

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4361730号
(P4361730)

(45) 発行日 平成21年11月11日(2009.11.11)

(24) 登録日 平成21年8月21日(2009.8.21)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
C O 7 K 14/745 (2006.01)	C O 7 K 14/745

請求項の数 27 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2002-532615 (P2002-532615)	(73) 特許権者	501497563
(86) (22) 出願日	平成13年10月2日 (2001.10.2)		ノボ ノルディスク ヘルス ケア アク
(65) 公表番号	特表2004-510436 (P2004-510436A)		チェンゲゼルシャフト
(43) 公表日	平成16年4月8日 (2004.4.8)		スイス国, ツェーハー ー 8 0 5 0 チュー
(86) 国際出願番号	PCT/DK2001/000635		リッヒ, アンドレアシュトラーセ 1 5
(87) 国際公開番号	W02002/029045	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成14年4月11日 (2002.4.11)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成16年9月8日 (2004.9.8)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	PA 2000 01456		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成12年10月2日 (2000.10.2)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		弁理士 福本 積
(31) 優先権主張番号	60/238, 944	(74) 代理人	100087413
(32) 優先日	平成12年10月10日 (2000.10.10)		弁理士 古賀 哲次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100108110
			弁理士 日野 あけみ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビタミンK-依存性タンパク質の生成方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第1発現単位における第1プロペプチド及びビタミンK-依存性タンパク質をコードする第1ポリヌクレオチドによりトランスフェクトされ、そして第2発現単位における第2遊離プロペプチドをコードする第2ポリヌクレオチドによりトランスフェクトされた真核宿主細胞であって、前記第1プロペプチド及び第2プロペプチドがそれぞれ、配列番号：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17及び18から成る群から独立に選択されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする宿主細胞。

【請求項 2】

前記第1ポリヌクレオチドが、プロトロンビン、第IX因子、FVII、第X因子、プロテインC、プロテインS、オステオカルシン、プロリンに富んでいるGlaタンパク質1、又はマトリックスGlaタンパク質から独立して選択されたビタミンK-依存性タンパク質をコードする請求項1に記載の真核宿主細胞。

【請求項 3】

前記ビタミンK-依存性タンパク質がFVII又はその変異体である、請求項1又は2に記載の真核宿主細胞。

【請求項 4】

前記宿主細胞が、発現単位におけるγ-グルタミルカルボキシラーゼをコードする追加のポリヌクレオチドによりトランスフェクトされる請求項1～3のいずれか1項記載の真核宿主細胞。

10

20

【請求項 5】

前記宿主細胞が哺乳類細胞である請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の真核宿主細胞。

【請求項 6】

前記哺乳類細胞がヒト細胞である請求項 5 記載の真核宿主細胞。

【請求項 7】

前記哺乳類細胞が、BHK細胞、HEK細胞、COS細胞又はCHO細胞から独立して選択される請求項 5 記載の真核宿主細胞。

【請求項 8】

前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドがDNAである請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の真核宿主細胞。

【請求項 9】

前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドがRNAである請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の真核宿主細胞。

【請求項 10】

ビタミンK - 依存性タンパク質の生成方法であって、

a) 同時トランスフェクトされた真核宿主細胞を生成するために、第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及びビタミンK - 依存性タンパク質をコードする第 1 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション、及び第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション；

b) 前記第 1 ポリヌクレオチド及び第 2 ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下での前記同時トランスフェクトされた真核宿主細胞の適切な培養培地における培養；及び

c) 前記培地からのビタミンK - 依存性タンパク質の単離、
を含んで成る方法において、前記第 1 プロペプチド及び第 2 プロペプチドがそれぞれ、配列番号：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17及び18から成る群から独立に選択されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする方法。

【請求項 11】

前記第 1 ポリヌクレオチドが、第 1 プロペプチド、及びプロトロンビン、第IX因子、FVII、第X因子、プロテインC、プロテインS、オステオカルシン、プロリンに富んでいるGlaタンパク質 1、又はマトリックスGlaタンパク質から独立して選択されたビタミンK - 依存性タンパク質をコードする請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記ビタミンK - 依存性タンパク質がFVII又はその変異体である、請求項10又は11に記載の方法。

【請求項 13】

前記第 1 発現単位が第 1 ベクター上に存在し、そして前記第 2 発現単位が第 2 の別のベクター上に存在する請求項10 ~ 12のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 14】

前記第 1 発現単位及び第 2 発現単位が、同じベクター上に存在する請求項10 ~ 12のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 15】

前記培養培地が血清フリー培地である請求項10 ~ 14のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 16】

前記宿主細胞が哺乳類細胞である請求項10 ~ 15のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 17】

前記哺乳類細胞がヒト細胞である請求項16記載の方法。

【請求項 18】

前記哺乳類細胞が、BHK細胞、HEK細胞、COS細胞又はCHO細胞から独立して選択される請求項16記載の方法。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドが DNA である請求項 10 ~ 18 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 20】

前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドが RNA である請求項 10 ~ 18 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 21】

第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及びビタミン K - 依存性タンパク質をコードする第 1 ポリヌクレオチド、及び第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクターにおいて、前記第 1 プロペプチド及び第 2 プロペプチドがそれぞれ、配列番号：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 及び 18 から成る群から独立に選択されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする組換えベクター。

10

【請求項 22】

前記第 1 ポリヌクレオチドが、第 1 プロペプチド、及びプロトロンビン、第 IX 因子、FVII、第 X 因子、プロテイン C、プロテイン S、オステオカルシン、プロリンに富んでいる Gla タンパク質 1、又はマトリックス Gla タンパク質から独立して選択されたビタミン K - 依存性タンパク質をコードする請求項 21 記載の組換えベクター。

【請求項 23】

前記ビタミン K - 依存性タンパク質が FVII 又はその変異体である、請求項 21 又は 22 に記載の組換えベクター。

20

【請求項 24】

前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドが DNA である請求項 21 ~ 23 のいずれか 1 項記載の組換えベクター。

【請求項 25】

前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドが RNA である請求項 21 ~ 23 のいずれか 1 項記載の組換えベクター。

【請求項 26】

FVII 又はその類似体の生成方法であって、

a) 第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及び FVII 又はその変異体をコードする第 1 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション、及び

30

b) 第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション、

を含んで成る方法において、前記第 1 プロペプチド及び第 2 プロペプチドがそれぞれ、配列番号：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 及び 18 から成る群から独立に選択されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする方法。

【請求項 27】

前記宿主細胞がさらに、 γ - グルタミルカルボキシラーゼをコードするポリヌクレオチドよりトランスフェクトされる請求項 26 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

40

発明の分野：

本発明は、ビタミン K - 依存性タンパク質及び特に凝固第 VII 因子 (FVII) の新規調製方法に関する。さらに、本発明は、ビタミン K - 依存性タンパク質のこの改良された方法に使用される、新規の同時トランスフェクトされた真核細胞及び組換えベクターに関する。

【0002】

発明の背景：

ビタミン K - 依存性タンパク質の生合成は、成熟の機能的タンパク質が得られる前、いくつかの後翻訳プロセッシング段階を包含する。

ビタミン K は、それらのビタミン K - 依存性タンパク質、例えば前凝固因子 トロンビン、第 VII、IX 及び X 因子；抗凝固剤 プロテイン C 及び プロテイン S；及び他のタンパク質、例えば

50

オステオカルシン（骨Glaタンパク質）、マトリックスGlaタンパク質及びプロリンに富んでいるGlaタンパク質1におけるグルタミン酸残基の γ -カルボキシル化のための必要な補因子である。このカルボキシル化は、それがリン脂質へのカルシウム結合及び前凝固剤及び抗凝固剤の結合を可能にするので、正常な止血のために必要とされる。

【0003】

γ -グルタミルカルボキシラーゼは、粗面小胞体に位置する膜内在性ミクロソーム酵素である。それは、ビタミンK-依存性タンパク質のGlaドメインに位置するグルタミン酸基をカルボキシル化する。ヒト γ -グルタミルカルボキシラーゼcDNAが最近、単離され、そして配列決定されている（Wu S.M. など. Science 254: 1634, 1991）。BHK及びCHO細胞におけるビタミンK-依存性タンパク質の生合成の研究は、カルボキシラーゼが小胞体（ER）及びゴルジ体の両者に存在し、そしてカルボキシラーゼ認識部位を含むプロペプチドが、 γ -カルボキシル化の完結の後、切断されることを示す。

10

【0004】

プロペプチドがカルボキシラーゼ活性を刺激することができことが推測される（Siglura, I. など. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 9, 9069-9074; Knobloch and Suttle (1987) J. Biol. Chem. 262, 19334-15337; Fuie など. (1999) Blood, 93. 1794-1808）。

【0005】

血液凝固は、最終的にフィブリン凝塊を生ぜしめる、種々の血液成分又は因子の複雑な相互作用から成る工程である。一般的に、凝固“カスケード”として言及されて来た工程に関係する血液成分は、プロ酵素又はチモーゲン、すなわちそれ自体、活性化された凝固因子である活性化因子の作用によりタンパク質加水分解酵素に転換される酵素的に不活性のタンパク質である。そのような転換を受け、そして一般的に、“活性因子”として言及される凝固因子は、“a”接尾語の付加により例示される（例えば、活性化された第VII因子（FVIIa））。

20

【0006】

活性化された第X因子（FXa）は、プロトロンピンをトロンピンに転換するために必要とされ、次にこれは、フィブリン凝塊を形成する最終段階としてフィブリノーゲンをフィブリンに転換する。FXの活性化を促進する2種のシステム又は経路が存在する。“固有の経路”とは、血漿にのみ存在する因子の利用を通してトロンピン形成を導くそれらの反応を言及する。一連のプロテアーゼ介在性活性化は究極的には、第VIIIa因子と共に、FXをFXaに分解する第IXa因子を生成する。

30

【0007】

類似するタンパク質加水分解は、血漿凝固の“外因性経路”において、FVIIa及びその補因子、すなわち組織因子によりもたらされる。組織因子は、膜結合されたタンパク質であり、そして通常、血漿においては循環しない。しかしながら、血管の破壊に基づいて、それは、 Ca^{2+} 及びリン脂質の存在下で、FX活性化又は第IX因子活性化を触媒するために、FVIIaと複合体化することができる。止血における2種の凝固経路の相対的重要性は不明であるが、最近、FVII及び組織因子が、血液凝固の調節において中枢的役割を演じることが見出された。

【0008】

40

FVIIは、一本鎖チモーゲンとして血液において循環する微量血漿糖タンパク質である。チモーゲンはクロット不活性である。一本鎖FVIIは、インピトロで、FXa、第XIIa因子、第IXa因子又はトロンピンにより二本鎖FVIIaに転換される。FXaは、FVIIの主要生理学的活性化因子であると思われる。止血に包含されるいくつかの他の血漿タンパク質のように、FVIIは、タンパク質のアミノ末端における10個のグルタミン酸残基の γ -カルボキシル化のために必要とされる、その生合成のためのビタミンKに依存する。FVIIの細胞内後-翻訳プロセッシングは、小胞体（ER）及びゴルジ体において起こる。ビタミンK-依存性 γ -カルボキシル化の他に、FVIIは、N-末端プロペプチドを除くために制限されたタンパク質加水分解、及びアスパラギン-145及び-322、及びセリン-52及び-60のグリコシル化にゆだねられる（図1）。

50

【0009】

γ -カルボキシル化されたグルタミン酸 (Gla) 残基は、リン脂質とのFVIIの金属-結合された相互作用のために必要とされる。

組織因子、リン脂質及びカルシウムイオンの存在下で、二本鎖FVIIaは、制限されたタンパク質加水分解により急速にFX又は第IX因子を活性化する。

プロテインCは、セリンプロテアーゼ、及び凝固カスケードにおいて第Va因子及びVIIaを不活性化することにより止血の調節において役割を演じる天然に存在する抗凝固剤である。ヒトプロテインCは、461個のタンパク質の一本鎖ポリペプチドとして主に肝臓においてインビボで製造される。この一本鎖前駆体分子は、9個のグルタミン酸残基のカルボキシル化を包含する複数の後-翻訳修飾を受ける。

