met Ser Leu His Phe Met Thr Leu			
455	460	465	
Gly Gly Ser Ser Leu Ser Pro Thr Glu Gly Lys Gly Ser Gly Leu			
470	475	480	10
Gln Gly His Ile Ile Glu Asn Pro Gln Tyr Phe Ser Asp Ala Cys			
485	490	495	
Val His His Ile Lys Arg Arg Asp Ile Val Leu Lys Trp Glu Leu			
500	505	510	
Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys His Asn			
515	520	525	
Leu Leu Pro Glu Gln Asp Lys Met Leu Val Ala Val Lys Ala Leu			20
530	535	540	
Lys Glu Ala Ser Glu Ser Ala Arg Gln Asp Phe Gln Arg Glu Ala			
545	550	555	
Glu Leu Leu Thr Met Leu Gln His Gln His Ile Val Arg Phe Phe			
560	565	570	
Gly Val Cys Thr Glu Gly Arg Pro Leu Leu Met Val Phe Glu Tyr			
575	580	585	
Met Arg His Gly Asp Leu Asn Arg Phe Leu Arg Ser His Gly Pro			30
590	595	600	
Asp Ala Lys Leu Leu Ala Gly Gly Glu Asp Val Ala Pro Gly Pro			
605	610	615	
Leu Gly Leu Gly Gln Leu Leu Ala Val Ala Ser Gln Val Ala Ala			
620	625	630	
Gly Met Val Tyr Leu Ala Gly Leu His Phe Val His Arg Asp Leu			
635	640	645	
Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Gln Gly Leu Val Val Lys Ile			40

【数 1 1 - 1 3】

650	655	660
Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Ile Tyr Ser Thr Asp Tyr Tyr		
665	670	675
Arg Val Gly Gly Arg Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met Pro Pro		
680	685	690
Glu Ser Ile Leu Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val Trp		
695	700	705
Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln		
710	715	720
Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Thr Glu Ala Ile Asp Cys Ile Thr		
725	730	735
Gln Gly Arg Glu Leu Glu Arg Pro Arg Ala Cys Pro Pro Glu Val		
740	745	750
Tyr Ala Ile Met Arg Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro Gln Gln Arg		
755	760	765
His Ser Ile Lys Asp Val His Ala Arg Leu Gln Ala Leu Ala Gln		
770	775	780
Ala Pro Pro Val Tyr Leu Asp Val Leu Gly		
785	790	

10

20

【数 1 2】

配列番号 10 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 23 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

10

(xi) 配列 :

Thr	Gly	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Ala	Thr	His	Ala	Thr	Gly	Thr	Gly	Gly
1				5					10					15
Tyr	Thr	Asn	Ala	Ala	Arg	Ala	Cys							
			20				23							

配列番号 11 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 23 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

20

(xi) 配列 :

Thr	Gly	Gly	Ala	Thr	Gly	Cys	Ala	Arg	Tyr	Thr	Asn	Thr	Gly	Gly
1				5					10					15
Cys	Ala	Arg	Cys	Ala	Arg	Cys	Ala							
			20				23							

配列番号 12 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 21 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

30

(xi) 配列 :

Tyr	Thr	Cys	Arg	Thr	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asn	Cys	Cys	Arg	Thr	Ala
1				5					10					15
Tyr	Thr	Cys	Arg	Thr	Thr									
			20		21									

40

【数 1 3】

配列番号 1 3 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 23 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

10

(xi) 配列 :

Cys	Cys	Tyr	Thr	Cys	Tyr	Thr	Gly	Arg	Thr	Ala	Arg	Thr	Ala	Tyr
1				5					10				15	
Thr	Cys	Asn	Ala	Cys	Gly	Thr	Gly							
				20			23							

配列番号 1 4 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 22 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

20

(xi) 配列 :

CACGTCAACA ACGGCAACTA CA 22

配列番号 1 5 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 25 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

30

(xi) 配列 :

GGAAGGATGA GAAACAGATT TCTGC 25

40

【数 1 4】

配列番号 16 :

(i) 配列の特徴

- (A) 配列の長さ : 23 塩基
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

10

(xi) 配列 :

