

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-517619

(P2008-517619A)

(43) 公表日 平成20年5月29日(2008.5.29)

(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 0 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-538806 (P2007-538806)
 (86) (22) 出願日 平成16年10月28日 (2004.10.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年6月7日 (2007.6.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2004/002739
 (87) 国際公開番号 W02006/046786
 (87) 国際公開日 平成18年5月4日 (2006.5.4)

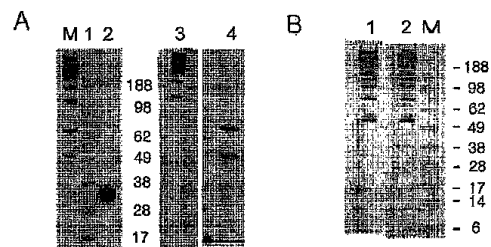
(71) 出願人 507140298
 ドゥビエル カンパニー リミテッド
 大韓民国 462-716 キョンギード
 ウ ソンナムーシ ユンウォンーク サン
 デウォンードン 434-6 ビョックサ
 ンテクノピア ナンバー 406
 (74) 代理人 100065215
 弁理士 三枝 英二
 (74) 代理人 100076510
 弁理士 掛樋 悠路
 (74) 代理人 100099988
 弁理士 斎藤 健治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高分子形マンノース結合型レクチンの大量生産方法

(57) 【要約】

本発明は、ヒトマンノース結合型レクチンのコード領域の配列を含むベクターによって形質転換された組換えヒトマンノース結合型レクチン (rhMBL) 生産用 CHO細胞株で高分子形の組換えヒトMBLを大量生産する方法、及びバクテリアまたはカビのような微生物による感染及び/または免疫欠乏の予防及び治療のために前記方法によって製造された組換えヒトMBLの治療学的用途に関するものである。特に、本発明の組換えヒトMBLは、ウイルス、バクテリアまたはカビによって感染した個体を治療するのに有用なので、補体系を活性化するための開始剤として使用されるだけでなく、ヒトMBLを検出する診断用キットの製造にもまた有用に使用できる。



(A) SDS-PAGE analysis of purified MBL

lane 1: purified rhMBL, non-reducing condition;
 lane 2: purified rhMBL, reducing condition;
 lane 3: larger form fraction of rhMBL;
 lane 4: smaller form fraction of rhMBL;
 lane M: molecular weight marker

(B) Western blot analysis of purified MBL

lane 1: purified rhMBL, non-reducing condition;
 lane 2: natural MBL partially purified from human plasma;
 lane M: molecular weight marker

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトマンノース結合型レクチン (human mannose binding lectin) コード領域の配列を含む、図 1 の遺伝子地図に図示された発現ベクター pMSG-MBL。

【請求項 2】

請求項 1 の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 3】

CHO (Chinese hamster ovary) 細胞、肝細胞 (hepatocyte)、HEK (human embryonic kidney) 細胞からなる群から選択される、請求項 2 に記載の宿主細胞。

10

【請求項 4】

KCTC (Korean Collection for Type Culture) 10472BP として寄託された CHO 細胞株 MBL/D1-3 である、請求項 2 に記載の宿主細胞。

【請求項 5】

(1) ヒトマンノース結合型レクチンコード領域の配列を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を提供する工程；

(2) 前記ヒトマンノース結合型レクチンのコード領域配列を培養システムで発現させて組換えヒトマンノース結合型レクチンを生産する工程；及び

20

(3) 工程 (2) の組換えヒトマンノース結合型レクチンを精製する工程を含む、高分子形の組換えマンノース結合型レクチンの大量生産方法。

【請求項 6】

形質転換された宿主細胞が、KCTC 10472BP として寄託された CHO 細胞株 MBL/D1-3 である、請求項 5 に記載の大量生産方法。

【請求項 7】

前記工程 (2) が、

無血清 / 無タンパク培地で細胞を浮遊培養する工程；及び

無血清 / 無タンパク培地で適応した細胞を順次にスケールアップしながら継代培養して多重合体形態の組換えヒトマンノース結合型レクチンタンパク質を大量生産する工程である、請求項 5 に記載の大量生産方法。

30

【請求項 8】

前記精製工程 (3) が、

(a) 陰イオン交換クロマトグラフィー法を使用して多重合体からなる高分子形の組換えマンノース結合型レクチンタンパク質試料を分画化する工程；

(b) B 型肝炎ウイルスプレ S が付着した基質を充填してカラムを製造する工程；

(c) 前記カラムを平衡化させた後に組換えマンノース結合型レクチンタンパク質試料をカルシウムイオンの存在下でカラムに投入して高分子形の組換えマンノース結合型レクチンタンパク質を前記 B 型肝炎ウイルスプレ S に特異的に結合させる工程；及び

(d) 前記組換えマンノース結合型レクチンタンパク質が結合されたカラムに EDTA または EGTA 緩衝液を流し入れて高分子形の組換えマンノース結合型レクチンタンパク質のみを溶出させる工程である、請求項 5 に記載の大量生産方法。

40

【請求項 9】

前記マンノース結合型レクチン結合型糖化タンパク質が、プレ S 糖化ウイルス性外皮タンパク質 (envelope protein)、糖化バクテリア性タンパク質、糖化カビ性タンパク質及び人工合成糖化タンパク質からなる群から選択される、請求項 5 に記載の大量生産方法。

【請求項 10】

i) 抗ヒトマンノース結合型レクチン抗体またはプレ S タンパク質がテストライン (test line) に固定された支持体；

50

i i) 前記支持体の下端部に連結されて染料接合体が吸着された染料パッド（ここで、コントロールライン（control line）に抗ヒトマンノース結合型レクチン抗体を固定した場合には、前記染料接合体は抗マウスIgG抗体-ゴールドパーティクルで、コントロールラインにプレスタンパク質を固定した場合には、前記染料接合体はプレスタンパク質に対する抗体-ゴールドパーティクルである）；及び

i i i) 前記染料パッドの下端部に連結されたサンプルパッドを含む組換えヒトマンノース結合型レクチン検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高分子形の組換えヒトマンノース結合型レクチン（rhMBL）の大量生産方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

マンノース結合型レクチン（mannose binding lectin：以下「MBL」と略称する）は、先天性免疫を担当している血清タンパク質で、その分子量は32kDaで、カルボキシ-末端部位の炭水化物認識ドメイン（C-terminal carbohydrate recognition domain、CRD）、コラーゲンドメイン及びアミノ-末端部位のシステイン豊富地域（cysteine rich region）からなっている。前記コラーゲンドメインは、3個の分子が三重らせん構造を形成して、3個のMBL分子からなる一つの複合体を形成した後、再びアミノ-末端部位のシステインによる内部分子間の二硫化結合（-s-s-）を通じて6個の複合体が結合することにより、総18個からなる巨大なMBL分子を形成する。

【0003】

また、MBLは、MBL関連セリンプロテアーゼ（MBL associated serine proteases；MASP-1、MASP-2またはMASP-3）またはMBL関連タンパク質（MBL associated protein；Map19）のような他のタンパク質と結合する。MBLは、全体分子構造及び機能面で補体系（complement system）中の古典的な経路（classical pathway）の第1成分であるC1qと類似であるが、C1qとは異なりレクチン経路（lectin pathway）を通じてC4とC2を分割することにより補体系を活性化させる。MBLによる補体系の活性化は、抗体が形成される前に微生物感染に対する1次的な防御の役割をする。すなわち、補体系の活性化によってMBLの炭水化物認識ドメイン（CRD）が、微生物表面に存在する表面タンパク質の独特の糖化形態（glycosylation pattern）を認識して微生物と複合体を形成する。ここで前記複合体は、セリンプロテアーゼの前駆体であるMASP-1またはMASP-2のプロテアーゼ活性を誘導して補体系のC4とC2をC4b2aに活性化させて、窮極的にはC3bを形成して補体系を活性化させる。また、補体系を成すタンパク質の中で一部は、オプソニン（opsonin）として作用して微生物表面に直接結合することにより大食作用または中性白血球による食菌作用（phagocytosis）を誘導するが、MBLもまた、自体がオプソニンとして作用して微生物に直接結合することにより食細胞による食菌作用を誘導する。また、ある程度活性化されたタンパク質は、膜攻撃性複合体（membrane attacking complex、MAC）を形成して侵入した微生物を直接分解したりし、それ以外にも活性化過程で生成された補体タンパク質切片は、強い炎症反応を起こすサイトカインの分泌を促進することによって外来物質が存在する部位に白血球を集めるようにする。

【0004】

以前報告されたように、CHO細胞、またはHLF肝臓癌細胞、骨髄腫細胞またはHEK293EBNA細胞を含む多様な細胞でMBL遺伝子が発現されることが明らかにされた。特に、CHO細胞では、MBL遺伝子が高収率で発現されたが、回収されたMBL

10

20

30

40

50

は主に活性がない単量体または二量体の分子で、MBLの活性を示す高分子形重合体の生産量は非常に低いという問題があり(Katsuki Ohtani等、J. Immunol. Methods, 1999年, 第222巻, 135-144頁)、HEK293EBNA細胞では、多重合体形態に発現したが、発現量が $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満で非常に低く、MBL生産細胞株としては適当ではなかった(T. Vorup-Jensen等、International Immunopharmacology, 2001年, 第1巻, 677-687頁)。

【0005】

中性白血球(neutrophil)、大食細胞(macrophage)等のような食菌作用をする細胞は、外部から侵入した微生物または異物を食菌作用及び直接的な溶菌によって効果的に除去する重要な役割をするだけでなく、APC(antigen presenting cell)として作用する大食細胞は、T-細胞を活性化させてインターフェロンガンマ、TNFまたはIL-12の分泌を誘導することにより後天性免疫反応もまた効果的に誘導する。すなわち、補体系を活性化することができる高分子形態のMBLは、先天性免疫反応に関与して人体での1次防御に重要な役割を果たすだけでなく、後天性免疫反応を誘導するのにおいても重要な役割をする。

