(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3805358号
(P3805358)
(45)発行日　平成18年8月2日(2006.8.2)　(24)登録日　平成18年5月19日(2006.5.19)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 14/745	(2006.01)	C07K	14/745	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B
A61K 38/43	(2006.01)	A61K	37/465	

請求項の数 13　(全 53 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平5-515136
(86)(22)出願日　平成5年2月23日(1993.2.23)
(65)公表番号　特表平7-507270
(43)公表日　平成7年8月10日(1995.8.10)
(86)国際出願番号　PCT/US1993/002034
(87)国際公開番号　WO1993/016709
(87)国際公開日　平成5年9月2日(1993.9.2)
審査請求日　平成12年2月18日(2000.2.18)
(31)優先権主張番号　841,591
(32)優先日　平成4年2月26日(1992.2.26)
(33)優先権主張国　米国(US)

微生物の受託番号　ATCC　68406
微生物の受託番号　ATCC　68407
微生物の受託番号　ATCC　HB10940

(73)特許権者　593052785
ザ　スクリップス　リサーチ　インスティテュート
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９２０３７　ラ　ジョラ　ノース　トーリー　パインス　ロード　１０５５０
(74)代理人　100059959
弁理士　中村　稔
(74)代理人　100067013
弁理士　大塚　文昭
(74)代理人　100065189
弁理士　宍戸　嘉一
(74)代理人　100084009
弁理士　小川　信夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】フォン・ウィルブランド因子の治療用ドメイン

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

配列番号１において、Tyr^{508}においてそのアミノ末端を有し、Glu^{700}～Val^{733}から選択される１つの残基においてそのカルボキシ末端を有し、Cys^{509}とCys^{695}がジスルフィド結合により共有結合で連結されていないアミノ酸配列からなる、血小板へのフォン・ウィルブランド因子の結合を阻害できるポリペプチド。

【請求項２】

請求項１に記載のグリコシル化ポリペプチド。

【請求項３】

Tyr^{508}～Val^{733}、Tyr^{508}～His^{709}、Tyr^{508}～Pro^{704}、及びTyr^{508}～Glu^{700}からなる群から選ばれる、請求項１に記載のポリペプチド。

【請求項４】

突然変異誘発、還元及び共有結合性標識の結合からなる群から選ばれる方法を使用して調製されたシステイン変異型である請求項１に記載のポリペプチド。

【請求項５】

請求項１に記載のポリペプチドをコードするＤＮＡ。

【請求項６】

請求項５に記載のＤＮＡを含有するクローニングビヒクル。

【請求項７】

請求項５に記載のＤＮＡを含有する発現プラスミド又はウィルス発現ベクター。

【請求項８】
請求項７に記載の発現プラスミド又はウィルス発現ベクターで形質転換された組換え宿主細胞。
【請求項９】
以下の工程を含む、請求項５に記載のコーディングＤＮＡからポリペプチドを産生させる方法。
(A)前記ＤＮＡを供給し；そして
(B)該ＤＮＡを適当なベクター内に挿入して、宿主細胞内で前記ポリペプチドの発現を行うことができる発現プラスミド又はウィルス発現ベクターを含む構築体を作成し；そして
(C)前記発現プラスミド又はウィルス発現ベクターで宿主細胞を形質転換し；
そして
(D)前記形質転換宿主細胞内で該ポリペプチドの発現を起こす条件下で該宿主細胞を培養する。
【請求項１０】
１以上の請求項１に記載のポリペプチド及び薬学的に許容できるキャリヤーを含む、血小板へのフォン・ウィルブランド因子の結合を阻害するための治療用組成物。
【請求項１１】
１以上の請求項１に記載のポリペプチド及び薬学的に許容できるキャリヤーを含む、血小板活性化及び／又は凝集を阻害するための医薬組成物。
【請求項１２】
１以上の請求項１に記載のポリペプチド及び薬学的に許容できるキャリヤーを含む、血管表面への血小板の付着を阻害するための医薬組成物。
【請求項１３】
１以上の請求項１に記載のポリペプチド及び薬学的に許容できるキャリヤーを含む、血栓症を阻害又は治療するための医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
関連出願との相互関係
本願は、１９９０年１１月１３日に出願された米国出願第０７／６１３，００４号及び１９９０年１０月１７日に出願された米国出願第０７／６００，１８３号の一部継続出願である、１９９１年１０月１７日に合衆国受理官庁に出願された合衆国を指定国とする出願番号第ＰＣＴ／ＵＳ９１／０７７５６号の一部継続出願である。前記出願第０７／６１３，００４号は、それ自身が１９９０年5月7日に出願された米国出願第０７／５１９，６０６号の一部継続出願である前記出願第０７／６００，１８３号の一部継続出願である。また、米国出願第０７／５１９，６０６号は、１９８８年１１月４日に出願され現時点では放棄された米国出願第０７／２７０，４８８号の一部継続出願であり、この米国出願第０７／２７０，４８８号は１９８６年5月３０日に出願され現時点では放棄された米国出願第０６／８６９，１８６号の一部継続出願である。
発明の分野
本発明は、血栓症の如き血管障害の治療に有用なポリペプチドに関する。本発明は、更に、組換えＤＮＡ統制（DNA-directed）法による薬学的に有用な量の本発明のポリペプチドの製造に関する。
“血流遮断”という用語は、血管の傷害によって起こる循環血液の損失に対する身体の防御メカニズムを含むプロセスのことをいう。血管障害への生理的応答として正常なプロセスは、アテローム硬化性血管疾患又は慢性うっ血性心不全を患っている患者における如き病的情況においては、望ましくない血栓（凝結塊）を形成し、その結果として血管閉塞をもたらし得る。そのような情況下での器官への血流の減少は、先進国における主要な死因である心筋梗塞を含む重い病的状態を将来し得る。
傷に応答して又は血管疾患状態の結果としての循環系内での血流の制限若しくは停止は複雑な一連の反応を包含しており、これらは２つのプロセス、つまり一次血流遮断及び二次血流遮断に分けることができる。一次血流遮断は、血小板凝固体又は軟質凝結塊形成のプ

ロセスに関連している。血小板は、巨核球由来の直径約２～５ミクロンの無核円板状構造体である。有効な一次血流遮断は、血小板付着、つまり下層のコラーゲン線維及び／又はプロテオグリカン及びグリコサミノグリカンの如き、血小板が結合する他の付着性巨大分子が露出した損傷を受けた血管内皮の表面と血小板との相互作用によってできる。
二次血流遮断は、該軟質血小板凝結塊の強化又は架橋を包含する。この二次プロセスは、傷又は血管疾患状態のいずれかに応答して一次血流遮断の間に活性化される血漿中を循環するタンパク質（凝固因子）によって開始される。これら因子の活性化により、結局、該軟質凝結塊を強化するタンパク質フィブリノーゲン（フィブリンと呼ばれる）のポリマー性マトリックスが生成する。
本発明は、抗血小板薬に関する。抗血小板薬には、血小板そのもの又はそれらと他の循環系成分との相互作用を変化させることによって一次血流遮断を抑制する薬品が含まれる。

報告された研究成果

具体的な抗血小板薬は、１又は幾つかのメカニズムにより作用する。最初の例は、血小板細胞質内のイオン化カルシウムの利用可能性を低下させ、それによって血小板の活性化及びその結果として生じる凝集を減じることを包含する。この戦略の代表例である医薬品にはプロスタサイクリンが含まれ、サイクリックＡＭＰの濃度に影響することによってカルシウム濃度に影響できるペルサンチン▲R▼（ジピリダモール）も含まれる。これら化合物の投与に関連する多数の副作用が報告されている。更なるクラスの抗血小板薬は、血小板内でのトロンボキサンA_2の合成を阻害して、血小板活性化応答を低下させることにより作用する。イブプロフェン、フェノールブタゾン及びナプスロキサン（napthroxane）の如き非ステロイド系抗炎症剤は、トロンボキサンA_2の前駆体の合成を触媒する特定のシクロオキシゲナーゼ酵素の競合的阻害によって類似の作用をもたらすことができる。類似の治療的作用が、トロンボキサンA_2を生成するのに必要なシクロオキシゲナーゼ酵素を非可逆的にアセチル化することが証明されているアスピリンの投与により誘導され得る。３番目の抗血小板メカニズムは、表面レセプター機能を妨害するように血小板膜に関係している。そのような薬剤の１つは、フィブリノーゲンと凝集の間に露出している血小板レセプターとの相互作用を減ずると考えられる、大きな分枝状ポリサッカライドであるデキストランである。デキストランは、腎臓に問題があるか又は心臓機能障害の病歴がある患者には禁忌である。治療用チクロピジンは、フォン・ウィルブランド因子及び／又はフィブリノーゲンと血小板表面上のそれらそれぞれのレセプターとの結合を抑制することによって、血小板付着及び凝集を阻害すると述べられている。しかしながら、チクロピジンは、特異性が不十分なので大量投与する必要があるため、臨床的な副作用を伴い得ることが分かった。
前述の医薬品は、身体には異種のものなので多数の臨床的副作用を起こし得、特に高い投与量が要求される場合は、かかる化合物が患者の生理学又は生化学の他の側面に関係するのを決して阻止することはできない。一定の血流遮断反応に対してかかる特異性を有し、患者に副作用をもたらすような量よりもずっと少ない低い投与量で患者に投与できる医薬品を提供することが望ましいであろう。
血流遮断プロセスの天然成分由来の治療薬の代表である医薬品の例は、ＥＰＯ公開番号３１７２７８に記載されている。この公報は、血小板膜糖タンパク質Ｉｂのα鎖のアミノ末端領域又はそのサブフラグメントを含む治療用ポリペプチドを患者に投与することにより、患者の血栓症を抑制する方法を開示している。
本発明は、血流遮断メカニズムのタンパク質の１種であるフォン・ウィルブランド因子由来の抗血栓症ポリペプチドを提供することに向けられている。

本発明の要旨

本発明によれば、血小板へのフォン・ウィルブランド因子（ｖＷＦ）の結合を阻害できるポリペプチドであって、
(A)凡そCys^{509}においてそのアミノ末端を有し凡そCys^{695}においてそのカルボキシ末端を有する成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニットのフラグメントのアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列から本質的になるドメイン（以下、“(A)ドメイン”という）

を含むポリペプチド；
(B)前記(A)ドメインと、凡そＡｒｇ^{441}においてそのアミノ末端を有し凡そＴｙｒ^{508}においてそのカルボキシ末端を有する成熟ｖＷＦサブユニットのフラグメント、又はそのサブフラグメント又はサブフラグメントの組み合わせのアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列から本質的になる(A)ドメインに共有結合した“第２ドメイン”とを含み、前記２つのドメインが前記第２ドメインのカルボキシ末端と前記(A)ドメインのアミノ末端の間で共有結合により連結されているポリペプチド；及び
(C)前記(A)ドメインと、凡そＡｓｐ^{696}においてそのアミノ末端を有し凡そＶａｌ^{733}においてそのカルボキシ末端を有する成熟ｖＷＦサブユニットのフラグメント、又はそのサブフラグメント又はサブフラグメントの組み合わせのアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列から本質的になる(A)ドメインに共有結合したもう１つのドメイン（以下、“他のドメイン”という）とを含み、前記２つのドメインが前記(A)ドメインのカルボキシ末端と前記他のドメインのアミノ末端の間で共有結合により連結されているポリペプチド
からなる群から選ばれるポリペプチドが提供される。
本発明の代表的なポリペプチドは、
(A)凡そＴｙｒ^{508}においてアミノ末端を有し凡そＡｓｐ^{696}においてカルボキシ末端を有するポリペプチド；及び
(B)凡そＴｙｒ^{508}においてアミノ末端を有し凡そＰｒｏ^{704}においてカルボキシ末端を有するポリペプチドである。
本発明のポリペプチドを提供する好ましい方法は、
(A)コーディングＤＮＡ配列を供給し；そして
(B)該ＤＮＡ配列を適当なベクター内に挿入して、発現プラスミド又はウィルス発現ベクターを含む構築体であって宿主細胞内で前記ポリペプチドの発現を行うことができる構築体を作成し；そして
(C)前記発現プラスミド又はウィルス発現ベクターで宿主細胞を形質転換し；そして
(D)前記形質転換宿主細胞内で該ポリペプチドの発現を起こす条件下で該宿主細胞を培養することを含む。
本発明のもう１つの側面は、治療有効量の１又は２以上の本発明のポリペプチド及び薬学的に許容できるキャリヤーを含む治療用組成物を提供することである。
本発明のなおもう１つの側面は、有効量の１又は２以上の本発明の治療用組成物を患者に投与することを含む患者の血栓症を抑制又は治療する方法を提供することである。

【図面の簡単な説明】

図１は、残基４３１と残基７５０の間の成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニット（ヒト）のこれまでに報告されたアミノ酸及びＤＮＡ配列を示す。
図２は、本発明の幾つかのポリペプチドを示す。
図３は、ＧＰＩｂαに向けられた抗体の血小板への結合を阻害する、ｖＷＦ由来ポリペプチドの酸化型及び還元型の相対能力を示す。

定義

特に断らない限り、以下の用語は以下に示した意味を有する。
コーディング配列（エンコーディングＤＮＡ）－適当な読み取り枠内で、タンパク質のアミノ酸をコードするＤＮＡ配列。本発明の目的のためには、コーディング配列の合成又は使用は、トリペプチドNH_2－ａｒｇ－ｇｌｙ－ｇｌｙ－CO_2Hを“エンコード”する５'－ＣＧＧ・ＧＧＡ・ＧＧＡ－３'／３'－ＧＣＣ・ＣＣＴ・ＣＣＴ－５'により示されるように、対応する相補鎖の合成又は使用を必ず包含する。一本鎖の説明又は特許請求は、当該技術分野の実情において適当であるか、有用であるか又は必要である場合は、その一方の鎖及び二本鎖相当物を言及又は特許請求しているとみなされる。
ｃＤＮＡ－ｍＲＮＡ鋳型内に存在する配列から酵素的に合成されたＤＮＡ分子又は配列。
転写鎖－そのヌクレオチド配列がＲＮＡポリメラーゼにより３'から５'へと読み取られてｍＲＮＡが生成するところのＤＮＡ鎖。この鎖を非コーディング鎖ともいう。
コーディング鎖又は非転写鎖－この鎖は、転写鎖のアンチパラレル相補鎖であって、転写

鎖から生成したｍＲＮＡのものと（該ｍＲＮＡのウラシル塩基の代わりに）チミン塩基が存在する以外は同一の塩基配列を有する。それは、ｍＲＮＡのように、及び５'から３'へと吟味したときに、翻訳のためのコドンが直接に認識され得るので“コーディング”と言われる。

生物活性－生物学的関連体内（即ち、生物内又はin vitro複写体内）の分子により行われ又は生じる１又は２以上の機能、作用又は活性、成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニットの５２／４８ｋＤａモノマー性フラグメントの特徴的な生物活性は、ただ１種の血小板ＧＰＩｂレセプターにだけ結合し、それによって該分子が血小板へのマルティマー性ｖＷＦのボトロセチン（botrocetin）誘発結合を阻害できるようにする潜在的能力である。未ダイマー化５２／４８ｋＤａ種の他の結果として生じる又は関連する作用には、血小板活性化、凝結又は表面への付着の阻害、及び血栓症の抑制が含まれる。

還元条件－フォン・ウィルブランド因子、又はそれから誘導されたポリペプチドを含有する溶液中に“還元”剤が存在していることをいい、この物質はｖＷＦのジスルフィド結合の分裂を起こす。

プロモーター－遺伝子の転写を促進するその遺伝子から上流のＤＮＡ配列。

クローニングビヒクル（ベクター）－宿主細胞内で複製できるプラスミド、ファージＤＮＡ又は他のＤＮＡ配列であって、典型的には、かかるＤＮＡ配列を、該ＤＮＡの本質的な生物学的機能、例えば、複製、外皮タンパク質の産生の付随する損失又はプロモーター若しくは結合部位の如き発現制御領域の損失を伴うことなく異種ＤＮＡの挿入のために確認可能な様式で切断する１又は少数のエンドヌクレアーゼ認識部位によって特徴付けられ、それで形質転換された宿主細胞の同定に用いるのに適する選択可能な遺伝子マーカー、例えば、テトラサイクリン耐性又はアンピシリン耐性を含有することができるもの。

プラスミド－無傷の“レプリコン”を含有する非染色体性二本鎖ＤＮＡ配列。その結果、該プラスミドは宿主細胞内で複製される。該プラスミドを原核又は真核宿主細胞内に入れると、該プラスミドのＤＮＡのためにその細胞の特徴が変化（又は形質転換）され得る。例えば、テトラサイクリン耐性（Ｔｅｔ^{R}）の遺伝子を保有するプラスミドは、それまでテトラサイクリンに感受性であった細胞をそれに耐性である細胞に形質転換する。プラスミドによって形質転換された細胞を“形質転換体”と呼ぶ。

発現プラスミド－フォン・ウィルブランド因子構造遺伝子の如きクローン化されるべきＤＮＡがその中に挿入されたプラスミド。そこに挿入されたＤＮＡ配列は、それから生成するｍＲＮＡの翻訳を制御する配列も含有してよく、前記発現プラスミドの組み立てを容易にした制限エンドヌクレアーゼ部位を含有してもよく、そして前記発現プラスミドの更なる修飾を容易にすることもできる。発現プラスミドは、宿主細胞内で、コードされるポリペプチドの発現を行うことができ、通常はコードされる構造遺伝子のＤＮＡ配列から上流に転写プロモーターを含有する。発現プラスミドは、宿主染色体ＤＮＡ内に組み込まれても組み込まれなくてもよい。本発明の目的のためには、組み込まれたプラスミドを、それとは関係なく発現プラスミドという。

ウィルス発現ベクター－ウィルス発現ベクターは、天然の生物学的プロセスにより細胞を形質移入できるウィルス粒子内にＤＮＡを包み込むことができることを除いては、発現プラスミドと同じである。

下流－構造遺伝子の転写鎖のヌクレオチドは、そのヌクレオチドが該遺伝子のより早い部分より後にＲＮＡポリメラーゼによって正常に読み取られるのなら、該遺伝子のその部分より下流であると言われる。非転写鎖のその相補的ヌクレオチド、又は該ＤＮＡの二本鎖型内の該対応する塩基対も下流と呼ばれる。

更に、構造遺伝子内での転写の方向及び翻訳の方向を参考にすると、該遺伝子に対して上流（又は５'）に付加される制限エンドヌクレアーゼ配列は、それが該タンパク質のアミノ末端をコードする配列の前に付加されることを意味すると共に、該構造遺伝子に対して下流（又は３'）に作られる修飾は、それがそのカルボキシ末端コーディング領域の向こう側になることを意味している。

フォン・ウィルブランド因子（ｖＷＦ）－フォン・ウィルブランド因子への全ての言及は

ヒトのｖＷＦに言及していると理解されるべきである。“フォン・ウィルブランド因子”という用語は、このすぐ下に定義するいずれかの及び全ての用語をその範囲内に含めることを意図している。
更に、フォン・ウィルブランド因子は、内皮下マトリックスの成分として、活性化された血小板により分泌されるα顆粒の成分として、及び循環血液血漿タンパク質として見出される。ｖＷＦの三次元サブユニット構造又は多サブユニット構造は、例えば、グリコシル化の相違によって起こる可能性があるこれら異なる情況内で変動することが可能である。かかる相違は、有用な治療用ｖＷＦ由来ポリペプチドを本発明の実施により内皮細胞又は巨核球のｖＷＦ ＤＮＡ配列から産生させるのを妨げない。
更に、本発明の実施に際して操作され又は他の方法で用いられる現実のＤＮＡ及びポリペプチドとここで報告されるアミノ酸又はそのヌクレオチドの構造配列の間には、僅かな生物学的に重要でない相違があってもよい。本発明は、かかる生物学的に重要でないあらゆる変化を包含すると理解される。
プレプロｖＷＦ－フォン・ウィルブランド因子は、広範な翻訳後プロセシングを受ける。“プレプロｖＷＦ”は、（Ｎ末端からＣ末端までに）約２２アミノ酸残基からなるシグナルペプチド、約７４１アミノ酸のプロペプチド、及び循環ｖＷＦの約２，０５０残基を含有する。
プロｖＷＦ－シグナルペプチドがプレプロｖＷＦから除かれたもの。
成熟ｖＷＦ－血漿中に見出されるか又は内皮下層に結合した循環ｖＷＦ。それは、ポリペプチドモノマーの集団であって一般に各サブユニットの長さが２，０５０残基である多種のそのマルティマーに会合しているものからなる。更に、哺乳動物細胞内で発現された場合、成熟ｖＷＦは通常グリコシル化されている。
シグナルペプチド（配列）－シグナルペプチドは、翻訳されたばかりのポリペプチド内のアミノ酸の配列であって、小胞体の膜を通過して細胞の分泌経路内へ該ポリペプチドを移行させる信号を送る配列である。シグナルペプチドは、典型的には、タンパク質の始点（アミノ末端）に存在し、２０～４０アミノ酸長でありその中央に約５～１５の一続きの疎水性アミノ酸を有する。典型的には、シグナル配列は、小胞体内への移行の過程で又はそのすぐ後に、そのタンパク質からタンパク質分解により切断される。シグナルペプチドをコードする遺伝子又はｃＤＮＡのその部分をシグナル配列と言ってもよい。
表１は、本願で用いるアミノ酸の標準的な３文字表記を記すものである。

表 1

アラニン	Ａｌａ
システイン	Ｃｙｓ
アスパラギン酸	Ａｓｐ
グルタミン酸	Ｇｌｕ
フェニルアラニン	Ｐｈｅ
グリシン	Ｇｌｙ
ヒスチジン	Ｈｉｓ
イソロイシン	Ｉｌｅ
リシン	Ｌｙｓ
ロイシン	Ｌｅｕ
メチオニン	Ｍｅｔ
アスパラギン	Ａｓｎ
プロリン	Ｐｒｏ
グルタミン	Ｇｌｎ
アルギニン	Ａｒｇ
セリン	Ｓｅｒ
スレオニン	Ｔｈｒ
バリン	Ｖａｌ
トリプトファン	Ｔｒｐ
チロシン	Ｔｙｒ

発明の詳細な説明

ここに開示又は言及するヌクレオチド及びアミノ酸配列について、３７ＣＦＲ§１．８２１（ｃ）に従う“配列表”を添付し、本願の一部とする。

“ペプチド”及び“ポリペプチド”という用語は、ここでは互換可能なものとして用いる。

上記のように、本発明の抗血栓性ポリペプチドは、天然に存在するタンパク質であるフォン・ウィルブランド因子（以下“ｖＷＦ”という）のフラグメントに基づいている。背景を明らかにするために、このタンパク質及び血流遮断と血栓症におけるその役割に関する情報を以下に示す。

血流遮断及び血栓症におけるｖＷＦの役割の説明

ｖＷＦは、血管傷害の間の正常な血流遮断において重要な役割を果たし、病んでいる血管内での急性血栓性閉塞症の病因においても中心的重要性を有している。これら両方の役割は、冒された部位に結合して架橋するように誘導されるｖＷＦと血小板との相互作用を包含する。まず、単独の血小板がトロンボゲン形成表面に付着した後に活性化されると考えられる、つまり血小板内での主要な代謝変化と有意な形態学的変化を含むプロセスである

