

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 527115

(P2003 - 527115A)

(43)公表日 平成15年9月16日(2003.9.16)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/47	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/47		16/18	4 B 0 6 4
16/18		19/00	4 B 0 6 5
19/00		C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19		1/21	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 77数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 567785(P2001 - 567785)

(86) (22)出願日 平成13年3月13日(2001.3.13)

(85)翻訳文提出日 平成13年11月9日(2001.11.9)

(86)国際出願番号 PCT/US01/07868

(87)国際公開番号 W001/068695

(87)国際公開日 平成13年9月20日(2001.9.20)

(31)優先権主張番号 60/188,870

(32)優先日 平成12年3月13日(2000.3.13)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 セント ビンセント ホスpital
オーストラリア国 ブイアイシー, 3065, フ
イツロイ, ビクトリア パレード 41

(72)発明者 マーフィー, ブレンドン エフ.
オーストラリア国 ビクトリア 3101, ケ
ーイーダブリュー, コーサム ロード 1
69

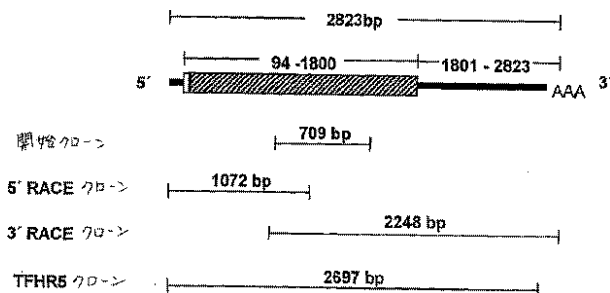
(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規のH因子関連タンパク質 5 及びその抗体

(57)【要約】

本発明は新規のヒトタンパク質、因子 - H 関連タンパク質 5 (F H R - 5)、F H R - 5 と実質的に同一なタンパク質、及びこれらのタンパク質に対する抗体に関する。新規のヒトH因子 - 関連タンパク質 (F H R - 5) が開示されている。本発明の範囲には F H R - 5 のアミノ酸配列、F H R - 5 のアミノ酸配列をコードする核酸配列及び実質的にこれらと同一のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列が含まれる。本発明のヌクレオチド配列を含むベクター、本発明のヌクレオチド配列を含むトランスジェニック宿主細胞及び F H R - 5 タンパク質と反応する抗体も本発明の範囲内である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 実質的に精製されたH因子関連タンパク質5であって、

(a) 配列番号2；

(b) 配列番号2に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列；

からなる群から選択される一次アミノ酸配列を含む、実質的に精製されたH因子関連タンパク質5。

【請求項2】 配列番号2のフラグメントを含んでなる実質的に精製されたH因子関連タンパク質5フラグメントであって、該フラグメントは補体コンポーネントC3bに結合し、活性化補体と結合した場合にはモノクローナル抗体K2.254によって識別される、実質的に精製されたH因子関連タンパク質5フラグメント。

【請求項3】 下記の群から選択される核酸配列を含む実質的に単離されたポリヌクレオチド：

(a) 配列番号2をコードする核酸配列；

(b) 配列番号2に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列；

(c) 配列番号2のフラグメントをコードする核酸配列であって、該フラグメントは補体コンポーネントC3bに結合し、活性化補体と結合した場合にはモノクローナル抗体K2.254によって識別される、核酸配列；

(d) 配列番号1またはその補体；

(e) 配列番号3またはその補体；

(f) 洗浄条件0.1X SSPE、0.1% SDS、42℃のもとで(a)の核酸配列にハイブリダイズし、そして補体コンポーネントC3bに結合し、活性化補体と結合した場合にはモノクローナル抗体K2.254によって識別されるタンパク質をコードする、核酸配列；

(g) 洗浄条件0.1X SSPE、0.1% SDS、42℃のもとで(a)の核酸配列にハイブリダイズする少なくとも20ヌクレオチドの核酸配列；

(h) 洗浄条件0.1X SSPE、0.1% SDS、42℃のもとで(b)の

核酸配列にハイブリダイズし、そして補体コンポーネントC3bに結合し、活性化補体に結合した場合にはモノクローナル抗体K2.254によって識別されるタンパク質をコードする、核酸配列；及び

(i) 洗浄条件0.1X SSPE、0.1% SDS、42 のもとで(b)の核酸配列にハイブリダイズする少なくとも20ヌクレオチドの核酸配列。

【請求項4】 請求項3のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

【請求項5】 前記ベクターがクローニングベクターである請求項4に記載の組換えベクター。

【請求項6】 前記ベクターが発現ベクターである請求項4に記載の組換えベクター。

【請求項7】 プロモーター、請求項3に記載のポリヌクレオチド、及び転写終止配列を含んでなる発現カセット。

【請求項8】 請求項4のベクターを含む宿主細胞。

【請求項9】 前記宿主細胞が細菌細胞、バクテリオファージ、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞、及び動物細胞からなる群から選択される請求項8に記載の宿主細胞。

【請求項10】 請求項7の発現カセットを含む宿主細胞。

【請求項11】 前記宿主細胞が細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞、及び動物細胞からなる群から選択される請求項10に記載の宿主細胞。

【請求項12】 請求項1のH因子関連タンパク質5に特異的に結合する抗体であって、モノクローナル抗体K2.254ではない、抗体。

【請求項13】 前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項12に記載の抗体。

【請求項14】 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項12に記載の抗体。

【請求項15】 前記抗体が組換え抗体である、請求項12に記載の抗体。

【請求項16】 前記抗体がキメラ抗体である、請求項15に記載の抗体。

【請求項17】 前記抗体がヒト化抗体である、請求項16に記載の抗体。

【請求項18】 前記抗体が免疫学的に活性な抗体フラグメントである、請

求項12に記載の抗体。

【請求項19】 H因子関連タンパク質5が活性化補体と結合した場合、前記抗体がH因子関連タンパク質5に結合する、請求項12に記載の抗体。

【請求項20】 請求項2に記載のH因子関連タンパク質5フラグメントに特異的に結合する抗体であって、モノクローナル抗体K2.254ではない抗体。

【請求項21】 前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項20に記載の抗体。

【請求項22】 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項20に記載の抗体。

【請求項23】 前記抗体が組換え抗体である、請求項20に記載の抗体。

【請求項24】 前記抗体がキメラ抗体である、請求項23に記載の抗体。

【請求項25】 前記抗体がヒト化抗体である、請求項24に記載の抗体。

【請求項26】 前記抗体が免疫学的に活性な抗体フラグメントである、請求項20に記載の抗体。

【請求項27】 前記H因子 - 関連タンパク質5フラグメントが活性化補体に結合した場合、前記抗体が該H因子 - 関連タンパク質5フラグメントに結合する、請求項12に記載の抗体。

【請求項28】 前記H因子 - 関連タンパク質5フラグメントが活性化補体と結合した場合、前記抗体が該H因子 - 関連タンパク質5フラグメントに結合する、請求項20に記載の抗体。

【請求項29】 細胞または組織を請求項12に記載の抗体と接触させる工程、および該抗体の該細胞または組織に対する結合を検出する工程を含む、C5b-9補体複合体の検出法。

【請求項30】 細胞または組織を請求項20に記載の抗体と接触させる工程、および該抗体の該細胞または組織に対する結合を検出する工程を含む、C5b-9補体複合体の検出法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(関連出願のクロス - リファレンス)

本出願は、あらゆる目的のために参考としてその全体が本明細書に援用される2000年3月13日出願の米国仮特許出願第60/188,870号の利益を主張する。

【0002】

(背景)

本発明は新規のヒトタンパク質、因子 - H関連タンパク質5 (FHR - 5)、FHR - 5と実質的に同一なタンパク質、及びこれらのタンパク質に対する抗体に関するものである。

【0003】

補体の活動が、抗体が脊椎動物を大部分の細菌感染から防御する第一の手段である。補体は、抗体 - 抗原複合体または微生物によって活性化されて一連のタンパク分解反応(その最終結果は膜攻撃複合体の集合である)を受ける血清タンパク質系からなる。これらの複合体は微生物に孔を開け、それによって微生物を破壊する。同時に、活性化過程に放出されたタンパク分解フラグメントは、血管を拡張し、食細胞を感染部位に引き付けることによって防御反応を促進する。補体は攻撃される微生物に対する食細胞の結合、消化、破壊能力も高める。

【0004】

補体は約20の相互作用するタンパク質からなる;そのうち反応性コンポーネントはC1 - C9、因子B、因子Dと呼ばれ、残りはH因子タンパク質等の種々の調節タンパク質を含む。補体コンポーネントは全て可溶性タンパク質である。それらは主として肝臓で作られ、血中及び細胞外液中を循環する。微生物の侵入によって直接的にまたは間接的に免疫反応によってトリガーされない限り、それらは大部分が不活性である。補体活性化の究極的結果は、後期の補体コンポーネント(C5、C6、C7、C8及びC9)が集合し、微生物細胞溶解を仲介する大きいタンパク質複合体(膜攻撃複合体)を形成することである。

【0005】

その主な機能は微生物細胞膜の攻撃であるから、補体の活性化は微生物細胞膜に焦点を合わせる。その細胞膜において補体は上記微生物に結合した抗体または微生物エンベロープ多糖類のいずれかによって、あるいは初期補体コンポーネントを活性化する上記両者によってトリガーされる。明らかに異なる二つの補体活性化経路に属する二組の初期コンポーネントがある：C 1、C 2 及び C 4 は抗体結合によってトリガーされる典型的経路に属し、因子 B 及び因子 D は微生物多糖によってトリガーされるもう一つの経路に属する。両経路の初期コンポーネント類は究極的には最も重要な補体コンポーネントである C 3 に作用する。初期コンポーネント類及び C 3 は、限定的タンパク質分解的切断によって逐次活性化される酵素前駆体である：その系列の各酵素前駆体が切断されると、それは活性化されてセリンプロテアーゼを発生し、それはその系列の次の酵素前駆体を切断する、等々。これら切断の多くは小さいペプチドフラグメントを遊離し、膜結合部位をより大きいフラグメントにさらす。より大きいフラグメントはその新たに露出した膜結合部位を介して標的細胞マクロファージにしっかりと結合し、その系列の次の反応の生成を助ける。このようにして補体活性化は、その活性化が始まる細胞表面にほぼ限定される。

【0006】

切断による C 3 の活性化は補体活性化系列の中心的反応であり、典型的経路と もう一つ別の経路が一点に集まるのは“ここ”なのである。両経路において、C 3 は C 3 変換酵素と呼ばれる酵素複合体によって切断される。異なる C 3 変換酵素が各経路で産生され、カスケードのより早い段階で活性化される 2 つの補体コンポーネントの自発的集合によって形成される。C 3 変換酵素の両タイプ共、C 3 を 2 つのフラグメントに切断する。これらのうちの大きい方 (C 3 b) は標的細胞膜に共有結合し、C 5 と結合する。ひとたび結合すると、上記 C 5 タンパク質は C 3 変換酵素 (今や C 5 変換酵素として作用する) によって切断され、後期コンポーネント (C 5 から C 9 まで) の自発的集合を開始し、膜攻撃複合体を形成する。活性化された各酵素は、連鎖における次にくる多くの酵素前駆体分子を切断するから、初期コンポーネントの活性化はタンパク質分解カスケードを増幅し、上記系列の開始時に活性化された各分子は多くの膜攻撃複合体を産生する。

【0007】

後期コンポーネントの集合が始まるのは、すでに標的細胞膜上のC3bにゆるく結合しているC5が、典型的またはもう一つの別の経路のどちらかのC3変換酵素によって分割されてC5a及びC5bを与えるときである。今述べたように、C5aは遊離し、炎症性反応を促進する。C5bはC3bに結合したままになり、C6に結合してC56を形成し、それからC7に結合してC567を形成する一過性能力を有する。C567複合体はその後C7を介して膜にしっかりと結合する。この複合体はC8の1分子を付加してC5678を形成し、それはその後C9の8ないし18分子に結合する。それは部分的に開き、重合して経膜チャンネルを形成する。

【0008】

上記補体カスケードの自己増幅性破壊特性にとって必要なのは、鍵となる活性化コンポーネントが生成後速やかに不活性化され、上記攻撃が近くの宿主細胞に絶対に広がらないようにすることである。不活性化は少なくとも二つの方法で実現する。第一は、血中の特異的インヒビタータンパク質が、タンパク分解性切断によって活性化された後、或る種のコンポーネントに結合するか、或る種のコンポーネントを切断することのいずれかによってそのカスケードを断ち切るという方法である。インヒビタータンパク質は例えばC1複合体の活性化コンポーネントに結合し、それらのその後の働きを阻止し、一方その他のインヒビタータンパク質はC3bを切断し、それによってそれを不活性化する。これらのインヒビターがなければ、血清C3は全て、相互に代わり得る別の経路によって形成される正のフィードバックループによって枯渇してしまうかも知れない。

【0009】

H因子(FH)(Ripocheら、Biochem. J. 249巻:593-602ページ:1988)は、染色体1q32上の主要RCA遺伝子集団から約7Mbの遺伝子によってコードされる液相RCA(補体活性化調節物質)タンパク質である(Houecadeら、Adv. Immunol.、45巻:381-416ページ、1989)。それは20の短いコンセンサス・リピート(SCR)ドメインから構成され、C3及びC5変換酵素の衰退を加速することによ

り、そして表面結合C3bの因子I仲介性切断の補因子として作用することによって、もう一つの補体活性化経路の増幅を阻止するようにはたらく。FHのSCR1-10及び16-20はC3bのための結合部位を含むと考えられており、衰退加速活性及び補因子活性はSCR1-5に局在化される(Alsenzら、Biochem. J. 224巻:389-398ページ、1984; Alsenzら、Biochem. J. 232巻:841-850ページ、1985; Gordonら、J. Immunol. 155巻:348-356ページ、1995; Kuhnら、J. Immunol. 155巻:5663-5670ページ、1995; KuhnおよびZipfel、Euro. J. Immunol. 26巻:2383-2387ページ、1996; SoamesおよびSim、Biochem. Soc. Trans. 23巻:53S、1995; SharmaおよびPangburn、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93巻:10996-11001、1996)。H因子ファミリーには、交互スプライシングによって生成するHFの比較的短い(SCR1-7)バージョンであるH因子様タンパク質1(FHL-1)(Schwaeblerら、Euro. J. Immunol.、17巻:1485-1489ページ、1987)、及びSCR4または5を含む四種類のH因子-関連タンパク質FHR-1~FHR-4(ZipfelおよびSkerka、Immunol. Today、15巻:121-126ページ、1994; Skerkaら、J. Biol. Chem. 272巻:5627-5634ページ、1997)も含まれる。これらの代わり得る形のうち、全てがC3b結合にかかわるSCRを含むとはいえ、補体調節活性を有するのはFHL-1だけである。

【0010】

糸球体免疫デポジットの新規コンポーネント類を確認するために設計された研究において、糸球体腎炎のヒト腎臓から得た糸球体基底膜試料でマウスを免疫した後、一連のモノクローナル抗体が産生された。生成した抗体の大部分は非構造的コンポーネントに向けられていたが、数種は終末補体複合体のコンポーネント類と反応した(Murphyおよびd'Apice、Pathology、20巻:130-136ページ、1988)。これらには、最初はヒト クラステリ

ン（SC5b-9補体複合体のコンポーネント）と同定された、2種類の抗体が含まれていた。糸球体免疫デポジットに対するもう一つの抗体、K2.254、の免疫組織学的反応性のパターンは正常及び糸球体腎炎のヒト組織における終末補体複合体のコンポーネント類に対する抗体のそれに似ているようにみえた。しかしこの抗体は既知の補体コンポーネントまたは精製した終末補体C5b-9複合体とは反応せず、そしてこの抗体は正常なヒト血清とは反応しない。こうしてこの抗体は、もともとは、活性化補体C5b-9複合体上の、推定的には活性化C9タンパク質上の新たに露出したエピトープに結合するか、または糸球体腎症に特異的な因子上のエピトープに結合すると考えられた。

【0011】

出願人は、抗体がこれまで知られていなかった補体結合タンパク質に結合することを発見した。部分的ペプチド配列決定ならびにcDNAクローニング及び配列決定によって導き出されたこのタンパク質の推定アミノ酸配列は、それがタンパク質のH因子-関連ファミリーのメンバーであることを示している。この分野における現在の命名法にしたがって、この新しいタンパク質をH因子-関連タンパク質5（FHR-5）と命名した。

【0012】

（概要）

本発明は新規のヒトH因子-関連タンパク質5（FHR-5）、実質的にこれと同一のタンパク質類、及びこれらのタンパク質に対する抗体に関するものである。

【0013】

一面において、本発明はアミノ酸配列がFHR-5、配列番号2に一致する実質的に精製されたタンパク質に関する。その他の実施形態において、本発明はFHR-5に実質的に同一のタンパク質類にも関する。従って、一実施形態において、このようなタンパク質は、そのタンパク質の配列を配列番号2と整列させ、マッチするアミノ酸の数を最大にするためにギャップを導入した場合に、配列中の同一のアミノ酸の数によって測定して、少なくとも90%の配列がFHR-5と同じ配列（または約495の一致するアミノ酸）であるタンパク質である。別

の実施形態においては、このようなタンパク質はFHR-5と一致する最低95%の配列（または約523の一致するアミノ酸）を有する。なお別の実施形態において、このようなタンパク質はFHR-5と一致する最低98%の配列（または約539の一致するアミノ酸）を有する。さらにまた別の実施形態では、このようなタンパク質はFHR-5に一致する最低99%の配列（または約545の一致するアミノ酸）を有する。さらなる一実施形態において、このようなタンパク質はFHR-5に一致する最低99.5%の配列（または約548の一致するアミノ酸）を有する。

