

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-99616

(P2004-99616A)

(43) 公開日 平成16年4月2日(2004.4.2)

(51) Int.Cl.⁷

C07K 16/18
A61K 39/395
A61K 51/00
A61P 29/00
// C12N 15/09

F I

C O 7 K 16/18 Z N A
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 K 49/02 C

テーマコード (参考)

4 B O 2 4
 4 C O 8 4
 4 C O 8 5
 4 H O 4 5

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-348879 (P2003-348879)
 (22) 出願日 平成15年10月7日 (2003.10.7)
 (62) 分割の表示 特願2002-137850 (P2002-137850)
 の分割
 原出願日 平成2年4月27日 (1990.4.27)
 (31) 優先権主張番号 345151
 (32) 優先日 平成1年4月28日 (1989.4.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 359516
 (32) 優先日 平成1年6月1日 (1989.6.1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 452675
 (32) 優先日 平成1年12月18日 (1989.12.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 592221528
 バイオジェン インコーポレイテッド
 B I O G E N I N C O R P O R A T E D
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ O 2
 1 4 2、ケンブリッジ、ケンブリッジ セ
 ンター 1 4
 (74) 代理人 100064012
 弁理士 浜田 治雄
 (72) 発明者 ヘッション、キャサリン アール
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ O 2
 1 9 0、サウス ウェイマス、ファウンテ
 イン レーン 9 6

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関与する分子 (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。白血球付着に関与する分子 (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。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核種に結合した V C A M 1 もしくは V C A M 1 b を認識する抗体からなる放射線免疫結合体。

【請求項 2】

前記核種が¹²⁵I、⁹⁰Y および¹⁸⁶Re よりなる群から選択される請求の範囲第 1 項に記載の放射線免疫結合体。

【請求項 3】

細胞毒素に結合した V C A M 1 もしくは V C A M 1 b を認識する抗体からなる免疫毒素。

10

【請求項 4】

前記細胞毒素がシュードモナス外生毒素である請求の範囲第 3 項に記載の免疫毒素。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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、およびこれらを発現に際しコードする D N A 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 D N A 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、D N A 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方法に関するものである。

20

【背景技術】

30

【0002】

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。临床上、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 [ベビ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。

40

【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しうる。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う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

50

。ARDSにおいては、PMN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、PMN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〕。

10

【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-B₄（LTB₄）、相補因子5a（C5a）およびホルミル-メチオニル-ロイシル-フェニルアラニン（FMLP）を包含する。これらの薬剤は、LeuCAMと呼ばれる1群の蛋白を活性化させる。LeuCAMはCD11およびCD18蛋白の二量体である。LeuCAMの1種、すなわちCD11a/CD18（LFA1とも呼ばれる）は、ICAM1（細胞間付着分子1）とも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、LeuCAMに対するモノクロ-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〕。

20

【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〔ベピラッカ等、1987a；ベピラッカ等、1987b；およびベピラッカ等、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〔シモンス等、1988；スタウントン等、1988；およびベピラッカ等、1987b〕。ICAM1は多くの細胞型で見出だされ、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〔ボバー等、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ボバー、1988〕。

30

【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（HUEC）に対するPMN付着を部分的に阻止するモノクロ-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HUEC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〔ベピラッカ等、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ボバー、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

40

50

と思われる。重要なことに、細胞表面における E L A M 1 の存在は急性炎症の自然経過を辿り、刺戟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]。

【 0 0 1 0 】

間接的証拠は、他の E L A M 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 P M N、単核細胞およびリンパ球の結合を誘発するが、E L A M 1 に対する M o a b s は P M N 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、E L A M 1 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 E L A M 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 V C A M 1 および V C A M 1 b と称する E L A M 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、E L A M は 1 群の分子と見なすことができる。

10

【 0 0 1 1 】

多くの証拠が示すように、E L A M は腫瘍侵蝕、転移およびウィ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バー、1988]。

【 0 0 1 2 】

E L A M を発現する細胞に対する白血球の付着は、白血球上に E L A M 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 I C A M 1 リガンド、すなわちリンパ球機能に関連した抗原 1 (L F A 1) である。L F A 1 は、 $\beta 2$ インテグリンもしくは C D 1 1 / 1 8 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、I C A M 1 / L F A 1 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 (P M N) 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、E L A M 1 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 (M I L A) の分離につき説明する。C D X と称する分子は約 150 k D の蛋白であって、H L - 60 細胞から分離された。C D X を認識するモノクローナル抗体は、E L A M 1 - 発現性細胞に対する P M N および H L - 60 細胞の結合を阻止する。さらに、C D X は E L A M 1 に付着することが知られた種類の白血球細胞に存在し、E L A M 1 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 C D X は或る種の白血球で発現される分子であって、E L A M 1 - 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、C D X をコードする c D N A の分離および配列決定についても説明する。

20

30

【 0 0 1 3 】

さらに、V C A M 1 および V C A M 1 b リガンド、すなわち V L A 4 の同定についても説明する [ヘルマーおよびタカダ、E P 330 506 号]。V L A 4 の α^4 および β_1 サブ単位に特異性の抗体は、V C A M 1 に対する V L A 4 - 発現性細胞の結合を完全に排除する。

40

【 0 0 1 4 】

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、P M N 付着を阻止するための白血球細胞表面複合体 (C D 1 1 / C D 1 8) に対する M o a b s 結合を含む (アルフォルス等、1987 ; ペダー等、1988 ; およびトッド等、1989)。

【 0 0 1 5 】

内皮細胞媒介の結合、並びに E L A M および M I L A (E L A M リガンドを含む) に基

50

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。E L A M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E L A M発現は構成的でなく誘発されるので、E L A M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、E L A M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E L A M 1はP M Nを結合するのに対し、V C A M 1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】

E L A M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E L A MおよびM I L 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D N A配列を分離すると共に、その生産のための組換D N A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。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

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關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 (E L A M) を発現に際しコードするD N A配列、E L A MのためのゲノムD N A配列 (E L A M発現制御配列を包含する)、これらD N A配列を有する組換D N A分子、これらD N A分子により形質転換された単細胞宿主、E L A M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E L A M蛋白を提供する。さらに本発明は、E L A M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關与した分子 (M I L A) を発現に際しコードするD N A配列をも提供する。M I L Aは、E L A Mに直接結合する白血球表面分子、すなわちE L A Mリガンドを包含する。E L A Mリガンドを認識するモノクローナル抗体は、E L A M / E L A Mリガンド結合を直接に阻止することができる。さらにM I L Aは、付着に間接的に關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E L A M / E L A Mリガンド結合を阻止する分子を包含する。この種の分子は、たとえばE L A Mに対する親和性を低下させるようE L A M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、M I L A D N A配列を有する組換D N A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M I L A蛋白、M I L Aの生産方法、並びにM I L A (特にC D X) 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C D XをコードするD N A配列を持った組換D N A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E L A M、E L A Mリガンドを包含するM I L 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P M N結合の阻止方法をも提供する。さらに、E L A M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、E L A M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、E L A M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、E L A MもしくはE L A Mリガンドを認識する抗体に対する抗 -

10

20

30

40

50

イディオタイプ抗体を使用する。

【発明の説明】

【0021】

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。

10

【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Fab、F(ab')₂もしくはdAb。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。

20

【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。

30

【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ELAM mRNA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。

40

【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ELAM 1によりコードされたポリペプチドをVCAM 1およびVCAM 1 b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。

50

何故なら、これらは炎症性サイトキシン $IL-1\beta$ 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、たとえばヒト内皮細胞も $ELAM$ を産生することが知られている [コトランおよびポパー、1988]。

【0031】

次の工程は、 $ELAM$ を発現する細胞（この場合には $IL-1\beta$ - 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 $cDNA$ プロープ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 $cDNA$ プロープ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 $cDNA$ プロープを作成した。次いで、当業界で周知された技術を用いて、抜取 $cDNA$ プロープにより、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。 $\lambda GT11$ 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、燐酸カルシウム、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 [アルッフォおよびシード、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

10

20

30

40

50

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ォ、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 [ベピラッカ等、1985] またはヒト B-リンパ球状細胞ライン RAMOS [アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ATCC 寄託番号 CRL 1596、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、ELAM 1 (HL-60 細胞に対する付着により選択) および VCAM 1 (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。

10

【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 4 kb 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、ELAM 1 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。

20

【0039】

IL-1 β -誘発 HUVEC cDNA 保存物を VCAM 1 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、VCAM 1 b に関する cDNA を分離した。VCAM 1 b は VCAM 1 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用いて、ELAM 1 並びに VCAM 1 および 1 b 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。

30

【0041】

上記 DNA 配列から ELAM 1、VCAM 1 および VCAM 1 b 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。

40

【0042】

さらに ELAM 1 並びに VCAM 1 および 1 b 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 ELAM 1 または VCAM 1 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、ELAM 1 および VCAM 1 の両遺伝子の 5' 未転写および未翻訳領域の部分を有するクローンを得た。

【0043】

ELAM 1 および VCAM 1 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べ

50

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】

VCA M1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-VCA M1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)という観察と組合わせて、これはVCA M1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、VCA M1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VCA M1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、VCA M1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、VCA M1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】

VCA M1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VCA M1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ニ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。VCA M1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、VCA M1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]。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 8 】

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 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 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、たとえばシュー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 $V C A M 1$ および $1 b$ 或いはこれらを認識する抗体と結合させて、 $V C A M 1$ リガンド（たとえば $V L A 4$ ）もしくは $V C A M 1$ を発現する細胞を標的とすることができる。

【 0 0 4 9 】

新規な $E L A M$ 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 $E L A M$ もしくは $M I L A$ の将来の発見も、新規な $T I L$ 治療を可能にする。たとえば $E L A M$ を表面上で発現する腫瘍が見出だされた場合、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 $T N F$ 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（ $T I L$ ）をトランスフェクトし、次いでこれを $I L - 2$ で拡充させる。トランスフェクトされた $T I L$ を患者中に注射すれば、 $T I L$ 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部作用のため放出される〔トーマスおよびシコラ、1989参照〕。 $E L A M$ 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 $T I L$ 治療も考えられる。

10

20

【 0 0 5 0 】

代案の $T I L$ 治療は、或る種の細胞型（特に或る種の癌細胞）が $E L A M$ もしくは $M I L A$ を発現するという事実を利用する。たとえば、結腸癌は $C D X$ を発現するのに対し、黒色腫は $V L A 4$ を発現することが知られている。

【 0 0 5 1 】

ここに開示する $D N A$ 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 $E L A M$ もしくは $M I L A$ 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 $E L A M 1$ の遺伝子（結腸癌の場合）または $V C A M 1$ もしくは $V C A M 1 b$ 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。

30

【 0 0 5 2 】

$H U V E C$ を $T N F$ および $I F N - \gamma$ と一緒に培養すれば、 $V C A M 1$ 発現が $T N F$ 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 $I F N - \gamma$ 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。 $V C A M$ は T 細胞結合を生ぜしめ、 T 細胞はさらに $I F N - \gamma$ 分泌を介し $V C A M$ 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 $V C A M$ 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 $I L - 1$ 、 $T N F$ もしくは $I F N - \gamma$ のようなサイトキンをたとえばモノクロ - ナル抗体で阻止して、サイトキン刺激された $V C A M$ の生産を阻止することからなっている。

40

【 0 0 5 3 】

さらに $E L A M 1$ - 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、 $E L A M 1$ リガンドに関与する $M I L A$ 、 $C D X$ を分離した。分離は第 1 工程として $C D X$ 分子に対するモノクロ - ナル抗体の生産を含んだ。マウスに対し、 $E L A M 1$ に結合することが知られた全 $H L - 60$ 細胞、すなわち $P M N$ - 関連細胞ラインで免疫化した。或いは、 $P M N$ 自身および本発明が示す $U 937$ 細胞を包含する $E L A M 1$ に結合する

50

細胞ラインで免疫化することもできる。さらに、他の E L A M に対する付着に關与する M I L A を分離するため、適する E L A M 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 V C A M 1 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 (R A M O S) および T - リンパ球状細胞ライン (J U R K A T) を同定した。

【 0 0 5 4 】

免疫化されたマウスからの免疫血清が付着分析にて H U V E C に対する H L - 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、C D X に対するモノクローナル抗体 (M o a b s) を産生するハイブリドーマを、付着分析にて誘発 H U V E C に対する H L - 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。

10

【 0 0 5 5 】

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 F a b 断片を生ぜしめこともできる (さらにスケラおよびプリュックスン、1988 参照)。或いは、ワード等 (1989) により記載されたように、単一ドメインの抗体を産生させることもできる。

【 0 0 5 6 】

C D X 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 E L A M 1 を発現する細胞に対する H L - 60 細胞もしくは P M N 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 E L A M 1 に結合する細胞を認識するが、E L A M 1 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 - L F A - 1、抗 - L F A - 3、抗 - C D 4 4、抗 - I C A M、抗 - C D 4 および抗 - L e u 8) 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。

