

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 210186

(P2003 - 210186A)

(43)公開日 平成15年7月29日(2003.7.29)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 48/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 48/00		A 6 1 P 29/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 29/00		35/00	4 B 0 6 4
35/00		C 0 7 K 14/47	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/47		16/18	4 C 0 8 4
審査請求 有 請求項の数 109 O L (全 46数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2002 - 381188(P2002 - 381188)	(71)出願人	592221528
(62)分割の表示	特願2001 - 184133(P2001 - 184133)の分割		バイオジェン インコーポレイテッド
(22)出願日	平成2年4月27日(1990.4.27)		B I O G E N I N C O R P O R A T E D
(31)優先権主張番号	345151		アメリカ合衆国、マサチューセッツ 0214
(32)優先日	平成1年4月28日(1989.4.28)		2、ケンブリッジ、ケンブリッジ センター
(33)優先権主張国	米国(US)		14
(31)優先権主張番号	359516	(72)発明者	ヘッション、キャサリン アール
(32)優先日	平成1年6月1日(1989.6.1)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ 0219
(33)優先権主張国	米国(US)		0、サウス ウェイマス、ファウンティン
(31)優先権主張番号	452675		レーン 96
(32)優先日	平成1年12月18日(1989.12.18)	(74)代理人	100064012
(33)優先権主張国	米国(US)		弁理士 浜田 治雄
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 内皮細胞 - 白血球付着分子 (E L A M) および白血球付着に關与する分子 (M I L A)

(57)【要約】

【課題】 炎症を検討し、診断し、予防しかつ処置するための新規な手段を提供する。

【解決手段】 内皮細胞 - 白血球付着分子 (E L A M) をコードする D N A 配列、この種の分子の生産方法および常態結合した動物蛋白を実質的に含まない E L A M (特定分子 E L A M 1 並びに V C A M 1 および 1 b を含む) につき開示する。さらに E L A M に対する抗体についても開示する。白血球付着に關与する分子 (M I L A) をコードする D N A 配列、この種の分子の生産方法、並びに常態結合した動物蛋白を実質的に含まない M I L A (特定分子 C D X を含む) についても開示する。M I L A に対し反応性である抗体調製物についても開示する。内皮細胞に対する白血球の結合を阻止する分子の同定方法、内皮細胞に結合する白血球の阻止方法、並びに急性炎症の検出方法についても開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (a)ヌクレオチド番号141 から番号1970までの図 1 における E L A M 1 DNA 配列、

(b)ヌクレオチド番号144 から番号1970までの図 1 における E L A M 1 DNA 配列、

(c)成熟 E L A M 1 のアミノ酸配列をコードする DNA 配列、

(d)ヌクレオチド番号204 から番号1970までの、必要に応じその 5' 末端に A T G 開始コドンを含む図 1 の DNA 配列、

(e)可溶性 E L A M 1 をコードする DNA 配列、

(f)標準ハイブリッド化条件下で前記 DNA 配列のいずれかにハイブリッド化する DNA 配列、および (g)前記 DNA 配列のいずれかによりコードされるアミノ酸配列を発現に際しコードする DNA 配列、よりなる群から選択される内皮細胞 - 白血球付着分子 (E L A M) もしくはその断片をコードする DNA 配列。

【請求項 2】 内皮細胞 - 白血球付着分子 (E L A M) もしくはその断片をコードする DNA 配列からなり、前記 DNA 配列は

(a)ヌクレオチド番号141 から番号1970までの図 1 における E L A M 1 DNA 配列、

(b)ヌクレオチド番号144 から番号1970までの図 1 における E L A M 1 DNA 配列、

(c)成熟 E L A M 1 のアミノ酸配列をコードする DNA 配列、

(d)ヌクレオチド番号204 から番号1970までの、必要に応じその 5' 末端に A T G 開始コドンを含む図 1 の DNA 配列、

(e)可溶性 E L A M 1 をコードする DNA 配列、

(f)標準ハイブリッド化条件下で前記 DNA 配列のいずれかにハイブリッド化する DNA 配列、および (g)前記 DNA 配列のいずれかによりコードされるアミノ酸配列を発現に際しコードする DNA 配列、よりなる群から選択されることを特徴とする組換え DNA 分子。

【請求項 3】 前記 DNA 配列が発現制御配列に作用結合してなる請求の範囲第 2 項に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 4】 前記発現制御配列が S V 4 0 もしくはアデノウィルスの早期もしくは後期プロモータ、l a c 系、t r p 系、T A C 系、T R C 系、ファージλの主オペレータおよびプロモータ領域、f d コート蛋白の制御領域、3 - ホスホグリセレートキナーゼのプロモータ、酸ホスファターゼのプロモータおよび酵母 α - 接合因子のプロモータよりなる群から選択される請求の範囲第 3 項に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 5】 プラスミド E L A M p C D M 8 クローン 6 からなる請求の範囲第 3 項に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 6】 内皮細胞 - 白血球付着分子 (E L A M) をコードする DNA 配列もしくはその断片からなり、前

記 DNA 配列は

(a)ヌクレオチド141 から番号1970までの図 1 における E L A M 1 DNA 配列、

(b)ヌクレオチド番号144 から番号1970までの図 1 における E L A M 1 DNA 配列、

(c)成熟 E L A M 1 のアミノ酸配列をコードする DNA 配列、

(d)ヌクレオチド番号204 から番号1970までの、必要に応じその 5' 末端に A T G 開始コドンを含む図 1 の DNA 配列、

(e)可溶性 E L A M 1 をコードする DNA 配列、

(f)標準ハイブリッド化条件下で前記 DNA 配列のいずれかにハイブリッド化する DNA 配列、および (g)前記 DNA 配列のいずれかによりコードされるアミノ酸配列を発現に際しコードする DNA 配列、よりなる群から選択され、しかも前記 DNA 配列が発現制御配列に作用結合してなる組換え DNA 分子により形質転換された単細胞宿主。

【請求項 7】 前記発現制御配列が S V 4 0 もしくはアデノウィルスの早期もしくは後期プロモータ、l a c 系、t r p 系、T A C 系、T R C 系、ファージλの主オペレータおよびプロモータ領域、f d コート蛋白の制御領域、3 - ホスホグリセレートキナーゼのプロモータ、酸ホスファターゼのプロモータおよび酵母 α - 接合因子のプロモータよりなる群から選択される請求の範囲第 6 項に記載の単細胞宿主。

【請求項 8】 プラスミド E L A M p C D M 8 クローン 6 からなる請求の範囲第 6 項に記載の形質転換宿主。

【請求項 9】 単細胞宿主がイー・コリ、シュードモナス、バチルス、ストレプトミセス、酵母、C H O、R 1 . 1、B - W、L - M、C O S 1、C O S 7、B S C 1、B S C 4 0 および B M T 1 0 細胞、組織培養における植物細胞、昆虫細胞およびヒト細胞よりなる群から選択される請求の範囲第 6 項に記載の形質転換宿主。

【請求項 10】 請求の範囲第 7 項に記載の形質転換宿主を培養することを特徴とする E L A M 1 の産生方法。

【請求項 11】 図 7 のヌクレオチド配列から誘導されるサイトキン - 誘発性発現制御配列。

【請求項 12】 図 7 のヌクレオチド 740 ~ 1307 からなる請求の範囲第 11 項に記載のサイトキン - 誘発性発現制御配列。

【請求項 13】 E L A M 1、E L A M 1 のレクチン状ドメイン、E L A M 1 の E G F 状ドメイン、E L A M 1 の一致システイン反復単位、可溶性 E L A M 1、成熟 E L A M 1 および E L A M 1 リガンドに結合しうる E L A M 1 断片よりなる群から選択される常態結合した動物蛋白を実質的に含まない E L A M もしくはその断片。

【請求項 14】 アミノ酸番号 22 (T r p) からアミノ酸番号 609 (L e u) までの、必要に応じ N - 末端メチオニン残基を含む図 1 のアミノ酸配列からなる請求

10

20

30

40

50

の範囲第 13 項に記載の分子。

【請求項 15】 E L A M 1 リガンドを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ C D B . B B 1 1 . B C 6 抗 - E L A M 1。

【請求項 16】 ハイブリドーマ C D B . B B 1 1 . B C 6 抗 - E L A M 1 により産生され、E L A M 1 リガンドを認識するモノクローナル抗体。

【請求項 17】 E L A M 1 もしくはその断片のための M I L A をコードする DNA 配列。

【請求項 18】 M I L A が E L A M 1 リガンドである 10 請求の範囲第 17 項に記載の DNA 配列。

【請求項 19】 E L A M 1 もしくはその断片のための M I L A をコードする DNA 配列からなる組換え DNA 分子。

【請求項 20】 M I L A が E L A M 1 リガンドである 請求の範囲第 19 項に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 21】 前記 DNA 配列が発現制御配列に作用結合されてなる請求の範囲第 19 項に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 22】 E L A M 1 もしくはその断片のための 20 M I L A をコードする DNA 配列からなる組換え DNA 分子により形質転換された単細胞宿主。

【請求項 23】 M I L A が E L A M 1 リガンドである 請求の範囲第 22 項に記載の単細胞宿主。

【請求項 24】 イー・コリ、シュドモナス、パチルス、ストレプトミセス、酵母、C H O、R 1 . 1、B - W、L - M、C O S 1、C O S 7、B S C 1、B S C 4 0、B M T 1 0 細胞、組織培養における植物細胞、昆虫細胞およびヒト細胞よりなる群から選択される 請求の範囲第 22 項に記載の単細胞宿主。 30

【請求項 25】 常態結合した動物蛋白質を実質的に含まない E L A M 1 もしくはその断片のための M I L A。

【請求項 26】 E L A M 1 に結合する請求の範囲第 25 項に記載の M I L A の断片。

【請求項 27】 E L A M 1 のための M I L A に対し反応性であるが、白血球細胞表面における他の蛋白質には反応性でない抗体調製物。

【請求項 28】 実質的にモノクローナル抗体よりなる 請求の範囲第 27 項に記載の抗体調製物。

【請求項 29】 (a)ヌクレオチド番号 107 から番号 40 2047 までの図 3 における V C A M 1 DNA 配列、

(b)ヌクレオチド番号 110 から番号 2047 までの図 3 における V C A M 1 DNA 配列、

(c)成熟 V C A M 1 のアミノ酸配列をコードする D N A 配列、

(d)ヌクレオチド番号 179 ~ 2047 の、必要に応じその 5 ' 末端に A T G 開始コドンを含む図 3 の V C A M 1 DNA 配列、

(e)可溶性 V C A M 1 をコードする DNA 配列、

(f)ヌクレオチド番号 100 ~ 番号 2316 の図 4 における 50

V C A M 1 b DNA 配列、

(g)ヌクレオチド番号 103 ~ 番号 2316 までの図 4 における V C A M 1 b DNA 配列、

(h)成熟 V C A M 1 b のアミノ酸配列をコードする D N A 配列、

(i)可溶性 V C A M 1 b をコードする DNA 配列、

(j)ヌクレオチド番号 172 ~ 番号 2316 までの、必要に応じその 5 ' 末端に A T G 開始コドンを含む図 4 の V C A M 1 b DNA 配列、

(k)標準ハイブリッド化条件下で前記 DNA 配列のいずれかにハイブリッド化する DNA 配列、

(l)前記 DNA 配列のいずれかによりコードされるアミノ酸配列を発現に際しコードする DNA 配列、よりなる群から選択される内皮細胞 - 白血球付着分子もしくはその断片をコードする DNA 配列。

【請求項 30】 内皮細胞 - 白血球付着分子 (E L A M) もしくはその断片をコードする DNA 配列からなり、前記 DNA 配列は

(a)ヌクレオチド番号 107 から番号 2047 までの図 3 における V C A M 1 DNA 配列、

(b)ヌクレオチド番号 110 から番号 2047 までの図 3 における V C A M 1 DNA 配列、

(c)成熟 V C A M 1 のアミノ酸配列をコードする D N A 配列、

(d)ヌクレオチド番号 179 ~ 2316 の、必要に応じその 5 ' 末端に A T G 開始コドンを含む図 4 の V C A M 1 DNA 配列、

(e)可溶性 V C A M 1 をコードする DNA 配列、

(f)ヌクレオチド番号 100 ~ 番号 2316 の図 4 における V C A M 1 b DNA 配列、

(g)ヌクレオチド番号 103 ~ 番号 2316 までの図 4 における V C A M 1 b DNA 配列、

(h)成熟 V C A M 1 b のアミノ酸配列をコードする D N A 配列、

(i)可溶性 V C A M 1 b をコードする DNA 配列、

(j)ヌクレオチド番号 172 ~ 番号 2316 までの、必要に応じその 5 ' 末端に A T G 開始コドンを含む図 4 の V C A M 1 b DNA 配列、

(k)標準ハイブリッド化条件下で前記 DNA 配列のいずれかにハイブリッド化する DNA 配列、

(l)前記 DNA 配列のいずれかによりコードされるアミノ酸配列を発現に際しコードする DNA 配列、よりなる群から選択されることを特徴とする組換え DNA 分子。

【請求項 31】 前記 DNA 配列が発現制御配列に作用結合されてなる請求の範囲第 30 項に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 32】 前記発現制御配列が S V 4 0 もしくはアデノウィルスの早期もしくは後期プロモータ、l a c 系、t r p 系、T A C 系、T R C 系、ファージ λ の主オペレータおよびプロモータ領域、f d コート蛋白の制御

領域、3 - ホスホグリセレートキナーゼのプロモータ、酸ホスファターゼのプロモータおよび酵母 α -接合因子のプロモータよりなる群から選択される請求の範囲第31項に記載の組換えDNA分子。

【請求項33】 プラスミドAM pCDM8クローン41またはプラスミドVCAM1bクローン1E11 pCDM8からなる請求の範囲第31項に記載の組換えDNA分子。

【請求項34】 内皮細胞-白血球付着分子(ELAM)もしくはその断片をコードするDNA配列からなり、前記DNA配列は

(a)ヌクレオチド番号107 から番号2047までの図3におけるVCAM1 DNA配列、

(b)ヌクレオチド番号110 から番号2047までの図3におけるVCAM1 DNA配列、

(c)成熟VCAM1のアミノ酸配列をコードするDNA配列、

(d)ヌクレオチド番号179 ~2316の、必要に応じその5'末端にATG開始コドンを含む図4のVCAM1 DNA配列、

(e)可溶性VCAM1をコードするDNA配列、

(f)ヌクレオチド番号100 ~番号2316の図4におけるVCAM1b DNA配列、

(g)ヌクレオチド番号103 ~番号2316までの図4におけるVCAM1b DNA配列、

(h)成熟VCAM1bのアミノ酸配列をコードするDNA配列、

(i)可溶性VCAM1bをコードするDNA配列、

(j)ヌクレオチド番号172 ~番号2316までの、必要に応じその5'末端にATG開始コドンを含む図4のVCAM1b DNA配列、

(k)標準ハイブリッド化条件下で前記DNA配列のいずれかにハイブリッド化するDNA配列、

(l)前記DNA配列のいずれかによりコードされるアミノ酸配列を発現に際しコードするDNA配列よりなる群から選択され、しかも前記DNA配列が発現制御配列に作用結合されてなる組換えDNA分子により形質転換された単細胞宿主。

【請求項35】 組換えDNA分子がプラスミドAM pCDM8クローン41またはクローンVCAM1b pCDM8クローン1E11からなる請求の範囲第34項に記載の単細胞宿主。

【請求項36】 単細胞性宿主がイー・コリ、シュードモナス、バチルス、ストレプトミセス、酵母、CHO、R1.1、B-W、L-M、COS1、COS7、BSC1、BSC40およびBMT10、組織培養における植物細胞、昆虫細胞およびヒト細胞よりなる群から選択される請求の範囲第34項に記載の単細胞宿主。

【請求項37】 請求の範囲第34項に記載の単細胞宿主を培養することを特徴とするVCAM1の産生方法。

【請求項38】 常態結合した動物蛋白質を実質的に含まないVCAM1もしくはVCAM1bまたはその断片。

【請求項39】 VCAM1のドメイン1、VCAM1のドメイン2、VCAM1のドメイン3、VCAM1のドメイン4、VCAM1のドメイン5、VCAM1のドメイン6、VCAM1bのドメイン3、VCAM1bのドメイン3B、VCAM1bのドメイン4およびその組合せよりなる群から選択されるVCAM1もしくはVCAM1bポリペプチド。

【請求項40】 アミノ酸番号25からアミノ酸番号647までの、必要に応じN-末端メチオニン残基を含む図3のアミノ酸配列からなる請求の範囲第38項に記載のVCAM1。

【請求項41】 VCAM1もしくはVCAM1bに対し反応性であるが、内皮細胞表面上で発現される他の付着分子に対し反応性でない抗体調製物。

【請求項42】 前記抗体調製物が実質的にモノクローナル抗体よりなる請求の範囲第41項に記載の抗体調製物。

【請求項43】 VCAM1を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項44】 生物をVCAM1もしくはVCAM1bまたはその抗原性断片で免疫化することを特徴とするVCAM1もしくはVCAM1bを認識する抗体の産生方法。

【請求項45】 (a)分子をELAMまたはELAM発現性細胞と接触させて第1混合物を作成し、

(b)前記第1混合物をELAMリガンドまたはMIL A発現性細胞と接触させて第2混合物を作成し、

(c)前記第2混合物を、前記ELAMリガンドもしくはMIL A-発現性細胞に結合した前記ELAMもしくはMIL A発現性細胞の量につき試験することを特徴とする内皮細胞に対する白血球の結合を阻止する分子の同定方法。

【請求項46】 (a)分子をELAMリガンドまたはMIL A発現性細胞と接触させて第1混合物を作成し、

(b)前記第1混合物をELAMまたはELAM発現性細胞と接触させて第2混合物を作成し、

(c)前記第2混合物を、前記ELAMもしくはELAM発現性細胞に結合した前記ELAMリガンドもしくはELAM発現性細胞の量につき試験する、ことを特徴とする内皮細胞に対する白血球の結合を阻止する分子の同定方法。

【請求項47】 ELAMがELAM1である請求の範囲第45項または第46項に記載の方法。

【請求項48】 ELAMリガンドがELAM1リガンドである請求の範囲第45項または第46項に記載の方法。

【請求項49】 ELAMがVCAM1もしくはVCAM1bである請求の範囲第45項または第46項に記載の方法。

M1bである請求の範囲第45項または第46項に記載の方法。

【請求項50】 M I L AがV C A M 1もしくはV C A M 1 bリガンドである請求の範囲第45項または第46項に記載の方法。

【請求項51】 M I L AがV L A 4である請求の範囲第45項または第46項に記載の方法。

【請求項52】 白血球と内皮細胞との間の付着をこれらを含む系にて阻止するに際し、有効量の阻止剤を前記系に導入し、前記阻止剤をE L A Mリガンドに結合しうるE L A Mもしくはその断片、M I L Aを認識する抗体、E L A Mに結合しうるE L A Mリガンドもしくはその断片、E L A Mに結合する炭水化物、およびE L A Mを認識する抗体よりなる群から選択する白血球と内皮細胞との間の付着の阻止方法。

【請求項53】 阻止剤が、E L A M 1のレクチン状ドメイン、E L A M 1のE G F様ドメイン、E L A M 1の一致システイン反復単位、および可溶性E L A M 1よりなる群から選択されるE L A M 1もしくはE L A Mの断片である請求の範囲第52項に記載の方法。

【請求項54】 阻止剤が、E L A M 1リガンドを認識するモノクローナル抗体の調製物である請求の範囲第52項に記載の方法。

【請求項55】 阻止剤が、V L A - 4を認識するモノクローナル抗体の調製物である請求の範囲第52項に記載の方法。

【請求項56】 モノクローナル抗体がV L A - 4の α^4 サブユニットを認識することを特徴とする請求の範囲第55項に記載の方法。

【請求項57】 前記阻止剤が、E L A M 1に結合しうるE L A M 1リガンドもしくはその断片である請求の範囲第52項に記載の方法。

【請求項58】 阻止剤が、E L A M 1を認識するモノクローナル抗体である請求の範囲第52項に記載の方法。

【請求項59】 モノクローナル抗体がハイブリドーマC D B . B B 1 1 . B C 6抗 - E L A M 1により産生されるものである請求の範囲第58項に記載の方法。

【請求項60】 前記阻止剤をV L A 4に結合するV C A M 1、V C A M 1 bおよびその断片よりなる群から選択する請求の範囲第52項に記載の方法。

【請求項61】 前記阻止剤が、V C A M 1リガンドを認識するモノクローナル抗体である請求の範囲第52項に記載の方法。

【請求項62】 前記阻止剤が、V C A M 1もしくはV C A M 1 bに結合するV C A M 1リガンドもしくはその断片である請求の範囲第52項に記載の方法。

【請求項63】 V C A M 1リガンドがV L A 4である請求の範囲第62項に記載の方法。

【請求項64】 E L A Mリガンド、E L A Mリガンド

のE L A M結合性断片、およびE L A Mを認識する抗体よりなる群から選択される検出可能となるよう標識した化合物を投与する工程からなる炎症の検出方法。

【請求項65】 (a) 血液、血清もしくは他の体液の試料を検出可能となるよう標識したE L A Mリガンド、E L A MリガンドのE L A M結合性断片またはE L A Mを認識する抗体と接触させて混合物を作成し、(b) 前記混合物をE L A Mリガンド、E L A MリガンドのE L A M結合性断片もしくはE L A Mに結合した抗体の量につき試験することを特徴とする炎症の検出方法。

【請求項66】 E L A MリガンドがE L A M 1リガンドである請求の範囲第64項または第65項に記載の方法。

【請求項67】 E L A MリガンドがV C A M 1リガンドもしくはV C A M 1 bリガンドである請求の範囲第64項または第65項に記載の方法。

【請求項68】 V C A M 1リガンドがV L A 4である請求の範囲第67項に記載の方法。

【請求項69】 抗体がハイブリドーマC D B . B 1 1 . B C 6抗 - E L A M 1により産生されたものである請求の範囲第64項または第65項に記載の方法。

【請求項70】 E L A Mもしくはその断片を発現に際しコードするDNA配列、および免疫グロブリン分子の定常領域を発現に際しコードするDNA配列からなることを特徴とするE L A M / 免疫グロブリン融合蛋白質を発現に際しコードする組換えDNA分子。

【請求項71】 E L A MがE L A M 1、V C A M 1もしくはV C A M 1 bである請求の範囲第70項に記載のDNA配列。

【請求項72】 V C A M 1ドメイン1 - 3およびヒト免疫グロブリンC - γ - 1の定常領域を含む請求の範囲第70項に記載の組換えDNA分子。

【請求項73】 mRNAにハイブリッド化する核酸配列からなるE L A MもしくはM I L A mRNAに対するアンチセンス核酸。

【請求項74】 前記mRNAの開始コドンに結合する請求の範囲第73項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項75】 E L A MがE L A M 1、V C A M 1もしくはV C A M 1 bである請求の範囲第73項に記載のアンチセンス核酸。

【請求項76】 M I L AがE L A M 1リガンドである請求の範囲第73項に記載のアンチセンス核酸。

【請求項77】 mRNAにハイブリッド化する核酸配列からなるV L A 4 mRNAに対するアンチセンス核酸。

【請求項78】 DNAを含む請求の範囲第73項に記載のアンチセンス核酸。

【請求項79】 RNAを含む請求の範囲第73項に記

載のアンチセンス核酸。

【請求項80】 DNA配列5' CCC AGG CA T TTT AAGを有する請求の範囲第79項に記載のアンチセンス核酸。

【請求項81】 ELAMもしくはMILA mRNAに対するアンチセンスリボ核酸を転写に際し産生するDNA配列を有し、前記アンチセンスリボ核酸が前記mRNAにハイブリッド化する核酸配列からなることを特徴とする組換えDNA分子。

【請求項82】 ELAMもしくはMILA mRNA 10に対するアンチセンスリボ核酸を転写に際し産生するDNA配列を有し、前記アンチセンスリボ核酸が前記mRNAにハイブリッド化する核酸配列からなる組換えDNA分子によりトランスフェクトされたELAM生産性もしくはMILA-生産性細胞ライン。

【請求項83】 ELAMもしくはMILA mRNA 20に対するアンチセンスリボ核酸を転写に際し産生するDNA配列を有し、前記アンチセンスリボ核酸が前記mRNAにハイブリッド化する核酸配列からなる組換えDNA分子によりELAM-生産性もしくはMILA-生産性細胞ラインをトランスフェクトすることを特徴とするELAMもしくはMILAの減少した発現を示す細胞ラインの作成方法。

【請求項84】 1種もしくはそれ以上のELAMもしくはMILAの産生を減少させるのに有効な量の請求の範囲第73項に記載のアンチセンス核酸を投与することを特徴とする炎症の処置方法。

【請求項85】 ELAMもしくはMILA mRNA 30を切断するリボザイムを転写に際し産生するDNA配列からなる組換えDNA分子によりトランスフェクトされたELAM生産性もしくはMILA mRNA生産性細胞ライン。

【請求項86】 ELAMもしくはMILA mRNAを切断するリボザイムを転写に際し産生する組換えDNA分子によりELAM-生産性もしくはMILA-生産性細胞ラインをトランスフェクトすることを特徴とするELAMもしくはMILAの減少した発現を示す細胞ラインの作成方法。

【請求項87】 ELAMもしくはELAMリガンドの産生を減少させるのに有効な量のELAM mRNAもしくはELAMリガンド mRNAを切断するリボザイムを投与することを特徴とする炎症の処置方法。

【請求項88】 ELAMもしくはMILAに対し反応性である抗-イディオタイプ抗体調製物。

【請求項89】 ELAM1、VCAM1もしくはVCAM1bに対し反応性である請求の範囲第88項に記載の抗-イディオタイプ抗体調製物。

【請求項90】 ELAM1リガンドに対し反応性である請求の範囲第88項に記載の抗-イディオタイプ抗体調製物。

【請求項91】 VLA4に対し反応性である請求の範囲第88項に記載の抗-イディオタイプ抗体調製物。

【請求項92】 CDXに対し反応性である請求の範囲第88項に記載の抗-イディオタイプ抗体調製物。

【請求項93】 VCAM1のドメイン1、2、3、4、5もしくは6またはVCAM1bのドメイン3、3Bもしくは4に対し反応性である請求の範囲第88項に記載の抗-イディオタイプ抗体調製物。

【請求項94】 (a) ELAM1、CDX、VCAM1、VCAM1bもしくはVLA4のいずれか1種を認識する抗体を認識する抗-イディオタイプ抗体に対し結合する蛋白質につき蛋白質混合物をスクリーニングし、(b) 前記抗-イディオタイプ抗体に結合する分子を分離し、

(c) ELAM1、CDX、VCAM1、VCAM1bもしくはVLA4に結合する蛋白の能力を試験することを特徴とするELAM1、CDX、VCAM1、VCAM1bもしくはVLA4のいずれか1種に結合するELAMもしくはELAMリガンドの同定方法。

【請求項95】 IL-1、TNFもしくはIFN-γを認識する抗体の有効量を投与することを特徴とするVCAM1もしくはVCAM1b発現の阻止方法。

【請求項96】 VCAM1もしくはVCAM1bを認識する抗体を持った放射線免疫結合体を投与することを特徴とするVCAM1もしくはVCAM1b-生産性癌細胞の検出方法。

【請求項97】 VCAM1もしくはVCAM1bを認識する抗体を持った放射線免疫結合体もしくは免疫毒素の有効量を投与することを特徴とする癌の処置方法。

【請求項98】 VCAM1リガンドを結合するVCAM1もしくはVCAM1bドメインおよびICAM1リガンドを結合するICAM1ドメインに関するDNA配列からなる、VCAM/ICAM融合蛋白質をコードするDNA配列。

【請求項99】 VCAM1リガンドがVLA4であり、ICAM1リガンドがLFA1である請求の範囲第98項に記載のDNA配列。

【請求項100】 VCAM1リガンドを結合するVCAM1もしくはVCAM1bドメインおよびICAM1リガンドを結合するICAM1ドメインからなるVCAM/ICAM融合蛋白質。

【請求項101】 VCAM1リガンドがVLA4であり、ICAM1リガンドがLFA1である請求の範囲第100項に記載の融合蛋白質。

【請求項102】 (1) 腫瘍組織の試料を、この種の腫瘍を有する哺乳動物から別出し、

(2) 腫瘍組織に浸潤した1個もしくはそれ以上の白血球を前記試料から分離し、

(3) 殺腫瘍剤をコードする遺伝子を含むと共に殺腫瘍性遺伝子生産物を前記白血球内に発現しうる組換え発現ベ

クターにより前記 1 個もしくはそれ以上の浸潤性白血球をトランスフェクトし、

(4) トランスフェクトされた白血球を前記哺乳動物に導入することを特徴とする E L A M 1、V C A M 1、V C A M 1 b もしくはそのリガンドを発現する腫瘍の処置方法。