10

【0006】

ヒト血清内MBLの量は、MBL遺伝子の遺伝的変異によって $50\text{ng}/\text{ml}$ 以下から $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の範囲で個人によって多くの差が見られ。例えば、MBL遺伝子中エクソン(exon)1の52番、54番または57番に点突然変異が発生すると、MBL分子間の複合体を形成することができなくてその活性が阻害される。また、MBL遺伝子のプロモーター部位に突然変異が発生する場合にも、MBLの発現量に影響を及ぼし得る。一般的に血中MBLの量が少ない人、特に新生児または免疫力が弱化した成人は、微生物感染に対する感受性が増加することが知られている(Sumiyama, M.等, Lancet, 1991年, 第337巻, 1569-1570頁; Summerfield, J. A.等, Lancet, 1995年, 第345巻, 886頁; Garred, P.等, Lancet, 1995年, 第346巻, 941頁; Summerfield, J.等, Br. Med. J., 1997年, 第314巻, 1229頁; Mullighan, C. G.等, Scand. J. Immunol., 2000年, 第51巻, 111-122頁; Neth, O.等, Lancet, 2001年, 第358巻, 614-618頁; Peterslund, N. A.等, Lancet, 2001年, 第358巻, 637-638頁; Mullighan, C. G.等, Blood, 2002年, 第99巻, 3524-3529頁)。

20

30

【0007】

また、B型肝炎ウイルス感染患者を対象にした研究(Hakozaki Y.等、Liver, 2002年, 第22巻, 29-34頁)では、B型肝炎ウイルスの感染によって劇症肝炎(Fulminant hepatic failure)に進展した患者たちの血漿内MBLの量が $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上なら死亡率が0%で、 $1.5\mu\text{g}/\text{ml}$ なら死亡率が54%であり、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下なら死亡率がほぼ80%以上に達し、このような感染は、血漿内MBLの量に依存することが示された。したがって、MBL量が低い人にMBLを補充してやればこのような感染可能性を下げるができる。

40

【0008】

前記のような治療目的に組換えMBLを使用するために組換えMBLは、活性を示す多重合体の形態で大量発現されなければならないが、いまだに活性形態の組換えMBLを大量生産する方法が明らかにされていないのが実情である。

【0009】

したがって、本発明者等は、MBL結合型糖化タンパク質及びセリンプロテアーゼの存在下にMBL結合型糖化タンパク質に特異的に結合して補体を活性化する組換えMBLを解明するために鋭意研究努力した結果、ヒトMBLのコード領域の配列を含む発現ベクターで形質転換されたCHO細胞株から治療目的に使用できる活性形態の組換えヒトMBL

50

を多重合体形態で大量生産することができることを確認して本発明を完成した。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

したがって、本発明は、組換えヒトマンノース結合型レクチン (recombinant human mannose binding lectin, rhMBL)、ヒトMBLのコード領域の配列を含むベクター、前記ベクターによって形質転換された組換えヒトMBL生産用CHO細胞株、前記CHO細胞株での組換えヒトMBLの大量生産方法、及び微生物による感染及び/または免疫欠乏の予防及び治療のための組換えヒトMBLの用途に関するものである。

10

【0011】

また、本発明は、i) 抗ヒトマンノース結合型レクチン抗体またはプレスタンパク質がテストライン (test line) に固定された支持体；ii) 前記支持体の下端部に連結されて染料接合体が吸着した染料パッド (ここで、コントロールライン (control line) に抗ヒトマンノース結合型レクチン抗体を固定した場合には、前記染料接合体は抗マウスIgG抗体-ゴールドパーティクルで、コントロールラインにプレスタンパク質を固定した場合には前記染料接合体はプレスタンパク質に対する抗体-ゴールドパーティクルである)；及びiii) 前記染料パッドの下端部に連結されたサンプルパッドを含む組換えヒトMBL検出用キット、前記MBL検出用キットの製造方法、及び前記MBL検出用キットを使用してMBLを検出する方法に関するものである。

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

前記目的を果たすために、本発明は、ヒトMBLコード領域の配列を含む、図1の遺伝子地図に開示された発現ベクターpMSG-MBLを提供する。

【0013】

また、本発明は前記発現ベクターで形質転換された宿主細胞株を提供する。

【0014】

また、本発明は、

(1) ヒトMBLコード領域の配列を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を提供する工程；

30

(2) 前記ヒトMBLコード領域配列を培養システムで発現させて組換えヒトMBLを生産する工程；及び

(3) 工程(2)の組換えヒトMBLを精製する工程を含む高分子形の組換えMBLの大量生産方法を提供する。

【0015】

また、本発明は、

i) 抗ヒトマンノース結合型レクチン抗体またはプレスタンパク質がテストライン (test line) に固定された支持体；

ii) 前記支持体の下端部に連結されて染料接合体が吸着した染料パッド (ここで、コントロールライン (control line) に抗ヒトマンノース結合型レクチン抗体を固定した場合には、前記染料接合体は抗マウスIgG抗体-ゴールドパーティクルで、コントロールラインにプレスタンパク質を固定した場合には、前記染料接合体はプレスタンパク質に対する抗体-ゴールドパーティクルである)；及び

40

iii) 前記染料パッドの下端部に連結されたサンプルパッドを含む、組換えヒトMBL検出用キットを提供する。

【0016】

また、本発明は、

(1) プレSまたは抗ヒトMBL抗体をゴールドパーティクルに結合させて染料接合体 (dye conjugate) を製造する工程；

(2) 前記染料接合体を染料パッドに吸着させる工程；

50

(3) 工程1においてプレスがゴールドパーティクルに結合する場合に支持体にテストライン(test line)として抗ヒトMBL抗体及びコントロールライン(control line)として抗プレス抗体を結合させたり、抗ヒトMBL抗体がゴールドパーティクルに結合する場合には支持体にテストライン(test line)として抗ヒトMBL抗体及びコントロールライン(control line)として抗マウスIgG抗体を結合させたりする工程；及び

(4) 前記支持体の下端部に前記染料パッド及びサンプルパッドを順次に付着させる工程を含むMBL検出用キットの製造方法を提供する。

【0017】

同時に、本発明は、

(1) 支持体の下端部に結合された染料パッドにMBLが含まれた試料を処理する工程；及び

(2) 支持体上のテストライン及びコントロールラインに抗体が結合することを確認する工程を含む、MBL検出用キットを使用してMBLを検出する方法を提供する。

【0018】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、MBL結合型糖化タンパク質及びセリンプロテアーゼの存在下にMBL結合型糖化タンパク質に特異的に結合して補体を活性化する組換えヒトMBLを形質転換された宿主細胞で発現させるのに十分であり、ヒトMBLコード領域の配列を含む、図1の遺伝子地図に開示された発現ベクターpMSG-MBLを提供する。

【0019】

本発明の一実施態様は、ベータグロビン遺伝子のMAR因子(Nuclear matrix attachment region element)逆方向体、SV40ウイルスのpoly-A及びガストリン(gastrin)遺伝子の転写終結因子の組合わせ体を含むpMSG(寄託番号KCCM(Korean culture center of microorganisms)10202)ベクターにヒトMBLcDNA(Gene Bank NM_000242)を挿入してpMSG-MBLベクターを製造することができる。

【0020】

また、本発明は、MBL結合型糖化タンパク質及びセリンプロテアーゼの存在下にMBL結合型糖化タンパク質に特異的に結合して補体を活性化する組換えヒトMBLを、形質転換された宿主細胞で発現させるのに十分であり、前記発現ベクターpMSG-MBLで形質転換された宿主細胞を提供する。

【0021】

本発明での宿主細胞は、通常的な動物細胞であり、好ましくはCHO(Chinese hamster ovary)細胞、肝細胞(hepatocyte)、HEK(human embryonic kidney)細胞などからなる群から選択することができる。

【0022】

本発明の一実施態様では、MBL結合型糖化タンパク質及びセリンプロテアーゼの存在下でMBL結合型糖化タンパク質に特異的に結合して補体を活性化する組換えヒトMBLを形質転換された宿主細胞で発現させるのに十分であり、前記発現ベクターpMSG-MBLをCHO細胞株に導入して形質転換体を製造して、前記形質転換体をMTX(methotrexate)の存在下で適応させて組換えヒトMBLを多重合体形態で大量発現する形質転換体を選別した。選別された形質転換体は、CHOMBL/D1-3と名付けて、2003年5月16日付けで大韓民国大田所在の遺伝子銀行(Korean Collection for Type Culture)に寄託して、寄託番号KCTC10472BPが付与された。

【0023】

本発明のMBL形質転換体で生産された組換えヒトMBLは、先天性免疫体系を活性化

10

20

30

40

50

することができない単量体または二量体のようなオリゴマー (oligomer) 形態ではない、ヒト由来の天然型 MBL と類似の多重合体 (multimerization) 形態のタンパク質であり、本発明の組換えヒト MBL は形質転換された CHO 宿主細胞で多重合体形態で非常に高い発現率を示す。したがって、前記形質転換体は、組換えヒト MBL を大量生産することができる細胞株として使用することができる。

【0024】

また、本発明は、

(1) MBL 結合型糖化タンパク質及びセリンプロテアーゼの存在下で MBL 結合型糖化タンパク質に特異的に結合して補体を活性化する組換えヒト MBL を形質転換した宿主細胞で発現させるのに十分であり、ヒト MBL コード領域の配列を含む前記発現ベクター pMSG-MBL で形質転換された宿主細胞を提供する工程；

(2) 前記ヒト MBL コード領域の配列を培養システムで発現して組換えヒト MBL を生産する工程；及び

(3) 工程 (2) の組換えヒト MBL を精製する工程を含む、組換えヒト MBL の生産方法を提供する。

【0025】

具体的には、本発明の工程 (1) で前記 MBL 結合型糖化タンパク質の例としては、B 型肝炎ウイルスのプレ S (pre S) を含む糖化ウイルス性外皮タンパク質 (envelope protein)、糖化バクテリア性タンパク質、糖化カビ性タンパク質及び人工合成糖化タンパク質を挙げることができる。

【0026】

本発明の好ましい実施態様で、工程 (1) で前記工程 (2) の組換えヒト MBL を生産する工程は、無血清 / 無タンパク培地で細胞を浮遊培養する工程；無血清 / 無タンパク培地で適応された細胞を継代培養することで順次にスケールアップして多重合体形態の組換えヒト MBL を大量生産する工程であることを特徴とする。

