

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4171228号
(P4171228)

(45) 発行日 平成20年10月22日(2008.10.22)

(24) 登録日 平成20年8月15日(2008.8.15)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28 Z N A
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 D
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 D
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08

請求項の数 5 (全 67 頁)

(21) 出願番号	特願2002-48096 (P2002-48096)	(73) 特許権者	390010205 第一ファインケミカル株式会社 富山県高岡市長慶寺530番地
(22) 出願日	平成14年2月25日(2002.2.25)	(74) 代理人	100097582 弁理士 水野 昭宣
(65) 公開番号	特開2003-128700 (P2003-128700A)	(72) 発明者	山本 博 石川県金沢市平和町3丁目19番15号
(43) 公開日	平成15年5月8日(2003.5.8)	(72) 発明者	小幡 賢一 富山県高岡市長慶寺530番地 第一ファインケミカル株式会 社内
審査請求日	平成17年1月24日(2005.1.24)	審査官	長井 啓子
(31) 優先権主張番号	特願2001-78409 (P2001-78409)		
(32) 優先日	平成13年3月19日(2001.3.19)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2001-243114 (P2001-243114)		
(32) 優先日	平成13年8月10日(2001.8.10)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
微生物の受託番号	FERM P-18218		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 可溶型RAGE測定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(1) 以下の(i)または(ii)のアミノ酸配列からなり且つ後期糖化反応生成物(Advanced glycation endproducts, AGE)と結合する活性を有する可溶型蛋白質:

(i) 配列表の配列番号: 2のアミノ酸配列

(ii) 配列表の配列番号: 2のアミノ酸番号332~347のうちの少なくとも7~16個の連続したアミノ酸配列を有し、且つ、上記(i)のアミノ酸配列のアミノ酸の一部が欠損、置換若しくは付加され、その結果上記(i)のアミノ酸配列から変異しているアミノ酸の数が10個以内であるアミノ酸配列

に対する抗体であり且つ配列表の配列番号: 2のアミノ酸番号332~347のうちの少なくとも7~16個の連続したアミノ酸配列と特異的に免疫反応する抗体、あるいは、

(2) 配列表の配列番号: 2のアミノ酸番号332~347のうちの少なくとも7~16個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドに対する抗体。

【請求項2】

請求項1に記載の抗体を測定試薬として用いることを特徴とする

(1) 以下の(i)または(ii)のアミノ酸配列からなり且つ後期糖化反応生成物と結合する活性を有する可溶型蛋白質またはその塩:

(i) 配列表の配列番号: 2のアミノ酸配列

(ii) 配列表の配列番号: 2のアミノ酸番号332~347のうちの少なくとも7~16個の連続したアミノ酸配列を有し、且つ、上記(i)のアミノ酸配列のアミノ酸の一部が欠損、置換若

しくは付加され、その結果上記(i)のアミノ酸配列から変異しているアミノ酸の数が10個以内であるアミノ酸配列、

または

(2) 配列表の配列番号：2のアミノ酸番号332～347のうちの少なくとも7～16個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の免疫学的測定方法。

【請求項3】

請求項1に記載の抗体を含むことを特徴とする組成物。

【請求項4】

請求項1に記載の抗体を含むことを特徴とする

10

(1)以下の(i)または(ii)のアミノ酸配列からなり且つ後期糖化反応生成物と結合する活性を有する可溶性蛋白質またはその塩：

(i) 配列表の配列番号：2のアミノ酸配列

(ii) 配列表の配列番号：2のアミノ酸番号332～347のうちの少なくとも7～16個の連続したアミノ酸配列を有し、且つ、上記(i)のアミノ酸配列のアミノ酸の一部が欠損、置換若しくは付加され、その結果上記(i)のアミノ酸配列から変異しているアミノ酸の数が10個以内であるアミノ酸配列、

または

(2) 配列表の配列番号：2のアミノ酸番号332～347のうちの少なくとも7～16個の連続したアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩の免疫学的測定試薬。

20

【請求項5】

請求項1に記載の抗体を含有していることを特徴とする後期糖化反応生成物とそのレセプターとの相互作用、後期糖化反応生成物と結合する活性を有する可溶性蛋白質の発現量及び/又は後期糖化反応生成物捕捉活性の変化に起因した疾患診断剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト由来の可溶性 RAGE ポリペプチドに対する抗体、それを用いたスクリーニング、測定検査、診断、治療のための用途に関する。

30

【0002】

【従来技術】

近年糖尿病患者数は増加の一途を辿り、1998年の厚生省統計では我が国の推定罹患人口は690万人、予備軍を含めると1400万人と報告されている。糖尿病患者の生命予後と quality of life (QOL)を直接左右するのは、一次的なインスリン作用不足ではなく、高血糖の結果二次的に起こる全身各部の血管障害すなわち血管合併症である。したがって、糖尿病合併症の成因を明らかにし、また、如何にこれを克服するかを解明することは緊急な解決を要する国民的研究課題である。発明者らは、糖尿病合併症の発症・進展に関わる環境因子ならびに遺伝因子につき探索してきた結果、前者として糖尿病状態で加速的に形成・蓄積される後期糖化反応生成物(advanced glycation endproducts, AGE)、後者としてはAGEを認識・結合する細胞表面特異受容体(receptor for AGE, RAGE)と下流にあるシグナル分子群・エフェクター遺伝子群が重要であることを培養血管細胞を用いた試験管内実験ならびにトランスジェニック動物を用いた個体レベルでの実験から明らかにした(J. Biol. Chem., 272, 8723-8730, 1997; 275, 27781-25790, 2000; J. Clin. Invest., 108, 261-268, 2001)。

40

【0003】

従来、糖尿病血管合併症には感受性/抵抗性遺伝要因が存在することが知られているが、その実体については未だ不明である。

AGEは、糖尿病や老化に伴った様々な合併症に関与することが指摘され、モノサイト/マクロファージ、ニューロン、平滑筋細胞、内皮細胞などの細胞表面に発現される受容体な

50

どの細胞表面受容体と結合することも知られている。AGE はこうした受容体（レセプター）と相互作用し、様々な生理的及び生物学的作用を生体や細胞に及ぼすと考えられている。AGE は、例えば、内皮細胞に対してはそれを増殖させたり、また透過性や血栓形成を高める。また、モノサイト/マクロファージなどでは、サイトカインの放出を促したり、さらには細胞の増殖、移動、マトリックスの合成に関与する各種ファクターの放出を促したりする。さらに、脈管壁における炎症反応にも関与することも疑われている。

【 0 0 0 4 】

【発明が解決しようとする課題】

AGE はその受容体（レセプター）と相互作用し、様々な生理的及び生物学的作用を生体や細胞に及ぼし、その結果、様々な疾患や病気を引き起こしたり、悪化させる働きをしている証拠が明らかにされつつあるので、AGE と RAGE との間の相互作用に影響を与える物質を明らかにし、様々な疾患や病気の原因及びその予防や治療、診断をできるようにすることが求められている。

10

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】

ごく最近本発明者の山本は、ヒト血管細胞で発現するRAGE蛋白に分子多様性があり、これはRAGE遺伝子転写産物のオルタナティブ スプライシングによることを明らかにし（図1参照）、そして、主要分子種の一つが可溶型RAGE蛋白で、膜結合領域を欠くため細胞外に分泌される一方、成熟膜結合型蛋白と同一の細胞外ドメインをもつため、AGE を捕捉することを見出した。実際、組み換えヒト可溶型RAGE蛋白を精製しAGE リガンドとの結合実験を行うと、高い親和性で種々のAGE 画分と結合することが立証された。したがって、もしこの可溶型RAGE蛋白の発現の程度に個人差があれば、当該蛋白の血中レベルが高い患者は糖尿病合併症を起こしにくく、逆に血中レベルが低ければ合併症を起こしやすいという可能性が想定される。

20

かくして、このヒト可溶型RAGE蛋白に対するモノクローナル抗体を作製し、これを用いた当該タンパクの測定系を開発し、糖尿病合併症発症・進展のリスク予知を図ることを目的とする。本発明は、新規な可溶型RAGEポリペプチドあるいはその塩に特異的に免疫反応する抗体及びその各種用途、例えばスクリーニング、診断あるいは治療用途を提供する。

【 0 0 0 6 】

本発明は、

30

〔 1 〕 次のものに対する抗体：

(1)(A)可溶型 RAGE ポリペプチド若しくは

(B) (i) 該可溶型 RAGE のアミノ酸配列と少なくとも60% の相同性を有し且つ

(ii) (a) 可溶型 RAGE のアミノ酸配列のうちの少なくとも 5 ~ 347 個の連続したアミノ酸残基を有するもの、

(b) 膜結合型RAGEの有している膜貫通ドメインを欠失し且つC 末端側には配列表の配列番号：2のアミノ酸配列Glu³³² ~ Met³⁴⁷のうちの少なくとも 1 ~ 16個の連続したアミノ酸残基を有するもの、

(c) 配列表の配列番号：2のN 末端側アミノ酸配列Met¹ ~ Val¹¹⁷のうちの少なくとも 1 ~ 117 個の連続したアミノ酸残基を有し且つ膜結合型RAGEの有している膜貫通ドメインを欠失しているもの、

40

(d) 膜結合型RAGEの有しているN 末端側アミノ酸配列の1 ~ 117 個の連続したアミノ酸残基のうちの少なくとも 1 ~ 117 個の連続したアミノ酸残基を有し且つその C末端側には配列表の配列番号：2のアミノ酸配列Glu³³² ~ Met³⁴⁷のうちの少なくとも 1 ~ 16個の連続したアミノ酸残基を有するもの、及び

(e) 配列表の配列番号：2のアミノ酸配列を有するものあるいはそれと実質的に同等の生物活性を示すもの

から成る群から選ばれたポリペプチドまたはその塩、

(2) 配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列のうち、

(i) 少なくとも連続した5 ~ 115 個のアミノ酸残基を有するもの、

50

- (ii) 少なくとも連続した116 ~ 230 個のアミノ酸残基を有するもの、
- (iii) 少なくとも連続した231 ~ 347 個のアミノ酸残基を有するもの、
- (iv) 第1番目 ~ 第117番目のアミノ酸配列のうちの少なくとも1個以上の連続したアミノ酸残基を有するもの、
- (v) 第332番目 ~ 第347番目のアミノ酸配列のうちの少なくとも1個以上の連続したアミノ酸残基を有するもの、
- (vi) 第19番目 ~ 第347番目のアミノ酸配列を有するもの、
- (vii) 第1番目 ~ 第347番目のアミノ酸配列を有するもの、及び
- (viii) それらのいずれか一つと実質的に同等のアミノ酸配列を有するもの

からなる群から選ばれたポリペプチドまたはその塩、

10

(3) 前記(1)又は(2)のポリペプチドのうち、AGEとそのレセプターの間の相互作用、可溶性RAGEの発現量及び/又はAGE捕捉活性の変化に起因した疾患に対して活性を有するポリペプチドまたはその塩、あるいは

(4) 前記(1) ~ (3)のいずれか一記載のポリペプチドの部分ペプチドまたはその塩；

【0007】

〔2〕 上記〔1〕の(1) ~ (4)のいずれか一記載のポリペプチドまたはその塩と特異的に免疫反応する抗体を測定試薬として用いることを特徴とする上記〔1〕の(1) ~ (4)のいずれか一記載のポリペプチドまたはその塩の免疫学的測定方法；

〔3〕 上記〔1〕の(1) ~ (4)のいずれか一記載のポリペプチドまたはその塩と特異的に免疫反応する抗体を含むことを特徴とする組成物；

20

〔4〕 上記〔1〕の(1) ~ (4)のいずれか一記載のポリペプチドまたはその塩と特異的に免疫反応する抗体を含むことを特徴とする上記〔1〕の(1) ~ (4)のいずれか一記載のポリペプチドまたはその塩の免疫学的測定試薬；

〔5〕 上記〔1〕記載の抗体を含有していることを特徴とする医薬；

〔6〕 上記〔1〕記載の抗体を含有していることを特徴とするAGEとそのレセプターの間の相互作用、可溶性RAGEの発現量及び/又はAGE捕捉活性の変化に起因した疾患診断剤；

〔7〕 上記〔1〕記載の抗体を使用した、可溶性RAGEの産生を亢進し、糖尿病合併症の発症及び/又は進展を防ぐ化合物のスクリーニング方法又はスクリーニングキット；

〔8〕 上記〔1〕記載の抗体を使用した、体液中の可溶性RAGEを検出し、糖尿病合併症、老化に付随した各種疾患、アルツハイマー病、動脈硬化症、生体内タンパク質のグリケーション化に起因した疾患あるいは病気の発症及び/又は進展、腫瘍の浸潤又は拡散を予知する方法；及び

30

〔9〕 上記〔1〕記載の抗体を使用し、可溶性RAGEの産生をスクリーニングすることにより得られる、可溶性RAGE産生制御化合物を提供する。

【0008】

別の態様では、本発明は、

〔10〕 配列表の配列番号：2のアミノ酸配列Glu³³² ~ Met³⁴⁷のうちの少なくとも4 ~ 16個の連続したアミノ酸残基を有するポリペプチドまたはその塩と特異的に免疫反応する抗体；

40

〔11〕 上記〔10〕記載の抗体を測定試薬として用いることを特徴とする上記〔1〕の(1) ~ (4)のいずれか一記載のポリペプチドまたはその塩の免疫学的測定方法；

〔12〕 上記〔10〕記載の抗体を含むことを特徴とする組成物；

〔13〕 上記〔10〕記載の抗体を含むことを特徴とする上記〔1〕の(1) ~ (4)のいずれか一記載のポリペプチドまたはその塩の免疫学的測定試薬；

〔14〕 上記〔10〕記載の抗体を含有していることを特徴とする医薬；

〔15〕 上記〔10〕記載の抗体を含有していることを特徴とするAGEとそのレセプターの間の相互作用、可溶性RAGEの発現量及び/又はAGE捕捉活性の変化に起因した疾患診断剤；

〔16〕 固相化された抗体である上記〔1〕又は〔10〕記載の抗体；

50

〔17〕 標識化された抗体である上記〔1〕又は〔10〕記載の抗体；
 〔18〕 ヒト化された抗体である上記〔1〕又は〔10〕記載の抗体；
 〔19〕 上記〔1〕、〔10〕又は〔18〕記載の抗体を使用したAGE とそのレセプターの間の相互作用、可溶性RAGEの発現量及び／又はAGE 捕捉活性の変化に起因した疾患の治療及び／又は予防法；

【0009】

〔20〕 上記〔1〕、〔10〕、〔16〕、〔17〕又は〔18〕記載の抗体をアフィニティ・クロマトグラフィーなどのアフィニティプロープとして使用すること；

〔21〕 糖尿病合併症、老化に付随した各種疾患、アルツハイマー病、腫瘍の浸潤又は拡散、動脈硬化症、生体内タンパク質のグリケーション化に起因した疾患あるいは病気の診断あるいは検知のための上記〔2〕又は〔11〕記載の測定方法；

〔22〕 糖尿病合併症、老化に付随した各種疾患、アルツハイマー病、腫瘍の浸潤又は拡散、動脈硬化症、生体内タンパク質のグリケーション化に起因した疾患あるいは病気の診断あるいは検知のための上記〔4〕又は〔13〕記載の試薬；及び

〔23〕 糖尿病合併症、老化に付随した各種疾患、アルツハイマー病、腫瘍の浸潤又は拡散、動脈硬化症、生体内タンパク質のグリケーション化に起因した疾患あるいは病気の治療及び／又は予防用の上記〔5〕又は〔14〕記載の医薬を提供する。

また、本発明は、新規な可溶性RAGEに特異的に免疫反応する抗体、それらのスクリーニング、診断あるいは治療目的の用途を提供する。本発明は、可溶性RAGEに関係した遺伝子診断技術を提供し、例えば糖尿病、がん、アルツハイマー病などへの罹患抵抗性・感受性決定の一素因と考えられる新規な可溶性RAGEの発現や多型を遺伝子診断し、さらに、当該診断結果に基づき関連疾患罹病へのリスクを下げるような遺伝子治療技術を提供する。

【0010】

本発明のその他の目的、特徴、優秀性及びその有する観点は、以下の記載より当業者にとっては明白であろう。しかしながら、以下の記載及び具体的な実施例等の記載を含めた本件明細書の記載は本発明の好ましい態様を示すものであり、説明のためにのみ示されているものであることを理解されたい。本明細書に開示した本発明の意図及び範囲内で、種々の変化及び／又は改変（あるいは修飾）をなすことは、以下の記載及び本明細書のその他の部分からの知識により、当業者には容易に明らかであろう。本明細書で引用されている全ての特許文献及び参考文献は、説明の目的で引用されているもので、それらは本明細書の一部としてその内容はここに含めて解釈されるべきものである。

本明細書において、用語「及び／又は」とは、(1)併合的接続関係と(2)選択的接続関係の両方が存在することを意味しており、例えば「治療及び／又は予防」の場合では(1)治療及び予防並びに(2)治療又は予防の両方を包含する意味で使用されている。その他においても用語「及び／又は」は同様に(1)併合的接続関係と(2)選択的接続関係の両方を包含する意味で使用されている。

【0011】

【発明の実施の形態】

本明細書において「可溶性RAGE」とは、糖尿病性合併症と関連の深いReceptor for advanced glycation endproducts (RAGE)に関連したペプチドであって、RAGEのスプライシング

バリエーションで膜貫通領域を有しない本発明で開示されている新規なペプチドを指している。該可溶性RAGEは、347個のアミノ酸残基からなるペプチドであり、そのC末端側には特徴的な配列GluGlyPheAspLysValArgGluAlaGluAspSerProGlnHisMetを有しており、膜貫通型RAGE（膜型RAGE又は膜結合型RAGEともいう）に存在する膜貫通ドメインを欠いていることを特徴としている。該可溶性RAGEは、advanced glycation endproducts (AGEs) 結合活性を有するか、あるいはAGE とそのレセプターの間の相互作用に阻害あるいは抑制活性を有することが挙げられる。典型的には、本発明の可溶性RAGEは、生体内に存在する天然型ペプチド（内在性ペプチドあるいは内因性ペプチド）で、C末端部分の16個のアミノ酸残基においてRAGE蛋白質と異なっているものである。本発明の代表的な可溶性RAGEとしては、配列表の配列番号:1のDNA でコードされて産生されるポリペプチド、例えば配列表の配

10

20

30

40

50

列番号:2のアミノ酸配列またはそれと実質的に同等なアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる。また、本発明の代表的な可溶型RAGEは、配列表の配列番号:2のアミノ酸配列Glu³³²~Met³⁴⁷のうちの少なくとも1~16個の連続したアミノ酸残基をそのC末端側に有し且つAGE結合活性を有するもの、配列表の配列番号:2のアミノ酸配列Met¹~Val¹¹⁷のうちの少なくとも1~117個の連続したアミノ酸残基をN末端側に有し且つAGE結合活性を有するもの、あるいはそれらの特徴を有し且つ配列表の配列番号:2のアミノ酸配列Tyr¹¹⁸~Gly³³¹に対し少なくとも60%の相同性を有するものなどで、新規なものが挙げられる。

【0012】

本明細書で用いる用語「ポリペプチド」としては、以下に記載するような如何なるポリペプチドを指すものであってもよい。ポリペプチドの基本的な構造は周知であり、当該技術分野において非常に数多くの参考書及びその他の刊行物に記載がある。こうしたことに鑑み、本明細書で用いる用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合又は修飾したペプチド結合により互いに結合しているような2個又はそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチド又は任意のタンパク質を意味する。本明細書で用いる用語「ポリペプチド」としては、当該分野において通常、例えばペプチド、オリゴペプチドあるいはペプチドオリゴマーとも称せられる短い鎖のもの、及びタンパク質と一般的に言われ、多くの形態のものが知られている長い鎖のものの両方を意味してよい。ポリペプチドは、しばしば、通常、20種の天然型アミノ酸(天然に存在しているアミノ酸:あるいは遺伝子でコードされるアミノ酸)と称されるアミノ酸(20個存在している)以外のアミノ酸を含有していてもよい。ポリペプチドは、また末端アミノ酸残基を含めて、その多くのアミノ酸残基が翻訳された後にプロセッシング及びその他の改変(あるいは修飾)されるといった天然の工程によるのみならず、当業者に周知の化学的改変技術によっても、上記のポリペプチドはそれが改変(修飾)できることは理解されよう。該ポリペプチドに加えらる改変(修飾)については、多くの形態のものが知られており、それらは当該分野の基礎的な参考書及びさらに詳細な論文並びに多数の研究文献にも詳しく記載されており、これらは当業者に周知である。幾つかのとりわけ常套的な改変・修飾としては、例えばグリコシル化、脂質結合、硫酸化、グルタミン酸残基の α -カルボキシル化、水酸化及びADP-リボシル化等が挙げられ、例えばT. E. Creighton, *Proteins-Structure and Molecular Properties*, Second Edition, W. H. Freeman and Company, New York, (1993); B.C.Johnson (Ed.), *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, Academic Press, New York, (1983) (Wold, F., "Posttranslational Protein Modifications: Perspective and Prospects", pp.1-12); Seifter et al., "Analysis for Protein Modifications and nonprotein cofactors", *Methods Enzymol.*, 182: 626-646 (1990); Rattan et al., "Protein Synthesis: Posttranslational Modification and Aging", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 663: p.48-62 (1992)等の記載を参照できる。

【0013】

本発明の「ポリペプチド」としては、特に可溶型RAGE及びその関連ポリペプチドを包含する。該可溶型RAGE及びその関連ポリペプチドとしては、ヒト由来のものが挙げられ、可溶性でAGE結合活性を有するものあるいは膜貫通型RAGEに存在する膜貫通ドメインを欠いているもの、例えば膜貫通領域を有しないAGE結合活性を有するものが挙げられ、代表的にはC末端側に特徴的な配列GluGlyPheAspLysValArgGluAlaGluAspSerProGlnHisMetを有しているものが挙げられ、より具体的には、配列表の配列番号:2で表されるアミノ酸配列のうち、少なくとも第332位~第347位のアミノ酸配列を有するもの、第1位~第117位のアミノ酸配列を有するもの、同第19位~第347位のアミノ酸配列を有するもの、同第1位~第347位のアミノ酸配列を有するもの、及びそれらのいずれか一つと少なくとも60%より高い相同性、好ましくは70%以上の相同性、さらに好ましくは80%以上の相同性、また好ましくは85%以上の相同性、もっと好ましくは90%以上の相同性、より好ましくは95%以上の相同性、特に好ましくは97%以上の相同性を有し且つAGE結合活性、AGEとそのレセプターの間の相互作用に対する阻害あるいは抑制活性あるいは同等の抗原性などとい

10

20

30

40

50

った実質的に同等の生物学的活性を有するアミノ酸配列を有するものがすべて挙げられる。

【0014】

本発明のヒト可溶性RAGEとしては、膜に結合していない遊離のもの、可溶性のAGE 結合活性を有するもの、膜貫通型RAGEに存在する膜貫通ドメインを欠いているもの、C 末端側に Glu-Gly-Phe-Asp-Lys-Val-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Ser-Pro-Gln-His-Met あるいはその一部を有し、RAGEファミリーのサブライシング バリエーションの一種であるもので且つ新規なアミノ酸配列を有するものであればよい。より好ましくは、本発明のペプチドとしては、RAGEファミリーと少なくとも60% より高い相同性を持つアミノ酸配列を有するものうち、膜貫通ドメインを欠くだけでなく、配列表の配列番号：2のアミノ酸配列Glu³³²~Met³⁴⁷のうちの少なくとも1~16個の連続したアミノ酸残基を有するものが挙げられ、特に配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列のうち、少なくとも第332位~第347位のアミノ酸配列部位、第1位~第117位のアミノ酸配列部位あるいはその主要部位（例えば、該第332位~第347位の全部又は一部を含む連続したアミノ酸残基、あるいは該第1位~第347位のうちの連続したアミノ酸残基5個以上、好ましくは10個以上、また好ましくは20個以上、さらに好ましくは30個以上、より好ましくは40個以上、また好ましくは50個以上、さらに好ましくは60個以上、もっと好ましくは70個以上、また好ましくは80個以上、さらに好ましくは90個以上、もっとも好ましくは100個以上、また好ましくは110個以上）を有するものが挙げられる。代表的には、本発明のペプチドは、配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列のうち、少なくとも第19位~第347位のアミノ酸配列を有するもの、及びそれらのいずれか一つと実質的に同等のアミノ酸配列を有するものからなる群から選ばれたものである。さらに本発明のペプチドとしては、配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列の一部または全部を有していてもよい。こうした配列を有するものはすべて包含されてよい。

【0015】

本明細書中、「相同性」とは、ポリペプチド配列（あるいはアミノ酸配列）又はポリヌクレオチド配列（あるいは塩基配列）における2本の鎖の間で該鎖を構成している各アミノ酸残基同志又は各塩基同志の互いの適合関係において同一であると決定できるようなものの量（数）を意味し、二つのポリペプチド配列又は二つのポリヌクレオチド配列の間の配列相関性の程度を意味するものである。相同性は容易に算出できる。二つのポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列間の相同性を測定する方法は数多く知られており、「相同性」（「同一性」とも言われる）なる用語は、当業者には周知である（例えば、Lesk, A. M. (Ed.), *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, D. W. (Ed.), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Academic Press, New York, (1993); Griffin, A. M. & Griffin, H. G. (Ed.), *Computer Analysis of Sequence Data: Part I*, Human Press, New Jersey, (1994); von Heinje, G., *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Academic Press, New York, (1987); Gribskov, M. & Devereux, J. (Ed.), *Sequence Analysis Primer*, M-Stockton Press, New York, (1991) 等）。二つの配列の相同性を測定するのに用いる一般的な方法には、Martin, J. Bishop (Ed.), *Guide to Huge Computers*, Academic Press, San Diego, (1994); Carillo, H. & Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988) 等が開示されているものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。相同性を測定するための好ましい方法としては、試験する二つの配列間の最も大きな適合関係部分を得るように設計したものが挙げられる。このような方法は、コンピュータープログラムとして組み立てられているものが挙げられる。二つの配列間の相同性を測定するための好ましいコンピュータープログラム法としては、GCG プログラムパッケージ (Devereux, J. et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1): 387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215: 403 (1990)) 等が挙げられるが、これらに限定されるものでなく、当該分野で公知の方法を使用することができる。

【0016】

10

20

30

40

50

本発明の可溶型RAGEをコードする核酸は、代表的には配列表の配列番号：2で表されるペプチド及びその一部の連続したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するもの、例えば、配列表の配列番号：1で表される塩基配列の少なくとも25-1068位により構成される塩基配列を含有するもの、配列表の配列番号：1で表される塩基配列の少なくとも136-1065位により構成される塩基配列を含有するもの、及び配列表の配列番号：1で表される塩基配列の25-27位のATGから1066-1068位のTGAより構成される塩基配列を含有するもの（1066-1068の終止コドンTGAは、TAAまたはTAGであってもよい）であることができるし、配列表の配列番号：1で表される塩基配列の25位から1065位の塩基配列を含有するもの、塩基配列に開始コドン（Metをコードするコドン）及び終止コドンを付加したもの、また、該塩基配列がコードするタンパク質と少なくとも80%の相同性を有するアミノ酸配列を持ち且つ配列表の配列番号：2のアミノ酸配列Glu³³²~Met³⁴⁷のうちの少なくとも1~16個の連続したアミノ酸残基を有し、尚且つAGE結合活性、AGEとそのレセプターとの相互作用に対する阻害あるいは抑制活性を有するかあるいは同等の抗原性などのそれと実質的に同等の生物学的活性を有するペプチドをコードするといったそれと同効の塩基配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。該可溶型RAGEをコードする核酸は、一本鎖DNA、二本鎖DNA、RNA、DNA:RNAハイブリッド、合成DNAなどの核酸であり、またヒトゲノムDNA、ヒトゲノミックDNAライブラリー、ヒト組織・細胞由来のcDNA、合成DNAのいずれであってもよい。該可溶型RAGEをコードする核酸の塩基配列は、修飾（例えば、付加、除去、置換など）されることもでき、そうした修飾されたものも含まれてよい。さらには、以下説明するように、本発明の核酸は、本発明のペプチドあるいはその一部をコードするものであってよく、好ましいものとしてはDNAが挙げられる。また上記「同効の塩基配列」とは、例えばストリンジентな条件で配列表の配列番号：1の塩基配列のうち連続した5個以上の塩基配列、好ましくは10個以上の塩基配列、より好ましくは15個以上の塩基配列、さらに好ましくは20個以上の塩基配列とハイブリダイズし、該可溶型RAGEと実質的に同等のアミノ酸配列をコードするものなどが挙げられる。