。活性化は、フォン・ウィルブランド因子（一種の付着性タンパク質）の如き付着性物質を含有する血小板収容顆粒(platelet storage granule)の放出、及び血小板表面上での更なる機能性付着部位の発現によって証明される。一旦、活性化されると、正常な血流遮断の一部として血小板細胞が凝集する、つまり血小板細胞と更なるタイプの付着性タンパク質との広範な架橋を包含するプロセスである。
上で述べたように、これらプロセスは、血管障害に対する生理的対応としては正常である。しかしながら、それらは、病んでいる血管における如き病的情況において望ましくない血小板血栓の形成をもたらして血管閉塞を生じ得る。
血管内での血小板の堆積を阻止するのに望ましい他の情況には、拍動を妨げて治療すること及び動脈移植片の閉塞を妨げることが含まれる。外科手術の間の血小板血栓形成も、先在する血管障害物を除去しようとする試みを妨害し得る。
損傷した又は病んでいる血管への血小板の付着は、特殊化した付着性分子と相互作用する特異的な血小板膜レセプターが関係するメカニズムにより起こる。かかる血小板レセプターの１つは、２つの細胞膜内タンパク質、つまり糖タンパク質Ｉｂ（ＧＰＩｂ）と糖タンパク質ＩＸ（ＧＰＩＸ）の非共有結合体からなる糖タンパク質Ｉｂ－ＩＸ複合体である。このＧＰＩｂ－ＩＸ複合体の付着性リガンドが、内皮下マトリックスの成分として、活性化された血小板により分泌されるα顆粒の成分として、及び循環血液血漿タンパク質としても見出されるタンパク質フォン・ウィルブランド因子である。ＧＰＩｂ－ＩＸレセプターへのｖＷＦの現実の結合部位は、糖タンパク質Ｉｂのα鎖のアミノ末端領域上に位置している。この完全長α鎖を“ＧＰＩｂ（α）”ともいう。
マルティマー性ｖＷＦと糖タンパク質Ｉｂ－ＩＸ複合体との（ＧＰＩｂ（α）での）相互作用が、血小板の活性化をもたらして、今まさに成長しようとする血栓に更に血小板が加わるのを促進すると考えられる。急速に蓄積する血小板は、血小板糖タンパク質IIｂ－IIIａレセプター部位におけるフィブリノーゲンの結合によっても、及びおそらくはこれら部位及び／又は更にＩｂ－ＩＸレセプター部位におけるｖＷＦによっても架橋（凝集）される。加えて、糖タンパク質IIｂ／IIIａレセプターも、血小板の初期の単層の形成に関与し得る。このプロセスにおいて特に重要なのは、循環ｖＷＦのマルティマー性及び多価性である。これは、該巨大分子がその結合機能及び架橋機能を効果的に果たせるようにしている。
患者の血小板上のＧＰＩｂαレセプターを不活性化し、それによってｖＷＦの結合能力及び架橋能力を阻害することは、血栓症の治療又は抑制にとって医学上非常に重要な事柄であろう。従って、本発明は、この事柄を達成するのに有効なポリペプチドの開発に関する。

ｖＷＦの構造に関する情報及びそれから誘導される治療剤のデザイン

血小板膜糖タンパク質Ｉｂ－ＩＸレセプター（ＧＰＩｂ（α））に結合するフォン・ウィルブランド因子サブユニットのドメインを、ｖＷＦのフラグメント内に同定した。このフラグメントは、トリプシン消化した後にジスルフィドを還元することにより生成させることができ、循環サブユニットの凡そ残基４４９（バリン）からその凡そ残基７２８（リシン）までに及ぶ。現時点で存在する証拠は、このセグメントがコラーゲン及びプロテオグリカンの如き内皮下層の成分に対する結合ドメインも（残基５０９と残基６９５の間に）含有していることを示している。もっとも、これら物質を認識するには成熟ｖＷＦサブユニットの他の領域がより重要であるかも知れない（追加のプロテオグリカン又はヘパリン結合部位は該成熟サブユニットの残基１～２７２に位置しており、追加のコラーゲン結合部位はその残基９１０～１１１０内に位置している）。
図１（配列番号：１（配列番号：１５も参照のこと））は、残基４３１と残基７５０の間の成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニット（ヒト）のこれまでに報告されたアミノ酸配列及びＤＮＡ配列を示している。トリプシン消化により生成した５２／４８ｋＤａフラグメントは、残基４４９（バリン）でアミノ末端を有し、凡そ残基７２８（リシン）にまで及ぶ。アミノ酸は標準的な３文字表記法で示している。ＤＮＡ配列は、コーディング鎖（非転写鎖）によって表している。５２／４８ヒト配列では、位置７０９におけるヒス

チジン／アスパラギン酸という１つの有意な例外があるが、多型現象は殆ど報告されていない。マンキュソ（Mancuso,D.J.）ら，J.Biol.Chem.,263(33),19514-19527,表Ｖ，(1989)を参照のこと。以下の実施例部分に記載した実験で用いたＤＮＡ配列は、残基７０９にアスパラギン酸コドン（コドンＧＡＣ）を含有する。もっとも、残基位置７０９にヒスチジン（ヒトの配列において他に知られているこの位置で天然に存在するアミノ酸，コドンＣＡＣ）を配置するのも本発明の実施に際して有用である。

本発明の治療用抗血栓性ポリペプチドに関して、ｖＷＦに関する以下の情報は特に興味深い。

血小板糖タンパク質Ｉｂ（α）の結合活性を有しかつ約１１６，０００（１１６ｋＤａ）分子量の成熟フォン・ウィルブランド因子のフラグメントは、ｖＷＦをトリプシンで消化することによって単離される。この１１６ｋＤａフラグメントをジスルフィド結合を切断することができる還元剤で処理すると、同一フラグメントのペアが生成する。（２つ併せて１１６ｋＤａポリペプチドを含む）この同一フラグメントのそれぞれは、約５２，０００（５２ｋＤａ）の見掛け分子量を有する。（ポリペプチドの分子量は、典型的には、変性ゲル電気泳動システムにおいてスタンダードと比較した移動度によって測定する。得られる値は凡その値に過ぎない。）

典型的には、５２，０００分子量フラグメントは、ヒト酵素系が該フラグメントをグリコシル化してその分子量に寄与するいう事実を反映して“５２／４８”フラグメントと言われる。グリコシル化の量は分子によって２種の重量で変動し、５２，０００と４８，０００が最も普通である。

５２／４８フラグメントは、そのアミノ末端として成熟サブユニットの残基４４９（バリン）を有し、そのカルボキシ末端として残基７２８（リシン）を有する。グリコシル化による重量増加がなければ、例えば、匹敵するフラグメントが組換え細菌細胞から発現されるというような場合には、このポリペプチドは約３８，０００の分子量を有することになろう。

５２／４８フラグメントは、血小板へのフォン・ウィルブランド因子の結合を競合的に阻害することが証明された。しかしながら、５２／４８フラグメント又はその未グリコシル化３８ｋＤａ等価物の操作は難しいことが分かった。該フラグメントをうまく操作するには、典型的には、そのシステイン残基を還元して永久的にアルキル化することが必要であった。この処理をしないと、システイン残基の望ましくない反応が必ず起こって、治療剤として有効に使用するのに適さない不溶性で生物学的に不活性なポリペプチド凝集体の生成をもたらす。

血小板糖タンパク質Ｉｂ（α）結合ドメインを含有する成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニットの残基４４９～７２８フラグメントは、位置４５９、４６２、４６４、４７１、４７４、５０９及び６９５でシステイン残基を有することが知られている。成熟ｖＷＦサブユニットの全てのシステイン残基がジスルフィド結合に関与していることも知られている。（レガッツ（Legaz）ら，J.Biol.Chem.,248,3946-3955(1973)）。

マルチ（Marti,T.）ら，Biochemistry,26,8099-8109(1987)は、最終的に、鎖内ジスルフィド結合に関与するものとして成熟サブユニット残基４７１と４７４を同定した。更に、残基５０９と６９５をジスルフィド結合に関与するものとして同定した。もっとも、このペアリングが、鎖内であるか鎖間（即ち、同じ成熟ｖＷＦサブユニット内）であるかは証明されなかった。

モウリ（Mohri,H.）ら，J.Biol.Chem.,263(34),17901-17904(1988)は、ホルマリン固定血小板への^{125}Ｉ標識マルティマー性ｖＷＦのリストセチン(ristocetin)誘導結合を４４９～７２８サブユニットフラグメントのペプチドサブフラグメントで阻害した。長さが１５残基のペプチドサブフラグメントが合成され試験された。２つの別々の領域、つまりＬｅｕ^{469}～Ａｓｐ^{498}とＧｌｕ^{689}～Ｖａｌ^{713}内に含まれるか又はそれらとオーバーラップしているサブユニット配列に相当するペプチドが、活性であることが分かった。

モウリは、ｖＷＦのＧＰＩｂ（α）結合ドメインは、天然ｖＷＦ内に正確なコンフォメーションで維持されている２つの不連続配列Ｃｙｓ^{474}～Ｐｒｏ^{488}とＬｅｕ^{694}～Ｐｒｏ^{708}

内に含まれる残基によって形成されていると結論付けた。もっとも、この著者らは、その安定化結合を形成するシステイン残基を同定すること及びその結合が鎖内であるか鎖間であるかを明らかにすることはできなかった。
本発明は、血栓症の如き血管障害の治療に有用な成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニットの残基４４９～７２８領域由来のポリペプチドを提供する。
かかる分子は、凡そ残基４４１（アルギニン）から凡そ残基７３３（バリン）までのアミノ酸配列を本質的に含む成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニットのフラグメントをコードするＤＮＡ、又は前記アミノ酸配列のいずれかのサブセット、又は匹敵する野性型アミノ酸配列よりも少ないシステイン残基を含有する突然変異型ポリペプチドフラグメント、又はそのサブセットをコードするＤＮＡから最も効率的に作ることができる。該分子を調製するのに好ましい方法は、前記フォン・ウィルブランド因子サブユニットの部分をコードする突然変異型ＤＮＡ配列を含有する生物学的に機能性の発現プラスミドで形質転換された宿主生物を、突然変異型フォン・ウィルブランド因子フラグメント又はそのサブセットを該宿主生物によって発現する条件下で培養すること、及びそれから前記フラグメントを回収することを含む。
ｖＷＦ ＤＮＡ内のシステインコドンをジスルフィド結合することのできないアミノ酸をコードするコドンに突然変異誘発する好ましい手段は、クンケル(Kunkel,T.A.),Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,82,488-492(1985)の部位特異的突然変異誘発法に基づく。次いで、かかる突然変異型ＤＮＡ配列を組換え型細菌又は組換え型真核宿主細胞系のいずれかから発現させる。

本発明の第１態様

本発明のこの態様の重要な側面は、宿主発現細胞の封入体（又は封入体溶解操作からの生成物）内での望ましくないジスルフィド結合によって起こる凝集及び変性の傾向がこれまでの製剤よりも少ない前記ｖＷＦ由来ポリペプチドの組成物を提供することである。この開発には、前記ポリペプチド内に存在するシステイン残基の数を制限するために突然変異誘発法を用いる。

成熟サブユニット残基４４９～７２８領域をコードするｖＷＦ ＤＮＡの突然変異誘発

システインコドンを他のアミノ酸のコドンに変えるのに用いることのできる種々の分子生物学的技術が利用可能である。適する技術には、ポリメラーゼ連鎖反応を用いる突然変異誘発法、間隙二連（gapped-duplex）突然変異誘発法、ヌクレオチドの一箇所が異なるＤＮＡ分子へのオリゴヌクレオチドの差別的(differential)ハイブリダイゼーション法が含まれる。適するコドン変換技術を再吟味するには、ライク（Kraik,C.）“部位特異的突然変異誘発法のためのオリゴヌクレオチドの使用”, Biotechniques,Jan/Feb 1985の１２頁を参照のこと。
この態様の実施に際しては、クンケル, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,82,488-492(1985)の部位特異的突然変異誘発法を用いるのが好ましい。この操作は、まずウラシル含有ＤＮＡ鋳型を作ってからそれに対して選択する一連の工程を利用する。本発明の実施例１は、突然変異型ｖＷＦｃＤＮＡを作成するのに用いる突然変異誘発法を詳しく説明している。
部位特異的突然変異誘発法を開示している他の刊行物は、ギース（Giese,N.A.）ら, Science,236,1315(1987)；米国特許第４，５１８，５８４号；及び米国特許第４，９５９，３１４号である。
この態様の実施に際しては、野生型ＤＮＡ配列コドンの１又は２以上のシステインコドンを１又は２以上の次のアミノ酸のコドンに置換することも好ましい：アラニン、スレオニン、セリン、グリシン、及びアスパラギン。アラニン及びグリシンコドンとの置換が最も好ましい。何れかの特定のコドンへの置換の選択は、一般に、何れかの他の位置での適当な置換の選択と独立している。
以下は、例としてシステイン残基４５９を用いて行うことのできるコドン置換のタイプの代表例である：
（Ａ）システイン４５９のコドンをグリシンのコドンで置換する；又は
（Ｂ）システイン４５９のコドンを２又は３以上のコドンにより置換する、例えば、セリ

ンの１コドンとグリシンの１コドンにより置換すると新たなアミノ酸配列－Ｈｉｓ^{458}－Ｓｅｒ$^{459(a)}$－Ｇｌｙ$^{459(b)}$－Ｇｌｎ^{460}が生成する；又は
（Ｃ）システイン４５９のコドンをｃＤＮＡから欠失させる、そのように欠失させると、－Ｈｉｓ^{458}－Ｇｌｎ^{460}により表される短縮したアミノ酸配列が生成する；又は
（Ｄ）システイン残基４５９に隣接する残基の１又は２以上のコドンを、－Ｇｌｎ^{457}－Ｇｌｎ^{460}により表されるように、コドン４５９と一緒に欠失させる。
標的システイン残基の一次、二次、三次及び四次環境に依り、本発明の実施には、アラニン、スレオニン、セリン、グリシン又はアスパラギン以外のアミノ酸のコドンも有用であると考えられる。
本発明の実施に際しては、４４９～７２８トリプシンｖＷＦサブユニットフラグメントの何らかの特定のシステイン残基の代わりとして、該システイン位がその中に位置している野生型アミノ酸配列サブセグメントの（αヘリックス又はβシートの如き）第二構造に最小限の乱れだけを起こして該システイン位に収まることができるアミノ酸に置換することが望ましいと考えられる。本発明の実施に際しては、アラニン、スレオニン、セリン、グリシン及びアスパラギンも概して満足の行くものであろう。というのは、それらはシステインのように、中性に荷電しておりかつ小さな又は比較的小さな側鎖を有しているからである。
何れのタイプのタンパク質の構造ドメイン（αヘリックス、βシート、又はランダムコイル）内に特定の種のアミノ酸を最もよく見出せそうか予見することを目的にかなりの研究を行った。セリンは、システインの大きさ及び極性に最も近いので、αヘリックス及びβシートを壊さないと考えられることから、本発明の実施に際して用いるのに好ましいアミノ酸である。
例えば、チョウ（Chou,P.Y.）ら，Biochemistry,13(2),211-222(1974)及びチョウら“Prediction of Protein Conformation,”Biochemistry,13(2),222-244(1974)を参照すると、置換用アミノ酸の選択に有用な更なる情報が得られる。チョウらは、特定のポリペプチド配列セグメントの第二構造を、その中のアミノ酸の何れの種が、例えば、αヘリックス領域の中心に見出されそうであるか、及びその残基の何れがヘリックスゾーンの広がりを終結して境界残基又はヘリックス切断基になりそうであるかを決めるための規則に基づいて予見した。チョウらの前記文献の２２３頁によれば、システインと、スレオニン、セリン及びアスパラギンのグループは、かかる領域の切断基又は形成基であるにも拘らず、αヘリックス構造に無関係であることが見出されている。かくして、スレオニン、セリン及びアスパラギンは、潜在的な標的システインがその中に位置しているであろうαヘリックス領域を乱さなさそうである。同じく、グリシン、アラニン及びセリンは、β領域の形成に多少無関係であることが分かった。セリン、スレオニン及びアスパラギン残基は新たなグリコシル化部位に相当する可能性があり、このことがそれらをグリコシル化を受ける分泌タンパク質の一定の位置において潜在的に不適当な置換用残基にすることが注目される。
一般に、適するアミノ酸置換を選択することに関連して考慮に入れなければならない事柄は、意図する置換がそのフラグメントの第三構造に逆の影響を有するか否かである。かくして、他のアミノ酸が、該新たな残基が４４９～７２８フラグメントの第三構造に望ましくない変化を持ち込まない限り、特定のシステイン残基の許容できる置換体として適しているかも知れない。ＮＭＣ－４抗体との反応性が、突然変異型ポリペプチドが望ましい治療特性を有するか否かの試験として推奨される。
特に好ましい本発明の突然変異型ポリペプチドは、該成熟サブユニットフラグメントの残基４４９～７２８ドメインのモノマー型を原型としたものである。これは、２つの血小板間に架橋機能を与え得るそのダイマーとは対照的なものである。普通、正常では鎖間ジスルフィド結合に関与する特定のシステインのｖＷＦ ＤＮＡフラグメント内のコドンを置換すべきである。鎖内ジスルフィド結合が該サブユニットフラグメントに重要な構造的特徴を付与することが証明されている場合、及び該鎖内結合を正確に形成するのを可能にする条件を見出すことができる場合には、該鎖内ジスルフィド結合を形成する残基をコードするシステインコドンは、突然変異しないで置くべきである。

より具体的には、残基４４１（アルギニン）でアミノ末端を有しかつ残基７３３（バリン）でカルボキシ末端を有する成熟フォン・ウィルブランドサブユニットのフラグメントに対応するが、そのシステイン残基のそれぞれがグリシン残基によって置換されている点でそれとは相違する突然変異型ポリペプチドフラグメントの調製を開示している。
この態様は、４４９～７２８ｖＷＦサブユニット領域に対応するポリペプチド内の一定のジスルフィド結合の保持が、それから誘導される治療用分子のデザインに特に重要であることも教示している。これに関して、実施例４に記載するように、ｐ５Ｅプラスミドにより発現され、鎖内ジスルフィド結合を含有する突然変異型ｖＷＦフラグメントを提供する。
本発明の好ましい突然変異型ポリペプチドのデザインに関連する重要な要因を以下に記載する。
コラーゲン及びヘパリン様グリコサミノグリカンのための潜在的な結合部位は、４４９～７２８トリプシンフラグメント内において、システイン残基５０９と６９５の間のループ領域内に存在する。これら部位での結合が、例えば、コラーゲンへの架橋をも与えることによって該分子の抗血栓治療への有用性を害する場合には、（例えば、化学合成又はタンパク質分解によって）該ポリペプチドをリデザインしてループ領域の全て又は一部分を取り除いてもよい。
細菌発現系由来のフォン・ウィルブランド因子ポリペプチドは、ゴルジ体又はワェイベイーパラデ体（Weibei-Palade body）内での如き翻訳後プロセシングの結果として正常に得られるグリコシル化ｖＷＦを実質的に欠いている。本発明は、大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）又は他の適当な原核宿主細胞により作られる分子であって、哺乳動物細胞により発現される分子により似せるために酵素的又は化学的にグリコシル化された分子をその範囲内に含む。
また、哺乳動物宿主細胞内で発現させることのできる発現プラスミド又はウィルス発現ベクターにＤＮＡコーディング配列を移行させて、正常なグリコシル化を行わせてもよい。
血小板及びフォン・ウィルブランド因子分子のいずれもが、例えば、シアル酸が寄与するものの如き多数の負電荷を含有していることが確認された。かかる電荷は、非傷害条件下で該分子の望ましい相互反発作用を高めることができる。リシン及び／又はアルギニンの１又は２以上の正に荷電した残基を付加して５２／４８トリプシンフラグメント又はその組換え相当物のアミノ末端から及び／又はカルボキシ末端から伸ばすと、ＧＰＩｂ－ＩＸレセプターに関する電気的反発作用に打ち勝つことができ、抗血栓治療剤としての該フラグメントの用途を高める。
更に、４４９～７２８ｖＷＦサブユニットフラグメントを原型としたポリペプチドに関して、部位特異的突然変異誘発により一定のシステイン残基を除去した後に、例えば、Ｓ－カルボキシメチル化の如き化学的不活性化により残りのシステイン残基を不活性化することは、本発明の範囲内である。
上記のように、本発明のポリペプチドをうまく操作するには、その１又は２以上のシステイン残基を変性させて、それらが互いに反応して望ましくない鎖内又は鎖間ジスルフィド結合を生じないようにすることが必要であるといえる。特に、この処理をしなければ、本発明の多くのポリペプチドについて、そのシステイン残基の望ましくない反応が一般に起こって、治療剤として効果的に用いるには適さない不溶性の又は生物学的に不活性なポリペプチド凝集体をもたらす。従って、本発明の多くのポリペプチドは、システイン変性ポリペプチドとして説明されるのが最良であり、それは、その１又は２以上のシステイン残基を何らかの方法で変化させて望ましくない反応を最小限にすることを意味している。前記システイン残基のかかる変性に有効であると当該技術分野において十分に知られているいずれかの操作により変性を行うことは、本発明の実施態様の範囲内である。システイン変性の好ましい形態が、システインコドンの他のアミノ酸のコドンへの突然変異誘発を含む（実施例１及び４を参照のこと）とはいえ、別の方法も利用可能である。かかる技術の１つは、システイン残基を、例えば、β－メルカプトエタノール又はジチオスレイトール、つまり“ＤＴＴ”の如き還元剤で処理した後に（例えば、ヨードアセトアミドで）永久

的にアルキル化することを含む。多くの他の共有結合性標識を標的システイン残基に結合させてそれらを不活性にすることができ、その際の唯一の要件は、標的ポリペプチドを非可逆的に変性しないｐＨ条件下で標識を供給できること、更なる操作又は貯蔵又は使用の間に該フラグメントが曝される条件下で、前記結合が変性されたシステインと他のシステイン残基との化学反応をさせないような種類のものであることである。
不溶性である突然変異型ポリペプチドは、水溶性ポリマー、例えば、ポリアクリルアミドのサブドメインをそれに共有結合で連結することによって可溶性にすることができる。他の形態の不溶性ポリペプチドに可溶性を付与するのに、他の技術も用いることができる。本発明の全てのポリペプチドに概して適用可能である前述の事柄に鑑み、本発明の第１態様の突然変異型ポリペプチドを調製できる方法を以下に説明する。
これを行うために、（該ｖＷＦプレプロペプチドの）フォン・ウィルブランド因子遺伝子をコードするｃＤＮＡクローンを用いた。次いで、示した領域の側面に位置するオリゴヌクレオチドを用いるポリメラーゼ連鎖反応で、該ｃＤＮＡを酵素的増幅反応に付した。コーディング鎖ＤＮＡに相当する第１オリゴヌクレオチドは、残基４４１（アルギニン）のコドンにＥｃｏＲＩ部位５'を含有し、残基４４６（グリシン）にまで及んだ。非コーディング鎖ＤＮＡに対応する第２オリゴヌクレオチドは、アミノ酸７２５～７３３をコードし、コドン７３３に３'ＨｉｎｄIII制限配列をコードした。次いで、（成熟サブユニットの）残基４４１から残基７３３までのアミノ酸配列に対応する得られた二本鎖フォン・ウィルブランド因子ｃＤＮＡを、ＥｃｏＲＩ及びＨｉｎｄIII制限酵素を用いて、適合するＥｃｏＲＩ及びＨｉｎｄIII配列を有する多クローニング部位を含有するバクテリオファージＭ１３ｍｐ１８の二本鎖複製型内に挿入した。クンケル，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,82,488-492(1985)の操作に従って、全てのシステインコドン（残基位置４５９、４６２、４６４、４７１、４７４、５０９及び６９５）を個々のグリシンコドンで（実施例１を参照のこと）又は、例えば、５つのシステインコドン（残基位置４５９、４６２、４６４、４７１及び４７４）を個々のグリシンコドンで（実施例４を参照のこと）置換するのに適するハイブリダイズ用オリゴヌクレオチドを用いて部位特異的突然変異誘発を行った。この操作により誘導した突然変異型二本鎖ｖＷＦｃＤＮＡフラグメントをＥｃｏＲＩ及びＨｉｎｄIII制限エンドヌクレアーゼでの処理によりＭ１３ｍｐ１８ファージから取り出した後、該ｖＷＦｃＤＮＡフラグメントの末端をＢａｍＨＩリンカーで修飾した。
次いで、５つ又は７つのＣｙｓからＧｌｙへの突然変異点を含有するこの２つのタイプの突然変異型ｖＷＦｃＤＮＡをｐＥＴ－３Ａ発現ベクター（ローゼンバーグ（Rosenberg,A.H.）ら，Gene,56,125-136(1987)）内に別々にクローン化し、大腸菌株ＢＬ２１（ＤＥ３）（ノバゲン社（Novagen Co.），マジソン，WI）から発現させた。７つのシステインからグリシンへの突然変異点を有するｖＷＦサブユニットフラグメントのためのｃＤＮＡを含有するｐＥＴ－３Ａビヒクルを“ｐ７Ｅ”と呼び、５つの上に特定したシステインからグリシンへの突然変異点をコードするｖＷＦｃＤＮＡフラグメントを含有する場合を“ｐ５Ｅ”と呼ぶ。発現プラスミドｐ５Ｅを含有する細菌培養物により産生された突然変異型フォン・ウィルブランド因子ポリペプチドを、ｐ７Ｅプラスミドを含有する培養物から発現されたものと比較した。このｐ５Ｅ分子は、システイン残基５０９と６９５の間にジスルフィド結合を形成できるのに対して、ｐ７Ｅ分子はできない。
この突然変異型ポリペプチドは該細菌宿主細胞によって分泌されなかったが、溶解性の乏しい凝集物（“封入体”）として蓄積され、該ポリペプチドは実施例１（ｐ７Ｅ）及び実施例４（ｐ５Ｅ）の操作に従ってうまく可溶化できた。ｐ７Ｅ及びｐ５Ｅプラスミドから発現されたポリペプチドの特徴をＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びイムノブロッティングにより明らかにした（実施例２及び５）。期待したアミノ酸配列の未グリコシル化分子量から予見されるように、還元条件下では、いずれのプラスミドも、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定して、約３８，０００の見掛け分子量を有するポリペプチド種を発現する。
ｐ５Ｅ及びｐ７Ｅ抽出液の挙動を免疫学的方法を用いて検定した（実施例５を参照のこと）。ｖＷＦ特異性マウスモノクローナル抗体ＲＧ－４６及びＮＭＣ－４をプローブとして

