

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5093783号  
(P5093783)

(45) 発行日 平成24年12月12日(2012.12.12)

(24) 登録日 平成24年9月28日(2012.9.28)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C 0 7 K 14/475 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/475 Z N A
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A
<b>C 1 2 P 21/02 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/02 C
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02
<b>A 6 1 K 38/22 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/24

請求項の数 20 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-512049 (P2008-512049)	(73) 特許権者 502068908 クリングルファーマ株式会社 大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目7-15 彩都バイオインキュベータ2F
(86) (22) 出願日 平成19年3月30日(2007.3.30)	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2007/057109	(73) 特許権者 504176911 国立大学法人大阪大学 大阪府吹田市山田丘1番1号
(87) 国際公開番号 W02007/122975	(74) 代理人 100077012 弁理士 岩谷 龍
(87) 国際公開日 平成19年11月1日(2007.11.1)	(72) 発明者 中村 敏一 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法 人大阪大学内
審査請求日 平成22年1月26日(2010.1.26)	(72) 発明者 松本 邦夫 大阪府茨木市彩都やまぶき2丁目2-A1 105
(31) 優先権主張番号 特願2006-116498 (P2006-116498)	
(32) 優先日 平成18年4月20日(2006.4.20)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HGF前駆体蛋白質改変体及びその活性型蛋白質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

HGFペプチド構造において、HGFの鎖の領域又はその鎖のC末端からアミノ酸残基を1乃至20個欠失するポリペプチドの領域と、HGFの鎖の領域又はその鎖のN末端からアミノ酸残基を1乃至20個欠失するポリペプチドの領域との間に、プロテアーゼ反応又は化学反応によってペプチド切断しうる2~20残基のアミノ酸配列を有するペプチド鎖Xが挿入された配列を有するHGF前駆体蛋白質改変体であって、ペプチド鎖X中の一ヶ所を切断することによって得られる蛋白質がジスルフィド結合でつながったヘテロダイマーを形成してHGFの活性を有することを特徴とするHGF前駆体蛋白質改変体。

【請求項2】

ペプチド鎖Xが、プロテアーゼ認識配列を有することを特徴とする請求項1に記載のHGF前駆体蛋白質改変体。

【請求項3】

プロテアーゼ認識配列がGenenase Iの認識配列、エンテロキナーゼの認識配列、血液凝固第Xa因子の認識配列、トロンビンの認識配列、TEVプロテアーゼの認識配列、Rhinovirus 3Cプロテアーゼの認識配列及びFurinの認識配列から選択される少なくとも1の認識配列であることを特徴とする請求項2に記載のHGF前駆体蛋白質改変体。

【請求項4】

プロテアーゼ認識配列がHis-Tyr又はTyr-Hisであることを特徴とする請

求項 2 に記載の H G F 前駆体蛋白質改変体。

【請求項 5】

H G F がヒト、ネコ又はイヌ由来 H G F であることを特徴とする 請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の H G F 前駆体蛋白質改変体。

【請求項 6】

H G F がヒト由来 H G F であることを特徴とする 請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の H G F 前駆体蛋白質改変体。

【請求項 7】

H G F が、  
配列番号 1 又は 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質  
であることを特徴とする 請求項 6 に記載の H G F 前駆体蛋白質改変体。 10

【請求項 8】

鎖が、  
( a ) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 3 2 位から第 4 9 4 位で表されるアミノ酸配列であり、鎖が、  
( b ) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 4 9 5 位から第 7 2 8 位で表されるアミノ酸配列、  
であるか、鎖が、  
( c ) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列の第 3 2 位から第 4 8 9 位で表されるアミノ酸配列であり、鎖が、 20  
( d ) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列の第 4 9 0 位から第 7 2 3 位で表されるアミノ酸配列であることを特徴とする 請求項 6 に記載の H G F 前駆体蛋白質改変体。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の H G F 前駆体蛋白質改変体における、ペプチド鎖 X 中の一ヶ所を切断することによって得られる活性型 H G F 蛋白質改変体。

【請求項 10】

切断がプロテアーゼ処理によって行われることを特徴とする 請求項 9 に記載の活性型 H G F 蛋白質改変体。

【請求項 11】

プロテアーゼが Genenase I、エンテロキナーゼ、血液凝固第 X a 因子、トロンビン、T E V プロテアーゼ、Rhinovirus 3 C プロテアーゼ及び Furin から選択される少なくとも 1 のプロテアーゼであることを特徴とする 請求項 10 に記載の活性型 H G F 蛋白質改変体。 30

【請求項 12】

切断が、H i s - T y r 又は T y r - H i s の C 末側で行われることを特徴とする 請求項 10 に記載の活性型 H G F 蛋白質改変体。

【請求項 13】

切断が Genenase I 処理によって行われることを特徴とする 請求項 10 又は 12 に記載の活性型 H G F 蛋白質改変体。

【請求項 14】 40

切断が化学的な切断方法によって行われることを特徴とする 請求項 9 に記載の活性型 H G F 蛋白質改変体。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の H G F 前駆体蛋白質改変体を製造し、続いてあるいは同時にペプチド鎖 X 中の一ヶ所を切断することによって前記 H G F 前駆体蛋白質改変体を活性型 H G F 蛋白質改変体に変換することを特徴とする活性型 H G F 蛋白質改変体の製造方法。

【請求項 16】

切断がプロテアーゼ処理又は化学的処理によって行われることを特徴とする 請求項 15 に記載の活性型 H G F 蛋白質改変体の製造方法。 50

## 【請求項 17】

プロテアーゼがGenenase I、エンテロキナーゼ、血液凝固第Xa因子、トロンピン、TEVプロテアーゼ、Rhinovirus 3Cプロテアーゼ及びFurinから選択される少なくとも1のプロテアーゼであることを特徴とする請求項16に記載の活性型HGF蛋白質改変体の製造方法。

## 【請求項 18】

ペプチド鎖XがHis-Tyr又はTyr-Hisの配列を有するペプチド鎖であって、該ペプチド鎖Xを挿入した配列を有する一本鎖のHGF前駆体蛋白質改変体を製造し、続いてあるいは同時に該HGF前駆体蛋白質改変体をGenenase Iで処理することを特徴とする請求項15に記載の活性型HGF蛋白質改変体の製造方法。

10

## 【請求項 19】

請求項1～8のいずれかに記載のHGF前駆体蛋白質改変体をコードするDNAと、ペプチド鎖Xを切断するプロテアーゼをコードするDNAとを同時に宿主に導入し、HGF前駆体蛋白質改変体とペプチド鎖Xを切断するプロテアーゼを同時に前記宿主に発現させ、当該プロテアーゼにペプチド鎖Xを切断させることを特徴とする請求項16～18のいずれかに記載の活性型HGF蛋白質改変体の製造方法。

## 【請求項 20】

請求項9～14のいずれかに記載の活性型HGF蛋白質改変体を有効成分として含有することを特徴とする医薬。

## 【発明の詳細な説明】

20

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、血清を使用せずとも活性化可能なHGF前駆体蛋白質改変体に関する。より詳細には、本発明は、HGFの鎖の領域と鎖の領域の間にプロテアーゼ反応又は化学反応によってペプチド切断しうる少なくとも2残基のアミノ酸配列を有するペプチド鎖Xが挿入された配列からなる一本鎖のHGF前駆体蛋白質改変体に関する。また、本発明は、該HGF前駆体蛋白質改変体をもとに、挿入したペプチド鎖Xのアミノ酸配列中の1ヶ所を切断することにより得られる活性型HGF蛋白質改変体に関する。さらに、本発明は活性型HGF蛋白質改変体の製造法に関する。

## 【背景技術】

30

## 【0002】

肝細胞増殖因子(HGF)は肝実質細胞の増殖活性を有する蛋白質として発見されたが、その後の研究から、HGFは肝実質細胞の増殖作用以外にも様々な薬理作用を示す生理活性蛋白質であることが判明しており、その薬理作用については、例えば非特許文献1に記載されている。HGFの名称は、活性の多彩さにもとづき、HGF以外にもSF(scatter factor)、TCF(Tumor cytotoxic factor)等が使用されているが、本発明ではこれらの公知の肝実質細胞増殖活性を有する蛋白質をHGFと総称する。HGFはその薬理作用から、肝硬変治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗ガン剤、ガン療法副作用防止剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸損傷治療剤、脳神経障害治療剤、免疫抑制副作用防止剤、コラーゲン分解促進剤、軟骨障害治療剤、動脈疾患治療剤、肺線維症治療剤、肝臓疾患治療剤、血液凝固異常治療剤、血漿低蛋白治療剤、創傷治療剤、神経障害改善薬、造血幹細胞増加剤、育毛促進剤(例えば、特許文献1～14参照)等としての開発が期待されている。

40

## 【0003】

HGFは、肝臓、腎臓、肺、脳、骨髄、ひ臓、胎盤等の臓器あるいは血小板や白血球等の血液細胞等から分泌されるが、生体内には極微量にしか存在しないため、HGFを医薬製剤として用いるためには、遺伝子工学的的手法により細胞を用いて大量に生産する必要がある。従来、HGFはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞等の動物細胞を用いて生産できることが知られている(例えば、特許文献15、16参照)。

従来動物細胞の培養にはウシ胎児血清が添加されてきたが、近年では無血清培養法も進

50

歩しており、医薬製剤として用いられる蛋白質をCHO細胞等の動物細胞を用いて生産する場合は無血清条件で培養が行われるのが一般的である。これは、ウシ胎児血清を使用しないことにより生産コストの削減が可能なことに加え、蛋白質製剤にウシ胎児血清に由来するウイルスや異常プリオンが混入する可能性を回避することができるためである。CHO細胞等の動物細胞を用いてHGFを生産する場合にも無血清培養は可能であるが、その場合、HGFは不活性型のHGF前駆体蛋白質としてしか製造できないという問題がある。