【0017】

配列表の配列番号：1で表される塩基配列またはそれと同効の塩基配列を含有する本発明のDNAは、例えば以下に示す方法によって取得できる。

なお、遺伝子組換え技術は、例えば J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); 日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法II」、東京化学同人 (1986); 日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸III (組換えDNA技術)」、東京化学同人 (1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, New York (1987); J. H. Miller ed., "Methods in Enzymology", Vol. 204, Academic Press, New York (1991); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 218, Academic Press, New York (1993)などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含まれる）。

【0018】

クローニングされているヒト由来のcDNAライブラリー、例えば種々のヒト由来の組織あるいは培養細胞（特に、ヒトの腎臓、脳、松果体、下垂体後葉、神経細胞、網膜、網膜血管細胞、網膜神経細胞、胸腺、血管、内皮細胞、血管平滑筋細胞、血液細胞、マクロファージ、リンパ球、精巣、卵巣、子宮、腸、心臓、肝臓、膵臓、小腸、大腸、歯肉関連細胞

10

20

30

40

50

、皮膚関連細胞、糸球体細胞、尿細管細胞、結合組織細胞などの組織・細胞等) cDNAライブラリーから得られたcDNA挿入配列を持つプラスミドを、適当な検知系によって、AGE 結合活性あるいはAGE とそのレセプターとの相互作用に対する阻害あるいは抑制活性のうちの少なくとも一つの活性を指標にして選別を行う。この検索手法は、繰り返し行なうことができる。こうして同定された核酸につき、その配列決定する。また、同定された配列に基づいて適切なプライマーを設計・合成し、場合によっては、同定された配列のオリジンである動物由来のcDNAライブラリーを用いるなどし、目的の配列をポリメラーゼ・チェーン・リアクション(polymerase chain reaction: PCR)増幅する。得られたDNA 断片はそれをプローブに種々のヒト組織あるいは培養細胞等から構築されたヒトゲノミック DNAライブラリーあるいはヒト由来cDNAライブラリーをスクリーニングし、プローブにハイブリダイズするクローンを選択し、該クローン中の(c)DNAの挿入配列の塩基配列を決定し、新規な可溶性RAGE及びそれに関連する塩基配列を有するDNA 断片を決定・取得することもできる。必要に応じて該クローン中の DNAの挿入配列はサブクローニングすることができる。こうして解析された新規なポリペプチドをコードしている核酸を有していると考えられるDNA 配列を基に、該可溶性RAGE及びそれに関連する塩基配列をコードする遺伝子を取得することも可能である。また、解析された該新規な可溶性RAGE及びそれに関連する遺伝子配列(DNA配列) を基にセンスプライマーとアンチセンスプライマーをデザインし、合成することができる。センスプライマーは、好ましくは解析された該所望のペプチドと推定されるコード配列の5'端側のエキソン部位から選んで合成することができ、アンチセンスプライマーは、好ましくは解析された該所望のペプチドと推定されるコード配列の3'端側のエキソン部位から選んで合成することができ、より好ましくは該センスプライマー合成に利用したエキソン部位以外から選ぶことができる。

【 0 0 1 9 】

当該cDNAは、その全長を一度に入手することを目指してもよいが、解析されたエキソン部位(複数のエキソン部位)を利用して、複数のプライマーをデザインして合成し、複数のPCR をデザインして行い(必要に応じて塩基配列決定されたDNA 断片を解析して、当該cDNAの全塩基配列を決定し、それに基づいてクローニングし)、得られたDNA 断片から当該所望のcDNAを得ることができる。プライマーは、好ましくは 5個以上の塩基、さらに好ましくは10個以上の塩基からなるオリゴヌクレオチド、より好ましくは18~25個の塩基からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる。プライマーの作製は、当該分野で知られた方法で行うことができ、代表的にはフォスフォジエステル法、フォスフォトリエステル法、フォスフォアミダイト法などにより合成でき、例えば自動DNA 合成装置、例えば、model 381A DNA synthesizer (Applied Biosystems) などを用いて合成できる。cDNAライブラリーと前記のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーを用いてPCR を行い、cDNAを増幅することもできる。また、当該核酸の取得には、上記のようにして同定されたクローンから特異的なハイブリダイゼーションプローブを調製し、ヒト由来DNA ライブラリーをスクリーニングし、プローブにハイブリダイズするクローンを選択することにより行うことができる。プローブなどを放射性同位体などによって標識するには、市販の標識キット、例えばランダムプライム DNAラベリングキット (Boehringer Mannheim)などを使用して行うことができる。例えば、random-primingキット (Pharmacia LKB, Uppsala) などを使用して、プローブ用DNA を [^{32}P]dCTP (Amersham)などで標識し、放射活性を持つプローブを得ることができる。

【 0 0 2 0 】

さらに鑄型として用いるcDNAライブラリーは、市販の種々の組織由来cDNAライブラリーを直接使用することもでき、例えばStratagene, Invitrogen, Clontechなどから市販されたcDNAライブラリーを用いることができる。典型的な例では、該標識DNA 断片とヒト組織・細胞から調製した遺伝子ライブラリー、例えばヒトP1 artificial chromosome ゲノミックライブラリー(Human Genome Mapping Resource Center)、ヒト脳cDNAライブラリー(例えば、Clontechなどから入手可能)を用い、ハイブリダイゼーションを行う。ヒト脳cDNAライブラリーは、例えば、gt10などのファージ中に構築することができ、それを大腸菌

10

20

30

40

50

C600hf1 株などの宿主大腸菌に感染させ、プラークを形成させて得ることができる。必要に応じて該クローン中のcDNAの挿入配列はサブクローニングすることができる。決定された塩基配列を基にして、目的とするDNAを単離することもできる。

塩基配列の決定は、ダイデオキシ法、例えばM13ダイデオキシ法など、Maxam-Gilbert法などを用いて行うことができるが、市販のシーケンシングキット、例えばTaqダイブライマーサイクルシーケンシングキット(Applied Biosystems)、Sequenase v 2.0 kitなどを用いたり、自動塩基配列決定装置、例えば蛍光DNAシーケンサー装置(例えば、Model 373A, Applied Biosystems)などを用いて行うことができる。ダイデオキシ法に用いられるポリメラーゼとしては、例えば、DNAポリメラーゼIのクレノー・フラグメント、AMV逆転写酵素、Taq DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、修飾T7 DNAポリメラーゼなどが挙げられる。

10

【0021】

本明細書中、「ポリメラーゼ・チェイン・リアクション(Polymerase Chain Reaction)」又は「PCR」とは、一般的に、米国特許第4683195号明細書などに記載されたような方法を指し、例えば、所望のヌクレオチド配列をインビトロで酵素的に増幅するための方法を指している。一般に、PCR法は、鋳型核酸と優先的にハイブリダイズすることのできる2個のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、プライマー伸長合成を行うようなサイクルを繰り返し行うことを含むものである。典型的には、PCR法で用いられるプライマーは、鋳型内部の増幅されるべきヌクレオチド配列に対して相補的なプライマーを使用することができ、例えば、該増幅されるべきヌクレオチド配列とその両端において相補的であるか、あるいは該増幅されるべきヌクレオチド配列に隣接しているものを好ましく使用され得る。

20

PCR反応は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、例えばR. Saiki, et al., Science, 230: 1350, 1985; R. Saiki, et al., Science, 239: 487, 1988; H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols: a guide to methods and applications", Academic Press, New York (1990); M. J. McPherson, P. Quirke and G. R. Taylor (Ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991); M. A. Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988)などに記載された方法あるいはそれを修飾したり、改変した方法に従って行うことができる。また、PCR法は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。

30

【0022】

代表的な場合には、例えば鋳型となる1st strand DNAとプライマーとを、10×反応緩衝液(Taq DNAポリメラーゼに添付されている)、dNTPs(デオキシヌクレオシド三リン酸dATP, dGTP, dCTP, dTTPの混合物)、Taq DNAポリメラーゼ及び脱イオン蒸留水と混合する。混合物を、例えば、GeneAmp 2400 PCR system, Perkin-Elmer/Cetusなどの自動サーマルサイクラーを用いて一般的なPCRサイクル条件下にそのサイクルを25~60回繰り返すが、増幅のためのサイクル数は適宜目的に応じて適当な回数とすることができる。PCRサイクル条件としては、例えば、変性90~95 5~100秒、アニーリング40~60 5~150秒、伸長65~75 30~300秒のサイクル、好ましくは変性94 15秒、アニーリング58 15秒、伸長72 45秒のサイクルが挙げられるが、アニーリングの反応温度及び時間は適宜実験によって適当な値を選択できるし、変性反応及び伸長反応の時間も、予想されるPCR産物の鎖長に応じて適当な値を選択できる。アニーリングの反応温度は、通常プライマーと鋳型DNAとのハイブリッドのTm値に応じて変えることが好ましい。伸長反応の時間は、通常1000bpの鎖長当たり1分程度がおおよその目安であるが、より短い時間を選択することも場合により可能である。

40

【0023】

50

得られたPCR産物は、通常1~2%アガロースゲル電気泳動にかけて、特異なバンドとしてゲルから切り出し、例えば、gene clean kit (Bio 101)などの市販の抽出キットを用いてDNAを抽出する。抽出されたDNAは適当な制限酵素で切断し、必要に応じ精製処理したり、さらには必要に応じ5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼなどによりリン酸化した後、pUC18などのpUC系ベクターといった適当なプラスミドベクターにライゲーションし、適当なコンピュタント細胞を形質転換する。クローニングされたPCR産物はその塩基配列を解析される。

また、当該遺伝子のエキソン部位のうち解析した5'端側のエキソン部位の塩基配列に基づいてデザインされたプライマーを利用して、当該所望のcDNAの5'端側のcDNAを取得し、一方当該遺伝子のエキソン部位のうち解析した3'端側のエキソン部位の塩基配列に基づいてデザインされたプライマーを利用して、当該所望のcDNAの3'端側のcDNAを取得し、次に必要に応じてこれらプライマーや得られた当該遺伝子の5'端側のcDNA並びに3'端側のcDNAの塩基配列の情報を利用してデザインしたプライマーを用い、ヒトの組織、特にヒト脳組織などから単離したmRNAから逆転写酵素により作製された1st strand cDNAを鋳型にしてPCRにより増幅して、当該遺伝子のcDNAを得ることもできる。

【0024】

5'端側のプライマーとしては、少なくとも開始コドンを含むか、あるいは該開始コドンを含めて増幅できるように選択し、また3'端側のプライマーとしては、少なくともストップコドンを含むか、あるいは該ストップコドンを含めて増幅できるように選択することが好ましい。当該遺伝子の全長のcDNAを得るにあたり、PCRは上記したようにして行なうことができ、また好ましいPCRサイクル条件としては、例えば、変性92~95 10~20秒、アニーリング55~60 10~30秒、伸長65~75 150~300秒のサイクル、より好ましくは変性94 15秒、アニーリング58 15秒、伸長68 4分のサイクルが挙げられる。

得られたPCR産物は、上記と同様にしてクローニングしてその塩基配列を解析され決定される。

また決定されたDNAの塩基配列を基にプライマーをデザインし、これらプライマーと各種の動物細胞由来のcDNAライブラリー（例えば、各種のヒト細胞由来のcDNAライブラリー）を用いて、スクリーニングを行うことにより、同様に目的とするクローンを得ることができる。またこれらプライマーを用いてPCR増幅を行い、目的とするコード配列含有核酸や、新規な遺伝子、それらの断片などを得ることができる。こうして可溶性RAGEと相同性を有するが、配列が新規なPCR産物を検索することもできる。

【0025】

本明細書中、「オリゴヌクレオチド」とは、比較的短い一本鎖又は二本鎖のポリヌクレオチドで、好ましくはポリデオキシヌクレオチドが挙げられ、Angew. Chem. Int. Ed. Engl., Vol.28, p.716-734 (1989)に記載されているような既知の方法、例えば、トリエステル法、ホスファイト法、ホスホアミダイト法、ホスホネート法などの方法により化学合成されることができる。通常合成は、修飾された固体支持体上で合成を便利に行うことができることが知られており、例えば、自動化された合成装置を用いて行うことができ、該装置は市販されている。該オリゴヌクレオチドは、一つ又はそれ以上の修飾された塩基を含有してよく、例えば、イノシンなどの天然においては普通でない塩基あるいはトリチル化された塩基などを含有してよい。

得られたPCR産物をクローニングし、得られたPCR産物の塩基配列を決定し、新規な可溶性RAGE及びそれに関連したコード配列を有するDNA断片を取得することもできる。また、このDNA断片をプローブに同様にして種々のcDNAライブラリーをスクリーニングし、目的とするDNAを単離することもできる。PCR産物のクローニングには、例えば、p-Direct (Clontech), pCR-Script™ SK(+) (Stratagene), pGEM-T (Promega), pAmp™ (Gibco-BRL)などの市販のプラスミドベクターを用いることが出来る。

【0026】

cDNAライブラリーを構築するためには、cDNAを入手する必要があるが、これは、例えば次

10

20

30

40

50

のようにして得られる。種々のヒトの組織あるいは培養細胞からmRNAを単離する。mRNAの単離は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、J. Sambrook et al., "Molecular Cloning", 2nd ed., Chapter 7, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) ; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) ; L. Grossman et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 12, Part A & B, Academic Press, New York (1968); S. L. Berger et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 152, p.33 & p.215, Academic Press, New York (1987); Biochemistry, 18: 5294-5299, 1979などに記載の方法、例えばグアニジン - 塩化セシウム法、チオシアン酸グアニジン法、フェノール法などの方法で行うことができる。mRNAの単離に用いられるキットとしては、例えば、Pharmacia, Stratagene, Gibco-BRLなどから市販されているものが挙げられる。必要に応じ、得られた全RNA はオリゴ(dT) - セルロースカラム、スピンカラム、オリゴ(dT)結合磁性ビーズなどを使用して精製してポリ(A)⁺ mRNAを得ることが出来る。

【 0 0 2 7 】

このmRNA及び逆転写酵素(RNA依存性DNAポリメラーゼ)を用いて、cDNAを作製する。逆転写反応では、オリゴ(dT)プライマーを用いることができる。オリゴ(dT)プライマーは、好適には12~18個のT残基を持つものが使用できる。指向性クローニングを行う場合には、12~18個のT残基の5'側に制限酵素部位を連結した合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いることも好ましい。こうしたプライマーの例としては、Xba I オリゴ(dT)プライマーアダプターなどが挙げられる。またランダムヘキサマープライマーを用いると、mRNAの5'末端側が得られる可能性が増大し、このランダムヘキサマープライマーは単独で、あるいはオリゴ(dT)プライマーと混合して使用できる。逆転写反応では、必要に応じてRNase 阻害剤、例えば、RNasin (Boehringer Mannheim)を加えることができる。mRNA及び逆転写酵素を用いてのcDNA合成は当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、H. Land et al., Nucleic Acids Res., 9: 2251, 1981; U. Gubler et al., Gene, 25: 263-269, 1983; S. L. Berger et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 152, p.307, Academic Press, New York (1987) などに記載の方法が挙げられる。

【 0 0 2 8 】

得られたcDNAはそれを基にして、ファージベクター、プラスミドベクターを使用するなどしてcDNAライブラリーを構築できる。またファージベクターを使用する以外で、大腸菌などの宿主細胞の形質転換をするには、例えばカルシウム法、ルビジウム/カルシウム法、カルシウム/マンガン法、TFB 高効率法、FSB 凍結コンピテント細胞法、迅速コロニー法、エレクトロポレーションなど当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができる(D. Hanahan, J. Mol. Biol., 166: 557, 1983 など)。目的とするDNAを単離するためには、逆転写PCR (polymerase chain reaction coupled reverse transcription; RT-PCR)、RACE (rapid amplification of cDNA ends)を適用することが出来る。RACEは、例えば、M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols" (M. A. Frohman, "a guide to methods and applications"), pp.28-38, Academic Press, New York (1990) などに記載された方法に従って行うことができる。RT-PCR産物はプラスミドベクターにクローニングすることができ、それを高効率のコンピテント細胞に導入できる。更に、微量の細胞あるいは組織からmRNAを単離精製できる方法、例えば、REX kit, United States Biochemical; Glass MAXTM RNA spin cartridge system, Gibco-BRLなどの市販のキットを利用し、得られたmRNAをオリゴ(dT)プライマーを用いて逆転写して、1st strand DNAを合成し、ついで1st strand DNAの3'末端にホモポリマーテール(例えば、G残基)を付けた後、あるいは該DNAにアダプターを付けた後、オリゴ(dT)プライマーとオリゴ(dC)プライマーあるいはアダプタープライマーを用いてcDNAをPCR増幅することもできる。これに適した市販のキットとしては、SuperScriptTM pre-amplification system (Gibco-BRL); cDNA CycleTM kit (Invitrogen)などが挙げられる。

【 0 0 2 9 】

ハイブリダイゼーションは、所定の挿入DNAを保持するなどしている微生物により形成されたブランクをナイロンフィルターなどの膜に転写せしめ、必要に応じ変成処理、固定化処理、洗浄処理などを施した後、その膜に転写せしめられたものを、必要に応じ変成させた標識プローブDNA断片と、ハイブリダイゼーション用バッファ中で反応させて行われる。ハイブリダイゼーション処理は、普通約35～約80、より好適には約50～約65で、約15分～約36時間、より好適には約1時間～約24時間行われるが、適宜最適な条件を選択して行うことができる。例えば、ハイブリダイゼーション処理は、約55で約18時間行われる。ハイブリダイゼーション用バッファとしては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができ、例えば、Rapid hybridization buffer (Amersham)などを
10
用いることができる。転写した膜の変成処理としては、アルカリ変性液を使用する方法が挙げられ、その処理後中和液や緩衝液で処理するのが好ましい。また膜の固定化処理としては、普通約40～約100、より好適には約70～約90で、約15分～約24時間、より好適には約1時間～約4時間ベーキングすることにより行われるが、適宜好ましい条件を選択して行うことができる。例えば、フィルターを約80で約2時間ベーキングすることにより固定化が行われる。転写した膜の洗浄処理としては、当該分野で普通に使用される洗浄液、例えば1M NaCl、1mM EDTAおよび0.1% Sodium Dodecyl sulfate (SDS) 含有50mM Tris-HCl緩衝液、pH8.0などで洗うことにより行うことができる。ナイロンフィルターなどの膜としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができ、例えば、ナイロンフィルター [ハイボンド (Hybond)-N、Amersham] などを挙げる
20
ことができる。

【 0 0 3 0 】

上記アルカリ変性液、中和液、緩衝液としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができ、アルカリ変性液としては、例えば、0.5M NaOH および1.5M NaClを含有する液などを挙げる
30
ことができ、中和液としては、例えば、1.5M NaCl 含有0.5M Tris-HCl 緩衝液、pH8.0などを挙げる
30
ことができ、緩衝液としては、例えば、2×SSPE (0.36M NaCl、20mM Na₂HPO₄および2mM EDTA)などを挙げる
30
ことができる。またハイブリダイゼーション処理に先立ち、非特異的なハイブリダイゼーション反応を防ぐために、必要に応じて転写した膜はプレハイブリダイゼーション処理することが好ましい。このプレハイブリダイゼーション処理は、例えば、プレハイブリダイゼーション溶液 [50% formamide、5×Denhardt's溶液 (0.2% ウシ血清アルブミン、0.2% polyvinyl pyrrolidone)、5×SSPE、0.1% SDS、100 µg/ml 熱変性サケ精子DNA]などに浸し、約35～約50、好ましくは約42で、約4～約24時間、好ましくは約6～約8時間反応させることにより行うことができるが、こうした条件は当業者であれば適宜実験を繰り返し、より好ましい条件を決めることができる。ハイブリダイゼーションに用いる標識プローブDNA断片の変成は、例えば、約70～約100、好ましくは約100で、約1分間～約60分間、好ましくは約5分間加熱するなどして行うことができる。なお、ハイブリダイゼーションは、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で行うことができるが、本明細書でストリンジентな条件とは、例えばナトリウム濃度に関し、約15～約50mM、好ましくは約19～約40mM、より好ましくは約19～約20mMで、温度については約35～約85、好ましくは約50～約70、より好ましくは約60～約65の条件を示す。
40

【 0 0 3 1 】

ハイブリダイゼーション完了後、フィルターを十分に洗浄処理し、特異的なハイブリダイゼーション反応をした標識プローブDNA断片以外の標識プローブを取り除く。フィルターの洗浄処理は、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いて行うことができ、例えば、0.1% SDS含有0.5×SSC (0.15M NaCl、15mM クエン酸) 溶液などで洗うことにより実施できる。

ハイブリダイズしたブランクは、代表的にはオートラジオグラフィーにより検出することができるが、当該分野で用いられる方法の中から適宜選択してブランク検出に用いることもできる。検出したシグナルに相当するブランクを、適切な緩衝液、例えば、SM溶液 (1
50

00mM NaCl および10mM MgSO₄含有50mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.5)などに懸濁し、ついでこのファージ懸濁液を適度に希釈して、大腸菌に感染させ、得られた大腸菌を培養して、その培養された大腸菌から目的組換え体ファージを得る。なお、必要に応じて上記プローブDNA を使用して、ハイブリダイゼーション処理により遺伝子ライブラリーやcDNAライブラリーから目的組換え体ファージをスクリーニングする処理は、繰り返して行うことができる。また目的組換え体ファージは、培養された大腸菌から抽出処理、遠心分離処理などを施して得ることができる。

【0032】

得られたファージ粒子は、当該分野で普通に使用される方法で精製分離することができ、例えば、グリセロールグラジエント超遠心分離法 (Molecular cloning, a laboratory manual, ed. T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed. 78, 1989) などにより精製することができる。ファージ粒子からは、当該分野で普通に使用される方法でDNA を精製分離することができ、例えば、得られたファージをTM溶液 (10mM MgSO₄含有50mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.8)などに懸濁し、DNase I およびRNase A などで処理後、20mM EDTA、50 µg/ml Proteinase K 及び0.5 % SDS 混合液などを加え、約65℃、約1時間保温した後、これをフェノール抽出ジエチルエーテル抽出後、エタノール沈殿によりDNA を沈殿させ、次に得られたDNA を70%エタノールで洗浄後乾燥し、TE溶液 (10mM EDTA 含有10mM Tris-HCl 緩衝液、pH8.0)に溶解するなどして得られる。また、目的としているDNA は、サブクローニングなどにより大量に得ることも可能であり、例えばサブクローニングは、宿主として大腸菌を用いプラスミドベクターなどを用いて行うことができる。こうしたサブクローニングにより得られたDNA も、上記と同様にして遠心分離、フェノール抽出、エタノール沈殿などの方法により精製分離できる。

【0033】

こうして本発明に従って、目的とするDNA を含有するクローン (例えば、組換え体ファージなどとして) を得ることができる。例えば、このクローン化した組換え体ファージより単離されたDNA インサートの配列決定された塩基配列の全長は1223bpであり、その配列は配列表の配列番号: 1で示されたものが得られていることが認められる。同定されたDNA 配列中には、推定347個のアミノ酸をコードするオープンリーディングフレームの存在が認められ、その推定されるアミノ酸配列は、配列表の配列番号: 2で示されるようなものと認められる。本配列は、RAGEのスプライシング バリエーションであって、そのC末端側には特徴的な配列Glu-Gly-Phe-Asp-Lys-Val-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Ser-Pro-Gln-His-Met を有しており、さらに膜貫通型RAGEに存在する膜貫通ドメインを欠いたものである。この推定されるタンパク質は、新規なヒトRAGE類の一つであり、それをここでは「可溶型RAGE」と呼ぶ。そして、可溶型RAGE遺伝子は、新規なRAGEファミリーに属するポリペプチドをコードしていることは明白であり、可溶型RAGE遺伝子を用いて作製した組換え体プラスミドは全て新規な組換え体であり、そのプラスミドで形質転換あるいはトランスフェクトされ得られた形質転換体あるいはトランスフェクタントも新規なものである。

【0034】

配列表の配列番号:1で示される塩基配列の全部あるいは一部を有する核酸は、化学合成によって得ることも可能である。その場合断片を化学合成し、それらを酵素により結合することによってもよい。また、化学合成断片を上記したようにして、プライマーあるいはプローブとして用いて目的とする配列を得ることも可能である。PCR法で用いるプライマーとしては、上記の部位を含むDNA断片を増幅できるものであれば、特に限定されない。代表的には、プライマーは (a)配列表の配列番号:1に示された塩基配列のうちの任意の領域に相当する塩基配列を有するオリゴヌクレオチド及び (b)配列表の配列番号:1に示された塩基配列のうちの任意の領域に対する相補塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用することができ、より好ましくは(1)配列表の配列番号:1に示された塩基配列のうちの5'端側の任意の領域に相当する塩基配列を有するオリゴヌクレオチド及び (2)配列表の配列番号:1に示された塩基配列のうちの3'端側の任意の領域に対する相補塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用することができ、例えば、5個以上の塩基、より好ましくは10個以

10

20

30

40

50

上の塩基、さらに好ましくは15個以上の塩基を有するオリゴヌクレオチドが挙げられ、3～150個、好ましくは10～150個、より好ましくは10～50個、さらに好ましくは15～35個のヌクレオチドを含有するものが挙げられる。また、PCR条件も特に限定されず、通常行われる公知の条件でよく、例えば、上記した文献の記載を参考に選択することができる。PCRにおいては、DNA鎖の熱変性、プライマーのアニーリング及びポリメラーゼによる相補鎖の合成からなる一つのサイクルが、例えば、10～50回、好ましくは20～35回、より好ましくは25～30回繰り返して行われる。

【0035】

本発明で得られたDNA断片を、下記で詳しく説明するような適当なベクター、例えば、プラスミドpEX、pMAMneo、pKG5などのベクターに組み込み、下記で詳しく説明するような適当な宿主細胞、例えば、大腸菌、酵母、CHO細胞、COS細胞などで発現させることができる。また、該DNA断片は、そのままあるいは適当な制御配列を付加したDNA断片として、または適当なベクターに組み込み、そして動物に導入して、可溶性RAGE遺伝子、例えば、可溶性RAGEを発現するトランスジェニック動物を作成することができる。動物としては、哺乳動物が挙げられ、例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ウシなどが挙げられる。好ましくは、マウスなどの動物の受精卵に該DNA断片を導入して、トランスジェニック動物を作成することができる。

可溶性RAGE遺伝子産物の確認を、可溶性RAGE遺伝子をトランスフェクションした、293T細胞、COS-1細胞などのそれに適した動物細胞などを用いて行うことができる。この外来遺伝子を哺乳動物などの動物細胞に導入する方法としては当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができ、例えばリン酸カルシウム法（例えば、F. L. Graham et al., *Virology*, 52: 456, 1973など）、DEAE-デキストラン法（例えば、D. Warden et al., *J. Gen. Virol.*, 3: 371, 1968など）、エレクトロポレーション法（例えば、E. Neumann et al., *EMBO J*, 1: 841, 1982など）、マイクロインジェクション法、リポソーム法、ウイルス感染法、ファージ粒子法などが挙げられる。こうして可溶性RAGE遺伝子をトランスフェクションされた動物細胞の産生する遺伝子産物は、それを解析することもできる。

【0036】

可溶性RAGE遺伝子など（本発明で得られたDNAなど）を組み込むプラスミドとしては遺伝子工学的に常用される宿主細胞（例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母、CHO細胞、COS細胞等の真核細胞宿主、Sf21等の昆虫細胞宿主）中で該DNAが発現できるプラスミドであればどのようなプラスミドでもよい。こうした配列内には、例えば選択した宿主細胞で発現するのに好適に修飾されたコドンが含まれていることができるし、制限酵素部位が設けられていることもできるし、目的とする遺伝子の発現を容易にするための制御配列、促進配列など、目的とする遺伝子を結合するのに役立つリンカー、アダプターなど、さらには抗生物質耐性などを制御したり、代謝を制御したりし、選別などに有用な配列（ハイブリドタンパク質や融合タンパク質をコードするものも含む）等を含んでいることができる。

好ましくは、適当なプロモーター、例えば大腸菌を宿主とするプラスミドでは、トリプトファンプロモーター(*trp*)、ラクトースプロモーター(*lac*)、トリプトファン・ラクトースプロモーター(*tac*)、リポプロテインプロモーター(*lpp*)、ファージ P_L プロモーター等を、動物細胞を宿主とするプラスミドでは、SV40レートプロモーター、MMTV LTRプロモーター、RSV LTRプロモーター、CMVプロモーター、SRプロモーター等を、酵母を宿主とするプラスミドでは、GAL1、GAL10プロモーター等を使用し得る。

【0037】

大腸菌を宿主とするプラスミドとしては、例えばpBR322、pUC18、pUC19、pUC118、pUC19、pSP64、pSP65、pTZ-18R/-18U、pTZ-19R/-19U、pGEM-3、pGEM-4、pGEM-3Z、pGEM-4Z、pGEM-5Zf(-)、pBluescript KSTM、(Stratagene)などが挙げられる。大腸菌での発現に適したプラスミドベクターとしては、pAS、pKK223 (Pharmacia)、pMC1403、pMC931、pKC30、pRSET-B (Invitrogen)なども挙げられる。動物細胞を宿主とするプラスミドと