【0014】

もう一つの面において、本発明は上記のタンパク質をコードする実質的に単離された核酸ポリマー類に関する。これらの核酸の一実施形態は、FHR-5の固有のcDNA配列、配列番号1、配列番号1にハイブリダイズするその補体及び配列、または高ストリンジェンシー状態下におけるその補体である。これらの核酸配列のその他の実施形態は、これもまた配列番号2をコードする同義の核酸配列である。これらの配列は配列番号3の一般配列によってあらわされる。FHR-5に実質的に同一のタンパク質をコードする核酸ポリマー類もこれらの配列の実施形態として考慮される。これらの配列は、上記で定義されるように、FHR-5に最低90%一致するタンパク質をコードするもの、並びにFHR-5に最低95%一致するタンパク質、98%一致するタンパク質、99%一致するタンパク質または99.5%一致するタンパク質をコードするものである。当業者は、遺伝暗号の再分類によって、及び配列番号1の核酸配列を誘導する種々の部位に特異的な変異誘発技術を利用することによって、このような配列を容易に考案し、作成し得る。

【0015】

別の面において、本発明はFHR-5または実質的に同一のタンパク質に対する抗体にも関する：その際上記抗体はK2.254ではない。この面の好ましい実施形態は、FHR-5のエピトープに対するK2.254以外の（非-K2.254）モノクローナル抗体である。これらは、FHR-5が活性化補体と結合する際に選択的にあらわれる。この面のその他の好ましい実施形態は、FHR-

5に対する非-K2.254抗体であって、FHR-5に結合すると、上記タンパク質が活性化補体に結合するために必要なFHR-5の機能を阻害する抗体である。この面のその他の実施形態は、FHR-5または実質的にこれと同一のタンパク質に対するヒト化モノクローナル抗体である。その他の面としては、FHR-5または実質的に同一のタンパク質に対する組換え及びキメラ抗体ならびにFHR-5または実質的にこれと同一のタンパク質に対する免疫学的に活性な抗体フラグメント（例えばFabフラグメント等）がある。

【0016】

もう一つの面において、本発明は本発明の抗体を利用する方法にも関する。FHR-5が活性化補体と結合するときに選択的にあらわれる、FHR-5のエピトープに対する非-K2.254モノクローナル抗体を免疫組織化学的診断試薬として用いて、生検組織の免疫学的デポジットを検出することができる。さらに、FHR-5に結合したときに、上記タンパク質が活性化補体と結合するのに必要なFHR-5の機能を阻害する、FHR-5に対する非-K2.254抗体を使用して、活性化補体とFHR-5との結合を阻止し得る。

【0017】

また別の面において、本発明は(a)配列番号1のポリヌクレオチド及びその補体と；(b)0.1X SSPE、0.1% SDS、42℃の洗浄条件下で(a)のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、抗体K2.254によって認識されるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；とからなる群から選択される単離されたポリヌクレオチドに関する。その他の実施形態は、0.1X SSPE、0.1% SDS、42℃の洗浄条件下で本発明のポリヌクレオチドのいずれかにハイブリダイズする少なくとも20の核酸のオリゴヌクレオチドを提供する。

【0018】

本発明のこれらの及びその他の特徴、観点、及び利点は下記の説明、添付の特許請求の範囲及び添付の図によってよりよく理解される。

【0019】

(定義)

“実質的に純粋”または“実質的に精製された”は、一般に、該物質にその他の混入タンパク質、核酸及び元の生物源に由来するその他の生物学的物質がないことを意味する。純度は標準的方法によって測定され、普通は最低約40%の純度、より一般的には最低約50%の純度、概して最低約60%の純度、より一般的には最低約70%の純度、頻繁には最低約75%の純度、より頻繁には最低約80%の純度、典型的には最低約85%の純度、より典型的には最低約90%の純度、好ましくは最低約95%の純度、より好ましくは最低約98%の純度、さらにより好ましい実施形態においては最低99%の純度である。分析は秤量で行われるか、または例えばゲル染色、分光光度法、または末端標識化(terminus labeling)等によって評価されるモルパーセントであらわされる。

【0020】

“核酸ポリマー”、“ポリヌクレオチド”及び“オリゴヌクレオチド”は交換可能に用いられ、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドどちらでも、ヌクレオチドのあらゆる長さのポリマー形態(モノマー2個以上)を指す。ヌクレオチドはホスホジエステル結合によって連結するのが普通だが、この用語はアミノエチルグリシン単位からなる中性アミド主鎖結合を含む重合性ヌクレオチドも含む。この用語は分子の一次構造だけを指す。従ってこの用語は二本鎖及び一本鎖DNA及びRNAを含む。それは公知の種類の変形、例えば標識、メチル化、“キャップ”、天然に生成する一つ以上のヌクレオチド類をアナログによって置換すること、ヌクレオチド間変形、例えば電荷をもたない結合(例えばメチルホスホネート類、ホスホトリエステル類、ホスホアミデート類、カルバメート類等)による変形、例えばタンパク質等のペンダント部分を含む変形(例えばヌクレアーゼ、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジン等を含む)、挿入物(例えばアクリジン、プソラレン等)による変形、キレート化剤(例えば金属、放射性金属、ホウ素、酸化性金属等)を含む変形、アルキレーター(alkylator)を含む変形、改変結合(例えばアルファアノマー核酸等)による変形、並びにポリヌクレオチドの未変形型も含む。ポリヌクレオチドは、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方を含む。ゲノムDNA、cDNA及びmRN

Aは典型的核酸ポリマーである。

【0021】

用語“ベクター”は関心とする核酸ポリマーを含む物理的または生化学的ビヒクルを含むものとする。このビヒクルによってこれら核酸ポリマーは宿主細胞に移入され、この移入された核酸ポリマーで細胞は形質変換される。ベクターの例には、DNAプラスミド、ウィルス、及び粒子状ガンペレット等がある。

【0022】

用語“宿主細胞”はベクター形質転換の標的細胞を意味し、移された核酸ポリマーはその細胞内で複製されおよび/または発現する。

【0023】

本明細書中で用いる“K2.254”は、特許手続き上の微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約の約定のもとでアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)10801 University Blvd.(マナッサス、バージニア 20110-2209 USA)に2000年12月13日に寄託された細胞株によって産生され、特許寄託名称PTA-2800を有するモノクローナル抗体を言う。

【0024】

(詳細な説明)

下記の詳細な説明は当業者による本発明の実施に役立つためのものである。だがこの詳細な説明は本発明を不当に制限するものではない。それは、当業者はこの発明的発見の精神または範囲から逸脱することなく本明細書に述べる実施形態の変更及び変化をなし得るからである。

【0025】

本出願に記載される全ての特許公報、特許、特許出願、データベース及びその他の参考文献は、あたかも各個々の特許公報、特許、特許出願、データベースまたはその他の参考文献が詳細にかつ個々に記載され、参考として援用されたかのように、そのまま参考として本明細書に援用される。

【0026】

新規のヒトタンパク質H因子関連タンパク質5(FHR-5)が本明細書に記

載のように単離され、特徴づけられ、組換えによって再生産された。FHR - 5は配列番号2に示す一次アミノ酸配列を有し、配列番号1に示される固有のcDNA配列によってコードされる。FHファミリーのその他のメンバーと同様に、FHR - 5は肝臓によって合成され、完全にSCRドメインからなる。それは成熟補体C5b - 9複合体と結合することが判明し、補体カスケードに或る役割を演ずると考えられている。特定の理論によって束縛されるものではないが、そのSCRの、その他のファミリーメンバーの特定のSCRとの相同性(図6)は、FHR - 5がC3b及びヘパリンに結合することを示唆する。FHR - 5は、FHR - 1及びFHR - 2(Park及びWright、J. Biol. Chem. 271巻:18054 - 18060ページ、1996)及びFHR - 4(Skerka、J. Biol. Chem. 272巻;5627 - 5634ページ、1997)で示されたように、リポタンパク質とも結合するにちがいない。同様に、その他の補体調節タンパク質(C4結合タンパク質、CD59及びクラステリン)もリポタンパク質結合を示した(Valeva、Immunology、82巻:28 - 33ページ、1994;Meri、Immunologist 2巻:149 - 155ページ、1994;Jenneら、J. Biol. Chem. 266巻:11030 - 11036ページ、1991;Jenne及びTschopp、Trends Biochem. Sci. 17巻:154 - 159ページ、1992;Funakoshiら、Biochem. Biophys. Acta 963巻;98 - 108ページ、1988)。こうしてリポタンパク質の構成成分としてのFHRタンパク質の役割が示唆され、リポタンパク質と補体系との機能的相互作用を示すことができた。

【0027】

FHR - 5は、それがインビボで終末C5b - 9複合体と結合して広く見いだされており、正常及び病的ヒト組織両方にこれらの複合体と一緒に局在しているように見えるという点で、FHファミリー中では特異である。こうしてFHR - 5タンパク質は終末C5b - 9複合体のマーカーとして有用である。一連のヒト腎生検において、K2.254は補体活性化の高感度のマーカーであるように見える。このようなC5b - 9とのインビボ結合にもかかわらず、FHR - 5とそ

他のF Hタンパク質との分子構造の類似性は、補体系とC3 / C5変換酵素との一次相互作用を示唆するものである。

【0028】

表2に列挙せるプライマー及び当業者には周知のDNA増幅法を用いて、当業者はFHR-5をコードするcDNAを、肝細胞cDNAライブラリーから容易に分離することができるかも知れない(例えばOriGene Technologies (ロックビル、MD、USA)から提供されるヒト肝Rapid-Scan™ Gene Expression Panel)。このような分離は実施例2に示される。その後成熟FHR-5タンパク質が真核生物タンパク質の産生に適した任意の組換え発現系において産生される。実施例2で用いた昆虫細胞発現系のような真核生物発現系を用いるのが好ましい。動物細胞系の利用はタンパク質の不当なグリコシル化を阻止するために賢明な方法である。

【0029】

分子生物学の技術的現状は今や十分に進歩し、比較的容易に正確に、DNA配列をごくわずか変化させることができるようになった。中程度に熟練せる実験技術者は市販の部位特異的突然変異キット(例えばPromega Corp. (マジソン、ウィスコンシン、USA)によって提供されるGene Editor™等)の一つの使用説明書にしたがってDNAヌクレオチド配列にいかなる数の変化も起こすことができる。標準的生化学的方法によってトリプレットヌクレオチドコドンを実験室に翻訳するために利用する遺伝暗号を支配する一般的規則も周知である。例えば、出願人は、配列番号2のFHR-5のアミノ酸配列をコードする、配列番号3のコンセンサス配列によって示されるDNA配列の群は、本発明の範囲内であると考えられる。コドン使用頻度のような遺伝暗号やGC%含有量のわずかな変化が若干の門(phylo)では起きるとはいえ、これらの変化を支配する規則はよく証明されており、分子遺伝学分野の熟練者の合理的技術の範囲内である。こうして出願人はアミノ酸配列配列番号2をコードするいかなるその他の核酸配列も本発明の範囲内であると考えられる。

【0030】

本明細書中に開示されるヌクレオチド配列の特殊の実施形態が配列番号1で与

えられているとはいえ、本発明の核酸配列のその他の生物学的機能的に等価の型が一般的DNA - DNA及びDNA - RNAハイブリダイゼーション技術を用いて容易に単離され得ることは当然である。このため本発明は、高ストリンジェンシー条件下で配列番号1またはその補体にハイブリダイズし、本明細書中に開示される配列番号2のタンパク質と同じかまたは類似の生物学的活性を示すタンパク質類をコードするヌクレオチド配列も含む。1つの実施形態においては、このようなヌクレオチド配列は、高ストリンジェンシー条件下で配列番号1の核酸またはその補体とハイブリダイズする。

【0031】

当業者には周知のように、ストリンジェンシーは生成したハイブリッドの T_m に関係する。核酸ハイブリッドの T_m （融点）とは、塩基の50%が塩基対となる温度である。例えば、もしもハイブリッドのパートナーの一つが約20塩基の短いオリゴヌクレオチドであるならば、二重鎖の50%は一般的には T_m では分離している鎖である。この場合、 T_m はオリゴヌクレオチドの濃度に依存し時間には依存しない平衡を反映する。これに対して、もしも両方の鎖がより長い場合は、 T_m は、それらの鎖が多分交互に代わる二重鎖及び変性領域を含む構造内に一緒に保持される状態に対応する。この場合、 T_m は時間及びポリヌクレオチド濃度には依存しない分子間平衡を反映する。

【0032】

当業者には公知のように、 T_m はポリヌクレオチドの組成（例えば二重鎖の長さ、種類、塩基組成、及び正確な塩基対合の程度）及び溶媒の組成（例えば塩濃度及びホルムアミドのような変性剤の存在等）に依存する。 T_m の計算式の一つはSambrookら（Molecular Cloning、2版、コールドスプリングハーバープレス、1989）に見いだされ、次のように示される：

$$T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) = 0.41 (\%G + C) - 0.63 (\text{ホルムアミドの}\%) - 600 / L$$

上記式中、Lは塩基対になっているハイブリッドの長さ、 Na^+ 濃度は0.01Mないし0.4Mの範囲で、G+C含有量は30%ないし75%の範囲である。

RNAを含むハイブリッドの等式は同じ文献に見いだされる。これに代わる等式がDavisら、Basic Methods in Molecular Biology、2版、Appleton及びLange、1994、6-8章に見いだされる。

【0033】

ハイブリダイゼーション法及び洗浄法は当業者には周知であり、本明細書に記載されているような分子生物学の標準的文献に見いだすことができる。概してハイブリダイゼーションは T_m より低い温度20-25℃で、高イオン強度の溶液(6X SSCまたは6X SSPE)中で行うのが普通である。高ストリンジェンシー洗浄条件は予備実験で実験的に決定することがよくあるが、通常は塩と、 T_m より低い約12-20℃の温度との組み合わせが関係する。高ストリンジェンシー洗浄条件の一例は60℃における1X SSCである。高ストリンジェンシー洗浄条件のもう一つの例は0.1X SSPE、0.1% SDS、42℃である(Meinkoth及びWahl、Anal. Biochem. 138巻: 267-284ページ、1984)。さらにより高いストリンジェンシー洗浄条件の一例は0.1X SSPE、0.1% SDS、50-65℃である。具体的条件は、5X SSPE、1-5X デンハート(Denhardt's)溶液、100-200 µg/ml 変性異種DNA、0.5% SDS、68℃において、ハイブリダイゼーションが行われる十分な時間、例えば数時間ないし一晩、最初のハイブリダイゼーションを行い、その後2X SSPE、0.1% SDS中で室温で2回洗浄し、さらに0.1X SSPE、0.1% SDS中で42℃で15分間2回洗浄し、その後ハイブリダイズ生成物を検出する。当業者にはよく認識されているように、因子類の種々の組み合わせが実質的に同等のストリンジェンシー条件に導くことがある。このような同等の条件は本発明の範囲内である。

【0034】

FHR-5に加えて、その他の実質的に一致するタンパク質が当業者によって容易に考案され、合成される。タンパク質生化学分野の理解は分子遺伝学のそれと同様に完全でないとはいえ、生化学の当業者は、合理的確実さをもって、タン

パク質の一次アミノ酸配列構造に若干の置換をおこなってもタンパク質構造または機能の明白な変化を起こさないことを予言することができる。このような保存的置換は、配列中のアミノ酸を、同様な電荷、サイズ、及びその他の特徴を有する側鎖を含む別のアミノ酸で置換することによって行われる。例えば、アミノ酸アラニン（これは小さい無極性メチル側鎖を有する）は通常、小さい無極性水素側鎖を有するアミノ酸であるグリシンに置き換えることができ、その際何ら顕著な影響はあらわれない。ポリペプチドの生物学的機能的活性を決めるのは、そのポリペプチドの相互作用し得る能力及び性質であるから、或るアミノ酸配列の置換をポリペプチド配列に加えることができ、しかも同様な特性を有するポリペプチドを得ることができる。

【0035】

このような変化を行う場合、アミノ酸のヒドロパシー指数を考えることができる。ポリペプチドに相互作用性生物学的機能を与える際のヒドロパシーアミノ酸指数の重要性は当業者には一般に理解されている（K y t e 及び D o o l i t t l e、J . M o l . B i o l . 1 5 7 巻：1 0 5 - 1 3 2 ページ、1 9 8 2）。或る種のアミノ酸が同様なヒドロパシー指数またはスコアを有するその他のアミノ酸に代わり得ること、そして同様な生物学的活性を有するポリペプチドを生成し得ることは知られている。各アミノ酸にはその疎水性及び電荷特性に基づいてヒドロパシー指数が割り当てられている。これらの指数は：イソロイシン（+ 4 . 5）；バリン（+ 4 . 2）；ロイシン（+ 3 . 8）；フェニルアラニン（+ 2 . 8）；システイン/シスチン（+ 2 . 5）；メチオニン（+ 1 . 9）；アラニン（+ 1 . 8）；グリシン（- 0 . 4）；スレオニン（- 0 . 7）；セリン（- 0 . 8）；トリプトファン（- 0 . 9）；チロシン（- 1 . 3）；プロリン（- 1 . 6）；ヒスチジン（- 3 . 2）；グルタメート（- 3 . 5）；グルタミン（- 3 . 5）；アスパルテート（- 3 . 5）；アスパラギン（- 3 . 5）；リジン（- 3 . 9）；アルギニン（- 4 . 5）である。