用いた。ＲＧ－４６は、そのエピトープとして、残基６９４～７０８を成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニット内に含むアミノ酸の直鎖状配列を認識することが証明されている。この抗体のその決定基への結合は、本質的にコンフォメーション非依存性である。モウリら，J.Biol.Chem.,263(34),17901-17904(1988)。

しかしながら、ＮＭＣ－４は、そのエピトープとして、糖タンパク質Ｉｂ結合活性を含有するフォン・ウィルブランド因子サブユニットのドメインを有する。該エピトープをマッピングすると、それがジスルフィド依存性会合体の中に組み込まれた（凡そ成熟ｖＷＦサブユニット残基４７４～４８８を含み凡そ残基６９４～７０８も含む）２つの不連続ドメイン内に含まれていることが証明された（モウリら，前記文献）。もっとも、天然ｖＷＦ分子内にこの三次コンフォメーションを与える該ジスルフィド結合が鎖内であるか鎖間であるかは確認できなかった（同文献，17903頁）。

従って、まず（タンパク質の）７．５μｇサンプルを１０％ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル上で移動させて、（還元及び非還元条件下で）特定のバンドの抗原的挙動を、クマシーブルー染色により得られた結果と比較できるようにした。次いで、標準的操作、つまりバーネット（Burnette),A.Anal.Biochem.,112,195-203(1981)に従ってイムノブロッティング（“ウェスタン・ブロッティング”）を行って、ｐ５Ｅ及びｐ７Ｅ抽出物を比較した。

非還元条件下では、単鎖ｐ５Ｅポリペプチドフラグメント（残基４４１から残基７３３の配列に相当する）は、ｐ７Ｅから単離した匹敵するシステイン不含種に比較して、ＮＭＣ－４に対する結合親和性が約１２０倍であることが確認された。（１００ｍＭ ＤＴＴを用いる）還元条件下での電気泳動の後では、ＮＭＣ－４に対する単鎖ｐ５Ｅ種の親和性は顕著に減少し、これは還元又は非還元のいずれかの条件下でのシステイン不含ｐ７Ｅ種のものと非常に類似するものであった。還元及び非還元のいずれの条件下でも、ＮＭＣ－４もエピトープとしてｐ５Ｅ抽出物からのジスルフィド連結ダイマー型を認識することができなかった。

ＮＭＣ－４に基づくオートラジオグラフを作るために用いたニトロセルロースフィルターを、低い抗体力価と短い接触時間の組み合わせにより低く維持した初期ＮＭＣ－４接触応答を差し引くことによってＲＧ－４６で再スクリーニングした。該フィルター上での３６，０００ｋＤａ ｐ７ＥへのＲＧ－４６の結合は、還元条件を選んでも非還元条件を選んでも同じで、これは、発現されたポリペプチドにおいて全てのシステインがグリシンによって置換されていることと一致する。

非還元条件下では、ｐ５Ｅポリペプチド抽出物内に（ＲＧ－４６に反応性の）大分子量ｖＷＦ抗原が存在した。これら（鎖間ジスルフィド結合を反映する）ｐ５Ｅ ｖＷＦ凝集体は、還元条件下でｐ７Ｅポリペプチドと同じ位置に移動した。これは、それらのジスルフィド連絡が壊れたことを示している。しかしながら、非還元条件下でＲＧ－４６により容易に認識されるこの大きなｐ５Ｅ鎖間ジスルフィド凝集体は、還元条件下でも非還元条件下でもＮＭＣ－４により認識されなかった。かくして、天然のマルティマー性ｖＷＦサブユニット内の残基５０９と６９５の間のジスルフィド結合が鎖内連絡に相当することが証明された。

成熟ｖＷＦサブユニットの残基４７１と４７４の間のジスルフィド結合は、以前に鎖内連絡であることが示されているので、前述の態様により、多サブユニット成熟ｖＷＦ内の鎖間ジスルフィド結合はシステイン残基４５９、４６２又は４６４のうちの１又は２以上を用いて形成されていると提案することができる。

広範な種々の発現プラスミド又はウィルス発現ベクターが、４４１～７３３フラグメント又は類似のｖＷＦフラグメントの発現に適している。代表例には、ｐＢＲ３２２、及びｐＥＴ－１からｐＥＴ－７の如きその誘導体が含まれる。適する宿主細胞には、エシェリキア属及びバシラス属の細菌が含まれる。発現系を選択する上で重要なことは、高度に効率的な転写プロモーターがｖＷＦクローン化ＤＮＡ挿入体のすぐ隣に存在することであり、そうすることが推奨される。突然変異型ｖＷＦ ｃＤＮＡフラグメントを真核宿主細胞内でクローン化してもよい。

この発見は、（抗血栓剤として用いるための）５２／４８トリプシンフラグメントを原型とするか又は代わりに（抗血栓剤として用いるための）その１１６ｋＤａホモダイマーを原型とする治療用ｖＷＦポリペプチドのデザインに特に有用であると考えられる。

本発明の第２態様

組換え細菌細胞からのｖＷＦの治療用フラグメントのデザイン及び発現に関する上記の多くの要因は、真核宿主細胞からのｖＷＦフラグメントのデザイン及び発現に適用可能である。かかる適用可能性は、当業者であれば容易に理解できる。

この第２態様は、成熟ｖＷＦサブユニットの残基４４９～７２８一次配列フラグメント内に存在するシステイン残基が果たす一定の役割の認識をその範囲内に含む。これに関連して、この態様は、システイン５０９－６９５ジスルフィド結合が鎖内結合であることを確認し、血栓症を治療するために又はフォン・ウィルブランド疾患を治療するために、５０９－６９５結合を取り込む有効な治療剤を提供する。

本発明のこの第２態様の抗血栓性ポリペプチドと抗出血性ポリペプチドのいずれも、成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニットの凡そ残基４４９から７２８を含むアミノ酸配列ドメインは、完全にグリコシル化されたとしても、５２／４８ｋＤａｖＷＦサブユニットフラグメントと重量が等しいであろうということに基づいている。実際には、治療的に有用な量のかかるポリペプチドを血漿から誘導することは困難である。困難さには、トリプシン消化物の他の成分から１１６ｋＤａと５２／４８ｋＤａフラグメントを効率的に分離すること及び肝炎及びエイズの如きヒトウィルスから血液由来成分を効率的に滅菌することが含まれる。更に、１１６ｋＤａダイマーから５２／４８ｋＤａモノマーを生成させる文献中に報告された方法は、完全にジスルフィドを還元しているので、第三構造が損なわれている。選択的にシステイン残基を置換して生成物の有用性と安定性を向上させる如き５２／４８フラグメントの一定の重要な操作は、実用的意味において組換えＤＮＡ法により達成できるに過ぎない。

しかしながら、５２／４８トリプシンフラグメントに類似する治療用ｖＷＦポリペプチドの組換えＤＮＡ統制手段による製造は、一定の制限に遭遇している。該ポリペプチドは、宿主細胞によって作られるだけでなく、最大の治療的有用性のために正確に折り畳まれているのが望ましい。５２／４８フラグメントの最も治療的に活性な型の発現のために阻止されなければならない最も重要な要因は、間違ったジスルフィド連絡を形成するシステイン残基の連結により生ずる間違った分子の折り畳みであると考えられる。更に、かかるポリペプチドは、もしもそれらが天然ｖＷＦサブユニットの全体内に含有されていたなら又は正当にグリコシル化されていたなら遭遇しないであろう疎水性又は溶解性の問題を呈するようである。

従って、ｖＷＦ由来治療用ポリペプチドの合成に非常に重要なことは、誤ったジスルフィド連絡の形成を最小限にする条件の選択である。宿主細菌細胞内での組換えＤＮＡからのかかるポリペプチドの事前発現（prior expression）は、一定の不利益を有している。第１態様に関連して、産生されたばかりのｖＷＦポリペプチドは宿主細胞から脱出できないので、システイン残基の有効濃度が極端に高い細胞内の不溶性凝集体（封入体）内に蓄積する。これら情況下では、封入体の中か又は該ポリペプチドをそこから可溶化しようとしている最中のいずれかに、ｖＷＦ分子が血漿内に天然に存在する場合の特徴を示さないジスルフィド結合の形成が助長され、また助長しもする。

この態様は、ｖＷＦ由来ポリペプチドをコードしかつシグナル配列をもコードするＤＮＡ配列を用いて該ポリペプチドが哺乳動物細胞内で発現されるようにすることによる、これら問題の解決法を提供する。このシグナル配列の存在は、ｖＷＦポリペプチドが該宿主細胞から分泌できるようにする。間違ったジスルフィド結合の形成は、封入体におけるような該ポリペプチドの高い局所濃度の蓄積を制限することによって最小限にされる。

更に、細菌とはちがって、宿主真核細胞内に存在する酵素は、ｖＷＦ由来ポリペプチドをグリコシル化することができ、ヒト血漿由来のｖＷＦ分子のドメインにより近似している治療用分子をもたらす。

この態様により生成した組換え１１６ｋＤａポリペプチドであってどのシステインコドン

も突然変異されていないものは、残基４４１～７３０からなるサブユニットフラグメントのダイマーに相当し、血漿由来ｖＷＦの匹敵する領域内に見られるものと等しいグリコシル化量を有していることが証明されている。
次に、第２態様の効果的な組換え操作に従って生成した又は生成させることができる治療用ｖＷＦ由来ポリペプチドのタイプを説明する。
第２態様の組換えｖＷＦポリペプチド
概略的に言えば、この第２態様は、システイン残基４５９、４６２及び４６４のうちの少なくとも１つが除去された凡そ残基４４９と凡そ残基７２８の間のアミノ酸の配列を含む成熟フォン・ウィルブランドサブユニットのあらゆるフラグメント、又はそのサブフラグメントを含む。かかる除去は、該フラグメントの望ましくない鎖間ジスルフィド結合（及びその結果としてのダイマー）を形成する傾向を低下させる結果、抗血栓剤としての治療的有用性を向上させる。
この態様の更なる側面は、上で定義したポリペプチドのグリコシル化型を包含する。
ｖＷＦの前述の領域由来の一定の抗血栓性ポリペプチドのデザインにおいて、位置５０９と６９５でシステイン残基を残して、ＧＰＩｂαと相互作用する成熟ｖＷＦサブユニットフラグメントの一定のドメインの第３構造を保存するのが好ましい。
また、この態様の実施に際して好ましいのは、システイン残基が位置５０９と６９５で保持され、システイン残基４５９、４６２及び４６４のそれぞれが欠落したか又は他のアミノ酸の残基により置換されたｖＷＦの前述の領域由来のグリコシル化ポリペプチドである。
この態様の実施に際して更に好ましいのは、システイン残基が位置５０９と６９５で保持され、システイン残基４５９、４６２及び４６４のいずれか１つが欠落したか又は他のアミノ酸の１残基により置換されたｖＷＦの前述の領域由来のグリコシル化ポリペプチドである。
本発明の好ましい突然変異型ポリペプチド（抗血栓剤）のデザイン又は更なる修飾に関連する重要な要因を以下に説明する。
コラーゲン及びグリコサミノグリカン（又はプロテオグリカン）の可能性ある結合部位は、４４９～７２８トリプシンフラグメント内において、システイン残基５０９と６９５の間のループ領域に存在する。これら部位におけるかかる巨大分子による結合が、例えば、コラーゲンへの架橋を与えることによっても、本発明の組換えポリペプチドの何らかの抗血栓治療有用性を害する場合には、（例えば、タンパク質分解、共有結合性標識又は突然変異誘発によって）該ポリペプチドをリデザインして該ループ領域又はそのサブドメインを欠落又は変性させることができる。
以下に、第２態様のポリペプチドを調製することができる手段、特にかかるポリペプチドを正確に折り畳まれた形で宿主細胞から効率的に分泌させ、好ましくは、その存在が治療的有用性と調和したジスルフィド結合だけを残す手段を説明する。
第２態様の突然変異型ポリペプチドの調製－適するＤＮＡ配列及び発現プラスミドの構築
この態様の実施に必要な必須要素は、(A)成熟ｖＷＦサブユニットの残基４４９～７２８ドメインをコードするか、又はそのサブドメインをコードするＤＮＡ配列；(B)真核細胞内で前述の残基４４９～７２８ドメイン又はそのサブドメインの発現を行うことができる発現プラスミド又はウィルス発現ベクター；及び(C)前記発現を行うことができる真核宿主細胞である。
フォン・ウィルブランド因子サブユニットフラグメントのＤＮＡ配列の発現は、残基４４９～７２８コーディングＤＮＡに対して上流（５'）に真核性コンサンセス翻訳開始配列及びメチオニン開始コドンを配置することによって促進される。ｖＷＦ ＤＮＡ配列はｃＤＮＡ配列であっても、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応においてゲノミッククローンから酵素的増幅によって作ることができるようなゲノミック配列であってもよい。残基４４９～７２８コーディング配列の発現は、その下流にＴＧＡの如き翻訳終止コドンを配置することによって更に促進される。そうして発現されたｖＷＦポリペプチドは、生成期のｖＷＦポリペプチドへのシグナルペプチドの結合が欠けているので、典型的には、宿主細胞内

に止まっている。そのような状況では、そこで発現されたタンパク質の精製及び薬学的に有用な量の抽出を行うのは、該ポリペプチドが宿主細胞の培地中に分泌された場合よりも難しい。それでも、かかる発現系は、例えば、患者における血小板ＧＰＩｂ－ＩＸレセプター複合体の正確な機能を試験するような診断的分析目的には有用である。

該ポリペプチドが宿主細胞から分泌される本発明の好ましい実施態様においては、ｖＷＦコーディングＤＮＡ配列であってその残基４４９～７２８コーディング配列から上流にｖＷＦシグナルペプチドをコードするＤＮＡ配列が挿入された配列を適当な宿主細胞内に挿入する（実施例７を参照のこと）。成熟ｖＷＦサブユニットの異なる領域、又は該ポリペプチド、又は幾つかのかかる領域の組み合わせに対応する他のｖＷＦコーディングＤＮＡ配列は、適当なコーディングＤＮＡ内にｖＷＦシグナルペプチド配列から下流にそれらを同じく配置することによって、同じく発現することができる。シグナル配列をｖＷＦサブユニットの残基４４９～７２８フラグメントのアミノ末端に結合させると、該シグナルポリペプチドは、該フラグメントを、細胞からの最終的な分泌のために処理されるべき種類のポリペプチドとして細胞構造体によって認識されるようにする。この最終的な分泌に伴って、該シグナルポリペプチドは、該４４９～７２８フラグメントから切り離される。

真核細胞発現系の構築及び成熟サブユニットｖＷＦのトリプシン５２／４８ｋＤａドメイン（残基４４９～７２８フラグメント）のその中での発現に関して、残基４４１（アルギニン）～７３０（アスパラギン）により表されるより僅かに大きなフラグメントを扱うのが便利であることが分かった（実施例７を参照のこと）。（４４９～７２８残基配列に加えて）追加のアミノ酸の小領域を含有する他の類似のフラグメントであって、追加のアミノ酸が前記フラグメントの機能に有意に影響しないフラグメントを発現させることもできる。

同じく、ＧＰＩｂ（α）結合配列が危うくならない限りは、４４９～７２８フラグメントと比較した場合にアミノ及びカルボキシ末端に隣接する幾つかの残基が取り除かれた機能性フラグメントを発現させることができる。

残基４４１～７３０フラグメントをコード及び発現するのに適するＤＮＡ配列の構築に関して、シグナルペプチドのカルボキシ末端をコードするＤＮＡと残基４４１のコドンの間にｖＷＦプロペプチドの最初の３アミノ酸（アラニン－グルタミン酸－グリシン）のコドンを挿入することが効果的であることも分かった。前記３コドンは、天然には、ヒトｖＷＦ遺伝子内のシグナル配列のすぐ下流（３'）に見られる。以下に更に詳しく述べるように（実施例７を参照のこと）、かかるプロペプチド配列（一種のスペーサー）の存在は、シグナルペプチダーゼによる適当な開裂部位の認識を促進し、そのプロセスが妥当な大きさの治療用ｖＷＦポリペプチドを生成して該治療用産物の宿主細胞からの分泌を促進する。以下に詳しく述べるように、このスペーサー配列は、半極性又は極性であるべきである。

本発明によれば、ｖＷＦプロペプチドのアミノ末端領域の最初の１～１０残基までを含むスペーサー配列が提供される。４４１～７３０残基配列の望ましい第三構造に悪影響を及ぼさないという条件で、より長いプロペプチドコーディング配列を用いることは本発明の範囲内である。

非常に多様な発現プラスミド又は細菌発現ベクターが、残基４４１～７３０成熟ｖＷＦサブユニットフラグメント又は類似のｖＷＦフラグメントの発現に適する。発現系を選択するに際して重要な１つの要因は、該プラスミド又はベクター内に、クローン化したｖＷＦ挿入体のすぐ隣に高い能力の転写プロモーターを供給することである。

発現プラスミド又はウィルス発現ベクターの選択において重要なもう１つの要因は、例えば、安定な形質転換真核宿主細胞の継続的選択を適用できるように該プラスミド又はベクター内に抗生物質耐性遺伝子マーカーを供給することである。

本発明の実施に用いるのに適するプラスミドの例には、ｐＣＤＭ８、ｐＣＤＭ８^{neo}、ｐＣＤＮＡ１、ｐＣＤＮＡ１^{neo}、ｐＭＡＭ^{neo}及びＲｃ／ＣＭＶが含まれる。好ましいプラスミドには、ｐＣＤＭ８^{neo}、ｐＣＤＮＡ１^{neo}、ｐＭＡＭ^{neo}及びＲｃ／ＣＭＶが含まれる。

本発明の実施に用いるのに適するウィルス発現ベクター系の例には、レトロウィルス科に基づくもの及びバキュロウィルス科の核多角体病ウィルス亜群に基づくものが含まれる。本発明の実施に用いるのに適する永久細胞系を含む代表的宿主細胞には、ＣＨＯ－Ｋ１チャイニーズハムスター卵巣細胞、ＡＴＣＣ－ＣＣＬ６１；ＣＯＳ－１細胞、ＳＶ－４０形質転換アフリカミドリザル腎臓、ＡＴＣＣ－ＣＲＬ１６５０；ＡＴＴ２０マウス脳下垂体細胞；ＲＩＮ－５Ｆラット膵臓β細胞；培養昆虫細胞、Spodoptera fruqiperda；又は酵母（Sarcomyces）が含まれる。

実施例７は、４４１～７３０配列を発現及び分泌するのに用いる好ましい操作の詳細な説明を含んでいる。その実施例では、該フラグメントは、システイン残基４５９、４６２及び４６４が関係する１又は２以上のジスルフィド結合により１つに維持されたホモダイマーとして分泌される。抗血栓剤として有用なモノマー性フラグメントの発現は、本発明の前述の第１態様で説明した突然変異誘発操作により最も好ましく達成されるモノマーのジスルフィド結合能力のコントロールを行うことを必要とする。

残基位置４５９、４６２及び４６４のそれぞれにおいてシステインのグリシンへの置換を含有する突然変異型ｖＷＦ残基４４１～７３０フラグメントを生成するのに用いられる独特の手順は、実施例８に記載されている。そこで用いられる発現プラスミドをｐＡＤ４／Δ３Ｃと呼称した。

実施例８の手順を適用して、それぞれが（位置４５９、４６２又は４６４において）異なる１つのＣｙｓ→Ｇｌｙ突然変異点を含有する３種の突然変異型残基４４１～７３０フラグメントを生成させるのに用いた独特な手順を、実施例１０に記載した。そこで用いたそれぞれの発現プラスミドをｐＡＤ／G^{459}、ｐＡＤ／G^{462}及びｐＡＤ／G^{464}（総称して“ｐＡＤ４／Δ１Ｃプラスミド”）と呼称した。類似の操作を用いて、前述の３つの位置のうちの２つでＣｙｓ→Ｇｌｙ突然変異点を有する突然変異型残基４４１～７３０フラグメントを生成させることができる。

第２態様のポリペプチドの特性

ホモダイマー性１１６ｋＤａ ｖＷＦフラグメント

以下の実施例７は、非突然変異型残基４４１～７３０ｖＷＦサブユニットフラグメントを発現するのに安定に形質転換されたＣＨＯ－Ｋ１細胞を用いることを開示している。以下の実施例１０に記載するように、該非突然変異型フラグメントは、不安定なＣＯＳ－１形質転換体内でも発現された。

分泌され免疫沈殿されたＣＨＯ－Ｋ１細胞由来タンパク質のＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、クマシーブルーでの染色によって検出された最も高割合のｖＷＦ由来ポリペプチドが非還元条件下で約１１６，０００の見掛け分子量を有することが証明された（実施例７）。この結果は、^{35}Ｓ－標識タンパク質のオートラジオグラフを用いて、ｐＡＤ４／ＷＴ形質転換ＣＯＳ－１細胞（実施例１１）により分泌されたポリペプチドの特徴を明らかにすることによって確認した。（１００ｍＭジチオスレイトール存在下の如き）ジスルフィド還元条件下では、１１６ｋＤａフラグメントはもはや検出されなかったので、該ｖＷＦ由来物質は期待した５２／４８ｋＤａモノマーと考えられる。

該組換え１１６ｋＤａポリペプチドの見掛け分子量は、前記ポリペプチドが４４１～７３０フラグメントのホモダイマーとして存在したことと一致している。このホモダイマーは、成熟血漿（循環）ｖＷＦのトリプシン消化により単離された１１６ｋＤａポリペプチドにおいて認められたのに等しいグリコシル化量も保持している。かくして、本発明の哺乳動物細胞培養での４４１～７３０フラグメントの発現は、血漿中で見られる構造を真似て、そのジスルフィド依存性１１６ｋＤａダイマーの形成に有利であることが明らかである。そうして形成された１１６ｋＤａフラグメントが正確に折り畳まれたポリペプチドに相当するとういうことを、コンフォメーション依存性ＮＭＣ－４抗体との（非還元条件下での）反応によって明らかにした。この抗体は、正確に組み立てられたＧＰＩｂ（α）結合部位を認識する。ＮＭＣ－４との反応性は、還元条件下では消失する。

システイン残基４７１及び４７４並びに残基５０９及び６９５も鎖内結合に関与しているということを（細菌で発現されたｖＷＦフラグメントを用いて）第１態様で証明したので

、１１６ｋＤａホモダイマーを安定化する鎖間結合は、残基４５９、４６２及び４６４の１又は２以上から形成されなければならない。更に、残基４５９、４６２及び４６４がいずれのモノマーにおいてもきわめて接近しているので、いずれかの特定の成熟ｖＷＦダイマー又はマルティマー、又は組換え１１６ｋＤａフラグメントにおいてどの特定の残基がポリペプチド間連絡を形成する鎖間ジスルフィド結合に寄与しているかに関して変動があってもよいということが注目される。ダイマー分子の治療的に活性な集団は、鎖間ジスルフィド結合の可能な組み合わせのいずれかを用いて、本発明の実施態様に従って生成させることができる。

