

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4201253号
(P4201253)

(45) 発行日 平成20年12月24日(2008.12.24)

(24) 登録日 平成20年10月17日(2008.10.17)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 N 5/10	(2006.01) C 12 N 5/00 A
A 61 K 38/00	(2006.01) A 61 K 37/00
C 07 K 19/00	(2006.01) C 07 K 19/00
C 12 N 1/15	(2006.01) C 12 N 1/15

請求項の数 23 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-555832 (P2002-555832)
(86) (22) 出願日	平成14年1月9日(2002.1.9)
(65) 公表番号	特表2004-520031 (P2004-520031A)
(43) 公表日	平成16年7月8日(2004.7.8)
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/000068
(87) 国際公開番号	W02002/055098
(87) 国際公開日	平成14年7月18日(2002.7.18)
審査請求日	平成17年1月5日(2005.1.5)
(31) 優先権主張番号	0100551.1
(32) 優先日	平成13年1月9日(2001.1.9)
(33) 優先権主張国	英国(GB)

(73) 特許権者	500543328 クイーンメリー アンド ウエストフィールド カレッジ 英国、イー1 4エヌエス ロンドン、マイル エンド ロード
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(72) 発明者	チャーナジョフスキー ユチ 英国 ロンドン チャーターハウス スクウェア ディシン アンド デンティストリー セイント パーソロミューズ アンド ザ ロイヤル ロンドン スクール オブ ミー ボーン アンド ジョイント リサーチ ユニット

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】薬学的活性物質に潜在性を提供する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

薬学的活性蛋白質への潜在性の提供に使用するための、TGF -1、2、3、4、または5の潜在性関連ペプチド(LAP)と異種のマトリクスメタロプロテイナーゼ(MMP)蛋白質分解切断部位とを含む融合蛋白質であって、該異種のMMP蛋白質分解切断部位がLAPと薬学的活性蛋白質との間に人為的に供給されるものである、融合蛋白質。

【請求項2】

潜在型薬学的活性蛋白質の部位特異的活性化の提供に使用するための、TGF -1、2、3、4、または5の潜在性関連ペプチド(LAP)と異種のマトリクスメタロプロテイナーゼ(MMP)蛋白質分解切断部位とを含む融合蛋白質であって、該異種のMMP蛋白質分解切断部位がLAPと薬学的活性蛋白質との間に人為的に供給されるものである、融合蛋白質。

10

【請求項3】

MMP切断部位が、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、またはMMP10から選択されるマトリクスメタロプロテイナーゼによって開裂する、請求項1または2記載の融合蛋白質。

【請求項4】

薬学的活性蛋白質が、増殖因子、分化因子、サイトカイン、ケモカイン、栄養因子、サイトカイン阻害剤、サイトカイン受容体、フリーラジカルスキャベンジャー酵素、プロドラッグ変換酵素、ペプチド模倣体、プロテアーゼ阻害剤、メタロプロテイナーゼ組織阻害剤、またはセリンプロテアーゼ阻害剤である、使用を目的とした請求項1~3のいずれか一項記載の融合蛋白質。

20

【請求項 5】

サイトカインがインターロイキンまたはインターフェロンである、使用を目的とした請求項4記載の融合蛋白質。

【請求項 6】

潜在型TGF-結合蛋白質に会合している、使用を目的とした請求項1~5のいずれか一項記載の融合蛋白質。

【請求項 7】

マトリクスメタロプロテイナーゼ(MMP)蛋白質分解切断部位をコードする核酸配列が第一の核酸配列と第二の核酸配列との間に提供される、薬学的活性蛋白質をコードする第一の核酸配列とTGF-1、2、3、4、または5のLAPをコードする第二の核酸配列とを含む核酸構築物。 10

【請求項 8】

MMP切断部位が、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、またはMMP10から選択されるマトリクスメタロプロテイナーゼによって開裂する、請求項7記載の核酸構築物。

【請求項 9】

薬学的活性蛋白質が、増殖因子、分化因子、サイトカイン、ケモカイン、栄養因子、サイトカイン阻害剤、サイトカイン受容体、フリーラジカルスキベンジャー酵素、プロドラッグ変換酵素、ペプチド模倣体、プロテアーゼ阻害剤、メタロプロテイナーゼ組織阻害剤、またはセリンプロテアーゼ阻害剤である、請求項7または8記載の核酸構築物。 20

【請求項 10】

サイトカインがインターロイキンまたはインターフェロンである、請求項9記載の核酸構築物。

【請求項 11】

第一の核酸配列が蛋白質IFN- α をコードする、請求項7記載の核酸構築物。

【請求項 12】

ベクターの形である、請求項7~11のいずれか一項記載の核酸構築物。

【請求項 13】

請求項7~12のいずれか一項記載の核酸構築物を含む細胞。

【請求項 14】

医学において用いるための請求項7~12のいずれか一項記載の核酸構築物。 30

【請求項 15】

変形性関節炎、強皮症、腎疾患、リウマチ性関節炎、炎症性腸疾患、多発性硬化症、アテローム性動脈硬化症、炎症性疾患、または癌を治療するための医用薬剤の製造における請求項7~12のいずれか一項記載の核酸構築物の使用。

【請求項 16】

薬学的に許容される担体と請求項7~12のいずれか一項記載の核酸構築物とを含む薬学的組成物。

【請求項 17】

TGF-1、2、3、4、または5のLAPと異種のマトリクスメタロプロテイナーゼ(MMP)蛋白質分解切断部位とを含む、薬学的活性蛋白質に会合している融合蛋白質であって、該異種のMMP蛋白質分解切断部位がLAPと薬学的活性蛋白質との間に人為的に供給されるものである、融合蛋白質。 40

【請求項 18】

宿主細胞における発現による組換え的な融合蛋白質の产生、発現された融合蛋白質の精製、および化学的クロスリンクによる精製融合蛋白質に対する薬学的活性蛋白質の会合を含む、請求項17記載の融合蛋白質を調製するための方法。

【請求項 19】

医学において用いられる請求項17記載の融合蛋白質。

【請求項 20】

変形性関節炎、強皮症、腎疾患、リウマチ性関節炎、炎症性腸疾患、多発性硬化症、ア 50

テローム性動脈硬化症、炎症性疾患、または癌を治療するための医用薬剤の製造における請求項17記載の融合蛋白質の使用。

【請求項21】

薬学的に許容される担体と請求項17記載の融合蛋白質とを含む薬学的組成物。

【請求項22】

TGF-1、2、3、4、または5の潜在性関連ペプチド(LAP)と異種のマトリクスメタロプロテイナーゼ(MMP)蛋白質分解切断部位とを含む融合蛋白質を薬学的活性蛋白質に会合させることを含む、薬学的活性蛋白質に潜在性を提供するインピトロでの方法であって、該異種のMMP蛋白質分解切断部位がLAPと薬学的活性蛋白質との間に人為的に供給されるものである、方法。

10

【請求項23】

請求項7~12のいずれか一項記載の核酸構築物、または請求項17記載の融合蛋白質、および投与媒体を含む成分のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、薬学的に活性な物質に対して潜在性を付与する蛋白質、蛋白質誘導体、およびDNA構築物の使用に関する。本発明は、薬学的活性物質に潜在性を提供する方法および潜在的な薬学的活性物質に部位特異的活性化を提供する方法にも関する。

【背景技術】

20

【0002】

ほとんどのサイトカインおよび増殖因子は、厳密な制御メカニズムの下で発現される。それらの遺伝子発現は、感染、細胞-細胞相互作用、細胞外マトリクス組成の変化、および接着分子との相互作用のような環境刺激によって、または他のサイトカインによる刺激によって調節される。

【0003】

転写および転写後レベルでの制御の他に、サイトカインの中には、第二のシグナルが細胞を活性化して初めて培地に放出されるものもある。サイトカイン活性を調節する第三のレベルは、潜在型で分泌されて、炎症、創傷治癒、および組織修復のプロセスが起こる場所でサイトカイン部分を放出することによって「活性化される」ようになる分子において認められる(Khalil, N.、Microbes and Infection、1、1255~1263(1999))。この後者の点において、トランスフォーミング増殖因子(TGF)は、最も注目を集めている。

30

【0004】

TGF-1は、アミノ末端の潜在性関連蛋白質(LAP)とそのCOOH末端での活性なTGF-1サイトカインからなる二量体の潜在性サイトカインとして合成される(Roberts and Sporn、Peptide Growth Factors and their Receptors ; Sporn, MB and Roberts, AB、Springer-Verlag、419~472頁(1996)；Roth-Eicchornら、Hepatology 28: 1588~1596(1998))。前駆体ペプチドは、蛋白質分泌にとって必要な、そしてゴルジ体を通して分子が蛋白質分解およびグリコシル化によって処理されるように誘導するために必要なシグナルペプチド(残基1~29位)を含む。LAPドメインは、アルギニン(277~278位)での蛋白質分解切断によってTGF-1から分離される。成熟TGF-1は、アラニン279位から始まる。LAPはTGF-1を保護する他に、他の分子との相互作用にとって必要な重要な残基を含む。LAPドメインにおける変異は最近、常染色体優性カムラチ-エンゲルマン疾患に関連している(Janssensら、Nature Genetics 26、273~275(2000))。224位および226位のシステインは、二つのLAPのあいだの分子間ジスルフィド結合において重要である。それらがセリンに変異すると、分子は「活性型」となる(Sandersonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92、2572~2576(1995)；Brunnerら、Mol. Endocrinol. 6、1691~1700(1992)；Brunnerら、J. Biol. Chem. 264、13660~13664(1989))。RGDモチーフ(245~247位)は、インテグリンとの相互作用を促進する(Mungerら、Mol. Biol. of the Cell 9、2627~2638(1998)；Deryck, R.、TIBS、19: 548~553(1994))。TGF-1をコードする核酸は米国特許第5801231号に記載されている。

40

50

【0005】

間葉、上皮、および内皮起源の細胞を含む調べたほとんどの細胞タイプにおいて、TGF は、潜在的TGF 結合蛋白質(LTBPs)に共有結合して、TGF とその潜在関連ペプチド(LAP)プロペプチド二量体からなる潜在型で分泌される。LTBPsもまた、TGF 蛋白質の分泌および折り畳みにとって必要である(Miyazanoら、EMBO J.、10、1091～1101(1991)；Miyazonoら、J. Biol. Chem.、267、5668～5675(1992)；Eklovら、Cancer Res. 53、3193～3197(1993))。33位のシステインは、潜在型TGF 結合蛋白質(LTBP)の第三の8システインリップチリピートとのジスルフィド架橋にとって重要である(Saharinenら、The EMBO Journal、15、245～253(1996))。トロンボスポンジン(Schultzら、The Journal of Biological Chemistry、269、26783～26788(1994)；Crawfordら、Cell、93、1159～1170(1998))、トランスクレルタミナーゼ(Nunesら、J. Cell Biol.、136、1151～1163(1997)；Kojimaら、The Journal of Cell Biology、121、439～448(1993))、およびMMP9、MMP2(Yu and Stamenkovic、Genes and Dev. 14、163～176(2000))のような酵素によってLTBPが改変されると、潜在的複合体からTGF の活性部分が放出されうるであろう。

【0006】

サイトカインは、細胞-細胞相互作用の可溶性局所メディエータとして作用する天然物である。それらは、多様な多面発現作用を有し、そのいくつかは、治療目的のために利用することができる。scFv(Lodeら、Pharmacol. Ther.、80、277～292(1998))およびvWF(Gordonら、Human Gene Therapy、8、1385～1394(1997))を用いた特定の細胞タイプへのサイトカインのターゲティングは、サイトカイン複合体の活性なサイトカイン部分に完全に集中している。

【0007】

薬理学的に活性な蛋白質またはそのような物質に基づく他の医薬品は、標的とする組織において生物学的に有効な濃度を得るために非常に高い濃度で全身投与しなければならず、望ましくない全身作用、例えば毒性を生じる傾向があり、そのためその利用と有効性とが制限される。

【発明の開示】

【0008】

本発明者らは、強力な生体物質を全身投与した場合の毒性作用を克服するための系を開発した。

【0009】

本発明の第一の局面に従って、薬学的活性物質に潜在性を提供するために、潜在性関連ペプチド(LAP)と蛋白質分解切断部位とを含む融合蛋白質を用いることが提供される。

【0010】

本発明の第一の局面はまた、部位特異的活性化を潜在的生物活性物質に提供するために、LAPと蛋白質分解切断部位とを含む融合蛋白質を用いることを提供する。本明細書において用いられるように、「部位特異的活性化」という用語は、一般的な用語において、蛋白質分解切断部位での部位特異的切断によって、薬学的活性物質に与えられた潜在性を除去または減少することを意味するがこれに限定されない。

【0011】

蛋白質分解切断部位での部位特異的切断は、薬学的活性物質の活性化の回復と同時に起こると予想される。

【0012】

本明細書において用いられる「潜在的生物活性物質」という用語は、LAPおよび蛋白質分解切断部位と会合しているために潜在的である生物活性物質を含んでもよいがこれらに限定されない。特に、生物活性物質は、潜在的融合蛋白質を形成するためにLAP会合蛋白質分解切断部位にそれが融合しているために、潜在的であってもよい。

【0013】

本発明の第二の局面に従って、潜在性関連ペプチド(LAP)と蛋白質分解切断部位とを含む融合蛋白質を薬学的活性物質に会合させることを含む、薬学的活性物質に潜在性を提供

10

20

30

40

50

する方法を提供する。

【0014】

本明細書において「蛋白質」という用語は、一般的な意味において、ペプチド結合によって結合した複数のアミノ酸残基を意味する。これは、ペプチド、オリゴペプチド、オリゴマー、またはポリペプチドと互換的に用いられ、それらと同じであることを意味する。「蛋白質」という用語にはまた、断片、類似体、または誘導体が参照蛋白質と本質的に同じ生物活性または機能を保持している、蛋白質の断片、類似体、および誘導体が含まれると解釈される。

【0015】

本明細書において定義される蛋白質の断片、類似体、または誘導体は、アミノ酸の長さが少なくとも6個、好ましくは10もしくは20個、または50もしくは100個までであってもよい。

10

【0016】

蛋白質の断片、誘導体、もしくは類似体は、(i)一つもしくは複数のアミノ酸残基が保存もしくは非保存的アミノ酸残基(好ましくは、保存的アミノ酸残基)に置換され、そのような置換アミノ酸残基が遺伝子コードによってコードされてもよく、もしくはコードされなくてもよい、断片、誘導体、もしくは類似体、(ii)一つもしくは複数のアミノ酸残基が置換基を含む、断片、誘導体、もしくは類似体、(iii)成熟ポリペプチドが、ポリペプチドの半減期を増加させる化合物のようなもう一つの化合物(例えば、ポリエチレングリコール)に融合している断片、誘導体、もしくは類似体、または(iv)さらなるアミノ酸が、ポリペプチドの精製のために用いられるリーダーもしくは分泌配列のような成熟ポリペプチドに融合している断片、誘導体、または類似体であってもよい。そのような断片、誘導体、および類似体は、本明細書の教示から当業者の範囲内であると思われる。

20

【0017】

いくつか、例えば、5~10、1~5、1~3、2、1個のアミノ酸残基が如何なる組み合わせで置換、欠失、または付加されている、または如何なるアミノ酸も置換、欠失、または付加されていない蛋白質のアミノ酸配列を有する断片、誘導体、および類似体が特に好ましい。これらの中で、本発明の蛋白質の特性および活性を変化させないサイレント置換、付加、および欠失が特に好ましい。同様に、この点において、保存的置換が特に好ましい。

【0018】

30

本発明の変更の例は、一つまたは複数のアミノ酸の一つまたは複数のアミノ酸への置換とは別に、先に定義した融合蛋白質である。当業者は、様々なアミノ酸が類似の特性を有することを承知している。物質のそのような一つまたは複数のアミノ酸は、しばしば、その物質の所望の活性を消失させることなく、一つまたは複数のそのような他のアミノ酸によって置換することができる。

【0019】

このように、アミノ酸のグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンはしばしば、互いに(脂肪族側鎖を有するアミノ酸)に置換することができる。これらの可能性がある置換の中で、グリシンとアラニンとを用いて互いに置換することができる(それらは比較的短鎖を有するため)、バリン、ロイシン、およびイソロイシンを用いて互いに置換することができる(それらは、疎水性であるより大きい脂肪族側鎖を有するため)。しばしば互いに置換することができる他のアミノ酸には:フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン(芳香族側鎖を有するアミノ酸);リジン、アルギニン、およびヒスチジン(塩基性側鎖を有するアミノ酸);アスパラギン酸塩およびグルタミン酸塩(酸性側鎖を有するアミノ酸);アスパラギンおよびグルタミン(アミド側鎖を有するアミノ酸);ならびにシステインおよびメチオニン(硫黄含有側鎖を有するアミノ酸)が含まれる。

