

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-75165

(P2006-75165A)

(43) 公開日 平成18年3月23日(2006.3.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 6 5
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 C O 8 4
C O 7 K 14/71 (2006.01)	C O 7 K 14/71	4 C O 8 5
C O 7 K 1/22 (2006.01)	C O 7 K 1/22	4 H O 4 5
審査請求 有 請求項の数 13 O L (全 69 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-260642 (P2005-260642)	(71) 出願人	596168317
(22) 出願日	平成17年9月8日(2005.9.8)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願平7-524743の分割		GENENTECH, INC.
原出願日	平成7年3月17日(1995.3.17)		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
(31) 優先権主張番号	08/215, 139		0-4990・サウス・サン・フランシス
(32) 優先日	平成6年3月18日(1994.3.18)		コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062144
(31) 優先権主張番号	08/286, 846		弁理士 青山 稔
(32) 優先日	平成6年8月5日(1994.8.5)	(74) 代理人	100068526
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田村 恭生
(31) 優先権主張番号	08/359, 705	(72) 発明者	レオナルド・ジー・プレスタ
(32) 優先日	平成6年12月20日(1994.12.20)		アメリカ合衆国94109カリフォルニア
(33) 優先権主張国	米国 (US)		州サンフランシスコ、ゴー・ナンバー20
			6、1900番
最終頁に続く			

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

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 種々のヒトの病理学的状態における t r k およびニューロトロフィン作用の役割をより一層理解するため、ヒト t r k B および t r k C タンパク質を提供する。

【解決手段】 免疫グロブリン配列に融合した t r k 受容体アミノ酸配列を含むキメラポリペプチド、該キメラポリペプチドを含む医薬組成物、該キメラポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、発現ベクター、宿主細胞、t r k 受容体アミノ酸配列を含むイムノアドヒーションである2特異的な分子、該2特異的な分子を含む医薬組成物、該2特異的な分子を用いた神経栄養因子の精製方法、および神経栄養因子を含む生物学的試料を、該神経栄養因子に結合することができる検出可能に標識した t r k 受容体ポリペプチドと接触させ、ついでそのように結合した標識を検出することを特徴とする、神経栄養因子の過剰または過小発現を特徴とする病理学的状態の診断方法からなる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫グロブリン配列に融合した t r k 受容体アミノ酸配列を含むキメラポリペプチド。

【請求項 2】

t r k A、t r k B または t r k C 受容体の細胞外ドメイン配列を免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合した請求項 1 のキメラポリペプチド。

【請求項 3】

該定常ドメイン配列が、免疫グロブリン重鎖配列のものである請求項 2 のキメラポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 のキメラポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、単離した核酸分子。

【請求項 5】

形質転換した宿主細胞により認識される調節配列に作動可能に連結した請求項 4 の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 5 のベクターで形質転換した宿主細胞。

【請求項 7】

神経栄養因子および異なる結合配列に結合することができる t r k 受容体アミノ酸配列を含む 2 特異的な分子。

【請求項 8】

2 特異的なイムノアドヒーションである請求項 7 の 2 特異的な分子。

【請求項 9】

神経栄養因子に結合することができる t r k 受容体アミノ酸配列の免疫グロブリン配列への融合体からなるイムノアドヒーションに該神経栄養因子を吸着させることを特徴とする神経栄養因子の精製方法。

【請求項 10】

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

【請求項 11】

薬理的に許容し得る賦形剤と混合した治療学的または予防学的に有効な量の請求項 1 のキメラポリペプチドを含む医薬組成物。

【請求項 12】

薬理的に許容し得る賦形剤と混合した治療学的または予防学的に有効な量の請求項 7 の 2 特異的な分子を含む医薬組成物。

【請求項 13】

t r k A - イムノアドヒーションを薬理的に許容し得る担体とともに含む、炎症性の疼痛および腫瘍よりなる群から選ばれた内生ニューロトロフィン産生を伴う病理学的状態の治療のための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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

【背景技術】

【0002】

神経栄養因子またはニューロトロフィンは、神経系の発達および維持に重要な役割を果

10

20

30

40

50

たしている小さな塩基性タンパク質のファミリーである。このファミリーの成員の中で最初に同定され、おそらく最もよく理解されているのは神経成長因子(NGF)であり、これは末梢神経系の知覚ニューロンおよび交感ニューロンを発達させるうえで顕著な作用を有する(非特許文献1; 非特許文献2)。NGF、およびマウス顎下腺からのホモログ(成熟した活性形はしばしば β -または2.5S NGFと呼ばれる)を含む多数の動物ホモログは長い間知られていたが、類似の機能を有し連続的に関連するが区別されるポリペプチドが同定されたのは最近になってからであった。

【0003】

一番目は脳由来神経栄養因子(BDNF)と呼ばれる(現在はニューロトロフィン-2(NT-2)とも呼ばれる)因子であり、このものはレイブロック(Leibrock, J.)らによりクローニングされ配列決定されている(非特許文献3)。この因子は最初ブタの脳から精製されたが(非特許文献4)、NGFとの相同性が明らかになったのはそのcDNAがクローニングされ配列決定されてからであった。NGFとBDNF(NT-2)との全アミノ酸配列の同一性は約50%である。この知見からレイブロックらは、構造および機能的特性を共通して有する神経栄養因子のファミリーの成員がBDNFおよびNGFに限られる理由はないと考えた。

【0004】

実際、 β -NGFおよびBDNFに密接に関連する別の神経栄養因子がその後発見されている。幾つかの研究グループは、最初ニューロン性因子(neuronal factor)(NF)と呼ばれ、現在はニューロトロフィン-3(NT-3)と呼ばれている神経栄養因子を同定した(非特許文献5; 非特許文献6; 非特許文献7; 非特許文献8; 非特許文献9; 非特許文献10)。NT-3は β -NGFおよびBDNF(NT-2)とアミノ酸の約50%が共通する。ニューロトロフィン-4およびニューロトロフィン-5(NT-4およびNT-5)が該ファミリーに最近加えられた(特許文献1; 非特許文献11; 非特許文献12; 非特許文献13)。上記パークマイヤーらにより最初に記載された哺乳動物分子はその後ゼノプス(Zenopus)NT-4のホモログであることがわかり、通常、NT-4/5と呼ばれる。

【0005】

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

【0006】

最初のtrk受容体ファミリーの成員であるtrkAは、トロポミオシン配列の触媒ドメインへの転座によって引き起こされた癌遺伝子の形質転換の結果として最初同定された。その後の研究により、trkAはNGFのシグナル変換受容体(signal transducing receptor)として同定された。その後、2つの他の関連する受容体、すなわちマウスおよびラットのtrkB(非特許文献14; 非特許文献15; 特許文献2)およびブタ、マウスおよびラットのtrkC(非特許文献16; 特許文献3)がtrk受容体ファミリーの成員として同定された。これらtrk受容体の構造は極めて類似しているが、交互のスプライシングにより該ファミリーの複雑さは増大し、2つの知られた形態のtrkA、3つの知られた形態のtrkB(2つは機能性のチロシンキナーゼドメインを有しない)および少なくとも4つの形態のtrkC(幾つかは機能性のチロシンキナーゼドメインを有せず、2つはチロシンキナーゼドメインに小さな挿入を有する)が出現する。このことは図1にまとめて示してある。

【0007】

10

20

30

40

50

p75 受容体および trk 受容体の役割は反対である。trk 受容体チロシンキナーゼは特定のニューロトロフィンに結合特異性を付与するうえで重要な役割を果たすことが一般に受け入れられているが、NT-3 にのみ結合する(しかしながら、他のニューロトロフィンには結合しない)と報告されている trkC 発現細胞とは対照的に、trkA を発現する細胞株は NGF のみならず NT-3 および NT-4/5 にも結合し(しかしながら、BDNF には結合しない)、trkB を発現する細胞は BDNF、NT-3、NT-4、および NT-4/5 に結合する(しかしながら、NGF には結合しない)。さらに、交互のスプライシング事象により生じる種々の形態の trk 受容体は異なる細胞内シグナル伝達経路を活性化することができ、それゆえ、おそらくインビボで異なる生理学的機能を媒体することがモデル系で示されている。所定の trk 受容体を発現する細胞が p75 の不在下でニューロトロフィンに低または高親和性で結合するかどうかは明らかでない(非特許文献 17)。

10

【0008】

種々の細胞株を用いた研究の刊行された結果は混乱しており、p75 がニューロトロフィンの応答性に本質的であるかまたは重要でないかいずれかであることを示唆している。p75 のみを発現する細胞株は NGF、BDNF、NT-3、および NT-4 に平衡時に同様の低親和性にて結合するが、結合速度定数は顕著に異なっている。その結果、p75 結合はすべてのニューロトロフィンの共通する性質であるが、p75 受容体はリガンド識別においても何らかの役割を果たしているかもしれないことが示唆されている(非特許文献 18)。p75 受容体単独でニューロトロフィンの生物学的活性を媒体しうるかどうかは明らかでない。trk 受容体は従来より生物学的に有意の神経栄養因子受容体と考えられてきたが、trkA 発現を欠くメラノーマ細胞で NGF がなおおそらく p75 により生物学的挙動の顕著な変化をもたらしうるということが最近示されている(非特許文献 19)。最近、デービーズ(Davies)らは(非特許文献 20)、p75 遺伝子にヌル変異(null mutation)を有するトランスジェニックマウスのモデルにおいてニューロトロフィンへの胚ニューロンの生存応答を媒体するうえでの p75 の役割を調べた研究の結果を報告している。彼らは、p75 が NGF 依存性の皮膚知覚ニューロンの NGF への感受性を高めることを見いだした。

20

【特許文献 1】米国特許第 5,364,769 号(1994 年 11 月 15 日発行)

【特許文献 2】EP 455,460 号(1991 年 11 月 6 日公開)

30

【特許文献 3】EP 522,530 号(1993 年 1 月 13 日公開)

【非特許文献 1】レビ・モンタルチーニ(Levi-Montalcini, R.)およびアンジェレッティ(Angeletti, P. U.)、Physiol. Rev. 48、534~569[1968]

【非特許文献 2】テーネン(Thoenen, H.)ら、Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 109、145~178[1987]

【非特許文献 3】レイブロック(Leibrock, J.)ら、Nature 341、149~152[1989]

【非特許文献 4】バード(Barde, T. A.)ら、EMBO J. 1、549~553[1982]

【非特許文献 5】アーンフォアズ(Ernfors)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87、5454~5458(1990)

40

【非特許文献 6】ヘーン(Hohn)ら、Nature 344、339[1990]

【非特許文献 7】メゾンピエール(Maisonpierre)ら、Science 247、1446[1990]

【非特許文献 8】ローゼンタール(Rosenthal)ら、Neuron 4、767[1990]

【非特許文献 9】ジョーンズ(Jones)およびライヒャルト(Reichardt)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87、8060~8064(1990)

【非特許文献 10】カイショー(Kaisho)ら、FEBS Lett. 266、187[1990]

【非特許文献 11】ハルブック(Hallbook, F.)ら、Neuron 6、845~858[1991]

【非特許文献 12】パークマイアー(Berkmeier, L. R.)ら、Neuron 7、857~866[1991]

50

1991]

【非特許文献13】イブ(Ip)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89、3060~3064[1992]

【非特許文献14】クライン(Klein)ら、EMBO J. 8、3701~3709[1989]

【非特許文献15】ミドルマス(Middlemas)ら、Mol. Cell. Biol. 11、143~153[1991]

【非特許文献16】ランバレ(Lamballe)ら、Cell 66、967~979[1991]

【非特許文献17】ミーキン(Meakin)およびシューター(Shooter)、Trends Neurosci. 15、323~331[1992]

【非特許文献18】ロドリゲス - テバー(Rodriguez - Tebar)ら、EMBO J. 11、917~922[1992] 10

【非特許文献19】ヘルマン(Herrmann)ら、Mol. Biol. Cell 4、1205~1216[1993]

【非特許文献20】デービーズ(Davies)ら、Neuron 11、565~574[1993]

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

ニューロトロフィン、末梢および中枢ニューロンの区別されるが重複するセットに作用を示す。これら作用は、発達しつつあるニューロンの生存を確実にするうえで決定的な役割を果たすものから(知覚ニューロンおよび交感ニューロンにおけるNGF)ニューロンの形態に対して比較的微妙な作用を及ぼすもの(プルキンエ細胞に対するNT-3)まである。これら作用は、ある種の神経変性疾患の治療のためにニューロトロフィンを使用するに際して関心がもたれてきた。ニューロトロフィンはまた炎症性疼痛の媒体にも影響を及ぼし、ある種の悪性腫瘍において過剰発現される。従って、ニューロトロフィンの生物学的活性のインヒビターは、疼痛の薬物療法や癌治療における化学療法剤として治療学的可能性を有する。 20

【0010】

種々のヒトの病理学的状態におけるtrkおよびニューロトロフィン作用の役割をより一層理解するため、ヒトtrkBおよびtrkCタンパク質を同定および単離し、とりわけの形態のtrkBおよびtrkCがヒトで発現されているかを決定することが有用であろう。科学および治療学的な可能性とは別に、かかるヒトtrk受容体タンパク質はヒト神経栄養因子の精製、およびtrkBおよび/またはtrkCに結合しうるニューロトロフィンの上昇レベルまたは減少レベルと関連する種々のヒトの病理学的状態の診断に有用であろう。 30

【0011】

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

【課題を解決するための手段】

【0012】

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

【0013】

40

50

一つの側面において、本発明は、

(a)天然配列のヒト t r k B または t r k C ポリペプチド、

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

(c)天然のヒト t r k B または t r k C ポリペプチドの生物学的特性を示し、かつヒトにおいて非免疫原性である (a) または (b) のポリペプチドの断片

よりなる群から選ばれた単離ヒト t r k B または t r k C ポリペプチドに関する。

【0014】

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

10

【0015】

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

【0016】

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

【0017】

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

20

【0018】

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

【0019】

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

30

【0020】

本発明はまた、ヒト t r k B または t r k C ポリペプチドの存在を決定する方法であって、かかるポリペプチドをコードする DNA を試験試料の核酸とハイブリダイズさせ、ついでヒト t r k B または t r k C ポリペプチド DNA の存在を決定することの特徴とする方法をも提供する。

【0021】

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

40

【0022】

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

【0023】

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

【0024】

50

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

10

【0025】

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

20

【0026】

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

【0027】

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

30

【0028】

別の側面において、本発明は、精製しようとする神経栄養因子に結合しうる t r k 受容体アミノ酸配列の免疫グロブリン配列への融合体からなるイムノアドヒーション上に吸着させることによる神経栄養因子の精製方法に関する。t r k 受容体配列は、精製しようとする神経栄養因子の採取源と同じ種のものであるのが好ましい。

【0029】

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

40

【0030】

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

【0031】

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

50

A . 定義

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

【0032】

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

【0033】

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

【0034】

それゆえ、「天然」または「天然配列」のヒトtrkBまたはtrkCポリペプチドは、完全長の天然ヒトtrkBおよびtrkC、完全長の天然ヒトtrkBおよびtrkCの切断されたチロシンキナーゼ(TK)ドメインの欠失した(スプライスされた)形態、および完全長または切断された天然ヒトtrkCの挿入変異体(該挿入はTKドメイン内かまたは細胞外ドメイン内にある)、および将来同定されるかもしれない他の天然にみられるヒトtrkBまたはtrkCポリペプチドを含む、ヒトにおいてみられるあらゆる形態のtrkBまたはtrkC受容体のアミノ酸配列を有する。動物種にみられるtrkポリペプチドと比較したヒトtrkポリペプチドの種々の同定形態の図表を図4に示す。シグナル配列が先行した後、完全長の天然trkA、trkBおよびtrkC受容体の細胞外ドメインは、種々の他のタンパク質において同定された相同なまたは他の仕方で類似の構造との関連で定められた5つの機能性ドメインを有する(図11参照)。これらドメインは、成熟trk受容体のアミノ酸配列のN末端から、1)ヒトtrkAの1位のアミノ酸から約32位のアミノ酸、ヒトtrkBの1位のアミノ酸から約36位のアミノ酸、およびヒトtrkCの1位のアミノ酸から約48位のアミノ酸にわたる第一のシステインに富むドメイン; 2)trkA中の約33位のアミノ酸から約104位のアミノ酸、trkB中の約37位のアミノ酸から約108位のアミノ酸、およびtrkC中の約49位のアミノ酸から約120位のアミノ酸にわたるロイシンに富むドメイン; 3)trkA中の約105位のアミノ酸から約157位のアミノ酸、trkB中の約109位のアミノ酸から約164位のアミノ酸、およびtrkC中の約121位のアミノ酸から約177位のアミノ酸にわたる第二のシステインに富むドメイン; 4)trkA中の約176位のアミノ酸から約234位のアミノ酸、trkB中の約183位のアミノ酸から約239位のアミノ酸、お

10

20

30

40

50

よび t r k C 中の約 1 9 6 位のアミノ酸から約 2 5 7 位のアミノ酸にわたる第一の免疫グロブリン様ドメイン；および 5) t r k A 中の約 2 6 4 位のアミノ酸から約 3 3 0 位のアミノ酸、t r k B 中の約 2 7 0 位のアミノ酸から約 3 3 4 位のアミノ酸、および t r k C 中の約 2 8 8 位のアミノ酸から約 3 5 1 位のアミノ酸にわたる第二の免疫グロブリン様ドメインとして示されている。「天然」または「天然配列」のヒト t r k B または t r k C なる語は、これら受容体のいずれかの形態の天然にみられる対立遺伝子変異体を含む。ヒト t r k B の 4 3 3 位のアミノ酸は M または V として種々に決定されていることが注目される。両配列とも本発明の範囲に本質的に包含される。