10

【0010】

プロテインSまた、インビトロクロットアッセイにおいて抗凝固活性を示す。プロテインSは、活性化されたプロテインCについての抗凝固相補因子活性を示す。プロテインSはまた、それが活性化されるプロテインCを有さないアッセイにおいてプロトロンピナーゼ活性を示すことができ、そして第Va因子又はXa因子に結合し、そして活性化されたプロテインCを伴わないで抗凝固剤として機能するので、活性化されたプロテインCの不在下で抗凝固剤であることが示されている。プロテインSは、その遺伝性又は獲得された欠損が静脈及び動脈血栓症に関連するので、生理学的に非常に重要な抗血栓因子である。正常レベルの合計プロテインSに関する遊離プロテインSの欠失が、血栓疾病を有する何人かの患者において記載されている。

20

【0011】

患者における凝固カスケードを選択的に阻止することがしばしば必要である。抗凝固剤、例えばプロテインC又はプロテインSは、例えば、腎臓透析の間、又は深静脈血栓、散在性血管内凝固 (DIC)、急性血栓症のために危険な患者、プロテインS欠失、敗血症、炎症、癌、手術を受ける患者及び他の医学的障害の宿主を処理するために使用され得る。

【0012】

オステオカルシンは、3個のGla残基を包含する、49個のアミノ酸残基から構成される。このタンパク質の機能は、過剰のミネラルイゼーションを抑制すると思われる。オステオカルシンは、骨芽細胞により分泌される骨-特異的タンパク質である。新しく合成されるオステオカルシンの画分は、血流に開放され、ここでその濃度は骨芽細胞活性率及び骨形成速度と相互関係する。ヒトにおいては、循環するオステオカルシンレベルの変化は、代謝性骨疾患、例えばオステオポロシス及び上皮小体亢進症に関連している。

30

【0013】

マトリックスGlaタンパク質 (MGP) は、5個のGla残基を包含する、79個のアミノ酸から構成される。このタンパク質は通常、鉱物質除去されたマトリックスにおいて見出され、そして骨形成の開始において一定の機能を有すると思われる。

組換えビタミンK-依存性タンパク質及び特定の組換え凝固因子の生成のための改良されたシステムの必要性がまだ当業界において存在する。本発明は、組換えビタミンK-依存性タンパク質、特にFVIIのより効果的でより早い生成及び/又はその高い収率を付与する方法を提供することによって、この必要性を満たす。

40

【0014】

発明の記載：

本発明は、ビタミンK-依存性タンパク質及び特に凝固因子VII (FVII) の新規調製方法に関する。

ビタミンK-依存性タンパク質のグルタミン酸残基のN-末端プロセッシング段階及び特に γ -カルボキシル化は、本発明者によりFVIIに関して例示されるように、それらのタンパク質の生合成における制限段階であることが示されている。 γ -カルボキシル化を高めるための方法は、組換えビタミンK-依存性タンパク質の発現を高めることが示されている。

【0015】

50

ビタミンK - 依存性タンパク質のプロペプチドは、カルボキシレートに結合するために必須であり、そしてそれは、後に成熟タンパク質のN - 末端になるであろう、カルボキシル化されるGlu残基のために、ビタミンK - 依存性タンパク質に共有結合されるべきである。本発明者は、遊離プロペプチドが、その遊離プロペプチドの濃度が高まる場合、 γ - カルボキシル化工程の活性をまた高めるような態様で、アロステリズム調節分子として機能することを仮定する。

【0016】

遊離プロペプチドの濃度の直接的な上昇は、遊離プロペプチド自体の同時発現により得られる。これは、突然変異誘発及び切断を伴って又はそれらを伴わないで、1又は複数のコピーで、遊離プロペプチドをコードするポリヌクレオチドによるトランスフェクションにより行われ得、そしてビタミンK - 依存性タンパク質をコードするポリヌクレオチドと共にこれを同時発現することができる。後者は、ビタミンK - 依存性タンパク質により通常結合される配列以外のもう1つのプロペプチド配列を含む。

10

【0017】

ビタミンK - 依存性タンパク質をコードするポリヌクレオチドの発現は、興味ある遺伝子を細胞中にトランスフェクトすることにより、又は細胞において通常、発現されないか、又は得られるような細胞において、生理学的に有意なレベルで発現されない、脊椎動物起源の一次、二次、又は不滅化された細胞にすでに存在するビタミンK - 依存性タンパク質をコードする内因性遺伝子を活性化することにより得られる。

【0018】

20

興味ある遺伝子の活性化に関しては、相同組換えが、その対応するトランスフェクトされていない細胞において明らかなレベルよりも高いレベルでの遺伝子の発現を引き起こすか、又はその対応するトランスフェクトされていない細胞において明らかなパターンとは異なる調節又は誘発のパターンの表示を引き起こす調節配列による得られるような細胞における遺伝子と通常関連する調節領域を置換するか又はその領域を無能にするために使用され得る。

【0019】

第1の観点においては、本発明は、第1発現単位における第1プロペプチド及びFVII又はその変異体をコードする第1ポリヌクレオチドを発現し、そして第2発現単位における第2遊離プロペプチドをコードする第2ポリヌクレオチドを発現する真核宿主細胞に関する。前記第1ポリヌクレオチドは第1発現単位に位置し、そして第2ポリヌクレオチドは第2発現単位に位置し、ここで前記第1及び第2単位は異なることが理解されるべきである。

30

【0020】

第2の観点においては、本発明は、第1発現単位における第1プロペプチド及びFVII又はその変異体をコードする第1ポリヌクレオチドによりトランスフェクトされ、そして第2発現単位における第2遊離プロペプチドをコードする第2ポリヌクレオチドによりトランスフェクトされた真核宿主細胞に関する。前記第1ポリヌクレオチドは第1発現単位に位置し、そして第2ポリヌクレオチドが第2発現単位に位置し、ここで前記第1及び第2発現単位は異なることが理解されるべきである。トランスフェクションの実際の順序はもちろん、通常通りであり、そして従って、宿主細胞は、第1、次に第2ポリヌクレオチドによりトランスフェクトされ得るか又は逆もまた真である。用語“第1プロペプチド”及び“第2プロペプチド”の使用は、単なる便利さからであり、従って第1及び第2プロペプチドは同じであっても又は異なっても良い。

40

【0021】

用語“真核宿主細胞”とは、本明細書において使用される場合、異種DNAが発現され得るハイブリッド細胞を包含するいずれかの細胞を表す。典型的な宿主細胞は、昆虫細胞、酵母細胞、哺乳類細胞、例えばヒト細胞、例えばBHK、CHO、HEK及びCOS細胞を包含するが、但しそれらだけに限定されない。本発明の実施においては、培養される宿主細胞は好ましくは、哺乳類細胞、より好ましくは確立された哺乳類細胞系、例えばCHO（例えば、ATC

50

C CCL61)、COS - 1 (例えば、ATCC CRL 1650)、子供ハムスター腎臓 (BHK) 及びHEK293 (例えば、ATCC CRL1503; Grahamなど., J. Gen. Virol. 36: 59-72, 1977) 細胞系であるが、但しそれらだけには限定されない。

【0022】

好ましいBHK細胞系は、tk-ts13BHK細胞系 (Waechter and Baserga, proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1106-1110, 1982) であり、この後、BHK570細胞として言及される。BHK570細胞系は、ATCC受託番号CRL10314号として、American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852から入手できる。tk-ts13BHK細胞系はまた、受託番号CRL1632としてATCCから入手できる。

【0023】

他の適切な細胞系は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない: Rat HepI (ラット肝癌; ATCC CRL 1600)、Rat HepII (ラット肺癌; ATCC CRL 1548)、TCMK (ATCC CCL 139)、ヒト肺 (ATCC HB8065)、NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1) 及びDUKX細胞 (Uriaub and Chusin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA77: 4216-4220, 1980)。3T3細胞、Namalwa細胞、メラノーマ、及び他の細胞とのメラノーマの融合体がまた有用である。

【0024】

用語“ポリヌクレオチド”とは、5'末端から3'末端に読み取られるデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド塩基の一本鎖又は二本鎖ポリマーである。ポリヌクレオチドは、RNA及びDNAを包含し、そして天然源から単離され、インビトロで合成され、又は天然及び合成分子の組み合わせから調製され得る。ポリヌクレオチドの長さは、ヌクレオチド (略語“nt”)、又は塩基対(略語“bp”)として表される。

【0025】

用語“ヌクレオチド”は、一本鎖又は二本鎖分子について使用される。この用語が二本鎖分子に適用される場合、それは全体の長さを示すために使用され、そして用語、“塩基対”に等しいことが理解されるであろう。二本鎖ポリヌクレオチドの二本の鎖は長さにおいてわずかに異なり、そしてその末端が酵素分解の結果として異なることは、当業者により理解されており; 従って、二本鎖ポリヌクレオチド分子内のすべてのヌクレオチドは一對に成り得ない。そのような不對末端は一般的に20ntの長さを越えない。

【0026】

用語“プロペプチド”とは、本明細書において使用される場合、 γ -グルタミルカルボキシラーゼを結合できるいずれかのアミノ酸配列を表す。ビタミンK-依存性タンパク質の γ -カルボキシル化を指図する典型的なプロペプチドは、ビタミンK-依存性タンパク質のN-末端で見出され、そしてビタミンK-依存性タンパク質のGlaドメインに通常位置するグルタミン酸残基をカルボキシル化する、 γ -グルタミルカルボキシラーゼとの相互作用のための結合部位又は認識配列として作用する。

【0027】

1つのプロペプチドにおいて、 γ -グルタミルカルボキシラーゼのための1つよりも多くの部位、すなわち γ -グルタミルカルボキシラーゼ認識配列が存在する。従って、この定義内のプロペプチドの1つの例は、FVIIの天然のプロペプチド配列である。この定義内のもう1つの例は、同じアミノ酸配列内の第IX因子の天然のプロペプチド配列に結合されるFVIIの天然のプロペプチド配列である。

【0028】

用語“遊離プロペプチド”とは、本明細書において使用される場合、 γ -カルボキシル化されるべきビタミンK-依存性タンパク質に結合されていないプロペプチドを意味する。従って、遊離プロペプチドの例は、FVIIのアミノ酸配列に結合されていないFVIIのプロペプチドである。

【0029】

用語“第VII因子”又は“FII”とは、本明細書において使用される場合、活性化されていない形から成る生成物(第VII因子)を意味する。用語“第VIIa因子”又は“FVIIa”とは、本明細書において使用される場合、活性化された形から成る生成物(第VIIa因子)を意

10

20

30

40

50

味する。これは、天然のヒト第VII又は第VIIa因子のアミノ酸配列1～406を有するタンパク質を包含する。それはまた、わずかに修飾されたアミノ酸配列、例えばそれらのタンパク質がFVIIaの活性を実質的に保持する限り、N-末端アミノ酸欠失又は付加を包含する修飾されたN-末端を有するタンパク質を包含する。上記定義内の“FVII”又は“FVIIa”はまた、1つの個体からもう1つの個体で存在し、そして生じることができる天然の対立遺伝子変異を包含する。また、グルコシル化又は他の後翻訳修飾の程度及び位置は、選択された宿主細胞及び宿主細胞環境の性質に依存して変化できる。

【0030】

用語“変異体”とは、本明細書において使用される場合、FVIIの企画を意図し、ここで親タンパク質の1又は複数のアミノ酸残基がもう1つのアミノ酸残基により置換されており、そして/又は親タンパク質の1又は複数のアミノ酸残基が欠失されており、そして/又は1又は複数のアミノ酸残基が親タンパク質に付加されている。そのような付加は、親タンパク質のN-末端又はC-末端、又は両方で起こることができる。

10

【0031】

用語“発現単位”とは、本明細書において使用される場合、次の操作可能的に連結された要素を含んで成るポリヌクレオチドを意味する：(a)転写プロモーター；(b)アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列；及び(c)転写ターミネーター。従って、発現単位の例は、次の連結された要素を含んで成るDNAベクターである：(a)転写プロモーター；(b)遊離プロペプチドをコードするcDNA配列；及び(c)転写ターミネーター。

20

【0032】

用語“ベクター”とは、本明細書において使用される場合、宿主細胞において増幅できるいずれかの核酸実在物を意味する。従って、ベクターは自律的に複製するベクター、すなわち染色体外実在物として存在し、その複製が染色体複製とは関係ないベクター、例えばプラスミドであり得る。他方では、ベクターは、宿主細胞中に導入される場合、宿主細胞ゲノム中に組み込まれ、そしてそれが組み込まれている染色体と共に複製されるベクターである。ベクターの選択はしばしば、それが導入されるべき宿主細胞に依存するであろう。ベクターは、プラスミドベクター、ファージベクター、ウィルス又はコスミドベクターを包含するが、但しそれらだけには限定されない。ベクターは通常、複製の起点、及び少なくとも1つの選択遺伝子、すなわち容易に検出できるか、又はその存在が細胞増殖のために必須である生成物をコードする遺伝子を含む。