20

【 0 0 5 7 】

これら M o a b s を用いて C D X を分離した。H L - 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 (A R X) に対し μ 鎖 - 特異性ウサギ抗 - マウス I g G を介し結合された抗 - C D X モノクローナル抗体 (α - C D X M o a b s) 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 k D の単一の核酸バンドとして S D S - P A G E 上に出現する。しばしば、90 k D 蛋白バンドが H L - 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 k D バンドは C D X 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 k D) 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 k D 蛋白を N - グリカナーゼで処理した場合、分子量が約 70 k D まで低下した。150 k D 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 k D 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 C D X である。

30

40

【 0 0 5 8 】

さらに当業界で知られた技術を用いて、C D X を発現に際しコードする D N A 配列を分離した。幾つかの実際的技術は、クローン化 D N A 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。C D X を発現する細胞ライン H L - 60 の m R N A から c D N A 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 C D X を発現しない細胞ライン (この場合はヘラ細胞) で C D X D N A 配列につき豊富化させた。細胞ライン C O S 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 C D X を発現する細胞を多数の方法で検査した。

【 0 0 5 9 】

トランスフェクト細胞を α - C D X M o a b s と共に培養し、かつこれらを抗 - マウ

50

ス I g G もしくは I g M 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 C D X を発現する細胞である。このようにして、C D X をコードする 2 . 1 k b の D N A 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 p S Q 2 1 9 と称する。

【 0 0 6 0 】

C D X (または他の M I L A) 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、C D X 発現性細胞を α - C D X M o a b s と共に培養し、次いで M o a b s 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 (F A C S) で分類した。分類された細胞からの D N A 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 D N A を用いて C O S 7 細胞をトランスフェクトし、この手順を単一の C D X - 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。

10

【 0 0 6 1 】

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 E L A M 1 (r s E L A M 1) で被覆されたプレート上に塗抹することである。実施例 V I I I においてはプレートを r s E L A M 1 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、C D X を発現するものである。同様に、他の可溶性 E L A M を用いて、その付着経路に關与するリガンドもしくは M I L A を発現する細胞を分離することができる。

【 0 0 6 2 】

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 Z A P (登録商標) (ストラタジーン) / H L - 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 D N A 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 - C D X モノクロ - ナル抗体で直接にスクリーニングすることができる [ヤングおよびデービス、1983、並びにヤングおよびデービス、1984]。モノクロ - ナル抗体が結合するブランクを釣り上げて、D N A 挿入物をこれらから分離することができる。

20

【 0 0 6 3 】

抗体認識に基づかずに E L A M リガンドを同定すべく使用する他の方法は、C O S 7 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 E L A M 発現性細胞 (たとえば誘発 H U V E C、E L A M - 発現性 C O S 7 細胞、または E L A M - 発現性 C H O 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。

30

【 0 0 6 4 】

C D X (または他の M I L A) をコードする D N A 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 c D N A 保存物のスクリーニングを含む。たとえば C D X に対する固定化抗体または固定化 E L A M 1 を用いる親和性クロマトグラフィーにより充分量の C D X 蛋白を精製すれば、部分アミノ酸配列を決定して、C D X 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 c D N A 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、C D X (M I L A) 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。

【 0 0 6 5 】

C D X のためのコード化配列を含む c D N A 挿入物を分離した後、C D X が E L A M 1 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。C D X 挿入物でトランスフェクトされた C O S 7 細胞は、r s E L A M 1 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、B B 1 1 (すなわち E L A M 1 を認識するモノクロ - ナル抗体と共に事前培養して阻止された。さらに、C D X 挿入物でトランスフェクトされた C O S 7 細胞は、蛍光標識された α - C D X M o a b s と共に培養した後に F A C S 上で陽性分析を示した。さらに C D X トランスフェクトされた C O S 7 細胞は、 α - C D X 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オ、1987]。さらに、約 120 k D の蛋白を沃素化すると共に、A R X 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 I g G を介

40

50

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[ハイネス、1987;マルカントニオおよびハイネス、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[ハイネス、1987およびルオスラ-チ、1988]。VLA4はリンパ性細胞(たとえばBおよびT細胞)、並びに骨髄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MILA DNA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、可溶性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

10

20

30

40

50

を形成させる。

【0071】

r s E L A M / 免疫グロブリン融合蛋白は、r s E L A M 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】

E L A M / 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個の結合部位を有するため）、E L A M / 免疫グロブリン融合蛋白は2個のE L A M を有し、したがって2個のE L A M リガンド結合部位を有する。したがって、これらはE L A M 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。

10

【0073】

第3に、E L A M に結合する分子（たとえば抗 - E L A M 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、E L A M 1 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、E L A M 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、E L A M を用いてこれが結合したE L A M リガンドにおける炭水化物を確認することもできる。

20

【0075】

第5に、E L A M およびM I L A 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C D X とE L A M 1 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、E L A M 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P M N を脱着させる際に関与する白血球付着阻止剤（L A I ）を一時的に確認した[ホイーラー等、1988]。

30

【0077】

第7に、V C A M / I C A M 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E L A M / 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V C A M 1 もしくはV C A M 1 b リガンドおよびI C A M 1 リガンドを結合する能力を持ったものである。V L A 4 およびL F A 1 （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V C A M 1 もしくはV C A M 1 b またはI C A M 1 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。

40

【0078】

最後に、E L A M およびE L A M リガンドDNA配列を用いて、E L A M もしくはE L A M 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m R N A の翻訳をこのm R N A 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】

50

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】

10

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。

20

【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。

30

【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-ナル抗体を含有することもできる。この供給形態は、マイナスフィール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。

40

【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

50

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。

10

【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。

20

【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、シュードモナス、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、R1.1、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。

30

【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。

40

【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容性、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

50

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-イジイオタイプ抗体と称する。或る種の抗-イ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、アングioten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〕。

10

【0094】

この現象を利用して、抗-イ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。

20

【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-イディオタイプ抗体は、バイ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るよう、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。

30

【実施例】

【0097】

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（HUVECs）を単離し、この細胞を予備培養で生育させ、ギムブロン（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HUVECs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-1 β （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：