本発明の組換え１１６ｋＤａダイマーの治療的に活性なコンフォメーションの生成に伴う幾つかの構造的折り畳み又はジスルフィド結合形成、又はその中でのジスルフィド交換は、該ポリペプチドが宿主細胞から分泌された後に起こることも可能であるということが注目される。

４４１～７３０ｖＷＦフラグメント内には潜在的なコラーゲン、プロテオグリカン及びグリコサミノグリカンのための結合部位も含まれるので、該１１６ｋＤａポリペプチドは、血小板と内皮下層の間で架橋機能を果たすことができる。このことは、それを、例えば、血管内皮下層の如き表面への血小板付着を誘導する方法に使用できるようにする。血小板に有効量の組換え１１６ｋＤａポリペプチドを接触させることを含む、血小板活性化及び／又は凝集を誘導する方法も提供する。かかる方法は、フォン・ウィルブランド疾患の治療に有用である。

ホモダイマーを安定化する１又は２以上の可能な鎖間ジスルフィド結合の少なくとも１つが無傷のままで残され、かつ２つのＧＰＩｂ（α）結合部位を含むアミノ酸配列が保存される限り、該ダイマーの治療特性を修飾するために、必要に応じて、その２つのモノマー性フラグメントの１又は２以上の他の領域が失われてもよいであろう。

５２／４８ｋＤａモノマー性ｖＷＦフラグメント

本発明の第２態様の重要な側面は、正常な第三構造の構造的要素を有するｖＷＦサブユニットのグリコシル化された５２／４８ｋＤａモノマー性フラグメントを提供することである。かかるフラグメントは、抗血栓性治療剤として用いるには不適当でありがちなダイマーを形成する傾向が低下している。

部位特異的突然変異誘発のための上記操作に従い、システイン残基４５９、４６２及び４６４の１又は２以上がグリシン残基で置換された残基４４１～７３０ｖＷＦフラグメントを産生させた。以下の実施例８、９及び１０は、これら突然変異型ｖＷＦポリペプチドを発現するＣＯＳ－１細胞形質転換体を作成するのに必要な突然変異誘発及び細胞培養条件を説明している。本発明の実施例１１～１３は、そうして誘導した分子の特性をｐＡＤ４／ＷＴ形質転換ＣＯＳ－１細胞から産生した組換え１１６ｋＤａポリペプチドと比較して説明している。

ｐＡＤ４／Δ３Ｃ形質転換ＣＯＳ－１細胞（ｖＷＦ４４１～７３０ＤＮＡ配列を含有するが、そのシステインコドン４５９、４６２及び４６４それぞれが単一のグリシンコドンによって置換されている）により発現されたｖＷＦ由来ポリペプチドを、ｐＡＤ４／ＷＴ形質転換ＣＯＳ－１細胞により分泌されたポリペプチドと比較した。比較を行うために、等量のＮＭＣ－４とＲＧ－４６抗ｖＷＦ抗体を用いて各培養物からの^{35}Ｓ－メチオニン補充培地を免疫沈殿に付して（実施例１１）、ｖＷＦ由来分泌タンパク質を採集した。次いで、該免疫沈殿ｖＷＦポリペプチドをＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル上での^{35}Ｓ－標識のオートラジオグラフィーにより分割した。非還元条件下では、ｐＡＤ４／Δ３Ｃ形質転換細胞の培養抽出液中に１１６ｋＤａポリペプチドを検出することができなかった。その代わり、還元又は非還元条件下のいずれかで、５２ｋＤａの見掛け分子量を有するバンドが見られた。対照的に、ｐＡＤ４／ＷＴ形質転換ＣＯＳ－１細胞は、非還元条件下で予測通りに１１６ｋＤａの見掛け分子量のポリペプチドを産生した。

この免疫沈殿操作もコンフォメーション依存性ＮＭＣ－４抗体だけを用いて繰り返した（実施例１２）。ｐＡＤ４／ＷＴ形質転換細胞の培地から単離した主要なｖＷＦ由来成分もやはり非還元条件下で１１６ｋＤａの見掛け分子量を有し、還元条件下で５２ｋＤａの見

掛け分子量を有した。見掛け５２ｋＤａ分子量のバンドは、非還元条件下では、ｐＡＤ４／Δ３Ｃ由来ポリペプチド物質のゲル上で検出された。実施例１２に記載するように、ＮＭＣ－４抗体との反応性は、ｐＡＤ４／Δ３Ｃ形質転換細胞内で検出された５２ｋＤａフラグメントが、天然残基４４１～７３０ドメインの第三構造を有する重要な証拠である。この免疫沈殿操作は、^{35}Ｓメチオニンの存在下でｐＡＤ４／ＷＴ及びΔ３Ｃ形質転換体についての条件と類似の条件下で培養したｐＡＤ４／Δ１Ｃ形質転換ＣＯＳ－１細胞により産生されたＮＭＣ－４反応性ｖＷＦポリペプチドを検出するのにも用いた。免疫沈殿したタンパク質を還元及び非還元条件下でＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲルにかけて、ｐＡＤ４／ＷＴ及びｐＡＤ４／Δ３Ｃ形質転換体により産生されたｖＷＦポリペプチドと比較した（実施例１３）。

システイン残基４５９、４６２及び４６４のいずれか１つのグリシンによる置換が、非還元又は還元条件下で５２ｋＤａの見掛け分子量を有するポリペプチドを主としてもたらし、１１６ｋＤａ種の生成を阻止したことが明らかになった。

ｐＡＤ４／Δ３Ｃ又はｐＡＤ４／Δ１Ｃプラスミドのいずれかで形質転換されたＣＯＳ－１細胞由来の組換えポリペプチドについての５２ｋＤａの見掛け分子量は、４４１～７３０フラグメントのモノマーである前記ポリペプチドと一致すると同時に、成熟血漿（循環）ｖＷＦのトリプシン消化及び還元から単離された５２ｋＤａポリペプチドに見られるのと等しいグリコシル化量も有している。

見掛け１１６ｋＤａ分子量のダイマー性ポリペプチドとは違って、ｐＡＤ４／Δ１Ｃ及びｐＡＤ４／Δ３Ｃプラスミドによって産生するモノマー性５２ｋＤａポリペプチドは、該ダイマーに伴う架橋機能の能力がなさそうである。従って、血小板に有効量の突然変異型組換え５２／４８ｋＤａポリペプチドを接触させることを含む、血小板活性化及び／又は凝集を阻止する方法であって、該ポリペプチドが、非突然変異型（野生型）組換え５２／４８ｋＤａポリペプチドと比較した場合に、少なくとも実質的に低下したダイマー化傾向を示す方法が提供される。

更に、血小板に有効量の突然変異型組換え５２／４８ｋＤａポリペプチドを接触させることを含む、表面への血小板の付着を阻止する方法であって、該ポリペプチドが、非突然変異型組換え５２／４８ｋＤａポリペプチドと比較した場合に、少なくとも実質的に低下したダイマー化傾向を示す方法が提供される。

４４１～７３０ｖＷＦフラグメントに含まれるものは、ＧＰＩｂα結合部位に加えて、コラーゲン（凡そ残基５４２～６２２）及びグリコサミノグリカン及びプロテオグリカン（残基５０９～６９５ジスルフィドループ内）の潜在的な結合部位である。それは、おそらく、残基４４１～７３０を含む単一のフラグメントは、潜在的に血栓性である架橋分子として効果的に役割を果たすことができないという立体的理由のためであろう。しかしながら、（凡そ一次配列領域４７４～４８８及び６９４～７０８、及び５０９－６９５ジスルフィド結合が部分的に寄与するその三次ドメインからなる）５２／４８ｋＤａモノマーのＧＰＩｂ（α）結合ドメインが保存されている限り、その抗血栓治療特性を修飾又は保存するために、必要に応じて、タンパク質分解により又は突然変異誘発によるなどして、前記５２／４８ｋＤａモノマー性フラグメントの（ヘパリン及びコラーゲン結合ループの一部の如き）他の領域が失われるか又は変化させられてもよいであろうということが注目される。

本発明の組換え５２／４８ｋＤａモノマーの治療的に活性なコンフォメーションの生成に関連する幾つかの構造の折り畳み又はジスルフィド結合形成、又はそこでのジスルフィド交換は、該ポリペプチドが宿主細胞から分泌された後に起こることも可能である。

本発明の現（第３）態様

本発明は、成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニットのアミノ酸配列（ドメイン）に対応する一連のポリペプチドを定義する。該ポリペプチドは、フォン・ウィルブランド因子への血小板糖タンパク質Ｉｂαの結合を阻害することができ、従って、抗血栓剤としての有用性を有している。

フジムラ（Fugimura,Y.）ら，J.Biol.Chem.,261,381-385(1986)は、還元されかつアルキ

ル化された成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニットのフラグメントであって、糖タンパク質Ｉｂαと相互作用する前記タンパク質のドメインを含有するアミノ酸残基Ｖａｌ^{449}で始まるフラグメントを定義した。該ドメインは、更に、残基Ｌｙｓ^{728}においてそのカルボキシ末端を有するという特徴が明らかにされた（フジムラら，J.Biol.Chem,262,1734-1739(1987)）。モウリら，J.Biol.Chem.,263,17901-17904(1988)は、ｖＷＦのＧＰＩｂα結合ドメインが、天然ｖＷＦにおいてジスルフィド結合により正確なコンフォメーションに維持されている前記フラグメント内に含有される２つの不連続配列、Ｃｙｓ^{474}～Ｐｒｏ^{488}とＬｅｕ^{694}～Ｐｒｏ^{708}によって形成されていることを確認した。もっとも、この著者らは、その安定化結合を形成するシステイン残基を同定すること及び前記結合が鎖内であるか鎖間であるかを明らかにすることはできなかった。その後、鎖内ジスルフィド結合（システイン５０９－６９５）がその２つの不連続位置の機能を調節するのに重要であることが確認された。ｖＷＦの４４９～７２８トリプシンフラグメント内の追加の領域（ドメイン）であって、血小板糖タンパク質１ｂαとのその相互作用に影響を与え、それによって、抗血栓性ポリペプチドのデザインに有用性を有する領域が同定された。特に、鎖内ジスルフィドループ（Ｃｙｓ^{509}とＣｙｓ^{695}の間）の修飾が、糖タンパク質Ｉｂαに対するｖＷＦの親和性を調節することが確認された。ウェアー（Ware,J.）ら，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,88,2946-2950(1991)は、IIb型フォン・ウィルブランド疾患を患っている患者において血小板膜糖タンパク質Ｉｂαに対するフォン・ウィルブランド因子の親和性を高める点突然変異を同定した。同定されたＴｒｐ^{550}からＣｙｓ^{550}への突然変異は、ｖＷＦのＣｙｓ^{509}からＣｙｓ^{695}へのループ領域内に存在する。クーニイ（Coony,K.A.）ら，Blood,76(supp.1)Abstract 1661,page 418a,November 15,1990は、該ループから追加のIIb型の表現型突然変異、つまりＡｒｇ^{543}からＴｒｐ^{543}及びＶａｌ^{553}からＭｅｔ^{553}への突然変異を同定している。II型フォン・ウィルブランド疾患又はIIb型様症状の患者からの更なる追加の突然変異には、Ａｒｇ^{511}からＴｒｐ^{511}及びＧｌｙ^{561}からＡｓｐ^{561}へのループ突然変異が含まれる。

ここに記載したもの（実施例１４～１７）は、抗血栓有用性を有するフォン・ウィルブランド因子ポリペプチドの４４９～７２８フラグメントのドメインの同一性を定義するための実験である。本発明の実施例１５は、例えば、フォン・ウィルブランド因子サブユニットの４４１～７３３残基フラグメントをコードするＤＮＡ配列を用いて、前記フォン・ウィルブランド因子フラグメントの抗血栓性ドメインをコードするＤＮＡ小配列を作った部位特異的又はループアウト（loopout）突然変異誘発の操作を説明している。

次のポリペプチドは、これら操作に従って作ったものの一部である：(A)残基４４１～７３３配列からなるが内部残基４７４～４８８又は残基６９４～７０８小配列のいずれかを欠いているポリペプチド；(B)Ｎ－末端欠落を含む前述のフラグメントの追加のポリペプチドドメイン、例えば、Ｇｌｙ^{475}～Ｖａｌ^{733}、Ｔｈｒ^{492}～Ｖａｌ^{733}及びＴｙｒ^{508}～Ｖａｌ^{733}；(C)Ｃ－末端欠落を含むポリペプチド、即ち、Ａｒｇ^{441}でアミノ末端を有するが、例えば、残基Ａｓｐ^{709}、Ｐｒｏ^{704}、Ｇｌｕ^{700}及びＡｓｐ^{696}でカルボキシ末端を有するポリペプチド；及び(D)Ｎ－末端欠落とＣ－末端欠落のいずれをも有するドメインを含む最終クラスのポリペプチド。

本発明のこの態様の抗血栓性ポリペプチドを図２に示す。本発明のこのポリペプチドは１～３のドメインを含み、凡そＣｙｓ^{509}でアミノ末端を有し凡そＣｙｓ^{695}でカルボキシ末端を有する成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニットのドメインに対応するアミノ酸の配列を共有している。このドメインを含有するポリペプチドは２つの型で存在する、即ち、５０９～６９５鎖内ジスルフィド結合を含有するもの、及び該ジスルフィド結合を欠いている分子である。典型的には、還元型を維持するには、システインを還元してから化学的にアルキル化するか、又はコーディングＤＮＡの修飾に基づいて他のアミノ酸でそれを置換することが要求される。

本発明の追加のポリペプチドは、前述のＣｙｓ^{509}～Ｃｙｓ^{695}ドメインを含み、前記ドメインのアミノ末端に結合した、Ａｒｇ^{441}又はその近傍にアミノ末端を有し凡そＴｙｒ^{508}にカルボキシル末端を有する成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニットのフラグメン

ト、又はそのサブフラグメント又はサブフラグメントの組み合わせに対応するアミノ酸配列を含む追加の“第２”ドメインも含む。
本発明の追加のポリペプチドは、前述のＣｙｓ^{509}～Ｃｙｓ^{695}ドメインを含み、前記Ｃｙｓ^{509}～Ｃｙｓ^{695}ドメインのカルボキシ末端に結合した、凡そＡｓｐ^{696}にそのアミノ末端を有し凡そＶａｌ^{733}にそのカルボキシ末端を有する成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニットのフラグメント、又はそのサブフラグメント又はサブフラグメントの組み合わせに対応するアミノ酸配列の第３の、又は“他のドメイン”も含む。
本発明の追加のタイプのポリペプチドは、Ｃｙｓ^{509}～Ｃｙｓ^{695}からのアミノ酸の配列が構成要素になるドメイン、及び前述の第２及び第３ドメインのいずれもが寄与するポリペプチドを含む。
従って、本発明のポリペプチドを、潜在的な抗血栓活性を示すin vitro分析法で試験した。本発明のポリペプチドの特性の説明は、実施例１４～１７に示す。

治療活性を有する抗体

抗体、特にコンフォメーション依存性抗体は、巨大分子の構造及び機能を分析するための有力な道具である。巨大分子の相互作用を遮断ることによって、抗体も重要な治療的有用性を有し得る。
従って、本発明は、ｖＷＦサブユニット、又はそのサブセットを含有する何らかのポリペプチドに特異的な抗体であって、本発明により定義される１又は２以上のポリペプチドで動物を免疫感作することを含む方法によって作られる抗体をその範囲内に包含する。

治療用組成物

本発明の１又は２以上のポリペプチドは、治療、診断、又は他の用途のための医薬製剤に配合することができる。静脈内投与用にそれらを調剤するには、典型的には、塩化ナトリウムの如き１又は２以上の生理学的に適合性の物質をも含有する水に該組成物を溶解する。そうして、治療用途に相応しいｐＨ、イオン強度、及び浸透ポテンシャルを有する溶液を得る（可能な溶質濃度の範囲は当該技術分野で周知であるか又は容易に決められる）が、前記の水及び生理学的に適合性の物質は、薬学的に許容できるキャリヤーを含む。
本発明のポリペプチドの治療的用途に関して、血栓症を予防又は阻害するための投与量は、ＧＰＩｂαに対する該ポリペプチドのin vitroでの親和性、及び／又は体内の血流遮断及び血栓症に関与する他の巨大分子に対する親和性に、体内での該ポリペプチドの寿命に、及び患者が患っている血栓症の重さに依存するであろう。前記の量は、個々の患者について容易に決めることができる。
１又は２以上の本発明のポリペプチド及び追加の治療用物質をも含有する治療用組成物を提供することも、本発明の実施態様の範囲内である。かかる追加の物質には、ヘパリン及び他の抗凝血剤、アスピリン又は他の抗血小板薬、又は組織プラスミノーゲン活性化因子又は他の前線維素溶解薬が含まれる。

実施例

以下の実施例は、本発明の実施態様の代表例である。

実施例１－残基４４１（アルギニン）でアミノ末端を有し残基７３３（バリン）でカルボキシ末端を有する突然変異型システイン不含成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニットフラグメントの発現

プレプローフォン・ウィルブランド因子

ｍＲＮＡからのｃＤＮＡクローンの調製

ボストン（ＭＡ）のダナ・ファーバー癌研究所（Dana-Farber Cancer Institute）のデニス・リンチ（Dennis Lynch）博士により、（プレポリペプチドの）全縁フォン・ウィルブランド因子遺伝子をコードするｃＤＮＡクローンの提供を受け、リンチら，Cell,41,49-56(1985)に記載されたようにして調製した。ｖＷＦ ｍＲＮＡの大きさは、ヒト２８Ｓ型ｒＲＮＡの大きさを超えているように思われた。従って、内皮細胞（血漿ｖＷＦの主要供給源）からの全ＲＮＡをショ糖勾配中で、ｃＤＮＡライブラリー構築用に選択した２８Ｓより大きいＲＮＡで沈殿させた。
この豊富化した画分を、ポリ（ｕ）－セファデックス▲Ｒ▼クロマトグラフィーの２つの

別のサイクルを用いて更に精製して、３'ポリアデニル化末端を有するＲＮＡ種（ｍＲＮＡ）を選択した。リンチらは前記文献で、この画分中のｖＷＦ ｍＲＮＡの存在率を５００中約１と見積もり、この画分を用いて、約６０，０００独立組換え体のｃＤＮＡライブラリーを生じさせた。

ｃＤＮＡライブラリーを生じさせるのに標準技術を用いた。オリゴ（ｄＴ）プライマーを用いてｍＲＮＡ集団をプライムし、次いで逆転写酵素で転写した。次いで、アルカリ加水分解により該ＲＮＡ鎖を除去して、（転写鎖と等価である）ｃＤＮＡアンチコーディング鎖を残し、これをＤＮＡポリメラーゼＩを用いる第２鎖合成用にヘアピンループピングによってプライムした。S_1ヌクレアーゼでヘアピンループを除去して粗末端をＤＮＡポリメラーゼＩで埋め合わせた。

次いで、ＧＣテーリング（マニアチス（Maniatis,T.）ら，Molecular Cloning,2nd ed.,v.1,p.5.56(1987)）を用いて、該ｃＤＮＡをプラスミドベクターｐＢＲ３２２内にアニーリングした。オリゴ（ｄＣ）テールを該ｃＤＮＡフラグメントにターミナルトランスフェラーゼで付け、オリゴ（ｄＧ）でテーリングされたｐＢＲ３２２にアニーリングした。このプラスミドを増殖させるためにアンピシリン感受性大腸菌、ＨＢ１０１株内に形質転換した。免疫精製したｖＷＦポリソームの逆転写酵素産物として調製した^{32}Ｐ標識ｃＤＮＡでスクリーニングした後、適するクローンを同定した。陽性クローンをｐＳＰ６４（プロメガ社，マジソン，ＷＩ）内にサブクローン化した。

ｃＤＮＡのプライマー統制（Primer directed）増幅

ｐＳＰ６４からの完全長プレプロｖＷＦ遺伝子に相当するｃＤＮＡをポリメラーゼ連鎖反応で酵素的増幅に付した。該プレプロｖＷＦ遺伝子の確立されたヌクレオチド配列（ボンスロン（Bonthron,D.）ら，Nucl.Acids Res.,14(17),7125-7127(1986)；マンキュソ（Mancuso,D.）ら，J.of Biological Chemistry,v.264(33),19514-19527(1989)）に基づいて、興味の対象である領域の側面に位置するオリゴヌクレオチド（(1)，配列番号：２、及び（2），配列番号：３と呼称する）を調製した。ここで用いた全てのオリゴヌクレオチドは、モデル３８０Ｂ自動化システム（アプライド・バイオシステムズ，フォスターシティ，ＣＡ）を用いるホスホラミダイト（phosphoramidite）法（シンハ（Sinha）ら，Tetrahedron Letters,24,5843(1983)）によって合成した。

オリゴヌクレオチド（1）（配列番号：２）

5'ACGAATTC CGG CGT TTT GCC TCA GGA3'
　　EcoRI Arg$_{441}$ Gly$_{446}$

オリゴヌクレオチド（2）（配列番号：３）

3'GG GAC CCC GGG TTC TCC TTG AGG TAC CAT TCGAAG5'

5'cc ctg ggg ccc aag agg aac tcc atg gta agcttc3'
　　Leu$_{725}$ Met$_{732}$ Val$_{733}$ HindIII

該オリゴヌクレオチドは、トリプシンでの消化により生成させることができ、残基４４９（バリン）で始まり残基７２８（リシン）で終わる成熟ｖＷＦサブユニットのフラグメントのコーディング領域の末端と重複している。オリゴヌクレオチド(1)は、アミノ酸位置４４１～４４６のコーディング鎖ＤＮＡ（ｍＲＮＡと類似）に対応しており、ＥｃｏＲＩ制限部位５'がアミノ酸４４１のコドンに付いている。オリゴヌクレオチド(2)は、アミノ酸位置７２５～７３３についての成熟ｖＷＦ ＤＮＡの非コーディング鎖（転写鎖）に対応しており、ＨｉｎｄIII制限部位３'がアミノ酸７３３のコドンに付いている。（2）に相補的なコーディング鎖を小文字で示している。

次いで、上のオリゴヌクレオチドを鋳型としての完全長ｃＤＮＡと共に用いて、成熟ｖＷＦ残基No.４４１～７３３に対応しかつＥｃｏＲＩ及びＨｉｎｄIIIリンカーを含有するｃＤＮＡフラグメントを、サイキら，Science,239,487-491(1988)の方法に従って、ポリメラーゼ連鎖反応で合成した。

この操作は、そのサブセグメントが増幅されることになる二本鎖ｖＷＦ ｃＤＮＡのセグメント、及び該サブセグメントの末端の側面に位置する２本の一本鎖オリゴヌクレオチド

プライマー（この場合はオリゴヌクレオチド(1), （2））を用いる。該プライマーオリゴヌクレオチドは、（ＤＮＡポリメラーゼ及びデオキシリボヌクレオチドトリホスフェートの存在下で）増幅されるべきＤＮＡよりもずっと高い濃度で添加された。
具体的には、Ｔａｑポリメラーゼ（Thermus aquaticus）を用いてＤＮＡサーマルサイクラー（thermal cycler）（パーキン・エルマー社, Norwalk,CT/Cetus Corporation,Berkeley,ＣＡ）でＰＣＲ反応を行った。この反応は、１．０μｇのプレプロｖＷＦ ｃＤＮＡ、１．０μｇの各合成オリゴヌクレオチドプライマー、及び５０ｍＭ ＫＣｌ、１０ｍＭトリス・ＨＣｌ（ｐＨ８．３）、１．５ｍＭ $MgCl_2$、０．１％ゼラチン（バイオラッド社, リッチモンド, ＣＡ）及び２００ｍＭの各ｄＮＴＰからなる緩衝液を含有する１００μｌ容量中で行った。ＰＣＲ条件は、９４℃で３０秒、５２℃で３０秒及び７２℃で１分を３５サイクルするものであった。次いで、増幅したフラグメントを２％アガロースゲルによる電気泳動によって精製及び単離した（マニアチスら, Moleculara Cloning,A Laboratory Mannual,164-170,Cold Spirng Harbor Lab.,Cold Spring Harbor,NY(1982)）。
変性、オリゴヌクレオチドアニーリング、及び合成を多数回行った後に蓄積するポリヌクレオチドの大多数は、クローニングによって更に増幅するのに適する目的の二本鎖ｃＤＮＡサブセグメントに相当する。
幾つかの実験を行うために、アミノ酸配列位置４４９で始まり位置７３３で終わる成熟ｖＷＦフラグメントに対応するｃＤＮＡを、ニューマン（Newman,P.J.）ら, J.Clin.Invest.,82,739-743(1988)の操作に従って、血小板ｍＲＮＡから直接に調製及び増幅した。プライマーヌクレオチドNo.４４０及び７３３を前のように用いて、ＥｃｏＲＩとＨｉｎｄIIIリンカーを含有するｃＤＮＡを得た。

