(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4813603号
(P4813603)

(45)発行日　平成23年11月9日(2011.11.9)　(24)登録日　平成23年9月2日(2011.9.2)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	ZNA
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	
C07K 14/745	(2006.01)	C07K	14/745	
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C

請求項の数 26　(全 69 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-543483 (P2009-543483)
(86)(22)出願日　平成19年12月28日 (2007.12.28)
(65)公表番号　特表2010-514433 (P2010-514433A)
(43)公表日　平成22年5月6日 (2010.5.6)
(86)国際出願番号　PCT/EP2007/064644
(87)国際公開番号　WO2008/080989
(87)国際公開日　平成20年7月10日 (2008.7.10)
審査請求日　平成22年12月20日 (2010.12.20)
(31)優先権主張番号　06380342.3
(32)優先日　平成18年12月29日 (2006.12.29)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

早期審査対象出願

(73)特許権者　508036503
スロムボターゲッツ、エウロペ、ソシエダッド、リミターダ
THROMBOTARGETS EUROPE, S. L.
スペイン国バルセロナ、カステルデフェルス、２ア、プランタ、エディフィシオ、ベ６、アビングーダ、デル、カナル、オリンピク、エセ／エネ、パルク、メディテラニ、デ、ラ、テクノロヒア
(74)代理人　100075812
弁理士　吉武　賢次
(74)代理人　100091487
弁理士　中村　行孝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】止血活性を有する組換え酵母由来の微小胞およびその使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
組織因子（ＴＦ）を担持し、かつ凝固促進活性を有する酵母由来の微小胞であって、（ｉ）酵母膜と、（ｉｉ）組織因子（ＴＦ）タンパク質、凝固促進活性を有するその変異体または凝固促進活性を有するそれらのフラグメントとを含んでなり、該組織因子（ＴＦ）タンパク質、凝固促進活性を有するその変異体または凝固促進活性を有するそれらのフラグメントの一部が該膜に組み込まれている、酵母由来微小胞。
【請求項２】
前記ＴＦ因子タンパク質または凝固促進活性を有するその変異体がグリコシル化されている、請求項１に記載の酵母由来微小胞。
【請求項３】
前記ＴＦ因子タンパク質、凝固促進活性を有するその変異体または凝固促進活性を有するそれらのフラグメントが融合タンパク質のメンバーであり、該融合タンパク質が、別のペプチドまたはタンパク質を含んでなる第二の領域と結合された、ＴＦタンパク質、凝固促進活性を有する変異体または凝固促進活性を有するそれらのフラグメントを含んでなる第一の領域を含有するものである、請求項１または２に記載の酵母由来微小胞。
【請求項４】
前記融合タンパク質が、ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するその変異体とタグを含んでなるものである、請求項３に記載の酵母由来微小胞。
【請求項５】

前記タグがヒスチジンタグ（Ｈｉｓ－タグ）である、請求項４に記載の酵母由来微小胞。

【請求項６】

成熟ＴＦタンパク質、好ましくはヒト成熟ＴＦタンパク質を含んでなる、請求項１～５のいずれか一項に記載の酵母由来微小胞。

【請求項７】

凝固促進活性を有する末端切断型ＴＦタンパク質を含んでなり、該末端切断型ＴＦタンパク質が、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメイン（ａａ３２～１７４）の全部または一部を欠いている、請求項１～６のいずれか一項に記載の酵母由来微小胞。

【請求項８】

前記末端切断型ＴＦタンパク質が、因子Ｘに対する相互作用ドメイン、膜貫通領域および細胞質テールを含んでなり、かつ、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインを部分的にまたは完全に欠いている、請求項７に記載の酵母由来微小胞。

【請求項９】

前記末端切断型ＴＦタンパク質が、ヒトＴＦの因子Ｘに対する相互作用ドメイン（ａａ１７４～２５１）、膜貫通領域（ａａ２５２～２７４）および細胞質テール（ａａ２７５～２９５）、ならびに付加的ヒスチジンタグを含んでなる、請求項８に記載の酵母由来微小胞。

【請求項１０】

前記ＴＦが少なくとも１つの非機能的Ｎ－グリコシル化部位を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の酵母由来微小胞。

【請求項１１】

前記非機能的Ｎ－グリコシル化部位が、成熟ヒトＴＦタンパク質のＮ－グリコシル化部位である１１～１３番のＮＬＴ、１２４～１２６番のＮＶＴまたは１３７～１３９番のＮＮＴに相当するものである、請求項１０に記載の酵母由来微小胞。

【請求項１２】

前記ＴＦが、成熟ヒトＴＦタンパク質における１１、１２４または１３７番に相当する位置のＡｓｎ残基において１以上のＡｓｎからＡｌａへの変異を有する、請求項１１に記載の酵母由来微小胞。

【請求項１３】

前記ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するその変異体のＮ末端ドメインが、前記膜の外質側に面している、請求項１～１２のいずれか一項に記載の酵母由来微小胞。

【請求項１４】

前記ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するその変異体のＮ末端ドメインが、前記膜の内質側に面している、請求項１～１２のいずれか一項に記載の酵母由来微小胞。

【請求項１５】

請求項１～１４のいずれか一項に記載のＴＦ担持酵母由来微小胞を含んでなる、組成物。

【請求項１６】

薬剤としての、請求項１～１４のいずれか一項に記載のＴＦ担持酵母由来微小胞。

【請求項１７】

凝固促進活性を有する薬剤としての、請求項１６に記載のＴＦ担持酵母由来微小胞。

【請求項１８】

請求項１～１４のいずれか一項に記載のＴＦ担持酵母由来微小胞と薬学上許容されるビヒクルとを含んでなる、医薬組成物。

【請求項１９】

被検体における出血の処置のための、請求項１～１４のいずれか一項に記載のＴＦ担持酵母由来微小胞。

【請求項２０】

被検体における出血の局所的処置のための、請求項１９に記載のＴＦ担持酵母由来微小

胞。
【請求項２１】
被検体において細胞遊走および／または脈管形成を促進する必要がある疾病を処置するための、請求項１～１４のいずれか一項に記載のＴＦ担持酵母由来微小胞。
【請求項２２】
請求項１に記載の凝固促進活性を有するＴＦ担持酵母由来微小胞を製造する方法であって、
ａ）ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントを発現する組換え酵母細胞の培養物を、該ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントの発現を可能とする条件下での発酵に供すること；
ｂ）工程ａ）の発酵から生じた生成物をペレット化して発酵生成物とすること；
ｃ）工程ｂ）からの発酵生成物にホモジナイゼーションを施して発酵ホモジネートとすること；および
ｄ）工程ｃ）からの発酵ホモジネートに分離を施して、ペレットと、凝固促進活性を有する該ＴＦ担持酵母由来微小胞を含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ）とすること；
ｅ）凝固促進活性を有するＴＦ担持酵母由来微小胞を含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ）を回収すること；および、所望により、
ｆ）望ましければ、凝固促進活性を有するＴＦ担持酵母由来微小胞を単離または精製すること
を含んでなる、方法。
【請求項２３】
前記精製がタグ精製またはイムノアフィニティークロマトグラフィーによって行われる、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
目的の膜タンパク質を含んでなる微小胞を真核宿主細胞から製造するための方法であって、目的のタンパク質が組換えＴＦタンパク質、そのフラグメントまたはそのＮ－グリコシル化変異体であり、以下の工程：
ａ）該真核宿主細胞の培養物を、目的の膜タンパク質の発現を可能とする条件下で増殖させる工程；
ｂ）ａ）の培養物の細胞画分にホモジナイゼーションを施す工程；
ｃ）工程ｂ）から得られたホモジネートに分離を施して、ペレットと、目的の膜タンパク質を含有する該細胞由来微小胞を含有する清澄細胞抽出液とする工程；および
ｄ）該細胞由来微小胞を、タンジェンシャルフロー濾過を用い、かつ／または直径０．１～０．２μｍの微小胞を保持する膜フィルターを用いるサイズ分画により精製する工程を含んでなる、方法。
【請求項２５】
サイズ排除クロマトグラフィーによるさらなる濃縮工程、または目的の膜タンパク質に対して親和性を示すリガンドを用いたアフィニティークロマトグラフィーによるさらなる精製工程を含んでなる、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
前記宿主細胞が酵母細胞である、請求項２４または２５に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【発明の背景】
【０００１】
技術分野
本発明は、一般に、凝固促進薬を用いた被検体の出血の処置に関する。より詳しくは、本発明は、酵母膜と組織因子タンパク質もしくはそのフラグメント、または凝固促進活性を有する融合タンパク質として別のタンパク質と融合された組織因子タンパク質またはそのフラグメントとを含んでなる組織因子担持酵母由来微小胞、ならびに被検体において出血を処置するため、および脈管形成および細胞遊走を促進するために有用な凝固促進薬と

してのその適用に関する。本発明はさらに、該組織因子担持酵母由来微小胞の製造方法に関する。

【０００２】

背景技術

止血は、生物が出血に応答する機構であり、傷害直後に機能的となるプロセスと長時間活性を留めるプロセスの２つのプロセスの関与を含む。１つ目のものは一次止血として知られ、血管傷害部位における血管収縮の発生と血小板凝集塊の形成を特徴とする。２つ目のものは二次止血として知られ、種々の凝固カスケードタンパク質分解酵素の作用のために繊維素血餅が形成される段階である。

【０００３】

この血液凝固プロセスの第二段階には、いくつかの補因子とタンパク質分解酵素が関与し、総て凝固因子と呼ばれ、いくつかの段階からなり、トロンビンの作用によるフィブリノゲン加水分解からの繊維素形成で終わる。トロンビンは、アポ酵素であるプロトロンビンのタンパク質分解性加水分解により事前に形成される。このタンパク質分解は活性化された凝固因子Ｘ（ＦＸａ）により起こるが、この因子は活性化された血小板の表面に、その補因子、活性化された凝固因子Ｖ（ＦＶａ）およびカルシウムイオンの存在下でのみ結合し、プロトロンビンを加水分解することができる。凝固因子Ｘ（ＦＸ）の活性化は、内因性経路と外因性経路の２つの独立した経路で起こり得る。

【０００４】

内因性経路は、各プロ酵素が加水分解されてその活性プロテアーゼ型を生じる一連の反応からなる。各段階では、新しく形成されたタンパク質分解酵素が以降のプロ酵素の活性化を触媒して首尾よく活性型を生じる。

【０００５】

血液凝固の外因性経路では、傷害部位の外膜細胞に曝された組織因子（ＴＦ）が循環凝固因子ＶＩＩ／活性化凝固因子ＶＩＩ（ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ）と結合してＴＦ：：ＦＶＩＩａ複合体を形成し、それがカルシウムの存在下で、ＦＸの活性化が起こるように基質として働く。この外因性経路は、現在、血液凝固における最も関連のある経路と考えられており、血管傷害によって起こる出血事象では、ＴＦとそのリガンドであるＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａの相互作用を含む外因性経路の活性化によって凝固が誘発されることが受け入れられている。

【０００６】

ＴＦは、タンパク質成分（これまでには組織因子アポタンパク質－ＩＩＩと呼ばれていた）とリン脂質からなる。ＴＦは、ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａと特異的に結合し、血液凝固の外因性経路に関連のある役割を果たす。ＴＦに割り当てられている生理学的役割はよく知られており、一方、それはＦＶＩＩａに特異的な受容体であり、一度、ＴＦ：：ＦＶＩＩａ複合体が形成されると、ＦＸの活性化が起こるように基質として働く。実際、血管傷害後、通常は血管の外を取り巻いている外膜細胞の表面に隔離されているＴＦが、血管内に存在するそのリガンドであるＦＶＩＩと接触して相互作用するようになり、ＴＦ：：ＦＶＩＩ複合体が形成される。一度、この複合体が形成されると、ＦＶＩＩの自己活性化が起こり、その活性型（ＦＶＩＩａ）が生じる。

【０００７】

グリコシル化は、脂質およびタンパク質に糖類が付加される酵素により指示される部位特異的プロセスである。このプロセスは安定性、折りたたみおよび輸送に関与すると考えられるが、ＴＦに関してその真の機能の証拠はまだ記載されていない。

【０００８】

ＴＦが、凝固が開始される中枢を担う主要な要素であることは広く受け入れられている。凝固の開始には、ＦＸが活性化され、プロトロンビンの加水分解が始まることが絶対必要である。このＦＸａの供給源は主として、ＦＶＩＩａとその受容体であるＴＦの相互作用にあるとされてきた。

【０００９】

ＴＦの精製は、ヒト脳、ウシ脳、ヒト胎盤、ヒツジ脳および肺などの種々の組織から報告されている。ＴＦタンパク質の構造には種間で違いがあるが、in vitro凝固アッセイによって評価した場合、機能的な違いはないことが広く受け入れられている。

【００１０】

生物活性を実証するためには、ＴＦはin vitroでリン脂質と会合されなければならないことが広く受け入れられている。例えばホスホリパーゼの使用によりＴＦのリン脂質成分を除去すると、そのin vitro生物活性が消失することが示されている。再脂質化するとin vitroＴＦ活性が回復し得る。

【００１１】

ある量の「精製」ＴＦタンパク質は種々の組織から得られたものが利用可能であるが、血液および組織中のＴＦタンパク質が低濃度であること、および組織からこのタンパク質を精製するコストが、経済的にも労力的にも高くつくことから、これは十分な材料ではない。従って、ＴＦタンパク質、有利には脂質化ＴＦタンパク質の別の供給源を探す必要がある。

【００１２】

ＴＦタンパク質は、クローニングされたヒトｃＤＮＡを用いて種々の系で発現されている。例えば、大腸菌(E. coli)におけるＴＦタンパク質の過剰発現が報告されている(Paborsky et al., Biochemistry 28, 8072 (1989))。さらに、米国特許第６，２６１，８０３号は、原核宿主生物において機能的組換えＴＦを産生する方法を開示している。完全なＴＦタンパク質の高い発現収量が大腸菌で達成されている。

【００１３】

大腸菌におけるタンパク質の異種発現はいくつかの有利な点があるが、この細菌での真核生物タンパク質の発現には、主として発現されるタンパク質がグリコシル化されている真核生物タンパク質である場合に、細菌にそれら固有のグリコシル化系が無いために、数多くの問題が伴う。

【００１４】

よって、もう１つの戦略は、膜貫通ドメインを欠いている変異ＴＦタンパク質を発現させることからなる。このいわゆる「可溶」ＴＦ（または「末端切断型」ＴＦ）は、細菌細胞の細胞質に蓄積し、比較的大量に発現させることができる。しかしながら、この系では、このようにして発現されるＴＦタンパク質が通常、大腸菌中に、いわゆる封入体の形態の準結晶状態で存在する。これがその場合である時には、極めて大量のカオトロピック剤を用いることで、これらの封入体を可溶化させ、このようにして単量体化されたタンパク質を次に、もう一度、再折りたたみして活性のある復元型(renatured confirmation)にしなければならず、多大な労力がかかり、通常収量も低い。さらに、原則的に、可溶性ＴＦは、リン脂質との相互作用のためのドメインを欠いているので、プロトロンビン時間測定試薬に用いるのに適さない。

【００１５】

ＴＦタンパク質を過剰発現させるためのもう１つのアプローチは、遺伝子融合生成物（例えば、β－ガラクトシダーゼ、ＭａｌＥ、グルタチオントランスフェラーゼ、Ｈｉｓ－タグなどとの）をコードする既知かつ首尾よく使用される多数の発現系を使用するものである。しかしながら、これらの系は、生物学的に活性なＴＦを発現するのには適さない。このような系を用いた場合、発現生成物は検出可能であり、その発現レベルも増強可能であるが、このようにして得られた発現生成物は完全な機能欠失と関連し、巧妙な復元法を用いても復元することができない。

【００１６】

大腸菌におけるＴＦタンパク質の過剰発現の問題は、真核生物系で該タンパク質の発現を行うことによって回避することができる。よって、酵母細胞、ベクターとしてバキュロウイルスを用いる昆虫細胞培養物、または培養哺乳類細胞、例えば、ハムスター卵巣細胞もしくはヒト細胞系統での発現が原則的に好適である。しかしながらこれらの系には重大な欠点があり、とりわけ、組換え大腸菌生産に比べて組換えタンパク質収量がはるかに低

い。
【００１７】
酵母株は、上記の異なる宿主系の利点を併せ持つ。一方で、それらは真核生物タンパク質の本来の生理学を大腸菌よりも厳密に模倣し、他方で、取扱いが容易、培養が容易であり、増殖がはるかに速く、経済性が優れている。同様に、いくつかの因子が酵母でのタンパク質発現に影響を及ぼす。これらの因子としては、限定されるものではないが、以下のものがある：
・異種タンパク質の発現を制御するプロモーターなどの遺伝子調節配列の選択；異種発現を制御するために用いられるプロモーター配列は一般に「強力」でなければならず、すなわち、それらは極めて高いタンパク質発現を果たさなければならず、まず、培養物の最適バイオマスに達するまで発現が効率的に抑制され、その後、すぐさまスイッチが入ってタンパク質発現を果たすように適宜制御可能でなければならない。
・発現された異種タンパク質の効率的分泌；発現されたタンパク質の分泌（細胞外発現）は多くの場合、細胞内発現よりも好ましく、細胞内発現は、まず、細胞を破壊開放し、全細胞内容物を放出させ、その後、細胞材料や残渣の汚水から目的のタンパク質を単離することを必要とする。そして、タンパク質のいっそう効率的な分泌は、（ｉ）シグナル配列－ペプチド配列（通常、本来分泌されるＮ末端領域であり、タンパク質を細胞分泌経路へ向ける）の選択、および（ｉｉ）シグナル配列と相互作用し、付着したタンパク質の分泌を果たす分泌経路の特異的成分を含むいくつかの因子に依存する。
【００１８】
Stone M.J. et al (Biochem. J. (1995) 310, 605-614)は、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)におけるＴＦの表面ドメイン（末端切断型ＴＦ）の発現を記載している。ＴＦの精製に関しては、抗ＴＦ抗体をコンジュゲートさせたイムノアフィニティーカラムに培養物をのせ、タンパク質を溶出させ、透析する。このアッセイにより、ミリグラム量の末端切断型ＴＦを得ることができる。
【００１９】
Brucato CL. et al. (Protein Expression and Purification 26 (2002), 386-393)は、ピキア・パストリス(Pichia pastoris)における成熟全長組換えウサギＴＦタンパク質の発現を記載している。ＴＦタンパク質の精製は固定化金属アフィニティークロマトグラフィーによって行われる。
【００２０】
酵母から高収率で大量の生物学的に活性組換えＴＦを製造するためにこれまで知られている方法はない。有利には、該組換えＴＦは、高レベルの活性、好ましくは治療使用のために好適なレベルの活性で得なければならない。ゆえに、本発明の目的は、組換え技術を用いて有用な量の脂質化ＴＦタンパク質を生成することである。有利には、該組換えＴＦタンパク質は治療適用に有用でなければならない。
【発明の概要】
【００２１】
第一の態様において、本発明は、組織因子（ＴＦ）を担持する酵母由来の微小胞であって、（ｉ）酵母膜と、（ｉｉ）組織因子（ＴＦ）タンパク質または凝固促進活性を有するその変異体とを含んでなり、該組織因子（ＴＦ）タンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントの一部が該膜に組み込まれている、酵母由来微小胞に関する。
【００２２】
さらなる態様において、本発明は、ＴＦ担持酵母由来微小胞を含んでなる組成物、薬剤としてのＴＦ担持酵母由来微小胞、ＴＦ担持酵母由来微小胞を含んでなる医薬組成物、被検体における出血の処置のためのＴＦ担持酵母由来微小胞、および被検体において細胞遊走および／または脈管形成を促進する必要がある疾病を処置するためのＴＦ担持酵母由来微小胞に関する。
【００２３】
さらなる態様において、本発明は、本発明の凝固促進活性を有するＴＦ担持酵母由来微