HGFの生合成では、まず一本鎖のHGF前駆体蛋白質が合成されて細胞から分泌されるが、このHGF前駆体蛋白質は不活性な前駆体である。HGF前駆体蛋白質がHGFアクチベーター(HGFA)と呼ばれるプロテアーゼの作用によって切断を受け、二本鎖に変換されて初めてHGFは活性型となる。活性型となったHGFは、鎖と鎖からなるヘテロダイマーである。HGFA自体も、もとは不活性な一本鎖前駆体(以下、プロHGFAともいう。)として生合成され、通常は血漿中をプロHGFAの形で循環している。組織傷害時には血液凝固系等と連動してトロンビンの作用によりプロHGFAが切断を受け、二本鎖の活性型HGFAとなり、HGF前駆体蛋白質を活性化する。血清はすでに血液凝固系が作用した後のものなので、血清中ではHGFAが活性型として存在する。したがって、HGFをコードするDNAを組み込んだCHO細胞を血清存在下で培養すると、血清中の活性型HGFAの作用により、HGFは活性型に変換された状態で培養液中に産生される。しかし、無血清条件でCHO細胞を培養すると、HGFAが存在しないことからHGFは不活性型のHGF前駆体蛋白質としてしか産生されない。HGFAを血清の代わりにCHO細胞の培養系に添加することも考えられるが、上記のようにHGFAも不活性な一本鎖のプロHGFAとして細胞から分泌された後に血液凝固系と連動した活性化を受けて初めて活性型HGFAが生じるというカスケードが存在するため、活性型HGFAを血清非存在下で得ることに難がある。したがって、従来の技術では血清を添加する条件でなければ活性型HGFを効率的に生産できないというのが実状である。

#### 【0004】

そこで、血清を添加せずともHGF前駆体蛋白質を活性化する方法の開発が望まれている。そのような方法が開発できれば、無血清条件でCHO細胞を培養しても活性型HGFを安全に生産することができ、ウイルスや異常プリオン混入の危険性を回避できる。またHGFの組換え生産のための宿主として酵母や昆虫固体等血清を使用しない宿主システムの利用も可能となり、CHO細胞より高いレベルで組換えHGFの発現が期待できる生産システムへの応用も可能である。

しかし、血清を添加せずともHGF前駆体蛋白質を活性化する方法は従来知られていなかった。

- 【特許文献1】特開平4-18028号公報
- 【特許文献2】特開平4-49246号公報
- 【特許文献3】特開平7-179356号公報
- 【特許文献4】特開平6-25010号公報
- 【特許文献5】特開平6-340546号公報
- 【特許文献6】特開平6-172207号公報
- 【特許文献7】特開平7-89869号公報
- 【特許文献8】特開平6-40934号公報
- 【特許文献9】特開平6-503949号公報
- 【特許文献10】特開平6-40935号公報
- 【特許文献11】特開平6-56692号公報
- 【特許文献12】特開平7-41429号公報
- 【特許文献13】特許第3395181号公報
- 【特許文献14】特開平5-213721号公報
- 【特許文献15】特開平11-4696号公報
- 【特許文献16】特開平10-191991号公報

10

20

30

40

50

【非特許文献1】実験医学、1992年、第10巻、第3号(増刊)、p. 330 - 339

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の課題は、血清を使用せずとも活性型HGF蛋白質改変体(活性型ヘテロダイマー)への変換が可能なHGF前駆体蛋白質改変体を提供すること、及びその活性型HGF蛋白質並びにその製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは上記課題を解決すべくHGF前駆体蛋白質の活性化に関する研究を鋭意重ねた結果、HGFの鎖の領域と鎖の領域の間にプロテアーゼ反応又は化学反応によってペプチド開裂(又は切断)しうる少なくとも2残基のアミノ酸配列を有するペプチド鎖Xを挿入したHGF前駆体蛋白質改変体は、血清を用いずとも活性型の二本鎖のHGF蛋白質改変体に変換できることを見出した。該開裂しうる配列を切断できるプロテアーゼ又は化学的処理剤を用いて鎖の領域と、鎖の領域の間に挿入したペプチド鎖Xの配列を切断することにより、該HGF前駆体蛋白質改変体はS-S(ジスルフィド)結合でつながったヘテロダイマーの活性型HGF蛋白質改変体となり、HGFの生物活性を示す。以上の発見に基づき、本発明者らはさらに研究を重ね本発明の完成に至った。

すなわち、本発明は、血清を使用せずとも活性型ヘテロダイマーへの変換が可能なHGF前駆体蛋白質改変体及びその活性型蛋白質、さらにはその製造方法を提供するものである。さらに、本発明は、活性型HGF蛋白質改変体を有効成分として含有する医薬製剤を提供する。

【0007】

すなわち、本発明は、

[1] HGFペプチド構造において、HGFの鎖の領域又はその鎖のC末端からアミノ酸残基を1乃至20個欠失するポリペプチドの領域と、HGFの鎖の領域又はその鎖のN末端からアミノ酸残基を1乃至20個欠失するポリペプチドの領域との間に、プロテアーゼ反応又は化学反応によってペプチド切断しうる少なくとも2残基のアミノ酸配列を有するペプチド鎖Xが挿入された配列を有するHGF前駆体蛋白質改変体であって、ペプチド鎖X中の少なくとも一ヶ所を切断することによって得られる蛋白質がHGFの活性を有することを特徴とするHGF前駆体蛋白質改変体、

[2] ペプチド鎖Xが、プロテアーゼ認識配列を有することを特徴とする前記[1]に記載のHGF前駆体蛋白質改変体、

[3] プロテアーゼ認識配列がGenenase Iの認識配列、エンテロキナーゼの認識配列、血液凝固第Xa因子の認識配列、トロンビンの認識配列、TEVプロテアーゼの認識配列、Rhinovirus 3Cプロテアーゼの認識配列及びFurinの認識配列から選択される少なくとも1の認識配列であることを特徴とする前記[2]に記載のHGF前駆体蛋白質改変体、

[4] プロテアーゼ認識配列がHis-Tyr又はTyr-Hisであることを特徴とする前記[2]に記載のHGF前駆体蛋白質改変体、

[5] HGFがヒト、ネコ又はイヌ由来HGFであることを特徴とする前記[1]~[4]のいずれかに記載のHGF前駆体蛋白質改変体、

[6] HGFがヒト由来HGFであることを特徴とする前記[1]~[4]のいずれかに記載のHGF前駆体蛋白質改変体、

[7] HGFが、

(a) 配列番号1又は2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

(b) 配列番号1又は2で表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつHGFと実質的に同質の活性を有する蛋白質、又は

10

20

30

40

50

(c) 配列番号 1 又は 2 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ HGF と実質的に同質の活性を有する蛋白質、  
であることを特徴とする前記 [ 6 ] に記載の HGF 前駆体蛋白質改変体、

[ 8 ] 鎖が、

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 32 位から第 494 位で表されるアミノ酸配列であり、鎖が、

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 495 位から第 728 位で表されるアミノ酸配列、

であるか、鎖が、

(c) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列の第 32 位から第 489 位で表されるアミノ酸配列であり、鎖が、

(d) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列の第 490 位から第 723 位で表されるアミノ酸配列であることを特徴とする前記 [ 6 ] に記載の HGF 前駆体蛋白質改変体、

[ 9 ] 前記 [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれかで示される HGF 前駆体蛋白質改変体における、ペプチド鎖 X 中の少なくとも一ヶ所を切断することによって得られる活性型 HGF 蛋白質改変体、

[ 10 ] 切断がプロテアーゼ処理又は化学的処理によって行われることを特徴とする前記 [ 9 ] に記載の活性型 HGF 蛋白質改変体、

[ 11 ] プロテアーゼが Genenase I、エンテロキナーゼ、血液凝固第 Xa 因子、トロンピン、TEV プロテアーゼ、Rhinovirus 3C プロテアーゼ及び Furin から選択される少なくとも 1 のプロテアーゼであることを特徴とする前記 [ 10 ] に記載の活性型 HGF 蛋白質改変体、

[ 12 ] 切断が、His - Tyr 又は Tyr - His の C 末側で行われることを特徴とする前記 [ 10 ] に記載の活性型 HGF 蛋白質改変体、

[ 13 ] 切断が Genenase I 処理によって行われることを特徴とする前記 [ 10 ] 又は [ 12 ] に記載の活性型 HGF 蛋白質改変体、

[ 14 ] 切断が化学的な切断方法によって行われることを特徴とする前記 [ 9 ] に記載の活性型 HGF 蛋白質改変体、

[ 15 ] 前記 [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれかに記載の HGF 前駆体蛋白質改変体を製造し、続いてあるいは同時にペプチド鎖 X 中の少なくとも 1 ヶ所を切断することによって前記 HGF 前駆体蛋白質改変体を活性型 HGF 蛋白質改変体に変換することを特徴とする活性型 HGF 蛋白質改変体の製造方法、

[ 16 ] 切断がプロテアーゼ処理又は化学的処理によって行われることを特徴とする前記 [ 15 ] に記載の活性型 HGF 蛋白質改変体の製造方法、

[ 17 ] プロテアーゼが Genenase I、エンテロキナーゼ、血液凝固第 Xa 因子、トロンピン、TEV プロテアーゼ、Rhinovirus 3C プロテアーゼ及び Furin から選択される少なくとも 1 のプロテアーゼであることを特徴とする前記 [ 16 ] に記載の活性型 HGF 蛋白質改変体の製造方法、

[ 18 ] ペプチド鎖 X が His - Tyr 又は Tyr - His の配列を有し、かつ 2 ~ 20 残基のアミノ酸を有するペプチド鎖であって、該ペプチド鎖 X を挿入した配列を有する一本鎖の HGF 前駆体蛋白質改変体を製造し、続いてあるいは同時に該 HGF 前駆体蛋白質改変体を Genenase I で処理することを特徴とする前記 [ 15 ] に記載の活性型 HGF 蛋白質改変体の製造方法、

[ 19 ] 前記 [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれかに記載の HGF 前駆体蛋白質改変体をコードする DNA と、ペプチド鎖 X を切断するプロテアーゼをコードする DNA とを同時に宿主に導入し、HGF 前駆体蛋白質改変体とペプチド鎖 X を切断するプロテアーゼを同時に前記宿主に発現させ、当該プロテアーゼにペプチド鎖 X を切断させることを特徴とする前記 [ 16 ] ~ [ 18 ] のいずれかに記載の活性型 HGF 蛋白質改変体の製造方法、及び

[ 20 ] 前記 [ 9 ] ~ [ 14 ] のいずれかに記載の活性型 HGF 蛋白質改変体を有効成分として含有することを特徴とする医薬、

10

20

30

40

50

に関する。

【発明の効果】

【0008】

本発明のHGF前駆体蛋白質改変体は、無血清条件下でS-S結合でつながった活性型ヘテロダイマー（活性型HGF蛋白質改変体）に変換でき、ウシ胎児血清に由来する異常プリオン混入の危険性を回避できる。また、血清を用いない発現システムでの活性型HGF蛋白質改変体の生産が可能となり、安価に活性型HGF蛋白質改変体を製造できるので経済的にも有利である。本発明により製造される活性型HGF蛋白質改変体は、HGFと実質的に同一の活性を有するので、HGFの代替医薬として使用し得る。