10

20

30

40

50

しては、SV40ベクター、ポリオーマ・ウイルスベクター、ワクシニア・ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられ、例えばpcD、pcD-SR、CDM8、pCEV4、pME18S、pBC12BI、pSG5 (Stratagene) などが挙げられる。酵母を宿主とするプラスミドとしては、Ylp 型ベクター、YEp 型ベクター、YRp 型ベクター、YCp 型ベクターなどが挙げられ、例えばpGPD-2などが挙げられる。宿主細胞としては、宿主細胞が大腸菌の場合、例えば大腸菌K12 株に由来するものが挙げられ、例えばNM533、XL1-Blue、C600、DH1、DH5、DH11S、DH12S、DH5、DH10B、HB101、MC1061、JM109、STBL2、B834株由来としては、BL21(DE3)pLysSなどが挙げられる。宿主細胞が動物細胞の場合、例えばアフリカミドリザル線維芽細胞由来のCOS-7 細胞、COS-1 細胞、CV-1細胞、マウス線維芽細胞由来のCOP 細胞、MOP 細胞、WOP 細胞、チャイニーズ・ハムスター細胞由来のCHO 細胞、CHO DHFR⁻ 細胞、ヒトHeLa細胞、マウス細胞由来C127細胞、マウス細胞由来NIH 3T3 細胞などが挙げられる。昆虫細胞としては、カイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus) あるいはそれに由来するものをベクターとし、カイコ幼虫あるいはカイコ培養細胞、例えばBM-N細胞などを用いることが挙げられる。植物細胞を宿主細胞として使用することも可能であり、それに適するベクターと共に、それらは当該分野で広く知られている。

【 0 0 3 8 】

本発明の遺伝子工学的手法においては、当該分野で知られたあるいは汎用されている制限酵素、逆転写酵素、DNA 断片をクローン化するのに適した構造に修飾したりあるいは変換するための酵素であるDNA 修飾・分解酵素、DNA ポリメラーゼ、末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ、DNA リガーゼなどを用いることが出来る。制限酵素としては、例えば、R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.*, 13: r165, 1985; S. Linn et al. ed. *Nucleases*, p. 109, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York, 1982; R. J. Roberts, D. Macelis, *Nucleic Acids Res.*, 19: Suppl. 2077, 1991などに記載のものが挙げられる。逆転写酵素としては、例えばマウスモロネイ白血病ウイルス (mouse Moloney leukemia virus; MMLV) 由来の逆転写酵素 (reverse transcriptase)、ニワトリ骨髄芽球症ウイルス (avian myeloblastosis virus; AMV) 由来の逆転写酵素などが挙げられる。逆転写酵素は、RNase H 欠損体などは好ましく用いることができ、特にRNase H 活性を欠いた修飾MMLV RT が好ましく使用でき、さらには熱安定性の高いものが好ましい。適した逆転写酵素としては、MMLV RT (Gibco-BRL)、Superscript RT plus (Life Technologies) などが挙げられる。

【 0 0 3 9 】

DNA ポリメラーゼとしては、例えば大腸菌DNA ポリメラーゼ、その誘導体であるクレノウ・フラグメント、大腸菌ファージT4 DNAポリメラーゼ、大腸菌ファージT7 DNAポリメラーゼ、耐熱菌DNA ポリメラーゼなどが挙げられる。末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼとしては、例えばR. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 96, Academic Press, New York (1983) に記載の3'-OH 末端にデオキシヌクレオチド(dNMP)を付加するTdTaseなどが挙げられる。DNA 修飾・分解酵素としては、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼなどが挙げられ、例えばヘビ毒ホスホジエステラーゼ、脾臓ホスホジエステラーゼ、大腸菌DNA エキソヌクレアーゼ I、大腸菌DNA エキソヌクレアーゼ III、大腸菌DNA エキソヌクレアーゼ VII、エキソヌクレアーゼ、DNase I、ヌクレアーゼS1、ミクロコッカス (*Micrococcus*) ヌクレアーゼなどが挙げられる。DNA リガーゼとしては、例えば大腸菌DNA リガーゼ、T4 DNAリガーゼなどが挙げられる。

DNA 遺伝子をクローニングしてDNA ライブラリーを構築するのに適したベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミド、P1ファージ、F 因子、YAC などが挙げられ、好ましくはファージ由来のベクターが挙げられ、例えばCharon 4A、Charon 21A、gt10、gt11、DASHII、FIXII、EMBL3、ZAPIITM (Stratagene) などが挙げられる。

【 0 0 4 0 】

本発明のタンパク質をコードする核酸を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体は、必要に応じて適当な選択マーカを用い、繰り返しクローニングを行うことにより

10

20

30

40

50

、高い発現能を安定して有する細胞株を得ることができる。例えば、宿主細胞として動物細胞を用いた形質転換体において、dhfr遺伝子を選択マーカーとして利用した場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、本発明のタンパク質をコードするDNAを増幅させ、より高い発現を得られる細胞株を得ることができる。本発明の形質転換体は、本発明のタンパク質をコードする核酸が発現可能な条件下で培養し、目的物を生成、蓄積せしめることができる。該形質転換体は、当該分野で汎用されている培地中で培養することができる。例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母などを宿主としている形質転換体は、液体培地を好適に使用することができる。培地中には、該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含まれしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえ

10

【0041】

培養は、例えば大腸菌では通常約15～約45で約3～約75時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5～約20%の胎児牛血清を含むMEM培地、PRMI1640培地、DMEM培地などが用いられる。pHは約6～約8であるのが好ましい。培養は通常約30～約40で約15～約72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。上記培養細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により粗抽出液を得る方法などを適宜用いることができる。緩衝液の中には尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白変性剤や、トリトン X-100(商品名)、ツウィーン-80(商品名)などの界面活性剤を加えてあってもよい。培養液中に目的生成物が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる目的生成物は、

20

30

40

【0042】

さらに、本発明に係わる可溶型RAGEの遺伝子塩基配列を基に遺伝子工学的に常用される方法を用いることにより、可溶型RAGEのアミノ酸配列中に適宜、1個ないし複数個以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、転移あるいは付加したとき変異を導入した相当するタンパク質を製造することができる。こうした変異・変換・修飾法としては、日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法II」、p105(広瀬進)、東京化学同人(1986);日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸III(組換えDNA技術)」、p233(広瀬進)、東京化学同人(1992); R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 154, p. 350 & p. 367, Academic Press, New York (1987); R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 457 & p. 468, Academic Press, New York (1983)

50

; J. A. Wells et al., *Gene*, 34: 315, 1985; T. Grundstroem et al., *Nucleic Acids Res.*, 13: 3305, 1985; J. Taylor et al., *Nucleic Acids Res.*, 13: 8765, 1985; R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 155, p. 568, Academic Press, New York (1987); A. R. Oliphant et al., *Gene*, 44: 177, 1986 などに記載の方法が挙げられる。例えば合成オリゴヌクレオチドなどを利用する位置指定変異導入法(部位特異的変異導入法)(Zoller et al., *Nucl. Acids Res.*, 10: 6487, 1987; Carter et al., *Nucl. Acids Res.*, 13: 4331, 1986), カセット変異導入法(cassette mutagenesis: Wells et al., *Gene*, 34: 315, 1985), 制限部位選択変異導入法(restriction selection mutagenesis: Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A*, 317: 415, 1986), アラニン・スクランニング法(Cunningham & Wells, *Science*, 244: 1081-1085, 1989), PCR 変異導入法, Kunkel法, dNTP[S]法(Eckstein), 亜硫酸や亜硝酸などを用いる領域指定変異導入法等の方法が挙げられる。

【0043】

さらに得られた本発明のタンパク質は、化学的な手法でその含有されるアミノ酸残基を修飾することもできるし、ペプチダーゼ、例えばペプシン、キモトリプシン、パパイン、プロメライン、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼなどの酵素を用いて修飾したり、部分分解したりしてその誘導体などにすることができる。本発明のタンパク質は、C末端が通常カルボキシル基(-COOH)またはカルボキシレート(-COO⁻)であるが、C末端がアミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR)であってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、*n*-ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくは*n*-ナフチルメチルなどの*n*-ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

【0044】

さらに、本発明のタンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₁₋₅アルキル-カルボニル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミル化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。また遺伝子組換え法で製造する時に融合タンパク質として発現させ、生体内あるいは生体外で天然の可溶性RAGEと実質的に同等の生物学的活性を有しているものに変換・加工してもよい。遺伝子工学的に常用される融合産生法を用いることができるが、こうした融合タンパク質はその融合部を利用してアフィニティークロマトグラフィーなどで精製することも可能である。こうした融合タンパク質としては、ヒスチジンタグに融合せしめられたもの、あるいは、*n*-ガラクトシダーゼ(-gal)、マルトース結合タンパク(MBP)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、チオレドキシシン(TRX)又はCre Recombinaseのアミノ酸配列に融合せしめられたものなどが挙げられる。同様に、ポリペプチドは、ヘテロジニアスなエピトープのタグを付加され、該エピトープに特異的に結合する抗体を用いてのイムノアフィニティークロマトグラフィーによる精製をなし得るようにすることもできる。より適した実施態様においては、該エピトープタグとしては、例えば AU5, c-Myc, CruzTag 09, CruzTag 22, CruzTag 41, Glu-Glu, HA, Ha.11, KT3, FLAG (registered trademark, Sigma-Aldrich), Omni-probe, S-probe, T7, Lex A, V5, VP16, GAL4, VS V-Gなどが挙げられる。(Field et al., *Molecular and Cellular Biology*, 8: pp.2159-

10

20

30

40

50

2165 (1988); Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5: pp.3610-3616 (1985); Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3(6): pp.547-553 (1990); Hopp et al., *BioTechnology*, 6: pp.1204-1210 (1988); Martin et al., *Science*, 255: pp.192-194 (1992); Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266: pp.15163-15166 (1991); Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: pp.6393-6397 (1990)など)。酵母を利用した two-hybrid 法も利用できる。さらに融合タンパク質としては、検出可能なタンパク質となるようなマーカーを付されたものであることもできる。より好適な実施態様においては、該検出可能なマーカーは、ビオチン/ストレプトアビジン系の Biotin Avi Tag、蛍光を発する物質などであってよい。該蛍光を発する物質としては、オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) などの発光クラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP)、それを改変した変異体 (GFP バリエーション)、例えば、EGFP (Enhanced-humanized GFP), rsGFP (red-shift GFP), 黄色蛍光タンパク質 (yellow fluorescent protein: YFP), 緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP), 藍色蛍光タンパク質 (cyan fluorescent protein: CFP), 青色蛍光タンパク質 (blue fluorescent protein: BFP), ウミシイタケ (*Renilla reniformis*) 由来の GFP などが挙げられる (宮脇敦史編、実験医学別冊ポストゲノム時代の実験講座 3 - GFP とバイオエンジニアリング、羊土社 (2000年))。また、上記融合タグを特異的に認識する抗体 (モノクローナル抗体及びそのフラグメントを含む) を使用して検出を行うこともできる。

【 0 0 4 5 】

本発明の好ましい態様において、精製を好適に実施するのに役立つマーカー配列、例えばヘキサ - ヒスチジンペプチドを融合したものなどが使用できる。こうした融合タンパク質の発現及び精製は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。タンパク質の構造の修飾・改変などは、例えば日本生化学会編、「新生物化学実験講座 1、タンパク質 VII、タンパク質工学」、東京化学同人 (1993) を参考にし、そこに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法、さらにはそれらと実質的に同様な方法で行うことができる。また下記するようにその生物学的活性のうちには、免疫的に活性、例えば抗原性を有するということも含まれてよい。該修飾・改変のうちには、脱アミノ化、ヒドロキシル化、リン酸化、メチル化、アセチル化、開環、閉環、含有糖鎖の種類を違うものに変えること、含有糖鎖の数を増減すること、D-体アミノ酸残基への置換などであ

【 0 0 4 6 】

かくして本発明のヒト由来のタンパク質は、1個以上のアミノ酸残基が同一性の点で天然のものとは異なるもの、1個以上のアミノ酸残基の位置が天然のものとは異なるものであってもよい。本発明のヒト由来のタンパク質は、可溶性 RAGE に特有なアミノ酸残基が 1 個以上 (例えば、1 ~ 80 個、好ましくは 1 ~ 60 個、さらに好ましくは 1 ~ 40 個、さらに好ましくは 1 ~ 20 個、特には 1 ~ 10 個など) 欠けている欠失類縁体、特有のアミノ酸残基の 1 個以上 (例えば、1 ~ 80 個、好ましくは 1 ~ 60 個、さらに好ましくは 1 ~ 40 個、さらに好ましくは 1 ~ 20 個、特には 1 ~ 10 個など) が他の残基で置換されている置換類縁体、1 個以上 (例えば、1 ~ 80 個、好ましくは 1 ~ 60 個、さらに好ましくは 1 ~ 40 個、さらに好ましくは 1 ~ 20 個、特には 1 ~ 10 個など) のアミノ酸残基が付加されている付加類縁体も包含する。天然の可溶性 RAGE の特徴であるドメイン構造あるいはリガンド結合能が維持されていれば、上記のごとき変異体は、全て本発明に包含される。また本発明の可溶性 RAGE は天然の可溶性 RAGE と実質的に同等の一次構造コンフォメーションあるいはその一部を有しているものも含まれてよいと考えられ、さらに天然の可溶性 RAGE と実質的に同等の生物学的活性を有しているものも含まれてよいと考えられる。さらに天然に生ずる変異体の一つであることもできる。本発明のヒト由来のタンパク質は、例えば、配列表の配列番号: 2 で表されるアミノ酸配列のうち、(1) 第 19 位 ~ 第 347 位のアミノ酸配列を有するもの、(2) 同

第1位～第347位のアミノ酸配列を有するもの、及び(3)少なくとも同第38位～第117位のアミノ酸配列を有し且つ同第332位～第347位のアミノ酸配列を有するものからなる群から選ばれたアミノ酸配列に対し、60%、場合によっては70%より高い相同性を有しているものが挙げられ、より好ましくはそれに対し、80%あるいは90%以上の相同アミノ酸配列を有するものが挙げられ、特に膜貫通ドメインを欠くもの、C末端側に配列GluGlyPheAspLysValArgGluAlaGluAspSerProGlnHisMetあるいはその一部を有しているものが挙げられる。本発明のヒト由来のタンパク質の一部のものとは、該ヒト由来のタンパク質の一部のペプチド(すなわち、該タンパク質の部分ペプチド)であって、本発明の可溶型RAGEと実質的に同等な活性を有するものであればいずれのものであってもよい。例えば、該本発明のタンパク質の部分ペプチドは、本発明の可溶型RAGEの構成アミノ酸配列のうち少なくとも5個以上、好ましくは20個以上、さらに好ましくは50個以上、より好ましくは70個以上、もっと好ましくは100個以上、ある場合には200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられ、好ましくはそれらは連続したアミノ酸残基に対応するものであるか、あるいは、例えば、配列表の配列番号：2で示されるアミノ酸配列のうち対応する領域に対する相同性に関して、上記と同様の相同性を有するものが挙げられる。

【0047】

本明細書において、「実質的に同等」とは蛋白質の活性、例えば、阻害活性、生理的な活性、生物学的な活性が実質的に同じであることを意味する。さらにまた、その用語の意味の中には、実質的に同質の活性を有する場合を包含してよく、該実質的に同質の活性としては、AGEとRAGEとの間の相互作用に対する活性、例えば、AGEのいずれか一つに対する結合活性、膜貫通型RAGEのAGEのいずれか一つに対する結合活性に対して抑制あるいは阻害する活性などを挙げることができる。該実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に同質であることを示し、例えば、生理的に、薬理的に、あるいは生物学的に同質であることを示す。例えば、AGEの膜貫通型RAGEに対する結合を阻害する活性などの活性が、同等(例えば、約0.001～約1000倍、好ましくは約0.01～約100倍、より好ましくは約0.1～約20倍、さらに好ましくは約0.5～約2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的な要素は異なってもよい。次に、アミノ酸の置換、欠失、あるいは挿入は、しばしばポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化を生ぜしめないし、こうした場合、その置換、欠失、あるいは挿入を施されたポリペプチドは、そうした置換、欠失、あるいは挿入のされていないものと実質的に同一であるとされるであろう。該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換体としては、そのアミノ酸が属するところのクラスのうちの他のアミノ酸類から選ぶことができる。例えば、非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられ、極性(中性)としては、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられ、陽電荷をもつアミノ酸(塩基性アミノ酸)としては、アルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられ、陰電荷をもつアミノ酸(酸性アミノ酸)としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

【0048】

本発明のタンパク質及びその一部のペプチドの合成には、当該ペプチド合成分野で知られた方法、例えば液相合成法、固相合成法などの化学合成法を使用することができる。こうした方法では、例えばタンパク質あるいはペプチド合成用樹脂を用い、適当に保護したアミノ酸を、それ自体公知の各種縮合方法により所望のアミノ酸配列に順次該樹脂上で結合させていく。縮合反応には、好ましくはそれ自体公知の各種活性化試薬を用いるが、そうした試薬としては、例えばジシクロヘキシルカルボジイミドなどカルボジイミド類を好ましく使用できる。生成物が保護基を有する場合には、適宜保護基を除去することにより目的のものを得ることができる。

本発明のタンパク質及びその一部のペプチドは、それが遊離型のもので得られた場合には、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で塩に変換することができ、またそれらは塩として得られた場合には、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で遊離

10

20

30

40

50

型のものあるいは他の塩に変換することができる。本発明のタンパク質及びその一部のペプチドの塩としては、生理的に許容されるものあるいは医薬として許容されるものが好ましいが、これらに限定されない。こうした塩としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸との塩、例えば酢酸、ギ酸、マレイン酸、フマル酸、コハク酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸などの有機酸との塩などが挙げられる。さらに該塩としては、アンモニウム塩、例えばエチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、ヒドロキシエチルアミンなどの有機塩基との塩なども挙げられる。

【0049】

こうした本発明の可溶型RAGE及びその変異体、修飾体、誘導体などは、上記で説明したような分離・精製処理を施すことができる。本発明では、「断片」、「誘導体」及び「類縁体」なる用語は、配列番号：2のポリペプチド、配列番号：1の配列から転写され且つスプライシングされていないか又は特異的にスプライシングされた hnRNA又はmRNAによりコードされるポリペプチド、又はゲノミックDNAによりコードされるポリペプチドに関連して、その「断片」、「誘導体」又は「類縁体」と称した場合、このようなポリペプチドと本質的に同一の生物学的機能又は活性を有しているポリペプチドを意味する。従って、類似体にはプロタンパク質部分が切断されて活性成熟ポリペプチドを産生するような、活性化できるプロタンパク質等が包含される。本発明のポリペプチドは組換えポリペプチド、天然ポリペプチド又は合成ポリペプチドでよい。特定の好ましい態様では、これは組換えポリペプチドである。

これまで先行技術に開示されている可溶型RAGEは、膜貫通ドメインを有するRAGE遺伝子から細胞外部位を遺伝子操作により人工的に作成したものであるのに対して、本発明の可溶型RAGEは、生体内に存在する天然型ペプチド（内在性ペプチドあるいは内因性ペプチド）で、C末端部分の16個のアミノ酸残基においてRAGE蛋白質と異なっているものである。先行技術に開示されている、遺伝子操作により人工的に作成された可溶型RAGEは、それ自体天然に存在するフォームでないので、非生理的なものであること、また分離・精製の過程で除去しきれなかった宿主昆虫細胞由来の夾雑物に対する免疫反応がおこる恐れもあり、さらに体外からの投与が必要であるが、それは蛋白であるため経口で行うことには無理があり、静脈等への注射等が必要となり、患者に苦痛を強いることになるなど、患者などへの負担の問題がある。これに対し、本発明の可溶型RAGEの有利な点としては、内在性に産生される天然のフォームなので、生理的なものであり、抗体ができる恐れが少なく、さらに経口剤などを開発して、そうした医薬により本発明の可溶型RAGEの発現を誘導できるようになれば、苦痛を与えることなしに、糖尿病患者を合併症から守ることなどができる。本発明の可溶型RAGEの変異体、修飾体、誘導体などは、本発明の可溶型RAGEに由来することからその可溶型RAGEの有する有利な点と同様な利点を期待できる。

【0050】

一方では、こうして、本発明は上記したポリペプチドをコードするDNA配列、そして天然の特性の全部あるいは一部を有する可溶型RAGEのポリペプチド、さらにその類縁体あるいは誘導体をコードするDNA配列も包含する。本発明のポリヌクレオチドは、アミノ末端に付加アミノ酸又はカルボキシル末端に付加アミノ酸を加えた成熟タンパク質、又は成熟タンパク質に内在するポリペプチド（例えば、成熟形態で一つ以上のポリペプチド鎖を有する場合）のアミノ酸をコードしているものであることができる。このような配列は、前駆体から成熟形態のタンパク質へのプロセッシングにおいても何らかの働きをなすものであってよく、例えば、タンパク質の移動や輸送を促進したり、タンパク質の半減期を延長もしくは短縮したり、又はタンパク質を操作してその検出もしくは産生を容易にすることができるものであってよい。一般的には、例えば、付加アミノ酸は、細胞酵素によりプロセッシングされ、成熟タンパク質から取り除かれる。1又はそれ以上のプロ配列と融合した成熟形態ポリペプチドを有する前駆タンパク質は、不活性形態ポリペプチドであることができる。プロ配列が除去されると、このような不活性前駆体は、通常活性化される。プロ配列のいくつか又は全ては、活性化の前に除去できる。通常、このような前駆体はプロタ

ンパク質と称される。本発明のポリペプチドは、成熟タンパク質、リーダー配列を付加してある成熟タンパク質（プレタンパク質と称することができる）、プレタンパク質のリーダー配列ではない1又はそれ以上のプロ配列を有する成熟タンパク質の前駆体、又はリーダー配列及び1又はそれ以上のプロ配列を有するプロタンパク質の前駆体であるプレプロタンパク質であってよい。また、該プロ配列は通常活性形態ポリペプチド及び成熟形態ポリペプチドを産み出すようなプロセッシングの段階で除去され得る。

【0051】

本発明のDNA配列は、これまで知られていなかった哺乳動物のタンパク質のアミノ酸配列に関する情報を提供しているから、こうした情報を利用することも本発明に包含される。こうした利用としては、例えば可溶性RAGE及び関連タンパク質をコードする哺乳動物、特に好ましくはヒトの、ゲノムDNA及びcDNAの単離及び検知のためのプローブの設計などが挙げられる。

本発明のDNA配列は、例えば可溶性RAGE及び関連タンパク質をコードする哺乳動物、特に好ましくはマウス、ラットやヒトの、ゲノムDNA及びcDNAの単離及び検知のためのプローブとして有用である。プローブは、必要に応じて、抗体に関連して挙げられている標識を付与しておくことができる。遺伝子の単離にあたっては、PCR法、さらには逆転写酵素（RT）を用いたPCR法（RT-PCR）を利用することが出来る。可溶性RAGE cDNA及びその関連DNAは、クローニングされ、配列決定された可溶性RAGE cDNA配列から推定されるアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、DNAプライマーをデザインして化学合成し、得られたDNAプライマーを用いて、PCR法、RT-PCR、その他の方法を用いて可溶性RAGE関連遺伝子の単離、検出などに利用することが出来る。例えば、可溶性RAGE mRNAのヒト組織中での発現を各種の組織由来poly(A)⁺ RNAに対するノーザンプロット分析により検討することができる。本発明のcDNAをプローブとして用いれば、例えばノーザン・プロテイング、サザン・プロテイング、in situ ハイブリダイゼーションなどによりヒト組織中での可溶性RAGE mRNAの発現や可溶性RAGE遺伝子自体などを検出・測定でき、ヒト組織における細胞内タンパク質代謝、ホルモン前駆体の活性化、および組織マトリックスや骨の改変を含む、多くの正常な細胞のプロセスに関与する、AGEとRAGEとの間の相互作用における役割、アルツハイマー病、糖尿病合併症、動脈硬化症、高脂血症、アレルギー疾患、炎症性疾患、神経変性疾患およびがんの浸潤・転移の様な多くの疾患等の研究の発展に貢献できる。可溶性RAGEに関連した疾患の遺伝子診断にも利用できる。そうした診断は、当該可溶性RAGE及び関連タンパク質をコードする核酸の異常、例えば損傷、突然変異、発現低下、発現過多などを診断するものであることができる。

【0052】

本発明に従えば、本発明の可溶性RAGEの遺伝子診断法（検出方法）が提供できる。該遺伝子診断法では、(a)核酸試料を得る工程、(b)工程(a)にて得られた核酸試料を、例えばPCR法、RNAポリメラーゼを利用した核酸増幅法、鎖置換増幅法などで遺伝子増幅し、例えば該可溶性RAGE遺伝子に存在しうる変異部位などを含む領域が増幅された核酸断片を得る工程、及び(c)工程(b)の核酸断片について変異の存在を調べる工程を含む態様が挙げられる。増幅の対象となる、変異部位を含む領域としては、本発明の可溶性RAGEの遺伝子の塩基配列のうち、疾患の原因となる変異を含んでいる領域であれば特に限定されず、例えば、配列表の配列番号：1に示される塩基配列の中の任意の位置の塩基を含む領域が挙げられる。上記工程(c)においては、当該分野で当業者に知られている変異の存在に検出方法の中から適切な方法を選んでそれを適用でき、特に限定されないが、例えばASPCR（allele-specific PCR）法により得られたDNA断片長を調べることにより検出することができる。DNA断片長を調べる方法は、特に限定されるものではないが、例えば蛍光DNAシーケンサーなどを使用して行うことができる。本工程で使用される変異検出法としては、例えば制限酵素断片長多型（restriction fragment length polymorphism: RFLP）を検出して調べる方法などが挙げられる。また、変異の検出には、例えば変異部位を含む適当なDNA片をプローブに用いるハイブリダイゼーション法や、SSCP法（単鎖高次構造多型）のような公知の変異検出法を使用してよい。本発明の遺伝子診断に従い、本発明の可溶性

10

20

30

40

50

RAGEに関係した遺伝子診断が可能であり、例えば糖尿病、がん、アルツハイマー病などへの罹患抵抗性・感受性決定の一素因と考えられる本発明の可溶性RAGEの発現や多型を遺伝子診断し、さらに、当該診断結果に基づき関連疾患罹病へのリスクを下げるような遺伝子治療を行うことが可能となる。

【0053】

本明細書中で開示した可溶性RAGE及びそれに関連したタンパク質、そのフラグメント、さらにはDNAを含めた核酸(mRNAやオリゴヌクレオチドを含む)は、それらを単独あるいは有機的に使用し、更には以下で説明する技術(アンチセンス法、モノクローナル抗体を含めた抗体、トランスジェニック動物など)とも適宜組合わせて、ゲノミクス及びプロテオミクス技術に応用できる。例えば、可溶性RAGE変異体は、ドミナントネガティブ効果を利用した機能解析にも利用可能である。また、二本鎖RNA(dsRNA)を使用してのRNAi(RNA interference)技術への応用の途もある。かくして、一塩基多型(SNP; single nucleotide polymorphisms)を中心とした遺伝子多型解析、核酸アレイ、タンパク質アレイを使用した遺伝子発現解析、遺伝子機能解析、タンパク質間相互作用解析、関連疾患解析、疾患治療薬解析をすることが可能となる。例えば、核酸アレイ技術では、cDNAライブラリーを使用したり、PCR技術で得たDNAを基板上にスポットティング装置で高密度に配置して、ハイブリダイゼーションを利用して試料の解析が行われる。該アレイ化は、針あるいはピンを使用して、あるいはインクジェットプリンティング技術などでもって、スライドガラス、シリコン板、プラスチックプレートなどの基板のそれぞれ固有の位置にDNAが付着せしめられることによりそれを実施することができる。該核酸アレイ上でのハイブリダイゼーションの結果得られるシグナルを観察してデータを取得する。該シグナルは、蛍光色素などの標識(例えば、Cy3, Cy5, BODIPY, FITC, Alexa Fluor dyes(商品名), Texas red(商品名)など)より得られるものであってよい。検知にはレーザースキャナーなどを利用することもでき、得られたデータは適当なアルゴリズムに従ったプログラムを備えたコンピュータシステムで処理されてよい。また、タンパク質アレイ技術では、タグを付された組換え発現タンパク質産物を利用してよく、二次元電気泳動(2-DE)、酵素消化フラグメントを含めての質量分析(MS)(これにはエレクトロスプレーイオン化法(electrospray ionization: ESI), マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(matrix-assisted laser desorption/ionization: MALDI)などの技術が含まれ、MALDI-TOF分析計、ESI-3連四重極分析計、ESI-イオントラップ分析計などを使用してよい)、染色技術、同位体標識及び解析、画像処理技術などが利用されることができ、したがって、本発明には上記で得られるあるいは利用できる可溶性RAGE及びそれに対する抗体に関連したソフトウェア、データベースなども含まれてよい。