小胞を製造する方法に関し、その方法は、
ａ）ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントを発現する組換え酵母細胞の培養物を、該ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントの発現を可能とする条件下での発酵に供する工程；
ｂ）工程ａ）の発酵から生じた生成物をペレット化して発酵生成物とする工程；
ｃ）工程ｂ）からの発酵生成物にホモジナイゼーションを施して発酵ホモジネートとする工程；および
ｄ）工程ｃ）からの発酵ホモジネートに分離を施して、ペレットと、凝固促進活性を有する該ＴＦ担持酵母由来微小胞を含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ）とする工程；
ｅ）凝固促進活性を有するＴＦ担持酵母由来微小胞を含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ）を回収する工程；および、所望により、
ｆ）望ましければ、凝固促進活性を有するＴＦ担持酵母由来微小胞を単離または精製する工程
を含む。

【００２４】
さらなる態様において、本発明は、目的の膜タンパク質を含んでなる微小胞を真核宿主細胞から製造するための方法に関し、その方法は、
ａ）該真核宿主細胞の培養物を、目的の膜タンパク質の発現を可能とする条件下で増殖させる工程；
ｂ）ａ）の培養物の細胞画分にホモジナイゼーションを施す工程；
ｃ）工程ｂ）から得られたホモジネートに分離を施して、ペレットと、目的の膜タンパク質を含有する該細胞由来微小胞を含有する清澄細胞抽出液とする工程；および
ｄ）該細胞由来微小胞をサイズ分画により精製する工程
を含む。

【００２５】
別の態様において、本発明は、
（ｉ）凝固促進活性を有する、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインの全部または一部を欠いている末端切断型組織因子（ＴＦ）、
（ｉｉ）ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインが機能的でない、凝固促進活性を有するＴＦタンパク質変異体、および
（ｉｉｉ）少なくとも１つの非機能的Ｎ－グリコシル化部位を有する、凝固促進活性を有するＴＦタンパク質変異体
の群から選択される、修飾組織因子（ＴＦ）脂質化タンパク質に関する。

【００２６】
さらなる態様において、本発明は、薬剤として用いるための本発明の修飾ＴＦ脂質化タンパク質、修飾ＴＦ脂質化タンパク質と薬学上許容されるビヒクルを含んでなる医薬組成物、被検体における出血の処置のため、および被検体において細胞遊走および／または脈管形成を促進する必要がある疾病を処置するための修飾ＴＦ脂質化タンパク質に関する。

【００２７】
さらなる態様において、本発明は、凝固促進活性を有する、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインの全部または一部を欠いている末端切断型組織因子（ＴＦ）をコードする、また、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインが機能的でない、凝固促進活性を有するＴＦタンパク質変異体をコードする、また、少なくとも１つの非機能的Ｎ－グリコシル化部位を有する、凝固促進活性を有するＴＦタンパク質変異体をコードするポリヌクレオチド配列に関する。

【００２８】
本発明はまた、本発明のポリヌクレオチド配列を含んでなるベクター、本発明のポリヌクレオチドを含んでなる宿主細胞、および本発明の修飾ＴＦタンパク質と特異的に結合する抗体に関する。

【図面の簡単な説明】

【００２９】
【図１】ｐＴＴ１０３０１の作製のためのクローニング戦略を示す。図１Ａは、ｐＴＴ１０３０１プラスミドのマップを示す。ＧＰＤプロモーター（ｐＧＰＤ）、ユニークなＢａｍＨ１部位およびＰＧＫターミネーター（ＰＧＫｔ）を含む１，０５０ｂｐのＤＮＡフラグメントを、ＨｉｎｄＩＩＩおよびＸｂａＩ　ＤＮＡ制限酵素で消化した後にプラスミドｐＧ１から切り出した。このＤＮＡフラグメントをアガロースゲル電気泳動により単離し、ＤＮＡ抽出キット(Qiagen)で精製し、予めＨｉｎｄＩＩＩおよびＸｂａＩで消化したＹｅｐ３５２プラスミドにクローニングした。得られたプラスミドｐＴＴ１０３０１プラスミドを大腸菌で増殖させ、および市販のＤＮＡ精製ＪＥＴｓｔａｒキット(Genomed Gmbh)で精製した。図１Ｂは、作製されたｐＴＴ１０３０１プラスミドの制限エンドヌクレアーゼ分析を示す。
【図２】ヒトＴＦタンパク質のハイドロパシープロットを示す。このタンパク質の４つのドメイン（リーダー配列、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメイン）を示す。
【図３】ヒトＴＦタンパク質のｃＤＮＡ配列（Ｇｅｎｅ　Ｂａｎｋ　＃ＢＣ０１１０２９）を示す。オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）が開始コドン（ＡＴＧ）および終結コドン（ＴＡＡ）とともに枠で囲まれている。このｃＤＮＡ配列は、ヒトＴＦ（ｈＴＦ）タンパク質の４つのドメイン（シグナルペプチド、細胞外ドメイン、膜貫通領域および細胞質テール）を含む。矢印は、プライマーＡ［シグナルペプチドを欠き、ＴＦ　ＯＲＦのフレーム内に開始コドンＡＴＧを含む成熟ｈＴＦの最初の４つのアミノ酸をコードする上流プライマー］およびＢ［下流プライマー、太字の終結コドンを有する］（双方とも制限ＢａｍＨＩ部位（下線）を含む）のアニーリング位置を示す。
【図４】ｐＴＴ１０３０２プラスミドを作製するためのクローニング戦略の概略図を示す（図４Ａ）。ＰＣＲ反応から得られたＤＮＡフラグメントをＢａｍＨＩで消化し、予めＢａｍＨＩで消化し、脱リン酸化したｐＴＴ１０３０１プラスミドにクローニングした。得られたプラスミド（ｐＴＴ１０３０２）を大腸菌で増殖させ、市販のＤＮＡ精製ＪＥＴｓｔａｒキット（Genomed Gmbh）で精製した。図４Ｂは、作製されたｐＴＴ１０３０２プラスミドの制限分析を示す。
【図５】種々の組換え酵母クローンにおけるｒＴＦの発現を示す。エンプティプラスミドｐＴＴ１０３０１（Ｃ－）で、また、組換え成熟ｈＴＦタンパク質を含有する発現ベクターｐＴＴ１０３０２（レーン１～８）で形質転換された酵母からの抽出液のウエスタンブロット分析を、精製マウス抗ヒトＣＤ１４２モノクローナル抗体(BID Biosciences Pharmingen)を用いて行った。分子量マーカー（ｋＤａ）を図の左側に示す。
【図６】ｙＴＴ１０３０１抽出液のエンドグリコシラーゼ処理後のウエスタンブロットの結果を示す。例えば、ｒＴＦ発現酵母（ｙＴＴ１０３０１）からの抽出液を、製造業者の説明書に従い、３７℃で１時間、５００ユニットのエンドグリコシラーゼＨ（ＥｎｄｏＨ）（レーン２）またはＮ－グルコシダーゼＦ（ＰＮＧａｓｅ　Ｆ）（レーン３）で処理した。これらのサンプルおよび非処理抽出液（レーン１）を、抗ヒトＴＦｍＡｂを用い、ウエスタンブロットにより分析した。分子量マーカー（ｋＤａ）を図の左側に示す。
【図７】ｙＴＴ１０３０１組換え酵母によるｒＴＦの発現を示す共焦点レーザー顕微鏡写真である。ｒＴＦを発現する組換え酵母からのスフェロプラストを４％パラホルムアルデヒドで固定し、酵母ＡＴＰアーゼ（図７Ａ）または抗ヒトＴＦｍＡｂ（図７Ｂ）に対するｍＡｂとともにインキュベートした。フルオレセインコンジュゲート二次ヤギ抗マウス抗体とのインキュベーション後、共焦点顕微鏡（１、３、５および７）または位相差（２、４、６および８）により細胞を観察した。ＢＩＯ－ＲＡＤ　Ｒａｄｉａｎｃｅ　２０００共焦点レーザー顕微鏡で画像を採取した。
【図８】組換え酵母によるｒＴＦの発現がｐＴＴ１０３０２プラスミドの存在に依存することを示す共焦点レーザー顕微鏡写真。エンプティ発現プラスミドｐＴＴ１０３０１を担持する組換え酵母（ｙＴＴ１０３００）からのスフェロプラストを４％パラホルムアルデヒドで固定し、酵母ＡＴＰアーゼ（図８Ａ）または抗ヒトＴＦｍＡｂ（図８Ｂ）に対する

ｍＡｂとともにインキュベートした。フルオレセインコンジュゲート二次ヤギ抗マウス抗体とのインキュベーション後、共焦点顕微鏡（１および３）または位相差（２および４）により細胞を観察した。ＢＩＯ－ＲＡＤ　Ｒａｄｉａｎｃｅ　２０００共焦点レーザー顕微鏡で画像を採取した。

【図９】ｒＴＦは酵母膜に関連していることを示す。ｙＴＴ１０３０１からの抽出液をＴｒｉｔｏｎ　Ｘ１１４で処理し、遠心分離の後に水相と洗剤ペレットを別々に採取した。水相を再びＴｒｉｔｏｎ　Ｘ１１４（終濃度１％）で処理し、前記のように二層に分けた。２回目の洗剤ペレットを１回目のものと混合した。全抽出液（レーン１）、１回目（レーン２）、２回目（レーン３）の水相および洗剤相（レーン４）をＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびクーマシー染色（図９Ａ）により、またはヒトＴＦに対するｍＡｂと反応させるウエスタンブロット（図９Ｂ）により分析した。

【図１０】発酵プロセス中の主要パラメーターの進行を示すグラフ。唯一制御できないパラメーターである酸素圧（PO_2）は、このプロセス中の細胞が受ける酸素要求の変化を反映する。PO_2が定常状態に達した際に発酵を停止させた（１８時間）。

【図１１】ＣＹＥ－ＴＦを産生するための発酵プロセスの一般スキームを表す図である。

【図１２】１回目の発酵試験から得られた調製物におけるＴＦの存在を判定するためのウエスタンブロット分析の結果を示す。各レーンは、図１１に記載の手順によって得られた上清（ｓｎ）またはペレット（ｐｐ）いずれか５μｌに相当する。タンパク質サンプルを、ヒトＴＦに対する特異的ｍＡｂを用い、ウエスタンブロットにより分析した。陽性対照（ｒＴＦ）は、大腸菌で生産された市販の組換えＴＦ(American Diagnostica, Inc.)（１０ｎｇ）である。分子量マーカー（ｋＤａ）を図の左側に示す。

【図１３】ＣＹＥ－ＴＦサンプルの電子顕微鏡写真を示す。ＣＹＥ－ＴＦ生成物を、予めグロー放電により処理した炭素コーティング銅格子に吸着させた。この格子を、ｈＴＦに対する特異的ｍＡｂまたは無関連の抗体とインキュベートする１時間前に、３％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有するＰＢＳとともにインキュベートした。格子をＰＢＳでよく洗浄し、金コンジュゲートウサギ抗マウスＩｇＧ二次抗体とともにインキュベートした。格子を洗浄し、サンプルに、１％酢酸ウラニルで処理することでネガティブ染色を行った。画像はＪＥＯＬ　１２００　ＥＸＩＩ電子顕微鏡で得た。矢印はコロイド金粒子の位置を示す。

【図１４】タンジェンシャルフロー濾過(Tangential Flow Filration)によるＣＹＥ－ＴＦの明澄化手順のスキームを示す。Ａ）ＣＹＥ－ＴＦに、クロスフロー濾過システム(Sartorius sartoflow Slice 200 Benchtop)にてタンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）を施した。ＣＹＥ－ＴＦを０．４５μｍ、０．２μｍおよび０．１μｍ膜（Sartorius, ポリスルホン）で順次濾過した。これらの膜は予めリン酸バッファー（２０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７．４、５００ｍＭ　ＮａＣｌ）で平衡化した。０．２μｍ膜での濾過の後、０．１０μｍ膜の前に保持されたままとなる材料を回収し、一連の精製工程の出発材料として用いた。Ｂ）動的光散乱を用いて微小胞のサイズ分布を測定した。

【図１５】セファクリルＳ－５００カラムで行ったＣＹＥ－ＴＦ生成物のサイズ排除クロマトグラフィープロフィールを示す。溶出は４℃でリン酸バッファーを用いて行い、流速１ｍＬ／分で４ｍＬ画分を採取した。タンパク質溶出は２８０ｎｍで光学密度を測定することによりモニタリングした。

【図１６】ｒＴＦを検出するためのウエスタンブロットアッセイを示す。各画分１５μＬを１２．５％－ＳＤＳ－ＰＡＧＥ　Ｔｒｉｓ－グリシンゲルでの電気泳動に付した。電気泳動後、タンパク質をニトロセルロース膜に移した。次に、これらの膜を抗ＴＦ市販マウスモノクローナル抗体(American Diagnostica)とともに１時間インキュベートした。その後、これらの膜をウサギ抗マウスＩｇＧ抗体とともにインキュベートした後、セイヨウワサビペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体とともにインキュベートした。免疫反応性タンパク質を、ＥＣＬ　Ａｄｖａｎｃｅｄウエスタンブロッティングキット(GE Healthcare)を用い、化学発光により検出した。

【図１７】サイズ排除クロマトグラフィーにより精製されたｒＴＦを含有する、種々のロ

ットの微小胞のタンパク質プロフィールを示す。ｒＴＦを含有する種々の４つの異なるロットの精製微小胞からのタンパク質（図の上に示されている通り）をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分画し、そのゲルをクーマシーブルーで染色した。分子量マーカーを図の左側に示す。Ｂ）染色したゲルの走査後に行った各ロットの種々のタンパク質バンドの濃度測定分析。

【図１８】薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）分析を示す。ＰＡ：ホスファチジン酸(Sigma)、ＰＳ：ホスファチジルセリン(Fluka)、ＰＧ：ホスファチジルグリセロール(Sigma)、ＣＡＲ：カルジオリピン(Sigma)、ＥＲＧ：エルゴステロール(Fluka)、ＰＥ：ホスファチジルエタノールアミン(Sigma)、ＰＩ：ホスファチジルイノシトール(Sigma)、ＰＣ：ホスファチジルコリナ(Phosphatydilcolina)(Sigma)、ＴＡＧ：トリアシルクリセリド(Triacylclycerides)(Sigma)。

【図１９】ヒトＴＦタンパク質のｃＤＮＡ配列（Ｇｅｎｅ　Ｂａｎｋ　＃ＢＣ０１１０２９）を示す。オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）が開始コドン（ＡＴＧ）および終結コドン（ＴＡＡ）とともに枠で囲まれている。このｃＤＮＡ配列は、ヒトＴＦ（ｈＴＦ）タンパク質の４つのドメイン（シグナルペプチド、細胞外ドメイン、膜貫通領域および細胞質テール）を含む。矢印は、プライマーＡ［シグナルペプチドを欠き、ＴＦ　ＯＲＦのフレーム内に開始コドンＡＴＧを含む成熟ｈＴＦの最初の４つのアミノ酸をコードする上流プライマー］およびＥ［下流プライマー、太字の終結コドンを有する］（双方とも制限ＢａｍＨＩ部位（下線）を含む）のアニーリング位置を示す。

【図２０】ｐＴＴ１０３０３を作製するためのクローニング戦略を示す。図２０Ａは、ＰＣＲ反応から得られたＤＮＡフラグメントをＢａｍＨＩで消化し、予めＢａｍＨＩで消化し、脱リン酸化したｐＴＴ１０３０１プラスミドにクローニングした。得られたプラスミドｐＴＴ１０３０３を大腸菌で増殖させ、市販のＤＮＡ精製ＪＥＴｓｔａｒキット（Genomed Gmbh）で精製した。図２０Ｂは、作製されたｐＴＴ１０３０３の制限分析を示す。

【図２１】ｒＴＦ－ｈｉｓタグの発現のウエスタンブロット分析の結果を示す。組換え酵母ｙＴＴ１０３０２の培養物からの抽出液（レーン１～４、クローン２～５に相当）および大腸菌（Ｃ＋）により産生されたｒＴＦのウエスタンブロット分析。ブロットを精製マウス抗ヒトＣＤ１４２モノクローナル抗体(BD Biosciences Pharmingen)と反応させた。分子量マーカー（ｋＤａ）を図の左側に示す。