【図面の簡単な説明】

10

【0009】

【図1】HGF前駆体蛋白質改変体をGenenase Iで処理した場合と非処理の場合のサンプルを還元条件下にSDS-PAGEを行い、抗HGFポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット分析を行った結果を示す図である。図中、Pro-HGFはHGF-NG前駆体蛋白質又はHGF前駆体蛋白質改変体を示し、 $\square$ はHGF-NGの鎖を又は活性型HGF蛋白質改変体の鎖に相当する鎖を、 $\square$ はHGF-NGの鎖又は活性型HGF蛋白質改変体の鎖に相当する鎖を示す。

【図2】HGF-NG前駆体蛋白質又はHGF前駆体蛋白質改変体をGenenase Iで処理した場合（+）と非処理の場合（-）のサンプルを非還元条件下にSDS-PAGEを行い、抗HGFポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット分析を行った結果を示す図である。

20

【図3】HGF-G1前駆体蛋白質、HGF-G2前駆体蛋白質又はHGF-G3前駆体蛋白質をGenenase Iで処理（+）して得られるサンプルの活性について、MDC K細胞に対するscatter活性で評価した結果を示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

以下、本発明を詳細に説明する。

HGFの鎖の領域と鎖の領域の間に挿入されるペプチド鎖Xは、プロテアーゼ反応又は化学反応によってペプチド開裂しうる少なくとも2残基のアミノ酸配列を有するペプチド鎖であれば、特に限定されない。ペプチド鎖Xを構成するアミノ酸数は約20アミノ酸残基以内が好ましい。より好ましいペプチド鎖Xのアミノ酸数は約2~10残基であり、さらに好ましくは約2~6残基である。

30

【0011】

プロテアーゼ反応によってペプチド開裂しうるアミノ酸配列としては、例えばプロテアーゼ認識配列（プロテアーゼによってペプチド開裂し得る配列）等が好ましく挙げられる。プロテアーゼ認識配列は、基質特異性の高いプロテアーゼの認識配列であれば特に制限はないが、プロテアーゼ認識配列がHGFのアミノ酸配列に含まれないことがさらに好ましい。プロテアーゼ認識配列としては、例えばGenenase I (Carter, P. et al., Proteins, 6, 240-248(1989))の認識配列であるHis-Tyr又はTyr-His; エンテロキナーゼ [Kunitz, M., J. Gen. Physiol., 22, 429-446 (1939), LaVallie, E. R. et al. Journal of Biological Chemistry, 268, 23311-23317 (1993), Voza, L. A. et al. Biotechnology (NY), 14, 77-81 (1996)]の認識配列であるAsp-Asp-Asp-Lys (配列番号3); 血液凝固第Xa因子の認識配列であるIle-Glu-Gly-Arg (配列番号4) 又はIle-Asp-Gly-Arg (配列番号5); トロンビンの認識配列であるLeu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser (配列番号6); TEV (tobacco etch virus) プロテアーゼ [Dougherty WG et al., Microbiological Reviews, 57, 781-822 (1992)]の認識配列であるGlu-Xaa-Xaa-Tyr-Phe-Gln-Ser (Xaaは任意のアミノ酸残基を表す; 配列番号7) 又はGlu-Xaa-Xaa-Tyr-Phe-Gln-Gly (Xaaは任意のアミノ酸残基を表す; 配列番号8); Rhinovirus 3Cプロテアーゼ [Walker PA, et al.,

40

50

Biotechnology (NY), 12(6), 601-605 (1994) ] の認識配列である Leu - Glu - Val - Leu - Phe - Gln - Gly - Pro (配列番号 9) ; Furin [Hosaka M, et al., Journal of Biological Chemistry, 266, 12127-12130 (1991) ] の認識配列である Arg - Xaa - Lys - Arg (Xaa は任意のアミノ酸残基を表す; 配列番号 10) 又は Arg - Xaa - Arg - Arg (Xaa は任意のアミノ酸残基を表す; 配列番号 11) 等が好ましく挙げられる。Genenase I の認識配列である His - Tyr 又は Tyr - His は認識配列が短いことから特に好ましい。ただし、His - Tyr 又は Tyr - His の配列の N 末側を延長して Pro - Gly - Ala - Ala - His - Tyr (配列番号 12) や Pro - Gly - Ala - Ala - Tyr - His (配列番号 13) 等の配列とすることにより、Genenase I の認識性を向上させることができる。Xaa の任意のアミノ酸残基は、天然の 20 種類のアミノ酸及び非天然アミノ酸から選択され得る。非天然アミノ酸は、アミノ基とカルボキシル基を有する限りどのような化合物でもよいが、例えば - アミノ酪酸等が挙げられる。

10

## 【0012】

化学反応によってペプチド開裂しうるアミノ酸配列としては、ヒドロキシルアミンによる反応で切断される Asn - Gly ; 塩酸グアニジンを含む酢酸で切断される Asp - Pro 等が挙げられる。

## 【0013】

本発明に係わる HGF 前駆体蛋白質改変体は、ヒト由来の HGF 又は哺乳動物 (例えば、ネコ、イヌ、ラット、マウス、ウシ、チンパンジー、ウマ、ブタ、ヒツジ等) 由来の HGF のアミノ酸配列をもとに設計できる。このような HGF としては、例えば NCBI のデータベース等に登録されている例えばヒト由来 HGF (例えば Accession No. NP\_001010932, P14210, BAA14348, AAC71655 等)、マウス由来 HGF (例えば Accession No. AAB31855, NP\_034557, BAA01065, BAA01064 等)、ラット由来 HGF (例えば Accession No. NP\_58713 等)、ウシ由来 HGF (例えば Accession No. NP\_001026921, XP874086, BAD02475 等)、ネコ由来 HGF (例えば Accession No. NP\_001009830, BAC10545, BAB21499 等)、イヌ由来 HGF (例えば Accession No. NP\_001002964, BAC57560 等) 又はチンパンジー由来 HGF (例えば Accession No. XP519174 等) 等が挙げられるが、これらに限定されない。また、前記 HGF は、HGF と実質的に同じ作用を有する限り、そのアミノ酸配列中の 1 若しくは数個 (例えば、約 2 ~ 30 個、好ましくは約 2 ~ 20 個、より好ましくは約 2 ~ 10 個、さらにより好ましくは 2 ~ 5 個; 以下において同じ) のアミノ酸が置換、欠失若しくは付加されていてもよく、また同様に糖鎖が置換、欠失若しくは付加されていてもよい。そのような HGF としては、例えば Accession No. P14210 として登録されている HGF に対して 5 アミノ酸が欠損する HGF (Accession No. NP\_001010932) 等を挙げることができる。また、挿入されるペプチド鎖 X 中に存在するプロテアーゼ反応又は化学反応によってペプチド開裂させる配列が、HGF のアミノ酸配列に含まれているときには、実質的に HGF と同じ作用を有する限り、HGF に存在するペプチド開裂配列の 1 若しくは数個のアミノ酸を公知の手段で置換、欠失若しくは付加させてもよい。公知の手段としては、例えば後述する部位特異的変異導入手法等が含まれる。ここで、アミノ酸配列について、「1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加」は、アミノ酸が遺伝子工学的手法、部位特異的突然変異誘発法等の周知の技術的手段により、又は天然に生じうる程度の数 (1 ~ 数個、数個の定義は前述した通りである。) 、欠失、置換若しくは付加等されている場合を含む。糖鎖が置換、欠失若しくは付加した HGF には、例えば天然の HGF に付加している糖鎖を酵素等で処理し糖鎖を欠損させた HGF、また糖鎖が付加しない様に糖鎖付加部位のアミノ酸配列に変異が施されたもの、あるいは天然の糖鎖付加部位とは異なる部位に糖鎖が付加するようアミノ酸配列に変異が施されたもの等が含まれる。具体的には、例えば Accession No. NP\_001010932 (配列番号 2) の HGF に対し、糖鎖付加部位の 289 位 Asn を Gln に、

20

30

40

50

397位AsnをGlnに、471位ThrをGlyに、561位AsnをGlnに、648位AsnをGlnにそれぞれ置換することによって糖鎖が付加しないようにしたHGF [配列番号14; Fukuta K et al., Biochemical Journal, 388, 555-562 (2005)]等を挙げることができる。さらに、HGFのアミノ酸配列と少なくとも約80%以上の相同性を有する蛋白質、好ましくは約90%以上の相同性を有する蛋白質、より好ましくは約95%以上の相同性を有する蛋白質であって、かつHGFと実質的に同質の活性を有する蛋白質も上記HGFに含まれる。上記アミノ酸配列について「相同」とは、蛋白質の一次構造を比較し、配列間において各々の配列を構成するアミノ酸の一致の程度の意味である(以下において同じ)。

#### 【0014】

上記HGFの具体的なアミノ酸配列としては、例えば配列番号1 (Accession No. P14210) 又は配列番号2 (Accession No. NP\_001010932) で表されるアミノ酸配列等が好ましく挙げられる。また、本発明におけるHGFのアミノ酸配列には、配列番号1又は2で表されるアミノ酸配列から、1~数個のアミノ酸を挿入又は欠失させたアミノ酸配列、1~数個のアミノ酸を別のアミノ酸と置換させたアミノ酸配列又は1~数個のアミノ酸が修飾されたアミノ酸配列等を含む蛋白質であって、HGFと実質的に同質の活性を有する蛋白質のアミノ酸配列が含まれる。なお、配列番号2で表されるHGFは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第162番目のフェニルアラニン残基から第166番目のセリン残基までの5アミノ酸残基を欠失する。このため、配列番号2で表されるHGFは、5アミノ酸欠失型ヒトHGFということもある。挿入されるアミノ酸又は置換されるアミノ酸は、DNAによりコードされる20種類のアミノ酸以外の非天然アミノ酸であってもよい。非天然アミノ酸は、アミノ基とカルボキシル基を有する限りどのような化合物でもよいが、例えば - アミノ酪酸等が挙げられる。また、本発明におけるHGFのアミノ酸配列には、配列番号1又は2で表されるアミノ酸配列と少なくとも約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、HGFと実質的に同質の活性を有する蛋白質のアミノ酸配列が含まれる。配列番号1又は2で表されるアミノ酸配列と約80%以上の相同性を有するアミノ酸配列としては、例えばNCBIのデータベース等にAccession No. NP\_001010934、BAA14348、AAC71655、AAB31855、NP\_034557、BAA01065、BAA01064、NP\_58713、NP\_001026921、XP874086、BAD02475、NP\_001009830、BAC10545、BAB21499、NP\_001002964、BAC57560又はXP519174等として登録されているHGFのアミノ酸配列等が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0015】