【 0 0 3 5 】

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

【 0 0 3 6 】

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

【 0 0 3 7 】

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

【 0 0 3 8 】

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

【 0 0 3 9 】

好ましくは、機能性誘導体は、天然のポリペプチドと少なくとも約 6 5 % のアミノ酸配列の同一性、さらに好ましくは約 7 5 % のアミノ酸配列の同一性、さらに一層好ましくは少なくとも約 8 5 % のアミノ酸配列の同一性、最も好ましくは少なくとも約 9 5 % のアミノ酸配列の同一性を有するポリペプチドである。本発明との関連においては、天然配列のヒト t r k B または t r k C ポリペプチドの機能性誘導体は、好ましくは、その同族ヒト受容体と少なくとも 9 5 % のアミノ酸配列の同一性を示し、ヒトにおいて免疫原性でないか、またはかかる天然受容体と少なくとも 9 5 % のアミノ酸配列の同一性を示し、ヒトにおいて免疫原性でない天然ヒト t r k B または t r k C 受容体またはポリペプチドの断片である。天然の完全長の t r k 受容体の断片は、リガンド結合および/または生物学的活性に必要な細胞外ドメイン内のドメインを保持しているのが好ましい。上記で検討したように、タンパク質の t r k ファミリーの細胞外ドメインは 5 つのドメイン、すなわち第一のシステインに富むドメイン、ロイシンに富むドメイン、第二のシステインに富むドメイン、および 2 つの免疫グロブリン様ドメインから構築されている。機能性誘導体には、天然の t r k 受容体の少なくとも第二の免疫グロブリン様ドメイン、または天然の t r k 受容体の第二の免疫グロブリン様ドメインと少なくとも約 9 5 % の配列同一性を示す配列が含まれ、その際、t r k 受容体は好ましくは t r k B または t r k C である。

【 0 0 4 0 】

アミノ酸配列の同一性またはホモロジーは、本明細書において、配列を整列させ必要な

10

20

30

40

50

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

【0041】

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

10

【0042】

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

【0043】

20

「単離ヒトtrkBおよびtrkCポリペプチド」なる語および文法的なその変形は、該ポリペプチドを単離したヒトその他の採取源中に存在する混入ポリペプチドから分離されたヒトtrkBおよびtrkCポリペプチド(上記定義による)、および少なくとも一つの天然の神経栄養因子に結合する定性的能力を保持しヒトにおいて免疫原性でない限りにおいて、かかる天然配列ポリペプチドの断片、アミノ酸配列変異体、グリコシル化変異体および誘導体をいう。かかる単離ヒトtrkBおよびtrkCポリペプチドは、天然の完全長のヒトtrkBおよびtrkC受容体、天然にみられる切断された形態および別の仕方のスプライシングおよび天然にみられる対立遺伝子により生じるアミノ酸(挿入)変異体を含む、天然配列のヒトtrkBおよびtrkCを含む。天然配列のtrkBまたはtrkCポリペプチドのアミノ酸配列変異体は、その天然対応物と少なくとも約95%のホモロジー、さらに好ましくは少なくとも約98%のホモロジーを示し、ヒトに対して非免疫原性である。最も好ましくは、単離された天然のヒトtrkBおよびtrkCポリペプチドの定義におけるアミノ酸配列変異体は、チロシンキナーゼドメインの全天然配列および天然にみられるスプライスされたヒトtrkBまたはtrkCポリペプチドにおいて認められる挿入を保存している。この定義にはさらに、少なくとも一つの天然の神経栄養因子に結合する定性的な能力を保持している限りにおいて、上記天然ポリペプチドの断片およびそのアミノ酸配列変異体並びにそのグリコシル化変異体および誘導体を含む。

30

【0044】

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

40

【0045】

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

【0046】

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

50

【0047】

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

【0048】

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

【0049】

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

【0050】

「共有結合誘導体」は、有機のタンパク質性または非タンパク質性の誘導体化剤による天然ポリペプチドまたはその断片の修飾、および翻訳後修飾を含む。共有結合修飾は、一般に選択された側鎖または末端残基と反応しうる有機誘導体化剤と標的アミノ酸残基を反応させるか、または選択された組換え宿主細胞中で機能する翻訳後修飾の動力化メカニズム(harnessing mechanism)により導入される。ある種の翻訳後修飾は、発現されたポリペプチドに対する組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミンおよびアスパラギン残基は、しばしば、翻訳後に脱アミド化されて対応グルタミン酸およびアスパラギン酸になる。別の場合には、これら残基は穏やかな酸性条件下で脱アミド化される。これらいずれの形態の残基も本発明のtrk受容体ポリペプチド中に存在してよい。他の翻訳後修飾としては、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリン、チロシンまたはトレオニン残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化が挙げられる[クレイトン(T. E. Creighton)、Proteins: Structure and Molecular Properties、フリーマン、サンフランシスコ、79~86頁(1983)]。

【0051】

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

【0052】

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

のに必要な要素を含有している。かくして外来DNAによりコードされるポリペプチドの多くの分子を速やかに合成することができる。

【0053】

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

【0054】

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

10

20

【0055】

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

【0056】

「外因性」要素は、本明細書において、細胞にとって外来性の核酸、または細胞にとって同種ではあるが通常みられない宿主細胞核酸内の位置にある核酸を意味するものと定義される。

30

【0057】

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

【0058】

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

40

50

【 0 0 5 9 】

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

【 0 0 6 0 】

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

【 0 0 6 1 】

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

【 0 0 6 2 】

Fabフラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第一定常ドメイン(C_H1)を含む。Fab'フラグメントは、重鎖C_H1ドメインのカルボキシル末端に抗体のヒンジ領域からの1またはそれ以上のシステインを含む幾つかの残基が付加しているところがFabフラグメントと異なる。Fab'-SHは、本明細書において定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を有するFab'をいう。F(ab')₂抗体フラグメントは、相互間にヒンジシステインを有する一対のFab'フラグメントとして元々生成された。抗体断片の他の化学的カップリングも知られている。

【 0 0 6 3 】

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

【 0 0 6 4 】

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

トからなる」含有ポリマー性 I g M (ポリ - I g M) とともに腺上皮を輸送されうる。

【 0 0 6 5 】

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

【 0 0 6 6 】

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

10

【 0 0 6 7 】

本明細書においてモノクローナル抗体は、定常ドメインによる抗 t r k 抗体の可変 (超可変を含む) ドメインのスプライシング (たとえば、「ヒト化」抗体)、または重鎖による軽鎖のスプライシング、または他の種からの鎖による一方の種からの鎖のスプライシング、または種の起源または免疫グロブリンクラスもしくはサブクラスとは無関係に異種タンパク質との融合により生成されるハイブリッド抗体および組換え抗体、並びに所望の生物学的活性を示す限りにおいて抗体断片 (たとえば、F a b、F (a b')₂、および F v) を含む [キャビリー (C abilly) ら、米国特許第 4, 8 1 6, 5 6 7 号; メージ (M age) および ラモイ (L amoyi)、Molecular Antibody Production Techniques and Applications、7 9 ~ 9 7 頁 (マーセル・デッカー (Marcel Dekker, Inc.)、ニューヨーク、1 9 8 7) 参照]。

20

【 0 0 6 8 】

それゆえ、「モノクローナル」という修飾語が付されている場合は、抗体の実質的に均質な集団から得られた抗体の特性を意味するものとし、特定の方法によって抗体を産生させる必要があるものではない。たとえば、本発明に従って用いるモノクローナル抗体は、コーラー (K ohler) およびミルシュテイン (M ilstein) によって最初に記載されたハイブリドーマ法 (Nature 2 5 6 : 4 9 5 (1 9 7 5)) により作製することができ、または組換え D N A 法 [キャビリーら、上掲] により作製することができる。

30

【 0 0 6 9 】

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

40

【 0 0 7 0 】

ハイブリダイゼーションは「ストリンジェントな条件」下で行うのが好ましいが、これ

50

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

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0071】

B. t r k受容体をコードするDNAの単離

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

20

【0072】

t r k受容体の同定は、既知の基準(その一つは、配列は偽陽性が最小となるように十分な長さを有し十分に明白でなければならないことである)に従って既知のt r k配列(ヒトt r k A配列、マウスt r k B配列またはマウスまたはブタt r k C配列)から選択した標識オリゴヌクレオチド配列によりヒトまたは他の哺乳動物のcDNAまたはゲノムライブラリーをプローブすることにより最も都合よく行われる。典型的に、約30~50塩基を有する³²P-標識オリゴヌクレオチドが、とりわけ該オリゴヌクレオチドがメチオニンまたはトリプトファンの1またはそれ以上のコドンを含む場合には十分である。単離核酸は、核酸の採取源からの他のポリペプチドをコードする混入核酸から同定および分離されたDNAであろう。

30

【0073】

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

40

【0074】

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

【0075】

C. 天然t r k受容体または受容体断片のアミノ酸配列変異体

天然t r k受容体およびt r k受容体断片のアミノ酸配列変異体は、天然のまたは変異体のt r k受容体DNA中に適当なヌクレオチド変化を導入することにより、または所望

50

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

10

20

30

40

50

【0076】

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

【0077】

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

【0078】

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

【0079】

一般に、部位特異的突然変異誘発を行うには、まずその配列内に関連タンパク質をコードするDNA配列を含む一本鎖ベクターを得る。所望の変異配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーを、たとえばクレア(Crea)らの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 75、5765(1978))により一般に化学的に調製する。ついで、このプライマーを上記一本鎖のタンパク質配列含有ベクターにアニールさせ、大腸菌ポリメラーゼIのクレノウ断片などのDNA重合酵素に供して変異含有鎖の合成を完成させる。かくして、一方の鎖が元々の非変異配列をコードし、第二の鎖が所望の変異を有するヘテロ二本鎖が生成する。ついで、このヘテロ二本鎖ベクターを用いてJP101細胞などの適当な宿主細胞を形質転換し、変異配列の組み合わせを有する組換えベクターを含むクローンを選択する。その後、変異領域を除去し、タンパク質産生のための適当な発現ベクター中に入れる。

10

【0080】

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

20

【0081】

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

30

【0082】

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

40

55 で2分

72 で30秒、ついで以下のサイクルを19サイクル：

94 で30秒

55 で30秒および

72 で30秒。

50

【 0 0 8 3 】

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

【 0 0 8 4 】

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

10

20

【 0 0 8 5 】

加えて、天然または変異体のtrk受容体またはその断片のアミノ酸配列を作製するうえでいわゆるファージミド提示法も有用であるかもしれない。この方法は、(a)変異させようとする受容体をコードする第一の遺伝子、天然または野生型のファージコートタンパク質の少なくとも一部をコードする第二の遺伝子(該第一の遺伝子および該第二の遺伝子は異種である)、該第一の遺伝子および該第二の遺伝子に作動可能に連結した転写調節要素を含む複製可能な発現ベクターを構築し、それによって融合タンパク質をコードする遺伝子融合を生成させ、(b)該第一の遺伝子内の1またはそれ以上の選択された部位で該ベクターを突然変異させ、それによって関連するプラスミドのファミリーを生成させ、(c)これらプラスミドで適当な宿主細胞を形質転換し、(d)これら形質転換した宿主細胞をファージコートタンパク質をコードする遺伝子を有するヘルパーファージで感染させ、(e)これら形質転換し感染した宿主細胞を、該プラスミドの少なくとも一部を含み宿主を形質転換しうる組換えファージミド粒子を生成するのに適当な条件下で培養し、その際、該条件は再少量以上のファージミド粒子が該粒子の表面上に1を越えるコピーの該融合タンパク質を提示するように調節されており、(f)これらファージミド粒子を適当な抗原と接触させてファージミド粒子の少なくとも一部が該抗原に結合するようにさせ、ついで(g)結合したファージミド粒子を結合しなかったファージミド粒子から分離する、ことを含む。工程(d)から(g)は1回からそれ以上繰り返すことができる。この方法において好ましくは、プラスミドを転写調節要素の厳重な制御下におき、培養条件を、ファージミド粒子の表面上に1を越えるコピーの融合タンパク質を提示するファージミド粒子の量または数が約1%未満となるように調節する。また、1を越えるコピーの融合タンパク質を提示するファージミド粒子の量が単一コピーの融合タンパク質を提示するファージミド粒子の量の10%未満であるのが好ましい。該量は20%未満であるのが最も好ましい。この方法においては一般に、該発現ベクターはさらに該ポリペプチドの各サブユニットをコードするDNAに融合した分泌シグナル配列をさらに含み、転写調節要素はプロモーター系であろう。好ましいプロモーター系は、lacZ、 λ p_L、tac、T7ポリメラーゼ、トリプトファン、およびアルカリホスファターゼプロモーターおよびこれらの組み合わせから選ばれる。また、この方法は、通常、M13K07、M13R408、M13-VCS、およびPhiX174から選ばれるヘルパーファージを用いるであろう。好ましいヘルパーファージはM13K07であり、好ましいコートタンパク質はM13ファージ遺伝子II

30

40

50

Ｉコートタンパク質である。好ましい宿主は大腸菌であり、大腸菌のプロテアーゼ欠失株である。

【 0 0 8 6 】

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

【 0 0 8 7 】

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

10

20

【 0 0 8 8 】

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

【 0 0 8 9 】

天然に存在するアミノ酸は共通する側鎖の特性に基づいてグループに分けられる：

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

30

【 0 0 9 0 】

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

40

【 0 0 9 1 】

アミノ酸欠失は一般に、約 1 ~ 3 0 残基、より好ましくは約 1 ~ 1 0 残基の範囲であり、典型的には隣接するものである。欠失はシグナル変換および／またはリガンド結合に直接には関与しない領域中に導入することにより、t r k 受容体の生物学的活性を修飾して

50

よい。シグナル変換および/またはリガンド結合に直接関与する領域からの欠失は一層有意に変異 t r k 受容体の生物学的活性の修飾をもたらすであろうし、t r k 受容体アンタゴニストを生成するかもしれない。連続的な欠失の数は、影響を受けるドメインにおいて t r k 受容体の三次元構造を保持すべく選択されるであろう。

【0092】

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

10

【0093】

アミノ酸挿入はまた、長さが1残基から数百またはそれ以上の残基を含むポリペプチドにいたるアミノ - および/またはカルボキシル - 末端での融合、並びに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。配列内挿入(すなわち、t r k 受容体アミノ酸配列内の挿入)は、一般に約1 ~ 10 残基、より好ましくは1 ~ 5 残基、さらに好ましくは1 ~ 3 残基の範囲であってよい。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する t r k 受容体、細菌組換え宿主細胞培養中での直接発現の人工産物、および組換え宿主細胞からの成熟 t r k 受容体の分泌を容易にするための t r k 受容体分子のN末端への異種N末端シグナル配列の融合が挙げられる。かかるシグナル配列は、一般に意図する宿主細胞種から得られ、それゆえ同種であろう。適当な配列としては、大腸菌に対する S T I I または I p p、酵母に対するアルファ因子、および哺乳動物細胞に対するヘルペス g D などのウイルスシグナルが挙げられる。

20

30

【0094】

天然 t r k 受容体分子の他の挿入変異体としては、該受容体のN - またはC - 末端への免疫原性ポリペプチド、たとえばβ - ラクタマーゼや大腸菌の t r p 遺伝子座によりコードされる酵素などの細菌性ポリペプチド、または酵母タンパク質の融合、および免疫グロブリン領域(好ましくは免疫グロブリンの定常領域)、アルブミン、またはフェリチンなどのような長い半減期を有するタンパク質のC - 末端融合が挙げられる(1989年4月6日に公開されたW O 8 9 / 0 2 9 2 2 に記載されているように)。

【0095】

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

40

【0096】

D . クローニングビヒクル中へのD N A の挿入

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

【0097】

発現ベクターおよびクローニングベクターは当該技術分野でよく知られており、1またはそれ以上の選択された宿主細胞中で複製することを可能にする核酸配列を含んでいる。適当なベクターの選択は、1) D N A 増幅かまたはD N A 発現のいずれに用いるのか、2)

50

ベクター中に挿入すべきDNAのサイズ、および3)ベクターで形質転換すべき宿主細胞に依存するであろう。各ベクターは、その機能(DNAの増幅かまたはDNAの発現か)およびそれが適合する宿主細胞に応じて種々の成分を含む。これらベクター成分としては、一般に下記のうちの1またはそれ以上が挙げられるが、これらに限られるものではない：シグナル配列、複製起点、1またはそれ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、および転写終結配列。

【0098】

(i)シグナル配列成分

一般に、シグナル配列はベクターの成分であってよく、またはベクター中に挿入されるtrk受容体の一部であってよい。天然のtrk受容体は、ポリペプチドの翻訳後プロセシングにより開裂されて成熟trk受容体を生成したときの該ポリペプチドのアミノ末端(該DNAの5'末端)にシグナル配列を含む。しかしながら、天然のtrk受容体は細胞外ドメインと細胞質ドメインとの間に膜接着ドメイン(membrane anchoring domain)を含むため、宿主細胞から分泌されない。それゆえ、分泌形態のtrk受容体を生成するには、膜接着ドメイン(膜貫通ドメインともよばれる)を通常欠失させるかまたは他の仕方で不活化させる(たとえば、点変異によって)。一般に、細胞質ドメインもまた膜接着ドメインとともに欠失させる。切断された(または膜貫通ドメインが不活化された)trk受容体変異体は、該切断された変異体をコードするDNAがアミノ末端のシグナル配列を保持している限りにおいて該細胞から分泌されう。