【図２２】これもまたｒＴＦ－ｈｉｓタグの発現の結果を示す。図２２Ａは、酵母ｙＴＴ１０３００（レーン１）、ｒＴＦを発現するｙＴＴ１０３０１（レーン２）またはｒＴＦ－ｈｉｓタグを発現するｙＴＴ１０３０２（クローン＃５）（レーン３）からの抽出液のＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびクーマシーブルー染色を示す。大腸菌で産生されたｒＴＦ５ｎｇに相当する陽性対照（レーン４）。図２２Ｂは、精製マウス抗ヒトＣＤ１４２モノクローナル抗体(BD Biosciences Pharmingen)を用いた、図１７Ａで示されるものと同じサンプルのウエスタンブロット分析である。分子量マーカー（ｋＤａ）を図の左側に示す。

【図２３】６ＨＴ－ＴＦ精製のための方法を概略的に示す。

【図２４】アフィニティークロマトグラフィーによる６ＨＴ－ＴＦ精製の結果を示す。ＣＹＥ－６ＨＴ－ＴＦを出発材料として用いた。抽出液を孔径０．２μｍのフィルターでタンジェンシャル濾過により濾過し、市販の５ｍｌ金属キレートアフィニティークロマトグラフィーカラム(HiTrap（登録商標）, Pharmacia Biotech)に適用した。このカラムを、開始バッファー（２０ｍＭリン酸バッファー、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）の、それぞれイミダゾールを含まないもの、１０ｍＭイミダゾールを含むもの、および１００ｍＭイミダゾールを含むもので３回連続洗浄した。１Ｍイミダゾールを含有する同じバッファーで６ＨＴ－ＴＦを溶出し、２．５ｍｌ溶出画分（レーン４～７、それぞれ画分＃１、＃２、＃３および＃４に相当する）を回収し、２０ｍＭリン酸バッファー、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４に対して透析した。出発濾過酵母抽出液（レーン１）、非結合材料（レーン２）、１００ｍＭを含有する出発バッファーによる最後の洗液および最初の４つの溶出画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロット（図２４Ａ）または銀染色（図２４Ｂ）により分析した。分子量マーカー（ｋＤａ）を図の左側に示す。

【図２５】エンドグリコシラーゼ処理後の精製６ＨＴ－ＴＦのウエスタンブロット分析の結果を示す。６ＨＴ－ＴＦの精製画分を、製造業者の説明書に従い、５００ユニットのＰＮＧａｓｅ　Ｆ（レーン２）またはＥｎｄｏ　Ｈ（レーン３）で処理した。これらのサンプルおよび非処理溶出液（レーン１）を、抗ヒトＴＦｍＡｂを用いたウエスタンブロットにより分析した。分子量マーカー（ｋＤａ）を図の左側に示す。

【図２６】アフィニティークロマトグラフィーによる精製６ＨＴ－ＴＦの免疫電子顕微鏡観察の結果を示す。最初の溶出画分をコロジオンコーティング銅格子に吸着させた。この格子を免疫金標識のために抗ＴＦモノクローナル抗体で処理した。

【図２７】本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の概略図である。図２２Ａは、酵母由来膜（１）と、該酵母由来膜（１）に組み込まれたＴＦタンパク質（２）（または凝固促進活性を有するそのフラグメント）を含んでなる本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の概略図を示す。微小胞空間内（３）および微小胞空間外（４）を表す。図２２Ｂおよび２２Ｃは、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の基本構造を示す。この酵母由来膜脂質二重層の脂質は両親媒性であり、微小胞空間外（４）に向いている親水性極性ヘッド（５）と、微小胞空間内（３）に向いている２つの疎水性炭化水素テール（６）を有する。図２２Ｂに示されている実施態様では、ＴＦタンパク質（２）または凝固促進活性を有するそのフラグメントのＮ末端ドメインは微小胞空間外（４）に面している。図２２Ｃに示されている実施態様では、ＴＦタンパク質（２）または凝固促進活性を有するそのフラグメントのＮ末端ドメインは微小胞空間内（３）に面している。

【図２８】ヒトＴＦタンパク質のｃＤＮＡ配列（Ｇｅｎｅ　Ｂａｎｋ　＃ＢＣ０１１０２９）を示す。オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）が開始コドン（ＡＴＧ）および終結コドン（ＴＡＡ）とともに枠で囲まれている。このｃＤＮＡ配列は、ヒトＴＦ（ｈＴＦ）タンパク質の４つのドメイン（シグナルペプチド、細胞外ドメイン、膜貫通領域および細胞質テール）を含む。矢印は、プライマーＦ［シグナルペプチドを欠き、ＴＦ　ＯＲＦのフレーム内に開始コドンＡＴＧを含む成熟ｈＴＦの最初の４つのアミノ酸をコードする上流プライマー］およびＥ［下流プライマー、太字はヒスチジンコードヌクレオチド］（双方とも制限ＢａｍＨＩ部位（下線）を含む）のアニーリング位置を示す。

【図２９】ｐＴＴ１０３０４の作製のためのクローニング戦略。Ａ）ＰＣＲ反応から得られたＤＮＡフラグメントをＢａｍＨＩで消化し、予めＢａｍＨＩで消化し、脱リン酸化したｐＴＴ１０３０１プラスミドにクローニングした。得られたプラスミドｐＴＴ１０３０４を大腸菌で増殖させ、市販のＤＮＡ精製ＪＥＴｓｔａｒキット(Genomed Gmbh)で精製した。Ｂ）作製されたｐＴＴ１０３０４ベクターの制限分析。

【図３０】ヒト(humnan)ＴＦにおけるグリコシル化部位の点変異の概略図を示す。

【図３１】抗ＴＦ１抗体(antobody)でプローブしたウエスタンブロットを示す。ＰＭ１は１１番におけるＡｌａ－Ａｓｎ変化を示し、ＰＭ２は１２４番におけるＡｌａ－Ａｓｎ変化を示し、ＰＭ３は１３７番におけるＡｓｎ－Ａｌａ変化を示す。ＰＭ１、２；１、３；および１、２、３はそれらの組合せを示す。ＴＴ１０３ＭＨは野生型ＴＦである。

【図３２】ＴＴ－１０３と再脂質化ｒＴＦの凝固促進活性の用量応答曲線。凝固促進活性は、プールした正常なヒト血漿および種々の濃度の種々のプールまたは再脂質化ｒＴＦいずれかを用い、凝固計で測定した。

【図３３】in vitroにおける、非処理ＴＴ－１０３（１）、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００処理を施したＴＴ－１０３（２）、透析後にＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００処理を施し、ｒＴＦを再脂質化させたＴＴ－１０３（３）、エンプティリポソーム（４）およびｒＴＦを発現しない組換え酵母からの微小胞（５）の凝固促進活性を示す。ＥＬＩＳＡにより測定されたｒＴＦの量はサンプル１、２および３で同じであった（１２０ｎｇ／ｍＬ）。

【図３４】再脂質化ｒＴＦ、トロンビンおよびトロボレルＳと比較したヘパリン処理血漿中のＴＴ－１０３（ＴＴ－１０３）の凝固促進活性を示す。

【発明の具体的説明】

【００３０】

本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞

一態様において、本発明は、（ｉ）酵母膜と、（ｉｉ）組織因子（ＴＦ）タンパク質または凝固促進活性を有するその変異体とを含んでなり、該組織因子（ＴＦ）タンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントの一部が該脂質二重層に組み込まれている、組織因子担持酵母由来微小胞（以下、「本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞」と呼ぶ）に関する。本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞は凝固促進活性を有し、従って、被検体における出血の処置のための薬剤として使用可能である。

【００３１】

本明細書において、「酵母由来微小胞」とは、酵母由来の膜またはそのフラグメントから実質的になる小さな閉じられたコンパートメントである。膜とは一般に、細胞の境界（すなわち、細胞膜または原形質膜）または細胞内オルガネラの境界を形成している数分子の厚さの組織化された層を指す。

【００３２】

本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の成分（ｉ）は、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の生産に用いる酵母細胞から生じる酵母膜である。一般に膜は２つの方向を向いた脂質層（すなわち、脂質二重層）からなり、そこにタンパク質が埋め込まれ得る。細胞の膜の基本構造である脂質二重層は、通常、水性環境中で両親媒性分子（例えば、リン脂質、脂肪酸など）により形成され、各分子は層の外側に親水基を向け、層の内側に疎水基を向けている。一般に、この脂質二重層にタンパク質が埋め込まれており、従って、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞は酵母細胞由来のタンパク質を含有し、通常、該酵母細胞膜に組み込まれている。

【００３３】

特定の実施態様では、該酵母由来微小胞は、酵母細胞膜またはそのフラグメント、例えば、酵母細胞原形質膜またはそのフラグメントに由来する。別の特定の実施態様では、該酵母由来微小胞は、核、ゴルジ体、小胞体などの細胞内酵母細胞オルガネラ膜またはそのフラグメントに由来する。

【００３４】

該酵母由来微小胞は、一般に、その生産に用いられる酵母細胞から生じる（例えば、実施例１に開示されている方法に示されているように酵母発酵生成物にホモジナイゼーション処理を施した後）。事実上、いずれも酵母細胞でも、該酵母由来微小胞、有利には、非綿状酵母細胞、好ましくは、ヒト消費に関して米国医薬品局(The Federal Drug Administration, FDA)により「一般に安全とみなされる(Generally Regarded as SafeまたはGRAS)」酵母細胞として分類されている酵母細胞（該ＧＲＡＳ認可物質は、ヒトを含む動物に実質的に無害(inocuous)であるので、ＦＤＡによる販売前承認の必要がない）を生産するために使用可能である。本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の生産するための方法に使用可能な、例示的、非限定的な酵母細胞の例は、醸造材料液を代謝することによりアルコール、炭酸ガスを生産するいわゆる酒造酵母種、パン酵母などがある。特に好ましい酵母細胞としては、サッカロミセス種由来の酵母細胞、例えば、Ｓ．セレビシエＴ７３　ｕｒａ３⁻株、Ｓ．セレビシエＴ７３株の誘導体、ワイン製造に広く用いられている株（実施例１）またはピキア種が挙げられる。

【００３５】

本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の成分（ｉｉ）は、組織因子（ＴＦ）タンパク質または凝固促進活性を有するその変異体である。

【００３６】

本明細書において「ＴＦ変異体」は、１以上のアミノ酸の置換、挿入または付加によるＴＦに由来する任意のポリペプチドに関する。

【００３７】

特定の実施態様では、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の成分（ｉｉ）はＴＦタンパク質である。

【００３８】

本明細書において「組織因子」または「ＴＦ」には、ヒトを含むいずれかの動物の天然

または野生型（ｗｔ）ＴＦ、ならびに該ｗｔＴＦの少なくとも１つの機能、有利には、凝固に関するｗｔＴＦの機能を維持するその変異体が含まれる。

【００３９】

ＴＦタンパク質は、天然に見られるようにタンパク質成分（タンパク質）とリン脂質からなる、動物界に広く分布している内在性膜糖タンパク質である。ＴＦタンパク質には、そのタンパク質にオリゴ糖側鎖を付加してグリコシル化形態のＴＦタンパク質とするためのいくつかのグリコシル化部位が存在する。グリコシル化程度によって、種々のグリコシル化形態のＴＦタンパク質が利用可能である。これに関して、成熟ＴＦは、Ａｓｎ－Ｘａａ－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ型の、可能性のある３つのＮ－結合グリコシル化部位（$Ａｓｎ^{１１}$－$Ｌｅｕ^{１２}$－$Ｔｈｒ^{１３}$、$Ａｓｎ^{１２４}$－$Ｖａｌ^{１２５}$－$Ｔｈｒ^{１２６}$および$Ａｓｎ^{１３７}$－$Ａｓｎ^{１３８}$－$Ｔｈｒ^{１３９}$）を含む。酵母におけるＮ－結合グリコシル化は一般に、２つのＧＩｌＮＡｃ残基を介してアスパラギンに結合されている約１０個のマンノース残基の内部コアと５０～１００個のマンノース残基の分枝した外部側鎖を含む。よって、Ｎ－結合グリコシル化は３００といった多くのマンノース残基をＴＦに潜在的に付加することができ、分子量増加は約６０ｋＤａとなる。さらに、種々の（２５を超える）Ｏ結合グリコシル化部位には数個のマンノース残基が付加することができる。特定の実施態様では、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞はグリコシル化されているＴＦタンパク質を含んでなる。本明細書において「グリコシル化されている」とは、任意のグリコシル化度を含む。

【００４０】

本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の概略図を図２７に示す。

【００４１】

ＴＦタンパク質はドメイン構造を有し、すなわち、それは独立した機能性領域を有するタンパク質である。特定の実施態様では、該ＴＦタンパク質はヒトＴＦ（ｈＴＦ）タンパク質である。このｈＴＦタンパク質の各ドメインはユニークな構造的および機能的特徴：（１）タンパク質が未熟型から成熟型へプロセシングされる際に翻訳後プロセシングを受ける３２アミノ酸のリーダー配列を有するシグナルペプチドまたは領域；（２）約２１９の末端アミノ酸を含んでなるＮ－グリコシル化親水性細胞外ドメイン；（３）膜貫通ドメインアミノ酸と考えられる主として疎水性の約２３のアミノ酸のフラグメント；および（４）タンパク質細胞質フラグメントの部分をなすアミノ酸と考えられる２１アミノ酸のカルボキシル末端を有する。ｈＴＦタンパク質のドメイン構造は、例えば、タンパク質またはその機能的フラグメントの細胞外ドメインの生産を可能とする。ｈＴＦタンパク質のアミノ酸配列は既知であり、例えばＮＣＢＩ（ｈＴＦ、受託番号Ｐ１３７２６）などのタンパク質データベースで調べることができる。

【００４２】

さらに、該ＴＦタンパク質は融合タンパク質のメンバーであってもよく、この融合タンパク質は、別のペプチドまたはタンパク質を含んでなる第二の領域と結合された、ＴＦタンパク質を含んでなる第一の領域を含む。該第二の領域は該ＴＦタンパク質のアミノ末端領域と結合されていてもよいし、あるいは該第二の領域は該ＴＦタンパク質のカルボキシル末端領域に結合されていてもよい。第一および第二の双方の領域は、互いに直接結合されていてもよいし、あるいは第一と第二の領域の間のリンカーポリペプチドを介して結合されていてもよい。

【００４３】

特定の実施態様では、該融合タンパク質はＴＦタンパク質と、該ＴＦタンパク質のＣ末端またはＮ末端ドメインと結合されたタグ、通常にはペプチドタグを含んでなる。該タグは一般に、該融合タンパク質の単離または精製に使用可能なペプチドまたはアミノ酸配列である。よって、該タグは、例えば高い親和性を有するクロマトグラフィー支持体またはビーズなどのアフィニティーマトリックスの１以上のリガンドなどの１以上のリガンドと結合することができる。該タグの例としては、高い親和性でニッケル（$Ｎｉ^{２＋}$）またはコバルト（$Ｃｏ^{２＋}$）のカラムと結合することができる、６残基のヒスチジン（Ｈｉｓ６

またはＨ６）を含んでなるタグなどの、ヒスチジンタグ（ＨｉｓタグまたはＨＴ）がある。実施例２および３に示されるＨｉｓタグは、ほとんどのタンパク質を変性し、ほとんどのタンパク質－タンパク質相互作用を破壊する条件下でそのリガンドと結合可能であるという望ましい特徴を有する。よって、それは、ベイト(bait)が関与していたタンパク質－タンパク質相互作用の破壊後にＨ６タグを有するベイトタンパク質を除去するために使用可能である。

【００４４】

融合タンパク質を単離および精製するのに有用なタグのさらなる例示的、非限定的な例としては、Ａｒｇタグ、ＦＬＡＧタグ、Ｓｔｒｅｐタグ、抗体により認識可能なエピトープ、例えば、ｃ－ｍｙｃタグ（抗ｃ－ｍｙｃ抗体により認識される）、ＳＢＰタグ、Ｓタグ、カルモジュリン結合ペプチド、セルロース結合ドメイン、キチン結合ドメイン、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼタグ、マルトース結合タンパク質、ＮｕｓＡ、ＴｒｘＡ、ＤｓｂＡ、Ａｖｉタグなど(Terpe K., Appl. Microbiol. Biotechnol. (2003), 60:523-525)、Ａｌａ－Ｈｉｓ－Ｇｌｙ－Ｈｉｓ－Ａｒｇ－Ｐｒｏ（配列番号２）；Ｐｒｏ－Ｉｌｅ－Ｈｉｓ－Ａｓｐ－Ｈｉｓ－Ａｓｐ－Ｈｉｓ－Ｐｒｏ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｉｌｅ－Ｈｉｓ－Ｓｅｒ（配列番号３）；Ｇｌｙ－Ｍｅｔ－Ｔｈｒ－Ｃｙｓ－Ｘ－Ｘ－Ｃｙｓ（配列番号４）などのアミノ酸配列；β－ガラクトシダーゼなどが挙げられる。

【００４５】

特定の実施態様では、該タグは、該ＴＦタンパク質のＣ末端ドメインと結合されているＨｉｓタグである。もう１つの実施態様では、該タグは、該ＴＦタンパク質のＮ末端ドメインと結合されているＨｉｓタグである。

【００４６】

該融合タンパク質もまた凝固促進活性を有する。該融合タンパク質の凝固促進活性は、血漿におけるin vitro凝固アッセイ、または非抗凝固処理全血におけるin vitro凝固アッセイ、または重度出血動物モデルにおけるin vivoアッセイ、または実施例４に述べられているアッセイなどの、致死的出血動物モデルにおけるin vivoアッセイによるなどの、実施例４に述べられている凝固アッセイのいずれかによって、これまでに述べられているようにアッセイすることができる。

【００４７】

該融合タンパク質は、例えば、好適な酵母細胞における、該融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の遺伝子発現によるなどの慣例の手段によって得ることができる。最終的なタグは、望ましければ、該融合タンパク質の単離または精製に使用可能である。

【００４８】

別の特定の実施態様では、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の該成分（ｉｉ）は、ＴＦ凝固促進活性を有するフラグメントである。

【００４９】

本明細書において「凝固促進活性を有するＴＦタンパク質のフラグメント」とは、脂質化された際に凝固促進活性を有するＴＦ由来の任意のペプチドを含む。ＴＦフラグメントの凝固促進活性は、慣例のアッセイのいずれによっても、例えば、実施例４に述べられている凝固アッセイのいずれによっても、容易にアッセイすることができる。単に例であるが、ＴＦフラグメントの凝固促進活性は、血漿におけるin vitro凝固アッセイ、または非抗凝固処理全血におけるin vitro凝固アッセイ、または重度出血動物モデルにおけるin vivoアッセイ、または実施例４に述べられているアッセイなどの、致死的出血動物モデルにおけるin vivoアッセイによって測定することができる。