【請求項 103】 殺腫瘍性遺伝子生産物が T N F もしくはリンパ性毒素である請求の範囲第 102 項に記載の方法。

【請求項 104】 哺乳動物がヒトである請求の範囲第 103 項に記載の方法。

【請求項 105】 組換え発現ベクターがレトロウィルスベクターである請求の範囲第 102 項に記載の方法。

【請求項 106】 トランスフェクトされた白血球を哺乳動物に導入する前に、前記トランスフェクトされた白血球を I L - 2 で拡充させる請求の範囲第 102 項に記載の方法。

【請求項 107】 腫瘍が悪性腫瘍である請求の範囲第 102 項に記載の方法。

【請求項 108】 腫瘍が V L A 4 もしくは C D X を発現する請求の範囲第 102 項に記載の方法。

【請求項 109】 腫瘍が黒色腫もしくは結腸癌である請求の範囲第 108 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の技術分野】本発明は、炎症の際の内皮細胞に対する白血球の付着に関与する分子、およびこれらが発現に際しコードする DNA 配列に関するものである。より詳細には本発明は、E L A M 1 並びに血管細胞付着分子 1 および 1 b (V C A M 1 および V C A M 1 b) を包含する内皮細胞付着分子 (E L A M) に関するものである。さらに本発明は、内皮細胞に対する白血球付着に関与する白血球の表面における分子 (M I L A) に関するものである。これらは C D X、すなわち E L A M 1 付着経路に関与する分子、並びに V L A 4、すなわち V C A M 1 および V C A M 1 b のリガンドを包含する。さらに本発明は、これら付着分子を認識する抗体、並びにこれら抗体と付着分子のためのリガンドもしくはリセプタとの両者を認識する抗 - イディオタイプ抗体に関するものである。さらに本発明は、この種の付着分子のための m R N A に対し相補的なアンチセンス DNA および R N A 分子に関し、さらにこの種の分子のための m R N A を認識するリボチームに関する。さらに本発明は、たとえば内皮細胞に対する白血球付着を検出し或いは阻止するための診断剤および治療剤を開発する際の上記分子、DNA 配列、抗体、抗 - イディオタイプ抗体、アンチセンス分子およびリボチームの使用法に関するものである。

【0002】

【発明の背景】炎症は、感染もしくは外傷に対する血管組織の反応である。臨床上、これは 4 種類の徴候を伴

う：すなわち発赤、発熱、疼痛および浮腫。その経過は急性もしくは慢性のいずれかである。

【0003】細胞レベルにて、炎症は血管の内皮壁に対する白血球の付着および周囲組織中へのその浸潤を伴う [ハーラン、1985]。急性炎症は多形核白血球 (P M N) の付着および浸潤を特徴とする [ハーラン、1987 並びにマレヒおよびガリン、1987]。組織内の P M N 蓄積は炎症刺激の 2.5 ~ 4 時間後にそのピークに達し、約 28 時間で止まる [ベピラッカおよびギンブロン、1987]。これに対し、慢性炎症は他の白血球、特に単核細胞およびリンパ球の付着および、浸潤を特徴とする。

【0004】一般的な炎症において、浸潤性白血球は侵入生物もしくは死滅細胞を食菌すると共に、組織修復および免疫反応に役割を演ずる。しかしながら病理学的炎症においては、浸潤性白血球が重大かつしばしば致命的な損傷をもたらす。関節リウマチ症およびアテローム性硬化症が慢性炎症病の例であり、単核白血球が組織に浸潤して損傷をもたらす [フーおよびソコロフ、1985 並びにロス、1986]。多器官不全症候群、成人呼吸困難症候群 (A R D S) および虚血性再灌流障害は急性炎症であって、浸潤性 P M N が損傷をもたらす [ハーラン、1987 並びにマレヒおよびガリン、1987]。たとえば重症火傷に伴うショックを受けた後に生じる多器官不全症候群においては、P M N 媒介の損傷が外傷を悪化させる。A R D S においては、P M N が肺に液体を充満させて犠牲者を溺死させることがある。血液の供給が遮断された組織に突然に血液が灌流された際に生ずる虚血性再灌流障害 (たとえば心臓発作または脚部再結合の後) において、P M N 付着は重大な組織損傷をもたらす [ハーラン、1987]。

【0005】白血球浸潤が多くの炎症関連病理学の原因であり、かつ白血球付着が浸潤の第 1 過程であることを認識して、最近研究者は内皮細胞表面に結合する白血球のメカニズムに注意を集中している。研究が示したところでは、結合はリセプタおよびリガンドとして作用する内皮細胞と白血球との両者における細胞表面分子により媒介される [ハーラン等、1987; ダナ等、1986; およびベピラッカ等、1987a]。

【0006】炎症の経過に際し、或る種の炎症剤は白血球に対し作用して、これらを内皮に対し高付着性にする。公知の炎症剤はロイコトリエン - B 4 (L T B 4)、相補因子 5 a (C 5 a) およびホルミル - メチオニル - ロイシル - フェニルアラニン (F M L P) を包含する。これらの薬剤は、L e u C A M と呼ばれる 1 群の蛋白を活性化させる。L e u C A M は C D 11 および C D 18 蛋白の二量体である。L e u C A M の 1 種、すなわち C D 11 a / C D 18 (L F A 1 と呼ばれる) は、I C A M 1 (細胞間付着分子 1) と呼ばれる内皮細胞上のリセプタに結合する [ハーラン、1985 およびダナ等、1986]。研究者等が示したところでは、L e u C

AMに対するモノクローナル抗体 (Moabs) はインビトロおよびインビボの両者にて内皮に対するPMN付着を阻止する [アルフォルス、1987; ペダー等、1988; およびトッド、1989]。

【0007】他の炎症剤は内皮細胞に直接作用して、実質的に白血球付着を開始させる。これらの薬剤はサイトキニン類、すなわちインタロイキン-1 (IL-1)、リンパ性毒素 (LT) および腫瘍壊死因子 (TNF)、並びに細菌内生毒素、リポ多糖類 (LPS) を包含する。たとえばIL-1は、ヒト内皮細胞の単層に対するPMN、単核細胞および関連細胞ラインHL-60 (PMN状) およびU937 (単核細胞状) の付着を刺激することが示されている。作用は時間依存性であると共に蛋白合成依存性である [ベビラッカ等、1987a; ベビラッカ等、1987b; およびベビラッカ等、1985]。

【0008】現在の証拠が示すように、これらの薬剤は内皮細胞表面に対するELAM (内皮細胞-白血球付着分子) と呼ばれる1群の分子を誘発させる。現在まで研究者は2種のこれら分子、すなわち細胞間付着分子1 (ICAM1) および内皮細胞-白血球付着分子1 (ELAM1) を同定している [シモンズ等、1988; スタウントン等、1988; およびベビラッカ等、1987b]。ICAM1は多くの細胞型で見出され、さらに血管内皮上でのその発現は炎症性サイトキン、すなわちインタロイキン-1 (IL-1)、腫瘍壊死因子- α (TNF) および γ インタフェロン (IFN- γ) によりインビトロおよびインビボの両者にて強力に増大される [ポパー等、1986; ダスチンおよびスプリンガー、1988; 並びにコトランおよびポパー、1988]。

【0009】ELAM1は最初に検出され、かつサイトキン処理されたヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) に対するPMN付着を部分的に阻止するモノクローナル抗体 (Moab) を特徴とする。ELAM1は、炎症性サイトキンIL-1もしくはTNFに反応するがIFN- γ には反応せずにHUVECにより急速に合成される116 kDの細胞表面グリコ蛋白である [ベビラッカ等、1987b]。ICAM1とは異なり、ELAM1は内皮においてのみ発現されると思われ、その発現は継続したサイトキンの存在下においてさえ一時的である。ICAM1と同様に、ELAM1もインビボにて炎症部位に存在する。免疫組織学の研究は、これが急性炎症部位には存在するが慢性炎症部位には存在せず、非炎症血管壁にも存在しないことを示している [コトラン等、1986、並びにコトランおよびポパー、1988]。したがって、ELAM1はインビボにおける炎症血管壁に対するPMN付着の主たる媒体であると思われる。重要なことに、細胞表面におけるELAM1の存在は急性炎症の自然経過を辿り、刺激の数時間後に出現すると共に1日以内に徐々に消失する [ベビラッカ等、1987b]。

【0010】間接的証拠は、他のELAMが存在するこ

とを示唆する。炎症剤はインビトロにて内皮に対するPMN、単核細胞およびリンパ球の結合を誘発するが、ELAM1に対するMoabsはPMNおよび関連細胞の結合のみを阻止する [ベビラッカおよびギンブロン、1987]。さらに、インビボにおける炎症部位でのリンパ球および単核細胞の最大蓄積は、ELAM1発現が基礎レベルまで復帰した際に約24時間にて生ずる。この情報に基づき研究者は、これらリンパ球および単核細胞の結合を媒介する他のELAMの存在を想定した [ベビラッカ等、1987b]。以下詳細に説明するように、本発明者等はさらに2種のVCAM1およびVCAM1bと称するELAMを特性化すると共にクローン化し、これらは内皮細胞に対するリンパ球の結合を媒介する。したがって、ELAMは1群の分子と見なすことができる。

【0011】多くの証拠が示すように、ELAMは腫瘍侵蝕、転移およびウイルス感染を包含する細胞-細胞認識を含む広範囲の病理学的状態にて重要な役割を演ずる [ハーラン、1985; ワリスおよびハーラン、1986; ベビラッカ等、1987a; 並びにコトランおよびポパー、1988]。

【0012】ELAMを発現する細胞に対する白血球の付着は、白血球上にELAMリガンドが存在することを示唆する。この種の分子の1種はICAM1リガンド、すなわちリンパ球機能に関連した抗原1 (LFA1) である。LFA1は、 β 2インテグリンもしくはCD11/18属として知られた3種のヘテロダイマー分子の1種である [ダスチン等、1986; ロスライン等、1986; 並びにマーリンおよびスプリンガー、1987]。最近の研究が示すところでは、ICAM1/LFA1経路はインビトロにて内皮細胞に対するリンパ球および多形核白血球 (PMN) の両者の付着に役割を演ずる [ダスチンおよびスプリンガー、1988; スミス等、1989]。本明細書では、ELAM1リガンドであると証明しうる、内皮細胞に対する白血球付着に関与する分子 (MILA) の分離につき説明する。CDXと称する分子は約150 kDの蛋白であって、HL-60細胞から分離された。CDXを認識するモノクローナル抗体は、ELAM1-発現性細胞に対するPMNおよびHL-60細胞の結合を阻止する。さらに、CDXはELAM1に付着することが知られた種類の白血球細胞に存在し、ELAM1に付着しない種類の白血球細胞およびその他の細胞には存在しない。したがってCDXは或る種の白血球で発現される分子であって、ELAM1-媒介の白血球-内皮細胞付着において重要な役割を演ずる。さらに、CDXをコードするcDNAの分離および配列決定についても説明する。

【0013】さらに、VCAM1およびVCAM1bリガンド、すなわちVLA4の同定についても説明する [ヘルマーおよびタカダ、EP330 506号]。VLA4の α^4 および β_1 サブ単位に特異性の抗体は、VCAM1に対するVLA4-発現性細胞の結合を完全に排除す

る。

【0014】血管壁に対する白血球付着は炎症における第1過程であるため、この過程を防止することに向けられる治療は病理学的炎症の処置に関し魅力的である。臨床医は或る程度の成功を以て白血球媒介付着の阻止に基づく治療につき既に試験している。この種の対策の1つは、PMN付着を阻止するための白血球細胞表面複合体(CD11/CD18)に対するMoabs結合を含む(アルフォルス等、1987; ベダー等、1988; およびトッド等、1989)。

【0015】内皮細胞媒介の結合、並びにELAMおよびMIL A (ELAMリガンドを含む)に基づく白血球付着を防止するための代案治療は特に一層有望であると思われる。ELAM系は2つの理由から特に魅力的である: 第1に、内皮細胞におけるELAM発現は構成的でなく誘発されるので、ELAMは炎症の部位に集中すると共に数が制限される。このことは付着阻止剤が局部的にのみ作用すればよく、したがって構成的に発現される分子に向けられた阻止剤よりも少なくい投与量にて効果的であることを意味する。第2に、ELAM結合は種々異なる種類の白血球に対し選択的である。たとえばELAM1はPMNを結合するのに対し、VCAM1はリンパ球を結合する。したがって、これらの治療は所定の種類の白血球に対し特異性であると共に、他の種類の白血球の循環もしくは移動に影響を与えない。さらに上記の理由から、この種の治療は安価かつ毒性が低いと判明した。

【0016】ELAMに基づく治療に対する対策は、常態結合した動物蛋白を含まない高度精製型におけるELAMおよびMIL Aの両者を出発物質として必要とする。さらに、これら分子を生産する方法も必要とされる。これらおよびその他の必要性は、特定付着分子を発現に際しコードするDNA配列を分離すると共に、その生産のための組換えDNA分子および発現ベクターを作成することにより、本明細書中に説明するように解決される。

【0017】

【発明の要点】本発明の主たる目的は炎症を検討し、診断し、予防しかつ処置するための新規な手段を提供することにある。より詳細には本発明の目的は、内皮細胞に対する白血球結合に関与する分子を提供すると共に、白血球の内皮細胞結合を阻止するのに自体有用である他の分子を分離することにある。

【0018】本発明は、内皮細胞 - 白血球付着分子(ELAM)を発現に際しコードするDNA配列、ELAMのためのゲノムDNA配列(ELAM発現制御配列を含む)、これらDNA配列を有する組換えDNA分子、これらDNA分子により形質転換された単細胞宿主、ELAMの産生方法、並びに常態結合した動物蛋白を実質的に含まないELAM蛋白を提供する。さらに本発明

は、ELAMに対し反応性の抗体調製物をも提供する。

【0019】さらに本発明は、内皮細胞に対する白血球付着に関与した分子(MIL A)を発現に際しコードするDNA配列をも提供する。MIL Aは、ELAMに直接結合する白血球表面分子、すなわちELAMリガンドを含む。ELAMリガンドを認識するモノクローナル抗体は、ELAM/ELAMリガンド結合を直接に阻止することができる。さらにMIL Aは、付着に間接的に関与する白血球表面分子、たとえばモノクローナル抗体のような第3の分子と相互作用することによりELAM/ELAMリガンド結合を阻止する分子を含む。この種の分子は、たとえばELAMに対する親和性を低下させるようELAMリガンドの表面構成を変化することにより作用することができる。さらに本発明は、MIL A DNA配列を有する組換えDNA分子、およびこれらにより形質転換された単細胞宿主をも提供する。さらに常態結合した動物蛋白を実質的に含まないMIL A蛋白、MIL Aの生産方法、並びにMIL A (特にCDX)を認識するモノクローナル抗体をも提供する。特に本発明は、さらにCDXをコードするDNA配列を持った組換えDNA分子を提供し、さらにこれらにより形質転換された単細胞宿主を提供する。

【0020】さらに本発明はELAM、ELAMリガンドを含むMIL A、またはこれら分子の1部をリセプタもしくはリガンドを阻止するため使用することを含む内皮細胞に対するPMN結合の阻止方法をも提供する。さらに、ELAM発現を阻止するためのアンチセンス核酸およびリボチームの使用にも関する。さらに本発明は、ELAMのそのリガンドに対する結合を阻止する能力につき分子をスクリーニングすることによる結合阻止剤の同定方法にも関する。さらに本発明は、ELAMおよびそのリガンドの同定方法をも提供する。この種の1つの方法は、ELAMもしくはELAMリガンドを認識する抗体に対する抗-イディオタイプ抗体を使用する。

【0021】

【発明の説明】以下の詳細な説明には次の定義を用いる: 発現制御配列: 他のDNA配列の転写および翻訳を制御かつ調整するDNA配列。

【0022】作用結合: 発現制御配列がDNA配列の転写および翻訳を制御かつ調整する際に前記DNA配列が発現制御配列に作用結合する。「作用結合」という用語は、発現すべきDNA配列の前側に適当な出発信号(たとえばATG)を有し、かつ正確な読枠を維持して発現制御配列の制御下におけるDNA配列の発現とDNA配列によりコードされた所望生産物の産生とを可能にすることを含む。組換えDNA分子中に挿入することを所望する遺伝子が適当に出発信号を持たなければ、この種の出発信号を遺伝子の前側に挿入することができる。

【0023】抗体: 免疫グロブリン分子またはその機能

的断片、たとえばF a b、F (a b ')₂、もしくはd A b。抗体調製物は、この調製物における個々の免疫グロブリン分子の少なくとも1部が抗原を認識する際(すなわち、これに結合する際)、特定抗原に対し反応性である。抗体調製物は、抗原に対する調製物における個々の免疫グロブリン分子の結合が慣用の方法により検出しえない場合、抗原に対し非反応性である。

【0024】標準ハイブリッド化条件:ハイブリッド化と洗浄との両者につき5×SSCおよび65℃に実質的に等しい塩および温度の条件。

【0025】DNA配列:本発明のDNA配列は、組換えDNA技術を用いて作成され或いは分離されたDNA配列を意味する。これらはcDNA配列、その天然ゲノムから分離されたDNA配列、および合成DNA配列を包含する。請求の範囲に用いる用語は、天然に存在する場合にも天然DNA配列を包含することを意図しない。

【0026】ELAM:内皮細胞に対する白血球の付着を媒介する、内皮細胞の表面で発現される分子。

【0027】MILA:内皮細胞に対するELAM-媒介結合に関与する、白血球の表面で発現される分子。これはELAMリガンド、すなわちELAMに直接結合する分子を包含する。

【0028】以下に説明するように、本発明者等はcDNAをELAMmRNAから分離すると共に配列決定し、ELAM分子を適当な宿主にて発現させ、MILAをコードするcDNAを分離すると共に配列決定し、さらにMILA用のDNA配列を分離しかつ発現させた。

【0029】本発明による組換えDNA分子の発現は、宿主細胞による得られたポリペプチドの翻訳後の改変を包含する。たとえば哺乳動物細胞において、発現は特にポリペプチドのグリコシル化、リピド化もしくはホスホリル化、或いは「成熟」蛋白を産生するための信号配列の切断を包含する。したがって、ここで用いるELAMおよびMILAという用語は、全長ポリペプチドおよびその改変物もしくは誘導体、たとえばこの種のポリペプチド、成熟蛋白、信号ペプチドを保持するポリペプチド、匹敵した生物活性を有する切断ポリペプチドなどのグリコシル化物を包含する。

【0030】ELAMは、炎症時にのみ内皮細胞の表面で発現される。この現象を利用してELAM cDNAを分離した。本発明のcDNA分離物ELAM1によりコードされたポリペプチドをVCAM1およびVCAM1bと命名した。この分離に関与する第1工程は、ELAM分子を種々異なって発現する細胞の選択である。ヒトの臍静脈内皮細胞を選択した。何故なら、これらは炎症性サイトキシンIL-1βにより誘発された際にELAMを産生するからである。しかしながら実際には、このサイトキン、この細胞型、または特にヒト細胞のみに限定されない。他の哺乳動物細胞、たとえばヒヒ内皮細胞もELAMを産生することが知られている[コトラン

およびボバー、1988]。

【0031】次の工程は、ELAMを発現する細胞(この場合にはIL-1β-誘発HUVEC)からmRNAを分離すると共にそれらからcDNA保存物を作成することである。mRNAを分離しかつそれからcDNAを作成するには、多くの方法が知られている[たとえばグラブラーおよびホフマン、1983、並びにマニアチス等、1982参照]。

【0032】次いで、cDNAを適当なベクターに挿入した。プライアン・シードにより記載されたように真核性発現ベクターpCDM8を選択した[シード、1987]。このプラスミドはイ・コリにおける高コピー数と、真核性プロモータと、たとえばCOS7細胞のような一時的発現系における高レベルの発現とを含む幾つかの利点を有する。しかしながら、他の数種のベクター系も可能である[たとえばケート等、1986参照]。

【0033】cDNA保存物を作成した後、次の工程はそれからELAM cDNA配列を持ったクローンを分離することであった。種々異なって発現されたmRNAにつきcDNAを分離するには現在多くの方法がある。これらはたとえば(1)標識されたcDNAによる+/-スクリーニング;(2)抜取cDNA保存物の作成;および(3)抜取cDNAプローブによるスクリーニング[デービス、1986;サージェント、1987;デービス等、1985、ヘドリック等、1984;およびツギド等、1988]。第3の技術、すなわち抜取cDNAプローブによるスクリーニングを選択すると共に、ELAM配列を豊富化させたcDNAサブ保存物を作成した。

【0034】以下、一層詳細に説明するように、サイトキン誘発細胞により産生されるが未誘発細胞では産生されないmRNAを豊富化させた抜取cDNAプローブを作成した。次いで、当業界で周知された技術を用いて、抜取cDNAプローブにより、サイトキン誘発cDNA保存物を試験した。これにより、ELAM配列を豊富化したサブ保存物を形成するクローンを分離することができた。

【0035】この時点で、2つの技術を用いてELAM配列に関するcDNAを持ったクローンを同定した。第1方法においては、適する真核性発現系にてELAM活性を発現するクローンを試験した。λGT11でクローン化されるcDNAによってコードされた融合蛋白の抗体スクリーニングを含む各種の直接的発現技術を用いることができ[ヤングおよびデービス、1983;ヤングおよびデービス、1984];またはクローン化されたcDNA、或いはSP6/T7プロモータを有するプラスミドもしくはファージDNAからのmRNAを注射した後に卵母細胞調節媒体の活性分析を用いることができる。或いは、各種のプロモータ、選択素子および複製素子を有するプラスミド、ファージおよびコスミドベクターにて保存物を作成することもできる。動物細胞を、一時的も

しくは安定な発現のため保存物でトランスフェクトすることができる。トランスフェクションは各種の方法で行なうことができる。一時的な発現につき、研究者はスフェロプラスト融合、DEAEデキストランおよびエレクトロポレーションを用いている。安定な発現については、磷酸カルシウム、スフェロプラスト融合およびエレクトロポレーションを用いている。本発明者等は、スフェロプラスト融合によりトランスフェクトされたCOS7細胞、すなわち一時的な発現系を用いた[アルッフオおよびシード、1987]。

【0036】最近まで、直接発現によるクローン化分子の同定は鋭敏な分析を必要とし、リンホキンのみに制限されていた。しかしながら、抗体「パニング」技術[ウィソッキおよびサトウ、1978]による或いはFACSでの機能分子の同定[ヤマサキ等、1988]による効率的な一時的発現ベクターにおける一本鎖細胞-表面分子のcDNAクローン化[たとえばシードおよびアルッフオ、1987並びにシード、1987参照]は、直接的発現により同定しうるクローン化分子の範囲を拡大した。本発明者等は、クローン化分子につきリガンドを発現する適当な細胞種類を用いてこの分子を同定するという付着分析を用いることにより技術を拡大した。

【0037】ヒト好中球状細胞ラインHL-60[ベビラッカ等、1985]またはヒトB-リンパ球状細胞ラインRAMOC[アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ATCC寄託番号CRL1596、ヒト・バ-キット・リンパ腫]のいずれかを結合するトランスフェクト細胞の能力を試験することにより、ELAM発現を検出した。これにつき以下詳細に説明する。トランスフェクト細胞はヒト細胞でないため、ヒトELAMポリペプチドを産生するものは実質的に精製された形態であって、常態結合した動物蛋白を実質的に含まない。この分析にて陽性の試験結果を得た細胞を釣り上げ、プラスミドDNAを回収し、さらにそれらから挿入物を分離した。これら挿入物は、ELAM1(HL-60細胞に対する付着により選択)およびVCAM1(RAMOS細胞に対する付着により選択)をコードするDNA配列を有した。

【0038】第2の方法においては、誘発されたmRNA(未誘発のmRNAでない)の4kbバンドに対しノーザン・ブロットでハイブリッド化した豊富化サブ保存物からcDNA挿入物を同定した。これら挿入物の2種は、ELAM1に関するDNA配列を有した。サブ保存物からの他の挿入物は、異なる誘発mRNAをコードする。

【0039】IL-1 β -誘発HUVEC cDNA保存物をVCAM1 cDNA配列から誘導されたランダム処理のオレゴヌクレオチドP³²標識プローブで試験することにより、他のVCAM、VCAM1bに関するcDNAを分離した。VCAM1bはVCAM1より大である。

【0040】これら3種の方法により同定されたクローンをを用いて、ELAM1並びにVCAM1および1bにつきcDNAの配列を決定した。遺伝子コードの縮退に基づき、これら配列の多くのヌクレオチドを変化させると共に図1、図3および図4に示したDNA配列によりコードされるものと同じのアミノ酸配列を発現に際しコードするDNA配列を保持し得ることに注目すべきである。さらに、ELAM cDNA配列の断片に関するDNA配列(すなわちELAM cDNA配列に対し実質的に相同であって、それ自身でELAMポリペプチドをコードするDNA配列)は標準ハイブリッド化条件下で上記ELAM cDNA配列にハイブリッド化する。

【0041】上記DNA配列からELAM1、VCAM1およびVCAM1bのアミノ酸配列を推定した。蛋白処理技術の現状に鑑み、当業者はこれらアミノ酸配列における合理的な改変、挿入および欠失を行なって、ここに開示した分子と実質的に同じ生物学的もしくは免疫学的活性を有する各種の分子を明らかに得ることができる。

【0042】さらにELAM1並びにVCAM1および1b遺伝子につき、転写プロモータを含むゲノムDNA配列を分離した。ヒトゲノム保存物をELAM1またはVCAM1 DNA配列のコード化領域から誘導されたP³²標識プローブでスクリーニングした。これにより、ELAM1およびVCAM1の両遺伝子の5'末転写および未翻訳領域の部分の有するクローンを得た。

【0043】ELAM1およびVCAM1転写プロモータは多数の用途を有する。第1に、これらはサイトキン(たとえばTNFもしくはIL-1)および細菌性リポ多糖類(LPS)または内皮細胞にてELAMの発現を誘発することが知られた他の薬剤によって誘発しうるベクターを作成するのに有用である。この種のベクターはたとえば遺伝子転移分析に有用であり、たとえばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼなどのリポータ遺伝子の転写を開始させるよう、誘発性プロモータを位置せしめる。次いで、この作成物を一時的に或いは安定的に適当な哺乳動物細胞ラインに導入する。誘発の有力な阻止剤もしくは刺激剤を、次いで上記誘発剤のいずれか或いは全てによる誘発に対する作用を測定して分析することができる。

【0044】さらに、BB11と称するELAM1を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを分離した。後記実施例Vにその生産につき説明する。

【0045】VCAM1は、内皮細胞に結合するTおよびB細胞に関与する。レクチン刺激もしくは特定抗原により活性化されたT細胞は、インビトロにてHUVECに結合する。この結合は部分的にICAM/LFA1経路によって媒介される。何故なら、CD18における阻止性エピトープ(LFA1の共通 β 連鎖)に結合するモ

ノクローナル抗体がT細胞結合を部分的に阻止するからである。さらに、抗-CD18および抗-VCAM1モノクローナル抗体は結合を完全に阻止することも判明した。CD18が欠損した人間は炎症部位に対するリンパ球の正常な修復を示すと共に、活性化されたT細胞はリンパ系を介して循環しない(すなわち、これらは炎症部位以外には血流から流出しない)という観察と組合せて、これはVCAM1がインビボにおける活性化T細胞移動に対し重要であることを意味する。すなわち、VCAM1は全活性化T細胞を炎症部位に集中させるよう作用する。活性化T細胞の存在が多くの炎症および自己免疫病の特徴であるため、これはVCAM1の不適切な発現がこの種の病気の基本的な病理化学的特徴であることを意味する。したがって、VCAM1経路は活性化T細胞修復が関与する病気(たとえば関節炎、狼瘡、多発性硬化症など)に対する重要な介入点を与える。したがって、VCAM1結合経路を阻止することにより内皮に対するT細胞結合を阻止するための治療処置につき開示する。これは、本明細書中に記載するいずれかの手段により行なうことができる。

【0046】VCAM1のDNA配列は分子がELAM1に対し構造類似性を持たず、免疫グロブリン超遺伝子群の一員であることを示す。免疫グロブリン超遺伝子群のうち3種は細胞-細胞付着分子であると確認される。これらはNCAM、CEAおよびICAM1である。NCAMはそれ自身で他の細胞の表面にて結合し(ホモタイプ付着)、かくして同種類の細胞間の付着を促進する。CEAの機能は最近まで未知であったが、付着分子として機能することにより結腸腫瘍細胞およびCEAに関するcDNAでトランスフェクトされた細胞のホモタイプ凝集を媒介することが見出された[ベンチモル等、1989]。ICAM1は白血球表面蛋白LFA1のリガンドであって、白血球-白血球付着および白血球-内皮細胞付着の両者を媒介する[スタウントン等、1988]。ICAM1およびVCAM1は或る程度の機能的類似性を有し、たとえば両者はサイトキンで処理した後に内皮細胞内で誘発され、さらに両者はリンパ球と関連細胞ラインとの付着を媒介する。ICAM1のリガンド(すなわちLFA-1)は充分特性化されている。VCAM1のリガンドはVLA4として同定されている(後記参照)。ICAM1は、インビボにおける炎症部位までのリンパ球の移動だけでなく免疫反応に関する多くのリンパ球機能にも役割を演ずると思われる。さらに、ICAM1は多くのリノウィルスのためのリセプタとなることも最近示された。他のウィルス(たとえばポリオ、HIV)のリセプタもIg上科のメンバーである[ホワイトおよびリットマン、1989]。たとえば、VCAM1は免疫調節およびウィルス感染の両者において重要な役割を演ずる。