30

【0033】

用語“プロモーター”とは、RNAポリメラーゼの結合、及び転写の開始を提供するDNA配列を含む遺伝子の一部を示す。プロモーター配列は通常、遺伝子の5'非コード領域に見出されるが、しかし必ずしもそうでない。

第3の観点においては、本発明は、第1発現単位における第1プロペプチド及びビタミンK-依存性タンパク質をコードする第1ポリヌクレオチドを発現し、そして第2発現単位における第2遊離プロペプチドをコードする第2ポリヌクレオチドを発現する真核宿主細胞に関する。

【0034】

さらなる観点においては、本発明は、第1発現単位における第1プロペプチド及びビタミンK-依存性タンパク質をコードする第1ポリヌクレオチドによりトランスフェクトされ、そして第2発現単位における第2遊離プロペプチドをコードする第2ポリヌクレオチドによりトランスフェクトされた真核宿主細胞を提供する。

40

【0035】

用語“ビタミンK-依存性タンパク質”とは、本明細書において使用される場合、グルタミン酸残基上でγ-カルボキシル化されるいずれかのタンパク質を意味する。典型的なビタミンK-依存性タンパク質は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：プロ凝固因子トロンビン、第VII、IX及びX因子；抗凝固剤プロテインC及びプロテインS；及び他のタンパク質、例えばオステオカルシン（骨Glaタンパク質）、マトリックス

50

Glaタンパク質、及びプロリンに富んでいるGlaタンパク質 1。

【 0 0 3 6 】

さらなる観点においては、本発明は、a) 同時トランスフェクトされた真核宿主細胞を生成するために、第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及びFVII又はその変異体をコードする第 1 ポリヌクレオチドの真核宿主細胞における発現、及び第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドの真核宿主細胞における発現；b) 前記第 1 ポリヌクレオチド及び第 2 ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下での前記同時トランスフェクトされた真核宿主細胞の適切な培養培地における培養を含んで成る、FVII又はその変異体の生成方法に関する。

【 0 0 3 7 】

さらなる観点においては、本発明は、a) 同時トランスフェクトされた真核宿主細胞を生成するために、第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及びFVII又はその変異体をコードする第 1 ポリヌクレオチドの真核宿主細胞における発現、及び第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドの真核宿主細胞における発現；b) 前記第 1 ポリヌクレオチド及び第 2 ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下での前記同時トランスフェクトされた真核宿主細胞の適切な培養培地における培養；及びc) 前記培地からのFVII又はその変異体の単離を含んで成る、FVII又はその変異体の生成方法に関する。

【 0 0 3 8 】

さらなる観点においては、本発明は、a) 同時トランスフェクトされた真核宿主細胞を生成するために、第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及びFVII又はその変異体をコードする第 1 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション、及び第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション；b) 前記第 1 ポリヌクレオチド及び第 2 ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下での前記同時トランスフェクトされた真核宿主細胞の適切な培養培地における培養を含んで成る、FVII又はその変異体の生成方法に関する。

【 0 0 3 9 】

さらなる観点においては、本発明は、a) 同時トランスフェクトされた真核宿主細胞を生成するために、第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及びFVII又はその変異体をコードする第 1 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション、及び第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション；b) 前記第 1 ポリヌクレオチド及び第 2 ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下での前記同時トランスフェクトされた真核宿主細胞の適切な培養培地における培養；及びc) 前記培地からのFVII又はその変異体の単離を含んで成る、FVII又はその変異体の生成方法に関する。

【 0 0 4 0 】

さらなる観点においては、本発明は、a) 同時トランスフェクトされた真核宿主細胞を生成するために、第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及びFVII又はその変異体をコードする第 1 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション、及び第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション；b) 前記第 1 ポリヌクレオチド及び第 2 ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下での前記同時トランスフェクトされた真核宿主細胞の適切な培養培地における培養；及びc) 前記培地からのFVII又はその変異体の単離及び活性化を含んで成る、FVIIa又はその変異体の生成方法に関する。

【 0 0 4 1 】

さらなる観点においては、本発明は、発現単位における遊離プロペプチドをコードするポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクターに関する。第 2 ポリヌクレオチド、第 2 遊離プロペプチド、及び第 2 発現単位に関しての下記態様は、ポリヌクレオチド、遊離プロペプチド、及び組換えベクター内に包含される発現単位の態様を、個々に又は組合して表す。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 2 】

さらなる観点においては、本発明は、第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及びFVII又はその変異体をコードする第 1 ポリヌクレオチド、及び第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクターに関する。

さらなる観点においては、本発明は、第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及びビタミンK - 依存性タンパク質をコードする第 1 ポリヌクレオチド、及び第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクターに関する。

【 0 0 4 3 】

さらなる観点においては、本発明は、 a) 第 1 発現単位におけるFVIIのアミノ酸配列 - 18 ~ 406及びそのプロペプチドをコードする第 1 ポリヌクレオチドを、真核宿主細胞において活性化する遺伝子、及び b) 第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクションを含んで成る、FVIIを生成する真核宿主細胞の調製方法に関する。この観点においては、アミノ酸配列 - 18 ~ 1 は、配列番号 7 として同定されるFVIIのプロペプチドと同一である。

10

【 0 0 4 4 】

さらなる観点においては、本発明は、 a) 第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及びFVII又はその変異体をコードする第 1 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション、及び b) 第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクションを含んで成る、FVII又はその類似体の生成方法に関する。

20

【 0 0 4 5 】

さらなる観点においては、本発明は、 a) 同時トランスフェクトされた真核宿主細胞を生成するために、第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及びビタミンK - 依存性タンパク質をコードする第 1 ポリヌクレオチドの真核宿主細胞における発現、及び第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション； b) 前記第 1 ポリヌクレオチド及び第 2 ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下での前記同時トランスフェクトされた真核宿主細胞の適切な培養培地における培養を含んで成る、ビタミンK - 依存性タンパク質の生成方法に関する。

【 0 0 4 6 】

さらなる観点においては、本発明は、 a) 同時トランスフェクトされた真核宿主細胞を生成するために、第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及びビタミンK - 依存性タンパク質をコードする第 1 ポリヌクレオチドの真核宿主細胞における発現、及び第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション； b) 前記第 1 ポリヌクレオチド及び第 2 ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下での前記同時トランスフェクトされた真核宿主細胞の適切な培養培地における培養；及び c) 前記培地からのビタミンK - 依存性タンパク質の単離を含んで成る、ビタミンK - 依存性タンパク質の生成方法に関する。

30

【 0 0 4 7 】

さらなる観点においては、本発明は、 a) 同時トランスフェクトされた真核宿主細胞を生成するために、第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及びビタミンK - 依存性タンパク質をコードする第 1 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション、及び第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション； b) 前記第 1 ポリヌクレオチド及び第 2 ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下での前記同時トランスフェクトされた真核宿主細胞の適切な培養培地における培養を含んで成る、ビタミンK - 依存性タンパク質の生成方法に関する。

40

【 0 0 4 8 】

さらなる観点においては、本発明は、 a) 同時トランスフェクトされた真核宿主細胞を生成するために、第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及びビタミンK - 依存性タンパク

50

質をコードする第1ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション、及び第2発現単位における第2遊離プロペプチドをコードする第2ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション；b)前記第1ポリヌクレオチド及び第2ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下での前記同時トランスフェクトされた真核宿主細胞の適切な培養培地における培養；及びc)前記培地からのビタミンK-依存性タンパク質の単離を含んで成る、ビタミンK-依存性タンパク質の生成方法に関する。

【0049】

さらなる観点においては、本発明は、a)同時トランスフェクトされた真核宿主細胞を生成するために、第1発現単位における第1プロペプチド及びFVII又はその変異体をコードする第1ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション、及び第2発現単位における第2遊離プロペプチドをコードする第2ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション；b)前記第1ポリヌクレオチド及び第2ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下での前記同時トランスフェクトされた真核宿主細胞の適切な培養培地における培養を含んで成る方法により得られる組換えFVII又はその変異体に関する。

10

【0050】

さらなる観点においては、本発明は、a)同時トランスフェクトされた真核宿主細胞を生成するために、第1発現単位における第1プロペプチド及びFVII又はその変異体をコードする第1ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション、及び第2発現単位における第2遊離プロペプチドをコードする第2ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション；b)前記第1ポリヌクレオチド及び第2ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下での前記同時トランスフェクトされた真核宿主細胞の適切な培養培地における培養；及びc)前記培地からのFVII又はその変異体の単離を含んで成る方法により得られる組換えFVII又はその変異体に関する。

20

【0051】

さらなる観点においては、本発明は、a)同時トランスフェクトされた真核宿主細胞を生成するために、第1発現単位における第1プロペプチド及びFVII又はその変異体をコードする第1ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション、及び第2発現単位における第2遊離プロペプチドをコードする第2ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション；b)前記第1ポリヌクレオチド及び第2ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下での前記同時トランスフェクトされた真核宿主細胞の適切な培養培地における培養；及びc)前記培地からのFVII又はその変異体の単離及び活性化を含んで成る方法により得られる組換えFVIIa又はその変異体に関する。

30

【0052】

さらなる観点においては、本発明は、a)同時トランスフェクトされた真核宿主細胞を生成するために、第1発現単位における第1プロペプチド及びビタミンK-依存性タンパク質をコードする第1ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション、及び第2発現単位における第2遊離プロペプチドをコードする第2ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション；b)前記第1ポリヌクレオチド及び第2ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下での前記同時トランスフェクトされた真核宿主細胞の適切な培養培地における培養を含んで成る方法により得られる組換えビタミンK-依存性タンパク質に関する。

40

【0053】

さらなる観点においては、本発明は、a)同時トランスフェクトされた真核宿主細胞を生成するために、第1発現単位における第1プロペプチド及びビタミンK-依存性タンパク質をコードする第1ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション、及び第2発現単位における第2遊離プロペプチドをコードする第2ポリヌクレオチドによる真核宿主細胞のトランスフェクション；b)前記第1ポリヌクレオチド及び第2ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下での前記同時トランスフェクトされた真核宿主細胞の適切な培養培地における培養；及びc)前記培地からのビタミンK-依存性タンパク質の単離を含んで成る方法により得られる組換えビタミンK-依存性タンパク質に関する。

50

【 0 0 5 4 】

前記第 1 プロペプチドは、ビタミンK - 依存性タンパク質に通常関連するプロペプチドであり得るか、又はそれは、いずれか他のプロペプチド、例えば異なったビタミンK - 依存性タンパク質に通常関連するプロペプチドであり得る。

1つの観点においては、前記第 1 プロペプチドは、 γ - グルタミルカルボキシラーゼのための1つの結合配列を含んで成る。もう1つの態様においては、前記第 1 プロペプチドは、 γ - グルタミルカルボキシラーゼのための複数の結合配列を含んで成る。従って、前記第 1 プロペプチドの例は、FVIIと通常関連するプロペプチド、及び同じ発現単位において共有結合されるプロトロンビンである。

【 0 0 5 5 】

さらなる態様においては、第 2 遊離プロペプチドは、 γ - グルタミルカルボキシラーゼのための1つの結合配列を含んで成る。さらなる態様においては、第 2 遊離プロペプチドは、 γ - グルタミルカルボキシラーゼのための複数の結合配列を含んで成る。従って、第 2 遊離プロペプチドの例は、FVIIに通常関連するプロペプチド、及び同じ発現単位において共有結合されるプロトロンビンである。

本発明のさらなる態様においては、真核宿主細胞は、第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及びFVIIをコードする第 1 ポリヌクレオチドを発現し、そして第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドを発現する。特定の態様においては、FVIIはヒトFVIIである。

【 0 0 5 6 】

本発明のさらなる態様においては、真核宿主細胞は、第 1 発現単位における第 1 プロペプチド及びFVIIをコードする第 1 ポリヌクレオチドによりトランスフェクトされ、そして第 2 発現単位における第 2 遊離プロペプチドをコードする第 2 ポリヌクレオチドによりトランスフェクトされる。特定の態様においては、FVIIはヒトFVIIである。