【００５０】

凝固促進活性を有するＴＦタンパク質のフラグメントのアミノ酸配列は、天然ＴＦタンパク質の対応するフラグメントと同一であり得るか、あるいは得られるＴＦタンパク質のフラグメントが凝固促進活性を有する限り、天然ＴＦタンパク質に対して１以上のアミノ酸の挿入、欠失または修飾を有してもよい。

【００５１】

特定の実施態様では、凝固促進活性を有するＴＦのフラグメントは成熟ＴＦタンパク質を含んでなる。本明細書において「成熟ＴＦ」とは、アミノ酸配列がシグナルペプチドを欠くＴＦタンパク質を指す。好ましい実施態様では、該成熟ＴＦタンパク質はヒト成熟ＴＦタンパク質を含んでなる。さらに、特定の実施態様では、該ヒト成熟ＴＦタンパク質は、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有する。

【００５２】

別の特定の実施態様では、凝固促進活性を有するＴＦタンパク質のフラグメントは、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインの全部または一部を欠いているＴＦタンパク質であり、結果として、得られたタンパク質はＦＶＩＩａと結合することができない。凝固促進活性を有するが、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインを欠いているＴＦタンパク質の該フラグメントは、本明細書では、「末端切断型ＴＦタンパク質」または「ＴＦの末端切断型」と呼ばれる場合がある。拡張すれば、該「末端切断型ＴＦタンパク質」は、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインが機能的でない、凝固促進活性を有するＴＦタンパク質変異体も含み得る。

【００５３】

特定の実施態様では、該末端切断型ＴＦタンパク質は、因子Ｘに対する相互作用ドメイン、膜貫通領域および細胞質テールを含み、かつ、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインを部分的にまたは完全に欠いている。さらに、特定の実施態様では、該末端切断型ＴＦタンパク質は、因子Ｘに対する相互作用ドメイン（ａａ１７４～２５１）、膜貫通領域（ａａ２５２～２７４）および細胞質テール（ａａ２７５～２９５）および付加的ヒスチジンタグ（実施例３）を含む、末端切断型のヒトＴＦタンパク質である。本発明者らは、今般、驚くべきことに、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインを欠いている末端切断型のＴＦタンパク質が凝固促進活性を有することを発見した（実施例４表３）。

【００５４】

本発明の著者らは、驚くべきことに、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインの全部または一部を欠いているＴＦのフラグメントが凝固促進活性を有することを見出した。この結果は、ＴＦが、傷害部位において外膜細胞に曝されて、循環凝固因子ＶＩＩ／活性化凝固因子ＶＩＩ（ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ）と結合してＴＦ：：ＦＶＩＩａ複合体を形成し、これがカルシウムの存在下で、ＦＸの活性化が起こるように基質として働くことで、血液凝固外因性経路で働くことが周知であることから、驚くべきことであった。血管傷害によって起こる出血の事象では、凝固は、ＴＦとリガンドであるＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａの相互作用を含む外因性経路の活性化によって誘発されることが受け入れられている。

【００５５】

もう１つの実施態様では、これらの修飾ＴＦは、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインに１以上の変異を含み、その結果、この修飾ＴＦはＦＶＩＩａと結合することができないか、または実質的に低い親和性でしか結合しない。該ＦＶＩＩａとの結合を無効にすることが知られているＴＦのＦＶＩＩａ結合ドメインにおける点突然変異が当技術分野で知られている（例えば、引用することによりその内容がそのまま本明細書の一部とされるKelley, R.F. et al., 1995, Biochemistry, 34:10383-10392によって記載されているもの）。

【００５６】

本発明の著者らはまた、ＴＦの凝固促進活性ならびに酵母宿主細胞におけるその発現が、該ＴＦがそのグリコシル化部位に、野生型ＴＦで見られる３つのＮ－結合グリコシル鎖のうち少なくとも１つの結合を妨げる変異を有する場合に増強されることも見出した。よって、特定の実施態様では、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞は、凝固促進活性を有するＴＦタンパク質の非グリコシル化フラグメントを含んでなる。上述のように、「グリコシル化」とは、いずれの程度のグリコシル化も含む。好ましい実施態様では、該ＴＦ変異体は、ＴＦのＮ－グリコシル化部位のうち少なくとも１つが、それを非機能的とするように、すなわち、グリコシド鎖の付加のためのアクセプター部位として働くことができないように修飾されているポリペプチドである。修飾可能なＴＦ配列のＮ－グリコシル化部位は前述のもの、すなわち、Asn^{11}－Leu^{12}－Thr^{13}部位、Asn^{124}－Ｖａ

ｌ^{125}－Ｔｈｒ^{126}部位および／またはＡｓｎ^{137}－Ａｓｎ^{138}－Ｔｈｒ^{139}部位である。Ｎ－グリコシル化コンセンサス領域の修飾はいずれも、Ｎ－結合グリコシル鎖の付加が無効となるか、または実質的に阻害される限り好適である。好ましくは、この修飾は成熟ヒトＴＦの１１、１２４および／または１３６番に相当するＡｓｎ残基に導入されるが、それはこれがグリコシル鎖の結合のためのアクセプターとして働く残基であるからである。本発明において「成熟ヒトＴＦの１１、１２４および／または１３６番に相当する部位」とは、ヒト配列とオーソログ配列が配列類似性に基づいてアラインされた際に、そのポリペプチド鎖の異なる位置に見られることがあるが、成熟ヒトＴＦのＮ－グリコシル化部位と一致する、他のＴＦオーソログのＮ－グリコシル化部位を指す。アライメントまたはマルチプルＴＦ配列のため、従って、ヒト成熟ＴＦにおける部位に相当するＴＦオーソログにおけるＮ－グリコシル化部位を同定するために好適なアルゴリズムは、ＧＣＧソフトウエアパッケージ(Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wis.)の一部となっているＰＩＬＥＵＰプログラムである。ＰＩＬＥＵＰは、累進型ペアワイズアライメントを用い、関連の配列群からマルチプル配列アラインメントを作成し、関係と配列同一性を示す。それはまた、アライメントを作成するために用いたクラスタリング関係を示す樹状図または系統樹もプロットする。ＰＩＬＥＵＰは、Feng and Doolittle, J. Mol. Evol., 35: 351-360 (1987)の累進型アライメント法の簡略化を用いる。好ましくは、１１、１２４および／または１３６番のＡｓｎ残基はＡｌａで置換される。よって、好ましい実施態様では、微小胞の一部をなすＴＦ変異体は、ヒト成熟ＴＦのＮ１１Ａ、Ｎ１２４Ａ、Ｎ１３７Ａ、Ｎ１１ＡとＮ１２４Ａ、Ｎ１１ＡとＮ１３７Ａ、Ｎ１２４ＡとＮ１３７Ａ、およびＮ１１ＡとＮ１２４ＡとＮ１３７Ａの群から選択される。他のいずれのＴＦオーソログでも、変異は、Ｎ－結合グリコシル化コンセンサス部位を形成する、対応するＡｓｎ残基で起こる。

【００５７】

さらに、ＴＦタンパク質の場合と同様、本発明を行う際に用いられる凝固促進活性を有するＴＦタンパクのフラグメントは融合タンパク質のメンバーであってもよく、この融合タンパク質は、別のペプチドまたはタンパク質を含んでなる第二の領域と結合された、凝固促進活性を有するそのＴＦタンパク質フラグメントを含んでなる第一の領域を含む。該第二の領域は該ＴＦタンパク質フラグメントのアミノ末端領域と結合されていてもよいし、あるいは該第二の領域は該ＴＦタンパク質フラグメントのカルボキシル末端領域に結合されていてもよい。第一および第二の双方の領域は、互いに直接結合されていてもよいし、あるいは第一と第二の領域の間のリンカーポリペプチドを介して結合されていてもよい。

【００５８】

特定の実施態様では、該融合タンパク質は、凝固促進活性を有するＴＦタンパク質のフラグメントと、該ＴＦタンパク質フラグメントのＣ末端またはＮ末端ドメインに結合されたタグを含んでなる。該タグは一般に、該融合タンパク質の単離または精製に使用可能なペプチドまたはアミノ酸配列である。この融合タンパク質の生産に好適なタグの例示的、非限定的な例としては、第一の領域がＴＦタンパク質であった融合タンパク質に関して上述されたものがある。特定の実施態様では、該タグは、凝固促進活性を有するＴＦタンパク質またはそのフラグメントのＣ末端ドメインと結合されたＨｉｓタグである。もう１つの実施態様では、該タグは、ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントのＮ末端ドメインと結合されたＨｉｓタグである。この融合タンパク質もまた凝固促進活性を有し、その凝固促進活性は前述のように、例えば実施例４に述べられている凝固アッセイのいずれかによってアッセイすることができる。

【００５９】

本発明によれば、該ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントの一部は該酵母膜に組み込まれている。通常、該部分は該タンパク質またはフラグメントの親油性領域（すなわち、ＴＦの中央ドメイン）を含んでなるが、その親水性領域（すなわち、該ＴＦタンパク質のアミノ末端領域およびカルボキシル末端領域）は膜の外質側または

内質側に面している。ＴＦタンパク質の親油性領域および親水性領域に関する情報は、ＴＦタンパク質のハイドロパシープロットを示す図２から得ることができる。実施例１セクション１．４は、該ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントは膜に組み込まれている（すなわち、それが膜関連タンパク質である）。

【００６０】

特定の実施態様では、ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントのＮ末端ドメインはこの膜の外質側に面しているが、別の特定の実施態様では、ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するフラグメントのＮ末端ドメインはこの膜の内質側に面している（図２７）。

【００６１】

本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の大きさは比較的広範囲で可変であり、通常、この大きさは１μｍ以下であり、一般には０．１μｍ以下である。特定の実施態様では、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の大きさは、電子顕微鏡で測定した場合（実施例１セクション１．６）、０．１～０．０１μｍの範囲である。

【００６２】

本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の産生方法

本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞は、一般に、組換え技術によって得ることができる。よって、他の態様では、本発明は、凝固促進活性を有するＴＦ担持酵母由来微小胞（すなわち、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞）の製造方法（以下、「本発明の方法」と呼ぶ）に関し、その方法は、

ａ）ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントを発現する組換え酵母細胞の培養物を、該ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントの発現を可能とする条件下での発酵に供すること；

ｂ）工程ａ）の発酵から生じた生成物をペレット化して発酵生成物とすること；

ｃ）工程ｂ）からの発酵生成物にホモジナイゼーションを施して発酵ホモジネートとすること；および

ｄ）工程ｃ）からの発酵ホモジネートに分離を施して、ペレットと、凝固促進活性を有する該ＴＦ担持酵母由来微小胞（すなわち、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞）を含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ）とすること；

ｅ）凝固促進活性を有する該ＴＦ担持酵母由来微小胞を含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ）を回収すること；および所望により、

ｆ）望ましければ、凝固促進活性を有する該ＴＦ担持酵母由来微小胞を単離または精製することを含む。

【００６３】

ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントを発現する組換え酵母細胞は、当業者に公知の慣例の組換え方法によって得ることができる。要するに、酵母細胞を、酵母機能的プロモーターに作動可能なように連結されたＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含んでなる酵母発現ベクターで形質転換する。

【００６４】

ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントをコードするｃＤＮＡを、鋳型としてのｃＤＮＡライブラリーと適当なプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって増幅することができる。実施例１は、成熟ｈＴＦタンパク質をコードするｃＤＮＡの増幅を開示し；実施例２は、３’末端に１８の付加的ヌクレオチド（６つのヒスチジンをコードする）を有する成熟ｈＴＦタンパク質をコードするｃＤＮＡの増幅を開示し；実施例３は、３’末端の１８の付加的ヌクレオチド（６つのヒスチジンをコードする）とともに因子Ｘに対する相互作用ドメイン、膜貫通領域および細胞質テールを含む末端切断型型のｈＴＦタンパク質（ＴＴＦ）をコードするｃＤＮＡの増幅を開示している。

【００６５】

本明細書において「ベクター」とは、それに連結されている別の核酸を運ぶことができる核酸分子を指す。本明細書において「酵母発現ベクター」とは、酵母中のベクターにより担持されている個々の組換え遺伝子（すなわち、ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメント）によりコードされている対象タンパク質を合成することができる、例えば、核酸セグメント、プラスミド、コスミド、ファージ、ウイルスまたはウイルス粒子などのＤＮＡ発現構築物を指す。あるいは、目的遺伝子が酵母ゲノムに安定的に組み込まれる無指向性または相同組換えを用いてトランスジェニック酵母細胞を作出するために核酸セグメントを用いてもよい。通常、この酵母発現ベクターは、酵母細胞で機能的なプロモーター（すなわち、酵母機能的プロモーター）に作動可能なように連結されたＴＦまたは凝固促進活性を有するそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含んでなる。

【００６６】

本発明とともに用いるためのベクターは例えば、酵母細胞において、それに連結されている核酸の自律的複製および／または発現が可能なベクターである。本明細書において「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドは最も一般に用いられる形態のベクターであるので、互換的に用いられる。さらに、本発明は、同等の機能を果たし、これに関しては以降、当技術分野で知られるようになる他の形態の発現ベクターを含むものとする。該酵母発現ベクターは、酵母エピソーム発現ベクターまたは酵母組み込み発現ベクターであってもよく、それらは当業者に公知の慣例の技術によって得ることができる。

【００６７】

よって、一つの実施態様では、該酵母発現ベクターは酵母エピソーム発現ベクターである。本明細書において「酵母エピソーム発現ベクター」とは、酵母の細胞質で染色体外ＤＮＡ分子として維持される発現ベクターを指す。特定の実施態様では、該酵母エピソーム発現ベクターは、酵母機能的プロモーターに作動可能なように連結されたＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列の他、（ｉ）酵母選択遺伝子；（ｉｉ）酵母複製開始点；（ｉｉｉ）細菌選択遺伝子；および（ｉｖ）酵母転写終結シグナルをさらに含んでなる。有利には、該酵母エピソーム発現ベクターは、酵母機能的プロモーターの制御下の、選択された遺伝子（ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメント）をクローニングするためのユニークな制限部位と、その後に酵母転写終結シグナルをさらに含んでなる。

【００６８】

事実上、該酵母エピソーム発現ベクターの作製には、いずれの酵母機能的プロモーター、酵母選択遺伝子、酵母複製開始点、細菌選択遺伝子、酵母転写終結シグナルおよびクローニングのための制限部位も使用可能であるが、やはり、特定の実施態様では、酵母機能的プロモーターとしてグリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター（ｐＧＰＤ）が用いられ；別の特定の実施態様では、酵母選択遺伝子としてＵＲＡ３遺伝子（ＵＲＡ３）が用いられ；別の特定の実施態様では、酵母複製開始点として酵母２ミクロン（２μ）複製開始点が用いられ；別の特定の実施態様では、細菌選択遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子（Ａｍｐ）が用いられ；別の特定の実施態様では、特異的酵母転写終結シグナルとしてホスホグリセレートキナーゼ（ＰＧＫｔ）の転写終結シグナルが用いられる。よって、特定の実施態様（実施例１～３）では、酵母エピソーム発現ベクターは、（ｉ）ＵＲＡ３遺伝子；（ｉｉ）大腸菌においてベクターを選択および増殖させるためのＡｍｐ遺伝子；（ｉｉｉ）酵母２μ複製開始点；（ｉｖ）ｐＧＰＤ；（ｖ）ＰＧＫｔの特異的酵母転写終結シグナル：および（ｖｉ）ｐＧＰＤの制御下で選択された遺伝子のクローニングを可能とするユニークなＢａｍＨＩ制限部位と、その後にＰＧＫｔ配列を含んでなる。

【００６９】

他の実施態様では、該酵母発現ベクターは酵母組み込み発現ベクターである。本明細書において「酵母組み込み発現ベクター」とは、酵母ゲノムに組み込み可能なベクターを指す。特定の実施態様では、該酵母組み込み発現ベクターは、（ｉ）細菌選択遺伝子；およ

び（ｉｉ）酵母選択遺伝子に挿入された発現カセットを含んでなり、該発現カセットは、酵母機能的プロモーター、酵母転写終結シグナルおよび選択された遺伝子（ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメント）をクローニングするためのユニークな制限部位をさらに含んでなる。

【００７０】

事実上、該酵母組み込み発現ベクターの作製には、いずれの細菌選択遺伝子、酵母選択遺伝子に挿入された発現カセット、酵母機能的プロモーター、酵母転写終結シグナルおよび選択された遺伝子をクローニングするためのユニークな制限部位も使用可能であるが、やはり、特定の実施態様では、細菌選択遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子（Ａｍｐ）が用いられ；別の特定の実施態様では、酵母機能的プロモーター（ｐＧＤＰ）と酵母転写終結シグナル（ＰＧＫｔ）とＵＲＡ３遺伝子の中央領域の選択される遺伝子をクローニングするためのユニークな制限部位（ＢａｍＨＩ）を含む発現カセットとして、ＵＲＡ３遺伝子の中央領域に挿入された発現カセットｐＧＰＤ－ＢａｍＨＩ－ＰＧＫｔが用いられる。

【００７１】

本発明では、酵母機能的プロモーターに作動可能なように連結されたＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含んでなる該酵母発現ベクターで形質転換され得る、事実上、いずれの酵母細胞も使用可能である。該酵母発現ベクターでの酵母細胞の形質転換は、当業者に公知の慣例の手段によって行うことができる(Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual)。

【００７２】

好ましい実施態様では、該酵母は非綿状酵母（すなわち、発酵工程で分散された際に綿状（凝集塊）とならない酵母細胞）である。有利には、該酵母細胞はＧＲＡＳ酵母細胞である。本発明の方法に使用可能な酵母細胞の例示的、非限定的な例は、醸造材料液を代謝することによりアルコール、炭酸ガスを生産するいわゆる酒造酵母種（酒造に用いられる酵母）、パン酵母などがある。特に好ましいものは、Ｓ．セレビシエから選択される。このような酒造酵母の例としては、ビール酵母細胞、ワイン酵母細胞および酒酵母細胞が挙げられる。本発明の好ましい実施態様では、酵母細胞は、Ｓ．セレビシエＴ７３　ｕｒａ３$^{-}$（実施例１～３）などのワイン酵母細胞である。