【0047】CEAとICAM1との両者は腫瘍細胞で

発現される。CEAは、結腸癌のための診断標識として永年にわたり使用されている。最近の診断技術は放射線免疫結合体の使用を含み、抗-CEA抗体を放射性標識に結合させると共に患者中に導入する。この方法により、臨床医は3mm程度に小さい腫瘍を同定することができる[ゴールデンベルク、1989]。

【0048】研究者等は、さらに放射線免疫治療および免疫毒素治療を開発している。放射線免疫治療は放射線免疫結合体の使用を含み、たとえばI¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶などの核種を特定の表面抗原を認識する抗体に結合させる。免疫毒素は、たとえばシュドモナス外生毒素などの細胞毒素と結合した抗体である。注射に際し、これらの結合した抗体は、抗原を発現する細胞に対し毒性剤を指向させる。本発明によれば、放射性標識、核種および細胞毒素をVCAM1および1b或いはこれらを認識する抗体と結合させて、VCAM1リガンド(たとえばVLA4)もしくはVCAM1を発現する細胞を標的とすることができる。

【0049】新規なELAMの発見、またはたとえば腫瘍細胞のような他の細胞で発現されるELAMもしくはMILAの将来の発見も、新規なTIL治療を可能にする。たとえばELAMを表面上で発現する腫瘍が見出された場合、この腫瘍を生検して浸潤リンパ球を除去することができる。たとえばレトロウィルス発現ベクターにおけるTNFのような殺腫瘍剤のための遺伝子を用いて、腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)をトランスフェクトし、次いでこれをIL-2で拡充させる。トランスフェクトされたTILを患者中に注射すれば、TILは初期の腫瘍に特異的に指向すると共に腫瘍中に移動して、ここで殺腫瘍遺伝子生産物が局所作用のため放出される[トーマスおよびシコラ、1989参照]。ELAMは全て或る種の白血球を結合することにより浸潤を媒介するので、浸潤白血球を分離し、特定の所望遺伝子生産物の発現につきトランスフェクトし、増量させ、かつ患者に再導入するという改変TIL治療も考えられる。

【0050】代案のTIL治療は、或る種の細胞型(特に或る種の癌細胞)がELAMもしくはMILAを発現するという事実を利用する。たとえば、結腸癌はCDXを発現するのに対し、黒色腫はVLA4を発現することが知られている。

【0051】ここに開示するDNA配列を用いて、白血球をトランスフェクトすることにより表面ELAMもしくはMILAを発現させて白血球の細胞融解活性を向上させ、対応リガンドを発現する標的細胞に対し結合を向上させるよう、治療を設計することができる。白血球型の細胞融解活性がより強い細胞-細胞付着の関数として増大する場合、この種の方法は白血球が標的細胞を破壊する能力を向上させる。たとえば、結腸癌または黒色腫の場合、白血球(好ましくは既に標的癌細胞に対し親和性を持った浸潤性白血球)をELAM1の遺伝子(結腸

癌の場合)またはVCAM1もしくはVCAM1bの遺伝子(黒色腫の場合)を含む発現ベクターでトランスフェクトすることができる。この種の白血球を患者中に導入すれば、それぞれ癌細胞もしくは黒色腫細胞に留まり得る白血球の群が得られる。これら白血球は、腫瘍細胞に付着して所望の細胞融解作用を発生する向上した能力を有する。

【0052】HUVECをTNFおよびIFN- γ と一緒に培養すれば、VCAM1発現がTNF単独での培養よりも約100%増大することが判明した。活性化T細胞はIFN- γ を分泌し、したがって積極的なフィードバック系を介し炎症部位に対するそれ自身の補充を促進することができる。VCAMはT細胞結合を生ぜしめ、T細胞はさらにIFN- γ 分泌を介しVCAM生産をさらに刺激する。したがって、このフィードバックメカニズムの障害を含むVCAM依存性病理学につき新たな処置を考案した。この処置はたとえばIL-1、TNFもしくはIFN- γ のようなサイトキンをたとえばモノクローナル抗体で阻止して、サイトキン刺激されたVCAMの生産を阻止することからなっている。

【0053】さらにELAM1-媒介付着に関与し、事実恐らく極く最近の本発明者等の証拠が示すように、ELAM1リガンドに関与するMILA、CDXを分離した。分離は第1工程としてCDX分子に対するモノクローナル抗体の生産を含んだ。マウスに対し、ELAM1に結合することが知られた全HL-60細胞、すなわちPMN-関連細胞ラインで免疫化した。或いは、PMN自身および本発明が示すU937細胞を包含するELAM1に結合する細胞ラインで免疫化することもできる。さらに、他のELAMに対する付着に関与するMILAを分離するため、適するELAMに結合する任意の細胞ラインで免疫化することもできる。たとえばVCAM1を分離する際、これら2種の細胞ライン、すなわちB-リンパ球状細胞ライン(RAMOS)およびT-リンパ球状細胞ライン(JURKAT)を同定した。

【0054】免疫化されたマウスからの免疫血清が付着分析にてHUVECに対するHL-60細胞の結合を阻止したことを知った後、当業界で周知された方法にて脾細胞からハイブリドーマを作成した[ゴジング、1983]。次いで、CDXに対するモノクローナル抗体(Moabs)を産生するハイブリドーマを、付着分析にて誘発HUVECに対するHL-60細胞の結合を阻止する能力につき試験することにより同定した。これらハイブリドーマの数種を用いて、モノクローナル抗体を含有する腹水液を作成した。

【0055】さらに、ヒューゼ等(1989)の技術を用いて、これら抗原を認識するモノクローナルFab断片を生ぜしめこともできる(さらにスケラおよびブリュクソン、1988参照)。或いは、ワード等(1989)により記載されたように、単ドメインの抗体を産生させること

もできる。

【0056】CDXに対する本発明のモノクローナル抗体は次の特徴を有する：第1に、これらはELAM1を発現する細胞に対するHL-60細胞もしくはPMNの結合を阻止する。第2に、これら抗体は特異的な細胞結合パターンを示し、すなわちこれらはELAM1に結合する細胞を認識するが、ELAM1に結合しない細胞は認識しない。第3に、これらはヒト細胞ラインに関し他の細胞-表面分子(たとえば抗-LFA-1、抗-LFA-3、抗-CD44、抗-ICAM、抗-CD4および抗-Leu8)に対する抗体のパターンとは異なる認識パターンを有する。

【0057】これらMoabsを用いてCDXを分離した。HL-60表面蛋白および好中球(ヒト血液から分離)からの表面蛋白をクルチンガーにより記載された方法[クルチンガー等、1981]の変法より沃素で放射能標識し、或いはS³⁵-メチオニンで代謝的に標識した。膜蛋白を可溶化させると共に、これらを蛋白Aセファロース(ARX)に対し μ 鎖-特異性ウサギ抗-マウスIgGを介し結合された抗-CDXモノクローナル抗体(α -CDX Moabs)と共に培養し、次いで抗体結合した蛋白を分離した。この蛋白は、約150 kDの単一の核酸バンドとしてSDS-PAGE上に出現する。しばしば、90 kD蛋白バンドがHL-60細胞からの結合蛋白および常に好中球からの蛋白に観察された。この90 kDバンドはCDX分解生成物を示すと思われる。さらに、しばしば一層高い分子量のバンド(すなわち約150 kD)も観察された。これらは非特異性バンドである。分離した150 kD蛋白をN-グリカナーゼで処理した場合、分子量が約70 kDまで低下した。150 kDバンドをN-グリカナーゼおよびO-グリカナーゼで処理した場合、分子量はさらに約45 kDまで減少した。これは極めて重度にグリコシル化した蛋白の蛋白コアを示すと思われる。この蛋白は、常態結合した動物蛋白を実質的に含まない分離CDXである。

【0058】さらに当業界で知られた技術を用いて、CDXを発現に際しコードするDNA配列を分離した。幾つかの実際的技術は、クローン化DNAを発現するための発現系を使用する。上記したように、各種の真核性発現系を用いることができる。CDXを発現する細胞ラインHL-60のmRNAからcDNA保存物を作成した。この保存物を上記したような抜取技術によりCDXを発現しない細胞ライン(この場合はヘラ細胞)でCDX DNA配列につき豊富化させた。細胞ラインCOS-7を抜取保存物でトランスフェクトすると共に約2100種のクローンを得、これらからCDXを発現する細胞を多数の方法で検査した。

【0059】トランスフェクト細胞を α -CDX Moabsと共に培養し、かつこれらを抗-マウスIgGもしくはIgMで被覆されたプレートに塗抹し、プレート

に結合する細胞はCDXを発現する細胞である。このようにして、CDXをコードする2.1 kbのDNA挿入体を同定し、配列決定用ベクターにサブクローン化させ、これをpSQ219と称する。

【0060】CDX（または他のMILA）を分離する他の方法は、蛍光性抗体標識を用いる。この方法においては、CDX発現性細胞を α -CDX Moabsと共に培養し、次いでMoabsをたとえば蛍光標識された抗-マウス抗体で標識する。蛍光性抗体を結合する細胞を、次いで蛍光活性化細胞分類器（FACS）で分類した。分類された細胞からのDNAを用いて、たとえばイー・コリのような細菌宿主を形質転換させた。次いで、得られたコロニーからのDNAを用いてCOS7細胞をトランスフェクトし、この手順を単一のCDX-発現性クローンが確認されるまで反復することができる。

【0061】第3の方法は、上記したようにトランスフェクトされた細胞を組換え可溶性ELAM1（rsELAM1）で被覆されたプレート上に塗抹することである。実施例VIIIにおいてはプレートをrsELAM1で被覆する方法を説明する。これらプレートに結合する細胞は、CDXを発現するものである。同様に、他の可溶性ELAMを用いて、その付着経路に関与するリガンドもしくはMILAを発現する細胞を分離することができる。

【0062】さらに、発現保存物をイー・コリで作成することもできる。たとえば、 λ ZAP（登録商標）（ストラタジーン）/HL-60保存物を作成すると共にこれを用いて、イー・コリで挿入DNAを発現させることができる。塗抹した後、ブランクをたとえば放射能標識された α -CDXモノクローナル抗体で直接にスクリーニングすることができる[ヤングおよびデビス、1983、並びにヤングおよびデビス、1984]。モノクローナル抗体が結合するブランクを釣り上げて、DNA挿入物をこれらから分離することができる。

【0063】抗体認識に基づかずにELAMリガンドを同定すべく使用する他の方法は、COS7細胞を適当な保存物（抜取ることができる）でトランスフェクトし、次いでこれらをELAM発現性細胞（たとえば誘発HUVEC、ELAM-発現性COS7細胞、またはELAM-発現性CHO細胞）に直接載せることである。この場合も、適切なクローンを分離するよう十分に保存物を豊富化するには、複数回の処理が必要である。

【0064】CDX（または他のMILA）をコードするDNA配列を分離するための他の技術は、オリゴヌクレオチドプローブによるcDNA保存物のスクリーニングを含む。たとえばCDXに対する固定化抗体または固定化ELAM1を用いる親和性クロマトグラフィーにより充分量のCDX蛋白を精製すれば、部分アミノ酸配列を決定して、CDX遺伝子の少なくとも1部に対応するオリゴヌクレオチドプローブを合成することができる。

次いで、これらプローブを用いてcDNA保存物をスクリーニングすることができる。或いは、オリゴヌクレオチドをプライマーとして使用することにより、CDX（MILA）遺伝子用の保存物をスクリーニングする際に使用すべき長いプローブを生ぜしめることができる。

【0065】CDXのためのコード化配列を含むcDNA挿入物を分離した後、CDXがELAM1用のリガンド（または少なくとも1種のリガンド）であるという証拠をさらに蓄積した。CDX挿入物でトランスフェクトされたCOS7細胞は、rsELAM1で被覆されたビーズに付着した。この相互作用は陽イオン依存性であって、BB11（すなわちELAM1を認識するモノクローナル抗体と共に事前培養して阻止された。さらに、CDX挿入物でトランスフェクトされたCOS7細胞は、蛍光標識された α -CDX Moabsと共に培養した後にFACS上で陽性分析を示した。さらにCDXトランスフェクトされたCOS7細胞は、 α -CDX被覆されたセファロースビーズによりロゼットを形成する[シードおよびアルッフォ、1987]。さらに、約120 kDの蛋白を沃素化すると共に、ARXビーズ（すなわち蛋白Aセファロースに対し μ 連鎖-特異性ウサギ抗-マウスIgGを介し結合した α -CDX）を用いてCDX COS7細胞から免疫沈殿させることができる。

【0066】重質炭水化物成分が天然産CDXと明らかに結合することに鑑み、さらにシアリダーゼによるHL-60細胞（CDX-発現性）の処理がELAM1に対する結合のロスをもたらすことも明らかに観察した。これは、たとえばCDX糖におけるシアル酸成分がELAM1結合に直接関与するという直接作用である。或いは、これはたとえばシアル酸成分の開裂がCDXの電荷における急激な変化をもたらして、ELAM1に対する結合を阻止するという間接的効果でもある。

【0067】さらに、VCAM1およびVCAM1bに関するリガンドを同定した。これはインテグリンVLA4である[ヘムラー、1988；ヘムラー等、1987a；およびヘムラー等、1987b]。インテグリンは細胞-細胞外マトリックスおよび α 、 β -ヘテロダイマー構造を示す細胞-細胞付着リセプタの1群である[ハynes、1987；マルカントニオおよびハynes、1988]。研究者等は、 β -サブ単位によって分類される3種のサブ群のインテグリンを確認した。VLA（極後期の抗原）蛋白は β_1 サブ群に属し、これらの多くは細胞-細胞外マトリックス付着に対し特異的である[ハynes、1987およびルオスラーチ、1988]。VLA4はリンパ性細胞（たとえばBおよびT細胞）、並びに骨髓性細胞にて比較的高レベルで発現されるが、他の細胞では検出困難である[ヘムラー等、上記]。細胞外マトリックスに対するBおよびT細胞の結合は、VLA4およびそのリガンド、ヒトフィブロネクチン（FN）によって媒介される[ウェイナー等、1989]。VLA4がVCAM1のためのリガンド

であるという知見は、これが活性化内皮細胞に対するBおよびTリンパ球の1つの結合経路を規定するので重要である。したがって、下記する方法におけるリガンドおよびリセプタとしてのVLA4並びにVCAM1および1bの使用につき説明する。

【0068】本発明では、ELAMおよびMILADNA配列および分子に関する幾つかの用途が考えられる。第1に、ELAMおよびMILAを用いて、これら分子に対し反応性のモノクローナル抗体調製物を作成することができる。次いで、Moabsを治療剤として使用することにより、内皮細胞に対する白血球結合を阻止することができる。

【0069】第2に、可溶型ELAM、可溶性ELAMリガンドまたはそのいずれかの断片を結合阻止剤として使用することができる。ELAMペプチドは白血球上のELAMリガンドに結合し、ELAMリガンドは内皮細胞上のELAMに結合する。両方法は、内皮細胞に対する白血球結合を阻止する。組換え可溶性ELAM(rsELAM)またはrsELAMリガンドを作成するため、好ましくは経膜領域を除去するよう分子をコードするDNAを変化させる。かくして、可溶性分子のためのDNAは、恐らく細胞質ドメインに付着した細胞外ドメインの全部または1部を含む。この対策は、可溶性CD4、すなわちAIDSウィルスに結合するT細胞における表面蛋白を用いて既に証明されている[フィッシャー等、1988]。この対策はさらに抗体治療の問題を回避する。何故なら、用いるポリペプチドが免疫反応を殆んど誘発しないからである。

【0070】可溶性組換え分子につき研究者等が遭遇した1つの問題は、短いインビボの血漿半減期である[カポン等、1989]。この種の分子は系から急速に除去されるので、治療効果を得るには大投与量もしくは頻繁な注射が必要である。したがって、研究者等は可溶性分子の半減期を増大させる方法を探求した。有力な解決策は、可溶性分子を血流中における長い半減期を持つことが知られた他の分子に結合させることである。その長い半減期により、免疫グロブリン分子は有力な候補となる。カポン等(1989)は、組換えDNA技術を用いた免疫グロブリン分子に対する可溶性CD4の結合を記載している。この対策においては、免疫グロブリン分子の可変領域の代りに可溶性蛋白を用いて蛋白/免疫グロブリン融合蛋白を形成させる。

【0071】rsELAM/免疫グロブリン融合蛋白は、rsELAM単独よりも長い血漿半減期を有することが予想される。この種の融合蛋白は好ましくは組換え作成物で製造され、その際可溶性分子をコードするDNA配列を免疫グロブリン分子の一定ドメインをコード化するDNA配列に融合させる。次いで、組換えDNAを適当な宿主細胞、好ましくは動物細胞で発現させて、融合蛋白を産生させる。

【0072】ELAM/免疫グロブリン融合蛋白は他の利点を有すると思われる。免疫グロブリン分子は一般に二価であるため(すなわち、これらは2つの結合部位を有するため)、ELAM/免疫グロブリン融合蛋白は2つのELAMを有し、したがって2つのELAMリガンド結合部位を有する。したがって、これらはELAMリガンドを示す細胞に対し大きい親和性もしくは親和力を有すると思われる。

【0073】第3に、ELAMに結合する分子(たとえば抗-ELAM抗体または標識、たとえばリガンドもしくはその断片)を用いて、炎症を検出することができる。これは、たとえば蛍光性もしくは放射能により分子を検出可能にし、これを患者に投与すると共に人体のどこにそれが蓄積したかを決定する。このようにして、炎症の種類を確認することもできる。たとえば、ELAM1に対する結合は慢性炎症でなく急性炎症を示す。

【0074】第4に、ELAMが炭水化物成分または他の翻訳後の改変を介しリガンドに結合すれば、ELAMを用いてこれが結合したELAMリガンドにおける炭水化物を確認することもできる。

【0075】第5に、ELAMおよびMILAを系の1部として用いることにより、付着阻止剤のための小分子をスクリーニングすることができる。たとえば、小分子をCDXとELAM1との間の相互作用を阻止する能力につき試験するような分析系を作成することができる。この方法で同定された小分子阻止剤は、抗炎症剤の候補となる。

【0076】第6に、これら分子を用いて、ELAMに対する白血球結合を阻止するような内生蛋白を確認することもできる。研究者は、この種の1つの分子、すなわち内皮から結合PMNを脱着させる際に関与する白血球付着阻止剤(LAI)を一時的に確認した[ホイラー等、1988]。

【0077】第7に、VCAM/ICAM融合蛋白を生ぜしめることができる。両蛋白は数種の構造ドメインで構成されることが知られている[シモンズ等、1988]。各蛋白の各種ドメインをコードするDNA配列を、たとえばELAM/免疫グロブリン融合蛋白の作成につき説明した遺伝子融合技術を用いて融合させる。選択されるドメインは、それぞれVCAM1もしくはVCAM1bリガンドおよびICAM1リガンドを結合する能力を持ったものである。VLA4およびLFA1(公知のリガンド)を結合するドメインが好適である。これらDNA配列の発現に際し産生されるポリペプチドは、リガンドを有する細胞がVCAM1もしくはVCAM1bまたはICAM1もしくはその両者のいずれかに付着するのを阻止するため有用である。

【0078】最後に、ELAMおよびELAMリガンドDNA配列を用いて、ELAMもしくはELAMリガンドの発現を翻訳レベルで介入する核酸分子を生成させる

ことができる。この手段は、特定mRNAの翻訳をこのmRNAをアンチセンス核酸で遮蔽し或いはこれをリボチームで切断することにより阻止するためのアンチセンス核酸およびリボチームを利用する。これらの方法は炎症状態を処置する際に有用である。

【0079】アンチセンス核酸は、特定mRNA分子の少なくとも1部に対し相補的なDNAもしくはRNA分子である[ワイントラウブ、1990；マルクス-セクラ、1988]。細胞において、これらは前記mRNAにハイブリッド化して二本鎖分子を形成する。細胞はこの二本鎖形態でmRNAを翻訳しない。したがって、アンチセンス核酸はmRNAから蛋白への発現を妨げる。約15個のヌクレオチドのオリゴマーおよびAUG開始コドンにハイブリッド化する分子は特に効果的である。何故なら、これらは合成が容易であると共に、これらをELAM生産性細胞に導入する際に大分子よりも少ない問題しか提起しないからである。アンチセンス法を用いて、インビトロにおける多くの遺伝子の発現を阻止した[マルクス-セクラ、1988；ハンバー等、1988]。

【0080】リボチームは、DNA制限エンドヌクレアーゼと若干類似した方法で他の一本鎖RNA分子を特異的に切断する能力を備えたRNA分子である。リボチームは、或る種のmRNAがそれ自身のイントロンを切除する能力を有するという観察から見出された。これらRNAのヌクレオチド配列を改変することにより、研究者等はRNA分子内の特定ヌクレオチド配列を認識して切断する分子を処理することができた[セッチ、1988]。これらは配列特異性であるため、特定配列を持ったmRNAのみが失活される。

【0081】研究者等は2種類のリボチーム、すなわちテトラヒメナ(Tetrahymena)-型および「ハンマーヘッド」-型を同定した[ハーゼルホッフおよびゲルラッハ、1988]。テトラヒメナ-型リボチームは4-塩基の配列を認識する一方、「ハンマーヘッド」-型は11~18-塩基配列を認識する。認識配列が長いほど、標的mRNA種類においてのみ生ずる傾向が大となる。したがって、ハンマーヘッド型リボチームは、特定mRNA種類を失活させるのにテトラヒメナ型リボチームより好ましく、18-塩基認識配列はより短い認識配列よりも好適である。

【0082】ここに説明したDNA配列は、したがってELAM1、VCAM1およびVCAM1b、CDXおよびVLA4のためのmRNAに対するアンチセンス分子を作成し、これらを切断するリボチームを作成するのに用いることができる。

【0083】アンチセンス分子およびリボチームは、付着分子の発現を妨げる細胞分子中に導入することにより、炎症を処置する方法に使用することができる。ELAMは炎症の症状発生の間に内皮細胞で誘発され、さらに治療剤が静脈内注射により容易に血管内皮細胞に供給

され得るので、内皮細胞はこの種の治療に魅力的な標的であり、ただしアンチセンス分子もしくはリボチームは適切な細胞に効果的に供給され得るものとする。

【0084】研究者等は、これら分子を標的細胞に供給すべく使用しうる2つの手段を示唆している。第1は、抗-ELAMアンチセンス核酸またはELAM-特異性リボチームをmRNA分子として発現するベクターにより標的細胞をトランスフェクトすることである[ハンバー等、上記]。この手段はインビトロにて細胞ラインで処理する際に極めて有用であるが、インビボでは効果的でないと思われる。インビボ供給につき一層有望である第2の手段は、リボソームに抗-ELAMアンチセンス分子、ELAM-特異性リボチーム、またはこれらを発現するベクターを充填することである。これらリボソームは、リボソームを炎症部位に指向させる抗-ELAMモノクローナル抗体を含有することもできる。この供給形態は、マイナスフィードバック系を与える。何故なら、細胞上のELAMの出現はこの細胞を抑制の標的にするからである。さらにアンチセンス成分またはリボチーム成分の浸透が成功すれば、ELAM産生を停止させることにより標的としての細胞を除去する。

【0085】本発明の他の特徴は、ここに説明したELAMおよびMILADNA配列の発現である。当業界で周知されているように、DNA配列は、これらを適切な発現ベクターにて発現制御配列に作用結合させると共にこの発現ベクターを用いて適切な単細胞宿主を形質転換させることにより発現させることができる。

【0086】発現制御配列に対する本発明のDNA配列の作用結合は、勿論、既にDNA配列の1部でなくてもDNA配列の上流における正確な読枠に開始コドンATGを与える。

【0087】本発明のDNA配列を発現させるには、広範な種類の宿主/発現ベクター組合せを用いることができる。たとえば、有用な発現ベクターは染色体、非染色体および合成DNA配列の断片で構成することができる。適するベクターはSV40および公知の細菌プラスミドの誘導体、たとえばイー・コリプラスミドcolE1、pCR1、pBP322、pMB9およびその誘導体、たとえばRP4のようなプラスミド；ファージDNA、たとえば多数のファージλの誘導体、たとえばNM989、並びに他のファージDNA、たとえばM13およびフィラメント状一本鎖ファージDNA；酵母プラスミド、たとえば2μプラスミドもしくはその誘導体；真核性細胞に有用なベクター、たとえば昆虫もしくは哺乳動物細胞に有用なベクター；プラスミドとファージDNAとの組合せから誘導されるベクター、たとえばファージDNAもしくは他の発現制御配列を用いるよう改変されたプラスミドなどを包含する。

【0088】広範な種類の発現制御配列(作用結合されたDNA配列の発現を制御する配列)をこれらベクター

で用いて、本発明のDNA配列を発現させることができる。この種の有用な発現制御配列は、たとえばSV40もしくはアデノウィルスの早期および後期プロモータ、Lac系、trp系、TACもしくはTRC系、ファージλの主オペレータおよびプロモータ領域、fdコート蛋白の制御領域、3-ホスホグリセレートキナーゼもしくは他の糖分解酵素のプロモータ、酸ホスファターゼのプロモータ（たとえばPho5）、酵母α-接合因子のプロモータ、並びに原核性もしくは真核性細胞またはそのウィルスの遺伝子の発現を制御することが知られた他の配列、並びにその種々の組合せを包含する。

【0089】本発明のDNA配列を発現するには、広範な種類の単細胞宿主細胞も有用である。これらの宿主は周知の真核性および原核性宿主、たとえばイー・コリ、シュドモナス、バチルス、ストレプトミセス、真菌類（たとえば酵母）の菌株、並びに動物細胞、たとえばCHO、R1、B-WおよびL-M細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞（たとえばCOS1、COS7、BSC1、BSC40およびBMT10）、並びに組織培養における昆虫細胞（たとえばSf9）、ヒト細胞および植物細胞を包含する。

【0090】必ずしも全てのベクター、発現制御配列および宿主が本発明のDNA配列を同等に充分発現するよう機能するとは限らないことが了解されよう。さらに、必ずしも全ての宿主が同じ発現系により同等に機能するとき限らない。しかしながら当業者は、本発明の範囲を逸脱することなく、所望の発現を達成するよう無駄な実験なしに適切なベクター、発現制御配列および宿主を選択することができる。たとえば、ベクターを選択する際、ベクターが宿主中で機能せねばならないので、この宿主を考慮せねばならない。ベクターのコピー数、このコピー数を制御する能力、およびベクターによりコードされる任意の他の蛋白（たとえば抗生物質マーカー）の発現も考慮される。

【0091】発現制御配列を選択する際は、各種の因子が一般に考慮される。これらは、たとえば系の相対強度、その制御性および発現すべき特定のDNA配列もしくは遺伝子との適合性を包含し、特に有力な二次構造を考慮せねばならない。適する単細胞宿主は、たとえば選択されたベクターに対する相溶性、分泌特性、蛋白を正確に折重ねる能力、およびその発酵要求性、並びに発現すべきDNA配列によりコードされる生産物の宿主に対する毒性、さらに発現生産物の精製容易さを考慮して選択される。

【0092】これらおよび他の因子を考慮して、当業者は発酵または大規模の動物培養に際し本発明のDNA配列を発現する各種のベクター/発現制御配列/宿主の組合せを作成することができる。

【0093】ELAM1、VCAM1および1b、CDXおよびVLA4に対する抗体の存在は、他のELAM

およびELAMリガンドに関する他の分離方法を可能にする。この方法は、イディオタイプとして知られた抗体特性を利用する。各抗体は、抗原に対し特異性の独特な領域を有する。この領域をイディオタイプと称する。抗体自身は抗原決定子を有し、抗体のイディオタイプはその分子に独特な抗原決定子である。抗体で生物を免疫化することにより、イディオタイプを認識する抗体を含め、これらを認識する「抗-抗体」を生ぜしめることができる。他の抗体のイディオタイプを認識する抗体を抗-イジディオタイプ抗体と称する。或る種の抗-イジディオタイプ抗体は、抗体が認識する初期抗原の形状に類似すると共に、抗原の「内部イメージ」を有すると言われる[ケネディー、1986]。抗原がリガンドである場合、或る種の抗-イジディオタイプはそのリガンドリセプタに結合することができる。研究者等は、インシュリン、アンギオテンシンII、アデノシンI、β-アドレナリンおよびラット脳ニコチンのためのリセプタ並びに麻酔性リセプタに結合する抗-イジディオタイプを包含するこれら数種を同定した[カールソンおよびグラッド、1989]。