<u>Ｍ１３ｍｐ１８クローニングビヒクル内へのｃＤＮＡの挿入</u>

次いで、残基４４１～７３３からのアミノ酸配列に対応する得られた二本鎖フォン・ウィルブランド因子ｃＤＮＡを、ＥｃｏＲＩ及びＨｉｎｄIII制限酵素を用いて、適合するＥｃｏＲＩ及びＨｉｎｄIII配列を有する多クローニング部位を含有するバクテリオファージＭ１３ｍｐ１８の二本鎖複製型内に挿入した。
Ｍ１３シリーズ線状ファージは雄（Ｆ因子含有）大腸菌株に感染する。該ウィルスの感染型は一本鎖ＤＮＡ、つまり（$^+$）鎖により表される。これは、宿主酵素によってマイナス（$^-$）鎖も含有する二本鎖環状型に転化され、その二本鎖構造を複製型（ＲＦ）という。該ウィルスの安定な一本鎖（$^+$）型を単離する能力は、そこでクローン化されるあらゆる配列の完全性を証明するのに特に有用である。メッシング(Messing,J.),Meth.Enzymology,101,20-78(1983)；ヤニッシュ－ペロン（Yanish-Perron,C.）ら, Gene,33,103-109(1985)を参照のこと。
従って、ｖＷＦ ｃＤＮＡ挿入体を、一本鎖ジデオキシ法（サンガー（Sanger,F.）ら, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,74,5463-5467(1977)）を用い、Ｍ１３ｍｐ１８の一本鎖（$^+$）型を用いて完全に配列分析して、該ｖＷＦ ｃＤＮＡフラグメントが成熟ｖＷＦサブユニット残基４４１～７３３の正確なコーディング配列を含有していることを確認した。

<u>システイン残基を置換するための部位特異的突然変異誘発</u>

アミノ酸４４１～７３３に対応する成熟ｖＷＦフラグメント内のシステイン残基４５９、４６２、４６４、４７１、４７４、５０９、及び６９５を、対応するｃＤＮＡ内のシステインコドンをグリシンコドンに置換することによって、グリシン残基で置換した。これを行うために、ｖＷＦ ｃＤＮＡの各システインコドンの領域を包含するオリゴヌクレオチド（配列表の配列番号：５～８を参照のこと）を、システインをグリシンに置換するのに必要な対応する塩基置換を有する非コーディング鎖（転写鎖）として調製した。用いたオリゴヌクレオチドは次の通りである。
オリゴヌクレオチド（3）（配列番号：４）

```
3'GGA CTC GTG CCG GTC TAA CCG GTG CAA CTA CAA CAG5'
5'cct gag gac ggc cag att ggc cac ggt gat gtt gtc3'
  Pro Glu His Gly Gln Ile Gly His Gly Asp Val Val
              459         462     464
```

(システイン４５９、４６２、４６４を同時に置換)

オリゴヌクレオチド（4）（配列番号：５）

```
3'TTG GAG TGG CCA CTT CGG CCG GTC CTC GGC5'
5'aac ctc acc ggt gaa gcc ggc cag gag ccg3'
  Asn Leu Thr Gly Glu Ala Gly Gln Glu Pro
             471         474
```

(システイン４７１、４７４を同時に置換)

オリゴヌクレオチド（5）（配列番号：６）

```
3'CTA AAG ATG CCG TCG TCC G5'
5'gat ttc tac ggc agc agg c3'
  Asp Phe Tyr Gly Ser Arg
            509
```

(システイン５０９を置換)

オリゴヌクレオチド（6）（配列番号：７）

```
3'TCG ATG GAG CCA CTG GAA CGG5'
5'agc tac ctc ggt gac ctt gcc3'
  Ser Tyr Leu Gly Asp Leu Ala
            695
```

(システイン６９５を置換)

ハイブリダイズ用（hybridizing）オリゴヌクレオチドは大文字で示しており、転写鎖（非コーディングＤＮＡ）に相当する。相当するコーディング鎖は、標準的な３文字表記法（表記法については表１を参照のこと）によって示した対応するアミノ酸と共に小文字で示している。

以下に詳細に説明するように、システイン４５９、４６２及び４６４を、オリゴヌクレオチド(3)を用いて同時に置換した。次いで、システイン残基４７１及び４７４を、オリゴヌクレオチド(4)を用いて同時に置換した。次いで、システイン残基５０９と６９５を、それぞれオリゴヌクレオチド(5)と(6)を用いて別々に置換した。

システインからグリシンへのｃＤＮＡ置換は、クンケル, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,82,488-492(1985)の操作に従って行った。その操作は、一連の工程を各オリゴヌクレオチドについて繰り返し、ウラシル含有ＤＮＡ鋳型に対して選択する条件を利用するものである：

(A)アミノ酸位置４４１～７３３に対応する野生型ｖＷＦ ｃＤＮＡを含有するＭ１３ｍｐ１８ファージを、大腸菌ＣＪ２３６突然変異型ｄｕｔ⁻ｕｎｇ⁻株内でウラシル豊富培地中で生育させる。この大腸菌株はデオキシウリジントリホスファターゼを欠いている（ｄｕｔ⁻）ので、ＤＮＡ内への組み込みについてｄＴＴＰと競合するｄＵＴＰの細胞内プールがたまる。（シュロマイ（Shlomai,J.）ら, J.Biol.Chem.,253(9),3305-3312(1978)を参照のこと。）これら条件下で合成されたウィルスＤＮＡは、ウィルスゲノム当たり幾つかのウラシル挿入を含み、ウラシルグリコシラーゼを欠く（ｕｎｇ⁻）株の如き、ウラシルを除去できない大腸菌株内でのみ安定である。ウラシル含有ヌクレオチドは、ウラシルグリコシラーゼによる非塩基部位の生成のために、ｕｎｇ⁺株内の一本鎖（⁺）Ｍ１３ｍｐ１８ＤＮＡ内で致命的となる。

(B)一本鎖（⁺）ウィルスＤＮＡを、ファージが大腸菌株ＣＪ２３６ｄｕｔ⁻ｕｎｇ⁻内で生育した培地から単離する。該ウィルスの一本鎖（⁺）型は、ｃＤＮＡが非転写ｖＷＦ ｃＤＮＡ鎖に相当するその多クローニング部位で特殊化されたｖＷＦ ｃＤＮＡを含有する。

(C)次いで、位置４５９、４６２及び４６４においてシステインをグリシンに置換するのに必要なコドン変異を含有するオリゴヌクレオチド(3)を一本鎖（+）ファージＤＮＡにin vitroでアニーリングする。一般に、この操作には広い範囲のオリゴヌクレオチド濃度が適する。典型的には、４０ｎｇのオリゴヌクレオチドを０．５～１．０μｇ Ｍ１３ｍｐ１８ファージ（+）ＤＮＡにアニーリングした。
(D)次いで、Ｍ１３ｍｐ１８（-）鎖の全ての欠けた配列を、ｄＴＴＰ豊富環境下でT_7ＤＮＡポリメラーゼ及びT_4ＤＮＡリガーゼを用いてin vitroで完全なものにし、それによって、成熟ｖＷＦサブユニットのアミノ酸位置４４１～７３３に対応する転写可能なｖＷＦ ｃＤＮＡ配列を生成させる。
(E)こうしてチミン正常（-）鎖及び（+）鎖を幾つかのウラシル置換と共に含有するようになった二本鎖Ｍ１３ｍｐ１８ファージを、正常レベルのウラシルグリコシラーゼとデオキシウリジントリホスファターゼを含有する野生型大腸菌ＸＬ－１ブルー（ストラタジェン，ラジョラ，ＣＡ）株内に形質転換する。
(F)この新たな宿主内に存在するウラシルグリコシラーゼ及び他の酵素は、二本鎖ファージのウラシル含有（+）鎖の破壊を開始して、残りのファージ（-）鎖ＤＮＡの宿主内における複製後に、該オリゴヌクレオチドにより誘発されたグリシン突然変異を反映する安定なチミン正常二本鎖（ＲＦ）ＤＮＡの存在をもたらす。
(G)次いで、Ｍ１３ｍｐ１８ファージ内のｖＷＦ配列のそれぞれの連続するシステインコドンがグリシンコドンに置換されるまで、各オリゴヌクレオチド(4)、(5)及び(6)について上の工程(A)～(F)のプロセスを繰り返す。
(H)突然変異誘発操作が完了するとすぐに、一本鎖ＤＮＡジデオキシ法（サンガーらの前記文献）を用いてｖＷＦ ｃＤＮＡ挿入体の配列を再確認した。

発現プラスミドの構築

次いで、ＥｃｏＲＩ及びＨｉｎｄIII制限エンドヌクレアーゼでの処理により、システインからグリシンへの７つの部位特異的突然変異点を含有する二本鎖ｖＷＦ ｃＤＮＡフラグメントをＭ１３ｍｐ１８ファージから取り出した後、高効率大腸菌発現ベクター内へのクローニングのために、該フラグメントの末端をＢａｍＨＩリンカーで修飾する（ロバーツ（Roberts,R.J.）ら，Nature,265,82-84(1977)）。この選択した特定の発現ベクターは、ローゼンバーグら，Gene,v.56,125-136,(1987)によって開発されたプラスミドｐＥＴ－３Ａであって、ＢａｍＨＩリンカー部位のすぐ隣に高効率（φ１０）Ｔ７転写プロモーターを含有するｐＢＲ３２２誘導体である。上で特定した成熟ｖＷＦ ｃＤＮＡのフラグメントを含有する場合、該ｐＥＴ－３Ａビヒクルを“ｐ７Ｅ”又はｐ７Ｅ発現プラスミドという。
第２ｐＥＴ－３Ａ由来発現プラスミド（ｐ７Ｄと呼称する）を構築した。このプラスミドは、該プラスミド内で反対方向にクローン化された同一のｖＷＦコーディング配列を含有する。ｐ７Ｄは、ｖＷＦポリペプチドフラグメントを発現することができない筈である。
第３発現プラスミド（ｐＪＤ１８）は、同じｐＥＴ－３Ａベクター内に、残基４４１～７３３のｖＷＦアミノ酸配列（７システインを有する）をコードする野生型５２／４８トリプシンｖＷＦフラグメントｃＤＮＡを含有する。
次いで、ｐ７Ｅ（又はｐ７Ｄ及びｐＪＤ１８）発現プラスミドを、十分に確立された手順（ハナハン(Hanahan,D.),J.Mol.Biol.,166,557-580(1983)）に従って、アンピシリン感受性大腸菌株ＢＬ２１（ＤＥ３）（ノバジェン（Novagen）社，マジソン，ＷＩ）内にクローン化した。ＢＬ２１（ＤＥ３）株は、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼの遺伝子を含有するように作られているので、該ｖＷＦ挿入体を高効率で転写することができる。

突然変異型ｖＷＦポリペプチドの発現

それぞれｐ７Ｅ、ｐ７Ｄ又はｐＪＤ１８発現プラスミドを含有する大腸菌株ＢＬ２１（ＤＥ３）の３つの別々のサンプルを、２００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する５～６ｍｌの２Ｘ－ＹＴ生育培地中に接種し、３７℃で一晩生育させて十分に生育した培養物を得た。２Ｘ－ＹＴ生育培地は、水１リッター当たり、１０ｇのバクト・トリプトン、１０ｇ酵母エキス及び５ｇ ＮａＣｌを含有する。次いで、やはり２００μｇ／ｍｌのアンピシ

リンを含有する５００ｍｌの２Ｘ－ＹＴ培地中に一晩培養物各５ｍｌを接種し、震盪しながら３７℃で２時間生育させた。
この２時間のインキュベーション後、５ｍＭの濃度までのイソプロピル－β－ｄ－チオガラクトピラノシドを添加することによって、該培養地のタンパク質発現を誘導した。次いで、インキュベーションを３７℃で３時間継続した。
ｐ７Ｅ及びｐＪＤ１８でｖＷＦポリペプチドが高レベルで発現し、高濃度のｖＷＦポリペプチドを本質的に不溶型で含有する細胞質顆粒又は“封入体”が生成した。次の操作に従ってｖＷＦポリペプチドの可溶化を行った。実施例２で説明するように、ｐ７Ｅ抽出物とｐＪＤ１８抽出物とでは、可溶化操作への応答が非常に異なった。封入体の特性の一般的説明、及び封入体についてうまくゆく操作戦略については、マニアチスら，Molecular Cloning,2nd ed.,vol.3,Sec.17.37,(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NYを参照のこと。
ＪＡ－１４ローター内での４０００ｇでの４℃１５分間の遠心分離によって細胞を採取した。沈殿した細胞を５０ｍｌの氷冷緩衝液（０．１Ｍ ＮａＣｌ、１０ｍＭトリスｐＨ９．０、１ｍＭ ＥＤＴＡ）中で洗浄して、４℃での４０００ｇの遠心分離によって再沈殿させた。
ｐ７Ｅ、ｐ７Ｄ及びｐＪＤ１８培養物からの細胞沈殿物を５ｍｌの溶解緩衝液中に再溶解して３０分間氷冷した。該溶解緩衝液は、スクロース２５％（ｗ／ｖ）、１ｍＭフッ化フェニルメチルスルホニル（ＰＭＳＦ）、１ｍＭエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、２ｍｇ／ｍｌライソザイム及び５０ｍＭトリス塩化水素のｐＨ８．０に調節した溶液を含む。
３０分間インキュベーションした後、１．０モル濃度の$MgCl_2$及び$MnCl_2$の小部分を添加して該溶解溶液を各カチオン１０ｍＭにした。次いで、６０μｇのＤＮＡｓｅＩ（ベーリンガー・マンハイム）を添加して、室温で３０分間インキュベーションを継続した。
次いで、２０ｍｌの緩衝液No.１（０．２Ｍ ＮａＣｌ、２ｍＭ ＥＤＴＡ及び１％（ｗ／ｖ）３－〔（３－コラミドプロピル）－ジメチルアンモニオ〕－１－プロパンスルホネート（ＣＨＡＰＳ）、１％（ｗ／ｖ）ノン・アイデット（Non-idet）４０、及び２０ｍＭトリス塩化水素，ｐＨ７．５）を該インキュベーション混合液に添加した。不溶物を１４，０００ｇ（ＪＡ－２０ローター内１２，０００ｒｐｍ）での４℃３０分間の遠心分離によって沈殿させた。
（ｐ７Ｄの場合を除いては目的のポリペプチドを含有する）各培養物から誘導された比較的不溶性の沈殿物質を２５℃で１０ｍｌの緩衝液No.２（０．５％（ｗ／ｖ）トリトンＸ－１００界面活性剤、２ｍＭ ＥＤＴＡ、０．０２Ｍトリス塩化水素、ｐＨ７．５）で洗浄して広範に渦を巻かせた。この懸濁液を１４，０００ｇで３０分間４℃で遠心分離してから上澄み液を捨てた。緩衝液No.２中での沈殿物質の懸濁、渦巻及び遠心分離のプロセスを２回繰り返した。
次いで、各沈殿物を５ｍｌの緩衝液No.３（０．０２Ｍトリス塩化水素、ｐＨ７．５及び２ｍＭ ＥＤＴＡ）中で２５℃で洗浄して広範に渦を巻かせた。次いで、該懸濁液を１４，０００ｇで３０分間４℃で遠心分離した後に上澄み液を捨てると、封入体由来物質の粘土様コンシステンシーを有する沈殿（“含水沈殿”）が残った（続く最終工程に関しては、そしてそれらの代わりに、更に改良した操作を示している実施例２０も参照のこと）。該不溶性沈殿物を室温に保った８モル濃度の尿素溶液にゆっくりと２時間で溶解させた後、４℃で一晩可溶化を継続した。尿素可溶物質を２０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ（Ｎ－〔２－ヒドロキシエチル〕ピペラジン－Ｎ－〔２－エタンスルホン酸〕）（ｐＨ７．４）（“食塩加Ｈｅｐｅｓ緩衝液”）を含有する０．１５Ｍ ＮａＣｌの溶液に対して４℃で広範に透析した。
可溶化したペプチド抽出物の純度を分析し（実施例２）、ｖＷＦ結合阻害分析（実施例３）に用いるか又は更なる精製に付した。更なる精製工程は遅らせて行ってはならず、サンプルは冷却したままにすべきである。

（サブユニット位置４４１～７３３を含む）システイン不含ｖＷＦポリペプチドは、上の操作に従って封入体から可溶化された物質の７５％以上を構成する。システイン不含突然変異型ｖＷＦポリペプチドの更なる精製は、該部分的に精製したペプチド抽出物を６Ｍグアニジン・Ｈｃｌ、５０ｍＭトリス・ＨＣｌ，ｐＨ８．８で透析し、続いて６Ｍ尿素、２５ｍＭトリス・ＨＣｌ、２０ｍＭ ＫＣｌ、０．１ｍＭ ＥＤＴＡ，ｐＨ８．０で透析することによって行った。次いで、該抽出液をアニオン交換のためにＱ－セファロース▲Ｒ▼ファースト・フロー（ファルマシア，ウプサラ，スウェーデン）を用いる高速液体クロマトグラフィーに付した。該カラムは、６Ｍ尿素、２５ｍＭトリス・ＨＣｌ、２０ｍＭ ＫＣｌ、０．１ｍＭ ＥＤＴＡ，ｐＨ８．０で予備平衡化した。該ｖＷＦポリペプチドの溶出には、ＫＣｌの濃度を２５０ｍＭに上昇させた以外は同じ緩衝液を用いた。更なる分析に用いたポリペプチドサンプルは、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、２０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ，ｐＨ７．４に対して透析した。しかしながら、尿素緩衝液（６Ｍ尿素、２５ｍＭトリス・ＨＣｌ、２０ｍＭ ＫＣｌ、０．１ｍＭ ＥＤＴＡ，ｐＨ８．０）中で最も長期間の貯蔵を行うことができた。最終ｐ７Ｅ－ｖＷＦポリペプチドの（酸加水分解による）アミノ酸組成（％）は、公表された配列情報（実施例１におけるボンスロンら及びママンキュソらの前記文献；図１も参照のこと）から予測した値に比較して近いものであった。

実施例２－発現プラスミドｐ７Ｅにより産生したシステイン不含突然変異型フォン・ウィルブラント因子フラグメントの特徴付け

発現プラスミドｐ７Ｅ、ｐ７Ｄ及びｐＪＤ１８を含有する培養物の封入体から抽出した尿素可溶化及び透析したポリペプチドを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）及びイムノブロッティングを用いて分析した。

ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動による特徴付け

尿素可溶化してから広範に透析した発現プラスミド抽出物の純度及び性質を、まず、ラエムリ(Laemli,U.K.),Nature,227,680-685(1970)が僅かに手を加えたウェバー（Weber,K）ら，J.Biol.Chem.,244,4406-4412(1969)の変性ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動操作を用い、１０％のアクリルアミド濃度を用いて分析した。結果として得られたゲルをクマシーブルーで染色して比較した。

発現プラスミドｐ７Ｅからの抽出物は、主成分として、約３６，０００ダルトンの見掛け分子量で移動する突然変異型フォン・ウィルブランド因子ポリアクリルアミドを含有する。該ポリペプチドは、還元条件（１０～１００ｍＭジチオスレイトール“ＤＴＴ”を含有する緩衝液中でゲルを作動する前に、サンプルに同じＤＴＴ濃度のＤＴＴを１００℃で５分間添加した）及び非還元条件下の両方で単一バンドとして現れ、この結果は、全てのシステイン残基をグリシン残基で置換したことと一致する。反対方向のｖＷＦ ｃＤＮＡ挿入体から予測されるように、ｐ７Ｄ発現プラスミドを含有する宿主細胞からは、ｖＷＦポリペプチドを抽出することはできなかった。

ｐＪＤ１８プラスミドを含有する宿主細胞により発現されたシステイン含有ｖＷＦポリペプチドであって、５２／４８フラグメントの野生型アミノ酸配列を含有するポリペプチド（ここでは残基４４１～７３３クローン化フラグメントにより表される）は、還元及び非還元条件下の電気泳動で異なる挙動を示した。ｐＪＤ１８型から発現された野生型配列は、分子間ジスルフィド架橋を形成して、１０％アクリルアミドゲルに入ることができない大きな分子量の凝集体をもたらす。還元（１００ｍＭ ＤＴＴと１００℃で５分間インキュベーション）後は、該ｖＷＦペプチドは、約３８，０００の分子量を有する単一のバンドとして移動する。

イムノブロッティングによる特徴付け

ｐ７Ｅ、ｐ７Ｄ及びｐＪＤ１８から発現されたポリペプチドを、バーネットら，A.Anal.Biochem.,112,195-203(1981)の標準操作及び試薬メーカーが推奨するところに従って、イムノブロッティング（“ウェスタンブロッティング”）によって更に特徴付けた。尿素可溶化及び透析した（ｐ７Ｅ、ｐ７Ｄ及びｐＪＤ１８プラスミドを含有する）宿主細胞の封入体からの約１０μｇのタンパク質を含有するサンプルを、２％濃度のドデシル硫酸ナトリウムの存在下で１０％ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動に付した（ラエムリ，Natu

re,227,680-685(1970))。
該タンパク質をニトロセルロースシート（シュライハー・アンド・シュエル(Schleicher and Schuell),Keene,ＮＨ）上にブロットして固定化し、次いで免疫反応性を用いてそのパターンを可視化した。
該ポリペプチドを同定するために用いた（マウスからの）フォン・ウィルブランド因子特異性モノクローナル抗体は、ＲＧ－４６（フジムラら，J.Biol.Chem.,261(1),381-385(1986)、フルハー（Fulcher,C.A.）ら，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,79,1648-1652(1982)）及びＮＭＣ－４（シマ（Shima,M）ら，Nara Med.Assoc.,36,662-669)1985)）であった。これらはいずれも、本発明の発現ｖＷＦポリペプチド内にエピトープを有している。
フレイカー（Fraker,P.J.）ら，Biochem.Biophys.Res.Commun.,80,849-857(1978)の方法によって標識された第２抗体（^{125}Ｉ－ウサギ抗マウスＩｇＧ）を該ニトロセルロースシート上で２５℃で６０分間インキュベートした。濯ぎ洗いをした後、該シートをオートラジオグラフィーによって現像した。
ｐ７Ｅ及びｐＪＤ１８発現プラスミドを含有する宿主細胞からのペプチド抽出物は、ＲＧ－４６抗体に対して強い免疫反応性を示し、ＮＭＣ－４抗体に対しては弱いが明確な親和性を示す。予期した通り、ｐ７Ｄプラスミドからのペプチド抽出物はＲＧ－４６及びＮＭＣ－４のいずれとも免疫反応性を示さない。
実施例３－ｐ７Ｅにより発現されたシステイン不含突然変異型ポリペプチドによるｖＷＦの血小板へのボトロセチン誘導結合の阻害
Bothrops jararacaの毒液から抽出したボトロセチンが、マルティマー性フォン・ウィルブランド因子の血小板へのin vitro結合を調節すること（リード（Read）ら，Proc.Natl.Acad.Sci.,75,4514-4518(1978)）、及びボトロセチンは、ｖＷＦに（該成熟サブユニットの）アミノ酸配列位置４４１～７３３を含有するその領域内で、従って、ＧＰＩｂ結合ドメイン内で結合することが証明された。（アンドリュース（Andrews,R.K.）ら，Biocehmistry,28,8317-8326(1989)）。
発現プラスミドｐ７Ｅ、ｐ７Ｄ及びｐＪＤ１８を含有する培養物から（実施例１の方法に従って）得られた尿素可溶化及び透析したポリペプチド抽出物を、更に精製することなしに、ホルマリン固定化血小板へのボトロセチン誘導ｖＷＦ結合を供与量に依存して阻害するそれらの能力について試験した。
マクファーレン（MacFarlane,D.）ら，Thromb.Diath.Heamorrh.34,306-308(1975)の方法に従って調製したホルマリン固定化血小板を、ｐＪＤ１８、ｐ７Ｄ、及びｐ７Ｅプラスミドを含有する培養物から得られたペプチド抽出物の特定の希釈液と共に室温で１５分間予備インキュベートした。次いで、最終濃度０．４μｇ／ｍｌのボトロセチン（シグマ，セントルイス，ＭＯ）、及び（フルハーら，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,79,1648-1652(1982)の方法に従ってヒト血漿寒冷沈降物から単離し、フレイカーら，Biochem.Biophys.Res.Commun.,80,849-857(1978)の方法に従って標識した）^{125}Ｉ－標識マルティマー性ｖＷＦを、該インキュベーション混合液中に添加し、該血小板に結合した^{125}Ｉ－ｖＷＦの量を測定した。
血小板への^{125}Ｉ－ｖＷＦ結合は、添加したペプチド抽出物の不存在下で結合した^{125}Ｉ－ｖＷＦの量を１００％結合と定義してこれを基準とした。
発現プラスミドｐ７Ｄ及びｐＪＤ１８からの（未還元及び未アルキル化）ペプチド抽出物は、血小板ＧＰＩｂレセプター結合部位において、血漿由来ｖＷＦと競合することができないことが明らかとなった。プラスミドｐ７Ｅからのペプチド抽出物は、（０～１００μｇ抽出物／ｍｌを用いたところ）供与量に依存して、ｖＷＦ結合を阻害するのに効果があった。インキュベーション混合物中の尿素可溶化ポリペプチド抽出物の濃度（μｇ／ｍｌ）は、該抽出物からの総タンパク質濃度を反映している。反応混合物にペプチド抽出物を添加すると、添加したペプチド抽出物の不存在下で見られる値の１１０％に見掛け初期結合を引き上げる一定の非特異的作用を起こす。用いた^{125}Ｉ－ｖＷＦ濃度は２μｇ．ｍｌであった。
実施例４－ジスルフィド依存性コンフォメーションを含むシステイン含有量を低下させた