40

【0020】

この特性の置換はしばしば、「保存的」、または「半保存的」アミノ酸置換と呼ばれる。

【0021】

50

アミノ酸欠失または挿入はまた、先に言及した融合蛋白質に関するアミノ酸配列に対してもよい。このように、例えば、ポリペプチドの活性に対して実質的な作用を有しないアミノ酸、または少なくともそのような活性を消失させないアミノ酸を欠失してもよい。そのような欠失は、活性を保持しながらポリペプチドの全長および分子量を減少させることができることから有利となりうる。これによって、特定の目的にとって必要なポリペプチドの量を減少させることができ、例えば、用量レベルを減少させることができる。

【0022】

上記の融合蛋白質の配列に対するアミノ酸挿入も同様に行うことができる。これは、本発明の物質の特性を変化させるために行ってもよい(例えば、融合蛋白質に関連して先に説明したように、同定、精製、または発現を補助するために)。

10

【0023】

上記のa)に示した配列に対するアミノ酸変化は、如何なる適した技術も用いて、例えば、部位特異的変異誘発によって行うことができる。

【0024】

本発明の範囲内のアミノ酸置換または挿入は、天然に存在する、または天然に存在しないアミノ酸を用いて行うことができると認識すべきである。天然または合成のアミノ酸を用いることができるが、L-アミノ酸のみが存在することが好ましい。

【0025】

本発明に係る蛋白質は、さらなるN末端および/またはC末端アミノ酸配列を有してもよい。そのような配列は、様々な理由、例えば、グリコシル化のために提供することができる。

20

【0026】

この意味において「融合蛋白質」という用語は、一般的な用語において、化学的手段もしくは蛋白質合成によるペプチド結合によって、またはその双方によって互いに結合した一つまたは複数の蛋白質を意味する。

【0027】

本発明の潜在性関連ペプチド(LAP)には、TGF の前駆体ドメインのコード配列、またはそれと実質的に同一な配列が含まれてもよいがこれらに限定されない。

【0028】

当技術分野で既知である「同一性」とは、配列の比較によって決定されるように、二つもしくはそれ以上のポリペプチド配列または二つもしくはそれ以上のポリヌクレオチド配列のあいだの関係である。当技術分野において、同一性はまた、場合によっては、そのような配列の鎖のあいだのマッチによって決定される、ポリペプチドとポリヌクレオチド配列のあいだの配列関連性の程度を意味する。二つのポリペプチドまたは二つのポリヌクレオチド配列のあいだの同一性を測定するために多くの方法が存在するが、同一性を測定するために一般的に用いられる方法は、コンピュータープログラムにおいて暗号化されている。二つの配列間の同一性を決定するための好ましいコンピュータープログラムには、CGプロダクションパッケージ(Devereuxら、Nucleic Acids Research、12、387(1984))、BLASTP、BLASTN、およびFASTA(Altschulら、J. Molec. Biol. 215、403(1990))が含まれるがこれらに限定されない。

30

【0029】

本発明のLAPは、TGF の前駆体ドメイン、例えば、TGF -1、-2、または-3(ヒト由来)(Deryckら、Nature、316、701～705(1985)；DeMartinら、EMBO J.、6、3673～3677(1987)；Hanksら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85、79～82(1988)；Deryckら、EMBO J.、7、3737～3743(1988)；Ten Dykeら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85、4715～4719(1988))、TGF -4(ニワトリ由来)(Jakowlewら、Mol. Endocrinol. 2、1186～1195(1988))、またはTGF -5(アフリカツメガエル由来)(Kondaiahら、J. Biol. Chem. 265、1089～1093(1990))の前駆体ペプチドを含んでもよい。「前駆体ドメイン」という用語は、成熟蛋白質をコードする配列を含まない前駆体ペプチドをコードする配列として定義される。TGF 1、2、3、4、および5の前駆体ドメインのアミノ酸配列(Roberts and Sporn, Peptide Growth Fac

40

50

tors and their Receptors : Sporn, MB and Roberts, A, Springer-Verlag、第8章、442(1996))を図3に示す。

【0030】

好ましくは、LAPのアミノ酸配列は、図3に示すように、HGMP(ヒトゲノムマッピングプロジェクト)によって提供されたBLASTコンピュータープログラム(Altschulら、J. Mol. Biol.、215、403～410(1990))のデフォルトパラメータを用いると、アミノ酸レベルでTGF

1、2、3、または5(Roberts and Sporn, Peptide Growth Factors and their Receptors : Sporn, MB and Roberts, A, Springer-Verlag、第8章、442(1996))と少なくとも50%の同一性を有する。より好ましくは、LAPは、図3に示すように、TGF 1、2、3、4、または5の前駆体ドメインと核酸またはアミノ酸レベルで少なくとも60%、70%、80%、90%、さらにより好ましくは95%(さらにより好ましくは少なくとも99%)の同一性を有してもよい。

【0031】

LAPは、図3に示すようにTGF 1、2、3、4、または5のLAPを含んでもよい(Roberts and Sporn, Peptide Growth Factors and their Receptors : Sporn, MB and Roberts, A, Springer-Verlag、第8章、442(1996))。

【0032】

LAPは、ジスルフィド結合を形成するためにシステイン残基少なくとも4、6、8、10、または20個を含んでもよい。

【0033】

LAPは、薬学的活性物質の周囲に保護的な「外皮」を提供して、それによって、それを遮へいして、その活性にとって重要な細胞表面または分子とのその相互作用を妨害、または防止する可能性がある。

【0034】

LAPは、図1のヌクレオチド1～832位、もしくは図2のヌクレオチド598～1352位によってコードされるアミノ酸の配列、またはHGMPによって提供されたBLASTコンピュータープログラムのデフォルトパラメータを用いて、それに対して少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。

【0035】

蛋白質分解切断部位は如何なるプロテアーゼ特異的切断部位を含んでもよい。蛋白質分解切断部位には、マトリクスマタロプロテイナーゼ(MMP)切断部位、セリンプロテアーゼ切断部位、病原性生物に由来する寄生虫プロテアーゼによって切断可能な部位(Zhangら、J. Mol. Biol.、289、1239～1251(1999)；Vothら、Molecular and Biochemical Parasitology、93、31～41(1998)；Yoshiokaら、Folia Pharmacologia Japonica、110、347～355(1997)；Tortら、Advances in Parasitology、43、161～266(1999)；McKerrow、International Journal for Parasitology、29、833～837(1999)；Youngら、International Journal for Parasitology、29、861～867(1999)；Cooms and Mottram、Parasitology、114、61～80(1997))、または補体力スケードの蛋白質によって切断可能な部位(Carroll、Annu. Rev. Immunol. 16、545～568(1998)；Williamsら、Ann. Allergy、60、293～300(1998))が含まれてもよいがこれらに限定されない。

【0036】

MMP切断部位は、MMPによって切断可能な如何なるアミノ酸配列も含んでもよい。MMP切断部位のアミノ酸配列は、図1のヌクレオチド844～861位、もしくは図2のヌクレオチド565～585位によってコードされてもよく、またはHGMPによって提供されたBLASTコンピュータープログラムのデフォルトパラメータを用いて、それに対して少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、もしくは99%の同一性を有するヌクレオチドの配列によってコードされてもよい。好ましくは、MMP切断部位をコードする核酸配列は、MMPによる認識および切断にとって必要な最小数の残基を含む。

【0037】

MMP切断部位は、MMPによって認識可能な多くのアミノ酸残基を含んでもよい。その上、

10

20

30

40

50

MMP部位のアミノ酸は、MMPによって蛋白質分解的に切断可能な一つまたは複数のペプチド結合によって結合してもよい。MMP部位を切断する可能性があるMMPには、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、またはMMP10が含まれるがこれらに限定されない(Yu and Stamenkovic, Genes and Dev. 14、163～176(2000) ; Nagase and Fields, Biopolymers, 40、399～416(1996) ; Massovaら、J. Mol. Model. 3、17～30(1997) ; Vu and Werb, Genes and Dev. 14、2123～2133(2000)による論評)。MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、およびMMP10の蛋白質切断部位の配列を図4に示す。

【0038】

好ましくは、本発明の蛋白質分解切断部位は、炎症および組織再モデリングの部位で切断される。より好ましくは、本発明の蛋白質分解切断部位は、MMP切断部位、例えば図4に示すようにMMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、またはMMP10の如何なる一つまたは複数である。

10

【0039】

本発明はさらに、本発明の第一および第二の局面の融合蛋白質をコードする核酸を提供する。融合蛋白質をコードする核酸は、図1のヌクレオチド1～861位、もしくは図2のヌクレオチド585～1352位を含んでもよく、またはHGMPによって提供されたBLASTコンピュータープログラムのデフォルトパラメータを用いて、それに対して少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。

【0040】

本発明は、「リンカー」ペプチドをさらに提供してもよい。好ましくは、リンカーペプチドは、蛋白質分解切断部位のアミノ酸配列に結合する。リンカーペプチドは、蛋白質分解切断部位をコードするアミノ酸配列のC末端またはC末端で提供してもよい。好ましくは、リンカーペプチドは、蛋白質分解切断部位のアミノ酸配列と連続している。リンカーペプチドは、図1のヌクレオチド862～873位、もしくは図2のヌクレオチド553～564位および/もしくは586～597位によってコードされるアミノ酸配列、またはHGMPによって提供されたBLASTコンピュータープログラムのデフォルトパラメータを用いて、それに対して少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、もしくは99%の同一性を有するヌクレオチドの配列によってコードされるアミノ酸配列を含んでもよい。

20

【0041】

「リンカーペプチド」という用語は、好ましくは発現された蛋白質に含まれる場合に親水性領域を提供するアミノ酸残基の如何なる配列も定義すると解釈される。そのような親水性領域は、蛋白質分解切断部位での酵素による切断を促進する可能性がある。

30

【0042】

本明細書において用いられるように、「潜在性」という用語は、融合蛋白質と細胞表面上の他の分子との相互作用を妨害する可能性がある遮へい効果に関連する可能性がある。または、潜在性という用語は、融合蛋白質に関連した分子/物質の活性の減少(活性の除去までおよび除去を含む)を記述するために用いてもよい。潜在性という用語はまた、融合蛋白質の安定化作用に関連してもよい。この作用は、完全であってもよく、または部分的作用が活性物質の潜在性を得るために十分である場合には、部分的であってもよい。

【0043】

40

薬学的活性物質には、増殖因子(例えば、TGF-β、上皮細胞増殖因子(EGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、神経生長因子(NGF)、コロニー刺激因子(CSF)、肝細胞増殖因子、インスリン様増殖因子、胎盤増殖因子)；分化因子；サイトカイン、例えば、インターロイキン(例えば、または型のIL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、またはIL-21)、インターフェロン(例えば、IFN-α、IFN-βおよびIFN-γ)、腫瘍壞死因子(TNF)、IFN-γ誘導因子(IGIF)、骨形態形成蛋白質(BMP)；ケモカイン(例えば、MIPs(マクロファージ炎症性蛋白質)、例えば、MIP1αおよびMIP1β；MCPs(单球化学遊走蛋白質)、例えば、MCP1、2、または3；RANTES(活性化に基づき調節される正常T細胞発現分泌))；栄養因子；サイトカイン阻害剤；サイトカイン受容体；フリーラジカルスキャベンジャー酵素、例

50

えば、スーパーオキサイドジスムターーゼまたはカタラーゼ；プロドラッグ変換酵素(例えば、アンジオテンシン転換酵素、デアミナーゼ、デヒドロゲナーゼ、レダクターゼ、キナーゼ、およびホスファターゼ)；ペプチド模倣体；プロテアーゼ阻害剤；メタロプロテイナーゼサブクラスの組織阻害剤(TIMPS)ならびにセルピン(serpins)(セリンプロテアーゼ阻害剤)が含まれてもよいが、これらに限定されない。好ましくは、薬学的活性物質は、治療すべき種に由来してもよく、例えば、ヒトを治療するためにヒト起源であろう。好ましくは、薬学的活性物質は、IFN である。

【 0 0 4 4 】

本明細書において用いられるように、「ペプチド模倣体」には、ペプチドを特定のコンフォメーションに保持する非ペプチド骨格に埋もれている所望のペプチド骨格コンフォメーションを有する物質が含まれるがこれらに限定されない。ペプチドの欠点のいくつかを有しないペプチド模倣体は、ペプチドが医薬品に適していない場合には重要である。

10

【 0 0 4 5 】

ペプチド模倣体は、LまたはDコンフォメーションのペプチド骨格を含んでもよい。ペプチド模倣体の例には、メラノコルチン、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、および中枢神経系、シグナル伝達および感染および免疫における内分泌系において役割を果たす他のペプチド模倣体が含まれる。

【 0 0 4 6 】

薬学的活性物質は、化学療法剤または他の合成薬のような化学化合物を含んでもよい。または、薬学的活性物質は、ペプチド核酸(PNA)配列、例えば、核酸に結合して脂質二重層を透過性にするポリリジン配列(Wymanら、*Biological Chemistry*、379、1045～1052(1998))、または脂質二重層の中の移動を促進するKALAペプチド(Wymanら、*Biochemistry*、36、3008～3017(1998))を含んでもよい。

20

【 0 0 4 7 】

本発明の意味において「会合する」という用語は、化学クロスリンクまたはペプチド結合を含むがこれらに限定されない全ての会合手段が含まれると解釈される。

【 0 0 4 8 】

もう一つの態様において、本発明はさらに、潜在型のTGF 結合蛋白質(LTBP)に選択的に会合した本発明の融合蛋白質を提供する。典型的に、融合蛋白質は、LTBPに共有結合して複合体を形成する。好ましくは、会合は、LAPの33位のシステインとLTBPの第三の8システイン残基とのあいだのジスルフィド結合(複数)によって媒介される。融合蛋白質と会合したLTBPには、LTBP1、2、3、もしくは4(Kanzakiら、*Cell*、61、1051～1061(1990)；Tsujiiら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87、8835～8839(1990)；Morenら、*J. Biol. Chem.* 269、32469～32478(1994)；Yinら、*J. Biol. Chem.* 270、10147～10160(1995)；Gibsonら、*Mol. Cell Biol.* 15、6932～6942(1995)；Saharinenら、*J. Biol. Chem.* 273、18459～18469(1998))、第三のシステイン8個のリピートを含む断片のようなLTBPの断片、またはHGPによって提供されたBLASTコンピュータープログラムのデフォルトパラメータを用いて、LTBPの配列に対して少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸もしくはヌクレオチド配列を有する相同体が含まれてもよいがこれらに限定されない。

30

【 0 0 4 9 】

LTBPの切断は、LTBP複合体からの融合蛋白質を放出する可能性がある。このようにしてLTBPを切断する可能性がある酵素には、トロンボスボンジン(Schultzら、*The Journal of Biological Chemistry*、269、26783～26788(1994)；Crawfordら、*Cell*、93、1159～1170(1998))、トランスグルタミナーゼ(Nunesら、*J. Cell Biol.* 136、1151～1163(1997)；Kojimaら、*The Journal of Cell Biology*、121、439～448(1993))、MMP9およびMMP2(Yu and Stamenkovic、*Genes and Dev.* 14、163～176(2000))が含まれるがこれらに限定されない。

40

【 0 0 5 0 】

本発明の第三の局面は、蛋白質分解切断部位をコードする核酸配列が、第一の核酸配列

50

と第二の核酸配列とのあいだに提供される、薬学的活性物質をコードする第一の核酸配列、LAPをコードする第二の核酸配列を含む核酸構築物を提供する。

【0051】

「核酸構築物」という用語は一般的に、クローニングによって得られる、または化学合成によって生成されるDNA、cDNA、またはmRNAのようなRNAであってもよい如何なる長さの核酸分子も意味する。DNAは一本鎖または二本鎖であってもよい。一本鎖DNAは、コードセンス鎖であってもよく、または非コードもしくはアンチセンス鎖であってもよい。治療的用途のために、核酸構築物は、好ましくは、治療すべき被験者において発現されうる形である。

【0052】

好ましくは、第一の核酸配列は、蛋白質IFNをコードする。第一の核酸配列は、図1のヌクレオチド874～1376位、もしくは図2のヌクレオチド598～1352位の配列、またはそれらと実質的に相同的な配列を含んでもよい。本発明の一つの態様において、第一の核酸配列はマウスまたはヒト由来のIFNをコードする。

【0053】

本発明の第三の局面の核酸構築物は、ベクター、例えば発現ベクターの形であってもよく、それらには、とりわけ、染色体、エピソーム、およびウイルス由来ベクター、例えば、細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入要素由来、酵母染色体要素由来、バキュロウイルス、SV40のようなバポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏頭ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、およびレトロウイルスのようなウイルス由来ベクター、ならびにプラスミドと、コスミドおよびファージミドのようなバクテリオファージ遺伝子要素由来のベクターのようなららの組み合わせに由来するベクターが含まれてもよい。一般的に、宿主においてポリペプチドを発現するために核酸を維持、増殖、または発現するために適した如何なるベクターもこの点において発現のために用いてもよい。