【0094】この現象を利用して、抗-イジディオタイプ抗体を用いることにより他のELAMおよびELAMリガンドを分離することができる。抗-イジディオタイプを用いて、初期抗原に結合する分子をスクリーニングすることができる。たとえば、この技術を用いて他のELAMリガンドを同定することができる。

【0095】同様なドメイン構造を有する関連ELAMが存在することを突き止めた（すなわちVCAM1およびVCAM1b）。遺伝子組換の結果、1個もしくはそれ以上のドメインを有する数種の付着分子を細胞表面上に存在させることができる。任意の共有ドメインを認識する抗-イジディオタイプ抗体は、ピオアッセイにより同定されないELAMもしくはELAMリガンドを免疫化学的に分離するのに有用であり、これは構造でなく蛋白の機能に依存する。

【0096】本発明を一層良好に理解しうよう、以下に実施例を示す。これら実施例は例示の目的であって、決して本発明の範囲を限定するものと解釈してはならない。

【0097】

【実施例】実施例I

ELAM配列について富化したcDNAサブライブラリの調製

次のようにして、ELAM配列について富化したcDNAサブライブラリを調製した：臍帯からヒト臍静脈内皮細胞（HUVES）を単離し、この細胞を予備培養で生育させ、ギムプロン（1976）に記載されたようにこれらを継代した。ライブラリ作成のため、4～5継代のHUVESを使用した。細胞を誘導してELAMsについてのmRNAを生産するため、群集モノレイヤを37で2.5時間、組換えヒトIL-1β（10単位

/ml)を用いてインキュベートした。これらの細胞からmRNAを単離し、当業界で周知の技術を使用してこれをcDNAに逆転写させた(グブラーとホフマン、1983)。標準的手順を使用し、次の配列を有するNotI-BstXIリンカ/アダプタに二本鎖cDNAを連結した:

5' GCG GCC GCT TTA GAG CAC A 3'
3' CGC CGG CGA AAT CTC 5'

その後、ブリアン・シードの手順により、ベックマン(登録商標)SW60ローター中で3時間50,000rpmで22℃にて、4.2ml5~20%酢酸カリウムグラジエント、2mMEDTA、1μg/mlエチジウムブロミドによりcDNAを大きさにより選択した(同様にマニアティスら、1982、第278頁参照)。500塩基対より大きいcDNA断片をプールした。その後ベクタ、pCDM8(ブリアン・シードより贈呈)を調製した。このプラスミドをBstXIにより消化した。400塩基対の近接断片を除去するため、この混合物を前記したように酢酸カリウムグラジエントにより遠心し、大きな断片を単離した。アガロースゲル電気泳動によりこの断片を更に精製した後、このcDNAをベクタと連結した。このようにして、誘導HUVECs中で発現されるmRNAについてのDNA配列を含有する組換えDNA分子を創製した。これらのプラスミドを使用してイー・コリMC1061P3を形質転換した。この結果、IL-1β誘導HUVECmRNAについてのcDNAライブラリからなる 7×10^6 組換えクローンのコレクションを得た。

【0098】このcDNAライブラリからELAMcDNA配列について富化したサブライブラリを調製するため、最初にELAM配列富化減算プローブを調製した。前記したように、IL-1βにより誘導したHUVECsからcDNAを調製し、これを ^{32}P によりラベルした(デービス、1986)。その後、誘導されなかったHUVECsからmRNAを単離した。未誘導cDNA配列を誘導配列から減算するため、mRNAとcDNAとをハイブリダイズさせ、デービス(1986)により記載されたようにして、mRNAにハイブリダイズしなかったcDNAを単離した。単離したcDNAを他のラウンドの減算に供し、富化のレベルを増加させた。結局、ELAM配列について富化された減算プローブの3つのバッチを調製した。

【0099】ノーザンプロットによりプローブの精製のレベルを試験した(レーラーら、1977)。誘導および未誘導HUVECsに由来するポリA+mRNAの平行レーンによりゲルを走らせ、これをジーン・スクリーン(登録商標)(ニュー・イングランド・ヌクレア)にプロットした。ハイブリダイゼーションおよび続くオートラジオグラフィにより、プローブは誘導レーン中で4kbのバンドに強固に結合したが、未誘導レーンではバ

ックグラウンドを越えた結合はしないことが明らかとなった。場合により、誘導レーン中の他のメッセージより弱いハイブリダイゼーションバンドを認めた。

【0100】減算プローブを使用し、IL-1β誘導配列について富化されたイー・コリMC1061P3中でcDNAライブラリを作成した。IL-1β誘導HUVECcDNAライブラリの百万のクローンをプレートアウトすることにより開始した。12.5μg/mlアンピシリンおよび7.5μg/mlテトラサイクリンを含有するLB寒天上で、ジーン・スクリーン・プラス(登録商標)フィルタ(ニュー・イングランド・ヌクレア)上に百万のコロニーをプレートし、これらを37℃で12時間生育させた。それぞれのマスターから2つのレブリカフィルタ(リフト)を作成した。12.5μg/mlアンピシリンおよび7.5μg/mlテトラサイクリンを含有するLB寒天上でこれらを4時間生育させ、250μg/mlクロラムフェニコールを含有するLB寒天上でこれらを16時間増幅した。製造業者の仕様書に従ってフィルタを溶解し、その後これらをブランク・スクリーン(登録商標)緩衝液(0.05Mトリス-HCl pH7.5、1MNaCl、1%SDS、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.2%ポリビニルピロリドン(PVP)、0.2%フィコール-400、0.2%BSA)中で予備ハイブリダイズした。10%硫酸デキストランおよび100μg/ml酵母tRNA並びに約 1×10^7 cpmの減算IL-1β誘導HUVECcDNAを含有する50mlのブランク・スクリーン(登録商標)緩衝液中で、フィルタを65℃で40時間ハイブリダイズさせた。その後、65℃にてブランク・スクリーン(登録商標)緩衝液で2回、 $2 \times \text{SSC}$ 、1%SDSで2回、そして $1 \times \text{SSC}$ 、1%SDSで2回フィルタを洗浄した。その後このフィルタを5日間フィルムに露呈した。

【0101】オートラジオグラフを用いてマスターフィルタをアニールし、滅菌した楊枝を用いてコロニーをフィルタから掻き取ることによりプローブにハイブリダイズするコロニーを選択した。それぞれの掻き取り物を96穴マイクロタイタプレート(1つの穴)に入れ、7.5μg/mlテトラサイクリンおよび12.5μg/mlアンピシリンを含有するLBブロスで満たした。接種後、マイクロタイタプレートを37℃で一夜インキュベートした。細胞が成育したならば、それぞれの穴に対し、最終濃度20%でグリセリンを添加し、プレートを-70℃で保存した。このようにして、マスターライブラリフィルタから864のELAM配列について富化したcDNAサブライブラリからなるコロニーを単離した。プレートする密度のため、富化したサブライブラリの全てのコロニーが純粋ではないことを銘記する。

【0102】富化したcDNAサブライブラリを用いて並列に2つのセットの手順を行った。

実施例IIE L A M 1 を発現するクローンの単離

第1の手順で、富化したサブライブラリからE L A M 1 を発現するクローンを単離した。このサブライブラリを選択して、高レベルの過渡的発現についてコンピテントなセルライン、アフリカミドリザルのセルラインC O S 7 に感染させた。この細胞をプレートし、スフェロプラスト融合(サンドリ・ゴールディンら、1981)によりサブライブラリを感染させた。感染後48時間に、H L - 60細胞(炎症剤により刺激された内皮細胞に結合 10 することが知られたセルライン)に結合する能力により、E L A M 1 の発現についてC O S 7 セルラインをアッセイした。

【0103】次のようにしてアッセイを行った：ブリーナンとパリッシュ法(ブリーナンとパリッシュ、1984)により、カルボキシフルオロセイン二酢酸を用いてH L - 60細胞をラベルした。すなわち、H L - 60細胞を 1×10^7 細胞/mlの濃度でR P M I / 10% F C S に再懸濁し、アセトン中の10mg/mlの保存溶液から0.1mg/mlの最終濃度でカルボキシフルオ 20 ロセイン二酢酸を添加した。室温で15分間ラベルしたH L - 60細胞と共にC O S 7細胞をインキュベートした。R P M I / 1% F C S により細胞を3~4回洗浄した。蛍光顕微鏡により付着性H L - 60細胞の群集についてペトリ皿を検査した。H L - 60細胞の群集を有する細胞プレートの領域を取り上げ、0.6% S D S、10mM E D T A、p H 8 中で溶解させた後、ヒルト(ヒルト、1967)の方法によりプラスミドを遊離させた。これらのプールのしたプラスミドを使用してイー・コリMC1061P3を形質転換した。これらの形質転換 30 体からコロニーを生育させ、C O S 7細胞を用い、続いてH L - 60付着についてのアッセイを用いて第2回のスフェロプラスト融合を行った。付着について陽性であった細胞の中から1つを選択し、これからプラスミドを単離した。このプラスミドE L A M p C D M 8クローン6を含有する培養物を選定した。このプラスミドを、ブタベスト条約により、イン・ビトロ・インターナショナル・インコ、611ピー・ハモンド・フェリー・アールディ、リンチカム、Md、21090(米国)に対し、1989年4月20日に寄託した。これは次のように同 40 定される：E L A M p C D M 8クローン6ノイー・コリMC1061P3受託番号I V I - 10204。

【0104】実施例IIIE L A M 1 配列についてのcDNA挿入物の単離

第2の手順で、I L - 1β誘導cDNA配列についてのcDNA挿入物を単離した。富化したライブラリの864のコロニーから24を無作為に選択し、マニアティスのアルカリ性ミニ調製手順を使用してこれらからプラスミドを単離した(マニアティス、1982)。X h o I またはN o t I によりプラスミドを消化し、1%アガロ 50

ースゲル上で断片を単離した。3kbを越える大きさの挿入物を有する2つのプラスミドをこのゲルから同定し、これらの挿入物を単離し、³²Pによりこれらをラベルした(フェインバーグとボーゲルスティン、1983および1984参照)。

【0105】その後これらの挿入物を用いてノーザンブロットを前記したようにして行った。両者の挿入物は、誘導H U V E C m R N A レーン中で4kbのバンドにハイブリダイズしたが、未誘導H U V E C m R N A レーンにはハイブリダイズしなかった。また、この挿入物は、E L A M 1 発現プラスミドE L A M p C D M 8クローン6(前記)に交叉ハイブリダイズした。これらの挿入物を、ウシ腸アルカリ性ホスファターゼにより処理したN o t I 消化p N N 11に挿入した。制限消化および新しい合成断片による置換により、市販のプラスミドp U C 8(ファルマシアP L バイオケミカルス)から合成ポリリンカを除去することにより、配列決定プラスミドp N N 11を作成した。複製開始点を与えアンピシリン耐性を与えるp U C プラスミドに共通の2.5kb骨格はそのまま残した。p N N 11の新しい合成部分を図2に示す。これらの新しい構成物をそれぞれp S Q 148およびp S Q 149と呼ぶ。

【0106】実施例IVE L A M 1 のDNA配列

プラスミドp S Q 148およびp S Q 149の挿入物の全DNA配列、およびE L A M p C D M 8クローン6の挿入物の5'末端の配列の624ヌクレオチドを決定した。マキシム・ギルバート法(マキシムとギルバート、1980)を使用した。これらの配列は顕著な重複を有するため、E L A M c D N A の複合配列、3863ヌクレオチドの配列を得た。この配列は、5'非翻訳領域の140ヌクレオチド、610アミノ酸をコードする1830ヌクレオチド、並びに3'非翻訳領域の1893ヌクレオチド(翻訳停止コドンおよびポリアデニル化シグナルを含む)よりなる。推論されたアミノ酸配列から誘導された成熟蛋白質をE L A M 1 とし、コード領域をE L A M 1 D N A 配列とした。E L A M 1 のcDNA配列を図1に示す。

【0107】ジーンバンク・データベース(解放58、1988年12月)の検索により、E L A M 1 のDNA配列は、公知のDNA配列とは顕著な相同性を有さないことが明らかになった。

【0108】このcDNA配列を使用してE L A M 1 アミノ酸配列を推論した。これも図1に示す。この配列の解析により、次の特性が明らかになった。この蛋白質は、シグナル配列に特徴的な疎水性N-末端配列を有する(フォン・ヘイジン、1986)。蛋白質配列決定では、シグナル開裂部位および成熟N-末端は決定しなかったが、フォン・ヘイジンによれば、成熟N-末端アミノ酸はトリプトファン、図1のヌクレオチド番号204

であると考えられる。ポリペプチドの外部ドメインは、シグナル配列を含む約554アミノ酸であり、この後に24アミノ酸の疎水性膜横断領域が続く。この蛋白質は、32アミノ酸の短い、荷電したサイトプラズム尾部を有する。この蛋白質はシステインに富み、11の可能なN-グリコシル化部位を含むことを銘記する。

【0109】ELAM1のアミノ酸配列とMBRFおよびNEW蛋白質データベースの他の蛋白質とを比較し、相補的C2前駆体、β-2糖蛋白質I、C4b結合蛋白質、相補的因子B、相補的因子H、ドロソフィラのノッチ蛋白質、IgEレセプタヘパチックレクチン、並びに凝集因子IXおよびX前駆体を含む幾つかの蛋白質との相同性を認めた。よって、前記した蛋白質との相同性に基き、ELAM1を少なくとも3つのドメインに分割することができる：(1)レクチン様ドメイン(図1のヌクレオチド204~563)、(2)EGF様ドメイン(ヌクレオチド564~668)、並びに(3)リピート当り6のシステイン残基を含有する59~63アミノ酸のコンセンサスシステインリピート単位(ヌクレオチド669~1793)。それぞれのリピート中の他の変化しないアミノ酸は、プロリン、グリシン並びにトリプトファンである。

【0110】実施例V

ELAM1を認識するモノクローナル抗体

ELAM1を認識するモノクローナル抗体を作成するため、実施例X(後記)で行ったものと主として同様にしてハイブリドマを調製した。ただし、IL-1β誘導HUVESsに対するHL-60細胞付着を遮断する能力について抗血清を試験することにより抗ELAM1抗体を生産するマウスを同定した。

【0111】幾つかのアッセイを使用し、これらの抗ELAM1モノクローナルを生産するものにつきこの様式で産生したハイブリドマを検索した。第1に、ELAM1を安定に発現するセルラインに結合する能力を有する抗体について、培養上澄を試験した。このセルラインは、ELAM1動物細胞発現ベクタ、pBG341jod・ELAM1により感染したCHO-DHFR⁻のラインとした。ELAM1をコードするDNA配列をpCDM8クローン6からpBG341・jodのNotI部位(実施例VIII、後記に記載)に導入することによりこのプラスミドを創製した。ELAM1発現CHO-DHFR⁻誘導セルラインは、HL-60細胞に対する付着アッセイを使用して検出した。

【0112】第2に、サイトカイン誘導HUVESsに結合する能力(コントロールには結合しない)についてハイブリドマ培養上澄を検索した。

【0113】第3に、サイトカイン誘導HUVESモノレイヤに対するHL-60細胞付着を阻害するこれらの能力につきこれらを試験した。

【0114】3つの全てのアッセイで陽性の結果を与え

た1つのハイブリドマクローン、BB11を同定した。BB11免疫沈殿蛋白質は、ELAM1発現HUVESsおよびCOS細胞に由来する約110kDおよび96kDの分子量を有し、ELAM1の種々のグリコシル化形態を示す(ベピラックラ、1989)。またこれは、ELAM1発現COSおよびCHO細胞に対するHL-60細胞の付着を完全に遮断した。これはIgG_{2b}クラスのイムノグロブリンを生産した。ブタペスト条約により、イン・ビトロ・インターナショナル・インコ、611ピー・ハモンド・フェリー・アールディ、リンチカム、Md、21090(米国)に対し、1989年12月13日に寄託した。これは次のように同定される：モノクローナル抗体CDB・BB11・BC6
受託番号IVI-10220。

【0115】実施例VI

VCAM1およびVCAM1bを発現するクローンの単離

更に、リンパ球およびリンパ球様セルラインに結合する2つの異なるELAMsの特徴を調べクローン化した。第1の工程として、4、24、または48時間、IL-1βまたはTNFにより誘導したHUVESsに対し、RAMOS、B-リンパ球様ライン、JURKAT、T-リンパ球様ラインの結合経路の特徴を調べた。RAMOSおよびJURKAT結合の両者は、IL-1βまたはTNFによる誘発の4時間後に最大となり、結合は24時間、誘発後48時間維持されることを認めた。RAMOS結合は温度感受性であり、室温では進行するが4℃では進行しなかった。JURKAT結合は4℃で減少したが、完全には除去されなかったため、JURKATは、温度感受性および温度非感受性の両者の成分を示した。JURKAT細胞により免疫したマウス由来の抗血清は、HUVESsに対するJURKATおよびRAMOS細胞の両者の結合を阻害し、RAMOSおよびJURKATがMILAを共有することを示した。誘発後4~48時間で、RAMOSおよびJURKATの両者は、ELAM1を発現するCOSまたはCHO細胞に結合せず、HUVESs上の少なくとも1つの他の誘導性ELAMの存在を示した。

【0116】HUVESsに結合するRAMOSおよびJURKATに含まれるELAMsを発現するクローンを単離するため、実施例II、前記に記載した方法により、先に記載したELAM富化HUVEScDNAサブライブラリを検索した。サブライブラリ感染COS7細胞と共に、カルボキシフルオレセイン二酢酸ラベルしたRAMOSおよびJURKAT細胞をインキュベートした。結合細胞の群集を有する細胞プレートの領域を取り出して溶解し、プラスミドを得、イー・コリに形質転換し、先に記載したようにCOS7細胞中で再アッセイした。再アッセイで陽性であった形質転換体に由来する個々の細菌コロニーからプラスミドを単離した。これらの

プラスミドをCOS7細胞に個々に感染させ、RAMOSおよびJURKATへの付着についての試験で陽性のプラスミドを同定した。このプラスミドからcDNA挿入物を摘出し、放射能ラベルし、レーラ(1979)の手順に従ってノーザンプロットのプローブとして使用した。このプローブは、長さ約3.4kbのRNA分子種にハイブリダイズした。このRNAは、未誘導HUV EC RNAにおいては検出できず、IL-1βによる処理の5、10、30または60分後にかろうじて検出することができたが、IL-1βによる処理の2、24、48並びに72時間後には十分に存在した。

【0117】プラスミドAMpCDM8クローン41を作成した。このプラスミドを、ブタペスト条約により、イン・ピトロ・インターナショナル・インコ、リンチカム、Md(米国)に対し、1989年5月24日に寄託した。これは次のように同定される：

AMpCDM8クローン41/イー・コリMC1061P3

受託番号IVI-10206。

【0118】また、他のVCAMからcDNAを単離した。AMpCDM8クローン41からラベルしたVCAM1コード挿入物を用いてIL-1β誘導HUV EC cDNAライブラリ(実施例I)を検索した。これらのクローンの1つである1E11を配列決定した。XbaIによる制限マッピングによる分析により、クローン41挿入物より長い幾つかのクローンを認めた。これらの1つのクローンである1E11を配列決定した。これを、ブタペスト条約により、イン・ピトロ・インターナショナル・インコ、リンチカム、Md(米国)に対し、1989年12月7日に寄託した。これは次のように同定される：VCAM1Bクローン1E11pCDM8/イー・コリMC1061p3受託番号IVI-10216。

【0119】また、他のELAMsについてのDNA配列を単離した。IL-1β誘発後48時間に渡りHUV ECsからmRNAを集めた。ELAM1およびVCAM1および1bについてcDNA配列を単離するのに使用したものと同様にしてELAMcDNA配列を単離し得る。

【0120】また、TNF、LT、LPS、インターフェロンのような他の炎症剤、またはこの種の薬剤の組合せを用いて誘発することにより他のELAMsを同定し得る。

【0121】実施例VII

VCAM1およびVCAM1bのDNA配列

マキサムとギルバート(1980)の方法により、プラスミドAMpCDM8クローン41の挿入物の全DNA配列を決定した。この配列は、106ヌクレオチドの5'非翻訳領域、1941ヌクレオチドをコードする647アミノ酸、並びに翻訳停止コドンを含む764ヌクレオチドの3'非翻訳領域よりなる。このcDNA配列

から誘導した蛋白質をVCAM1とし、コード配列をVCAM1DNA配列とした。図3にVCAM1のcDNA配列を示す。VCAM1の推定されるアミノ酸配列を同様に図3に示す。

【0122】また、マキサムとギルバート(1980)の方法により、プラスミドVCAM1bpCDM81E11の挿入物のDNA配列を決定した。この配列は、99ヌクレオチドの5'非翻訳領域、2217ヌクレオチドをコードする739アミノ酸、並びに翻訳停止コドンを含む764ヌクレオチドの3'非翻訳領域よりなる。cDNA配列から誘導された成熟蛋白質をVCAM1bとし、コード配列をVCAM1bDNA配列とした。cDNA配列および推定されたVCAM1bのアミノ酸配列を図4に示した。

【0123】VCAM1およびVCAM1bのDNAおよびアミノ酸配列の比較により、1つの有意な差以外は、これらは実質的に同一であることが明らかとなった。すなわち、VCAM1bは、コード領域の中間付近に276ヌクレオチドの挿入を含む。これらのヌクレオチドは、VCAM1ドメイン3の末端とVCAM1ドメイン4の開始部との間に位置する84アミノ酸の余分なドメインを形成する92の付加的なアミノ酸をコードする。VCAM1ドメイン3Bとしたこのドメインの意義を以下に論ずる。

【0124】配列の解析により次の特性が明らかとなった：VCAM1ポリペプチドは、シグナル配列(フォン・ヘイジン、1986)を特徴とする疎水性N-末端配列を有する。蛋白質配列決定では、シグナル開裂部位および成熟N-末端を決定しなかったが、ヘイジンにより、成熟蛋白質のN-末端アミノ酸は、図3のヌクレオチド番号179のフェニルアラニンと推定される。このポリペプチドの細胞外ドメインは、シグナル配列を含む約606アミノ酸であり、その後22アミノ酸の疎水性膜横断領域が続く。この蛋白質は、19アミノ酸からなる短い荷電したサイトプラズム尾部を有する。この蛋白質は、6の可能なN-グリコシル化部位を含有することを銘記する。

【0125】同様に、成熟VCAM1b蛋白質のN-末端アミノ酸はフェニルアラニンの筈であり、これは図4のヌクレオチド番号172である。このポリペプチドの細胞外ドメインはVCAM1より長く、シグナル配列を含む約698アミノ酸であり、この後に22アミノ酸の疎水性膜横断領域が続く。この蛋白質は、19アミノ酸の短い荷電したサイトプラズム尾部を有する。この蛋白質は7の可能なN-グリコシル化部位を含有することを銘記する。

【0126】VCAM1およびVCAM1bのアミノ酸配列とNBRFおよびNEW蛋白質データベース中の他の蛋白質とを比較することにより、非特異的交叉反応抗原(NCA)、胆汁糖蛋白質1(BG1)、神経細胞付

着分子(NCAM)、発癌胚抗原(CEA)、免疫グロブリン α 鎖一定領域、T細胞レセプタ(TCR) α および β 鎖変動領域、並びにミエリン関連糖蛋白質(MAG)を含む幾つかの蛋白質との顕著な相同性が明らかとなった。より少ない相同性が、ミオシン軽鎖キナーゼ、リブローズニリン酸カルボキシラーゼ、アデノウイルスE1A28K蛋白質、シウドウリジン合成酵素、並びにキシルロキナーゼについて認められる。VCAM1および1b並びにVCAM1および1bDNA配列は、先に記載したELAM1(前記)と全く相同性を示さず、こ

【0127】重要なことは、NCA、BG1、NCAM、CEA、MAG並びにTCRが免疫グロブリンスーパーファミリーの一員であることである(ウイリアムスとパークレイ、1988、フンカピラーとフッド、1989)。このファミリーの構成員は、イムノグロブリン(Ig)分子の基本構造単位、Ig相同単位に対して相同な1以上の領域の存在により特定される(フンカピラーとフッド、1989)。これらの単位は、長さ約70~110残基の一次アミノ酸配列を特徴とし、50~70残基に及ぶ実質的に変動しないジスルフィド架橋を有し、「抗体の折り畳み」と呼ばれる三次構造を確立する際に包含される幾つかの他の比較的保存された残基を有する。これらの単位は、更に3つの群に分割することができる。すなわち、V、C1およびC2(ウイリアムスとパークレイ、1988)、またはV、CおよびH(フンカピラーとフッド、1989)であり、内部システイン離間、 β 鎖の数、並びに保存残基の種類を含む種々の基準に基く。これらの基準を推論されたVCAM1の一次配列に適用すると、この配列を6のIg単位に分割することができ、これをドメイン1~6とすると、その全てはC2またはHサブセットとなり、それぞれ約100アミノ酸の長さである。図3に示すように、6のドメインの変動しないジスルフィド架橋は、システイン47および95(ドメイン1)、137および195(ドメイン2)、246および291(ドメイン3)、333および391(ドメイン4)、442および487(ドメイン5)並びに531および576(ドメイン6)の間に存在する。

【0128】前記したように、VCAM1bは7のドメインを有する。付加的なドメインをドメイン3Bとした。このドメインは、図4のヌクレオチド1027で開始しヌクレオチド1305で終了するVCAM1bの付加的な276ヌクレオチドに含まれる。ドメイン1~3に及ぶDNA配列は、ドメイン3B~5に及ぶDNA配列に対し72%相同である。ポリペプチドレベルでは、それぞれドメイン1および3B、2および4、並びに3および5の間に顕著な相同性がある。図5および図6に、VCAM1およびVCAM1bのドメイン構造を示す。

【0129】VCAM1およびVCAM1bのmRNAは2つの機構により生成し得る。これらは同一の遺伝子生成物の交互にスプライスされた形態を与えることができるか、別のVCAM対立遺伝子の生成物たり得る。これらの可能性の区別に供すべく、サイトカイン誘発後の異なる時点で、3つの個体からのVCAM1およびmRNAを試験した。3つの異なる個体由来する臍帯からHUVECsを調製し、緒のサンプルを#1、#2、並びに#3とラベルした。それぞれの調製物を4つの別のフラスコに分け、TNFによる0(未処理)、2.5、24並びに48時間の処理に供した。VCAM1およびVCAM1bmRNAの相対量は、ノーザンブロットおよびそれぞれの形態について特異的な合成オリゴヌクレオチドによるプローブによって決定した。VCAM1bは、3つの臍帯調製物の全てにおいて、明らかに主要な存在するmRNAであった。VCAM1は緒#1および#3に存在し、2.5時間の誘発時点で最も優勢であったが、緒#3VCAM1も24および48時間において存在した。緒#2細胞は殆どまたは全くVCAM1mRNAを有さなかったが、VCAM1bmRNAの量は、緒#1および#3に由来するHUVECs中のものと対比し得た。これらの2つの生成物が生成する機構はなお不明であるが、交互にスプライスされる可能性がある。2つのmRNAは、スプライス部位の可能性のある点において1つのドメインの欠損以外は同一であるためである。そのドメイン間の位置(フンカピラーとフッド、1989)およびスプライス部位に典型的なジヌクレオチドAGの存在(プレサナクとチャンボン、1981)により判断したものである。更に、交互スプライシングは、VCAM1が明らかに最も関連するIg遺伝子スーパーファミリーの他の構成員に共通である(フンカピラーとフッド、1989)。

【0130】作用的には、VCAM1の2つの形態の差異は最小であると考えられる。両者の形態は、COS7細胞中で過渡的に発現された場合、RAMOS細胞に結合し、この結合はMoab14B9により完全に阻害されたことから、同一のエピトープがそれぞれの場合の結合に関与することを示す。更に、このエピトープは、最初の3つのドメイン内に位置することを示したが、これは両者の形態に共通である(実施例VIII、前記参照)。

【0131】実施例VIII

組換え可溶性ELAM1およびVCAM1b

組換え可溶性ELAM1(rsELAM1)を発現するベクタを作成した。このベクタをpSAB108と呼ぶ。pSAB108により発現されるrsELAM1は、図1のヌクレオチド141~ヌクレオチド1970のDNA配列によりコードされるELAM1の細胞外ドメインの一部を含有する。

【0132】pSAB108を作成するため、第1にrsELAM1をコードするDNA断片を創製した。M1

uIおよびNotIによりELAMpCDM8クローン6を消化した。これにより、ELAM1をコードするDNA配列を含む3.8kbのDNA断片を得た。ウシ腸アルカリ性ホスファターゼ（実施例IIIに記載）により予め処理したNotI消化pNN11にこの断片をサブクローン化した。これをベクタpNNELAM1とした。