40

```
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、1 μ g/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

50

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-1 β 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】

10

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-1 β により誘導したHUVECsからcDNAを調製し、これを³²P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】

20

ノーザンブ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）にブロットした。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-1 β 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-1 β 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。12.5 μ g/mlアンピシリンおよび7.5 μ g/mlテトラサイクリンを含む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つのレプリカフィルタ（リフト）を作成した。12.5 μ g/mlアンピシリンおよび7.5 μ g/mlテトラサイクリンを含むLB寒天上でこれらを4時間生育させ、250 μ g/mlクロラムフェニコールを含む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ック・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100 μ g/ml酵母tRNA並びに約 1×10^7 cpmの減算IL-1 β 誘導HUVECcDNAを含有する50mlのブラック・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にてブラック・スクリーン（登録商標）緩衝液で2回、 $2 \times$ SSC、1%SDSで2回、そして $1 \times$ 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によりプローブにハイブリダイズするコロニーを選択

50

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に1つの穴に入れ、 $7.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ テトラサイクリンおよび $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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℃で一晩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。

10

実施例II

ELAM1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ELAM1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COS7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-ゴールドインら、1981)によりサブライブラリを感染させた。感染後48時間に、HL-60細胞(炎症剤により刺激された内皮細胞に結合することが知られたセルライン)に結合する能力により、ELAM1の発現についてCOS7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HL-60細胞をラベルした。すなわち、HL-60細胞を 1×10^7 細胞/mlの濃度でRPMI/10% FCSに再懸濁し、アセトン中の $10 \text{ mg}/\text{ml}$ の保存溶液から $0.1 \text{ mg}/\text{ml}$ の最終濃度でカルボキシフルオロセイン二酢酸を添加した。室温で15分間ラベルしたHL-60細胞と共にCOS7細胞をインキュベートした。RPMI/1% FCSにより細胞を3~4回洗浄した。蛍光顕微鏡により付着性HL-60細胞の群集についてペトリ皿を検査した。HL-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% SDS、 10 mM EDTA、pH 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。これらの形質転換体からコロニーを生育させ、COS7細胞を用い、続いてHL-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ELAMpCDM8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、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定される：

20

30

ELAMpCDM8クローン6/イー・コリMC1061P3受託番号IVI-10204。

【0104】

実施例III

ELAM1配列についてのcDNA挿入物の単離

第2の手順で、IL-1 β 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)。XhoIまたはNotIによりプラスミドを消化し、1%アガロースゲル上で断片を単離した。3 kb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、 ^{32}P 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タイン、1983および1984参照)。

【0105】

40

50

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4 k b 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 1 1 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 1 1 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 . 5 k b 骨格はそのまま残した。p N N 1 1 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 1 4 8 およびp S Q 1 4 9 と呼ぶ。 10

【0106】

実施例 IV

E L A M 1 の D N A 配列

プラスミドp S Q 1 4 8 およびp S Q 1 4 9 の挿入物の全D N A 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。マキサム-ギルバート法(マキサムとギルバート、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c D N A 配列を図1に示す。 20

【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D N A 配列は、公知のD N A 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c D N A 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・ハイジン、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・ハイジンによれば、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。 30

【0109】

E L A M 1 のアミノ酸配列とM B R F およびN E W 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、I g E レセプタヘパチックレクチン、並びに凝集因子I X 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、E L A M 1 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)E G F 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。 40

【0110】

実施例 V

E L A M 1 を認識するモノクローナル抗体

E L A M 1 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ーマを調製した。ただし、I L - 1 β 誘導 H U V E C s に対する H L - 6 0 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 E L A M 1 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 E L A M 1 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ーマを検索した。第 1 に、E L A M 1 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、E L A M 1 動物細胞発現ベクタ、p B G 3 4 1 j o d . E L A M により感染した C H O - D H F R⁺ のラインとした。E L A M 1 をコードする D N A 配列を p C D M 8 クローン 6 から p B G 3 4 1 . j o d の N o t I 部位 (実施例 V I I I、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。E L A M 1 発現 C H O - D H F R⁺ 誘導セルラインは、H L - 6 0 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 H U V E C s 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ーマ培養上澄を検索した。

【0113】

第 3 に、サイトカイン誘導 H U V E C モノレイヤに対する H L - 6 0 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 つのハイブリドーマクローン、B B 1 1 を同定した。B B 1 1 免疫沈殿蛋白質は、E L A M 1 発現 H U V E C s および C O S 細胞に由来する約 1 1 0 k D および 9 6 k D の分子量を有し、E L A M 1 の種々のグリコシル化形態を示す (ベピラッカら、1 9 8 9)。またこれは、E L A M 1 発現 C O S および C H O 細胞に対する H L - 6 0 細胞の付着を完全に遮断した。これは I g G_{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、6 1 1 ピー・ハモンド・フェリー・アールディ、リンチカム、M d、2 1 0 9 0 (米国) に対し、1 9 8 9 年 1 2 月 1 3 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 C D B . B B 1 1 . B C 6

受託番号 I V I - 1 0 2 2 0。

【0115】

実施例 V IV C A M 1 および V C A M 1 b 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 E L A M s の特徴を調べクローン化した。第 1 の工程として、4、2 4、または 4 8 時間、I L - 1 β または T N F により誘導した H U V E C s に対し、R A M O S、B - リンパ球様ライン、J U R K A T、T - リンパ球様ラインの結合経路の特徴を調べた。R A M O S および J U R K A T 結合の両者は、I L - 1 β または T N F による誘発の 4 時間後に最大となり、結合は 2 4 時間、誘発後 4 8 時間維持されることを認めた。R A M O S 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。J U R K A T 結合は 4℃で減少したが、完全には除去されなかったため、J U R K A T 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。J U R K A T 細胞により免疫したマウス由来の抗血清は、H U V E C s に対する J U R K A T および R A M O S 細胞の両者の結合を阻害し、R A M O S および J U R K A T が M I L A を共有することを示した。誘発後 4 ~ 4 8 時間で、R A M O S および J U R K A T の両者は、E L A M 1 を発現する C O S または C H O 細胞に結合せず、H U V E C s 上の少なくとも 1 つの他の誘導性 E L A M の存在を示した。

【0116】

H U V E C s に結合する R A M O S および J U R K A T に含まれる E L A M s を発現するクローンを単離するため、実施例 I I、前記に記載した方法により、先に記載した E L A

10

20

30

40

50

M 富化 H U V E C c D N A サブライブラリを検索した。サブライブラリ感染 C O S 7 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 R A M O S および J U R K A T 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 C O S 7 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 C O S 7 細胞に個々に感染させ、R A M O S および J U R K A T 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 c D N A 挿入物を摘出し、放射能ラベルし、レーラ (1 9 7 9) の手順に従ってノーザンブ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 . 4 k b の R N A 分子種にハイブリダイズした。この R N A は、未誘導 H U V E C R N A においては検出できず、I L - 1 β 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、I L - 1 β 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。

10

【0117】

プラスミド A M p C D M 8 クローン 4 1 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・ビトロ・インターナショナル・インコ、リンチカム、M d (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：

A M p C D M 8 クローン 4 1 / イー・コリ M C 1 0 6 1 P 3

受託番号 I V I - 1 0 2 0 6。

【0118】

20

また、他の V C A M から c D N A を単離した。A M p C D M 8 クローン 4 1 からラベルした V C A M 1 コード挿入物を用いて I L - 1 β 誘導 H U V E C c D N A 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 1 E 1 1 を配列決定した。X b a I による制限マッピングによる分析により、クローン 4 1 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 1 E 1 1 を配列決定した。これを、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、リンチカム、M d (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：

V C A M 1 B クローン 1 E 1 1 p C D M 8 / イー・コリ M C 1 0 6 1 p 3

受託番号 I V I - 1 0 2 1 6。

【0119】

30

また、他の E L A M s についての D N A 配列を単離した。I L - 1 β 誘発後 48 時間に渡り H U V E C s から m R N A を集めた。E L A M 1 および V C A M 1 および 1 b について c D N A 配列を単離するのに使用したものと同様に E L A M c D N A 配列を単離し得る。

【0120】

また、T N F、L T、L P S、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 E L A M s を同定し得る。

【0121】

実施例 VII

V C A M 1 および V C A M 1 b の D N A 配列

40

マキサムとギルバート (1 9 8 0) の方法により、プラスミド A M p C D M 8 クローン 4 1 の挿入物の全 D N A 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 c D N A 配列から誘導した蛋白質を V C A M 1 とし、コード配列を V C A M 1 D N A 配列とした。図 3 に V C A M 1 の c D N A 配列を示す。V C A M 1 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 (1 9 8 0) の方法により、プラスミド V C A M 1 b p C D M 8 1 E 1 1 の挿入物の D N A 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

50

を含む 7 6 4 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 V C A M 1 b とし、コード配列を V C A M 1 b D N A 配列とした。cDNA 配列および推定された V C A M 1 b のアミノ酸配列を図 4 に示した。

【0123】

V C A M 1 および V C A M 1 b の D N A 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、V C A M 1 b は、コード領域の中間付近に 2 7 6 ヌクレオチドの挿入を含む。これらのヌクレオチドは、V C A M 1 ドメイン 3 の末端と V C A M 1 ドメイン 4 の開始部との間に位置する 8 4 アミノ酸の余分なドメインを形成する 9 2 の付加的なアミノ酸をコードする。V C A M 1 ドメイン 3 B としたこのドメインの意義を以下に論ずる。

10

【0124】

配列の解析により次の特性が明らかとなった：V C A M 1 ポリペプチドは、シグナル配列（フォン・ハイジン、1 9 8 6）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、ハイジンにより、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 1 7 9 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 6 0 6 アミノ酸であり、その後 2 2 アミノ酸の疎水性膜横断領域が続く。この蛋白質は、1 9 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 V C A M 1 b 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 1 7 2 である。このポリペプチドの細胞外ドメインは V C A M 1 より長く、シグナル配列を含む約 6 9 8 アミノ酸であり、この後に 2 2 アミノ酸の疎水性膜横断領域が続く。この蛋白質は、1 9 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。

20

【0126】

V C A M 1 および V C A M 1 b のアミノ酸配列と N B R F および N E W 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（N C A）、胆汁糖蛋白質 1（B G 1）、神経細胞付着分子（N C A M）、発癌胚抗原（C E A）、免疫グロブリン α 鎖一定領域、T 細胞レセプタ（T C R）α および β 鎖変動領域、並びにミエリン関連糖蛋白質（M A G）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、リプロースニリン酸カルボキシラーゼ、アデノウイルス E 1 A 2 8 K 蛋白質、シウドウリジン合成酵素、並びにキシロキナーゼについて認められる。V C A M 1 および 1 b 並びに V C A M 1 および 1 b D N A 配列は、先に記載した E L A M 1（前記）と全く相同性を示さず、これとは異なるものである。

30

【0127】

重要なことは、N C A、B G 1、N C A M、C E A、M A G 並びに T C R 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、1 9 8 8、フンカピラーとフッド、1 9 8 9）。このファミリーの構成員は、イムノグロブリン（I g）分子の基本構造単位、I g 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、1 9 8 9）。これらの単位は、長さ約 7 0 ~ 1 1 0 残基の一次アミノ酸配列を特徴とし、5 0 ~ 7 0 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、C 1 および C 2（ウイリアムスとパークレイ、1 9 8 8）、または V、C および H（フンカピラーとフッド、1 9 8 9）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 V C A M 1 の一次配列に適用すると、この配列を 6 の I g 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 C 2 または H サブセットとなり、それぞれ約 1 0 0 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

40

50

、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。

10

【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 つの異なる個体に由来する臍帯から 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 VCAM1b mRNA 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 #3 VCAM1 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 VCAM1 mRNA を有さなかったが、VCAM1b mRNA 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 (ブ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)。

20

30

【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 Moab 14B9 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

40

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。MluI および NotI により ELAMP CDM8 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 3.8 kb 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 pNN

50

11にこの断片をサブクローン化した。これをベクタ pNNE LAM1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(ペデンとナサンス、1982、カルデロンら、1982、オーストラら、1983)。よって、pNNE LAM1のサンプルをEcoRIにより消化し、大きい断片を単離した。SmaIによりpNNE LAM1の他のサンプルを線状化した。その後、配列5' TGT GAA GCT CCC TAA 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3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。

10

【0134】

その後AatIIおよびNcoIによりpSAB100を消化し、5.2 kb断片を単離した。また、pNNE LAM1をこれらの2つの酵素で消化し、1.4 kb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、3.8 kb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7819 bp断片に連結した。

20

【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라마ニら、1981)。これをApaIおよびEcoRIにより消化し、4420 bp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。このオリゴヌクレオチドをpSV2-DHFRの4420 bp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、4391 bp断片を単離した。

30

【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、5462 bp断片を単離した。この断片をpDT4の4391 bp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。

40

【0138】

その後AatIおよびNotIによりpJOD-sを消化し、6750 bp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1100 bp NotI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。BglII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

50

このプラスミドを線状化し、配列 5' G C G G C G C を有する N o t I リンカを末端に連結した。得られたプラスミドを p B G 3 4 1 と呼ぶこととした。

【 0 1 4 0 】

A a t II および N o t I により p B G 3 4 1 を消化し、1100bp断片を単離した。この断片を p J O D - s の 6750bp断片に連結した。得られたプラスミドを p B G 3 4 1 . j o d 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。N o t I 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。

【 0 1 4 1 】

その後、N o t I により p B G 3 4 1 . j o d を線状化し、線状7819bp断片を単離した。これを、r s E L A M 1 をコードする p S A B 1 0 8 の 3.8kb断片に連結し、プラスミド p S A B 1 1 0 を作成した。

【 0 1 4 2 】

A a t II により線状化したプラスミド p S A B 1 1 0 を用いてエレクトロポレーションにより C H O - D H F R⁻ 細胞に感染させた。20mM H E P E S、pH 7.05、137mM N a C l、5mM K C l、0.7mM N a₂ H P O₄、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レーションを行った。感染後、選択培地、αMEM（500nMメトトレキサートおよび10%透析FCSを含有する）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B B 1 1 を使用してr s E L A M 1 発現細胞を検出した。10%ウシ胎児血清（FCS）を含有する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r s E L A M 1 を生産する2%FCSを含有する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。

【 0 1 4 3 】

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r s E L A M 1 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）M o a b B B 1 1 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、pH 2.7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、r s E L A M 1 を更に精製した。

【 0 1 4 4 】

次のアッセイを使用し、r s E L A M 1 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、pH 9.5を添加した。これに10μgの純粋なr s E L A M 1 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、r s E L A M 1 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有する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温し、10%ウシ胎児血清を含有する培地によりこれらを洗浄し、2mlの細胞（2×10⁶ 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R P M I 1 6 4 0）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。

【 0 1 4 5 】

H L - 6 0 細胞のようなE L A M 1 に結合する細胞は、r s E L A M 1 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R A M O S のようなE L A M 1 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。

【 0 1 4 6 】

10

20

30

40

50

更に、特異的 M o a b B B 1 1 は r s E L A M 1 被覆プレートに対する H L - 6 0 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、r s E L A M 1 が生産され、次に E L A M 1 のように、r s E L A M 1 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 V C A M 1 b (r s V C A M 1 b) を発現するベクタを作成した。このベクタを p B N 1 0 0 6 と命名した。p B N 1 0 0 6 により発現される r s V C A M 1 b は、図 4 に示す D N A 配列のヌクレオチド 1 0 7 ~ ヌクレオチド 2 1 9 3 によりコードされる V C A M 1 b の細胞外ドメインの一部を含有する。

【0148】

可溶性 V C A M 1 b 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 N o t I 部位を有する p J O D - s からベクタを作成し、発現ベクタへの N o t I 断片の挿入を図った。プラスミド D N A の N o t I 開裂により p J O D - 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 D N A 断片を、低融点アガロース (L M A) ゲル電気泳動により精製した。T 4 D N A リガーゼを使用して D N A 断片を再連結した。その後連結した分子をイー・コリ J A 2 2 1 (A T C C 受託番号 3 3 8 7 5) に形質転換した。N o t I 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 p J O D - s デルタ N o t 1 とした。p J O D - s デルタ N o t 1 を S a l I 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。L M A ゲル電気泳動により線状化した D N A 断片を精製し、ホスホリル化オリゴヌクレオチド A C E 1 7 5 (5 ' p T C G A C G C G G C C G C G) の存在下に連結した。連結混合物をイー・コリ J A 2 2 1 に形質転換し、N o t I 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 p M D R 9 0 1 と命名した。

【0149】

A l u I による消化によりヌクレオチド 2 1 9 3 で V C A M 1 b クローン 1 E 1 1 を縮めることにより、可溶性 V C A M 1 b 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 - N o t I リンカを添加し、挿入物を p C D M 8 に再連結した。N o t I により p C D M 8 から挿入物を切り取り、N o t I 部位で p M D R 9 0 1 に連結した。この構成物を p B N 1 0 0 6 としたが、これは図 4 に示すようにアミノ酸 1 ~ 6 9 8 を有する可溶性 V C A M 1 b 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 r s E L A M 1 および r s V C A M 1 b 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、E L A M 1 および V C A M 1 b 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 B B 1 1 および 4 B 9 により認識される E L A M 1 および V C A M 1 および 1 b のドメインを検討した。

【0151】

C H 1 0 1 とした可溶性 E L A M 1 構成物を調製した。これは E L A M 1 のレクチン様ドメインからなる。図 1 を参照すると、C H 1 0 1 は、ヌクレオチド 1 ~ 5 5 7 (E L A M 1 のアミノ酸 1 ~ 1 3 9 をコードする) および停止コドンを含む c D N A 配列の発現生成物であった。C H 1 0 2 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 E L A M 1 の E G F 様ドメインからなる。図 1 を参照すると、C H 1 0 2 は、ヌクレオチド 1 ~ 6 7 1 (E L A M 1 のアミノ酸 1 ~ 1 7 7 をコードする) および停止コドンを含む c D N A 配列の発現生成物であった。可溶性 E L A M 1 構成物 C H 1 0 2 は、抗 E L A M 1 モノクローナル抗体、B B 1 1 を免疫沈澱させることが認められた。

【0152】

次の可溶性 V C A M 1 および 1 b 構成物を同様に調製した：(A) ドメイン 1 (アミノ酸 1 ~ 1 0 8 をコードする図 3 のヌクレオチド 1 ~ 4 3 0)、(B) ドメイン 1 + ドメイ

10

20

30

40

50

ン 2 (アミノ酸 1 ~ 2 1 7 をコードする図 3 のヌクレオチド 1 ~ 7 5 7)、(C) ドメイン 1 + ドメイン 2 + ドメイン 3 (アミノ酸 1 ~ 3 1 0 をコードする図 3 のヌクレオチド 1 ~ 1 0 3 6)、(D) ドメイン 1 + ドメイン 2 + ドメイン 3 (V C A M 1 と V C A M 1 b c D N A とのハイブリッド、図 4 に示すアミノ酸 1 ~ 3 1 7 をコードする)、(E) 可溶性 V C A M 1 の全長 (図 3 のヌクレオチド 1 ~ 1 9 2 4、アミノ酸 1 ~ 6 0 6 をコードする)、並びに (F) 可溶性 V C A M 1 b の全長 (図 4 のヌクレオチド 1 ~ 2 1 9 3、アミノ酸 1 ~ 6 9 8 をコードする)。

【 0 1 5 3 】