【0054】

好ましくは、核酸構築物は、本明細書の実施例4において定義したようなLAP-huIFNまたはhuIFN-LAPである。または、核酸構築物は、図1に示し、図5に略図で示すようなLAP-mIFNであってもよく、または図2に示し、図5に略図を示すmIFN-LAPであってもよい。

【0055】

本発明はさらに、本明細書に記載の潜在性TGF結合蛋白質(LTBP)に選択的に会合して本発明の第三の局面の核酸構築物によってコードされた蛋白質を提供する。典型的に、核酸構築物によってコードされた蛋白質は、LTBPと共有結合して複合体を形成する。好ましくは、会合は、LAPの33位のシステインと、LTBPの第三のシステイン8個の残基とのジスルフィド結合(複数)によって媒介される。

【0056】

本発明の第三の局面の核酸構築物には好ましくは、核酸の発現を制御するプロモーターまたは他の調節配列が含まれる。核酸の発現を制御するプロモーターおよび他の調節配列は同定されており、当技術分野において既知である。当業者は、必ずしもプロモーター全体または他の調節配列を利用する必要はない可能性があることに注目すると思われる。最小の必須調節要素のみが必要であり、実際に、そのような要素は、キメラ配列または他のプロモーターを構築するために用いることができる。必須の要件は、当然、組織および/または時間的特異性を保持することである。プロモーターは、如何なる適した既知のプロモーター、例えばヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、CMV前初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40プロモーター、またはラウス肉腫ウイルス(RSV)およびマウスマタロチオネイン-I-プロモーターのようなマタロチオネインプロモーターのような、レトロウイルスLTRsのプロモーターとなりうる。プロモーターは、プロモーター活性のために含まれる最小の配列、例えば、CMVプロモーターの最小配列を含んでもよい(エンハンサー要素を有しないTATA要素のような)。

10

20

30

40

50

【0057】

好ましくは、プロモーターは、第一および/または第二の核酸配列に連続している。

【0058】

本明細書において記載するように、本発明の第三の局面の核酸構築物は、ベクターの形であってもよい。ベクターには、しばしば、それらによってトランスフェクトされる(または形質転換される)細胞の選択を可能にし、好ましくは異種DNAを組み入れるベクターを含む細胞の選択を可能にする一つまたは複数の発現マーカーが含まれる。一般的に、適した開始および停止シグナルが存在するであろう。

【0059】

本発明の一つの態様は、本発明の第三の局面の核酸構築物を含む細胞に関する。細胞は、クローニングを含む核酸の操作のために有用である「宿主」細胞と名付けてもよい。または、核酸の発現を得るために細胞であってもよい。本発明の核酸構築物を発現するための適当な宿主細胞の代表的な例には、核酸をウイルスベクターに封入させるウイルスパッケージング細胞；連鎖球菌(*Streptococci*)、ブドウ球菌(*Staphylococci*)、大腸菌(*E. coli*)、放線菌(*Streptomyces*)、および枯草菌(*Bacillus subtilis*)のような細菌細胞；酵母細胞、例えば酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)およびアスペルギルス(*Aspergillus*)細胞のような単細胞；ショウジョウバエ(*Drosophila*)S2およびスポドプテラ(*Spodoptera*)Sf9細胞のような昆虫細胞、CHO、COS、C127、3T3、PHK293、およびBowes黒色腫細胞ならびに他の適したヒト細胞のような動物細胞；ならびに植物細胞、例えば、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)が含まれる。

10

20

【0060】

発現ベクターの宿主細胞への誘導は、磷酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン-脂質媒介トランスフェクション、電気穿孔、形質導入、スクレイプ(scrape)ローディング、弾道(ballistic)導入、感染または他の方法によって影響を受けうる。そのような方法は、SambrookらのMolecular Cloning, a Laboratory Manual、第二版、コールドスプリングハーバー研究所出版、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州(1989)のような、多くの標準的な実験マニュアルに記載されている。

【0061】

成熟蛋白質は、適当なプロモーターの制御下でCHO細胞、酵母、細菌、または他の細胞のような哺乳類細胞を含む宿主細胞において発現させることができる。細胞不翻訳系を用いて、本発明の第三の局面の核酸構築物に由来するRNAsを用いてそのような蛋白質を產生することができる。原核宿主および真核宿主に用いるための適当なクローニングおよび発現ベクターは、SambrookらのMolecular Cloning, a Laboratory Manual、第二版、コールドスプリングハーバー研究所出版、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州(1989)に記載されている。

30

【0062】

蛋白質は、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法によって組換え型細胞培養から回収および精製することができる。治療目的の場合、例えば組換え型ベクターの形での核酸構築物は、SambrookらのMolecular Cloning, a Laboratory Manual、第二版、コールドスプリングハーバー研究所出版、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州(1989)に記載されるようなカラムクロマトグラフィーによって、当技術分野で既知の技術によって精製してもよい。

40

【0063】

第四の局面において、本発明は、レシピエントに本発明の第三の局面の核酸構築物の治療的有効量を投与することを含む、ヒトを含む哺乳類のような患者の治療方法を提供する。核酸構築物を本発明の治療方法において用いる場合、構築物は、発現構築物の一部、例

50

えばプラスミドまたはウイルスのような発現ベクターの形として用いてもよい。そのような方法において、構築物は、静脈内、皮内、筋肉内、経口、または他の経路によって投与してもよい。

【0064】

本発明の第三の局面の核酸構築物、およびそれに由来する蛋白質は、単独または治療化合物、例えば抗炎症薬、細胞障害剤、細胞抑制剤、または抗生物質のような他の化合物と組み合わせて用いてもよい。本発明において有用な核酸構築物および蛋白質は好ましくは単離型で提供され、好ましくは均一になるまで精製される。

【0065】

本明細書において用いられるように、「治療」には、ヒトまたはヒト以外の動物に利益を生じうる如何なる療法も含まれる。「ヒト以外の動物」の治療は、ウマおよびペット動物(例えば、ネコおよびイヌ)、ならびにヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、およびウマ家系メンバーを含む農場/農業用動物を含む家畜動物の治療に及ぶ。治療は、如何なる既存の病態もしくは疾患に関してあってもよく、または予防的(予防的治療)であってもよい。治療は、遺伝的または後天性の疾患に対する治療であってもよい。治療は急性または慢性病態に対するものであってもよい。好ましくは、治療は、炎症に関連した病態/疾患の治療である。本発明の第三の局面の核酸構築物の第一の核酸配列は、変形性関節炎、強皮症、腎疾患、リウマチ性関節炎、炎症性腸疾患、多発性硬化症、アテローム性動脈硬化症、または他の炎症性疾患もしくは癌を含むがこれらに限定されない疾患の治療において用いられる蛋白質をコードしてもよい。

10

【0066】

本発明の第三の局面の核酸構築物は、遺伝子治療によって本発明の方法において治療的に用いてもよい。または、核酸構築物によってコードされる蛋白質は、本明細書に記載のように直接投与してもよい。

【0067】

第三の局面の核酸構築物の投与は、物理的な方法によって標的部位に向けてもよい。これらの例には、適当な媒体において、例えば、磷酸緩衝生理食塩液のような薬学的に許容される賦形剤の溶液において、ベクターの形で「裸の」核酸を局所投与すること、または当技術分野で既知の方法に従う粒子衝突のような物理的方法によってベクターを投与することが含まれる。

30

【0068】

本発明の第三の局面の核酸構築物または蛋白質をレシピエントに直接投与するための他の物理的方法には、超音波、電気刺激、電気穿孔およびマイクロシーディングが含まれる。さらなる投与方法には、経口投与または吸入による投与が含まれる。

【0069】

患者においてインサイチューで細胞に遺伝子材料を輸送するための系であるマイクロシーディング輸送様式が特に好ましい。この方法は米国特許第5697901号に記載されている。

【0070】

本発明の第三の局面に従う核酸構築物はまた、輸送ベクターによって投与してもよい。これらには、当技術分野で既知のアデノウイルスまたはレトロウイルス輸送ベクターのようなウイルス輸送ベクターが含まれる。

40

【0071】

他の非ウイルス輸送ベクターには、当技術分野で既知のリポソーム輸送ベクターを含む脂質輸送ベクターが含まれる。

【0072】

投与は、形質転換宿主細胞を通して行ってもよい。そのような細胞には、それに対して核酸構築物が当技術分野において既知の遺伝子移入法によって移入される、被験者から回収した細胞が含まれる。その後形質転換細胞を培養において増殖させて、被験者に移植する。

50

【0073】

本明細書において用いられるように、「遺伝子治療」とは、患者の利益のために体細胞(体細胞遺伝子治療)または生殖系列の細胞(生殖系列治療)の組換えによる遺伝子操作による遺伝子の導入を意味する。さらに、遺伝子治療は、エクスピボおよびインビボ技術に分けることができる。エクスピボ遺伝子治療は、患者から体細胞の採取、ベクター、すなわち組換え型ベクターによる採取した細胞の処置、処置した細胞をその後患者に戻すことに関する。インビボ遺伝子治療は、例えば、静脈内または血管内手段による組換え型遺伝子ベクターの直接投与に関する。

【0074】

好ましくは、本発明の遺伝子治療の方法はエクスピボで行われる。

10

【0075】

好ましくは、遺伝子治療において、本発明の発現ベクターは、それが治療すべき被験者において発現されるように投与される。このように、ヒト遺伝子治療に関して、プロモーターは好ましくはヒト遺伝子由来のヒトプロモーター、またはヒトCMV由来のプロモーターのようなヒトにおいて典型的に発現される遺伝子由来のヒトプロモーターである。

【0076】

遺伝子治療に関して、本発明は、ヒトおよびヒト以外の哺乳類の体細胞を操作する方法を提供してもよい。

【0077】

本発明はまた、ヒト以外の哺乳類の生殖系列細胞の操作を含んでもよい遺伝子治療法を提供する。

20

【0078】

したがって、本発明は、ヒト細胞が、本発明の第三の局面に従って核酸構築物をそこに挿入するためにインビトロで処理されている、哺乳類細胞をヒトに導入することを含む、ヒトに治療蛋白質を提供する方法を提供する。

【0079】

エクスピボ体細胞遺伝子治療法の個々の段階のそれともまた、本発明に含まれる。例えば、適当なベクターにおける本発明の第三の局面の核酸構築物によって患者から採取した細胞を操作する段階。本明細書において用いられるように、「操作された細胞」という用語は、組換え型ベクターをトランスフェクトした細胞を含む。

30

【0080】

同様に、炎症性疾患を治療する薬剤を製造するためにトランスフェクトした細胞を用いることも企図される。

【0081】

本発明の第五の局面は、本発明の第三の局面に従う核酸構築物またはそれによってコードされた蛋白質を、医薬品に用いるために、好ましくは遺伝子治療において用いるために提供する。

【0082】

本発明はまた、ウマおよびペット動物(例えば、ネコおよびイヌ)、ならびにヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、およびウマ家系メンバーを含む家畜/農業動物を含む家畜動物の治療/予防のために獣医学に適用してもよい。

40

【0083】

本発明の第六の局面は、炎症性疾患を治療するための薬剤を製造するために本発明の第三の局面に従う核酸構築物を用いることを提供する。この意味において、炎症性疾患は、上記の如何なる一つまたは複数の炎症関連病態を含んでもよい。

【0084】

本発明はまた、本発明の第三の局面の核酸構築物または蛋白質を含む組成物にも関する。したがって、本発明の核酸構築物は、薬学的に許容される担体または複数の担体と共に用いてもよい。そのような担体には、生理食塩液、緩衝生理食塩液、デキストロース、リポソーム、水、グリセロール、エタノール、およびその組み合わせを含んでもよいがこれ

50

らに限定されない。

【0085】

薬学的組成物は、例えば、経口、局所、静脈内、筋肉内、鼻腔内、または皮内経路による投与を含む、患者の疾患を治療するためには効果的な如何なる有効な簡便な方法で投与してもよい。治療においてまたは予防として、活性物質を例えば滅菌水性分散剤として、好ましくは等張な注射用組成物として個体に投与してもよい。

【0086】

哺乳類、特にヒトに投与する場合、活性物質の一日用量は、0.01mg/kg体重から典型的には約1mg/kg周辺であると考えられる。いずれの事象においても医師は、年齢、体重、性別、および個体の反応を含む要因に依存する、個体にとって最も適した実際の用量を決定しうる。上記の用量は平均的な症例の例である。当然、これより高いまたはより低い用量が正当である場合が存在しうる、そしてそれらも本発明の範囲内である。

10

【0087】

本発明の第七の局面は、融合蛋白質が薬学的活性物質に会合している、LAPと蛋白質分解切断部位とを含む融合蛋白質を提供する。

【0088】

本発明はさらに、本発明の第七の局面の融合蛋白質をコードする核酸構築物を提供する。核酸構築物は好ましくは、蛋白質分解切断部位をコードする核酸配列に隣接したLAPをコードする核酸配列を含む。好ましくは、LAPをコードする核酸配列は、ふさわしくは蛋白質分解切断部位をコードする核酸配列に機能的に結合している。融合蛋白質をコードする核酸構築物は、図1のヌクレオチド1～861位、もしくは図2のヌクレオチド585～1352位、またはHGMPによって提供されたBLASTコンピュータープログラムのデフォルトパラメータを用いて、それに対して少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、もしくは99%の同一性を有するヌクレオチドの配列を含んでもよい。

20

【0089】

本発明はさらに、本明細書に記載の潜在型TGF-結合蛋白質(LTBP)に選択的に会合した本発明の第七の局面の融合蛋白質を提供する。

【0090】

本発明の第七の局面の融合蛋白質は、ペプチド結合によって薬学的活性物質に会合してもよい。または、融合蛋白質は、化学療法剤、合成薬、またはPNAのような化学化合物に融合蛋白質をクロスリンクさせることによって、化学結合によって薬学的活性物質に会合させてもよい。

30

【0091】

好ましくは、薬学的活性物質は、本発明の第七の局面の融合蛋白質において蛋白質分解切断部位のアミノ酸配列のC末端に結合する。より好ましくは、薬学的活性物質は、蛋白質分解切断部位のアミノ酸配列のC末端残基と連続している。

【0092】

本発明の第八の局面は、宿主細胞における発現によって組換え的に融合蛋白質を產生する段階、発現された融合蛋白質を精製する段階、およびペプチド結合または化学的クロスリンクによって精製融合蛋白質に薬学的活性物質を会合させる段階を含む、本発明の第七の局面の融合蛋白質および会合する薬学的活性物質を調製するプロセスを提供する。

40

【0093】

第九の局面において、本発明は、本発明の第七の局面の融合蛋白質の治療的有効量と会合する薬学的活性物質とをレシピエントに投与することを含む、ヒトを含む哺乳類のような患者の治療方法を提供する。そのような方法において、融合蛋白質および会合する薬学的活性物質は静脈内、皮内、筋肉内、経口、または他の経路によって投与してもよい。

【0094】

本発明の第七の局面の融合蛋白質および会合する薬学的活性物質は、単独で、または治療化合物、例えば抗炎症薬、細胞障害剤、細胞抑制剤、もしくは抗生物質のような他の化合物と併用して用いてもよい。

50

【 0 0 9 5 】

好ましくは、本発明の第七の局面の融合蛋白質および会合する薬学的活性物質は、本明細書に記載のように患者に直接投与する。

【 0 0 9 6 】

本発明の第十の局面は、医学において用いるために本発明の第七の局面に従う融合蛋白質および会合する薬学的活性物質を提供する。

【 0 0 9 7 】

本発明の第十一の局面は、本発明の第七の局面に従う融合蛋白質および会合する薬学的活性物質を炎症性疾患を治療するための薬剤の製造に用いることを提供する。この意味において、炎症性疾患には、本明細書において考察した如何なる一つまたは複数の炎症関連病態も含まれてもよい。

10

【 0 0 9 8 】

本発明はまた、本発明の第七の局面の融合蛋白質および会合する薬学的活性物質を含む組成物にも関する。したがって、融合蛋白質および会合する薬学的活性物質は、薬学的に許容される担体または複数の担体と共に用いてもよい。そのような担体には、生理食塩液、緩衝生理食塩液、デキストロース、リポソーム、水、グリセロール、ポリエチレングリコール、エタノール、およびその組み合わせが含まれてもよいがこれらに限定されない。

【 0 0 9 9 】

薬学的組成物は、例えば、中でも経口、局所、静脈内、筋肉内、鼻腔内、または皮内経路を含む、患者の疾患を治療するために有効な如何なる有効な簡便な方法で投与してもよい。治療においてまたは予防として、活性物質を滅菌水性分散液、好ましくは等張な注射用組成物として個体に投与してもよい。