本発明の活性型HGF蛋白質改変体は、以下の工程1乃至工程4を含む方法により製造できるが、これら工程に限定されず、活性型HGF蛋白質改変体が製造できればよい。

##### 工程1:

工程1によって、HGF前駆体蛋白質改変体をコードするDNAが作製される。該工程には、HGFの鎖の領域と鎖の領域の間にペプチド鎖Xを挿入してHGF前駆体蛋白質改変体をコードするDNAを含む組換え発現ベクターを作製する工程が含まれる。

ペプチド鎖XをHGFの鎖の領域と鎖の領域の間に挿入する場合、天然のHGFの鎖と鎖の境界にペプチド鎖Xを単に挿入するだけでもよい。この場合はHGFの全アミノ酸数が挿入配列の分だけ増加することになる。また、HGFの鎖と鎖の境界を挟み鎖のC末端からアミノ酸残基を約1乃至20個及び/又は鎖のN末端からアミノ酸残基を約1乃至20個欠失させ、その欠失させた領域にペプチド鎖Xを挿入してもよい。

HGFにおける鎖と鎖としては、例えば配列番号1で表されるアミノ酸配列の第32位から第494位で表されるアミノ酸配列からなる鎖、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第495位から第728位で表されるアミノ酸配列からなる鎖、又は配列番号2で表されるアミノ酸配列の第32位から第489位で表されるアミノ酸配列からなる鎖、配列番号2で表されるアミノ酸配列の第490位から第723位で表されるアミノ酸

10

20

30

40

50

配列からなる鎖等が挙げられる。鎖と鎖の境界を構成するアミノ酸残基は、例えば配列番号1で表されるHGFの場合は配列番号1の第494位のアルギニンと第495位のバリンである。また、例えば配列番号2で表される5アミノ酸欠失型ヒトHGFにおける鎖と鎖の境界を構成するアミノ酸残基は、配列番号2の第489位アルギニンと第490位のバリンである。

#### 【0016】

HGFの鎖と鎖の境界へのペプチド鎖Xの挿入は、蛋白質の部位特異的変異導入手法等によって行なうことができる。前記手法としては、例えばHGFの鎖をコードするDNAと鎖をコードするDNAの境界に該当する塩基配列の部分に目的のペプチド鎖Xをコードする塩基配列が挿入されるか、又は目的の配列への置換が起こるように変異を導入する方法が挙げられる。塩基配列に変異を導入する方法としては、例えば変異を導入したい部分に対応する変異プライマーを合成し、例えばクンケル法 [Kunkel, T. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82, 488 - 492 (1985)] 等の既知の技術を用いて行うことができる。また、市販の変異導入キット等を用いるとより簡便に変異を導入することができる。変異導入キットとしては、例えばMutazyme DNA polymeraseを含むGeneMorph Random Mutagenesis Kit (Stratagene社製)、GeneTailor (登録商標) Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen社製)、Mutan (登録商標) - Super Express Km (タカラバイオ株式会社製)、QuikChange (登録商標) XL Site-Directed Mutagenesis Kit (東洋紡績社製) 又はGeneEditor in vitro Site-Directed Mutagenesis System (Promega社製) 等が挙げられるが、これらに限定されない。前記クンケル法や変異導入キット等によって変異が導入されたDNA (HGF前駆体蛋白質改変体をコードする塩基配列を含有するDNA; 以下、HGF前駆体蛋白質改変体をコードするDNAという。) は、該DNAに変異させた及び/又は増殖させたプラスミドやファージ等から、制限酵素によって切り出され得る。切り出されたDNAは、公知の方法で精製されてもよく、後記する適当な発現用ベクターに直接挿入されてもよい。前記精製は、市販キットを使用することができ、例えばQIAquick Gel extraction Kit (Qiagen社製) 又はS.N.A.P. UV-Free Gel Purification Kit (Invitrogen社製) 等を使用し得るが、これらに限定されない。また、上記したHGF前駆体蛋白質改変体をコードするDNAは、従来公知の方法を用いて化学合成により製造することもできる。化学合成法としては、例えば、フォスフォアミダイト法を利用したDNA合成機等のDNA合成機で化学合成する方法等が挙げられる。

#### 【0017】

HGF前駆体蛋白質改変体をコードするDNAを含む組換え発現ベクターは、HGF前駆体蛋白質改変体をコードするDNAを、HGFの発現に適したベクターのプロモーターの下流に制限酵素とDNAリガーゼを用いて結合して作製することが出来る。組み換え発現ベクターは、必要により、プロモーター、リボソーム結合部位、開始コドン、終止コドン及びターミネーター等を含む。組み換え発現ベクターは、例えば転写の下流方向に順番に、(1)プロモーター、(2)リボソーム結合部位、(3)開始コドン、(4)本発明のHGF前駆体蛋白質改変体をコードするDNA、(5)終止コドン、及び(6)ターミネーターを含むように構築されるのが好ましい。本発明で用いることが出来る発現ベクターとしては、大腸菌を宿主とする場合はpBR322、pUC18、pUC19 (東洋紡績社製) 等のプラスミドを、枯草菌を宿主とする場合はpUB110 (シグマ社製) 等のプラスミドを、酵母を宿主とする場合はpYES2 (Invitrogen社製) 又はpRB15 (ATCC37062) 等のプラスミドを挙げることができる。動物細胞用の発現ベクターとしては、pCAGGS及びpCXN2 [Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J., Gene, 第108巻, p. 193-200 (1991), 特開平03 168087] 又はpcDL-SR [Takebe, Y. ら, Mol. Cell. Biol., 第8巻, p. 466-472 (1988)] 等が挙げられる。その他、発現ベクターとしては、バクテリオファージgt10、gt11 (ストラタジーン社製)、ウイルスSV40 (BRL社製)、BPV (ATCC VR-703) 又はレトロウイルスの遺伝子由来のベクター等が挙げられるが宿主内で複製・増幅可能なベ

10

20

30

40

50

クターであれば特に限定はされない。

【0018】

プロモーター及びターミネーターに関しても、目的とするHGF前駆体蛋白質改変体をコードするDNAの発現に用いられる宿主に対応したものであれば特に限定はない。プロモーターの例としては、宿主が大腸菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、PLプロモーター又はlppプロモーター等が挙げられ、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター又はADHプロモーター等が挙げられる。動物細胞を宿主として用いる場合は、SRプロモーター、CAGプロモーターの他、ラウス肉腫ウイルス(ウイルスRSV)、MPSV、ポリオマーウイルス、鶏頭ウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、B型肝炎ウイルス、シミアンウイルス40(SV40)、ワクシニアウイルス等のウイルスゲノムから得られるプロモーター、メタロチオネインプロモーター又はヒートショックプロモーター等が挙げられる。また、高等哺乳動物宿主を用いる際には、ベクターにエンハンサーを導入するのが好ましい。エンハンサーを導入することにより転写が増大し得る。エンハンサーとしては、SV40エンハンサー、サイトメガロウイルスの初期プロモーター/エンハンサー、ポリオマーエンハンサー又はアデノウイルスのエンハンサー等が挙げられる。またターミネーターとしては、宿主が大腸菌の場合、trpターミネーター又はlppターミネーター等を、宿主が枯草菌の場合、amyFターミネーター等を、宿主が酵母の場合、CYC1ターミネーター等を、宿主が動物細胞の場合、SV40ターミネーター又はHSV1TKターミネーター等を例示することが出来る。これらのプロモーターとターミネーターは用いる宿主に応じて適宜に組み合わせられる。

【0019】

工程2:

工程2によって、HGF前駆体蛋白質改変体が合成される。該工程では工程1で構築された組み換え発現ベクターが宿主に導入されて形質転換体が作製され、その形質転換体においてHGF前駆体蛋白質改変体が合成される工程が含まれる。

工程1で構築されたHGF前駆体蛋白質改変体をコードするDNAを含む組み換え発現ベクターが、コンピテント細胞法(J. Mol. Biol., 53, 154, 1970)、プロトプラスト法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929, (1978)]、リン酸カルシウム法[Science, 221, 551 (1983)]、DEAEデキストラン法[Science, 215, 166 (1982)]、電気パルス法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7161, (1984)]、インビトロパッケージング法[Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 581 (1975)]、ウイルスベクター法(Cell, 37, 1053, 1984)又はマイクロインジェクション法[Exp. Cell. Res., 153, 347 (1984)]等によって宿主に導入され、形質転換体が作製される。

宿主として用いることのできる細胞としては、特に制限はなく、動物、植物、昆虫、真核微生物等の真核細胞、又は原核微生物等の原核細胞等が挙げられる。これらの細胞は個体を形成していてもよく、動物個体、植物個体又は昆虫個体等を宿主としてもよい。真核細胞では、付着性細胞又は浮遊性細胞等の何れも使用でき、例えばHGF前駆体蛋白質改変体を細胞内に生産蓄積する真核細胞でもよく、あるいはHGF前駆体蛋白質改変体を細胞外に分泌生産する真核細胞でもよい。動物細胞では、例えばCHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞)、COS細胞、BHK細胞、マウスC127細胞又はHelA細胞等が挙げられる。植物細胞では、例えばイネ、タバコ又はシロイヌナズナ等を挙げる事ができ、昆虫細胞では、例えばSf9やSf21等の細胞を挙げる事ができる。昆虫個体では例えばカイコを挙げる事ができる。真核微生物ではSaccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Candida boidinii又はPichia pastoris等の酵母、あるいはAspergillus属、Trichoderma属又はMucor属等の糸状菌等を挙げる事ができる。原核微生物では、大腸菌又は枯草菌等が挙げられる。