【0133】部位特異的変異誘発を使用し、ELAM1の膜横断および細胞内領域を除去した（ベデンとナサンズ、1982、カルデロンら、1982、オーストラ10 10ら、1983）。よって、pNNELAM1のサンプルをEcoRIにより消化し、大きい断片を単離した。ScaIによりpNNELAM1の他のサンプルを線状化した。その後、配列5' TGT GAA GCT CCCTAA ATT CCCを有するオリゴヌクレオチドを合成した。この配列がELAM1アンチセンス配列にハイブリダイズすると、これはヌクレオチド番号1790以降のELAM1 DNA配列に停止コドンおよびBamHI制限部位を導入する。モリナガラ（1984）およびチャンら（1984）の方法により、これらの320 20つの断片を使用してヘテロデュプレックスを創製した。クレニュー断片およびT4リガーゼを用いて一本鎖ギャップを埋め、混合物を使用してイー・コリMC1061を形質転換した。BamHI部位についてチェックすることにより得られたコロニーを検索し、変異誘発クローンを選択した。結果的に発現に際し、ポリペプチドの膜横断領域は除去され、C-末端アミノ酸はプロリンである。これをプラスミドpSAB100と呼ぶ。

【0134】その後AatIIおよびNcoIによりpSAB100を消化し、5.2kb断片を単離した。また、pNNELAM1をこれらの2つの酵素で消化し、1.4kb断片を単離した。NcoIは、ELAM1コード領域の中央付近で、図1のヌクレオチド927で切断する。これらの2つのDNA断片を連結し、プラスミドpSAB108とした。このように構成したのは、部位特異的変異誘発により、場合により分子の他の部分に変異が起こり、rsELAM1のコード領域中でのこの種の全ゆる変異を回避せんがためである。NotIによりpSAB108を消化し、3.8kb断片を単離した。この断片を、後記するようにして創製したpBG341.jodの7819bp断片に連結した。40 40

【0135】まず、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ベセスダ、Md（米国）からpSV2-DHFR、ATCC37146を得た（サブマニラ、1981）。これをApaIおよびEcoRIにより消化し、4420bp断片を単離した。その後、ApaIオーバーハングを有する合成二本鎖DNA配列、ヒトガストリン遺伝子（サトラ、1986、図4）のヌクレオチド+190～+233、XhoI部位およびEcoRIオーバーハングをコードするDNA配列を作成した。50 50

このオリゴヌクレオチドをpSV2-DHFRの4420bp断片に連結し、得られたプラスミドをpDT4と呼ぶこととした。AatIIおよびXhoIによりこのプラスミドを消化し、4391bp断片を単離した。

【0136】その後、AatIIおよびSalIによりミューラー阻害物質発現ベクタpD1（ケートら、1986）を開裂し、5462bp断片を単離した。この断片をpDT4の4391bp断片と連結してpJOD-10を作成した。

【0137】HindIIIおよびBstEIIによりpJOD-10を消化し、ミューラー阻害物質をコードしない大断片を単離した。断片末端を平滑末端とし、この末端にSalIリンカを連結し、ベクタを自己連結させた。これはpJOD-sを与えた。

【0138】その後AatIおよびNotIによりpJOD-sを消化し、6750bp断片を単離した。これを次のようにして創製したpBG341由来の1100bpNotI断片に連結した。

【0139】pBG312のSmaI部位（ケートら、1986）をNotI部位で置換することによりpBG341を創製した。BgIIIによりpBG312を線状化し、クレニューにより埋めることによりこの断片を平滑末端とし、これを自己連結させた。BamHIによりこのプラスミドを線状化し、再度平滑末端とし、これを自己連結させた。SmaIによりこのプラスミドを線状化し、配列5' GCGGCGCを有するNotIリンカを末端に連結した。得られたプラスミドをpBG341と呼ぶこととした。

【0140】AatIIおよびNotIによりpBG341を消化し、1100bp断片を単離した。この断片をpJOD-sの6750bp断片に連結した。得られたプラスミドをpBG341.jodと呼ぶこととした。このプラスミドは、SV40初期およびアデノウイルス主要後期プロモータを含有する。NotI部位にてプラスミドに挿入された遺伝子は、これらのいずれのプロモータからでも転写される。

【0141】その後、NotIによりpBG341.jodを線状化し、線状7819bp断片を単離した。これを、rsELAM1をコードするpSAB108の3.8kb断片に連結し、プラスミドpSAB110を作成した。

【0142】AatIIにより線状化したプラスミドpSAB110を用いてエレクトロポレーションによりCHO-DHFR⁻細胞に感染させた。20mMHEPES、pH7.05、137mM NaCl、5mM KCl、0.7mM Na₂HPO₄、並びに6mMデキストロース中で10⁷細胞/mlを使用し、20μgプラスミドおよび200μg超音波処理サケ精子DNAを用いて、270Vおよび960μFDにて、バイオラド（登録商標）ジーン・パルサーによりエレクトロポーレ

ーションを行った。感染後、選択培地、 α -MEM (500 nMメトトレキセートおよび10%透析FCSを含む) 中で細胞を培養した。コロニーを取り上げ、これらを96穴クラスタープレートにプレートし、モノクローナル抗体BB11を使用してrsELAM1発現細胞を検出した。10%ウシ胎児血清(FCS)を含む完全培地中で群集になるまで細胞を生育させた後、細胞がrsELAM1を生産する2%FCSを含む培地中でこれらを維持した。培地を回収し、3~4日毎に新鮮な2%血清によりこれを置換した。

【0143】このコンディショニングした培地から少なくとも95%純度にrsELAM1を単離した。これには、培地を濃縮し、プロテインAセファロースに共有結合した(シュナイダーら、1982)Moab BB11を用いてこれを一夜インキュベートすることが包含される。その後PBSによりこの樹脂を洗浄し、未結合蛋白質を除去し、0.1Mグリシン、pH2.7により結合物質を溶出させ、溶出物をリン酸ナトリウムで中和し、これをPBSに対して透析した。PBS中でのプロテインAセファロースによるクロマトグラフィにより、rsELAM1を更に精製した。

【0144】次のアッセイを使用し、rsELAM1を生産したことを示す。直径6cmの細菌用プラスチック(例えばファルコン#1007、登録商標)のペトリ皿に、2.5mlの50mMトリス緩衝液、pH9.5を添加した。これに10 μ gの純粋なrsELAM1を添加した。このプレートを室温で60分間インキュベートし、rsELAM1をプレートに結合させた。その後培地を吸引し、10mg/mlウシ血清アルブミンを含むPBSによりこれを置換した。この溶液中でプレートを一夜4でインキュベートし、プレート上の残留する蛋白質結合部位をブロックした。プレートを室温に加熱し、10%ウシ胎児血清を含む培地によりこれらを洗浄し、2mlの細胞(2×10^6 ml⁻¹)を用いて20分間これらをインキュベートした。培地を吸引し、3mlのそれぞれの培地(10%血清を有するRPMI 1640)によりプレートを2回洗浄した。その後顕微鏡によりプレートを検定した。

【0145】HL-60細胞のようなELAM1に結合する細胞は、rsELAM1被覆プレートに結合することを認めたが、例えばBセルラインRAMOSのようなELAM1に結合しない細胞はこれらのプレートに結合しないことを認めた。

【0146】更に、特異的Moab BB11はrsELAM1被覆プレートに対するHL-60細胞の結合を遮断することを認めた。また、これらの結果はまず、rsELAM1が生産され、次にELAM1のように、rsELAM1は白血球に結合する能力を有することを示す。

【0147】また、組換え可溶性VCAM1b(rsV

CAM1b)を発現するベクタを作成した。このベクタをpBN1006と命名した。pBN1006により発現されるrsVCAM1bは、図4に示すDNA配列のヌクレオチド107~ヌクレオチド2193によりコードされるVCAM1bの細胞外ドメインの一部を含有する。

【0148】可溶性VCAM1bの全長を構成的に発現し得るセルラインを作成するため、まずアデノウイルス主要後期プロモータの下流の独特のNotI部位を有するpJOD-sからベクタを作成し、発現ベクタへのNotI断片の挿入を図った。プラスミドDNAのNotI開裂によりpJOD-sを線状化した。突出する5'末端をマング・ビーン・ヌクレアーゼを使用して平滑末端とし、線状化したDNA断片を、低融点アガロース(LMA)ゲル電気泳動により精製した。T4DNAリガーゼを使用してDNA断片を再連結した。その後連結した分子をイー・コリJA221(ATCC受託番号33875)に形質転換した。NotI部位の非存在についてコロニーを検索した。得られたベクタをpJOD-sデルタNot1とした。pJOD-sデルタNot1をSalIを使用して線状化し、ウシ腸アルカリ性ホスファターゼを使用して5'末端を脱リン酸化した。LMAゲル電気泳動により線状化したDNA断片を精製し、ホスホリル化オリゴヌクレオチドACE175(5'pTCGACGCGGCCGCG)の存在下に連結した。連結混合物をイー・コリJA221に形質転換し、NotI部位の存在についてコロニーを検索した。合致するプラスミドをpMDR901と命名した。

【0149】AluIによる消化によりヌクレオチド2193でVCAM1bクローン1E11を縮めることにより、可溶性VCAM1bを得、これにより膜横断および細胞内部分並びに3'非翻訳領域を除去した。停止コドン-NotIリンカを添加し、挿入物をpCDM8に再連結した。NotIによりpCDM8から挿入物を切り取り、NotI部位でpMDR901に連結した。この構成物をpBN1006としたが、これは図4に示すようにアミノ酸1~698を有する可溶性VCAM1bの全長をコードする。

【0150】先に記載した材料および方法を使用し、前記したrsELAM1およびrsVCAM1b分子の縮めた形態を発現するプラスミドを同様に作成した。これらの縮めた形態は、ELAM1およびVCAM1bの細胞外領域の1以上の特定のドメインのアミノ酸配列からなり、これを使用していずれのドメインが細胞-細胞付着に直接関与するかを検討した。最初の実験では、これらの分子に対する抗体、すなわちそれぞれ抗体BB11および4B9により認識されるELAM1およびVCAM1および1bのドメインを検討した。

【0151】CH101とした可溶性ELAM1構成物を調製した。これはELAM1のレクチン様ドメインか

らなる。図1を参照すると、CH101は、ヌクレオチド1～557(ELAM1のアミノ酸1～139をコードする)および停止コドンを含むcDNA配列の発現生成物であった。CH102とした他の可溶性構成物を調製した。これはレクチン様ドメインおよびELAM1のEGF様ドメインからなる。図1を参照すると、CH102は、ヌクレオチド1～671(ELAM1のアミノ酸1～177をコードする)および停止コドンを含むcDNA配列の発現生成物であった。可溶性ELAM1構成物CH102は、抗ELAM1モノクローナル抗体、BB11を免疫沈澱させることが認められた。

【0152】次の可溶性VCAM1および1b構成物を同様に調製した：(A)ドメイン1(アミノ酸1～108をコードする図3のヌクレオチド1～430)、(B)ドメイン1+ドメイン2(アミノ酸1～217をコードする図3のヌクレオチド1～757)、(C)ドメイン1+ドメイン2+ドメイン3(アミノ酸1～310をコードする図3のヌクレオチド1～1036)、(D)ドメイン1+ドメイン2+ドメイン3(VCAM1とVCAM1bcDNAとのハイブリッド、図4に示すアミノ酸1～317をコードする)、(E)可溶性VCAM1の全長(図3のヌクレオチド1～1924、アミノ酸1～606をコードする)、並びに(F)可溶性VCAM1bの全長(図4のヌクレオチド1～2193、アミノ酸1～698をコードする)。

【0153】前記したVCAM1構成物の内、B、C、D、E並びにF(Aを除く)は、抗VCAM1抗体4B9と免疫沈澱する。また、構成物B、D、E並びにFは、細胞吸着に機能的な蛋白質を生産することが認められた。構成物B、D、E並びにFによりコードされる蛋白質を含有するコンディショニング培地を濃縮し、固定化4B9抗体の免疫アフィニティカラムを通し、結合した蛋白質を溶出させ、rsELAM1について記載したように中和した。rsELAM1について記載したように溶出蛋白質をプラスチックに固定化し、RAMOSおよびJURKAT細胞の支持体特異的付着を認めた。これらの結果は、VCAM1の最初の2つのドメインは、所定のVLA4発現ヒトリンパ球セルラインの付着を支持するのに十分であることを示す。

【0154】実施例IX

ELAM1およびVCAM1プロモータの単離

ELAM1およびVCAM1遺伝子について染色体クローンを単離し特徴を調べた。ELAM1クローンを次のようにして単離した。

【0155】プローブとして全ELAMPcDM8クローン6挿入物またはその5'末端から400塩基対断片を選択した。ランダム・プライミングによりこれらの分子を32Pラベルした。その後、ELAMcDNAプローブを用いてヒト染色体EMBL3ライブラリを検索した。ライブラリから染色体ELAM1クローンを単離し

て特徴を調べ、これをEL1-07とした。これは、ELAM1の転写プロモータを含む15kbの5'フランク配列および遺伝子の5'末端の約100塩基対のコード領域を含む。現在の知識によれば、誘導についての関連する制御配列は、このファージクローンにより示されるDNA配列内に含まれることが示唆されている(レオナルドとバルチモア、1989)。840bpの5'フランク配列および720bpのELAM1遺伝子の5'末端を含む領域の配列決定を行った(最初の2つのエクソン、最初のイントロン並びに第2イントロンの一部を含む)。この配列を図7に示す。5'フランク領域は、TATAAAおよびCAAT配列を含む古典的なプロモータ構造を示す。またこれは、転写の推定開始から約95塩基対上流の配列GGGGATTTCCを含む。この配列は、ヒトκ免疫グロブリン(Ig)遺伝子エンハンサに認められるものと同一のNF-κB結合配列である。NF-κBは、炎症および免疫応答に関連する多数の遺伝子(例えば免疫グロブリン、インターロイキン-2レセプタ、並びにβ-インターフェロン、その他)の転写を刺激することが知られた、または推定された誘導性DNA結合蛋白質である。これは、ELAM1、VCAM1並びにICAM1の生産を刺激することが知られた同一のインデューサであるTNF、IL-1並びにLPSにより活性化され得る(レナルドとバルチモア、1989、オスボーンら、1989)。NF-κBDNA結合活性は、IL-1およびTNFにより内皮細胞中で刺激されることを示したが、ここでは、内皮および他の種類の細胞中にプロモータ/レセプタ遺伝子構成物を感染させることにより、ELAM1プロモータからの誘導性転写に必要な最少のDNA配列の特定を行った。

【0156】ブダベスト条約により、イン・ビトロ・インターナショナル・インコ、リンチカム、Md(米国)に対し、1989年12月7日にクローンEL1-07を寄託した。これは次のように同定される：

EL1-07

受託番号IVI-10218。

【0157】VCAM1cDNAの5'末端に相同の³²Pラベルした30塩基オリゴマープローブを用いて前記EMBL3ヒト染色体ライブラリをプローブすることにより、VCAM1遺伝子を示すEMBL3染色体クローンを単離した。このクローンをVC1-16とし、これをブダベスト条約により、イン・ビトロ・インターナショナル・インコ、リンチカム、Md(米国)に対し、1989年12月7日に寄託した。これは次のように同定される：

VC1-16

受託番号IVI-10217。

【0158】VCAM1遺伝子の約300bpの5'フランク配列および900bpの5'末端を含む領域を配列決定した(第1エクソン、第1イントロン、並びに第

2 エクソンの一部を含む)。この配列を図8に示す。
5' フランク配列は、古典的なTATAA配列および
2つのNF- κ Bコンセンサス配列：転写開始から約
63～54からのセンス鎖上のAGGGATTTTC
C、および約69～78からの逆相補鎖上のGGG
GAAACCCを有する。この配列は、ELAM1プロ
モータ配列について提唱したものと類似する検討に使用
し得る。

【0159】実施例X

抗体認識CDX

CDX、ELAM1媒介付着に關与するMILAを単離
した。最初の工程として、白血球細胞表面上で抗原を認
識し、白血球-内皮細胞結合を妨害するモノクローナル
抗体を調製した。これらのモノクローナルが認識する抗
原がELAM1媒介付着に關与することを確認するた
め、ELAM1媒介結合が排他的な細胞-細胞結合経路
である系でモノクローナルを試験した。

【0160】1. CDXに対するモノクローナル抗体の 調製および分析

a. 付着アッセイ

白血球-内皮細胞結合を阻害するMoabsを同定する
ため、内皮細胞-白血球付着を検出する改良したアッセ
イを開発した。HL-60細胞およびHUVECsを使用
してこのアッセイを行った。MILAを発現するい
ずれかのセルラインを使用し、ELAMを発現するい
ずれかのセルラインを用いて、この種のアッセイを行う
ことができるのは明らかであろう。48穴組織培養プレ
ート中で、HUVECsを群集に生育させた(8×10^4 細胞/穴)。RPMI/1%FCSにより細胞を1回洗
浄し、それぞれの穴に対して13U/mlのIL-1 β により0.5mlのRPMI/1%FCSを添加した(コ
ントロールの穴を除く)。これらの細胞を37℃で4時
間インキュベートした。使用の直前にこれらをRPMI
/1%FCSにより1回洗浄した。アッセイに使用した
HL-60細胞を1 μ Ci/mlの 35 S-メチオニンに
より一夜ラベルした。これらの細胞を1回洗浄した後、
これらを 5×10^6 細胞/mlでRPMI/1%FCS
中に再懸濁した。100 μ lのHL-60細胞を取り、
50 μ lのMoab(1 μ g/ml)を用いて0℃で3
0分間これらをインキュベートした。その後それぞれの
穴に対して150 μ lのHUVECsを添加した。20
分間細胞を結合させた後、RPMI/1%FCS
を用いて穴を穏やかに1回洗浄した。RPMI/1%
FCSにより穴を満たし、プレートを封止し、これらを
反転させ、500 $\times$ gで2分間これらを遠心した。培地
を除去し、PBS⁺により更に2回穴を洗浄した(PBS⁺
は、Ca⁺⁺を含有せず、Mg⁺⁺を含有しないPBS
である)。200 μ lの0.2N NaOH/1%SDS
によりそれぞれの穴中で細胞を可溶化し、4.5mlの
シンチラント(レディ・プロテイン、ベックマン)を添

加し、シンチレーション・カウンタでカウントすること
により、HUVECsに結合したHL-60細胞の数を
測定した。

【0161】b. ハイブリドーマの調製

CDXに対するモノクローナル抗体を作成するため、次
のようにしてハイブリドーマを調製した。全体の生きた
HL-60細胞を用いてBALB/Cマウスを注射し
た。最初に、それぞれのマウスは腹腔内(IP)にPBS⁺
中の 2×10^7 細胞を受けた。2～24時間後に異
なる部位にて腹腔内に完全フレンドアジュバントを注射
した。6週間に渡り、2週間毎に 2×10^7 細胞IPに
よりマウスを補助装薬した。融合4日前に、マウスに対
し静脈内に 5×10^6 細胞、IPにより 5×10^6 細胞
を注射した。

【0162】前記した付着アッセイによりIL-1 β 刺
激HUVECsに対するHL-60細胞の結合を阻害す
る能力についてこれらの動物からの免疫血清を試験し
た。第3回の補助装薬後に免疫血清は試験の結果陽性と
なり、免疫した動物の脾臓細胞からのハイブリドーマ生
産を続けた。当業界で標準的な様式(ゴディング、19
83参照)で、脾臓細胞とミエローマ細胞との融合を行
った。

【0163】前記した付着アッセイを使用し、IL-1
 β 誘導HUVECsに対するHL-60細胞の結合を阻
害するモノクローナル抗体を生産するものについてハイ
ブリドーマを検索した。このようにして、CDXを認識
するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを同
定した。これらのハイブリドーマの5つを使用して腹水
液を生産した。SGB₃B₄としたこれらの1つを、ブ
ダペスト条約により、イン・ビトロ・インターナシヨナ
ル・インコ、リンチカム、Md(米国)に対し、198
9年4月25日に寄託した。これは次のように同定され
る：

SGB₃B₄

受託番号IVI-10205。

【0164】c. FACS分析

いずれの種類の細胞に対してこのモノクローナルが結合
するかを同定するため、FACS分析を行った。これ
は、 2×10^5 細胞を取り、PBS⁺によりこれらを1
回洗浄し、その後25 μ lのRPMI、1%FCS、
0.1mg/mlヒトIgG、並びに0.1%アジ化ナ
トリウム中で0℃にて10分間インキュベートすること
によりFcレセプタを遮断することを含む。その後抗体
(1 μ g/mlで25 μ l)を添加し、細胞を0℃で3
0分間インキュベートした。250 $\times$ gで5分間細胞を
遠心し、緩衝液A(PBS⁺、5%FCS、0.1%ア
ザイド)によりこれらを2回洗浄し、0.1mg/ml
ヒトIgGを含有する25 μ lの緩衝液Aにこれらを再
懸濁した。フルオレセイン共役抗マウスIgG(緩衝液
A中に5 μ g/mlで25 μ l)(キャベル)を添加

し、混合物を0 で30分間インキュベートした。細胞を遠心し、これらを緩衝液Aにより1回洗浄し、これらを250 μ lの緩衝液Aに再懸濁した。その後、ベクトン・ディキンソンFACSター・セルソーターによりこれらを分析した。

【0165】主としてHL-60細胞-HUVEC付着アッセイについて記載したように、ELAM1発現COS細胞により細胞結合の検討を行った。

【0166】2. ハイブリドーマSGB₃B₄は、CDXを認識するモノクローナル抗体を生産することの説明 10
ELAM1媒介結合に関与するMILA(特にCDX)について、ハイブリドーマSGB₃B₄由来のモノクローナルの特異的認識を示す証拠たる幾つかのラインを開発した。

【0167】第1に、 α -CDX抗体は、CDXを発現する細胞のELAM1発現細胞への結合を阻害する筈である。付着アッセイを使用し、これらのモノクローナルが、IL-1 β 誘導HUVECsおよびELAM1発現COS7細胞に対するHL-60細胞およびPMNsの結合を実際に阻害することを示す。60.3、 β_2 イン 20
テグリン鎖に対するモノクローナル抗体の存在下では、ELAM1発現COS7細胞中で利用されるHL-60細胞およびPMNsに対する唯一の結合経路はELAM1自体である。したがって、この系における細胞-細胞付着の抗体阻害は、CDXを経由するELAM1経路を介する必要がある。

【0168】第2に、 α -CDXモノクローナルは、付着アッセイにおいてELAM1発現細胞に結合するこれらの細胞を認識する筈であるが、このアッセイにおいてELAM1に結合しないこれらの細胞を認識しない筈 30
である。FACS分析を使用し、このMoabsの結合パターンを決定した。これらのモノクローナルは次の種類の細胞に結合した: HL-60、U937、HT-29、THP-1、SW620、SW948、SW1417、単球、エオジン好性細胞、並びにPMNs。これらは次の細胞には結合しなかった: RAJI、DAUDI、RAMOS、HeLa、またはJY。(末梢血液白血球を分画することにより非形質転換細胞を単離した。)これらの結合パターンは、これらの細胞のELAM1発現COS7細胞およびrsELAM1被覆プレー 40
トに対する結合と正確に平行したものである。

【0169】第3に、 α -CDXモノクローナルは、LFA-1、LFA-3、CD44、ICAM1並びにCD4のような他の白血球細胞表面抗原に対するモノクローナルとは異なる認識パターンを示す筈である。実際、ここで考える他のモノクローナルには、本発明の抗体と同じ細胞認識パターンを示すものはない。

【0170】要は、ハイブリドーマSGB₃B₄により、およびここで単離した他のハイブリドーマにより生産されるモノクローナルがCDXを認識することは明ら 50

かである。最終的に、これらのモノクローナルを使用し、CDX自体を単離した。

【0171】実施例XI

CDXの単離

1. HL-60細胞表面蛋白質のヨウ素化

PBS⁺により1 $\times$ 10⁷HL-60細胞を3回洗浄し、これらを0.5mlPBS⁺に再懸濁し、50 μ gの1,3,4,6-テトラクロロ-3 α ,6 α -ジフェニルグリコウリル(シグマ・ケミカルズ社)により被覆したチューブにこれらを添加した。これに1mCi¹²⁵Iを添加した。この混合物を0 で30分間インキュベートした。ラベルした細胞を10mlのRPMI/10%FCSを含有するチューブに移し、1000 $\times$ gで5分間これらを遠心した。その後これらを最初に別の10mlのRPMI/10%FCSにより、次に2mlのPBS⁺により洗浄した。(また、³⁵S-メチオニンまたは³⁵S-システインを用いて細胞を代謝的にラベルした。)1%NP40、2mMPMSF、1mMEDTA、大豆トリプシンインヒビタ(50mg/ml)並びにロイペプチン(1mM)(シグマ・ケミカルズ社)を含有する1.0mlのPBS⁺の添加により細胞を溶解した。その後これらを0 で30分間インキュベートした。溶解物を10分間10,000 $\times$ gで遠心して粒子物を除去した。10 μ gのウサギ抗マウスIgM(ジャクソン・イムノ・リサーチ・ラブス)および50 μ lの蛋白質Aセファロース(ジムド、2mg蛋白質A/ml)を用いて、0 で2時間、ラベルした可溶性膜蛋白質を含有する上澄を予備清澄化した。溶解物を4 で保存した。

【0172】2. CDXの免疫沈殿

Moabsを使用してこれを免疫沈殿させるべく他のラベルした蛋白質からCDXを精製した。次のようにして免疫沈殿を行った。

【0173】10 λ のARXビーズを用いて4 で2時間予備清澄化した溶解物(50~100 μ l)をインキュベートした。0.75%NP40、0.2%DOC、並びに1mMEDTAを含有する2mlのPBS⁺によりセファロースを4回洗浄した。その後、ARXビーズを非還元性SDSサンプル緩衝液に再懸濁した。このサンプルを85 で10分間加熱し、上澄を除去した。これに β -MEを5%添加し、5分間加熱し、10%SDSポリアクリルアミドゲル上で分子を分離した。ゲルを乾燥し、これをオートラジオグラフにかけた。

【0174】CDXは、約150kDの分子量を有する単一の拡散バンドとしてオートラジオグラフ上に現れた。

【0175】実施例XII

CDXを発現するクローンの単離

実施例Iの一般の手順に従い、2つの種類のCDX発現細胞、HL-60細胞およびU937細胞に由来するp

CDM8ベクタ中の2つのcDNAライブラリを調製した。その後、最初に1μグラムのHL-60ポリA+mRNA由来の³²PラベルcDNAプローブを創製することにより富化したCDX cDNAライブラリを調製し、その後HeLa細胞由来の30μグラムのポリA+mRNA（これはCDXを発現しない）とハイブリダイズすることによりプローブから非CDX cDNA配列を減算した（デービス、1986参照）。減算プローブを使用してイー・コリMC1061P3中でHL-60細胞から富化したサブライブラリを創製し、22の96穴プレート中で約2100クローンを生育させた。V937富化CDXサブライブラリを同様の様式で調製し、1400のクローンを得た。

【0176】実施例IIの一般的手順に従い、スフェロプラスト融合によりCOS7細胞の感染についてコロニーを22のプールに分割した。シードとアルファ（1987）の方法により、ハイブリドーマSGC2E5（実施例Xで単離）からα-CDXモノクローナル抗体を選別することによりCDX発現について感染COS7細胞をアッセイした。アッセイの結果プール#7は陽性であり、2.1kbcDNA挿入物を有する2つのクローンを生成し、これを7.1および7.2とした。

【0177】配列決定ベクタpNN11にサブクローン化したCDX pCDM8クローン7.2および7.2挿入物の一部から、マキサムとギルバート技術（1980）によりCDXのDNA配列を得た。後者のプラスミドをpSQ219とした。得られたDNA配列を図9に示す。

【0178】ブダベスト条約により、イン・ビトロ・インターナショナル・インコ、611P、ハモンド・フェリー Rd、リンチカム、Md（米国）に対し、1990年4月26日にプラスミドCDX pCDM8クローン7.2を含有する培養物を寄託した。これは次のように同定される：

CDX pCDM8 / イー・コリMC1061P3
受託番号IVI-10242。

【0179】また、CDXクローン7.1および7.2をCOS7細胞に感染させ、CDXの発現を確認した。感染後48時間で、これらの細胞は、FACSによるアッセイによりα-CDX抗体が結合するその細胞表面で蛋白質を発現した。この細胞表面蛋白質は¹²⁵Iによりラベルすることができ、免疫沈殿した。免疫沈殿したダブレットのみかけの分子量は約125kDだった。また、CDX発現COS7.2はrsELAM1により被覆したセファロースビーズの周囲にロゼットを形成し、このロゼット形成は陽イオン依存性であり、BB11（抗ELAM1抗体）により阻害され、更にpCDM8単独（挿入されたCDX遺伝子を有さない）により感染したCOS細胞は、rsELAM1ビーズにロゼット形成しなかった。また、COS7.2細胞は、ウシ血清ア