20

【 0 1 0 0 】

本発明はまた、本発明の第三の局面の核酸構築物、または本発明の第七の局面の融合蛋白質および会合する薬学的活性物質、ならびに経口投与のための錠剤、肺内投与のための吸入器、および静脈内投与のための注射用溶液を含むがこれらに限定されない投与用溶媒を含む成分のキットを提供する。

【 0 1 0 1 】

本発明の好ましい態様は、蛋白質分解切断部位、好ましくはマトリクスマタロプロテイナーゼ(MMP)切断部位に会合した潜在性関連ペプチド、好ましくはTGF由来の潜在性関連ペプチドと、薬学的活性物質とを有する融合蛋白質を構築することを含む、サイトカイン、好ましくはインターフェロンである薬学的活性物質に潜在性を提供する方法を提供する。好ましくは、以下のように薬学的活性物質の後に蛋白質分解切断部位およびLAPが続く：活性物質 - 切断部位 - LAP。

30

【 0 1 0 2 】

本発明の第二およびその後の局面の全ての好ましい特徴は、第一の局面に必要な変更を加えたものである。

【 0 1 0 3 】

本発明は、以下の非制限的な実施例を参照して説明する。

【 0 1 0 4 】

40

実施例 1 - hLAP-mIFN、mIFN - hLAP、およびpLAP-mIFN 融合蛋白質の構築方法

pcDNA3のEcoRI-NotI部位へのGS-MMP-GSリンカーのクローニング

GS-MMP-GSリンカーをEcoRI-NotI切断pcDNA3に挿入することによってベクターを構築した。pcDNAは、ヒトサイトメガロウイルス前初期プロモーターおよびエンハンサーを、転写を可能にするRNAプロセシングシグナルと共に含む発現ベクター(インビトロジェン(Invitrogen)社)である。

【 0 1 0 5 】

配列

GLY GLY GLY GLY SER PRO LEU GLY LEU TRP ALA GLY GLY GLY SER
をコードする二本鎖デオキシオリゴヌクレオチドは以下のようにデザインした：
センスオリゴ：

5'AATTGGGGAGGCGGATCCCCGCTGGGCTTGGCGGGAGGGGGC
TCAGC 3'

アンチセンスオリゴ：

5' GGCGCTGAGCCCCCTCCGCCAAAGCCCGAGCGGGGATCCGCCTCC
CCCG 3'

10

【0106】

合成デオキシオリゴヌクレオチドは、ライフテクノロジーズ(Life Technologies)社(ペイズリー、イギリス)から購入した。アニーリングしたデオキシオリゴヌクレオチドをEcoRI-NotI切断pcDNA3(インビトロジェン(Invitrogen)社、グロニンゲン、オランダ)にクローニングした。組換え型クローンは、そのEcoRV部位を喪失して、さらなるBamHI部位を獲得した。プラスミドクローンは、末端標識オリゴとのサザンプロットハイブリダイゼーションによってアクセスした。クローンをGS-MMP-GSと名付けた。制限酵素およびDNA改変酵素は、ニューイングランドバイオラブス(New England Biolabs)社、ヒッчин、イギリスから得た。

20

【0107】

NH₂末端の次にGS-MMP-GSおよび成熟IFN が続くLAP(TGF)の構築

LAP(TGF)の次にGS-MMP-GSおよび成熟IFN を含むベクターは以下のように構築した：HindIIIおよびEcoRI末端を有する5'単位(シグナルペプチドを有する)としてのTGF からのLAPを、プラスミドTGF -Babe neoからPCRによってクローニングした(Chernajovskyら、Gene Ther. 4、553～559(1997))。以下のプライマーを用いた：

センスプライマー

5' CCAAGCTTATGCCGCCCTCCGGGCTGCGG 3'

アンチセンスプライマー

30

5' CCGAATTGCTTGCAGATGCTGGCCCT 3'

【0108】

PCR後、産物をフェノール抽出して、末端をクレノウによって塞いで、HindIIIおよびEcoRIによって消化した。820 bpの産物を、同じ酵素によって切断したGS-MMP-GSプラスミドにクローニングした。クローンは、TGF -GS-MMP-GSリンカーと名付けた。5'NotIおよび3'XbaI部位を有する成熟mIFN (マウス由来)を、以下のプライマーを用いてクローンアフロダイト(Aphrodite)(Triantaphyllopoulosら、Gene Ther. 5、253～263(1998))からPCRによって合成した：

センスプライマー

40

5' CGCGGCCGCAATCAACTATAAGCAGCTCCAG 3'

アンチセンスプライマー

5' GGTCTAGATCAGTTGGAAAGTTCTGGTAAG 3'

【0109】

PCR後、断片をフェノール抽出して、末端をクレノウによって塞ぎ、NotIおよびXbaIによって消化した。LAP-mIFN クローンは、TGF -GS-MMP-GSリンカープラスミドのNotIおよびXbaI部位に断片をクローニングすることによって得た。LAP-mIFN インサートのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図1に示す。

50

【0110】

NH₂末端の後にGS-MMP-GSおよび成熟LAP(TGF_β)が続くmIFNの構築

成熟mIFNの後にGS-MMP-GSとLAP(TGF_β)とを続けて含むベクターを以下のように構築した：

シグナルペプチドを有し、停止コドンを有しないプレ-mIFNを以下のプライマーを用いて上記のようにPCRによって合成した：

センスプライマー

5' CCAAGCTTATGAACAAACAGGTGGATCCTC 3'

アンチセンスプライマー

5' CCGAATTCTGTTGGAAAGTTCTGGTAAG 3'

10

【0111】

PCR合成、フェノール抽出を行って、DNAポリメラーゼのクレノウ断片によって塞いだ後、DNA産物をHindIIIおよびEcoRIによって消化して、プラスミドpCDNA3 GS-MMP-GSの同じ部位にクローニングした。クローンをIFN- β -GS-MMP-GSリンカーと名付けた。停止コドンを有する成熟LAP(TGF_β)を、以下のプライマーを用いて上記のPCRによって合成した：

センスプライマー

5' CGCGGCCGCACTATCCACCTGCAAGACTATC 3'

20

アンチセンスプライマー

5' GGTCTAGATCAGCTTGCAGATGCTGGGCCCT 3'

【0112】

PCRおよびフェノール抽出後、末端をクレノウによって塞ぎ、NotIおよびXbaIによって消化した。mIFN- β -LAPクローンは、プラスミドIFN- β -GS-MMP-GSの同じ部位にPCR断片をクローニングすることによって得た。mIFN- β -LAPインサートのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図2に示す。

【0113】

mIFNの前にブタLAPのクローニング

30

プラスミドpPK14として、システインがセリン(223/225)に変異している変異ブタcDNA(S andersonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92、2572～2576(1995))は、メリーランド州ベセスダのNIHのP. J. Wirth氏から供与された。ブタLAPのクローニングは、以下のプライマーの組を用いてPCRによって行った：

シグナルペプチドで始まるセンスプライマーは

5' CGCCCATGGCGCCTCGGGGCCT 3'

であった。このプライマーは、NcoI部位を作製するために開始ATG周辺で改変された配列を有する。

アンチセンスプライマー

40

5' CCGAATTCTGCTGTGCAGGTGCTGGGCCCT 3'

【0114】

PCR合成後、PCR産物をクレノウ-DNAポリメラーゼによって末端を塞いで、EcoRIによって切斷し、HindIII(塞いだ)によって切斷したLAP-mIFNプラスミドにクローニングした後、EcoRIによって切斷した(ヒトLAPを交換)。構築物はPorcLap-mIFNと命名した。

【0115】

結果

構造に関する検討

二つのコンフォメーションのTGF_β融合蛋白質のLAPドメインを用いて潜在型サイトカイ

50

ンを開発するために、マウスIFN のアミノ末端にLAPを含む潜在型サイトカイン(図1を参照のこと)と、COOH末端にLAPを含む潜在型サイトカイン(図2を参照のこと)とを構築した。

【0116】

LAPの278位のアルギニンでのLAP-mIFN 蛋白質のプロセシングを回避するために、アミノ酸1位のメチオニンから273位のセリンに及ぶLAPをクローニングした。この配列の次に、柔軟なリンカー(GGGGS)、推定のMMP9(Pengら、Human Gene Therapy、8、729～738(1997)；Yeら、Biochemistry、34、4702～4708(1995))、または推定のMMP1(Nagase and Fields、Biopolymers、40、399～416(1996))切断部位(PLGLWA)およびもう一つの柔軟な部分(GGG GSAAA)の次に成熟mIFN (アミノ酸22位のイソロイシンから始まる)が続いた。親水性領域にMMP切断部位が埋もれることによって、酵素の攻撃に対するアクセスが容易となるはずである。切断部位(PLGL)の中心は、MMP2によってペプチドとして切断されることが示されており、異なる型(PLGI)でも同様に、MMP3、MMP7、およびMMP8によって切断されることが示されている(Nagase and Fields、Biopolymers、40、399～416(1996))。

【0117】

IFN -LAP分子は、その停止コドンが柔軟なリンカーを通して読み取られるように変異している前駆体mIFN 配列、およびMMP部位の後に続くLAPの成熟配列(29位のロイシンから273位のセリン)で構成された。

【0118】

非プロセシングLAP-mIFN およびmIFN -LAP融合蛋白質はそれぞれ、推定される分子量52,375および51,768ダルトンを有する。これらの融合蛋白質の一次配列は、可能性がある四つのN-グリコシル化部位を含む。これらの蛋白質の一次構造および推定の折り畳み構造ならびにLTBPとのその起こりうる相互作用の略図を図5に示す。図5Bの右のパネルに、本来のTGF の折り畳み構造に類似したLAP-mIFN の折り畳み構造を示す。LAP-mIFN のアミノ末端(N)の近傍で、33位のシステインがLTBPの第三の8システインリッチリピートと相互作用するが、224位および226位のシステインは、分子間ジスルフィド結合によって蛋白質を二量体化すると予想される(Saharinenら、Cytokine and Growth Factors、10、99～17(1999))。図5Bの左のパネルでは、mIFN -LAPの構造を示す。33位のシステインは、この場合MMP切断部位の後方に存在し、224位および226位のシステインは、蛋白質のカルボキシ(C)末端により近い。

【0119】

実施例2 - 細胞トランスフェクション研究

方法

DHFR欠損チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞へのトランスフェクション

ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)-欠損CHO細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)(ライフテクノロジーズ社)、ペニシリン/ストレプトマイシン、およびグルタミンを含むHAM-F12培地(ライフテクノロジーズ社、ペイスリー、イギリス)において維持した。

【0120】

LAP-mIFN またはmIFN -LAPを発現するpcDNA3プラスミド(20 μg)をそれぞれPvuIによって直鎖状にして、PvuI切断pSV₂DHFR(1 μg)(Chernajovskyら、DNA、3、297～308(1984))に個々にライゲーションした。フェノール抽出を行った後、プラスミドをT4 DNAリガーゼによって300 μl中で16 ℃で3日間ライゲーションした。DNAを0.4 M 酢酸アンモニウム中で沈殿させて、水に再浮遊させて、24時間前に播種した9 cmプレートにおいてCHO細胞0.5 × 10⁶個に磷酸カルシウム共沈殿物1 mlとして加えた。4時間後、細胞をFBSを含まない10%グリセロールのHAM-F12溶液によって処置して、FBS不含培地において洗浄して、48時間放置した。トランスフェクトした細胞をトリプシン処理して、9 cmプレート6枚に分割した。スクレオシド(PAAラボラトリーズ、リンツ、オーストリア)、10%透析FBS(PAAラボラトリーズ)、および1 mg/ml G418(ジェネチシン、ライフテクノロジーズ社)を含まない - DMEM培地において選択を行った。選択培地は1週間に2回交換した。細胞クローンは2～3週間後に出現し、集団で維持された(Chernajovskyら、DNA、3、297～308(1984))。

10

20

30

40

50

【0121】

遺伝子増幅のため、細胞を50 nM(LAP-mFN)または12.5 nM(mIFN-LAP)メソトレキセート(MTX)(シグマ社、プール、イギリス)によってそれぞれさらに選択した。細胞クローニングは、環状クローニングによって単離して選択培地において増殖させた。

【0122】

IFN 生物アッセイ法

マウスIFN 生物アッセイ法は、記述のように(Triantaphyllopoulosら、Gene Ther. 5、253~263(1998))細胞上清の二倍希釈を用いて、マウスLTK⁻細胞におけるEMCウイルス(ロンドン、王立癌研究基金のI. Kerr氏の提供)感染症の細胞変性作用の阻害によって評価した。指示されている場合、血清不含CHO上清は、分子量カットオフ30,000 kDaのVivaspinフィルター(ザルトリウス(Sartorius)、ゲッティンゲン、ドイツ)を用いて遠心によって濃縮した。 10

【0123】

CHO細胞の代謝標識

永続的にトランスフェクトした細胞、または非トランスフェクトCHO細胞のコンフルエントプレートを、10%透析FBSを含み、チミジン、グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシンおよび150 μg/ml-L-プロリンを添加したシステイン-メチオニン不含培地(ライフテクノロジーズ社)によって洗浄した。標識は、1 Ci/mmolの³⁵S-メチオニン-システインミクス(アマシャム-ファルマシアバイオテック(Amersham-Pharmacia Biotech)、バックス、イギリス)の存在下で、培地5 mlにおいて250 mCi/プレートを用いて一晩または48時間のいずれかで行った。 20

【0124】

標識期間の終了時、上清を回収して、細胞の破片を遠心して除去し、透明な上清に、表記の場合にはセリンプロテアーゼ阻害剤(SPI)(10 μg/mlペプスタチン-A、1 μg/mlアプロチニン、10 μg/mlキモスタチン、10 μg/mlロイペプチド、および200 μM AEBSF(4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニル-フルオリド、HCl)(全てカルビオケム(Calbiochem)社、ビーストン、イギリス)を添加した。これらの上清は、免疫沈降試験に用いるまで-70度凍結した。

【0125】

免疫沈降 30
代謝的に標識した細胞からの上清を、0.1%NP40(50%ビーズ/容積)(BDH、プール、イギリス)を含むPBS中で平衡にしたプロテイン-G-セファロース(アマシャム-ファルマシアバイオテック社)によって予めきれいにした。トリクロロ酢酸(TCA)(シグマ社)総沈殿蛋白質25 × 10⁶ cpmを含む上清を用いた(細胞上清の約5~7ml)。4度4時間十分に混合した後、プロテイン-G-セファロースを遠心(2000 rpm、5分)によって除去した。澄んだ上清をヤギ抗ヒト-LAP抗体(R&Dシステムズ、オキソン、イギリス、0.9 μg/ml)またはモノクローナルラット抗mIFN(7F-D3、AMS、アビンドン、イギリス; 250倍希釈)のいずれかと共に4度3~4時間インキュベートした。

【0126】

次に、抗原-抗体複合体を、4度一晩回転させて十分に混合することによって、プロテイン-G-セファロース(50%溶液700 μl)に結合させた。プロテイン-G-セファロースビーズを0.1%NP40のPBS溶液5 mlによって3回洗浄した。ビーズに結合した蛋白質を小さい試験管のビーズ50 μl分画に分割して、Laemmliローディング緩衝液に直接再浮遊させるか、またはMMP反応において用いてから、10%アクリルアミドゲル中でのSDS-PAGEを行った。または、上清をMMPによって処理してから、免疫沈降させた。ゲルを7%酢酸および10%メタノール中で30分間固定して、1 Mサリチル酸ナトリウムによって処置してから乾燥させてX-線フィルムにオートラジオグラフィーによって曝露した。着色蛋白質分子量マーカーはアマシャム-ファルマシアバイオテック社から得た。 40

【0127】

MTX選択細胞からの上清をMMPまたはリウマチ性関節炎患者(RA/SF: 1/5)の滑液によって 50

一晩処置して、反応を10 mM EDTAによって停止させた後、免疫沈降した。

【0128】

MMP消化

組換え型プロMMP9(デトロイト、ウェイン大学のR. Fridman氏からの提供)または活性なMMP1およびMMP3(ロンドンのケネディリウマチインスチチュートのH. Nagase博士からの提供)を、CHO細胞からの免疫沈降した上清と共に、20 mMトリスHCl、pH 7.4、5 mM CaCl₂、140 mM NaCl、および0.1% Brij35(全てシグマ社)50 μlにおいて1 μg/mlで37 °Cで一晩インキュベートするか、または細胞上清に直接加えた(4 μg/mlで)。特定の実験では、10 μM 酢酸アミノフェニル水銀(APMA)(シグマ社)を用いてプロ-MMP9を37 °Cで一晩活性化した(Ogataら、J. Biol. Chem.、270: 18506 ~ 18511(1995))。