前記した V C A M 1 構成物の内、B、C、D、E 並びに F (A を除く) は、抗 V C A M 1 抗体 4 B 9 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 4 B 9 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、r s E L A M 1 について記載したように中和した。r s E L A M 1 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、R A M O S および J U R K A T 細胞の支持体特異的付着を認めた。これらの結果は、V C A M 1 の最初の 2 つのドメインは、所定の V L A 4 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。

10

【 0 1 5 4 】

実施例 IX

E L A M 1 および V C A M 1 プロモータの単離

20

E L A M 1 および V C A M 1 遺伝子について染色体クローンを単離し特徴を調べた。E L A M 1 クローンを次のようにして単離した。

【 0 1 5 5 】

プローブとして全 E L A M p C D M 8 クローン 6 挿入物またはその 5 ' 末端から 4 0 0 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 32 P ラベルした。その後、E L A M c D N A プローブを用いてヒト染色体 E M B L 3 ライブラリを検索した。ライブラリから染色体 E L A M 1 クローンを単離して特徴を調べ、これを E L 1 - 0 7 とした。これは、E L A M 1 の転写プロモータを含む 1 5 k b の 5 ' フランク配列および遺伝子の 5 ' 末端の約 1 0 0 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 D N A 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、1 9 8 9)。8 4 0 b p の 5 ' フランク配列および 7 2 0 b p の E L A M 1 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、T A T A A A および C A A T 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 9 5 塩基対上流の配列 G G G A T T T C C を含む。この配列は、ヒト κ 免疫グロブリン (I g) 遺伝子エンハンサに認められるものと同一の N F - κ B 結合配列である。N F - κ B 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 D N A 結合蛋白質である。これは、E L A M 1、V C A M 1 並びに I C A M 1 の生産を刺激することが知られた同一のインデュースである T N F、I L - 1 並びに L P S により活性化され得る (レナルドとバルチモア、1 9 8 9、オスボーンら、1 9 8 9)。N F - κ B D N A 結合活性は、I L - 1 および T N F 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、E L A M 1 プロモータからの誘導性転写に必要な最少の D N A 配列の特定を行った。

30

40

【 0 1 5 6 】

ブダペスト条約により、イン・ビトロ・インターナショナル・インコ、リンチカム、M d (米国) に対し、1 9 8 9 年 1 2 月 7 日にクローン E L 1 - 0 7 を寄託した。これは次のように同定される：

50

E L 1 - 0 7

受託番号 I V I - 1 0 2 1 8。

【 0 1 5 7 】

V C A M 1 c D N A の 5 ' 末端に相同の³²P ラベルした 3 0 塩基オリゴマープローブを用いて前記 E M B L 3 ヒト染色体ライブラリをプローブすることにより、V C A M 1 遺伝子を示す E M B L 3 染色体クローンを単離した。このクローンを V C 1 - 1 6 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、M d (米国) に対し、1 9 8 9 年 1 2 月 7 日に寄託した。これは次のように同定される：

V C 1 - 1 6

受託番号 I V I - 1 0 2 1 7。

10

【 0 1 5 8 】

V C A M 1 遺伝子の約 3 0 0 b p の 5 ' フランク配列および 9 0 0 b p 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 T A T A A A 配列および 2 つの N F - κ B コンセンサス配列：転写開始から約 - 6 3 ~ - 5 4 からのセンス鎖上の A G G G A T T T C C 、および約 - 6 9 ~ - 7 8 からの逆相補鎖上の G G G G A A A C C C を有する。この配列は、E L A M 1 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。

【 0 1 5 9 】

実施例 X

20

抗体認識 C D X

C D X 、 E L A M 1 媒介付着に關与する M I L A 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 E L A M 1 媒介付着に關与することを確認するため、E L A M 1 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。

【 0 1 6 0 】

1 . C D X 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 M o a b s 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。H L - 6 0 細胞および H U V E C s を使用してこのアッセイを行った。M I L A を発現するいずれかのセルラインを使用し、E L A M 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。4 8 穴組織培養プレート中で、H U V E C s を群集に生育させた (8 × 1 0 ⁴ 細胞 / 穴) 。R P M I / 1 % F C S により細胞を 1 回洗浄し、それぞれの穴に対して 1 3 U / m l の I L - 1 β により 0 . 5 m l の R P M I / 1 % F C S を添加した (コントロールの穴を除く) 。これらの細胞を 3 7 ° で 4 時間インキュベートした。使用の直前にこれらを R P M I / 1 % F C S により 1 回洗浄した。アッセイに使用した H L - 6 0 細胞を 1 μ C i / m l の ³⁵S - 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 × 1 0 ⁶ 細胞 / m l で R P M I / 1 % F C S 中に再懸濁した。1 0 0 μ l の H L - 6 0 細胞を取り、5 0 μ l の M o a b (1 μ g / m l) 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 1 5 0 μ l の H U V E C s を添加した。2 0 ° で 1 0 分間細胞を結合させた後、R P M I / 1 % F C S を用いて穴を穏やかに 1 回洗浄した。R P M I / 1 % F C S により穴を満たし、プレートを封止し、これらを反転させ、5 0 0 × g で 2 分間これらを遠心した。培地を除去し、P B S * により更に 2 回穴を洗浄した (P B S * は、C a ⁺⁺ を含有せず、M g ⁺⁺ を含有しない P B S である) 。2 0 0 μ l の 0 . 2 N N a O H / 1 % S D S によりそれぞれの穴中で細胞を可溶化し、4 . 5 m l 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、H U V E C s に結合した H L - 6 0 細胞の数を測定した。

30

40

50

【0161】

b. ハイブリドーマの調製

C D X 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 H L - 6 0 細胞を用いて B A L B C マウスを注射した。最初に、それぞれのマウスは腹膜内 (I P) に P B S * 中の 2×10^7 細胞を受けた。2 ~ 2 4 時間後に異なる部位にて腹膜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 I P 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、I P 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 I L - 1 β 刺激 H U V E C s に対する H L - 6 0 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、1983 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、I L - 1 β 誘導 H U V E C s に対する H L - 6 0 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、C D X 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。S G B₃ B₄ 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・インターナショナル・インコ、リンチカム、M d (米国) に対し、1989 年 4 月 25 日に寄託した。これは次のように同定される：

S G B₃ B₄

受託番号 I V I - 10205。

【0164】

c. F A C S 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、F A C S 分析を行った。これは、 2×10^5 細胞を取り、P B S * によりこれらを 1 回洗浄し、その後 25 μ l の R P M I、1 % F C S、0.1 m g / m l ヒト I g G、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 F c レセプタを遮断することを含む。その後抗体 (1 μ g / m l で 25 μ l) を添加し、細胞を 0 で 30 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 (P B S *、5 % F C S、0.1 % アザイド) によりこれらを 2 回洗浄し、0.1 m g / m l ヒト I g G 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 I g G (緩衝液 A 中に 5 μ g / m l 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、ペクトン・ディキンソン F A C S ター・セルソーターによりこれらを分析した。

【0165】

主として H L - 6 0 細胞 - H U V E C 付着アッセイについて記載したように、E L A M 1 発現 C O S 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 S G B₃ B₄ は、C D X を認識するモノクローナル抗体を生産することの説明

E L A M 1 媒介結合に関与する M I L A (特に C D X) について、ハイブリドーマ S G B₃ B₄ 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 - C D X 抗体は、C D X を発現する細胞の E L A M 1 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、I L - 1 β 誘導 H U V E C s および E L A M 1 発現 C O S 7 細胞に対する H L - 6 0 細胞および P M N s の

結合を実際に阻害することを示す。60・3、 β_2 イン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である。FACS分析を使用し、このMoaabs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被覆プレートに対する結合と正確に平行したものである。

10

【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。

20

【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かである。最終的に、これらのモノクローナルを使用して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 1×10^7 HL-60細胞を3回洗浄し、これらを0.5 ml PBS*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・ケミカルス社)により被覆したチューブにこれらを添加した。これに1 mCi ¹²⁵I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10 ml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10 mlのRPMI/10% FCSにより、次に2 ml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、2 mM PMSF、1 mM EDTA、大豆トリプシンインヒビタ(50 mg/ml)並びにロイペプチン(1 mM)(シグマ・ケミカルス社)を含有する1.0 ml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・ラプス)および50 μ lの蛋白質Aセファロース(ジムド、2 mg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。

30

40

【0172】

2. CDXの免疫沈殿

Moaabs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1 mM EDT

50

Aを含有する2 ml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150 kD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

10

CDXを発現するクローンの単離

実施例Iの一般的手順に従い、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pCDM8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1 μg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30 μg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。

20

【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。シードとアルフォ（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、2.1 kb cDNA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。

30

【0178】

ブダペスト条約により、イン・ピトロ・インターナショナル・インコ、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。

40

【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125 kD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

50

ット形成しなかった。前記した事実は全てC D XがE L A M 1 についてのリガンドであることを示す。

【0180】

C D X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。U W G C G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F A S T Aを使用してN B R F蛋白質データベース(解放23、1989年12月)を検索した。また、T F A S T Aを使用して、ゲンバンク(解放63、1990年3月)およびE M B L(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ッ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、C D Xは新規な蛋白質であると結論した。

10

【0181】

実施例XIII

V C A M 1のM I L A sを認識する抗体

全J U R K A T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H U V E C sに対するR A M O SおよびJ U R K A T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R A M O Sを完全に阻害したが、同様の条件下でJ U R K A T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、R A M O SおよびJ U R K A TはM I L Aを共有し、J U R K A TはR A M O Sにより共有されていない少なくとも1つの他のM I L Aを阻害することを示す。

20

【0182】

リンパ球M I L A sに単するM o a b sを調製するため、全生存R A M O SおよびJ U R K A T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、J U R K A T免疫マウス由来の脾臓細胞とミエローマ細胞との融合を行った。C D X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、T N Fにより24時間処理したH U V E C sに対するR A M O S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M I L A s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。

30

【0183】

実施例XIV

V L A 4がV C A M 1リガンドである証拠

本発明者および協力者は、V L A 4はV C A M 1のリガンドであり、V L A 4はV C A M 1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、V L A 4のサブユニットに対するモノクローナル抗体は、活性化H U V E C sおよびV C A M 1により感染したC O S細胞に対するV L A 4発現細胞の付着を阻害することを示した。V L A 4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B 1 E 1 1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H U V E C sおよび感染C O S細胞に対するR A M O S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、H P 2 / 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R A M O Sの付着を遮断した。同様に、これらの抗体は、V L A 4発現Tリンパ芽球セルラインH P B - A L Lの付着を阻害した。

40

【0185】

次に、本来V L A 4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V C

50

A M 1 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 - 5 6 2 赤白血球細胞を感染させた。1つのセットは、 α^4 をコードするc D N Aを用いて感染させた（タカダら、1 9 8 9）。他は、V L A 4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、1 9 8 9）。 α^4 により感染したK - 5 6 2 細胞は、かくしてV C A M 1 感染C O S細胞またはT N F 活性化H U V E C sのモノレイヤに結合することが可能となったが、親K - 5 6 2 細胞およびK - 5 6 2 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V C A M 1 発現細胞に対する α^4 感染K - 5 6 2 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、V L A 4は、F N C S - 1 部位を介してヒトプラズマフィブロネクチン（F N）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、1 9 8 9）。V C A M 1 に対するV L A 4 結合部位は、F Nに対するその結合部位とは異なることを示した。最初に、R A M O S細胞または α^4 感染K - 6 5 2 細胞とF N - 4 0（可溶性F N断片）との予備インキュベーションにより、F N - 4 0とのその結合が阻害されるが、V C A M 1 感染C O S細胞またはT N F α 活性化H U V E C sとでは阻害されないことを認めた。次に、V L A 4、H P 1 / 3に対するモノクローナルは、感染C O S細胞または活性化H U V E C sに対するこれらの細胞の結合を阻害するが、F N - 4 0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、E L A M s 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、E L A M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、H L - 6 0 細胞を添加する。阻害剤は、E L A M発現細胞に対するH L - 6 0 結合を阻害するその能力により同定する。E L A M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、E L A M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r s E L A M 1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、リンプロノタイタテック# 7 6 - 2 3 2 - 0 5、登録商標）を、50 μ lの15 m M炭酸ナトリウム / 3 5 m M重炭酸ナトリウム、p H 9 . 2中の穴当り0 . 5 μ gのr s E L A M 1により、4 で一晩インキュベートする。その後10 m g / m lのウシ血清アルブミンを含有するP B Sによりこのプレートを室温で1時間ブロックし、その後例えば穴当り50 μ lのH L - 6 0 細胞、 2×10^6 / m lを使用し、実施例VIII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、H L - 6 0 細胞はr s E L A M 1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H L - 6 0 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E L A M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E L A M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E L A MリガンドまたはE L A Mを安定に発現する細胞のモノレイヤに対する可溶性E L A MまたはE L A Mリガンドの結合を検定するも

10

20

30

40

50

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。 10

【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' G A G C T C G A G G C C G C A C C A T G C C T G G G A A G A T G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' C T A G C T A G C G C G T T T T A C T T C A C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。 20 30

【0195】

SalIによりpJOD-s（実施例VIII）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。 40

【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' CTA GCT TTC CAA GGT GAG TCC TA 3'
3' GA AAG GTT CCA CTC AGG ATT CGA 5'

【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。 50

【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pAB53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。

10

【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'CCCCAGGCATTTTAAG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。

20

【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。

30

【0202】

実施例XVIIIVCAM1mRNA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'AUGCCUGGG AAG 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のヌクレオチドが含まれる。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。

40

【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 [CUGAUGAGUCCGUGAGGACGA A] 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'フラंक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VCAM1mRNA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】

50

実施例XIXE L A M 1 リガンドを認識する抗イディオタイプ抗体

H L - 6 0 細胞上の E L A M 1 のリガンドに結合する抗 E L A M 1 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 C D B . B B 1 1 . B C 6 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 2 6 日に、ウサギを採血し、F A C S を使用して特異的抗体について抗血清を分析した。H L - 6 0 細胞 (E L A M 1 のリガンドを発現する) または R A M O S 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、H L - 6 0 細胞に特異的に結合したが、R A M O S 細胞には結合しないことを認め、これは E L A M 1 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。

10

【 0 2 0 5 】

実施例XX新規な E L A M の証拠

誘導された H U V E C s に対する U 9 3 7 細胞 (これは単球様である) の結合は、E L A M 1 、 V C A M 1 、 および / または I C A M 1 に至る特定の M o a b s 経路によっては遮断されない。しかしながら、U 9 3 7 結合は、C D 2 9 、 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 H U V E C s 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 V C A M 1 に類似する時間経過により誘導され、誘導後 4 8 時間最大レベルを維持する。2 . 5 時間 I L - 1 誘導 H U V E C 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、4 8 時間 T N F 処理 H U V E C s 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。

20

【 0 2 0 6 】

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。

【 0 2 0 7 】

【表 1】

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)

10

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)

Benchimol, 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)

20

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")

30

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")

【 0 2 0 8 】

【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)

10

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)

20

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

30

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

40

【 0 2 0 9 】

【表 3】

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)

10

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)

20

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)

30

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)

40

【 0 2 1 0 】

【表 4】

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")

10

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)

20

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)

30

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

40

【 0 2 1 1 】

【表 5】

- 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) 10
- 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) 20
- 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) 30
- 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) 40

【表 6】

- 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)
- Oostra et al., "Transforming Activity of Polyoma Virus Middle-T Antigen Probed by Site-Directed Mutagenesis," Nature, 304, pp. 456-60 (1983) 10
- 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) 20
- 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) 30
- 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) 40

【表 7】

- 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) 10
- 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 F₁ 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) 20
- 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) 30
- 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) 40

【表 8】

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-Mo1 (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

10

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)

20

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)

30

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)

40

【 0 2 1 5 】

【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/IFNB2) Receptor", Science, 241, pp. 825-28 (1988)

10

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

20

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

【図面の簡単な説明】

【0216】

【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。

30

【図1B】図1Aの分図である。

【図1C】図1Aの分図である。

【図1D】図1Aの分図である。

【図1E】図1A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3A】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1~2811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。

40

【図3B】図3Aの分図である。

【図3C】図3Aの分図である。

【図3D】図3Aの分図である。

【図4A】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4B】図4Aの分図である。

【図4C】図4Aの分図である。

【図4D】図4Aの分図である。

50

【図5】V C A M 1 のドメイン構造を示し、アミノ酸はウイスコンシン大学のジェネティックス・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】V C A M 1 b のドメイン構造を示し、アミノ酸はウイスコンシン大学のジェネティックス・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7】クローン E L 1 - 0 7 から誘導された E L A M 1 の 5' 未翻訳および未転写領域における部分の D N A 配列を示す。

【図8】クローン V C 1 - 1 6 から誘導された V C A M 1 の 5' 未翻訳および未転写領域における部分の D N A 配列を示す。

【図9A】p S Q 2 1 9 および C D X p C D M 8 クローン 7 . 2 から誘導された C D X をコードする c D N A 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 D N A 配列を C D X 用の D N A 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 C D X と称する。

【図9B】図9Aの分図である。

【図9C】図9Aの分図である。

【図1A】