ルブミンにより被覆したビーズにロゼット形成しなかった。前記した事実は全てCDXがELAM1についてのリガンドであることを示す。

【0180】CDXの推論されたアミノ酸配列の一次分析により、405アミノ酸部分（図9のヌクレオチド66~1280）が示された。UWGCG配列回折ソフトウェアパッケージ（バージョン6.1、1989年8月）を使用し、他の蛋白質との相同性につきプログラムFASTAを使用してNBRF蛋白質データベース（解放23、1989年12月）を検索した。また、TFASTAを使用して、ゲンバンク（解放63、1990年3月）およびEMBL（解放19、1989年5月）を検索した。これらの検索で、ヘルペス・シンプレックス・ウイルス・タイプ1、デングウイルス、黄熱および他のフラビウイルスを含む所定のウイルスエンベロープ蛋白質に対して相同の短い領域（例えば約23アミノ酸）を認めた。一般に、公知の蛋白質に対する相同性は低く、CDXは新規な蛋白質であると結論した。

【0181】実施例XIII

VCAM1のMILAsを認識する抗体

全JURKAT細胞により免疫した3匹のマウスからポリクローナル抗血清を得た。1つのマウス由来の血清は、室温で4時間誘導HUVESに対するRAMOSおよびJURKAT結合の両者を完全に阻害した。他の2つのマウス由来の血清はRAMOSを完全に阻害したが、同様の条件下でJURKAT結合を部分的に阻害するのみであった。これらのデータは、RAMOSおよびJURKATはMILAを共有し、JURKATはRAMOSにより共有されていない少なくとも1つの他のMILAを阻害することを示す。

【0182】リンパ球MILAsに単するMoabsを調製するため、全生存RAMOSおよびJURKAT細胞に対してマウスを免疫し、前記実施例VIIIに記載した様式にて、JURKAT免疫マウス由来の脾臓細胞とミエロマ細胞との融合を行った。CDXに対するモノクローナル抗体を得るのに成功裡に使用した実施例VIIに記載した方法により、得られたハイブリドーマを検索した。現在まで、TNFにより24時間処理したHUVESに対するRAMOS付着を阻害する約260のハイブリドーマをコンディショニングした培地から検索した。約25のハイブリドーマが付着の一貫した部分的阻害を示し、現在これらは再検索のためサブクローン化されている。この種の抗体は、リンパ球MILAsの単離およびクローン化の両者に使用することができる。

【0183】実施例XIV

VLA4がVCAM1リガンドである証拠

本発明者および協力者は、VLA4はVCAM1のリガンドであり、VLA4はVCAM1およびフィブロネクチンに対する別の結合部位を有することを示す幾つかの検討を行った。

【0184】最初に、VLA4のサブユニットに対するモノクローナル抗体は、活性化HUVECsおよびVCAM1により感染したCOS細胞に対するVLA4発現細胞の付着を阻害することを示した。VLA4は、サブユニット β_1 および α^4 から構成される(ヘムラー、1988)。 β_1 に対するB1E11としたモノクローナル抗体、およびヤギ抗 β_1 ヘテロ抗血清は、活性化HUVECsおよび感染COS細胞に対するRAMOS細胞の付着を完全に阻害することを認めた。対照の抗体は付着を阻害しなかった。更に、HP2/1とした α^4 サブユニットに対するモノクローナル抗体は、同様にこれらの細胞に対するRAMOSの付着を遮断した。同様に、これらの抗体は、VLA4発現Tリンパ芽球セルラインHPB-ALLの付着を阻害した。

【0185】次に、本来VLA4を発現しない細胞を α^4 により感染することにより、これらをVCAM1発現細胞に結合させることが可能なことを示す。2つのセットのK-562赤白血病細胞を感染させた。1つのセットは、 α^4 をコードするcDNAを用いて感染させた(タカダら、1989)。他は、VLA4の一部ではない α^2 を用いて感染させた(タカダとヘムラー、1989)。 α^4 により感染したK-562細胞は、かくしてVCAM1感染COS細胞またはTNF活性化HUVECsのモノレイヤに結合することが可能となったが、親K-562細胞およびK-562 α^2 感染細胞は可能ではなかったことを示した。更に、 α^4 または β_1 に対するモノクローナル抗体は、これらのVCAM1発現細胞に対する α^4 感染K-562細胞(これは通常は β_1 サブユニットを発現する)の付着を排除した。

【0186】最近の検討により、VLA4は、FNCS-1部位を介してヒトプラズマフィブロネクチン(FN)に対する細胞付着を媒介することが示された(ワイナーら、1989)。VCAM1に対するVLA4結合部位は、FNに対するその結合部位とは異なることを示した。最初に、RAMOS細胞または α^4 感染K-562細胞とFN-40(可溶性FN断片)との予備インキュベーションにより、FN-40とのその結合が阻害されるが、VCAM1感染COS細胞またはTNF α 活性化HUVECsとでは阻害されないことを認めた。次に、VLA4、HP1/3に対するモノクローナルは、感染COS細胞または活性化HUVECsに対するこれらの細胞の結合を阻害するが、FN-40に対しては阻害しないことを認めた。

【0187】実施例XV

阻害剤検索

合成有機化学物質、天然発酵生成物、ペプチド等のような可能な阻害剤を検索する3つの基本的な付着アッセイにおいて、ELAMsおよびそのリガンドを使用することができる。

【0188】1. 細胞-細胞付着アッセイ

第1のアッセイにより、細胞-細胞付着を阻害する分子の能力を試験し得る。このアッセイは、96穴マイクロタイタプレート中で行うことができる。最初に、例えば実施例Vに記載したように、ELAMを安定に発現するセルラインを創製する。その後、これらの細胞をプレートアウトし、HL-60細胞を添加する。阻害剤は、ELAM発現細胞に対するHL-60結合を阻害するその能力により同定する。ELAMリガンドに対するモノクローナル抗体を検索する際に記載したのと全く同様にアッセイを行い得る。

【0189】2. 細胞付着蛋白質アッセイ

第2のアッセイにより、ELAM自体に対する細胞結合を阻害する低分子の能力を試験し得る。96穴マイクロタイタプレートで行うrsELAM1によるこの種のアッセイを開発した。細菌性プラスチックからなるこれらのプレート(例えば、リンプロ/タイタテック#76-232-05、登録商標)を、50 μ lの15mM炭酸ナトリウム/35mM重炭酸ナトリウム、pH9.2中の穴当たり0.5 μ gのrsELAM1により、4で一夜インキュベートする。その後10mg/mlのウシ血清アルブミンを含有するPBSによりこのプレートを室温で1時間ブロックし、その後例えば穴当たり50 μ lのHL-60細胞、 2×10^6 /mlを使用し、実施例VIIに記載したようにして付着アッセイを行う。これらの条件下で、HL-60細胞はrsELAM1に良好に結合し、検索に便利なマイクロアッセイを提供する。プレートに対するHL-60結合を阻害するその能力により阻害剤を同定し得る。その他、プローブとしてELAMを安定に発現するセルラインを使用し、このアッセイにおいてELAMリガンドを使用することができる。

【0190】この範疇の他のアッセイは、それぞれELAMリガンドまたはELAMを安定に発現する細胞のモノレイヤに対する可溶性ELAMまたはELAMリガンドの結合を検定するものである。この可溶性分子は、レポーター群(例えば、放射能、蛍光プローブ、酵素等)によりラベルし得る。

【0191】3. 付着蛋白質-付着蛋白質アッセイ

このアッセイは、ELAMのそのリガンドに対する結合を阻害する低分子の能力を検定するものである。可溶性形態の2つの分子、例えば可溶性ELAMを96穴マイクロタイタプレートの穴に固定化し、この対の他の構成員、例えばレポーター群によりラベルしたELAMリガンドの結合により付着を測定する。

【0192】これらの3つのアッセイのいずれにおいても、付着を阻害するその能力によって阻害剤を検出する。

【0193】実施例XVI

VCAM1/免疫グロブリン構成物

発現に際してrsVCAM1/免疫グロブリン融合蛋白質を生産するDNA配列を調製した。このDNA配列

は、5'から3'に、VCAM1ドメイン1~3およびIgG1重鎖遺伝子の一定領域を含む。

【0194】ポリメラーゼ鎖反応(PCR)により、図3のヌクレオチド1035を介してVCAM1ドメイン1~3を含有するDNA断片を生産した(サンプロックら、1989)。3'-5'プライマは、配列5'GAGCTCGAGGCCGCACCATGCTGGGAAAGATGを有する。これは図3のヌクレオチド100~114に相補的であり、VCAM1開始コドンおよびXhoIおよびNotIについての認識部位を含有する。5'-3'プライマは、配列5'CTAGCTAGCGCGTTTATCTTCACTCACを有する。これはドメイン3の末端で図3のヌクレオチド1016~1035に相補的であり、NheI認識部位を含有する。これらのプライマを使用し、AmpcDM8クローン41のVCAM1コード領域を含有するプラスミドから断片を増幅した。このプロセスの生成物は、VCAM1ドメイン1~3をコードするDNA配列であった。XhoIおよびNheIによりこのDNA断片を消化し、次のようにして作成したpAB53にこれを挿入した。

【0195】SalIによりpJOD-s(実施例VII)を消化し、ヒトrsCD4をコードするcDNA配列を挿入した。このプラスミドをpJOD-rsT4と呼ぶこととした。PvuIIおよびSphIによりpJOD-rsT4を部分消化し、DHFRcDNAの転写を調節するSV40プロモータ中の2つのSV40エンハンサリピートを含む断片を欠損させた。プラスミドを再連結し、これをpJOD-rsT4デルタEとした。その後、NheIおよびNotIによりpJOD-rsT4デルタEを消化し、2つのDNA断片を挿入した。最初に5'mRNAスプライス部位を含むNheI-HindIIIリンカ、次にIgG重鎖遺伝子の一定領域をコードするDNA断片である。これらの断片を次のようにして得た。

【0196】次の配列を有するNheI-HindIIIリンカを合成した：

5'スプライス

5'CTAGCTTTCAGGTGAGTCCTA3'
3'GAAGGTTCCATCAGGATTGCA5'

【0197】IgG重鎖遺伝子のDNA配列はエリソンら(1982)に記載されている。EMBL3ヒト染色体ライブラリ(実施例VIII)からオリゴヌクレオチドプローブを使用してこの遺伝子の断片を単離した。HindIIIおよびNotIによりこの断片を消化し、一定の重ドメインおよび随伴するイントロンを含む断片を単離した。

【0198】これらの2つの断片をpJODrsT4デルタEに連結し、得られたプラスミドをpAB53と呼ぶこととした。XhoIおよびNheIによりpAB5

3を消化し、rsT4コード領域を欠損させた。この場所に、VCAM1ドメイン1~3をコードするXhoI-NheI断片を挿入した。このプラスミドをVCAM1-IgG1と呼ぶこととした。

【0199】rsVCAM1/IgG融合蛋白質を、このプラスミドを使用して発現させた。安定した発現のため、このプラスミドをCHO細胞に感染させた。この遺伝子の転写後、mRNAをスプライスしてイントロンを除去し、翻訳の際に、細胞はrsVCAM-IgG融合蛋白質を生産した。

【0200】実施例XVII

アンチセンス核酸による阻害VCAM1発現

ここで、VCAM1に対するアンチセンス核酸および誘導されたHUVECsにおけるVCAM1発現を阻害するその能力を試験する方法を記載する。アンチセンス核酸についての有効な核酸配列は、mRNAのコード領域、更に詳しくは開始コドンAUG、またはスプライス部位に相補的なものである(マルクス-セクラ、1988)。また、約15ヌクレオチドのオリゴマが最も好適である。よって、VCAM1に対する最も有効なアンチセンス核酸は、DNA配列5'CCCAGGCATTTTAAGを有するオリゴマである。これは、図3のヌクレオチド94~108に結合し得る(アンチセンス開始コドン)。このDNA配列は、例えば自動DNA合成装置によって合成される。

【0201】このアンチセンス核酸のVCAM1発現を阻害する能力は次のようにして試験する。細胞生育に使用する血清を60で30分間熱失活させてヌクレアーゼを失活させる以外は、実施例Vと同様にしてHUVECsを群集に生育させる。4~48時間、10μM~100μMの濃度で、最も好ましくは細胞生存性に影響を与えない最も高い濃度で、オリゴマを用いて細胞を予備インキュベートする。これらの範囲は、有効な阻害のために必要である(マルクス-セクラ、1988、ベッカーら、1989)。その後、HUVECsを10ng/mlTNFにより処理してVCAM1を誘導する。約4時間後、細胞の表面上のVCAM1の存在を付着アッセイにより試験する。

【0202】実施例XVIII

VCAM1mRNAを認識するハンマーヘッドリボザイム

次のようにしてハセルホフとゲーラー(1988)の規則に従い、VCAM1mRNAを認識するハンマーヘッド型リボザイムを調製する。最初に、標的mRNA上の開裂部位を同定する。ハンマーヘッドリボザイムは、配列5'GUX(Xはいずれかのヌクレオチドである)の後を開裂する。VCAM1mRNAのコード領域中のこの配列の最初の例は、6番目のコドン、5'AUGCCUGGGAAAG AUG GUC GUG AUC CUUである。適切な認識配列には、開裂部位の側

面に位置する5'および3'領域の約6のヌクレオチドが包含される。開裂部位を含む18塩基の認識配列は、5' AAG AUG GUC CUG AUC CUU である。

【0203】その後、認識配列および触媒「ハンマーヘッド」の配列を含むリボザイムについてRNA配列を設計する。この種の配列は、5' AAG GAU CAC [CUGAUGAGUCCGUGAGGACGAA] AC CAU CUUである。括弧内の配列は、触媒「ハンマーヘッド」および5'および3'フランク配列を生成し、認識部位に相補的で、これに結合する。同様の方法で、より短い認識配列またはVCAM1 mRNAの他の開裂部位についてのものまたは他のELAMまたはELAMリガンドmRNAについてのものを設計し得る。

【0204】実施例XIX

ELAM1リガンドを認識する抗イディオタイプ抗体
HL-60細胞上のELAM1のリガンドに結合する抗ELAM1抗体に対する抗イディオタイプ抗体を調製した。完全フレンドアジュバント中で1:1に乳化した蛋白質A精製CDB.BB11.BC6モノクローナル（実施例V）によりウサギを免疫した。免疫後26日に、ウサギを採血し、FACSを使用して特異的抗体について抗血清を分析した。HL-60細胞（ELAM1のリガンドを発現する）またはRAMOS細胞（発現しない）を用いて抗体調製物をインキュベートした。この抗体調製物は、HL-60細胞に特異的に結合したが、RAMOS細胞には結合しないことを認め、これはELAM1リガンドを認識する抗体を含有することが示され

た。対照抗血清は、いずれのセルラインとも反応しなかった。

【0205】実施例XX

新規なELAMの証拠

誘導されたHUVECsに対するU937細胞（これは単球様である）の結合は、ELAM1、VCAM1、および/またはICAM1に至る特定のMoabs経路によっては遮断されない。しかしながら、U937結合は、CD29、 β_1 インテグリン・サブユニットに対するモノクローナル抗体によって遮断される。このことから、 β_1 インテグリンを介して白血球と相互作用するHUVECs上の新たな付着分子の存在が推定される。この新たな分子はVCAM1に類似する時間経過により誘導され、誘導後48時間最大レベルを維持する。2.5時間IL-1誘導HUVEC減算サブライブラリについて先に記載した方法を使用し、48時間TNF処理HUVECsから減算ライブラリを作成した。先に記載した直接発現手順を使用し、新たな分子のクローン化を試みているところである。

【0206】この発明の多数の態様をここに記載したが、当業者であれば本発明の手順を改変して、この発明の方法および組成物を利用する他の態様を提供し得ることは明らかである。したがって、この発明の範囲はここに添付する請求の範囲により特定され、例として示した特定の態様によらないことが銘記されよう。

【0207】

【表1】

62
引用文献

- Arfors, K.-E., et al., "A Monoclonal Antibody to the Membrane Glycoprotein Complex CD18 Inhibits Polymorphonuclear Leukocyte Accumulation and Plasma Leakage In Vivo", Blood, 69, pp. 338-40 (1987)
- Aruffo, A., and Seed, B., "Molecular Cloning of a CD28 cDNA by a High Efficiency COS Cell Expression System", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, pp. 8573-77 (1987)
- Becker, D., et al., "Proliferation of Human Malignant Melanomas Is Inhibited by Antisense Oligodeoxynucleotides Targeted Against Basic Fibroblast Growth Factor", EMBO J., 8, pp. 3685-91 (1989)
- Benichmol, S., et al., "Carcinoembryonic Antigen, A Human Tumor Marker, Functions as an Intercellular Adhesion Molecule", Cell, 57, pp. 327-34 (1989)
- Bevilacqua, M.P., and M.A. Gimbrone, "Inducible Endothelial Functions in Inflammation and Coagulation", Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 13, pp. 425-33 (1987)
- Bevilacqua, M.P., et al., "Interleukin 1 Acts on Cultured Human Vascular Endothelium to Increase the Adhesion of Polymorphonuclear Leukocytes, Monocytes, and Related Leukocyte Cell Lines", J. Clin. Invest., 76, pp. 2003-11 (1985) ("Bevilacqua I")
- Bevilacqua, M.P., et al., "Endothelial-Dependent Mechanisms of Leukocyte Adhesion: Regulation by Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor", Leukocyte Emigration and Its Sequelae (S. Karger A.G., Switzerland, 1987a), pp. 79-93 ("Bevilacqua II")
- Bevilacqua, M.P., et al., "Identification of an Inducible Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, pp. 9238-42 (1987b) ("Bevilacqua III")

【0208】

【表2】

- Bevilacqua, M.P., et al., "Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1: An Inducible Receptor for Neutrophils Related to Complement Regulatory Proteins and Lectins", Science, 243, pp. 1160-5 (1989) ("Bevilacqua IV")
- Breathnach, R. and P. Chambon, "Organization and Expression of Eucaryotic Split Genes Coding for Proteins", Ann. Rev. Biochem., 50, pp. 349-83 (1981)
- Brenan, M. and C.R. Parish, "Intracellular Fluorescent Labelling of Cells for Analysis of Lymphocyte Migration", J. Immun. Meth., 74, pp. 31-38 (1984)
- Capon, D.J., et al., "Designing CD4 Immuno adhesins for AIDS Therapy", Nature, 337, pp. 525-31 (1989)
- Carlsson, R., and C. Glad, "Monoclonal Antibodies into the '90s", Bio/Technology, 7, pp. 567-73 (June 1989)
- Cate, R., et al., "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene in Animal Cells", Cell, 45, pp. 685-98 (1986)
- Cech, T.R., "Ribozymes and Their Medical Implications", J. Amer. Med. Assn., 260, pp. 3030-4 (1988)
- Chang et al., "Recombination Following Transformation of Escherichia coli by Heteroduplex Plasmid DNA Molecules", Gene, 29, pp. 255-61 (1984)
- Cotran, R.S., et al., "Induction and Detection of a Human Endothelial Activation Antigen In Vivo", J. Exp. Med., 164, pp. 661-66 (1986)
- Cotran, R.S., and J.S. Pober, "Endothelial Activation: Its Role in Inflammatory and Immune Reactions," in Endothelial Cell Biology, Simionescu and Simionescu, Eds., Plenum Press, New York (1988), pp. 335-47
- Dana, N., et al., "Mol Surface Glycoprotein: Structure, Function and Clinical Importance", Pathol. Immunopathol. Res., 5, pp. 371-83 (1986)
- Davis, M.M., "Subtractive cDNA Hybridizaion and the T-Cell Receptor Gene", Handbook of Experimental Immunology In Four Volumes, 4th ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England (1986), pp. 76.1-76.13

- Davis, M.M., et al., "Cell Type-Specific cDNA Probes and the Murine I Region: The Localization and Orientation of Ad", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp. 2194-98 (1984)
- Devereux, J., et al., "A Comprehensive Set of Sequence Analysis Programs for the VAX," Nucl. Acids Res., 12, pp. 387-95 (1984)
- Duguid, J.R., et al., "Isolation of cDNAs of Scrapie-Modulated RNAs by Subtractive Hybridization of a cDNA Library", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, pp. 5738-42 (1988)
- Dustin, M.L., and T.A. Springer, "Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 (LFA-1) Interaction with Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) Is One of at Least Three Mechanisms for Lymphocyte Adhesion to Cultured Endothelial Cells," J. Cell. Biol., 107, pp. 321-33 (1988)
- Dustin, M.L., et al., "Induction by IL1 and Interferon-gamma: Tissue Distribution, Biochemistry, and Function of a Natural Adherence Molecule (ICAM-1), J. Immunol., 137, pp. 245-254 (1986)
- Ellison, J.W., et al., "The Sequence of a Human Immunoglobulin C-gamma-1 Gene," Nucl. Acids Res., 10, pp. 4071-79 (1982)
- Feinberg, A.P., and B. Vogelstein, "A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity", Anal. Biochem., 132, pp. 6-13 (1983)
- Feinberg, A.P., and B. Vogelstein, "A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity", Anal. Biochem., 137, pp. 266-67 (1984) (Addendum)
- Fisher, R.A., et al., "HIV Infection Is Blocked In Vitro by Recombinant Soluble CD4", Nature, 331, pp. 76-78 (1988)
- Gimbrone, M.A., "Culture of Vascular Endothelium", Prog. Hemostasis Thromb., 3, pp. 1-28 (1976)
- Goding, W., ed., Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, (Academic Press, New York, 1983)
- Goldenberg, D.M., "Targeted Cancer Treatment," Immunology Today, 10, pp. 286-88 (1989)

- Gubler, U. and Hoffman, B.J., "A Simple and Very Efficient Method for Generating cDNA Libraries", Gene, 25, pp. 263-69 (1983)
- Hambor, J.E., et al., "Functional Consequences of Anti-Sense RNA-Mediated Inhibition of CD8 Surface Expression in a Human T Cell Clone," J. Exp. Med., 168, pp. 1237-45 (1988)
- Harlan, J.M., "Leukocyte-Endothelial Interactions," Blood, 65, pp. 513-25 (1985) ("Harlan I")
- Harlan, J.M., "Neutrophil-Mediated Vascular Injury", Acta Med. Scand., Suppl., 715, pp. 123-29 (1987) ("Harlan II")
- Harlan, J.M., et al., "The Role of Neutrophil Membrane Proteins in Neutrophil Emigration," in Leukocyte Emigration and Its Sequelae, H. Movat, ed. (S. Karger AG, Basel, Switzerland, 1987), pp. 94-104
- Haselhoff, J., and W.L. Gerlach, "Simple RNA Enzymes with New and Highly Specific Endoribonuclease Activities," Nature, 334, pp. 585-591 (1988)
- Hedrick, S.M., et al., "Isolation of cDNA Clones Encoding T Cell-Specific Membrane-Associated Proteins," Nature, 308, pp. 149-53 (1984)
- Hemler, M.E., "Adhesion Protein Receptors on Hematopoietic Cells", Immunol. Today, 9, pp. 109-113 (1988)
- Hemler, M.E., et al., "The VLA Protein Family (Characterization of Five Distinct Cell Surface Heterodimers Each with a Common 130,000 Molecular Weight β Subunit)," J. Biol. Chem., 262, pp. 3300-09 (1987a)
- Hemler, M.E., et al., "Characterization of the Cell Surface Heterodimer VLA-4 and Related Peptides," J. Biol. Chem., 262, pp. 11478-85 (1987b)
- Hirt, B., "Selective Extraction of Polyoma DNA from Infected Mouse Cell Cultures", J. Mol. Biol., 26, pp. 365-69 (1967)
- Hough, A. and L. Sokoloff, "Pathology", Chap. 4, Rheumatoid Arthritis, P.D. Ustinger, N.J. Zugifler, and Ehrlich, G.E., eds., (Lippencott, Philadelphia, 1985), pp. 49-69

- Hunkapiller, T. and L. Hood, "Diversity of the Immunoglobulin Gene Superfamily", Adv. Immunol., 44, pp. 1-63 (1989)
- Huse, W.D., et al., "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda," Science, 246, pp. 1275-81 (1989)
- Hynes, R.O., "Integrins: A Family of Cell Surface Receptors", Cell, 48, pp. 549-554 (1987)
- Kaldoron et al., Nucl. Acids Res., 10, pp. 5161-71 (1982)
- Kennedy, R.C., et al., "Anti-idiotypes and Immunity," Sci. Am., 255, pp. 48-56 (July 1986)
- Kurzinger, K., et al., "A Novel Lymphocyte Function-Associated Antigen (LFA-1): Cellular Distribution, Quantitative Expression, and Structure", J. Immunol., 127, pp. 596-602 (1981)
- Lehrach, H., et al., "RNA Molecular Weight Determinations by Gel Electrophoresis under Denaturing Conditions, a Critical Reexamination", Biochem., 16, pp. 4743-51 (1977)
- Lenardo, M.J. and D. Baltimore, "NF- κ B: A Pleiotropic Mediator of Inducible and Tissue Specific Gene Control," Cell, 58, pp.227-30 (1989)
- Malech, H.L. and Gallin, J.I., "Neutrophils in Human Diseases", N. Eng. J. Med., 317, pp. 687-94 (1987)
- Maniatis, T., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982)
- Marcantonio, E.E., and R.O. Hynes, "Antibodies to the Conserved Cytoplasmic Domain of the Integrin β -1 Subunit React with Proteins in Vertebrates, Invertebrates and Fungi," J. Cell. Biol., 106, pp. 1765-72 (1988)
- Marcus-Sekura, C.J., "Techniques for Using Antisense Oligonucleotides to Study Gene Expression," Anal. Biochem., 172, pp. 289-95 (1988)
- Marlin, S.D., and T.A. Springer, "Purified Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) Is a Ligand for Lymphocyte Function-Associated Antigen 1 (LFA-1)," Cell, 51, pp. 813-9 (1987)

Maxam, A. and W. Gilbert, "Sequencing End-Labeled DNA with Base-Specific Chemical Cleavages", Methods in Enzymol., 65, pp. 499-560 (1980)

Morinaga et al., "Improvement of Oligonucleotide-Directed Site-Specific Mutagenesis Using Double-Stranded Plasmid DNA," Bio/Technology, 2, pp. 636-9 (1984)

Costra et al., "Transforming Activity of Polyoma Virus Middle-T Antigen Probed by Site-Directed Mutagenesis," Nature, 304, pp. 456-60 (1983)

Osborn, L., et al., "Tumor Necrosis Factor α and Interleukin 1 Stimulate the Human Immunodeficiency Virus Enhancer by Activation of the Nucleus Factor κ B," Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86, pp. 2336-40 (1989)

Peden, K.W.C. and D. Nathans, "Local Mutagenesis Within Deletion Loops of DNA Heteroduplexes," Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 79, 7214-17 (1982)

Pober, J.S., et al., "Overlapping Patterns of Activation of Human Endothelial Cells by Interleukin 1, Tumor Necrosis Factor, and Immune Interferon," J. Immunol., 137, pp. 1895-6 (1986)

Ross, R., "The Pathogenesis of Atherosclerosis - An Update", N. Eng. J. Med., 314, pp. 488-500 (1986)

Rothlein, R., et al., "A Human Intercellular Adhesion Molecule (ICAM-1) Distinct from LFA-1," J. Immunol., 137, pp. 1270-4 (1986)

Ruoslahti, E., "Fibronectin and its Receptors", Ann. Rev. Biochem., 57, pp. 375-413 (1988)

Sambrook, J., et al., "In Vitro Amplification of DNA by Polymerase Chain Reaction," Chapter 14 in Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)

Sandri-Goldin, R.M., et al., "High Frequency Transfer of Cloned Herpes Simplex Virus Type I Sequences to Mammalian Cells by Protoplast Fusion", Molec. and Cell Biol., 1, pp. 743-52 (1981)

Sargent, T.D., "Isolation of Differentially Expressed Genes", Methods in Enzymol., 152, pp. 423-47 (1987)

- 73
- Sato, K., et al., "A Specific DNA Sequence Controls Termination of Transcription in the Gastrin Gene," Molec. and Cell Biol., 6, pp. 1032-43 (1986)
- Schneider, C., et al., "A One-Step Purification of Membrane Proteins Using a High Efficiency Immunomatrix" J. Biol. Chem., 257, pp. 10766-69 (1982)
- Seed, B., "An LFA-3 cDNA Encodes a Phospholipid-Linked Membrane Protein Homologous to Its Receptor CD2", Nature, 329, pp. 840-42 (1987)
- Seed, B. and A. Aruffo, "Molecular Cloning of the CD2 Antigen, the T-Cell Erythrocyte Receptor, by a Rapid Immunoselection Procedure", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, pp. 3365-69 (1987)
- Skerra, A. and A. Pluckthun, "Assembly of a Functional Immunoglobulin F. Fragment in Escherichia coli," Science, 240, pp. 1038-1043 (1988)
- Simmons et al., "ICAM, an Adhesion Ligand of LFA-1, Is Homologous to the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM," Nature, 331, pp. 624-47 (1988)
- Smith, C.W., et al., "Cooperative Interactions of LFA-1 and Mac-1 with Intercellular Adhesion Molecule 1 in Facilitating Adherence and Transendothelial Cell Migration of Human Neutrophils in Vitro," J. Clin. Invest., 83, pp. 2008-17 (1989)
- Springer, T.A., et al., "The Lymphocyte Function-Associated LFA-1, CD2, and LFA-3 Molecules: Cell Adhesion Receptors of the Immune System", Ann. Rev. Immunol., 5, pp. 223-252 (1987)
- Staunton, D.E., et al., "Primary Structure of ICAM-1 Demonstrates Interaction Between Members of the Immunoglobulin and Integrin Supergene Families", Cell, 52, pp. 925-33 (1988)
- Subramani, S., et al., "Expression of the Mouse Dihydrofolate Reductase Complementary Deoxyribonucleic Acid in Simian Virus 40 Vectors," Molec. Cell. Biol., 1, pp. 854-64 (1981)
- Takada, Y., and M.E. Hemler, "The Primary Structure of the VLA-2/Collagen Receptor α^2 Subunit (Platelet GP Ia): Homology to Other Integrins and the Presence of a Possible Collagen-Binding Domain," J. Cell. Biol., 109, pp. 397-407 (1989)

- Takada, Y., et al., "The Primary Structure of the $\alpha 4$ Subunit of VLA-4: Homology to Other Integrins and a Possible Cell-Cell Adhesion Function," EMBO J., 8, pp. 1361-68 (1989)
- Thomas, H. and Sikora, K., "Biological Approaches to Cancer Therapy", J. Intl. Med. Res., 17, pp. 191-204 (1989)
- Todd III, R.F., et al., "The Anti-Inflammatory Properties of Monoclonal Anti-Mol (CD11B/CD18) Antibodies in Vitro and in Vivo," in Structure and Function of Molecules Involved in Leukocyte Adhesion, Rosenthal et al., Eds., Springer - Verlag, New York (1989) in press
- Vedder, N.B., et al., "A Monoclonal Antibody to the Adherence-Promoting Leukocyte Glycoprotein, CD18, Reduces Organ Injury and Improves Survival from Hemorrhagic Shock and Resuscitation in Rabbits", J. Clin. Invest., 81, pp. 939-44 (1988)
- von Heijne, G., "A Method for Predicting Signal Sequence Cleavage Sites", Nucl. Acids Res., 14, pp. 4693-90 (1986)
- Ward, E.S., et al., "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from *Escherichia coli*," Nature, 341, pp. 544-46 (1989)
- Wallis, W.J., and J.M. Harlan, "Effector Functions of Endothelium in Inflammatory and Immunologic Reactions," Pathol. Immunopathol. Res., 5, pp. 73-103 (1986)
- Wayner, E.A., et al., "Identification and Characterization of the Lymphocyte Adhesion Receptor for an Alternative Cell Attachment Domain in Plasma Fibronectin," J. Cell. Biol., in press (1989)
- Weintraub, H.M., "Antisense RNA and DNA," Sci. Am., 262, pp. 40-46 (Jan. 1990)
- Wheeler, M.E., et al., "Cultured Human Endothelial Cells Stimulated with Cytokines or Endotoxin Produce an Inhibitor of Leukocyte Adhesion", J. Clin. Invest., 82, pp. 1211-18 (1988)
- White, J. and D. Littmann, "Viral Receptors of the Immunoglobulin Superfamily", Cell, 56, pp. 725-28 (1989)
- * * 【表 9】
- Williams, A. and Barclay, A.N., "The Immunoglobulin Superfamily -- Domains for Cell Surface Recognition", Ann. Rev. Immunol., 6, pp. 381-405 (1988)
- Wysocki, L.J. and V.L. Sato, "'Panning' for Lymphocytes: A Method for Cell Selection", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, pp. 2844-48 (1978)
- Yamasaki, K., et al., "Cloning and Expression of the Human Interleukin-6 (BSF-2/IFN β 2) Receptor", Science, 241, pp. 825-28 (1988)
- Young, R.A. and R.W. Davis, "Efficient Isolation of Genes by Using Antibody Probes", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, pp. 1194-98 (1983) ("Young I")
- Young, R.A. and R.W. Davis, "Yeast RNA Polymerase II Genes: Isolation with Antibody Probes", Science, 222, pp. 778-82 (1984) ("Young II")

外国特許出願

Hemler, M.E. and Y. Takada, "VLA Proteins," EP 330,506, published August 30, 1989.