【0020】

得られた形質転換体は、目的とする組換えHGF前駆体蛋白質改変体を産生させるため

にその宿主に応じた適切な培地中で培養されるのが好ましい。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、ビタミン、血清及び薬剤等が含有される。培地の例としては、形質転換体の宿主が大腸菌の場合、LB培地(日水製薬)又はM9培地[J. Exp. Mol. Genet., Cold Spring Laboratory, New York, 431 (1972)]等が挙げられ、宿主が酵母の場合はYEPD培地(Genetic Engineering, vol. 1, Plenum Press, New York, 1979, p. 117)等が挙げられる。宿主が動物細胞の場合、培地としては、20容量%以下のウシ胎児血清を含有するMEM (Minimum Essential Medium)培地、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)培地又はRPMI 1640培地(日水製薬)等を挙げることが出来る。形質転換体の培養は、通常20 ~ 45、pHは5 ~ 8の範囲で行われ、必要に応じて通気又は攪拌が行われる。また、宿主が接着性の動物細胞等の場合は、ガラスピース、コラーゲンピース、あるいはアセチルセルロースフォローファイバー等の担体を好ましく用いることができる。これら以外の培地組成あるいは培養条件下でも形質転換体が生育できれば実施でき、これらに限定されるものではない。

10

作製された形質転換体は、HGF前駆体蛋白質改変体をコードするDNAを発現し、HGF前駆体蛋白質改変体を合成し得る。

#### 【0021】

さらに、本発明のHGF前駆体蛋白質改変体は、無細胞蛋白質合成システムを利用して得ることもできる。無細胞蛋白質合成システムとは、大腸菌、ウサギ網状赤血球細胞、小麦胚芽等から調製した細胞抽出液を用いるか、あるいは細胞抽出液中に含まれる蛋白質合成因子群を利用して、目的蛋白質をコードするDNAあるいはmRNAを鋳型として、生細胞を用いずに蛋白質合成を行う方法を含む。細胞抽出液にはリボソーム、tRNA及び翻訳因子等の蛋白質合成に必要な分子群が含まれているため、これにATPやGTP等のエネルギー源及び基質となるアミノ酸を添加すると、蛋白質が合成される。細胞抽出液の代わりに、細胞抽出液中に含まれる蛋白質合成因子群を混合して用いてもよい。

20

#### 【0022】

##### 工程3:

工程3によって、HGF前駆体蛋白質改変体(以下において、単に前駆体ということもある)を活性型HGF蛋白質改変体に変換させる。

工程2において合成されたHGF前駆体蛋白質改変体は不活性であることから、鎖の領域と鎖の領域の間に挿入されたペプチド鎖X中の少なくとも一ヶ所を切断することによって該前駆体を開裂して、二本鎖に変換し、活性型HGF蛋白質改変体に変換させることが好ましい。

30

切断の方法は、前駆体に存在するペプチド鎖X中の特定のアミノ酸配列が切断されれば特に限定されない。該方法には、例えばプロテアーゼによる処理又は化学的な処理を含む。

#### 【0023】

特定のアミノ酸配列を切断し得るプロテアーゼとしては、特に限定されないが、ペプチド鎖X中の特定のアミノ酸配列を認識し得る基質特異性が高い例えばGenenase I、エンテロキナーゼ、血液凝固第Xa因子、トロンピン、TEVプロテアーゼ、Rhinovirus 3Cプロテアーゼ又はFurin等が好ましい。例えば、Genenase Iの認識配列が挿入された前駆体であれば一本鎖の該前駆体にGenenase Iを作用させることで該前駆体を活性化することができる。この場合の切断は、Genenase Iの認識配列のHis-Tyr又はTyr-Hisの間で行なわれる。エンテロキナーゼの認識配列が挿入された前駆体であれば一本鎖の該前駆体にエンテロキナーゼを作用させることで該前駆体を活性化することができる。この場合の切断は、エンテロキナーゼの認識配列のAsp-Asp-Asp-Lys(配列番号3)のリジン残基のC末端部で行なわれる。同様に、血液凝固第Xa因子の認識配列が挿入された前駆体であれば一本鎖の該前駆体に血液凝固第Xa因子を作用させることで該前駆体を活性化することができる。この場合の切断は、血液凝固第Xa因子の認識配列のIle-Glu-Gly-Arg(配列番号4)又はIle-Asp-Gly-Arg(配列番号5)のうち、Gly-Argの間で行なわれる。また、トロンピンの

40

50

認識配列が挿入された前駆体であれば一本鎖の該前駆体にトロンピンを作用させることで該前駆体を活性化することができる。この場合の切断は、トロンピンの認識配列の Leu - Val - Pro - Arg - Gly - Ser (配列番号6) の Arg - Gly の間で行なわれる。TEVプロテアーゼの認識配列が挿入された前駆体であれば一本鎖の該前駆体にTEVプロテアーゼを作用させることで該前駆体を活性化することができる。この場合の切断は、TEVプロテアーゼの認識配列である Glu - Xaa - Xaa - Tyr - Phe - Gln - Ser (配列番号7) のセリン残基のC末端部又は Glu - Xaa - Xaa - Tyr - Phe - Gln - Gly (配列番号8) のグリシン残基のC末端部で行なわれる。Rhinovirus 3Cプロテアーゼの認識配列が挿入された前駆体であれば一本鎖の該前駆体にRhinovirus 3Cプロテアーゼを作用させることで該前駆体を活性化することができる。この場合の切断は、Rhinovirus 3Cプロテアーゼの認識配列である Leu - Glu - Val - Leu - Phe - Gln - Gly - Pro (配列番号9) のうち Gln - Gly の間で行なわれる。Furinの認識配列が挿入された前駆体であれば一本鎖の該前駆体にFurinを作用させることで該前駆体を活性化することができる。この場合の切断は、Furinの認識配列である Arg - Xaa - Lys - Arg (配列番号10) 又は Arg - Xaa - Arg - Arg (配列番号11) のC末アルギニン残基のC末端部で行なわれる。

10

## 【0024】

プロテアーゼには、生体や細胞又は菌等から分離して精製されたもの、組換え蛋白質として精製されたもの、あるいは市販されているもの等が含まれる。プロテアーゼは、上記形質転換体を培養する培地に添加してもよいし、形質転換体等から抽出して精製した HGF前駆体蛋白質改変体に作用させてもよい。

20

また、プロテアーゼをHGF前駆体蛋白質改変体に作用させる他の方法としては、HGF前駆体蛋白質改変体を生産させる形質転換体にプロテアーゼをコードするDNAを組み込んで、該形質転換体にHGF前駆体蛋白質改変体と同時に該プロテアーゼを発現させる方法等が挙げられる。この場合、ペプチド鎖Xに含まれるプロテアーゼ認識配列を認識するプロテアーゼをコードするDNAを組み込むのが好ましい。形質転換体は、HGF前駆体蛋白質改変体と同時にプロテアーゼを生産するので、該形質転換体が生産するHGF前駆体蛋白質改変体はペプチド鎖Xに含まれるプロテアーゼ認識配列部位で自動的に切断され、活性化され得る。

## 【0025】

30

化学的な処理によってHGF前駆体蛋白質改変体のペプチド鎖X部位を開裂する方法としては、化学的処理剤、例えばヒドロキシルアミン又は塩酸グアニジンを含む酢酸( [好ましくは例えば約7M塩酸グアニジンを含む約10容量%酢酸(pH約2.5)] )等をHGF前駆体蛋白質改変体と接触させて反応させる方法が挙げられる。例えばヒドロキシルアミンによる反応ではAsn - Gly結合が切断され、塩酸グアニジンを含む酢酸ではAsp - Proの結合が切断され蛋白質が開裂され得る。前記化合物は、形質転換体が生育できる限りにおいて、形質転換体の培養培地に添加してもよい。

## 【0026】

プロテアーゼによる処理又は化学的な処理は、例えば還元剤[例えばジチオスレイトール(DTT)、 $\beta$ -メルカプトエタノール等]や変性剤(例えばSDS、尿素、塩酸グアニジン等)などの存在下で行なわれてもよい。この場合には、ペプチド鎖Xの切断後にrenaturation(蛋白質の再生)反応を行なうことが好ましい。Renaturation反応は、公知の方法、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Sambrook, J. and Russell, D.W., eds. (2001) Cold Spring Harbor Press, pp. A4.39に記載の方法等に従って行なうことができる。

40

## 【0027】

## 工程4:

工程4によって、活性型HGF蛋白質改変体が分離、精製される。形質転換体の培養上清中又は形質転換体中に生成した活性型HGF蛋白質改変体は、公知の塩析法、溶媒沈殿法、透析法、限外濾過法、ゲル電気泳動法、あるいはゲル濾過クロマトグラフィー、イオ

50

ン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等又はそれらを組み合わせて分離精製することが出来る。特に、硫酸アンモニウムによる塩析法、S-セファロースイオンクロマトグラフィー、ヘパリンセファロースアフィニティークロマトグラフィー、及びフェニルセファロース逆相クロマトグラフィーの組み合わせ、あるいは硫酸アンモニウムによる塩析法、S-セファロースイオンクロマトグラフィー、及び抗HGF抗体セファロースアフィニティークロマトグラフィーの組み合わせ等が好ましく有効な精製法である。

#### 【0028】

本発明の活性型HGF蛋白質改変体はHGFと実質的に同質の活性を有するので、HGFと同様に、蛋白質医薬品として、ヒト及び哺乳動物（イヌ、ネコ、ラット、マウス、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、モルモット等）の各種疾患治療薬又は予防薬として用いることができる。用途としては、例えば、肝疾患治療剤、腎疾患治療剤、創傷治療剤、皮膚潰瘍治療剤、毛根細胞増殖剤、制ガン剤、肺傷害治療剤又はガン療法用副作用防止剤等の用途が挙げられる。より具体的には、HGFを適用できる疾患、例えば、肝疾患（例えば、肝炎、肝硬変、肝不全、外科手術後の肝再生等）、腎疾患（例えば、糸球体腎炎、腎不全、腎性貧血症、糖尿病性腎症、薬剤投与後の腎傷害等）、皮膚疾患（例えば、白斑病、熱傷、床擦れ、皮膚潰瘍、禿頭症等）、血液疾患（例えば、血小板減少症、骨髄移植等）、眼疾患（例えば、角膜潰瘍等）、肺疾患（例えば、肺炎、肺気腫、肺結核、慢性閉塞性肺疾患、塵肺、肺線維症等）、胃十二指腸疾患（例えば、胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍等）、癌疾患及びその関連疾患（例えば、各種癌、癌療法による副作用、例えば肝毒性、腎毒性、悪心、嘔吐、血小板減少、脱毛等の予防等）、骨疾患（例えば、骨粗鬆症、骨異形成症、変形性関節炎等）、中枢疾患（例えば、神経分化異常症等）などの予防・治療に有用である。