【0054】

本発明で得られたDNA(例えば、可溶性RAGEをコードするDNA)を対象動物に転移させるにあたっては、それをDNA断片としてあるいは該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合して用いるのが一般に有利である。たとえば、マウスに可溶性RAGE DNAを導入する場合、これと相同性が高い動物由来の可溶性RAGE DNAを動物細胞で発現させる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、対象動物の受精卵、たとえばマウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって可溶性RAGEを高産生する遺伝子導入(トランスジェニック)マウスを作出できる。マウスとしては、特に純系のマウスに限定されないが、例えば、C57BL/6、Balb/C、C3H、(C57BL/6×DBA/2) F_1 (BDF₁)などが挙げられる。このプロモーターとしては、例えばウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキタスな発現プロモーターなどが好ましく使用しうる。また該可溶性RAGE DNAを導入する場合、組換えレトロウイルスに組み換えて、それを用いて行うこともできる。好適には対象DNAを導入されたマウス受精卵は、例えば、ICRのような仮親のマウスを使用して生育せしめることができる。

受精卵細胞段階における本発明で得られたDNA(例えば、可溶性RAGEをコードするDNA)の転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において可溶性RAGEをコードするDNAが存在することは、作出

10

20

30

40

50

動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに該可溶型RAGEをコードするDNAを有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てにおいて、該可溶型RAGEを発現できる可能性を有している。

【0055】

該可溶型RAGE DNA導入動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。該可溶型RAGE DNAが導入された動物は、該可溶型RAGEタンパク質が高発現させられているので、該可溶型RAGEタンパク質に対する阻害剤（インヒビター）のスクリーニング用の動物などとして有用である。また可溶型RAGE遺伝子の発現を阻害することのできるアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、アンチセンスDNAなどのスクリーニング用の動物などとして有用である。

この遺伝子導入動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、遺伝子導入マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するかあるいは遺伝子により発現されたタンパク質・組織を分析することにより、AGEとRAGEとの間の相互作用に関連したタンパク質について分析することができる。該可溶型RAGEを産生する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、たとえば脳、胸腺、血管内皮細胞などの血管細胞、血液細胞、精巣、脳、腸、腎臓やその他の組織由来の細胞についてその機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、たとえば各種組織の機能を高めるような医薬開発に資することも可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、可溶型RAGEを単離精製することも可能である。トランスジェニックマウスなどに関連した技術は、例えば、Brinster, R. L., et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4438, 1985; Costantini, F. & Jaenisch, R. (eds): Genetic manipulation of the early mammalian embryo, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985などの文献に記載の方法あるいはそこに引用された文献に記載の方法、さらにはそれらの改変法により行うことができる。

【0056】

本発明で得られた遺伝子（例えば、可溶型RAGEに相当するマウス可溶型RAGEをコードするDNA）に変異をもち、マウス可溶型RAGEを全く発現しない変異マウス（ノックアウトマウス）を作出することができる。たとえば、該遺伝子の翻訳開始コドンの前後4kbを含むおよそ8kbのゲノムDNAの中央近傍に位置し翻訳開始コドンに近いエキソンにneo耐性遺伝子-polyA付加シグナルからなる遺伝子カセットを挿入した変異遺伝子を持つターゲティングベクターを構築することができる。挿入する遺伝子カセットはneo耐性遺伝子カセット以外にDT-Aカセット、tkカセット、lacZカセットなどが挙げられる。ターゲティングベクターを直鎖状に開き、樹立したマウス胚性幹細胞（embryonic stem cells: ES細胞）にエレクトロポレーションで導入、さらに培養してneo耐性を獲得したES細胞を選別する。ES細胞は129、C57BL/6、F1(C57BL/6×CBA)マウスなどのマウス系統から選択して調製することができる。neo耐性を獲得したES細胞は、マウス可溶型RAGE遺伝子領域において遺伝子カセットを挿入したターゲティングベクターと相同組換えを起こしていると想定され、少なくともマウス可溶型RAGE遺伝子アレルのうち一つは破壊され、マウス可溶型RAGEを正常に発現できなくなる。選別には挿入した遺伝子カセットによりそれぞれ適当な方法が選択され、また、変異の導入はPCR、サザンハイブリダイゼーションあるいはノーザンハイブリダイゼーションなどの方法を用いて確認することができる。

【0057】

変異を導入したES細胞は、C57BL/6、BALB/c、ICRマウスなどから取り出した8細胞期胚に注入、1日培養し胚盤胞に発生したものをICRのような仮親に移植することで個体まで生育させることができる。生まれる子マウスは変異をもつES細胞と正常な宿主胚に由来するキメラマウスで、ES細胞に由来する細胞がどの程度含まれるかは個体の毛色で判断する。従って、ES細胞と宿主胚は毛色の異なった系統の組み合わせが望ましい。得られたキメラ

10

20

30

40

50

マウスの変異はヘテロであり、これらを適宜交配することでホモ変異マウスを得ることができる。このようにして得られたホモ変異マウスは生殖細胞および体細胞の全てにおいて、マウス可溶性RAGE遺伝子のみが破壊され、マウス可溶性RAGEを全く発現せず、繁殖継代される子孫もまた同様の表現系をもつ。

このノックアウトマウスは正常マウスとの比較において、発生、成長、生殖、老化および死など個体のライフサイクルにおける可溶性RAGEの役割や各臓器、組織における可溶性RAGEの機能を解析するのに有用である。また、AGE とRAGEとの間の相互作用に関連した医薬品開発にも応用できる。ノックアウトマウスはこれらモデル動物としてだけではなく、組織培養のための細胞源として使用することもでき、細胞レベルでの可溶性RAGEの機能解析などに供することができる。ノックアウトマウス等に関連した技術は、例えば、Mansour, S. L., et al.,; Nature, 336: 348-352, 1988; Joyner, A. L., ed.; Gene targeting, IRL Press, 1993; 相沢慎一, ジーンターゲティングES細胞を用いた変異マウスの作成, 羊土社, 1995などの文献に記載の方法あるいはそこに引用された文献に記載の方法、さらにはそれらの改変法により行うことができる。

【0058】

本発明に従えば、可溶性RAGE遺伝子の発現を阻害することのできるアンチセンス・オリゴヌクレオチド(核酸)を、クローン化したあるいは決定された可溶性RAGEをコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたオリゴヌクレオチド(核酸)は、可溶性RAGE遺伝子のmRNAとハイブリダイズすることができ、該mRNAの機能を阻害することができるか、あるいは可溶性RAGE関連mRNAとの相互作用などを介して可溶性RAGE遺伝子の発現を調節・制御することができる。可溶性RAGE関連遺伝子の選択された配列に相補的なオリゴヌクレオチド、及び可溶性RAGE関連遺伝子と特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドは、生体内及び生体外で可溶性RAGE遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、またそれに関連した病気などの治療又は診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチド(タンパク質)との間で「対応する」とは、ヌクレオチド(核酸)の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド(タンパク質)のアミノ酸を通常指している。当該遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF 翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、及び3'端ヘアピンループは、好ましい対象領域として選択しうるが、当該遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

【0059】

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なオリゴヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドとの関係を意味し、それは、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー(例えば、市販のタンパク質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー)又は特殊な結合を含有するその他のポリマー(但し、該ポリマーはDNA やRNA 中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する)などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA, 1本鎖DNA, 2本鎖RNA, 1本鎖RNA, さらにDNA:RNA ハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド又は非修飾オリゴヌクレオチド、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合(例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど)を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど)を持つもの、例えばタンパク質(ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシ

ン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L- リジンなど)や糖(例えば、モノサッカライドなど)などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物(例えば、アクリジン、プソラレンなど)を持つもの、キレート化合物(例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など)を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの(例えば、アノマー型の核酸など)であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、公知のプリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオシド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

10

【0060】

本発明のアンチセンス核酸は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計される。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

20

こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えばJ. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, 8: 247, 1992; 8: 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993などに開示がある。本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リボゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうした付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質(例えば、ホスホリピッド、コレステロールなど)といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体(例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸)が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

30

【0061】

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは可溶性RAGEの生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

40

以上述べた、本発明者らの研究成果により可溶性RAGEの遺伝子及び組換えDNA分子を宿主に移入し、可溶性RAGEを発現させ、目的とする可溶性RAGEを得る方法が提供される。こうして本発明によれば、可溶性RAGEの遺伝子を実質的に発現する組換え体あるいはトランスフェクタント及びその製造法、さらにはその用途も提供される。

別の面では、本発明はRAGEファミリーに属する天然型(ネイティブ)可溶性RAGE(特に、内在性(endogenous)可溶性RAGE)に関し、AGEとRAGEとの相互作用に対して活性を有する(例えば、AGEの膜結合型RAGEへの結合抑制あるいは阻害活性を有するなど)し且つC末端側には配列表の配列番号: 2のアミノ酸配列Glu³³²~Met³⁴⁷のうち少なくとも1~16個の連続したアミノ酸残基を有するポリペプチドの一種であり且つ天然のヒト可溶性

50

RAGEと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質またはその塩、より好ましくは可溶性RAGEまたはその塩と、実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次構造コンフォメーションを持つ該タンパク質の少なくとも一部あるいは全部を有するポリペプチドを、大腸菌などの原核生物あるいは哺乳動物細胞などの真核生物で発現させることを可能にするDNA やRNA などの核酸に関することができる。またこうした核酸、特にDNA は、(a) 配列表の配列番号：2 で表されるアミノ酸配列をコードできる配列あるいはそれと相補的な配列、(b) 該(a) のDNA 配列またはその断片とハイブリダイズすることのできる配列、及び(c) 該(a) 又は(b) の配列にハイブリダイズすることのできる縮重コードを持った配列であることができる。ここでハイブリダイズの条件としては、ストリンジントな条件であることができる。こうした核酸で形質転換され、本発明の該ポリペプチドを発現できる大腸菌などの原核生物あるいは哺乳動物細胞などの真核生物も本発明の特徴をなす。

10

【0062】

こうして典型的には本発明の目的は、可溶性RAGE遺伝子、それから誘導されたプローブを用い、あるいはさらに必要に応じ、可溶性RAGEに対する阻害物質を用い、被検試料中の可溶性RAGEあるいはその遺伝子、さらには産生細胞を検知・分別定量する優れた方法及びその為の試薬キットを提供することにある。本発明はこうした可溶性RAGEあるいはその遺伝子、さらには産生細胞を検知・分別定量することのできる試薬キットのうちの各試薬をすべてその実施態様のうちに含むと理解される。さらに本発明の目的は、上記方法を用いて可溶性RAGEあるいはその遺伝子、さらには産生細胞を検知・分別定量することにより、細胞内タンパク質代謝、ホルモン前駆体の活性化、および組織マトリックスあるいは骨の改変など、多くの正常な細胞のプロセスに關与するAGE とRAGEとの相互作用の役割、糖尿病合併症、動脈硬化症、血栓症、高脂血症、アルツハイマー病、アレルギー疾患、炎症性疾患、骨粗鬆症、神経変性疾患およびがんの浸潤・転移の様な多くの疾患などをモニターし得る方法並びに試薬あるいは診断剤を提供することにある。したがって、医学的・生理学的分野における上記試薬の各種利用、AGE とRAGEとの相互作用に起因する応答・症状・疾患の研究・解析・測定、診断、予防、治療などの目的で上記試薬を使用することは、すべて本発明のその実施態様のうちに含まれると理解される。

20

【0063】

本発明の可溶性RAGEあるいはその塩は、AGE とRAGEとの相互作用に対して活性を有し、例えばAGE と膜貫通型RAGEとの結合を抑制あるいは阻害する活性を有し、例えば生体防御・老化・成人病性血管障害・がんなどにおいて重要な働きを有する因子であると考えられる。そして、該タンパク質は可溶性RAGE無形成症、可溶性RAGE発現不全症、可溶性RAGE遺伝子欠損症など病状を呈する可溶性RAGE関連機能不全疾患の治療に有用であると考えられる。すなわち、可溶性RAGE、変異体、修飾体、誘導体を含む医薬を用いれば、可溶性RAGEによる活性が不十分であることに起因する疾患患者を健全な状態にすることが可能である。本発明のポリペプチドは、AGE 活性阻害剤の一つであり、該タンパク質の発現量やAGE 活性阻害活性が減少している場合に生ずる種々の疾患の治療及び/又は予防剤などの医薬として有用である。また本発明のポリペプチドは、AGE 活性が亢進している場合に生ずる種々の疾患の治療及び/又は予防剤などの医薬として有用である。例えば、生体内において可溶性RAGEが減少あるいは欠損しているために、細胞における当該生物学的活性が十分に得られていないか、あるいは正常でない症状の患者の場合には、(A) 本発明のタンパク質等を該患者に投与することによるか、(B) 本発明のDNA などの核酸を該患者に投与して、生体内で本発明のタンパク質等を発現させることによるか、(C) 本発明のDNA などの核酸を発現可能に導入した細胞を該患者に移植することによって、生体内に本発明のタンパク質等を補充する等して、該患者における当該症状を改善したりする。

30

40

【0064】

本発明の可溶性RAGEの生物学的活性などの機能（例えば、AGE と膜貫通型RAGEとの結合を抑制あるいは阻害する活性など）を促進する化合物（アゴニスト、あるいは促進剤）又はその塩は、可溶性RAGE機能不全症状、糖尿病合併症、動脈硬化症、血栓症、高脂血症、ア

50

ルツハイマー病、神経変性疾患、リウマチ性関節炎およびがんの浸潤・転移などの各種の疾病の治療及び/又は予防剤として有用な医薬として使用できる。一方、本発明の可溶性RAGEの生物学的活性などの機能(例えば、AGEと膜貫通型RAGEとの結合を抑制あるいは阻害する活性など)を阻害する化合物(アンタゴニスト、あるいは阻害剤)又はその塩は、過可溶性RAGE機能症、AGEとRAGEとの相互作用に起因した疾患や病気、がんなどの各種の疾病の治療及び/又は予防剤などの医薬として使用できる。例えば可溶性RAGEは、AGEの生理作用あるいは生物活性を抑制あるいは阻害する作用を有し、AGE過多に起因する疾患の治療用医薬として有用である。

【0065】

かくして、本発明の可溶性RAGEなどのポリペプチド等は、本発明の可溶性RAGEなどのポリペプチド等の、生物学的活性などの機能(例えば、AGEと膜貫通型RAGEとの結合を抑制あるいは阻害する活性など)を促進する化合物(アゴニスト)や阻害する化合物(アンタゴニスト)又はそれらの塩をスクリーニングするための試薬として有用である。かくして、本発明の可溶性RAGEなどのポリペプチド、その一部のペプチド又はそれらの塩を用いた、本発明の可溶性RAGEといったタンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩などの生物学的活性などの機能(例えば、AGEの生理作用あるいは生物活性を抑制あるいは阻害する活性など)を促進する化合物(アゴニスト)や阻害する化合物(アンタゴニスト)又はそれらの塩のスクリーニング方法も提供される。

該スクリーニングでは、例えば(i)本発明のタンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩(該タンパク質を発現する形質転換体を含んでいてもよい、以下同様)などにAGEなどの基質を接触させた場合と、(ii)本発明のタンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩などに基質及び試験試料を接触させた場合との比較を行う。具体的には、上記スクリーニングでは、当該生物学的活性(例えば、AGEとRAGEとの相互作用に関連した活性など)を測定して、比較する。また、該スクリーニングは、膜結合型RAGE存在下にそれを行ってよい。

基質としては、AGE等の基質となることのできるものであれば何れのものであってよい。例えば、AGEとRAGEとの相互作用を測定する目的で使用されるものの中から選んで用いることができるが、好ましくは合成されたAGEなどを使用できる。基質は、そのまま使用できるが、好ましくはフルオレッセインなどの蛍光、酵素や放射性物質で標識したものを使用できる。

【0066】

試験試料としては、例えばタンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、植物抽出物、動物などの組織抽出物、細胞抽出物などが挙げられる。試験試料に使用される試験化合物の例には、好ましくは抗AGE抗体、抗RAGE抗体、AGEとRAGEとの結合阻害剤、タンパク質の糖化反応に対するインヒビター活性を有する化合物、特に合成化合物などを含んでいてよい。これら化合物は、新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。該スクリーニングは、通常の場合の結合活性の測定法に準じて実施することができ、例えば当該分野で公知の方法などを参考にして行うことができる。また、各種標識、緩衝液系その他適当な試薬等を使用したり、そこで説明した操作等に準じて行うことができる。使用ペプチドなどは、活性化剤で処理したり、その前駆体あるいは潜在型のものを活性型のものに予め変換しておくこともできる。測定は通常トリス塩酸緩衝液、リン酸塩緩衝液などの反応に悪影響を与えないような緩衝液等の中で、例えば、pH約4~約10(好ましくは、pH約6~約8)において行うことができる。これら個々のスクリーニングにあたっては、それぞれの方法における通常の場合の条件、操作法に当業者の通常の場合の技術的配慮を加えて、本発明の可溶性RAGEあるいはそれと実質的に同等な活性を有するポリペプチドあるいはペプチドに関連した測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、Methods in Enzymology, Academic Press社(USA)発行)など参照〕。

【0067】

本発明のスクリーニング方法又はスクリーニングキットを用いて得られる化合物又はその

10

20

30

40

50

塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等の機能を促進あるいは阻害する化合物である。該化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容される塩などが挙げられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。無機塩基との塩の好適な例としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、並びにアルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2,6-ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えば、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などとの塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

【0068】

本明細書中、「抗体」との用語は、広義の意味で使用されるものであってよく、所望の可溶性RAGEポリペプチド及び関連ペプチド断片に対するモノクローナル抗体の単一のものや各種エピトープに対する特異性を持つ抗体組成物であってよく、また1価抗体または多価抗体並びにポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を含むものであり、さらに天然型(intact)分子並びにそれらのフラグメント及び誘導体も表すものであり、F(ab')₂、Fab'及びFabといったフラグメントを包含し、さらに少なくとも二つの抗原又はエピトープ(epitope)結合部位を有するキメラ抗体若しくは雑種抗体、又は、例えば、クワドローム(quadrome)、トリオーム(triome)などの二重特異性組換え抗体、種間雑種抗体、抗イデオタイプ抗体、さらには化学的に修飾あるいは加工などされてこれらの誘導体と考えられるもの、公知の細胞融合又はハイブリドーマ技術や抗体工学を適用したり、合成あるいは半合成技術を使用して得られた抗体、抗体生成の観点から公知である従来技術を適用したり、DNA組換え技術を用いて調製される抗体、本明細書に記載し且つ定義する標的抗原物質あるいは標的エピトープに関して中和特性を有したりする抗体又は結合特性を有する抗体を包含してよい。特に好ましい本発明の抗体は、天然型の可溶性RAGEポリペプチドを特異的に識別できるものであり、例えば、全長型RAGEポリペプチドや全長型RAGEポリペプチドからそのN末端側あるいはそのC末端側を開裂せしめて生成せしめた公知の可溶化型RAGEポリペプチドとは区別してそれを認識できるものである。

【0069】

抗原物質に対して作製されるモノクローナル抗体は、培養中の一連のセルラインにより抗体分子の産生を提供することのできる任意の方法を用いて産生される。修飾語「モノクローナル」とは、実質上均質な抗体の集団から得られているというその抗体の性格を示すものであって、何らかの特定の方法によりその抗体が産生される必要があるとみなしてはならない。個々のモノクローナル抗体は、自然に生ずるかもしれない変異体が僅かな量だけ存在しているかもしれないという以外は、同一であるような抗体の集団を含んでいるものである。モノクローナル抗体は、高い特異性を持ち、それは単一の抗原性をもつサイトに対して向けられているものである。異なった抗原決定基(エピトープ)に対して向けられた種々の抗体を典型的には含んでいる通常の(ポリクローナル)抗体調製物と対比すると、それぞれのモノクローナル抗体は当該抗原上の単一の抗原決定基に対して向けられているものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養により合成され、他のイムノグロブリン類の夾雑がないあるいは少ない点でも優れている。モノクローナル抗体は、ハイブリッド抗体及びリコンビナント抗体を含むものである。それら

10

20

30

40

50

は、所望の生物活性を示す限り、その由来やイムノグロブリンクラスやサブクラスの種別に関わりなく、可変領域ドメインを定常領域ドメインで置き換えたり（例えば、ヒト化抗体）、あるいは軽鎖を重鎖で置き換えたり、ある種の鎖を別の種の鎖でもって置き換えたり、あるいはヘテロジニアスなタンパク質と融合せしめたりして得ることができる（例えば、米国特許第4816567号；Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.79-97, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987 など）。モノクローナル抗体を製造する好適な方法の例には、ハイブリドーマ法 (G. Kohler and C. Milstein, Nature, 256, pp.495-497 (1975)); ヒトB細胞ハイブリドーマ法 (Kozbor et al., Immunology Today, 4, pp.72-79 (1983); Kozbor, J. Immunol., 133, pp.3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987); トリオーマ法; EBV-ハイブリドーマ法 (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96 (1985)) (ヒトモノクローナル抗体を産生するための方法); 米国特許第4946778号 (単鎖抗体の産生のための技術) が挙げられる他、抗体に関して以下の文献が挙げられる:

【0070】

S. Biocca et al., EMBO J, 9, pp.101-108 (1990); R.E. Bird et al., Science, 242, pp.423-426 (1988); M.A. Boss et al., Nucl. Acids Res., 12, pp.3791-3806 (1984); J. Bukovsky et al., Hybridoma, 6, pp.219-228 (1987); M. DAINO et al., Anal. Biochem., 166, pp.223-229 (1987); J.S. Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, pp.5879-5883 (1988); P.T. Jones et al., Nature, 321, pp.522-525 (1986); J.J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986); S. Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp.6851-6855 (1984); V.T. Oi et al., BioTechniques, 4, pp.214-221 (1986); L. Riechmann et al., Nature, 332, pp.323-327 (1988); A. Tramontano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, pp.6736-6740 (1986); C. Wood et al., Nature, 314, pp.446-449 (1985); Nature, 314, pp.452-454 (1985) あるいはそこで引用された文献（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。

【0071】

本発明に係るモノクローナル抗体は、それらが所望の生物活性を示す限り、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の種から誘導される又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一又はホモローガスであるが、一方、鎖の残部は、別の種から誘導される又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一又はホモローガスである、「キメラ」抗体（免疫グロブリン）を特に包含する（米国特許第4816567号明細書；Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp.6851-6855 (1984)）。以下、モノクローナル抗体を例に挙げて、抗体の作製につき詳しく説明する。本発明のモノクローナル抗体は、ミエローマ細胞を用いての細胞融合技術を利用して得られたモノクローナル抗体であってよく、例えば次のような工程で作製できる。

1. 免疫原性抗原の調製
2. 免疫原性抗原による動物の免疫
3. ミエローマ細胞（骨髄腫細胞）の調製
4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合
5. ハイブリドーマ（融合細胞）の選択及びモノクローン化
6. モノクローナル抗体の製造

【0072】

1. 免疫原性抗原の調製
 抗原としては、上記で記載してあるように、可溶性RAGEポリペプチド又はそれから誘導された断片を単離したものをを用いることもできるが、決定された可溶性RAGEのアミノ酸配列情報を基に、適当なオリゴペプチドを化学合成しそれを抗原として利用することができる。代表的には配列表の配列番号:2の

10

20

30

40

50

- (1) 少なくとも第332位～第347位のアミノ酸配列；
- (2) 第1位～第117位のアミノ酸配列；
- (3) 第19位～第347位のアミノ酸配列；及び
- (4) 第1位～第347位のアミノ酸配列

から成る群から選ばれた領域に存在するアミノ酸残基のうちの連続した少なくとも5個のアミノ酸を有するペプチドが挙げられる。

抗原は、そのまま適当なアジュバントと混合して動物を免疫するのに使用できるが、免疫原性コンジュゲートなどにしてもよい。例えば、免疫原として用いる抗原は、可溶性RAGEを断片化したもの、あるいはそのアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、ポリペプチドをデザインして化学合成して得られた合成ポリペプチド断片であってもよい。また、その断片を適当な縮合剤を介して種々の担体タンパク質類と結合させてハプテン-タンパク質の如き免疫原性コンジュゲートとし、これを用いて特定の配列のみと反応できる（あるいは特定の配列のみを認識できる）モノクローナル抗体をデザインするのに用いることもできる。デザインされるポリペプチドには予めシステイン残基などを付加し、免疫原性コンジュゲートの調製を容易にできるようにしておくことができる。担体タンパク質類と結合させるにあたっては、担体タンパク質類はまず活性化されることができ、こうした活性化にあたり活性化結合基を導入することが挙げられる。

活性化結合基としては、(1) 活性化エステルあるいは活性化カルボキシル基、例えばニトロフェニルエステル基、ペンタフルオロフェニルエステル基、1-ベンゾトリアゾールエステル基、N-スクシンイミドエステル基など、(2) 活性化ジチオ基、例えば2-ピリジルジチオ基などが挙げられる。担体タンパク質類としては、キーホール・リンペット・ヘモシアニン (KLH)、牛血清アルブミン (BSA)、卵白アルブミン、グロブリン、ポリリジンなどのポリペプチド、細菌菌体成分、例えばBCGなどが挙げられる。

【0073】

2. 免疫原性抗原による動物の免疫

免疫は、当業者に知られた方法により行うことができ、例えば村松繁、他編、実験生物学講座14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和60年、日本生化学会編、続生化学実験講座5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年、日本生化学会編、新生化学実験講座12、分子免疫学III、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じて行うことができる。免疫化剤を（必要に応じアジュバントと共に）一回又はそれ以上の回数哺乳動物に注射することにより免疫化される。代表的には、該免疫化剤及び/又はアジュバントを哺乳動物に複数回皮下注射あるいは腹腔内注射することによりなされる。免疫化剤は、上記抗原ペプチドあるいはその関連ペプチド断片を含むものが挙げられる。免疫化剤は、免疫処理される哺乳動物において免疫原性であることの知られているタンパク質（例えば上記担体タンパク質類など）とコンジュゲートを形成せしめて使用してもよい。アジュバントとしては、例えばフロイント完全アジュバント、リビ(Ribi)アジュバント、百日咳ワクチン、BCG、リピッドA、リポソーム、水酸化アルミニウム、シリカなどが挙げられる。免疫は、例えばBALB/cなどのマウス、ハムスター、その他の適当な動物を使用して行われる。抗原の投与量は、例えばマウスに対して約1～400 µg/動物で、一般には宿主動物の腹腔内や皮下に注射し、以後1～4週間おきに、好ましくは1～2週間ごとに腹腔内、皮下、静脈内あるいは筋肉内に追加免疫を2～10回程度反復して行う。免疫用のマウスとしてはBALB/c系マウスその他、BALB/c系マウスと他系マウスとのF1マウスなどを用いることもできる。必要に応じ、抗体価測定系を調製し、抗体価を測定して動物免疫の程度を確認できる。本発明の抗体は、こうして得られ免疫された動物から得られたものであってよく、例えば、抗血清、ポリクローナル抗体等を包含する。

【0074】

3. ミエローム細胞（骨髄腫細胞）の調製

細胞融合に使用される無限増殖可能株（腫瘍細胞株）としては免疫グロブリンを産生しない細胞株から選ぶことができ、例えばP3-NS-1-Ag4-1 (NS-1, Eur. J. Immunol., 6: 511-519, 1976)、SP-2/0-Ag14 (SP-2, Nature, 276: 269～270, 1978)、マウスミエローム M

10

20

30

40

50

OPC-21セルライン由来のP3-X63-Ag8-U1 (P3U1, Curr. topics Microbiol. Immunol., 81: 1-7, 1978)、P3-X63-Ag8 (X63, Nature, 256: 495-497, 1975)、P3-X63-Ag8-653 (653, J. Immunol., 123: 1548-1550, 1979)などを用いることができる。8-アザグアニン耐性のマウスミエローマ細胞株はダルベッコMEM培地 (DMEM培地)、RPMI-1640培地などの細胞培地に、例えばペニシリン、アミカシンなどの抗生物質、牛胎児血清(FCS)などを加え、さらに8-アザグアニン(例えば5~45 µg/ml)を加えた培地で継代されるが、細胞融合の2~5日前に正常培地で継代して所要数の細胞株を用意することができる。また使用細胞株は、凍結保存株を約37で完全に解凍したのちRPMI-1640培地などの正常培地で3回以上洗浄後、正常培地で培養して所要数の細胞株を用意したものであってもよい。