突然変異型ｖＷＦフラグメントの発現

以下のように僅かに手を加えた以外は実施例１の操作を用いて、（残基４４１～残基７３３の成熟ｖＷＦサブユニット配列に対応する）突然変異型ｖＷＦポリペプチドフラグメントであって、位置４５９、４６２、４６４、４７１及び４７４でシステインをそれぞれグリシン残基に置換したフラグメントを調製した。位置５０９及び６９５でシステイン残基を残して、鎖内ジスルフィド結合を形成させた。

オリゴヌクレオチドNo.４５９及び４７１でのみ部位特異的突然変異誘発を行い、それによって、位置４５９、４６２、４６４、４７１及び４７４でのみグリシンコドンに置換した。突然変異誘発操作を完了するとすぐに、一本鎖ジデオキシ法を用いて突然変異型ｖＷＦ ｃＤＮＡの配列を確認した。

次いで、（システインからグリシンへの５突然変異点を含有する（ｖＷＦ ｃＤＮＡ挿入体の二本鎖型をＥｃｏＲＩ及びＨｉｎｄIII制限エンドヌクレアーゼでの処理によりＭ１３ｍｐ１８ファージから取り出し、実施例１におけるようにＢａｍＨＩリンカーで修飾し、そしてｐＥＴ－３Ａ内にクローン化した。そうして形成したｐＥＴ－３Ａビヒクルを“ｐ５Ｅ”又はｐ５Ｅ発現プラスミドという。

次いで、ｐ５Ｅ発現プラスミドを、ハナハン，J.Mol.Biol.,166,557-580(1983)の操作に従って、アンピシリン感受性大腸菌株ＢＬ２１（ＤＥ３）（ノバジェン社，マジソン，ＷＩ）内にクローン化した。このｐ５Ｅ突然変異型ポリペプチドを大腸菌株ＢＬ２１（ＤＥ３）の培養物から発現させた。これは、実施例１の操作に従ったが、８モル濃度尿素存在下での封入体沈殿物質の可溶化を室温で最初の２時間を越えて継続する必要はなく、この時点で溶解した物質は２００μｇ／ｍｌの濃度に達していた。ジスルフィド結合を形成するためのシステイン残基５０９と６９５の酸化は、食塩加Ｈｅｐｅｓ緩衝液に対して一晩透析することにより行った。鎖間よりは鎖内ジスルフィド結合を形成させるには、５０～１００μｇ／ｍｌの如き低タンパク質濃度でチオールの酸化を進行させるのが有利である。

ｐ７Ｅ抽出物に関する実施例１におけるように、尿素可溶化封入体試料の最終精製は、６Ｍグアニジン及び６Ｍ尿素緩衝液に対して透析した後にアニオン交換クロマトグラフィーに付することによって行った。

実施例５－発現プラスミドｐ５Ｅにより産生された突然変異型ｖＷＦフラグメントの特徴付け

発現プラスミドｐ５Ｅを含有する培養物により産生した突然変異型フォン・ウィルブランド因子ポリペプチドを、実施例２の操作を用いて特徴を明らかにし、特にプラスミドｐ７Ｅにより発現されたｖＷＦフラグメントと比較した。

（実施例４の操作に従って）封入体から抽出した尿素可溶化及び透析したポリペプチドを、実施例１におけるように生成させたｐ７Ｅプラスミド培養物からの類似の抽出物と比較した。

ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動による特徴付け

実施例２の変性ドデシル硫酸ナトリウムゲル操作を用いて、システイン残基５０９と６９５を用いてジスルフィド結合を形成することができるｐ５Ｅ ｖＷＦフラグメントを、システイン残基を持たないｐ７Ｅフラグメントと比較した。レーン当たり７．５μｇのタンパク質抽出物を用いて、還元（１００ｍＭジチオスレイトール）及び非還元条件下、１０％アクリルアミドゲル上で電気泳動を行った。

還元条件下では、クマシーブルーで染色して後、ｐ７Ｅとｐ５Ｅからの抽出物は、同一の電気泳動移動度を有する。

しかしながら、非還元条件下での電気泳動では、残基５０９と６９５に関係するジスルフィド結合の効果が証明される。相当量のｐ５Ｅ抽出物が、僅かしかゲルに入らない（鎖間ジスルフィド結合の結果として得られる）高分子量複合体として現れる。初期試料のゲルの比重走査は、非還元性ゲル上に見られるｐ５Ｅポリペプチド物質の約２５％が、約３８，０００の見掛け分子量を有する４４１～７３３フラグメントのモノマーに相当することをしめしている。ｐ５Ｅ抽出物中に存在するモノマーのこのパーセントは、尿素可溶化、

透析、及び鎖間よりも鎖内ジスルフィド結合形成を有利にする５０～１００μｇ／ｍｌの如きより希薄なタンパク質濃度でのチオール酸化を行うことにより、有意に向上させることができる。
このｐ５Ｅモノマー種は、非還元条件下で電気泳動の間、システイン残基を持たない比較ｐ７Ｅ生成種よりも僅かに高い移動度を有する。これらｐ５Ｅ及びｐ７Ｅモノマー性３８ｋＤａ種の移動度は還元条件下では同一のようである。非還元条件下、ＳＤＳ存在下で第３構造を維持するポリペプチドのこの僅かに加速した移動度は、前記条件下で該アニオン性界面活性剤により負に荷電した十分に硬直性の棒状物に完全に転化される同種ポリペプチドの移動度と比較すれば、概して鎖内ジスルフィド結合の存在を示唆していると考えられる。

イムノブロッティングによる特徴付け

ｐ５Ｅ及びｐ７Ｅ抽出物の挙動も免疫学的方法を用いて検定した。
実施例２におけるように、ｖＷＦ特異的マウスモノクローナル抗体ＲＧ－４６及びＮＭＣ－４をプローブとして用いた。ＲＧ－４６は、そのエピトープとして、成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニット内の残基６９４～７０８を含む線状アミノ酸配列を認識することが証明されている。この抗体のその決定基への結合は、本質的にコンフォメーション依存性である。モウリら，J.Biol.Chem.,263(34),17901-17904(1988)。
しかしながら、ＮＭＣ－４は、そのエピトープとして、糖タンパク質Ｉｂ結合部位を含有するフォン・ウィルブランド因子サブユニットのドメインを有する。該エピトープのマッピングにより、それは、ジスルフィド依存性会合に加わっている（凡そ成熟ｖＷＦサブユニット残基４７４～４８８及び凡そ残基６９４～７０８を含む）２つの不連続ドメイン内に含まれていることが証明されている（モウリらの前記文献）。もっとも、天然ｖＷＦ分子内にこの三次コンフォメーションを授けているジスルフィド結合が鎖内か鎖間かは不明であった。同文献の１７９０３頁。
まず、特定のバンドの（還元及び非還元条件下での）抗原的挙動をクマシーブルー染色によって上で得られた結果と比較できるように、（タンパク質の）７．５μｇサンプルを１０％ＳＤＳポリアクリルアミドゲル上を移動させた。実施例２におけるようにイムノブロッティングを行って、ｐ５Ｅ抽出物とｐ７Ｅ抽出物とを比較した。
ニトロセルロースシートへの抗体の適用は、次のようにして調製した抗体溶液で普通に行った。ＮＭＣ－４又はＲＧ－４６を産生するＢリンパ球ハイブリドーマをマウスに注射した。腹膜腫瘍からの腹水を採集し、典型的には、約５ｍｇ／ｍｌのモノクローナル抗体を含有した。該腹水をブロッキング液（５％（ｗ／ｖ）脱脂粉乳を含有するＰＢＳ，カーネーション）中に混合（１：１０００）して非特異的バックグラウンド結合を最小限にした。次いで、この抗体含有ブロッキング液を該ニトロセルロースに適用した。
非還元条件下で、（残基４４１～残基７３３の配列に相当する）単鎖ｐ５Ｅポリペプチドフラグメントは、やはり残基４４２～７３３の一次配列に相当するｐ７Ｅから単離された比較システイン不含種と比較して、ＮＭＣ－４に対する結合親和性が約１２０倍増加した。（１００ｍＭ ＤＴＴを用いて）還元条件下で電気泳動した後は、該単鎖ｐ５Ｅ種のＮＭＣ－４に対する親和性は顕著に減少し、それは還元条件下でも非還元条件下でもシステイン不含ｐ７Ｅ種のものに非常に近いものであった。ＮＭＣ－４も、還元及び非還元のいずれの条件下でも、ｐ５Ｅ抽出物からのジスルフィド連結ダイマーをエピトープとして認識できない。
ＮＭＣ－４に基づくオートラジオグラフを作るのに用いたニトロセルロースフィルターを、低い抗体力価と短い接触時間の組み合わせにより低く維持された初期ＮＭＣ－４接触応答を差し引くことによって、ＲＧ－４６で再スクリーニングした。該フィルター上でのｐ７Ｅ ３６，０００ｋＤａポリペプチドへのＲＧ－４６の結合は、還元又は非還元条件のいずれが選ばれても同じである。このことは、発現されたポリペプチド中で全てのシステインがグリシンと置換されたことと一致する。
（ＲＧ－４６と反応性である）大きな分子量のｖＷＦ抗原が、非還元条件下でｐ５Ｅポリペプチド抽出物中に存在する。（鎖間ジスルフィド結合を反映する）これらｐ５Ｅ ｖＷ

Ｆ凝集体は、還元条件下で、それらのジスルフィド連絡の破壊を示すｐ７Ｅポリペプチドと同じ位置に移動する。しかしながら、非還元条件下でＲＧ－４６によって容易に認識されるこの大きなｐ５Ｅ鎖間ジスルフィド凝集体は、還元及び非還元いずれの条件下でもＮＭＣ－４によって認識されない。かくして、天然のマルティマー性ｖＷＦサブユニット内の残基５０９と６９５の間のジスルフィド結合は、鎖内連絡に該当することが証明される。

実施例６－ｐ５Ｅポリペプチドによる抗ＧＰＩｂモノクローナル抗体の結合の阻害

モノクローナル抗体ＬＪ－Ｉｂ１は、フォン・ウィンブランド因子－血小板糖タンパク質Ｉｂ相互作用を完全に阻害することが知られている。ハンダ（Handa,M.）ら，J.Biol.Chem.,261(27),12579-12585(1986)。それは、ｖＷＦ結合部位を含有するＧＰＩｂαのアミノ末端４５ｋＤａドメインと特異的に反応する。ビーセント（Vicente,V）ら，J.Biol.Chem.,265,274-280(1990)。

抗体結合へのｐ５Ｅ抽出物の阻害活性を評価するために、まず、ｐ５Ｅ抽出物の不存在下で半最大結合（half-maximal binding）を与えるであろうＬＪ－Ｉｂ１の濃度を選択した。

アマルシャム，アーリントン・ハイツ，ＩＬからのI^{125}及びヨードゲン（Iodogen）（ピアス・ケミカル社，ロックフォード，ＩＬ）を用いて、フレイカーら，Biocehm.Biophys.Res.Commun.,80,849-857(1978)の操作により、ＬＪ－Ｉｂ１をヨウ素化した。ウォルシェ（Walsh）ら，Br.J.Haematol.,36,281-298(1977)のアルブミン密度勾配法によって精製血小板を調製し、１×１０^{8}／ｍｌの数で用いた。１０μｇ／ｍｌ ＬＪ－Ｉｂ１濃度で血小板への抗体の半最大結合を認め、この濃度をｐ５Ｅポリペプチド阻害研究に選択した。

６．０Ｍグアニジン及び尿素溶液に対する透析に続くＱ－セファロース▲Ｒ▼クロマトグラフィーによる尿素可溶化封入体試料の最終精製を含む実施例４の操作に従って、ｐ５Ｅポリペプチド抽出物を精製した。

結合を評価するために、血小板をＬＪ－Ｉｂ１（１０μｇ／ｍｌ）及び図３に示した濃度（０．００２～１０．０μモル濃度）の精製ｐ５Ｅタンパク質と共に２２～２５℃で３０分間インキュベートした。２μｇ／ｍｌのボトロセチン（シグマケミカル社，セントルイス，ＭＯ）の存在下（図３，塗り潰した丸）及びボトロセチン不存在下（中空きの丸）における阻害率をプロットした。

１００倍過剰の未標識ＬＪ－Ｉｂ１の存在下での結合競合実験により測定して、血小板に結合したI^{125}Ｉ標識の５％未満がＬＪ－Ｉｂ１以外の標識された物質によるものであった。バックグランド標識をデータポイントから差し引いた。^{125}Ｉ ＬＪ－Ｉｂ１の結合は、組換えポリペプチドを欠くコントロール分析のパーセントとして表した。ボトロセチンなしでは、血小板への^{125}Ｉ ＬＪ－Ｉｂ１結合の５０％阻害が１０μＭのｐ５Ｅポリペプチドで達成されたのに反して、ボトロセチン（２μｇ／ｍｌ）存在下では、５０％阻害は０．１μＭ未満で達成することができる。ボトロセチンが、循環多サブユニットフォン・ウィルブランド因子及びその単サブユニットにおいて、ＧＰＩｂαレセプターへの結合を高めるか又は可能にするコンフォメーションの変化を誘導することは知られている。この実施例は、（鎖内システイン５０９－６９５結合を含有する）ｐ５Ｅポリペプチドが、ボトロセチンによるその活性の調節のされ方に関して、天然の循環フォン・ウィルブランド因子と非常によく似た挙動をとることを証明している。従って、構造的類似性を暗示している。

実施例７－安定な哺乳動物形質転換体内でのホモダイマー性１１６ｋＤａフォン・ウィルブランド因子フラグメントの発現

この実施例は、残基４４１（アルギニン）でアミノ末端を有し残基７３０（アスパラギン）でカルボキシ末端を有する成熟ｖＷＦサブユニットフラグメントをコードするＤＮＡ配列を発現することができる条件、及び培養した哺乳動物宿主細胞からの天然の第３構造を有する４４１～７３０ｖＷＦフラグメントのグリコシル化ホモダイマー型の分泌を説明するものである。

１１６ｋＤａホモダイマーの発現は、次の構造要素が５'から３'方向に組み立てられたＤ

ＮＡ構築体（コーディング鎖又は非転写鎖という）を用いて行われる：
(A)真核性コンサンセス翻訳開始配列、ＣＣＡＣＣ；及び
(B)開始ｖＷＦメチオニンコドン、それに続くｖＷＦシグナルペプチドの残りの２１アミノ酸；及び
(c)ｖＷＦプロペプチドのアミノ末端領域から最初の３つのアミノ酸に対応するコーディング配列；及び
(D)ｖＷＦアミノ酸残基４４１～７３０のコーディング配列；及び
(E)“ＴＧＡ”翻訳終止コドン。
全縁プレプロｖＷＦ遺伝子をコードするｃＤＮＡクローン、つまりｐｖＷＦをボストン（ＭＡ）のダナ・ファーバー癌研究所のデニス・リンチ博士から入手して・リンチら，Cell,41,49-56(1985)に記載されたようにして調製した。ｐｖＷＦの調製は実施例１で説明した。
哺乳動物宿主細胞からの成熟ｖＷＦサブユニットのホモダイマー性Arg^{441}～Asn^{730}フラグメントの発現に必要な詳細な操作は、アズマ（Azuma,H.）らの刊行物、Independent Assembly and Secretion of a Dimeric Adhesive Domain of von Willebrand Factor Containing the Glycoprotin Ib-Binding Site,J.Biol.Chem.,266(19),12342-12347(1991)に記載されている。この組換え技術により作られた分子は、本来備わった性質により、分子間ジスルフィド結合の形成を介して、５２／４８ｋＤａ残基４４１～７３０ポリペプチドドメインのダイマー（１１６ｋＤａ）に自己会合し、血液から単離されたときのｖＷＦの最終構造でその役割を全く同様に行う。
モノマー性残基４４１～７３０ポリペプチドを作るには、そのシステイン残基４５９、４６２及び４６４（鎖間ジスルフィド連絡）のうち１又は２以上の不活性化、欠落又は置換が要求される。これは、以下に説明するように、Ｍ１３ｍｐ１８の如き適当なクローニングビヒクル内に含有されたときのｖＷＦ構築物の部位特異的突然変異誘発を用いて効果的に行うことができる。
実施例８－残基４５９、４６２及び４６４においてシステインからグリシンへの突然変異を有するモノマー性４４１～７３０成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニットフラグメントの発現用哺乳動物形質転換体の構築
この実施例は、残基４４１（アルギニン）でアミノ末端を有し残基７３０（アスパラギン）でカルボキシ末端を有し、更にその位置４５９、４６２及び４６４においてシステイン残基と置き換わったグリシン残基を含有する成熟ｖＷＦサブユニットフラグメントをコードするＤＮＡ配列を構築して哺乳動物細胞内に形質移入することができる条件を説明するものである。
ｐＡＤ３－２のＳａｌＩ－ＸｂａＩ挿入体（実施例７を参照のこと）を切断によって分離し、次いで、前もってＸｈｏＩ及びＸｂａＩ制限酵素で消化したｐｃＤＮＡ１ベクター（インビトロゲン，サンディエゴ，ＣＡ）内にクローン化した。ＸｈｏＩ及びＳａｌＩ制限部位は、同一の内部配列－ＴＣＧＡ－／－ＡＧＣＴ－を含有するので、ＳａｌＩ制限フラグメントをＸｈｏＩ部位内にアニーリングすることができる。該フラグメントをT_4ＤＮＡリガーゼで連結した；しかしながら、ＸｈｏＩ部位の完全性は元に戻らなかった。このプラスミド構築体をｐＡＤ４／ＷＴと呼称した。
Ｍ１３ｍＰ１８を用いる部位特異的突然変異誘発
ｐＡＤ４／ＷＴをＥｃｏＲＩ及びＳｍａＩ酵素で切断した。ｐｃＤＮＡ１ベクターは、ＸｈｏＩ（“ＳａｌＩ”）部位から上流にあるそのポリリンカー領域内にＥｃｏＲＩ部位を含有するが、ＳｍａＩ部位を含有しない。図１（配列番号：１）に示すように、独特のＳｍａＩ部位（ＣＣＣＧＧＧ）がｖＷＦ ｃＤＮＡ挿入体内に含まれており、成熟サブユニット残基７１６（グリシン）から残基７１８（グリシン）にまたがっている。
従って、ｐＡＤ４／ＷＴの約９５０塩基対ＥｃｏＲＩ－ＳｍａＩフラグメントをＭ１３ｍｐ１８ファージのポリリンカー領域内のＥｃｏＲＩ－ＳｍａＩ部位内にサブクローン化した。次いで、Ｍ１３ｍｐ１８内のｖＷＦ配列を突然変異誘発して、前もって切断したｐＡＤ４／ＷＴ構築体内に再挿入し、無傷の残基４４１～７３０ｖＷＦ配列を再び組み立てた

。
この突然変異誘発は、実施例１の操作及びクンケルの前記文献に従い、次のオリゴヌクレオチドを用いた。
オリゴヌクレオチド（７）－配列番号：８を参昭のこと
3'-GGACTCGTGCCGGTCTAACCGGTGCCACTACAACAG-5'

5'-cctgagcacggccagattggccacggtgatgttgtc-3'
Gly459 Gly462 Gly464

ハイブリダイズ用オリゴヌクレオチドは大文字で示されており（３'→５'）、転写鎖（非コーディング鎖ＤＮＡ）に相当する。下線を引いた文字は、該突然変異コドンについての１塩基突然変異を示す。相当するコーディング鎖は、３文字表記法によって特定した対応するグリシン置換と共に小文字で示されている。
次いで、突然変異型９５０塩基対ＥｃｏＲＩ－ＳｍａＩフラグメントを、前もって切断したｐＡＤ４／ＷＴプラスミドのＥｃｏＲＩ－ＳｍａＩ部位内に再挿入した。該突然変異型構築体をｐＡＤ４／Δ３Ｃと呼称した。長期間貯蔵及び増殖を容易にするために、ハナハン，J.Mol.Biol.,166,557-580(1983)の方法に従って、ｐＡＤ４／Δ３Ｃをアンピシリン感受性大腸菌株ＸＳ－１２７内に形質転換した。
実施例１の操作に準じて、該突然変異型ｃＤＮＡの配列をジデオキシ法により確認し、該プラスミドをＣｓＣｌ／臭化エチジウム平衡遠心分離により精製した。
ＣＯＳ－１細胞の形質転換
標準的なリン酸カルシウム媒介形質移入操作により、ｐＡＤ４／Δ３ＣをＣＯＳ－１細胞（ＳＶ４０形質転換アフリカミドリザル腎臓細胞，ＡＴＣＣ ＣＲＬ１６５０）内に導入した。チェン（Chen,C.）ら，Mol.Cell.Biol.,7(8),2745-2752(1987)。
ＣＯＳ－１細胞を、１０％ウシ胎児血清（ＦＣＳ）を補充したダルベッコ修飾イーグル培地（ＤＭＥＭ）（ギブコ／ライフ・テクノロジーズ社，Gaithersburg,ＭＤ）中、３７℃で５％CO_2雰囲気下で生育させ、次いで、１．５×10^5細胞／６０ｍｍ組織培養皿の密度で形質転換前２４時間継代培養した（約２５％の集密度）。ＣＯＳ－１細胞は、これら条件下で、ＤＭＥＭ／１０％ＦＣＳ中、約２０時間の倍加時間を有する。
形質転換をするために、バーンボイム（Birnboim,H.C.）及びドリイ(Doly,J.),Nucleic Acids Research,7,1513(1979)の方法に従って、ｐＡＤ４／Δ３Ｃプラスミドを大腸菌株ＸＳ－１２７から回収した。チェンらの前記文献に従って、リン酸カルシウム溶液中の各６０ｍｍ培養皿の細胞に１０μｇのプラスミドを適用した。プラスミドを接種した後、該細胞を５％CO_2雰囲気下でＤＭＥＭ／１０％ＦＣＳ中に３７℃で８時間維持した。
次いで、生育培地を食塩加リン酸緩衝液／１０％（ｖ／ｖ）グリセロールの溶液と置き換えた。次いで、培養液をグリセロール－ＰＢＳ中に２分間維持して形質転換体の生成を促進した（オースケル（Ausukel）ら編，Current Protocols in Molecular Biology,p.9.1.3,Wiley & Sons(1987)）。２分後、該グリセロール－ＰＢＳ溶液をＤＭＥＭ／１０％ＦＣＳと置き換えた。安定な形質転換体を選択するのに抗生物質耐性を用いなかった。次いで、細胞を５％CO_2雰囲気下でＤＭＥＭ／１０％ＦＣＳ中に３７℃で維持した。
実施例９－ｐＡＤ４／ＷＴプラスミドによるＣＯＳ－細胞の形質転換
ＣＯＳ－１細胞をｐＡＤ４／ＷＴプラスミドでもうまく形質転換した。安定な形質転換体を選択するのに抗生物質耐性を用いなかったが、それからの１１６ｋＤａフラグメントの一過性発現は、ｐＡＤ４／Δ３Ｃプラスミドにより産生された１１６ｋＤａ突然変異型ポリペプチドの特性を、ｐＡＤ４／ＷＴ１１６ｋＤａホモダイマーの特性と比較する目的に特に有用であった。
実施例９の操作に従って、ｐＡＤ４／ＷＴプラスミドを大腸菌株ＸＳ－１２７の貯蔵培養物から回収した。次いで、ｐＡＤ４／ＷＴでのＣＯＳ－１細胞の形質転換を実施例８の操作を用いて行った。次いで、該細胞を５％CO_2雰囲気下でＤＭＥＭ／１０％ＦＣＳ中で３７℃で維持した。
実施例１０－各突然変異体が１個のシステインからグリシンへの置換を含有する突然変異