【0027】

本発明の好ましい実施態様で、前記工程 (3) は陰イオン交換クロマトグラフィー法及び B 型肝炎ウイルスプレ S の結合性を使用して、MBL 形質転換体の培養液から精製することができる。MBL 精製方法は、(a) 陰イオン交換クロマトグラフィー法を使用して多重合体を構成する高分子形組換えヒト MBL 試料を分画化する工程；(b) B 型肝炎ウイルスプレ S が付着した基質を充填してカラムを製造する工程、(c) 前記カラムを平衡化させた後、組換えヒト MBL 試料をカルシウムイオンの存在下にカラムに投入して組換えヒト MBL を前記 B 型肝炎ウイルスプレ S に特異的に結合させる工程；及び (d) 前記組換えヒト MBL が結合されたカラムに EDTA または EGTA が含まれた緩衝液を流し入れて組換えヒト MBL を溶出させる工程であることを特徴とする。

【0028】

前記 (a) 工程で、前記基質は通常的な陰イオン交換クロマトグラフィー法に使用されるもので、その例としては、Q-セファロースがある。ここで、単量体または二量体形態の MBL 試料は、NaCl が 150 乃至 200 mM 含まれた条件で分画され、多重合体形態の高分子形の組換えヒト MBL 試料は、NaCl が 350 乃至 400 mM 含まれた条件で分画される。

【0029】

前記 (b) 工程で、前記基質は通常的な親和性クロマトグラフィーに使用されるもので、その例にはセファロースがある。

【0030】

前記 (c) 工程で、カラムの平衡化は組換えヒト MBL を B 型肝炎ウイルスプレ S と結合させる時に使用される同一な溶液または緩衝液をカラムに流し入れることにより実施することができる。組換えヒト MBL を B 型肝炎ウイルスプレ S と結合させる場合には、カルシウムイオンの存在下で実施するのが好ましく、ここでカルシウムの濃度は 2 乃至 20 mM であることが好ましい。組換えヒト MBL 試料は、MBL 形質転換体の培養培地また

10

20

30

40

50

はMBL形質転換体の溶出物から修得された上澄み液であることができる。

【0031】

前記(d)工程で、組換えヒトMBLの溶出は、カルシウムイオンが含まれないEDTAまたはEGTA緩衝液を使用して実施する。前記緩衝液は、EDTAまたはEGTAが2乃至10mMの濃度で含まれた緩衝液、例えば蒸留水またはTris-Cl緩衝液であることができる。

【0032】

前記(d)工程以後に溶出物は、凍結乾燥したり、透析後凍結乾燥して精製された組換えヒトMBLを修得することができる。

【0033】

本発明の前記組換えヒトMBL精製方法は、形質転換体から生産された組換えヒトMBL以外にも天然の生体試料からMBLを精製するのに使用することができる。前記生体試料としては、血液、プラズマまたは血清(serum)が使用できる。

【0034】

また、本発明は、

- i) 抗ヒトマンノース結合型レクチン抗体またはプレスタンパク質がテストライン(test line)に固定された支持体；
- ii) 前記支持体の下端部に連結されて染料接合体が吸着した染料パッド(ここで、コントロールライン(control line)に抗ヒトマンノース結合型レクチン抗体を固定した場合には、前記染料接合体は抗マウスIgG抗体ゴールドパーティクルで、コントロールラインにプレスタンパク質を固定した場合には、前記染料接合体はプレスタンパク質に対する抗体ゴールドパーティクルである)；及びiii) 前記染料パッドの下端部に連結されたサンプルパッドを含む組換えヒトMBL検出用キットを提供する。

【0035】

本発明に使用され得る支持体としては、ニトロセルロース膜、ポリビニリデンジフルオライド(PVDF)及びナイロン膜(nylon membrane)を挙げることができる。また、本発明で使用できる染料パッドとしては、ポリエステル、グラスファイバー(glass fiber)などを挙げることができるが、それに限定されない。

【0036】

また、本発明は、

- (1) プレスまたは抗ヒトMBL抗体をゴールドパーティクルに結合させて染料接合体を製造する工程；
- (2) 前記染料接合体を染料パッドに吸着させる工程；
- (3) 工程(1)においてプレスがゴールドパーティクルに結合する場合に支持体にテストライン(test line)として抗ヒトMBL抗体及びコントロールライン(control line)として抗プレス抗体を結合させたり、抗ヒトMBL抗体がゴールドパーティクルに結合する場合には支持体にテストライン(test line)として抗ヒトMBL抗体及びコントロールライン(control line)として抗マウスIgG抗体を結合させたりする工程；及び
- (4) 前記支持体の下端部に前記染料パッド及びサンプルパッドを順次に付着させる工程を含む、MBL検出用キットの製造方法を提供する。本発明で使用できる染料接合体には、プレスタンパク質または抗ヒトMBL抗体を挙げることができるが、それに限定されない。

【0037】

同時に、本発明は、

- (1) 支持体の下端部に結合された染料パッドにMBLが含まれた試料を処理する工程；及び
- (2) 支持体上のテストライン及びコントロールラインに抗体が結合することを確認する工程を含む、MBL検出用キットを使用してMBLを検出する方法を提供する。

【0038】

10

20

30

40

50

特に、本発明の組換えヒトMBLは、ウイルス、バクテリアまたはカビによって感染した個体を治療するのに有用なので、補体系を活性化するための開始剤として使用されるだけでなく、組換えヒトMBLを検出する診断用キットの製造にもまた、有用に使用できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0039】

以下、本発明を実施例によって詳しく説明する。

但し、下記の実施例は本発明を例示するだけのものであって、本発明の内容が下記の実施例に限定されるものではない。

【実施例】

10

【0040】

実施例1：MBL形質転換体製作及び組換えヒトMBLの発現

1-1. 発現ベクター製作

ヒトの肝細胞 (hepatocyte) cDNAライブラリからPCR法によって修得されたMBL cDNAをpEZベクターにクローニングしてpEZ-MBL2-5を製造して、報告されたMBL塩基配列とMBL cDNA塩基配列を比べた (Gene Bank NM_000242)。鑄型としての前記pEZ-MBL2-5、及び順方向プライマー1及び逆方向プライマー2のセットを使用して、PCRを実施することにより約750bpのMBL cDNAを増幅した。プライマー各々は、制限酵素認識配列及びコザック配列 (Kozak sequence) を含んでいて、暗号化部位全体を増幅することができる。続いて、MBL cDNAをpMSGベクター (寄託番号KCCM10202) にクローニングしてpMSG-MBLを製造し、遺伝子配列分析法によって挿入されたMBL塩基配列を確認した (図1)。

20

【0041】

順方向プライマー1 (配列番号1)

ctagctagcc accatgtccc tgtttccatc actc (34mer)

逆方向プライマー2 (配列番号2)

gaagatctca gatagggaac tcacagacg (29mer)

30

【0042】

1-2. 宿主細胞へのpMSG-MBLの形質導入

1-2-1. pMSG-MBL発現プラスミドDNAの準備

pMSG-MBLを大腸菌 (E. coli) に形質転換させた後、得られた形質転換体をアムピシリン (Ampicillin; Sigma, 米国) 100 µg/mlを添加したLB培地100mlで培養して、プラスミドミディキット (QUIAPREP Plasmid Midi Kit; Qiagen, 米国) を使用してpMSG-MBL DNAを分離した。分離したDNAをSca I制限酵素で切断して線形化して、PCR生成物精製キット (QIAquick PCR product purification kit; Qiagen, 米国) で分離して使用した。

40

【0043】

1-2-2. 宿主細胞の準備

CHO DG44 (dhfr- / dhfr-) 宿主細胞を、10% cFBSを添加した - MEM培地で培養した後、血球計数器 (hemacytometer) を使用して細胞の数を測定した。10% cFBSを添加した - MEM培地に 2×10^5 細胞/ウェルで分注して、CO₂ 培養器で24時間培養した。

【0044】

1-2-3. 形質転換

pMSG-MBLベクター2 µgをDospertTM 5.3 µl、pDCH1Pベクター (DHFR遺伝子を含むプラスミド; Venolia, L. 等., Somat. Cell Mol. Genet. 1987年, 第13巻, 491-501頁) DNA16 ngと

50

混合して常温で45分間反応させて、それを宿主細胞に添加した。37℃で6時間培養した後、培地を除去して、新鮮な10% c F B Sを含む - M E M培地を3ml / ウェルで添加して再び培養した。2乃至3日後、形質転換された細胞が十分に成長した時にトリプシンを処理し、続いて細胞(4 × 10⁵細胞 / ウェル)に10% d F B Sを含む - M E M (w / o)培地2mlを添加した後、それを培養した。2乃至3日間隔で培地を交換しながら顕微鏡で細胞の状態及び単一コロニーの生成有無を観察し、10日後に初期適応した細胞を得た。

【0045】

1 - 3 . M B L 発現細胞株の選別及び発現量の増幅

初期適応した細胞を得た後、培地に添加したM T X (m e t h o t r e x a t e) 濃度を段階的に増加させることにより、導入遺伝子の増幅を誘導した。初期適応した細胞を4 × 10⁵細胞 / ウェルで分注して、10nM M T Xを添加した培地(- M E M + 10% d F B S)で培養した。2乃至3日間隔で培地を交換しながらコンフルエント(c o n f l u e n c y)に至るまで培養した。前記細胞を4 × 10⁵細胞 / ウェルで再び分注した後に前記と同一な方法で100nM M T Xを添加した培地で適応させて、引き続き1uM M T Xの条件下で適応させた。上述したように導入した遺伝子の増幅過程を遂行する間、各工程で試料を採取してM B L 発現量の変化をウエスタンブロットによって観察した。M B Lは、培地に含有されたM T X濃度が高くなるにつれて発現量が増加することが示された。

【0046】

1 - 4 . 単一細胞株分離

M B L 発現効率が高い単一細胞株を選別するために、1uM M T X 培養条件で適応した細胞を0.5細胞 / ウェルで96ウェル平板に分注して、1uM M T Xを含んだ培地(- M E M + 10% d F B S)で培養した。約2週間後に単一コロニーが形成されると24ウェル平板に移して、それを継続的に培養して十分な数の細胞に増殖させた後、一部を凍結保管して、一部をウエスタンブロットによって細胞の発現量を比べた。多重合体を成す高分子形M B Lを多量発現することが確認された単一細胞D1 - 3形質転換体を細胞株に選別し、それをC H O M B L / D1 - 3と命名して、2003年5月16日付けで大韓民国大田所在の遺伝子銀行(K o r e a n C o l l e c t i o n f o r T y p e C u l t u r e)に寄託して、寄託番号K C T C 1 0 4 7 2 B Pが付与された。形質転換体で発現した組換えM B Lを非変性条件で電気泳動した結果、ヒト由来天然型M B Lと類似の多重合体(m u l t i m e r i z a t i o n)様相を示すことが明らかになった。