【0036】

アミノ酸の相対的ヒドロパシー特性が、生成するポリペプチドの二次構造を決め、それはそれでポリペプチドとその他の分子、例えば酵素、基質、受容体、抗

体、抗原等との相互作用を決める考えられている。アミノ酸は同様なヒドロパシー指数を有するその他のアミノ酸によって置換され、それでも機能的に同様のポリペプチドを得ることができることは当業者には公知である。このような変化の場合、ヒドロパシー指数が ± 2 の範囲内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 の範囲内にあるアミノ酸の置換が特に好ましく、 ± 0.5 の範囲内のそれらがさらに一層好ましい。

【0037】

類似アミノ酸の置換は親水性に基づいても行うことができる。特に、それによって作成された生物学的機能的等価のポリペプチドまたはペプチドが免疫学的実施形態に使用するためのものである場合にはこれが言える。参考として本明細書に組み込まれる米国特許第4,554,101号は、隣接アミノ酸の親水性によって支配されるポリペプチドの最大局部的平均親水性は、その免疫原性及び抗原性と、すなわちそのポリペプチドの生物学的特性と相関関係にあると述べている。

【0038】

米国特許第4,554,101号に詳述されているように、下記の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン(+3.0)；リジン(+3.0)；アスパルテート(+3.0 \pm 1)；グルタメート(+3.0 \pm 1)；セリン(+0.3)；アルギニン(+0.2)；グルタミン(+0.2)；グリシン(0)；プロリン(-0.5 \pm 1)；スレオニン(-0.4)；アラニン(-0.5)；ヒスチジン(-0.5)；システイン(-1.0)；メチオニン(-1.3)；バリン(-1.5)；ロイシン(-1.8)；イソロイシン(-1.8)；チロシン(-2.3)；フェニルアラニン(-2.5)；トリプトファン(-3.4)。或るアミノ酸が同様な親水性値を有する別のアミノ酸に置換され、なお生物学的に等価の、特に免疫学的に等価のポリペプチドを得ることができることは理解される。このような変化の場合、親水性値が ± 2 の範囲内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 の範囲内であるものが特に好ましく、 ± 0.5 の範囲内であるものがさらにより一層好ましい。

【0039】

上に概略したように、保存的アミノ酸置換は概してアミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えばそれらの疎水性、親水性、電荷、サイズ等の類似性に基づく。前記の種々の特徴を考慮する具体的置換は当業者にはよく知られており、次のものが含まれる：アルギニンとリジン；グルタメートとアスパルテート；セリンとスレオニン；グルタミンとアスパラギン；及びバリン、ロイシンとイソロイシン（下表1を参照されたい）。このため本発明はFHR-5と実質的に同一であるFHR-5の機能的または生物学的等価物を考慮する。これらの等価のタンパク質類は活性化補体と結合することができ、上記タンパク質の配列を配列番号2と整列させ、アミノ酸の最多数がマッチするようにギャップを導入した際の、配列中の一致するアミノ酸の数によって測定して、FHR-5に一致する配列が少なくとも90%（または約495のマッチするアミノ酸）はあるものである。より好ましくはこのようなタンパク質が、FHR-5と一致する配列を少なくとも95%有し（または約523のマッチするアミノ酸）、より好ましくはこのようなタンパク質がFHR-5と一致する配列を少なくとも98%有し（または約539のマッチするアミノ酸）、より好ましくはこのようなタンパク質がFHR-5と一致する配列を少なくとも99%有し（または約545のマッチするアミノ酸）、最も好ましくはこのようなタンパク質がFHR-5と一致する配列を少なくとも99.5%（または約548のマッチするアミノ酸）を有する。これらの等価のタンパク質は配列番号1に示される固有のcDNA配列から、上述の種々の部位特異的変異誘発法によって作成される。

【0040】

当業者にはよく理解されているように、“同一性（一致）（identity）”は配列の比較によって決まる2種類以上のポリペプチド配列間または2種類以上のポリヌクレオチド配列間の関係である。この分野では、“同一性（一致）”はこのような配列のストリング（紐、string）間の一致によって決まるポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列間の配列関連程度も意味する。“同一性（一致）”は次のような公知の方法によって容易に計算できる（だがこれらに方法に制限するものではない）：Computational Molecular Biology、Lesk, A.M. 編、オックスフォード大学プレス、

ニューヨーク(1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 編、アカデミックプレス、ニューヨーク、1993; Computer Analysis of Sequence Data、第I部、Griffin, A.M. 及び Griffin, H.G. 編、ヒューマナプレス、ニュージャージー(1994); Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heinje, G.、アカデミックプレス(1987); Sequence Analysis Primer、Gribskov, M. 及び Devereux, J. 編、ストックトンプレス、ニューヨーク(1991); ならびに Carillo, H. 及び Lipman, D.、SIAM J Applied Math, 48巻: 1073ページ(1988)。同一性を決める方法は被検配列間の最大の一致を生み出すようにデザインすることである。さらに、同一性を測定する方法は人々が利用できるプログラムに体系化される。2配列間の同一性を決めるために用いるコンピュータープログラムには非制限的に次のものがある: “GCG”(Devereuxら、Nucleic Acid Research、12巻(1号): 387ページ(1984); “5BLASTプログラムからなる一組”、このうち3プログラム(BLASTN、BLASTX、及びTBLASTX)はヌクレオチド配列の問合わせ(query)に関して設計され、2プログラム(BLASTP及びTBLASTN)はタンパク質配列の問合わせに関して設計されたものである(Coulson、Trends in Biotechnology、12巻: 76-80ページ(1994); Birrenら、Genome Analysis、1巻: 543-559ページ(1997))。BLASTXプログラムはNational Center for Biotechnology Information(NCBI)及びその他のソース(BLASTマニュアル、Altschul, S.ら、NCBI NLM NIH、ベセスダ、MD 20894; Altschul, S.ら、J. Mol. Biol. 215巻: 403-410ページ(1990))から一般の人々に提供される。よく知られているスミス ウォターマン(Smith Waterman)アルゴリズムも同一性の測定のために用いることが

できる。

【0041】

【表1】

表 1

もとの残基	代表的な置換
Ala	Gly; Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg
Met	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

本発明はFHR-5タンパク質のフラグメント、アナログ及び誘導体にも関係する。本明細書中で用いる用語“フラグメント”、“誘導体”及び“アナログ”はC3bに結合するポリペプチドであって、活性化補体と結合した際にはモノクローナル抗体K2.254によって識別されるポリペプチドを意味する。例えばアナログには切断されて活性成熟タンパク質を生成するプロタンパクが含まれる。

【0042】

実施例2におけるFHR-5の単離の際のK2.254の使用によって示されるように、FHR-5は少なくとも一つの抗原性エピトープを含み、そのエピトープはFHR-5が活性化補体と結合した場合にあらわれ、FHR-5が正常ヒト血清中に存在する場合にはあらわれない。こうしてFHR-5は補体活性化のマーカーとして役立つ。FHR-5とリポタンパク質との結合が、正常なヒト血

清中でK2・254がFHR-5を検出できないことを説明するかも知れない。もしもFHR-5がリポタンパク質複合体に組み込まれると、K2・254 Mab結合部位は隠蔽されるかも知れない。このタンパク質が多分補体の活性化によって、その他のタンパク質から解離すると、上記エピトープは多分露出する。FHR-5が正常ヒト血清においてK2・254 Mabで検出できなかったため、ポリ-ヒスチジンタグを組換えFHR-5に組み入れて分泌されたタンパク質の検出を確実なものにした。興味深いことに、細胞培養上澄液をウェスタンブロット法によって分析したとき、K2・254 Mabも抗ヒスチジン抗体も約67 kDaの生成物を検出した。特定の理論によって束縛されるものではないが、これらのデータは、FHR-5が正常ヒト血清中では培養培地には存在しないその他の分子に結合し得るという意見を裏づける。こうして、K2・254によって識別されるエピトープは正常ヒト血清中では露出しないとはいえ、FHR-5が溶液中で実質的に単離された場合には露出する。このため、実質的に単離されたFHR-5、または同じエピトープを有する実質的に同一のタンパク質を使用して、活性化補体の同定のために有用で、正常ヒト血清とは交差反応しない抗体を生成することができる。

【0043】

当業者に公知の標準法を用いて、FHR-5または実質的に同一のタンパク質に対する抗体類を生成し得る。上記抗体類はポリクローナル、モノクローナル、組換え、キメラ、一本鎖および/または二特異性(bispecific)等である。本発明は免疫学的に活性な抗体フラグメント、例えばFab及びFab'フラグメント等も含む。当該分野で公知の種々の方法を用いて本発明のポリペプチド類のエピトープを識別するポリクローナル抗体を産生できる。抗体産生のためには種々の宿主動物、例えばウサギ、マウス、ラット、にわとり等(これらに制限するものではない)をポリペプチド、またはそのフラグメントまたは誘導体の注入によって免疫することができる。宿主種に応じた種々のアジュバントを用いて免疫反応を増強してもよい。これらアジュバントには、非制限的に、フロインドアジュバント、水酸化アルミニウム(alum)等のミネラルゲル類、リゾレシチン等の表面活性剤、プルロニックポリオール類、ポリアニオン類、ペプチ

ド類、オイルエマルション類、キーホール・リンペット・ヘモシアニン類、ジニトロフェノール、及びBCG(ワクチン)及びコリネバクテリウム パルヴム(Corynebacterium parvum)等の潜在的に有用なヒトアジュバント類がある。

【0044】

FHR-5または実質的にこれと同一のタンパク質に向けられるモノクローナル抗体の調製のためには、連続培養細胞株によって抗体分子を産生するいかなる技術も使用できる。例えばNature 256巻:495-497ページ(1975)に記載されている、最初はKohler及びMilsteinによって開発されたハイブリドーマ法、トリオーマ法、Kozborら(Immunol. Today、4巻:72ページ(1983))によって記載されたヒトB-細胞ハイブリドーマ法、及びColeら(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、77-96ページ(1985))によって報告された、モノクローナル抗体を産生するためのEBV-ハイブリドーマ法は、全て、本発明によるモノクローナル抗体の調製に役立つ。その他の方法はMonoclonal Antibodies: A Manual of Techniques(Heddy Zola(1987))に述べられている。

【0045】

さらに、FHR-5に対する“ヒト化”抗体及び実質的にこれと同一のタンパク質が当業者に公知の方法を用いて産生できる。このプロセスにより、FHR-5のエピトープを識別する非-ヒト種の抗体は、キメラまたは分子遺伝学的技術によってキメラ性の部分的ヒト抗体に転換される。ヒト化プロセスは米国特許第5,861,155号に徹底的に議論されている。これは参考として本明細書に組み込まれる。

【0046】

或いは、組換え抗体はファージ・ディスプレイ法によって産生できる。ファージディスプレイを用いる抗体の産生及び選択のための方法は当業者にはよく知られており、例えばVaughanらのNature Biotech. 16巻:

535 - 539ページ、1998 ; Watkins及びOuwelandのVox Sanguinis 78巻:72 - 79ページ、2000 ; 及びそこに記載の参考文献に見いだされる。

【0047】

ファージディスプレイによる抗体産生は、免疫グロブリンの可変H鎖(VH)及び可変L鎖(VL)配列の組み合わせライブラリーの産生を含む。これらの配列はコート(coat)タンパク質をコードするファージ遺伝子に挿入され、VH及びVL配列は繊維状バクテリオファージのコート上に発現(提示)する。関心とするVH及びVL領域を発現するファージは一般にはパンニング法と呼ばれるアフィニティー選択法によって選別される。

【0048】

VH及びVL配列は、B-細胞を分泌する抗体からmRNAを単離し、免疫グロブリン遺伝子の保存領域に対するプライマーを用いるRT-PCRによって上記mRNAを増幅するという方法で作製される。mRNAは動物、好ましくは関心とする抗原で免疫された動物から、または関心とする抗原に対する抗体を産生するハイブリドーマ細胞から直接得られるB-細胞から得ることができる。得られたならば、そのVH及びVL cDNAをVH及びVL配列の同一ベクターへの逐次クローニングによって(Huseら、Science、246巻:1275 - 1281ページ、1989)、バクテリオファージPIのloxCre部位特異的組換え系を用いる組み合わせ感染によって(Waterhouseら、Nucleic Acids Res.、21巻:2265 - 2266ページ、1993)、またはPCRアセンブリーによって(Cracksonら、Nature、352巻:624 - 628ページ、1991; Marksら、J. Molec. Biol.、222巻:581 - 597ページ、1991)組み換えられる。或いは、例えばGriffithsら(EMBO J.、13巻:3245 - 3260ページ、1994)が記載したように、可変部配列の合成レパートリーを用いることができる。

【0049】

ひとたびファージディスプレイライブラリーを構成したならば、反応性抗体を

表現するファージをパンニングによって選択する。一般的には精製抗原をプラスチック表面またはアフィニティークロマトグラフィーカラムのような固体基質に付着させる。上記抗原は上記表面に直接、またはストレプトアビジン/ビオチン系等の中間体を介して結合させることができる。選択すべきファージを抗原と共にインキュベートし、結合しないファージは洗い流す。選択の一ラウンドで特異的ファージが20ないし1000倍豊富になる。一般的には数ラウンドの選択が行われ、特異性及び親和性を高める。ひとたび所望特性の抗体を表現するファージが確認されたなら、それらを適切な細菌宿主中で増やし、上記抗体をコードするDNAを単離し、そのDNAの配列決定を行う。その抗原配列をその後適切な宿主細胞に挿入して発現させることができる。原核細胞、低級真核細胞及び真核細胞からの抗体を大規模生産する方法は当業者には周知であり、例えばFrenkenら(Res. Immunol. 149巻:589-599ページ、1998)及びそこに記載の参考文献に見いだされる。

【0050】

これらに代わって、上記のヒト化抗体を含むキメラ抗体を用いることができる。キメラ抗体とは、免疫グロブリン分子の異なる領域が異なるソースに由来する抗体である。一般的にはキメラ抗体はマウス可変部と、ヒト由来の定常部とを含む。キメラ抗体の産生は当業者には日常的となり、抗体-抗原相互作用の深い構造知識を何ら必要としない(Watkins及びOwehand、Vox Sanguinis、78巻:72-79ページ、2000)。キメラ抗体のもう一つの形は、“CDRグラフティング”として知られる方法によって産生できる(Jonesら、Nature、321巻:522-525ページ、1986)。CDRは免疫グロブリンのひだとして知られる構造の逆平行β-プリーツシート間の頂点のループである。上記β-プリーツシートは抗原との相互作用のためにCDRを正しく方向づけるためのフレームワークを形成する。CDRグラフティングにおいて、特異抗体のマウスCDRを適したβ-プリーツシートのフレームワークに移植する。

【0051】

さらに、抗体類をトランスジェニック動物、特にトランスジェニックマウスか

ら得ることができる (Bruggemann及びTauszig、Curr. Opin. Biotechnol.、8巻:455-458ページ、1997)。この方法で、内因性マウス免疫グロブリン遺伝子を不活性化し、ヒトからの再配列していない免疫グロブリン配列で置換する。こうして上記の方法を用いてトランスジェニックマウスからモノクローナル抗体が産生される。

【0052】

ひとたびFHR-5または実質的にこれと同一のタンパク質に対する抗体が作られたならば、二、三の所望活性についてそれらをスクリーニングし得る。本発明の抗体類の一つの好ましい活性は、活性化補体を選択的に識別する能力である。FHR-5または実質的にこれと同一のタンパク質に対する抗体類をこの活性に関してスクリーニングするには、先ず最初に、実施例2.3のモルモット赤血球に生成したような活性化補体とそれらとの反応性を試験する。上記スクリーニングは実施例2.4に記載のように例えばELISAまたはウェスタンブロット法によって実施できる。その後活性化補体と反応するモノクローナル抗体類について、その他の補体タンパク質(C3、C5、C6、C7、C8、C9)及び正常ヒト血清との交差反応性を実施例1.6に記載したようにウェスタンブロットまたはELISAによってスクリーニングする。その他の補体コンポーネントまたは正常ヒト血清と交差反応しない抗体類を放射性核種、発蛍光団または蛍光色素、酵素、ビタミン、ステロイドまたはその他の検出可能部分に結合し、種々の生検組織、またはその他の生物学的分離物中の活性化補体を確認するために用いることができる。このような確認のためにこれらの抗体を使用する、ELISA及び蛍光顕微鏡法等を含む数種の免疫組織化学的方法は当業者には公知である。このような方法に関するより詳細な説明はAlan Johnston及びRobin Thorpe編“Immunocytochemistry in Practice”、1996、及びMargaret M. Manson編“Immunocytochemical Protocols”、1992に見いだされる。

【0053】

本発明の抗体類のその他の好ましい活性は、FHR-5が活性化補体と結合するために必要なFHR-5の生化学的機能を阻止する能力である。抗体類はかな

り大きいかさばった分子であるから、それらが、生物分子の正しい生物学的機能のために必要な生物分子ドメインの近くのエピトープに結合する際、その生物分子の正常機能を立体的に妨げる傾向があることは当該分野において周知である。例えばタンパク質に結合したときにそのタンパク質が活性化補体と結合するために必要な生化学的機能を阻害する、FHR-5または実質的にこれと同一のタンパク質に対する抗体類を産生することができる。この特殊の活性を有する抗体FHR-5または実質的にこれと同一なタンパク質は、活性化補体とFHR-5との結合の阻害をスクリーニングすることによって確認できる。スクリーニングプロセスの第一段階はELISAまたはその他のイムノアッセイ技術によって、より好ましくは上記のように産生したポリクローナル抗体を用いることによって、正常ヒト血清中のFHR-5濃度を測定することである。正常ヒト血清試薬ロット中のFHR-5濃度を測定した後、候補となる抗体の化学量論的に意味のある量をそのロットの一つの血清サンプルに加える。抗体を含まない別の血清サンプルを対照として用いる。実施例2.3に記載される方法により、両血清サンプルを用いて補体溶解 (complement-lysed) モルモット赤血球を生成する。その後溶解赤血球をK2.254をプローブとして実施例2.4に示すようにウェスタンブロット法によって分析することができる。候補サンプルが生成したモルモット赤血球のK2.254との反応性を対照と比較した際にみられる減少は、より少ないFHR-5が活性化補体と結合したこと、及びその抗体が所望活性を有することを示唆する。