```

1  TTCACATCAAACTCCTATCTACTGACCTGAGACAGAGGCAGTGATACC  50
51  CACCTGAGAGATCTCTGTGTTTGAACAACCTCTCCCAAAACGAAAGTAT  100
101  TTCAGCCTAAACCTTTGGGTGAAAAAGAACTCTTGAAGTCATGATTGCTT  150
    MetIleAlaS
151  CACAGTTTCTCTCAGCTCTCACTTTGGTGCTTCTCATTAAAGAGAGTGGAA  200
    erGlnPheLeuSerAlaLeuThrLeuValLeuLeuIleLysGluSerGly
201  GCCTGGTCTTACAACACCTCCACGGAAGCTATGACTTATGATGAGGCCAG  250
    AlaTrpSerTyrAsnThrSerThrGluAlaMetThrTyrAspGluAlaSe
251  TGCTTATTGTGACGAAAGGTACACACCTGGTTCGAATTCAAAACAAAG  300
    rAlaTyrCysGlnGlnArgTyrThrHisLeuValAlaIleGlnAsnLysG
301  AAGAGATTGAGTACCTAACTCCATATTGAGCTATTACCAAGTTATTAC  350
    luGluIleGluTyrLeuAsnSerIleLeuSerTyrSerProSerTyrTyr
351  TGGATTGGAATCAGAAAAGTCAACATTCGTGGGTCTGGGTAGGAACCA  400
    TrpIleGlyIleArgLysValAsnAsnValTrpValTrpValGlyThrGl
401  GAAACCTCTGACAGAAGAGCCAAAGAACTGGGCTCCAGGTGAACCAACA  450
    nLysProLeuThrGluGluAlaLysAsnTrpAlaProGlyGluProAsnA
451  ATAGGCAAAAAGATGAGGACTGCGTGGAGATCTACATCAAGAGAGAAAA  500
    snArgGlnLysAspGluAspCysValGluIleTyrIleLysArgGluLys
501  GATGTGGGCATGTGGAATGATGAGAGGTGCAGCAAGAAAGCTTGCCCT  550
    AspValGlyMetTrpAsnAspGluArgCysSerLysLysLysLeuAlaLe
551  ATGCTACACAGCTGCTGTACCAATACATCTCTGCAGTGGCCACGGTGAAT  600
    uCysTyrThrAlaAlaCysThrAsnThrSerCysSerGlyHisGlyGluC
601  GTGTAGAGACCATCAATAATTACACTTGCAAGTGTGACCTGGCTTCAGT  650
    ysValGluThrIleAsnAsnTyrThrCysLysCysAspProGlyPheSer
651  GGACTCAAGTGTGAGCAAAATTGTAAGTGTACAGCCCTGGAATCCCCTGA  700
    GlyLeuLysCysGluGlnIleValAsnCysThrAlaLeuGluSerProGl
701  GCATGGAAGCCTGGTTTGCAAGTCCCACTGGGAAACTTCAGCTACAATT  750
    uHisGlySerLeuValCysSerHisProLeuGlyAsnPheSerTyrAsnS
751  CTTCTGCTCTATCAGCTGTGATAGGGGTACCTGCCAAGCAGCATGGAG  800
    erSerCysSerIleSerCysAspArgGlyTyrLeuProSerSerMetGlu

```

【図1B】