【 0 0 5 7 】

本発明のさらなる態様においては、ビタミンK - 依存性タンパク質は、プロトロンビン、第IX因子、FVII、第X因子、プロテインC、プロテインS、オステオカルシン、プロリンに富んでいるGlaタンパク質 1、又はマトリックスGlaタンパク質から独立して選択される。それらのタンパク質のいずれか 1 つが、本発明の他の態様を構成することが理解されるべきである。

【 0 0 5 8 】

本発明のさらなる態様においては、真核宿主細胞はさらに、発現単位における γ - グルタミルカルボキシラーゼをコードするポリヌクレオチドによりトランスフェクトされる。この発現単位は、第 1 又は第 2 発現単位とは異なる発現であり得、又は γ - グルタミルカルボキシラーゼをコードするポリヌクレオチドは第 1 又は第 2 発現単位に位置することができる。 γ - グルタミルカルボキシラーゼの例は、組換えヒト、ラット、ショウジョウバエ、ハツカネズミ筋又はハムスター γ - グルタミルカルボキシラーゼから選択される。

【 0 0 5 9 】

本発明のさらなる態様においては、第 1 プロペプチドは、下記式：

$$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}$$

[式中、 X_1 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_9 , X_{10} 及び X_{13} は独立して、G, P, A, V, L, I, M, C, F, Y, W, H, K, R, Q, N, E, D, S 及び T から選択され、そして

X_2 , X_3 , X_{11} 及び X_{12} は独立して、V, L, P, N, A, I, S, F, M, W, Q, T 及び Y から選択され、そして

X_8 は独立して、G 及び A から選択され、そして

X_{14} , X_{15} , X_{16} 及び X_{17} は独立して、R, H, A, T, W, L, I, V, Q, K, Y, P 又は不在である] により表されるアミノ酸配列を含んで成る。

【 0 0 6 0 】

第 1 プロペプチドの 1 つの態様においては、 X_1 は A, S, N, R, T 及び H から選択される。

第 1 プロペプチドのさらなる態様においては、 X_2 は V, L, P, N 及び A から選択される。

第1プロペプチドのさらなる態様においては、 X_3 はL, I, V及びSから選択される。

第1プロペプチドのさらなる態様においては、 X_4 はS, R, N, T, D及びAから選択される。

第1プロペプチドのさらなる態様においては、 X_5 はR, Q, K, G, H, S及びPから選択される。

【0061】

第1プロペプチドのさらなる態様においては、 X_6 はE, R及びQから選択される。

第1プロペプチドのさらなる態様においては、 X_7 はQ, N, E, K及びRから選択される。

第1プロペプチドのさらなる態様においては、 X_8 はA及びGから選択される。

第1プロペプチドのさらなる態様においては、 X_9 はN, H, S及びRから選択される。

第1プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{10} はQ, N, T, G, S, K及びEから選択される。

10

第1プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{11} はV, I, F及びLから選択される。

【0062】

第1プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{12} はL, I及びVから選択される。

第1プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{13} はQ, A, S, H, V, K, N及びRから選択される。

第1プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{14} はR, H, K, I及びPから選択されるか、又は不在である。

第1プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{15} はR, H, K, Q, V, Y, P, A, T, W及びLから選択されるか、又は不在である。

20

第1プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{16} はR, H, T, Q, K, Y及びPから選択されるか、又は不在である。

第1プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{17} はR, H及びKから選択されるか、又は不在である。

第1プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{17} はRである。

【0063】

本明細書においては、アミノ酸残基は、IUPAC - IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN) により許可される、表1に示されるような略語を用いて表される。アミノ酸、及び異性体を有する同様のものに関しては、次の略語により表されるそれらは、天然のL-形で存在する。さらに、ペプチドのアミノ酸配列の左及び右端は、特にことわらない限り、それぞれN-及びC-末端である。

30

【0064】

本発明のさらなる態様においては、第1プロペプチドは、1mM以下の阻害定数(K_i)を有するアミノ酸配列を含んで成る。さらなる態様においては、アミノ酸配列は0.5mM以下の K_i を有する。さらなる態様においては、アミノ酸配列は、0.1nM~0.5mMの K_i を有する。

本発明のさらなる態様においては、第1プロペプチドは、配列番号1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17及び18から成る群から独立して選択された配列に対して少なくとも30%の相同性を有するアミノ酸配列を含んで成る。

【0065】

本発明のさらなる態様においては、第1プロペプチドは、配列番号1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17及び18から成る群から独立して選択された配列に対して少なくとも40%の相同性を有するアミノ酸配列を含んで成る。

40

本発明のさらなる態様においては、第1プロペプチドは、配列番号1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17及び18から成る群から独立して選択された配列に対して少なくとも50%の相同性を有するアミノ酸配列を含んで成る。

【0066】

本発明のさらなる態様においては、前記第1プロペプチドが、1mM以下の K_i 、及び配列番号1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17及び18から成る群から独立して選択された配列に対して少なくとも30%の相同性を有するアミノ酸配列を含んで成る。

50

本発明のさらなる態様においては、前記第1プロペプチドが、配列番号1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17及び18から成る群から独立して選択された特定のアミノ酸配列を含んで成る。

【0067】

本発明のさらなる態様においては、第2遊離プロペプチドは、下記式：

$$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}$$

[式中、 X_1 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_9 , X_{10} 及び X_{13} は独立して、G, P, A, V, L, I, M, C, F, Y, W, H, K, R, Q, N, E, D, S及びTから選択され、そして

X_2 , X_3 , X_{11} 及び X_{12} は独立して、V, L, P, N, A, I, S, F, M, W, Q, T及びYから選択され、そして

X_8 は独立して、G及びAから選択され、そして

X_{14} , X_{15} , X_{16} 及び X_{17} は独立して、R, H, A, T, W, L, I, V, Q, K, Y, P又は不在である]
により表されるアミノ酸配列を含んで成る。

【0068】

第2プロペプチドの1つの態様においては、 X_1 はA, S, N, R, T及びHから選択される。

第2プロペプチドのさらなる態様においては、 X_2 はV, L, P, N及びAから選択される。

第2プロペプチドのさらなる態様においては、 X_3 はL, I, V及びSから選択される。

第2プロペプチドのさらなる態様においては、 X_4 はS, R, N, T, D及びAから選択される。

第2プロペプチドのさらなる態様においては、 X_5 はR, Q, K, G, H, S及びPから選択される。

【0069】

第2プロペプチドのさらなる態様においては、 X_6 はE, R及びQから選択される。

第2プロペプチドのさらなる態様においては、 X_7 はQ, N, E, K及びRから選択される。

第2プロペプチドのさらなる態様においては、 X_8 はA及びGから選択される。

第2プロペプチドのさらなる態様においては、 X_9 はN, H, S及びRから選択される。

第2プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{10} はQ, N, T, G, S, K及びEから選択される。

第2プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{11} はV, I, F及びLから選択される。

【0070】

第2プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{12} はL, I及びVから選択される。

第2プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{13} はQ, A, S, H, V, K, N及びRから選択される。

第2プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{14} はR, H, K, I及びPから選択されるか、又は不在である。

第2プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{15} はR, H, K, Q, V, Y, P, A, T, W及びLから選択されるか、又は不在である。

第2プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{16} はR, H, T, Q, K, Y及びPから選択されるか、又は不在である。

第2プロペプチドのさらなる態様においては、 X_{17} はR, H, T, Q, K, Y及びPから選択されるか、又は不在である。

【0071】

本発明のさらなる態様においては、第1プロペプチドは、1mM以下の阻害定数(K_i)を有するアミノ酸配列を含んで成る。さらなる態様においては、アミノ酸配列は0.5mM以下の K_i を有する。さらなる態様においては、アミノ酸配列は、0.1nM~0.5mMの K_i を有する。

本発明のさらなる態様においては、第1プロペプチドは、配列番号1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17及び18から成る群から独立して選択された配列に対して少なくとも30%の相同性を有するアミノ酸配列を含んで成る。

【0072】

本発明のさらなる態様においては、第1プロペプチドは、配列番号1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17及び18から成る群から独立して選択された配列

10

20

30

40

50

に対して少なくとも40%の相同性を有するアミノ酸配列を含んで成る。

本発明のさらなる態様においては、第1プロペプチドは、配列番号1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17及び18から成る群から独立して選択された配列に対して少なくとも50%の相同性を有するアミノ酸配列を含んで成る。

【0073】

本発明のさらなる態様においては、前記第1プロペプチドが、1mM以下の K_i 、及び配列番号1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17及び18から成る群から独立して選択された配列に対して少なくとも30%の相同性を有するアミノ酸配列を含んで成る。

本発明のさらなる態様においては、前記第1プロペプチドが、配列番号1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17及び18から成る群から独立して選択された特定のアミノ酸配列を含んで成る。

【0074】

本発明のさらなる態様においては、真核宿主細胞は、酵母細胞である。

本発明のさらなる態様においては、真核宿主細胞は、昆虫細胞である。

本発明のさらなる態様においては、真核宿主細胞は、哺乳類細胞である。

本発明のさらなる態様においては、真核宿主細胞は、ヒト細胞である。

本発明のさらなる態様においては、真核宿主細胞は、BHK細胞、HEK細胞、COS細胞又はCHO細胞から独立して選択される。

【0075】

本発明のさらなる態様においては、第1ポリヌクレオチド配列はDNAである。

本発明のさらなる態様においては、第2ポリヌクレオチド配列はDNAである。

本発明のさらなる態様においては、第1ポリヌクレオチド配列はRNAである。

本発明のさらなる態様においては、第2ポリヌクレオチド配列はRNAである。

本発明のさらなる態様においては、第1発現単位は第1ベクター上に存在し、そして第2発現単位は第2別のベクター上に存在する。

本発明のさらなる態様においては、第1及び第2発現単位は、同じベクター上に存在する。

【0076】

本発明のさらなる態様においては、第1ベクターは、プラスミドベクターである。

本発明のさらなる態様においては、第2ベクターは、プラスミドベクターである。

本発明のさらなる態様においては、第1ベクターは、ファージベクターである。

本発明のさらなる態様においては、第2ベクターは、ファージベクターである。

本発明のさらなる態様においては、培養培地は、血清フリー培地である。

【0077】

本発明のさらなる態様においては、第1ポリヌクレオチドは、プラスミドDNAである。

本発明のさらなる態様においては、第2ポリヌクレオチドは、プラスミドDNAである。

用語“ γ -グルタミルカルボキシラーゼのための結合配列”とは、本明細書において使用される場合、 γ -グルタミルカルボキシラーゼによる結合又はそれとの相互作用のための配列（すなわち、認識配列内）の必要なアミノ酸残基を意味する。

【0078】

本発明のさらなる態様においては、第1プロペプチドは、第2遊離のプロペプチドよりも、カルボキシラーゼに対して高い親和性（阻害定数（ K_i ）により測定される場合）を有する。カルボキシラーゼ、基質結合及び活性調節に対するビタミンK-依存性タンパク質のプロペプチドの2種の分離できる機能が存在する場合、共有結合されるプロペプチド及び遊離プロペプチドの異なった親和性及び濃度は、組換えビタミンK-タンパク質をカルボキシレート化する生成体細胞の全体的能力に影響を及ぼす。

【0079】

遊離プロペプチド及び共有結合されるプロペプチドの同時発現及びそれらの組合せは、機能的組換えFVII（rFVII）の生成を高める。新しく合成されたGlu-含有ビタミンK-依存

10

20

30

40

50

性タンパク質のカルボキシル化を阻害しないためには、好ましくは、第2遊離プロペプチドは、 γ -カルボキシル化されるビタミンK-依存性タンパク質に対して共有結合されるプロペプチドよりも低い親和性を有する。

【0080】

遊離プロペプチドについての K_i は、Stanleyなど、(Biochemistry38, 15681-15687 (1999) 及びJ. Biol. Chem. 274, 16940-16944) に従って決定される。

さらなる態様においては、ビタミンK-依存性タンパク質と共に同時発現される遊離プロペプチドは好ましくは、表2及び3に要約されるような列挙から選択される。

【0081】

【表1】

10

表1：アミノ酸残基についての略語：

アミノ酸	3文字コード	1文字コード
グリシン	Gly	G
プロリン	Pro	P
アラニン	Ala	A
バリン	Val	V
ロイシン	Leu	L
イソロイシン	Ile	I
メチオニン	Met	M
システイン	Cys	C
フェニルアラニン	Phe	F
チロシン	Tyr	Y
トリプトファン	Trp	W
ヒスチジン	His	H
リシン	Lys	K
アルギニン	Arg	R
グルタミン	Gln	Q
アスパラギン	Asn	N
グルタミン酸	Glu	E
アスパラギン酸	Asp	D
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T

20

30

40

【0082】

【表2】

表2: ビタミンK-依存性タンパク質からのプロペプチド及びコンセンサス
プロペプチドのアミノ酸配列

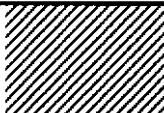
位置—	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	*KinM
コンセンサス*	A	V	F	L	S	R	E	Q	A	N	Q	V	L	Q	R	R	R	R	0.43
第IX因子	S	L	F	I	R	R	E	Q	A	N	N	I	L	A	R	V	T	R	2.6
マトリックスGla タンパク質	N	P	F	I	N	R	R	N	A	N	T	F	I	S	P	Q	Q	R	5.8
FVII	A	V	F	V	T	Q	E	E	A	H	G	V	L	H	R	R	R	R	11.1
プロテインS	A	N	F	L	S	K	Q	Q	A	S	Q	V	L	V	R	K	R	R	12.2
PRGP1	R	V	F	L	T	G	E	K	A	N	S	I	L	K	R	Y	P	R	12.8
第IX因子	T	V	F	L	D	H	E	N	A	N	K	I	L	N	R	P	K	R	33.6
プロテインC	S	V	F	S	S	S	E	R	A	H	Q	V	L	R	I	R	K	R	230
プロトロンビン	H	V	F	L	A	P	Q	Q	A	R	S	L	L	Q	R	V	R	R	277
オステオカルシ	A	A	F	V	S	K	Q	E	G	S	E	V	V	K	R	P	R	R	>500,000

* : Stanleyなど. (1999) Biochemistry, 38, 15681-15887 及び
J. Biol. Chem. 274, 16940-16944.