【００７３】

ひと度、酵母細胞が形質転換されると、次の工程は、ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントを発現する組換え酵母細胞の培養物を、該ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントの発現を可能とする条件下で発酵に供することからなる。特定の実施態様では、該酵母細胞は、該酵母細胞が所望の異種生成物（ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメント）を発現することができる適当な培養培地で増殖させる。酵母細胞の増殖に適当な培養培地は当業者に周知であり、培養される酵母細胞に関して最も適当なものから選択する。発酵生成物を製造するには、用いる非凝集性酵母細胞によって起こる発酵に好適なものである限りいずれの材料も使用可能であり、既知の材料を随意に使用することができる。例えば、麦芽、果汁、糖液、穀類糖化液などが通常には単独で、あるいは酒造においては適宜組み合わせて用いられる。また、必要であれば、適当な栄養素などを添加してもよい。

【００７４】

発酵条件は本質において既知の条件と変わらず、当業者ならば決定することができる。特定の実施態様では、発酵の後、その発酵プロセスの主要パラメーターの進行を制御し、酸素圧（PO_2）が定常状態に達した際に発酵を停止させる。

【００７５】

次に、発酵工程ａ）から得られた発酵生成物を、遠心分離などの慣例の方法によってペレット化し、好適な溶解バッファーに再懸濁させた後、該生成物にホモジナイゼーションを施す。酵母は、例えば、ホモジナイザーで高圧によるなどの慣例の方法によりホモジナイズして発酵ホモジネートとする。

【００７６】
次に、この発酵ホモジネートに、遠心分離などの慣例の方法によって分離を施し、個別ペレットと、凝固促進活性を有するＴＦ担持酵母由来微小胞（すなわち、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞）を含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ）とする（これらは個別回収可能である）。本発明の方法の一般スキームを図１１に示す。
【００７７】
ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントの存在は、特異的抗ＴＦタンパク質モノクローナル抗体（ｍＡｂ）を用いることで、ウエスタンブロット分析などの慣例の方法によって判定することができる。さらに、ＣＹＥの凝固促進活性は、実施例４に述べられている凝固アッセイのいずれか、例えば、血漿における、または非抗凝固処理全血におけるin vitro凝固アッセイなどによる任意の凝固アッセイで測定することができる。
【００７８】
免疫電子顕微鏡によりＣＹＥサンプルをさらに検討したところ、微小胞の表面に、抗ＴＦｍＡｂにより標識された酵母由来微小胞の存在が示された。ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントを含んでなるこの微小胞もまた凝固促進活性を有し、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞に相当する。
【００７９】
所望により、望ましければ、本発明の方法に従ってこれまでに得られた凝固促進活性を有するＴＦ担持酵母由来微小胞は、当業者に公知の慣例の方法により濃縮、単離または精製することができる。例として、Ｃ末端またはＮ末端のいずれかにペプチドタグ（例えば、Ｈｉｓタグなど）を含むタンパク質のアフィニティークロマトグラフィー精製が、多くのタンパク質の、精製度の高い調製物を得るために用いられる十分標準化された方法である。いずれのクロマトグラフィー法としても、この方法は容易にスケールアップすることができる。イムノアフィニティークロマトグラフィーなどの別の精製手順も実施可能であるが、特に大規模生産のためには、特異的抗ＴＦモノクローナルまたはポリクローナル抗体の十分標準化されたストックが利用可能である必要がある。
【００８０】
よって、この単離および精製方法は、とりわけ、ＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントの性質、すなわち、それがクロマトグラフィー支持体またはビーズなどのアフィニティーマトリックスの１以上のリガンドと高い親和性で結合するためのタグ（例えば、Ｈｉｓタグなど）、またはｃ－ｍｙｃタグ（抗ｃ－ｍｙｃ抗体により認識される）などの、抗体により認識可能なエピトープを有する融合タンパク質であるかどうかに依存する。
【００８１】
図２３は、Ｈｉｓタグと融合された融合タンパク質の形態の組換えＴＦタンパク質（または凝固促進活性を有するそのフラグメント）を担持する酵母由来微小胞［すなわち、図２３に述べられているような（ＴＦ－Ｈｉｓタグタンパク質）担持酵母由来微小胞または「６ＨＴ－ＴＦ薬剤生成物」］を精製するための方法の概略を示す。要するに、これまでに開示されている方法に従って得られた、（ＴＦ－ｈｉｓタグタンパク質）担持酵母由来微小胞を含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ）を濾過（例えば、タンジェンシャルフロー濾過により孔径０．２μｍのフィルターで）した後に、適当なアフィニティーカラム（例えば、ＨｉＴｒａｐ（登録商標）アフィニティーカラム）にのせ、次に、サンプルを適用した後に、流出液（非結合材料）を回収し、このカラムを数回洗浄し、最後の洗浄の後に、カラムに適当なバッファー（例えば、イミダゾールを含有するバッファー）を加えることで（ＴＦ－Ｈｉｓタグタンパク質）担持酵母由来微小胞を溶出させ、溶出画分を回収し、透析して、単離または精製された（ＴＦ－ｈｉｓタグタンパク質）担持酵母由来微小胞とする。
【００８２】
また、別の実施態様では、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞はＡＫＴＡプライム装置に

よって精製することができる。このＡＫＴＡプライムは、大量生産向けに容易にスケールアップ可能な標準精製プロトコールの開発に使用可能なGeneral Electric Healthcareからの自動液体クロマトグラフィーシステムである。

【００８３】

真核生物宿主から目的の膜タンパク質を含んでなる微小胞を精製するための方法

本発明の著者らはまた、ＴＦを発現する細胞に由来する清澄抽出液中に存在する小胞がサイズ分画を用いてさらに富化可能であることを見出した。特定の理論に何ら縛られるものではないが、定義された孔径を有する膜を用いたサイズ分画は、タンパク質の凝固促進活性に悪影響を及ぼす細胞抽出液の他の成分の排除を可能とすると考えられる。本発明者らによって開発された方法は一般に、真核生物宿主(wherein said membrane)のいずれの膜タンパク質の精製にも適用可能であると考えられる。よって、別の態様において、本発明は、目的の膜タンパク質を含んでなる微小胞の調製物を作製するための方法に関し、その方法は、

ａ）真核宿主細胞の培養物を目的の膜タンパク質の発現を可能とする条件下で増殖させる工程；

ｂ）ａ）の培養物の細胞にホモジナイゼーションを施す工程；

ｃ）工程ｂ）から得られたホモジネートに分離を施して、ペレットと、目的の膜タンパク質を含有する該細胞由来微小胞を含有する清澄細胞抽出液とする工程；

ｄ）該細胞由来微小胞をサイズ分画により精製する工程

を含む。

【００８４】

工程（ａ）：真核生物宿主細胞の培養物の増殖

本発明に関して使用可能な真核生物の宿主としては、研究室または生産プラントで培養可能ないずれの細胞も含むが、細胞内で目的の膜タンパク質の発現を可能とするように遺伝的に操作することができる細胞がより好ましい。本発明において使用可能な宿主としては、酵母（例えば、サッカロミセス、ピキア）、昆虫細胞、植物細胞または哺乳類細胞系（例えば、ＣＯＳ、ＣＨＯ、ＢＨＫ、２９３、３Ｔ３）が挙げられる。

【００８５】

用いられる真核生物宿主は、通常のプロテオームの一部としてそれらのタンパク質を発現することができるか、または目的の膜タンパク質をコードする外来核酸を導入することによって改変されたものであり得る。両場合とも、細胞を目的の膜タンパク質の発現を可能とする条件下で培養する必要がある。目的の膜タンパク質が核酸によりコードされている場合は、この核酸をベクター内の、プロモーターの制御下に置けばよい。本発明の実施に好適な周知のプロモーターの例としては、数種の真核生物ウイルス（ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ＳＶ４０、ＣＭＶ、トリ肉腫ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス）で見られるもの、メタロチオネインｇｅｎプロモーター、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーター、レトロウイルスＬＴＲ領域、免疫グロブリンプロモーター、アクチンプロモーター、ＥＦ－１αプロモーターなどの構成プロモーター、ならびにテトラサイクリンプロモーター、ＮＦκＢ／ＵＶ光、Ｃｒｅ／ｌｏｘ、熱ショックプロモーター、ＷＯ／２００６／１３５４３６に記載の調節型ＲＮＡポリメラーゼＩＩプロモーターなど、下流遺伝子の発現に、培養物への外因性シグナル物質の添加が必要な誘導プロモーター、ならびにＷＯ２００６０１２２２１に記載のＰＳＡプロモーターなどの組織特異的プロモーターが挙げられる。

【００８６】

これらの細胞を任意の好適な培養培地を用いて培養する。当業者であれば、培養培地は用いる宿主細胞のタイプに応じて選択しなければならないことが分かるであろう。しかしながら、Sambrook, J. et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989))およびAusubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al, John Wiley & Sons (1992))に記載されているように、当業者であれ

ば、各細胞種に対して広範な培地を利用可能である。

【００８７】

事実上、本発明の方法によれば、いずれの膜タンパク質も発現および精製可能である。目的タンパク質が膜タンパク質であれば、それがシグナル配列を含む限り、宿主細胞の膜系が標的となるので、それ自体発現可能である。本発明の方法を用いて発現可能な膜タンパク質としては、受容体、輸送体、例えば、エストロゲン受容体、アミノ酸輸送体、アンドロゲン受容体、下垂体受容体、トランスフェリン受容体、プロゲステロン受容体およびグルコース輸送体が挙げられる。また、本発明の方法を用い、可溶性タンパク質も、これらの可溶性タンパク質がＮ末端でシグナル配列と、そしてＣ末端で膜貫通ドメインと融合されていれば、発現させることができる。このようにして、この融合タンパク質を宿主細胞の膜に挿入し、微小胞において精製する。好ましい実施態様では、目的の膜タンパク質は、上記のようなｒＴＦ、そのフラグメントまたはそのＮ－グリコシル化変異体である。

【００８８】

工程（ｂ）：ホモジナイゼーション

工程（ｂ）において、培養細胞をホモジナイズして、ホモジネートを得る。これらの細胞は、当業者に利用可能ないずれかの技術（遠心分離、沈降、濾過など）を用いて培養培地から分離する必要がある。ひと度、細胞が単離されれば、これらに、細胞壁および原形質膜を壊し、細胞内容物をバッファー中に放出させ、そこでホモジナイゼーションが行われるようにホモジナイゼーションを施す。細胞の破砕は、高圧、窒素空洞法、低張バッファーを用いた浸透圧ショック、超音波処理、機械的ホモジナイゼーション、酵素的破砕法、音波処理などの当技術分野で公知の好適な方法のいずれかを用いて行う。このホモジナイゼーションは洗剤の不在下で行う。好ましくは、このホモジナイゼーションは高圧により行う。

【００８９】

工程（ｃ）：ホモジネートの分離

次に、ホモジネートを、細胞から放出された内容物から壊れていない細胞および大きな凝集塊を分離するために、慣例の手段で分画する。好ましくは、この分画は１３０００ｘｇでの遠心分離により行う。遠心分離後に得られた上清は、可溶性材料と細胞膜系の断片化から生じた異なるサイズの種々の微小胞集団を含んでなる清澄細胞抽出液である。

【００９０】

工程（ｄ）：サイズ分画精製

次に、工程（ｃ）で得られた清澄細胞抽出液をその抽出液を形成している微小胞のサイズに基づいて分画し、特定の直径を有するものを選択する。本発明の著者らは、サイズ分画精製技術を用いれば、クロマトグラフィーおよびこれまでに必要とみなされた他の方法などの付加的精製工程を行わずに治療投与することができる十分な純度の微小胞調製物が得られることを見出した。本発明の特定の理論に縛られるものではないが、サイズ分画により清澄細胞抽出液を処理する工程の結果、夾雑物の混入が減った生成物が得られると考えられる。さらに、これらの夾雑物は、簡単なサイズ分画精製工程により微小胞から容易に分離できるサイズおよび性質のものである。

【００９１】

膜濾過はバイオプロセシング分野で周知の技術である。膜は、多様な駆動力下でそれを経て物質の移動が起こり得る、その厚さよりもはるかに大きな横寸法を有する構造として定義される。多くのフィルターが膜とみなされるが、その横寸法が深さの通常１００倍を超えず、その分離機能が主としてその深さによる種または粒子の捕捉によるものである材料も含まれる。膜を特徴付けるために用いられる最も一般的なパラメーターは３つの一般カテゴリーに属す。これらには輸送特性、孔の（幾何学的）特徴、および表面（または主に化学的）特性がある。しかしながらやはり、輸送特性は孔および表面の特徴に著しく依存する。膜分離は他の分離方法よりもゆっくりした、低容量の方法であり得るが、その有効性により、少量の有益な生成物を回収するために使用できる方法となる。

【００９２】

膜フィルター系は、種々の濾過特性を持つように種々の様式で設計することができる。設計基準には、終端（攪拌の有無）またはクロスフロー様式の取扱い；フィード混合物の全回収か部分回収か；ポンプ、不活性ガスブランケットまたは装置の透過側の排出による外部膜間差圧の適用；およびフラットシート（一重または多重）、中空繊維束または管状膜の使用が含まれる。サイズ分画分離法は、当業者に知られているような、透析または他の類似の膜であり得るサイズ分画膜を用いる。本発明のサイズ分画膜濾過に有用な好適な透析膜素材としては、ポリエーテルスルホン、ポリカーボネート、ナイロン、ポリプロピレン製のものなどの市販品が含まれる。これらの透析膜素材の供給者としては、例えば、Akzo-Nobel、Millipore, Inc., Poretics, Inc.およびPall Corp.が挙げられる。

【００９３】

好ましい実施態様では、膜に基づくサイズ分画は、クロスフロー型濾過としても知られるタンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）である。タンジェンシャルフロー濾過は、膜の表面の長手接線上に液体がポンピングされる加圧型分離方法である。適用される圧力は夾雑物を含む液体の一部を膜を経て濾過物となるサイズにする働きをする。膜の孔を通過するには大きすぎる粒子および高分子は上流側に保持される。保持された成分が膜の表面に堆積するノーマルフロー濾過（ＮＦＦ）技術とは対照的に、タンジェンシャルフロー濾過は保持された成分を液体の流れに沿って洗い流す。

【００９４】

ＴＦＦは、分離される成分のサイズに基づいて分類される。膜の孔径表示は一般にミクロン値として示され、表示よりも大きい粒子が膜に保持されることを示す。他方、公称分子量限界（ＮＭＷＬ）は、ＮＭＷＬより大きい分子量を有する溶解高分子の大部分とＮＭＷＬより小さい分子量を有するものがいくらか膜に保持されることを示す。成分の形状、その変形能、およびその溶液中の他の分子との相互作用は総て保持に影響を及ぼす。膜の製造業者が異なれば、系列の膜にＮＭＷＬ表示を割り当てる基準が違うが、当業者であれば、適当な表示を経験的に決定することができる。

【００９５】

限外濾過は最も広く用いられている形態のＴＦＦの１つであり、バッファー交換、脱塩または濃縮のためにバッファー成分からタンパク質を分離するために使用されるが、本発明の清澄細胞抽出液の濾過にも使用可能である。微小胞濾過の典型的な孔径は０．２～０．１ミクロンの範囲である。好ましい実施態様では、ＴＦＦは０．２ミクロンの孔径を有する第一の膜と０．１ミクロンの孔径を有する第二の膜を含み、その結果、膜間空間に０．２～０．１ミクロンの間の直径を有する微小胞が蓄積する。

【００９６】

ＴＦＦユニット操作では、ポンプを用いて、２つの膜表面の間のチャネルにフィード流の流れを作り出す。液体が膜の表面を通過するたび、適用された圧力が液体の一部を膜から濾過物流へ押しやる。この結果として、チャネルの中央でのバルク状態から膜表面のより濃縮された壁条件まで供給原料濃度に勾配ができる。また、入口から出口（保持物）まで、フィードチャネルの長さに沿って濃度勾配があり、徐々にたくさんの液体が濾過物側へ送られる。膜の長さに沿った供給原料流はチャネルのフィード端から保持物端へ圧力低下が起こる。膜の濾過物側の流れは一般に低く、制限はほとんどなく、従って、濾過物側での膜の長さに沿った圧力はほぼ一定である。

【００９７】

膜は種々の材料から製造可能であり、流水特徴および化学適合性に選択肢を与える。好適な材料としては、セルロース、ポリエーテルスルホンおよび当業者に公知の他の材料が含まれる。ある特定の実施態様では、ポリエーテルスルホンが用いられる。典型的なポリエーテルスルホン膜は、タンパク質ならび他の生体成分を吸着し、膜の汚れや流れの低下をもたらす傾向がある。Ｂｉｏｍａｘ(Millipore)など、いくつかの膜は耐汚染性が増すように親水性修飾されている。

【００９８】

当業者であれば、様々な種類のＴＦＦモジュールが本発明の実施に有用であることが分

かるであろう。有用なＴＦＦモジュールとしては、限定されるものではないが、平板モジュール（カセットとしても知られる）、スパイラル型モジュールおよび中空繊維モジュールが挙げられる。

【００９９】

与えられた任意のモジュールに対して、当業者であれば、鍵となるプロセスパラメーターを容易に最適化することができる。このようなパラメーターとして、クロスフロー流速、膜間差圧（ＴＭＰ）、濾過物制御、膜面積およびダイアフィルトレーション設計が挙げられる。クロスフロー流速はどのモジュールが選択されるかによって異なる。一般に、同じＴＭではクロスフロー流速が大きいほど、流束が大きく、膜の洗い流し作用が増し、膜表面に向かう濃度勾配が小さくなる。多くのＴＦＦ適用がクロスフローを用い、クロスフローおよび圧力設定点を用い、モジュールの外では濾過物は無制御かつ無制限に流れる。これは最も簡単なタイプの作動であるが、状況によっては、単に保持物バルブで圧力を調節することによって達成されるもの以上に、数種の濾過物制御を使用することが望ましい場合がある。膜面積はプロセスフローおよび処理される総量を決定した後に選択し、これもまた処理時間に依存する。