【図面の簡単な説明】

【図1A】ELAM pCDM8クローン6、pSQ148およびpSQ149のDNA配列から誘導された複合ELAM1 cDNA配列および推定アミノ酸配列を示し、ヌクレオチドは1~3863の番号を有する。本明細

書の全体にわたり、この図のコード化DNA配列をELAM1のためのDNA配列と称する。さらに、この図に示したアミノ酸配列からなる分子をELAM1と称する。

【図1B】図1Aの分図である。

【図 1 C】図 1 A の分図である。

【図 1 D】図 1 A の分図である。

【図 1 E】図 1 A の分図である。

【図 2】pNN11 の合成ポリリンカーの DNA 配列を示す。

【図 3 A】AM pCDM8 クローン 41 から誘導された VCAM1 をコードする cDNA の配列および VCAM1 の推定アミノ酸配列を示し、ヌクレオチドは 1~281 の番号を有する。本明細書において、この図のコード化 DNA 配列を VCAM1 のための DNA 配列と称する。さらに、この図に示したアミノ酸配列からなる分子を VCAM1 と称する。

【図 3 B】図 3 A の分図である。

【図 3 C】図 3 A の分図である。

【図 3 D】図 3 A の分図である。

【図 4 A】VCAM1b pCDM8 クローン 1E11 から誘導された VCAM1b をコードする cDNA の配列および VCAM1b の推定アミノ酸配列を示し、ヌクレオチドは 1~3080 の数で示す。本明細書において、この図のコード化 DNA 配列を VCAM1b のための DNA 配列と称する。さらに、この図に示したアミノ酸配列からなる分子を VCAM1b と称する。

【図 4 B】図 4 A の分図である。

【図 4 C】図 4 A の分図である。

【図 1 A】

```

1  TTCACATCAAACTCCTATCTAGTACCTGAGACAGAGGCAGTCAGTATACC  50
51  CACCTGAGAGATCTCTGTGTGAACAACTGCTTCCCAAAACGAAAGTAT  100
101  TTCAAGCCTAAACCTTTGGGTGAAAGAACTCTTGAAGTCATGATTGCTT  150
    MetIleAlaAs
151  CACAGTTTCTCTCAGCTCTCCTTTGGTGCTTCTCATTAAAGAGAGTGGGA  200
    erGlnPheLeuSerAlaLeuThrLeuValLeuLeuIleLysGluSerGly
201  GCCTGGTCTTAAACACCTCCACGGAAGCTATGACTTATGATGAGGCCAG  250
    AlaTrpSerTyrAsnThrSerThrGluAlaMetThrTyrAspGluAlaSe
251  TGCCTATTGTCAGCAAGGTACACACCTGGTGGCAATTCAAACAAG  300
    rAlaTyrCysGlnGlnArgTyrThrHisLeuValAlaIleGlnAsnLysG
301  AAGAGATTGATACCTAACTCCATATTGAGCTATTCCACCAAGTTATTAC  350
    luGluIleGluTyrLeuAsnSerIleLeuSerTyrSerProSerTyrTyr
351  TGGATTGGAAATCAGAAAAGTCAACATGTGTGGGTCTGGGTAGGAACCA  400
    TrpIleGlyIleArgGlyValAsnAsnValTrpValTrpValGlyThrGl
401  GAAACCTCTGACAGAGAAGCCAAAGAACTGGGCTCCAGGTGAACCCACA  450
    nLysProLeuThrGluGluAlaLysAsnTrpAlaProGlyGluProAsnA
451  ATAGGCAAAAAGATGAGGACTGCGTGGAGATCTATACATCAAGAGAGAAAA  500
    snArgGlnLysAspGluAspCysValGluIleTyrIleLysArgGluLys
501  GATGTGGGCATGTGGAAATGATGAGAGGTGCAGCAAGAAGAAGCTTGCCT  550
    AspValGlyMetTrpAsnAspGluArgCysSerLysLysLysLeuAlaLe
551  ATGCTACACAGCTGCCTGTACCAATACATCTTCAGTGGCCACGGTGAAT  600
    uCysTyrThrAlaAlaCysThrAsnThrSerCysSerGlyHisGlyGluC
601  GTGTAGAGAACCATCAATAATTACACTTGCAGTGTGACCTGGCTTCAGT  650
    ysValGluThrIleAsnAsnTyrThrCysLysCysAspProGlyPheSer
651  GGACTCAAGTGTGAGCAAAATTGTGAAGTGTACAGCCCTGGAATCCCTCA  700
    GlyLeuLysCysGluGlnIleValAsnCysThrAlaLeuGluSerProGl
701  GCATGGAAGCCTGGTTTCAGTCCACCCACTGGGAACTTCAGTACAAATT  750
    uHisGlySerLeuValCysSerHisProLeuGlyAsnPheSerTyrAsnS
751  CTCTCTGCTCTATCAGCTGTGATAGGGGTACCTGCCAAGCAGCATGGAG  800
    erSerCysSerIleSerCysAspArgGlyTyrLeuProSerSerMetGlu

```

* 【図 4 D】図 4 A の分図である。

【図 5】VCAM1 のドメイン構造を示し、アミノ酸はウィスコンシン大学のジェネティクス・コンピュータ・グループにより使用される一文字コードによって示される [デブロー等、1984]。

【図 6】VCAM1b のドメイン構造を示し、アミノ酸はウィスコンシン大学のジェネティクス・コンピュータ・グループにより使用される一文字コードによって示される [デブロー等、1984]。

10 【図 7】クローン EL1-07 から誘導された ELAM1 の 5' 未翻訳および未転写領域における部分の DNA 配列を示す。

【図 8】クローン VC1-16 から誘導された VCAM1 の 5' 未翻訳および未転写領域における部分の DNA 配列を示す。

20 【図 9 A】pSQ219 および CDX pCDM8 クローン 7.2 から誘導された CDX をコードする cDNA の配列および推定アミノ酸配列を示し、ヌクレオチドは 1~2175 の番号を有する。本明細書において、この図のコード化 DNA 配列を CDX 用の DNA 配列と称する。さらに、この図に示したアミノ酸配列からなるポリペプチドを CDX と称する。

【図 9 B】図 9 A の分図である。

* 【図 9 C】図 9 A の分図である。

【図 1 B】

```

801  ACCATGCAGTGTATGTCTCTGGAGAATGGAGTGCTCCTATTCCAGCCTG  850
    ThrMetGlnCysMetSerSerGlyGluTrpSerAlaProIleProAlaCy
851  CAATGTGGTTGAGTGTGATGCTGTGACAAATCCAGCCAAATGGGTTCTGG  900
    sAsnValValGluCysAspAlaValThrAsnProAlaAsnGlyPheValG
901  AATGTTTCCAAAACCTGGGAAGCTTCCCATGGAAACACAACTGTACATT  950
    luCysPheGlnAsnProGlySerPheProTrpAsnThrThrCysThrPhe
951  GACTGTGAAGAAGGATTGAACTAATGGGAGCCAGAGCCCTCAGTGTAC  1000
    AspCysGluGluGlyPheGluLeuMetGlyAlaGlnSerLeuGlnCysTh
1001  CTCATCTGGGAATGGGACCAACGGAAGCCAACTGTAAAGCTGTGACAT  1050
    rSerSerGlyAsnTrpAspAsnGluLysProThrCysLysAlaValThrC
1051  GCAGGGCCGTCCGCCAGCCTCAGAAATGGCTCTGTGAGGTGCAGCCATTCC  1100
    ysArgAlaValArgGlnProGlnAsnGlySerValArgCysSerHisSer
1101  CCTGCTGGAGAGTTACCTTCAATCATCTCTGCAACTTCACCTGTGAGGA  1150
    ProAlaGlyGluPheThrPheLysSerSerCysAsnPheThrCysGluGl
1151  AGGCTTCACTGTGACAGGACCCAGCCAGGTTGAATGCACCACTCAAGGGC  1200
    uGlyPheMetLeuGlnGlyProAlaGlnValGluCysThrThrGlnGlyG
1201  AGTGGACACAGCAAAATCCCAAGTTTGTGAAGCTTTCAGTGCACAGCCTG  1250
    lnTrpThrGlnGlnIleProValCysGluAlaPheGlnCysThrAlaLeu
1251  TCCAAACCCGAGCGAGGCTACATGAATTTCTTCTTCTGAGTGTCTTGGCAG  1300
    SerAsnProGluArgGlyTyrMetAsnCysLeuProSerAlaSerGlySe
1301  TTTCCGTTATGGGTCCAGCTGTGAGTTCTCTCTGTGAGCAGGTTTGTGT  1350
    rPheArgTyrGlySerSerCysGluPheSerCysGluGlnGlyPheValL
1351  TGAAGGGATCCAAAGGCTCCAAATGTGGCCCCACAGGGGAGTGGGACAA  1400
    euLysGlySerLysArgLeuGlnCysGlyProThrGlyGluTrpAspAsn
1401  GAGAAGCCCATATGTGAAGCTGTGAGATGCGATCTGTCCACGACCCCC  1450
    GluLysProThrCysGluAlaValArgCysAspAlaValHisGlnProPr
1451  GAAGGGTTGTGAGGTGTGCTCATTCCTTATGGAGAATTCACCTACA  1500
    oLysGlyLeuValArgCysAlaHisSerProIleGlyGluPheThrTyrL
1501  AGTCCTCTTGTGCTTTCAGCTGTGAGGAGGAGTGTGAATTACATGGATCA  1550
    ysSerSerCysAlaPheSerCysGluGluGlyPheGluLeuHisGlySer
1551  ACTCAACTGAGTGACATCTCAGGACAAATGCACAGAAAGGTTCTCTTC  1600
    ThrGlnLeuGluCysThrSerGlnGlyGlnTrpThrGluGluValProSe

```

【 1 D】

1650
1700
1750
1800
1850
1900
1950
2000
2050
2100
2150
2200
2250
2300
2350
2400
2450
2500
2550
2600

2601	AGAGTCTCTAAGGATTGTGAATTTTCTTGCATTGAATATATTATAAT	2650
2651	CTTCCATACTTCTTCATTCAATACAAGTGTGGTAGGGACTTAAAAAACTT	2700
2701	GTAATGCTGTCAACTATGATATGGTAAAAATTACTTATTCTAGATTACC	2750
2751	CCCTCATTGTTTTATAACAAATTATGTATACATCTGTTTTAAATTATTTC	2800
2801	AAAAAGGGAAACTATTGTCCCTAGCAAGGCATGATGTTAACCAAGATAA	2850
2851	AGTTCTGAGTGTTTTTACTACAGTTGTTTTTTGAAAACATGGTAGAATTG	2900
2901	GAGAGTAAAAACTGAATGGGAAGTTGTATATTGTCAGATATTTTTTCAG	2950
2951	AAATATGTGTTTCCAGGATGAAAACTTCCATGAGGCCAAACGTTTTGA	3000
3001	ACTAATAAAAGCATAAATGCAACACACAAAGGTATAATTTTATGAATGT	3050
3051	CTTTGTTGGAAAAAATACAGAAAGATGGATGTGCTTTGTCATCCCTACAA	3100
3101	AGATGTTTTGTCAGATATGATATGTAAACATAATCTTGTATATTATGGAA	3150
3151	GATTTTAAATTCACAAATAGAAACTCCCAATGTAAAAAGAGTCACTCTGGTAG	3200
3201	ATTTTTAAACGAATGAAGATGTCTAATAGTTATTCCCTATTGTGTTTTCTC	3250
3251	TGATGTGTAGGGTGCTCTGGAAGAGAGGAATGCCCTGTGTGAGCAAGCATT	3300
3301	TATGTTTATTATATAAGCAGATTTAAACAATTCCAAAGGAATCTCCAGTTTT	3350
3351	CAGTTGATCACTGGCAATGAAAAATTCAGTCAGTAATTGCCAAAGCTG	3400
3401	CTCTAGCCTTGAGGAGTGTGAGAAATCAAACTCTCCTACACTCCATTAA	3450
3451	CTTAGCACTGTGTTGAAAAAAAAGTTTCAGAGAAATCTGTGCTGAACACTG	3500
3501	CCACCAACAAAGCCAACTGCAAAACAGAGATGTGATAAGGATCAGAACA	3550
3551	GCAAGGCTCTTTTAAAGGGCCAGAAAAAATCTGGGAAAATAGAGAGAAAC	3600
3601	AACATGTGTGATCAGGCTATGATGGAAATCAGTGTTATTTCTTTGAAA	3650
3651	TGTGTTAAGTGTGTAATAATTTATGTGTAACCTGCATTAGAAATTAGCTGT	3700
3701	GTGAAATACCACTGTGGTTGTGTGTTGAGTTTATTGAGAAATTTAAATT	3750
3751	ATAACTTAAAAATTTTATATTTTAAAGTATATATTATTTAAGCTTA	3800

3801 TGTCAGACCTATTTGACATAACACTATAAAGGTTGACAATAAATGTGCTT 3850
3851 ATGTTTAAAAAAA 3863

【圖 2】

		N				N				N	
N	D	8255				8258				X	D 8258
h	=	gapaf				pas				h	s pa gaf
a	a	lelel				lelel				a	lelel
1	1	11221				1111				2	1 22 111
		///				///					/

401 GcTAGGGGGCTGGGGGGCACTCCAAACCCATCTGAAGCATAGGGACATGGGGCGGGCAAAAGGATCAGCAGATCTTCAGATCCCAATCCGAGCGGGGTGGGCG

CgtTGGGGGAGGGGGGGTTCAGCTTGCTGTTAGAGTTTGGATTCGGCTGAGAGCGGGGTTTTCGAGTGTCTAGAGCTGTAGGTTAGGCTTCGGGGCCAGCGGCG 510

【图 4 D】

2551 GTTTTATAATTTTATAGACAAATAAAGCAAAGGAGACATGGGTTGAC 2600
2601 TTTCAGGTACTAAATACCTCAACCTATGGTATAATGTTGACTGGGTTTC 2650
2651 TCTGTATAGTACTGGCATGGTACGGAGATGTTTCACGAAGTTGTTTCATC 2700
2701 AGACTCTCTGCAACTTTCCCAATGTGGCCATAAAATGCAACTTCTTTTT 2750
2751 ATTTTCTTTTGTAATGTTTAGGTTTTTTTGATAGTAAAGTGATAATTT 2800
2801 CTGGAATATAA 2811

2351	ATTATCTGTGCAAACTCCCTGATAGTCTCATCATCTCCTTGAGAAAAACA	2400
2401	ATGAGCTGAGAGGCAGACTTCCCTGAATGTATTGAACTTGGAAAGAAATG	2450
2451	CCCATCTATGTCCTCTGCTGTGAGCAAGAAGTCAAAGTAAAACTTGTGTC	2500
2501	CTGAAGAAGCAGTAACTGCCATCAAGATGAGAGAACTGGAGGAGTTCCCTTG	2550
2551	ATCTGTATATACAAATAACAATAATTTGTACATATGTAAATAAAATTATGC	2600
2601	CATAGCAAGATGCTTAAAAATAGCAACACTCTATATTAGATTGTTAAAA	2650
2651	TAACCTAGTGTGCTTTGGACTATTATAATTTAATGCATGTTAGGAAAAATT	2700
2701	CACATTAATATTGCTGACAGCTGACCTTTGTGCATCTTCTTCATTTTA	2750
2751	TTCCCTTTCACAAAAATTTATTCCATATAGTATTATGACAAATAATTCA	2800
2801	GGTTTGTAAAGATGCCGGGTTTATATTTTATAGACAAATAATAAGCA	2850
2851	AAGGGAGCACTGGTTGACTTTGAGTACTAAATACCTCAACCTATGGTA	2900
2901	TATGCTGTTGCATGCGTTTCTCTGTATAGTACTGGCATGGTACGGAGATGT	2950
2951	TTACGGAAGTTTGTTCATCAGACTCTGTGCAACTTTCCCAATGTGGCCCT	3000
3001	AAAAAGTCAACTCTTTTATTCTTCTTGTGTAAGTATTAGGTTTTTTG	3050
3051	TATAGTAAGTGATATTTCTGGAATTAAA	3080

【図 3 A】

1 CCGGCTCCTCAGGCTTCAGAGCTGAATACCTCCAGGCACACAGGT 50
 51 GGGACACAAATAAGGGTTTGGAAACCACTATTTCTCATCAGCAGCAA 100
 101 CTTAAATGCTGGGAAGATGGTCTGATCTCTGGAGCCTCAATATACT 150
 NetProGlyLysMetValValIleLeuGlyAlaSerAsnIleLe
 151 TTGGATAATGTTTTCAGCTTCTCAAGCTTTTAAATCGAGACCACCCAG 200
 UTrpIleMetPheAlaAlaSerGlnAlaPheLysIleGluThrThrProG
 201 AATCTAGATATCTTGCTCAGATTGGTGAATCTCTCATGACTTGCAGC 250
 LuSerArgTyrLeuAlaGlnIleGlyAspSerValSerLeuThrCysSer
 251 ACCACAGGCTGTGAGTCCCACTTTTCTCTGGAGAACCCAGATAGATAG 300
 ThrThrGlyCysGluSerProPhePheSerTrpArgThrGlnIleAspSe
 301 TCCACTGAATGGGAAGGTGACGAATGAGGGGACCACATCTACGCTGACAA 350
 rProLeuAsnGlyLysValThrAsnGluGlyThrThrSerThrLeuThrM
 351 TGAATCTCTGTTAGTTTGGGAACGACACTCTTACCTGTGCACAGCAACT 400
 eAsnProValSerPheGlyAsnGluHisSerTyrLeuCysThrAlaThr
 401 TGTGAATCTAGGAAATGGAAAAAGGAATCCAGGTGGAGATCTACTCTTT 450
 CysGluSerArgLysLeuGluLysGlyIleGlnValGluIleTyrSerPh
 451 TCCTAAGGATCCAGAGATTCATTGAGTGGCCCTCTGGAGGCTGGGAAGC 500
 eProLysAspProGluIleHisLeuSerGlyProLeuGluAlaGlyLysP
 501 CGATCAGCTCAAGTGTTCAGTGTCTGATGTATACCCATTGACAGGCTG 550
 rIleThrValLysCysSerValAlaAspValTyrProPheAspArgLeu
 551 GAGATAGACTTACTGAAAGGAGATCATCTCATGAAGAGTCAGGAATTTCT 600
 GluIleAspLeuLeuLysGlyAspHisLeuMetLysSerGlnGluPheLe
 601 GGAGGATCCAGACAGGAATCTCTGGAACCAAGAGTTTGGAAAGTAACCT 650
 uLysAspAlaAspArgLysSerLeuGluThrLysSerLeuGluValThrP
 651 TTACTCTCTGTCAGGAGTATTTGGAAAAGTTCTTGTTCGCGAGCTAAA 700
 heThrProValIleGluAspIleGlyLysValLeuValCysArgAlaLys
 701 TTACACATGTATGAAATGGATCTGTGCTCCACAGTAAGGCGGCTGTAAA 750
 LeuHisIleAspGluMetAspSerValProThrValArgGlnAlaVally
 751 AGAATTCAGCTACATATCACCCAAGAAATACAGTTATTTCTGTGAATC 800
 sGluLeuGlnValTyrIleSerProLysAsnThrValIleSerValAsnF

【図 3 B】

801 CATCCACAAAGCTGCAAGAAGGTGGCTCTGTGACCATGACCTGTTCCAGC 850
 rSerThrLysLeuGlnGluGlyGlySerValThrMetThrCysSerSer
 851 GAGGGCTTACAGCTCCAGAGATTTCTGGAGTAAGAATAGATAATGG 900
 GluGlyLeuProAlaProGluIlePheTrpSerLysLysLeuAspAsnGly
 901 GAATCTACAGCACCTTCTGGAATGCAACTCTCACCTTAATTGCTATGA 950
 yAsnLeuGlnHisLeuSerGlyAsnAlaThrLeuThrLeuIleAlaMetA
 951 GGATGGAAGATTCTGGAATTTATGTGTGTGAAGGAGCTTAATTGATTGGG 1000
 rgnMetGluAspSerGlyIleTyrValCysGluGlyValAsnLeuIleGly
 1001 AAAACAGAAAAGAGGTGGAATTAATTGTTCAAGCATTCCTTAGAGATCC 1050
 LysAsnArgLysGluValGluLeuIleValGlnAlaPheProArgAspPr
 1051 AGAATTCAGATGAGTGGTGGCTCTGGAATGGAGCTCTGCTACGTAA 1100
 oGluIleGluMetSerGlyGlyLeuValAsnGlySerSerValThrValS
 1101 GCTGCAAGTTCTTAGCTGTGACCCCTTGAACCGGCTGGAGATTCAATTA 1150
 erCysLysValProSerValTyrProLeuAspArgLeuGluIleGluLeu
 1151 CTTAAGGGGAGACTATTCTGGAGATATAGATTTTTCGAGGATACGGA 1200
 LeuLysGlyGluThrIleLeuGluAsnIleGluPheLeuGluAspThrAs
 1201 TATGAATCTCTAGAGAACAAAGTTTGGAAATGACCTTCATCCCTACCA 1250
 pMetLysSerLeuGluAsnLysSerLeuGluMetThrPheIleProThrI
 1251 TTGAAGATCTGGAAGGCTCTTGTGTCAGGCTAAGTTACATATTGAT 1300
 leGluAspThrGlyLysAlaLeuValCysGlnAlaLysLeuHisIleAsp
 1301 GACATGGAATTCGAACCAACAAAGGCAAGTACGCAACACTTTATGT 1350
 AspMetGluPheGluProLysGlnArgGlnSerThrGlnThrLeuTyrVa
 1351 CAATGTGCTCCCGAGAGATCAACCGCTCTGGTCAACCCCTCTCCATCC 1400
 lAsnValAlaProArgAspThrThrValLeuValSerProSerSerIleLe
 1401 TGGAGGAAGGCACTCTGTGAATATGACATGCTTGAGCAGGCTGCTCT 1450
 suGluGluGlySerSerValAsnMetThrCysLeuSerGlnGlyPhePro
 1451 GCTCCGAAAATCTGTGGAGCAGGAGCTCTTACCGGGAGCTACAGCC 1500
 AlaProLysIleLeuTrpSerArgGlnLeuProAsnGlyGluLeuGlnPr
 1501 TCTTCTGAGAATGCAACTCTACCTTAATTTCTACAAAATGGAGATT 1550
 sLeuSerGluAsnAlaThrLeuThrLeuIleSerThrLysMetGluAspS
 1551 CTGGGGTTTATTTATGTGAAGGAATTAACAGGCTGGGAAGGACAGAA 1600
 sGlyValTyrLeuCysGluGlyIleAsnGlnAlaGlyArgSerArgLys

【図 3 C】

1601 GAAGTGAATTAATTATCAAGTTACTCCAAAAGACATAAACTTACAGC 1650
 GluValGluLeuIleIleGlnValThrProLysAspIleLysLeuThrAl
 1651 TTTTCCTTCTGAGAGTGTCAAAGAAGGAGACACTGTCTATCTCTTGTA 1700
 aPheProSerGluSerValLysGluGlyAspThrValIleIleSerCysT
 1701 CATGTGAAATGTTCCAGAAACATGATATACTCTGAAGAAAAAGCGAG 1750
 hrCysGlyAsnValProGluThrTrpIleIleLeuLysLysLysAlaGlu
 1751 ACAGGAGACACAGTACTAAAACTCTATAGATGGCGCTTATCATCTCGAAA 1800
 ThrGlyAspThrValLeuLysSerIleAspGlyAlaTyrThrIleArgLy
 1801 GECCEAGTTGAAGGATCGCGGAGTATATGAATGTGAATCTAAAAACAAAG 1850
 sAlaGlnLeuLysAspAlaGlyValTyrGluCysGluSerLysAsnLysV
 1851 TTGGCTCACAAATTAAGAAGTTTAACTTGAATGTTCAAGGAGAGAAAAC 1900
 sGlySerGlnLeuArgSerLeuThrLeuAspValGlnGlyArgGluAsn
 1901 AACAAAGACTATTTTCTCTGAGCTTCTGCTGCTCTATTTGCTATCTTC 1950
 AsnLysAspTyrPheSerProGluLeuValLeuTyrPheAlaSerSe
 1951 CTTAATAATACCTGCCATGGAATGATAATTACTTTGCAAGAAAAGCCA 2000
 rLeuIleIleProAlaIleGlyMetIleIleTyrPheAlaArgLysAlaA
 2001 ACATGAAGGGGTATATAGTCTTGTAGAAGCAGCAAAATCAAAAGTGTAG 2050
 snMetLysGlySerTyrSerLeuValGluAlaGlnLysSerLysVal
 2051 CTAATGCTTGATATGTTCACTGAGACACTATTTATCTGTGCAAAATCCT 2100
 2101 TGATAGTCTCATCATCTCTTGAAGAAAACAAAGAGCTGAGAGGCAGACT 2150
 2151 TCCCTGAATGTATGAACTTGGAAAGAAATGCCCATCTATGTCCCTTGCT 2200
 2201 GTGAGCAAGAGTCAAAGTAAACTTGCTGCTGGAAGACAGTAACCTGCC 2250
 2251 ATCAAGATGAGAGAACTGGAGAGTCTCTGTATGTATATACAAATACA 2300
 2301 TAATTTGTACAGATGAAATTAATTAATGTCATAGCAAGATGCTTAAA 2350
 2351 ATAGCAACACTCTATATTTAGATTGTAAATAAATAGTGTGCTTGAC 2400
 2401 TATTATAATTTAATGCATGTTAGGAAAAATTCACATTAATATTGCTGAC 2450
 2451 AGCTGACCTTTGTCATCTTTCTCTATTTATTCCTCTTACAAAATTTT 2500
 2501 ATTCTATATAGTTTATTGACAAATATTCAGGTTTGTAAAGATGCCGG 2550