10

【0099】

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

20

【0100】

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

30

【0101】

(ii)複製起点成分

発現ベクターおよびクローニングベクターの両者とも、1またはそれ以上の選択された宿主細胞中での複製を可能とする核酸配列を含む。一般に、クローニングベクターでは、この配列は宿主染色体と独立に複製することを可能とする配列であり、複製起点および自律複製配列を含む。かかる配列は、種々の細菌、酵母およびウイルスについてよく知られている。よく知られたpBR322からの複製起点が大抵のグラム陰性細菌に適しており、2μプラスミド起点が酵母に適しており、種々のウイルス起点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSVまたはBPV)が哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。複製起点は哺乳動物発現ベクターには必要でない(SV40起点は、それが初期プロモーターを含むことのみによって一般に用いられる)。大抵の発現ベクターは「シャトル」ベクターである、すなわち少なくとも一つのクラスの生物において複製することができるが、発現のために他の生物中にトランスフェクションすることができる。たとえば、ベクターを大腸菌中にクローニングし、ついで、宿主細胞染色体とは独立に複製することができないときでも同ベクターを酵母または哺乳動物細胞中に発現のためにトランスフェクションする。

40

【0102】

DNAはまた、宿主ゲノム中に挿入することによりクローニングされる。このことは、

50

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

【0103】

(iii) 選択遺伝子成分

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

【0104】

選択スキームの一例は、宿主細胞の増殖を阻止する薬剤を利用するものである。異種遺伝子で首尾よく形質転換された細胞は薬剤耐性を付与するタンパク質を発現し、それゆえ選択レジメンを生き残る。かかる主要な選択の例では、薬剤のネオマイシン[サザーン(Southern)ら、J. Molec. Appl. Genet. 1、327(1982)]、マイコフェノール酸[マリガン(Mulligan)ら、Science 209、1422(1980)]、またはハイグロマイシン[サジェン(Sudgen)ら、Mol. Cell. Biol. 5、410~413(1985)]を利用する。上記3つの例では、それぞれ適当な薬剤である G418 またはネオマイシン(ジェネチシン)、xgpt (マイコフェノール酸)、またはハイグロマイシンに対する耐性を付与すべく真核細胞制御下に細菌遺伝子を用いる。

【0105】

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

【0106】

たとえば、DHFR 選択遺伝子で形質転換された細胞は、ヒポキサンチン、グリシン、およびチミジンを欠く培地中ですべての形質転換体を培養することにより最初に同定される。この場合に適した宿主細胞は、ウアラウプ(Urlaub)およびチェイシン(Chasin)により記載されたようにして(Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 77、4216(1980))調製および増殖した DHFR 活性を欠くチャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株である。とりわけ有用な DHFR は、MTX に高度に耐性の変異体 DHFR である(EP 117,060号)。この選択剤は、内生の DHFR の存在の如何にかかわらず、他の面では適当なかなる宿主、たとえば ATCC No. CCL 61 CHO - K1 に用いることができる。ついで、それぞれ DHFR および所望のポリペプチドをコードする DNA が該 DHFR を不活化する剤(メトトレキセート、すなわち MTX)に暴露することにより増幅される。その後のラウンドの一層高濃度の MTX 中で増殖しうる細胞のみを選択することにより

、細胞が一層 D H F R を必要とする(従って、すべての外来 D N A を増幅させる)ことが確
 実になる。別法として、所望のポリペプチドをコードする遺伝子、野生型 D H F R をコ
 ドする遺伝子、および n e o 遺伝子などの他の選択マーカーを同時に形質転換した宿主は
 、G 4 1 8 などの選択マーカーのための選択剤を用いて同定することができ、ついで内生
 の D H F R を有する野生型宿主中でメトトレキセートを用いて選択および増殖することが
 できる(米国特許第 4 , 9 6 5 , 1 9 9 号をも参照)。

【 0 1 0 7 】

酵母中で使用するのに適した適当な選択遺伝子は酵母プラスミド Y R p 7 中に存在する
 t r p 1 遺伝子である(スティンチコム(Stinchcomb)ら、1 9 7 9、Nature 2 8 2 :
 3 9 ; キングスマン(Kingsman)ら、1 9 7 9、Gene 7 : 1 4 1 ; またはチェンパー(T
 schemper)ら、1 9 8 0、Gene 1 0 : 1 5 7)。t r p 1 遺伝子は、トリプトファン中で
 増殖する能力を欠く酵母の変異体株、たとえば A T C C No . 4 4 0 7 6 または P E P
 4 - 1 (ジョーンズ(Jones)、1 9 7 7、Genetics 8 5 : 1 2)に選択マーカーを提供す
 る。ついで、酵母宿主細胞中の t r p 1 領域の存在は、トリプトファンの不在中で増殖さ
 せることにより形質転換を検出するための有効な環境を提供する。同様に、l e u 2 欠失
 酵母株(A T C C 2 0 , 6 2 2 または 3 8 , 6 2 6)は、l e u 2 遺伝子を有する既知のプラ
 スミドにより補足される。

10

【 0 1 0 8 】

(iv) プロモーター成分

クローニングベクターと違って発現ベクターは、宿主生物によって認識され所望のポリ
 ペプチドをコードする核酸に作動可能に連結したプロモーターを含んでいなければならない
 い。プロモーターは構造遺伝子(一般に約 1 0 0 ~ 1 0 0 0 b p 内)の開始コドンの上流に
 位置する非翻訳配列であり、その制御下に核酸の転写および翻訳を制御する。プロモータ
 ーは典型的に誘導性および構成的の 2 つのクラスに分けられる。誘導性プロモーターは、
 培養条件の変化、たとえば栄養素の存在または不在または温度の変化に応答して、その制
 御下に D N A から増加したレベルの転写を開始するプロモーターである。現時点では種
 々の可能な宿主細胞により認識される多数のプロモーターがよく知られている。これらプ
 ロモーターは、その由来する遺伝子から制限酵素消化により除去し、ついで発現すべきポ
 リペプチドの開始コドンの 5 ' 側に挿入することにより、所望のポリペプチドをコードす
 る D N A に作動可能に連結される。このことは、t r k 受容体のゲノムプロモーターを使
 用できないということではない。しかしながら、一般に異種プロモーターは天然の t r k
 受容体プロモーターに比べて発現される t r k 受容体の一層大きな転写および一層高い収
 量が得られるであろう。

20

30

【 0 1 0 9 】

原核細胞宿主に使用するのに適したプロモーターとしては、β - ラクタマーゼおよびラ
 クトースプロモーター系(チャング(Chang)ら、Nature 2 7 5 : 6 1 5 (1 9 7 8) ; お
 よびゴッデル(Goeddel)ら、Nature 2 8 1 : 5 4 4 (1 9 7 9))、アルカリホスファタ
 ーゼ、トリプトファン(t r p)プロモーター系(ゴッデルら、Nucleic Acids Res.、8
 : 4 0 5 7 (1 9 8 0) および E P O 出願公開第 3 6 , 7 7 6 号)および t a c プロモーター
 (ドゥ・ベール(H.de Boer)ら、Proc.Nat'l.Acad.Sci.U S A 8 0 : 2 1 ~ 2 5 (1
 9 8 3))などのハイブリッドプロモーターが挙げられる。しかしながら、他の知られた細
 菌プロモーターも適している。それらのヌクレオチド配列は刊行されており、それにより
 当業者は必要な制限部位を供給するためにリンカーまたはアダプターを用い、これらプロ
 モーターを t r k をコードする D N A (ジーベンリスト(Siebenlist)ら、Cell 2 0 : 2
 6 9 (1 9 8 0))に作動可能に連結することができる。細菌系に用いるプロモーターはま
 た、t r k をコードする D N A に作動可能に連結したシャイン - ダルガーノ(S.D.)配列
 をも含むであろう。

40

【 0 1 1 0 】

酵母宿主に用いるのに適したプロモーター配列としては、3 - ホスホグリセリン酸キナ
 ーゼのプロモーター(ヒッツェマン(Hitzeman)ら、J . Biol . Chem . 2 5 5 : 2 0 7 3 (1

50

980))、またはエノラーゼ、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼおよびグルコキナーゼなどの他の解糖酵素のプロモーター(ヘス(Hess)ら、J. Adv. Enzyme Req. 7: 149(1978); およびホランド(Holland)、Biochemistry 17: 4900(1978))が挙げられる。

【0111】

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

10

【0112】

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

20

【0113】

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

30

【0114】

SV40ウイルスの初期および後期プロモーターは、SV40ウイルスの複製起点を含むSV40制限断片として都合よく得られる[ファイヤーズ(Fiers)ら、Nature 273: 113(1978)、マリガン(Mulligan)およびバーク(Berg)、Science 209、1422~1427(1980); パブラキス(Pavlikis)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 78: 7398~7402(1981)]。ヒトサイトメガロウイルスの即時(immediate)初期プロモーターはHindIII制限断片として都合よく得られる[グリーンアウェイ(Greenaway)ら、Gene 18、355~360(1982)]。ベクターとしてウシパピローマウイルスを用いた哺乳動物宿主中でのDNAの発現系が米国特許第4,419,446号に開示されている。この系の変法は米国特許第4,601,978号に記載されている。ヒト免疫インターフェロンをコードするcDNAのサル細胞中での発現に関してはグレイ(Gray)らのNature 295、503~508(1982)をも参照; 単純ヘルペスウイルスからのチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞中でのヒトβ-インターフェロンcDNAの発現に関してはレイズ(Reyes)らのNature 297、598~601(1982)を参照; 培養マウスおよびウサギ細胞中でのヒトインターフェロンβ1遺伝子の発現に関してはカナニ(Canaani)およびバーク、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 79、5166~5170(1982)を参照; およびラウス肉腫ウイルスの長末端リピート(long terminal repeat)を用いたCV-1サル腎臓細胞、ニワトリ胚線維芽細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、ヒーラ細胞、およびマウスHIN-3T3細胞中での細菌C

40

50

A T 配列の発現に関してはゴーマン (Gorman) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 79、6777 ~ 6781 (1982) を参照。

【0115】

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

【0116】

(v) エンハンサー要素成分

高等真核細胞による本発明の *trk* 受容体をコードする DNA の転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによりしばしば増加する。エンハンサーはプロモーター上に作用してその転写を増加させる、通常、約 10 ~ 300 bp の DNA のシス作用性要素である。エンハンサーは転写ユニットの 5' 側 [ライミンス (Laimins) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 78、993 (1981)] および 3' 側 [ラスキー (Lasky) ら、Mol. Cell Biol. 3、1108 (1983)]、イントロン内 [バネルジ (Banerji) ら、Cell 33、729 (1983)] 並びにコード配列自身の内部 [オズボーン (Osborne) ら、Mol. Cell Biol. 4、1293 (1984)] に認められ、方向および位置に関して比較的独立である。現在、多くのエンハンサー遺伝子が哺乳動物遺伝子 (グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α - フェトプロテインおよびインスリン) から知られている。しかしながら、一般に、真核細胞ウイルスからのエンハンサーが使用されるであろう。例としては、複製起点の後期側上の SV40 エンハンサー (bp 100 ~ 270)、サイトメガロウイルスの初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側上のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。真核細胞プロモーターの活性化のためのエンハンサー要素に関しては、ヤニブ (Yaniv)、Nature 297、17 ~ 18 (1982) をも参照。エンハンサーは *trk* 受容体 DNA の 5' 側または 3' 側の位置にてベクター中にスプライスされるが、プロモーターの 5' 側の部位に位置するのが好ましい。

【0117】

(vi) 転写終結要素

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

【0118】

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

【0119】

構築したプラスミド中で配列が正しいことを確認するための分析のため、ライゲーション混合物を用いて大腸菌 K12 株 294 (ATCC 31,446) を形質転換し、首尾よくいった形質転換体を必要に応じてアンピシリンまたはテトラサイクリン耐性により選択する。これら形質転換体からのプラスミドを調製し、制限エンドヌクレアーゼ消化により分析し、および / またはメッシングらの方法 (Nucleic Acids Res. 9、309 (1981)) かまたはマクサムらの方法 (Methods in Enzymology 65、499 (1980)) により配列決定する。

【0120】

10

20

30

40

50

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

【0121】

10

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

【0122】

E. 宿主細胞の選択および形質転換

本発明においてベクターをクローニングおよび発現するのに適した宿主細胞は、上記原核細胞、酵母または高等真核細胞である。適当な原核細胞としては、グラム陰性またはグラム陽性生物、たとえば、大腸菌または桿菌が挙げられる。好ましいクローニング宿主は大腸菌294(ATCC 31,446)であるが、大腸菌B、大腸菌X1776(ATCC 31,537)、大腸菌W3110(ATCC 27,325)、シュードモナス種、またはセラチア・マルセサンス(*Serratia Marcesans*)などの他のグラム陰性またはグラム陽性原核細胞も適している。

20

【0123】

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

30

40

【0124】

適当な宿主細胞はまた多細胞生物に由来してもよい。かかる宿主細胞は、プロセッシング活性およびグリコシル化活性を複合しうる。原則として、脊椎動物培養か無脊椎動物培養かにかかわらず、いかなる高等真核細胞培養も利用できるが、ヒトなどの哺乳動物からの細胞が好ましい。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞および昆虫細胞が挙げられる。スポドブレタ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*)(イモムシ)、エデス・エジプティ(*Aedes aegypti*)(蚊)、エデス・アルボピクツス(*Aedes albopictus*)(蚊)、ドロソフィラ・メラノガスター(*Drosophila melanogaster*)(ショウジョウバエ)、およびボンビクス

50

・モリ (*Bombyx mori*) 宿主細胞などの宿主から数多くのバクテリオファージ株および変異体および対応する許容しうる昆虫宿主細胞が同定されている。ルッコウ (Luckow) ら、*Bio/Technology* 6、47～55 (1988); ミラー (Miller) ら、*ジェネティック・エンジニアリング (Genetic Engineering)*、セットロウ (Setlow, J. K.) ら編、Vol. 8 (プレナム・パブリッシング、1986)、277～279頁; およびマエダ (Maeda) ら、*Nature* 315、592～594 (1985) 参照。かかるウイルス株は、種々、公的に利用可能であり (たとえば、アウトグラフィ・カリフォルニカ (*Autographa californica*) NPV の L-1 変異体)、かかるウイルスはとりわけスポドプテラ・フルギペルダ細胞のトランスフェクションのために本発明によるウイルスとして使用できる。

【0125】

綿、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト、およびタバコの植物細胞培養を宿主として利用することができる。一般に、trk 受容体 DNA を含むように前以て操作しておいた細菌アグロバクテリウム・チュメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のある株とともにインキュベートすることにより植物細胞をトランスフェクションする。植物細胞培養をアグロバクテリウム・チュメファシエンスとともにインキュベートする間に、trk 受容体をコードする DNA は該植物細胞宿主に移され、トランスフェクションされて適当な条件下で trk 受容体 DNA を発現するようになる。加えて、ノパリンシンターゼプロモーターやポリアデニル化シグナル配列などの植物細胞と適合しうる調節配列およびシグナル配列も利用できる。デピッカー (Depicker) ら、*J. Mol. Appl. Gen.* 1、561 (1982)。加えて、T-DNA 780 遺伝子上流から単離した DNA セグメントは、組換え DNA を含有する植物組織での植物発現可能な遺伝子の転写レベルを活性化または増加させる。1989年6月21日に公開された EP 321,196 を参照。

【0126】

しかしながら、脊椎動物細胞での関心が最も高く、培養 (組織培養) 中での脊椎動物細胞の増殖は、それ自体よく知られている。ティッシュ・カルチャー (Tissue Culture)、アカデミック・プレス、クルーズ (Krusz) およびパターソン (Patterson) 編 (1973) 参照。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40 により形質転換されたサル腎臓 CV1 株 (COS-7、ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓細胞株 [293 または浮遊培養での増殖用にサブクロニングした 293 細胞、グラハム (Graham) ら、*J. Gen. Virol.* 36、59 (1977)]; ベビーハムスター腎臓細胞 9BHK、ATCC CCL 10); チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR [CHO、ウアラウプおよびチェイシン、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77、4126 (1980)]; マウスセルトリ細胞 [TM4、マザー (Mather)、*Biol. Reprod.* 23、243～251 (1980)]; サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL 70); アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1578); ヒト頸部癌腫細胞 (HELA、ATCC CCL 2); イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC CCL 34); バッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A、ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL 75); ヒト肝臓細胞 (Hep G2、HB 8065); マウス乳腫瘍 (MMT 060562、ATCC CCL 51); TRI 細胞 [マザーら、*Annals N.Y. Acad. Sci.* 383、44068 (1982)]; MRC 5 細胞; FS4 細胞; およびヒト肝癌細胞株 (Hep G2) である。好ましい宿主細胞はヒト胚腎臓 293 およびチャイニーズハムスター卵巣細胞である。

【0127】

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

【0128】

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

【0129】

10

20

30

40

50

F. 宿主細胞の培養

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

【0130】

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

【0131】

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

【0132】

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

【0133】

G. 遺伝子増幅 / 発現の検出

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

【0134】

遺伝子発現はまた、別のやり方として、遺伝子産物の発現を直接定量するための組織切片の免疫組織化学的染色および細胞培養液または体液のアッセイなどの免疫学的方法によっても測定することができる。免疫組織化学的染色法では、細胞試料を一般に脱水および固定によって調製し、ついで遺伝子産物に特異的な標識抗体と反応させる。その際、該標識は、酵素標識、蛍光標識、ルミネセンス標識などの、通常、視覚的に検出しうるものである。本発明に用いるのに適した特に感度の高い染色法は、フセ (Hse) らの Am. J. Clin. Pharm. 7 5、7 3 4 ~ 7 3 8 (1 9 8 0) に記載されている。