【0054】

本発明は、本発明の実質的に精製された配列とその他の諸配列とを含んでなる組換えポリヌクレオチドも含む。このような組換えポリヌクレオチドは一般にクローニングベクターまたは発現ベクターとして使用される。ただしそれ以外の用途も可能である。組換えポリヌクレオチドは、異なる生物のポリヌクレオチド配列が一緒になって単一単位を形成しているものである。クローニングベクターはDNAセグメントを宿主細胞に移すために役立つ自己複製DNA分子である。クローニングベクターの最も一般的な三つのタイプは、細菌プラスミド、ファージ、及びその他のウィルス類である。発現ベクターは特定部位に挿入されたコード

配列が転写され、タンパク質に翻訳されるように設計されたクローニングベクターである。

【0055】

クローニングベクター及び発現ベクターは両方とも、一つ以上の適切な宿主細胞内でそれらベクターを複製させるヌクレオチド配列を含む。クローニングベクターにおいて、この配列は概して、宿主細胞の染色体には無関係にそのベクターを複製させる配列であり、複製開始点(ori領域)かまたは自己複製配列も含む。種々の細菌及びウイルス複製開始点は当業者には周知であり、非制限的に、pBR322プラスミドオリジン、2 μ プラスミドオリジン、及びSV40、ポリオマ、アデノウイルス、VSV及びBPVウイルスオリジンがある。

【0056】

本発明のポリヌクレオチド配列を用いて、これらの配列を含む組換え発現ベクターの使用により、タンパク質を生産することができる。適切な発現ベクターには染色体、非染色体及び合成DNA配列、例えばSV40誘導體等；細菌プラスミド；ファージDNA；バキュロウイルス；酵母プラスミド；プラスミド及びファージDNAの組み合わせから誘導されるベクター類；及びワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、シュードラビー(pseudorabies)のようなウイルスDNAがある。さらに、宿主中で複製でき、生育可能であれば、いかなる他のベクターも使用できる。

【0057】

関心とするヌクレオチド配列は種々の方法によってベクター内に挿入できる。最も一般的な方法において、上記配列を適切な制限エンドヌクレアーゼ部位(1または複数部位)に挿入する。その際当業者には一般的に知られており、例えば Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、2版、コールドスプリング・ハーバー・プレス(1989)及びAusubelら、Short Protocols in Molecular Biology、2版、ジョンウィリー&ソズ(1992)に詳述されている方法が用いられる。

【0058】

発現ベクターにおいて、関心とする配列を宿主細胞によって識別される適切な発現コントロール配列またはプロモーターに操作可能に結合させ、mRNA合成に向ける。プロモーターは、そのコントロール下で核酸配列の転写及び翻訳を調節する構造遺伝子の開始コドンから上流約100ないし1000塩基対(bp)に位置する翻訳されない配列である。プロモーターは概ね誘導性かまたは構成性として分類される。誘導性プロモーターはそのコントロール下で何らかの環境変化、例えば栄養のあるなしまたは温度変化等に反応してDNAからの転写レベルの上昇を開始するプロモーターである。これに対し、構成プロモーターは転写レベルを比較的一定に維持する。さらに、有用なプロモーター類は適切な細胞特異性及び時間特異性も与えることができる。このようなプロモーターには発育的に調節されるプロモーター類、または細胞小器官特異的、組織特異的、または細胞特異的なプロモーター類が含まれる。

【0059】

核酸配列は、その他の核酸配列と機能的関係に置かれたときは操作可能に結合する。例えばプレシーケンス(presequence)や分泌リーダー(leader)のためのDNAは、それがポリペプチドの分泌に関与するプレプロテインとして発現される場合、ポリペプチドのためのDNAに操作可能に結合する；プロモーターは、コード配列の転写に影響を与える場合は、そのコード配列に操作可能に結合する；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置かれると、コード配列に操作可能に結合する。概して、操作可能に結合する配列は隣接しており、分泌リーダーの場合は隣接して、リーディング相(reading phase)にある。制限酵素部位の結紮によって連結が行われる。もしも適切な制限部位が与えられないならば、当業者に公知のように、合成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ことができる。Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、2版、コールドスプリング・ハーバー・プレス(1989)及びAusubelら、Short Protocols in Molecular Biology、2版、ジョンウィリー&ソズ(1992)。

【0060】

発現ベクターに用いられる一般的プロモーター類には、非制限的に、LTRまたはSV40プロモーター、大腸菌(E. coli) lacまたはtrpプロモーター、及びファージラムダPLプロモーターがある。原核または真核細胞の遺伝子の発現をコントロールすることが知られているその他のプロモーターを用いることができ、これらは当業者には公知である。発現ベクターは翻訳開始のためのリボソーム結合部位、及び転写ターミネーターも含むことができる。ベクターは遺伝子発現の増幅のために役立つ配列も含むことができる。

【0061】

発現ベクター及びクローニングベクターは選択遺伝子または選択マーカを含むことができ、これらを含むのが普通である。一般的にはこの遺伝子は、上記ベクターで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。適切なマーカの例としては、ジヒドロフォレート還元酵素(DHFR)、または真核細胞のためにはネオマイシン耐性、大腸菌のためにはテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性がある。

【0062】

それに加えて発現ベクターは、マーカとして使用する付加的タンパク質をコードする、タンパク質のためのヌクレオチド配列に、操作可能に結合するマーカ配列も含むことができる。その結果は二つの結合した異なるタンパク質を含むハイブリッドまたは融合タンパク質である。マーカタンパク質は例えば発現ベクターによって生産される組換えタンパク質のための免疫学的または酵素マーカを提供できる。アフィニティークロマトグラフィーによって生成するタンパク質の精製のために有用なアミノ酸配列をコードする配列をポリヌクレオチド末端に付加することによってポリヌクレオチド末端を変化させることができる。このようなアフィニティー精製部分をタンパク質に付加するための種々の方法が考案された。代表的例は米国特許第4,703,004号、同第4,782,137号、同第4,845,341号、同第5,935,824号及び同第5,594,115号に見いだすことができる。精製部分をコードするヌクレオチド配列の付加のための当業者に公知のいかなる方法も用いることができる。これらの方法は例えばInnisら、PCR Protocols、アカデミック・プレス(

1990)及びSambrookら、Molecular Cloning、2版、コールドスプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(1989)に含まれる。

【0063】

より詳細に述べれば、本発明は本発明の分離されたポリヌクレオチド配列を含んでなる組換え構成物を含む。上記構成物としては、本発明の配列が順方向(forward orientation)または逆方向(reverse orientation)に挿入されたプラスミドまたはウィルスベクター等のベクターがある。上記組換え構成物は、例えば上記配列に操作可能に結合したプロモーター等の調節配列をさらに含む。適切なベクター及びプロモーターの多数が当業者には公知であり、商業的に販売されている。

【0064】

本発明のポリヌクレオチド配列は、5'から3'の方向に操作可能に結合した少なくともプロモーター、本発明のポリヌクレオチド、及び宿主細胞内で機能する転写終止シグナル配列を含む発現カセットの一部でもある。プロモーターは本明細書中に述べるタイプのいずれでもよい；例えば組織特異的プロモーター、発達の調節プロモーター、細胞小器官特異的プロモーター等である。発現カセットは操作可能に結合するターゲティング配列、産生したタンパク質の輸送を指向できる輸送ペプチドまたは分泌ペプチドコード領域をさらに含むことができる。発現カセットはさらに、選択性マーカーをコードするヌクレオチド配列、及び精製部分も含むことができる。

【0065】

本発明のその他の実施形態は本発明のポリヌクレオチド配列を含んでなる構成物を含む形質転換宿主細胞に関係する。上記宿主細胞は哺乳動物細胞等のより高次の真核細胞、または昆虫細胞または酵母細胞のようなより低次の真核細胞でもよく、または宿主は細菌細菌のような原核細胞でもよい。構成物の宿主細胞への導入は、燐酸カルシウム トランスフェクション、DEAE-デキストラン仲介性トランスフェクション、ポリブレン仲介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、リポソーム仲介性トランスフェクション、核への直接微量注入法、微

粒子銃（遺伝子銃）デバイス、スクレイプローディング、及びエレクトロポレーション等、種々の方法によって達成される。

【0066】

（実施例）

下記の実施例は本発明の出願の説明となるものである。下記の実施例は本発明の範囲を完全に明確にするものではなく、制限するものでもない。

【0067】

（実施例1）

（モノクローナル抗体K2.254の産生）

（1.1 ヒト糸球体の分離及び調製）

K2.254モノクローナル抗体の産生は既に記載されている（Murphy及びd'Apice "Pathology" 20巻：130-136ページ、1988）。末期腎不全以外の原因で死亡した糸球体腎炎患者2名から死後の腎臓を得た。腎皮質の部分をその後の免疫組織学的研究のためにパラホルムアルデヒド-リジン過ヨウ素酸塩（PLP）もしくは水銀ホルマリンに固定し、または新鮮なまま凍結し、皮質の残りをその後のマウス免疫のために凍結した。新鮮組織の凍結切片4µmをヒトIgG、IgM、IgA及びC3に対する蛍光標識抗体で染色し、免疫蛍光顕微鏡で検査した。さらに水銀ホルマリン固定組織の切片を光顕微鏡検査のために処理した。

【0068】

各々の死後腎臓からの糸球体基底膜（GBM）をさいの目に切り、250µm篩を加圧濾過して通し、冷0.1M燐酸緩衝化生理食塩水（PBS）で180µm篩を通しながら洗い、106µm篩上に糸球体を集めた。糸球体懸濁液を位相差顕微鏡によって検査し、細管フラグメントの混入が20%より大きい場合には再び篩を通した。糸球体をPBSで4で2回洗い、PBSに12,500/ml濃度で再懸濁した。

【0069】

糸球体懸濁液の半分をそれからブランソン超音波装置でマイクロチップ及び出力6を用いて超音波処理した。糸球体の90%以上の破壊には3回、20秒間の

バースト（各バースト間に氷水で1分間冷却）で十分であることが判明した。この方法がGBMの諸成分を損傷し、予想通りGBMに付着した免疫デポジットの諸成分を剥離したり破壊し得ることが判明したため、最小の超音波処理が必要であると考えられた。超音波処理後、その懸濁液を1,500gで遠心分離し、PBSで2回洗った。

【0070】

（1.2 マウスの免疫）

系球体懸濁液をほぼ同容量のフロイド完全アジュバントと共に乳化し、齢5ないし6週のBalb Cマウスに上記乳濁液を0.8ml（約5,000系球体）づつ皮内注射した。GBM懸濁液も同様に等量のフロイド完全アジュバントと共に（懸濁液0.8mlが5,000系球体の等価量を含むようにした）乳化し、その他のマウスに皮内注射した。21日後、不完全アジュバントを使用した同じ乳濁液を用いて注射を繰り返した。各マウスはどちらの場合も同じ腎臓から採取した腎組織の注射を受けた。さらに14日後、全てのマウスはPBS中適切なGBM製剤の腹腔内注射（約3,000系球体の等価量を含む）を受けた。

【0071】

（1.3 免疫マウスの抗HSA抗体の測定）

腹腔内注射（融合3日前）の前に全てのマウスにおいて目から血を取った。マウス血清の逡減希釈物を1%アガロース中のcarionin及び固有ヒト血清アルブミン（HSA）に対する放射免疫拡散によって試験した。実施例1.6に記載のように酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）によってマウス血清の抗-HSA抗体の定量的推定も行った。

【0072】

（1.4 融合）

融合技術はOi及びHerzenbergの方法（Selected Methods in Cellular Immunology、Mishell及びShiigi編、Freeman、351-372ページ、1980）から採用した。GBMの腹腔内注射の3日後にポリエチレングリコールの50%（w/

v) 溶液の存在のもとでマウス脾臓と 10^7 SP2/0 骨髓腫細胞とを融合させた。融合混合物をHAT培地(グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン、ピルビン酸Na、HEPES緩衝液を含むRPMI、及びヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを付加した15%ウシ胎児血清)に再懸濁し、あらかじめマウス胸腺フィーダー細胞を植え付けた3枚の96ウェル-マイクロタイタートレー上にプレーティングした。各ウェルからの上澄液をサンプルとして取り、マウス免疫グロブリンの存在をELISA法によって試験した。

【0073】

(1.5 上澄液のスクリーニング)

10日目に全てのウェルについてマウス免疫グロブリンの産生をELISAによって試験した。マウス免疫グロブリンを産生しているウェルは2日後に再サンプリングし、HSAに対する活性をELISAによって試験した。抗HSA活性を有するウェルからのハイブリドーマをより大きいウェルに取り、マウス胸腺フィーダー細胞を用い、96ウェル-マイクロタイタートレーにおける希釈を制限することによってクローン化した。48時間後に陽性ウェルを再サンプリングし、免疫組織学的試験を次のように行った：

免疫のために用いた腎臓及び正常腎から採取したPLP固定皮質の3 μ m凍結切片をスライド上に互いに隣接するように置いた。それらの切片をハイブリドーマ上澄液と共にインキュベートし、それから4層イムノペルオキシダーゼ法によって染色した。正常腎と免疫腎の両方で同様に反応する抗体を産生するハイブリドーマは棄てた。免疫腎の糸球体免疫デポジットに対して明らかに優先的に反応する抗体を産生するハイブリドーマをクローン化した。

【0074】

(1.6 “免疫デポジット反応性”モノクローナル抗体の組織学的反応性及び特徴)

免疫腎の切片をさらに最終的クローン化モノクローナル抗体の各々を用いてイムノペルオキシダーゼによって試験し、糸球体及び糸球体外反応性のパターンを調べ、記載した。

【0075】

マイクロタイタープレートをPBS中の抗原と共に4℃でプレインキュベートし、0.5%ツイーン20(ビオ・ラド・ラボラトリーズ、ヘラクレス、CA、USA)を含むPBSで洗い、続いてMAb上澄液、マウスIgG及びIgMに対するアルカリホスファターゼ結合抗体(Kirkegaard and Perry Laboratories、Gaithersburg、MD、USA)及び基質、p-ニトロフェニル燐酸(シグマケミカル、セントルイス、MO、USA)と共にインキュベートした。ティトレテク(Titretex)マルチ-スキャンプレートリーダーを用いて405nmでプレートを読んだ。使用した抗原は精製ヒトIgG、IgA及びIgM、精製ヒト補体コンポーネント(C3、C5、C6、C7、C8、C9)及び溶解赤血球から抽出した補体(MAC)の精製膜攻撃複合体であった。

【0076】

正常ヒト血清が抗原であったELISA研究では、二次抗体はマウス免疫グロブリンに対するホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗体(DAKO、デンマーク)で、基質はo-フェニレンジアミンであった。プレートを485nmで読んだ。

【0077】

精製MAC及び精製補体コンポーネント類をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にかけた。ビオラド(BioRad)トランスブロットセルを用いてタンパク質をニトロセルロースに移し、ニトロセルロース片を、モノクローナル抗体上澄液、その後¹²⁵I-標識(Fab)₂ヤギ抗マウス免疫グロブリン(ペル-フリーズ(Pel-Freeze)、ロジャーズ、AR、USA)をプローブとして分析した。その他のセルロース片はヒト補体コンポーネントC5、C6、C7、C8及びC9に対する抗血清をプローブとし、その後ヤギ(Kirkegaard and Perry Laboratories)またはウサギ(DAKO、デンマーク)免疫グロブリンに対する¹²⁵I-標識抗血清をプローブとして分析した。ニトロセルロース片をその後オートラジオグラフィーにかけた。

【0078】

このやり方で産生したモノクローナル抗体から、系球体免疫デポジットと反応するが、精製ヒト補体コンポーネント(C3、C5、C6、C7、C8、C9)、溶解赤血球または正常ヒト血清から抽出した補体の精製膜攻撃複合体(MAC)とは反応しない一つの候補が見つかった。この抗体、K2.254、をその後の実験に用い、系球体免疫デポジットに結合しているコンポーネントを明らかにした。

【0079】

(実施例2)

(FHR-5タンパク質の分離及びそのアミノ酸配列の解明)

(2.1 材料)

K562細胞の表面に対するウサギポリクローナル抗原はPaul Morgan教授(Cardiff、英国)から提供され、重合ヒトC9上のネオ抗原に対するモノクローナル抗体(Wu-7-2)はReinhardt Wurzner博士から提供された(Immunology、74巻:132-138ページ、1991)。ヒトC9に対するモノクローナル抗体(K2.322)及びアイソタイプ対合(isotype matched)対照モノクローナル抗体(K1.431)は前記のようにして産生した。FITC結合ヒツジ抗ヒトアルブミン抗体はシレナス(Silenus)、オーストラリア、から入手した。使用した二次抗体はFITC結合ウサギ抗マウス免疫グロブリン(DAKO、カルピンテリア、CA、USA)、¹²⁵Iで標識した(Wurznerら、Immunology、74巻:132-138ページ、1991)ウサギ抗マウス及びロバ抗ヤギ免疫グロブリン(Kirkegaard and Perry Laboratories)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ-結合ウサギ抗マウス免疫グロブリン(DAKO)、及びヒツジ抗-蛍光-POD Fabフラグメント(Roche Diagnostics、マンハイム、ドイツ)であった。