【0047】

1 - 5 . 形質転換体での組換えヒトM B L 発現量の測定

ヒト血清から精製 / 定量された天然M B Lと比べて形質転換体C H O M B L / D1 - 3での組換えヒトM B L 発現量を分析した。T25フラスコに5 × 10⁵個の細胞を分注して10% d F B Sを含む - M E M (w / o)培地で培養した。細胞が約90%のコンフルエント(c o n f l u e n c y)に至った時、培地(- M E M (w / o) + 5% d F B S)3mlを添加した後、4日間培養した。得られた培養液を10倍希釈してウエスタンブロットを遂行して天然型M B Lとの発現量を比べた。その結果、平板培養時に組換えヒトM B Lの発現量は、約50μg / 10⁶細胞 / 日であると示された。

【0048】

実施例2 : 組換えヒトM B Lの大量生産方法

2 - 1 . 無血清浮遊培養適応細胞株の確保

付着細胞であるM B L 発現細胞株を10% d F B S及び1uM M T Xを添加した - M E M (w / o)培地で培養した後、細胞を回収して、0.15%重炭酸ナトリウムを添加した無タンパク培地H y Q S F M 4 C H O培地(H y c l o n e、米国)100mlを含む250mlスピナーフラスコに5 × 10⁵細胞 / mlの濃度で接種した。スピナーフラスコでの培養は、37℃の5% C O₂インキュベーターで40rpmで攪拌しながら遂行した。細胞数が1.0乃至2.0 × 10⁶細胞 / mlに到達すると再び0.15

10

20

30

40

50

%重炭酸ナトリウム100mlを添加したHyQ SFM4CHO培地に 5×10^5 細胞/mlの濃度で接種して、前記のように培養を繰り返した。細胞の生存度 (cell viability) は、トリパンブルー色素排除法 (trypan blue exclusion method) で決定し、適応過程後半期には細胞が90%以上の生存度を維持した。

【0049】

無血清浮遊培養培地に適応した細胞株を 2.5×10^6 細胞/mlの濃度まで培養した後、細胞を回収して凍結培地に再懸濁して、 2.8×10^7 細胞/mlの濃度で凍結用バイアル (cryovial) に分注して液体窒素タンクに保存した。

【0050】

2-2. 無血清浮遊培養適応細胞株を使用した生物反応器 (bioreactor) 工程の開発

0.15%重炭酸ナトリウムを添加した無血清/無タンパク培地であるHyQ SFM4CHO培地100mlを含む250mlスピナーフラスコに浮遊培養細胞を 5×10^5 細胞/mlの濃度で接種した。細胞数が1.0乃至 2.0×10^6 細胞/mlに到達すると、HyQ SFM4CHO培地200mlを含む500mlスピナーフラスコに 5×10^5 細胞/mlの濃度で接種して培養して、再び細胞数が 2×10^6 細胞/mlに到達すると、HyQ SFM4CHO培地400mlを含む1,000mlスピナーフラスコに 5×10^5 細胞/mlの濃度で接種して培養した。前記のように順次的な方式でスケールアップ (scale up) して、 2.5×10^6 細胞/ml濃度の接種用細胞1

【0051】

準備した接種用細胞を7.5l (5l作業容積) 生物培養器に接種した後、50rpmで撹拌しながら34で5日間DO50で培養して目的とする培養液 (pH7.2乃至7.4) を修得した。

【0052】

実施例3: 高分子形の組換えヒトMBLの精製方法

MBLを大量発現するCHO細胞株をHyQ SFM4CHO培地で培養して、培養液を遠心分離した後に0.45 μ m膜を通過させて細胞を除去した。続いて、通常的な陰イオン交換クロマトグラフィー法及び親和性クロマトグラフィー法によって組換えヒトMBLを精製し、MBLエライザキットを使用してこれを定量化した。

【0053】

3-1. Qセファロースカラムを使用した多重合体含有試料の分画化

上澄み液のpHと伝導率を滴定した後、Qセファロースが充填されたカラムを通過させて単量体または二量体のような分子量が少ない形態 (smaller form) のタンパク質を除去して、多重合体を含む分子量が大きい形態 (larger form) のタンパク質を収集した。分子量が少ない形態のタンパク質試料を150乃至200mM NaClの緩衝液で分画して、分子量が大きい形態のタンパク質試料を350乃至400mM NaClの緩衝液で分画した。SDS-PAGE分析法によって組換えヒトMBL中で80%以上が多重合体形態である高分子形に発現されることを確認した (図2A)。

【0054】

3-2. プレS-セファロースカラムの製造

使用されたプレS組換えタンパク質は、B型肝炎ウイルスの表面タンパク質であるプレSタンパク質をサカロマイセスセレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) で発現して高糖化された形態に精製した (国際公開公報WO02/094866号)。

【0055】

CNBrで活性化になったセファロース4Bパウダー1gを1mM HClに溶解させた後、数回洗浄した。プレS組換えタンパク質をリガンドに使用するためにプレS組換えタンパク質6.4mgをカップリング緩衝液 (0.2M NaHCO₃、0.5M Na

10

20

30

40

50

Cl及びpH8.3)に0.5乃至10mg/mlの濃度になるように溶解させた。セファロース4B樹脂をプレS溶液と混合した後、常温で2時間反応させて、それをブロッキング緩衝液(0.1M TrisCl、pH8.0)に移して、再び常温で2時間反応させた。洗浄後、セファロースに結合されたプレSをウエスタンブロットで確認した。その結果、大部分のプレS組換えタンパク質がセファロース樹脂に結合するということが確認された。プレS組換えタンパク質が結合されたプレS-セファロース4B樹脂をカラムに充填して、組換えヒトMBLを精製するためのプレS-セファロースカラムを製造した。

【0056】

3-3. 組換えヒトMBL精製

プレS-セファロースが充填されたカラムを結合緩衝液(20mM Tris、150mM NaCl及び10mM CaCl₂、pH7.6)で平衡化させた後、組換えヒトMBLの培養培地をカラムに積載して組換えヒトMBLを吸着させて、結合緩衝液でカラムを数回洗浄した。続いて、Ca²⁺イオンが添加されない溶出緩衝液(20mM Tris、150mM NaCl及び5mM EDTA、pH7.6)をカラムに通過させて、組換えヒトMBLを溶出させた。得られた溶出液をSDS-PAGE分析法によって確認した結果、純度が99.9%である組換えヒトMBLが精製されたことを確認した(図2A及びB)。

【0057】

実施例4: 組換えヒトMBLの多重合体形成及び微生物表面への結合

4-1. 組換えヒトMBLの多重合体形成確認

精製された組換えヒトMBLが、花束形態の多重合体を形成するかどうかを確認するため、精製された組換えヒトMBLを非結晶質炭素で処理した後、透過型電子顕微鏡(transmission electron microscope、TEM)であるテクナイ(Tecnai)12(FEI、オランダ)を使用して、組換えヒトMBLの形態を観察した。その結果、精製された組換えヒトMBLは、花束形態の多重合体を成すことが確認された(図3)。

【0058】

4-2. 組換えヒトMBLとプレSが付着したゴールドパーティクルの結合

B型肝炎ウイルスの表面タンパク質であるプレSを使用したモデルシステムによって、組換えヒトMBLが微生物の表面に結合する方式を観察した。20乃至40nmサイズに該当するゴールドパーティクル表面に、プレSタンパク質を付着させて微生物の表面と類似の形態に製作して、カルシウムの存在下で組換えヒトMBLを添加した後、透過型電子顕微鏡のテクナイ(Tecnai)12を使用して組換えヒトMBLが結合された複合体形態を観察した。その結果、図4に図示されたように、組換えヒトMBLはプレSが付着したゴールドパーティクルを取り囲んでいる複合体形態の構造が観察された。実際に、組換えヒトMBLは、前記の方式で微生物表面にも付着して補体系を活性化して、微生物に対する防御をすることが分かった。また、組換えヒトMBLは、微生物がヒト細胞の表面に近付くことを遮断することによって、微生物の感染を抑制するということが分かった。

【0059】

実施例5: 組換えヒトMBLの結合活性試験

カルシウムイオンの存在下で組換えヒトMBLが、プレS及びマンナンに結合するかどうかを確認するために下記のように組換えヒトMBLの生物活性実験を実施した。

【0060】

50mMのカーボネート-バイカーボネート緩衝液に溶解されたマンナンまたはB型肝炎ウイルスプレSタンパク質をウェル当り1µgになるようにヌンクマキシソーブイムノプレート(Nunc Maxisorp Immunoplate)に添加して、4でひと晩コーティングした。それを洗浄緩衝液(20mM Tris、150mM NaCl、10mM CaCl₂、0.05% Tween-20、pH7.6)で4回洗浄した後、0.2% BSAで常温で1時間ブロッキングした。続いて、洗浄緩衝液で3回洗浄して、結合緩衝液(20mM Tris、1M NaCl、10mM CaCl₂、0.1% B

10

20

30

40

50

S A、0.05% Tween-20、pH 7.6) に溶解させた組換えヒトMBL 1 μ g を入れて、常温で2時間反応させた。洗浄緩衝液で6回洗浄した後、マウス単クローン性抗ヒトMBL 8F6 (mouse monoclonal anti-human MBL 8F6 (ドゥビエル、大韓民国)) を1:100に希釈して常温で2時間反応させた。抗マウスIgG-HRPを1:1500に希釈して常温で1時間反応させた後、OPD溶液150 μ lを入れて、20分間発色させた。3M HCl 50 μ lを添加して反応を停止させた後、492 nmでエライザ(ELISA)プレートリーダー(Multiskan Ex、Labsystems、米国)を使用してOD値を測定した。図5Aは、マンナン及びプレスタンパク質に対するヒト血漿-由来天然型MBLの結合性を示したもので、図5Bはマンナン及びプレスタンパク質に対する組換えヒトMBLの結合性を示したもので、天然MBL及び組換えヒトMBLは糖化されたプレS及びマンナンに類似の活性で結合する一方、BSAには結合しなかった(図5A及びB)。