型４４１～７３０成熟フォン・ウィルブランド因子サブユニットフラグメントを発現する哺乳動物形質転換体の構築

実施例８の操作に従い、そして部位特異的突然変異誘発に適するオリゴヌクレオチドを用いて、３つのプラスミド（ｐＡＤ４／G^{459}、ｐＡＤ４／G^{462}及びｐＡＤ４／G^{464}、総称して“ｐＡＤ４／Δ１Ｃプラスミド”という）を構築した。かかるプラスミドは、それぞれが、成熟ｖＷＦサブユニット残基位置４５９、４６２及び４６４のそれぞれにおいてシステインからグリシンへの１個の置換に対応する１個の塩基対突然変異を含有する以外は、ｐＡＤ４／ＷＴと同一である。用いたオリゴヌクレオチドは、それぞれが、オリゴヌクレオチド(7)の３つの突然変異コドンのうち１つだけを含有し、その他の２つのコドンが野生型コーディング配列によって表される以外は、ｐＡＤ４／Δ３Ｃを調製するのに用いたオリゴヌクレオチド(7)と同一である。長期間貯蔵及び増殖を容易にするために、実施例８の方法に従って、ｐＡＤ４／G^{459}、ｐＡＤ４／G^{462}及びｐＡＤ４／G^{464}のサンプルそれぞれをアンピシリン感受性大腸菌株ＸＳ－１２７内にクローン化した。

実施例８の操作に準じて、突然変異型ｃＤＮＡの配列をジデオキシ法により確認し、該プラスミドをＣｓＣｌ／臭化エチジウム平衡遠心分離により精製した。

ｐＡＤ４／G^{459}、ｐＡＤ４／G^{462}又はｐＡＤ４／G^{464}プラスミドのいずれかによるＣＯＳ－１細胞の形質転換は、実施例８の手順に従って行った。安定な形質転換体を選択するのに抗生物質耐性を用いなかった。次いで、細胞を５％CO_2雰囲気下でＤＭＥＭ／１０％ＦＣＳ中に３７℃で維持した。

実施例１１－ｐＡＤ４／ＷＴ及びｐＡＤ４／Δ３Ｃプラスミドで形質転換したＣＯＳ－１細胞によるフォン・ウィルブランド因子サブユニットフラグメントの発現及び特徴付け

実施例８及び９の操作それぞれに従い、ｐＡＤ４／Δ３Ｃ又はｐＡＤ４／ＷＴプラスミドで形質転換したＣＯＳ－１細胞を以下に説明するコードされたｖＷＦＤＮＡを発現するために培養した。（ｖＷＦ ｃＤＮＡ挿入体を含有しない）ｐｃＤＮＡ１プラスミドベクターで同じく形質転換したＣＯＳ－１細胞をコントロールとして用いた。

４～５×10^5／６０ｍｍ培養皿の密度のＣＯＳ－１細胞を、時間０で１０μｇのｐＡＤ４／ＷＴ、ｐＡＤ４／Δ３Ｃ又はｐｃＤＮＡ１プラスミドを添加することによって形質転換した。実施例９及び１０の操作に従って、８時間後に該細胞にグリセロールでショックを与えた。次いで、該細胞を５％CO_2雰囲気下、ＤＭＥＭ／１０％ＦＣＳで３７℃で３２時間覆った。

次いで、各培養液の細胞をＰＢＳで３回濯ぎ洗いして、１０００Ｃｉ／ミリモルの比活性を有する^{35}Ｓ－メチオニン（アマルシャム社，アーリントン・ハイツ，ＩＬ）を１００μＣｉ／ｍｌの最終濃度まで補充したＤＭＥＭ（ＦＣＳなし）と共にインキュベーションを継続した。細胞をインキュベーターに戻して１６時間後、それぞれの培地を採取して分泌したｖＷＦポリペプチドを免疫沈殿により精製した。

免疫沈殿は、概して実施例７の操作に従った。５ｍｌ容量の培地を０．５ｍｌの１０Ｘ免疫沈殿緩衝液、０．０５ｍｇのＮＭＣ－４抗体及び０．０５ｍｇのＲＧ－４６抗体と共に１６時間インキュベートした。

実施例７に従って、プロテインＡ－セファロース▲Ｒ▼４Ｂでの処理を行った。ＩｇＧ複合化ｖＷＦタンパク質のサンプルをＳＤＳ含有サンプル緩衝液中でのＰＡＧＥの前に解離させた。

還元条件下でのｖＷＦポリペプチドの分析用に、サンプル緩衝液を１００ｍＭジチオスレイトール（ＤＴＴ）を含有するように修飾した。

結果

ゲルは還元及び非還元条件下で作動させ、乾燥してからオートラジオグラフィーに付して^{35}Ｓ標識を現像した。^{35}Ｓ標識していないタンパク質は、還元及び非還元のいずれの条件下でも（未修飾ｐｃＤＮＡ１ビヒクルにより形質転換した）ＣＯＳ－１細胞のコントロール培養物由来の免疫沈殿物として検出されなかった（モックと呼称したゲルレーンを参照のこと）。

ｐＡＤ４／ＷＴプラスミドで形質転換したＣＯＳ－１細胞は、非還元条件下で見掛け分子

量約１１６，０００の突出した^{35}Ｓ標識バンドをもたらす。この値は、４４１～７３０フラグメントの正確な哺乳動物グリコシル化に一致する。還元条件下で移動させると、１１６ｋＤａ物質は現れず、これは１１６ｋＤａホモダイマーを安定化するジスルフィド結合が還元された場合と一致する。還元条件下では、突出した^{35}Ｓ標識バンドは、約５２，０００の見掛け分子量で可視化される。この見掛けの５２ｋＤａ値は、やはり還元されたモノマー性４４１～７３０フラグメントの正確なグリコシル化と一致する。

ｐＡＤ４／Δ３Ｃでの形質転換に対応するゲルレーンは、見掛け１１６ｋＤａ物質を示さない。代わりに、還元及び非還元条件下で、約５２，０００の見掛け分子量のバンドが現れる。

かくして、４４１～７３０ｖＷＦフラグメント内のシステイン残基４５９、４６２及び４６４をグリシン残基で置換する突然変異誘発は、おそらく鎖内（４７１から４７４及び５０９から６９５）ジスルフィド結合だけを有するであろう非ダイマー化ポリペプチドを発現できるようにする。ＮＭＣ－４との相互作用（実施例７を参照のこと）は無傷の５０９から６９５への鎖内ジスルフィド結合を必要とすることが知られているが、このことは、ｐＡＤ４／Δ３Ｃによって産生されたポリペプチド内に天然の野生型第３構造が存在することを証明するものである。

このゲルは、（還元及び非還元条件下で）低分子量の^{35}Ｓ標識物質の存在も証明している。このことは、おそらく、ｐＡＤ４／ＷＴ構築体により産生されたｖＷＦポリペプチドの全てがうまくダイマー化する訳ではないこと及び該ポリペプチドのタンパク質分解及び／又は不完全なグリコシル化が高収量を妨害していることを示している。タンパク質分解及び／又は不完全グリコシル化は、多分、ｐＡＤ４／Δ３Ｃ形質転換体によって産生されるモノマー性ｖＷＦポリペプチドの収量にも影響を及ぼすであろう。何らかの高分子量凝集物質（本質的にゲルに入らない）が、ｐＡＤ４／ＷＴ及びｐＡＤ４／Δ３Ｃからの非還元サンプル中に存在する。

実施例１２－ｐＡＤ４／ＷＴ及びｐＡＤ４／Δ３Ｃ形質転換ＣＯＳ－１細胞により分泌されるｖＷＦポリペプチドを免疫沈殿するためのＮＭＣ－４モノクローナル抗体の使用

ＮＭＣ－４モノクローナル抗体は、そのエピトープとして、糖タンパク質１ｂ結合部位を含有するフォン・ウィルブランド因子サブユニットのドメインを有する。該エピトープのマッピングにより、それは、１つの鎖内（残基５０９から６９５）ジスルフィド結合によるジスルフィド依存性会合に加わっている（凡そ成熟ｖＷＦサブユニット残基４７４～４８８及び凡そ残基６９４～７０８を含む）２つの不連続ドメイン内に含まれていることが証明された。

かくして、ＮＭＣ－４との反応性は、特定の組換え４４１～７３０成熟ｖＷＦサブユニットフラグメントが類似の野生型残基４４１～７３０ドメインの第３構造の役目を果たしているかどうかの重要な証拠となる。

従って、実施例１１の操作に従って、ｐＡＤ４／ＷＴ及びｐＡＤ４／Δ３Ｃ形質転換ＣＯＳ－１細胞により分泌されたｖＷＦポリペプチドの特徴を明らかにした。なお、培地の免疫沈殿をＮＭＣ－４抗体単独（０．５ｍｌの１０×免疫沈殿緩衝液を添加した培地５ｍｌ当たり０．０５ｍｇＮＭＣ－４）で行うという変更を加えた。

サンプルを還元及び非還元条件下で移動させた。実施例１１の結果と同じように、ｐＡＤ４／ＷＴの培地から単離した主成分は、非還元条件下で１１６ｋＤａそして還元条件下で５２ｋＤａの見掛け分子量を有する。

全ｐＡＤ４／Δ３Ｃ由来ｖＷＦポリペプチド物質の小画分だけが（コンフォメーション非依存性ＲＧ－４６に比較して）ＮＭＣ－４と結合するが、見掛け分子量５２ｋＤａのバンドは、還元及び非還元条件下で、ＮＭＣ－４免疫沈殿物のゲル中に目視可能である。

実施例１３－ｐＡＤ４／Ｇ^{459}、ｐＡＤ４／Ｇ^{462}及びｐＡＤ４／Ｇ^{464}プラスミドで形質転換したＣＯＳ－１細胞により産生されるフォン・ウィルブランド因子サブユニットフラグメントの発現及び特徴付け

ｐＡＤ４／Ｇ^{459}、ｐＡＤ４／Ｇ^{462}又はｐＡＤ４／Ｇ^{464}プラスミド（“Ｐ－ＡＤ４／Δ１Ｃプラスミド”と総称する）のいずれかによるＣＯＳ－１細胞の形質転換を実施例１０

の操作に従って行った。実施例７の操作に従い、免疫沈殿にＮＭＣ－４だけを用いて、分泌されたｖＷＦポリペプチドについて培地を分析した。
実施例１１に従って調製した^{35}Ｓ標識タンパク質をＮＭＣ－４により免疫沈殿させ、還元及び非還元条件下でＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル中で移動させてｐＡＤ４／ＷＴ及びｐＡＤ４／Δ３Ｃ形質転換体により産生したｖＷＦ抗原と比較した。
このゲルにより、天然成熟サブユニット内での鎖間ジスルフィド連絡の原因と考えられる３つのシステイン（４５９、４６２及び４６４）のいずれか１つの置換は、ｐＡＤ４／ＷＴ形質転換ＣＯＳ－１細胞の特性を示すホモダイマー性１１６ｋＤａポリペプチドの形成を阻止することが証明された。１個のグリシン置換を有するこれら３つのｖＷＦ抗原は、還元又は非還元条件下で、主として５２，０００の見掛け分子量のモノマ性ポリペプチドとして現れる。この主物質が５２ｋＤａの見掛け分子量を有することは、ヒト５２／４８ｋＤａトリプシンｖＷＦフラグメントに見られるグリコシル化を同じように行うＣＯＳ－１細胞形質転換体による正確なグリコシル化を強く示唆するものである。何らかの不適当にグリコシル化及び／又はタンパク質分解されたｖＷＦ抗原（分子量５２ｋＤａ未満）もこのゲルに現れている。うまく折り畳まれかつ分泌され、それによってＮＭＣ－４エピトープを有するｐＡＤ４／Δ３Ｃ ｖＷＦポリペプチドの比較的小さな画分が、見掛け５２，０００分子量の低強度のｐＡＤ４／Δ３Ｃ形質転換体オートラジオグラフバンドにより示された。
実施例１４－５２／４８ｋＤａポリペプチドのサブセットの調製
この実施例は、ｖＷＦサブユニットの残基４４１～７３３フラグメント由来のシステイン欠損サブセットである本発明の態様に該当するポリペプチドの調製を説明するものである。この実施例は、組換え細菌宿主細胞からかかるサブセットを発現させることができる条件を説明するものである。このサブセットは、例えば、実施例７及び８の一般的操作に従って、組換え真核細胞から発現させることもできる。このサブセットは、マルティマー性ｖＷＦと血小板ＧＰＩｂαとの相互作用に干渉することができる、即ち、それらは抗血栓剤としての有用性を有している。
以下に、前述のタイプのサブセットを含む３グループのポリペプチドの調製を説明する。第１グループのサブセットがシステイン不含であり、第２及び第３グループのサブセットがシステイン残基を２つだけ有する（５つのシステイン残基が除かれている）。第２及び第３グループのサブセットは、該ポリペプチドのＮ－末端領域（第２グループ）又はＣ－末端領域（第３グループ）のいずれかが残されている点で相違している。
ｖＷＦサブユニットの残基４４１～７３３ドメインのポリペプチドサブセット（システイン不含）
残基４４１～７３３配列からなるが、内部Ｇ１０（残基４７４～４８８）又はＤ５（残基６９４～７０８）領域のいずれかを欠く突然変異型（融合）ポリペプチドを、ｐ７Ｅ構築体の制限フラグメントのＭ１３ｍｐ18ファージ内でのループアウト突然変異誘発を用いて作成し、抗血栓活性について試験した。
具体的には、アルカリ性細胞溶解操作，バーンボイム及びドリイ，Nucleic Acids Research,7,1513(1979)を用いて、大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）の培養物からｐ７Ｅプラスミドを回収した後、ＣｓＣｌ／臭化エチジウム平衡遠心分離により精製した。ＸｂａＩ制限部位が、（親ｐＥＴ－３Ａベクターが寄与している）ｐ７Ｅプラスミド内に、Ｔ７転写プロモーターから上流に存在する。従って、（残基４４１～７３３のための）ｖＷＦ挿入体を、Ｍ１３ｍｐ18ファージ内でのループアウト突然変異誘発（実施例１を参照のこと）用のＸｂａＩ－ＨｉｎｄIII制限フラグメントとして取り出した。Ｇ１０領域又はＤ５領域のループアウトは、それぞれ、非コーディング鎖（転写鎖）ＤＮＡを表わす次のオリゴヌクレオチドを用いて行った。２つの３'→５'オリゴヌクレオチドの下に示したのは、対応するコーディング鎖及びその結果としてのアミノ酸配列である。
オリゴヌクレオチド(8)－配列番号：９を参照のこと

```
3'- GAG TGG CCA CTT CGG CAC TCG GGG TGG TGA - 5'

5'- ctc acc ggt gaa gcc gtg agc ccc acc act - 3'
    Leu Thr Gly Glu Ala Val Ser Pro Thr Thr
    469 470 471 472 473 489 490 491 492 493
                        ↑
```

Ｇ１０結合ペプチドの欠落

オリゴヌクレオチド(9)－配列番号：１０を参照のこと

```
3'- CTC TAG CAA TCG ATG CTG TAC CGT GTT CAG - 5'

5'- gag atc gtt agc tac gac atg gca caa gtc - 3'
    Glu Ile Val Ser Tyr Asp Met Ala Gln Val
    689 690 691 692 693 709 710 711 712 713
                        ↑
```

Ｄ５結合ペプチドの欠落

ＤＮＡ配列分析を用いて、目的のｖＷＦコーディング配列が生成したことを確認した。次いで、該２つの突然変異誘発ＸｂａＩ－ＨｉｎｄIII制限フラグメントを、ＸｂａI及びＨｉｎｄIII制限エンドヌクレアーゼで切断した別々のｐＥＴ－３Ａプラスミド内に挿入した。以下、これらをｐ７Ｅ／ΔＧ１０及びｐ７Ｅ／ΔＤ５と呼称した。

次いで、生成した突然変異型（融合）ｖＷＦポリペプチドを、それらのＧＰＩｂαへの結合能力について試験した。実施例６の分析操作（ボトロセチンモジュレーター不存在下でのＧＰＩｂαへのＬＪ－Ｉｂ１抗体の結合の阻害）を用いて、ｐ７Ｅから発現され“Ｇ１０”ペプチド配列が欠落した残基４４１～７３３フラグメントがＧＰＩｂαに結合することを確認した。“Ｄ５”ペプチド配列を欠くｐ７Ｅ由来融合フラグメントは結合しなかった。しかしながら、ボトロセチンを結合のモジュレーターとして用いて実験を繰り返すと（実施例６の方法を参照のこと）、該融合サブフラグメントのいずれも、ＬＪ－Ｉｂ１による結合を阻害する効果があった。従って、これらは抗血栓剤としての有用性を有している。

抗血栓活性を有するｖＷＦ由来ポリペプチドを同定するのに用いることができる他のin vitro分析には、突然変異型ポリペプチドによる血小板へのｖＷＦのボトロセチン誘導結合の阻害（実施例３を参照のこと）、及びボトロセチン又はリストセチン（ristocetin）の如きモジュレーターなしのウシｖＷＦを用いる系におけるヒト血小板凝集の阻害が含まれる。

Ｎ－末端欠落を有するシステイン欠損ポリペプチドサブセット

残基４４１～７３３ｖＷＦサブユニットを原型とするがＮ－末端欠落を含んでいる抗血栓剤として有効な治療用ポリペプチドサブセットも調製した。

かかるポリペプチドの調製を、ｐ５Ｅ発現プラスミドからのＸｂａＩ－ＨｉｎｄIII制限フラグメントのＭ１３ｍｐ１８ファージ内のループアウト突然変異誘発を用いて行った。かくして、該ｖＷＦコーディング配列（ｐ５Ｅ）は、残基位置５０９及び６９５についてシステインをコードし、残基位置４５９、４６２、４６４、４７１及び４７４においてグリシンをコードした。ｐ７Ｅもかかる抗血栓性ポリペプチドの発現に有用である。ｐ７Ｅ構築体から発現されたものに相当する抗血栓性ポリペプチドは、そこに含有されるシステイン残基の還元及びアルキル化によって作ることもできる。

ｖＷＦサブユニットフラグメント内にＮ－末端欠落を設けるのに用いるオリゴヌクレオチドのデザインは、ｖＷＦ残基４４１をコードするコドンから上流（５'）にあるｐＥＴ－３ＡベクターのＤＮＡ配列を参考にした。ＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｄIII挿入体（ＢａｍＨＩリンカーにより修飾されたその５'と３'の両方を有する）としての残基４４１～７３３フラグメントのｐＥＴ－３Ａ内での発現は、該ｖＷＦフラグメントのアミノ末端に結合したままの２０残基アミノ酸配列（配列番号：１１）の発現も含む。以下に示すように、この配列は、Ｔ７プロモーター部位から下流のベクターＤＮＡによりコードされるが、該ｖＷＦポリペプチドの抗血栓活性に逆作用することはない。

開始コドン
↓
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met

Gly Arg Gly Ser Pro Gly Leu Gln Glu Phe Arg$_{441}$
↑
ＥｃｏＲＩから

この特定の場合において、ＥｃｏＲＩコーディング配列（Ｇｌｕ－Ｐｈｅ）がT_4－ＤＮＡリガーゼ操作（実施例１）におけるＢａｍＨＩリンカーでの修飾にも拘らず存在し続けたことが注目される。開始メチオニン及び残基４４１（アルギニン）から上流に位置する対応するｐＥＴ－３Ａベクターコーディング配列は次の通りである。

オリゴヌクレオチド(11)－配列番号：１２を参照のこと

5'- GAA GGA GAT ATA CAT ATG GCT AGC ・・・
Met Ala Ser

従って、Ｎ－末端欠落の生成は、該ベクターからの配列（開始メチオニンで終わる）及び次いで新たなｖＷＦポリペプチドの予定のＮ－末端領域をコードするハイブリダイズ用オリゴヌクレオチドでのループアウト突然変異誘発を用いて行った。

該治療用ポリペプチドの調製に必要なオリゴヌクレオチドの代表は、非コーディング鎖（転写鎖）ＤＮＡに対応するオリゴヌクレオチド１２（配列番号：１３）である。このオリゴヌクレオチドの下に示すのは、対応するコーディング鎖と結果として生成するアミノ酸である。

3'- CCT CTA TAT GTA TAC GTC CTC GGC CCT CCG - 5'

gga gat ata cat atg cag gag ccg gga ggc
Met Gln Glu Pro Gly Gly
474' 475 476 477 478 479

かかるＮ－末端欠落を反映するシステイン欠損ポリペプチドの代表は、Ｍｅｔ・Ｇｌｎ^{475}～Ｖａｌ^{733}、Ｍｅｔ・Ｔｈｒ^{492}～Ｖａｌ^{733}、及びＭｅｔ・Ｔｙｒ^{508}～Ｖａｌ^{733}である。かかるポリペプチド（及び１又は２以上のシステイン残基を含有するｖＷＦ残基４４１～５０８配列のあらゆるサブセットの末端欠落を有する他の種）は、抗血栓性治療活性を有する。これらポリペプチドは、ｐ５Ｅ構築体から発現される場合には、システイン５０９－６９５ループも示すことができる。細菌発現系が、生成するポリペプチドからの開始メチオニン残基の開裂を起こすかどうかを確認するために、配列分析実験を行うことはしなかった。

Ｃ－末端欠落を有するシステイン欠損ポリペプチドサブセット

ｐＥＴ－３Ａベクターを用いて組換え細菌ポリペプチドを発現するのに用いた操作は、Ｖａｌ^{733}のＣ－末端側に一続きのアミノ酸を含むポリペプチドをもたらす。この追加の残基はベクター配列の翻訳から起こるものである（配列番号：１４を参照のこと）。

具体的には、ｐ５Ｅ（又はｐ７Ｅ）構築体から発現される残基４４１～７３３フラグメントは、最初のベクター停止コドンの前のベクター配列の発現の結果として生じる、残基７３３（バリン）のＣ－末端側と融合した２２残基も含有する。

ＢａｍＨＩリンカーによるＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｄIIIフラグメントのＨｉｎｄIII部位の修飾（実施例１）も反映しているこのｐＥＴ－３Ａベクター配列は（配列番号：１４）：

Val Ser Ser Asp Pro Ala Ala Asn Lys Ala
733

Arg Lys Glu Ala Glu Leu Ala Ala Ala Thr

Ala Glu Gln *
↑
停止コドン

Ｃ－末端欠落を有するｖＷＦポリペプチドをコードする適当なＤＮＡ配列を調製するために、非コーディング鎖ＤＮＡを原型とするハイブリダイズ用オリゴヌクレオチドを用いて、ｐ５Ｅ内でループアウト突然変異誘発を行った。（例として残基Ａｓｐ^{709}で終わるポリペプチドを用いて）ポリペプチドを調製するために、ｖＷＦサブユニット配列（例えば、残基７０６～７１３）であってその一定のコドン（例えば、コドン７０９とコドン７１０）の間に停止コドン／読み取り枠シフト配列３'－ＡＣＴ・ＡＣＴ・Ｔ－５'をも含む配列をコードするハイブリダイズ用オリゴヌクレオチドを作成した。
従って、Ｃ－末端欠落を有し、それぞれ残基７０９、７０４、７００及び６９６で終結するｖＷＦ由来ポリペプチドを生成させた。