【0080】

テトラ-Hisモノクローナル抗体(Qiagen、ヒルデン、ドイツ)を用い、His-タグ化組換えタンパク質発現の検出を行った。

【0081】

(2.2 Mab K2.254とヒト補体攻撃にさらされたK562細胞との反応性の測定)

ヒトリンパ芽球細胞株K562をアメリカンタイプカルチャーコレクション(マナッサス、VA、USA)から得た。約100万のK562細胞を0.1mg/ml抗-K562抗体と共に37℃で2時間インキュベートし、PBSで3回洗い、PBSで1:2希釈した正常ヒト血清または対照-熱不活性化正常ヒト血清と共に37℃で4時間インキュベートした。血清と共にインキュベートした後、細胞をPBSで3回洗い、その試料を分割し、アミノアルキルシラン(AAS)(シグマ社)で処理した顕微鏡スライド上に延ばし、アセトン中で10分間固定し、空気乾燥した。それらのスライドをK2.254、抗-C9Mab K2.322、またはアイソタイプ-対合対照モノクローナル抗体K1.431(抗体は全て10µg/mlで)と共に室温(RT)で1時間インキュベートし、PBSで3回洗った。スライドを最後にウサギFITC-抗マウス-マウス免疫グロブリン(1:20)中でRTで30分間インキュベートし、さらに3回洗い、エピフルオレッセンス顕微鏡で検査した。

【0082】

Mab K2.254は未処理K562細胞、抗-K562抗体にさらしたK562細胞及び熱不活性化ヒト血清、または新鮮ヒト血清にさらした未感作K562細胞の表面とは反応しなかった。しかし抗-K562抗体及び新鮮なヒト血清の両方にさらした後、上記細胞は補体ダメージの形態的証拠をあらわし、C9(Mab K2.322)及びK2.254抗原に対する強い細胞表面染色を示した(図1)。新鮮ヒト血清をモルモットまたはウサギ血清に代えると、K562細胞は形態的ダメージを示したが、K2.254との細胞表面反応性はなかった。これらのデータは、K2.254のためのエピトープが、補体の活性化によってヒト血清由来抗原上に発現することを示唆する。

【0083】

(2.3 補体溶解ヒト及びモルモット赤血球ゴーストの生成)

モルモット赤血球(GPE)を、新鮮な正常ヒト血清を用いる反応性溶解によ

って直接溶解した。洗浄したGPEを0.9%塩化ナトリウム溶液に1:10 (v:v)に懸濁し、この試料5mlを正常ヒト血清20mlと共に37℃で一晩インキュベートした。GPEゴーストが遠心分離によって回収され、これを上澄液が澄明になるまで生理的食塩液中で3-5回洗った。

【0084】

ヒト赤血球(HE)(ABO血液型A)を20%高いタイターのヒト抗-血液型A血清と共にインキュベートすることによって(21、30分間)抗体を感作させた。HEをその後一回洗い、GPEについて述べたように、正常ヒト血清と共にインキュベートした。陰性対照赤血球ゴーストを生成するために、洗浄したGPE及びHEの1:10懸濁液5mlを10ml蒸留水の添加によって浸透圧的に溶解し、赤血球ゴーストを回収し、上記のように洗った。

【0085】

(2.4 ウェスタン ブロットイング)

活性血清から精製した正常ヒト血清、SC5b-9複合体(Wurznerら、Immunology、74巻:132-138ページ、1991)、赤血球ゴースト及びアフィニティー精製K2.254抗原を生成し、7.5%または4-16%勾配SDS-PAGEゲル上で電気泳動にかけ(Laemmli、Nature、227巻:680-685ページ、1970)、Bio-Radトランスブロットセルを用いて(Burnette、Anal.Biochem.112巻:195-203ページ、1981)ニトロセルロースに移し(Trans-Blot(登録商標)伝達培地、Bio-Rad、ヘラクレス、CA、USA)、PBS(燐酸緩衝化生理食塩水)中5%ドライミルクでRTで1時間ブロックし、それから適切なモノクローナル及びポリクローナル抗体をプローブとして用いた。膜をPBS+0.05%ツイーン20で5分間5回洗い、その後¹²⁵I標識二次抗体またはウサギ抗マウスHRP(1:100)と共にRTで1時間インキュベートした。洗浄後、既述のように放射性バンドをオートグラフィーによって検出し、HRP標識バンドをSuperSignal(登録商標)West Pico Chemiluminescent Substrate(ピアース、ロックフォード、IL、USA)を用いて検出した。

【0086】

K2.254によって識別される抗原をさらに分析するために、ヒト血清で溶解したモルモットまたはヒト赤血球からの膜をウェスタン・イムノブロッティングによって試験した(図2)。K2.254は補体溶解HE及びGPE膜(レーン1、2、3)に約65kDのバンドを確認したが、対照-水溶解膜(レーン4)には確認しなかった。

【0087】

正常ヒト血清はC9を含んでいた(図3A)が、Mab K2.254とは反応しなかった(図3B)。上記血清をチモサンで前処理して補体を活性化した後、二量体C9が検出され、補体の活性化を示したが、この際もK2.254との反応性は認められなかった。同様に精製SC5b-9のウェスタンブロッティングはK2.254によって識別される抗原を確認できなかった。

【0088】

(2.5 K2.254抗原のアフィニティー精製)

補体溶解GPEゴーストを0.1M PBS中1%ジギトニン(シグマ)5mlで4で一晩抽出した。アフィニティークロマトグラフィーはメーカーのインストラクションにより、臭化シアン-活性化セファロース4Bの10mlカラム(Amersham Biotech、アップザラ、スウェーデン)を用い、それにK2.254Mab 50mgを加えることによって行った。5mlのジギトニン抽出液を上記カラムを通過させ、集めた。その後上記カラムを0.01%トリトンX-100を含むPBS200容量(PBS/トリトン)で洗い、0.05Mジエチルアミン、pH11.5、10mlで溶出した。サンプルを1Mトリス-HCl(pH7.0)1ml中に溶出した。各5ml抽出液をカラムを2回通し、3サンプルからの溶出液(6通過)を集め、PBS/トリトンに対して広く透析し、それから0.5mlに濃縮した(YM30膜及びCentricon30;アミコン、ビバリー、MA、USA)。濃縮した溶出液をその後上記のようにSDS-PAGE及びウェスタン・ブロッティングにかけた。

【0089】

K2.254とヒト補体-溶解GPEとの強い反応性により、ジギトニンで抽

出したGPEゴーストを用いて関連タンパク質を抽出し、アフィニティー精製した。その際K2.254アフィニティーカラムを用いた。アフィニティー精製した材料はウェスタン・ブロット法でK2.254と反応したが、C9及びヒト血清アルブミン(HSA)で汚染されており(図4)、さらなる精製が必要であった。

【0090】

(2.6 逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC))

HSA及びC9からの分離は逆相HPLCによって行われた。K2.254と反応するがヒトC9またはHSAとは反応しない物質を含むフラクションを集め、凍結乾燥し、その後ペプチド配列決定のために用いた。濃縮したアフィニティーカラム溶出液のサンプルを10%トリクロロ酢酸(TCA)で沈殿させ、80%エーテル/20%エタノール溶液で洗い、6M塩酸グアニジン、0.1Mトリス、pH8.0(HCl)+0.05%トリフルオロ酢酸(TFA)100 μ lに再溶解し、2.1mmID \times 250mm Brownlee RP3007オングストロームのC8カラムを用いるファルマシアSMART HPLC装置で逆相HPLCにかけた。(溶媒A:0.1%TFA、溶媒B:60%アセトニトリル 0.1%TFA、流速100マイクロリットル/分)。60分間に0-100%Bの勾配を用い、ピークを280nmにおいてモニターし、手動で集めた。フラクションをウェスタン・ブロットによって分析し、個々のコンポーネントの溶出を検出し、K2.254結合活性を含むフラクションを集めて凍結乾燥した。

【0091】

(2.7 ペプチド配列分析)

HPLCから得られた凍結乾燥フラクションをSDSサンプル緩衝液で再構成し、10%SDS PAGE上を移動させた。バンドを切り取り、還元し、ピリジルエチル化し、Achrombacter Lys-C エンドプロテイナーゼ(ワコー)によるゲル内(in-gel)消化を行った(Mitchellhillら、J. Biol. Chem.、272巻:24475-24479ページ、1997)。抽出されたペプチド混合物を1mmID \times 250mm、SGE3

00ミクロン、5オングストローム、C18 GLTカラムを用いるファルマシアSMART装置でHPLCにかけた。(溶媒A:0.1%TEA、溶媒B:60%アセトニトリル 0.075%TFA、流速40マイクロリットル/分)。150分間0-100%B勾配で行い、214、254及び280nmのピークをモニターし、個々のペプチドを手動で集めた。ペプチドの相同性及び質量をPerseptive Biosystems Voyager DE MALDI質量計で確認し、アミノ酸配列をヒューレットパッカードG1000Aタンパク質シーケンサーで決定した。ホモロジー検索は、重複しないタンパク質データベース(Genbank CDS翻訳+PDB+Spundate+PIR)とESTデータベースの6翻訳を用いて行った。

【0092】

ゲル内タンパク質分解及びペプチドのHPLC分離後、13の精製ペプチド配列が得られた。これらペプチドの全てはタンパク質のH因子(FH)ファミリーのメンバーに関して若干の相同性を示した。表3はこれらのペプチド配列を示し、それらが最も強い相同性を示したペプチドを列挙している。

【0093】

(2.8 RNAの作製)

肝切除中の一患者から得た一片の正常、非侵潤ヒト肝から全RNAを抽出した。その組織をホモジナイズし、RNAをメーカーのインストラクションによってTRIZOL試薬(Life Technologies、グランドアイランド、NY、USA)で単離した。全RNA 10µgをDNaseで処理し、混入ゲノムDNAを除去し、ポリ(A)⁺RNAをオリゴテックス(Oligotex)mRNAキット(Qiagen、ヒルデン、ドイツ)を用いて単離した。

【0094】

(2.9 cDNA合成及びクローニング)

二本鎖cDNAをヒト肝ポリ(A)⁺RNA 2µgから、オリゴ(dT)またはランダムプライマーのどちらかと、Superscript II RNaseH逆転写酵素(Life Technologies)を用いてメーカーのインストラクションにしたがって合成した。

【0095】

遺伝子特異的プライマー類 (GSP - 1 及び GSP - 2、表2 参照) を用いて、ヒト肝 cDNA からの最初の生成物を増幅した。DNA Engine 熱サイクラー (MJ Research、ウォータタウン、MA、USA) 中でアニーリング温度 70 から 65 でタッチダウン PCR を 40 サイクル行った。3' 及び 5' RACE (cDNA 末端の急速増幅法) (参照: Innis ら、PCR Protocols、アカデミックプレス、28 - 38 ページ、1990) を、GSP、Advantage DNA ポリメラーゼ及び Marathon cDNA 増幅キット (Clontech Laboratories、パロアルト、CA、USA) を用いて行った。ヒト肝ポリ(A)⁺RNA から、TCAP-F プライマー (表2) 及び Marathon キットと共に供給された AP1 プライマーを用いて、全長 cDNA を上記のように増幅した。

【0096】

PCR 生成物をゲル精製し (Qiagen ゲル抽出キット)、pGEM-T Easy にクローン化した (Promega、マジソン、WI、USA)。オリゴヌクレオチド プライマーは Life Technologies で合成された。

【0097】

【表2】

表 2

cDNA合成およびクローニングにおいて使用した遺伝子特異的プライマー

プライマー	配列	配列番号
GSP-1:	5'-GGTGTGTTGCAACACACATAGGAAGCTCT-3'	4
GSP-2:	5'-GTCATGTTGCCCATTTTAGAAGCCAATG-3'	5
CAP-F1:	5'-GGAGAAGGAACACTTTGTGA-3'	6
CAP-F2:	5'-ATAAGAGTTGGATCAGACTC-3'	7
CAP-F3:	5'-GTATATCCTCCAGGGTCAAC-3'	8
CAP-F4:	5'-GTGGATACATACCTGAACCTCG-3'	9
CAP-F5:	5'-TCACCAACACCGAAGTGTCTC-3'	10
CAP-F6:	5'-CCATCTACGCTAAAAGTAGCC-3'	11
CAP-R1:	5'-GAACATAACCGTACTCGAG-3'	12
CAP-R2:	5'-CCACATGATCGTACTTGTGTC-3'	13
CAP-R3:	5'-GAGCATCTACATTTGGCTTC-3'	14
CAP-R4:	5'-GTTGACCCTGGAGGATATAC-3'	15
CAP-R5:	5'-CTGAGCATTAGGTATCTGAGG-3'	16
CAP-R6:	5'-CTTCCCCTGTACGAACTTGGGAA-3'	17
707-F2:	5'-GTTTCAGACATCTTCAGATACAGGC-3'	18
707-F3:	5'-CAGTTAAAATGGAGAAAACGATGG-3'	19
3'BAC:	5'-GGACTAGTGGCTACTTTTAGCGTAGATGG-3'	20
5'BAC(C):	5'-GAAGGAACACTTTGTGATTTTCC-3'	21
TCAP-F:	5'-CGGGCAGGTGCTTGTACTGTAAATG-3'	22
TCAP-R:	5'-GCTACAACCACAAAAGTTGACAGCT-3'	23
Mlu 1-F:	5'-CGACGCGTGAAGGAACACTTTGTGA-3'	24
Sal 1-R:	5'-GCCGTCGACCCCTTCACATATAGGATATTC-3'	25

(2.10 DNAの作製及び配列決定)

プラスミドDNAを、Qiagen Plasmid Mini Kitを用いて細菌培養物から作製した。クローンフラグメントの正確な同定が配列決定、PCR、及び制限酵素分析によって確認された。DNA配列決定反応は、オーストラリア ゲノム研究所(メルボルン、オーストラリア)によってBIGDYE Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction(PE Applied Biosystems、フォスターシティー、CA、USA)及び電気泳動を用いて行われた。cDNAクローンの両

方の鎖とも、標準ベクタープライマー及び表2に記載されている内プライマー数種を用いて配列決定された。

【0098】

cDNA単離のためのプライマーを設計するために、ペプチドとヒトFHとのアラインメントを利用した。FH遺伝子ファミリーのメンバーが肝臓に発現するので、ヒト肝をRNAのソースとして選んだ。2種類の変性プライマー、254-F1(5'-GGNGARTGYCAYGTNCCNAT、配列番号26)及び254-R1(5'-CARTCNACYTCNGGRTTCCA、配列番号27)を用いて709bp生成物を増幅した。このPCR生成物の配列決定は、ヒトFHのアミノ酸549から785までに55.5%一致する部分的タンパク質配列をコードする一つのオープンリーディングフレーム(ORF)を明らかにした。導きだ出されたアミノ酸配列はペプチドH1113、H1114、H1116及びH1117との完全な一致を含んでいた(表3)。この新しいタンパク質はFHに似てはいるが同一ではなかったから、それはH因子-関連タンパク質5(FHR-5)と命名された。

【0099】

3'及び5'RACEをその後行い、それぞれ1072bp及び2248bp生成物を得た。これらのクローンの配列決定は肝RNAからの単一全長FHR-5cDNAの増幅を可能にした。図5は2823bp cDNAを生成するためのこれらクローンの位置及び重なりを示す。PCRで発生する誤差の可能性を最小にするために、少なくとも2回の同一PCRから生成したクローンから、全配列を得た。

【0100】

(2.11 ノザン・プロット分析)

全RNA10µgまたはポリ(A)⁺RNA1µgをホルムアルデヒド含有1%アガロースゲル上で電気泳動にかけ、標準法によって(Sambrookら、Molecular Cloning、2版、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、1989)ナイロン膜GeneScreen Plus(NENTM-Life Science Products、ボストン、MA、

USA)に移した。UV Stratalinker (登録商標) 1800 (Stratagene、ラジヨラ、CA、USA)を用いてRNAを膜にクロスリンクさせ、プロットをRapis-hyb緩衝液 (Amersham Biotech、アップザラ、スウェーデン) 中で65℃、1時間プレハイブリダイズした。Megaprime DNA標識装置 (Amersham Biotech) を用いて³²P- で標識した特異的プローブとのハイブリダイゼーションを65℃で2時間行った。膜を2X SSC+0.1% SDS、65℃、1X SSC+0.1% SDS、65℃、そして0.1X SSC+0.1% SDS、室温、で15分間洗い、フィルターを-70℃に一晩さらした。

【0101】

ヒト肝RNAのノザン・プロットを709bp FHR-5 PCRフラグメントをプローブとして分析し、ヒトFH711bp PCRフラグメントを同じ領域から増幅した。FHR-5フラグメントは推定サイズ3.0キロベースを有する単一のmRNA種にハイブリダイズした(図7)。他のmRNA種との交差反応性はなかった。同じプロットをFHプローブを用いて分析した際、2種類のmRNAが4.4及び5.0キロベースに見いだされた。このような2種については既に述べた。上記FHプローブはFHR-5 mRNAとはクロス・ハイブリダイズせず、特異的FHR-5 mRNAの同定がさらに確認された。

【0102】

(2.12 バキュロウィルス発現のためのプラスミドの構成)

完全cDNA配列は配列番号1に示され、導き出だされたアミノ酸配列は配列番号2に示される。塩基94から1800までのORFがあり、開始コドンの領域は翻訳開始のためのコザク(Kozak)コンセンサス配列と良く一致している。上記ORFは18-アミノ酸シグナル配列と成熟タンパク質の551アミノ酸をコードしていた。上記ORFに続いて、2705-2710の位置のコンセンサス ポリアデニル化シグナル及びポリA⁺テイル(tail)を含む1000bpの3'非翻訳配列があった。