10

【0061】

実施例6：高分子形組換えヒトMBLとオリゴマー型組換えヒトMBLの生物活性比較

多重合体を成す分子量が大きい形態と単一体及び二量体を含んだ分子量が小さな形態の組換えヒトMBLの生物活性を比べるために、プレSに対する結合実験とC4活性化実験を実施した。

【0062】

6-1. 糖化されたタンパク質プレSに対する結合試験

実施例5と同一な条件下でプレスタンパク質をヌンクマキシソーブイムノプレート(Nunc Maxisorp Immunoplate)にコーティングした後、結合緩衝液(20mM Tris、1M NaCl、10mM CaCl₂、0.1%BSA、0.05%Tween-20、pH 7.6)に溶解された組換えヒトMBLを200 ngから2倍数に希釈して添加して、37℃で1時間反応させた。ここで使用された組換えヒトMBLは、本発明で提供された多重合体形態の分子量が大きい高分子形の組換えヒトMBL(larger form)と単一体及び二量体を多量に含む分子量が小さな組換えヒトMBL(smaller form)を各々使用して活性を比べた。抗ヒトMBLマウス単クローン性抗体MB1B5(ドゥビエル、大韓民国)を1:10,000の割合に希釈して37℃で1時間反応させた。抗マウスIgG-HRPを1:10,000の割合に希釈して37℃で1時間反応させた後、100 μ l TMB溶液を入れて、30分間発色させた。続いて、反応停止液(H₂SO₄)50 μ lを添加した後、450 nmでエライザ(ELISA)プレートリーダーを使用してOD値を測定した。

20

30

【0063】

多重合体を成す分子量が大きい形態の高分子形組換えヒトMBLは、単一体及び二量体のようなオリゴマー型で主に成り立った分子量が小さな形態のタンパク質に比べてプレSに対する結合活性が非常に高いことが示された(図6)。

【0064】

6-2. 補体系でのC4活性化試験

ヌンクマキシソーブイムノプレート(Nunc Maxisorp Immunoplate)にウェル当り500 ngのプレSでコーティングして、そこに相違する濃度の組換えヒトMBLを添加して常温で2時間結合させた。MASPタンパク質供給源でMBLが欠乏した血清(MBL-free serum)を1:100に希釈して使用した。それを洗浄緩衝液で6回洗浄した後、C4 500 ngを入れて、常温で2時間反応させた。抗C4抗体-HRPを1:1500に希釈して常温で1時間反応させた後にOPD溶液150 μ lを入れて、20分間発色させて、C4b沈殿物(deposit)を測定した。3M HCl 50 μ lを添加した後、492 nmでエライザ(ELISA)プレートリーダーでOD値を測定した(図7)。ここで、組換えヒトMBLは、本発明で提供された多重合体形態の高分子形組換えヒトMBLと単一体及び二量体を多量に含む分子量が小さな組換えヒトMBLを各々使用して活性を比べた。図7に図示されたように、高分子形組換えタンパク質は優秀なC4活性化を誘導する一方、分子量が小さな形態のMBLは、

40

50

C4活性化をほとんど誘導することができなかった。したがって、本発明で提供された多重合体形態の組換えヒトMBLが、C4活性化を誘導することが確認された。

【0065】

実施例7：多様な微生物に対する組換えヒトMBLの結合試験

S. aureusを含む11種のグラム陽性菌(gram positive bacteria)、グラム陰性菌(gram negative bacteria)及び真菌を選別して前記各々の菌株に適合した液体培地で培養した。ヌンクマキシソーブイムノプレート(Nunc Maxisorp Immunoplate)にウェル当たり細胞数が 1×10^7 細胞/mlの濃度になるように4でひと晩中コーティングした。0.2%BSAを使用して37で1時間ブロックした後、結合緩衝液(20mM Tris、1M NaCl、10mM CaCl₂、0.1%BSA、0.05%Tween-20、pH7.6)に溶解された組換えヒトMBL500ngを入れて、37で1時間反応させた。抗ヒトMBLマウス単クローン性抗体MB1B5(ドゥビエル、大韓民国)を1:10,000の濃度に希釈して、37で1時間反応させた。抗マウスIgG-HRPを1:10,000の濃度に希釈して、37で1時間反応させた後、TMB溶液100 μ lを入れて、30分間発色させた。続いて、反応停止液(H₂SO₄)50 μ lを添加した後、450nmでエライザプレートリーダーを使用してOD値を測定した。

10

【0066】

本発明で使用した微生物は、微生物表面に対する組換えヒトMBLの結合力の差が多様な群から選択し、図8に図示したように、カンジダ・アルビカンス(C. albicans、インフルエンザ菌(H. influenzae ATCC51907)、黄色ブドウ球菌(S. aureus CCARM3197)及び黄色ブドウ球菌(S. aureus ATCC29213)は、組換えヒトMBLと高い結合力を示し、化膿連鎖球菌(S. pyogenes ATCC8668)、黄色ブドウ球菌(S. aureus CCARM3114)及び大便レンサ球菌(E. faecalis ATCC29212)は中間程度の結合力を示したが、肺炎桿菌(K. pneumoniae ATCC10031)、表皮ブドウ球菌(S. epidermidis ATCC12228)、表皮ブドウ球菌(S. epidermidis CCARM35048)、ヘシウム菌(E. faecium CCARM5028)は、組換えヒトMBLとの結合力が非常に低かった。したがって、組換えヒトMBLは、微生物表面の糖化された表面タンパク質パターンを認知して結合することが明らかになり、その結合程度は標的微生物によって相異することが分かった。

20

30

【0067】

実施例8：組換えヒトMBLによるSARSコロナウイルス(SARS-CoV)の感染抑制試験

サルの腎臓細胞FRhk-4をMEM培地に接種して培養して、得られた培養液に組換えヒトMBLを処理した後、SARSコロナウイルス(SARS-CoV)を感染させた。組換えヒトMBLは、2.5 μ g/mlの濃度で4倍ずつ順次に希釈して使用し、SARSコロナウイルスはサス感染患者から直接分離して使用した(Ksiazek T. G.等, N. Eng. J. Med, 2003年, 第348巻, 1953-1966頁; Peiris等, Lancet, 2003年, 第361巻, 1319-1325頁)。

40

【0068】

SARSコロナウイルスによる宿主細胞の感染有無を確認するため、SARS-CoVに特異的なプライマーを使用して定量的リアルタイムPCR(Quantitative Real-time PCR, GeneAmp PCR system, Applied Biosystems、米国)を実施した。対照群には培養液に組換えヒトMBLを処理しないでSARS-CoVによって感染したFRhk-4細胞を使用した。

【0069】

図9に図示したように、組換えヒトMBLを処理した場合には、濃度依存的にSARSコロナウイルスの感染を抑制し、組換えヒトMBLを2.5 μ g/mlで処理した場合、

50

対照群に比べてウイルスの増殖が約 15% 以下に抑制されることが分かった。

【0070】

図10は、位相差顕微鏡 (phase contrast microscope) で SARS コロナウイルスによって感染した FRhk-4 細胞を観察した写真で、図10の(1)では組換えヒトMBLを処理しない対照群で元気な細胞が観察されないが、図10の(2)乃至(6)では組換えヒトMBLが処理された実験群で元気な細胞が観察された。特に、使用された組換えヒトMBLの濃度が高くなるにつれて元気な細胞の数が増加することが分かった。

【0071】

実施例9：臨床試料に含まれたMBL量の測定

B型肝炎ウイルスのプレスタンパク質が、MBLに結合する能力を使用して血液、血清、唾液などを含む臨床試料中のMBLの量を測定する診断方法を開発した。

【0072】

9-1. ゴールドパーティクルとプレスタンパク質の結合

粒子サイズが、20乃至80nmのコロイド性ゴールドパーティクルを準備した後、pH6.0乃至8.0条件下でプレスタンパク質を添加して、室温で攪拌しながら反応させた。反応後、10%BSA(Bovine Serum Albumin)を最終濃度が0.3%(重量/体積)になるように添加して、室温で15分間攪拌しながら反応させて残り表面をブロックした。12,000rpmで15分間遠心分離して上澄み液を除去した後、ペレットを2%BSAが含まれた緩衝液に懸濁させた。前記のように製作した染料接合体(dye conjugate)は、コロイド性ゴールドパーティクル表面にプレスタンパク質が均一に結合し、ここでコロイド性ゴールドパーティクルによって赤色または紫色を示す。

【0073】

9-2. 診断用ストリップ(strip)製作

ニトロセルロース膜(S&S、米国)に通常的なインクジェットプリンターまたはスプレー型プリンターを使用してテストライン(test line)及びコントロールライン(control line)を引いて、前記通常的な方法によってテストラインには抗ヒトMBLマウス単クローン性抗体MB1B5(ドゥビエル、大韓民国)を結合させて、コントロールラインにはプレSに対する単クローン性抗体を結合させて診断用ストリップを製作した。診断用ストリップの支持体の下端部に連結された染料パッドであるポリエステルまたはグラスファイバー(glass fiber)には、染料接合体を吸着させて診断時に陽性または陰性を確認することができるマーカー(marker)として使用した。

【0074】

組換えヒトMBLが含まれた一滴の臨床試料を診断用ストリップの下端部に落とすと、臨床試料が毛細管現象及び拡散によってニトロセルロース膜にしたがって進行して、試料がテストラインに到達した場合にはMBL-プレS-ゴールドパーティクル複合体が抗ヒトMBLマウス単クローン性抗体と結合してラインが赤色に変わり、コントロールラインに到達した場合にはMBL-プレS-ゴールドパーティクル複合体及びプレS-ゴールドパーティクルがプレSに対する単クローン性抗体と結合してラインが赤色に変わった。したがって、試料中にMBLが存在する場合にはテストライン及びコントロールラインが陽性で示され、試料中にMBLが存在しない場合にはコントロールラインだけが陽性で示された(図11)。