10

20

30

40

50

【0135】

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

【0136】

H . t r k 受容体の精製

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

【0137】

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

【0138】

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

【0139】

I . t r k 受容体の共有結合修飾

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

10

20

30

40

50

とができる。

【0140】

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

10

【0141】

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

【0142】

リシンおよびアミノ末端残基は、無水コハク酸または他の無水カルボン酸と反応させる。これら試薬による誘導体化は、リシン残基の電荷を逆転する効果を有する。 α -アミノ含有残基を誘導体化するための他の適当な試薬としては、メチルピコリンイミデートなどのイミドエステル；ピリドキサルリン酸；ピリドキサル；クロロボロハイドライド(c 20
chloroborohydride)；トリニトロベンゼンスルホン酸；O-メチルイソ尿素；2,4-ペンタンジオン；およびグリオキシル酸とのトランスアミナーゼにより触媒された反応が挙げられる。

【0143】

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

【0144】

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

30

【0145】

カルボキシル側鎖基(アスパラギン酸またはグルタミン酸)は、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-4-エチル)カルボジイミドや1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミドなどのカルボジイミド(R'-N=C=N-R') 40
と反応させることにより選択的に修飾する。さらに、アスパラギン酸およびグルタミン酸残基はアンモニウムイオンと反応させることによりアスパラギンおよびグルタミン残基に変換される。

【0146】

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

【0147】

他の修飾には、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリン、トレオニンまたはチロシン残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖の

50

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

【0148】

10

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

20

【0149】

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

【0150】

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

30

【0151】

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

40

【0152】

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

【0153】

trk 受容体は、たとえばコアセルベーション法または界面重合法により調製したマイクロカプセル中、コロイド状のドラッグデリバリーシステム(たとえば、リポソーム、ア

50

ルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子(nano-particles)およびナノカプセル(nanocapsules))中、またはマクロエマルジョン中に包括することができる。かかる技術はレミングトンズ・ファーマシューティカル・サイエンスィズ(Remington's Pharmaceutical Sciences)、第16版、オソル(Osol, A.)編(1980)に開示されている。

【0154】

J. t r k 受容体のグリコシル化変異体

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

10

【0155】

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

20

【0156】

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

30

【0157】

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

40

【0158】

K. t r k 受容体 - 免疫グロブリンキメラ(イムノアドヒーション)

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

【0159】

免疫グロブリン(Ig)およびある種の変異体は知られており、その多くは組換え細胞培

50

養において調製されている。たとえば、米国特許第 4,745,055 ; EP 256,654 ; フォークナー (Faulkner) ら、Nature 298 : 286 (1982) ; EP 120,694 ; EP 125,023 ; モリソン (Morrison)、J. Immun. 123 : 793 (1979) ; ケーラー (Kohler) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 77 : 2197 (1980) ; ラソ (Raso) ら、Cancer Res. 41 : 2073 (1981) ; モリソン ら、Ann. Rev. Immunol. 2 : 239 (1984) ; モリソン、Science 229 : 1202 (1985) ; モリソン ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 81 : 6851 (1984) ; EP 255,694 ; EP 266,663 ; および WO 88 / 03559 を参照。再会合した免疫グロブリン鎖もまた知られている。たとえば、米国特許第 4,444,878 ; WO 88 / 03565 ; および EP 68,763 およびその引用文献を参照。本発明のキメラ中の免疫グロブリン部分は I g G - 1、I g G - 2、I g G - 3 または I g G - 4 サブタイプ、I g A、I g E、I g D または I g M から得られてよいが、好ましくは I g G - 1 または I g G - 3 である。

【0160】

適当な免疫グロブリン定常ドメイン配列に結合した受容体配列から構築したキメラ (イムノアドヒージョン) は当該技術分野で知られている。文献に報告されたイムノアドヒージョンは、T 細胞受容体^{*} [ガスコイン (Gascoigne) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 84、2936 ~ 2940 (1987)] ; CD 4^{*} [カポン (Capon) ら、Nature 337、525 ~ 531 (1989)] ; トラウネッカー (Traunecker) ら、Nature 339、68 ~ 70 (1989) ; ゼットマイスル (Zettmeissl) ら、DNA Cell Biol. U S A 9、347 ~ 353 (1990) ; バーン (Byrn) ら、Nature 344、667 ~ 670 (1990)] ; L - セレクチン (ホーミングレセプター) [ワトソン (Watson) ら、J. Cell. Biol. 110、2221 ~ 2229 (1990) ; ワトソン ら、Nature 349、164 ~ 167 (1991)] ; CD 44^{*} [アルフォ (Auffo) ら、Cell 61、1303 ~ 1313 (1990)] ; CD 28^{*} および B 7^{*} [リンズレイ (Linsley) ら、J. Exp. Med. 173、721 ~ 730 (1991)] ; CTLA - 4^{*} [リンズレイ ら、J. Exp. Med. 174、561 ~ 569 (1991)] ; CD 22^{*} [スタメンコビッチ (Stamenkovic) ら、Cell 66、1133 ~ 1144 (1991)] ; TNF 受容体 [アシュケナージ (Ashkenazi) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 88、10535 ~ 10539 (1991)] ; レスラウアー (Lesslauer) ら、Eur. J. Immunol. 27、2883 ~ 2886 (1991) ; ペッペル (Peppl) ら、J. Exp. Med. 174、1483 ~ 1489 (1991)] ; NP 受容体 [ベネット (Benett) ら、J. Biol. Chem. 266、23060 ~ 23067 (1991)] ; I g E 受容体^{*} [リッジウェイ (Ridgway) およびゴーマン (Gorman)、J. Cell. Biol. 115、要約、1448 (1991)] ; HGF 受容体 [マーク (Mark, M. R.) ら、1992、J. Biol. Chem. 提出] (星印^{*}) は該受容体が免疫グロブリンスーパーファミリーの成員であることを示す) の融合体を含む。

【0161】

最も簡単で直截的なイムノアドヒージョンの設計は、「アドヒージョン」タンパク質の結合領域を免疫グロブリン重鎖のヒンジ領域および Fc 領域と組み合わせるものである。通常、本発明の t r k 受容体 - 免疫グロブリンキメラを調製するには、所望の t r k 受容体の細胞外ドメインまたはその断片をコードする核酸の C 末端を免疫グロブリン定常ドメイン配列の N 末端をコードする核酸に融合させるが、N 末端融合も可能である。

【0162】

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

【0163】

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

ることができる。

【0164】

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

【0165】

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

10

【0166】

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

20

【0167】

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

- (a) A C_L - A C_L ;
- (b) A C_H - [A C_H、A C_L - A C_H、A C_L - V_H C_H、またはV_L C_L - A C_H] ;
- (c) A C_L - A C_H - [A C_L - A C_H、A C_L - V_H C_H、V_L C_L - A C_H、またはV_L C_L - V_H C_H] ;
- (d) A C_L - V_H C_H - [A C_H、またはA C_L - V_H C_H、またはV_L C_L - A C_H] ;
- (e) V_L C_L - A C_H - [A C_L - V_H C_H、またはV_L C_L - A C_H] ; および
- (f) [A - Y]_n - [V_L C_L - V_H C_H]₂

30

(式中、各Aは同一または異なるtrk受容体のアミノ酸配列を示す；

V_Lは免疫グロブリン軽鎖の可変ドメインである；

V_Hは免疫グロブリン重鎖の可変ドメインである；

C_Lは免疫グロブリン軽鎖の定常ドメインである；

C_Hは免疫グロブリン重鎖の定常ドメインである；

nは1を超える整数である；

Yは共有架橋剤の残基を示す)。

40

【0168】

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

【0169】

50

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

【 0 1 7 0 】

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

【 0 1 7 1 】

好ましい態様において、本発明のイムノアドヒーションの構築に使用する免疫グロブリン配列は、I g G 免疫グロブリン重鎖の定常ドメインからのものである。ヒトイムノアドヒーションの場合、ヒト I g G 1 および I g G 3 免疫グロブリン配列を使用するのが好ましい。I g G 1 を使用する主要な利点は、I g G 1 イムノアドヒーションが固定化プロテイン A 上で効率的に精製しうることである。対照的に、I g G 3 の精製にはプロテイン G が必要であるが、これは有意に利用範囲の狭い手段である。しかしながら、特定のイムノアドヒーションの構築のための I g 融合相手の選択に際しては、免疫グロブリンの他の構造的および機能的特性をも考慮すべきである。たとえば、I g G 3 のヒンジは一層長くて一層可撓性に富むため、I g G 1 に融合した場合には折り畳まれずまたは適切に機能しない一層大きな「アドヒーション」ドメインを収容することが可能である。他の考慮すべき点は結合価である；I g G イムノアドヒーションは2価のホモ二量体であるのに対し、I g A や I g M のような I g サブタイプは、それぞれ基本的な I g ホモ二量体ユニットの二量体構造または五量体構造を生じる。インビボ適用のために設計した t r k - I g イムノアドヒーションのためには、薬物動態学的特性および F c 領域により特定されるエフェクター機能もまた重要である。I g G 1、I g G 2 および I g G 4 はすべて21日のインビボ半減期を有するが、補体系を活性化する相対的な効力は異なっている。I g G 4 は補体を活性化せず、I g G 2 は I g G 1 に比べて補体活性化が有意に弱い。さらに、I g G 1 とは異なり、I g G 2 は単核細胞または好中球上の F c 受容体には結合しない。I g G 3 は補体活性化が最適であるが、インビボでの半減期は他の I g G イソタイプの約 1 / 3 である。イムノアドヒーションをヒト治療剤として用いるべく設計するに際して考慮すべき他の重要な点は、特定のイソタイプのアロタイプ変異体である。一般に、血清学的に定められたアロタイプの少ない I g G イソタイプが好ましい。たとえば、I g G 1 はわずかに4つのみの血清学に定められたアロタイプ部位を有し、そのうち2つ (G 1 m および 2) は F c 領域に位置している；これら部位のうちの一つである G 1 m 1 は非免疫原性である。対照的に、I g G 3 には12の血清学的に定められたアロタイプが存在し、そのすべてが F c 領域中に存在する；これら部位のうち3つ (G 3 m 5、1 1 および 2 1) だけが非免疫原性の一つのアロタイプを有する。それゆえ、 γ 3 イムノアドヒーションの潜在的な免疫原性は γ 1 イムノアドヒーションの免疫原性よりも大きい。

【 0 1 7 2 】

本発明の t r k - I g イムノアドヒーションを設計するに際して、ニューロトロフィン結合および/または生物学的活性に必要なドメインは欠失させてよい。かかる構造において、折り畳みの間違いを回避するために融合接続 (junction) をドメイン間に位置する残基に置くのが重要である。親の免疫グロブリンに関して、有用な接続点は2つの重鎖の間

10

20

30

40

50

でジスルフィド結合を形成するヒンジのシステインの直ぐ上流である。しばしば用いられる設計において、該分子の「アドヒーシン」(t r k)部分のC末端残基のコドンにI g G 1 ヒンジ領域の配列D K T H T C P P C Pのコドンの直ぐ上流に位置させる。

【0173】

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

【0174】

t r k - I g イムノアドヒーシンの発現のための宿主細胞株の選択は、主として発現ベクターに依存する。他の考慮すべき点は、必要とするタンパク質の量である。ミリigramの量が一過性のトランスフェクションによってしばしば産生されうる。たとえば、アデノウイルスE I A で形質転換された293ヒト胚腎臓細胞株をリン酸カルシウム法の変法によりp R K 5 ベースのベクターでトランスフェクションして十分なイムノアドヒーシン発現を行うことができる。C D M 8 ベースのベクターを用いてD E A E - デキストラン法によりC O S 細胞をトランスフェクションすることができる[アルフォら、Cell 61、1303~1313(1990); ゼットマイスルら、DNA Cell Biol.(U S) 9、347~353(1990)]。一層多量のタンパク質の産生を望む場合は、宿主細胞株の安定なトランスフェクションの後にイムノアドヒーシンを発現させることができる。たとえば、p R K 5 ベースのベクターを、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(D H F R)をコードしG 4 1 8 に対する耐性を付与する別のプラスミドの存在下でチャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞中に導入することができる。G 4 1 8 に対して耐性のクローンを培養中で選択することができる; これらクローンを増加レベルのD H F R インヒビターのメトトレキセートの存在下で増殖させる; D H F R およびイムノアドヒーシン配列をコードする遺伝子コピーの数が同時に増幅されたクローンを選択する。イムノアドヒーシンがそのN末端に疎水性のリーダー配列を含む場合には、トランスフェクションした細胞によってプロセシングおよび分泌されやすい。一層複雑な構造のイムノアドヒーシンの発現には、独特に適した宿主細胞を必要とする; たとえば、軽鎖またはJ鎖などの成分は、ある種のエロームまたはハイブリドーマ細胞宿主によって提供されてよい[ガスコインら、1987、上記文献; マーチン(Martin)ら、J.Virol.67、3561~3568(1993)]。

【0175】

イムノアドヒーシンはアフィニティークロマトグラフィーにより都合よく精製すること

ができる。アフィニティーリガンドとしてのプロテイン A の適合性は、キメラに用いた免疫グロブリンの F c ドメインの種およびイソタイプに依存する。プロテイン A は、ヒト γ 1、 γ 2、または γ 4 重鎖に基づくイムノアドヒーションを精製するのに用いることができる [リンドマーク (Lindmark) ら、J. Immunol. Meth. 62、1 ~ 13 (1983)]。プロテイン G はすべてのマウスイソタイプおよびヒト γ 3 に推奨される [グス (Guss) ら、EMBO J. 5、15671575 (1986)]。アフィニティーリガンドを結合させるマトリックスは最もしばしばアガロースであるが、他のマトリックスを利用することもできる。制御多孔性ガラス (controlled pore glass) やポリ (スチレンジビニル) ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスは一層速い流速を可能とし、一層短い処理時間がアガロースで達成できる。イムノアドヒーションをプロテイン A またはプロテイン G アフィニティークラムに結合させる条件は、完全に F c ドメインの特性、すなわちその種およびイソタイプによる。一般に、適切なリガンドを選択すると、非適正化培養液から効率的な結合が直接生じる。イムノアドヒーションの一つの顕著な特徴は、ヒト γ 1 分子の場合、プロテイン A に対する結合能が同じ F c タイプの抗体に比べて若干減少していることである。結合したイムノアドヒーションは、酸性 pH (3.0 またはそれ以上) かまたは穏やかなカオトロブ塩を含む中性 pH の緩衝液中で効率的に溶出することができる。このアフィニティークロマトグラフィー工程の結果、> 95% の純度のイムノアドヒーション調製物を得ることができる。プロテイン A またはプロテイン G 上のアフィニティークロマトグラフィーの代わりに、またはプロテイン A またはプロテイン G 上のアフィニティークロマトグラフィーに加えて、当該技術分野で知られた他の方法を用いてイムノアドヒーションを精製することができる。イムノアドヒーションは、親チオ性 (thiophilic) ゲルクロマトグラフィー [ハッチェンズ (Hutchens) およびポラト (Porath)、Anal. Biochem. 159、217 ~ 226 (1986)] および固定化金属キレートクロマトグラフィー [アル - マシキ (Al-Mashikhi) およびマカイ (Makai)、J. Dairy Sci. 71、1756 ~ 1763 (1988)] において抗体と同様に振る舞う。しかしながら、抗体とは対照的に、イオン交換カラム上の振る舞いは等電点によるのみならず、そのキメラ特性のために分子中に存在するかもしれない荷電双極子にもよる。

【0176】

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

【0177】

L . t r k 受容体抗体調製物

(i) ポリクローナル抗体

t r k 受容体に対するポリクローナル抗体は、一般に、t r k 受容体およびアジュバントの複数の皮下 (s c) または腹腔内 (i p) 注射により動物において産生される。t r k 受容体または標的アミノ酸配列を含むその断片を、2 官能性または誘導体化試薬、たとえば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル (システイン残基による結合)、N - ヒドロキシスクシンイミド (リシン残基による結合)、グリタルアルデヒド、無水コハク酸、S O C l₂、または R¹ N = C = N R (式中、R および R¹ は異なるアルキル基である) を用い、免疫をしようとする種において免疫原性であるタンパク質、たとえばキーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、またはダイズトリ

プシンインヒビターにコンジュゲートするのが有用である。

【0178】

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

10

【0179】

(ii)モノクローナル抗体

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

【0180】

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

20

【0181】

ハイブリドーマ法では、マウスや他の適当な宿主動物、たとえばハムスターを上記のようにして免疫して、免疫に用いたタンパク質に特異的に結合するであろう抗体を産生するまたは産生しうるリンパ球を生成させる。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することができる。ついで、ポリエチレングリコールなどの適当な融合剤を用いてリンパ球をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマ細胞を生成する[ゴードینگ(Goding)、モノクローナル・アンティボディーズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice)、59 ~ 103 頁(アカデミックプレス、1986)]。

30

【0182】

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

40

【0183】

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

【0184】

ハイブリドーマ細胞を増殖させた培地を、t r k 受容体に対して向けられたモノクロー

50

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

【0185】

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

【0186】

所望の特異性、親和性、および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定した後、これらクローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準法により増殖させる。ゴーディング(Goding)、モノクローナル・アンティボディーズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス、59~104頁(アカデミックプレス、1986)。この目的に適した培地としては、たとえば、ダルベッコの変性イーグル培地やRPMI-1640培地が挙げられる。加えて、ハイブリドーマ細胞はまた腹水腫瘍として動物中でインビボで増殖させることができる。サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、たとえば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなどの通常の免疫グロブリン精製手順により、培地、腹水、または血清から適当に分離する。

【0187】

本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常法(たとえば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合しうるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)を用い、容易に単離および配列決定される。本発明のハイブリドーマ細胞は、かかるDNAの好ましい採取源である。単離されたら、DNAを発現ベクター中に入れ、ついで該発現ベクターをサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または免疫グロブリンタンパク質を産生しないミエローマ細胞などの宿主細胞中にトランスフェクションして、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体を合成する。DNA配列はまた、たとえば、相同なマウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインのコード配列で置換することにより(モリソンら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851(1984))、または免疫グロブリンのコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全体または部分を共有結合により連結することにより、修飾することができる。このようにして、本発明の抗trkモノクローナル抗体の結合特異性を有する「キメラ」または「ハイブリッド」抗体が調製される。