【0103】

成熟FHR-5は推定分子量(非グリコシル化)が~62,650Daであり

、108及び382の位置に、可能性のある二つのN-結合グリコシル化部位を有する。配列番号2を参照されたい。

【0104】

FHR-5の分泌型は9つの短いコンセンサスリピート(SCR)のドメインを含む。各SCRは4個の特徴的システイン(C)残基(図9のボックス)及びその他の保存アミノ酸(図9に整列)を含む。単離された全てのペプチドフラグメントは成熟タンパク質とすることができた。

【0105】

FHR-5のSCRはFHファミリーのメンバーに対して種々の相同性をあらわす(図10)。FHR-5のSCR1及び2はFHR-1及びFHR-2のSCR1及び2に相同であり、SCR3-7はFHのSCR10-14にわたって相同性を示し、SCR8及び9はFH及び全てのFHRタンパク質の最後の2SCRに対して相同性を示す。SCRアラインメントの略図が図6に示される。

【0106】

1,672bpフラグメントを全長(3.0kb)cDNAから、Pfu DNAポリメラーゼ(Roche Diagnostics、マンハイム、ドイツ)を用いるPCR(タッチダウン56-50)によって増幅した。前方プライマー(Mlu1-F、表2参照)は、シグナルペプチドをコードする領域の直ぐ下流をアニールするように設計され、5'末端にMlu1制限部位を含んでいた。逆プライマー(Sal1-R、表2参照)はオープンリーディングフレーム(ORF)の直ぐ下流をアニールし、5'末端にSal1制限部位を挿入した。PCR生成物をMlu1/Sal1で消化し(Promega、マジソン、WI、USA)、pFASTBAC1-His¹⁰⁺ベクターにクローン化した; 上記ベクターはMlu1で一部分消化され、ゲル精製され、それからXho1で処理されていた。pFASTBAC1の変形物であるpFASTBAC1-His¹⁰⁺(Life Technologies)はSVIMRのDr Brett Cromerから好意的に提供された。これは効率的分泌を確実にするgp67シグナルペプチドと、検出及び精製のための10-ヒスチジンN-末端エピトープタグとをコードする。上記挿入物(insert)及びその結合の完全配

列が配列決定によって確認された。

【0107】

(2.13 昆虫細胞におけるFHR-5の組換え発現及び精製)

Bac-to-Bacバキュロウィルス発現システムプロトコル(Life Technologies)の一変法を利用して精製組換えバキュロウィルスを得た。組換えpFastBac1-His¹⁰⁺ベクターをDH10Bac-コンピテント細胞に移入し、ゲンタマイシン、テトラサイクリン及びカナマイシンを含むS.O.C.培地4ml中で一晚培養した。ブランクアッセイ分析の必要なしに純粋な組換えウィルス種を得るために、組換えBacmid DNAを上記のように分離し、エレクトロポレーション(2.5kV、25µFD、200ohm)によってDH10コンピテント細胞(Life Technologies)に導入した。トランスフェクトした細胞を5-ブromo-4-クロロ-3-インドイル-D-ガラクトシド(X-Gal)、イソプロピル-D-チオガラクトシド(IPTG)、カナマイシン及びゲンタマイシンを含むルリア(Luria)寒天プレート上で24時間培養した。純粋な組換えBacmid DNAを含むコロニーをブルー/ホワイトスクリーニングによって選択し、全DNAを生成し、これを用いてSf9細胞にトランスフェクトした。

【0108】

Spodoptera frugiperda細胞(Sf9)を、10%ウシ胎児血清(FCS、Life Technologies)を補充したグレース(Grace)の昆虫培地(Invitrogen、カールスバード、CA、USA)に27℃で維持した。細胞はスピナーフラスコ中で懸濁培養として増殖させるか、または組織培養フラスコ中で単層培養として増殖させた。組換え発現プラスミドでトランスフェクションする前に、HyQ(登録商標)SF-X-昆虫血清フリー細胞培養培地(Progen、Ipswich、Qld、オーストラリア)を用いて細胞を無血清条件に適應させた。

【0109】

Sf9細胞を10⁶/35-mmウェルで1回、播種し、メーカーの操作法にしたがってBac-to-Bacバキュロウィルス発現系を用いてトランスフェ

クトした。3 - 4日後に培養上澄液を集め、組換えタンパク質の合成をウェスタン・ブロット法によって分析した。昆虫細胞培養培地15 μ lを4X非還元または4X還元サンプル緩衝液5 μ lに加え、20 μ lサンプルを7.5% SDS - PAGEゲル上で電気泳動し、既述のようにニトロセルロースにトランスフェクトした。ブロットをK2.254または抗-テトラHis Mab (1:1000) (Qiagen)をプローブとして、そして陰性対照として抗ヒトH因子 Mab (1:1000) (Serotec、英国)をプローブとして分析した。二次抗体はウサギ抗マウス - HRP (DAKO)であった。

【0110】

組換えウィルスをトランスフェクションの3日後に培養培地から分離し、ウィルス ストックを確立した。組換えタンパク質の精製のために、40ml Hy Q培地中の 1×10^6 Sf9 / High Five細胞に精製組換えウィルスを感染させた。感染4日後、組換えタンパク質を Ni^{2+} - NTAアガロース (Qiagen) クロマトグラフィーを用いて既述のように精製した (Kuhn及びZipfel、Euro. J. Immunol、26巻: 2383 - 2387、1995)そしてウェスタンブロットによって分析した (図8)。

【0111】

C - 末端にポリヒスチジンエピトープタグを組み込んだFHR - 5の組換えバージョンをバキュロウィルス発現系を用いて昆虫細胞に発現させた。テトラ - His抗体を用いるウェスタンブロット (図8、レーン3)は感染昆虫細胞の細胞培養培地に65 kD分子を検出した。還元で、~90 kDのバンドが見られ (図8、レーン4)、生成したタンパク質がSCR含有分子に特徴的な内部ジスルフィド結合を含むことが確認された。K2.254抗体もウェスタンブロット法に用い、非還元サンプルに同一バンドを確認した (図8、レーン1)。多分二量体形成を示唆する、より高次のタンパク質バンドも~140 kDaのMrに検出された;ただしこれは抗 - His抗体では検出されなかった。K2.254で試験した還元サンプルではバンドは全然見られなかった。これはジスルフィド結合の還元後には上記エピトープが消失することを示唆している。

【0112】

【表3】

表3

FHおよびFHRタンパク質に対するHPLC精製したペプチドのアミノ酸相同性

ペプチド#	配列	相同性 対応配列
H1113	WNPEVDCTEK	H因子 416-423
H1114	GECHVPILEANVDAQPK	H因子 549-565
H1115	FEYPICE	H因子 1205-1211
H1116	EEYGHNEVVEYDCNPNFIINGPK	H因子 629-651
H1117	IQCVDGEWTTLPTCV	H因子 653-672
H1118	GWSTP	FHR1/2 115-119
H1119	SFWTRITCTEEG	FHR-2 47-58
H1120	MCSFP	指定されず (SCR 2 FHR-5)
H1121	AMISSPPFRAICQEGK	指定されず (SCR20 FHR-5)
H1122	TGDAVEFQCK	H因子 1175-1184
H1123	DGRWQSLPR	H因子 837-845
H1124	VALVCK	H因子 817-822
H1125	ENYLLPEAK	H因子 823-831

関連ペプチドと最も強い相同性を有するタンパク質領域のアミノ酸対応配列をコラム3に示す。大部分のペプチドがヒトFHと高い相同性を示したが、H1118及びH1119はFHR-及びFHR-2に最も近い関連性を示した。ペプチドH1120及びH1121はタンパク質のFHファミリーに顕著な相同性を示さなかったが、後にFHR-5タンパク質に指定された。

【0113】

(実施例3)

(組換えFHR-5とのインビトロ結合研究)

組換えFHR-5またはH因子(シグマ)を0.1Mカルボネート緩衝液、pH9.3で1:2に逡減希釈した。マイクロタイタープレートの二重ウェルを、50pmol/ウェルから0.4pmol/ウェルまでのFHR-5またはH因子希釈液と共にインキュベートした。プレートをブロックし、ウェルを10µg/ウェルのヒトC3b、C5b-6またはHSAと共にインキュベートした。C3bはポリクローナルウサギ抗-C3抗体(1:1000希釈)とのインキュベーション、その後ペルオキシダーゼ結合ブタ抗ウサギ抗体(1:2000希釈)

とのインキュベーションによって検出した。C5b-6及びHSAはそれぞれK1.115(抗C6)及び抗HSAモノクローナル抗体を用い(1:500希釈)、その後ペルオキシダーゼ結合ウサギ抗マウス抗体(1:2000希釈)を用いて検出した。ELISAはO-フェニレンジアミン二塩酸で発現させた。その反応を4M H_2SO_4 で停止し、溶液の光学密度をBehring EL31ミクロプレートリーダーを用い波長492nmで測定した。

【0114】

結果を図11に示す。H因子(パネルB、図11)のように、C3bは用量依存的及び飽和可能にFHR-5に結合した(パネルA、図11)。ヒトC5b-6複合体もHSAもFHR-5またはH因子への結合を示さなかった。

【0115】

(結論)

本発明の詳細な説明及び上に示した実施例によって、本発明のいくつかの面が達成されることを認めることができる。

【0116】

その他の当業者に本発明、その原理、及びその実際的利用を知らせるために、本発明を具体的説明及び実施例によって詳細に記載したことが理解されるべきである。本発明の特定の処方及びプロセスは、示される特異的实施形態の記載によって制限されるものでなく、むしろ上記の記述及び実施例は添付の特許請求の範囲及びその同等物に関連して考慮しなければならない。上記の実施例及び記述の若干は本発明が機能する方法に関する結論を幾つか含むとはいえ、発明者はこれらの結論及び機能によって束縛されることは意図せず、それらを可能性のある説明として提供するに過ぎない。

【0117】

示された本発明の特殊な実施形態は本発明を余すところなく網羅しているものでも、制限するものでもなく、当業者には前記の実施例及び詳細な説明によって多くの変更、修正及び変化が可能であることも理解すべきである。よって本発明は添付の特許請求の範囲の精神及び範囲内に入る全てのこのような変更、修正及び変化を含むものとする。

【図面の簡単な説明】**【図1】**

図1は、K562 Mabで染色した抗体感受性、正常ヒト血清処理K562細胞の免疫蛍光を示す図である。細胞を抗-K562ポリクローナル及び正常ヒト血清と共に徐々にインキュベートし、K2.254及びFITC-標識二次抗体を用いてK2.254抗原結合を検出する。倍率、X400。

【図2】

図2は、補体-溶解HE及びGPEからの膜のウェスタン・プロットを示す。このプロットをK2.254 Mab及び¹²⁵I標識二次抗体をプローブとして分析した。~67kDのバンド(矢印)がヒト補体溶解ヒト赤血球(レーン1および2)及びモルモット赤血球(レーン3)に検出されたが、浸透圧によって溶解したヒト赤血球(レーン4)では検出されなかった。

【図3】

図3は、正常(N)及びチモサン活性化(Z)ヒト血清のウェスタン・プロットを示す図である。プロットを抗-native C9 Mab K2.322、K2.254 Mabをプローブとして、または陰性対照として二次¹²⁵I抗体のみをプローブとして分析した。Mrマーカートンパク質類のシフトが左に示される。K2.322(図3A)はZ及びNヒト血清両方のモノマーC9(矢印)を検出し、Zヒト血清のダイマーC9(矢印の頭)を検出し、補体活性化が起きたことを示した。K2.254(図3B)は両血清試料で特異的反応性を示さない。

【図4】

図4は、補体溶解GPEから抽出したアフィニティー精製タンパク質のウェスタン・プロットを示す図である。アフィニティー精製試料は、K2.254抗原(レーン1)の他に混入C9(レーン2)及びHSA(レーン3)を含んでいた。Mrマーカートを左に示す。

【図5】

図5は、FHR-5 cDNAの概略図である。ORFはボックス化され、シグナルペプチドが斜線を引いていない領域をコードする。RT-PCRによって

生成したcDNAクローンが示される。

【図6】

図6は、ヒトFHファミリー内の相同性を示す図である。(ZipfelおよびSkerka、Immunol.Today、15巻：121-126ページ、1994から採用)。個々のタンパク質のSCRに連続番号をつけた。関連SCRは縦の整列によって示され、ギャップは破線であらわされる。明確なSCR及びSCR内の明確な配列は黒色で示され、それらの縦の整列も相同性を示す。提案の機能性ドメインは水平の棒であらわされる：(A)、衰退加速と補因子活性；(B)、C3b結合；(C)、ヘパリン結合。RGD配列はFH及びFHL-1のSCR4に局在化された。

【図6A】

図6は、ヒトFHファミリー内の相同性を示す図である。(ZipfelおよびSkerka、Immunol.Today、15巻：121-126ページ、1994から採用)。個々のタンパク質のSCRに連続番号をつけた。関連SCRは縦の整列によって示され、ギャップは破線であらわされる。明確なSCR及びSCR内の明確な配列は黒色で示され、それらの縦の整列も相同性を示す。提案の機能性ドメインは水平の棒であらわされる：(A)、衰退加速と補因子活性；(B)、C3b結合；(C)、ヘパリン結合。RGD配列はFH及びFHL-1のSCR4に局在化された。

【図7】

図7は、ヒト肝RNAに関するノザン・プロット分析を示す図である。総細胞RNA及びmRNAをヒト肝組織から単離した。全RNA10 μ g及びmRNA2 μ gを変性アガロースゲル上で分離し、ニトロセルロース膜に移した。FHR-5に特異的な³²P-標識cDNAプローブを用い、推定サイズ3.0キロベースのmRNA種にハイブリダイズした。同じ膜をはがし、FHに特異的なcDNAプローブで分析した。このプローブは特徴的な4.4キロベースmRNAとより大きい5.0キロベース種を検出したが、3.0kb種とはクロス-ハイブリダイズしなかった。

【図8】

図8は、組換えFHR-5 (r F H R - 5) を発現するSf9昆虫細胞からの培養培地のウェスタン・ブロット分析を示す図である。タンパク質を7.5% SDS-PAGEゲル上で非還元条件及び還元条件下で分離し、ニトロセルロース膜に移し、ウェスタン・ブロットを行った。rFHR-5タンパク質の発現を検出するために、ブロットをK2.254 (レーン1、非還元条件及びレーン2、還元条件) または抗-Tetra-his 抗体 (レーン3、非還元条件及びレーン4、還元条件) をプローブとして分析した。抗C9モノクローナル、K2.254、を陰性対照として用いた。これはレーン5 (非還元条件) 及びレーン6 (還元条件) に示される。Mr マーカーが左に示される。

【図9】

図9は、FHR-5のSCR構造を示す図である。これらの配列はSCR構造によりそれらの保存アミノ酸に基づいて並べられた。特徴的なシステイン残基はボックス内に囲み、保存配列は整列している。

【図10】

図10は、FHR-5のSCRとその他のファミリーメンバーとを整列させた図である。同一アミノ酸は点 (dot) によって示される。個々のラインはFHR-5のSCR及び40%より大きい相同性を示すFHファミリーのSCRをあらわす。

【図11A】

図11は、組換えFHR-5のインビトロ結合を示す図である。C3b、C5b-6及びHSAの、組換えFHR-5 (パネルA) またはH因子 (パネルB) への結合をELISAによって明らかにした。

【図11B】

図11は、組換えFHR-5のインビトロ結合を示す図である。C3b、C5b-6及びHSAの、組換えFHR-5 (パネルA) またはH因子 (パネルB) への結合をELISAによって明らかにした。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Baxter Healthcare Corporation

<120> A NOVEL FACTOR-H RELATED PROTEIN 5 AND ANTIBODIES THERETO

<130> DI-5585L PCT (BXTD 9000.2)