【0075】

4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合

上記2.の工程に従い免疫された動物、例えばマウスは最終免疫後、2~5日後にその脾臓が摘出され、それから脾細胞懸濁液を得る。脾細胞の他、生体各所のリンパ節細胞を得て、それを細胞融合に使用することもできる。こうして得られた脾細胞懸濁液と上記3.の工程に従い得られたミエローマ細胞株を、例えば最小必須培地(MEM培地)、DMEM培地、RPMI-1640培地などの細胞培地中に置き、細胞融合剤、例えばポリエチレングリコールを添加する。細胞融合剤としては、この他各種当該分野で知られたものを用いることができ、この様なものとしては不活性化したセンダイウイルス(HVJ: Hemagglutinating Virus of Japan)なども挙げられる。好ましくは、例えば30~60%のポリエチレングリコールを0.5~2ml加えることができ、分子量が1,000~8,000のポリエチレングリコールを用いることができ、さらに分子量が1,000~4,000のポリエチレングリコールがより好ましく使用できる。融合培地中でのポリエチレングリコールの濃度は、例えば30~60%となるようにすることが好ましい。必要に応じ、例えばジメチルスルホキシドなどを少量加え、融合を促進することもできる。融合に使用する脾細胞(リンパ球): ミエローマ細胞株の割合は、例えば1:1~20:1とすることが挙げられるが、より好ましくは4:1~7:1とすることができる。

融合反応を1~10分間行い、次にRPMI-1640培地などの細胞培地を加える。融合反応処理は複数回行うこともできる。融合反応処理後、遠心などにより細胞を分離した後選択用培地に移す。

【0076】

5. ハイブリドーマ(融合細胞)の選択及びモノクローン化

選択用培地としては、例えばヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地などの培地、所謂HAT培地が挙げられる。選択培地交換の方法は、一般的には培養プレートに分注した容量と等容量を翌日加え、その後1~3日ごとにHAT培地で半量ずつ交換するというように処理することができるが、適宜これに変更を加えて行うこともできる。また融合後8~16日目には、アミノプテリンを除いた、所謂HT培地で1~4日ごとに培地交換をすることができる。フィーダーとして、例えばマウス胸腺細胞を使用することもでき、それが好ましい場合がある。

ハイブリドーマの増殖のさかんな培養ウェルの培養上清を、例えば放射免疫分析(RIA)、酵素免疫分析(ELISA)、蛍光免疫分析(FIA)などの測定系、あるいは蛍光惹起細胞分離装置(FACS)などで、所定の断片ペプチドを抗原として用いたり、あるいは標識抗マウス抗体を用いて目的抗体を測定するなどして、スクリーニングしたりする。

目的抗体を産生しているハイブリドーマをクローニングする。クローニングは、寒天培地中でコロニーをピック・アップするか、あるいは限界希釈法によりなされる。限界希釈法でより好ましく行うことができる。クローニングは複数回行うことが好ましい。

【0077】

6. モノクローナル抗体の製造

得られたハイブリドーマ株は、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地などの適当な増殖用培地中で培養し、その培地上清から所望のモノクローナル抗体を得ることが出来る。大量の抗体を得るためには、ハイブリドーマを腹水化することが挙げられる。この場合ミエロー

10

20

30

40

50

マ細胞由来の動物と同系の組織適合性動物の腹腔内に各ハイブリドーマを移植し、増殖させるか、あるいは例えばヌード・マウスなどに各ハイブリドーマを移植し、増殖させ、該動物の腹水中に産生されたモノクローナル抗体を回収して得ることが出来る。動物はハイブリドーマの移植に先立ち、プリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン)などの鉱物油を腹腔内投与しておくことができ、その処理後、ハイブリドーマを増殖させ、腹水を採取することもできる。腹水液はそのまま、あるいは従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製してモノクローナル抗体として用いることができる。好ましくは、モノクローナル抗体を含有する腹水は、硫酸分画した後、DEAE-

10

【0078】

また、トランスジェニックマウス又はその他の生物、例えば、その他の哺乳動物は、本発明の免疫原ポリペプチド産物に対するヒト化抗体等の抗体を発現するのに用いることができる。

またこうして大量に得られた抗体の配列を決定したり、ハイブリドーマ株から得られた抗体をコードする核酸配列を利用して、遺伝子組換え技術により抗体を作製することも可能である。当該モノクローナル抗体をコードする核酸は、例えばマウス抗体の重鎖や軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用するなどの慣用の手法で単離し配列決定することができる。一旦単離されたDNAは、上記したようにして発現ベクターに入れ、CHO、COSなどの宿主細胞に入れることができる。該DNAは、例えばホモジニアスなマウスの配列に代えて、ヒトの重鎖や軽鎖の定常領域ドメインをコードする配列に置換するなどして修飾することが可能である (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6581, 1984)。かくして所望の結合特異性を有するキメラ抗体やハイブリッド抗体も調製することが可能である。また、抗体は、下記するような縮合剤を用いることを含めた化学的なタンパク合成技術を適用して、キメラ抗体やハイブリッド抗体を調製するなどの修飾をすることも可能である。

20

30

ヒト化抗体は、当該分野で知られた技術により行うことが可能である(例えば、Jones et al., Nature, 321: pp.522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: pp.323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: pp.1534-1536 (1988))。ヒトモノクローナル抗体も、当該分野で知られた技術により行うことが可能で、ヒトモノクローナル抗体を生産するためのヒトミエローマ細胞やヒト・マウスヘテロミエローマ細胞は当該分野で知られている (Kozbor, J. Immunol., 133, pp.3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987))。バイスペシフィックな抗体を製造する方法も当該分野で知られている (Millstein et al., Nature, 305: pp.537-539 (1983); WO93/08829; Traunecker et al., EMBO J., 10: pp.3655-3659 (1991); Suresh et al., "Methods in Enzymology", Vol. 121, pp.210 (1986))。

40

【0079】

さらにこれら抗体をトリプシン、パパイン、ペプシンなどの酵素により処理して、場合により還元して得られるFab、Fab'、F(ab')₂といった抗体フラグメントにして使用してもよい。

抗体は、既知の任意の検定法、例えば競合的結合検定、直接及び間接サンドイッチ検定、及び免疫沈降検定に使用することができる (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987))。

抗体を検出可能な原子団にそれぞれコンジュゲートするには、当分野で知られる任意の方

50

法を使用することができ、例えば、David et al., Biochemistry, 13巻, 1014-1021 頁 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40: pp.219-231 (1981);及び "Methods in Enzymology", Vol. 184, pp.138-163 (1990) により記載の方法が挙げられる。標識物を付与する抗体としては、IgG 画分、更にはペプシン消化後還元して得られる特異的結合部Fab'を用いることができる。これらの場合の標識物の例としては、下記するように酵素(ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼあるいは -D- ガラクトシダーゼなど)、化学物質、蛍光物質あるいは放射性同位元素などがある。

【0080】

本発明での検知・測定は、イムノ染色、例えば組織あるいは細胞染色、イムノアッセイ、例えば競合型イムノアッセイまたは非競合型イムノアッセイで行うことができ、ラジオイムノアッセイ、ELISA などを用いることができ、B - F分離を行ってもよいし、あるいは行わないでその測定を行うことができる。好ましくは放射免疫測定法や酵素免疫測定法であり、さらにサンドイッチ型アッセイが挙げられる。例えばサンドイッチ型アッセイでは、一方を本発明の可溶型RAGE及びその関連ペプチド断片に対する抗体とし、他方を可溶型RAGEのC末端側残基に対する抗体とし、そして一方を検出可能に標識化する。同じ抗原を認識できる他の抗体を固相に固定化する。検体と標識化抗体及び固相化抗体を必要に応じ順次反応させるためインキュベーション処理し、ここで非結合抗体を分離後、標識物を測定する。測定された標識の量は抗原、すなわち可溶型RAGEポリペプチド断片抗原の量と比例する。このアッセイでは、不溶化抗体や、標識化抗体の添加の順序に応じて同時サンドイッチ型アッセイ、フォワード (forward) サンドイッチ型アッセイあるいは逆サンドイッチ型アッセイなどと呼ばれる。例えば洗浄、攪拌、震盪、ろ過あるいは抗原の予備抽出等は、特定の状況のもとでそれら測定工程の中で適宜採用される。特定の試薬、緩衝液等の濃度、温度あるいはインキュベーション処理時間などのその他の測定条件は、検体中の抗原の濃度、検体試料の性質等の要素に従い変えることができる。当業者は通常の実験法を用いながら各測定に対して有効な最適の条件を適宜選定して測定を行うことが出来る。

【0081】

抗原あるいは抗体を固相化できる多くの担体が知られており、本発明ではそれらから適宜選んで用いることができる。担体としては、抗原抗体反応などに使用されるものが種々知られており、本発明においても勿論これらの公知のものの中から選んで使用できる。特に好適に使用されるものとしては、例えばガラス、例えば活性化ガラス、多孔質ガラス、シリカゲル、シリカ - アルミナ、アルミナ、磁化鉄、磁化合金などの無機材料、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリメタクリレート、ポリスチレン、スチレン - ブタジエン共重合体、ポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド、スチレン - メタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイン - エチレングリコールジメタクリレート共重合体など、架橋化アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、デキストラン、アガロース、架橋アガロース、セルロース、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートなどの天然または変成セルロース、架橋デキストラン、ナイロンなどのポリアミド、ポリウレタン、ポリエポキシ樹脂などの有機高分子物質、さらにそれらを乳化重合して得られたもの、細胞、赤血球などで、必要に応じ、シランカップリング剤などで官能性基を導入してあるものが挙げられる。

さらに、ろ紙、ビーズ、試験容器の内壁、例えば試験管、タイタープレート、タイターウェル、ガラスセル、合成樹脂製セルなどの合成材料からなるセル、ガラス棒、合成材料からなる棒、末端を太くしたりあるいは細くしたりした棒、末端に丸い突起をつけたりあるいは偏平な突起をつけた棒、薄板状にした棒などの固体物質(物体)の表面などが挙げられる。

【0082】

これら担体へは、抗体を結合させることができ、好ましくは本発明で得られる抗原に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を結合させることができる。担体とこれら抗原抗体反応に関与するものとの結合は、吸着などの物理的な手法、あるいは縮合剤などを用いた

10

20

30

40

50

り、活性化されたものなどを用いたりする化学的な方法、さらには相互の化学的な結合反応を利用した手法などにより行うことができる。

標識としては、酵素、酵素基質、酵素インヒビター、補欠分子類、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質、色素物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、発色物質、磁気物質、金属粒子、例えば金コロイドなど、放射性物質などを挙げるができる。酵素としては、脱水素酵素、還元酵素、酸化酵素などの酸化還元酵素、例えばアミノ基、カルボキシル基、メチル基、アシル基、リン酸基などを転移するのを触媒する転移酵素、例えばエステル結合、グリコシド結合、エーテル結合、ペプチド結合などを加水分解する加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼなどを挙げるができる。酵素は複数の酵素を複合的に用いて検知に利用することもできる。例えば酵素的サイクリングを利用する

10

【0083】

代表的な放射性物質の標識用同位体元素としては、 $[^{32}\text{P}]$, $[^{125}\text{I}]$, $[^{131}\text{I}]$, $[^3\text{H}]$, $[^{14}\text{C}]$, $[^{35}\text{S}]$ などが挙げられる。

代表的な酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ、大腸菌 $-D-$ ガラクトシダーゼなどのガラクトシダーゼ、マレエート・デヒドロゲナーゼ、グルコース-6- フォスフェート・デヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、カタラーゼ、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、大腸菌アルカリホスファターゼなどのアルカリホスファターゼなどが挙げられる。

アルカリホスファターゼを用いた場合、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどのウンベリフェロン誘導体、ニトロフェニルホスフェートなどのリン酸化フェノール誘導体、NADPを利用した酵素的サイクリング系、ルシフェリン誘導体、ジオキセタン誘導体などの基質を使用したりして、生ずる蛍光、発光などにより測定できる。ルシフェリン、ルシフェラーゼ系を利用したりすることもできる。カタラーゼを用いた場合、過酸化水素と反応して酸素を生成するので、その酸素を電極などで検知することもできる。電極としてはガラス電極、難溶性塩膜を用いるイオン電極、液膜型電極、高分子膜電極などであることもできる。

20

酵素標識は、ビオチン標識体と酵素標識アビジン(ストレプトアビジン)に置き換えることも可能である。標識は、複数の異なった種類の標識を使用することもできる。こうした場合、複数の測定を連続的に、あるいは非連続的に、そして同時にあるいは別々に行うことを可能にすることもできる。

30

【0084】

本発明においては、信号の形成に4-ヒドロキシフェニル酢酸、1,2-フェニレンジアミン、テトラメチルベンジジンなどと西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ、ウンベリフェリルガラクトシド、ニトロフェニルガラクトシドなどと $-D-$ ガラクトシダーゼ、グルコース-6- リン酸・デヒドロゲナーゼなどの酵素試薬の組合わせも利用でき、ヒドロキノン、ヒドロキシベンゾキノン、ヒドロキシアントラキノンなどのキノール化合物、リポ酸、グルタチオンなどのチオール化合物、フェノール誘導体、フェロセン誘導体などを酵素などの働きで形成しうるものが使用できる。

蛍光物質あるいは化学ルミネッセンス化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート、例えばローダミンBイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートなどのローダミン誘導体、ダンシルクロリド、ダンシルフルオリド、フルオレスカミン、フィコビリプロテイン、アクリジニウム塩、ルミフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリンなどのルミノール、イミダゾール、シュウ酸エステル、希土類キレート化合物、クマリン誘導体などが挙げられる。

40

標識するには、チオール基とマレイミド基の反応、ピリジルジスルフィド基とチオール基の反応、アミノ基とアルデヒド基の反応などを利用して行うことができ、公知の方法あるいは当該分野の当業者が容易になしうる方法、さらにはそれらを修飾した方法の中から適宜選択して適用できる。また上記免疫原性複合体作製に使用されることのできる縮合剤、担体との結合に使用されることのできる縮合剤などを用いることができる。

50

【 0 0 8 5 】

縮合剤としては、例えばホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N,N'-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、N,N'-エチレンビスマレイミド、エチレングリコールビススクシニミジルスクシネート、ビスジアゾベンジジン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、N-スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、N-スルホスクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、N-スクシンイミジル (4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート、N-スクシンイミジル 4-(1-マレイミドフェニル)ブチレート、N-(-マレイミドカプロイルオキシ)コハク酸イミド(EMCS)、イミノチオラン、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物、メチル-3-(4'-ジチオピリジル)プロピオンイミデート、メチル-4-メルカプトブチリルイミデート、メチル-3-メルカプトプロピオンイミデート、N-スクシンイミジル-S-アセチルメルカプトアセテートなどが挙げられる。

10

【 0 0 8 6 】

本発明の測定法によれば、測定すべき物質を酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬と、担体に結合された抗体とを順次反応させることができるし、同時に反応させることもできる。試薬を加える順序は選ばれた担体系の型により異なる。感作されたプラスチックなどのビーズを用いた場合には、酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬を測定すべき物質を含む検体試料と共に最初適当な試験管中に一緒に入れ、その後該感作されたプラスチックなどのビーズを加えることにより測定を行うことができる。

20

本発明の定量法においては、免疫学的測定法が用いられるが、その際の固相担体としては、抗体などタンパク質を良く吸着するポリスチレン製、ポリカーボネイト製、ポリプロピレン製あるいはポリビニル製のボール、マイクロプレート、スティック、微粒子あるいは試験管などの種々の材料および形態を任意に選択し、使用することができる。

測定にあたっては至適pH、例えばpH約4～約9に保つように適当な緩衝液系中で行うことができる。特に適切な緩衝剤としては、例えばアセテート緩衝剤、クエン酸塩緩衝剤、フォスフェート緩衝剤、トリス緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ボレート緩衝剤、グリシン緩衝剤、炭酸塩緩衝剤、トリス-塩酸緩衝剤などが挙げられる。緩衝剤は互いに任意の割合で混合して用いることができる。抗原抗体反応は約0～約60の間の温度で行うことが好ましい。

30

酵素などで標識されたモノクローナル抗体などの抗体試薬及び担体に結合せしめられた抗体試薬、さらには測定すべき物質のインキュベーション処理は、平衡に達するまで行うことができるが、抗原抗体反応の平衡が達成されるよりもずっと早い時点で固相と液相とを分離して限定されたインキュベーション処理の後に反応を止めることができ、液相又は固相のいずれかにおける酵素などの標識の存在の程度を測ることができる。測定操作は、自動化された測定装置を用いて行うことが可能であり、ルミネセンス・ディテクター、ホト・ディテクターなどを使用して基質が酵素の作用で変換されて生ずる表示シグナルを検知して測定することもできる。

40

【 0 0 8 7 】

抗原抗体反応においては、それぞれ用いられる試薬、測定すべき物質、さらには酵素などの標識を安定化したり、抗原抗体反応自体を安定化するように適切な手段を講ずることができる。さらに、非特異的な反応を除去し、阻害的に働く影響を減らしたり、あるいは測定反応を活性化したりするため、タンパク質、安定化剤、界面活性化剤、キレート化剤などをインキュベーション溶液に加えることもできる。キレート化剤としては、エチレンジアミン四酢酸塩(EDTA)がより好ましい。

当該分野で普通に採用されていたりあるいは当業者に知られた非特異的結合反応を防ぐためのブロッキング処理を施してもよく、例えば、哺乳動物などの正常血清タンパク質、アルブミン、スキムミルク、乳発酵物質、コラーゲン、ゼラチンなどで処理することができ

50

る。非特異的結合反応を防ぐ目的である限り、それらの方法は特に限定されず用いることができる。

本発明の測定方法で測定される試料としては、あらゆる形態の溶液やコロイド溶液、非流体試料などが使用しうるが、好ましくは生物由来の試料、例えば胸腺、睾丸、腸、腎臓、脳、乳癌、卵巣癌、結腸・直腸癌、血液、血清、血漿、関節液、脳脊髄液、涙液、胆汁液、唾液、羊水、尿、その他の体液、細胞培養液、組織培養液、組織ホモジネート、生検試料、組織、細胞などが挙げられる。

これら個々の免疫学的測定法を含めた各種の分析・定量法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて、本発明の当該対象物質あるいはそれと実質的に同等な活性を有する物質に関連した測定系を構築すればよい。

【0088】

これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編、「ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和49年発行；入江 寛編、「続ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和54年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」、医学書院、昭和53年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」（第2版）、医学書院、昭和57年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」（第3版）、医学書院、昭和62年発行；H. V. Vunakis et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 70 (Immunochemical Techniques, Part A), Academic Press, New York (1980); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 73 (Immunochemical Techniques, Part B), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 74 (Immunochemical Techniques, Part C), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 84 (Immunochemical Techniques, Part D: Selected Immunoassays), Academic Press, New York (1982); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 92 (Immunochemical Techniques, Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods), Academic Press, New York (1983); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 178 (Antibodies, Antigens, and Molecular Mimicry), Academic Press, New York (1989); M. Wilchek et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 184 (Avidin-Biotin Technology), Academic Press, New York (1990); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 203 (Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, Part B: Antibodies and Antigens, Nucleic Acids, Polysaccharides, and Drugs), Academic Press, New York (1991) などあるいはそこで引用された文献（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）〕。

【0089】

本発明の抗可溶性RAGE抗体、特にモノクローナル抗体を用いて、エピトープマッピングを行うこともでき、各エピトープを認識する抗体を用いれば可溶性RAGE及びその関連ペプチド断片などの検知・測定を行うことができる。

可溶性RAGE及びその関連ペプチド断片に対する抗体は、可溶性RAGEによるAGEと膜結合型RAGE受容体との相互作用の抑制あるいは阻害などの現象の検出及び/又は測定、さらにはAGEの過剰により生ずる各種の生理活性物質あるいは生理現象又は生物現象の検出及び/又は測定、また、可溶性RAGE産生を制御する因子や機構の研究・開発などに有用である。該抗体、特にモノクローナル抗体は、(i) AGEとRAGEとの間での相互作用に起因する組織あるいは細胞が関連する障害、異常及び/又は疾患を検出したり、(ii) AGEとRAGEとの間での相互作用に起因する細胞の腫瘍化、細胞の移動、浸潤、遊走及び/又は転移あるいはその可能性を検出したり、(iii) タンパク質の糖化反応に関連して生ずる障害、異常及び/又は疾患あるいはその可能性を検出したり、(iv) 可溶性RAGEの発現量を測定したり、(v) AGE捕捉活性の変化を検出及び/又は測定したり、(vi) 可溶性RAGE産生を制御する化合

物などの探索をしたり、及び/又は(vii) 該可溶型RAGE産生を制御する化合物の活性の検知及び/又は測定をしたりなどするのに有用である。糖尿病合併症、組織の異常、がんの移動性、浸潤性、走化性及び/又は転移性の程度を知るのに使用できると期待される。

本発明にしたがえば、可溶型RAGEによるAGEの膜結合型RAGEとの相互作用の抑制あるいは阻害活性を検出及び/又は測定し、糖尿病治療剤、糖尿病合併症予防・治療剤、組織の疾患予防・治療剤、抗炎症剤、抗がん剤、がん転移阻害剤、動脈硬化症治療剤、アルツハイマー治療剤、関節破壊治療剤、抗アレルギー剤及び/又は免疫抑制剤の効果判定モニターとして使用することが可能となる。

また、本発明では、AGEによる組織・細胞あるいはタンパク質の異常化現象の検出及び/又は測定方法やそのための試薬が提供できる。

10

【0090】

本発明の活性成分〔例えば、(a) 可溶型RAGEポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩、それに関連するペプチド等、(b) 該可溶型RAGEあるいは可溶型RAGEポリペプチドをコードするDNAなどの核酸等、(c) 本発明の抗体、その一部断片(モノクローナル抗体を包含する) またはその誘導体、(d) 可溶型RAGEによるAGEと膜貫通型RAGEとの間の相互作用を抑制あるいは阻害するなどの現象あるいは組織あるいはタンパク質の変質・過剰生産あるいは分解現象といった生物学的活性を抑制及び/又は阻害する化合物またはその塩、可溶型RAGE産生を制御する化合物またはその塩、(e) 本発明のDNAなどの核酸に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドなど、(f) 本発明を使用して見出された活性物質など〕を医薬として用いる場合、例えばAGEとRAGEとの間の相互作用阻害剤またはそれらの塩等は、通常単独或いは薬理的に許容される各種製剤補助剤と混合して、医薬組成物又は医薬調製物などとして投与することができる。好ましくは、経口投与、局所投与、または非経口投与等の使用に適した製剤調製物の形態で投与され、目的に応じていずれの投与形態(吸入法、あるいは直腸投与も包含される)によってもよい。

20

また、本発明の活性成分は、糖尿病合併症用剤、動脈硬化症用剤、抗高脂血症剤、抗腫瘍剤(抗がん剤)、腫瘍転移阻害剤、血栓形成阻害剤、アルツハイマー治療剤、関節破壊治療剤、消炎剤及び/又は免疫抑制剤と配合して使用することもでき、それらは、有利な働きを持つものであれば制限なく使用でき、例えば当該分野で知られたものの中から選択することができる。

【0091】

30

そして、非経口的な投与形態としては、局所、経皮、静脈内、筋肉内、皮下、皮内もしくは腹腔内投与を包含し得るが、患部への直接投与も可能であり、またある場合には好適でもある。好ましくはヒトを含む哺乳動物に経口的に、あるいは非経口的(例、細胞内、組織内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内、胸腔内、脊髄腔内、点滴法、注腸、経直腸、点耳、点眼や点鼻、歯、皮膚や粘膜への塗布など)に投与することができる。具体的な製剤調製物の形態としては、溶液製剤、分散製剤、半固形製剤、粉粒体制剤、成型製剤、浸出製剤などが挙げられ、例えば、錠剤、被覆錠剤、糖衣を施した剤、丸剤、トローチ剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、マイクロカプセル剤、埋込剤、粉末剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、注射剤、液剤、エリキシル剤、エマルジョン剤、灌注剤、シロップ剤、水剤、乳剤、懸濁剤、リニメント剤、ローション剤、エアゾール剤、スプレー剤、吸入剤、噴霧剤、軟膏製剤、硬膏製剤、貼付剤、パスタ剤、パップ剤、クリーム剤、油剤、坐剤(例えば、直腸坐剤)、チンキ剤、皮膚用水剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、塗布剤、輸液剤、注射用液剤などのための粉末剤、凍結乾燥製剤、ゲル調製品等が挙げられる。

40

医薬用の組成物は通常の方法に従って製剤化することができる。例えば、適宜必要に応じて、生理学的に認められる担体、医薬として許容される担体、アジュバント剤、賦形剤、補形剤、希釈剤、香味剤、香料、甘味剤、ペヒクル、防腐剤、安定化剤、結合剤、pH調節剤、緩衝剤、界面活性剤、基剤、溶剤、充填剤、増量剤、溶解補助剤、可溶化剤、等張化剤、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、増粘剤、ゲル化剤、硬化剤、吸収剤、粘着剤、弾性剤、可塑剤、崩壊剤、噴射剤、保存剤、抗酸化剤、遮光剤、保湿剤、緩和剤、帯電防止剤、無痛化剤などを単独もしくは組合わせて用い、それとともに本発明のタンパク質等を混和

50

することによって、一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態にして製造することができる。

非経口的使用に適した製剤としては、活性成分と、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る媒体との無菌性溶液、または懸濁液剤など、例えば注射剤等が挙げられる。一般的には、水、食塩水、デキストロス水溶液、その他関連した糖の溶液、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどのグリコール類が好ましい注射剤用液体担体として挙げられる。注射剤を調製する際は、蒸留水、リンゲル液、生理食塩液のような担体、適当な分散化剤または湿化剤及び懸濁化剤などを使用して当該分野で知られた方法で、溶液、懸濁液、エマルジョンのごとき注射しうる形に調製する。

【0092】

注射用の水性液としては、例えば生理食塩液、ブドウ糖やその他の補助薬（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）を含む等張液などが挙げられ、薬理的に許容される適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノールなど）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート 80TM、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）又は浸透圧調節のための試薬、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、アスコルビン酸などの酸化防止剤、吸収促進剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

【0093】

非経口投与には、界面活性剤及びその他の薬学的に許容される助剤を加えるか、あるいは加えずに、水、エタノール又は油のような無菌の薬学的に許容される液体中の溶液あるいは懸濁液の形態に製剤化される。製剤に使用される油性ベヒクルあるいは溶剤としては、天然あるいは合成あるいは半合成のモノあるいはジあるいはトリグリセリド類、天然、半合成あるいは合成の油脂類あるいは脂肪酸類が挙げられ、例えばピーナッツ油、トウモロコシ油、大豆油、ゴマ油などの植物油が挙げられる。例えば、この注射剤は、通常本発明化合物を0.1 ~ 10重量%程度含有するように調製されることことができる。

局所的、例えば口腔、又は直腸的使用に適した製剤としては、例えば洗口剤、歯磨き剤、口腔噴霧剤、吸入剤、軟膏剤、歯科充填剤、歯科コーティング剤、歯科ペースト剤、坐剤等が挙げられる。洗口剤、その他歯科用剤としては、薬理的に許容される担体を用いて慣用の方法により調製される。口腔噴霧剤、吸入剤としては、本発明化合物自体又は薬理的に許容される不活性担体とともにエアゾール又はネブライザー用の溶液に溶解させるかあるいは、吸入用微粉末として歯などへ投与できる。軟膏剤は、通常使用される基剤、例えば、軟膏基剤（白色ワセリン、パラフィン、オリーブ油、マクロゴール400、マクロゴール軟膏など）等を添加し、慣用の方法により調製される。

【0094】

歯、皮膚への局所塗布用の薬品は、適切に殺菌した水または非水賦形剤の溶液または懸濁液に調剤することができる。添加剤としては、例えば亜硫酸水素ナトリウムまたはエドト酸二ナトリウムのような緩衝剤；酢酸または硝酸フェニル水銀、塩化ベンザルコニウムまたはクロロヘキシジンのような殺菌および抗真菌剤を含む防腐剤およびヒプロメルローズのような濃厚剤が挙げられる。

坐剤は、当該分野において周知の担体、好ましくは非刺激性の適当な補形剤、例えばポリエチレングリコール類、ラノリン、カカオ脂、脂肪酸トリグリセライド等の、好ましくは常温では固体であるが腸管の温度では液体で直腸内で融解し薬物を放出するものなどを使用して、慣用の方法により調製されるが、通常本発明化合物を0.1 ~ 95重量%程度含有するように調製される。使用する賦形剤および濃度によって薬品は、賦形剤に懸濁させるかまたは溶解させることができる。局部麻酔剤、防腐剤および緩衝剤のような補助薬は、賦