10

【0129】

結果

【0130】

(表1) mIFN の生物アッセイ

試料	抗ウイルス活性 (U/ml)
非トランスフェクト	0
mIFNβ-LAP	210
LAP-mIFNβ	0

20

1試料あたり3回ずつのアッセイ法の平均値

【0131】

LAP-mIFN およびmIFN -LAP組換え型蛋白質は、直鎖状プラスミドをDHFRプラスミド(pSV₂DHFR)と永続的に同時トランスフェクトさせた後に、ジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損チャイニーズハムスター卵巣(DHFR⁻ CHO)細胞(クローンCHO-K1)において発現され(Chernajovskyら、DNA、3、297 ~ 308(1984))、G418および透析血清の双方において選択した。

【0132】

表1に示すように、低い残留生物活性を有するmIFN -LAPが分泌されたが、LAP-mIFN は、完全に「潜在型」または不活性であった。蛋白質発現レベルは、抗-LAP抗体によるウエスタンプロットティングによって確認すると、類似であった(示していない)。

30

【0133】

組換え型蛋白質の生化学的特徴

永続的にトランスフェクトされた細胞からの分泌蛋白質を、³⁵S-メチオニンおよびシステインによって代謝的に標識した。LAP-mIFN およびmIFN -LAP標識蛋白質はいずれも、非還元状態において97 kDa以上の2個の主なバンドを示したが、これはCHO非トランスフェクト細胞からの上清では認められなかった(図6)。

【0134】

抗LAP抗体との免疫沈降により、LAP-mIFN およびmIFN -LAP上清は図7の還元条件下において、3個のバンドを示し、1個は57 kDa、もう1個は135 kDa、そしてもう1個の小さい成分を約75 kDa周辺に示した。135 kDaの蛋白質はおそらく、LAPにジスルフィド結合しているCHO由来(LTBP)である(Saharinenら、Cytokine and Growth Factors、10、99 ~ 117(1999))。

40

【0135】

小さい75 kDa成分(図7、レーン1、3、および5)は、MTXによる遺伝子増幅によって抗-LAP抗体によって認識される主成分となる(図8A、レーン1 ~ 4)。興味深いことに、モノクローナル抗-mIFN 抗体は、75 kDaのグリコシル化産物(図8Aおよび7、レーン5 ~ 8)を認識しないように思われ、抗-LAPは、蛋白質のmIFN -LAP配座(図8A、レーン5 ~ 8)ではLAPをあまり認識せず、このことは、融合蛋白質が異なるコンフォーメーションを有することを示す。

50

ている。免疫沈降した材料を酵素的に処理して(MMP1またはMMP3)、SDS-PAGE上で分離しても、類似の結果が得られた。コンフォメーションの差は、異なるMMP(下記参照)およびその潜在性の程度に対するこれらの蛋白質の異なる感受性を説明する可能性がある。

【0136】

分泌された組換え型蛋白質の推定分子量は、LAP-mIFN およびmIFN-LAPの双方について49,376 Daである。決定された分子量の増加は、これらの蛋白質のグリコシル化による可能性がある。免疫沈降蛋白質をN-グリコシダーゼFと共にインキュベートすると、分子量70 kDaおよび51 kDaの2個の主な蛋白質が生成され、これはそれぞれ、LTBPおよび融合蛋白質に対応する(示していない)。

【0137】

組換え型蛋白質のMMP切断

免疫沈降複合体を単一のMMPまたはその組み合わせによって一晩処置した。図7に示すように、プロ-MMP9またはMMP1は、57 kDa組換え型産物をあまり効率的に切断しなかった。MMP1は、融合蛋白質のグリコシル化型を切断することができるが(図7、レーン3および4；図8A、レーン2)、MMP3は、それだけでグリコシル化型をいくつかの個別のバンドに消化することができた(図7、レーン5および6；図8Aおよび8B、レーン3および7)。

【0138】

LTBPバンドはまた、MMP3によっても切断されて(図7、レーン3および4ならびに図8B、レーン3および7)、78 kDa産物を生成した。消化された産物の二つ(分子量36 kDaと20 kDa)はそれぞれ、推定されるLAPおよびIFN ポリペプチド断片に対応する。

【0139】

これらのインビオ実験において示された特異性は、MMP処置後の細胞上清において測定した抗ウイルス活性を完全には反映しない可能性がある。細胞上清は、特定の程度に既に活性化されており、このことは、上清に存在する他の蛋白質分解酵素が潜在型-サイトカイン部分を活性化する可能性があることを示している。インビトロで(示していない)MMP1もしくはMMP3と組換え型プロMMP9の組み合わせ、またはAPMA-活性化プロMMP9単独を用いて免疫沈降した後の融合ポリペプチドの蛋白質分解の増加は、明白ではなかった。

【0140】

MMPによる潜在型IFN の活性化

【0141】

(表2) MMPによって処置した濃縮上清からのmIFN 生物活性(U/ml)

		プロ-MMP9	MMP1	MMP3	プロ-MMP9+ MMP1	プロ-MMP9 + MMP3
mIFN β -LAP	実験 1	1,305	1,740	870	3,481	7,740
LAP-mIFN β	実験 1	163	217	109	435	217
	実験 2	109	N.D.	N.D.	435	217

濃縮血清を含まない上清を、表に示すようにMMPによって処置した。

N.D. = 行っていない

【0142】

(表3) MTX増幅CHOトランスフェクト細胞の非濃縮上清からのmIFN 生物活性(U/ml)

処置

	なし	MMP1	MMP3	プロ-MMP9	プロ-MMP9 + MMP1	プロ-MMP9 + MMP3	リウマチ性関節炎滑液	SPIなし
LAP-mIFN (50nM MTX)	288	6144	9216	288	1536	768	1152	768
mIFN β -LAP (12.5nM MTX)	1536	6144	3072	1536	1536	4608	6144	3072

10

【0143】

表記のように、上清に、セリンプロテアーゼ阻害剤(SPI)およびMMPを添加した、または添加しなかった(最後の列)。RA.SF(リウマチ性関節炎滑液)は、図6において用いたものと同じである。

【0144】

非濃縮上清は、約0.3 ng蛋白質に相当する抗ウイルス活性約210 U/mlを有した(Iwakuraら、J. Biol. Chem. 253、5074～5079(1978))。細胞上清は、MMP活性をより高い物質濃度にするために、多孔性のメンブレンを通して遠心することによって100倍濃縮した。

【0145】

濃縮すると、LAP-IFN 上清でもさらに処置しなくとも抗ウイルス活性を示した(表3)。この結果は、CHO細胞が、MMP(Muraseら、Eur. J. Biochem. 244、21～30(1997))を含む多様なプロテアーゼ(Goldmanら、Cytotechnology、23、103～111(1997)；Satohら、Cytotechnology、13、79～88(1993))を分泌することが報告されているという事実によって説明される可能性がある。おそらく、MMPのいくつかの天然の阻害剤(TIMPs)は、その活性を促進するこの濃縮法によってプロテアーゼから除去される可能性がある。

20

【0146】

非トランスフェクトCHO細胞からの上清は、MMPまたは最終容積の1/5のリウマチ性関節炎の滑液(RA-S.F.)による処置後でも生物活性を示さなかった(データは示していない)。

【0147】

MMP1を濃縮上清に加えると、生物活性をわずかに増加させたが、MMP1とプロMMP9の双方またはMMP3とプロ-MMP9の双方を添加しても同じであった(表2を参照のこと)。興味深いことに、IFN β -LAPをMMP1およびプロ-MMP9によって処置すると、抗ウイルス活性は3～6倍増加して、このことはこの分子のさらなる活性化が得られる可能性があることを示している。

30

【0148】

MTX増幅細胞からの非濃縮上清を用いて、MMP1およびMMP3の双方は、LAP-IFN をそれぞれ21倍および32倍活性化できること(表3)、そしてリウマチ性関節炎患者の滑液はこれを4倍まで活性化できること(表3)が証明された。mIFN β -LAPもまた活性化することができるが、既に示されているように(表1)、その基礎活性レベルは高い。図8Aおよび8B(レーン4および8)は、リウマチ性関節炎患者からの滑液もまた融合蛋白質を切断して、LAPおよびIFN β にそれぞれ対応する36 kDaおよび20 kDaの個々の産物を生成することができることを示している。

40

【0149】

先に述べたように、プロテアーゼ阻害剤を含まずに上清をインキュベートすると生物活性が増加して、CHO細胞からの分泌酵素がこれを切断する可能性があることを示している。MMP9の存在に対する二つの融合蛋白質の感度は異なり、mIFN β -LAPは活性化されるが、LAP-IFN β に関しては、MMP9は阻害性であるように思われ、おそらくCHO細胞上清に存在する他の酵素によるさらなるその分解を誘導する。

【0150】

50

炎症部位からの試料による潜在型IFN の活性化

図8および表3は、リウマチ性関節炎患者からの滑液が潜在型サイトカインを活性化できるることを示した。

【0151】

潜在型サイトカインをこれらの試料と共に長期間インキュベートすると、活性化合物へのその分解または蓄積を引き起こすか否かを評価するために、LAP-mIFN およびmIFN -LAPの双方をリウマチ性関節炎患者からの滑液の存在下または非存在下で37 ℃で5日間までインキュベートした後、IFN生物アッセイに適用した。白字の記号は、10%FBSを添加した培地においてインキュベートした試料であり、黒字の記号はリウマチ性関節炎滑液(RA-S.F.)を容積比1/5でインキュベートした試料である。

10

【0152】

試料を24時間間隔で採取した。図9は、この長期間のインキュベーションによって活性が増加したこと、すなわちLAP-mIFN は最初の24~48時間のあいだに10倍まで活性化して、その後徐々に減少したことを示す。mIFN -LAPは活性化されることができず、その活性の減少を認めたに過ぎなかった。この結果は、LAP-IFN コンフォーメーションがおそらく治療的用途を有しうることを明らかに示している。

【0153】

mIFN -LAPを用いた場合には活性化を認めなかった。全体的に、細胞の培地に認められるプロテアーゼが操作された蛋白質を分解することができることから、いずれの場合においても、蛋白質活性は経時的に減少した。

20

【0154】

別の病理的炎症状態からの試料を用いて、潜在型サイトカインの活性化を行うことができるか否かを決定するために、実験的アレルギー脳脊髄炎のサルからの脳脊髄液を試験した。一晩インキュベートした後、調べた試料3個中2個は、その平行な血清試料より4倍まで高く融合蛋白質の生物活性を増加させ(データは示していない)、部位特異的活性化を得ることができる可能性があることを示している。

【0155】

実施例3

LAP-mIFN によって検出される潜在性が二量体ジスルフィド結合LAPによって結合された推定の閉鎖外皮状構造の形成を必要とするか否かを評価するために、223位および225位のシステインがセリンに変異しているブタLAPを用いて融合蛋白質を構築した。

30

【0156】

方法

構築物の調製

ブタLAPは、実施例1に説明したPCRによってクローニングした。用いたプライマーは、実施例において説明した通りであった(ブタLAPのクローニング)。クローニングしたブタLAPは、223位および225位のシステインがセリンに変異していた(Sandersonら、Proc. Natl. Acad. Science、92、2572~2576(1995))。

【0157】

サルCOS-7細胞への一過性のトランスフェクション

40

プラスミドDNA、PorcLAP-mIFN 、mIFN -LAPおよびLAP-mIFN 対照20 μgを、磷酸カルシウム共沈殿法によって上記のように9cmプレートに播種したCOS-7細胞 0.5×10^6 個に1試料あたり2個ずつトランスフェクトさせた。DNA共沈殿物は、4時間ではなくて一晩細胞上に残っていた。COS-7細胞は抗生物質および10%FBSを含むDMEMにおいて増殖させた。グリセロールショックの48時間後、上清をIFN抗ウイルスアッセイ法のために採取した。

【0158】

結果

変異構築物PorcLAP-mIFN を、COS-7細胞への一過性のトランスフェクション後、インビトロでのその生物活性に関して他の構築物と比較した。表4は、以下を示すこのアッセイ法において、PorcLAP-mIFN がmIFN -LAPと同程度に活性であることを示している。

50

【0159】

(表4)

プラスミド	抗ウイルス活性 (U/ml)
LAP-mIFN β	0
PorcLAP-mIFN β	256
mIFN β -LAP	256

10

示した結果は、2回の実験のうち1つの代表的なものである。

【0160】

結論

結果は、223位と225位でのジスルフィド結合がLAP-mIFN β の潜在性にとって必要であることを示している。

【0161】

実施例4ヒトIFN β 、IL-2、およびIL-10-LAP融合蛋白質のクローニングおよび発現

ヒトIFN β -MMP-LAPおよびLAP-MMP-ヒトIFN β の構築は、CHO細胞株におけるこれらの構築物の発現の試験、ならびにインビトロおよびインビボでのいくつかのヒト細胞株による発現産物の活性のその後の試験を容易にするであろう。

20

【0162】

ヒトIL-2およびIL-10を含む構築物は上記のように発現および調べられると考えられる。発現された融合蛋白質の精製は、精製スキームのための固定としてポリヒスチジンテールを利用しうる。そのような精製スキームは当技術分野で周知である。

【0163】

ヒトIFN-LAPおよびLAP-ヒトIFN融合蛋白質の構築方法

マウスIFN β 遺伝子(実施例1を参照のこと)の場合と同様に、以下のプライマーを用いて、ヒトIFN遺伝子をMMP部位(LAP後)のCOOH末端のNotI/XbaI部位でクローニングすると、分子OM52(LAP-huIFN β)が得られた：

30

センスプライマー

5' cgc/g gcc gca ATG AGC TAC AAC TTG CTT GG

アンチセンスプライマー

5' ggt/ctaga TCA GTT TCG GAG GTA ACC

【0164】

PCR産物は、プラスミドPSVEIFのPCRによって得られ(Chernajovskyら、DNA、3、297～308(1984))、PCR産物をNotIおよびXbaIによって消化して、同じ酵素によって消化したLAP-mIFN β を発現するプラスミドにクローニングして、そこからマウス遺伝子を除去した。

40

【0165】

以下のPCRプライマーを用いて、ヒトプレIFN β をヒトLAPの前にクローニングすると、分子OM53(huIFN β -LAP)を生成した：

センスプライマー

5' cca /agc tt ATG ACC AAC AAG TGT C

アンチセンスプライマー

5' ccg/aat tc GTT TCG GAG GTA ACC TG

50

【0166】

プラスミドPSVEIFを上記のPCR反応の錆型として用い、PCR産物をHindIIIおよびEcoRIによって消化して、マウスcDNAを除去したmIFN-LAPの同じ部位にクローニングした。

【0167】

huIFN-LAP構築物およびLAP-huIFN構築物のヌクレオチドおよびアミノ酸配列をそれぞれ、図11および12に示す。

【0168】

これらの分子の潜在性または活性を評価するために、直鎖状のOM52およびOM53プラスミドDNA 20 μ gならびにpSV2DHFR(先の記述と同じ)1 μ gを、CHO細胞に永続的に同時トランسفエクトした。選択は、G418(ライフテクノロジーズ社のジェネチシアン)、10%透析ウシ胎児血清(FBS)、およびDMEM培地で行った。24時間コンフルエント培養物からの上清は、ヒト線維芽細胞(MRC5株)および実施例2に記載のEMCウイルスを用いる抗ウイルスアッセイにおいて調べた。結果を表5に示す。

【0169】

(表5)

プラスミド	抗ウイルス活性 U/ml
OM52 (LAP-huIFN)	256
OM53 (huIFN-LAP)	0

10

20

【0170】

結果

このデータは、LAP-MMPに融合したヒトIFNが、LAP-MMPペプチドに融合したマウス蛋白質とは異なる挙動を示すことから、融合蛋白質の潜在性は予測できないことを示している。マウス配列の場合、LAP-MMP-IFNコンフォメーションは潜在型であったが、ヒト(OM52)の場合この構築物は活性であり、その逆も同じであり、すなわちマウスIFN-LAPコンフォメーションは活性であるのに対し、ヒト(OM53)は不活性であった。

30

【0171】

実施例5コラーゲン誘発関節炎(CIA)とDNA注射

DBA/1マウスを、Drejaら、Arthritis and Rheumatism、43、1698～1708(2000)に記述されるようにII型コラーゲン(CII)によって免疫して、3週間後、フロイントの不完全アジュバントと共にCIIを追加免疫した。プラスミドDNAのPBS溶液100 μ gを大腿4頭筋の3カ所に筋肉内注射して、関節炎が発症すると、2日ごとにマウスを臨床関節炎に関して採点して、後肢の腫脹を記述のようにノギスで測定した(Drejaら、Arthritis and Rheumatism、43、1698～1708(2000))。

40

【0172】

関節炎モデル(CIA)において、活性型(PorcLAP-mIFNおよびmIFN-LAP)に対する潜在型サイトカイン(LAP-mIFN)の相対的有効性を測定した。潜在型LAP-mIFNは、pCDNA3の空のプラスミドベクターによって処置した対照と比較して、活性部分、すなわちmIFN-LAPまたはPorcLAP-IFNのいずれかより大きい有効性を示す。