<150> US 60/188,670

<151> 2000-03-13

<160> 27

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 2823

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ggcagggtgct tgttactggt aatgaaagca gattttaaagc aacaccacca tcaactggaggt      60
atTTTTagtt atatacgatt gagactacca agcatgttgc tcttattcag tgtaatocta      120
atctcatggg tatccactgt tgggggagaa ggaacacttt gtgattttcc aaaaatacac      180
catggatttc tgtatgatga agaagattat aacccttttt cccaagttcc tacaggggaa      240
gttttctatt actcctgtga atataatttt gtgtctcctt caaaatcctt ttggactcgc      300
ataacatgca cagaagaagg atggtcacca acaccgaagt gtctcagaat gtgttccttt      360
ccttttgtga aaaatggcca ttctgaatct tcaggactaa tacatctgga aggtgatact      420
gtacaaaatta tttgcaacac aggatacagc cttcaaaaca atgagaaaaa catttcgtgt      480
gtagaacggg gctgggccac tcctcccata tgcagcttca ctaaaggaga atgtcatggt      540
ccaattttag aagccaatgt agatgctcag ccaaaaaaag aaagctacaa agttggagac      600
gtgttgaaat tctcctgcag aaaaaatcct ataagagttg gatcagactc agttcaatgt      660
taccaatttg ggtggtcacc taactttcca acatgcaaag gacaagtacg atcatgtggt      720
ccacctcctc aactctcaa tggggaagtt aaggagataa gaaaagagga atatggacac      780
aatgaagtag tggaatatga ttgcaatcct aattttataa taaacgggcc taagaaaata      840
caatgtgtgg atggagaatg gacaacttta ccacttgtg ttgaacaagt gaaaacatgt      900
ggatacatac ctgaaactga gtacggttat gttcagccgt ctgtccctcc ctatcaacat      960
ggagtttcag tcgaggtgaa ttgcagaaat gaatatgcaa tgattggaaa taacatgatt     1020
acctgtatta atggaatatg gacagagctt cctatgtgtg ttgcaacaca ccaacttaag     1080

```

aggTgcAAAA tagcaggagt taatataaaa acattactca agctatctgg gaaagaatTT 1140
aatcataatt ctagaatacg ttacagatgt tcagacatct tcagatacag gcactcagtc 1200
tgtataaacg gaaatggaa tcctgaagta gactgcacag aaaaaggga acaattctgc 1260
ccaccgccac ctcagatacc taatgctcag aatatgacaa ccacagtga ttatcaggat 1320
ggagaaaaag tagctgttct ctgtaaagaa aactatctac ttccagaagc aaaagaaatt 1380
gtatgtaaag atggacgatg gcaatcatta ccacgctgtg ttgagtctac tgcatattgt 1440
gggccccctc catctattaa caatggagat accacctcat tcccattatc agtatatcct 1500
ccagggtcaa cagtgcgta ccgttgccag tccttctata aactccaggg ctctgtaact 1560
gtaacatgca gaaataaaca gtggtcagaa ccaccaagat gcctagatcc atgtgtggta 1620
tctgaagaaa acatgaacaa aaataacata cagttaaaat ggagaaacga tggaaaactc 1680
tatgcaaaaa caggggatgc tgttgaattc cagtgtaaat tcccacataa agcgatgata 1740
tcatcaccac catttcgagc aatctgtcag gaagggaaat ttgaatatcc tatatgtgaa 1800
tgaagcaagc ataattttcc tgaatatatt cttcaaacat ccactctacgc taaaagtagc 1860
cattatgtag ccaattctgt agttacttct tttattcttt caggtgttgt ttaactcagt 1920
tttatttaga actctggatt tttagagctt tagaaatttg taagctgaga gaacaatggt 1980
tcacttaata ggaggggtgc ttagtccata ttacattggt ataacagagt atcacagact 2040
ggataacttc taaccaatag tttatttggt tcataaatct aaaagctgag aagtccaaga 2100
tggtggggct gcctctgggt agggctctct cgaagcatca taatatgctg gaaggcatca 2160
caacatgggtg gaagggatca cgtggcaaaa gagcatgtac atgggagtga gagaaaaaga 2220
gagagagaga cagagtggcg ggggccgggg aggagcga aaactcatcctt tataaagaca 2280
ccactcctga gataacaatc caatcccatg ataatgacat taatccattc aagaagatag 2340
agctctcgtg acttaatcac cttctaaaga tctcacctga caacactggt gcattggcag 2400
ttaagtttcc acgtaaactt tcggggacac attcaaacca caggagaaac tcaaattggt 2460
cctgggcaaa tcacaacatg ggaatttta ttcataaatg tccacagaaa cagtaaattgt 2520
tctcgcttca gaacttaatt catctaattc ctctgtttg tctcaaatta taggataact 2580
ttgaaaactt ctgaattaac gttatttaaa aggaaatgta gatgttattt tagtctctat 2640
cttcagggtta ttatcactta aaaacctgcg aaagctgtca acttttgtgg ttgtagcaag 2700
tattaataaa tatttataaa tcctctaattg taagtctagc taactatcca atactaaata 2760
ccccttaaag tattaatgc actatctgct gtaaacggaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2820

aaa

2823

<210> 2

<211> 569

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Leu Leu Phe Ser Val Ile Leu Ile Ser Trp Val Ser Thr Val
 1 5 10 15

Gly Gly Glu Gly Thr Leu Cys Asp Phe Pro Lys Ile His His Gly Phe
 20 25 30

Leu Tyr Asp Glu Glu Asp Tyr Asn Pro Phe Ser Gln Val Pro Thr Gly
 35 40 45

Glu Val Phe Tyr Tyr Ser Cys Glu Tyr Asn Phe Val Ser Pro Ser Lys
 50 55 60

Ser Phe Trp Thr Arg Ile Thr Cys Thr Glu Glu Gly Trp Ser Pro Thr
 65 70 75 80

Pro Lys Cys Leu Arg Met Cys Ser Phe Pro Phe Val Lys Asn Gly His
 85 90 95

Ser Glu Ser Ser Gly Leu Ile His Leu Glu Gly Asp Thr Val Gln Ile
 100 105 110

Ile Cys Asn Thr Gly Tyr Ser Leu Gln Asn Asn Glu Lys Asn Ile Ser
 115 120 125

Cys Val Glu Arg Gly Trp Ser Thr Pro Pro Ile Cys Ser Phe Thr Lys
 130 135 140

Gly Glu Cys His Val Pro Ile Leu Glu Ala Asn Val Asp Ala Gln Pro
 145 150 155 160

Lys Lys Glu Ser Tyr Lys Val Gly Asp Val Leu Lys Phe Ser Cys Arg
 165 170 175

Lys Asn Leu Ile Arg Val Gly Ser Asp Ser Val Gln Cys Tyr Gln Phe
 180 185 190

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

Gly Pro Pro Pro Gln Leu Ser Asn Gly Glu Val Lys Glu Ile Arg Lys
 210 215 220

Glu Glu Tyr Gly His Asn Glu Val Val Glu Tyr Asp Cys Asn Pro Asn
 225 230 235 240

Phe Ile Ile Asn Gly Pro Lys Lys Ile Gln Cys Val Asp Gly Glu Trp

ytnytnaary tnwsnggnaa rgarttyaay cayaaywsnm gnathmgnta ymgntgywsn 1080
 gayathttym gntaymgna ywsngtntgy athaayggna artggaaycc ngargtngay 1140
 tgyacngara armngaraca rttytgyccn ccncncncnc arathccnaa ygcncaraay 1200
 atgacnacna cngtneaayta ycargayggn garaargtng cngtnytntg yaargaraay 1260
 tayytnytn cngargcnaa rgarathgtn tgyaargayg gnmngtggca rwsnytncn 1320
 mgntgygtng arwsnacngc ntaytgyggn ccncncncnw snathaayaa yggngayacn 1380
 acnwsnttyc cnytnwsngt ntayccncn ggnwsnacng tnaentaymg ntgycarwsn 1440
 tnytayaary tncarggnws ngtnacngtn acntgymgna ayaarcartg gwsngarccn 1500
 ccnmngtgyy tngayccntg ygtngtnwsn gargaraaya tgaayaaraa yaayathcar 1560
 ytnaartggm gnaaygaygg naarytntay gcnaaracng gngaygcngt ngarttycar 1620
 tgyaarttyc cncayaargc natgathwsn wsncncncnt tymngcncat htgycargar 1680
 ggnaarttyg artayccnat htgygar 1707

<210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)
 <223> GSP-1 Primer

<400> 4
 ggtgtgttgc aacacacata ggaagctct 29

<210> 5
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(28)
 <223> GSP-2 Primer

<400> 5
 gtcattgttgc ccattttaga agccaatg 28

<210> 6
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> CAP-F1 Primer

 <400> 6
 ggagaaggaa cactttgtga 20

 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> CAP-F2 Primer

 <400> 7
 ataagagttg gatcagactc 20

 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> CAP-F3 Primer

 <400> 8
 gtatatcctc cagggtaaac 20

 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> CAP-F4 Primer

 <400> 9
 gtggatacat acctgaactc g 21

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> CAP-F5 Primer

<400> 10
 tcaccaaacac cgaagtgtct c

21

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> CAP-F6 Primer

<400> 11
 ccatctacgc taaaagtagc c

21

<210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> CAP-R1 Primer

<400> 12
 gaacataacc gtactcgag

19