【産業上の利用可能性】

【0075】

上述したように、本発明の高分子形組換えヒトマンノース結合型レクチン(rhMBL)は、ウイルス、バクテリアまたはカビによる感染を抑制する効果があるので、ウイルス、バクテリアまたはカビのような微生物、特にSARSコロナウイルスによる感染の予防及び/または治療に使用することができる治療剤の開発及び組換えヒトMBLを検出する

10

20

30

40

50

診断用キットの製造に有用に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0076】

【図1】 pMSG-MBL プラスミドベクターの遺伝子地図を示したものである。

【図2】 A及びBは、形質転換体CHOMBL/D1-3で生産された組換えヒトMBLを精製してSDS-PAGEとウエスタンブロットで確認したものである。

【図3】 組換えヒトMBLの電子顕微鏡写真である。

【図4】 組換えヒトMBLとプレS-ゴールドパーティクルナノパーティクル複合体の電子顕微鏡写真である。

【図5】 A及びBは、組換えヒトMBLが糖化されたタンパク質であるプレS (preS) またはマンナン (mannan) に特異的に結合することを示すグラフである。

【図6】 多重合体を成す分子量が大きい形態と単量体及び二量体で主に成り立った分子量が小さな形態の組換えヒトMBLが糖化タンパク質であるプレSに結合する活性を比べたグラフである。

【図7】 分子量が大きい形態と分子量が小さな形態の組換えヒトMBLがプレSに結合してC4を活性化する程度を比べたグラフである。

【図8】 組換えヒトMBLが多様な微生物表面に特異的に結合する程度を示すグラフである。

【図9】 組換えヒトMBLがSARSコロナウイルスによる感染を抑制する効果を示したグラフである。

【図10】 SARSコロナウイルスを感染させたFRhK-4細胞を位相差顕微鏡 (phase contrast microscope) で観察した写真である。

【図11】 組換えヒトMBLを使用した診断用ストリップの例を示した写真である。

【配列表フリーテキスト】

【0077】

配列番号1 MBL cDNA増幅のためのフォワードプライマー1

配列番号2 MBL cDNA増幅のためのリバースプライマー2

10

20

【 図 1 】

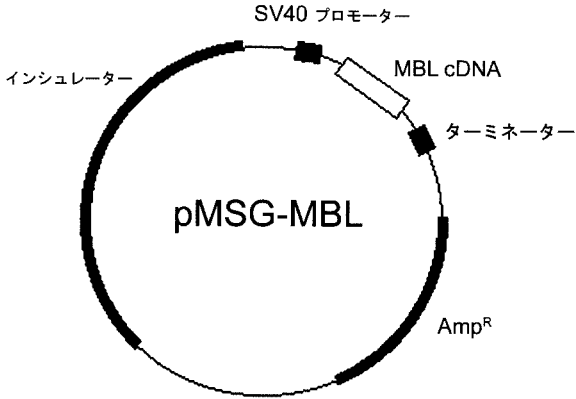


図1. pMSG-MBLプラスミドベクターの遺伝子地図

【 図 5 】

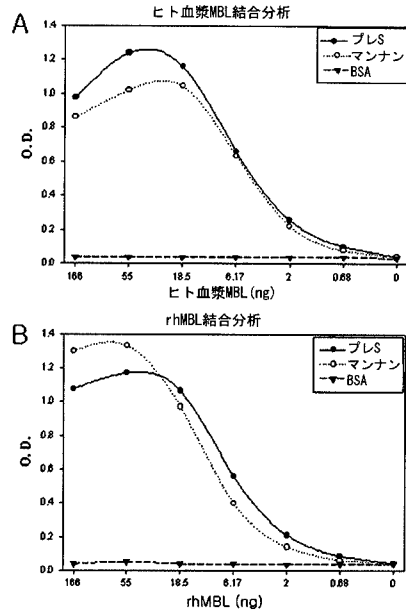


図5. 糖化タンパク質またはマンナンに結合するMBL
A: ヒト血漿MBL. B: rhMBL
ヒト血漿MBLおよびrhMBLの両方は、濃度依存的な方式でプレスおよびマンナンに類似な親和性で結合したが、BSAには結合しなかった。

【 図 6 】

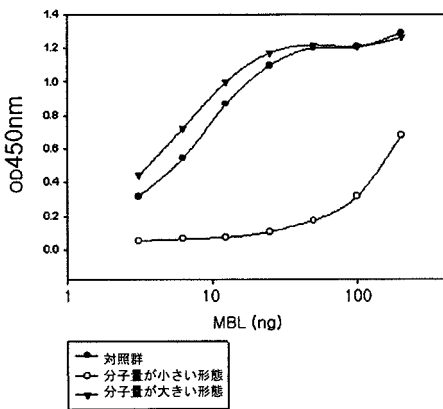


図6. 分子量が大きい形態および分子量が小さい形態のrhMBLの結合試験
分子量が大きい形態のrhMBLだけが対照群に相応するプレス結合活性を示す。

【 図 7 】

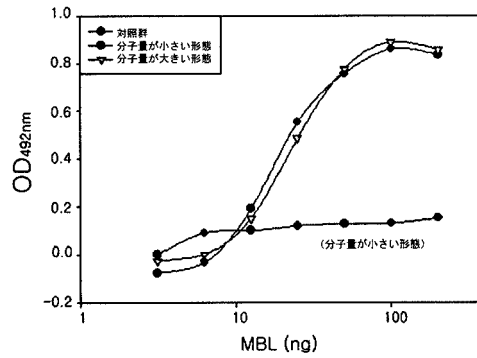


図7. 分子量が大きい形態および分子量が小さい形態のrhMBLを使用したC4活性化試験
分子量が大きい形態だけが対照群と類似なC4活性化を誘導したが、分子量が小さい形態はC4活性化を誘導しなかった。
MBL-無血清がMASP供給源に使用される。

【 図 8 】

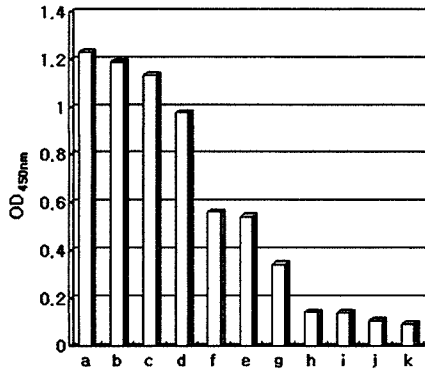
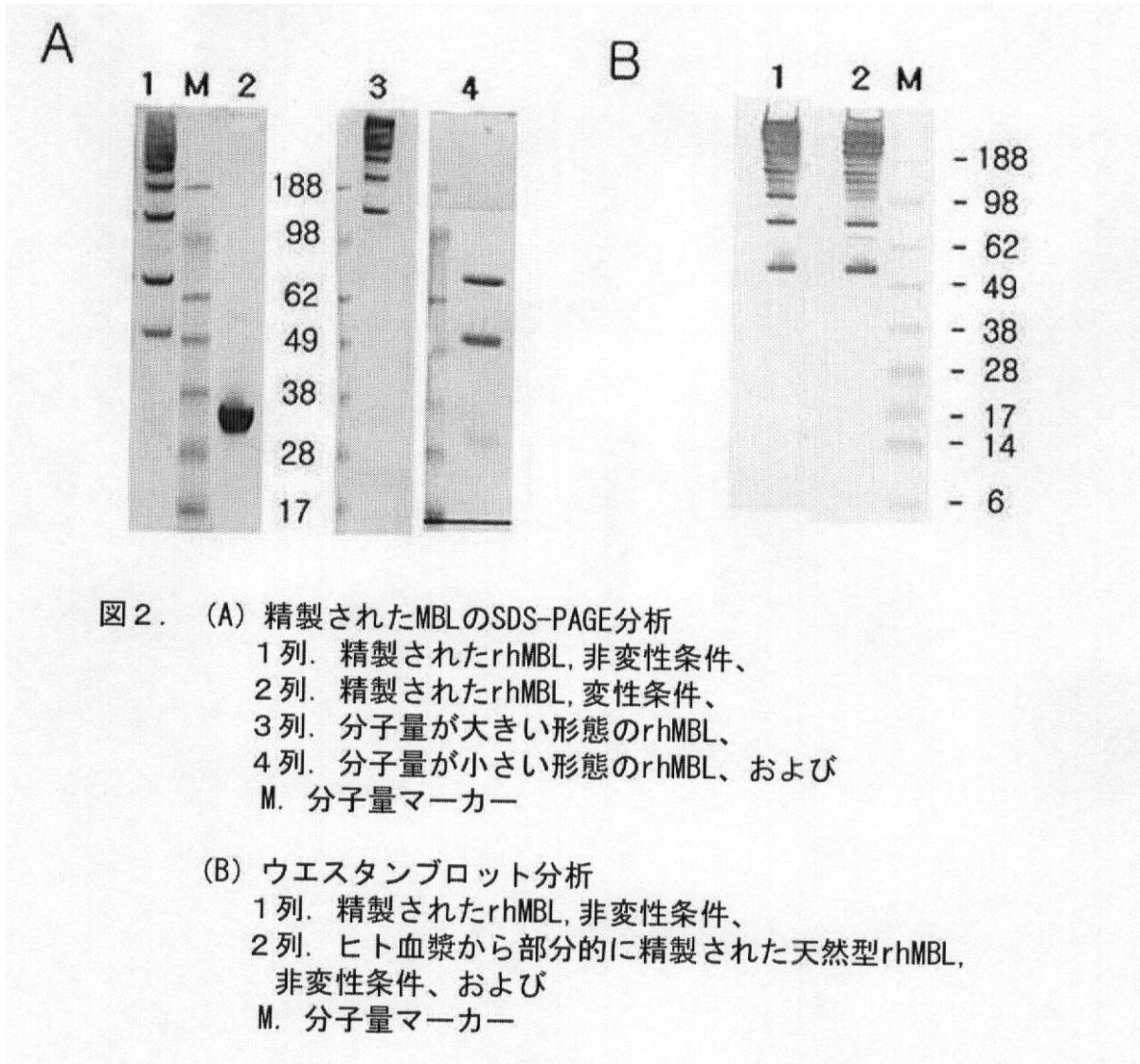