【０１００】

濃縮は一般に、２０００～４５００ｇ、例えば２５００～４０００ｇの間、または２７５０～３５００ｇの間、または３０００～３５００ｇの間、例えば、３０００ｇまたは３１００ｇまたは３２００ｇまたは３３００ｇまたは３４００ｇまたは３５００ｇでの遠心分離によって行うことができる。

【０１０１】

一般にこの遠心分離は数時間、例えば、１時間より長い時間、例えば、１～１０時間行うことができる。

【０１０２】

目的のポリペプチドの安定性に対する負の作用を最小化するために、遠心分離は特に２～２００℃の範囲、例えば３～１５℃の範囲、または３～１０℃の範囲、または３～６℃の範囲の温度で行うことができる。

【０１０３】

ＴＦＦに用いるのに好ましいバッファーはリン酸バッファー、ＨＥＰＥＳバッファーまたはＴＲＩＳバッファーである。しかしながら、ある特定の実施態様では、このバッファーは、少なくとも５ｍＭ、６ｍＭ、７ｍＭ、８ｍＭ、９ｍＭ、１０ｍＭ、１１ｍＭ、１２ｍＭ、１３ｍＭ、１４ｍＭおよび１５ｍＭの濃度を含み、さらにこの間のｍＭ濃度を含む５ｍＭ～１５ｍＭの濃度を有する。ある特定の実施態様では、このバッファーは約７．２～７．５の間のｐＨを有する。よって、ある実施態様では、バッファーは７．２、７．３、７．４または７．５のｐＨ、またはその間の端数ｐＨを有する。もう１つの実施態様では、バッファーは、０．１０Ｍ～０．２０ＭのＮａＣｌおよび３．５％～４．５％のスクロースをさらに含んでなるバッファーに置き換わる。

【０１０４】

好ましい実施態様では、サイズ分画工程の後に得られた微小胞調製物を、サンプル中に存在する他のいずれかの生成物から、最も高いタンパク質量／活性を有する微小胞の分離を可能とする第二の精製工程に適用する。

【０１０５】

一つの実施態様では、この第二の精製工程は、第二のサイズ分画工程によって行われる。もう１つの実施態様では、この第二の精製工程はアフィニティークロマトグラフィーによって行うことができる。微小胞がＴＦを含んでいれば、アフィニティークロマトグラフィーは、ＴＦに対して親和性を示す化合物（例えば、抗体）を用いて行う。微小胞がＴＦとタグを含んでなる融合タンパク質を含む場合には、アフィニティークロマトグラフィーは、該タグに対して親和性を示すリガンドを用いることによって行うことができる。好ましくは、このタグはヘキサヒスチジンタグであり、この場合、アフィニティークロマトグラフィーは、金属親和性カラムを用いて行う。ひと度、微小胞調製物が精製されれば、次

に、この分画工程の溶出液を目的タンパク質の存在に関して試験し、その後、最高量のタンパク質または最高活性を含有する画分をプールし、そのまま用いる。カラムの溶出プロフィールは、与えられたタンパク質の存在を検出するために当技術分野で公知の利用可能ないずれかの手段（ＥＬＩＳＡ、ウエスタンブロット、ＲＩＡなど）を用いてタンパク質の存在に関して試験することができるか、または目的タンパク質の活性の存在に関して試験することができる。当業者であれば、活性試験が精製されるタンパク質によって異なることが分かるであろう。好ましい実施態様では、目的タンパク質はＴＦであり、該タンパク質を含んでなる小胞を含有する画分を同定するために検出可能な活性は実施例５に説明されている凝固促進活性である。

【０１０６】

本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の治療的使用

種々のアッセイが、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞が凝固促進活性を示すことを示した。効果的には、実施例４は下記を含む。

ａ）本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞は、健常状態および罹患状態の双方で、繊維素血餅の形成および血液凝固を起こすことを示すin vitroアッセイ；すなわち、該アッセイは、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞が

・健常被検体からの血漿（血漿における凝固アッセイ）；
・血漿のＦＶＩＩＩ、ＦＩＸまたはＦＸＩ欠損（血漿における凝固アッセイ）；
・後天性血小板欠乏症からの血漿（血小板減少症血漿における凝固アッセイ）；
・抗ＦＶＩＩ抗体の存在下でのＦＸＩ欠損血漿からの血漿（血漿における凝固アッセイ）；
・健常被検体からの血液（非抗凝固処理全血における凝固アッセイ）；および
・血友病患者からの血液（非抗凝固処理全血における凝固アッセイ）

を凝固可能であることを示す。

ｂ）本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞が重度出血モデルにおける局所的抗血友病処置に有用な薬剤であることを示すin vivoアッセイ（予め切断された血管に直接適用することによる）；すなわち、該アッセイは、該ＴＦ担持酵母由来微小胞が非処理およびヘパリン処理実験動物において局所的止血剤として有用であることを示す。

ｃ）本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞が致死的出血モデルにおける局所的抗血友病処置に有用な薬剤であることを示すin vivoアッセイ（予め切断された血管に直接適用することによる）；すなわち、該ＴＦ担持酵母由来微小胞が、ＦＶＩＩＩ欠損マウス尾の基部切断による致死的出血モデル動物モデルにおいて局所的止血剤として有用であることを示す。

【０１０７】

これらの結果は本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞が被検体における出血の局所的処置に有用な凝固促進薬または抗血友病薬であることを示す。

【０１０８】

よって、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞は、被検体における出血の処置において、薬剤として、すなわち、凝固促進薬または抗血友病薬として、特には、局所的適用用の抗血友病薬として使用可能である。

【０１０９】

従って、別の態様では、本発明は、薬剤としての本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞に関する。特定の実施態様では、本発明は、被検体において出血を処置するのに好適な凝固促進（抗出血）活性を有する局所的薬剤としての本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞に関する。

【０１１０】

本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞は、被検体において出血を処置するために局所的に、すなわち、薬学上許容されるビヒクルと混合することなく、適用することができるが、本発明の方法に従って得られたＴＦ担持酵母由来微小胞を含んでなる清澄酵母抽出液（ＣＹＥ）の成分は、一般に被検体への投与に関して、被検体に実質的に無害であるので、本発

明のＴＦ担持酵母由来微小胞は、その投与に、好ましくは、出血の局所的（局部的）処置のためのその局所投与に好適な医薬投与形で処方される。

【０１１１】

よって、別の態様において、本発明は、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞と薬学上許容されるビヒクル、担体または賦形剤とを含んでなる医薬組成物、（以下、本発明の医薬組成物）に関する。該医薬組成物は次に、被検体に対するその投与に好適な医薬投与形として処方される。

【０１１２】

そして、被検体に対するその投与のためには、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞は、医薬投与形、好ましくは、この目的のために所望の医薬投与形の作製に好適な薬学上許容される担体および賦形剤が組み込まれている、その局所投与に好適な医薬投与形として処方される。本発明の生成物の投与に好適な担体および賦形剤ならびに投与形についての情報は生薬学論文に見出すことができる。一般的な薬剤の種々の医薬投与形およびそれらの製法に関する総説は、C. Fauli i Trillo, 1st Edition, 1993, Luzan 5, S.A. of Edicion esmによる、"Tratado de Farmacia Galenica" ("Galenic Pharmacy Treatise")と題された書籍に見出すことができる。

【０１１３】

本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の種々の医薬投与形が使用可能であるが、該生成物の局所投与が実施上最も有利であり、従って、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞はその局所投与に好適な医薬形として処方される。該医薬形の例示的、非限定的な例としては、エアゾール、溶液、懸濁液、エマルション、ゲル、膏薬、クリーム、包帯、パッチ剤、軟膏、マウスウォッシュなどが挙げられる。この目的のため、本発明の医薬組成物は、局所投与用の本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の医薬投与形を製造するのに必要な薬学上許容されるビヒクル、担体および／または賦形剤を含む。

【０１１４】

よって、特定の実施態様では、本発明の医薬組成物は、該生成物と本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の局所投与に好適な薬学上許容されるビヒクル、担体または賦形剤とを含んでなる本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の局所投与のための医薬組成物である。該ＴＦ担持酵母由来微小胞の局所投与に好適な薬学上許容されるビヒクル、担体または賦形剤の例示的、非限定的な例は生薬学論文に見出すことができる。

【０１１５】

特定の実施態様では、本発明の医薬組成物は、ヒトＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメント、例えば、成熟ヒトＴＦまたは末端切断型ヒトＴＦ（すなわち、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインの全部または一部を欠いているヒトＴＦタンパク質、またはＦＶＩＩａとの結合を担うドメインが機能的でない、凝固促進活性を有するヒトＴＦタンパク質変異体）などを含んでなるＴＦ担持酵母微小胞を含んでなる。

【０１１６】

本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞は、本発明の医薬組成物中に治療上有効な量で存在する。この量は広範囲で可変であり、例えば、活性タンパク質約１．０ｐｇ／ｍｌ～活性タンパク質１．０ｍｇ／ｍｌの間、好ましくは、活性タンパク質０．０５μｇ／ｍｌ～活性タンパク質１０μｇ／ｍｌの間、いっそうより好ましくは、活性タンパク質約０．１μｇ／ｍｌ～活性タンパク質２．０μｇ／ｍｌの間である。

【０１１７】

被検体に投与される本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の用量は極めて広範囲で可変であり、例えば、活性タンパク質約１．０ｐｇ／ｍｌ～活性タンパク質１．０ｍｇ／ｍｌの間、好ましくは、活性タンパク質０．０５μｇ／ｍｌ～活性タンパク質１０μｇ／ｍｌの間、いっそうより好ましくは、約活性タンパク質０．１μｇ／ｍｌ～活性タンパク質２．０μｇ／ｍｌの間である。投与される本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の用量は、とりわけ、用いるＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメントの特徴、例えば、その活性および生体半減期、処方物中のＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するその

フラグメントの濃度、被検体または患者の臨床症状、処置される出血性障害などを含むいくつかの因子によって異なる。この理由のため、当業者は本明細書で述べられる用量を単に指針としてみなすべきであり、当業者はこれまでに述べられた変数に従って用量を調整しなければならない。しかしながらやはり、本発明の医薬組成物は、予防目的または治療目的で１日に１回以上投与することができる。

【０１１８】

本発明の医薬組成物は、出血素因の予防および／または処置に有用な他の付加的薬剤（例えば、凝固因子、ヒト血漿など）とともに用いて併用療法を提供することができる。これらの付加的薬剤は同じ医薬組成物の一部であってもよいし、あるいは本発明の医薬組成物の投与に関して、それらの同時投与または連続投与（逐次投与）のための別個の組成物の形態で提供することもできる。

【０１１９】

本発明の医薬組成物は、支持体上に置くこともできる。よって、別の態様では、本発明は、本発明の医薬組成物と支持体とを含んでなる生成物に関する。本明細書において「支持体」とは、本発明の医薬組成物を付着させ、それを担持させ、それを所望の部位、例えば、本発明の医薬組成物がその治療効果を発揮する部位で放出する好適な材料の基質を指す。該支持体は固相支持体または非固相支持体であってよく、例えば、液体支持体または気体支持体であってもよい。固相支持体の例示的、非限定的な例としては、包帯、バンドエード、圧縮剤、硬膏などが挙げられる。液体支持体の例示的、非限定的な例としては、ゲル、スプレー、マウスウォッシュなどが挙げられる。気体支持体の例示的、非限定的な例としては、空気、噴射剤などが挙げられる。

【０１２０】

特定の実施態様では、本発明の医薬組成物は、ヒトＴＦタンパク質または凝固促進活性を有するそのフラグメント、例えば、成熟ヒトＴＦまたは末端切断型ヒトＴＦ（すなわち、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインの全部または一部を欠いているヒトＴＦタンパク質、またはＦＶＩＩａとの結合を担うドメインが機能的でない、凝固促進活性を有するヒトＴＦタンパク質変異体）を含んでなるＴＦ担持酵母微小胞を含んでなる。

【０１２１】

支持体に付着された本発明の医薬組成物を含んでなるこの生成物は、例えば、本発明の医薬組成物と支持体を混合することよるなどの慣例の方法によって得ることができる。本発明の医薬組成物と支持体の間の相互作用は、本発明の医薬組成物の性質および用いる支持体によって、物理的または化学的相互作用であり得る。

【０１２２】

他の態様では、本発明は、被検体における出血の処置のため、特に、健常な被検体または出血素因を有する被検体における出血の局所的処置のための薬剤の製造における、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の使用に関する。

【０１２３】

本明細書において「局所的処置」とは、それが必要な部位、例えば、開放創傷、外科術などによる静脈および動脈出血、ならびに粘膜皮膚出血および微小血管出血における、皮膚（切断など）および血管組織（血管破裂など）の不連続部における直接的処置の適用を指す。

【０１２４】

本発明によれば、また、実施例４に示されているように、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞は凝固促進薬または抗血友病薬として作用することができ、結果として、該生成物が出血性障害、特に出血素因を伴う出血性障害を処置または矯正するために使用可能である。

【０１２５】

「出血素因」とは、出血性障害を引き起こし、その結果、時として長期かつ過度な出血を伴って起こり得る出血症候群の発生をもたらすプロセスを指す。出血素因は先天性または後天性凝固障害により、および／または先天性および後天性血小板障害により起こり得

る。
【０１２６】
「凝固障害」とは、凝固因子障害を指す。この障害は特異的凝固因子の欠乏または欠損によるか（その結果として出血症候群が起こる）、または凝固因子障害によるものであり得る。凝固障害は一般に先天性凝固障害または後天性凝固障害であり得る。
【０１２７】
先天性凝固障害の例示的、非限定的な例として、凝固因子Ｖ（ＦＶ）、凝固因子ＶＩＩ（ＦＶＩＩ）、その欠損または欠乏が血友病Ａを引き起こす凝固因子ＶＩＩＩ（ＦＶＩＩＩ）、その欠損または欠乏が血友病Ｂを引き起こす凝固因子ＩＸ（ＦＩＸ）、凝固因子Ｘ（ＦＸ）、その欠損または欠乏が血友病Ｃを引き起こす凝固因子ＸＩ（ＦＸＩ）、凝固因子ＸＩＩ（ＦＸＩＩ）、凝固因子ＸＩＩＩ（ＦＸＩＩＩ）およびそれらの組合せから選択される凝固因子の欠乏が挙げられる。
【０１２８】
後天性凝固障害は、種々の起源を持ち得る。例示としては、重度の肝不全、抗凝固薬療法（ヘパリン、低分子量ヘパリン、ワーファリン、クマリン誘導体、ジクマリンなど）における凝固因子合成欠損が挙げられる。もう１つの機構は凝固因子の極度の消耗に基づくものであり、その結果、それらは出血傷害部において血餅の形成に利用できない。この機構は播種性血管内凝固症候群または複数の微小血栓の形成を伴う、血小板および凝固因子を活性化する微小循環内皮を傷害する重度の敗血症；胎盤放出などのＴＦによる血管侵入；死亡胎児の保持；組織の破壊を伴う多重外傷；有毒のヘビの噛みつきなどの多重疾患において起こる消耗による凝固障害で見られる。脈管炎では、体壁および内皮の損傷が凝固アクチベーターを放出する。凝固因子の消耗は、ＰＤＦの放出を伴うプラスミン（抗血小板薬および抗凝固薬）の作用による多くの微小血栓の繊維素の溶解により悪化する。
【０１２９】
「血小板障害」とは、血小板の数および機能的能力の双方の障害を指し、その結果、出血症候群が起こる。この血小板障害は先天性または後天性であり得る。
【０１３０】
特定の実施態様では、該血小板障害は先天性血小板障害である。先天性血小板障害の例示的、非限定的な例としては、Glanzmann病、Bernard Soulier病、Bolin-Jamieson症候群、Wiskott-Aldrich症候群、Paris-Trousseau-Jacobsen症候群、Ｘ染色体血小板減少症、Gray血小板症候群、Sebastian症候群およびFanconi貧血が挙げられる。
【０１３１】
別の特定の実施態様では、該血小板障害は後天性血小板障害である。後天性血小板障害の例示的、非限定的な例としては、血小板血症、赤血球増加症、慢性骨髄球性白血病などの骨髄増殖性障害が挙げられ、出血時間の延長、ガラスビーズ保持欠損、血小板凝集欠損、異常な放出および血小板因子ＩＩＩ欠損を伴う骨髄化性における機能的血小板障害がある。機能的血小板欠損は、壊血病ならびに先天性心疾患および硬変における異常タンパク質血症で見られている。
【０１３２】
「後天性凝固障害」および「後天性血小板障害」とは、医原性または他の疾病の続発性であり得る障害の起源を指す。
【０１３３】
本明細書において「被検体」とは、ヒト種を含む動物種のいずれのメンバーも含み、例示的、非限定的な例としては、該被検体は霊長類、家庭内動物、齧歯類などの哺乳類であり得、該被検体は好ましくは、任意の年齢および人種の男性または女性である。特定の実施態様では、該被検体は、止血障害の履歴のないヒト、例えば、凝固障害または血小板障害を有していない個体である。別の特定の実施態様では、該被検体は、止血障害の履歴のあるヒト、例えば、凝固障害（先天性もしくは後天性凝固障害など）、または血小板障害（先天性もしくは後天性血小板障害など）などの出血素因を有する個体である。
【０１３４】

よって、特定の実施態様では、本発明は、止血障害の履歴のないヒトにおける出血の局所的処置のための薬剤の製造における、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の使用に関する。別の特定の実施態様では、本発明は、出血素因を有するヒトにおける出血の局所的処置のための薬剤の製造における、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞の使用に関する。

【０１３５】

上述のように、被検体への局所投与のためには、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞は、被検体における出血の局所的（局部的）処置のためのその局所投与に好適な医薬形で処方される。該医薬形の例示的、非限定的な例としては、エアゾール、溶液、懸濁液、エマルション、ゲル、膏薬、クリーム、包帯、パッチ剤、軟膏、マウスウォッシュなどが挙げられる。この目的のため、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞を含んでなる医薬組成物は、選択された医薬投与形を作製するのに必要な薬学上許容されるビヒクル、担体および賦形剤を含む。医薬組成物に関する情報（医薬投与形、用量、有効成分の量など）は、本発明の医薬組成物に関してすでに述べられている。