```

801  ACCATGCAGTGTATGCTCTCTGGAGAATGGAGTGCTCCTATCCAGCCTG  850
    ThrMetGlnCysMetSerSerGlyGluTrpSerAlaProIleProAlaCy
851  CAATGTGGTTGAGTGTGATGCTGTGACAAATCCAGCAATGGGTTCGTGG  900
    sAsnValValGluCysAspAlaValThrAsnProAlaAsnGlyPheValG
901  AATGTTTCCAAAACCTGGAAAGCTTCCCATGGAAACACAACTGTACATT  950
    luCysPheGlnAsnProGlySerPheProTrpAsnThrThrCysThrPhe
951  GACTGTGAAGAAGGATTGAACTAATGGAGCCAGAGCTTCAGTGTAC  1000
    AspCysGluGluGlyPheGluLeuMetGlyAlaGlnSerLeuGlnCysTh
1001  CTCATCTGGGAATTGGGACAACGAGAAGCCAACTGTAAAGCTGTGACAT  1050
    rSerSerGlyAsnTrpAspAsnGluLysProThrCysLysAlaValThrC
1051  GCAGGGCCGCTCCGCCAGCCTCAGAAATGGCTCTGTGAGGTGCAGCCATCC  1100
    ysArgAlaValArgGlnProGlnAsnGlySerValArgCysSerHisSer
1101  CCGTGTGGAGAGTTACCTTCAAATCATCTGCAACTTCACCTGTGAGGA  1150
    ProAlaGlyGluPheThrPheLysSerSerCysAsnPheThrCysGluGl
1151  AGGCTTCATGTGTCAGGGACCAAGCCAGGTTGAAATGCCACTCAAGGCC  1200
    uGlyPheMetLeuGlnGlyProAlaGlnValGluCysThrThrGlnGlyG
1201  AGTGGACACAGCAAAATCCAGTTTGTGAAGCTTTCCAGTGCACAGCTTG  1250
    lnTrpThrGlnGlnIleProValCysGluAlaPheGlnCysThrAlaLeu
1251  TCCAACCCGAGCGAGGCTACATGAATTGTCTTCCTAGTGCTTGGCAG  1300
    SerAsnProGluArgGlyTyrMetAsnCysLeuProSerAlaSerGlySe
1301  TTTCCGTTATGGGTCCAGCTGTGAGTTCCTCTGTGAGCAGGGTTTGTGT  1350
    rPheArgTyrGlySerSerCysGluPheSerCysGluGlnGlyPheValL
1351  TGAAGGGATCCAAAAGGCTCCAATGTGGCCCAAGGGGAGTGGGACAA  1400
    euLysGlySerLysArgLeuGlnCysGlyProThrGlyGluTrpAspAsn
1401  GAGAAGCCCACTGTGAAGCTGTGAGATGCGATGCTGTCACCAAGCCCC  1450
    GluLysProThrCysGluAlaValArgCysAspAlaValHisGlnProPr
1451  GAAGGGTTTGGTGAAGTGTGCTCATTCCTATTGGAGAAATCACCTACA  1500
    oLysGlyLeuValArgCysAlaHisSerProIleGlyGluPheThrTyrL
1501  AGTCCTCTGTGCTTCAGCTGTGAGGAGGATTTGAATTACATGGATCA  1550
    ysSerSerCysAlaPheSerCysGluGluGlyPheGluLeuHisGlySer
1551  ACTCAACTTGAGTGACATCTCAGGGACAAATGGACAGAAGGGTTCCTTC  1600
    ThrGlnLeuGluCysThrSerGlnGlyGlnTrpThrGluGluValProSe

```

【 図 1 D 】

1601	CTGGCCAAGTGTAAAATGTTCAAGCGCTGGCAGTTCCGGGAAAGATCAACA	1650
	cgcGlnValValLysCysSerSerLeuAlaValProGlyGlyLysLeuAsnH	
1651	TGAGTGCAGTGGGGAGCCGCTGTTTGGCACTGTGGTTCAGGATTCGCGTGT	1700
	etSerCysSerGlyGlyProValPheGlyThrValCysLysPheAlaCys	
1701	CTCGAAGATGGACCTCATGGCTCTTCGACGTCCGACGTGTGGAGCCAC	1750
	ProGluGlyTrpThrLeuAsnGlySerLeuAlaArgThrCysGlyAlaThr	
1751	AGGACATGTGTGGCGCTGCTACTACTCTGTGAAGCTCCCACTGAGTCCA	1800
	rglyHisTrpSerGlyLeuLeuProThrCysGlyGluProThrGluSerA	
1801	ACATTCCCTGGTAGCTGGACTTCTCTCGCTGGACTCTCCCTCCCTGACA	1850
	snIleProLeuValAlaGlyLeuSerAlaAlaGlyLeuSerLeuLeuThr	
1851	TTAGCACCAATTCTCCCTGGCTTCGGAAATGCTTCAGGAAAGCAAGAA	1900
	LeuAlaProPheLeuLeuTrpLeuArgLysCysGlyLysAlaLysLysL	
1901	ATTGTCTCTGCCACAGCTGCCAAAGCTGTGAATCAGATGGAGGACTTC	1950
	sPheValProAlaSerSerCysGlnSerLeuGluSerAlaGlySerThrG	
1951	AAAAGCCTCTTACACTCTTTAAGTCAAAAGATCAGAAACAGGTCGT	2000
	lnLysProSerTryTyrLeuLeu	
2001	CTGGGGAACTAGAGGGATACACTGAAGTTAACAGAGACAGATAACTCTCC	2050
2051	TCGGGTCTCTGGCCCTCTCTTGCTACTATGCAAGATGCCTTTATGGCTGA	2100
2101	AACCCGCAACACCCCATCAACCACTTCAATAGATCAAAAGTCCAGCAGGCAAG	2150
2151	ACGGCTCTCAACTGAAAGACTCAGTGTCTCCCTTCTCTACTCTCAGGATC	2200
2201	AAGAAAGTGTGTGGTAATGAAGGGAAAGAGTATTTCTTCTCAAGCAAGG	2250
2251	TGAAGAGACCAAGACTCTGAAATCTCAGAATTCCCTTTTCTAACTCTCCCT	2300
2301	TGCTCTGCTGTAATAATCTTGGCAGAGAAACACAATATTTTGTGGCTTTCTT	2350
2351	TCTTTTGCCCTTTCACAGTGTTTCGACAGCTGATTACACAGTTGCTGTGCAT	2400
2401	AAGAATGAATAAATAATATCGAGAGTTTGAGTGGCAAAAAAATGACTAAAAA	2450
2451	TATTATAACTTAAAAAATGACAGATTTTGAAATGCCCAAGGCAAAATGGCAT	2500
2501	GGAGGGTGTGTTAATGGTGCAAACTCTACTGAATGTGCTGTCGAGGGTTA	2550
2551	CTATGCACAAATTAATACCTTTTCATCCCTATGGGAATTCAGTGCTTCTTAA	2600

2601	AGAGTCTCTTAAGGATTGTGATATTTTACTTGCATTGAAATATATTATAAT	2650
2651	CTTCCATACCTCTTTCATTCAATACAAGTGGTGGTAGGGACCTAAAAAACTT	2700
2701	GAATAAGCTGTCCAATATGATATGGTAAAAGTTACTTATTTAGATATACC	2750
2751	CCCTCATGTTTATTATCAAAATATGTGCATCTGTTTAAATTTTATTTCT	2800
2801	AAAAAGGGAACTATTGTCCTCTAGCAGGCGATGTTAAACCGAATAAA	2850
2851	AGTTCGTAGTGTCTTTTACTACAGTTGTTTTTGAAGACATGGTAGAATTG	2900
2901	GAGAGTAAAACTGAAATGGAAGGTTGTATATGTGCAGATATTTTTTCAG	2950
2951	AAATATGTGGTTTTCCACGATGAAAAACTTCCATGAGGCCAAACGTTTGA	3000
3001	ACTATAAAAGCATAAATGTCAACACACAAAGGTATAAATTTATGAATGT	3050
3051	CTTTTGTGGAAAAAATACCAAGAATGGATGCTGCTTTGTCATCTCTACAA	3100
3101	AGATGTTTGTGCAGATATGATATGTAAACATAATCTCTGTATATTTAGGAA	3150
3151	GATTTTAAATTCACAATAGAACTCACCATGTAAAAGAGTCATCTGGTAG	3200
3201	ATTTTAAACGAATGAAGATGTCTAATAGTTATTCCTCATTTGTTTTCTTC	3250
3251	TGTATGTAGGGTGTCTCTGGAAGAGAGGAATGCCGTGTGAGCAAGCATT	3300
3301	TATGTTTATTTTATAAGCAGATTTTAACAATCTCAAGGAATCTCCAGTTT	3350
3351	CAGTGTATCATCTGGCAATGAAAAATCTCAGTCAGATATGCCAAAGCTG	3400
3401	CTCTAGCCTTGAGGAGTGTGAGAAATCAAACTCTCTACACTCCATATAA	3450
3451	CTTAGCATGTGTTGAAAAAAAAGTTTCAGAGAAAGTCTGGCTGAACACTG	3500
3501	GCAACAACAAAGCCAAAGCTCAAAACAGAGATGTGATAAGGATCAGAACA	3550
3551	GCAGAGGTTCTTTTAAAGGGGCAGAAAAACTCTGGGAAATAGAGAGAAAC	3600
3601	AACACTCTGTATCAGGCTATGTATGGAAATCAGTGTTATTTCTTTTGAAA	3650
3651	TGTTTAAAGTGTGTTAAATTTTATGTGAATCGCATAGGAATTAGAAAT	3700
3701	GTGAAATACCAAGTGTGGTTGTGTTTGTAGTTTTATTGAGAAATTTACTGT	3750
3751	ATAACTTAAAAATATTTTATAAATTTTAAAGTATATTTTATTAAAGCTTA	3800

【 図 1 E 】

3801 TGTCAGACCTATTTGACATAACACTATAAAGGTTGACAATAAATGTGCTT 3850
3851 ATGTTTAAAAAAA 3863

【 図 2 】

[illegible]

【 図 3 A 】

1	CGGGCTCACTGGGTTCCAGAGCTGAATACCTCCAGGCACACACAGGT	50
51	GGGACACAAATAAAGGTTTGGAAACCACATATTTTCTCATCAGCAGACAA	100
101	CTTAAATTCCTCGGGAAGATGGTCGTGATCTTGGAGCCTCAAAATATACT	150
	MetProGlyLysMetValVal11LeuGlyAlaSerAsnIleLe	
151	TGGATAATGTTTCAGACTCTCAAGCTTTTAAATCGAGACACCCAGC	200
	uTrpIleMetPheAlaAlaSerGlnAlaPheLysIleGluThrThrProG	
201	AATCTAGATATCTTGCACAGTTGGTGACCTCCGTCATTGATCTTCGAGC	250
	lueSerArgTyrLeuAlaGlnIleGlyAspSerAlaSerLeuThrCysSer	
251	ACCACAGGCTGTGAGTCCCAATTTTCTCTGGAGAACCCAGATAGATAG	300
	ThrThrglyGlyGluSerProPhePheSerTrpArgThrGluThrIleAspSe	
301	TCCACTGAATGGGAAGGTGACGAATGAGGGGACCATCTACGCTGACAA	350
	rProLeuAsnGlyLysValThrAsnGluGlyThrThrSerThrLeuThrM	
351	TGAATCTCTGTAGTTTGGGAACGACACTCTTACCTGCGACGCAACT	400
	etAsnProValSerPheGlyAsnGluHisSerTyrLeuGlyThrAlaThr	
401	TGTGAATCTAGGAAATGGAAAAGGAATCCAGGTGGAGATCACTCTCTT	450
	CysGluSerArgLysLeuGlyLysGlyIleGlnValGluIleTyrSerPh	
451	TCTTAAGGATCCAGAGATTCAITTTAGTGGCCCTCTGGAGGCTGGGAAGC	500
	eProLysAspProGluIleHisLeuSerGlyLysGlyProLeuGluAlaGlyLysP	
501	CGATCACAGTCAGTTCTCAGTTCTGTATGATACCACTTACGACAGCT	550
	roIleThrValLysCysSerValAlaAspValTyrProPheAspArgLeu	
551	GAGATAGACTTACTGAAAGGAGATCTCATGAAGAGTCAGGAATTTCT	600
	GluIleAspLeuLysGlyLysGlyAspHisLeuMetLysSerGlnGluPhe	
601	GGGAGTCCGACAGCAGGAAGTCCCTGGAAACCAAGACTTTGGAAGTAACT	650
	uGluAspAlaAspArgLysSerLeuGluThrLysSerLeuValThrP	
651	TTACTCCTGTCTAGGAGTATGGAAAAGTCTCTGTTGGCGACTAAA	700
	heThrProValIleGluAspIleGlyLysValLeuValCysArgAlaLys	
701	TACACATTTGATAAATGGATTCTGTGCCACAGTAAGGCAGGCTGTAA	750
	LeuHisIleAspGluThrAspSerValProThrValArgGlnAlaValLys	
751	AGAAATGCAAGTCTACATATCACCCAAAGATACAGGTTATTTCTGTGAATC	800
	SGluLeuGlnValTyrIleSerProLysAsnThrValIleSerValAsnArg	

【 3 B 】

801 CATCCACAAGGCTGCAAGAGGTTGGCTCTGTGACCATGACCTGTTCCAGC
roSerThrLysLeuGlnGluGlyGlySerValThrMetThrCysSerSer 850

851 GAGGGTCTACAGCTCCAGAGATTTCTGGAGTAAGAAATAGATAATGG
GluGlyLeuProAlaProGluLeuPheTrpSerLysLysLeuAspAsnGln 900

901 GAATCTACAGCACCTTTCTGGAAATGCACTCTCACCCTAATGCTATGA
yAsnLeuGlnHisLeuSerGlyAsnAlaThrLeuThrLeuLeuAlaMetA 950

951 GGATGGAAGATTCTGGAAATTTATGTGTGTGAAGGAGTTAATTTGATTGGG
rgMetGluAspSerGlyIleTyrValCysGluGlyValAsnLeuLeuGly 1000

1001 AAAAAACAGAAAGAGGTGAATTAATGTTCAGCATTCCTAGAGATCC
LysAsnArgLysGluValGluLeuLeuValGlnAlaPheProArgAspPr 1050

1051 AGAAATCGAGATGAGTGGTGGCTCOTGAATGGGAGCTCTGTCACTGTAA
GluIleGluMetSerGlyGlyLeuValAsnGlySerSerValThrValS 1100

1101 GCTGCAAGGTTCTAGCGGTACCCCTTGACGGCTGGAGATTGAATTA
erCysLysValProSerValTyrProLeuAspArgLeuGluLeuGluLeu 1150

1151 CTTAAGGGGAGACTATTCTGGAGAATATAGAGTTTGGAGGATACGGA
LeuLysGlyGluThrIleLeuGluAsnIleGluPheLeuGluAspThrAs 1200

1201 TATGAAATCTCTAGAGAACAAAGTTTGGAAATGACCTTCATCCCTACCA
pMetLysSerLeuGluAsnLysSerLeuGluMetThrPheIleProThrI 1250

1251 TTGAAGATATCTGGAAAGCTCTGTGTGTGACGCTAAGTTACATATTGAT
leGluAspThrGlyLysAlaLeuValCysGlnAlaLysLeuHisIleAsp 1300

1301 GACATGGAAATTCGAACCAAAAGGAGAGTACGCAACACTTATGT
AspMetGluPheGluProLysGlnArgGlnSerThrGlnThrLeuTyrVa 1350

1351 CAATGTTGGCCCCAGAGATCAACCGCTTGGTCAAGCTTCTCCATCC
IAsnValAlaProArgAspThrThrValLeuValSerProSerSerIleL 1400

1401 TGGAGGAAGCGATTTCTGTGAATATGACATGCTTGAGCCAGGGCTTCTCT
euGluGluGlySerSerValAsnMetThrCysLeuSerGlnGlyPhePro 1450

1451 GCTCCGAAATCTCTGGAGCAGGCGCTCCCTAACGGGAGCTACAGCC
AlaProLysIleLeuTrpSerArgGlnLeuProAsnGlyGluLeuGlnP 1500

1501 TCTTTCTGAGAAATGCACTCTCACTTAAATTTCTACAAAATGGGAAGT
oLeuSerGluAsnAlaThrLeuThrLeuIleSerThrLysMetGluAspS 1550

1551 CTGGGTTTATTTATGTGAAGAAATTAACAGGCTGGAAAGCAGAAAG
erGlyValTyrLeuCysGluGlyIleAsnGlnAlaGlyArgSerArgLys 1600

【 3 C 】

1601 GAAGTGGAAATTAATATCCAACTTCTCCAAAGACATAAACTTACAGC
GluValGluLeuIleIleGlnValThrProLysAspIleLysLeuThrAl 1650

1651 TTTCTCTCTGAGAGTGTCAAGAGGAGACACTGTCTCATCTCTGTGA
aPheProSerGluSerValLysGluGlyAspThrValIleIleSerCysT 1700

1701 CATGTGGAAATGTTCCAGAAACATGGATAATCCTGAAGAAAAAGCGGAG
hrCysGlyAsnValProGluThrTrpIleIleLeuLeuLysLysAlaGlu 1750

1751 ACAGAGACACAGTACTAAATCTATAGATGGCGCTATACCATCCGAAA
ThrGlyAspThrValLeuLysSerIleAspGlyAlaTyrThrIleArgLy 1800

1801 GCGCCAGTTGAAGATGCGGGAGTATATGAATGTGAATCTAAAAACAAAG
sAlaGlnLeuLysAspAlaGlyValTyrGluCysGluSerLysAsnLysV 1850

1851 TTGGCTCACAATTAAGAAGTTTAACACTTGATGTTCAGGAAGAGAAAAAC
alGlySerGlnLeuArgSerLeuThrLeuAspValGlnGlyArgGluAsn 1900

1901 AACAAAGACTATTTTCTCTGAGCTTCTGCTCTCTATTTTGCATCCTC
AsnLysAspTyrPheSerProGluLeuLeuValLeuTyrPheAlaSerSe 1950

1951 CTTAATAATACCTGCCATTGGAAATGATAATTTTACTTTGCAAGAAAGCCA
rLeuIleIleProAlaIleGlyMetIleIleTyrPheAlaArgLysAlaAl 2000

2001 ACATGAAGGGGTATATAGTCTTGTAGAGCAGAGAAATCAAAAGTGTAG
snMetLysGlySerTyrSerLeuValGluAlaGlnLysSerLysVal 2050

2051 CTAATGCTGTATATGTTCACTGAGAGACATTTATCTGTGTGCAAACTCT 2100

2101 TGATAGTCTCATCTTCTTGAGAAAAACATGAGCTGAGAGGAGAGACT 2150

2151 TCCCTGAATGTATTGAACCTTGAGAAAGAAATGCCATCTATGCTCTGCT 2200