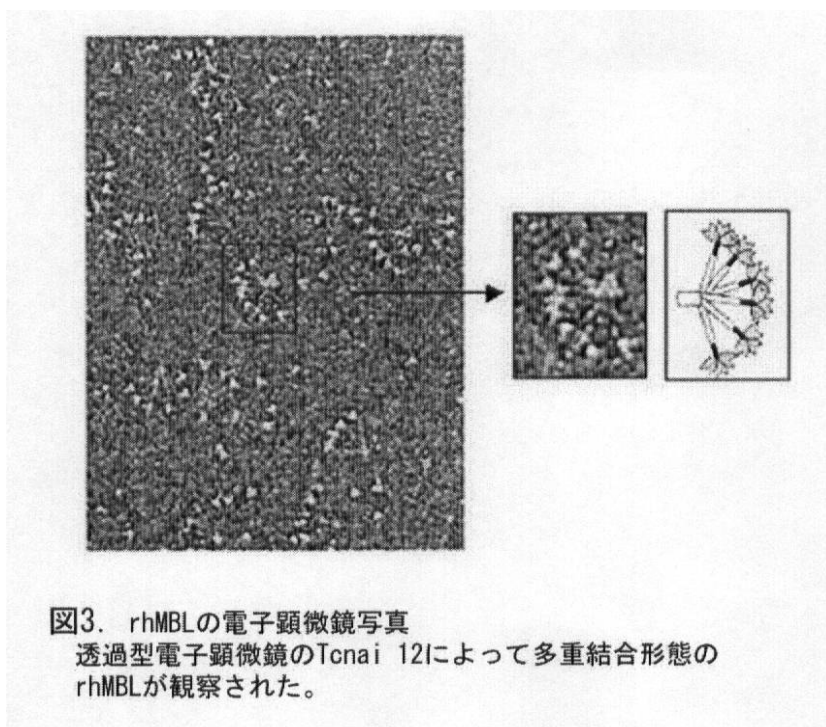
図8. 多様な微生物に対するrhMBLの結合試験

- (a) カンジダ・アルビカンス (*C. albicans*)
- (b) インフルエンザ菌 (*H. influenzae* ATCC51907)
- (c) 黄色ブドウ球菌 (*S. aureus* CCARM3197)
- (d) 黄色ブドウ球菌 (*S. aureus* ATCC29213)
- (e) 化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes* ATCC8668)
- (f) 黄色ブドウ球菌 (*S. aureus* CCARM3114)
- (g) 大便レンサ球菌 (*E. faecalis* ATCC29212)
- (h) 肺炎桿菌 (*K. pneumoniae* ATCC10031)
- (i) 表皮ブドウ球菌 (*S. epidermidis* ATCC12228)
- (j) 表皮ブドウ球菌 (*S. epidermidis* CCARM35048)
- (k) ヘシウム菌 (*E. faecium* CCARM5028)

【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】

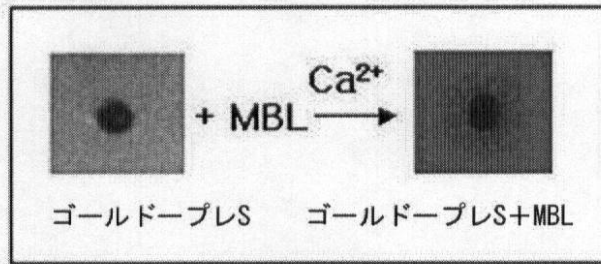


図 4. プレス-ゴールドナノパーティクルに結合したrhMBLの電子顕微鏡写真

透過型電子顕微鏡のTcni 12によってプレス-ゴールドナノパーティクルを取り囲んでいるrhMBLが観察された。

【 図 9 】

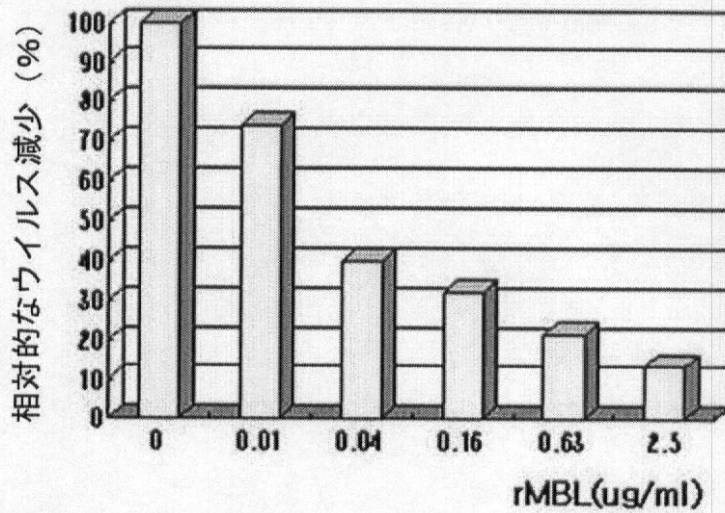


図 9. rhMBLによるSARS-CoV感染の抑制

rhMBLの増加する量の存在下にSARS-CoVはFRhK-4を感染させる。培養培地中のrhMBLは、rhMBLがない感染の15%未満までウイルス感染を減少させる。