【 0 0 8 3 】

【 表 3 】

表3: ビタミンK-依存性タンパク質と共に同時発現される遊離プロペプチ
ドの例

	位置一	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
真正の	FVII	A	V	F	V	T	Q	E	E	A	H	G	V	L	H	R	R	R	R
	第IX因子	T	V	F	L	D	H	E	N	A	N	K	I	L	N	R	P	K	R
	プロテインC	S	V	F	S	S	S	E	R	A	H	Q	V	L	R	I	R	K	R
変異体	オステオカルシ (G-10A, V-6L)	A	A	F	V	S	K	Q	E		S	E	V		K	R	P	R	R
	FVII (A-10G)	A	V	F	V	T	Q	E	E		H	G	V	L	H	R	R	R	R
	FVII (H-9R)	A	V	F	V	T	Q	E	E	A		G	V	L	H	R	R	R	R
	FVII (H-9K)	A	V	F	V	T	Q	E	E	A		G	V	L	H	R	R	R	R
	FVII (H-9L)	A	V	F	V	T	Q	E	E	A		G	V	L	H	R	R	R	R
	FVII (V-15S)	A	V	F		T	Q	E	E	A	H	G	V	L	H	R	R	R	R
切断 された	FVII	A	V	F	V	T	Q	E	E	A	H	G	V	L	H				
	第IX因子	T	V	F	L	D	H	E	N	A	N	K	I	L	N				
	プロテインC	S	V	F	S	S	S	E	R	A	H	Q	V	L	R				

【 0 0 8 4 】

本発明はまた、上記で言及されるようなビタミンK-依存性タンパク質の生成方法に関する。ビタミンK-依存性タンパク質は好ましくは、組換えDNA技法により生成される。このためには、ビタミンK-依存性タンパク質をコードするDNA配列は、ゲノム又はcDNAライブラリーを調製し、そして標準技法に従って、合成オリゴヌクレオチドプローブを用いてのハイブリダイゼーションによりタンパク質のすべて又は一部をコードするDNA配列についてスクリーニングすることにより単離され得る (Sambrookなど., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989を参照のこと)。このためには、タンパク質をコードするDNA配列は好ましくは、ヒ

10

20

30

40

50

ト起源のものであり、すなわちヒトゲノムDNA又はcDNAライブラリー由来のものである。

【0085】

本発明はまた、通常、細胞において発現されないか、又は得られるような細胞において生理学的に有意なレベルで発現されない、脊椎動物起源の一次、二次又は不滅化された細胞に存在するビタミンK - 依存性タンパク質をコードする遺伝子を活性化する（すなわち、変更する）方法に関する。相同組換えは、その対応するトランスフェクトされていない細胞において明らかなよりも高いレベルでの遺伝子の発現、又はその対応するトランスフェクトされていない細胞において明らかなパターンとは異なる調節又は誘発のパターンの遺伝子による表示を引き起こす調節配列により、得られるような細胞における遺伝子に通常関連する調節領域を置換するか、又はそれを無能にするために使用され得る。

10

【0086】

従って、本発明はまた、トランスフェクトされた一次、二次又は不滅化された細胞におけるビタミンK - 依存性タンパク質をコードする内因性遺伝子を変更するか又は活性化することによって、ビタミンK - 依存性タンパク質を調製するための方法にも関する。内因性遺伝子の活性化は、アメリカ特許第5,968,502号に記載のようにして行われ得る。

【0087】

ビタミンK - 依存性タンパク質をコードするDNAはまた、確立された標準方法、例えばBeaucage and Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1959-1869により記載されるホスホアミジット方法、又はMattresなど., EMBO Journal 3 (1984), 801-805により記載される方法により、合成的に調製され得る。ホスホラミジット方法に従って、オリゴヌクレオチドは、例えば自動DNA合成機により合成され、精製され、アニーリングされ、結合され、そして適切なベクターにクローン化される。

20

DNA配列はまた、例えばアメリカ特許第4,683,202号、Saikiなど., Science 239 (1988), 487-491, 又はSambrookなど., 前記に記載のように、特定のプライマーを用いてのポリメラーゼ鎖反応により調製され得る。

【0088】

ビタミンK - 依存性タンパク質をコードするDNA配列は通常、便利には組換えDNA工程にゆだねられ得る、いずれかのベクターであり得る組換えベクター中に挿入され、そしてベクターの選択は、それが挿入される宿主細胞に、しばしば依存する。従って、ベクターは、自律的に複製するベクター、すなわちその複製が染色体複製に関係しない染色体外実在物として存在するベクター、例えばプラスミドである。他方では、ベクターは、宿主細胞中に導入される場合、宿主細胞ゲノム中に組み込まれ、そしてそれが組み込まれた染色体と共に複製されるベクターである。

30

【0089】

ベクターは好ましくは、ビタミンK - 依存性タンパク質がDNAの転写のために必要とされる追加のセグメントに操作可能に連結されている発現ベクターである。一般的に、発現ベクターはプラスミド又はウィルスDNA由来であるか、又は両者の要素を含むことができる。用語“操作可能的に連結される”とは、セグメントが、それらの意図された目的のために機能し、例えば転写がプロモーターにより開始し、そしてポリペプチドをコードするDNA配列を通して進行するよう配置されることを示す。

40

【0090】

プロモーターは、選択の宿主細胞における転写活性を示すいずれかのDNA配列であり得るか、又は宿主細胞に対して相同であるか又は異種であるタンパク質をコードする遺伝子から誘導され得る。

【0091】

哺乳類細胞におけるビタミンK - 依存性タンパク質をコードするDNAの転写を指図するための適切なプロモーターの例は、SV40プロモーター（Subramaniなど., Mol. Cell Biol. 1 (1981), 854-864）、MT - 1（メタロチオネイン遺伝子）プロモーター（Palmiterなど., Science 222 (1983), 809-814）、CMVプロモーター（Boshartなど., Cell 41: 521-530, 1985）、又はアデノウィルス2主要後期プロモーター（Kaufman and Sharp, Mol. Cell. B

50

iol. 2: 1304-1319, 1982) である。

【 0 0 9 2 】

昆虫細胞への使用のための適切なプロモーターの例は、ポリヘドリンプロモーター（アメリカ特許第4,745,051号；vasuvedanなど., FEBS Lett. 311 (1992) 7-11）、オートグラフィ・カリホルニカ（*Autographa californica*）多角体病ウイルス塩基性タンパク質プロモーター（EP397,485号）、バキュロウイルス初期遺伝子1プロモーター（アメリカ特許第5,155,037号；第5,162,222号）、又はバキュロウイルス39K遅延された - 初期遺伝子プロモーター（アメリカ特許第5,155,037号；第5,162,222号）である。

【 0 0 9 3 】

酵母宿主細胞への使用のための適切なプロモーターの例は、酵母解糖遺伝子からのプロモーター（Hitzemanなど., J. Biol. Chem. 255 (1980), 12073-12080; Alber and Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982), 419-434）、又はアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子（Youngなど., Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaenderなど, eds.), Plenum Press, New York, 1982）、又はTP11（アメリカ特許第4,59,311号）又はADH2-4c（Russellなど., Nature 304, (1983), 652-654）プロモーターである。

【 0 0 9 4 】

糸状菌宿主細胞への使用のための適切なプロモーターの例は、例えばADH3プロモーター（McKnightなど., The EMBO J. 4 (1985), 2093-2099）、又はtpiAプロモーターである。他の有用なプロモーターの例は、A. オリザエ（*A. oryzae*）TAKAアミラーゼ、リゾムコル・ミエヘイ（*Rhizomucor miehei*）アスパラギン酸プロテイナーゼ、A. ニガー（*A. niger*）中性 α -アミラーゼ、A. ニガー酸安定性 α -アミラーゼ、A. ニガー又はA. アワモリ（*A. awamori*）グルコアミラーゼ（gluA）、リゾムコル・ミエヘイリパーゼ、A. オリザエアルカリプロテアーゼ、A. オリザエトリオースリン酸イソメラーゼ又はA. ニジュランス（*A. nidulans*）アセトアミダーゼをコードする遺伝子由来のそれらである。TAKA - アミラーゼ及びgluAプロモーターが好ましい。適切なプロモーターは、例えばEP238,023号及びEP383,779号に言及されている。

【 0 0 9 5 】

ビタミンK - 依存性タンパク質をコードするDNA配列はまた、必要なら、適切なターミネーター、例えばヒト成長ホルモントーミネーター（Palmiterなど., Science222, 1983, pp. 809-814）、又はTP11（Alber and Kawasaki J. Mol. Appl. Gen. 1, 1982, pp. 419-434）又はADH3（McKnightなど., The EMBO J. 4, 1985, pp. 2093-2099）ターミネーターに操作可能的に連結される。ベクターはまた、プロモーターの下流に、及びFVII配列自体のための挿入部位から上流に位置する1組のRNAスプライス部位を含むことができる。好ましいRNAスプライス部位は、アデノウイルス及び/又は免疫グロブリン遺伝子から得られる。

【 0 0 9 6 】

挿入部位の下流に位置するポリアデニル化シグナルはまた、発現ベクターに含まれる。特に好ましいポリアデニル化シグナルは、SV40からの初期又は後期ポリアデニル化シグナル（Kaufman and Sharp. 前記）、アデノウイルス5E1b領域からのポリアデニル化シグナル、ヒト成長ホルモン遺伝子ターミネーター（DeNotoなど., Nuc. Acids Res. 9: 3719-3730, 1981）、又はヒトFVII遺伝子又はウシFVII遺伝子からのポリアデニル化シグナルを包含する。発現ベクターはまた、非コードウィルスリーダー配列、例えばプロモーターとRNAスプライス部位との間に位置するアデノウイルス2 三分節リーダー；及びエンハンサー配列、例えばSV40エンハンサーを含むことができる。

【 0 0 9 7 】

組換えベクターはさらに、問題の宿主細胞におけるベクターの複数の可能にするDNA配列を含んで成る。そのような配列の例（宿主細胞が哺乳類細胞である場合）は、複数のSV40起点である。

宿主細胞が酵母細胞である場合、ベクターの複製を可能にする適切な配列は、酵母2 μ 複製遺伝子REP1 - 3及び複数の起点である。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 8 】

ベクターはまた、選択マーカー、例えば宿主細胞における欠失を補充する生成物の遺伝子、例えばジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) をコードする遺伝子又はシゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) TPI 遺伝子 (P.R. Rnssell, Gene40, 1985, pp. 125-130により記載される)、又は薬剤、例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、ヒグロマイシン又はメトトレキセートに対する耐性を付与する遺伝子を含んで成ることができる。糸状菌に関しては、選択マーカーは、and S, pyrG, argB, niaD, niaD又はsCを包含する。