#### 【0029】

本発明の活性型HGF蛋白質改変体を含む医薬製剤は、一般的な医療製剤の形態で用いられる。医薬製剤の形態としては、種々の製剤形態（例えば、液剤、固形剤、カプセル剤等）をとり得る。一般的には有効成分である活性型HGF蛋白質改変体と結合性物質のみ又はそれと慣用の担体と共に注射剤、吸入剤、坐剤又は経口剤とされ得るが、注射剤が好適である。注射剤は、水性注射剤又は油性注射剤のいずれでもよい。当該注射剤は常法により調製することができる。例えば水性注射剤とする場合、例えば、水性溶媒（注射用水、精製水等）に、医薬上許容される添加剤、例えば等張化剤（塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、ホウ酸、ホウ砂、ブドウ糖、プロピレングリコール等）、緩衝剤（リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、グルタミン酸緩衝液、イプシロンアミノカプロン酸緩衝液等）、保存剤（パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、ホウ酸、ホウ砂等）、増粘剤（ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール等）、安定化剤（例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、アラニン、グリシン、マンニトール、グルコース、デキストラン、ソルビトール、エチレングリコール、亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸、ジブチルヒドロキシルエン等）又はpH調整剤（塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸等）等を適宜添加した溶液に、活性型HGF蛋白質改変体を溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。また適当な溶解補助剤、例えばアルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）又は非イオン界面活性剤（ポリソルベート80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油50等）等をさらに配合してもよい。油性注射剤とする場合、油性溶媒としては、例えば、ゴマ油又は大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル又はベンジルアルコール等を配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプル又はバイアル等

10

20

30

40

50

に充填される。注射剤中の活性型HGF蛋白質改変体含量としては、通常0.0002～3質量%程度、好ましくは0.001～2質量%程度に調製される。なお、水性注射剤等の液状製剤とした場合はこれを凍結保存してもよいが、凍結乾燥等により水分を除去して保存するのが望ましい。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水等を加え、再溶解して使用され得る。

#### 【0030】

また、経口薬としては、例えば、錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠、腸溶錠を含む）、顆粒剤、細粒剤、散剤、軟もしくは硬カプセル剤（腸溶カプセル剤を含む）、液剤、乳剤、懸濁剤又はシロップ剤等の剤形に製剤化され、これらの製剤は製剤化の常法に準じて調製することができる。

また、本発明で用いられる活性型HGF蛋白質改変体は、生体分解性高分子と共に、徐放性製剤（例えばデポ剤）とすることもできる。活性型HGF蛋白質改変体は特にデポ剤とすることにより、投薬回数の低減、作用の持続性及び副作用の軽減等の効果が期待できる。該徐放性製剤は公知の方法に従って製造することができる。本徐放性製剤に使用される生体内分解性高分子は、公知の生体内分解性高分子のなかから適宜選択できるが、例えばデンプン、デキストラン又はキトサン等の多糖類；コラーゲン又はゼラチン等の蛋白質；ポリグルタミン酸、ポリリジン、ポリロイシン、ポリアラニン又はポリメチオニン等のポリアミノ酸；ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸-グリコール酸共重合体、ポリプロラク톤、ポリ- -ヒドロキシ酪酸、ポリリンゴ酸、ポリ酸無水物又はフマル酸・ポリエチレングリコール・ビニルピロリドン共重合体等のポリエステル；ポリオルソエステル又はポリメチル- -シアノアクリル酸等のポリアルキルシアノアクリル酸；ポリエチレンカーボネート又はポリプロピレンカーボネート等のポリカーボネート等が挙げられる。好ましくはポリエステル、更に好ましくはポリ乳酸又は乳酸-グリコール酸共重合体である。乳酸-グリコール酸共重合体を使用する場合、その組成比（乳酸/グリコール酸）（モル%）は徐放期間によって異なるが、例えば徐放期間が約2週間ないし3カ月、好ましくは約2週間ないし1カ月の場合には、約100/0乃至50/50が好ましい。該ポリ乳酸又は乳酸-グリコール酸共重合体の重量平均分子量は、一般的には約5,000乃至20,000が好ましい。ポリ乳酸又は乳酸-グリコール酸共重合体は、公知の製造法、例えば特開昭61-28521号公報に記載の製造法に従って製造できる。生体分解性高分子と活性型HGF蛋白質改変体の配合比率は特に限定はないが、例えば生体分解性高分子に対して、活性型HGF蛋白質改変体が約0.01～30質量%程度が好ましい。

#### 【0031】

また、吸入剤も製剤上の常套手段に準じて調製することができる。製剤中の活性型HGF蛋白質改変体含量は、剤形、適用疾患等に応じて適宜調整することができる。

噴霧剤も製剤上の常套手段によって調製することができる。噴霧剤として製造する場合、その噴霧剤に配合される添加剤としては、一般に吸入用製剤に使用される添加剤であればいずれのものであってもよく、例えば、噴射剤の他、上記した溶剤、保存剤、安定化剤、等張化剤、pH調整剤等を配合し得る。噴射剤としては、液化ガス噴射剤又は圧縮ガス等が挙げられる。液化ガス噴射剤としては、例えば、フッ化炭化水素（HFC22、HFC-123、HFC-134a、HFC142等の代替フロン類等）、液化石油又はジメチルエーテル等が挙げられる。圧縮ガスとしては、例えば、可溶性ガス（炭酸ガス、亜酸化窒素ガス等）又は不溶性ガス（窒素ガス等）等が挙げられる。

#### 【0032】

坐剤も慣用の基剤（例えば、カカオ脂、ラウリン脂、グリセロゼラチン、マクロゴール、ウイテップゾル等）を用いた製剤上の常法によって調製することができる。製剤化に際して、好ましくは安定化剤が添加され、さらに、本発明の製剤は製剤化に必要な添加物、例えば、賦形剤、溶解補助剤、酸化防止剤、無痛化剤又は等張化剤等を含んでいてもよい。

#### 【0033】

本発明の製剤は、その製剤形態に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、

10

20

30

40

50

本発明の製剤を注射剤の形態にして静脈、動脈、皮下又は筋肉内等に投与することができる。その投与量は、患者の疾患、症状、年齢又は体重等により適宜調整され得るが、例えば、成人に対し、通常HGFとして0.01mg～500mg、好ましくは0.05mg～100mgであり、さらに好ましくは0.05～50mg、とりわけ好ましくは0.05～20mgである。これを1日1回ないし数回に分けて投与するのが適当である。

#### 【0034】

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

なお、実施例で使用される各略号の意味は次の通りである。

HGF：肝細胞増殖因子

LB培地：Luria-Bertani培地

DMEM培地：ダルベッコ改変イーグル培地

Amp：アンピシリン

FCs：牛胎児血清

Tris：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン

Tween 80：ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレート

SDS：ドデシル硫酸ナトリウム

PAGE：ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

PVDF：ポリフッ化ビニリデン

A：アデニン

C：シトシン

G：グアニン

T：チミン

Ala：アラニン

Arg：アルギニン

Gly：グリシン

Gln：グルタミン

Lys：リジン

Thr：スレオニン

Leu：ロイシン

His：ヒスタミン

Tyr：チロシン

Pro：プロリン

また、%は特記しない場合は質量%を示す。

#### 【実施例1】

#### 【0035】

配列番号14に示されるHGF [5アミノ酸欠失・糖鎖欠損型ヒトHGF；天然型の鎖-鎖境界配列Arg(489位)-Val(490位)を有し、糖鎖付加部位に変異を有するHGF。；以下、HGF-NGと称する]をコードする塩基配列(配列番号15)の両端にBamHI認識配列(GGATCC)を含む塩基配列とXbaI認識配列(TCTAGA)を含む塩基配列を付与した後、これをpCDNA3.1(+ )ベクター(Invitrogen社製)のBamHIサイトとXbaIサイトの間に組み込んだ。得られたベクターをpCDNA-dHGF-NGと称する。

HGF-NGの鎖と鎖の境界にGenase I認識配列(His-Tyr)が導入された改変体として、該HGF鎖のC末端2残基(Leu-Arg)がHis-Tyrに変換された改変体(HGF-G1と称する)、該HGF鎖のC末端1残基(Arg)がTyrに、HGF鎖のN末端1残基(Val)がHisに変換された改変体(HGF-G2と称する)及び該HGF鎖のC末端6残基(配列番号14の第484-489位；Lys-Thr-Lys-Gln-Leu-Arg)がPro-Gly-Ala-Ala-His-Tyr(配列番号12)に変換された改変体(HGF-G3と称する)を以下

10

20

30

40

50

のように調製した。

まず、HGF-G1、HGF-G2、HGF-G3を発現させるためのベクターを作製した。このためには、上記のpCDNA-dHGF-NGをテンプレートとして、クンケル法によりHGFの鎖と鎖の境界をコードする領域の塩基配列に変異を導入し、この変異導入鎖を増幅させた。具体的には、HGF-G1を発現するベクターの調製のためには配列番号16のプライマー(5'-リン酸化)を、HGF-G2を発現するベクターの調製のためには配列番号17のプライマー(5'-リン酸化)を、HGF-G3を発現するベクターの調製のためには配列番号18のプライマー(5'-リン酸化)を用い、pCDNA-dHGF-NGをテンプレートとしてDNA polymeraseにKOD Plus(東洋紡績社製)を用いて変異導入鎖を伸長させ、増幅させた。その後、テンプレートDNAをDpnI処理により消化し、残った変異導入鎖を、塩化カルシウム法により作製した大腸菌DH5株のコンピテントセル(ニッポンジーン社製)にトランスフォーム(形質導入)することによって、変異ベクターを調製した。

【0036】

【表1】

プライマー	配列表
5'-CCAAAACGAAACAACACTATGTTGTAATGGGATTCCAACACG-3'	配列番号16
5'-CGAAACAATTGTATCACGTAATGGGATTCCAACACG-3'	配列番号17
5'-GTAATATCTTGTGCCCCAGGGCCGCACACTATGTTGTAATGG-3'	配列番号18

【0037】

LB/Ampプレート上でAmp耐性コロニーをピックアップし、得られた各クローンからQIAprep Spin Miniprep Kit(キアゲン社製)を用いて各変異ベクターを抽出した。各変異ベクターにおけるHGF-NGをコードする塩基配列を解析することによって、目的のクローンを選択した。具体的には変異ベクターにおける配列番号14に示されるHGFをコードする塩基配列部分について、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit(アプライドバイオシステム社製)を用いてシーケンス反応を行なった後、3100 Genetic Analyzer(アプライドバイオシステム社製)を用いて塩基配列の解析を行なった。それによってHGF-NGの鎖と鎖の境界部分に目的の変異導入を確認できたベクターを選択し、以後の実験に用いた。