【0173】

筋肉内注射による遺伝子治療によって輸送した場合、潜在型サイトカインは、確立した疾患の治療においてより有効であることが判明した。

【0174】

結論

活性なサイトカイン分子は、TGFの潜在性ドメインをそのNH₂またはCOOH末端のいずれ

50

かに付加することによって、「潜在型」となるようにデザインすることができることが本明細書において示されている。サイトカインIFN を実験モデルにおいて用いた。

【0175】

TGF のLAPドメインはIFN に「潜在性」を与え、この潜在性は融合蛋白質をMMPと共にインキュベートすることによって除去することができる。おそらく、潜在性は、IFN 部分とその細胞受容体との相互作用をLAPが立体的に妨害することに関係している。IFN の結晶構造では、分子のNH₂およびCOOH末端が近位に存在するという事実にもかかわらず、TGF そのものにおいて認められるようにLAPドメインをそのNH₂末端で融合することによって、よりよい「外皮」が付与されるように思われた。他のサイトカインの場合、これはその三次構造およびその受容体との相互作用表面に応じて異なる可能性がありうる。

10

【0176】

LAPとIFN との間に存在するMMP部位は、MMP-3およびMMP-1によってインビトロで切断することができる。MMP-3およびMMP-1は、その活性部位において相同な領域を有する(Mas sovaら、J. Mol. Model.、3、17～30(1997))。他のMMPもまた、CHO細胞の濃縮血清不含上清において起こる活性化によって示されるようにこの部位を切断する可能性がかなりあり得る(表2)。MMPの発現は非常に厳密に調節されている(Hanら、Autoimmunity、28、197～208(1998))。MMPは、組織再モデリング、創傷治癒、および炎症の際に活性である(Kubotaら、J. Oral and Maxillofacial Surgery、55、20～27(1997)；Van Meursら、Arthritis and Rheumatism、42、2074～2084(1999)；Leppertら、Brain、121、2327～2334(1998)；Uhmら、Annals of Neurology、46、319～324(1999)；Louisら、Clin. Exp. Immunol. 120、241～246(2000)；Baughら、Gastroenterology、117、814～822(1999))。MMPはまた、腫瘍細胞が周辺組織に浸潤する際に必要である。実際に、メタロプロテアーゼの組織阻害剤(TIMPs)の発現は、腫瘍の浸潤および転移を阻害することができる(DeClerckら、Cancer Res. 52、701～708(1992))。

20

【0177】

MMP9は、融合蛋白質を切断することができない。配列PLGLWA-d-Rを有する蛍光発生ペプチド基質を用いると、マトリクスメタロプロテイナーゼの加水分解速度(kcat/Km)の値は、MMP9 > MMP2 > MMP7 > MMP3 > MMP1の順であるように思われる(Nagase and Fields、Biopolymers、40、399～416(1996))。本研究において用いたペプチド基質と操作された蛋白質との加水分解の感受性におけるこの相違は、その三次構造に関連する可能性がある。

30

【0178】

「潜在型」サイトカインデザインは、いくつかの長所を有するように思われる。第一に、サイトカインを投与しても、その受容体を有する細胞によって急速に取り込まれないように思われ、これはその毒性に対して影響を及ぼす可能性があり、より長い半減期を提供する可能性がある。LAP-含有TGF は、インビトロでの半減期が増加することが示されている(Wakefieldら、J. Clin. Invest. 86、1976～1984(1990))。このように、その結果として、治療的全身投与はより低い濃度で行うことができると考えられる。

【0179】

第二に、LAPおよびLTBPはいずれも、潜在型サイトカインと細胞外マトリクスとの相互作用を促進する可能性がある。

40

【0180】

第三に、サイトカインは典型的に、MMP活性を含む炎症または組織再モデリングプロセスが起こっている場合でなければ、放出されず、細胞受容体と相互作用しない可能性がある。そのような活性は、変形性関節炎、リウマチ性関節炎(Kubotaら、J. Oral and Maxillofacial Surgery、55、20～27(1997)；Van Meursら、Arthritis and Rheumatism、42、2074～2084(1999)；Singerら、Osteoarthritis and Cartilage、5、407～418(1997))、ならびに炎症性腸疾患(Louisら、Clin. Exp. Immunol. 120、241～246(2000)；Baughら、Gastroenterology、117、814～822(1999))、多発性硬化症(Leppertら、Brain、121、2327～2334(1998))、アテローム性動脈硬化症(Libby、Vascular Medicine、3、225～229(1998))および癌浸潤の際(DeClerckら、Cancer Res. 52、701～708(1992))のような他のタイプの

50

慢性疾患において認められる。

【0181】

切断されると、LAPはインビトロで活性なTGF の作用を阻害することができることが示されていることから、LAPが放出されることは、TGF に関して拮抗作用を有しうると論じることができる(Wakefieldら、Growth Factors、1、203～218(1989))。しかし、本発明者らのLAP-融合蛋白質は、フリーラジカルが周囲に存在する炎症部位でその作用を発揮する可能性があると予想される。LAPがニトロシル化されると、TGF に対するその結合能を失うことが示されている(Vodovotzら、Cancer Res.、59、2142～2149(1999))。このため、炎症部位において、放出されたLAPがTGF 機能に拮抗する可能性は低い。

【0182】

10

MMP切断部位にさらなる変更を行えば、さらなる組織特異性を提供する可能性がある。

【図面の簡単な説明】

【0183】

本発明を、下記の添付の図面を参照して、例としてのみ説明する。

【図1】LAP-mIFN 構築物のスクレオチド(A)および対応するアミノ酸(B)配列を示す。四角で囲んだ配列はリンカー配列を含むMMP切断部位の配列に対応する。

【図2】mIFN -LAP構築物のスクレオチド(A)および対応するアミノ酸(B)配列を示す。四角で囲んだ配列はリンカー配列を含むMMP切断部位の配列に対応する。

【図3】TGF 1、2、および3(ヒト、Hu)、TGF 4(ニワトリ、Ck)、TGF (カエル、Fg)の前駆体ドメインのアミノ酸配列を示す。矢印は、TGF 1のシグナルペプチドおよび成熟TGF sの切断が起こる蛋白質分解プロセシングの位置を示す。インテグリン細胞認識配列と同様に、N-結合グリコシル化部位に下線を引いて示す(Roberts and Sporn、Peptide Growth Factors and their Receptors : Sporn, MB and Roberts, A, Springer-Verlag、第8章、442(1996))。

20

【図4】マトリクスメタロプロテイナーゼ(MMP)(Nagase and Fields、Biopolymers、40、399～416(1996))の蛋白質切断部位の配列を示す。

【図5】本研究において用いた融合蛋白質とその推定の折り畳み構造の略図を示す。(A)組換え型潜在性蛋白質の一次構造。本研究において用いた二つのコンフォメーションLAP-mIFN およびmIFN -LAPにおけるLAP、MMP、およびmIFN の直鎖状の配列配置を示す。LAP-mIFN およびmIFN -LAPのアミノ末端の四角は、TGF またはmIFN のいずれかをそれぞれ分泌するための本来のシグナル配列ペプチドを示す。(B)推定の折り畳み構造と潜在型サイトカインのLTBPとの相互作用。LTBPにおいて、EGF様リピートを小さい四角で、システインリッヂリピートおよびハイブリッドドメインを丸で、そして蛋白質分解切断に対して感受性がある「ヒンジ領域」を黒い実線で示す。ジスルフィド結合を灰色の実線で示す。

30

【図6】CHO細胞の上清における組換え型融合蛋白質の検出を示す。CHO細胞(レーン1)、LAP-mIFN トランスフェクト(レーン2)、およびmIFN -LAP(レーン3)トランスフェクトしたCHO細胞の上清の非変性SDS-PAGEである。新しく発現された融合蛋白質の二本のバンドの位置に、二本の矢印で印を付ける。kDaで示した分子量マーカーの位置を示す。

【図7】抗LAP抗体によるCHO細胞上清の免疫沈降とMMP1およびMMP3による切断を示す。LAP-mIFN (レーン1、3、および5)およびmIFN -LAP(レーン2、4、および6)。無処置対照(レーン1および2)、MMP3による処置(レーン3および4)、MMP1による処置(レーン5および6)。SDS PAGEは、変性条件で行った。LTBPおよび融合蛋白質の位置を矢印で示す。星印(*)をつけた矢印は、MMP切断産物が存在することを示す。kDaで示した分子量マーカー(M.W.)の位置を示す。

40

【図8】抗LAPおよび抗IFN 抗体によるMTX選択CHO細胞上清の免疫沈降、ならびにMMP1、MMP3、およびリウマチ性関節炎患者からの滑液による切断を示す。(A)LAP-mIFN およびB)mIFN -LAP。無処置上清(レーン1および5)、MMP1処置(レーン2および6)、MMP3処置(レーン3および7)ならびにリウマチ性関節炎滑液処置(レーン4および8)上清。抗LAP(レーン1～4)および抗IFN モノクローナル抗体(レーン5～8)による免疫沈降。LTBPおよび融合蛋白質の位置を示す。

50

白質の位置を矢印で示す。星印(•)で記した矢印は、MMP切断産物が存在することを示す。

【図9】培地単独またはリウマチ性関節炎の滑液とのインキュベーション後のIFN活性の速度論を示す。A. LAP-mIFN ; パネルB. mIFN -LAP。

【図10】LAP-IFNによるDNA注射によるコラーゲン誘発関節炎の阻害を示す。パネルAは後肢の腫脹を示し、パネルBはII型コラーゲンによる追加免疫時期からの臨床スコア発達を示す。

【図11】huIFN- β -LAP構築物の推定ヌクレオチド(A)および対応するアミノ酸(B)配列を示す。

【図12】LAP-huIFN 構築物の推定ヌクレオチド(A)および対応するアミノ酸(B)配列を示す。

【図 1 - 1】

【図 1 - 2】

AGATCAACC	TCACCTACAA	GGCGGACTTC	AGAGATCCCA	TGGAGATGCC	GGAGAAGATG	1020
LysIleAsnL	euHtrItyR	alaaLysPhe	ProLysPhe	etclGluMet	rglyLysMet	
CAGAAAGGCT	ACATGCGCT	TGCCATCCAA	GAGATGCTCC	AGAATGTCCT	TCTTGTCTTC	1080
GlyLysSer	yrHtrIalAla	alaleIgl	GluMetLys	lnsValPhe	leuLvalPhe	
AGRAAGCAATT	TCTCCAGCAC	TGGCTGGAAAT	GAGACTATCTG	TGTGATCTCT	CCTGATGAA	1140
ArgAsnAsnIF	tyrLysTrpAsn	hlyTrpAsn	hlyHtrIleLys	leuLysArgLys	leuLysArgLys	
CTTCACCAAGC	AGRCAGTTGT	TCTGAGAACG	GTACTAGAGG	AAAGACGAGA	GGAAAAGATTG	1200
LeuHisGlnG	leuLysLys	ValLeuGluG	luLysGlnG	luLysGlnG	luLysGlnG	
ACGTGGGAGA	TCTCTCAACG	TGCTCTAAC	TGGAGAGCT	ATTACTGGAG	GGTCCGAAAGG	1260
TyrTrpGluM	etSerSerTh	ralAlaLeuHis	LeuLysSerTh	yrTyrTrpR	gvaLglnArg	
TACCTTAAAC	TCATGAGTGA	CAACAGCTAC	GCTCTGGATGG	TGGCTCCAGC	AGAGATCTTC	1320
TyrLeuLysI	euMetLysTyr	rhssSerTyr	AlaTrpPhe	alvalArgLys	agluteLphe	
AGGAACCTTC	TCATCATGG	AGAACCTTAC	AGAACCTTC	AAACTCTG	TAGACC	1376
ArgAsnGlnH	euLleIleLys	gkgLeuLys	ArgAsnPheG	inras***	SeLarg	

uga

【図2-1】

lfn+MMP+TGF β AL94						
	10	20	30	40	50	60
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
ATGACACAGA	GTTGGATCCT	CCAGGCTCGG	TTCTCTGCTG	GCTTCCTCAC	CCAGACCGTG	
MetAsnAsnR	rgTpIleLe	gHisAlaAla	PheuLeuys	ysPheSerTh	rThraLeu	60
TCCATCACT	ATAAGCAGCT	CCAGCTCCAA	GAAGAGCAGA	ACATCGGAA	ATGTCAGGAG	
SerLeuAsnT	ytLysGlnLe	uglnLeuGln	GluArgThra	smileArgly	scysGlnGlu	120
CTCTCTGGAGC	AGCTGAATGG	AAAGATCNCAC	CCTACCTACA	GGCCGGACTT	CAAGATCCT	
LeuLeuGlu	lLeuAsnG	ytLysIleLe	TyrThraTyr	rgAlaLeuPh	elysilePro	180
ATGGAGATGA	CGGAGAAGAT	CGAGAAGAGT	TACACTGCT	TTGCCATCAA	AGAGATCCIC	
MetGluMetT	hrGluLysM	tGlnLysSer	TyrThraAla	bsLeuAlaLe	gNGLuMetLeu	240
CAGAATGCT	TTCTCTGCT	CAAGAACAT	TCTCTCCAGCA	CTGGCTGGAA	TGAGAGTATT	
GlnAsnVal	HeleValPh	ehrGAsnAsn	PheSerSerT	hrGlyTprGlu	rThraThrIle	300
CTGTCAGCTC	TCCTGGATGA	ACTCCACAG	CAAGACAGT	TTCTGAAGAC	AGTACTAGRG	
ValValArg	euLeuAspG	leuLysGln	GlnThraVal	HeleLysTh	rValLeuGlu	360
GAAAAGCAAG	AGAAAAGATT	GACGTGGGAG	ATGTCCTCAA	CTGCTCTCAA	CTTGAAGAGC	
GluLysGln	igluArgLe	uhrTprGlu	MetSerSerT	hrAlaLeuHil	SleLysSer	420
TATTACTGGA	GGGTGCAAGA	GTACCTTAA	CTCATGAGT	ACACAGCTA	CGCCGTGATG	
TytTyrLys	rgValGlnH	rgLysLeuLys	LeuMetLysT	yrAsnSerT	rAlaTrpMet	480
GTGTCGCGG	CGAGACACTT	CAGGAACATT	CTCATCATC	GAAGACTTAC	CGAACATTTC	
ValValA	rga	lgLluLe	hrGAsnPh	LeuIleIle	rgArgLeuTh	540
CAAAACGAT	TGGGGGAGG	CGGATCCGG	CTGGGCGCTT	GGGGCGGGGG	GGGGCTCCGG	
GlnAsnGluP	heleGlyG	ylGlySerPro	LeuLysLeuT	rgAlaLysGly	rgLysSerAla	600
GGCCGCACT	CCACCTGCAA	GACTATGCCA	ATGGAGCTGG	TGAAGCGGAA	GCGCAGTCG	
AlaLeuAsn	erThrCys	slhrIleAsp	MetGluLeuH	allysArgly	sArgIleGlu	660
GCCATCCCGG	GCCAGATCCT	GTCCAAGCTG	CGGCTCGCCA	GCCCCCGGAG	CGAGGGGAG	
AlaIleArgG	lygInleLe	uSerLysLeu	ArgleuSlas	erProProSe	rGlyLysGlu	720
GTCCCCCGCG	GCCCCCTGCC	CGAGCGCGT	CTGGGCGCTGT	ACACAGCAC	CCGGCCACCG	
ValProProG	LeuLeuLeu	AlaLvaLe	LeuLysLeu	ysAsnSerTh	rArgAspArg	780
GTGGGGGGGG	AGAGTGGAGA	ACCGGGAGCC	GACGCTGAGG	CGGACTACTA	CGCCAGAGG	
ValAlaGlyG	luSerAlaG	uProGluPro	GluProGluA	LeAspTyrT	rAlaLysGlu	840
GTCACCCCGG	TGCTAATGTT	GGRAACCCAC	AAAGGAATCT	ATGACRAGTT	CAAGCAGAGT	
ValThrArgV	allMetLeuA	gIluThrHis	AsnGluLeuT	yrAspLysPh	eLysGlnSer	900
ACACACAGCA	ATAATATGTT	CTTCAACACA	TAAGACCTTC	GAAAGCGGT	ACCTGACCC	
ThrHisSerT	leuPheMetPh	fePheAsnTh	SerGluLeu	rgGluLysLeu	rProGluPro	960