2201 GTGAGCAAGAGTCAAGTAAAACTTGCTGCTGAAGAACAGTAAGTCC 2250

2251 ATCAAGATGAGAGAACTGGAGGAGTCTCTGATCTGTATATACAAATCA 2300

2301 TAAATTTGATATATGATAAAATTAATGCTATAGCAAGATGCTTAA 2350

2351 ATAGCAACACTCTATATTAGATTTGTAATAATACTAGTGTGCTGGAC 2400

2401 TATTATAATTAATGCATGTTAGGAAATTTACATTAAATTTGCTGAC 2450

2451 AGCTGACCTTTGTCTATCTTCTCTATTTTATCTCTCTCAAAAATTTT 2500

2501 ATTCCTATATAGTTTATTGACAAATATTCAGGTTTGTAAAGATGCCGG 2550

【 3 D 】

2551 GTTTTATATTTTATAGACAAATAAAGCAAGGGGAGCTGGGTTGAC 2600

2601 TTTCCAGTACTAAATACCTCAACCTATGGTATAATGGTTGACTGGGTTTC 2650

2651 TCTGTATAGTACTGGCATGGTACGGAGATGTTCCAGGAATGTTGTTCA 2700

2701 AGACTCCTGTGCAACTTTCCCAATGTGGCCTAAAAATGCAACTTCTTTT 2750

2751 ATTTCTTTTGTAAATGTTTAGGTTTTTTGTATAGTAAAGTATAATTT 2800

2801 CTGGAATTA 2811

【 4 A 】

1 CACTGGCTTCAGGAGCTGAATACCTCCCAAGGCACACAGGTGGGACAC 50

51 AAATAAGGGTTTGGAAACCACTATTTCTCATCAGCAGCAACTTAA 100

101 TGGCTGGAAAGATGGTCTGATCCTTGGAGCTCAAAATACTTTGGATA 150

151 ATGTTTGCAGCTTCTCAAGCTTTTAAATCGAGACACCCAGAAATCTAG 200

201 ATATCTTGTCTAGATGGTGACTCCGTCTCATTGACTTGCAGCACCACAG 250

251 GCTGTGAGTCCCACTTTTCTCTGGAGAACCCAGATAGATAGTCACTG 300

301 AATGGGAAGGTGACGAATGAGGGGACCACTCTACGCTGACAAATGAATCC 350

351 TGTATGTTTGGGAACGAACCTCTTACCTGTGCACAGCAACTTGTGAAT 400

401 CTAGGAAATGGAAAAAGGAATCCAGGTGGAGATCTACTCTTTCTTAAG 450

451 GATCCAGAGATTCAATTGAGTGGCCCTCTGGAGGCTGGGAAGCCGATCAC 500

501 AGTCAAGTGTTCAGTTGCTGATATACCAATTTGACAGGCTGGAGATAG 550

551 ACTTACTGAAAGGAGATCATCTCAAGAGTCAAGAAATTTCTGGAGGAT 600

601 GCAGACAGGAAGTCCCTGGAAACCAAGAGTTTGGAAATTAACCTTACTCC 650

651 TGTCAATTGAGGATTTGAAAAAGTCTTGTGTTGCCAGCTAAATTACACA 700

701 TTGATGAATGGATTCTGTGCCACAGTATAGCCAGGCTGTAAAGAAATG 750

【 4 B 】

751 CAAGTCTACATATACCCAAAGAAATCAGTTATTTCTGTGAATCCATCCAC 800

801 AAAGTCAAGAGGTTGGCTCTGTGACCATGACCTGTTCCAGCGAGGGTCT 850

851 TACCAGCTCCAGAGATTTCTGGAGTAAGAAATAGATAATGGGAATCTA 900

901 CAGCACTTCTGGAATGCAACTCTCACCTTAATGCTATGAGGATGGA 950

951 AGATTCTGGAAATTTATGTGTGTGAAGGAGTTAATTTGATTGGGAATAA 1000

1001 GAAAGAGGTTGGAATTAATGTTCAAGAGAAACCAATTTACTGTTGAGATC 1050

1051 TCCCTGGAGCCCGGATTGCTGCTCAGATTTGAGAGCTCAGTCTGTTGAC 1100

1101 ATGATGTCTATGGGCTGTGAATCCCATCTTCTCTCTGGAGAACCCAGA 1150

1151 TAGACAGCCCTCTGAGCGGAGAGGTGAGGAGTGGGGGACCAATTCACG 1200

1201 CTCACCTGAGCCCTGTGAGTTTGGAGAACCAACTCTTATCTGTGAC 1250

1251 AGTGACTTGTGGACATAAGAACTGGAAAAAGGAATCCAGGTGGAGCTCT 1300

1301 ACTCATCTCTAGAGATCCAGAAATCGAGATGAGTGGTGGCCCTGTGAAT 1350

1351 GGGAGCTCTGCTCACTGTAAGCTGCAAGGTTCTAGCGTGTACCCCTGGA 1400

1401 CCGGCTGGAGATTGAATTAATTAAGGGGAGACTATTCTGGAGAAATAG 1450

1451 AGTTTGGAGGATACGGATATGAAATCTTAGAGAAACAAAGTTTGGAA 1500

1501 ATGACCTTCATCCCTACCAATGAAGATCTGGAAGAGCTTGTGTTGCA 1550

【 4 C 】

1551 GGCTAAGTTACATATTGATGACATGGAATTCGAACCCAAACAAAGGCAG
nAlaLysLeuHisIleAspAspMetGluPheGluProLysGlnArgGlnS 1600
1601 GTACGCCAAACACTTATTGTCAATGTTCGCCCCAGAGATACAAACCGTCTTG
erThrGlnThrLeuTyValAsnValAlaProArgAspThrThrValLeu 1650
1651 GTACGCCCTTCTCCATCCTGGAGGAAGGCAGTCTGTGAATATGACATG
ValSerProSerSerIleLeuGluGluGlySerSerValAsnMetThrCy 1700
1701 CTTGAGCCAGGGCTTCTCGTCCGAAATTCCTGTGGAGCAGGCAGCTCC
sLeuSerGlnGlyPheProAlaProLysIleLeuTrpSerArgGlnLeuP 1750
1751 CTAACGGGGAGCTACAGCCTCTTCTGAGAAATGCAACTCTCACCTTAATT
roAsnGlyGluLeuGlnProLeuSerGluAsnAlaThrLeuThrLeuIle 1800
1801 TCTACAAAAATGGAAGATTCTGGGGTTTATTATGTGAAGGAATTAACCA
SerThrLysMetGluAspSerGlyValTyLeuCysGluGlyIleAsnGl 1850
1851 GGCTGGAAGAAGCAGAAAGGAAGTGAATTAATATCCAACTACTCCAA
nAlaGlyArgSerArgLysGluValGluLeuIleGlnValThrProL 1900
1901 AAGACATAAACTACAGCTTTCTCTGAGAGTGTCAAAGAAGAGAGAC
ysAspIleLysLeuThrAlaPheProSerGluSerValLysGluGlyAsp 1950
1951 ACTGTGCATCATCTCTGTACATGTGGAAATGTTCCAGAAACATGGATAAT
ThrValIleIleSerCysThrCysGlyAsnValProGluThrTrpIleIl 2000
2001 CCTGAAGAAAAAGCGGAGACAGGAGACACAGTACTAAAAATCTATAGATG
eLeuLysLysLysAlaGluThrGlyAspThrValLeuLysSerIleAspG 2050
2051 GCGCTATACCATCCGAAAGGCCAGTGAAGGATGCGGGAGTATATGAA
lyAlaTyThrIleArgLysAlaGlnLeuLysAspAlaGlyValTyGlu 2100
2101 TGTGAATCTAAAAACAAAGTTGGCTCACAATTAAGAAGTTTAAACACTTGA
CysGluSerLysAsnLysValGlySerGlnLeuArgSerLeuThrLeuAs 2150
2151 TGTTCAGGAAGAGAAAAACAAGAACTATTTTCTCTGAGCTTCTCTG
pValGlnGlyArgGluAsnAsnLysAspTyPheSerProGluLeuLeuV 2200
2201 TGCTCTATTTGCATCCTCTCTTAATAACCTGCCATTGGAATGATAATT
alLeuTyThrAlaSerSerLeuIleIleProAlaIleGlyMetIleIle 2250
2251 TACTTTGCAAGAAAAGCCCAATGAAGGGGTATATAGTCTTTGTAGAAGC
TyThrAlaArgLysAlaAsnMetLysGlySerTySerLeuValGluAl 2300
2301 ACAGAAATCAAAAGTGTAGCTAATGCTTATATGTTCACTGGAGACACT
aGlnLysSerLysVal 2350

【 4 D 】

2351 ATTTATCTGTGCAAAATCCTTGATACTGCTCATCTCCTTGAGAAAAACA 2400
2401 ATGAGCTGAGAGGAGAGCTTCCCTGAATGATTGAACCTTGAGAAAGAAATG 2450
2451 CCCATCTATGTCCTCTGCTGTGAGCAAGAAGCTCAAAGTAAACTTGCCTG 2500
2501 CTGAAGAACAGTAACCTGCCATCAAGATGAGAGAACTGGAGGAGTTCCTTG 2550
2551 ATCTGTATATACAATAACATAAATTTGTACATATGTAATAAATAATATGC 2600
2601 CATAGCAAGATTGCTTAAAAATAGCAACACICTATATTAGATTGTTAAAA 2650
2651 TAACTAGTGTGCTTGGACTATTATAATTTAATGCATGTTAGGAAAAATTT 2700
2701 CACATTAAATTTGCTGACAGCTGACCTTTGTCATCTTTCTTCTATTTTA 2750
2751 TTCCTTTTCAAAAAATTTATTCCTATATAGTTTATTGACAAATAATTCA 2800
2801 GGTTTTGTAAAGATGCCGGGTTTTATATTTTATAGACAAATAAAGCA 2850
2851 AAGGGAGCACTGGGTGACTTTCAGGTACTAAATACCTCAACCTATGGTA 2900
2901 TAATGGTGTGACTGGGTTCTCTGTATAGTACTGGCATGGTACGGAGATGT 2950
2951 TTCACGAAGTTTGTTCATCAGACTCCTGTGCAACTTTCCCAATGTGGCCT 3000
3001 AAAAAATGCAACTCTCTTTTATTCTTTTGTAAATGTTTAGGTTTTTTTG 3050
3051 TATAGTAAAGTGATAATTCTGGAATTA 3080

【 5 】

1 KLETTPEKTLAIGDSVLTCTCCSFSSFTTIDSLFK-----VTNKGTTSTLWVPSGHESTLCTATCSKLEGI
2 QVETSPKDEPHLSGL-EAGEFVYKGSVA-DVTFPMALIDLLKORLWKSOPLEADNRSLKTSLEPTFTPTEDIGVLCVAKLIDHDSPTTVAVKEL
3 QVETSPMTVIVNPSKTL-ORGSVYVTCSSGLPAKPIFUSKLNCHLAP-----LSCHNLTLL-LANHEDSG-ITVCEGVNLCKNKEVELLYQA
4 FPROPEIENSGCL-WKSSVYTSKVP-SVTFLMLLELLAGTILLNIFLEDTWKSLNKSLEPTFTPTEDIGVLCVAKLIDHDSPTTVAVKEL
5 TWVAPRDTVLVPSFSL-BEGSSVMTCLSGOFFPAKILNSROLPMGELAP-----LSNATLTLL-ISTHEDSG-VTLCEGHNKGKSEVELLIQV
6 TPDKILANPSESV-KEGDTVVISCTQWV--PET-VTLKEKATGTVL-----SIDGATTINAKLQMG-VTECSKRWVCSLSLTLDVQREN
NKDTFPELLVLITFASLLIPALCHLITFARANKGCSLVEAQSKV

【 6 】

1 KLETTPEKTLAIGDSVLTCTCCSFSSFTTIDSLFK-----VTNKGTTSTLWVPSGHESTLCTATCSKLEGI
2 QVETSPKDEPHLSGL-EAGEFVYKGSVA-DVTFPMALIDLLKORLWKSOPLEADNRSLKTSLEPTFTPTEDIGVLCVAKLIDHDSPTTVAVKEL
3 QVETSPMTVIVNPSKTL-ORGSVYVTCSSGLPAKPIFUSKLNCHLAP-----LSCHNLTLL-LANHEDSG-ITVCEGVNLCKNKEVELLYQA
4 FPROPEIENSGCL-WKSSVYTSKVP-SVTFLMLLELLAGTILLNIFLEDTWKSLNKSLEPTFTPTEDIGVLCVAKLIDHDSPTTVAVKEL
5 TWVAPRDTVLVPSFSL-BEGSSVMTCLSGOFFPAKILNSROLPMGELAP-----LSNATLTLL-ISTHEDSG-VTLCEGHNKGKSEVELLIQV
6 TPDKILANPSESV-KEGDTVVISCTQWV--PET-VTLKEKATGTVL-----SIDGATTINAKLQMG-VTECSKRWVCSLSLTLDVQREN
NKDTFPELLVLITFASLLIPALCHLITFARANKGCSLVEAQSKV

1	CGGGCGCGCGCTCTCTACAGCCTGGGAGCGGTGGGAGCGGAGGCAGG	50
51	CTGCCTGTTGGCGCATCGGGAGGACCGCTGGGGCTGGCGACGGCGGGCG MetGlyAlaLeuProLeuProLeuProLeuProLeuProLeuAlaAla	100
101	CGGCGGGCGCGCGGGCTGGCGCGAGCGGGGGCTGCCATGGACCGCTCT aGlyGlyArgArgGlyTrpArgArgGlyArgGlyLeuProLeuTrpValC	150
151	CTGCTGGCGCGCGCGCGCGCTTCAGGCTATACGGCGCTCATCTACCGCT ysValLeuAlaAlaAlaGlyLeuThrCysThrAlaLeuLeuThrTrpAla	200
201	TGCTGGGGGAGCCTCGCGCGCTCGCTCGCTCGGCTCGCCAAACCGCGTGG CysTrpGlyGlnLeuProLeuProLeuProLeuProLeuProLeuProSer	250
251	ACGGTGGGGCTGCTGCTGCTGGTGGAGCGCTTCGGGGCGGGCGGATAGGG GProValGlyValLeuLeuTrpTrpGluProLeuGlyArgAspSerG	300
301	CGCGGAGCGCGCGCTGACTGCGGGCTGGCTTCAACATCAGGCGGTGC LeuArgProProProAspCysArgLeuArgPheAlaIleSerGlyCys	350
351	CGCTGCTCATCGACCGCGGCTGCTACGGAGAGCTCAGCGCGCTGTTT ArgLeuLeuThrAspArgAlaLeuTrpGlyGluAlaGlnAlaValLeu	400
401	CCACCGCGAGCATCGTGAAGGGGCGCGGCGCTGCCCGCGCGCTGGT eHisArgAspLeuValGlyCysProProAspTrpProProProTrpG	450
451	GCATCAGCGCCACATCGCCAGGAGGTGGATCTCGCGGTGTGGACTAC lytGlnAlaAlaHisThrAlaGluGluValAspLeuArgValLeuAspArg	500
501	GAGGAGGAGCGGGCGGGCGAGGACCGCTGGGACCTCAGCGCGCGCGCC GluGluAlaAlaAlaAlaAlaGluAlaLeuAlaLeuThrSerSerProArgP	550
601	CGGGCGGACGCGTGGTGTGGATGAATTCGACTCGCCTCGCATCCG oProGlyGlnLeuTrpValTrpMetAsnPheGluProSerHisArgP	600
651	CGGCTCGGAAGCTCGGCAATTAACCTTCAACTGGACGCTCTCTCTAC roGlyLeuArgSerLeuAlaSerAsnLeuPheAsnTrpLeuThrSerTr	650
701	CGGCGGACTGCGGAAGCTTTTGATCTATTGGCTACTCTACCCAGAGA ArgAlaAspSerAspValPheValProTrpGlyTrpLeuTrpProArgSe	700
751	CAACCGCGGACCGCGCTCAGGCTCGGCGCGCGCGCTGCGAGAAAC rHisProGlyAspProProSerGlyGluAlaLeuProLeuSerArgGlyS	750
801	AGGGCTGTGGTGCATGGGTGTGGACCTCATGGAGTACGAGCGGCGACGG lnGlyLeuLeuArgTrpValValSerHisTrpAspGluArgGlnAlaAla	800

801	GTCCGCTACTACCACCAACTGAGCCCAACATGTGACCGTGGAAGTGTTCGG	850
	ValGlyTyrTyrGlnGlnLeuSerGlnHisValThrValAspValPheGln	
851	CGGAGGGGGGGGGGGGGGAGCGCGCGCGGCAATGGGCTCTGCCACAG	900
	ValGlyGlyProGlyGlnProValProGluLeuGlyLeuLeuHisThrV	
901	TGGCCCGCTCAAAAGTTCTACCTGGCTTTGGAGAAGCTGCAGCACTGGAT	950
	AlaAlaArgTyrTyrPheTyrLeuAlaPheGluAlaGlnSerGlnLeuAsp	
951	TATATTCAGAGAAAGCTCTGGCGCAACGGCTGTGTGTCTGGGGCGGTGCC	1000
	TyrLeuThrGluLeuLeuTyrPargAsnAlaLeuLeuAlaGlyValValPr	
1001	GGTGTGCTCGGCGCAGACGGCTGCAACTACGAGCGCTTTGTGCGCGGG	1050
	oValValLeuGlyProAspArgAlaAsnTyrGluArgPheValProArgG	
1051	CGCGCTTCATCCAGGTGGAGCACTCCCAAGTCTCTCTCTCGGCTGGCT	1100
	lyAlaPheLeuHisValAspPheProSerAlaSerSerLeuLeuHis	
1101	TACCTGTCTTCTCGACGGCAACCGCGGGCTATCGCGCTACTTCCA	1150
	TyrLeuLeuPhePheLeuAspArgAsnProArgTyrArgArgTyrPheHis	
1151	CTGGGCGCGGAGCTACGGCTGTCCACATCACTCTCTCTGGAGAGAGCTT	1200
	sTsrArgSerTyrAlaValHisIleThrSerPheTsrAspGlnProT	
1201	GTGCGGGGTGTCCGAGCTGTACGAGGGCTGGGGACGGCGCCAGAGC	1250
	rpCyArgValCyGlnAlaValGlnArgAlaGlyAspArgProLysSer	
1251	ATAAGGAATCTGGGCAAGCTGGTGTGACGGGTGAAGCGGGCTCCCTCGA	1300
	AlaArgAsnLeuLeuSerTsrPheGluArg	
1301	AGCGACCCAGGGGAGCCAAAGTTGTCACTTTTATCTCTCTACTGTGCA	1350
	TCTCTTGACTGCCGCATCATGGAGTAAGTTTCTTCAACACCAATTTT	1400
1401	GCTCTAGGGGAAAAAAGCAATTTACCAATTAATATTACTGAGCAGAGAG	1450
1451	TGGGGGCGCGGTTTCATATTTTTCGACAGCTAGCAATTTGGGCTCCCTT	1500
	TGTGCTGTGATGGGCATCATTTTATTTAGGGGTGAAGGAGGGGTTCTTCTC	1550
1501	ACCTTTGTAAACGCTGCAGAAATGAATAGCTTACGGCCAGAAAGCGGTG	1600
1601	AGGCGGTTTCTCAAGTTTCCCATCTGCCACAGGCCATATTGTGCGCGC	1650
1651	TGCAGCTTCCAAATCTCATACACAAAGTTTCCGAGTTACAGTTTTCGTG	1700
1701	ACCAAGCTGAAGCAAAATTTGTGCTGTGAGAGGAGCCTTTGTGTGGAGA	1750

【 図 9 C 】