配列番号16の変異プライマーを用いて配列番号14の第488-489位がLeu-ArgからHis-Tyrに置換されるように変異を導入したベクターはpCDNA-dHGF-NG-G1と称する。配列番号17の変異プライマーを用いて、配列番号14の第489-490位がArg-ValからTyr-Hisに置換されるように変異を導入した変異ベクターはpCDNA-dHGF-NG-G2と称する。配列番号18の変異プライマーを用いて、配列番号14の第484-489位がLys-Thr-Lys-Gln-Leu-ArgからPro-Gly-Ala-Ala-His-Tyrに置換されるように変異を導入した変異ベクターはpCDNA-dHGF-NG-G3と称する。

【0038】

次に、pCDNA-dHGF-NG及び各変異ベクター(pCDNA-dHGF-NG-G1、pCDNA-dHGF-NG-G2及びpCDNA-dHGF-NG-G3)をそれぞれヒト胎児腎細胞株293T細胞[DuBridge RB, et al., Molecular Cellular Biology, 7, 379-387 (1987)]にトランスフェクションした。トランスフェクションを行なうにあたり、293T細胞はダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)に牛胎児血清(FCS)を10容量%添加した培地で前培養した。トランスフェクションの直前にこのDMEM培地を無血清DMEM培地に交換し、LIPOFECTAMINE 2000(Invitrogen社製)を用いてリポフェクション法によってトランスフェクションを行った。トランスフェクション後も無血清DMEM培地で培養を継続し、トランスフェクションの6時間後にヘパリンを1µg/mLとなるように添加した。これを3日間培養し、各ベクターが産生するH

G F - N G 前駆体蛋白質又はH G F 前駆体蛋白質改変体 ( H G F - G 1 前駆体蛋白質 , H G F - G 2 前駆体蛋白質又はH G F - G 3 前駆体蛋白質 ) を無血清D M E M 培地中にそれぞれ蓄積させた。3日後にそれぞれ3枚のシャーレから培地を回収して混合し、0.22 μm フィルターで濾過した後、精製に供するまで - 80 で保存した。培地中に分泌されたH G F - N G 前駆体蛋白質、H G F - G 1 前駆体蛋白質、H G F - G 2 前駆体蛋白質又はH G F - G 3 前駆体蛋白質の濃度はE L I S A 法によって分析した。E L I S A 法は、イムニスキット ( 特殊免疫研究所製 ) を用い、キットに記載のプロトコルに従った。

上記の培地を解凍し、再度0.22 μm フィルターで濾過した後、50 mM T r i s - H C l ( p H 7 . 5 ) 、 0 . 0 1 % T w e e n 8 0 、 0 . 3 M N a C l で平衡化したHeparin Sepharose樹脂 ( Amersham Biosciences社製 ) を添加し、室温でH G F - N G 前駆体蛋白質、H G F - G 1 前駆体蛋白質、H G F - G 2 前駆体蛋白質又はH G F - G 3 前駆体蛋白質を樹脂に結合させた。樹脂を50 mM T r i s - H C l ( p H 7 . 5 ) 、 0 . 0 1 % T w e e n 8 0 、 0 . 3 M N a C l で洗浄後、50 mM T r i s - H C l ( p H 7 . 5 ) 、 0 . 0 1 % T w e e n 8 0 、 2 M N a C l でH G F - N G 前駆体蛋白質、H G F - G 1 前駆体蛋白質、H G F - G 2 前駆体蛋白質又はH G F - G 3 前駆体蛋白質を溶出させることにより、H G F - N G 前駆体蛋白質、H G F - G 1 前駆体蛋白質、H G F - G 2 前駆体蛋白質又はH G F - G 3 前駆体蛋白質を部分精製した。

#### 【 0 0 3 9 】

ヘパリン樹脂で部分精製したH G F - N G 前駆体蛋白質、H G F - G 1 前駆体蛋白質、H G F - G 2 前駆体蛋白質又はH G F - G 3 前駆体蛋白質 ( 各 2 0 0 n g ) に重量比 1 / 2 量 ( 1 0 0 n g ) のGenenase I ( New England Laboratory製 ) を加え、50 mM T r i s - H C l ( p H 7 . 5 ) 、 0 . 0 1 % T w e e n 8 0 、 2 M N a C l 中で25にて12時間処理した。なお、Genenase I 認識配列を挿入していない天然型の鎖 - 鎖境界配列を有するH G F - N G 前駆体蛋白質は、F C S を 1 容量 % の濃度で添加して50 mM T r i s - H C l ( p H 7 . 5 ) 、 0 . 0 1 % T w e e n 8 0 、 2 M N a C l 中で37にて12時間インキュベートした。

#### 【 0 0 4 0 】

Genenase I で処理した後に得られた各活性型H G F 蛋白質改変体 ( 活性型H G F - G 1 、 活性型H G F - G 2 又は活性型H G F - G 3 ) を還元条件下又は非還元条件下にてウエスタンブロットを行なった。ウエスタンブロットは、以下により行なった。

ウエスタンブロット : Genenase I で処理した後の活性型H G F - G 1 、 活性型H G F - G 2 又は活性型H G F - G 3 を還元条件下 ( 1 0 0 m M D T T の存在下 ) 又は非還元条件下でS D S - P A G E を行い、P V D F メンブレンに転写した。P V D F メンブレンに転写された蛋白質は、ヒトH G F をウサギに免疫することによって作製されたヒトH G F ポリクローナル抗体 ( Matsumoto K , et al . , Proceedings for National Academy of Science of the United States of America , 89 , 3800-3804 ( 1992 ) ) をプローブとして検出した。

#### 【 0 0 4 1 】

還元条件下でS D S - P A G E を行なった時のウエスタンブロットの結果を図1に示す。Genenase I 認識配列を挿入していない天然型の鎖 - 鎖境界配列を有するH G F - N G 前駆体蛋白質では、Genenase I 処理の有無でバンドの位置に変化はなく、いずれも一本鎖のH G F - N G 前駆体蛋白質の位置にバンドが認められた ( 図1 ; レーン 1 、 2 ) 。このことから、天然型の鎖 - 鎖境界配列を有するH G F - N G 前駆体蛋白質はGenenase I による切断を受けないことが確認された。一方、このH G F - N G 前駆体蛋白質にF C S を添加して37、12時間処理することにより、鎖と鎖の二本のバンドが検出され、活性型となったことが確認された ( レーン 3 ) 。Genenase I 認識配列を挿入したH G F - G 1 前駆体蛋白質、H G F - G 2 前駆体蛋白質及びH G F - G 3 前駆体蛋白質においては、いずれもGenenase I 非処理の場合は一本鎖のH G F - N G 前駆体蛋白質と同じ位置にバンドが認められた ( 図1 ; レーン 4 、 6 、 8 ) が、Genenase I 処理によりH G F - N G における鎖と鎖と同じ位置にバンドが検出されるようになり ( 図1 ;

10

20

30

40

50

レーン 5、7、9)、二本鎖に変換されたと考えられた。

【0042】

非還元条件下で SDS-PAGE を行なった時のウエスタンブロットの結果を図 2 に示す。天然型の鎖-鎖境界配列を有する HGF-NG 前駆体蛋白質は、活性化処理前に加えて FCS による活性化処理後も一本のバンドとして検出される(図 2; レーン 1, 3)。このことは、活性型 HGF-NG 構造は S-S 結合でつながっていることを意味している。HGF-NG は Genenase I 処理によっては活性化されず、その他の切断もないので、一本のバンドのままである(図 2; レーン 2)。Genenase I 認識配列を挿入した HGF-G1 前駆体蛋白質、HGF-G2 前駆体蛋白質及び HGF-G3 前駆体蛋白質においても、Genenase I 非処理(図 2; レーン 4, 6, 8)に加えて Genenase I 処理後の

10

【実施例 2】

【0043】

実施例 1 で調製した活性型 HGF-G1 又は活性型 HGF-G3 を還元条件下で SDS-PAGE を行い、PVDF メンブレンに転写した。PVDF メンブレンに転写された蛋白質を、クーマシーブリリアントブルー染色によって染色し、HGF 鎖に対応する 30 kDa のバンドを切り出した。アミノ酸シークエンサー(Applied Biosystems 社 Proci se 491 cLC)により N 末端アミノ酸の配列を解析した。HGF-G1 及び HGF-G3 の鎖と考えられるバンドの N 末端アミノ酸配列は共に VVNGI (Val - Val - Asn - Gly - Ile) であった。このことから、Genenase I 認識配列を導入した HGF 前駆体蛋白質改変体は、Genenase I 処理によって設計通りに Genenase I 認識配列の部分で切断されていることが確認された。

20

【表 2】

	アミノ酸配列	配列表
HGF	・・・CAKTKQLR↓VVNGI・・・	配列番号 14;482..494
HGF-G1	・・・CAKTKQHY↓VVNGI・・・	配列番号 19;482..494
HGF-G3	・・・CAPGAAHY↓VVNGI・・・	配列番号 20;482..494
HGF β 鎖	VVNGI・・・	配列番号 14;490..494
HGF-G1 β 鎖	VVNGI・・・	配列番号 19;490..494
HGF-G3 β 鎖	VVNGI・・・	配列番号 20;490..494

30

【実施例 3】

【0044】

イヌ腎臓上皮細胞 MDC K 株 [Montesano R, et al., Cell, 66, 697-711 (1991)] を DMEM 培地 (10 容量% FCS を含む) に懸濁して 24 well プレートに  $1 \times 10^4$  cells / well (480  $\mu$ L / well) で播き、ここに活性型 5 アミノ酸欠失型ヒト HGF 又は実施例 1 で調製した活性型 HGF-G1、活性型 HGF-G2 もしくは活性型 HGF-G3 を含む被検サンプル 20  $\mu$ L を添加し、37 °C で 20 時間培養した後、scatter の有無を顕微鏡で観察した(図 3)。被検サンプルは、該サンプル 20  $\mu$ L を培地に添加した後の 5 アミノ酸欠失型ヒト HGF、活性型 HGF-G1、活性型 HGF-G2 又は活性型 HGF-G3 の濃度が各々 2、5 又は 10 ng / mL となるように調製した。