<210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> CAP-R2 Primer

<400> 13
 ccacatgatc gtacttgtc 19

<210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> CAP-R3 Primer

<400> 14
 gagcatctac attggcttc 19

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> CAP-R4 Primer

<400> 15
 gttgaccctg gaggatatac 20

<210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> CAP-R5 Primer

<400> 16
 ctgagcatta ggtatctgag g 21

<210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)

<223> CAP-R6 Primer

<400> 17

cttcccctgt acgaacttgg gaa

23

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(24)

<223> 707-F2 Primer

<400> 18

gttcagacat cttcagatac aggc

24

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(23)

<223> 707-F3 Primer

<400> 19

cagttaaaat ggagaaacga tgg

23

<210> 20

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(29)

<223> 3'BAC Primer

<400> 20

ggactagtgg ctacttttag cgtagatgg

29

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)
 <223> 5'BAC(C) Primer

<400> 21
 gaaggaacac tttgtgattt tcc

23

<210> 22
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <223> TCAP-F Primer

<400> 22
 cgggcagggtg cttggtactg ttaatg

26

<210> 23
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)
 <223> TCAP-R Primer

<400> 23
 gctacaacca caaaagttga cagct

25

<210> 24
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)
 <223> Mlu 1-F Primer

<400> 24
 cgacgcgtga aggaacactt tgtga

25

<210> 25
 <211> 29

<212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)
 <223> Sal 1-R Primer

 <400> 25
 gccgctcgacc cttcacatat aggatattc 29

 <210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> 254 F-1 Primer

 <400> 26
 ggngartgyc aygtncnat 20

 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> 254 R-1 Primer

 <400> 27
 cartcnacyt cnggrttcca 20

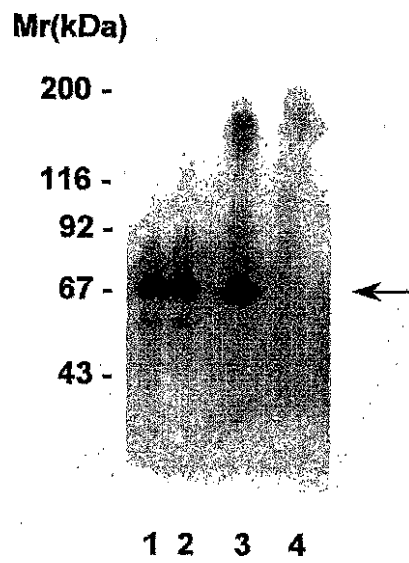
【図1】

FIG. 1

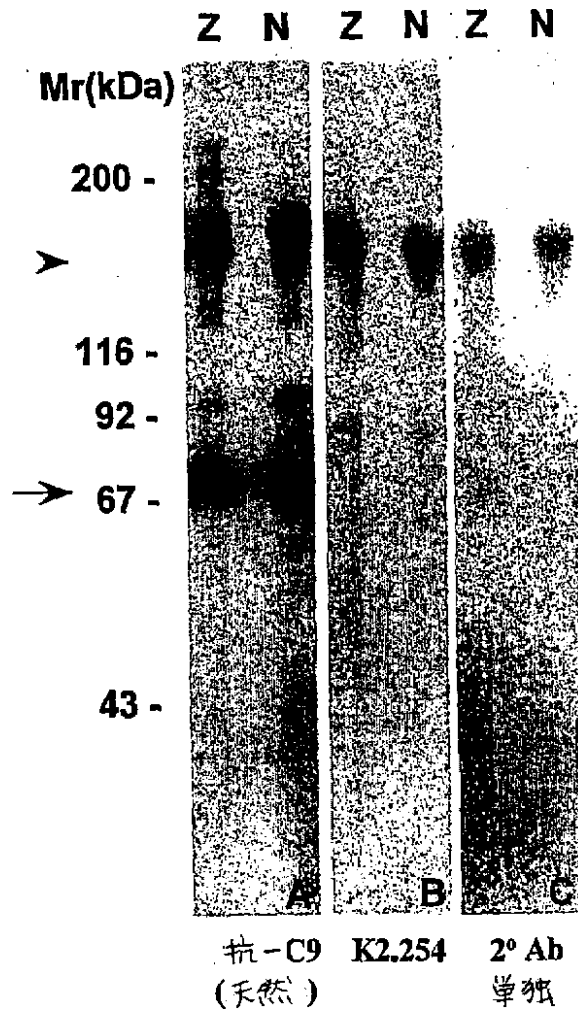


【図2】

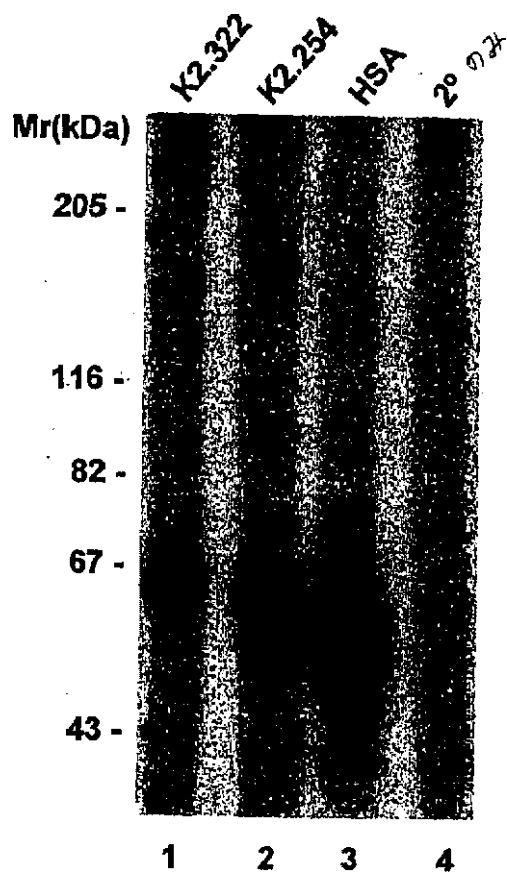
FIG. 2



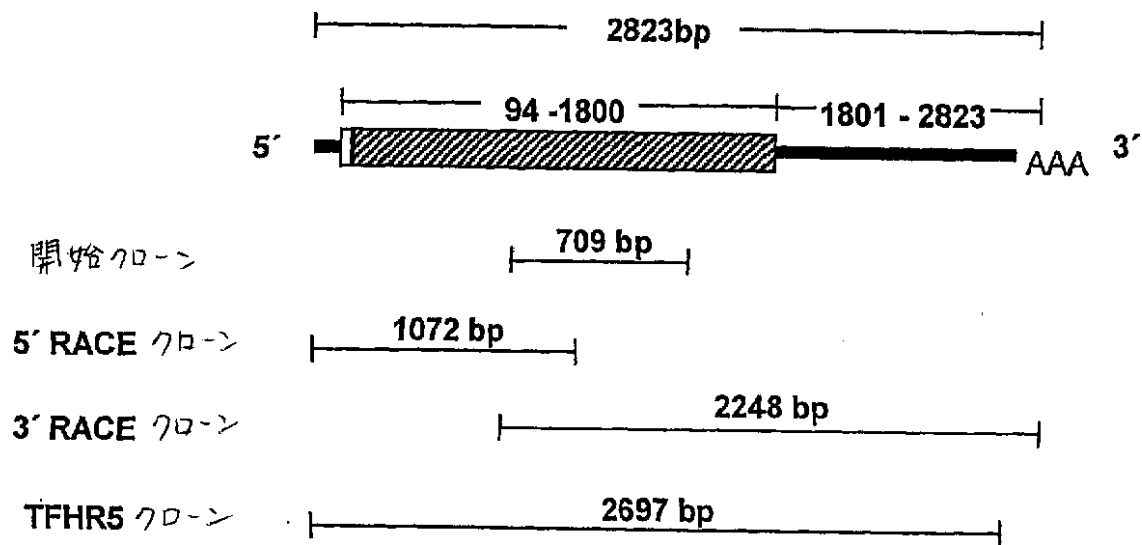
【图3】



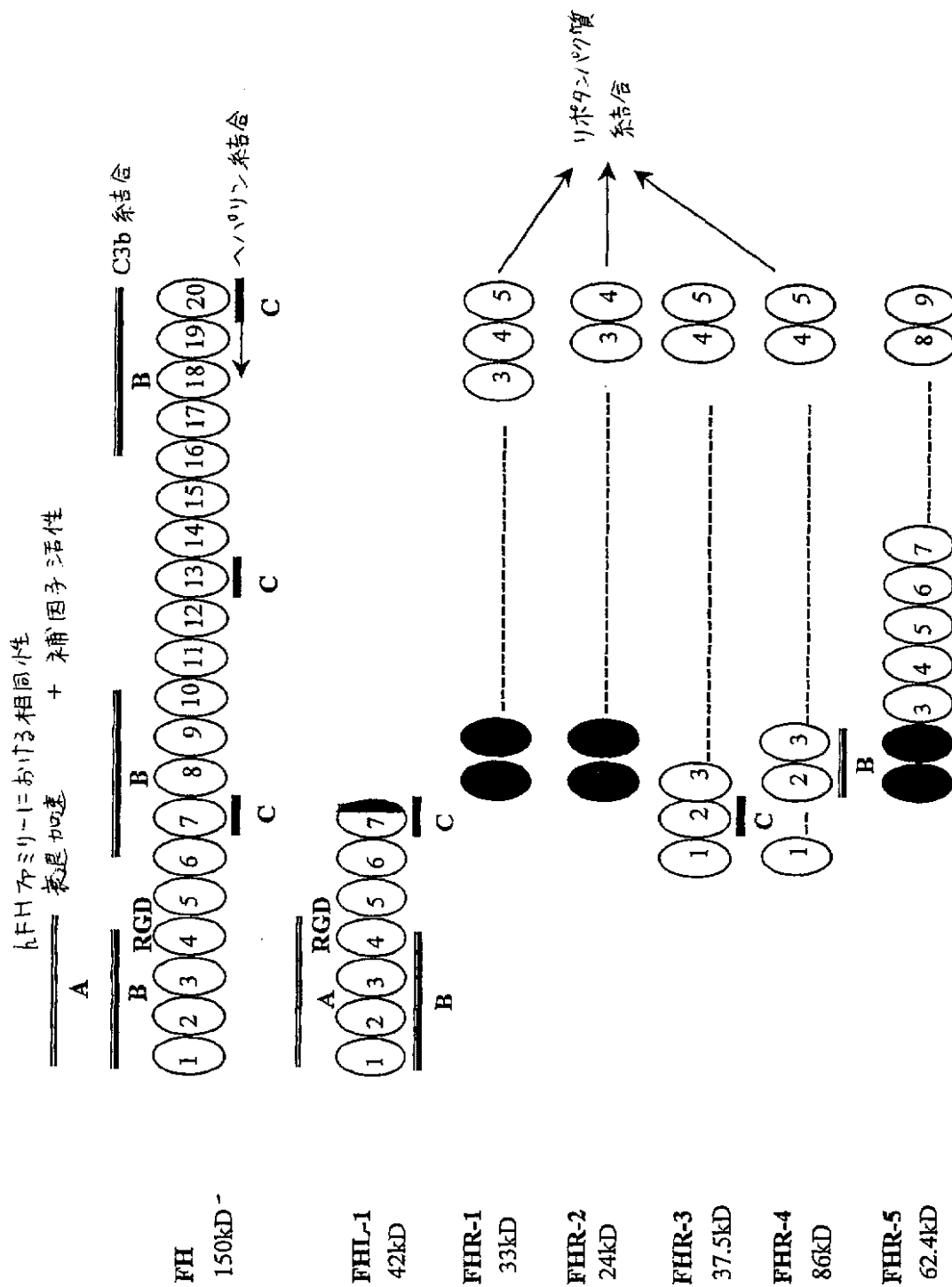
【図4】



【図5】

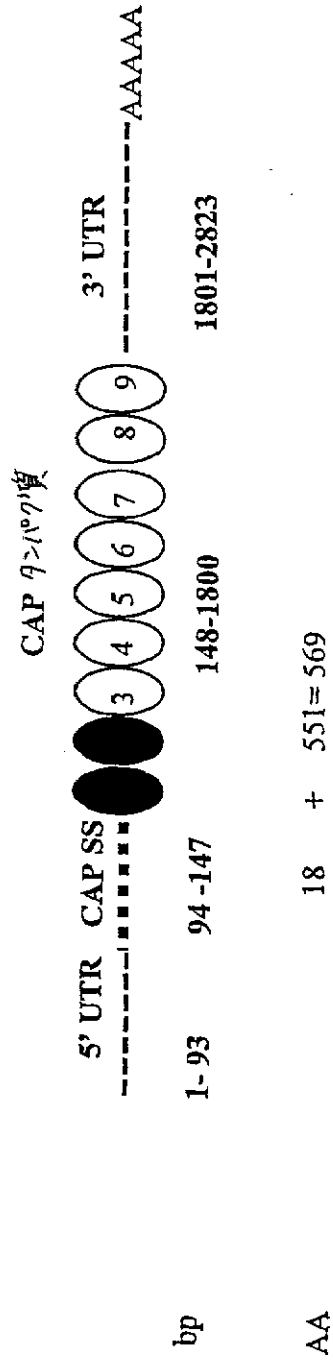


【図6】

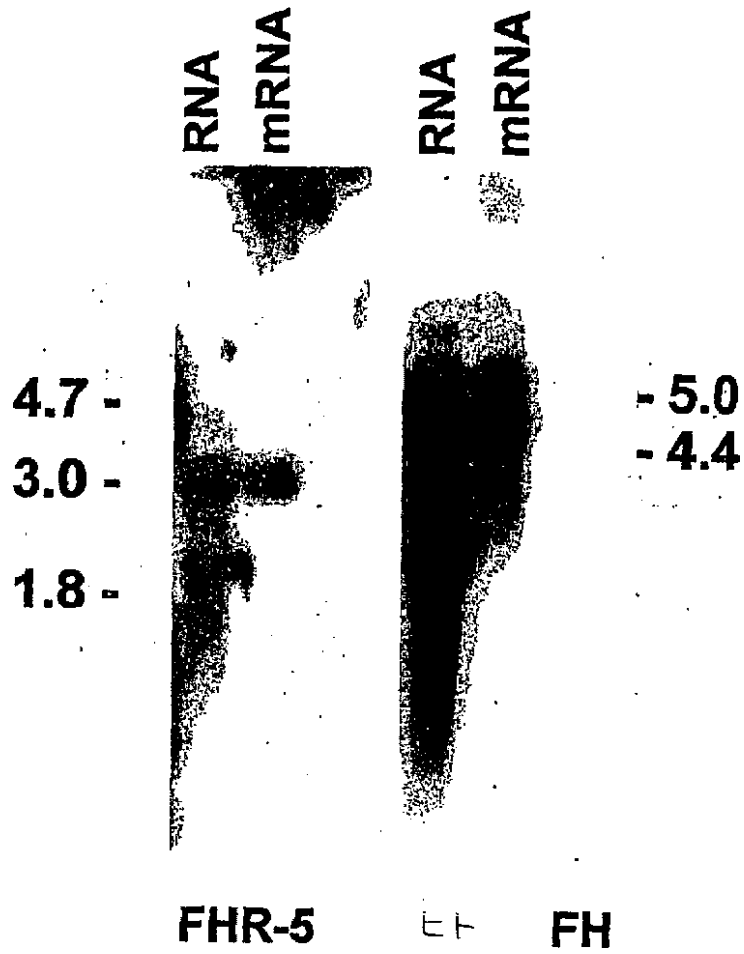


【図6A】

CAP 9>107複製
(2823bp/569AA)

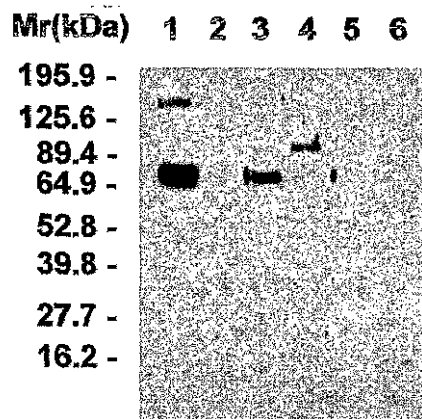


【図7】



【図8】

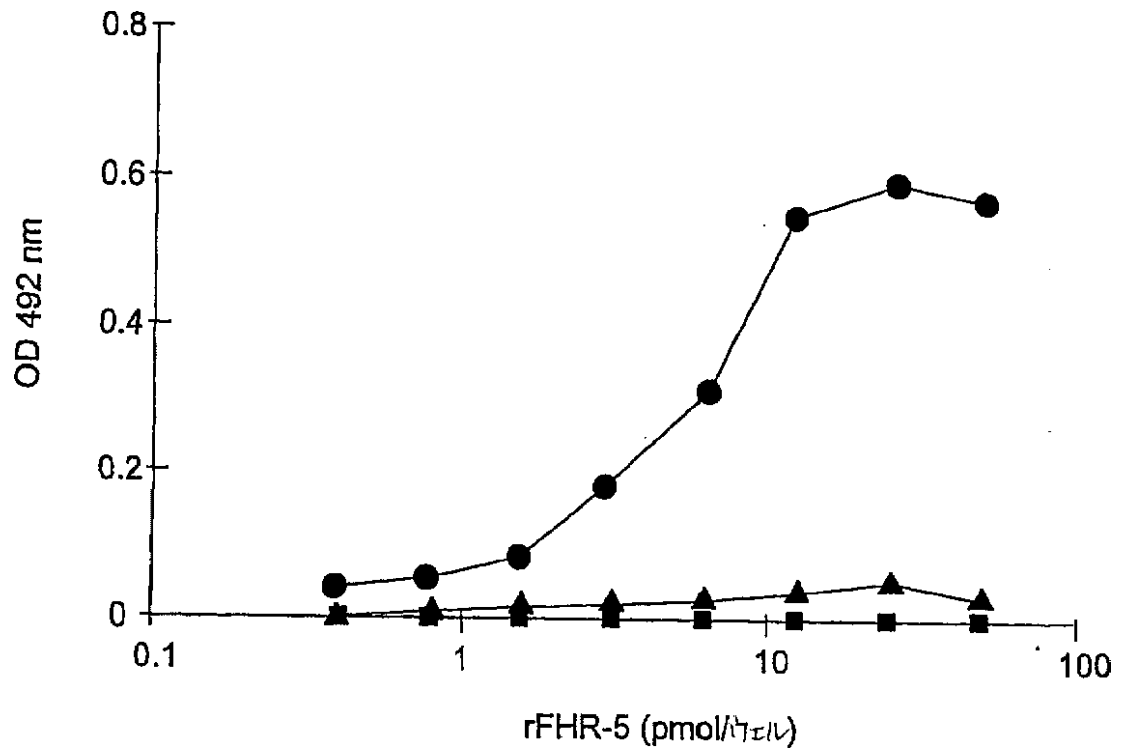
FIG. 8



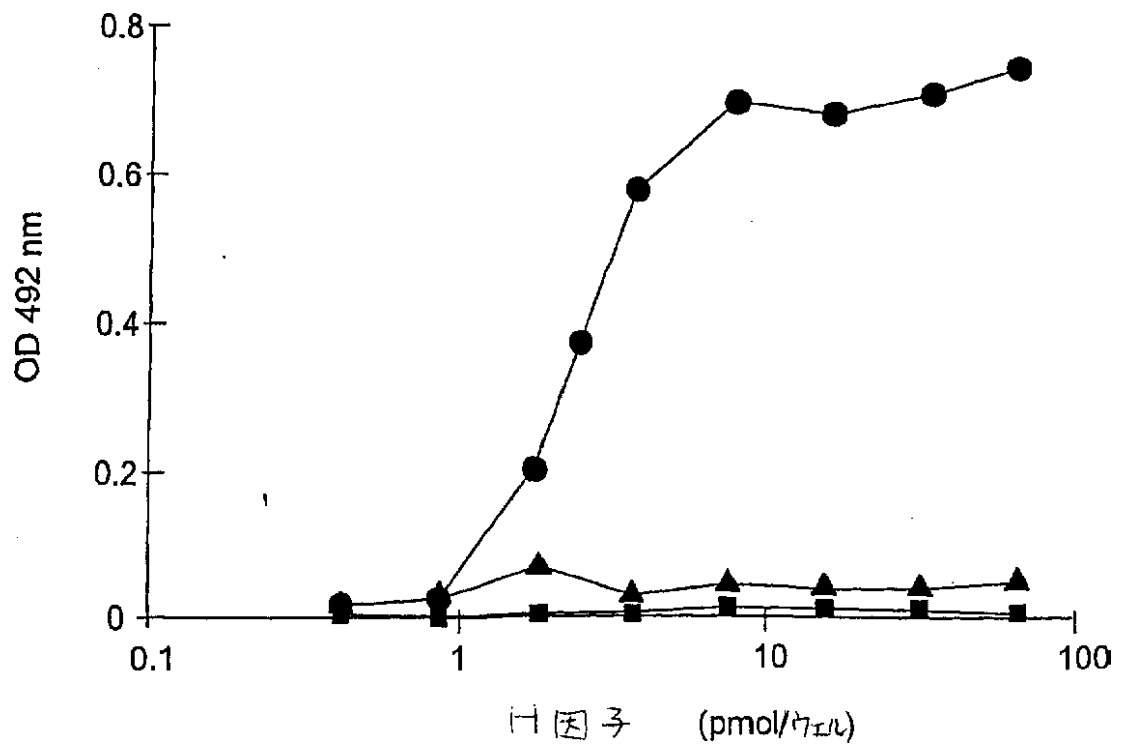
【図10】

FHR-5	SCR	1	EGTLCDFPKIHGFLYDEEDYMFQVPTGEVYFYSCYVNFVSPKSFWTRITCTEEGWSPTPKCL	%相同
FHR-1	SCR	1	. A . P N K . X N	89.4%
FHR-2	SCR	1	. AMF N K . K A	87.9%
FHR-5	SCR	2	RMCSFPFVKNGHSESSGLHLEQDVTQIICNTGYSLQNNNEKNISCVERGWSPTPICST	
FHR-1	SCR	2	. L . P E QT R N K . RS .	83.0%
FHR-2	SCR	2	. L . P E QT R N K . RS .	83.0%
FHR-5	SCR	3	KGECHVPILEANVDAQPKKESYKVGQVLFKSCRKNLIRVGSQVQCYQFGWSPNPTCK	
FH	SCR	10	ER EL . KIDVHLVPDR DQY B KPGFTI PNS H . . L . DL . I . .	47.5%
FHR-5	SCR	4	QQVRSQGPPLQSLNGEVKEIRKEEYGHNEVVEYDCNPNFINGPKKIQCVDGEWTLPTCV	
FH	SCR	11	E . . . Q E . L . N KT S Y R . LMK . N V .	173.8%
FHR-5	SCR	5	EQVKTCCGYIPELEYGVQPSVPPYQHVSZYVNCRNEYAMIGNNMITCINGIWTCLPMCV	
FH	SCR	12	VEES D H . WA . L . S YY . D F SESFT HRS H . Y . . Q . . Q . .	56.7%
FHR-5	SCR	6	ATHQLKRCRCKIAGVNIKTLKLSGKEFNHNSRIRYRCSDIFRYMHSVCINGKWNPEVDCT	
FH	SCR	13	. IDK K SSNLI . LEEHLKKN D N ROKEGWJ . T R . D N . S	47.5%
FHR-3	SCR	7	EKREQFCPPQIPNAQNMITTYNYQDGEKVAVLCKENYLLPEAKEIVCKDGRWQSLPCV	
FH	SCR	14	MAQI . L SH L . R S Q IQ . GE . . T I . . L . .	70.5
FHR-5	SCR	8	ESTAYCGPPPSINNGDTSFPLSVYPPGSTVTYRCQSFYKLOGSVTVTCRANKQWSEPPRCL	
FH	SCR	19	D . . GK PID I A . A . S . E . Q . . NL . Q . E . NKRI G K . .	67.2%
FHR-1	SCR	4	D . . GK PID I A . A . S . E . Q . . NL . Q . E . NKRI G K . .	62.3%
FHR-2	SCR	3	I . AE G PID I L A S . E . Q . . NL . Q . E . NNQI G K . .	63.9%
FHR-2	SCR	4	N . SEK PIS L . K . V . Q . R . E . Q Y . E NY S . GE . . A I	65.6%
FHR-4	SCR	4	N . SEK PIS L . K . V . Q . R . E . Q Y . E NY S . GE I	63.9%
FHR-5	SCR	9	DPCYVSEENNMMNKNQIKWRNDGKLYAKTODAVEFQCKFPHKAMISSPPFRAICQEGKFEYPICE	
FH	SCR	20	H I . R . I ENY . . A . RWTAKQ SR ES V RGYRLSSRSHTL . TT . WD . L T . AKR	41.8%
FHR-1	SCR	5	H I . R . I ENY . . A . RWTAKQ LR ESAEFV RGYRLSSRSHTL . TT . WD . L T . AKR	41.7%
FHR-2	SCR	4	D I . Q . I EKY . . K . KWT . KQ SR I V RGYHPTKS . HS . . AM . . N . LV . . S . . EK	55.2%
FHR-3	SCR	5	H IT K G . S . R . Y TIEFM LGYN . NTS . LS . Q . V . R . . IV R . .	58.5%
FHR-4	SCR	5	H IT QLKCKS . . I . Y TIEFM LGYN . NTSVLS . Q . V . R . . IV R . .	58.5%

【図11A】



【図11B】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 01/07868
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C12N15/12 C12N5/10 C07K16/18 G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	MCRAE ET AL: "Human factor H-related protein 5 (FHR-5)" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, 2 March 2001 (2001-03-02), pages 6747-6754, XP002183722 * See page 6751 (Figure 4 & Discussion) *	I-30
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 22 November 2001		Date of mailing of the international search report 06/12/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2048, Tx 31 651 epo nt, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Korsner, S-E

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト' (参考)	
C 1 2 N	1/21	C 1 2 N	7/00	
	5/10	G 0 1 N	33/53	Y
	7/00		33/577	B
G 0 1 N	33/53	C 1 2 P	21/08	
	33/577	C 1 2 N	15/00	Z N A A
// C 1 2 P	21/08		5/00	A

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA44 BA61 BA80 CA04
CA07 CA09 CA12 CA20 DA01
DA02 DA05 DA06 DA12 DA20
EA02 FA02 FA07 GA11 GA14
GA18 HA03 HA13 HA14 HA15
4B064 AG27 CA01 CA10 CA19 CA20
CC01 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA58X AA72X AA90X
AA93Y AA98X AB01 AC14
BA02 BB01 BC03 CA24 CA44
CA46
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
BA41 CA40 DA76 DA86 EA20
EA50 FA71 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	新因子H相关蛋白5及其抗体		
公开(公告)号	JP2003527115A	公开(公告)日	2003-09-16
申请号	JP2001567785	申请日	2001-03-13
[标]申请(专利权)人(译)	圣瓶美分医院		
申请(专利权)人(译)	圣Binsentsu医院		
[标]发明人	マーフィーブレンダンエフ		
发明人	マーフィー, ブレンダン エフ.		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/577		
CPC分类号	C07K14/47 C07K16/18 C12N2799/026		
FI分类号	C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 G01N33/53.Y G01N33/577.B C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA61 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/DA20 4B024/EA02 4B024/FA02 4B024/FA07 4B024/GA11 4B024/GA14 4B024/GA18 4B024/HA03 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AA98X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB01 4B065/BC03 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	60/188870 2000-03-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及新型人蛋白质，因子H相关蛋白质5 (FHR-5)，与FHR-5基本相同的蛋白质以及针对这些蛋白质的抗体。公开了新型的人因子H相关蛋白 (FHR-5)。本发明的范围包括FHR-5的氨基酸序列，编码FHR-5的氨基酸序列的核酸序列以及它们基本相同的氨基酸序列和核苷酸序列。包含本发明的核苷酸序列的载体，包含本发明的核苷酸序列的转基因宿主细胞和与FHR-5蛋白反应的抗体也在本发明的范围内。