【0188】

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

【0189】

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

【0190】

診断に応用するには、本発明の抗体は典型的に検出可能な部分で標識されるであろう。検出可能な部分とは、検出可能なシグナルを直接または間接に生成しうるものであればいずれであってもよい。たとえば、検出可能な部分は、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、または¹²⁵Iなどの放射性同位元素、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、またはルシフェリンなどの蛍光または化学ルミネセンス化合物；ビオチン；放射性同位元

10

20

30

40

50

素標識、たとえば、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{14}C 、または ^3H 、またはアルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素であってよい。

【0191】

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

【0192】

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

【0193】

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

【0194】

サンドイッチアッセイは、それぞれ、検出すべきタンパク質の異なる免疫原性部分またはエピトープに結合しうる2つの抗体を使用することを含む。サンドイッチアッセイにおいては、試験試料の分析対象物が固相支持体上に固定化した第一の抗体に結合され、その後、第二の抗体が分析対象物に結合し、かくして不溶性の3部分複合体を生成する。デービッドおよびグリーン(Greene)、米国特許第4,376,110号。第二の抗体は、それ自体が検出可能な部分で標識されていてもよい(直接サンドイッチアッセイ)、または検出可能な部分で標識した抗免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい(間接サンドイッチアッセイ)。たとえば、一つのタイプのサンドイッチアッセイはELISAアッセイであり、この場合は検出可能な部分は酵素である。

【0195】

(iii)ヒト化抗体

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

【0196】

抗体のヒト化は、抗原に対する高親和性および他の好ましい生物学的特性を保持しながら行うことが重要である。この目的を達成するため、好ましい方法に従い、ヒト化抗体は親およびヒト化配列の三次元モデルを用いた親配列および種々の概念的ヒト化産物の分析プロセスにより調製される。三次元免疫グロブリンモデルは当業者には普通に利用でき、

10

20

30

40

50

よく知られている。選択した候補免疫グロブリン配列のありうる三次元立体構造を明らかにし表示するコンピュータプログラムを利用できる。これら表示を調べると、候補免疫グロブリン配列の機能におけるこれら残基の果たしうる役割の分析、すなわち該候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このように、標的抗原への増加した親和性などの所望の抗体特性が達成されるように、F R 残基を共通配列およびインポート配列から選択し組み合わせることができる。一般に、C D R が直接かつ最も実質的に抗原結合への影響に関与している。詳細は P C T 特許公報第 W O 9 4 / 0 4 6 7 9 号参照。

【 0 1 9 7 】

(iv) ヒト抗体

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

【 0 1 9 8 】

免疫後に内生の免疫グロブリン産生の不在下でヒト抗体のレパートリーを産生しうるトランスジェニック動物 (たとえば、マウス) を作製することが今や可能である。たとえば、キメラおよび生殖細胞変異体マウスにおける抗体重鎖ジョイニング領域 (J_H) 遺伝子のホモ接合性欠失は内生抗体産生の完全な抑制という結果になることが記載されている。ヒト生殖細胞免疫グロブリン遺伝子アレイをかかえる生殖細胞変異体マウス中に移すと、抗原攻撃によりヒト抗体が産生される結果となる。たとえば、ジャコボビッツ (Jakobovits) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90、2551 ~ 255 (1993); ジャコボビッツら、Nature 362、255 ~ 258 (1993) 参照。

【 0 1 9 9 】

別法として、ファージ提示 (phage display) 法 (マッカファーティ (McCafferty) ら、Nature 348、552 ~ 553 [1990]) を用い、免疫していない供与体からの免疫グロブリン可変 (V) ドメイン遺伝子レパートリーからインビトロでヒト抗体および抗体断片を作製することができる。この技術によれば、抗体の V ドメイン遺伝子が M 13 や f d などの繊維状バクテリオファージのメジャーまたはマイナーコートタンパク質遺伝子のいずれかの中にインフレームでクローニングされ、該ファージ粒子の表面上に機能的抗体断片として提示される。繊維状粒子はファージゲノムの一本鎖 DNA コピーを含むので、抗体の機能的特性に基づく選択はまた、該特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択という結果となる。それゆえ、ファージは B 細胞の幾つかの特性を真似たものとなる。ファージ表示は種々の態様で行うことができる; その概論には、たとえば、ジョンソン (Johnson)、ケビン (Kevin S.) およびチズウエル (Chiswell)、デービッド (David J.)、カレント・オピニオン・イン・ストラクチャル・バイオロジー (Current Opinion in Structural Biology) 3、564 ~ 571 (1993) を参照。幾つかの入手源の V - 遺伝子セグメントをファージ提示に使用できる。クラックソン (Clackson) らは、免疫したマウスの脾臓からの V 遺伝子の小さなランダム組み合わせライブラリー (small random combinatorial library) から抗オキサゾロン抗体の種々のアレイを単離した (Nature 352、624 ~ 628 (1991))。免疫していないヒトからの V 遺伝子のレパートリーの構築および抗原の種々のアレイ (自己抗原を含む) に対する抗体の単離は、本質的にマークス (Marks) ら (J. Mol. Biol. 222、581 ~ 597 (1991)) またはグリフィス (Griffith) ら (EMBO J. 12、725 ~ 734 (1993)) によって記載された技術に従って行うことができる。天然の免疫応答においては、抗体遺伝子は高率で突然変異を蓄積する (体細胞超突然変異 (somatic hypermutation))。導入された変化の幾つかは一層高い親和性を付与し、高親和性の表面免疫グロブリンを提示する B 細胞はその後の抗原攻撃の間に優

10

20

30

40

50

先に複製し分化する。この天然のプロセスは、「鎖シャフリング(chain shuffling)」として知られる技術により真似ることができる(マークスら、Bio/Technol. 10、779~783[1992])。この方法では、ファージ提示により得られた「一次(primary)」ヒト抗体の親和性は、免疫していない供与体から得られたVドメイン遺伝子の天然にみられる変異体のレパートリーで重鎖および軽鎖V領域遺伝子を順次置換していくことにより改善することができる。この技術はnM範囲の親和性を有する抗体および抗体断片の作製を可能とする。非常に大きなファージ抗体レパートリー(「マザー・オブ・オールライブラリー(the mother-of-all libraries)」としても知られる)を作製するための戦略がウォーターハウス(Waterhouse)らによって記載されており(Nucl. Acids Res. 21、2265~2266(1993))、かかる大きなファージライブラリーからの高親和性のヒト抗体の直接の単離はグリフィスらにより報告されている(EMBO J. (1994)、印刷中)。遺伝子シャフリング(gene shuffling)はまた、ネズミ抗体からヒト抗体を由来するのに用いることができ、その際、該ヒト抗体は出発のネズミ抗体と類似の親和性および特異性を有する。「エピトープインプリンティング(epitope imprinting)」とも呼ばれるこの方法によれば、ファージ提示法により得られたネズミ抗体の重鎖または軽鎖Vドメイン遺伝子をヒトVドメイン遺伝子のレパートリーで置換してネズミ-ヒトキメラが創製される。抗原の選択は、機能的な抗原結合部位、すなわち相手の選択を支配(刷り込む)するエピトープを再分類しうるヒト可変の単離という結果となる。このプロセスを残りのネズミVドメインを置換するために繰り返すと、ヒト抗体が得られる(1993年4月1日に公開されたPCT特許出願第WO93/06213号を参照)。CDR移植によるネズミ抗体の伝統的なヒト化と異なり、この方法は、ネズミ由来のフレームワークもCDR残基もともに有しない完全にヒトの抗体を提供する。

10

20

30

40

50

【0200】

(v) 2 特異的抗体

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

【0201】

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

【0202】

異なる一層好ましいアプローチによれば、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗体-抗原結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合する。融合は、少なくとも一部のヒンジ、CH2およびCH3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインと行うのが好ましい。軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)が融合物の少なくとも一つに存在するのが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合体および所望なら免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物中にコトランスフェクションする。このことは、構築において3つのポリペプチド鎖の均等でない比率を使用することが最適の収率を与える態様において、これら3つのポリペプチド断

片の相互の比率を調節するうえでの大きな柔軟性を付与する。しかしながら、少なくとも2つのポリペプチド鎖の等比率での発現が高収率の結果となるかまたは比率が特に重要でない場合には、3つのポリペプチドのうちの2つまたはすべてをコードする配列を一つの発現ベクター中に挿入することが可能である。このアプローチの好ましい態様において、2特異的抗体は、一方のアームにおける第一の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖と、他方のアームにおけるハイブリッド免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対(第二の結合特異性を付与する)とからなる。このような非対称な構造は、免疫グロブリン軽鎖が2特異的分子の半分の一方にのみ存在することは分離を容易にするので、望まない免疫グロブリン鎖の組み合わせから所望の2特異的化合物を分離するのを容易にすることがわかった。このアプローチは、1994年3月3日に公開されたPCT出願公開第WO94/04690に開示されている。

10

【0203】

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

【0204】

(v)ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に包含される。ヘテロコンジュゲート抗体は、共有結合により結合された2つの抗体からなる。かかる抗体は、たとえば、免疫系細胞を所望されていない細胞にターゲティングしたり(米国特許第4,676,980)、HIV感染の治療(PCT出願公開第WO91/00360およびWO92/200373; EP03089)に提唱されている。ヘテロコンジュゲート抗体は、都合のよい架橋法を用いて作製することができる。適当な架橋剤は当該技術分野でよく知られており、多数の架橋法とともに米国特許第4,676,980に開示されている。

20

【0205】

M. t r k - I g イムノアドヒーシンの使用

(i)リガンド結合

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

30

40

【0206】

(ii)リガンドの同定/単離

t r k - I g イムノアドヒーシンを使用できる他の領域は、ヒトまたは種々の動物種におけるさらなるニューロトロフィンの探索、およびかかるリガンドの精製である。このアプローチによって現在までに同定されたリガンドとしては、2つのL-セレクチンリガンド、G l y C A M - 1およびC D 3 4が挙げられ、これらはL-セレクチン - I g Gアフ

50

イニティーカラムを用いて同定および単離された(イマイ(Imai)ら、J. Cell. Biol. 113、1213~1221(1991); ワトソンら、J. Cell. Biol. 110、2221~2229(1990); ワトソンら、J. Cell. Biol. 349、164~167(1991))。

【0207】

(iii)大量の精製可溶性 t r k 受容体の製造

イムノアドヒーションと抗体との構造的類似は、パパインなどのタンパク質加水分解酵素によりイムノアドヒーションを開裂して「アドヒーション」部分を含む F d 様の断片を生成することが可能であることを示唆した。イムノアドヒーションの開裂のための一層包括的なアプローチを得るためには、標的配列に高度に特異的なプロテアーゼを用いるべきである。この目的に適したプロテアーゼは、ズブチリシン B P N の遺伝子操作変異体であり、このものは配列 A A H Y T L を認識し開裂する。この標的配列を t r k - I g G 1 イムノアドヒーションの支持体ヒンジ領域中に導入すると、F c ドメインと t r k ドメインとの間での高度に特異的な開裂が容易となる。イムノアドヒーションはプロテイン A クロマトグラフィーにより精製し、固定化された該酵素により開裂される。開裂の結果、2つの生成物、F c 領域および t r k 領域が得られる。これら断片は、プロテイン A カラムに2回目通過させて F c を保持し溶出フラクション中に精製 t r k 断片を得ることにより容易に分離することができる。同様のアプローチは、開裂可能な配列を一層下方のヒンジ部に配置することにより二量体 t r k 部分を得るのに使用できる。

10

【0208】

20

N . t r k 受容体の使用

(i)キナーゼ受容体活性化アッセイ

t r k 受容体は、P C T 特許公開第 W O 9 4 / 0 3 1 9 8 に記載されたキナーゼ受容体活性化(K I R A)アッセイに使用できる。この E L I S A タイプのアッセイは、受容体プロテインチロシンキナーゼ(r P T K、たとえば、t r k 受容体)のキナーゼドメインの自己リン酸化を測定することによるキナーゼ活性化の定性的または定量的測定、並びに選択された r P T K の潜在的なアゴニストまたはアンタゴニストの同定および特徴付けに適している。このアッセイの第一段階は、キナーゼ受容体、たとえば t r k 受容体のキナーゼドメインのリン酸化を含み、その際、該受容体は真核細胞の細胞膜中に存在する。受容体は内生の受容体であってよく、または受容体または受容体構築物をコードする核酸を細胞中に形質転換してよい。典型的に、第一の固相(たとえば、第一のアッセイプレートのウエル)にかかる細胞(通常、哺乳動物細胞株)が接着するように該細胞の実質的に均一な集団で該固相をコーティングする。しばしば、細胞は接着性であり、それによって第一の固相に自然に接着する。「受容体構築物」を使用する場合には、それは通常、キナーゼ受容体とフラグ(flag)ポリペプチドとの融合からなる。フラグポリペプチドは該アッセイの E L I S A 部分において捕捉試薬、しばしば捕捉抗体により認識される。ついで、チロシンキナーゼ受容体(たとえば、t r k 受容体)が分析対象物に暴露されるように(または分析対象物と接触するように)、細胞が接着したウエルに分析対象物を加える。このアッセイは、興味のもたれるチロシンキナーゼ受容体(たとえば、t r k A、t r k B または t r k C)に対するアゴニストおよびアンタゴニストリガンドの同定を可能にする。受容体にアゴニストが結合するのを阻止するアンタゴニストリガンドの存在を検出するためには、受容体結合および活性化の競合的抑制を測定できるように、まず、接着している細胞をアンタゴニストリガンドであると思われるものに暴露し、ついでアゴニストリガンドに暴露する。また、このアッセイは、アゴニストリガンドに結合することによって該アゴニストリガンドが r P T K に結合し活性化する能力を減少または除去するアンタゴニストを同定することができる。かかるアンタゴニストを検出するには、r P T K に対するアンタゴニストと思われるものおよびアゴニストと一緒にインキュベートし、ついで、このリガンド混合物に接着細胞を暴露する。分析対象物への暴露の後、接着細胞を溶解緩衝液(可溶性界面活性剤を含有する)および穏やかな攪拌により可溶化し、それによって細胞溶解液を放出させ、これを濃縮または清澄化する必要なく直接、アッセイの E L I S A 部分に供す

30

40

50

ることができる。ついで、かくして調製した細胞溶解液はアッセイの E L I S A 段階に容易に供することができる。E L I S A 段階の第一の工程として、第二の固相(通常、E L I S A マイクロタイタープレートのウェル)を、チロシンキナーゼ受容体または受容体構築物の場合はフラグポリペプチドに特異的に結合する捕捉試薬(しばしば捕捉抗体)でコーティングする。第二の固相のコーティングは、捕捉試薬が第二の固相に接着するようにして行う。捕捉試薬は一般にモノクローナル抗体であるが、実施例にも記載するようにポリクローナル抗体を用いることもできる。ついで、受容体または受容体構築物が第二の固相に接着する(または捕捉される)ように、得られた細胞溶解液を接着捕捉試薬に暴露または接触させる。ついで、未結合の細胞溶解液を除去するために洗浄工程を行い、捕捉された受容体または受容体構築物を残す。ついで、接着したまたは捕捉された受容体または受容体構築物を、チロシンキナーゼ受容体中のリン酸化されたチロシン残基を同定する抗ホスホチロシン抗体に暴露または接触させる。好ましい態様において、抗ホスホチロシン抗体は、非放射性の発色試薬の色変化を触媒する酵素に(直接または間接に)コンジュゲートされている。従って、受容体のリン酸化は、その後の試薬の色変化により測定することができる。該酵素は抗ホスホチロシン抗体に直接結合させることができるし、またはコンジュゲート分子(たとえば、ビオチン)を抗ホスホチロシン抗体にコンジュゲートし、その後、該酵素をコンジュゲート分子を介して抗ホスホチロシン抗体に結合させることができる。最後に、捕捉された受容体または受容体構築物への抗ホスホチロシン抗体の結合を、たとえば発色試薬の色変化により測定する。

10

20

30

40

50

【0209】

(ii)治療学的使用

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

【0210】

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

たはPEGなどの非イオン性界面活性剤を含む。

【0211】

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

【0212】

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

【0213】

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

【0214】

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

【0215】

除放調製物の適当な例としては、たとえばフィルムやマイクロカプセルなどの形状製品の形態の半透明ポリマーマトリックスが挙げられる。除放マトリックスは、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド(米国特許第3,773,919、EP58,481)、L-グルタミン酸とγ-L-グルタミン酸エチルとのコポリマー(シドマン(U.Sidman)ら、1983、「Biopolymers」22(1):547~556)、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)(ランガー(R.Langer)ら、1981、「J.Biomed.Master.Res.」15:167~277およびランガー、1982、Chem.Tech.12:98~105)、エチレンビニルアセテート(ランガーら、上掲)またはポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸(EP133,988A)を含む。除放組成物はまたリポソームを含む。本発明の範囲内の分子を含むリポソームは、それ自体公知の方法により調製される:DE3,218,121A;エプスタイン(Epstein)ら、1985、「Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.」82:3688~3692;ファング(Hwang)ら、1980、「Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.」77:4030~4034;EP52322A;EP36676A;EP88046A;EP143949A;EP142641A;日本特許出願第83-118008;米国特許第4,485,045および4,544,545;およびEP102,324A。通常、リポソームは脂質含量が約30モル%コレステロールを越える小さな(約200~800オングストローム)単ラメラタイプのものであり、選択された比率は最適なNT-4療法に適合されている。