40

Genenase I 認識配列を挿入した HGF-G1 前駆体蛋白質、HGF-G2 前駆体蛋白質及び HGF-G3 前駆体蛋白質は、いずれも Genenase I 処理をしない(図 3; -)と細胞遊走活性を示さなかったが、これらを Genenase I で処理した(図 3; +)後の活性型 HGF-G1、活性型 HGF-G2 及び活性型 HGF-G3 はいずれも、活性型 5 アミ

50

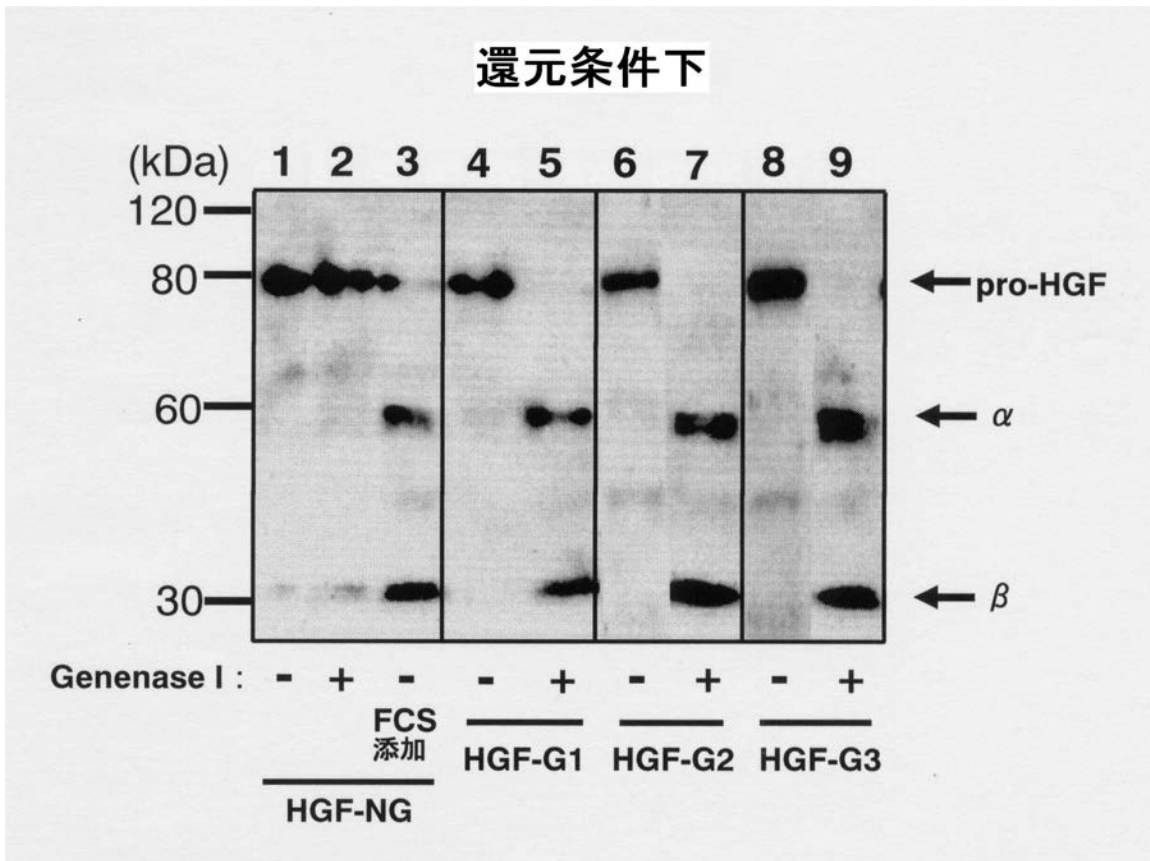
ノ酸欠失型ヒトHGFと同等の細胞遊走活性を示した。このことから、Genenase I 認識配列を挿入したHGF前駆体蛋白質改変体は、Genenase I で二本鎖構造に変換されることにより、HGF活性を有する活性型HGF蛋白質改変体になることが確認された。

【産業上の利用可能性】

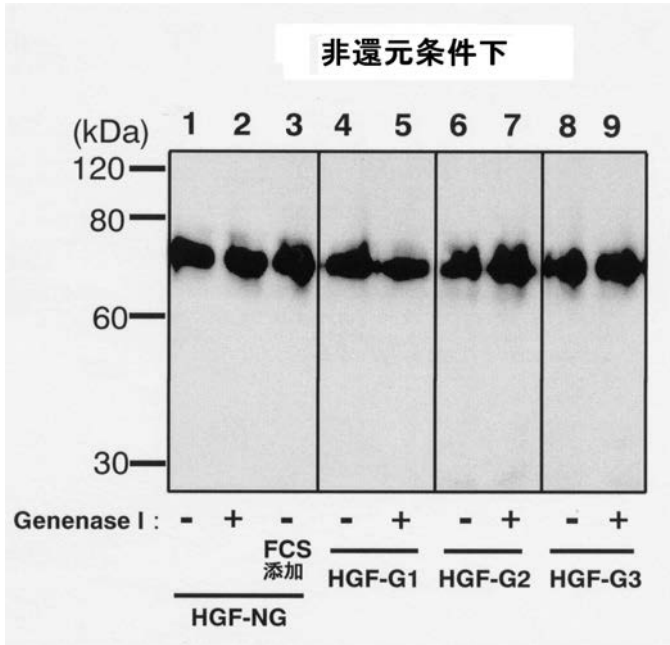
【0045】

本発明に係る活性型HGF蛋白質改変体は、HGFと実質的に同質の活性を有するのでHGFの代替医薬として有用である。

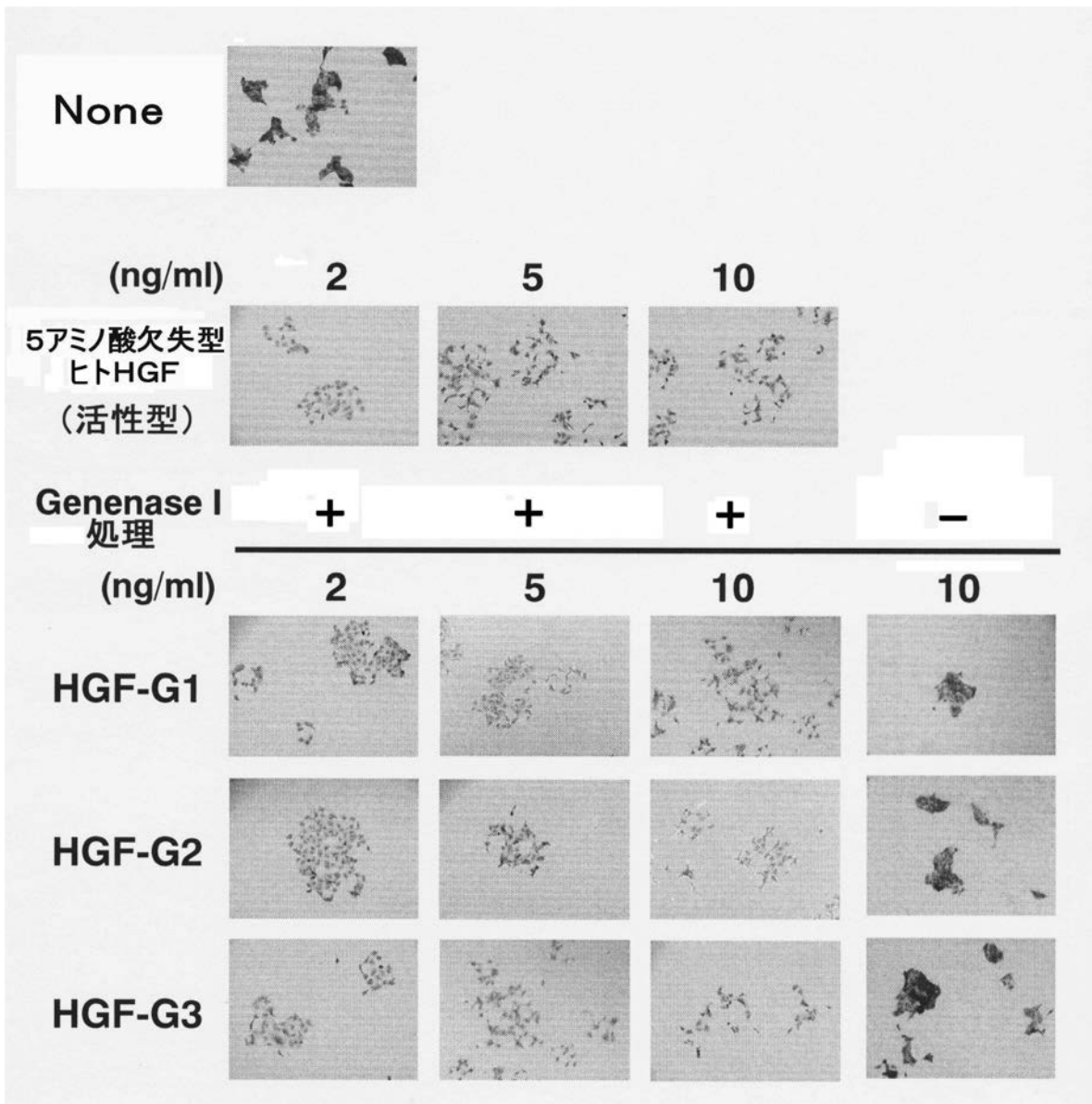
【図1】



【 図 2 】



【 図 3 】



**【配列表】**

005093783000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02
A 6 1 P	17/14 (2006.01)	A 6 1 P	17/14
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	7/04
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	31/06 (2006.01)	A 6 1 P	31/06
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04
A 6 1 P	19/10 (2006.01)	A 6 1 P	19/10
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	19/08 (2006.01)	A 6 1 P	19/08
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1

(72)発明者 福田 一弘

大阪府箕面市小野原東5-18-27 Tメゾン ロベリア202号

(72)発明者 安達 喜一

大阪府豊中市新千里東町1丁目5-3 千里朝日阪急ビル クリングルファーマ株式会社内

(72)発明者 早田 大真

大阪府豊中市新千里東町1丁目5-3 千里朝日阪急ビル クリングルファーマ株式会社内

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 特表2002-541813(JP,A)

特表2001-513631(JP,A)

実験医学,1990,8(3),p.250-5

Cytotechnology,1996,21(3),p. 279-88

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C07K 1/00-19/00

UniProt/GeneSeq

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CAPlus/BIOSIS(STN)

WPI