CATCAATGGC CACTTCCTCA AGG 23

配列番号 17 :

(i) 配列の特徴

- (A) 配列の長さ : 22 塩基
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

20

(xi) 配列 :

AGGTGTTTCG TCCTTCTTCT CC 22

配列番号 18 :

30

(i) 配列の特徴

- (A) 配列の長さ : 24 塩基
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 :

GAGATGTGCC CGACCGGTTG TATC 24

40

【数 1 5】

配列番号 19 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 22 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

10

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 :

CACAGTGATA GGAGGTGTGG GA 22

配列番号 20 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 20 塩基

20

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 :

TAACCACTCC CAGCCCCTGG 20

配列番号 21 :

30

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 19 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 :

GGGCAACCCG CCCACGGAA 19

40

【数 1 6】

配列番号 2 2 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 1 9 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

10

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 :

ACGCCAGGCC AAGGTTGAG 19

配列番号 2 3 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 2 0 塩基

20

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 :

TAACCACTCC CAGCCCCTGG 20

配列番号 2 4 :

30

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 2 0 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 :

TTGGTGGCCT CCAGCGGCAG 20

40

【数 1 7】

配列番号 2 5 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 2 2 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

10

(xi) 配列 :

AATTCATGAC CACCAGCCAC CA 22

配列番号 2 6 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 2 0 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

20

(xi) 配列 :

GCTCCTCGGG ACTGCGATGC 20

配列番号 2 7 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 2 4 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

30

(xi) 配列 :

ATGTCGCCCT GGCCGAGGTG GCAT 24

40

【数 1 8】

配列番号 28:

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ: 21塩基

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

10

(xi) 配列:

AAGCTCAACA GCCAGAACCT C 21

配列番号 29:

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ: 21塩基

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

20

(xi) 配列:

CAGCTCTGTG AGGATCCAGC C 21

配列番号 30:

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ: 21塩基

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

30

(xi) 配列:

CCGACCGGTT TTATCAGTGA C 21

40

【数 1 9】

配列番号 3 1 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 2 3 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

10

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 :

ATGATCTTGG ACTCCCGCAG AGG 23

配列番号 3 2 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 2 1 塩基

20

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 :

CTTGGCCAAG GCATCTCCGG T 21

配列番号 3 3 :

30

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 2 1 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 :

ATGTGCAGCA CATTAGAGG A 21

40

【数 2 0】

配列番号 3 4 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 2 4 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

10

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 :

TTATACACAG GCTTAAGCCA TCCA 24

配列番号 3 5 :

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 1 9 塩基

20

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 :

AGGAGGCATC CAGCGAATG 19

30

40

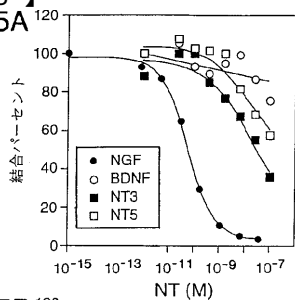
【図 5】
FIG. 5A

FIG. 5B

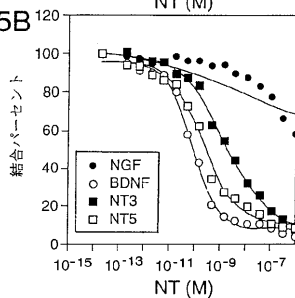
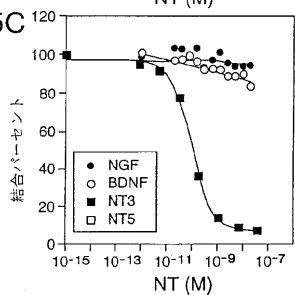