【図2-2】

GTGTGCTCTCTGGGGCCACCA GCTGGCTCTG CTGAGGGAGGC TCAAGTTAAAG ATGCTGGAGCAG ValLeuLeuLeuLeuArgAlaG1 LeuLeuArgLeuArgArgLeu euLeuLeuLeuValGlnGln	1020
CACCGTGGAGC TGATCACGAA ATATCACGACCA AATTCTCTGGC GATACCTCGG CRACCGGGCTG HisValGlnLeu tyroGlnLy sTyrSerKen AsnSerTrpPa rgTyrLeuLeu RasArgLeu	1080
CTGGGACCCA GCGACTGGCC AGACTGGTTA TCTTGTGAGC TCAACGGAGCTG TGTGCGGGAG LeuLeuAlaProLeuArgAspSerPheTyrLeuSerPheAspV alThrGlyIva ValArgGln	1140
TGTTGGAGCC GAGCTGGGGG AATTTGAGGGC TGGGGCTTCA GGGCCGACTG CTCTGTGAC TrpLeuSerXa rGlyGlyGlyIleuGlyGly PheArgLeuLeuAsp euArgLysCysSerCysAsp	1200
AGCAAGGGATA ACACACTGCCA AGTGGACATC PAACTGGGTCTA CTACGGCGCCG CGGAGGTGAC SerArgAspA sThrLeuG1 nValAspTle AsnGlyPheP hrThrGlyHr GArgGlyAsp	1260
CTGGGGCCACCA TTCTATGGCAT GAACCCGGCTT TCTCTGGCTTC TCAATGGCCAC CCGGGCTGGAG LeuLeuAlaThr1 HisGlyLeuTrsAspArgPro PheLeuLeuLeu euMetAlaTh xProLeuGlu	1320
AGGGCCGAGC ATCTGCAAGG TgtGtCTGAA CC ArgAlaGlnH xLeuGlnSer r...SerArg	1352

【図3-1】

【図3-2】

200	u TGF- β 1	WLSFPIVGDYVPRMLSRGIGEFLERISAHCSG---T-----DSRDNTLQYDIN-GTGTG-----RGDIAT-----	240
	u TGF- β 2	WLSFPIVDAHMLHKKDGLPKLISLCHCPCFVPSNNYIIPNNESEELEARPA-GIDGTSTYTGDKTGTGKTRK	
	u TGF- β 3	WLSFPIVDTQYRMLLARERNCLETSIHCCHCFPQ-NCDIENIHEMELKPKR-GVNEODHGDGIGRK---K	
	k TGF- β 4	WLSFPIVDAHMLSESLGKLVSHCPCPENGP-G-HADEKRSIESTEQQ---K-----RGDRQSTA---K	
	g TGF- β 5	WNSVPIVKTWNMLKPKLSELENEQGPQAGG-----PPIQKQD-----IDIEGFLP-----KDLASI---SSK	
		+	+
		*	*
220			
			300
		↓ 280	
260		---	
	u TGF- β 1	---HGMWRPFLIMATPLERA-OK---LQS---RRHRLDNYCFSST---EKNUCCVROIYIDEBKOLGKWAHTEP	
	u TGF- β 2	KNRGK---T-----PHILMLLPSYRL-EQ---QTRKRLDNYCFSR-----QDOLCFLYIDERDGLKWAHTEP	
	u TGF- β 3	ORDNIN-N-----MLLMMPPHRL-DNPQGG---RRKRLDNYCFSR-----EENCCVRLPFLYIDERDGLKWAHTEP	
	k TGF- β 4	-KHR---V-----PYVLMALPHERN---LHSA---RRRQLDNYCFSR-----SS-----RRIKQVCKPLYINFEDGLKWAHTEP	
	g TGF- β 5	ENT-----KRYL---MTSMPAERIDTV-----SS-----RRIKQVCKPLYINFEDGLKWAHTEP	
		+	+
		*	*
320		340	
		↓ 360	
		390	
	u TGF- β 1	KGYHANFOLGCPCTYISSLTQYSKVALYVNHQPGASAAPCCVPALEPLPIVYNGRKPKVEQUSNTVSRCKS	
	u TGF- β 2	KGYANFACQYLSIDQVQHNGPASAAPCCVPALEPLPIVYNGRKPKVEQUSNTVSRCKS	
	u TGF- β 3	KGYANFSCCPCTYISSLTQYSKVALYVNHQPGASAAPCCVPALEPLPIVYNGRKPKVEQUSNTVSRCKS	
	k TGF- β 4	KGYANFMCOPCTYISSLTQYSKVALYVNHQPGASAAPCCVPALEPLPIVYNGRKPKVEQUSNTVSRCKS	
	g TGF- β 5	KGYANFCLGCPCTYISSLTQYSKVALYVNHQPGASAAPCCVPALEPLPIVYNGRKPKVEQUSNTVSRCKS	
		+	+
		*	*

【図4-1】

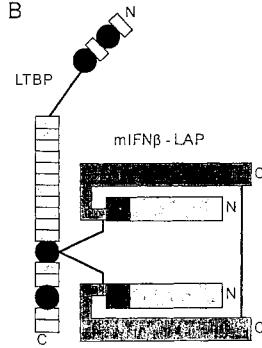
番号	アミノ酸	番号
MMP-1/MMP-8		
ヒト型コラーゲン(α1)	Ala-Pro-Gln-Gly ₇₃ -Ile ₇₄ -Ala-Gly-Gln	80
ヒト型コラーゲン(α2)	Gly-Pro-Gln-Gly ₇₃ -Leu ₇₄ -Leu-Gly-Ala	80
ヒト型コラーゲン	Gly-Pro-Gln-Gly ₇₃ -Leu ₇₄ -Ala-Gly-Gln	80
ヒト型コラーゲン	Gly-Pro-Leu-Gly ₇₃ -Ile ₇₄ -Ala-Gly-Ile	80
ヒト型コラーゲン	Gly-Pro-Gln-Gly ₇₃ -Leu ₇₄ -Arg-Val-Gly	84
ラットα ₁ 型コラーゲン	Ala-Ala-Tyr-His ₇₃ -Leu ₇₄ -Val-Ser-Gln	84
ラットα ₁ 型コラーゲン	Met-Asp-Ala-Phe ₇₃ -Leu ₇₄ -Leu-Ser-Ser	84
ラットα ₁ 型コラーゲン	Glu-Pro-Gln-Ala ₇₃ -Leu ₇₄ -Ala-Met-Ser	84
ラットα ₁ 型コラーゲン	Gln-Ala-Leu-Ala ₇₃ -Met ₇₄ -Ser-Ala-Ile	84
ヒト型コラーゲン	Pro-Ser-Tyr-Phe ₇₃ -Leu ₇₄ -Ile-His-Gly	79
ヒト型コラーゲン	Tyr-Glu-Ala-Gly ₇₃ -Leu ₇₄ -Gly-Val-Val	84
ヒト型コラーゲン	Ala-Gly-Leu-Gly ₇₃ -Val ₇₄ -Val-Gly-His	84
ヒト型コラーゲン	Ala-Gly-Leu-Gly ₇₃ -Leu ₇₄ -Ser-Ser-Thr	84
α ₁ 型コラーゲン	Gly-Ala-Met-Phe ₇₃ -Leu ₇₄ -Glu-Ala-Ile	85
ヒト型コラーゲン	Ile-Pro-Gln-Asn ₇₃ -Phe ₇₄ -Phe-Gly-Val	86
ヒト型コラーゲン	Thr-Glu-Gly-Gly ₇₃ -Ala ₇₄ -Arg-Gly-Ser	86
ヒト型コラーゲン	Arg-Ala-Ile-His ₇₃ -Ile ₇₄ -Gln-Ala-Glu	87
ヒト型コラーゲン	Leu-Arg-Ala-Tyr ₇₃ -Leu ₇₄ -Leu-Pro-Ala	88

番号	アミノ酸	番号
MMP-2		
ラットα ₁ 型コラーゲン	Gly-Ala-Hyp-Gly ₅₄ -Leu ₅₅ -Glx-Gly-His	24
ラットα ₁ 型コラーゲン	Gly-Pro-Gln-Gly ₅₄ -Val ₅₅ -Arg-Gly-Glu	30
ラットα ₁ 型コラーゲン	Gly-Pro-Ala-Gly ₅₄ -Val ₅₅ -Gln-Gly-Pro	30
ラットα ₁ 型コラーゲン	Gly-Pro-Ser-Gly ₅₄ -Leu ₅₅ -Hyp-Gly-Pro	30
ラットα ₁ 型コラーゲン	Gly-Pro-Ala-Gly ₅₄ -Glu ₅₅ -Arg-Gly-Ser	30
ラットα ₁ 型コラーゲン	Gly-Ala-Lys-Gly ₅₄ -Leu ₅₅ -Thr-Gly-Ser	30
ラットα ₁ 型コラーゲン	Gly-Pro-Ala-Gly ₅₄ -Gln ₅₅ -Asp-Gly-Pro	30
ラットα ₁ 型コラーゲン	Gly-Pro-Ala-Gly ₅₄ -Phe ₅₅ -Ala-Gly-Pro	30
ラットα ₁ 型コラーゲン	Gly-Pro-Ile-Gly ₅₄ -Asn ₅₅ -Val-Gly-Ala	30
ラットα ₁ 型コラーゲン	Gly-Pro-Hyp-Hyl-Gly ₅₄ -Ser ₅₅ -Arg-Gly-Ala	30
ラット型コラーゲン(α1)	Gly-Pro-Gln-Gly ₇₃ -Ile ₇₄ -Ala-Gly-Gln	22
ラット型コラーゲン(α2)	Gly-Pro-Gln-Gly ₇₃ -Leu ₇₄ -Leu-Gly-Ala	22
ヒト型コラーゲン	Ile-Pro-Glu-Asn ₇₃ -Phe ₇₄ -Phe-Gly-Val	89
ヒト型コラーゲン	Pro-Pro-Gly-Ala ₇₃ -Tyr ₇₄ -His-Gly-Ala	90
ヒト型コラーゲン	Arg-Ala-Ile-His ₇₃ -Ile ₇₄ -Gln-Ala-Glu	87
ヒト型コラーゲン	Gly-Pro-His-Leu ₇₃ -Leu ₇₄ -Val-Gly-Ala	87
ヒト型コラーゲン	Leu-Arg-Ala-Tyr ₇₃ -Leu ₇₄ -Leu-Pro-Ala	88

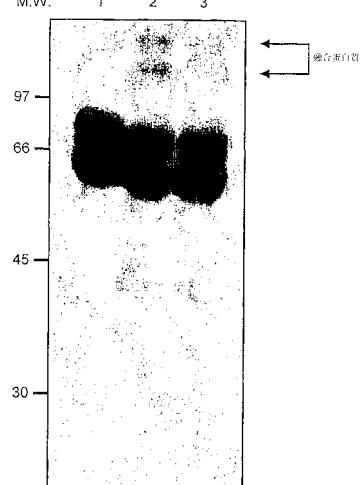
【図4-2】

MMP-3	アミノ酸	番号
ヒトα ₁ 型コラーゲン	Gly-Pro-Glu-Gly ₆₁ -Leu ₆₂ -Arg-Val-Gly	79
ヒトα ₁ 型コラーゲン	Arg-Val-Gly-Phe ₆₁ -Tyr ₆₂ -Glu-Ser-Asp	79
ヒトα ₁ 型コラーゲン	Leu-Leu-Ser-Ala ₆₁ -Leu ₆₂ -Val-Glu-Thr	91
α ₁ 型コラーゲン	Glu-Ala-Ile-Pro ₆₁ -Met ₆₂ -Ser-Ile-Pro	91
アントラニン	Ile-Ala-Gly-Arg ₆₁ -Ser ₆₂ -Leu-Asn-Pro	91
ヒト型コラーゲン	Leu-Asn-Ala-Gly ₆₁ -Phe ₆₂ -Thr-Ala-Ser	92
ヒト型コラーゲン	Ile-Pro-Glu-Asn ₆₁ -Phe ₆₂ -Phe-Gly-Val	93
サザンアミド	Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu	37
ヒトα ₁ 型コラーゲン	Asp-Val-Ala-Gly ₆₁ -Phe ₆₂ -Val-Leu-Thr	43
ヒトα ₁ 型コラーゲン	Asp-Thr-Leu-Glu ₆₁ -Val ₆₂ -Met-Arg-Lys	94
ヒトα ₁ 型コラーゲン	Asp-Val-Gly-His ₆₁ -Phe ₆₂ -Arg-Thr-Phe	94
ヒトα ₁ 型コラーゲン	Asp-Ser-Gly-Gly ₆₁ -Phe ₆₂ -Met-Leu-Thr	95
ヒトα ₁ 型コラーゲン	Arg-Val-Ala-Gly ₆₁ -Met ₆₂ -Arg-Gly-Glu	48
ヒトα ₁ 型コラーゲン	Asp-Leu-Gly-Arg ₆₁ -Phe ₆₂ -Gln-Thr-Phe	48
ヒトα ₁ 型コラーゲン	Pro-Phe-Ser-Pro ₆₁ -Leu ₆₂ -Val-Ala-Thr	21
ヒト型コラーゲン	Leu-Arg-Ala-Tyr ₆₁ -Leu ₆₂ -Leu-Pro-Ala	88
α ₁ 型コラーゲン	Ala-Pro-Gly-Asn ₆₁ -Ala ₆₂ -Ser-Glu-Ser	88
ヒトα ₁ 型コラーゲン	Pho-Ser-Ser-Gly ₆₁ -Ser ₆₂ -Lys-Arg-Glu	88
ウシα ₁ (IX)型コラーゲン	Ala-Gly-Gly-Ala ₆₁ -Gln ₆₂ -Met-Gly-Val	96
ウシα ₁ (IX)型コラーゲン	Gly-Met-Gly-Val ₆₁ -Met ₆₂ -Gin-Gly-Pro	96
ウシα ₁ (IX)型コラーゲン	Met-Ala-Ala-Ser-Leu-Lys-Arg-Pro	96
ウシα ₁ (IX)型コラーゲン	-Ala-Lys-Arg-Glu	96
ウシα ₁ (IX)型コラーゲン	-Leu-Arg-Lys-Pro	96
ウシα ₁ (IX)型コラーゲン	Gly-Ala-Gly-Ala-Ile-Leu-Gly-Gly	96
ヒト骨シングル	Arg-Ala-Ile-His ₆₁ -Ile ₆₂ -Gln-Ala-Glu	87
ヒト骨シングル	Leu-Val-Gly-Ala ₆₁ -Leu ₆₂ -Tyr-Leu-Val	97
ヒト骨シングル	Gly-Ala-Leu-Tyr ₆₁ -Leu ₆₂ -Val-Cys-Gly	21,97