【図10】

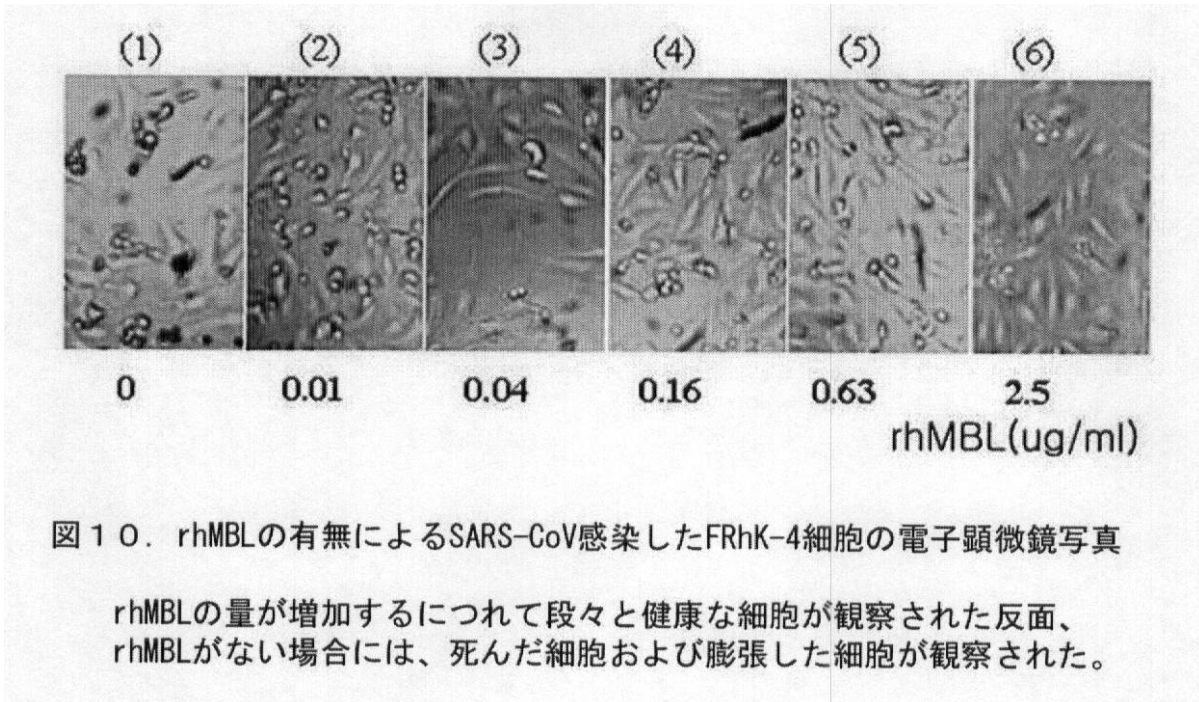


図10. rhMBLの有無によるSARS-CoV感染したFRhK-4細胞の電子顕微鏡写真

rhMBLの量が増加するにつれて段々と健康な細胞が観察された反面、rhMBLがない場合には、死んだ細胞および膨張した細胞が観察された。

【図11】

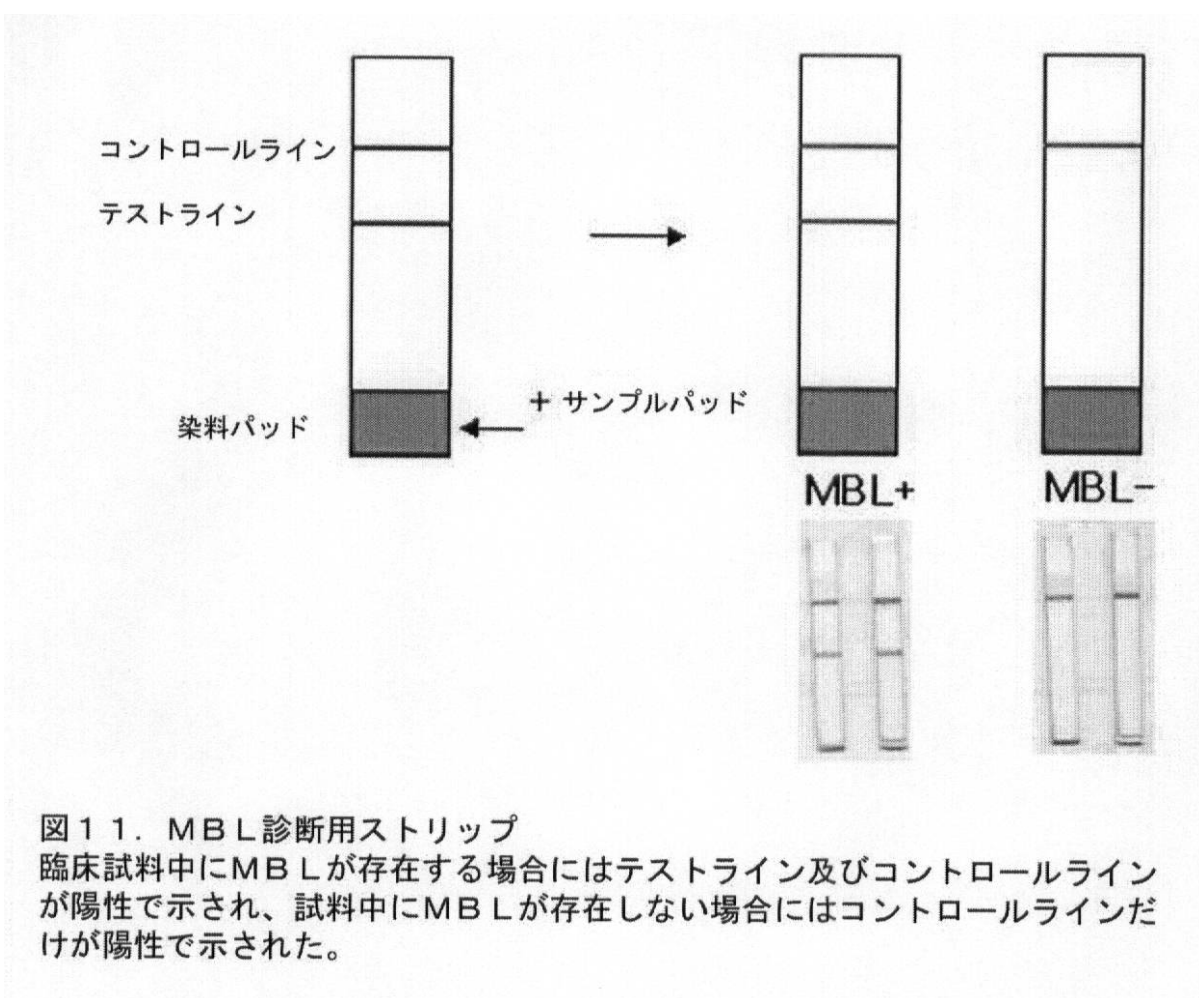


図11. MBL診断用ストリップ

臨床試料中にMBLが存在する場合にはテストライン及びコントロールラインが陽性で示され、試料中にMBLが存在しない場合にはコントロールラインだけが陽性で示された。

【配列表】

2008517619000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成19年6月18日(2007.6.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0060

【補正方法】変更

【補正の内容】



【0060】

50 mMのカーボネート - バイカーボネート緩衝液に溶解されたマンナンまたは肝炎B型ウイルスプレスタンパク質をウェル当り1 μ gになるようにヌンクマキシソープイムノプレート(Nunc Maxisorp Immunoplate)に添加して、4でひと晩コーティングした。それを洗浄緩衝液(20 mM Tris、150 mM NaCl、10 mM CaCl_2 、0.05% Tween-20、pH 7.6)で4回洗浄した後、0.2% BSAで常温で1時間ブロッキングした。続いて、洗浄緩衝液で3回洗浄して、結合緩衝液(20 mM Tris、1 M NaCl、10 mM CaCl_2 、0.1% BSA、0.05% Tween-20、pH 7.6)に溶解させた組換えヒトMBL 1 μ gを入れて、常温で2時間反応させた。洗浄緩衝液で6回洗浄した後、マウス単クローン性抗ヒトMBL 8F6(mouse monoclonal anti-human MBL 8F6(ドゥビエル、大韓民国))を1:100に希釈して常温で2時間反応させた。抗マウスIgG-HRPを1:1500に希釈して常温で1時間反応させた後、OPD溶液150 μ lを入れて、20分間発色させた。3 M HCl 50 μ lを添加して反応を停止させた後、492 nmでエライザ(ELISA)プレートリーダー(Multiskan Ex、Labsystems、米国)を使用してOD値を測定した。図5Aは、マンナン及びプレスタンパク質に対するヒト血漿-由来天然型MBLの結合性を示したもので、図5Bはマンナン及びプレスタンパク質に対する組換えヒトMBLの結合性を示したもので、天然MBL及び組換えヒトMBLは糖化されたプレS及びマンナンに類似の活性で結合する一方、BSAには結合しなかった(図5A及びB)。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2004/002739

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC7 C07K 1/16 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) IPC7 C07K 1/16, A61K 39/29, C12N 15/85 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Patents and applications for inventions since 1975 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKIPASS, NCBI PubMed database, Delphion Research Intellectual Property Network database		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/018617 A1 (Fuso pharmaceutical industries, Ltd., et al.) 06 March 2003 See the whole document.	1 - 7
E	KR 10-2004-0106194 A (Dobee Co., Ltd.) 17 December 2004 See the claims 1 - 4, 7 and 10	1 - 4, 7, 10
A	US 6,589,534 B1 (Yeda Research and Development Co., Ltd.) 08 July 2003 See the whole document	8 - 10
A	Flemming Larsen, et al. ' Disease-associated mutations in human mannose binding lectin compromise oligomerization and activity of the final protein ' Journal of biological chemistry, Vol. 279(20): 21302-21311 (2004) See the whole document	1 - 7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of 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 27 JULY 2005 (27.07.2005)		Date of mailing of the international search report 27 JULY 2005 (27.07.2005)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer JEONG Eui Jun  Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2004/002739

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR 10-2004-0106194 A	17.12.2004	CN1572874A	02.02.2005
		US20040253601A1	16.12.2004
		US2004253601A1	16.12.2004
		US2004253601AA	16.12.2004
US 6,589,534 B1	08.07.2003	US20040138131A1	15.07.2004
		US20030185857A1	02.10.2003
		US6589534	08.07.2003

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 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
G 0 1 N	30/88 (2006.01)	G 0 1 N	30/88	J
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	30/88	2 0 1 R
G 0 1 N	33/543 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 2 1
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	31/10 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/10	
		A 6 1 P	31/04	

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

(72)発明者 ムーン ホン モー

大韓民国 4 6 4 - 1 2 0 キョンギ - ドウ クワンジュ - シ ホーダック - ドン 2 9 5 - 3
ビュクサン アpartment ナンバー 1 0 3 - 1 1 0 1

(72)発明者 ヨム ジョン サン

大韓民国 4 6 3 - 9 1 4 キョンギ - ドウ ソンナム - シ ブンダン - ク ユンジャ - ドン ハ
ンソル マエル チャング アpartment ナンバー 1 1 5 - 5 0 2

(72)発明者 アン ビョン チョル

大韓民国 4 6 3 - 5 0 0 キョンギ - ドウ ソンナム - シ ブンダン - ク クミ - ドン 1 3
クンヨン ビラ カシ マエル ナンバー 6 0 6 - 1 0 3

(72)発明者 イ ジュ ヨン

大韓民国 4 6 3 - 8 6 2 キョンギ - ドウ ソンナム - シ ブンダン - ク ソヒョン - ドン パ
ングリム アイ - ワン ナンバー ビー - 2 3 0 9

(72)発明者 ユン ヤエセウン

大韓民国 4 4 9 - 1 6 0 キョンギ - ドウ ヨンイン - シ チュクチョン - ドン ダエイ マエ
ル ユンギャン ハイツ アpartment ナンバー 1 0 1 - 1 5 0 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA20 DA02 DA03 DA06 EA04 GA11
GA18 GA27 HA03
4B064 AG28 CA01 CA10 CA19 CC01 CC03 CC24 CE11 CE12
4B065 AA01X AA26X AA58X AA72X AA87X AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02
BA24 BB01 BB31 BB32 BC03 BC07 BC26 BD14 CA24 CA43
CA44 CA46
4C084 AA06 BA05 BA44 CA18 CA53 CA56 ZB332 ZB352

专利名称(译)	大分子甘露糖结合凝集素的大规模生产方法		
公开(公告)号	JP2008517619A	公开(公告)日	2008-05-29
申请号	JP2007538806	申请日	2004-10-28
[标]申请(专利权)人(译)	多見爾有限公司		
申请(专利权)人(译)	Dubieru有限公司		
[标]发明人	ムーンホンモー ヨムジョンサン アンビョンチョル イジュヨン ユンヤエセウン		
发明人	ムーン ホン モー ヨム ジョン サン アン ビョン チョル イジュ ヨン ユン ヤエセウン		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 G01N30/88 G01N33/53 G01N33/543 A61K38/00 A61P31/12 A61P31/10 A61P31/04		
CPC分类号	C07K14/4726 C12N2510/02 G01N33/68 G01N33/6842 G01N2333/4724		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/02.C G01N30/88.J G01N30/88.201.R G01N33/53.D G01N33/543.521 A61K37/02 A61P31/12 A61P31/10 A61P31/04		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA27 4B024/HA03 4B064/AG28 4B064/CA01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC01 4B064/CC03 4B064/CC24 4B064/CE11 4B064/CE12 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/BB01 4B065/BB31 4B065/BB32 4B065/BC03 4B065/BC07 4B065/BC26 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA06 4C084/BA05 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/ZB332 4C084/ZB352		
代理人(译)	斋藤健治		
其他公开文献	JP4592756B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及在用含有人MBL编码区序列的载体转染的CHO细胞系中大量生产多聚体重组人甘露糖结合凝集素 (rhMBL) 的方法。另外，本发明涉及重组细胞系的构建，从该重组细胞系中可以产生80%以上的MBL作为高功能聚合物形式。本发明还涉及重组细胞系的构建，该重组细胞系可在用于培养MBL的烧瓶培养系统中每天产生50µg/百万个细胞。此外，本发明描述了使用生物反应器在无蛋白培养基中高密度培养细胞并从培养基中选择性纯化高分子形式的MBL的方法。本发明还描述了用于生产功能性rhMBL的方法，该方法可用于开发用于治疗病毒，细菌或真菌感染的治疗剂。

【 図 1 】

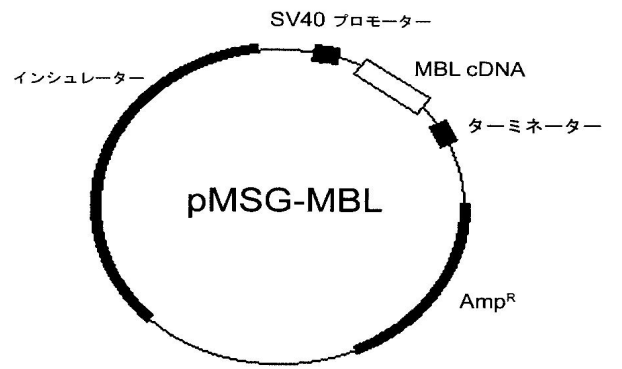


図1. pMSG-MBLプラスミドベクターの遺伝子地図