【０１３６】

また、ＴＦは、脈管形成を誘発し、ＶＥＧＦの産生を増大させることが報告されている(Ollivier et al, 2000, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol, 20:1374-1381; Chen et al, 2000, Thromb. Haemost., 86:334-345 y Watanabe et al., 1999, Thromb. Res., 96: 183- 189)。よって、別の態様では、本発明は、脈管形成の増大または細胞遊走の増大が必要な疾病の処置のための本発明の酵母由来微小胞に関する。

【０１３７】

脈管形成の低下に関連し、本発明の脈管形成促進組成物の処置から利益を受け得る疾病としては、冠動脈疾患、例えば、虚血性心筋、心筋梗塞、虚血性心筋症）または末梢動脈疾患、例えば、慢性四肢虚血、跛行（骨格筋）または安静時疼痛／虚血性潰瘍形成／壊疽などが挙げられる。脈管形成の促進は同様に、虚血性脳卒中／神経障害（脳／神経組織など）、例えば、脳卒中／梗塞周囲の虚血性半影帯(ischemic pneumbra)においても必要とされる。あるいは、本発明の組成物の脈管形成促進作用は、血管内管腔表面の治癒および／または内皮化を促進するため、例えば、不安定／潰瘍化アテローム斑の内皮化を促進するため、例えば、冠動脈／頸動脈、または例えば頚動脈内の動脈内膜切除術において、または血栓摘出術（動脈／静脈のいずれか）、血管形成術（バルーン、レーザーまたは低温血管形成術など）、粥腫切除術後、または血栓溶解後に見られるものなどの脱内皮化管腔表面において、酸化窒素剤を含む組成物を投与することにより使用することができる。本発明の脈管形成促進組成物はまた、急性または慢性動脈および／または静脈血栓の消散、例えば、再血管新生および／または新血管新生および／または再疎通にも有用であり得る。別の実施態様では、本発明の組成物は、遺伝子療法適用、臓器再生適用のため、およびバイオ人工ハイブリッド臓器（例えば、膵臓、腎臓、肺、肝臓）置換ならびに創傷治癒の促進のため、および／または増進および／または例えば虚血性、糖尿病性、神経因性、静脈鬱血に基づく創傷に対する顆粒組織の促進のための新毛細血管床の発達を促進する。

【０１３８】

ＴＦは、細胞遊走を促進することが報告されている（Ott et al., 2005, Circulation, 111:349-355およびＷＯ０１０５３５３）。よって、別の態様において、本発明は、それを必要とする患者において細胞遊走を促進するための、本発明のＴＦを含んでなる組成物に関する。種々の疾病が、その遊走が刺激される細胞種に応じて本発明の組成物で処置可能であると考えられる。例えば、血管、動脈、冠動脈、静脈、食道管腔および尿道などの体腔に傷害を有する患者は内皮細胞の遊走刺激を必要とし；虚血性および出血性脳卒中の双方の結果として中枢神経系に傷害を有する患者および外傷を受けた患者は、その傷害部への神経細胞の遊走刺激を必要とし；例えば糖尿病患者および高齢患者において、慢性および処置耐性であり得る潰瘍（例えば四肢潰瘍および褥瘡）、角膜創傷、火傷、擦過傷、外科的切開、ドナー移植片部位、および感染性病原体により引き起こされる傷害部を有する患者。処置可能な他の医学的症状は慢性症状（例えば、慢性静脈性潰瘍、糖尿病性潰瘍、圧迫性潰瘍、褥瘡、および粘膜表面の潰瘍またはただれなど）であり得、持続的炎症

症状または感染により、あるいは遺伝的欠陥（ケロイド形成および凝固異常）により引き起こされる皮膚および内皮表面の傷害は、受傷組織を再増殖させるのに必要な内皮細胞の遊走刺激から利益を受ける。

【０１３９】

本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞を含んでなる組成物

他の態様では、本発明は、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞とビヒクルを含んでなる組成物（以下、「本発明の組成物」と呼ぶ）に関する。

【０１４０】

事実上、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞に悪影響を及ぼさないビヒクルはいずれも本発明の組成物に使用可能である。

【０１４１】

一つの実施態様では、該ビヒクルは、本発明の方法を実施することにより得られる本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞を取り巻く培地などの実質的に液体培地である。よって、特定の実施態様では、本発明の組成物は、本発明の方法の実施において得られる清澄酵母抽出液を含んでなる。

【０１４２】

ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインの全部または一部を欠いている末端切断型ＴＦ

上述のように、発明者らは驚くべきことに、ＦＶＩＩａと結合することができない末端切断型ＴＦタンパク質が凝固促進活性を有することを見出した。実施例４に見られるように、発明者らは、末端切断型のＴＦタンパク質が血漿における凝固アッセイで凝固促進活性を有することを示した。

【０１４３】

よって、別の態様において、本発明は、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインの全部または一部を欠いている末端切断型ＴＦ（以下、「本発明の、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ」と呼ぶ）を指し、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインの全部または一部を欠いており、その結果、それはＦＶＩＩａと結合することができないが、凝固促進活性は有する。拡張すれば、この「本発明の、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ」は、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインが変異のために機能的でない、凝固促進活性を有するＴＦタンパク質変異体を含む。

【０１４４】

本発明の、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦは、例えば、好適な発現系（酵母、細菌、真核細胞、昆虫細胞など）での該タンパク質をコードするヌクレオチド配列の遺伝子発現によるなどの慣例の手段により得ることができる。

【０１４５】

本発明の、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦがＦＶＩＩａと結合することができるかどうかを判定するため、国際公開公報ＷＯ００／０４１４８に記載されているような結合アッセイを使用することができる。さらに、本発明の、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦの凝固促進活性は、これまでに述べられているように、例えば、血漿におけるin vitro凝固アッセイによるか、または非抗凝固処理全血におけるin vitro凝固アッセイによるか、または重度出血動物モデルにおけるin vivoアッセイによるか、または実施例４に述べられているアッセイなどの致死的出血モデル動物モデルにおけるin vivoアッセイによるなど、実施例４に述べられている凝固アッセイのいずれかによりアッセイすることができる。

【０１４６】

特定の実施態様では、本発明の、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦは、因子Ｘに対する相互作用ドメイン、膜貫通領域および細胞質テールを含んでなり、かつ、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインを部分的にまたは完全に欠いている。さらに、特定の実施態様では、本発明の、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦは、因子Ｘに対する相互作用ドメイン（ａａ１７４～２５１）、膜貫通領域（ａａ２５２～２７４）および細胞質テール（ａａ２７５～２９５）および付加的ヒスチジンタグ（実施例

３）を含有する末端切断型のヒトＴＦタンパク質である。発明者らは今般、驚くべきことに、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインを欠いている、該末端切断型のＴＦタンパク質は凝固促進活性を有することを見出した（実施例４表３）。

【０１４７】

別の特定の実施態様では、該ＴＦはＦＶＩＩａ結合ドメインにおける１以上の点変異により改変されており、その結果、該ドメインはもはやＦＶＩＩａと結合することができない。該ＦＶＩＩａとの結合を無効にすることが知られているＴＦのＦＶＩＩａ結合ドメインにおける点変異は当技術分野で公知である（例えば、引用することによりそのまま本明細書の一部とされるKelley, R.F. et al, 1995, Biochemistry, 34:10383-10392に記載されているもの）。

【０１４８】

周知のように、血液凝固外因性経路において、ＴＦは循環ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａと結合してＴＦ：：ＦＶＩＩａ複合体を形成し、カルシウムの存在下で、ＦＸの活性化が起こるように基質として働くことから、ＦＶＩＩａとの結合を担うドメインの全部または一部を欠いている該ＴＦフラグメントは凝固促進活性を有することが、驚くべきことに認められている。血管傷害によって起こる出血事象では、ＴＦとそのリガンドであるＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａの相互作用を含む外因性経路の活性化によって凝固が誘発されることが受け入れられている。

【０１４９】

本発明の、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦはグリコシル化されていてもされていなくてもよい。よって、特定の実施態様では、本発明の、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦはグリコシル化されておらず、一方、別の特定の実施態様では、本発明の、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦはグリコシル化されている。上述のように、「グリコシル化」とは、いずれの程度のグリコシル化も含む。

【０１５０】

１以上の非機能的グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体

上述のように、本発明の著者らはまた、ＴＦの凝固促進活性ならびに酵母宿主細胞におけるその発現が、該ＴＦがそのグリコシル化部位に、野生型ＴＦで見られる３つのＮ－結合グリコシル鎖のうち少なくとも１つの結合を妨げる変異を有する場合に増強されることも見出した。よって、特定の実施態様では、本発明のＴＦ担持酵母由来微小胞は、凝固促進活性を有するＴＦタンパク質の非グリコシル化フラグメントを含んでなる。上述のように、「グリコシル化」とは、いずれの程度のグリコシル化も含む。好ましい実施態様では、該ＴＦ変異体は、ＴＦのＮ－グリコシル化部位のうち少なくとも１つが、それを非機能的とするように、すなわち、グリコシド鎖の付加のためのアクセプター部位として働くことができないように修飾されているポリペプチドである。修飾可能なＴＦ配列のＮ－グリコシル化部位は前述のもの、すなわち、Asn^{11}－Leu^{12}－Thr^{13}部位、Asn^{124}－Val^{125}－Thr^{126}部位および／またはAsn^{137}－Asn^{138}－Thr^{139}部位である。Ｎ－グリコシル化コンセンサス領域の修飾はいずれも、Ｎ－結合グリコシル鎖の付加が無効となるか、または実質的に阻害される限り好適である。好ましくは、この修飾は成熟ヒトＴＦの１１、１２４および／または１３６番に相当するＡｓｎ残基に導入されるが、それはこれがグリコシル鎖の結合のためのアクセプターとして働く残基であるからである。本発明において「成熟ヒトＴＦの１１、１２４および／または１３６番に相当する部位」とは、ヒト配列とオーソログ配列が配列類似性に基づいてアラインされた際に、そのポリペプチド鎖の異なる位置に見られることがあるが、成熟ヒトＴＦのＮ－グリコシル化部位と一致する、他のＴＦオーソログのＮ－グリコシル化部位を指す。アライメントまたはマルチプルＴＦ配列のため、従って、ヒト成熟ＴＦにおける部位に相当するＴＦオーソログにおけるＮ－グリコシル化部位を同定するために好適なアルゴリズムは、ＧＣＧソフトウエアパッケージ(Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wis.)の一部となっているＰＩＬＥＵＰプ

ログラムである。ＰＩＬＥＵＰは、累進型ペアワイズアライメントを用い、関連の配列群からマルチプル配列アラインメントを作成し、関係と配列同一性を示す。それはまた、アライメントを作成するために用いたクラスタリング関係を示す樹状図または系統樹もプロットする。ＰＩＬＥＵＰは、Feng and Doolittle, J. Mol. Evol., 35: 351-360 (1987)の累進型アライメント法の簡略化を用いる。好ましくは、１１、１２４および／または１３６番のＡｓｎ残基はＡｌａで置換される。よって、好ましい実施態様では、微小胞の一部をなすＴＦ変異体は、ヒト成熟ＴＦのＮ１１Ａ、Ｎ１２４Ａ、Ｎ１３７Ａ、Ｎ１１ＡとＮ１２４Ａ、Ｎ１１ＡとＮ１３７Ａ、Ｎ１２４ＡとＮ１３７Ａ、およびＮ１１ＡとＮ１２４ＡとＮ１３７Ａの群から選択される。他のいずれのＴＦオーソログでも、変異は、Ｎ－結合グリコシル化コンセンサス部位を形成する、対応するＡｓｎ残基で起こる。

【０１５１】

本発明の、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ、非機能的ＦＶＩＩａ結合ドメインを担持する変異ＴＦおよび１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体は融合タンパク質のメンバーであり、該融合タンパク質は、別のペプチドまたはタンパク質を含んでなる第二の領域と結合された、本発明の、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ、該変異ＴＦ担持非機能的ＦＶＩＩａ結合ドメインおよび１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体を含んでなる第一の領域を含む。該第二の領域は、本発明の、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ、非機能的ＦＶＩＩａ結合ドメインを担持する変異ＴＦ、および１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体のアミノ末端領域と結合されることができ、あるいは該第二の領域は、本発明の、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ、非機能的ＦＶＩＩａ結合ドメインを担持する変異ＴＦ、および１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体のカルボキシル末端領域と結合されることができる。第一および第二の双方の領域は、直接結合されていてもよいし、あるいは第一と第二の領域の間のリンカーポリペプチドを介して結合されていてもよい。

【０１５２】

特定の実施態様では、該融合タンパク質は、本発明の、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦのＣ末端またはＮ末端ドメインに結合された、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ、非機能的ＦＶＩＩａ結合ドメインを担持する変異ＴＦまたは１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体とタグ、通常にはペプチドタグを含んでなる。該タグは一般に、該融合タンパク質の単離または精製に使用可能であるペプチドまたはアミノ酸配列である。このタグの例示的、非限定的な例はこれまでに記載されている。特定の実施態様では、このタグは、ＴＦタンパク質のＣ末端ドメインに結合されたＨｉｓタグである。別の実施態様では、このタグは、ＴＦタンパク質のＮ末端ドメインに結合されているＨｉｓタグである。

【０１５３】

該融合タンパク質は、例えば、好適な酵母細胞における、該融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の遺伝子発現によるなどの慣例の手段によって得ることができる。最終的なタグは、望ましければ、該融合タンパク質の単離または精製に使用可能である。

【０１５４】

ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ、非機能的ＦＶＩＩａ結合ドメインを担持する変異ＴＦ、および１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体は、薬剤として、例えば、被検体における出血の処置において凝固促進薬として使用可能である。

【０１５５】

よって、別の態様において、本発明は、薬剤としての該ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ、該非機能的ＦＶＩＩａ結合ドメインを担持する変異ＴＦ、および該１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体に関する。特定の実施態様では、本発明は、被検体において出血を処置するために好適な凝固促進活性を有する薬剤としての、該ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ、該非機能的ＦＶＩ

Ｉａ結合ドメインを担持する変異ＴＦ、および該１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体に関する。

【０１５６】

さらに、別の態様において、本発明は、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ、非機能的ＦＶＩＩａ結合ドメインを担持する変異ＴＦまたは１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体と薬学上許容されるビヒクルとを含んでなる医薬組成物に関する。

【０１５７】

特定の実施態様では、該医薬組成物は、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ、非機能的ＦＶＩＩａ結合ドメインを担持する変異ＴＦまたは１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体と、本発明のＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦまたは１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持する変異ＴＦの局所投与に好適な薬学上許容される担体の局所投与に好適な医薬組成物である。

【０１５８】

別の態様において、本発明は、被検体において細胞遊走および／または脈管形成を促進する必要がある疾病の処置のための、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ、非機能的ＦＶＩＩａ結合ドメインを担持する変異ＴＦ、および１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体に関する。別の態様において、本発明は、それを必要とする被検体において脈管形成を促進するため、または細胞遊走を促進するための、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ、非機能的ＦＶＩＩａ結合ドメインを担持する変異ＴＦ、または１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体に関する。

【０１５９】

一般に、被検体に投与するために、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ、非機能的ＦＶＩＩａ結合ドメインを担持する変異ＴＦ、または１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体は、出血の局所的（局部的）処置のためのその局所投与に好適な医薬形として処方される。該医薬形の例示的、非限定的な例としては、エアゾール、溶液、懸濁液、エマルション、ゲル、膏薬、クリーム、包帯、パッチ剤、軟膏、マウスウォッシュなどが挙げられる。この目的のため、本発明のＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦを含んでなる医薬組成物は、選択された医薬投与形を作製するのに必要な薬学上許容される担体および賦形剤を含む。よって、特定の実施態様では、本発明のこの医薬組成物は、本発明の末端切断型ＴＦタンパク質の他、生薬学論文に見出すことができるような薬学上許容されるビヒクルを含んでなる。

【０１６０】

本発明のＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ、本発明の非機能的ＦＶＩＩａ結合ドメインを担持する変異ＴＦ、および本発明の１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体は、治療上有効な量でこの医薬組成物中に存在する。この量は広範囲で可変であり、例えば、活性タンパク質約１．０ｐｇ／ｍｌ～活性タンパク質１．０ｍｇ／ｍｌの間、好ましくは、活性タンパク質０．０５μｇ／ｍｌ～活性タンパク質１０μｇ／ｍｌの間、いっそうより好ましくは、活性タンパク質約０．１μｇ／ｍｌ～活性タンパク質２．０μｇ／ｍｌの間である。

【０１６１】

別の態様において、本発明は、該ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ、該非機能的ＦＶＩＩａ結合ドメインを担持する変異ＴＦ、および該１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体をコードするポリヌクレオチド配列（以下、「本発明のポリヌクレオチド」と呼ぶ）に関する。

【０１６２】

別の態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチド配列を含んでなるベクター（以下、「本発明のベクター」と呼ぶ）に関する。本発明において用いるのに好適なベクターとしては、原核生物発現ベクター（ｐＵＣ１８、ｐＵＣ１９、Ｂｌｕｅｓｃｒｉｐｔお

よびそれらの誘導体ｍｐ１８、ｍｐ１９、ｐＢＲ３２２、ｐＭＢ９、ＣｏＩＥ１、ｐＣＲ１、ＲＰ４など）、ファージおよびシャトルベクター（ｐＳＡ３およびｐＡＴ２８など）、酵母発現ベクター（２ミクロンプラスミド、組込型プラスミド、ＹＥＰベクター、セントロメアプラスミドなど）、植物発現ベクター（ｐＩＢＩ、ｐＥａｒｌｅｙＧａｔｅ、ｐＡＶＡ、ｐＣＡＭＢＩＡ、ｐＧＳＡ、ｐＧＷＢ、ｐＭＤＣ、ｐＭＹ、ｐＯＲＥベクターなど）、昆虫細胞発現ベクター（ｐＡＣおよびｐＶＬベクターなど）、ウイルスベクター（アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルスおよびレンチウイルスなど）ならびに非ウイルスベクター（ｐｃＤＮＡ３、ｐＨＣＭＶ／Ｚｅｏ、ｐＣＲ３．１、ｐＥＦ１／Ｈｉｓ、ｐＩＮＤ／ＧＳ、ｐＲｃ／ＨＣＭＶ２、ｐＳＶ４０／Ｚｅｏ２、ｐＴＲＡＣＥＲ－ＨＣＭＶ、ｐＵＢ６／Ｖ５－Ｈｉｓ、ｐＶＡＸ１、ｐＺｅｏＳＶ２、ｐＣＩ、ｐＳＶＬおよびｐＫＳＶ－１０、ｐＢＰＶ－１、ｐＭＬ２ｄおよびｐＴＤＴ１など）のいずれかに基づく真核生物発現ベクターが挙げられる。