FIG. 5C



【図 7】

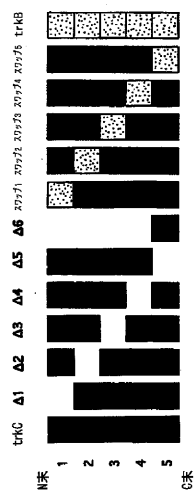


FIG. 7

【図 6】

FIG. 6A

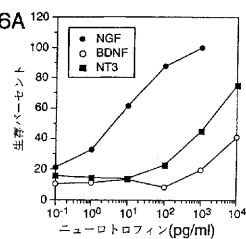


FIG. 6B

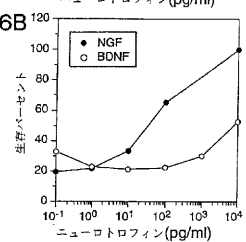
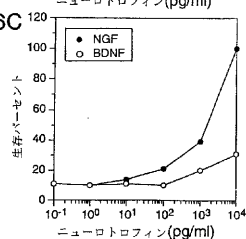
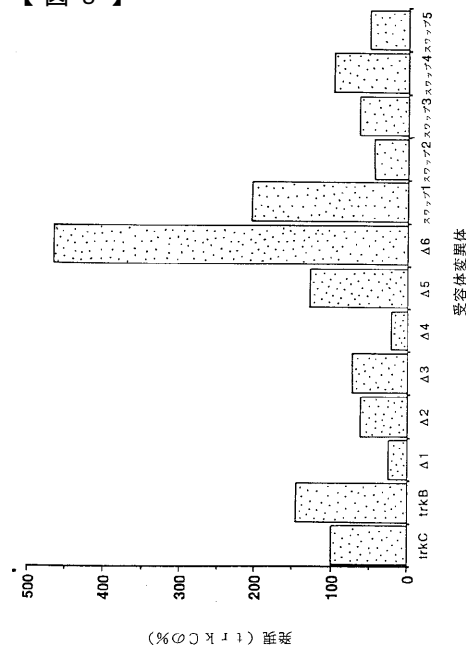