【0216】

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

【0217】

本発明は下記の限定されない実施例によりさらに詳細に説明されるであろう。実施例に記載した実験については、ヒト脳cDNA、ポリα+RNA、ゲノムおよびcDNAライブラリーはクローンテック(Clontech)(パロアルト、カリフォルニア)から入手した。pGEMはプロメガ(Promega)(マジソン、ウイスコンシン)から、制限酵素はニュー・イングランド・バイオラブズ(New England Biolabs)(ピバリー、マサチューセッツ)から入

10

20

30

40

50

手した。Taqポリメラーゼはパーキン・エルマー(Perkin-Elmer)(ノーウォーク、コネチカット)から入手したが、他のすべての酵素、凍結したコンピテントな大腸菌および組織培養培地はギブコ-Gibco(BRL)(ライセルスブルク、メリーランド)から購入した。

【0218】

実施例 1

ヒトtrkBおよびtrkC受容体のクローニング

A. ヒトtrkBおよびtrkCプロープの生成

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

cDNAライブラリーのプロープに使用するヒトtrkBおよびtrkC配列の断片を増幅するため、ラットtrkBまたはブタtrkCの公知配列に基づく縮重プライマー(表1参照)を用いたPCRを採用した。PCR反応緩衝液は、10mMトリス(室温にてpH8.4)、2.0mM MgCl₂ および50mM KClからなっていた。すべての反応に「ホットスタート(hot start)」手順を用い、酵素を含まない試料を98℃にて10分間インキュベートし、65℃に平衡化し、酵素を加えた。ついで、94℃にて45秒; 60℃にて45秒; および72℃にて60秒のサイクルを35サイクル行い、最終伸長を72℃で10分間行った。この手順により増幅された断片をpGEMベクター(プロメガ、マジソン、ウイスコンシン)中にサブクローニングし、配列決定した。ついで、公知のtrkBおよびtrkC配列と類似の配列を有するクローンから挿入物を切り出し、ゲル精製し、32P dCTPを用いたランダムプライミングにより標識した。これらを用いて15cm皿当たり 5×10^4 プラークにてプレーティングした 10^6 cDNAクローンをプロープし、ニトロセルロース(シュライヒャー・アンド・シュエル(Schleicher and Schuell)、キーン、ニューハンプシャー)に2つずつ移し、アルカリ変性し、中和し、80℃で2時間焼結した。フィルターを50%ホルムアミド、5×SSC、5×デンハルト溶液、20mM NaPO₄、pH7.4、0.1% SDS、および100μg/mlサケ精子DNA中、42℃にて少なくとも4時間プレハイブリダイズし、デンハルト溶液を1×に下げた同じ条件下で一夜ハイブリダイズした。ついで、フィルターを2×SSC、0.1% SDSで4回、および0.1×SSC、0.1% SDSで室温にて2回、および0.1×SSC、0.1% SDSで42℃にて2回、洗浄した。両セットのフィルターで陽性であったクローンをブラーク精製し、挿入物をヘルパー媒体した切り出し(ラムダDR2ライブラリー)かまたは標準的なサブクローニングによりpGEM中にサブクローニングした。オリゴヌクレオチドプロープをポリヌクレオチドキナーゼを用いて末端標識するか、またはDNAポリメラーゼのクレノウ断片を用いた「充填(fill-in)」反応により標識し、ホルムアミドを35%に減少させた同じ条件下でフィルターにハイブリダイズさせた。trkBの5'プロープにハイブリダイズするゲノムクローンをSau3aで消化し、得られた断片をBamHI切断したM13mp18中にサブクローニングした。これらクローンをラムダライブラリーと同様に再スクリーニングし(変性工程なし)、陽性のクローンをブラーク精製し、配列決定した。trkBおよびtrkCの完全なコード領域をコードするDNAを標準法を用いて再構築した。

【0219】

B. ヒトtrkBクローンの特徴付け

ヒトtrkBのプロープを用いて6つのクローンが得られた。これらを、最初のプロープで得られた配列から設計したPCRおよびプライマーを用いてマッピングし、最大の3'および5'伸長を有するクローンを配列決定した。配列分析は、これらクローンがネズミtrkBと高度に相同なタンパク質をコードしており、全チロシンキナーゼドメインを含み3'ポリA+テールは完全であるが5'末端は明らかに不完全であることを明らかにした。ラットtrkB配列の5'末端から設計したオリゴヌクレオチドプロープを用い、最初のライブラリー、および引き続き、陽性のクローンが認められなかった4つの他のdTプライミングしたヒト脳ライブラリーを再スクリーニングした。このプロープを用いてラン

ダムプライミングヒト脳ライブラリーをスクリーニングしたところ、4つの陽性クローンが得られた。これらクローンの配列分析は、これらクローンが前記ヒトクローンと重複しているが、ラットと比較すると5'末端のコード領域の17の塩基が依然として失われていた。ついで、ヒトゲノムライブラリーを5'オリゴヌクレオチドプローブでプローブし、ゲノムクローンを単離した。ついで、これらクローンのS a u 3 a断片をM 1 3中にサブクローニングし、再スクリーニングし、陽性サブクローンの配列を決定して最終のコード配列を得た。これらc D N Aクローンの重複領域から得られたヒトt r k Bの最終的なヌクレオチド配列およびそれから導かれたアミノ酸配列を図1に示す。

【0220】

C. ヒトt r k Cクローンの特徴付け

同様の戦略をヒトt r k Cの細胞外ドメインに特異的なプローブを作製するために用い、2つの最初のクローンを得た。これらクローンの両者とも、ブタおよびラットにおいて記載されたt r k Cの切断形態に対応する配列を含むことがわかった(ランバレら、[1992]上掲; ツォウルファス、[1993]上掲; バレンズエラら、[1993]、上掲)。なぜなら、該配列は、t r k Cの完全な細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびT K様配列を含まない短い細胞質ドメインをコードしていたからである。t r k Cのチロシンキナーゼドメインをコードするクローンを単離するため、ブタt r k CのC末端テールおよびヒトt r k Cの細胞間ドメインの膜近傍領域に対応するオリゴヌクレオチドを用いてライブラリーを2回再プローブした。二重陽性クローンが分析され、切断されたt r k Cクローンと重複する配列を含み、チロシンキナーゼコード配列をも含むことがわかった。これらクローンの重複領域から得られたヌクレオチド配列およびそれから導かれたアミノ酸を

10

20

【0221】

D. ヒトt r k Aのクローニング

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

30

【0222】

E. 結果

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

40

【0223】

t r k Bおよびt r k Cについて得られた異なるクローンの幾つかの配列分析において、おそらく別の仕方のスプライシングにより生じたと思われる複数の形態が認められた。

50

変異体の形態は、t r k Cの細胞外ドメイン中への可能な挿入、切断された非T K形態のt r k Bおよびt r k C、およびt r k CのT Kドメイン内の可能な挿入として観察された。ついで、特異的なオリゴヌクレオチドプローブでのライブラリースクリーニングおよびP C Rを用い、異なるヒトt r k中のこれら部位での他の潜在的な変異を探索するために一層系統的な探索を行った。異なるヒトt r k中でみられた異なる形態および他の公知のt r kでみられたものとの比較の図式を図4に示す。

【0224】

ヒトt r k Cの細胞外ドメイン中には、ラットおよびヒトt r k Aにおいて細胞外挿入が記載された部位の近接部位に、ラットおよびブタt r k Cと比べて9つのアミノ酸の可能な欠失が存在した(パーカー(Barker)ら、J. Biol. Chem. 268、1510~15157[1993]; 図2)。ヒトt r k C中の該領域のP C R分析は、挿入含有および挿入欠失の両形態に期待される長さに対応する2つのバンドしか示さなかった。ヒトt r k B中の該領域のP C R分析は検出可能な断片長多型を示さなかったが、t r k A特異的なプライマーを用いた増幅では2つの区別されるバンドが示され、これらをクローニングし配列決定した。潜在的なヌクレオチド挿入は、ラットおよびヒトt r k Aにおいて以前に記載されたもの(パーカーら、上掲)と同一のペプチド挿入をコードする1297位でのT C T C C T T C T C G C C G G T G Gであった。

【0225】

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

【0226】

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

【0227】

c D N Aクローンにおいて得られたt r k CのT Kドメインは、サブドメインV I IとV I I Iとの間に14のアミノ酸のみかけの挿入を有していた(ハンクス(Hanks)ら、Science 241:42~52[1988]およびハンクスら、Methods in Enzymol. 200:38~62[1991])。この配列はラットt r k C T Kドメインでみられた観察された潜在的な挿入と同じ部位に挿入されており、そこでみられた14のアミノ酸挿入と配列が同じである(ハンクスら、[1988]、上掲; バレンズエラら、[1993]、上掲)。ラットt r k Cでみられた14のアミノ酸挿入に加え、25(ツォウルファスら、[1993]、上掲)または39(バレンズエラら、[1993]、上掲)のアミノ酸の一層長い挿入が認められている。これら一層長い挿入がヒトでも発現されているかどうかを決定するため、この領域にわたって脳c D N AをP C R増幅の鋳型として用いた。これら実験は一貫して、2つのすでに観察されたスプライス型、すなわち14のアミノ酸挿入を有するものと有しないものに対応する長さの2つのバンドを示した。これら2つのバンドのクローニン

10

20

30

40

50

グおよび配列決定により、これらバンドが以前にみられた 14 のアミノ酸挿入を有する形態と有しない形態との 2 つの形態に対応することが確かめられた。興味深いことに、挿入不含の形態に対応するバンドは高レベルの t r k C を発現する非神経組織、すなわち精巢からの c D N A を用いた増幅においてのみ認められたので(データは示していない)、このスプライスは組織特異的であった。t r k B T K ドメインの同領域に特異的なオリゴヌクレオチドを用いたヒト脳 c D N A の P C R は、この領域における断片長多型の証拠を示さなかった。

【 0 2 2 8 】

F . 検討

単一の種内での異なる t r k の間および異なる種の同じ t r k の間での類似性の程度を調べることににより、ある種の一般化が引き出されるかもしれない。3 つのヒト t r k 相互間およびこれらとラットからの等価な t r k との比較を、上記シュナイダーおよびシュバイガー (1991) によって定められた異なるドメインについて図 3 に示す。各 t r k はヒトとラットとで極めてよく保存されており、t r k B および t r k C はこれら 2 つの哺乳動物種間で殆ど同一である。t r k B および t r k C の個々のドメインはラットとヒトとの間で少なくとも 85 % 類似である。他方、t r k A はヒトとラットとの間の全体的な類似性は極めて高いものの、有意の配列相違の領域を示す。とりわけ、細胞外ドメインにおいては、少なくとも 85 % 類似であるのはロイシンに富む領域と第二の I g 様ドメインのみである。このことは、t r k のニューロトロフィン結合ドメインの局在化を意味しているのかもしれない。t r k A の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインは、t r k B および t r k C と同様にラットおよびヒト間で高度に保存されている。ヒトにおいて異なる t r k 間で類似性を比較すると、T K ドメインが異なる t r k 間で最も高度に保存されていることが明らかである。細胞外ドメインのうちでは、この場合も異なるヒト t r k 間で最も類似しているのは第二のシステインに富むドメインとともに第二の I g 様ドメインである。

【 0 2 2 9 】

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

【 0 2 3 0 】

t r k の切断形態に対して提唱されている役割の一つは、発現細胞においてニューロトロフィンによるシグナル変換に対し優勢な負の作用 (dominant negative influence) を及ぼすことである (ジング (Jing) ら、Neuron 9、1067 ~ 1079 [1992])。このことは、ニューロトロフィンで刺激したときに成人脳からの組織でみられるニューロトロフィンシグナル伝達の効率の相対的な欠如と一致する (クヌセル (Knusel) ら、J. Neurosci. [1994])。なぜなら、切断されない形態に対する切断された形態の比は成人において極めて高いからである。これが切断された t r k の主要な役割であるなら、ヒトにおいて t 2 が見かけ上欠如しているのはますます一層興味深い。というのは、ネズミでは t 2 はニューロンにおいて主として発現されるが t r k B の他の切断形態である t 1 は主として非ニューロン性細胞で発現されることが示されているからである。このような局在化がヒトにも当てはまるなら、t 2 の存在しないヒトニューロンは t r k B の切断形態をネズミに比べてはるかに低レベルで発現する。それゆえ、提唱されている優勢な負の作用はヒトニューロンではネズミほど重要ではないかもしれない。

【 0 2 3 1 】

ヒト t r k C と以前に記載された t r k C の転写物との間にもまた相違が存在する。細

胞外ドメインにおいて、9のアミノ酸の挿入を有する形態と有しない形態という2つの形態を生じる明らかな別の仕方のスプライシングが存在する。この明らかな挿入部位は、ラット *trk A* で以前に特徴付けられた挿入部位と整列する。挿入が6アミノ酸であるラット *trk A* の2つのスプライス形態では、今のところ結合またはシグナル変換における機能的な相違は検出されていないが(バーカー(Barker)ら、*J. Biol. Chem.* 268、1510~15157[1993])、おそらく、9のアミノ酸挿入を有するヒト *trk C* 形態では一層大きな相違が存在するであろう。異なってスプライスされた形態の生物学的役割が何であれ、これら形態は極めて種特異的である。なぜなら、本研究においてはヒト *trk B* で該位置に挿入の証拠はみられず、これまでの研究ではヒト以外で *trk C* 中の挿入は検出されていないからである(バレンズエラら、[1993]、上掲；ツォウルファス、[1993]、上掲；ランパレら、[1991]、上掲)。

10

【0232】

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

【0233】

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

20

30

【0234】

実施例2

ヒト組織における *trk* 受容体の発現パターン

A. ノーザン分析

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

40

50

【0235】

結果

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

10

【0236】

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

20

【0237】

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

【0238】

検討

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

30

40

【0239】

B. インシトゥハイブリダイゼーション

以前に刊行された手順(フィリップス(Phillips)ら、Science 250、290~294[1990])の変法によりインシトゥハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションのための組織は種々の技術により調製した。すべての組織について自己消化の

50

時間は24時間以下であった。全体の非固定胎児をOCT中に埋設し、液体窒素上のペトリ皿中に塊を浮遊させることにより凍結し、クリオスタットの助けをかりて切片にした。切片をスライド(スーパーフロストプラス(superfrost plus)、フィッシャー(Fisher))上に解凍・積載し(thaw-mounted)、空気乾燥し、55℃にて10秒間焼結し、使用時まで除湿剤を入れた密封箱中に-70℃にて貯蔵した。成人後根神経節を4%ホルムアルデヒド中に浸漬し、パラフィン切片化または凍結切片化(cryosectioning)のいずれかのために処理した。脳標本は、4%ホルムアルデヒド中に24時間浸漬することにより固定し、ショ糖緩衝液中で24時間凍結保護し(cryoprotected)、ドライアイス上で凍結し、フリージングスライディングマイクロトーム(freezing sliding microtome)上で切断した。切片をリン酸緩衝食塩水中で4℃にて貯蔵し(48時間未満)、ゼラチン-埋設(gelatin-subbed)スライド上に積載し、空気乾燥し、4℃で貯蔵した。組織貯蔵の間のすべての組織切片上での水分の凝結を回避すべく注意を払った。

10

20

30

【0240】

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

【0241】

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

【0242】

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

40

【0243】

結果

発生中の後根神経節内では、6週および8週の胎児からの神経節の両方でtrkCが強く発現された。奇妙なことに、両方の胎児において、trkCを発現する細胞が該神経節の腹側に局在する顕著な傾向がみられた。対照的に、trkA陽性細胞は該神経節の主として脊側に限られていた。成人後根神経節(パラフィン埋設または凍結切片固定化した組織)では、DRGニューロンの亜集団を3つの各trkプローブで標識した。これら3つ

50

の各 t r k に対するプローブで標識した細胞は、神経節でランダムに分布しているように思われた。これらプローブのいずれを用いても非ニューロン性細胞の標識は観察されなかった。

【0244】

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

【0245】

検討

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

【0246】

実施例 3

t r k イムノアドヒージンの発現

A. t r k - I g イムノアドヒージンの構築

タンパク質工学技術を用い、ヒト t r k を t r k 細胞外ドメインとヒト I g G 重鎖の F c ドメインとのキメラとして発現させた。t r k 細胞外ドメインと I g G - 1 F c ドメインとのキメラをコードする DNA 構築物を、ヒト I g G - 1 の F c 領域クローンを用いて作製した(アシュケナーゼら、Immunoadhesins Intern. Rev. Immunol. 10、219 ~ 227 [1993])。さらに詳しくは、I g G - 1 コード配列の採取源は、アスパラギン酸 216 (重鎖定常領域の第一の残基をアミノ酸 114 とする(カバットら、シークエンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イミュノロジカル・インタレスト、第4版 [1987])) (該アミノ酸は重鎖 - 軽鎖結合に関与するシステイン残基の後の I g G - 1 ヒンジの第一の残基である)から始まり残基 441 で終わって I g G - 1 の C H 2 および C H 3 F c ドメインを含むヒト I g G - 1 配列に融合した成熟ヒト C D 4 タンパク質の残基 1 ~ 180 からなるハイブリッドポリペプチドをコードする c D N A 配列を含む C D 4 - I g G - 1 発現プラスミド p R K C D 4₂ F c₁ (カポンら、Nature 334、525 [1989]; パーンら、Nature 344、667 [1990])であった。