Ｎ－末端及びＣ－末端欠落を有するシステイン欠損ポリペプチドサブセット

残基４４１～７３３ｖＷＦサブセットフラグメントを原型とするが、それからのＮ－末端及びＣ－末端欠落の両方を含有する抗血栓剤として有効な治療用ポリペプチドサブセットも調製した。
そのような２つのポリペプチド（Ｍｅｔ・Ｔｙｒ^{508}～Ｐｒｏ^{704}及びＭｅｔ・Ｔｙｒ^{508}～Ａｓｐ^{696}）の調製は、Ｎ－末端欠落を作る（Ｍｅｔ・Ｔｙｒ^{508}～Ｖａｌ^{733}の調製）ために上で説明した操作に準じた後、それからＣ－末端欠落を生じさせるための上記の戦略に従った。具体的には、Ｍ１３ｍｐ１８内でのループアウト突然変異誘発用のハイブリダイズ用オリゴヌクレオチドを選択して上に挙げた停止コドン／読み取り枠シフト配列をそれぞれ残基７０４と７０５及び残基６９６と６９７の間に挿入した。

実施例１５－ｖＷＦドメインとＧＰＩｂαとの相互作用

血小板ＧＰＩｂαへのマルティマー性ｖＷＦの結合を支援するのに必要な構造的要件を確認するために、組換えｖＷＦ残基４４１～７３３フラグメント（“ｒｖＷＦ$^{441-733}$”）から作った１又は２以上のアミノ酸配列のドメインを含む一連の組換えポリペプチド（実施例１４）を調製した。得られたｒｖＷＦのポリペプチド（欠落フラグメント）の配列を図２に示す。これらポリペプチド（以下“ドメイン”という）は、（システイン５０９とシステイン６９５の間のアミノ酸配列として定義される）ループ領域の側面に位置するｒｖＷＦアミノ酸配列の２つのセグメントのうちの１つ又は両方に欠落を含有した。該突然変異型分子の幾つかは、ＧＰＩｂαにｖＷＦを結合させるのに関与する配列の２つの短いセグメント－図２において斜線を引いた枠により表される残基４７４～４８８及び６９４～７０８－の１つ又は両方の完全な又は部分的な欠落を有した（モウリら，J.Biol.Chem.,263(34),17901-17904(1988)）。
該突然変異型分子とＧＰＩｂαとの相互作用を、血小板への抗体ＬＪ－Ｉｂ１の結合の阻害に基づく分析法（スギモト（Sugimoto,M.）ら，Biochemistry,30,5202-5209(1991)）を用いて評価した。対応するＩＣ$_{50}$値（抗体結合を５０％阻害するのに要求されるフラグメントの濃度）を図２（モジュレーターなし）及び図３（ボトロセチン添加）に示す。最大の結合親和性を意味する最低のＩＣ$_{50}$値は、該ループのアミノ末端側で完全な配列の欠落を有する突然変異型分子で得られた。欠落を含有する還元及びアルキル化された突然変異型分子では、２つを除く全ての分子が、ｒｖＷＦ$^{441-733}$のものに類似するか又はそれよりも大きいＧＰＩｂαに対する親和性を示した。システイン６９５のカルボキシ末端側での完全な配列の欠落を有する２つの分子（ｒｖＷＦ$^{508-696}$、ｒｖＷＦ$^{441-696}$）は、血小板へのＬＪ－Ｉｂ１結合を阻害する能力が大きく低下した（表２）。

表　2

モジュレーター不存在下での組換えｖＷＦフラグメントによる血小板へのＬＪ－Ｉｂ１結合の阻害

呼　称	（酸化型）IC_{50}（μM）	n	（還元／アルキル化型）IC_{50}（μM）	n
ｒｖＷＦ$^{441-733}$	3～5	6	0.07～0.3	6
ｒｖＷＦ$^{492-733}$	1.2～4	3	0.04～0.05	2
ｒｖＷＦ$^{508-733}$	0.1～0.3	4	0.02～0.03	3
ｒｖＷＦ$^{441-704}$	2.6～3.2	2	0.03～0.04	2
ｒｖＷＦ$^{441-700}$	2.0～3.1	2	0.5	2
ｒｖＷＦ$^{441-696}$	1.0～1.3	3	＞4	3
ｒｖＷＦ$^{508-704}$	0.6	1	0.09	1
ｒｖＷＦ$^{508-696}$	0.4～0.7	2	＞4	2

報告値は、示した実験数で得られた結果の範囲に該当する。

表　3

ボトロセチン存在下での組換えｖＷＦフラグメントによる血小板へのＬＪ－Ｉｂ１結合の阻害

呼　称	（酸化型）IC_{50}（μM）	n	（還元／アルキル化型）IC_{50}（μM）	n
ｒｖＷＦ$^{441-733}$	１３～２５	3	４～２４	3
ｒｖＷＦ$^{492-733}$	３６	1	２８	1
ｒｖＷＦ$^{508-733}$	2.6	1	１７	1
ｒｖＷＦ$^{441-704}$	6	1	6	1
ｒｖＷＦ$^{441-700}$	8	1	３０～３６	2
ｒｖＷＦ$^{441-696}$	３３	1	２０	1
ｒｖＷＦ$^{508-704}$	6	1	３１	1
ｒｖＷＦ$^{508-696}$	２００	2	５１	1

報告値は、示した実験数で得られた結果の範囲に該当する。

システイン残基５０９と６９５の間の１８５残基ループの完全性が、ＧＰＩｂ結合機能に有意に貢献することが証明されている。この結果は、鎖内Cys^{509}～Cys^{695}結合が酸化されている場合は、該ジスルフィドループの側面に並ぶ配列の、アミノ及びカルボキシ末端両側での完全な欠落は、該ループとＧＰＩｂαとの相互作用に有害な作用をしないという観察によって支持される。これら結果は、ｖＷＦサブユニットのアミノ酸配列４４１～５０８及び６９６～７３３内のどの残基も、ｖＷＦ由来抗血栓性ポリペプチドのＧＰＩｂα結合機能の発現には必ずしも必要でないことを暗示している。単離したｖＷＦの組換

えフラグメントの治療用抗血栓剤としての用途の可能性に関して、ＧＰＩｂα上のｖＷＦ結合部位の機能阻害を行う効果的構造体は、Ｃｙｓ^{509}～Ｃｙｓ^{695}ジスルフィド結合を含有する環状５０８～６９６分子、及び還元型及び酸化型両方の残基５０８～７０４ポリペプチドである。

実施例１６－ボトロセチン存在下での残基４４１～７３３ｖＷＦフラグメントの（システインにおける）酸化型及び還元型の挙動

ｒｖＷＦ$^{441-733}$とＧＰＩｂαとの相互作用を、血小板への抗ＧＰＩｂαモノクローナル抗体、つまりＬＪ－ＩＢ１の結合を阻害するｒｖＷＦ$^{441-733}$の能力によって測定した。この分析法には、先に詳細に説明したように（スギモトら，Biochemistry,30,5202-5208(1991)）、天然ｖＷＦのものとは異なり、ＬＪ－Ｉｂ１の結合がリストセチン又はボトロセチンのようなモジュレーターの存在に依存しないという利点がある。ＧＰＩｂαへのｖＷＦ$^{441-733}$による結合は、ＬＪ－Ｉｂ１が結合するＧＰＩｂαの領域を遮断すると考えられる。

これらの実験にｒｖＷＦ$^{441-733}$の２つの型、即ち、Ｃｙｓ^{509}～Ｃｙｓ^{695}ジスルフィド結合を（ｐ５Ｅ構築体として）保持している酸化型及び該ジスルフィド結合を欠いているｒｖＷＦ$^{441-733}$の還元・アルキル化型を用いる。

該実験の結果を図３に示す。モジュレーターの不存在下では、ｒｖＷＦ$^{441-733}$の還元・アルキル化型は、酸化型よりもずっと大きな親和性でＧＰＩｂαと相互作用した（ＬＪ－Ｉｂ１結合の５０％を阻害するのに要求される還元・アルキル化型ｒｖＷＦ$^{441-733}$の濃度（IC_{50}）は、ＬＪ－Ｉｂ１結合の同様な阻害をもたらすのに要求される酸化型ｒｖＷＦ$^{441-733}$の量よりも１０倍以上低い、図３，パネルＡ）。モジュレーターであるボトロセチンは、両方の型のｒｖＷＦ$^{441-733}$のＧＰＩｂα結合親和性に劇的な作用を有した。しかしながら、酸化種についてのボトロセチンの作用は相対的にずっと大きくなり、その結果、ボトロセチンの存在下では、酸化型は、還元・アルキル化型のものに近い親和性で血小板へのＬＪ－Ｉｂ１結合を阻害した（図３，パネルＢ）。

従って、Ｃｙｓ^{509}～Ｃｙｓ^{695}結合は、循環血小板との相互作用を阻止するが、適当なモジュレーターの存在下では十分な結合活性の発現を可能にする、溶液中での天然ｖＷＦのコンフォメーションの安定化に寄与している。

実施例１７－ポリペプチド精製

組換えｖＷＦ残基４４１～７３３フラグメントを、酸化型で又は２つのｐ５Ｅシステイン残基（５０９、６９５）の還元及びアルキル化後に、均質になるまで精製し、明確に異なる保持時間に基づいて、逆相ＨＰＬＣによりこれら２つの型を区別した。それらは、また、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動により異なる移動度を示した。

本発明を実施するに際して有用なハイブリドーマ及び株の寄託

次のハイブリドーマ／株の生物学的に純粋な培養物の寄託をブダペスト条約の下、メリーランド州、ロックビル、１２３０１パークラウン（Parklawn）ドライブのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに行った。生育可能性試験に合格した後に下に示した受託番号が付与され、必要な手数料を納付した。

前記培養物の分譲は、この特許出願の係属中には、３７Ｃ．Ｆ．Ｒ．§１．１４及び３５Ｕ．Ｓ．Ｃ．§１２２の下に、米国特許商標局長官によりその権利が与えられるべきであると決定された者に対して、又はブダペスト条約によりかかる分譲が要求された場合に可能であろう。公衆への前記培養物の利用可能性に関する全ての制限は、本願に基づく特許が許可されることで最終的に取り除かれ、前記培養物は、サンプルの供給についての最初の請求後少なくとも５年間及び如何なる場合も寄託の日の後少なくとも３０年間は変わらず入手できるようになるであろう。もしも、該培養物が生育不能になるか又は不注意で破損された場合は、それらを同じ分類学的種類の生育可能な培養物と取り換えられるであろう。

ハイブリドーマ又は株	ATCC No.	寄託日
大腸菌 p5E BL21 (DE3) 96.3	ATCC 68406	9/19/90
大腸菌 XS127 96.4	ATCC 68407	9/19/90
マウスハイブリドーマ LJ-Ib1 (TSRI 138.5)	ATCC HB10940	12/3/91

配列表

(1)一般的情報：

(i)出願人：ルゲリ，ザベリオ　Ｍ．及びウェアー，ジュリー、ザ・スクリプス・リサーチ・インスティチュートを代表する発明者

(ii)発明の名称：フォン・ウィルブランド因子の治療用ドメイン

(iii)配列の数：１５

(iv)通信連絡先：

（Ａ）受信人：ザ・スクリプス・リサーチ・インスティチュート

（Ｂ）通り：１０６６６ノーストレイ・パインズロード

（Ｃ）市：ラジョラ

（Ｄ）州：カルフォルニア

（Ｅ）国：合衆国

（Ｆ）ＺＩＰ：９２０３７

(v)コンピューター読み取り可能型：

（Ａ）媒体タイプ：２メガバイト３．２５”フロッピィ

（Ｂ）コンピューター：ＡＳＴ Ｂｒａｖｏ ３８６ＳＸ

（Ｃ）作動システム：ＭＳ ＤＯＳ バージョン３．２

（Ｄ）ソフトウェア：ＡＳＣＩＩに変換したワードパーフェクト５．１

(vi)現出願データ：

（Ａ）出願番号：

（Ｂ）出願日：１９９３年２月２３日

（Ｃ）分類：

(vii)先行出願データ：これは次の出願の一部継続出願である。

（Ａ）出願番号：ＰＣＴ／ＵＳ９１／０７７５６

（Ｂ）出願日：１９９１年１０月１７日

(viii)弁理士／代理人情報：

（Ａ）氏名：バロン，アレキシス

（Ｂ）登録番号：２２，７０２

（Ｃ）整理／ドケット番号：Ｐ１６，６３３－Ｈ ＰＣＴ

(ix)電気通信情報：

（Ａ）電話：（２１５）９２３－４４６６

（Ｂ）テレファックス：（２１５）９２３－２１８９

（２）配列番号：１の情報：

(i)配列の特性：

（Ａ）長さ：９６０

（Ｂ）型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

(xi)配列；配列番号：１：

```
GAA GAC TGT CCA GTG TGT GAG GTG GCT GGC                    30
Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly
                435                 440

CGG CGT TTT GCC TCA GGA AAG AAA GTC ACC                    60
Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr
                445                 450

TTG AAT CCC AGT GAC CCT GAG CAC TGC CAG                    90
Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln
                455                 460

ATT TGC CAC TGT GAT GTT GTC AAC CTC ACC                   120
Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr
                465                 470

TGT GAA GCC TGC CAG GAG CCG GGA GGC CTG                   150
Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu
                475                 480

GTG GTG CCT CCC ACA GAT GCC CCG GTG AGC                   180
Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser
                485                 490

CCC ACC ACT CTG TAT GTG GAG GAC ATC TCG                   210
Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser
                495                 500

GAA CCG CCG TTG CAC GAT TTC TAC TGC AGC                   240
Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser
                505                 510

AGG CTA CTG GAC CTG GTC TTC CTG CTG GAT                   270
Arg Leu Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp
                515                 520
```

```
GGC TCC TCC AGG CTG TCC GAG GCT GAG TTT                    300
Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe
                525                 530

GAA GTG CTG AAG GCC TTT GTG GTG GAC ATG                    330
Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met
                535                 540

ATG GAG CGG CTG CGC ATC TCC CAG AAG TGG                    360
Met Glu Arg Leu Arg Ile Ser Gln Lys Trp
                545                 550

GTC CGC GTG GCC GTG GTG GAG TAC CAC GAC                    390
Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp
                555                 560

GGC TTC CAC GCC TAC ATC GGG CTC AAG GAC                    420
Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp
                565                 570

CGG AAG CGA CCG TCA GAG CTG CGG CGC ATT                    450
Arg Lys Arg Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile
                575                 580

GCC AGC CAG GTG AAG TAT GCG GGC AGC CAG                    480
Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln
                585                 590

GTG GCC TCC ACC AGC GAG GTC TTG AAA TAC                    510
Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr
                595                 600

ACA CTG TTC CAA ATC TTC AGC AAG ATC GAC                    540
Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys Ile Asp
                605                 610

CGC CCT GAA GCC TCC CGC ATC GCC CTG CTC                    570
Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu
                615                 620

CTG ATG GCC AGC CAG GAG CCC CAA CGG ATG                    600
Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met
                625                 630

TCC CGG AAC TTT GTC CGC TAC GTC CAG GGC                    630
Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly
                635                 640

CTG AAG AAG AAG AAG GTC ATT GTG ATC CCG                    660
Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro
                645                 650
```

```
GTG GGC ATT GGG CCC CAT GCC AAC CTC AAG                    690
Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys
                655                 660

CAG ATC CGC CTC ATC GAG AAG CAG GCC CCT                    720
Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro
                665                 670

GAG AAC AAG GCC TTC GTG CTG AGC AGT GTG                    750
Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val
                675                 680

GAT GAG CTG GAG CAG CAA AGG GAC GAG ATC                    780
Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile
                685                 690

GTT AGC TAC CTC TGT GAC CTT GCC CCT GAA                    810
Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu
                695                 700

GCC CCT CCT CCT ACT CTG CCC CCC CAC ATG                    840
Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro His Met
                705                 710

GCA CAA GTC ACT GTG GGC CCG GGG CTC TTG                    870
Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu
                715                 720

GGG GTT TCG ACC CTG GGG CCC AAG AGG AAC                    900
Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn
                725                 730

TCC ATG GTT CTG GAT GTG GCG TTC GTC CTG                    930
Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu
                735                 740

GAA GGA TCG GAC AAA ATT GGT GAA GCC GAC                    960
Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp
                745                 750
```

（２）配列番号：２の情報：

(i)配列の特性：

（Ａ）長さ：２６

（Ｂ）型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

(xi)配列；配列番号：２：

```
ACGAATTC CGG CGT TTT GCC TCA GGA                    26
```

（２）配列番号：３の情報：

(i)配列の特性：

（Ａ）長さ：３５塩基対

（Ｂ）型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

(xi)配列；配列番号：３：

```
GAAGCT TAC CAT GGA GTT CCT CTT GGG CCC CAG GG       35
```

（２）配列番号：４の情報：

(i)配列の特性：
（Ａ）長さ：３６塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(xi)配列；配列番号：４：
GAC AAC ATC AAC GTG GCC AAT CTG GCC GTG CTC AGG 36

（２）配列番号：５の情報：
(i)配列の特性：
（Ａ）長さ：３０塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(xi)配列；配列番号：５：
CGG CTC CTG GCC GGC TTC ACC GGT GAG GTT 30

（２）配列番号：６の情報：
(i)配列の特性：
（Ａ）長さ：１９塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(xi)配列；配列番号：６：
G CCT GCT GCC GTA GAA ATC 19

（２）配列番号：７の情報：
(i)配列の特性：
（Ａ）長さ：２１塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(xi)配列；配列番号：７：
GGC AAG GTC ACC GAG GTA GCT 21

（２）配列番号：８の情報：
(i)配列の特性：
（Ａ）長さ：３６
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(xi)配列；配列番号：８：
GAC AAC ATC ACC GTG GCC 18
AAT CTG GCC GTG CTC AGG 36

（２）配列番号：９の情報：
(i)配列の特性：
（Ａ）長さ：３６
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状

(xi)配列；配列番号：９：
GAC AAC ATC ACC GTG GCC AAT CTG GCC GTG CTC AGG 36

（２）配列番号：１０の情報：
(i)配列の特性：
（Ａ）長さ：３０塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(xi)配列；配列番号：１０：
GAC TTG TGC CAT GTC GTA GCT AAC GAT CTC 30

（２）配列番号：１１の情報：
(i)配列の特性：
（Ａ）長さ：２１
（Ｂ）型：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数：
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(xi)配列；配列番号：１１：
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met
5 10
Gly Arg Gly Ser Pro Gly Leu Gln Glu Phe Arg
15 20

（２）配列番号：１２の情報：
(i)配列の特性：
（Ａ）長さ：２４塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(xi)配列；配列番号：１２：
GAA GGA GAT ATA CAT ATG GCT AGC 24

（２）配列番号：１３の情報：
(i)配列の特性：
（Ａ）長さ：３０塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(xi)配列；配列番号：１３：
GCC TCC CGG CTC CTG CAT ATG TAT ATC TCC 30

（２）配列番号：１４の情報：
(i)配列の特性：
（Ａ）長さ：２３
（Ｂ）型：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数：
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(xi)配列；配列番号：１４：

Val Ser Ser Asp Pro Ala Ala Asn Lys Ala
5 10

Arg Lys Glu Ala Glu Leu Ala Ala Ala Thr
15 20

Ala Glu Gln

（２）配列番号：１５の情報：

(i)配列の特性：

（Ａ）長さ：３２０

（Ｂ）型：アミノ酸

（Ｃ）鎖の数：

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

(xi)配列；配列番号：１５：

Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly
435 440

Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr
445 450

Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln
455 460

Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr
465 470

Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu
475 480

Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser
485 490

Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser
495 500

Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser
505 510

Arg Leu Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp
515 520

Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe
525 530

Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met
535 540

Met Glu Arg Leu Arg Ile Ser Gln Lys Trp
545 550

Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp
555 560

Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp
565 570

Arg Lys Arg Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile
575 580

Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln
585 590

Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr
595 600

Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys Ile Asp
605 610

Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu
615 620

Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met
625 630

Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly
635 640

Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro
645 650

Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys
655 660

Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro
665 670

Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val
675 680

Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile
685 690

Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu
695 700

Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro His Met
705 710

Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu
715 720

Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn
725 730

Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu
735 740

Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp
745 750

【図１Ａ】



FIG.IA

【図１Ｂ】

FIG.IB

【図２】

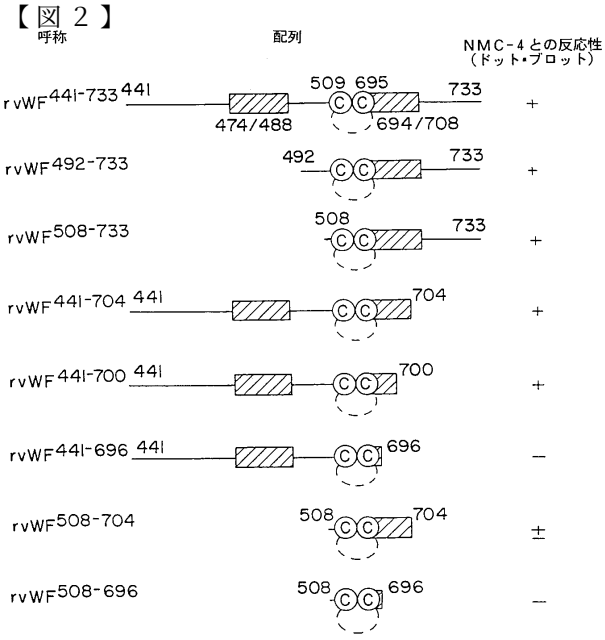


FIG. 2

【図３Ａ】

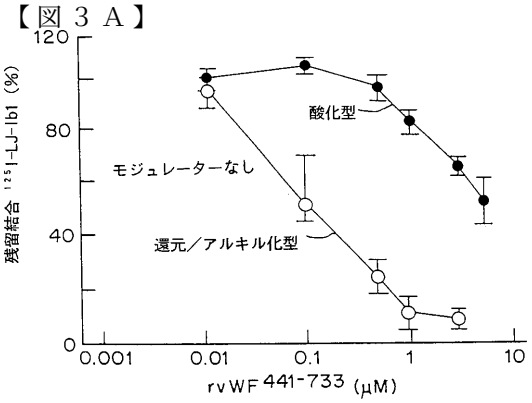


FIG. 3A

【図３Ｂ】

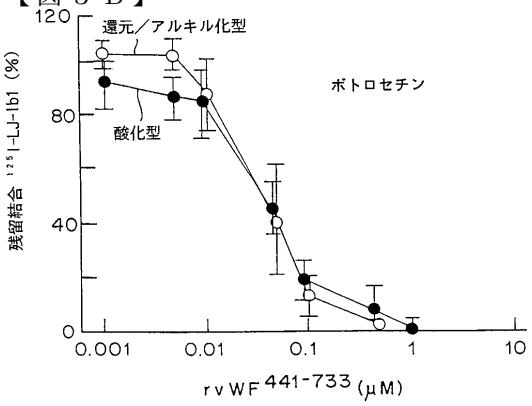


FIG. 3B

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
A61P	***7/02***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	7/02	
C12P	***21/02***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ
C12R	*1/19*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21	
C12R	*1/91*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｒ	1:19	
			Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ
			Ｃ１２Ｒ	1:19	
			Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ
			Ｃ１２Ｒ	1:91	

(74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治
(72)発明者 ルッジェリ ツァヴェリオ エンメ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２０３７ ラジョラ アヴェニダ デ ラ ペスカス ６６３３
(72)発明者 ウェア ジェリー エル
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２０２４ エンシニタス サマーヒル ドライヴ ２１１９

審査官 植原 克典

(56)参考文献 国際公開第９１／０１３０９３（WO, Ａ１）
Biochemistry(1989),28, p.8326-8336
J.Biol.Chem.(1989),264(29), p.17361-17367
Proc.Natl.Acad.Sci.(1991),88, p.2946-2950

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C07K 14/745 - 14/755
C12N 15/09
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq
CA/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus(JDream2)