FIG. 6C



【図 8】



受容体変異体

FIG. 8

【図 9 - 1】

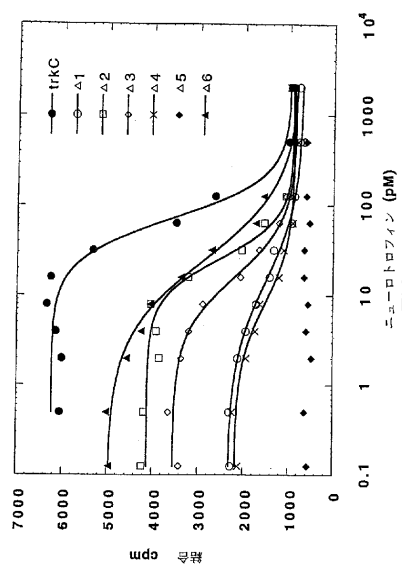


FIG. 9A

【図 9 - 2】

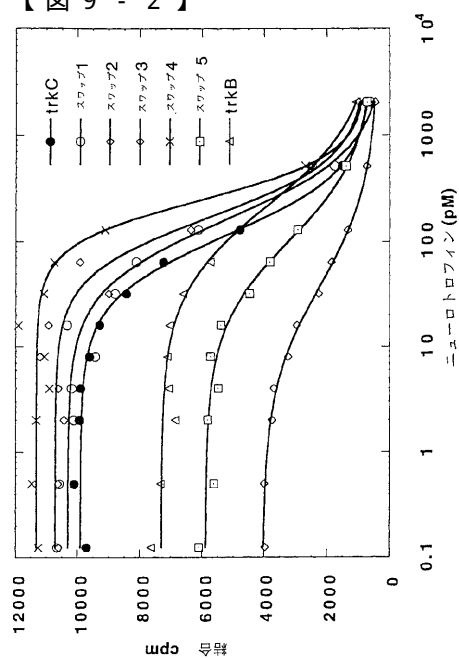


FIG. 9B

【図 9 - 3】

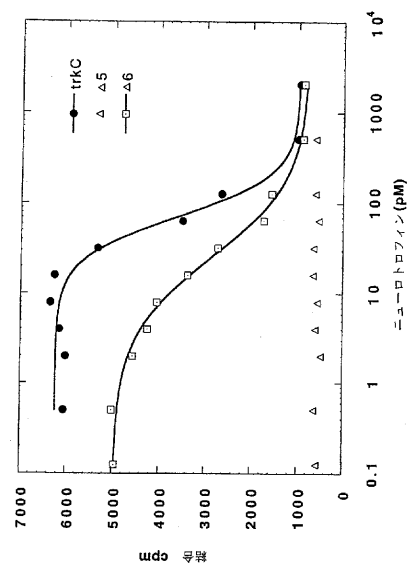


FIG. 9C

【図 10 - 1】

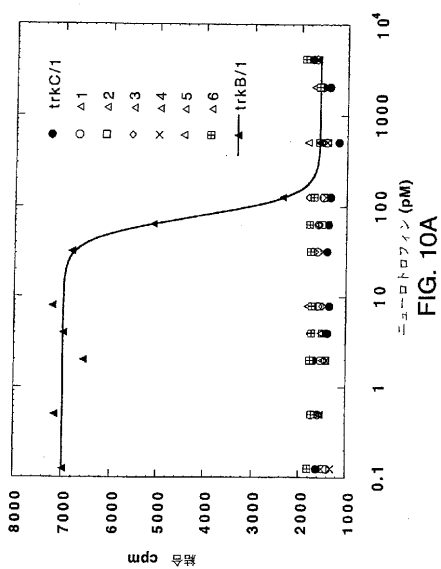


FIG. 10A

【図 1 1 - 3】

trkA	532	K	L	V	A	K	L	E	S	A	R	Q	D	F	O	R	E	A	L	L	M	L	O	H	I	V	R	F	G	V	C	I	E	Q	R	P																																										
trkB	596	K	L	V	A	K	L	E	S	A	R	Q	D	F	H	R	E	A	L	L	M	L	O	H	I	V	R	F	G	V	C	I	E	Q	R	P																																										
trkC	596	K	L	V	A	K	L	E	S	A	R	Q	D	F	H	R	E	A	L	L	M	L	O	H	I	V	R	F	G	V	C	I	E	Q	R	P																																										
																																							トランスジナーゼ																																							
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															
		L	V	F	E	Y	K	H	G	D	N	I	F	L	R	S	H	G	P	D	K	L	L	A	G	R	D	V	-	A	P	G	P	L	G	G	Q	L	L	A	V	A	S	Q	V	A	-																															

FIG. 11C

【図 1 2】

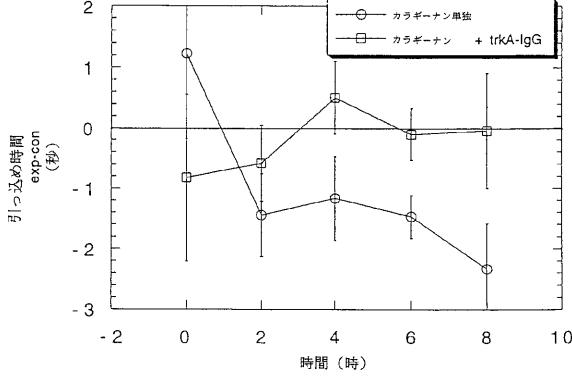


FIG. 12

【図 1 3】

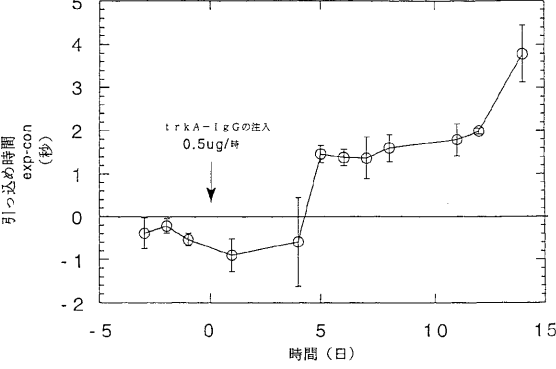


FIG. 13

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	A 6 1 P 43/00	1 0 5
	A 6 1 P 25/00	

(72)発明者 レオナルド・ジー プレスタ
 アメリカ合衆国 9 4 1 0 9 カリフォルニア州 サンフランシスコ、ゴー・ナンバー 2 0 6、1 9 0
 0 番