【 0 0 9 9 】

宿主細胞の分泌路中に本発明のビタミンK - 依存性タンパク質を指図するためには、分泌シグナル配列 (リーダー配列、プレプロ配列又はプレ配列として知られている) が、組換えベクターに供給され得る。分泌シグナル配列は、正しい読み取り枠で、ビタミンK - 依存性タンパク質をコードするDNA配列に連結される。分泌シグナル配列は、ペプチドをコードするDNA配列の5'側に通常位置する。分泌シグナル配列は、通常、タンパク質に関連する配列であるか、又はもう1つの分泌されたタンパク質をコードする遺伝子からであり得る。

10

【 0 1 0 0 】

酵母細胞からの分泌に関しては、分泌シグナル配列は、細胞の分泌路中への発現されたビタミンK - 依存性タンパク質の効果的な指図を確保するいずれかのシグナルペプチドをコードすることができる。シグナルペプチドは、天然に存在するシグナルペプチド、又はその機能的部位であり得るか、又は合成ペプチドであり得る。適切なシグナルペプチドは、 α - 因子シグナルペプチド (アメリカ特許第4,870,008号を参照のこと)、マウス唾液アミラーゼのシグナルペプチド (O. Hagenbuchleなど., Nature 289, 1981, pp. 643-646)、修飾されたカルボキシペプチダーゼシグナルペプチド (L.A. Valisなど., Cell 48, 1987, pp. 887-897)、酵母BAR1シグナルペプチド (W087/02670号)、又は酵母アスパラギン酸プロテアーゼ3 (YAP3) シグナルペプチド (M. Egel-Mitaniなど., Yeast 6, 1990, pp. 127-137) であることが見出されている。

20

【 0 1 0 1 】

酵母における効果的な分泌に関しては、リーダーペプチドをコードする配列はまた、シグナル配列の下流に及びビタミンK - 依存性タンパク質をコードするDNA配列の上流に挿入され得る。リーダーペプチドの機能は、ゴルジ体への、及びさらに、培養培地中への分泌のための分泌小胞への小胞体からの発現されたペプチドの方向付け (すなわち、酵母細胞の細胞周辺腔中への細胞を通しての又は少なくとも細胞膜を通してのビタミンK - 依存性タンパク質の輸送) を可能にすることである。

30

【 0 1 0 2 】

リーダーペプチドは、酵母 α - 因子リーダーであり得る (その使用は、例えばアメリカ特許第4,546,082号、アメリカ特許第4,870,008号、EP16201号、EP123294号、EP123544号及びEP163529号に記載される)。他方では、リーダーペプチドは、天然において見出されないリーダーペプチドである合成リーダーペプチドであり得る。例えば、合成リーダーペプチドは、W089/02463号又はW092/11378号に記載されている。

40

【 0 1 0 3 】

糸状菌への使用に関しては、シグナルペプチドは便利には、アスペルギラスsp. アミラーゼ又はグルコアミラーゼをコードする遺伝子、リゾムコル・ミエヘイリパーゼ又はプロテアーゼをコードする遺伝子、又はヒューミコラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*) リパーゼをコードする遺伝子から誘導され得る。シグナルペプチドは好ましくは、A. オリザエTAKAアミラーゼ、A. ニガー中性 α - アミラーゼ、A. ニガー酸安定性アミラーゼ、又はA. ニガーグルコアミラーゼをコードする遺伝子から誘導される。適切なシグナルペプチドは、例えばEP238023号及びEP215594号に開示される。

【 0 1 0 4 】

昆虫細胞への使用に関しては、シグナルペプチドは便利には、昆虫遺伝子 (W090/05783号

50

）、例えば鱗翅目のマンジュカ・セキスタ (*Manduca sexta*) 脂肪動員物質) ホルモン前駆体ペプチド (アメリカ特許第5,023,328号) から誘導され得る。

それぞれ、ビタミンK - 依存性タンパク質、プロモーター及び任意には、ターミネーター及び/又は分泌シグナル配列をコードするDNA配列を連結し、そして複製のために必要な情報を含む適切なベクター中にそれらを挿入するために使用される方法は、当業者に良く知られている (例えば、Sambrookなど., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, 1989)。

【0105】

哺乳類細胞をトランスフェクトし、そして細胞に導入されるDNA配列を発現するための方法は、例えば次の文献に記載されている: Kaufman and Sharp, *J. Mol. Biol.* 159 (1982) 601-621; Southern and Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (1982), 327-341; Loyter など., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982), 422-426; Wigler など., *Cell* 14 (1978), 725; Corsaro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7 (1981), 603; Graham and van der Eb, *Virology* 52 (1973), 456; 及びNeumannなど., *EMBO J.* 1 (1982), 841-845。

【0106】

適切なマーカーは、興味ある遺伝子と同時に、別々のプラスミドに基づいて細胞中に導入されるか、又は同じプラスミド上に導入され得る。同じプラスミド上に存在する場合、選択マーカー及び興味ある遺伝子は、異なったプロモーター又は同じプロモーターの制御下にあり、後者の配列はニシストロン性メッセージを生成する。このタイプの構成体は、当業界において知られている (例えば、Levinson and Simonsen, アメリカ特許第4,713,339号)。細胞中に導入される混合物に、“キャリアーDNA”として知られている追加のDNAを付加することはまた、好都合であり得る。

【0107】

細胞がDNAを取り込んだ後、それらは、興味ある遺伝子の発現を開始するために、適切な増殖培地において、典型的には1～2日間、増殖される。本明細書において使用される場合、“適切な増殖培地”とは、細胞の増殖、及び興味あるビタミンK - 依存性タンパク質の発現のために必要とされる他の成分及び栄養物を含む培地を意味する。培地は一般的に、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、必須糖、ビタミン、塩、リン脂質、タンパク質及び成長因子を含む。

【0108】

γ - カルボキシル化されたタンパク質の生成に関して、培地は、ビタミンKを、好ましくは約0.1 $\mu\text{g/ml}$ ~ 約5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で含むであろう。次に、薬剤選択が、選択マーカーを安定性態様で発現する細胞の増殖について選択するために適用される。増幅できる選択マーカーによりトランスフェクトされた細胞に関しては、薬物濃度は、高められたコピー数のクローン化された配列について選択するために高められ、それにより、発現レベルが高められる。次に、安定してトランスフェクトされた細胞のクローンは、興味あるビタミンK - 依存性タンパク質の発現についてスクリーンされる。

【0109】

ビタミンK - 依存性タンパク質をコードするDNA配列が導入される宿主細胞は、後翻訳の修飾されたビタミンK - 依存性タンパク質を生成することができるいずれかの細胞であり得、そして酵母、菌類及び高等真核細胞を包含する。

本発明への使用のための哺乳類細胞系の例は、COS - 1 (ATCC CRL 1650)、子供ハムスター肝臓 (BHK) 及び293 (ATCC CRL 1573; Graham など., *J. Gen. Virol.* 36: 59-72, 1977) 細胞系である。好ましいBHK細胞系は、tk.sup⁺ts13BHK細胞系 (Waechter and Baserga, *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 1106-1110, 1982) であり、この後、BHK570細胞として言及される。

【0110】

BHK570細胞系は、ATCC受託番号CRL10314号として、American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852から入手できる。tksup-ts13BHK細胞系はまた、受託番号CRL1632としてATCCから入手できる。さらに、多くの他の適切な細胞系は、次

のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：Rat HepI（ラット肝癌；ATCC CRL 1600）、Rat HepII（ラット肺癌；ATCC CRL 1548）、TCMK（ATCC CCL 139）、ヒト肺（ATCC HB8065）、NCTC 1469（ATCC CCL 9.1）、CHO（ATCC CCL 61）及びDUKX細胞（Uria ub and Chusin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA77: 4216-4220, 1980）。

【0111】

適切な酵母細胞の例は、サッカロミセスsp.又はシゾサッカロミセスspp., 特にサッカロミセス・セレピシアエ又はサッカロミセス・クルイベリの株の細胞を包含する。異種DNAにより酵母細胞を形質転換し、そしてそれらから異種ポリペプチドを生成するための方法は、例えばアメリカ特許第4,599,311、第4,931,373号、第4,670,008号、第5,037,743号及び第4,845,075号（それらのすべては、引用により本明細書に組み込まれる）に記載されている。形質転換された細胞は、選択マーカー、通常、薬物耐性、又は特定の栄養物、例えばロイシン不在下で増殖する能力により決定される表情型により選択される。

10

【0112】

酵母への使用のための好ましいベクターは、アメリカ特許第4,931,373号に開示されるPOT1ベクターである。ビタミンK-依存性タンパク質をコードするDNA配列に続いて、シグナル配列及び任意には、リーダー配列が存在する。適切な酵母細胞のさらなる例は、クルイベロミセス（*Kluyveromyces*）、例えば*K. ラクチス*（*K. lactis*）、ハンセンラ（*Hansenula*）、例えば*H. ポリモルファ*（*H. polymorpha*）、又は*ピチア*（*Pichia*）、例えば*P. パストリス*（*P. pastoris*）の株である（Gleesonなど., *J. Gen. Microbiol.* B2, 1986, pp. 3459-3465; アメリカ特許第4,882,279号）。

20

【0113】

他の菌類細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギラスspp., ニューロスポラspp., フサリウムspp. 又はトリコダーマspp. の株、特に*A. オリザエ*、*A. ニジュランス*又は*A. ニガー*の株である。タンパク質の発現のためへのアスペルギラスspp.の使用は、例えばEP272277号、EP238023号、EP184438号に記載される。*F. オキシスポラム*の形質転換は、Malardierなど., 1989, *Gene* 78: 147-156により記載される。トリコダーマsppの形質転換は、例えばEP244234号に記載のように行われ得る。

【0114】

糸状菌が宿主細胞として使用される場合、それは、便利には、組換え宿主細胞を得るために、宿主染色体にDNA構成体を組み込むことによって、本発明のDNA構成体により形質転換され得る。この組み込みは一般的に、DNA配列が細胞に安定して維持される場合、有益であると思われる。宿主染色体中へのDNA構成体の組み込みは、従来の方法、例えば相同又は異種組換えにより行われ得る。

30

【0115】

昆虫細胞の形質転換及びそこにおける異種ポリペプチドの生成は、アメリカ特許第4,745,051号；第4,879,236号；第5,155,037号；第5,162,222号；EP397,485号（それらはすべて引用により本明細書に組み込まれる）に記載のように行われ得る。宿主として使用される昆虫細胞系は適切には、レピドプテラ（*Lepidoptera*）細胞系、例えばスポドプテラ・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）細胞又はトリコプルシエ・ニ（*Trichoplusia ni*）細胞である（アメリカ特許第5,077,214号）。培養条件は、適切には、WO89/01029号又はWO89/01028号、又は前述の引例のいずれかに記載される。

40

【0116】

次に、上記形質転換されるか又はトランスフェクトされた宿主細胞は、ビタミンK-依存性タンパク質の発現を可能にする条件下で、適切な栄養培地において培養され、この後、得られるペプチドのすべて又は一部が培養物から回収され得る。細胞を培養するために使用される培地は、宿主細胞を増殖するために適切ないずれかの従来培地、例えば適切な補充物を含む最少又は複合培地であり得る。適切な培地は市販されており、又は公開されたレシピ（例えば、ATCCのカatalog）に従って調製され得る。

【0117】

次に、細胞により生成されるビタミンK-依存性タンパク質が、従来の方法、例えば遠心

50

分離又は濾過による培地からの宿主細胞の分離、塩、例えば硫酸アンモニウムによる上清液又は濾液のタンパク質成分の沈殿、問題のポリペプチドの型に依存して、種々のクロマトグラフィー方法、例えばイオン交換クロマトグラフィー、ゲル化クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー又は同様のものによる精製により、培養培地から回収され得る。

【0118】

組換えヒトFVII又はその変異体の調製に関しては、クローン化された野生型FVII DNA配列が使用される。この配列は、所望するFVIIタンパク質又はその変異体をコードするよう修飾され得る。次に、配列が、発現ベクター中に挿入され、このベクターにより、宿主細胞が形質転換されるか又はトランスフェクトされる。高等真核細胞、特に培養された哺乳類細胞が、宿主細胞として好ましい。ヒトFVIIのための完全なヌクレオチド及びアミノ酸配列は知られている。引用により本明細書に組み込まれるアメリカ特許第4,784,950号を参照のこと（ここで、組換えヒトFVIIのクローニング及び発現が記載されている）。ウシFVII配列は、Takeyaなど., J. Biol. Chem. 263: 14868-14872 (1988)（これは引用により本発明に組み込まれる）に記載されている。