```
1751 GTGGAAGGACTGTGGCTGCAGGTGGGACTTTGTTGTTGGATTCTCACA 1800
1801 GCCTTGGCTCCTGAGAAAGGTGAGGAGGGCAGTCCAAGAGGGGCCGCTGA 1850
1851 CTTCTTTCAAGTACTATCTGTTCCCTGTCTGTGAATGGAAGCAAAG 1900
1901 TGCTGGATTGTCTTGGAGGAACTTAAGATGAATACATGGGTGTACCTC 1950
1951 ACTTTACATAAGAAATGTATTCTGAAAAGCTGCATTTAATCAAGTCCC 2000
2001 AAATTCATTGACTTAGGGGAGTTCAGTATTTAATGAAACCCATGGAGAA 2050
2051 TTTATCCCTTTACAATGTGAATAGTCATCTCCTAAATTTGTTCTTCTGTC 2100
2101 TTTATGTTTTTCTATAACCTGGATTTTAAATCATATTAAAAATTACAGA 2150
2151 TGTGAAAATAAAAAAAGCGCCGCGC 2175
```

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
 A 6 1 K 43/00
 C 1 2 N 15/00 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 0 2 0 9 0、ウェストウッド、ローリング ストリート 6
 2

(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 0 1 8 9 0、ウインチェスター、ボンド ストリート 1 9
 5

(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 0 2 1 4 6、ブライトン 3 1、エンゲルウッド アベニュー 3 9

(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 0 1 9 1 5、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 0 1 8 9 0、ウインチェスター、ブローブ ストリート 3
 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA38 BA61 BA80 CA01 HA20
 4C084 AA12 MA66 NA14 ZB111
 4C085 AA13 AA14 AA27 BB11 BB31 BB41 BB43 CC02 CC22 CC23
 EE01 GG01 HH03 KA03 KA04 KA29 KB07 KB10 KB18 LL01
 4H045 AA11 BA71 BA72 CA40 DA76 DA83 EA20 EA50

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	JP2004099616A	公开(公告)日	2004-04-02
申请号	JP2003348879	申请日	2003-10-07
[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	C07K16/18.ZNA A61K39/395.D A61K39/395.N A61P29/00 A61K49/02.C A61K43/00 C12N15/00.A A61K51/00 A61K51/00.100 A61K51/00.200 A61K51/02.200 A61K51/10.200 C12N15/113.140.P C12N15/113.140.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA38 4B024/BA61 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/HA20 4C084 /AA12 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB111 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA27 4C085/BB11 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085 /GG01 4C085/HH03 4C085/KA03 4C085/KA04 4C085/KA29 4C085/KB07 4C085/KB10 4C085/KB18 4C085/LL01 4H045/AA11 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA83 4H045 /EA20 4H045/EA50		
优先权	07/345151 1989-04-28 US 07/359516 1989-06-01 US 07/452675 1989-12-18 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检查，诊断，预防和治疗炎症的新方法。 编码内皮细胞 - 白细胞粘附分子 (ELAM) 的DNA序列。将被披露。还公开了针对ELAM的抗体。还公开了编码参与白细胞粘附的分子 (MILA) 的DNA序列，产生这种分子的方法，以及基本上不含正常结合的动物蛋白的MILA (包括特定分子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，阻断与内皮细胞结合的白细胞的方法，以及检测急性炎症的方法。 【选择图表】无

(43) 公開日 平成16年4月2日(2004.4.2)			
(51) Int.Cl. ⁷		F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 1 6 / 1 8		C 0 7 K 1 6 / 1 8 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5		A 6 1 K 3 9 / 3 9 5 D	4 C 0 8 4
A 6 1 K 5 1 / 0 0		A 6 1 K 3 9 / 3 9 5 N	4 C 0 8 5
A 6 1 P 2 9 / 0 0		A 6 1 P 2 9 / 0 0	4 H 0 4 5
// C 1 2 N 1 5 / 0 9		A 6 1 K 4 9 / 0 2 C	
		審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 53 頁) 最終頁に付	
(21) 出願番号	特願2003-346879 (P2003-346879)	(71) 出願人	592221528
(22) 出願日	平成15年10月7日 (2003.10.7)		バイオジェン インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2002-137850 (P2002-137850) の分割		B I O G E N I N C O R P O R A T E
原出願日	平成2年4月27日 (1990.4.27)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ C
(31) 優先権主張番号	345151		1 4 2、ケンブリッジ、ケンブリッジ
(32) 優先日	平成1年4月28日 (1989.4.28)	(74) 代理人	ンター 1 4
(33) 優先権主張国	米国 (US)		100064012
(31) 優先権主張番号	358516		弁理士 浜田 治雄
(32) 優先日	平成1年6月1日 (1989.6.1)	(72) 発明者	ヘッション, キャサリン アール
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ C
(31) 優先権主張番号	452675		1 9 0、サウス ウェイマス、ファウン
(32) 優先日	平成1年12月18日 (1989.12.18)		イン レーン 9 6
(33) 優先権主張国	米国 (US)		