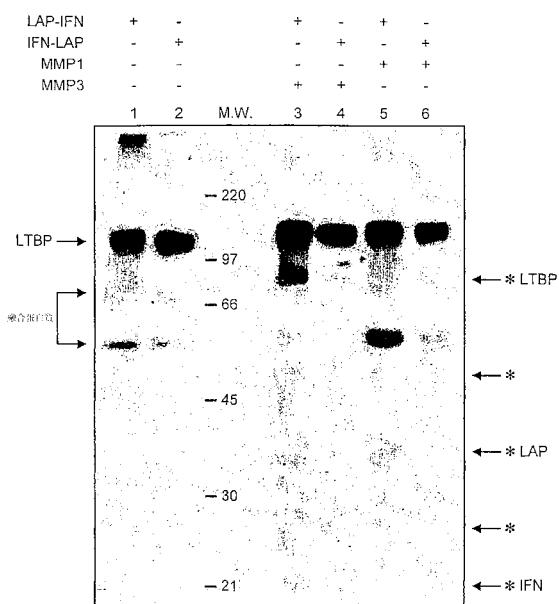
【図5】



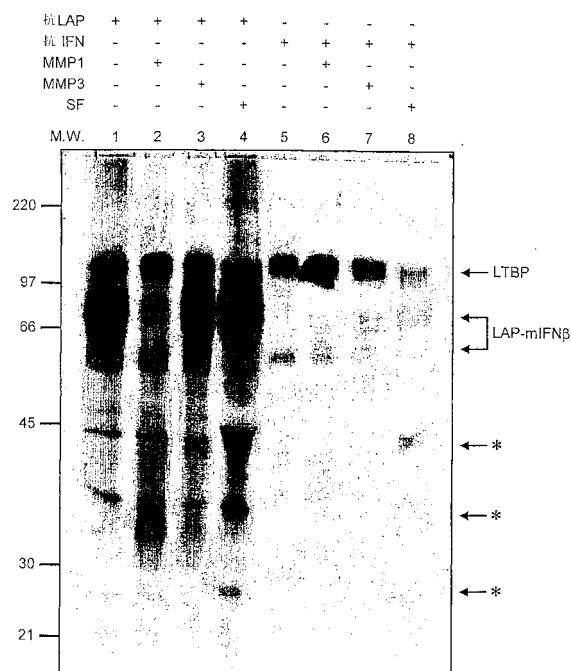
【図6】



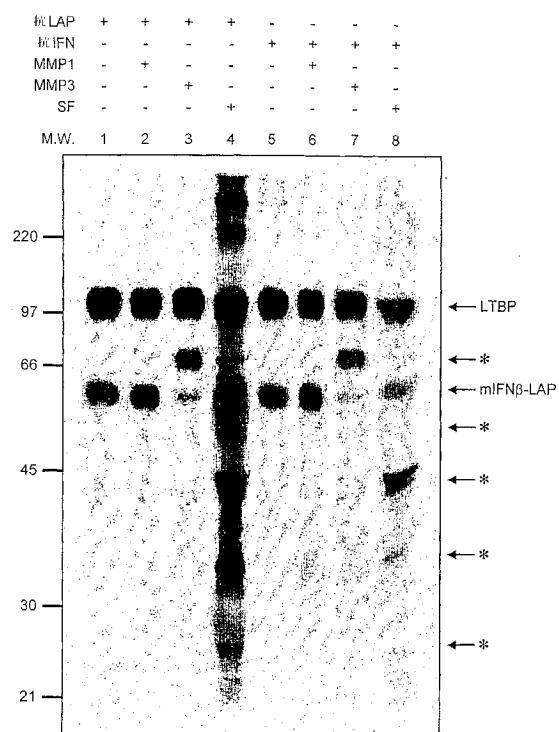
【図7】



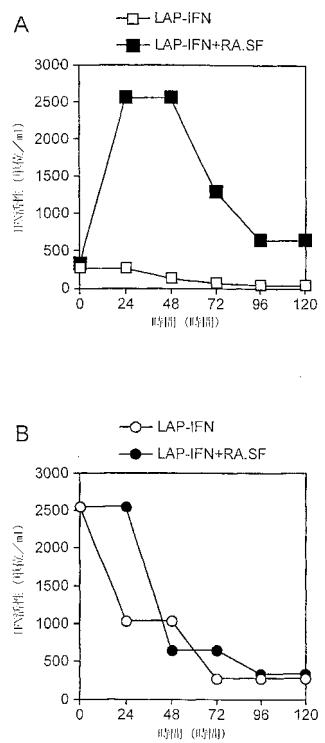
【図8 A】



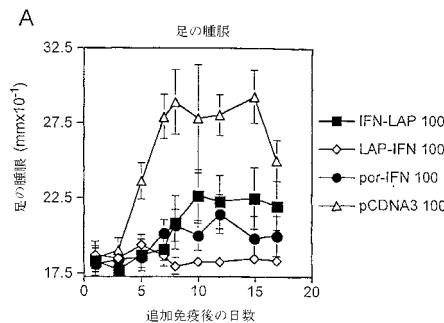
【図8 B】



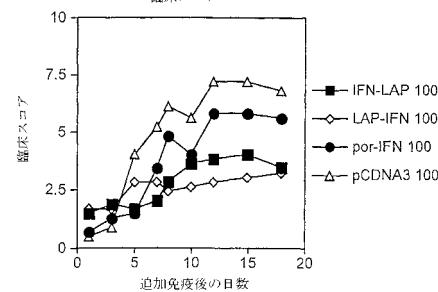
【図9】



【 図 1 0 】



B 駐床するヨウ



【図 1-1-2】

```

901   / 301          931   / 311
ACA CAC AGC ATA TAT ATG TTC AAC ACA TCA GGC CCT CGA GAA GCG GTA CCT GAA CCC
his ser ile tyr met phe phe asp thr ser glu leu arg glu ala val pro glu pro
961   / 321          991   / 331
GTG TTT CTC TCC CGG GCA GAG CCT CTC CGT CGG AGG CTC AAC TTA AAA GTG CGG CAG
val leu leu ser arg ala glu leu arg leu arg leu lys leu val glu glu glu
1021  / 341          1051  / 351
CAG GTG GAG CTC TAG CAC AAC TAC AGC AAC RAT TCC TGG CGA TAC CTC AAC ACC CGG CTG
his val glu leu tyr gln lys tyr ser asp ser ser trp arg tyr leu ser asp arg leu
1081  / 361          1111  / 371
CTG CGA CCC AGC GAC TGG TCC CGA GAG TGG TTA TCA TCT TTT GAT GTC ACC GGA GTT CGG CGG
leu ala pro ser asp ser pro glu trp leu ser phe asp val trp gly val val arg cag
1141  / 381          1171  / 391
TGG TTC AGC CGT GGA GGG GAA ATT GAG GGG TCC TTT CGC CCT TCT AGG GCC CAC TGC TCC TGT GAC
trp leu ser arg gly gly glu ile glu gly phe arg leu ser ala his cys ser cys asp
1201  / 401          1231  / 411
AGC AGG GAT AAC ACA CTG CCA CGG GAC ATC AAC GGG TTC ACT ACC GGG CGG CCC CGA GGT GAC
ser arg asp asn thr leu val smn asp ile asn gly phe val thr gly arg arg gly glu
1261  / 421          1291  / 431
CTG CGC ACC ATT CAT GGC ATG AAC CGG CCT TTC CGT CCT CTC ATG GCC ACC CGG CTG GAG
leu ala thre ile his gly met asn arg pro phe leu leu leu met ala thr pro leu glu
1321  / 441
AGG GCC CAG CAT CTC CGA AAC TGA TCT TGA
arg ala gln his leu glu ser CPA ser arg

```

【 図 1 1 - 1 】

```

DNB A列 1352b.p. ATGAAACACAGG ... CTGATCTAGACC 標記

1      /      1      31      /      11
ATG AAC AGG TGG ATC CTC CRC GCT GCG TTC CTC CTG TGC TTC TCC ACC ACA AGA GCC CTC
met asn ala arg trp ile leu his ala ala phe leu leu cys phe ser thr thr ala leu
61      /      21      91      /      31
CTC ATC AAC TAT AAG CAG CTC CAG CTC CAA GAA AGG ACC AAC ATT CGG AAA TGT CAG GAG
ser ile asp tyr lys gln leu gln leu gln glu arg thr asp ile arg lys cys gln glu
121      /      41      151      /      51
CTC CTG GAC CAG CTG ATT GGA AGG ATC AAC CTC AAC TAC AGG GGC GAC TTC AAC TGT CCT
val glu glu glu leu asp gln gly lys ile asn leu leu thr tyr arg ala phe lys ile leu
181      /      61      211      /      71
ATG GAC ATC AGC GAG AGG ATG CAG AAC AGT TAC ACT GCC TTT GCC ATC CAA GAG ATG CTC
met glu met thr glu lys met gln lys ser tyr thr ala phe ala ile gln glu met leu
241      /      81      271      /      91
CAG PAT GTC TTT CTT GTC TTC AAC AGA AAC ATC ATT TCC ATC AGC ACT GGG TGG ATT GAG ACT ATT
val asn val phe leu val phe arg asn asn phe ser ser the gly trp asn glu thr leu
301      /      101      331      /      111
GTT GTC CGT CCT CTG GAT GAA CTC CAC CAG CAC AGA GTG TTT CTG AGG ACA GTA CTR GAG
val val arg leu leu asp glu leu his gln gln thr val phe leu lys thr val leu glu
361      /      121      391      /      131
GAA RAG CAN CAG GAA AGA TTG AGC TGG GAG ATG TCC TCA ACT GCT CTC CAC TTG RAG RGC
lys gln glu glu glu arg leu the trp glu met ser ser the ala leu his leu lys ser
421      /      141      451      /      151
TAT TAC TGG AGG ATG GTG CAA AGG TAC CCT ATT AAC CTC ATT AGG TAC AAC AGC TAC GGC TGG ATG
tyr trp arg val val gln arg tyr leu lys leu met lys tyr asp ser tyr ala trp met
481      /      161      511      /      171
GTC GTC CGA GCA GAG ATC TTC AGG AAC ATT CTC ATT CGA AGA CTT ACC AGA AAC TTC
val val arg ala glu ile phe arg asn phe ileu ile ile arg arg leu thr arg asn phe
541      /      181      571      /      191
CAA AAC GAA TTT CCC GGG GAA GGC GGG TCC CCG CTC GGG CCT TTT TGG GGC GGA GGG GGC TCA CGG
glu asn glu phe glu gly gln gly ser leu pro leu phe leu trp ala gly gly gln ser ala
601      /      201      631      /      211
GCC GCA CTA TCC ACC TGC AAC ACT ATC GAC ATT GAG CTG GTG PAT CTT AAG CGC ATC GAG
ala ala leu ser thr cys lys thr ile asp met glu leu val lys arg lys arg ile glu
661      /      221      691      /      231
GCC ATC CGG CGC CAG ATC CTG FCC AAC CTG CGG CCT CCC AGC AAC GAG GGG GAG
ala ile arg gly gln gln ile leu ser leu arg leu ala ser pro pro ser gln arg gln
721      /      241      751      /      251
GGG CGC CCC GGC CGG CCT CCC GAG GCC GTG CCT GGC CCT TAC AAC AGC ACC CGC GAC CGG
val pro pro gly pro leu pro glu ala val leu ala leu tyr asn ser thr arg asp arg
781      /      261      811      /      271
CTG GCC CGG GAG ACT GCA GAA CGG CGG CCC GAG CCT GAG GCC GAC TAC TAC GGC ARG GAG
val ala gly gln ser ala glu pro glu pro glu pro glu asp tyr tyr ala lys glu
841      /      281      871      /      291
GGC ACC CGG CGG GTG CTA ATG GTG GAA ACC AAC AAC GAA ATC TAT GAC AAG TTC AAC GAG AGT
val the arg val leu met val glu his asn glu ile tyr asp arg gln ser phe gln ser

```

【 図 1 2 - 1 】

```

DNA NAME      1391p.p.   ATGCCGGCCCTCC ... CTGTATCTAGGCC  p(130)
1   ATG CGG CCC TCC GGG CTG CGG CTG CTG CGG CTG CTG CTA CGG CTG CTG TGG CTA CTG GTG
met pro pro ser gly leu arg leu leu pro leu leu leu pro leu leu trp leu leu val
61   / 21
CTG ACG CCT GGG CGC CGG CCC GGG GGA CTA TCC ACC TGG AGC ACT ATC GAC ATG AGG CGG
leu the pro gly pro pro ala ala leu ser thr cys lys the ile asp met gly leu
121  / 41
TGG AGG CCG AAG CGC ATC GAG CCC ATC CGC GGC CAG ATC CTG TCC AAG CTG CGG CTC GCG
val lys arg lys arg ile glu ala ile arg gly glu ile leu ser lys leu arg leu ala
181  / 61
AGC CCC CGG AGC CAG GGG GAG GTG CGG CCC GGC CCG CCG GGC GAG GGC GTG CTC GGC CGT
pro pro ser pro glu val pro gly pro gly pro pro glu ala val leu ala
241  / 81
TAC AAC AGC ACC CGC GGC CGG GTG GCC GGG GAG ATG GCA GAA CGG GAG CCC GAG CCT GNG
tyr ass ser thr arg asp arg val ala gly glu ser ala glu pro glu pro glu
301  / 101
GCC GAC TAC TAT GGC AAG ARG GGC GTG ACC CGC GTG CTA ATG GTG GAA ACC CAC ABC GAA ATC
ala asp tyr tyr ala lys glu val thr arg val leu met val glu thr his asn glu
361  / 121
TAC GAC MAG TTC AAC CAG AGC AGT RCR CRC AAC TAT TGT ATC TTC AAC RCR TCA GAG CGC
tyr ass lys phe lys gin ser thr his ser ile tyr met phe asp ass thr ser glu leu
421  / 141
CGA GAA GGG GTT CCT GAA CCC GTG TTG CTC TCC CGG CCA GAG CTG CGT CTG CTG AGG
arg glu ala val pro glu pro val leu leu ser arg ala glu leu arg leu leu arg
481  / 161
CTG AAC TTA AAA GTG GAG CAG CAC GTG CGC TGT CAG AAC TAC AGC AAC ATT TCC TGG
leu lys leu lys val glu gin his val glu leu tyz gin lys tyr ser ass ass ser
541  / 181
CGA TAC CTC AGC AAC CGG CTG CTG GCA CCC AGC GGC TCG TTA CCA GAG TGG TTA TCT TTT
arg tyr leu ser ass arg leu leu ala pro ser ass ser pro glu trp leu ser phe asp
601  / 201
GTC ACC GGA TTT GTG CGG CAG TGG TTG AGC CGT GGA GGG GAA ATT TAC GAG GGC TTT CGC CTT
val the gly val val arg gin trp leu ser arg gly gly glu ile glu gly phr arg
661  / 221
AGC GGC CAC TGC TCC TGT GAC AGC AGG GAT AAC ACA CTC CAA GTG GAC ATC AAC GGG TTC
ser ass ala his cys ser cys ass ser arg asp ass thr leu gin val asp ile ass gly
721  / 241
ACT ACC GGC CGC CCA GGT GAC CTG CGC GGG ACC ATT CAT GGC ATC AAC CGG CCT TGT CTG
the thr gly arg arg gly ass gly leu ala ala thr ile his gly met ass arg arg pro phe leu
781  / 261
CTG ATC GGC ACC CGG CTG CGT GAG AGG GCC CAG CAT CTG CAA AGC GAA TTC GGG GGA GGC GGA
leu met ala the thr pro leu glu arg ala gin his leu gin ser glu phe gly gly gly
841  / 281
TTC CGG CTC GGG CCT TGT CGG GGA GGG GCA GGC TCA GGC GGC CAA GCA ATG AGC TAC AAC TGG CTG
ser pro pro leu gly leu trp ala gly gly gly GCA GGC CAA GCA ATG AGC TAC AAC TGG CTG
871  / 291

```

【図12-2】

```

901 / 301 931 / 311
GGA TTC CTA CAA AGA AGC AGC AAT TTT CAG TGT CAG AAG CTC CTC TGG CAA TTG AAT GGG
gly phe leu gln arg ser ser asn phe gln cys gln lys leu leu trp gln leu asn gln
961 / 321 991 / 331
AGG CTT GAA TAT TGC CTC CAG GAC AGG ATG AAC TTT GAC ATC CCT GAG GAG ATT AAG CAG
arg leu glu tyr cys leu lys asp arg met asn phe asp ile pro glu glu ile lys gln
1021 / 341 1051 / 351
CTG CAG CGG TTC CAG PAG GAG GAC GCC GCA TTG ACC ATC TAT GAG ATG CTC CAG AAC ATC
leu gln gln phe gln lys glu asp ala ala leu thr ile tyr glu met leu gln asn ile
1081 / 361 1111 / 371
TTT GCT ATT TTC AGA CAA CAT TCA TCT AGC ACT GGC TGG AAT GAG ACT ATT GTT GAG AAC
phe ala ile phe arg gln asp ser ser ser thr gln trp asn glu thr ile val glu asn
1141 / 381 1171 / 391
CTC CTG GCT AAT GTC TAT CAT CAG ATA AAC CAT CTG AAG ACA GTC CTG GAA GAA AAA CTG
leu leu ala asn val tyr his gln ile asn his leu lys thr val leu glu glu lys leu
1201 / 401 1231 / 411
GAG AAA GAA GAT TTT ACC AGG GGA AAA CTC ATG AGC AGT CTG CAC CTG AAA AGA TAT TAT
glu lys glu asp phe thr arg gln lys leu met ser ser leu his leu lys arg lys leu
1261 / 421 1291 / 431
GGG AGG ATT CTG CAT TAC CTG AAG GCC AAG GAG TAC AGT CAC TGT GCC TGG ACC ATA GTC
gly arg ile leu his tyr leu lys ala lys glu tyr ser his cys ala trp thr ile val
1321 / 441 1351 / 451
AGA GTG GAA ATC CTA AGG AAC TTT TAC ATT AAC AGA CTT ACA GGT TAC CTC CGA AAC
arg val glu ile leu arg asn phe tyr phe ile asn arg leu thr gly tyr leu arg asn
1381 / 461
TGA TCT AGA
OPA ser arg

```

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
A 6 1 K 38/21 (2006.01)	A 6 1 K 37/66 H
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C

(72)発明者 ドレジャ ハンナ スティナ
 英国 ロンドン チャーター・ハウス スクウェア デイシン アンド デンティストリー セイン
 ト パーソロミューズ アンド ザ ロイヤル ロンドン スクール オブ ミー ボーン アン
 ド ジョイント リサーチ ユニット

(72)発明者 アダムス ジリアン
 英国 ロンドン チャーター・ハウス スクウェア デイシン アンド デンティストリー セイン
 ト パーソロミューズ アンド ザ ロイヤル ロンドン スクール オブ ミー ボーン アン
 ド ジョイント リサーチ ユニット

審査官 中村 正展

(56)参考文献 米国特許第06080575(US, A)
 国際公開第98/049311(WO, A1)
 国際公開第97/012048(WO, A1)
 国際公開第00/020449(WO, A1)
 国際公開第02/022883(WO, A1)
 Genes Dev., 2000年, vol. 14, 163-176
 Human Gene Therapy, 1997年, vol. 8, 729-738

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90
 C12N 1/00- 1/38
 C12N 5/00- 5/10
 C12P 21/02
 C07K 19/00
 A61K 38/00
 A61K 38/21
 WPIDS(STN)
 MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 CA/CONFSCI/SCISEARCH(STN)
 JSTPlus(JDreamII)
 JMEDPlus(JDreamII)