【図 4 A】

1 CACTGGCTTCAGGAGCTGAATACCTCCAGGCACACAGGTGGGACAC 50
 51 AAATAAGGGTTTGGAAACCACTATTTCTCATCAGCAGCAACTTAAAA 100
 M
 101 TGCCCTGGGAAGATGGTCTGATCTCTGGAGCCTCAATATACTTTGGATA 150
 stProGlyLysMetValValIleLeuGlyAlaSerAsnIleLeuTrpIle
 151 ATGTTTTCAGCTTCTCAAGCTTTTAAATCGAGACACCCAGAAATCTAG 200
 MetPheAlaAlaSerGlnAlaPheLysIleGluThrThrProGluSerAr
 201 ATATCTGCTCAGATTGGTGAATCTCTCATGACTTGCAGCACCACAG 250
 gTyrLeuAlaGlnIleGlyAspSerValSerLeuThrCysSerThrThrG
 251 GCTGTGAGTCCCACTTTTCTCTGGAGAACCCAGATAGATAGTCCACTG 300
 lyCysGluSerProPhePheSerTrpArgThrGlnIleAspSerProLeu
 301 AATGGGAAGGTGACGAATGAGGGGACCACATCTACGCTGACAAATGATCC 350
 AsnGlyLysValThrAsnGluGlyThrThrSerThrLeuThrMetAsnPr
 351 TGTAGTTTGGGAACCAACACTCTTACCTGTGCACAGCAACTTGTGAAT 400
 ovalSerPheGlyAsnGluHisSerTyrLeuCysThrAlaThrCysGluS
 401 CTAGGAAATGGAAAAAGGAATCCAGGTGGAGATCTACTCTTTTCTTAAG 450
 erArgLysLeuGluLysGlyIleGlnValGluIleTyrSerPheProLys
 451 GATCCAGAGATTCAATTGAGTGGCCCTCTGGAGGCTGGGAACCGCATC 500
 AspProGluIleHisLeuSerGlyProLeuGluAlaGlyLysProIleTh
 501 AGTCAAGTGTTCAGTTGCTGATGATACCACTTTCAGAGCTGGAGATAG 550
 rValLysCysSerValAlaAspValTyrProPheAspArgLeuGluIleA
 551 ACTTACTGAAAGGAGATCTCTCATGAAGAGTCAAGAAATTTCTGGAGGAT 600
 sLeuLeuLysGlyAspHisLeuMetLysSerGlnGlyLysLeuGluAsp
 601 GCAGACAGGAAGTCCCTGGAAACCAAGAGTTTGGAGTAACCTTACTTC 650
 AlaAspArgLysSerLeuGluThrLysSerLeuGluValThrPheThrPr
 651 TGTCTTGAAGATATTTGGAAAAGTTCTTGTGTCGAGCTTAAATACACA 700
 ovalIleGluAspIleGlyLysValLeuValCysArgAlaLysLeuHisI
 701 TTGATGAATGAGATTCTGTGCCACAGTAAGGAGGCTGTAAAGAAATG 750
 leAspGluMetAspSerValProThrValArgGlnAlaValLysGluLeu

【図 4 B】

751 CAAGCTACATATACCCCAAGAATACAGTATTCTGTGAATCCATCCAC
GlnValTyrIleSerProLysAsnThrValIleSerValAsnProSerTh
801 AAAGCTGCAAGAAGGTGGCTCTGTGACCATGACCTGTCCAGCGAGGGTC
rLysLeuGlnGluGlyGlySerValThrMetThrCysSerSerGluGlyL
851 TACCAGCTCCAGAGATTTCTGGAGTAAGAAATTAGATAATGGGAATCTA
suProAlaProGluIlePheTrpSerLysLysLeuAspAsnGlyAsnLeu
901 CAGCACCTTTCTGGAATGCAACTCTCACCTTAATTGCTATGAGGATGGA
GlnHisLeuSerGlyAsnAlaThrLeuThrLeuIleAlaMetArgMetG1
951 AGATTCTGGAATTTATGTGTGTAAGAGATTAAATTTGATTGGGAACAA
uAspSerGlyIleTyrValCysGluGlyValAsnLeuIleGlyLysAsnA
1001 GAAAAGAGGTGGAAATTAATTTCTCAAGAGAAACATTACTGTTGAGATC
rgLysGluValGluLeuIleValGlnGluLysProPheThrValGluIle
1051 TCCCTGGACCCCGGATTGCTGCTCAGATTGGAGACTCAGTCATGTTGAC
SerProGlyProArgIleAlaAlaGlnIleGlyAspSerValMetLeuTh
1101 ATGTAAGTGTCAAGGCTGTGAATCCCCATCTTCTCTGGAGAACCCAGA
rCysSerValMetGlyCysGluSerProSerPheSerTrpArgThrGlnI
1151 TAGACAGCCCTCTGAGCGGGAAGGTGAGGAGTGAAGGACCAATCCACG
leAspSerProLeuSerGlyLysValArgSerGluGlyThrAsnSerThr
1201 CTGACCTGAGCCCTGTGAGTTTGGAGACCAACACTCTTATCTGTGCAC
LeuThrLeuSerProValSerPheGluAsnGluHisSerTyrLeuCysTh
1251 AGTGACTTGTGACATAAGAACTGGAAAGGGAATCCAGGTGAGGCTCT
rValThrCysGlyHisLysLysLeuGluLysGlyIleGlnValGluLeuT
1301 ACTCATTCCCTAGAGATCCAGAAATCGAGATGAGTGGCTCGTGAAT
yrSerPheProArgAspProGluIleGlnMetSerGlyGlyLeuValAsn
1351 GGGAGCTCTGTCTACTGTAAAGTGCAGGTTCTAGCTGTATCCCCCTGA
GlySerSerValThrValSerCysLysValProSerValTyrProLeuAs
1401 CCGCTGAGAGATTGAATTAAGTGAAGGAGACTATTCTGAGAGATATAG
pArgLeuGluIleGluLeuLeuLysGlyIleThrIleLeuGluAsnIleG
1451 AGTTTGTGAGGATACGATATGAATCTCTAGAGAACAAAGTTTGAA
luPheLeuGluAspThrAspMetLysSerLeuGluAsnLysSerLeuGlu
1501 ATGACCTTCATCCCTACCAATGAAGATCTGGAAGAGCTCTTGTGTTCA
MetThrPheIleProThrIleGluAspThrGlyLysAlaLeuValCysG1

【図 4 C】

1551 GGCTAAGTTACATATTGATGACATGGAATTCGAACCAACAAAGGCAGA
AlaLysLeuHisIleAspAspPheGluPheGluProLysGlnArgGlnS
1601 GTACGCAAACTTTATGTCAATGTTGCCCCAGAGATACACCGTCTTG
erThrGlnThrLeuTyrValAsnValAlaProArgAspThrThrValLeu
1651 GTACGCCCTTCTCCATCTCTGGAGGAAGGAGTTCTGTGAATATGACATG
ValSerProSerSerIleLeuGluGluGlySerSerValAsnMetThrCy
1701 CTTGAGCCAGGGCTTCTCTGCTCCGAAATCTCTGTGAGCAGGCAGCTCC
sLeuSerGlnGlyPheProAlaProLysIleLeuTrpSerArgGlnLeuP
1751 CTAACGGGAGCTACAGCTCTTCTGTGAGAAATGCAACTCTCCTTAAT
roAsnGlyGluLeuGlnProLeuSerGluAsnAlaThrLeuThrLeuIle
1801 TCTACAAAATGGAAGATTCTGGGGTTTATTATGTGAAGCAATTAACCA
SerThrLysMetGluAspSerGlyValTyrLeuCysGluGlyIleAsnG1
1851 GGCTGGAAGACAGAAAGCAAGTGAATTAATATCCAAAGTTACTCCAA
AlaGlyArgSerArgLysGluValGluLeuIleGlnValThrProL
1901 AAGACATAAACTTACAGCTTTCTCTGTGAGAGTGTCAAAGAGGAGAC
ysAspIleLysLeuThrAlaPheProSerGluSerValLysGluGlyAsp
1951 ACTGTCTATCTCTCTGTACATGTGGAATGTTCCAGAAATATGGAAT
ThrValIleIleSerCysThrCysGlyAsnValProGluThrTrpIleI1
2001 CCTGAAGAAAAAGCGGAGACAGGAGACACAGTACTAAATCTATAGATG
sLeuLysLysLysAlaGluThrGlyAspThrValLeuLysSerIleAspG
2051 CGCTCTATACCATCCGAAAGGCCAGCTTGAAGGATCGCGAGTATATGAA
lyAlaTyrThrIleArgLysAlaGlnLeuLysAspAlaGlyValTyrGlu
2101 TGTGAATCTAAAAACAAGTTGGCTCACAATTAAGAAGTTTAACACTTGA
CysGluSerLysAsnLysValGlySerGlnLeuArgSerLeuThrLeuAs
2151 TGTTCAGGAAGAGAAAACAACAAGACTATTTCTCTGAGCTCTCTCG
pValGlnGlyArgGluAsnAsnLysAspTyrPheSerProGluLeuLeuV
2201 TGTCTATTATTGTCATCTCTTAATTAATCTGCAATGGAATGATAATT
alleuTyrPheAlaSerSerLeuIleIleProAlaIleGlyMetIleIle
2251 TACTTTGCAAGAAAGCCAACTAGAGGGGTATATAGTCTTGTGAGAGC
TyrPheAlaArgLysAlaAsnMetLysGlySerTyrSerLeuValGluAl
2301 ACAGAAATCAAAAGTGTAGCTAATGCTGATATGTTCACTGGAGACACT
agLysSerLysVal

【図 5】

1 FKIEITPESRYLAQIGDSYSLCTSTGCRSPFPSTRTQIDSLNCK-----VTRGTTSTLTNNPVSFCNHSILCTATCESKLEGI
2 QVEITSPFPPRIHLSGLP-RAGCFITVKSVA-DVTPFORLEIDLLKQDLNKSOFLEADNRSLKSLSVPTTPTVIEDIGKVLVCRKLHIDENDSVPTVQAVKL
3 QVTISPMNTVISVNFSTKL-ORCGSVTHTCSSGLPAPKIPUSKLDNKLQ-----LSGNATLTL-IANNHDSG-IITVCGVNLIGKNNKVELIQV
4 FPPDPIEMSGCL-VNCSSTVYSCKVP-SVTPLOMLKILKAGSTILNINPLEDTNKSLENKSLNITPTIEDTKALVQAKLIDONEPEPKQKSTQTL
5 TVVWAPRDTVLVSPSSIL-RECSVNTCLSGFPAPKILYSNLMKGLQ-----LSGNATLTL-ISTKHDSG-VTLCEGHNQGRSKREVELIQV
6 TPKDKILTAFFSESV-KRGDTVITISCTQW--PRT-VIILKKAATGDTVL-----SIDGATTIRKAQLKADG-VTECSKRWVGSQSLSLTLVQGRN
NKDTFSPPELLVLTFASSLIIPAIENIIPANKANNKSTSLVRAKSKV

【図 6】

1 FKIEITPESRYLAQIGDSYSLCTSTGCRSPFPSTRTQIDSLNCK-----VTRGTTSTLTNNPVSFCNHSILCTATCESKLEGI
2 QVEITSPFPPRIHLSGLP-RAGCFITVKSVA-DVTPFORLEIDLLKQDLNKSOFLEADNRSLKSLSVPTTPTVIEDIGKVLVCRKLHIDENDSVPTVQAVKL
3 QVTISPMNTVISVNFSTKL-ORCGSVTHTCSSGLPAPKIPUSKLDNKLQ-----LSGNATLTL-IANNHDSG-IITVCGVNLIGKNNKVELIQV
4 FTVKISPPRIAAQIGDSYSLCTSTGCRSPFPSTRTQIDSLNCK-----VTRGTTSTLTNNPVSFCNHSILCTATCESKLEGI
5 QVELYSPFPPRIEMSGCL-VNCSSTVYSCKVP-SVTPLOMLKILKAGSTILNINPLEDTNKSLENKSLNITPTIEDTKALVQAKLIDONEPEPKQKSTQTL
6 TVVWAPRDTVLVSPSSIL-RECSVNTCLSGFPAPKILYSNLMKGLQ-----LSGNATLTL-ISTKHDSG-VTLCEGHNQGRSKREVELIQV
7 TPKDKILTAFFSESV-KRGDTVITISCTQW--PRT-VIILKKAATGDTVL-----SIDGATTIRKAQLKADG-VTECSKRWVGSQSLSLTLVQGRN
NKDTFSPPELLVLTFASSLIIPAIENIIPANKANNKSTSLVRAKSKV

【図7】

1 GCATGCCCA CCATGCCAG CTAATTTTGT ATTTTASTA GAGATGDCGT TTCTCATGT TGTCTAGCT GGTCTTGAAC TCCDGCCTC AGGTGATCCG
 101 CTGCTCTCG CCTCCCAAG TGTGMAAT ACAGGCTBA GCACTGTTC CTGCTCTCT TTTATTTTT TTACTGAAC AAGCATGAA ACTTCCAG
 201 ATGTAAATAT CTATTTCCTA TTTTCTTTT TTTAAATAA GCAATATTT TAACCATTT AGTGTAGAT ATTATTTTA GATAATATT TAAITTAGGC
 301 ATACTGCGC TGCAAAATCT GAGATTAAT ATCTAGCTTG TGAATCATT CTCTGTGAA CAGTCATGT TAAATATTT GAAITGCGAG GTGAAAAGG
 401 AAGAAAAAT GAGTATGAT TGTATATCCA CAGCTATBA TGAAGATTT AAGGTATAG ACTATGATG ACAAACCTAT TCTGTCTTC CTCTGTCTC
 501 TGAATTTCTA ATTACTACA CAATACATG AGAGACATA CTACACACA AATTTTACA ACTTTTAAA GACATAGAT TTATGTTATT ATATTTAAA
 601 ATCATCATT TTTGTATAT TAATAAATV GCATATACA TATAAGGCA TGAAGAGG TGAAGTACT TCAAGACATA GATTTCTGA CATCATTTA
 701 ATTTAAGCA TGTGMAAT TCCGAGAAA GTTTTMAAT GCAATTTT ^{NP-kappa 2} ~~ATTTCTTT~~ TACTGATGT GGCATATC CTCTATTAT TCACAGGAG
 801 CAATCCCTCC ^{cdna clone 41} ~~TATAAAGG~~ CCTCAGCCA AGTATGTC AGCTGTTCT GGTGACTTC ~~ACATCAAGC~~ TCTATACTG ~~AGCTGAGCA~~ ~~GAGGACAGC~~
 901 ~~TGATACCAAG~~ ~~CTGAGATC~~ ~~CTGTGTTGA~~ ~~AGAGTCTT~~ ~~CTGAAAGG~~ ~~TAAATGAGA~~ ~~ACCTTTATA~~ ~~AGGCAAGCT~~ ~~CGGACATGA~~ ~~AACACAGATA~~
 1001 TGAAGAGGC CTCTAATAA AAACCATC TGTACAGCT CTATTTGAT TGTAGCTAA ACCTGCTTT TCTCTTTGAC CTAAATAAG AAGTCTTAA
 1101 AATTGTTTA TTTATTTGAT TAACTCTGA AATAAATAT ATTGACTAG TGTCTTTTC CCAAAATCTT AGGATGCTG CTAAACATC ATGATAGAT
 1201 AATGTAACT GCTACCAAG ATTTCTCTT TTAATCTAT TGTATTTTA TCTGCTTTC ^{exon 2} ~~AAATATTTT~~ ~~AGGCTTAA~~ ~~CTTGTGCTGA~~ ~~AAAGACTCT~~
 1301 ^{translation initiation codon} ~~TAAATCTAT~~ ~~ATTTCTCTT~~ ~~AGTCTCTCT~~ ~~AGTCTCTCT~~ ~~TGTGATAT~~ ~~GATGATAT~~ ~~AGAGCAAT~~ ~~TTCTATCT~~ ~~CTGATATAT~~ ^{intron 2} ~~ATATTTGAGA~~
 1401 CTAAATATC CTCTCTCTC TGGGCTGTC CTGACAGGA TATCTGACG CATCTTTGAC CTCTACCTG AATGATTTT TCCCTGAGC TGGGATCAT
 1501 TACTTACCT CTGTGCTCT CCGTTTCTT AAGTGAAG TGTGATCCG TTAACCTGA GATCGA

【図8】

1 AAGTTEATT CTGCAATCAG CATGTCTCT TATCTTCCA GTAAGATAG CCTTTTGAG TGAAGATGA GGAAGAGCT GTATTTTATA GTCTTGGAG
 101 TGTCTTITTT TCCCAAGGA GAGAGAGGAG CTTCAGCAGT GAGAGCACT GAGGAGCTTA ATAGTGAAC TTGCTGAGT GTCTGTTAAA CTTTTTCCT
 201 TGGCTCTGCT ^{NP-kappa 2} ~~CTGCTCTCT~~ ^{NP-kappa 2} ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~
 301 ^{cdna clone 41} ~~ATCTGCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~
 401 ~~AATTTAAT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~ ~~CTGCTCTCT~~
 501 ATGTAGCAT TCAATTTAG CCTGTCTTT GCTTCAATC AGTTTTCGA TAGTATGAA GTAGAGACAG TAGGATTTA AACAGTAGGA AAGATTAAT
 601 TAGTATCAT TTAATATGC AATGATTTT TGTATATAC CATGTACTG TCATAGTTAG AGCTGAAAT TGAATGTTTT GGTATCTTT TTTCCAAAGG
 701 CAATTAAGTA ATTTGATTC TGTCTGAT GGTCTGCT CTCTATTTT CTATCTTGA CAATGAGGT AACTTAGCA AATAACAAA CAGCTTTGAT
 801 AATTAAGCA CAGGTTGGA ACTGAAAT CTCTCTACT AGATGATTC CATAACTTT TTTGCACTG ACTTGGTGC TTTTGGCTA CTTTGCAGTT
 901 AGTTTGAAG AGCTTAAAG AGAGATCAG CTATCATAT TTAGACATT ATACAGAGAA GAGGAGGAG AATCTAGAC AACTAGTGG TAAATTTGCT
 1001 TGTGCTTTT TTTCTTTTG CAGTGAAG ^{exon 2} ~~CT~~

【図9C】

1751 GTGAAAGCACTGTGCTCCAGTGGGACTTTGTTGTTGGATTCTCACA 1800
 1801 GCTTGGCTCCTGACAAAGGTGAGGAGGCGAGTCCACAGGGGCGGCTGA 1850
 1851 CTCTTTTCAAGTACTATCTGTTCCCTGCTCTGTTGAATGGAAGCAAG 1900
 1901 TGTGGAATGCTCTTGGAGGAACTTAAGATGAATACATGCGGTACCTC 1950
 1951 ACTTTACATAAGAAATGTATTCCTGAAAGCTGCATTAAATCAAGTCCC 2000
 2001 AAATTCATTGACTTAGGGAGTTCACTATTTAATGAAACCTATGAGAA 2050
 2051 TTTATCCCTTTACAAATGGAATCACTCATCTCTAATTTGTTTCTCTGTC 2100
 2101 TTTATGTTTTTCTATAACCTGGATTTTTTAAATCATATTAAATTAACGA 2150
 2151 TGTGAAATTAAGAAAGGCGGCGC 2175

【図 9 A】

```

1  GCGGCGCGCGCTCTCCAGCGCTGCGGACGCGCTGGCGAGCGGAGCGCG  50
51  CTGCGCTGTTGCGCGCATCGCGGCGCTGCGGAGCGGCGCGCGCGCG  100
    Na tGlyAlaProTrpGlySerProThrAlaAla
101  GCGGCGCGCGCGCGCGCTGCGGCGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCT  150
    aGlyGlyArgArgGlyTrpArgArgGlyArgGlyLeuProTrpThrValC
151  GTGTGCTGCGCGCGCGCGCGCTGCGGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCT  200
    ysValLeuAlaAlaAlaGlyLeuThrCysThrAlaLeuIleThrTyrAla
201  TGCTGGGCGCGCTGCGGCGCGCGCTGCGGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCT  250
    CysTrpGlyGlnLeuProLeuLeuProTrpAlaSerProThrProSerAr
251  ACGGCGCGCGCGCTGCGGCGCGCGCTGCGGCGCGCGCTGCGGAGCGCG  300
    gProValGlyValLeuLeuTrpTrpGluProPheGlyGlyArgAspSerA
301  CCGGCGCGCGCGCGCTGCGGCGCGCGCTGCGGCGCGCGCTGCGGAGCG  350
    laProArgProProProAspCysArgLeuArgPheAlaSerGlyCys
351  CGCTGCTGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCTGCGGCGCGCGCTGCTTT  400
    ArgLeuLeuThrAspArgAlaSerTyrGlyGluAlaGlnAlaValLeuPh
401  CGACCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCGCGCGCGCTGCGGCGCGCGCTG  450
    eHisHisArgAspLeuValIysGlyProProAspTrpProProTrpG
451  GCATCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCGCGCGCGCTGCGGCGCGCTG  500
    lyIleGlnAlaHisThrAlaGlnGluValAspLeuArgValLeuAspTyr
501  GAGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCGCGCG  550
    GluGlnAlaAlaAlaAlaGlnAlaAlaAlaThrSerSerProArgFr
551  CCGGCGCGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCG  600
    oProGlyGlnArgTrpValTrpPheAsnPheGlnSerProSerHisSer?
601  CGCGCTGCGGAGCGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCGCGCGCTGCTAC  650
    roGlyLeuArgSerLeuAlaSerAsnLeuPheAsnTrpThrLeuSerTyr
651  CGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCGCGCG  700
    ArgAlaAspSerAspValPheValProTyrGlyTyrLeuTyrProArgSe
701  CGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCGCG  750
    rHisProGlyAspProProSerGlyLeuAlaProProLeuSerArgLysG
751  AGCGCGCTGCGGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  800
    lngLeuValAlaTrpValValSerHisTrpAspGluArgGlnAlaArg

```

【図 9 B】

```

801  GTGCGCTACTACCACTGAGCGCAACATGTGACCGTGGACGTGTTCGG  850
    ValArgTyrTyrHisGlnLeuSerGlnHisValThrValAspValPheGl
851  GCGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCGCGCG  900
    yArgGlyGlyProGlyGlnProValProGluIleGlyLeuLeuHisThrV
901  TGGCGCGCGCTCAAGTTCTACTGCGCTTGGAGAACTGGCAGCACCTGGAT  950
    alAlaArgTyrLysPheTyrLeuAlaPheGluAsnSerGlnHisLeuAsp
951  TATATCACCGAGAAAGCTCTGGCGCAACCGCTTCTGCGTGGGCGGTGCC  1000
    TyrIleThrGluLysLeuTrpArgAsnAlaLeuLeuAlaGlyAlaValFr
1001  GGTGCTGCTGGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCTGCGGAGCGCGCG  1050
    oValValLeuGlyProAspArgAlaAsnTyrGluArgPheValProArgG
1051  GCGCGCTTCTACCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCTGCGGAGCGCGCG  1100
    lyAlaPheIleHisValAspAspPheProSerAlaSerSerLeuAlaSer
1101  TACCTGCTTTTCTGCGCGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCGCGCT  1150
    TyrLeuLeuPheLeuAspArgAsnProAlaValTyrArgArgTyrPheHi
1151  CTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCGCT  1200
    eTrpArgArgSerTyrAlaValHisIleThrSerPheTrpAspGluProT
1201  GGTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCGCG  1250
    rpCysArgValCysGlnAlaValGlnArgAlaGlyAspArgProLysSer
1251  ATACGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCG  1300
    IleArgAsnLeuAlaSerTrpPheGluArg
1301  AGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCGCG  1350
    TCTCTGCTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCG  1400
    GCTCTATGCGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCG  1450
    TGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCG  1500
    TGTGCTGATGGCGCATCTGTTTGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCT  1550
    ACCTTGTAACTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  1600
    AGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  1650
    TGCAGCTTCCAAATCTCATACAACTTCCGCGATTCACGTTTCTGCG  1700
    ACCAAGCTGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  1750

```

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード ⁸ (参考)
C 0 7 K	16/18	C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
	19/00		
C 1 2 N	1/15	C 1 2 N 1/15	
	1/19	1/19	
	1/21	1/21	
	5/10		
C 1 2 P	21/02	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 Q 1/02	
// C 1 2 P	21/08	C 1 2 P 21/08	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		5/00	A

(72)発明者 ロップ, ロイ アール
アメリカ合衆国、マサチューセッツ
02090、ウェストウッド、ローリング ス
トリート 62

(72)発明者 ゲルツ, スーザン イー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ
01890、ウインチェスター、ポンド スト
リート 195

(72)発明者 オズボーン, ローレリー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ
02146、ブライトン 31、エングルウッド
アベニュー 39

(72)発明者 ベンジャミン, クリストファー デー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ
01915、ベバリー、オーク ヒル レーン
2

(72)発明者 ローザ, マーガレット デー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ
01890、ウインチェスター、ブローブ ス
トリート 32

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA05
CA11 CA12 DA02 FA02 GA21
HA17
4B063 QA01 QA06 QA18 QQ08 QQ79
QR48 QR77 QX01
4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CA20
CC24 DA01 DA13
4B065 AA90X AA93Y AB01 CA24
CA44 CA46
4C084 AA13 NA14 ZB11 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
BA41 CA42 DA76 EA22 EA54
FA74

专利名称(译)	内皮细胞 - 白细胞粘附分子 (ELAM) 和参与白细胞粘附的分子 (MILA)		
公开(公告)号	JP2003210186A	公开(公告)日	2003-07-29
申请号	JP2002381188	申请日	2002-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	拜奥根有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物遗传公司		
[标]发明人	ヘッションキャサリンアール ロップロイアール ゲルツスーザンイー オズボーンローレリー ベンジャミンクリストファーデー ローザマーガレットデー		
发明人	ヘッション, キャサリン アール ロップ, ロイ アール ゲルツ, スーザン イー オズボーン, ローレリー ベンジャミン, クリストファー デー ローザ, マーガレット デー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7105 A61K35/16 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61K49/00 A61K51/00 A61P1/00 A61P17/00 A61P29/00 A61P35/00 C07H21/04 C07K7/00 C07K14/00 C07K14/195 C07K14/41 C07K14/435 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/00 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/42 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/00 C12N15/02 C12N15/04 C12N15/09 C12N15/113 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/63 C12N15/70 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12R1/19 C12R1/91 G01N33/00 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/536 G01N33 /543 G01N33/566 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61K47/6849 A61P1/00 A61P17/00 A61P29/00 A61P35/00 C07K14/70564 C07K16/28 C07K16/2836 C07K16/2854 C07K16/4241 C07K16/4258 C07K2317/76 C07K2319/30 C12N15/1138 C12N2310/11 C12N2310/12 Y02A50/473 C07K16/2866		
FI分类号	A61K48/00 A61P29/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/113.140.P C12N15/113.140.Z C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024 /DA02 4B024/FA02 4B024/GA21 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA06 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064 /CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB11 4C084/ZB26 4H045 /AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA54 4H045/FA74		
优先权	07/345151 1989-04-28 US 07/359516 1989-06-01 US 07/452675 1989-12-18 US		
其他公开文献	JP3684228B2		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

要解决的问题：提供一种新颖的方法来检查，诊断，预防和治疗炎症。

编码内皮细胞-白细胞粘附分子 (ELAM) 的DNA序列，产生这种类型分子的方法和基本不含正常结合的动物蛋白 (包括特定分子ELAM1和VCAM1和1b) 的ELAM 将被披露。 还公开了针对ELAM的抗体。 还公开了编码与白细胞粘附 (MILA) 有关的分子的DNA序列，产生这种分子的方法以及基本上不含通常结合的动物蛋白的MILA (包括特异性分子CDX)。 还公开了对MILA具有反应性的抗体制剂。 还公开了鉴定阻断白细胞与内皮细胞结合的分子的方法，阻断白细胞与内皮细胞结合的方法以及检测急性炎症的方法。