10

20

30

40

50

形剤に溶解可能である。経口的使用に適した製剤としては、例えば錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末剤、顆粒剤、トローチのような固形組成物や、液剤、シロップ剤、懸濁剤のような液状組成物等が挙げられる。製剤調製する際は、当該分野で知られた製剤補助剤などを用いる。錠剤及び丸剤はさらにエンテリックコーティングされて製造されることもできる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。

【0095】

さらに、本発明のDNAなどの核酸を上記したような治療及び/又は予防剤として用いる場合、該核酸はそれを単独で用いることもできるし、あるいは上記したような遺伝子組換え技術で使用される適当なベクター、例えばレトロウイルス由来ベクターなどウイルス由来のベクターなどに結合させるなどして用いることができる。本発明のDNAなどの核酸は通常の知られた方法で投与でき、そのまま、あるいは、例えば細胞内への摂取が促進されるように、適当な補助剤あるいは生理的に許容される担体などと共に、製剤化されて用いることができ、上記したような、医薬組成物又は医薬調製物などとして投与することができる。また遺伝子治療として知られた方法を適用することもできる。

本発明の活性成分は、その投与量を広範囲にわたって選択して投与できるが、その投与量及び投与回数などは、処置患者の性別、年齢、体重、一般的健康状態、食事、投与時間、投与方法、排泄速度、薬物の組み合わせ、患者のその時に治療を行なっている病状の程度に応じ、それらあるいはその他の要因を考慮して決められる。

【0096】

医薬品製造にあたっては、その添加剤等や調製法などは、例えば日本薬局方解説書編集委員会編、第十四改正 日本薬局方解説書、平成13年6月27日発行、株式会社廣川書店；一番ヶ瀬 尚 他編 医薬品の開発12巻（製剤素剤〔I〕）、平成2年10月15日発行、株式会社廣川書店；同、医薬品の開発12巻（製剤素材〔II〕）平成2年10月28日発行、株式会社廣川書店などの記載を参考にしてそれらのうちから必要に応じて適宜選択して適用することができる。

本発明の活性成分は、AGEの活性、特にAGEとRAGEとの間の相互作用を抑制あるいは阻害するといった生物学的活性をもつものであれば特に限定されないが、好ましくは有利な作用を持つものが挙げられる。本発明の活性成分は、例えば、(a)可溶性RAGE、その変異体ポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩等、(b)該可溶性RAGEをコードするDNA、可溶性RAGE変異体ポリペプチドをコードするDNAなどの核酸等、(c)本発明の抗体、その一部断片（モノクローナル抗体を包含する）またはその誘導體、(d)可溶性RAGEによるAGEとRAGEとの間の相互作用を抑制あるいは阻害するといった生物学的活性に有利な作用をもつ化合物またはその塩などが包含される。

【0097】

本発明の活性成分は、AGEとRAGEとの間の相互作用に起因する各種組織あるいは細胞における変化を抑制あるいは阻害するのに有用と期待される。また、該活性成分は、AGEの活性発現の抑制に有用であり、AGEとRAGEとの間の相互作用に起因する障害、異常及び/又は疾患の予防あるいは治療に有用である。また、AGEとRAGEとの間の相互作用が関与する腫瘍細胞などの移動、浸潤、遊走及び/又は転移の制御、例えば抑制に有用であると期待される。

可溶性RAGE及びその関連ペプチドは、悪性腫瘍、すなわち、がんの移動、浸潤及び/又は転移の阻止及び/又は抑制するのに有用で、血管形成・新生阻害剤、抗腫瘍剤及び/又はがん転移抑制剤として期待できる。また、血液系細胞の、AGEが関与した障害、異常及び/又は疾患の予防あるいは治療にも有用で、糖尿病合併症治療・予防剤、動脈硬化症治療・予防剤、血栓症治療・予防剤、消炎剤及び/又は免疫抑制剤としても期待できる。さらに、アルツハイマー治療剤、関節破壊治療剤などとしても期待できる。

【0098】

さらに、本発明では、(a)可溶性RAGEのアミノ酸配列中、第1番目のアミノ酸残基～第347番目のアミノ酸残基の範囲の配列：

10

20

30

40

50

(b) 可溶性RAGEのアミノ酸配列中、第1番目のアミノ酸残基～第117番目のアミノ酸残基の範囲の配列：及び

(c) 可溶性RAGEのアミノ酸配列中、第332番目のアミノ酸残基～第347番目のアミノ酸残基の範囲の配列

から成る群から選ばれたものに基づいて分子設計を施して、AGEとRAGEとの間の相互作用を抑制あるいは阻害する活性を有する物質を得るのに使用できる。こうして得られる物質も本発明の思想の範囲内のものであるし、本発明の活性成分として扱うことができる。該配列から特定の特徴部分を選択し、(i) そのうちの薬理作用団をイソスターで置き換えることによりなされるか、(ii) 構成アミノ酸残基の少なくとも1個をD体のアミノ酸残基に置き換えるか、(iii) アミノ酸残基の側鎖を修飾するか、(iv) 該配列に存在するアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基を配置して連結するか、(v) 立体構造を解析してmimic体をデザインすることなど、当該分野で採用される技術を駆使して行うことができる(例えば、首藤 紘一 編 医薬品の開発7巻(分子設計)、平成2年6月25日発行、株式会社廣川書店及びそこで引用している文献や論文など)。そうした技術の一部は、上記で説明したものを含んでいる。

明細書及び図面において、用語は、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるか、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。

後述の実施例2(g)に記載の抗可溶性RAGEモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ:269-9C2は、平成13年2月22日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(旧住所表記:茨城県つくば市東1丁目1番3号)(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository: IPOD)(旧名称:経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所(NIBH))に寄託されて保管されている(受託番号 FERM P-18218)。

【0099】

【実施例】

以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されず、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。

全ての実施例は、他に詳細に記載するもの以外は、標準的な技術を用いて実施したもの、又は実施することのできるものであり、これは当業者にとり周知で慣用的なものである。なお、以下の実施例において、特に指摘が無い場合には、具体的な操作並びに処理条件などは、DNAクローニングでは J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) 及び D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); 特にPCR法では、H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) 及び M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols", Academic Press, New York (1990)に記載の方法に準じて行っているし、また市販の試薬あるいはキットを用いている場合はそれらに添付の指示書(protocols)や添付の薬品等を使用している。

なお、試薬として、

Tween 20 : Bio-Rad

スキムミルク(skim milk):森永乳業

Trizma base : Sigma

エタノールアミン(ethanolamine): Sigma

を使用する他、その他の試薬は和光純薬から購入した。

【0100】

実施例1

〔細胞〕

初代培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞は、Cascade Biologics, Inc. (Portland,OR) より入手し、poly(A)⁺ RNA 精製には継代数 5-10 の細胞を使用した。

〔ポリソ - ム由来 poly(A)⁺ RNA の分離〕

組織培養用フラスコで培養したヒト皮膚微小血管内皮細胞を氷冷リン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、セルスクレイパーで細胞を掻きとった。細胞懸濁液を遠心して細胞を沈澱として回収し、0.25M KCl, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA, 0.25M sucrose (RNase free), 0.1mM DTT, 2mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride, 1,000u/ml RNase inhibitor (Ambion, Inc., Austin, TX) を含む10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.6)で懸濁後、ダウンス型ホモジナイザ - で破碎した。細胞核とミトコンドリアを除去するため細胞破碎液を12,000 x g、15分間遠心し上清を回収した。得られた上清を100,000 x g で 60 分間遠心し、ポリソ - ム画分を沈澱として回収した。得られたポリソ - ム画分より、Quickprep micro mRNA isolation kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて、poly(A)⁺ RNA を精製した。

10

【0101】

〔可溶型RAGE cDNA の分離〕

ヒト皮膚微小血管内皮細胞ポリソ - ム由来 poly(A)⁺ RNA を鋳型にoligo(dT) プライマーと AMV由来逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、RAGE遺伝子のエキソン1とエキソン11(図1参照)に対応するプライマー(配列表の配列番号: 3, 5'-GCCAGGACCCTGGAAGGAAGCA-3';

配列表の配列番号: 4, 5'-CTGATGGATGGGATCTGTCTGTG-3')とTaKaRa La Taq ポリメラーゼを用いてRAGE cDNA を増幅した。増幅されたRAGE cDNA はpCR2.1 (Invitrogen) に挿入して大腸菌XL1-Blueを形質転換した。得られた組換え大腸菌コロニー32クローンよりプラスミドDNA を精製し、ABI377シーケンサ - (Applied Biosystems Inc) を用いて塩基配列決定を行ない、可溶型RAGEをコードするcDNAを得た。

20

配列決定された可溶型RAGEをコードするcDNAの塩基配列及び該配列のオープン・リーディング・フレームでコードされるアミノ酸配列を、配列表の配列番号: 1に示す。また、配列表の配列番号: 2には可溶型RAGEのアミノ酸配列を示す。図2~4には、膜貫通型RAGE (fullRAGE)及び膜貫通ドメインを有するRAGE cDNA より人工的に作製された組換え可溶化型RAGEとよばれるもの(US5864018)と比較しての本発明の可溶型RAGEをコードする核酸(solubleRAGE)の塩基配列を示す。また、図5には、fullRAGE及びUS5864018と比較しての本発明の可溶型RAGE(solubleRAGE)のアミノ酸配列を示す。本発明の可溶型RAGE(solubleRAGE)は天然型(native)内在性(endogenous)であり、fullRAGEとはC末端部分の16個のアミノ酸(配列番号:2のうちの配列Glu³³²~Met³⁴⁷)が異なっている。

30

【0102】

〔可溶型RAGE発現ベクターの作製〕

可溶型RAGEをコードするcDNAを鋳型として、EcoRI 認識配列を有する5'-プライマー(配列表の配列番号: 5, 5'-GAGAATTCGCCAGGACCCTGGAAGGAAGCA-3')と XbaI 認識配列を有する3'-プライマー(配列表の配列番号: 6, 5'-GATCTAGAGATTGTTGACCATCCCCCAG-3')を用いて増幅した。増幅されたDNA を精製後、EcoRI とXbaIで消化し、動物細胞発現ベクターpC1-neo vector (Stratagen)の EcoRIとXbaIサイトに挿入した。発現ベクターDNA はQIAGEN社 (Valencia, CA) のプラスミド精製キットにて精製し、塩基配列はABI377シーケンサ - (Applied Biosystems Inc) を用いて確認した。

40

【0103】

〔COS 7 細胞への可溶型RAGE発現ベクターの導入とstable transformant の分離〕

可溶型RAGE発現ベクターは、Tfx-20 reagent (Promega Corp., Madison, WI) を用いてCOS 7 細胞へ導入した。発現ベクター導入48時間後に、細胞培養培地にG418(Geneticin) を添加し、2週間後に複数のG418耐性コロニーを得た。得られたコロニーは別々に培養し、細胞抽出物および培養培地を抗ヒトRAGE抗体を用いたウエスタンブロットで分析し、可溶型RAGEを高発現しているコロニーを選択した。

〔Transformantの培養〕

組織培養用150 mmディッシュを用い、可溶型RAGE過剰発現COS7細胞を5%牛胎児血清及び 5

50

00 µg/ml G418 含有ダルベッコ変法イーグル培地中で、37 °C、5%CO₂ の条件下コンフルエントまで培養後、細胞層をPBS (Ca²⁺/Mg²⁺-free)で2回洗浄し、培地を完全に取除いた。続いて無血清ダルベッコ変法イーグル培地中で48時間培養した。その後、培養培地を回収し、10,000 rpmで20分間遠心した上清を0.22 µm メンブレンフィルターで濾過し、得られた処理培地から以下の方法に従い可溶性RAGEを精製した。

【 0 1 0 4 】

〔可溶性RAGE蛋白の精製〕

処理培地 4L を20 mM Tris-HCl (pH7.4)で平衡化したHiTrap Heparin (カラム体積 3×5 ml、Amersham Pharmacia) に流速3 ml/minでアプライし、75 ml の0.15 M NaCl 含有20 mM Tris-HCl (pH7.4)を用いて流速2 ml/minでカラムを洗浄した。続いて段階的に75 ml の0.3 M, 0.5 M及び1 M NaCl含有20 mM Tris-HCl pH7.4でカラムに結合したheparin 結合性物質を流速2 ml/minで順次溶出させ、5 mlずつ分画した。溶出された可溶性RAGE画分はWestern blottingにより同定した。次いで50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5) で平衡化したRESOURCE S 1 ml カラム (Amersham Pharmacia) に50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5) で5倍に希釈した可溶性RAGE画分を流速1 ml/minでアプライし、3 mlの0.2 M NaCl含有50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液を用い、流速 1 ml/min でカラムを洗浄した。次に5 mlの50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液を用い、流速1 ml/minで0.2 M から1.0 M まで直線的なNaClによる濃度勾配をかけ、カラムに結合した陰イオン物質を順次溶出させ、0.5 mlずつ分画した。可溶性RAGE画分はWestern blottingにより決定した。得られた可溶性RAGE画分を2 mlずつPBS (Ca²⁺/Mg²⁺-free)で平衡化したHiTrap Desaltingカラム (カラム体積 2×5 ml、Amersham Pharmacia) にアプライし、PBS (Ca²⁺/Mg²⁺-free)を用いて流速0.5 ml/minでゲル濾過し、高分子量画分を回収した。その後、必要に応じCentricon YM-3(MILLIPORE) を用いた限外濾過により可溶性RAGE(sRAGE) 濃縮溶液を調製した。

精製sRAGE タンパクの純度は100 ngタンパク相当を10%SDS-PAGE により分離後、ゲルの銀染色により評価した。その結果を、図6に示す。図6中、1は細胞培養上清の銀染色像、そして2は精製蛋白の銀染色像を示す。

なお、上記のクロマトグラフは

【数1】

ÄKTA

システム (Amersham Pharmacia) を用い、溶出液は230 nm, 280 nmおよび300 nmにおける吸光度を測定してモニターした。

【 0 1 0 5 】

〔精製組換え可溶性RAGE蛋白とAGE との結合試験〕

可溶性RAGEのAGE 結合能を表面プラズモン共鳴法によりBIACORE(Biacore, Sweden)を用いて確認した。Sensor chip CM5 (Biacore) にアミノカップリング法を用いて精製可溶性RAGE蛋白を固定化した。グルコースとウシ血清アルブミン(BSA) を無菌的に37 °Cで12週間インキュベートして調製したAGE-BSA をBIACORE のマイクロ流路系にアナライトとして500 µg/mlの濃度で添加した。その結果、インラインレファランス (コントロールチップ) やイムノグロブリンを固定したチップには全く反応せず、可溶性RAGEを固定したセンサーチップとのみ特異的な結合を示した。

【 0 1 0 6 】

実施例2：モノクローナル抗体の作成

(a) 免疫源

免疫に用いる抗原は、組換え可溶性RAGEをはじめ、配列表の配列番号:2のアミノ酸配列を基にデザインされた合成ペプチドを使用することができる。さらに、免疫に用いる抗原は、得られたcDNAを動物細胞発現ベクターに連結し、これをCHO 細胞、COS 細胞などで発現させて得られる組換え可溶性RAGEを使用することも可能である。これらの抗原タンパク質は、イオン交換、ゲル濾過またはそれ以外の各種クロマトグラフィーによって精製できる。

。

10

20

30

40

50

精製した免疫用抗原を一般的な方法で免疫し、抗体産生細胞を誘導、細胞融合によりハイブリドーマとして抗体産生細胞を得ることができる。さらに精製した免疫用抗原に対する反応性に基づいてクローニング、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマとして株化できる。

また、可溶性RAGE特異的モノクローナル抗体を得るための免疫源としては、可溶性RAGEに特徴的なアミノ酸配列を持つハプテン化合物ペプチドが使用できる。例えば、C末端にはGlu-Gly-Phe-Asp-Lys-Val-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Ser-Pro-Gln-His-Met から選択された連続した少なくとも3個以上、好ましくは5個以上の連続したペプチド配列を含むことが特に好ましい。具体的にはCys-Glu-Gly-Phe-Asp-Lys-Val-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Ser-Pro-Gln-His-Met (CEGFDKVREAEDSPQHM) などが免疫源として好適である。

10

【0107】

(b) 抗原ポリペプチドの調製

配列番号:2に記載したヒト可溶性RAGEのアミノ酸配列中より特徴的な配列を選択し、合成する。ペプチドはペプチド合成機(ペプチドシンセサイザー9600、MilliGen/Biosearch)を使用して、Fmoc-bop法で合成する。ポリペプチドのN末端にはシステインを導入する。合成したペプチドは μ Bondasphere, C18カラム(Waters)を用いた高速液体クロマトグラフィーなどにより精製する。Cys-Glu-Gly-Phe-Asp-Lys-Val-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Ser-Pro-Gln-His-Met [配列番号:7]を合成し、以下の実験で使用した。

(c) ポリペプチドとBSAの複合体の調製

システイン残基を介してウシ血清アルブミン(BSA)と結合させ、抗原コンジュゲートとした。10.1mgのBSAを1mLの0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0に溶解したものと1.14mgのEMCS(N-(α -maleimidocaproyloxy)-succinimide)を24.9 μ Lのジメチルホルムアミドに溶解したものと混合し、30、30分間反応させ、ついで、上記の混合液を0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0で平衡化したSephadex G-25 (Pharmacia)ゲルカラム(直径13mm、長さ120mm)でゲルろ過する。前記(b)で合成したポリペプチドを0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0に溶解し、マレイミド結合BSAに対しおおよそ50倍モル量を混合する。すなわち、ポリペプチドに対しマレイミド結合BSAを混合し、4、20時間インキュベートし、BSA-ポリペプチド複合体を調製する。得られるBSA-ポリペプチド複合体を0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0で希釈した後、150 μ Lずつに分注して-30で凍結保存する。

20

【0108】

(d) 抗体産生細胞の調製

前記(c)で調製したBSA-ポリペプチド複合体を完全フロインドアジュバントと共に6週令Balb/c雌マウスに腹腔内投与し、初回免疫した。おおよそ18日目に0.1Mリン酸緩衝液、pH7.5に溶解したBSA-ポリペプチド複合体を初回免疫したマウスに腹腔内投与し、追加免疫する。さらにおおよそ52日目に0.1Mリン酸緩衝液、pH7.5に溶解したBSA-ポリペプチド複合体を静脈内投与し、最終免疫とする。その4日後に脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液を調製する。

30

(e) 細胞融合

細胞融合には、以下の材料および方法を用いる。RPMI-1640培地:RPMI-1640(Flow Lab.)に重炭酸ナトリウム(24mM)、ピルビン酸ナトリウム(1mM)、ペニシリンGカリウム(50U/ml)、硫酸アミカシン(100 μ g/ml)を加え、ドライアイスでpHを7.2にし、0.2 μ m東洋メンブレンフィルターで除菌ろ過する。NS-1培地:上記RPMI-1640培地に除菌ろ過したウシ胎児血清(FCS, M.A. Bioproducts)を15%(v/v)の濃度になるように加える。PEG-4000溶液:RPMI-1640培地にポリエチレングリコール-4000(PEG-4000, Merck & Co.)を50%(w/w)になるように加えた無血清培地を調製する。

40

8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞SP2(SP2/0-Ag14)との融合は、Selected Method in culture immunology p351~372(ed. B. B. Mishell and S. N. Shiigi), W. H. Freeman and Company (1980)に記載のOiらの方法を若干改変して行う。

【0109】

前記(d)で調製した有核脾細胞(生細胞率100%)とミエローマ細胞(生細胞率100%)

50

とをおおよそ5:1 ~ 10:1の比率で以下の手順で融合する。ポリペプチド免疫脾細胞懸濁液とミエローマ細胞をそれぞれRPMI1640培地で洗浄する。次に同じ培地に懸濁し、融合させるために有核脾細胞とミエローマ細胞を混合する。すなわち、おおよそ 4.0×10^8 個の有核脾細胞に対しおおよそ 8.0×10^7 個のミエローマ細胞を混合する。

次に、それぞれの細胞混合液を遠心分離により細胞を沈殿させ、上清を完全に吸引除去する。沈殿した細胞に37 に加温した50%PEG-4000 含有RPMI-1640 培地（ミエローマ細胞がおおよそ 3×10^7 個/mL となるよう体積を決定する）を滴下し、攪拌し、細胞を再懸濁、分散させる。次に添加した50%PEG-4000 含有RPMI-1640 培地の2 倍体積の37 に加温したRPMI-1640 培地を滴下する。さらに添加した50%PEG-4000 含有RPMI-1640 培地の7 倍体積のRPMI-1640 培地を常に攪拌しながら滴下し、細胞を分散させる。これを遠心分離し、上清を完全に吸引除去する。次に、ミエローマ細胞がおおよそ 3×10^6 個/mL となるように37 に加温したNS-1培地を沈殿した細胞に速やかに加え、大きい細胞塊を注意深くピペティングで分散する。さらに同培地を加えて希釈し、ポリスチレン製96穴マイクロウエルにウエル当りミエローマ細胞がおおよそ 6.0×10^5 個となるように接種する。それぞれの細胞を加えた上記マイクロウエルを7 %炭酸ガス/93 %空気中で温度37 、湿度100 %で培養する。

【0110】

(f) 選択培地によるハイブリドーマの選択的増殖

(1)使用した培地は以下の通りである。

HAT 培地：前記(e) 項で述べたNS-1培地に更にヒポキサンチン（100 μ M）、アミノプテリン（0.4 μ M）およびチミジン（16 μ M）を加える。

HT培地：アミノプテリンを除去した以外は上記HAT 培地と同一組成のものである。

(2)前記(e) 項の培養開始後翌日（1 日目）、細胞にパスツールピペットでHAT 培地2 滴（約0.1 ml）を加える。2、3、5、8 日目に培地の半分（約0.1 ml）を新しいHAT 培地で置き換え、10日目に培地の半分以上を新しいHT培地で置き換える。ハイブリドーマの生育が肉眼にて認められた全ウエルについて固相-抗体結合テスト法（ELISA）により陽性ウエルを調べる。まず、20mM炭酸緩衝液（pH9.6）で希釈した抗原ポリペプチドでポリスチレン製96穴プレートをコート（100ng/ウエル）し、次に0.05% Tween20含有PBS を用いて洗浄して未吸着のペプチドを除く。各ウエルにハイブリドーマの生育が確認されたウエルの培養上清0.1 mlを添加し、室温で約1 時間静置する。洗浄後、2 次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン（Cappel）を加え、さらに室温で約1 時間静置する。洗浄後、基質である過酸化水素と3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）を加え発色させる。各ウエルに2N硫酸を加え発色反応を停止し、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機（MRP-A4、東ソー）を用いて450nm の吸光度で測定する。

【0111】

(g) ハイブリドーマのクローニング

上記(f) 項で得られた抗原ペプチドに対する陽性ウエル中のハイブリドーマを、限界希釈法を用いてモノクローン化する。すなわち、NS-1培地1 ml当りフィーダーとしておおよそ 10^7 個のマウス胸腺細胞を含むクローニング培地を調製し、96穴マイクロウエルにハイブリドーマをウエル当り5 個、1 個、0.5 個になるように希釈し、それぞれ36穴、36穴、24穴に加える。5 日目、12日目に全ウエルに約0.1 mlのNS-1培地を追加する。クローニング開始後肉眼的に十分なハイブリドーマの生育を認めたもの、コロニー形成陰性ウエルが50%以上である群について（f）項に記載したELISA を行う。調べた全ウエルが陽性でない場合、抗体陽性ウエル中のコロニー数が1 個のウエルを4 ~ 6 個選択し、再クローニングを行う。最終的にそれぞれのポリペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。モノクローナル抗体 4 種類を得た。

(h) モノクローナル抗体のクラス、サブクラスの決定

前述したELISA に従い、それぞれのポリペプチドをコートしたポリスチレン製96穴プレートに、前記(g) 項で得られたハイブリドーマの上清を加える。次にPBS で洗浄後、アイソタイプ特異的ウサギ抗マウスIgG 抗体（Zymed Lab.）を加える。PBS により洗浄後、西洋

わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG (H +L)を加え、基質として過酸化水素および2,2'-アジノ-ジ(3-エチルベンゾチアゾリン酸)を用いてクラス、サブクラスを決定する。

【0112】

【表1】

抗ヒト可溶性RAGE C末端ペプチドモノクローナル抗体

クローンNo.	サブクラス
269-1D10	$\gamma 1/\kappa$
269-4C9	μ /κ
269-6B12	μ /κ
269-9C2	$\gamma 1/\kappa$

10

【0113】

(i) ハイブリドーマの培養とモノクローナル抗体の精製

得られたハイブリドーマ細胞をNS-1培地で培養し、その上清からモノクローナル抗体を得ることができる。また、得られたハイブリドーマ 10^7 個を予め1週間前にプリスタン腹腔内投与したマウス(Balb/c系、雌、6週齢)に同じく腹腔内投与し、1~2週間後、腹水中からも4~7mg/mlのモノクローナル抗体を含む腹水を得ることができる。得られた腹水を40%飽和硫酸アンモニウムで塩析後、IgGクラスの抗体をプロテインAアフィゲル(Bio-Rad)に吸着させ、0.1Mクエン酸緩衝液、pH5.0で溶出することにより精製する。

20

【0114】

実施例3：ウエスタンブロッティング

ヒト可溶性RAGEを発現するCOS7細胞の培養上清9 μ l、精製組換えヒト全長型成熟RAGE(膜型RAGE)750 ngおよびヒト肺抽出蛋白150 ngを還元条件下、10% SDS-PAGEで分離後、polyvinylidene difluoride (PVDF)膜(MILLIPORE)に転写した。続いて1% BSA, 5% スキムミルクおよび0.1% Tween 20 含有PBS(ブロッキングバッファー)を用いて室温で1時間ブロッキングした後、ヒト可溶性RAGE特異抗体を発現するハイブリドーマ細胞株269-1D10, 269-4C9, 269-6B12 あるいは269-9C2 の培養上清中、25 で1時間インキュベートした。それぞれの膜を0.1% Tween 20 含有PBS(0.1%PBS-T)で4回洗浄し、結合した抗体をブロッキングバッファーで1:1,000に希釈したHRP結合ヒツジ抗マウスIgG抗体(Amersham Pharmacia)と25、1時間反応させた。反応後、膜を0.1% PBS-Tで4回洗浄し、結合した抗体をEnhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia)により検出した。また陽性コントロールは、ヒト可溶性RAGE蛋白発現COS7細胞培養上清、ヒト組換え全長型成熟RAGE蛋白およびヒト肺抽出蛋白をそれぞれ3 μ l、250ng および50ng用い、ブロッキングバッファーで1:500に希釈したウサギ抗ヒトRAGE抗血清およびブロッキングバッファーで1:2,000に希釈したHRP結合ヤギ抗ウサギIgG(H+L)抗体(Zymed)により同様に処理し、ECLで検出した。結果を図7に示す。

30

M：分子量マーカー

40

1, 4, 7, 10, 16:組換え膜型RAGE

2, 5, 8, 11, 17:組換え可溶性RAGE

3, 6, 9, 12, 18:ヒト肺抽出物(膜型RAGEを多く含む)

結果

各モノクローナル抗体は組換え膜型RAGEおよびヒト肺抽出物中膜型RAGEとは交差反応せず、可溶性RAGEと反応した。

【0115】

実施例4：サンドイッチEIA

下記の方法に従えば、実施例2で調製した抗可溶性RAGE抗体から少なくとも1種を選択し、抗RAGE抗体の2種の適当な組み合わせによってヒト可溶性RAGEを特異的に検出・測定す

50

るサンドイッチEIA系が構成できる。EIA系は1ステップ法、2ステップ法のいずれも可能であり、標識抗体はFab'-HRPに限定されない。各反応緩衝液の組成や反応条件は測定目的に応じて、短縮、延長など調整できる。また、標準品となるヒト可溶性RAGEは、組織培養上清、細胞培養上清または実施例2記載あるいはそれ以外の方法で発現した組換え体から精製することができる。精製にはイオン交換、ゲルろ過、抗ヒト可溶性RAGEモノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーまたはそれ以外の各種アフィニティークロマトグラフィーの組み合わせによって達成される。

(a) 標識抗体の調製

抗ヒト可溶性RAGEモノクローナル抗体を0.1M NaClを含む0.1M酢酸緩衝液、pH4.2に抗体量の2%(W/W)のペプシンを加え、37℃、24時間消化する。消化物に3M Tris-HCl、pH7.5を添加し、反応を停止する。0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0で平衡化したウルトロゲルAcA54カラムによるゲルろ過でF(ab')₂画分を分取する。このF(ab')₂画分に最終濃度0.01Mとなるようにシステアミン塩酸塩を添加し、37℃、1.5時間還元し、5mM EDTA含有0.1Mリン酸緩衝液、pH6.0で平衡化したウルトロゲルAcA54カラムによるゲルろ過でFab'画分を分取する。