10

【0119】

アミノ酸配列変更は、種々の技法により達成され得る。DNA配列の修飾は、部位特異的突然変異誘発による。部位特異的変異誘発は当業界において知られており、そして例えばZoller and Smith (DNA 3: 479-488, 1984)により記載される。従って、FVIIのヌクレオチド及びアミノ酸配列を用いて、選択の変更を導入することができる。

20

【0120】

本発明内への使用のためのDNA配列は典型的には、正しい後 - 翻訳プロセッシング（例えば；グルタミン酸残基の γ -カルボキシ化）及び宿主細胞からの分泌を得るために、FVIIタンパク質のアミノ末端でプレ-プロペプチドをコードするであろう。前記プレ-プロペプチドは、FVII又はもう1つのビタミンK-依存性血漿タンパク質、例えば第IX因子、第X因子、プロトロンビン、プロテインC又はプロテインSのそのプロペプチドであり得る。当業者により理解されるように、追加の修飾がFVIIのアミノ酸配列において行われ得、ここでそれらの修飾は凝固因子として作用するタンパク質の能力を有意に害しない。例えば、触媒試験におけるFVIIはまた、引用により本明細書に組み込まれるアメリカ特許第5,288,629号に一般的に記載のように、チモーゲンFVIIのその活性化された二本鎖形への転換を

30

【0121】

本発明においては、トランスジェニック動物技法が、ビタミンK-依存性タンパク質を生成するために使用され得る。宿主雌哺乳類の乳腺内でタンパク質を生成することが好ましい。興味あるタンパク質の乳腺における発現及びその乳汁への続く分泌は、他の源からタンパク質を単離することにおいて遭遇する多くの困難性を克服する。乳汁は容易に集められ、多量に入手でき、そして生化学的に十分に特徴づけられている。さらに、主要乳汁タンパク質は、高濃度（典型的には、約1~15g/l）で乳汁に存在する。商業的な観点から、高い乳生成の種を宿主として使用することが明らかに好ましい。

【0122】

より小さな動物、例えばマウス及びラットが使用され（そして、主要段階の証明で好ましい）るが、本発明においては、家畜哺乳類、例えばブタ、羊及びウシを使用することが好ましいが、但しそれらだけには限定されない。羊は、この種におけるトランスジェネシスのこれまでの歴史、乳汁収率、費用及び羊乳汁を集めるための装置の容易な入手性のような因子のために、特に好ましい。宿主種の選択に影響を及ぼす因子の比較についてはWIPO公開WO88/00239号を参照のこと。酪農使用のために交配された宿主動物の品種、例えばEast Friesland羊を選択するか、又は後日、トランスジェニック系の交配により酪農家畜を得ることが一般的に所望される。とにかく、既知の良好な健康の状態の動物が使用されるべきである。

40

【0123】

50

乳腺における発現を得るためには、乳タンパク質遺伝子からの転写プロモーターが使用される。乳タンパク質遺伝子は、ガゼイン（引用により本明細書に組み込まれるアメリカ特許第5,304,489号を参照のこと）、 β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミン及び乳清酸性タンパク質をコードするそれらの遺伝子を包含する。 β -ラクトグロブリン（BLG）プロモーターが好ましい。羊 β -ラクトグロブリン遺伝子の場合、遺伝子5'フランギングの配列の少なくとも近位406bpの領域が一般的に使用され得るが、但し約5kbpまでの5'フランギング配列の大きな部分、例えば5'フランギングプロモーター及び β -ラクトグロブリン遺伝子の非コード部分を包含する約4.25kbpのDNAセグメントも好ましい。Whitelawなど., Biochem. J. 286: 31-39 (1992) を参照のこと。他の種からのプロモーターDNAの類似するフラグメントもまた適切である。

10

【0124】

β -ラクトグロブリン遺伝子の他の領域はまた、発現されるべき遺伝子のゲノム領域である場合、構成体に組み込まれ得る。イントロンを欠いている構成体は、そのようなDNA配列を含むそれらの構成体に比較して、不良に発現することは一般的に当業界において許容されている（Brinsterなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 836-840 (1988); Palmiter など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 478-482 (1991); Whitelawなど., Transgenic Res. 1: 3-13 (1991); WO89/01343号；及びWO81/02318号を参照のこと；それらの個々は引用により本明細書に組み込まれる）。

【0125】

これに関しては、興味あるタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子の生来のイントロンのすべて又はいくつかを含むゲノム配列を使用することが一般的に好ましく、従って、 β -ラクトグロブリン遺伝子からの少なくともいくつかのイントロンのさらなる包含が好ましい。1つのそのような領域は、羊 β -ラクトグロブリン遺伝子の3'非コード領域からのイントロンスプライシング及びRNAポリアデニル化を提供するDNAセグメントである。遺伝子の天然の3'非コード配列により置換される場合、この羊ベーターラクトグロブリンセグメントが興味あるタンパク質又はポリペプチドの発現レベルを増強し、そして安定化することができる。

20

【0126】

他の態様においては、ビタミンK-依存性タンパク質をコードする配列の開始ATGを取り囲む領域が、乳汁特異的タンパク質遺伝子からの対応する配列により置換される。そのような置換は、発現を増強するための推定上の組織-特異的開始環境を提供する。ビタミンK-依存性タンパク質の完全なブレ-プロ配列及び5'非コード配列を、例えばBLG遺伝子のそれらの配列により置換することが便利であるが、但しより小さな領域でも置換され得る。

30

【0127】

トランスジェニック動物におけるビタミンK-依存性タンパク質の発現に関しては、ビタミンK-依存性タンパク質をコードするDNAセグメントが、発現単位を生成するために、その発現のために必要とされる追加のDNAセグメントに操作可能的に連結される。そのような追加のセグメントは、上記プロモーター、及び転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を提供する配列を包含する。

40

【0128】

発現単位はさらに、ビタミンK-依存性タンパク質をコードするセグメントに操作可能的に連結される分泌シグナル配列をコードするDNAセグメントを包含するであろう。分泌シグナル配列は、ビタミンK-依存性タンパク質の生来の分泌シグナル配列であり、又はもう1つのタンパク質、例えば乳タンパク質のその配列であり得る。例えば、von Heinje, Nuc. Acids Res. 14: 4683-4690 (1986)；及びMeadeなど., アメリカ特許第4,873,316号（それらは、引用により本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

【0129】

トランスジェニック動物への使用のための発現単位の構成は便利には、発現単位は実質的にいずれかの配列の連結により構成され得るが、追加のDNAセグメントを含むプラスミド

50

又はファージベクター中に、ビタミンK - 依存性タンパク質をコードする配列を挿入することによって行われる。乳タンパク質をコードするDNAセグメントを含むベクターを供給し、そして乳タンパク質のためのコードを、ビタミンK - 依存性タンパク質のその配列により置換し、それにより、乳タンパク質遺伝子の発現制御配列を含む遺伝子融合体を創造することが特に便利である。いずれにせよ、プラスミド又は他のベクターにおける発現単位のクローニングは、ビタミンK - 依存性タンパク質の増幅を促進する。増幅は便利には、細菌（例えば、E. コリ）宿主細胞において行われ、従って、ベクターは典型的には、複製の起点、及び細菌細胞において機能的な選択マーカーを含むであろう。

【 0 1 3 0 】

次に、発現単位は、選択された宿主種の受精卵（初期段階胚を包含する）中に導入される。異種DNAの導入は、マイクロインジェクション（例えば、アメリカ特許第4,873,191号）、レトロウイルス感染（Jaenisch, Science 240: 1468-1474 (1988)）又は胚幹（ES）細胞を用いての特定部位組み込み（Bradleyなど., Bio/Technology 10: 534-539 (1992)）を包含するいくつかの経路の1つにより達成され得る。次に、卵が、擬似妊娠雌の卵管又は子宮に移植され、そして一定の期間、成長せしめられる。それらの胚系において前記導入されたDNAを担持する子孫は正常なメンデルの法則でそれらの子供にDNAを伝達することができ、トランスジェニック集団の開発を可能にする。

10

【 0 1 3 1 】

トランスジェニック動物を生成するための一般的な方法は、当業界において知られている。例えば、下記文献及び特許を参照のこと：Hogan など., Manipulating the Mouse Embryo; A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 1986; Simons など., Bio/Technology 6: 179-183 (1988); Watl など., Biol. Reprod. 32: 645-651 (1985); Buhier など., Bio/Technology 8: 140-143 (1990); Ebert など., Bio/Technology 9: 836-838 (1991); Krimpenfortなど., Bio/Technology 9: 844-847 (1991); Wall など., J Cell. Biochem. 49: 113-120 (1992); アメリカ特許第4,873,191号及び第4,873,316号；WIPO公開WO88/00239号、WO90/05188号、WO92/11757号；及びGB87/00458号（それらの引用により本明細書に組み込まれる）。

20

【 0 1 3 2 】

哺乳類及びそれらの胚細胞中に外来性DNA配列を導入するための技法は、本来、マウスにおいて開発された。例えば、Gordonなど., Pro. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7380-7384 (1980); Gordon and Ruddle, Science 214: 1244-1246 (1981); Palmiter and Brinster, Cell 41: 343-345 (1985); Brinsterなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442 (1985); 及びHoganなど. (前記)を参照のこと。従って、それらの技法は、より大きな動物、例えば家畜種による使用のために適合された（例えば、WIPO公開WO88/00239号、WO90/05188号、及びWO91/11757号；及びSimonsなど., Bio/Technology 6: 179-183 (1988)を参照のこと）。

30

【 0 1 3 3 】

要約すると、トランスジェニックマウス又は家畜の生成に今日まで使用されて来た最も効果的な経路においては、興味あるDNAの数百の線状分子が、確立された技法に従って、受精された卵の前核の1つの中に注入される。接合体の細胞中へのDNAの注入がまた使用され得る。トランスジェニック植物における生成もまた使用され得る。発現は一般化されるか、又は特定の器官、例えば塊茎に向けられ得る。Hiatt, nature 344: 469-479 (1990) ; Edelbaumなど., J. Interferon Res. 12: 449-453 (1992); Sijmons など., Bio/Technology 8: 217-221 (1990); 及びヨーロッパ特許局EP255,378号を参照のこと。

40

【 0 1 3 4 】

本発明に従って生成されたFVIIは、抗 - FVII抗体カラム上での親和性クロマトグラフィーにより精製され得る。好ましくは、免疫吸着カラムは、高い特異性のモノクローナル抗体を含んで成る。Wakabayashiなど., J. Biol. Chem. 261: 11097-11108, (1986) 及びThim など., Biochem. 27: 7785-7793, (1988) (引用により本明細書に組み込まれる)により記載されるように、カルシウム - 依存性モノクローナル抗体の使用が特に好ましい。追加の

50

精製が、従来の化学的精製手段、例えば高性能液体クロマトグラフィーにより達成され得る。

【0135】

クエン酸バリウム沈殿を包含する他の精製方法は、当業界において知られており、そして本明細書に記載されるFVIIの精製に適用され得る（一般的には、Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982を参照のこと）。少なくとも約90~95%の均質性の実質的に純粋なFVIIが好ましく、そして98~99%又はそれ以上の均質性が医薬使用のためには、最も好ましい。所望により、部分的に又は均質性に精製されると、FVIIは治療的に使用され得る。

【0136】

一本鎖FVIIの活性二本鎖FVIIaへの転換は、Hedner and Kisiel (1983, J. Clin. Invest. 71: 1836-1841)により記載のようにして、第XIIa因子を用いて、又はトリプシン様特異性を有する他のプロテアーゼ (Kisiel and Fujikawa, Behring Inst. Mitt. 73: 29-42, 1983) により達成され得る。他方では、FVIIは、それを、イオン交換クロマトグラフィーカラム、例えばモノQ. RTM. (Pharmacia Fire Chemicals) 又は同様のもの (Bjoemなど., 1986, Research Disclosures 269: 564-565) に通すことによって活性化され得る。本発明のFVII分子及びその医薬組成物は、血管内凝固を包含する種々の状態を処理するためにヒトへの投与のために特に有用である。