【0247】

C D 4 コード配列を発現プラスミド p R K C D 4₂ F c₁ から除去し、I g G - 1 のアスパラギン酸 216 と t r k A のバリン 402、t r k B のトレオニン 422、または t r k C のトレオニン 413 とのスプライシングにより、該ベクターを t r k 受容体をコードする DNA に融合した。受容体全体または I g G キメラをコードする DNA を、リン酸カルシウムを用いた 293 細胞での一過性発現のために p R K 中にサブクロニングした(スバ(Suva)ら、Science 237、893 ~ 896 [1987])。t r k - I g G キメラの精製のため、細胞をトランスフェクションの1日後に血清不含培地に移し、さらに2 ~ 3 日後に培地を回収した。培地を濾過し、プロテイン A カラム(ハイトラップ(Hi-Trap) A、ファルマシア)に結合させ、カラムを P B S で洗浄し、結合したタンパク質を 0.1

10

20

30

40

50

Mグリシン(pH 3.0)で溶出し、トリス緩衝液で直ちに中和した。1.5の吸光係数を用いた280nmでの吸光度により濃度を評価した。SDS-PAGE分析は、得られたタンパク質が単一の検出バンドであることを示した。

【0248】

これらDNA構築物で一過性にトランスフェクションした細胞は、プロテインAに結合し、還元SDS-ポリアクリルアミドゲル上で約125kDの分子量にて移動したタンパク質を分泌した。精製trk-IgGキメラは、プロテインAカラム上の1回のアフィニティークロマトグラフィーにおいてならし培地から容易に単離することができた。これら精製タンパク質の配列分析から、予測されたシグナル配列開裂部位およびそれから得られるN末端が確認された(データは示していない)。

10

【0249】

B. 結合アッセイ

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

20

【0250】

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

30

【0251】

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

40

【0252】

ニューロトロフィンの結合を分析するうえでの有用性に加え、trk-IgGキメラはその同族ニューロトロフィンの生物学的活性の有用なインヒビターである。ここでの実験はすべてインビトロ系で行ったが、予備的な実験はtrkA-IgGがインビボでもNGF活性を抑制しうることを示している(データは示していない)。BDNF、NT3および

50

N T 4 / 5 に対する良好な阻止抗血清を産生することは困難であったので、このことは t r k B キメラおよび t r k C キメラの必要性を満たすであろう。

【 0 2 5 3 】

ヒトに存在する t r k の形態に関する情報が手に入ったので、正常な状態および疾患状態におけるこれら形態の発現の探査を開始することが可能である。異なる形態の t r k はニューロトロフィンへの応答において異なるおおよびしばしば相反するシグナル変換を示しうるので、各 t r k の形態の全スペクトルの発現レベルに関する知見は必須であろう。加えて、可溶性の形態のヒト t r k を利用できることは、内生の生物学的活性の阻止を可能とすることによって、インビボでのニューロトロフィンの生物学の研究を加速させるに違いない。

10

【 0 2 5 4 】

実施例 4

ヒト t r k C の突然変異誘発

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

20

【 0 2 5 5 】

これら t r k C 受容体ドメインの機能を調べるため、5 つのドメインをそれぞれ一つずつ欠失した 5 つの t r k 変異体 ($\Delta 1 \sim \Delta 5$) および第二の免疫グロブリン様ドメイン以外はすべてのドメインを欠失した一つの変異体 ($\Delta 6$) を構築した。これらの構造は図 7 に示してある。これら変異体に加えて、N T - 3 に対する残留親和性を決定し B D N F 結合の補充を試験するため、5 つのすべてのドメインをそれぞれ対応する t r k B 配列と個々に交換した ($s 1 \sim s 5$)。t r k C キメラおよび t r k B キメラを含むすべての t r k C 変異体をイムノアドヒージンの形態で調べた。イムノアドヒージンは実施例 3 に記載したプロセスと同様にして構築し、p R K 5 (E P 3 0 7 , 2 4 7) または p R K 7 ベクターを用いてヒト胎児腎臓細胞株 2 9 3 で発現させた。p R K 7 は、C l a I と H i n d I I I との間のポリリンカー領域中のエンドヌクレアーゼ制限部位の順序が逆になっている他は p R K 5 と同じである (1 9 9 2 年 4 月 2 8 日発行の米国特許第 5 , 1 0 8 , 9 0 1 参照)。これらタンパク質は血清不含培地中に分泌され、2 0 × に濃縮し、抗 F c E L I S A アッセイにより定量した。典型的な発現の結果を図 8 に示す。特定の興味ある変異体、t r k C、 $\Delta 6$ 、 $\Delta 5$ 、 $s 5$ および t r k B を標準プロトコルを用いてプロテイン A 上で均質に精製した。これら変異体の N 末端配列を決定したが、予測したものと同一であった。

30

【 0 2 5 6 】

標識 N T - 3 に結合する能力について、すべての受容体変異体を標準イムノアドヒージン技術を用いた競合置換アッセイにおいて試験した。 $\Delta 5$ を除き、すべての融合体およびスワップは依然として t r k C と同様の親和性で N T - 3 に結合することができた。幾つかの変異体 (すなわち、 $\Delta 1$ 、 $\Delta 4$ 、 $s 2$) については全体の結合した標識 N T - 3 は低かったが、I C 5 0 値はすべて t r k C の値に近いものであった (図 9 A および 9 B)。最も重要なことに、第二の免疫グロブリン様ドメイン以外はすべてのドメインを欠失した変異体 $\Delta 6$ は、t r k C の完全長受容体の結合能のほとんどを保持していた。加えて、 $\Delta 5$ において該ドメインを欠失させると、N T - 3 に全く結合することのできない分子となる (図 9 C)。N T - 3 結合と同じタイプのアッセイを用いた競合置換アッセイにおいて、すべての受容体変異体が標識 B D N F に結合する能力について試験した。t r k C は B D N F に結合できないことに注意しなければならない。一つの変異体以外のすべての変異体が B D N F に結合できなかった (図 1 0 A ~ C)。B D N F に結合した唯一の変異体は、t r k C の第二の免疫グロブリン様ドメインが t r k B のものと交換されたスワップ 5 であ

40

50

った(図10C)。この変異体は、trkB完全長受容体と同様にBDNFに結合した。

【0257】

上記結果から、trkCおよびtrkBの機能における第二の免疫グロブリン様ドメインの最重要性が明らかである。このドメイン以外のすべてのドメインを欠失してもtrkCの完全な結合能は本質的に保持された。このドメインを欠失するとNT-3に対するtrkCの結合能は除去された。このドメインを交換すると、trkBと同様の親和性でBDNFに結合しうるtrkC変異体が創製された。

【0258】

実施例5

炎症性疼痛の治療におけるtrkA-IgGイムノアドヒージョンの使用

10

A. カラギーナンにより誘発されたラットにおける痛覚過敏の阻止

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

20

【0259】

B. trkA-IgGイムノアドヒージョンは鈍磨に導く

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

【0260】

30

実施例6

trkCおよびtrkAの突然変異誘発

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

【0261】

trkCのVal₂₉₇からThr₄₂₀のアミノ酸配列(第二の免疫グロブリン様ドメインを含む)をtrkAのSer₂₇₇からVal₄₀₂のアミノ酸配列(第二の免疫グロブリン様ドメインを含む)で置換した成熟trk変異体(s5a)を構築した。競合置換アッセイにおいて、trkCではなくtrkAがNGFに高親和性で結合し、s5AキメラはtrkAの親和性(IC₅₀ 73.9 ± 8.1 pM)に匹敵する親和性(IC₅₀ 39.3 ± 1.7 pM)でNGFに結合する。¹²⁵I-NGFを用いた飽和結合実験は、trkAおよびs5Aに対してそれぞれ47.1 ± 12.4および38.6 ± 8.6 pMのK_d値となった(抑制定数(IC₅₀)と結合定数(K_d)との間の一般的な関係は、チェング(Cheng)およびプルソフ(Prusoff)によって以前に記載されている; Biochem. Pharmacol. 22: 3099(1973))。これら結果は、trkAのNGF結合特異性にとってtrkAの第二の免疫グロブリン様ドメインが重要であることを示している。

40

【0262】

50

つぎに、4つの成熟 *trkA* 変異体を構築した：*trkA* の Val₁₉₃ から Val₂₈₂ のアミノ酸配列を欠失した一つの変異体 ($\Delta 4A$)、*trkA* の Pro₂₈₅ から Val₄₀₂ を欠失した他の変異体 ($\Delta 5A$)、*trkA* の Pro₃₅ から Ser₂₈₃ を欠失した他の変異体 ($\Delta 6A$)、および *trkA* の Pro₃₅ から Val₁₉₃ を欠失した他の変異体 ($\Delta 7A$) である。実施例 4 に記載した *trkC* 受容体変異体に関して得られた結果と同様、変異体 $\Delta 5A$ における *trkA* の第二の免疫グロブリン様ドメインの欠失は NGF 結合が検出されないという結果になったが、このドメイン単独 (変異体 $\Delta 6A$) では天然の *trkA* に匹敵する NGF に対する結合親和性が示された。加えて、*trkA* の第一の免疫グロブリン様ドメインの欠失 ($\Delta 4A$) は天然の *trkA* に比べて約 2 倍だけ NGF に対する親和性を減少させたが、最初の 3 つのドメインを欠失させても ($\Delta 7A$) NGF に対する親和性に何ら影響を及ぼさなかった。*trkA* および $\Delta 6A$ の NGF 結合親和性を飽和実験において決定したところ、 K_d 値は 47.1 ± 12.4 および 155.3 ± 33 pM (約 3.3 倍の差異) であり、*trkA* 受容体において NGF との結合相互作用のほとんどが第二の免疫グロブリン様ドメインによるものであることが確認された。しかしながら、飽和結合実験において、 $\Delta 5A$ 変異体は > 3500 pM と推定される K_d 値にて検出しうる特異的結合を示し、NGF との相互作用に影響を及ぼす *trkA* ドメイン 1 ~ 4 中の別の要素の存在の可能性が示されたが、 $\Delta 6A$ 変異体と *trkA* との K_d 値が類似していることから明らかなように、これら要素の結合への貢献は小さなものであると思われる。

【表 1】

表 1

使用	trkA	trkB	trkC
縮重センサ		TGYGAYATHATGTGTYNAARAC SEQ. ID. NO:10	TGGATGCARYTNTGGCARGCA SEQ. ID. NO:11
縮重アンチ		YTCRTCTTNCRTAYTCRTT SEQ. ID. NO:12	CCYTCYTGRATARTATCNACGTG SEQ. ID. NO:13
ECD 挿入 センス	CACGTCAACACGCGCACTACA SEQ. ID. NO:14	GGAGGATGAGAAACAGATTCTTCTGC SEQ. ID. NO:15	CATCAATGCCACTTCTCTCAAGG SEQ. ID. NO:16
ECD 挿入 アンチ	AGGTGTTTCGTCTCTTCTCTCC SEQ. ID. NO:17	GAGATGTGCCGACCGGTGTGATC SEQ. ID. NO:18	CACAGTGATGAGAGGTGTGGGA SEQ. ID. NO:19
TK 挿入 センス	GGATGTGGTCCAGGCCCC SEQ. ID. NO:20	GGGCAACCGCCGACGGAA SEQ. ID. NO:21	ACGCCAGGCCAAGGGTGAG SEQ. ID. NO:22
TK 挿入 アンチ	TAACCACTCCAGCCCTGG SEQ. ID. NO:23	TTGGTGGCTCCAGCGGACG SEQ. ID. NO:24	AATTCATGACCAAGCCACCA SEQ. ID. NO:25
プローブ			
ECD センス	GCTCCTCGGACTGCGATGC SEQ. ID. NO:26	ATGTGCGCTGGCGAGGTGGCAT SEQ. ID. NO:27	AAGCTCAACAGCCAGAACCTC SEQ. ID. NO:28
ECD アンチ	CAGCTCTGTGAGGATCCAGCC SEQ. ID. NO:29	CCGACCGGTTTATCATGTGAC SEQ. ID. NO:30	ATGATCTTGGACTCCGCGAGAGG SEQ. ID. NO:31
TK 特異的 センス		CTTGGCCCAAGGCATCTCCGGT SEQ. ID. NO:32	ATGTGCAGCACATTAAAGAGGA SEQ. ID. NO:33
TK 特異的 アンチ		TTATACACAGGCTTAAGCCATCCA SEQ. ID. NO:34	AGGAGGCATCCAGCGAATG SEQ. ID. NO:35

10

20

30

【図面の簡単な説明】

【0263】

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

40

【0264】

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

50

配列およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号：4および3として添付してある。

【0265】

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

10

【0266】

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

20

【0267】

【図3】ラットおよびヒトからの *trk* ファミリー成員の種々のドメインの類似性。PAM250マトリックス(デイホフ(Dayhoff)ら、1983)に基づく類似性パーセントを、シュナイダー(Schneider)およびシュバイガー(Schweiger)、Oncogene 6、1807~1811(1991)により定められているように、異なる *trk* ドメインについて決定した。ヒト *trkA* とヒト *trkB* (H A - B)、ヒト *trkA* とヒト *trkC* (H A - C)、ヒト *trkB* とヒト *trkC* (H B - C)、ヒト *trkA* とラット *trkA* (H - R A)、ヒト *trkB* とラット *trkB* (H - R B)、およびヒト *trkC* とラット *trkC* (H - R C)との間で一対毎に比較を行った。

【0268】

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

30

40

【0269】

【図5】*trk* - IgGに結合したニューロトロフィンの競合置換。放射性標識したニューロトロフィン(25~35 pM)を、増加濃度の種々の非標識ニューロトロフィンの存在下で *trk* - IgGに結合させた。A) *trkA* - IgGへの標識NGFの結合。B) *trkB* - IgGへの標識BDNFの結合。C) *trkC* - IgGへの標識NT3の結合。置換は、冷NGF(黒丸)、冷BDNF(白丸)、冷NT3(黒方形)、または冷NT5(白方形)で行った。

【0270】

【図6】ニューロトロフィンの生物活性は *trk* イムノアブヒーションにより阻止される。

50

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

【0271】

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

【0272】

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

10

【0273】

【図 9 A】*trk C* 変異体に結合した NT - 3 の競合置換。増加量の非標識 NT - 3 の存在下で放射性標識した NT - 3 (50 pM) を *trk C* 変異体に結合させた (*trk C* の欠失)。

【0274】

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

【0275】

【図 9 C】*trk C* 変異体に結合した NT - 3 の競合置換。増加量の非標識 NT - 3 の存在下で放射性標識した NT - 3 (50 pM) を *trk C* 変異体に結合させた (*trk C* の Ig - ドメイン 2 の変異体)。

20

【0276】

【図 10 A】*trk C* 変異体に結合した BDNF の競合置換。増加量の非標識 BDNF の存在下で放射性標識した BDNF (50 pM) を *trk C* 変異体に結合させた (*trk C* の欠失)。