上記の操作とは別にHRPを0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0に溶解、HRPの25倍モル量のEMCSをDMF溶液として加え、30℃、30分間反応させる。これを0.1Mリン酸緩衝液、pH6.0で平衡化したNICK-5カラム(Pharmacia)でゲルろ過しマレイミド標識HRP画分を分取する。

Fab'画分とマレイミド標識HRPを等モルとなるように両画分を混合し4℃、20時間反応させた後、Fab'の10倍モル量のN-エチルマレイミドで未反応のチオール基をブロックする。これを0.1Mリン酸緩衝液、pH6.5で平衡化したウルトロゲルAcA54カラムでゲルろ過し、Fab'-HRP標識抗体を分取する。これに0.1% BSAおよび0.001%クロルヘキシジンを添加して4℃で保存する。

【0116】

(b) モノクローナル抗体結合担体の調製

抗ヒト可溶性RAGEモノクローナル抗体を0.1Mリン酸緩衝液、pH7.5に溶解し、50μg/mLの濃度に調製する。このモノクローナル抗体溶液を96穴マイクロプレートにウエルあたり100μLずつ加え、4℃、18時間静置する。モノクローナル抗体溶液を除去し、生理食塩液で1回、0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0で3回洗浄後、1% BSA、0.1M NaCl、5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0を加えブロッキングする。

(c) 1ステップサンドイッチEIA法

精製したヒト可溶性RAGE画分を標準抗原としてヒト可溶性RAGE定量用標準曲線を作成する。1% BSA、0.05% Brij35、0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0で段階希釈した標準ヒト可溶性RAGEを60μLずつ分注、それぞれに1% BSA、0.05% Brij35、0.05% Tween 20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0で100ng/50μLに調製した標識抗体Fab'-HRPを60μLずつ添加し十分混和する。調製した抗体結合マイクロプレートを0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0で3回洗浄し、標準抗原と標識抗体混合液を100μL/ウエルずつ添加する。室温で1時間反応した後0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0で3回洗浄する。次に、6%ジメチルホルムアミド、0.005%過酸化水素含有0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)に溶解した0.01% 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンをウエルあたり100μL添加し、室温で20分間反応後、2N硫酸を100μL添加し反応を停止する。この反応混液の450nmをマイクロプレートリーダーを用いて測定し、標準曲線を求める。

測定検体は、ヒト血清、脊髄液、血漿、関節液、尿および唾液などヒトに由来する体液成分、各種ヒト組織の抽出液、ヒト由来あるいは組換え体など各種培養細胞の細胞抽出液、培養上清などから調製される。それぞれの測定検体は、標準ヒト可溶性RAGEにかえて上記の1ステップサンドイッチEIAに供し、標準ヒト可溶性RAGEと同時に反応を進行させる。測定検体から得られた吸光度を標準曲線にあてはめ、測定検体に含まれるヒト可溶性RAGEの量を算出する。

【 0 1 1 7 】

実施例 5 : ヒト可溶性RAGEモノクローナル抗体の検定

ウエスタン ブロットイング (Western blotting)

ヒト成熟型RAGEタンパク過剰発現GEN-T 細胞抽出物 (750 ngタンパク相当)、ヒト可溶性RAGEタンパク過剰発現COS 7 細胞の培養上清 3 μ l、ヒト肺抽出物 (150 ngタンパク相当) およびRainbow Marker (ミオシン(myosin), フォスホリラーゼ b (phosphorylase b), ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin), 卵白アルブミン(ovalbumin), カルボニック アンヒドラーゼ(carbonic anhydrase), トリプシン インヒビター(trypsin inhibitor), リゾチーム(lysozyme) 各 3 μ g) (Amersham Pharmacia) を還元条件下、10% SDS-PAGEにより分離後、Immobilon transmembrane (MILLIPORE) に転写し、膜をPBS/0.1% Tween 20/5% スキムミルク(skim milk) 溶液中、室温で1時間緩やかに振とうした。次に膜をクローン番号(clone No.) 269-1D10, -4C9, -6B12 および-9C2の培養上清中、室温で1時間反応後、0.1% Tween 20/PBS 溶液で15分間、4回洗浄した。続いてPBS/0.1% Tween 20/5% スキムミルク(skim milk) 溶液で1,000倍に希釈した抗マウスIg (Anti-mouse Ig), horseradish peroxidase linked whole antibody (from sheep) (Amersham Pharmacia)中、室温で1時間反応させ、PBS/0.1% Tween 20 溶液で15分間、4回洗浄した。その後、膜をECL Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia)で処理し、シグナルをX線フィルムで検出した。結果を図8に示す。図8中、M:分子量マーカー(各3 μ g)、R:ヒト成熟型RAGE-Hisタグタンパク、CM: COS 7細胞過剰発現ヒト可溶性RAGEタンパク、及びL:ヒト肺抽出物を示す。いずれのモノクローナル抗体もヒト成熟型RAGEおよびヒト肺抽出物と反応せず、ヒト可溶性RAGEのみと反応した。

10

20

【 0 1 1 8 】

実施例 6 : 免疫沈降

1 mlのProtein G Sepharose (Amersham Pharmacia)を 200 \times g で1分間遠心し、上清を取り除いた後にTSAを加え同様の操作で3回樹脂を洗浄した。次に10,000回転で20分間遠心したヒト可溶性RAGE過剰発現COS 7細胞の培養上清600 μ lを加え室温で2時間穏やかに攪拌、200 \times g で1分間遠心した上清を以下に用いた。上記同様TSAで洗浄した樹脂50 μ lに100 μ lのPBSに溶解した可溶性RAGEモノクローナル抗体269-1D10, 269-9C2あるいは正常マウスイムノグロブリンをそれぞれ50 μ gずつ加え、ときどき攪拌しながら4で2時間放置した。次に200 \times g で1分間遠心し、上清を捨てた後に上記培養上清を150 μ lずつ分注し、ときどき攪拌しながら4で2時間放置した。その後200 \times g で1分間遠心し、上清を捨てたのち、500 μ lのTSAを加え同様の操作で3回樹脂を洗浄した。最後に500 μ lのTris-HCl pH 6.8を加えて樹脂を洗浄した後、200 \times g で1分間遠心上清を捨てた。これにサンプルバッファー(sample buffer; 0.05 M Tris-HCl, pH 6.8/ 2% SDS/0.6% 2-メルカプトエタノール(2-mercaptoethanol)/10% グリセロール(glycerol)/0.05% ブロモフェノールブルー(bromophenol blue)) 50 μ lを加え、100で3分間加熱し、200 \times g で1分間遠心した上清のうち20 μ lを10% SDS-PAGEにより分離した。分離後、Immobilon transmembrane (MILLIPORE) に転写し、膜をPBS/0.1% Tween 20/5% スキムミルク(skim milk) 溶液中、室温で1時間緩やかに振とうした。次に膜を5 μ g/mlウサギ抗ヒト可溶性RAGEポリクローナル抗体/PBS/0.1% Tween 20/5% スキムミルク(skim milk) 溶液中室温で1時間反応後、0.1% Tween 20/PBS 溶液で15分間、4回洗浄した。続いてPBS/0.1% Tween 20/5% スキムミルク(skim milk) 溶液で1,000倍に希釈した抗マウスIg (Anti-mouse Ig), horseradish peroxidase linked whole antibody (from sheep) (Amersham Pharmacia)中、室温で1時間反応させ、PBS/0.1% Tween 20 溶液で15分間、4回洗浄した。その後、膜をECL Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia)で処理し、シグナルをX線フィルムで検出した。結果を図9に示す。図9中、1:モノクローナル抗体269-1D10、2:モノクローナル抗体269-9C2及び3:正常マウスイムノグロブリンを示す。抗可溶性RAGEモノクローナル抗体結合アフィニティーカラムはヒト可溶性RAGEをトラップした。なお、対照に用いたマウス正常イムノグロブリン結合アフィニティーカラムにおいてはヒト可溶性RAGEをトラップすることは出来なかった。

30

40

50

【 0 1 1 9 】

実施例 7 : ヒト可溶性RAGEイムノアフィニティーカラムの作製

ディスポーザブル(disposable) PD-10カラム (Amersham Pharmacia) を用いてヒト可溶性RAGEモノクローナル抗体269-1D10の溶媒をカップリングバッファー(coupling buffer; 0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3) に交換した。氷冷した1 mM塩酸6 mlで洗浄したHiTrap NHS-activated 1ml (Amersham Pharmacia) に上記ヒト可溶性RAGEモノクローナル抗体溶液1 mlを注入し、室温で30分間反応させた。その後3 mlのcoupling buffer をカラムに注入し、溶出液に1 mlの2M Glycine-HCl, pH2.0 を加え、A₂₈₀を測定しカップリング効率を算出した。カラムは6 mlのBuffer A (0.5 M ethanolamine, 0.5 M NaCl, pH8.3)、6 mlのBuffer B (0.1 M acetate, 0.5 M NaCl, pH 4.0)で順次洗浄した後、6 mlのBuffer Aを注入し、室温で30分間放置した。再び6 mlのBuffer B、6 mlのBuffer Aで順次カラムを洗浄し、最後に6 mlのBuffer Aで洗浄した。カラムは2 mlの保存溶液(0.05 M Na₂HPO₄, 0.1% NaN₃, pH7.0)を注入後4 で保存した。上記操作はすべて流速 200 µl/minで行った。

10

【 0 1 2 0 】

実施例 8 : ヒト血清からの可溶性RAGEタンパクの分離

上記の方法に従って作製した可溶性RAGEイムノアフィニティーカラムをSMART systemに取り付け、5 mlのスタートバッファー(start buffer: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH8.0)、5 mlの溶出バッファー(elution buffer: 100 mM グリシン(glycine)-HCl, 150 mM NaCl, pH2.5)で順次洗浄後、10 ml のスタートバッファー(start buffer)でカラムを平衡化した。次にMILLEX-GV 0.22 µm Filter Unit (MILLIPORE) で濾過したヒト血清 2 ml にスタートバッファー(start buffer) 8 ml を加え、流速 100 µl/min でカラムに供し、10 ml のスタートバッファー(start buffer)で洗浄した。続いて溶出液を 230 nm, 280 nm および 300 nm の紫外吸収によりモニターしながら 3 ml の溶出バッファー(elution buffer)で結合物を溶出させ 100 µl ずつ分画した。得られたピーク画分に 0.9倍量のトリクロロ酢酸を加えて氷中で30分間放置後、15,000 rpmで20分間遠心、その後上清を捨てエタノール 750 µl を加えて再び15,000 rpmで5 分間遠心した後、上清を捨て風乾した。得られた沈殿物を還元条件下、10% SDS-PAGEにより展開後、Immobilon transmembrane (MILLIPORE) に転写し、膜をPBS/0.1% Tween20/5% スキムミルク(skim milk) 溶液中、室温で1時間緩やかに振とうした。次に膜を 5 µg/mlウサギ抗ヒト可溶性RAGEポリクローナル抗体/PBS/0.1% Tween 20/5% スキムミルク(skim milk) 溶液中、室温で1時間反応後、PBS/0.1% Tween 20 溶液で15分間、4回洗浄した。続いて膜を 1.5 µg/ml anti-ウサギ IgG(H+L) HRP コンジュゲート (Zymed)/PBS/0.1% Tween20/5% スキムミルク(skim milk) 溶液により室温で1時間反応し、PBS/0.1% Tween 20 溶液で15分間、4回洗浄した。その後 ECL Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia) で膜を処理し、シグナルをX線フィルムで検出した。結果を図10に示す。

20

30

抗可溶性RAGEモノクローナル抗体結合アフィニティーカラムでヒト血清中の可溶性RAGEをトラップし、そのトラップされたタンパクがヒトRAGEであることをウエスタン ブロット(western blot)により確認した。このことより、ヒト血清中にRAGEタンパクの C末端が欠如した可溶性RAGEが存在することを確認した。

【 0 1 2 1 】

実施例 9 : 可溶性RAGEのAGE 中和作用の検討

(AGE 誘導性VEGF発現亢進への可溶性RAGEの影響)

実験には 25 cm² フラスコでサブコンフルエント(subconfluent)まで培養した初代培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (Cascade Biologics, Inc., Portland, OR、クラボウ、大阪より購入) を用いた。細胞は新しい5% ウシ胎児血清(fetal bovine serum), 5 ng/ml 塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor), 10 µg/mlヘパリン(heparin) 含有 Hu-Media MV2 培地(assay medium)で洗浄後、(1) 未添加、(2) 10 µg/ml AGE2-BSA 添加、(3) 10 µg/ml AGE2-BSA および25 µg/ml精製可溶性RAGE添加、のassay mediumに置換し、37、4時間保温した。処理後、細胞より poly(A)⁺ RNA をQuickprep micro mRNA isolation kit (Amersham Pharmacia Biotech) により分離し、SuperScript On

40

50

e-Step RT-PCR キット (GIBCO BRL) を用いて、VEGF mRNA の検出を行った。VEGF mRNA 増幅に用いた poly(A)⁺ RNA 量は 30 ng、PCR サイクル数は 30 サイクルである。内部コントロールとして、 β -アクチンを用いた (30ng、20 サイクル)。RT-PCR 産物を、3% アガロースゲル電気泳動にて分離後、ナイロン膜へアルカリトランスファーし、³²P-標識した VEGF 特異的オリゴヌクレオチドプローブでハイブリダイゼーションを行った。VEGF mRNA 増幅用プライマーおよびプローブは Nomura et al., J. Biol. Chem. 1995 と同一である。結果を図 11 に示す。初代培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞における VEGF mRNA 発現レベルは AGE 添加により約 2 倍亢進するが、AGE と可溶性 RAGE が共存すると、可溶性 RAGE がドミナントネガティブに作用し、AGE による VEGF mRNA レベルの亢進が防止された。

【 0 1 2 2 】

実施例 10：ヒト可溶性 RAGE を特異的に測定するサンドイッチアッセイ
(測定系 A)

(a) モノクローナル抗体結合担体の調製

抗ヒト可溶性 RAGE モノクローナル抗体 278-13F11 を 0.1M リン酸緩衝液、pH7.5 に溶解し、25 μ g/mL の濃度に調製した。このモノクローナル抗体溶液を 96 穴マイクロプレートにウェルあたり 100 μ L ずつ加え、4、16~24 時間静置した。モノクローナル抗体溶液を除去し、精製水で 1 回洗浄後、1% BSA、0.15M NaCl、0.001% クロロヘキシジン含有 10mM リン酸緩衝液、pH7.0 を 300 μ L ずつ加え 4、24 時間以上静置しブロッキングした。

(b) ポリクローナル抗体の調製

合成ペプチド [配列番号：7] を MBS 法により KLH にコンジュゲートし、ウサギに免疫し抗血清を得た。同合成ペプチドをカップリングしたアフィニティークラムで抗血清を精製した。

【 0 1 2 3 】

(c) ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ EIA 法

精製したヒト可溶性 RAGE 画分を標準抗原として標準曲線を作製した (図 12)。調製したモノクローナル抗体結合担体を 300 μ L の 30mM NaCl、0.01% Tween 20 含有 5mM リン酸緩衝液、pH7.0 (洗浄液 A) で 1 回洗浄した。1% BSA、0.1M NaCl、15% ブロックエース (大日本製薬)、35 μ g/mL HAMA 試薬含有 10mM リン酸緩衝液、pH7.0 (緩衝液 A) で 1.7 μ g/mL に調製したウサギ抗ヒト可溶性 RAGE C 末端ペプチドポリクローナル抗体を 160 μ L ずつ抗体結合プレートに加えた。さらに、調製した標準液または測定検体を 40 μ L ずつ加え、マイクロプレートミキサーで十分に混合後、反応液の蒸発を防ぐためにシールを貼り 4、16~24 時間静置した。洗浄液 A でウェルあたり 300 μ L で 4 回洗浄し、緩衝液 A で 5000 倍希釈した抗ウサギ IgG ペルオキシダーゼ標識抗体 (Amersham Pharmacia) を 100 μ L 加え、25、2 時間静置した。洗浄液 A でウェルあたり 300 μ L で 4 回洗浄し、0.1mg/mL 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、0.0075% 過酸化水素、1% DMF 含有 0.1M クエン酸緩衝液、pH4.0 を 100 μ L ずつ加え、25、30 分間静置した。2N 硫酸を 100 μ L ずつ添加し反応を停止し、この反応混液を波長 450nm で測定し、標準曲線より検体の測定値を求めた。

【 0 1 2 4 】

実施例 11：ヒト可溶性 RAGE を特異的に測定するサンドイッチアッセイ
(測定系 B)

(a) モノクローナル抗体結合担体の調製

抗ヒト可溶性 RAGE C 末端ペプチドモノクローナル抗体 269-1D10 を 0.1M リン酸緩衝液、pH7.5 に溶解し、25 μ g/mL の濃度に調製した。このモノクローナル抗体溶液を 96 穴マイクロプレートにウェルあたり 100 μ L ずつ加え、4、16~24 時間静置する。モノクローナル抗体溶液を除去し、精製水で 1 回洗浄後、1% BSA、0.15M NaCl、0.001% クロロヘキシジン含有 10mM リン酸緩衝液、pH7.0 を 300 μ L ずつ加え 4、24 時間以上静置しブロッキングした。

(b) モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ EIA 法

精製したヒト可溶性 RAGE 画分を標準抗原として標準曲線を作製した (図 13)。調製したモ

10

20

30

40

50

ノクローナル抗体結合担体を 300 μ L の洗浄液A で 1 回洗浄した。緩衝液A で 1 μ g/mL に調製した酵素標識抗体液 (278-3A6、IgG-HRP) を 160 μ L ずつ抗体結合プレートに加えた。さらに、調製した標準液または測定検体を 40 μ L ずつ加え、マイクロプレートミキサーで十分に混合後、反応液の蒸発を防ぐためにシールを貼り 4、16~24 時間静置した。洗浄液A でウェルあたり 300 μ L で 4 回洗浄し、0.1mg/mL 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、0.0075% 過酸化水素、1% DMF 含有 0.1M クエン酸緩衝液、pH4.0 を 100 μ L ずつ加え、25、30 分間静置する。2N 硫酸を 100 μ L ずつ添加し反応を停止し、この反応混液を波長 450nm で測定し、標準曲線より検体の測定値を求めた。

【0125】

実施例 12：ヒト可溶型及び膜型 RAGE を特異的に測定する サンドイッチアッセイ (測定系 C)

10

(a) モノクローナル抗体結合担体の調製

抗ヒト可溶型 RAGE モノクローナル抗体 278-13F11 を 0.1M リン酸緩衝液、pH7.5 に溶解し、25 μ g/mL の濃度に調製した。このモノクローナル抗体溶液を 96 穴マイクロプレートにウェルあたり 100 μ L ずつ加え、4、16~24 時間静置する。モノクローナル抗体溶液を除去し、精製水で 1 回洗浄後、1% BSA、0.15M NaCl、0.001% クロロヘキシジン含有 10mM リン酸緩衝液、pH7.0 を 300 μ L ずつ加え 4、24 時間以上静置しブロッキングした。

(b) モノクローナル抗体を用いた サンドイッチ EIA 法

精製したヒト可溶型 RAGE 画分を標準抗原として標準曲線を作製した (図 14)。調製したモノクローナル抗体結合担体を 300 μ L の洗浄液A で 1 回洗浄した。緩衝液A で 1 μ g/mL に調製した酵素標識抗体液 (278-3A6、IgG-HRP) を 100 μ L ずつ抗体結合プレートに加えた。さらに、調製した標準液または測定検体を 20 μ L ずつ加え、マイクロプレートミキサーで十分に混合後、25、1~2 時間静置した。洗浄液A でウェルあたり 300 μ L で 4 回洗浄し、0.1mg/mL 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、0.0075% 過酸化水素、1% DMF 含有 0.1M クエン酸緩衝液、pH4.0 を 100 μ L ずつ加え、25、30 分間静置した。2N 硫酸を 100 μ L ずつ添加し反応を停止し、この反応混液を波長 450nm で測定し、標準曲線より検体の測定値を求めた。

20

【0126】

〔各測定系の特異性〕

測定系 A、B、C いずれもヒト可溶型 RAGE を標準物質として 0.1 ~ 6.4ng/mL の範囲で良好な標準曲線を描くことができた。

30

膜型 RAGE 過剰発現 COS-7 細胞をコンフルエントまで培養後、培地を抜き取り、PBS で細胞層を洗浄した。その後、1% n-Octylglucoside、0.1 M NaCl、1 mM PMSF 含有 20 mM Tris-HCl、pH 7.4 で細胞を lysis し、遠心した上清について、可溶型 RAGE を標準物質として A、B、C それぞれの測定系で測定した。測定系 C での測定値は 48ng/mL であったが、測定系 A および B ではそれぞれ 0ng/mL、2.7ng/mL であった (図 15)。これらのことから、測定系 C は可溶型および膜型両方の RAGE を認識し、測定系 A および B は可溶型 RAGE のみ認識することが確認された。

【0127】

〔測定系 A を用いたヒト血中可溶型 RAGE の測定〕

40

糖尿病罹病期間 7.8 ~ 17.3 年 (平均 12.5 \pm 2.6 年)、インスリン皮下自己注射療法のみで治療を受けている I 型糖尿病患者血清及び血漿について、ヒト可溶型 RAGE を特異的に測定する測定系 A で測定した。

網膜症の進展程度は眼底所見をもとに、正常、単純網膜症に分類した。腎症については糖尿病腎症病期分類厚生省改定案に準じ、随時尿による尿中アルブミン・クレアチニン比 30 mg/g 未満を腎症前期、30 ~ 299 mg/g を早期腎症と判定した。なお、病期が前増殖性網膜症、増殖性網膜症および顕性腎症以上の患者試料と血清クレアチニン値 2mg/dL 以上の腎不全期の患者試料は除外した。網膜症、腎症ともに発症していない患者群 (合併症未発症群) と腎症を発症していない単純網膜症患者群 (単純網膜症患者群) および網膜症を発症していない早期腎症患者群 (早期腎症患者群) 間で測定系 A を利用して血中可溶型 RAGE 量を測

50

定し、統計的に解析した。

その結果、合併症未発症群（糖尿病罹病期間 12.1 ± 2.3 年）の可溶型RAGE量は単純網膜症患者群（糖尿病罹病期間 13.1 ± 2.6 年）、早期腎症発症患者群（糖尿病罹病期間 11.7 ± 2.5 年）と比較してそれぞれ有意($p < 0.005$, $p < 0.05$)に高値を示した（図16）。

糖尿病合併症発症には個人差があり、とくに腎症では約30%が罹患感受性を示すことが知られている。今回の検討では、合併症未発症群の血中可溶型RAGE量が単純網膜症患者群、早期腎症患者群と比較して有意に高い値を示した。このことから糖尿病合併症発症時期における個体間の可溶型RAGE発現量の遺伝的差異が糖尿病合併症罹患感受性/抵抗性の決定因子の一つであると推察され、可溶型RAGEが糖尿病合併症の発生に対して保護的に機能している可能性が考えられた。すなわち、可溶型RAGEを定量することによる、糖尿病合併症罹患感受性、抵抗性の予測可能性が示唆された。

10

【0128】

【発明の効果】

天然型の可溶型RAGEを測定することが可能であり、AGEとRAGEの間の相互作用に起因する疾患の診断、糖尿病合併症の原因究明、診断・リスク予知などに有用である。ヒト可溶型RAGE蛋白に対するモノクローナル抗体を始めとした抗体などの活性物質を作製し、これを用いた当該タンパクの測定系を開発することが可能で、糖尿病合併症発症・進展のリスク予知などに役立つ。また、可溶型RAGEの産生を制御する化合物の開発も可能となるし、がんの転移、浸潤の診断などにも有用である。

本発明の可溶型RAGEは、生体内に存在する天然型ペプチド（内在性ペプチドあるいは内因性ペプチド）で、C末端部分の16個のアミノ酸残基においてRAGE蛋白質と異なっているものである。本発明の可溶型RAGEは、内在性に産生される天然のフォームなので、生理的なものであり、抗体ができる恐れが少なく、さらに経口可能な可溶型RAGE産生制御化合物及び薬剤などを開発して、そうした医薬により本発明の可溶型RAGEの発現を誘導できるようになれば、苦痛を与えることなしに、糖尿病患者を合併症から守ることなどができる。本発明により、内因性可溶型RAGEポリペプチド若しくはその塩、さらにはそれを基礎とした変異体、修飾体、誘導體などをデザインして得ることが可能となり、またそれらをコードする核酸、該核酸を有するベクター、該ベクターで形質転換された宿主細胞が提供でき、内因性可溶型RAGEに関連した疾患、例えば糖尿病合併症、老化に付随した各種疾患、アルツハイマー病、動脈硬化症、生体内タンパク質のグリケーション化に起因した疾患あるいは病気の発症及び/又は進展、及び腫瘍の浸潤又は拡散などの病的な状態あるいは症状の研究に役立つし、医薬品、診断薬、さらには遺伝子診断や遺伝子治療の途を開くと期待できる。

20

30

本発明は、前述の説明及び実施例に特に記載した以外も、実行できることは明らかである。上述の教示に鑑みて、本発明の多くの改変及び変形が可能であり、従ってそれらも本件添付の請求の範囲の範囲内のものである。

【0129】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Daiichi Fine Chemical Co., Ltd.