【0137】

本発明のビタミンK - 依存性タンパク質は、一定の型の血友病を処理するために使用され得る。血友病Aは、活性第VII因子、第VIIa因子の不在、又は第VIII因子に対するインヒビターの存在により特徴づけられる。血友病Bは、活性第IX因子、第IXa因子の不在、FVII欠失により特徴づけられるが、但しまれであるが、第VII因子投与に十分に応答する (Bauer, K. A., 1996, Haemostasis, 26: 155, suppl. 1)。第VIII因子置換療法は、ある患者において高い力価の阻害第VIII因子抗体の開発のために制限される。

【0138】

他方では、FVIIaは、血友病A及びBの処理に使用され得る。第IXa因子及び第VIIIa因子は第X因子を活性化する。第VIIa因子は、第X因子を直接的に活性化することによって、第IX及びVIII因子のための必要性を排除し、そして少数の免疫学的因果関係を有する第IX及びVIII因子欠失の問題を克服することができる。

本発明は次の例によりさらに例示されるが、但しそれらの例は、本発明の範囲を制限するものではない。前述の記載及び次の例に開示される特徴は、種々の型で本発明を実現するための材料であり得る。

【0139】

実施例

例1. CHO - K1細胞におけるFVII及びFVIIプロペプチドの同時発現

ヒトFVIIの発現のためのプラスミドベクターpLN174は記載されている (Person and Nielsen, 1996, FEBS Lett. 385: 241-243)。手短に言及すれば、それは、挿入されたcDNAの転写のためのマウスメタロチオネインプロモーターの制御の下でのプロペプチドを包含するヒトFVIIをコードするcDNAヌクレオチド配列、及び選択マーカーとしての使用のためのSV40初期プロモーターの制御下でのマウスジヒドロ葉酸レダクターゼcDNAを担持する。

【0140】

γ - カルボキシル化認識配列をコードするプラスミドベクターの構成に関しては、そのプロペプチドを包含するFVIIをコードするcDNAを包含するクローニングベクターpBluescript II KS+ (Stratagene) を使用した (pLN171) (Perssonなど., 1997, J. Biol. Chem. 272: 19919-19924)。停止コドンコードするヌクレオチド配列を、クローニングベクターに基づく逆PCR - 介在性変異誘発により、FVIIのプロペプチドの後に、FVIIをコードするcDNA中に挿入した。鋳型プラスミドを、NaOHによる処理、続いて、次のプライマーを用いて、Pwo (Boehringer-Mannheim) 及びTaq (Perkin-Elmer) ポリメラーゼによるPCRにより変性した：

a) 5' - AGC GTT TTA GCG CCG GCG CCG GTG CAG GAC - 3' (配列番号19) ;

b) 5' - CGC CGG CGC TAA AAC GCT TTC CTG GAG GAG CTG CGG CC - 3' (配列番号20)。

【0141】

得られる混合物を、残留鑄型DNAを消化するために、DpnIにより消化し、そしてE. コリを、PCR生成物により形質転換した。クローンを、配列決定することによって、突然変異の存在についてスクリーンした。正しいクローンからのcDNAを、BamHI - EcoRIフラグメントとして、発現プラスミドpcDNA3 (Invitrogen) にトランスファーした。得られるプラスミドを、pLN329と命名した。

【0142】

CHO K1細胞 (ATCC CCL61) を、Fugene6方法 (Boehringer-Mannheim) を用いて、等量のpLN 174及びpLN329によりトランスフェクトした。トランスフェクタントを、メトトレキセートを1 µMまで、及びG-418を0.45mg/mlまで添加することにより選択した。トランスフェクタントのプールを、制限希釈によりクローン化し、そしてそしてそのクローンからのFVII発現を決定した。

【0143】

高い生成性クローンをさらに、サブクローン化し、そして10% ウシ胎児血清を含むダルベッコ変性イーグル培地において2.4pg/細胞/日の特異的FVII発現をクローンE11を選択した。クローンを、市販のCHO培地 (JRH Bioscience) における血清フリー懸濁培養に適合した。

適合された細胞を、回転培養において連続的に増殖し、そして細胞数の上昇につれて、体積を、新規培養物の添加により高めた。

25日後、6 Lの回転培養物を、50Lのバイオリアクター中に接種した。細胞をそのバイオリアクターにおいて増殖し、そして細胞数の上昇につれて、体積を、新規培地の添加により徐々に高めた。

【0144】

最終的に、50Lの種培養物を、マクロ多孔性Cytopore1キャリアー (Pharmacia) を含む500 Lの生成バイオリアクター中に接種し、この後、それはその懸濁細胞はキャリアーに固定されるようになる。培養物を、7.0 ~ 7.1のpH及び50%飽和の溶解された酸素均衡 (DOT) で、36 で維持した。バイオリアクターにおける体積を、細胞数の上昇につれて、新しい培地の添加により徐々に高めた。

【0145】

細胞密度が約 $10 \sim 2 \times 10^5$ 個の細胞/mlに達する場合、生成相を開始し、そして培地交換を24時間ごとに行い；攪拌を停止し、細胞包含キャリアーの沈殿を可能し、そして次に、培養上清液の80%を収穫し、そして新しい培地により交換した。収穫された培養上清液を濾過し、獲得されなかった細胞 (すなわち、キャリアーに固定されなかった細胞) 及び細胞残骸を濾過し、そして次に、さらなるプロセッシングのためにトランスファーした。生成相の間、細胞は $2 \sim 3 \times 10^7$ 個の細胞/ml及び8mgの第VII因子/Lの力価に達した。

【0146】

例2 . FVII発現CHO - K1細胞、及びFVII及び遊離FVIIプロペプチドを同時発現する細胞の比較

CHO - K1細胞を、例1に記載のようにして、pLN174及び1) 空のpcDNA3.1+ベクター、又はpcDNA3.1+中、FVIIプロペプチドによりトランスフェクトした。トランスフェクタントのプールを、FVII発現及び細胞数について分析した。FVII収率/細胞/24時間が図3に概略されている。その結果は、FVIIプロペプチドの同時発現が、約1 pg/細胞/日から4 pg/細胞/日まで、FVII収率/細胞を高めることを示す。結果は図3に示される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、正しくプロセッシングされたヒト凝固FVIIの構造、アミノ酸1 ~ 406、並びにγ - カルボキシル化されたGlu - 残基 (γ) 及びグリコシル化 (*) を示す。アミノ酸残基152での矢印は、一本鎖FVIIが切断され、活性された二本鎖FVII (FVIIa) に転換される部位を示す。

【図 2】 図 2 は、遊離プロペプチドの発現及び連結されたプロペプチドと共に組換えヒトFVIIの発現のためのプラスミドの構成を示す。プラスミドpLN171及びpLN174は、天然においてFVIIに関連する、連結されたプロペプチドと共にヒトFVIIを発現する。プラスミドpLN329は、遊離プロペプチドのみを発現するために天然においてFVIIに関連するプロペプチドの後に、FVIIをコードするcDNA中に挿入された停止コドンを含む。

【図 3】 図 3 は、FVIIを発現するCHO - K 1 細胞（対照）、及びFVII及び遊離プロペプチド（FVIIプロペプチド）を同時発現する細胞の比較を示す。結果は、pgFVII発現/細胞/日で示される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Novo Nordisk A/S

<120> Method for the Production of Vitamin K-Dependent Proteins

<130> 6270-WO

<160> 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Val Phe Leu Ser Arg Glu Gln Ala Asn Gln Val Leu Gln Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn Asn Ile Leu Ala Arg Val
1 5 10 15

Thr Arg

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Pro Phe Ile Asn Arg Arg Asn Ala Asn Thr Phe Ile Ser Pro Gln
1 5 10 15

Gln Arg

10

20

30

40

<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Asn Phe Leu Ser Lys Gln Gln Ala Ser Gln Val Leu Val Arg Lys
1 5 10 15

Arg Arg

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Arg Val Phe Leu Thr Gly Glu Lys Ala Asn Ser Ile Leu Lys Arg Tyr
1 5 10 15

Pro Arg

<210> 6
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

His Val Phe Leu Ala Pro Gln Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val
1 5 10 15

Arg Arg

<210> 7
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg

10

20

30

<210> 8
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro
1 5 10 15

Lys Arg

<210> 9
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Ser Val Phe Ser Ser Ser Glu Arg Ala His Gln Val Leu Arg Ile Arg
1 5 10 15

Lys Arg

<210> 10
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 10

Ala Ala Phe Val Ser Lys Gln Glu Ala Ser Glu Val Leu Lys Arg Pro
1 5 10 15

Arg Arg

<210> 11
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 11

Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Gly His Gly Val Leu His Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg

10

20

30

<210> 12
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 12

Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala Arg Gly Val Leu His Arg Arg
 1 5 10 15

Arg Arg

<210> 13
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 13

Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala Lys Gly Val Leu His Arg Arg
 1 5 10 15

Arg Arg

<210> 14
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 14

Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala Leu Gly Val Leu His Arg Arg
 1 5 10 15

Arg Arg

<210> 15
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 15

Ala Val Phe Ser Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg
 1 5 10 15

Arg Arg

10

20

30

<210> 16
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val Leu His
1 5 10

<210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 17

Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn
1 5 10

<210> 18
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Val Phe Ser Ser Ser Glu Arg Ala His Gln Val Leu Arg
1 5 10

20

<210> 19
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 19

agcgttttag cgccggcgcc ggtgcaggac

30

<210> 20
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

30

<400> 20

cgccggcgct aaaacgcttt cctggaggag ctgcggcc

38

【 図 2 】

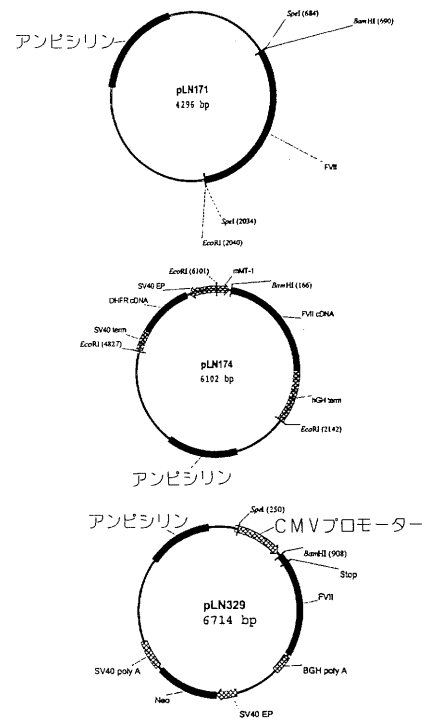


Fig. 2

F V II 発現 CHO-K 1 細胞 (対照), 及び F V II 及び遊離 F V II プロペプチド (F V II プロペプチド) を同時発現する細胞の比較。結果は, pg での F V II 発現/細胞/日で示される。

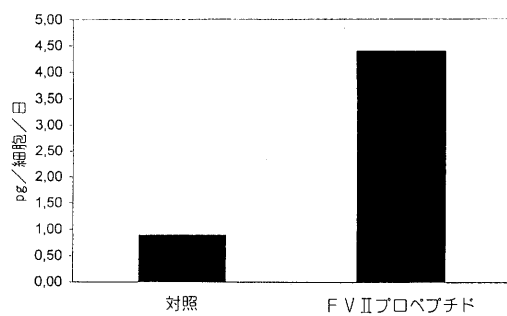


Fig. 3

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 PA 2001 00262
(32)優先日 平成13年2月16日(2001.2.16)
(33)優先権主張国 デンマーク(DK)
(31)優先権主張番号 60/271,581
(32)優先日 平成13年2月26日(2001.2.26)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 PA 2001 00430
(32)優先日 平成13年3月14日(2001.3.14)
(33)優先権主張国 デンマーク(DK)
(31)優先権主張番号 60/276,322
(32)優先日 平成13年3月16日(2001.3.16)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 2001 00751
(32)優先日 平成13年5月14日(2001.5.14)
(33)優先権主張国 デンマーク(DK)
- (74)代理人 100108903
弁理士 中村 和広
(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100082898
弁理士 西山 雅也
(72)発明者 ニコライセン, エルセ マリエ
デンマーク国, デーコー - 2 0 0 0 フレデリクスベルウ, # 5 0 3, マリエンドルスバイ 2
3 アー
(72)発明者 ニエルセン, ラルス セーガールズ
デンマーク国, デーコー - 2 9 9 0 ニボー, ニボーバルク 5 8

審査官 松田 芳子

- (56)参考文献 特開平05 - 508551 (JP, A)
Biochemistry, 1999年, Vol.38, p.15681-7

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/09