【0277】

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

30

【0278】

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

【0279】

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

【0280】

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

40

【0281】

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

【0282】

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

【0283】

50

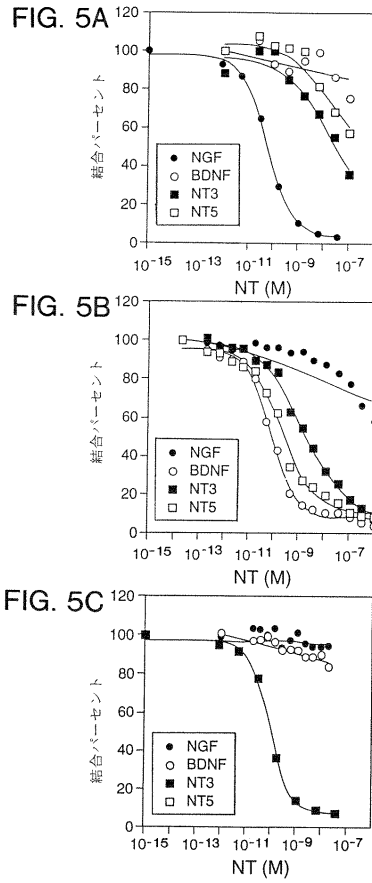
【 ㊦ 1 A 】

FIG. 1A

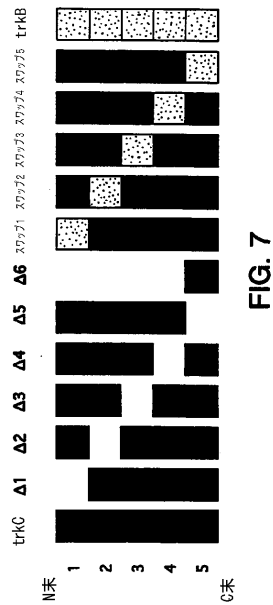
【 ㄨ 1 B 】

FIG. 1B

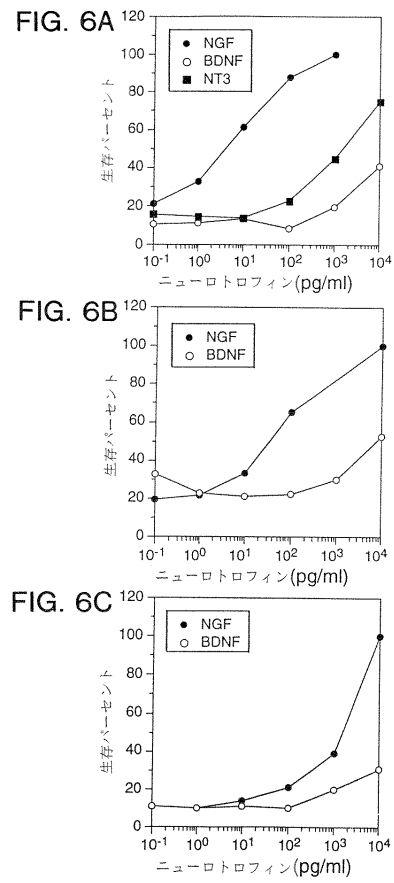
【 図 5 】



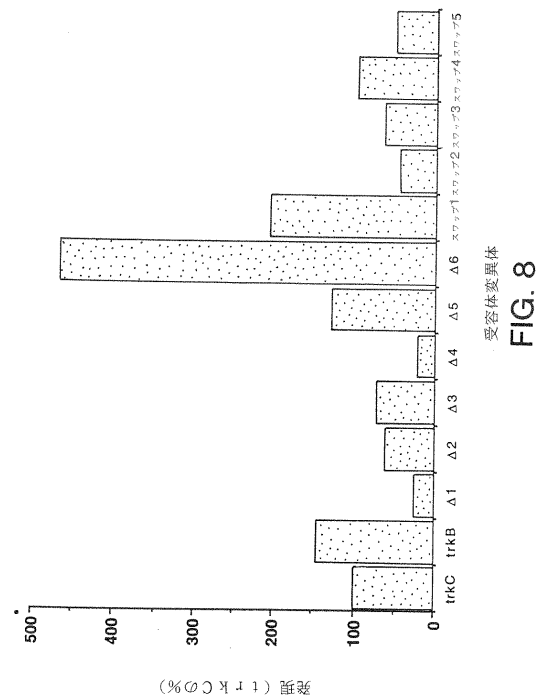
【 図 7 】



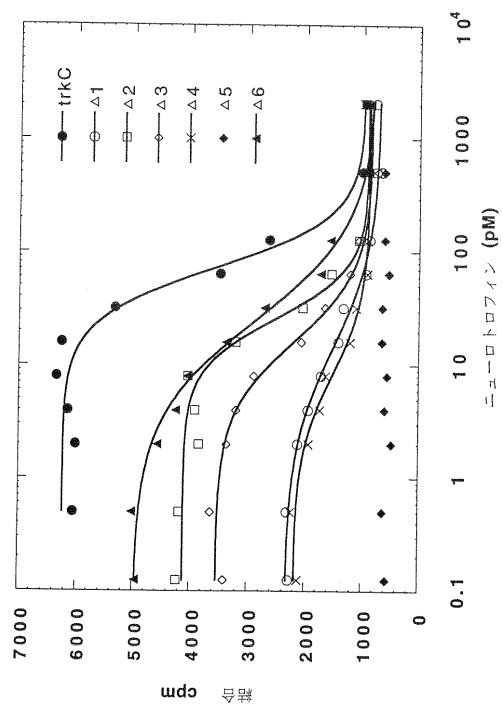
【 図 6 】



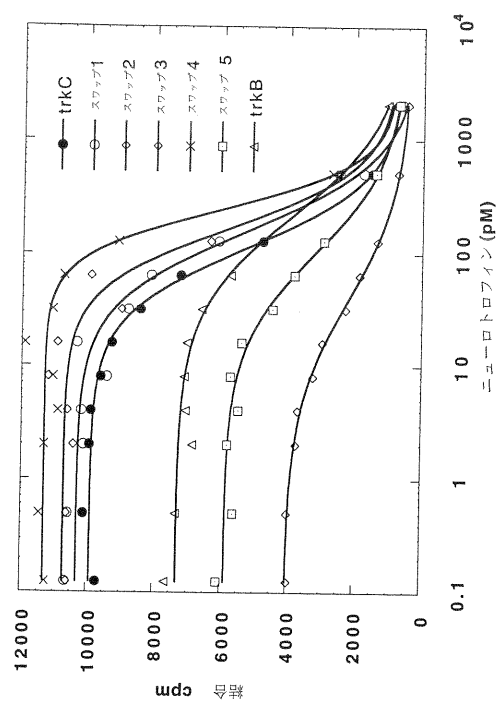
【 図 8 】



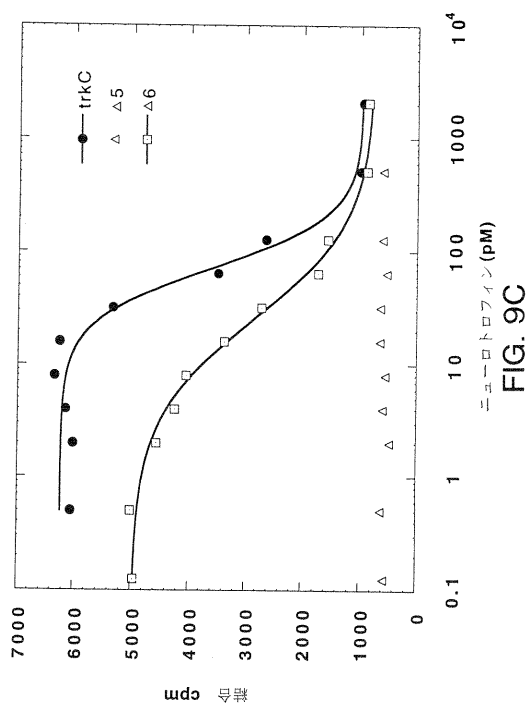
【図 9 A】



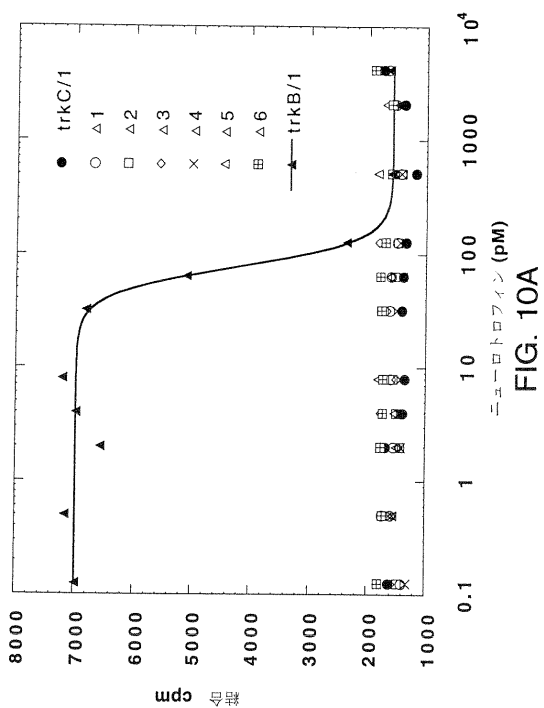
【図 9 B】



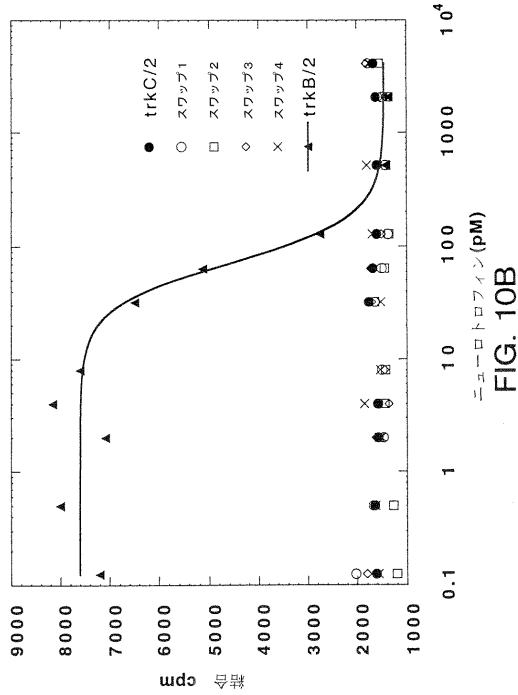
【図 9 C】



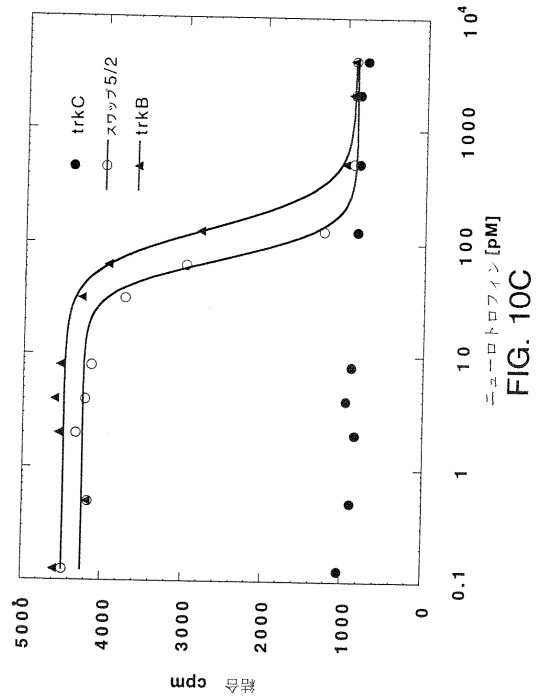
【図 10 A】



【図 10B】



【図 10C】



【図 11A】

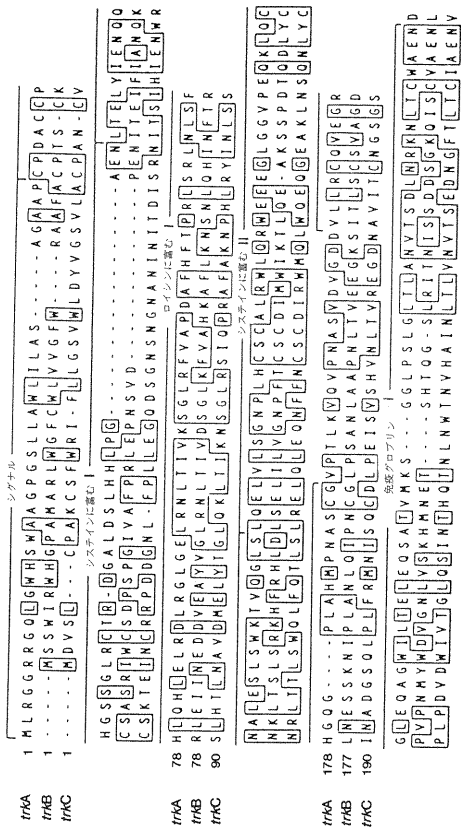


FIG. 11A

【図 11B】

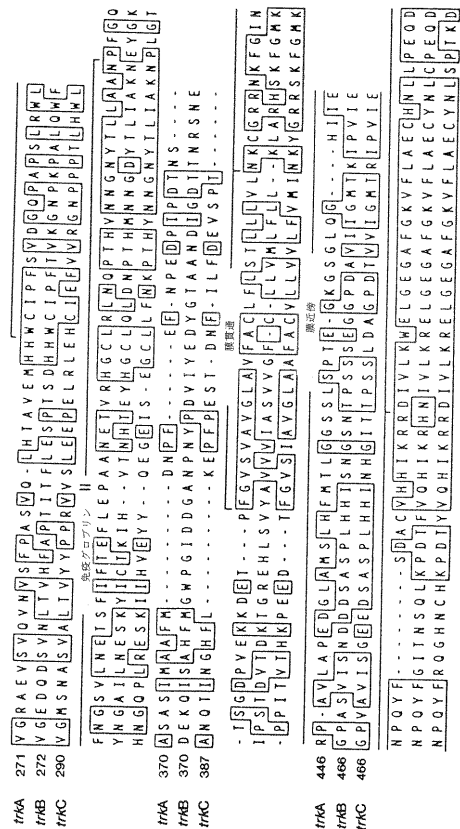


FIG. 11B

【図 11C】

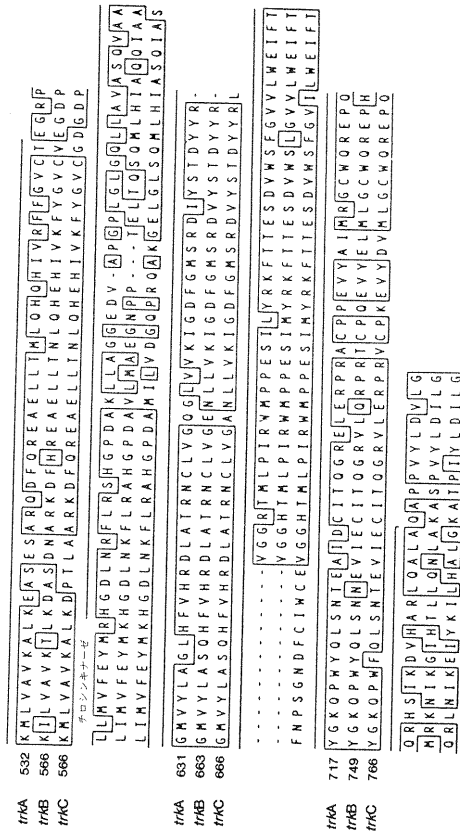


FIG. 11C

【図 12】

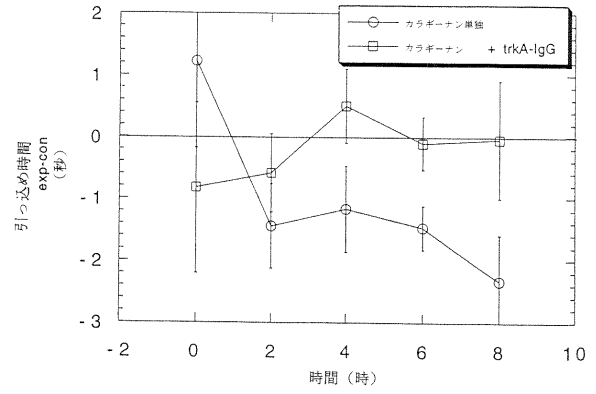


FIG. 12

【図 13】

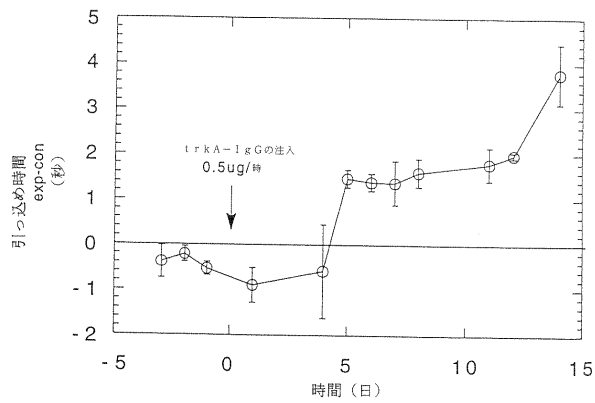


FIG. 13

【配列表】

2006075165000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/18 (2006.01)	A 6 1 P 25/18	

(72)発明者 デイビッド・エル・シェルトン

アメリカ合衆国 9 4 0 4 4 カリフォルニア州パシフィカ、ローリー・レイン 1 8 3 番

(72)発明者 ロマン・アーファー

アメリカ合衆国 9 4 0 4 4 カリフォルニア州パシフィカ、タルボット・アベニュー・ナンバー 3 0
2、3 8 0 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA61 BA63 CA04 CA05 CA06 CA07 DA02
 DA06 EA04 FA02 FA10 GA11 GA18 GA19 HA03 HA08 HA13
 4B065 AA26X AA90X AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA24 CA24 CA44
 CA46 CA60
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 NA14 ZA081 ZA181 ZA361
 ZA401 ZA591 ZA661 ZA811 ZB111 ZB261
 4C085 AA16 AA34 BB11 BB31
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA45 DA50 DA75 EA20
 EA21 EA22 EA50 EA61 FA72 FA74 GA22 GA23 GA25 GA26

专利名称(译)	人trk受体和神经营养因子抑制剂		
公开(公告)号	JP2006075165A	公开(公告)日	2006-03-23
申请号	JP2005260642	申请日	2005-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	レオナルドジープレスタ デイビッドエルシエルトン ロマンアーファー		
发明人	レオナルド・ジー・プレスタ デイビッド・エル・シエルトン ロマン・アーファー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K19/00 C07K16/18 C07K14/71 C07K1/22 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61K38/00 A61P25/04 A61P1/18 A61P13/12 A61P11/00 A61P9/00 A61P35/00 A61P25/08 A61P25/18 G01N33/53 A61K38/55 A61P1/00 A61P9/08 A61P9/10 A61P13/02 A61P15/00 A61P25/28 A61P29/00 C07H21/04 C07K14/705 C07K16/28 C12N15/02 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/00 A61P1/18 A61P9/00 A61P9/08 A61P9/10 A61P11/00 A61P13/02 A61P13/12 A61P15/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/18 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/71 C07K19/00 C07K2319/00 C07K2319/30		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K19/00 C07K16/18 C07K14/71 C07K1/22 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A A61K39/395.Y A61K37/02 A61P25/04 A61P1/18 A61P13/12 A61P11/00 A61P9/00 A61P35/00 A61P25/08 A61P25/18 A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA13 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4B065/CA60 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/NA14 4C084/ZA081 4C084/ZA181 4C084/ZA361 4C084/ZA401 4C084/ZA591 4C084/ZA661 4C084/ZA811 4C084/ZB111 4C084/ZB261 4C085/AA16 4C085/AA34 4C085/BB11 4C085/BB31 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA45 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/EA61 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA22 4H045/GA23 4H045/GA25 4H045/GA26		
优先权	08/215139 1994-03-18 US 08/286846 1994-08-05 US 08/359705 1994-12-20 US		
其他公开文献	JP4199223B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供人类trkB和trkC蛋白，以进一步了解trk和神经营养蛋白作用在各种人体病理状况中的作用。 包含与免疫球蛋白序列融合的trk受体氨基酸序列的嵌合多肽，包含该嵌合多肽，编码该嵌合多肽的核苷酸序列，表达载体，宿主细胞和trk受体的药物组合物 包括作为包含氨基酸序列的免疫粘附素的双特异性分子，包含双特异性分子的药物组合物，使用双特异性分子纯化神经营养因子的方法和神经营养因子。 一种神经营养因子，其包括使生物样品与能够结合该神经营养因子的可检测标记的trk受体多肽接

触，然后检测如此结合的标记。它由诊断以过表达或过表达为特征的病理状况的方法组成。[选择图]无

[illegible][illegible]