<120> Assay for soluble RAGE

<130> P-02NF375

10

<140>

<141>

<150> JP 2001-78409

<151> 2001-03-19

20

<150> JP 2001-243114

<151> 2001-08-10

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

30

<210> 1

<211> 1223

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

40

<222> (25)..(1068)

gga aag gag acc aag tcc aac tac cga gtc cgt gtc tac cag att cct	387	
Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro		
110 115 120		
ggg aag cca gaa att gta gat tct gcc tct gaa ctc acg gct ggt gtt	435	
Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val		10
125 130 135		
ccc aat aag gtg ggg aca tgt gtg tca gag gga agc tac cct gca ggg	483	
Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly		
140 145 150		
act ctt agc tgg cac ttg gat ggg aag ccc ctg gtg cct aat gag aag	531	20
Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys		
155 160 165		
gga gta tct gtg aag gaa cag acc agg aga cac cct gag aca ggg ctc	579	
Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu		
170 175 180 185		30
ttc aca ctg cag tcg gag cta atg gtg acc cca gcc cgg gga gga gat	627	
Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp		
190 195 200		
ccc cgt ccc acc ttc tcc tgt agc ttc agc cca ggc ctt ccc cga cac	675	
Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His		40
205 210 215		

cgg gcc ttg cgc aca gcc ccc atc cag ccc cgt gtc tgg gag cct gtg 723
 Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val
 220 225 230

cct ctg gag gag gtc caa ttg gtg gtg gag cca gaa ggt gga gca gta 771
 Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val
 235 240 245

10

gct cct ggt gga acc gta acc ctg acc tgt gaa gtc cct gcc cag ccc 819
 Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro
 250 255 260 265

tct cct caa atc cac tgg atg aag gat ggt gtg ccc ttg ccc ctt ccc 867
 Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro
 270 275 280

20

ccc agc cct gtg ctg atc ctc cct gag ata ggg cct cag gac cag gga 915
 Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly
 285 290 295

acc tac agc tgt gtg gcc acc cat tcc agc cac ggg ccc cag gaa agc 963
 Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser
 300 305 310

30

cgt gct gtc agc atc agc atc atc gaa cca ggc gag gag ggg cca act 1011
 Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr
 315 320 325

40

gca ggt gag ggg ttt gat aaa gtc agg gaa gca gaa gat agc ccc caa 1059

Ala Gly Glu Gly Phe Asp Lys Val Arg Glu Ala Glu Asp Ser Pro Gln
 330 335 340 345

cac atg tga ctgggggat ggccaacaag aaaggaatgg aaggccccag 1108
 His Met

aaaaccagga ggaagaggag gagcgtgcag aactgaatca gtcggaggaa cctgaggcag 1168 10

gcgagagtag tactggaggg ccttgagggg cccacagaca gatcccatcc atcag 1223

<210> 2

<211> 347

<212> PRT

<213> Homo sapiens 20

<400> 2

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
 20 25 30 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
 35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
 50 55 60 40

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro

65		70		75		80																
Asn	Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	Pro	Ala	Val	Gly	Ile	Gln	Asp	Glu	Gly	Ile							
			85						90					95								
Phe	Arg	Cys	Gln	Ala	Met	Asn	Arg	Asn	Gly	Lys	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn							
			100						105					110								10
Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Tyr	Gln	Ile	Pro	Gly	Lys	Pro	Glu	Ile	Val	Asp							
			115						120					125								
Ser	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Ala	Gly	Val	Pro	Asn	Lys	Val	Gly	Thr	Cys							
			130						135					140								20
Val	Ser	Glu	Gly	Ser	Tyr	Pro	Ala	Gly	Thr	Leu	Ser	Trp	His	Leu	Asp							
			145						150					155								
Gly	Lys	Pro	Leu	Val	Pro	Asn	Glu	Lys	Gly	Val	Ser	Val	Lys	Glu	Gln							
			165						170					175								
Thr	Arg	Arg	His	Pro	Glu	Thr	Gly	Leu	Phe	Thr	Leu	Gln	Ser	Glu	Leu							
			180						185					190								30
Met	Val	Thr	Pro	Ala	Arg	Gly	Gly	Asp	Pro	Arg	Pro	Thr	Phe	Ser	Cys							
			195						200					205								
Ser	Phe	Ser	Pro	Gly	Leu	Pro	Arg	His	Arg	Ala	Leu	Arg	Thr	Ala	Pro							
			210						215					220								40

Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu
 225 230 235 240

Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr
 245 250 255

Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met
 260 265 270

10

Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu
 275 280 285

Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr
 290 295 300

20

His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile
 305 310 315 320

Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Glu Gly Phe Asp Lys
 325 330 335

30

Val Arg Glu Ala Glu Asp Ser Pro Gln His Met
 340 345

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 3

gccaggaccc tggaaggaag ca

22

10

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to act as a primer for PCR

20

<400> 4

ctgatggatg ggatctgtct gtg

23

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to act as a primer for PCR

40

<400> 5

gagaattcgc caggaccctg gaaggaagca

30

〈210〉 6

〈211〉 29

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

10

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to act as a primer for PCR

〈400〉 6

gatctagaga ttgttgacca tccccccag

29

20

〈210〉 7

〈211〉 17

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: Designed

peptide to act as an immunogen

30

〈400〉 7

Cys Glu Gly Phe Asp Lys Val Arg Glu Ala Glu Asp Ser Pro Gln His

1

5

10

15

Met

40

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒトRAGE遺伝子の構造及びRAGE遺伝子転写産物のオルタナティブスプライシングによって生成される RAGE 蛋白の分子多様性を示す。C端欠失可溶型が、本発明の可溶型RAGEに相当するものである。

【図2】 膜貫通型RAGE(fullRAGE)及び膜貫通ドメインを有するfullRAGE遺伝子より人工的に作製された可溶化型RAGEとよばれるもの(US5864018)と比較しての本発明の可溶型RAGEをコードする核酸(solubleRAGE)の塩基配列を示す。

【図3】 図2に続く fullRAGE、US5864018及びsolubleRAGEの塩基配列を示す。

50

【図4】 図3に続く fullRAGE、US5864018及びsolubleRAGEの塩基配列を示す。

【図5】 fullRAGE及びUS5864018と比較しての本発明の可溶性RAGE(solubleRAGE)のアミノ酸配列を示す。

【図6】 sRAGEタンパクの10%SDS-PAGE分離後の電気泳動写真を示す。1は細胞培養上清の銀染色像、2は精製蛋白の銀染色像を示す。

【図7】 本発明の抗可溶性RAGEモノクローナル抗体を使用してのウエスタンブロットティングの結果を示す。

【図8】 ハイブリドーマクローンの検定ウエスタンブロットティング(western blotting)の結果の電気泳動写真を示す。

成熟型RAGE(R)、可溶性RAGE過剰発現COS7細胞培養上清(CM)、ヒト肺抽出タンパク(L)および7種のタンパクを含む分子量マーカー(M)をSDS-PAGEで分離後、抗可溶性RAGEモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ培養上清を用いウエスタンブロットティングを行った。

10

【図9】 可溶性RAGEモノクローナル抗体を用いた免疫沈降の結果の電気泳動写真を示す。

可溶性RAGEモノクローナル抗体269-1D10(1)、269-9C2(2)或いは正常マウスIgMノグロブリン(3)を結合させたprotein G Sepharoseを用いて可溶性RAGE過剰発現COS7細胞培養上清から当該タンパクを免疫沈降後、SDS-PAGEで分離し、ウエスタンブロットティング(western blotting)により可溶性RAGEを検出した。

【図10】 ヒト血清中に存在する可溶性RAGEタンパクの検出のため、抗ヒト可溶性RAGEモノクローナル抗体を使用したイムノアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行った結果の溶出パターンとそのピーク画分より得られた沈殿物の電気泳動写真を示す。

20

2.5 mgのヒト可溶性RAGEモノクローナル抗体269-1D10が結合したイムノアフィニティーカラムにヒト血清2 mlをアプライし、カラムクロマトグラフィーを行った。ピーク画分(fraction no. 16~18)はTCAで処理し、沈殿物をSDS-PAGEにより展開、ウサギ抗ヒト可溶性RAGEポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットティング(western blotting)を行った。

【図11】 可溶性RAGEによるAGE内皮作用の中和作用を示す。

初代培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞を(1)未添加、(2)10 µg/ml AGE2-BSA添加、(3)10 µg/ml AGE2-BSAおよび25 µg/ml精製可溶性RAGE添加培養液中で処理後、細胞よりpoly(A)⁺ RNAを分離しVEGF mRNAの検出を行った。

30

【図12】 抗ヒト可溶性RAGE抗体を使用したヒト可溶性RAGE測定サンドイッチアッセイ系(測定系A)で得られた可溶性RAGE画分(標準抗原)の標準曲線を示す。

【図13】 抗ヒト可溶性RAGE抗体を使用したヒト可溶性RAGE測定サンドイッチアッセイ系(測定系B)で得られた可溶性RAGE画分(標準抗原)の標準曲線を示す。

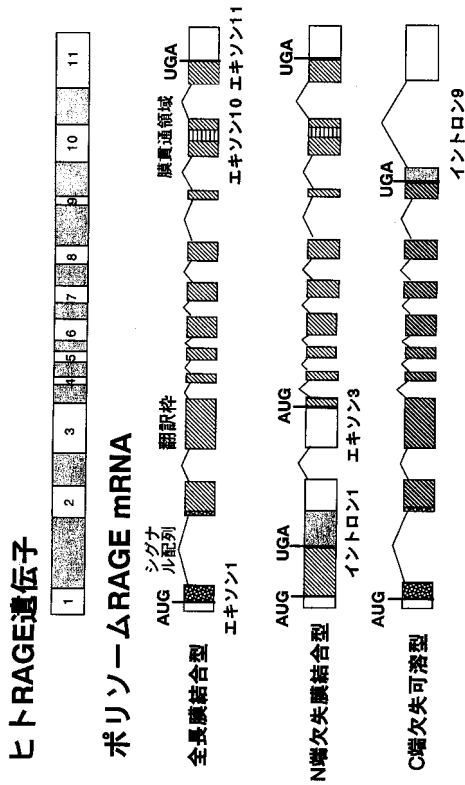
【図14】 抗ヒト可溶性RAGE抗体を使用したヒト可溶性及び膜型RAGE特異的測定サンドイッチアッセイ系(測定系C)で得られた可溶性RAGE画分(標準抗原)の標準曲線を示す。

【図15】 膜型RAGE過剰発現COS-7細胞のライゼート(上清)を測定系A、B及びCで測定した結果を示す。可溶性RAGEを標準物質として使用した。

40

【図16】 I型糖尿病患者について、血中ヒト可溶性RAGEを測定系Aで測定した結果を示す。

【 図 1 】



【 図 2 】

fullRAGE.nuc	1:GCCAGCACCTGGAAGGAACGAGCAAGTTCGACGCCGGAACAGCAGTTGGAGCTGGTGGCTG 60
US5864018.nuc	1:-----TTCGACGCCGGAACAGCAGTTGGAGCTGGTGGCTG 36
solubleRAGE.nuc	1:GCCAGCACCTGGAAGGAACGAGCAAGTTCGACGCCGGAACAGCAGTTGGAGCTGGTGGCTG 60 *****
fullRAGE.nuc	81:GTCCTCAGCTGTGGGGGGCAGTAGTAGTGTCTCAAAACATCACAGCCGGATTGGCGAG 120
US5864018.nuc	37:GTCCTCAGCTGTGGGGGGCAGTAGTAGTGTCTCAAAACATCACAGCCGGATTGGCGAG 96
solubleRAGE.nuc	81:GTCCTCAGCTGTGGGGGGCAGTAGTAGTGTCTCAAAACATCACAGCCGGATTGGCGAG 120 *****
fullRAGE.nuc	121:CCACTGGTGTGAAGTGTAAAGGGGCCCCAAGAAACACCCAGGGCTGGAATGGAAA 180
US5864018.nuc	97:CCACTGGTGTGAAGTGTAAAGGGGCCCCAAGAAACACCCAGGGCTGGAATGGAAA 156
solubleRAGE.nuc	121:CCACTGGTGTGAAGTGTAAAGGGGCCCCAAGAAACACCCAGGGCTGGAATGGAAA 180 *****
fullRAGE.nuc	181:CTGAACACAGCCCGGACAGAGCTTGAAGGCTCTCTCCAGGGAGGAGGCCCTCTGG 240
US5864018.nuc	157:CTGAACACAGCCCGGACAGAGCTTGAAGGCTCTCTCCAGGGAGGAGGCCCTCTGG 216
solubleRAGE.nuc	181:CTGAACACAGCCCGGACAGAGCTTGAAGGCTCTCTCCAGGGAGGAGGCCCTCTGG 240 *****
fullRAGE.nuc	241:GACAGTGTGGCTGTGTCTTCCCAAGGCTCCCTCTCTCCGGCTGGGGATCCAG 300
US5864018.nuc	217:GACAGTGTGGCTGTGTCTTCCCAAGGCTCCCTCTCTCCGGCTGGGGATCCAG 276
solubleRAGE.nuc	241:GACAGTGTGGCTGTGTCTTCCCAAGGCTCCCTCTCTCCGGCTGGGGATCCAG 300 *****
fullRAGE.nuc	301:GATGAGGGGATTTTCGGTCCAGCAATGAACAGGAATGGAAAGACCAAGTCCAAC 360
US5864018.nuc	277:GATGAGGGGATTTTCGGTCCAGCAATGAACAGGAATGGAAAGACCAAGTCCAAC 336
solubleRAGE.nuc	301:GATGAGGGGATTTTCGGTCCAGCAATGAACAGGAATGGAAAGACCAAGTCCAAC 360 *****
fullRAGE.nuc	361:TACCGAGTCCGTGTACCAGATTCCTGGGAAGCCAGAAATTAGATTCTGCTCGAA 420
US5864018.nuc	337:TACCGAGTCCGTGTACCAGATTCCTGGGAAGCCAGAAATTAGATTCTGCTCGAA 396
solubleRAGE.nuc	361:TACCGAGTCCGTGTACCAGATTCCTGGGAAGCCAGAAATTAGATTCTGCTCGAA 420 *****
fullRAGE.nuc	421:CTCAGGCTGTGTTCCCAATAGGTGGGACATGTGTGTGAGAGGAGCTACCTGCA 480
US5864018.nuc	397:CTCAGGCTGTGTTCCCAATAGGTGGGACATGTGTGTGAGAGGAGCTACCTGCA 456
solubleRAGE.nuc	421:CTCAGGCTGTGTTCCCAATAGGTGGGACATGTGTGTGAGAGGAGCTACCTGCA 480 *****

【 図 3 】

fullRAGE.nuc	481:GGGACTCTTAGTGGCACTTGGATGGGAGCCCTGGTGCCTAATGAGAAGGGAGTATCT 540
US5864018.nuc	457:GGGACTCTTAGTGGCACTTGGATGGGAGCCCTGGTGCCTAATGAGAAGGGAGTATCT 516
solubleRAGE.nuc	481:GGGACTCTTAGTGGCACTTGGATGGGAGCCCTGGTGCCTAATGAGAAGGGAGTATCT 540 *****
fullRAGE.nuc	541:GTGAAGAACACAGCAGGAGACACCTGAGACAGGGCTCTTCACTGCAGTCGGAGCTA 600
US5864018.nuc	517:GTGAAGAACACAGCAGGAGACACCTGAGACAGGGCTCTTCACTGCAGTCGGAGCTA 576
solubleRAGE.nuc	541:GTGAAGAACACAGCAGGAGACACCTGAGACAGGGCTCTTCACTGCAGTCGGAGCTA 600 *****
fullRAGE.nuc	601:ATGGTACCCAGCCCGGGGAGAGATCCCCGTCCACCTTCTCTGAGCTTCAAGCCCA 660
US5864018.nuc	577:ATGGTACCCAGCCCGGGGAGAGATCCCCGTCCACCTTCTCTGAGCTTCAAGCCCA 636
solubleRAGE.nuc	601:ATGGTACCCAGCCCGGGGAGAGATCCCCGTCCACCTTCTCTGAGCTTCAAGCCCA 660 *****
fullRAGE.nuc	661:GGCTTCCCGACACCCGGGCTTGGCCACAGCCCATCCAGCCCGTGTCTGGAGCT 720
US5864018.nuc	637:GGCTTCCCGACACCCGGGCTTGGCCACAGCCCATCCAGCCCGTGTCTGGAGCT 706
solubleRAGE.nuc	661:GGCTTCCCGACACCCGGGCTTGGCCACAGCCCATCCAGCCCGTGTCTGGAGCT 720 *****
fullRAGE.nuc	721:GTGCTCTGGAGAGTCCAATTGGTGGTGGAGCCAGAAGTGGAGCAGTAGCTCTGGT 780
US5864018.nuc	697:GTGCTCTGGAGAGTCCAATTGGTGGTGGAGCCAGAAGTGGAGCAGTAGCTCTGGT 756
solubleRAGE.nuc	721:GTGCTCTGGAGAGTCCAATTGGTGGTGGAGCCAGAAGTGGAGCAGTAGCTCTGGT 780 *****
fullRAGE.nuc	781:GGAACCGTAACCTGACCTGTGAAGTCCCTGGCCAGCCCTCTCTCAAATCCACTGGAT 840
US5864018.nuc	757:GGAACCGTAACCTGACCTGTGAAGTCCCTGGCCAGCCCTCTCTCAAATCCACTGGAT 816
solubleRAGE.nuc	781:GGAACCGTAACCTGACCTGTGAAGTCCCTGGCCAGCCCTCTCTCAAATCCACTGGAT 840 *****
fullRAGE.nuc	841:AAGGATGGTGGCTTCCCTTCCCTCCCGCCCTGTGCTATCCCTCCGATAGGG 900
US5864018.nuc	817:AAGGATGGTGGCTTCCCTTCCCTCCCGCCCTGTGCTATCCCTCCGATAGGG 876
solubleRAGE.nuc	841:AAGGATGGTGGCTTCCCTTCCCTCCCGCCCTGTGCTATCCCTCCGATAGGG 900 *****
fullRAGE.nuc	901:CCTCAGGACAGGGAACCTACAGCTGTGTGGCCACCCATTCCAGCCAGGGCCCGAGAA 960
US5864018.nuc	877:CCTCAGGACAGGGAACCTACAGCTGTGTGGCCACCCATTCCAGCCAGGGCCCGAGAA 936
solubleRAGE.nuc	901:CCTCAGGACAGGGAACCTACAGCTGTGTGGCCACCCATTCCAGCCAGGGCCCGAGAA 960 *****

【 図 4 】

fullRAGE.nuc	961:AGCCGTGCTGTACGATCAGCATCATGAACAGCCGAGGAGGGCCAACTGCAGC----- 1015
US5864018.nuc	937:AGCCGTGCTGTACGATCAGCATCATGAACAGCCGAGGAGGGCCAACTGCAGC----- 991
solubleRAGE.nuc	961:AGCCGTGCTGTACGATCAGCATCATGAACAGCCGAGGAGGGCCAACTGCAGC----- 1020 *****
fullRAGE.nuc	1016:----- 1016
US5864018.nuc	992:----- 992
solubleRAGE.nuc	1021:GGGTTGATAAGTCAAGGAAGCAGAGATAGCCCAACACATGTCAGCTGGGGGATGG 1080 *****
fullRAGE.nuc	1016:-----GCTGTGGGAGATCAGGCTGGGAATCTAGCCCTGGCCCT 1058
US5864018.nuc	992:-----GCTGTGGGAGATCAGGCTGGGAATCTAGC----- 1023
solubleRAGE.nuc	1081:TCAACAAGAAAGGAATC----- 1097 *****
fullRAGE.nuc	1059:GGGATCTGGAGGCTGGGCAAGCCCGCTGCTATTGGGGTCACTGTGGCAAG 1118
US5864018.nuc	1024:----- 1024
solubleRAGE.nuc	1098:----- 1098
fullRAGE.nuc	1119:CGCCACCCCGGAGGAGCAGGAGGAGCCCGCCAGAAACAGGAGGAGAGGAGGCG 1178
US5864018.nuc	1024:----- 1024
solubleRAGE.nuc	1098:-----GAAGGCCAGAAACAGGAGGAGAGGAGGCG 1133 *****
fullRAGE.nuc	1179:TCGAACTGAATCAGTGGAGAACTGAGGAGGAGAGTACTGGAGGCTTGG 1238
US5864018.nuc	1024:----- 1024
solubleRAGE.nuc	1134:TCGAACTGAATCAGTGGAGAACTGAGGAGGAGAGTACTGGAGGCTTGG 1193 *****
fullRAGE.nuc	1239:AGGGCCACAGACAGATCCCATCATCAG 1288
US5864018.nuc	1024:----- 1024
solubleRAGE.nuc	1194:AGGGCCACAGACAGATCCCATCATCAG 1223

【 5 】

```

fullRAGE. ptn 1:MAAGTAVGAVLVLVSLWGAVGQAQNTARIGEPLVLKCKGAPKKPPQRLWLNKTRTEA 60
US5864018. ptn 1:MAAGTAVGAVLVLVSLWGAVGQAQNTARIGEPLVLKCKGAPKKPPQRLWLNKTRTEA 60
solubleRAGE. ptn 1:MAAGTAVGAVLVLVSLWGAVGQAQNTARIGEPLVLKCKGAPKKPPQRLWLNKTRTEA 60
*****

fullRAGE. ptn 61:WKVLSQGGGPDVSVARVLPNGSLFLPAVGIQDEGIFRCQAMRNNGKETKSNYRVRYQI 120
US5864018. ptn 61:WKVLSQGGGPDVSVARVLPNGSLFLPAVGIQDEGIFRCQAMRNNGKETKSNYRVRYQI 120
solubleRAGE. ptn 61:WKVLSQGGGPDVSVARVLPNGSLFLPAVGIQDEGIFRCQAMRNNGKETKSNYRVRYQI 120
*****

fullRAGE. ptn 121:PKKPEIVDSASELTAGVFNKVGTCVSEGSYPAGTLSWHLQKPLVPNEKGVSKRQTRRH 180
US5864018. ptn 121:PKKPEIVDSASELTAGVFNKVGTCVSEGSYPAGTLSWHLQKPLVPNEKGVSKRQTRRH 180
solubleRAGE. ptn 121:PKKPEIVDSASELTAGVFNKVGTCVSEGSYPAGTLSWHLQKPLVPNEKGVSKRQTRRH 180
*****

fullRAGE. ptn 181:PETGLFTLQSELMVTPARGDPRPTFSCFSPLPHRALRTAPIQPRVWEPVLEEVL 240
US5864018. ptn 181:PETGLFTLQSELMVTPARGDPRPTFSCFSPLPHRALRTAPIQPRVWEPVLEEVL 240
solubleRAGE. ptn 181:PETGLFTLQSELMVTPARGDPRPTFSCFSPLPHRALRTAPIQPRVWEPVLEEVL 240
*****

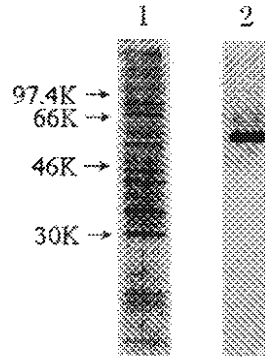
fullRAGE. ptn 241:VVEPEGGAVAPGGTVTLTCEVPAQPSQIHWMDGVPLPLPSPVLLPEIGPDQGTYS 300
US5864018. ptn 241:VVEPEGGAVAPGGTVTLTCEVPAQPSQIHWMDGVPLPLPSPVLLPEIGPDQGTYS 300
solubleRAGE. ptn 241:VVEPEGGAVAPGGTVTLTCEVPAQPSQIHWMDGVPLPLPSPVLLPEIGPDQGTYS 300
*****

fullRAGE. ptn 301:CVATHSHGQPSRAVSIIEFGEEGPTAG-----SVGGGLGLTALA 344
US5864018. ptn 301:CVATHSHGQPSRAVSIIEFGEEGPTAG-----SVGGGLGLTALA 341
solubleRAGE. ptn 301:CVATHSHGQPSRAVSIIEFGEEGPTAGGFDKVRKREADSPQHW 347
*****

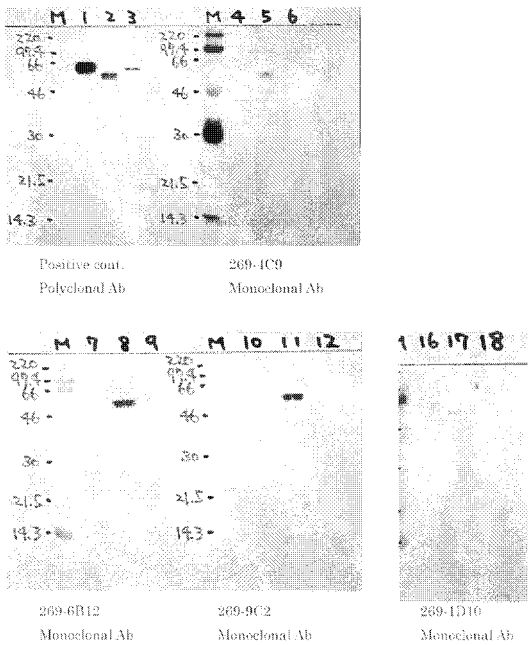
fullRAGE. ptn 345:LGILGGLTAALLIGVILWQRQRGGERKAPENQEEEEERAEINQSEEPPEAGESSTGGP 404

```

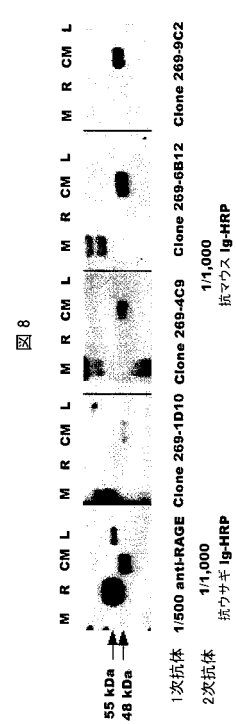
【 6 】



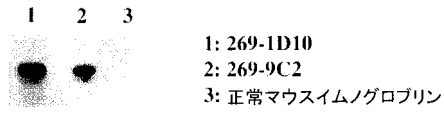
【 7 】



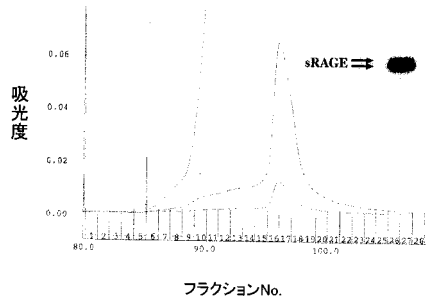
【 8 】



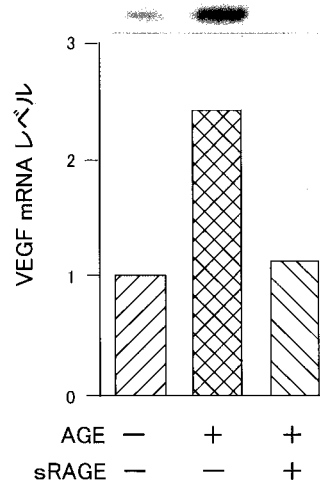
【 図 9 】



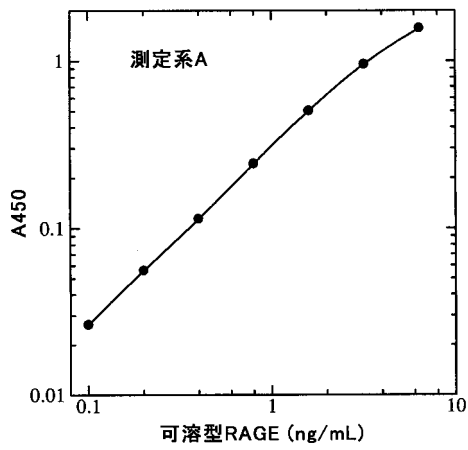
【 図 10 】



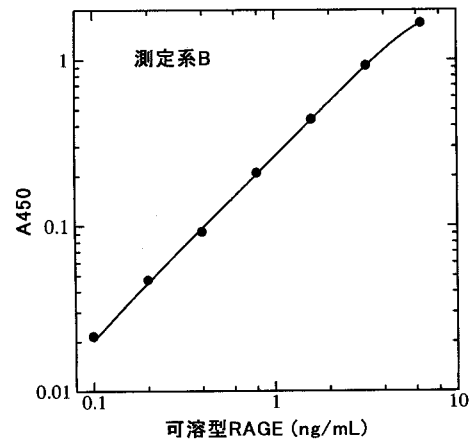
【 図 11 】



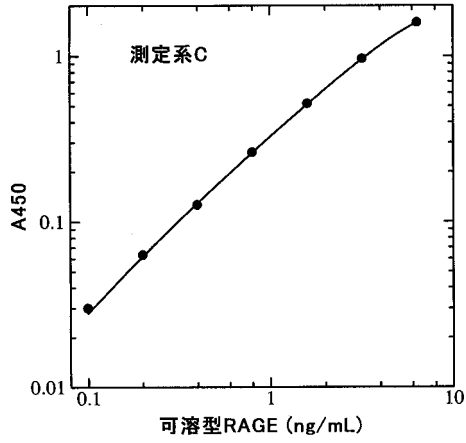
【 図 12 】



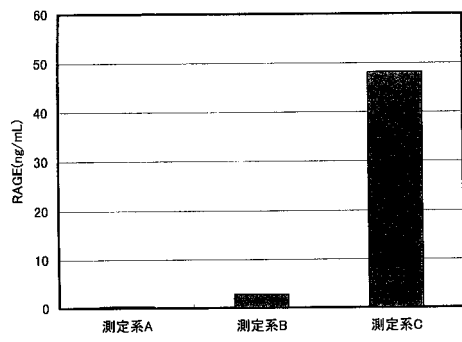
【 図 13 】



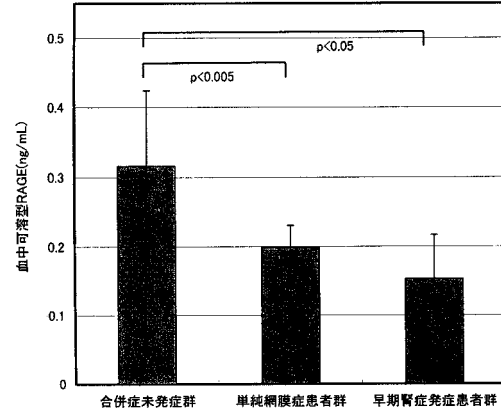
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第97/039125(WO, A1)
特許第3837494(JP, B2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

C07K 16/28

REGISTRY/CAplus/BIOSIS/MEDLINE(STN)

PubMed

JSTPlus(JDreamII)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

专利名称(译)	可溶性RAGE测定法		
公开(公告)号	JP4171228B2	公开(公告)日	2008-10-22
申请号	JP2002048096	申请日	2002-02-25
申请(专利权)人(译)	第一ファインケミカル株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	第一ファインケミカル株式会社		
[标]发明人	山本博 小幡賢一		
发明人	山本 博 小幡 賢一		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 A61K39/395 G01N33/53 C12P21/08 G01N33/50 A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/10 A61P9/10 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 G01N33/15 G01N33/566		
FI分类号	C12N15/00.A C07K16/28.ZNA A61K39/395.D G01N33/53.D C12P21/08 A61K31/7088 A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P3/10 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P9/10.101 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/566		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA11 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA162 4C084/ZA452 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB262 4C084/ZC412 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA16 4C086/ZA45 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB26 4C086/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72		
优先权	2001078409 2001-03-19 JP 2001243114 2001-08-10 JP		
其他公开文献	JP2003128700A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过阐明控制AGE及其受体之间相互作用的因子来研究和开发各种生物活性，生理现象和与AGE（晚期糖基化和产物）和RAGE（AGE受体）相关的疾病，这些因子在体内与糖尿病一起产生或老化。解决方案：RAGE中有多种分子种类。在它们的可溶性RAGE中，识别AGE和跨膜RAGE之间的相互作用的活性。因此，针对可溶性RAGE的抗体有助于研究各种生理现象，生物活性和与AGE和RAGE之间的相互作用相关的疾病以及可溶性RAGE的测量，并且有助于开发和研究有用的药物。

ト可溶性RAGE C末端ペプチドモノクローナル抗体

クローンNo.	サブクラス
269-1D10	γ1/κ
269-4C9	μ/κ
269-6B12	μ/κ
269-9C2	γ1/κ