(72)発明者 デイビッド・エル シェルトン
 アメリカ合衆国 9 4 0 4 4 カリフォルニア州 パシフィカ、ローリー・レイン 1 8 3 番

(72)発明者 ロマン アーファー
 アメリカ合衆国 9 4 0 4 4 カリフォルニア州 パシフィカ、タルボット・アベニュー・ナンバー 3
 0 2、3 8 0 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 BA63 CA04 DA02 EA04 GA11 HA14
 4B063 QA01 QR32 QR40 QR56 QS34 QS36 QX07
 4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA01X AA57X AA90X AA91X AA92X AA93X AA93Y AB01 AB05 AC14
 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 CA25 CA28 DB59 DB70 NA14
 ZA011 ZA021 ZA081 ZA201 ZA211 ZA241 ZB211 ZB261 ZC021
 4H045 AA10 AA11 AA20 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20 EA50
 FA74

专利名称(译)	人trk受体和神经营养因子抑制剂		
公开(公告)号	JP2006166924A	公开(公告)日	2006-06-29
申请号	JP2006019882	申请日	2006-01-27
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	レオナルドジープレスタ デイビッドエルシエルトン ロマンアーファー		
发明人	レオナルド・ジー プレスト デイビッド・エル シェルトン ロマン アーファー		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/02 C07K14/71 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12Q1/68 A61K38/00 A61P25/04 A61P35/00 A61P43/00 A61P25/00 G01N33/53 A61K38/55 A61K39/395 A61P1/00 A61P9/08 A61P9/10 A61P11/00 A61P13/02 A61P15/00 A61P25/18 A61P25/28 A61P29/00 C07H21/04 C07K14/705 C07K19/00 C12N15/12 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/00 A61P1/18 A61P9/00 A61P9/08 A61P9/10 A61P11/00 A61P13/02 A61P13/12 A61P15/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/18 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/71 C07K19/00 C07K2319/00 C07K2319/30		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.C C07K14/71 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12N5/00.B C12P21/02.C C12Q1/68.A A61K37/02 A61P25/04 A61P35/00 A61P43/00.111 A61P43/00.105 A61P25/00 A61K38/00 A61K38/01 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QR32 4B063/QR40 4B063/QR56 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX07 4B064/AG01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA25 4C084/CA28 4C084/DB59 4C084/DB70 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA021 4C084/ZA081 4C084/ZA201 4C084/ZA211 4C084/ZA241 4C084/ZB211 4C084/ZB261 4C084/ZC021 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	08/215139 1994-03-18 US 08/286846 1994-08-05 US 08/359705 1994-12-20 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供对神经营养因子的生物活性有效的抑制剂。解决方案：公开了一种分离的人trkB或trkC多肽，其包含选自下组的多肽的氨基酸序列：（a）天然序列人trkB或trkC多肽，（b）具有至少95%氨基酸的多肽与天然序列人trkB或trkC多肽的序列同一性，表现出天然人trkB或trkC多肽的生物学特性，并且在人体中具有非免疫原性，和（c）（a）或（b）多肽的片段）表现出天然人trkB或trkC多肽的生物学特性，并且在人体中具有非免疫原性。Ž

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 6 3
C O 7 K 14/71 (2006.01)	C O 7 K 14/71	4 B O 6 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 107 頁) 最終頁		

(21) 出願番号	特願2006-19882 (P2006-19882)	(71) 出願人	596168317
(22) 出願日	平成18年1月27日 (2006.1.27)		ジェネンテック・インコーポレーテッ
(62) 分割の表示	特願平7-524743の分割		GENENTECH, INC.
原出願日	平成7年3月17日 (1995.3.17)		アメリカ合衆国カリフォルニア・94
(31) 優先権主張番号	08/215, 139		O-4990・サウス・サン・フラン
(32) 優先日	平成6年3月18日 (1994.3.18)		コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	08/286, 846		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成6年8月5日 (1994.8.5)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	08/359, 705	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成6年12月20日 (1994.12.20)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)		