【０１６３】

別の態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明のベクターを含んでなる宿主細胞（以下、「本発明の宿主細胞」と呼ぶ）に関する。本発明の目的のために使用可能な細胞は好ましくは、真核細胞、より好ましくは、脊椎動物または無脊椎動物細胞、昆虫細胞または真菌細胞であり、いっそうより好ましくは、脊椎動物細胞はアフリカツメガエル細胞、ゼブラフィッシュから単離された細胞または哺乳類細胞である。好ましくは、哺乳類細胞は、ＣＨＯ、ＶＥＲＯ、ＢＨＫ、ＨｅＬａ、ＣＯＳ、ＭＤＣＫ２９３、３Ｔ３、ＷＩ３８などの確立された細胞系統に由来の細胞、胚幹細胞、成人幹細胞または体細胞である。

【０１６４】

別の態様において、本発明は、本発明の、ＦＶＩＩａ結合ドメインを欠いている末端切断型ＴＦ、非機能的ＦＶＩＩａ結合ドメインを担持する変異ＴＦ、または１以上の非機能的Ｎ－グリコシル化部位を担持するＴＦ変異体と特異的に結合する抗体に関する。本発明において用いるのに好適な抗体としては、抗原結合可変領域ならびに軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）および重鎖定常ドメインＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３を含んでなる「完全」抗体、完全抗体のパパイン消化から得られ、単一の抗原結合部位とＣＬおよびＣＨ１領域を含んでなる「Ｆａｂ」フラグメント、完全抗体のペプシン消化から得られ、２つの抗原結合部位を含む「Ｆ（ａｂ’）２」フラグメント、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一の定常ドメイン（ＣＨ１）を含み、抗原結合部位を１つだけ含む「Ｆａｂ」フラグメントが挙げられる。Ｆａｂ’フラグメントは、重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端に、抗体ヒンジ領域に由来する１以上のシステインを含む数残基が富化されていることでＦａｂフラグメントと異なり、「Ｆｖ」は、完全な抗原認識・抗原結合部位、抗体のＶＬドメインとＶＨドメイン（これらのドメインは単鎖ポリペプチド中に存在する）を含んでなる単鎖ＦＶまたは「ｓｃＦｖ」抗体フラグメント、を含む最小抗体フラグメントであり、「ダイアボディー」は、同じ鎖上の２つのドメイン間で対合させるには短過ぎるペプチドリンカーによって接続された同じポリペプチド鎖（ＶＨ－ＶＬ）上の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に接続された重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含んでなり、「二重特異性抗体」（ＢＡｂ）は、２つの異なる特異性の抗原結合部位を有する単一の二価抗体（またはその免疫療法上有効なフラグメント）である。

【０１６５】

以下の実施例は本発明を例示するものであり、その限定と考えるべきでない。

【実施例】

【０１６６】

実施例１～３は、酵母における（ｉ）所望によりＨｉｓタグと融合された融合タンパク質の形態の、成熟ヒトＴＦタンパク質（実施例３）、（ｉｉ）Ｈｉｓタグと融合された末端切断型のヒトＴＦタンパク質（実施例４）および（ｉｉｉ）ヒトＴＦタンパク質のＮ－グリコシル化変異体（実施例５）の発現に基づく凝固促進生成物の生産を開示している。該凝固促進生成物はひとまとめに実施例６で一般名として呼ばれ、簡単には、微小胞化組

織因子、微小胞化ＴＦまたはｍＴＦと呼ばれる。実施例２は、微小胞化ＴＦの精製を教示している。

【０１６７】

実施例６は、健常被検体および血友病被検体において、該ｍＴＦの種々の濃度での繊維素血餅生成能を評価する目的で行ったいくつかのin vitroアッセイならびに重度出血モデルおよび致死的出血モデルにおける該ｍＴＦの出血処置能を評価する目的で行ったいくつかのin vivoアッセイを開示している。

【０１６８】

実施例１

酵母における全長ＴＦタンパク質の発現に基づく凝固促進生成物（ＣＹＥ－ＴＦ）の生産

１．１．　酵母発現ベクター

組換えＴＦ発現のため、図１に示されているクローニング戦略に従い、プラスミドｐＧ１（ＡＴＣＣ＃３７３０５）およびＹｅｐ３５２（ＡＴＣＣ＃３７６７３）から酵母エピソームベクター（ｐＴＴ－１０３０１）を作製した。プラスミドｐＴＴ－１０３０１は以下のエレメントを含む：

ｉ）増殖培地においてウラシルの不在下で組換え酵母の選択を可能とするＵＲＡ３遺伝子、

ｉｉ）大腸菌におけるプラスミドベクターの選択および増殖のためのアンピシリン耐性遺伝子（Ａｍｐ）、

ｉｉｉ）酵母においてベクターのエピソーム複製を可能とする酵母２ミクロン（２μ）複製開始点、

ｉｖ）下流に置かれた遺伝子の転写を制御するグリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）プロモーター、

ｖ）ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）の特異的酵母転写終結シグナル、および

ｖｉ）ＧＰＤプロモーター（ｐＧＰＤ）の制御下で選択された遺伝子のクローニングを可能とするユニークなＢａｍＨＩ制限部位、およびそれに続く、ＰＧＫ停止配列（ＰＧＫｔ）。

【０１６９】

図１Ａは、プラスミドベクターｐＴＴ１０３０１のマップを示す。プラスミド内の総てのエレメントが適正に構成されていることを確認するための制限エンドヌクレアーゼ分析を図１Ｂに示す。

【０１７０】

大腸菌ＤＨ５α株(Stratagene)をプラスミドの増幅に用いた。プラスミドｐＴＴ１０３０１を担持する細菌細胞を３７℃にてLuria Broth Ampicilin (LBA)培地（１％トリプトン、１％ＮａＣｌ、０．５％酵母抽出液、５０ｍｇ／ｍｌのアンピシリン）で増殖させた。ｐＴＴ－１０３０１プラスミドを含有する組換え細菌培養物のグリセロール保存株を－８０℃で維持した。

【０１７１】

１．２．　組換え遺伝子

組織因子（ＴＦ）は、３２アミノ酸（ａａ）のリーダー配列を含む２９５ａａのタンパク質である。この成熟タンパク質は、細胞外ドメイン（ａａ３３～２５１）、膜貫通領域（ａａ２５２～２７４）および細胞質テール（ａａ２７５～２９５）の３つのドメインに分けることができる。図２は、ヒトＴＦ（ｈＴＦ）タンパク質のハイドロパシープロットを示す。

【０１７２】

成熟ｈＴＦタンパク質（ａａ３３～２９５）をコードするｃＤＮＡを、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により、８１６ｂｐのフラグメントとして増幅させた。このＰＣＲ反応では、ヒト胎盤ｃＤＮＡライブラリー(Marathon-Ready cDNA, Clontech Laboratories, Inc.)を鋳型として用い、ヒトＴＦ遺伝子のそれぞれ５’末端または３’末端にアニーリングするオリゴヌクレオチドＡおよびＢをプライマーとして用いた。

【０１７３】
図３は、ｈＴＦ　ＤＮＡ配列〔配列番号５〕（Ｇｅｎｅ　ｂａｎｋ受託番号ＢＣ０１１０２９）内のプライマーＡおよびＢのアニーリング配列を示す。プライマーＡは、シグナルペプチドを欠き、ｈＴＦ　ＯＲＦ内に開始コドンＡＴＧを含む成熟ｈＴＦの最初の４つのアミノ酸をコードする。
【０１７４】
ＰＣＲ条件は次の通りであった：３５サイクルのＰＣＲ（９４℃３０秒、４５℃３０秒、７２℃１分）および最終伸張工程７２℃７分。その後、ＰＣＲ生成物を精製した(Qiagen DNA purification system)。
【０１７５】
１．３．　ｒＴＦプラスミド発現ベクターの作製
第１．２節で述べたようにして得られたＰＣＲ増幅ＤＮＡフラグメントをＢαｍＨＩで消化して末端を除去し、エタノール沈降させ、予めＢαｍＨＩで消化したｐＴＴ１０３０１ベクターにクローニングした。いくつかのクローンのエンドヌクレアーゼ制限分析の後、組換え成熟ｈＴＦ（以下、ｒＴＦと呼ぶ）遺伝子を、ＧＤＰプロモーター（ｐＧＤＰ）に対して適正な配向で含む、ｐＴＴ１０３０２と呼ばれるプラスミドを選択した（図４）。
ｉｎプラスミドｐＴＴ１０３０２に含まれるｒＴＦのＤＮＡ配列は、公開されている配列（Ｇｅｎｅ　Ｂａｎｋ　＃ＢＣ０１１０２９）と１００％同一であった。ｒＴＦをコードするＤＮＡのＤＮＡ配列を、プライマーＡとＢおよびBig Dye Terminator試薬を用い、自動シーケンサー(ABI prism 370, Applied Biosystems)で求めた。ｐＴＴ１０３０２プラスミドを担持するＤＨ５α大腸菌細胞を３７℃で一晩、ＬＢＡ培地で増殖させ、グリセロール保存株の調製に用い、これを－８０℃で維持した。
【０１７６】
１．４．　組換え酵母によるｒＴＦの発現
組換え成熟ヒト組織因子（ｒＴＦ）を発現する組換え酵母を作製するため、発現ベクターｐＴＴ１０３０２を用いてＴ７３　ｕｒａ３⁻酵母細胞を形質転換した。
Ｔ７３　ｕｒａ３⁻は、極めてよく特徴付けられたＳ．セレビシエＴ７３株の誘導体であり、ワイン製造に広く用いられている。Ｔ７３は、スペインのアリカンテ州で選抜された２倍体株であり(Coleccion Espanola de Cultivos Tipo, 受託番号＃ＣＥＣＴ１８９４)、Lallemand Inc. (Montreal, Quebec, Canada)により、食品産業向けに世界中で市販されている。Ｔ７３　ｕｒａ３⁻株は、ＵＲＡ３遺伝子が両コピーとも破壊されているＴ７３誘導体である(J. Agric. Food Chem. 1998. 46, 1689-1693)。Ｔ７３　ｕｒａ３⁻は、ＵＲＡ３選択マーカー遺伝子を担持するプラスミドベクターを用いたＴ７３組換え酵母の作製を可能にする表現型的に安定なＵＲＡ－、食品に安全な酵母株である。
【０１７７】
実施保存株を作製するため、Ｔ７３　ｕｒａ３⁻細胞をペトリ皿で増殖させ、単一コロニーを単離し、３０℃にてＹＰＤ培地（１％酵母抽出液、２％細菌性ペプトン、２％グルコース）で10^7細胞／ｍｌの密度に達するまで増殖させた。次に、酵母細胞を遠心分離によりペレットとし、最小選択培地（酵母抽出液窒素ベースおよびウラシルを除いた完全合成培地；ＹＮＢ　ＣＳＭ－ＵＲＡ）中１５％のグリセロールに再懸濁させ、アリコートを使用まで－８０℃で冷凍した。無作為に選択した３つのアリコートを解凍し、細菌の混入がないか確認した。まず、新鮮なＴ７３ｕｒａ３⁻アリコートを解凍し、ＬｉＡｃ／ＳＳ－ＤＮＡ／ＰＥＧプロトコール(Methods in Enzymology 1994. 350:87-96)に従い、細胞をプラスミドベクターを捕捉しやすい状態にする。エンプティプラスミドｐＴＴ１０３０１を担持する対照組換え酵母を作製するため、同様の戦略を行った。
【０１７８】
組換え酵母クローンを、ウラシルを欠いた培地でのそれらの増殖能により選択した。ｐＴＴ１０３０２で形質転換された８つの独立したクローンを単離し、ウラシルを含まない培地で一晩培養した。ｙＴＴ１０３０１と呼ばれるこれらの組換え酵母培養物をペレット

とし、ガラスビーズを用いてホモジナイズした。同様に、ｐＴＴ１０３０１で形質転換された酵母からの独立したクローン（ｙＴＴ１０３００と呼ぶ）に対しても同じ手順を施した。

【０１７９】

両タイプの組換え酵母の種々のクローンに由来するタンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分離し、ニトロセルロース膜に移し、これに対してウエスタンブロット分析を行った。図５に示されるように、ｙＴＴ　１０３０１培養物から選択された総てのクローン（クローン１～８）が、抗ヒトＴＦ特異的モノクローナル抗体（ｍＡｂ）ＣＤ１４２(BD Biosciences Pharmingen)により認識された数種のポリペプチドを発現した。しかしながら、ｙＴＴ１０３００クローンには、特異的抗ヒトＴＦｍＡｂとの免疫反応性ポリペプチドを示すものはなかった（図５レーンＣ、これらのクローンの１つに相当）。

【０１８０】

図５に示されるように、ｙＴＴ１０３０１における主要な免疫反応性生成物の分子サイズ（レーン１～８）は約３５ｋＤａであった（アスタリスクで示す）。分子量４４および４６ｋＤａの他の生成物（矢印で示す）および７０～１１５ｋＤａの範囲の大きさのより大きな凝集塊（矢印）も見られる。３５ｋＤａより小さな分子量を持つポリペプチドはおそらくｒＴＦ分解生成物に相当する。

【０１８１】

異なる電気泳動移動度を示すいくつかのＴＦ関連生成物の出現は、タンパク質凝集、グリコシル化度の違い、またはその双方によるものであり得る。これらの可能性を検討するため、ｙＴＴ１０３０１（クローン＃７）からの抽出液をエンドグリコシラーゼＥｎｄｏＨおよびＰＮＧａｓｅ　Ｆで処理した。図６に示されるように、ｅｉｔｈｅｒＥｎｄｏＨ（レーン２）またはＰＮＧａｓｅ　Ｆ（レーン３）のいずれかとともにインキュベートした後はより大きな凝集塊（７５～１５０ｋＤａ）は消失したが、７５ｋＤａ生成物は明らかに見られた（レーン１とレーン２および３を比較）。さらに、４４および４６ｋＤａのタンパク質バンドも両処理で消失した。Ｅｎｄｏ　Ｈで処理したサンプルでは（レーン２）、４４および４６ｋＤａの生成物が約３６ｋＤａの生成物を生じるものと思われる。ｓＰＮＧａｓｅ　Ｆ処理は、３７および３９ｋＤａの２つのバンドの出現をもたらした（レーン３）。他方、これらのグリコシラーゼ処理の後も３５ｋＤａの生成物は変わらないままであった。よって、この３５ｋＤａの生成物は非グリコシル化ｒＴＦタンパク質に相当し、エンドグリコシラーゼ処理後に認識できる７５ｋＤａの生成物は非グリコシル化タンパク質の二量体を示す可能性がある。非処理サンプルで見られた大きな凝集塊は、同じ二量体であるが、グリコシル化度が異なるものに相当し得る。同様に、４４および４６ｋＤａのタンパク質は、グリコシル化パターンの異なる３５ｋＤａタンパク質に相当すると思われる。

【０１８２】

アミノ酸配列に従って決定された、シグナルペプチドを欠くｈＴＦの推定分子量は２９．８ｋＤａである。推定分子量と測定分子量の間の矛盾は、疎水性アミノ酸の連なりの存在による、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにおけるタンパク質の変則的な移動のためであり得る。さらに、ｙＴＴ１０３０１によるｒＴＦの発現をレーザー走査共焦顕微鏡により分析した。これらの試験のため、非発現（ｙＴＴ１０３００）およびｒＴＦ発現（ｙＴＴ１０３０１クローン＃７）組換え酵母からのスフェロプラスト（すなわち、酵素処理により作製される細胞壁を欠いた酵母）を固定し、抗ヒトＴＦｍＡｂまたは酵母膜ＡＴＰアーゼに対するｍＡｂのいずれかとともにインキュベートした。図７に示されるように、抗ＡＴＰアーゼｍＡｂはスフェロプラストの表面のみを特異的に標識した（図７Ａ写真１および３）。しかしながら、抗ヒトＴＦｍＡｂは細胞全体に分布したシグナルを示し、このことは、ｒＴＦが原形質膜だけでなく、おそらくは内部の膜細胞のコンパートメントに結合して、細胞内部にも存在することを示唆する（図７Ｂ写真５および７）。他方、図８に示されるように、エンプティプラスミドを担持する酵母細胞（ｙＴＴ１０３００）では、抗ＡＴＰアーゼｍＡｂはまた細胞表面で特異的シグナルを生じたが（図８Ａ写真１）、予測されたように

、抗ヒトＴＦ抗体による標識は検出できなかった（図８Ｂ写真３）。

【０１８３】

ｒＴＦは膜結合タンパク質であったことを確認するため、ｙＴＴ１０３０１酵母細胞を、洗剤Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１１４（終濃度１％）を含有する溶解バッファーで処理した。４℃で１時間インキュベートした後、このライゼートを６％スクロースクッション上に適用し、３０℃３分間温め、３００ｘｇで３分間遠心分離して、下方の洗剤相から上方の水相を分離した。水相を回収し、洗剤ペレットを氷上で維持した。次の分析のために小アリコートを採取した後、この水相に対して２回目のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１１４抽出を行った。第二の水相を回収し、新しい洗剤ペレットを先のものに加えた。洗剤ペレットおよび２つの水抗ヒトＴＦｍＡｂ相双方の混合物を用いたウエスタンブロットＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびクーマシーブルー染色（図９Ａ）により、また、（図９Ｂ）で分析した。図９Ｂに示されるように、特徴的なｒＴＦｄ由来生成物はもっぱら洗剤相に見られ（レーン４）、２つの水相には見られなかった（レーン２および３）。このクーマシー染色ゲルにおいて、本発明者らは、酵母抽出液由来のほとんどのタンパク質が水相に残っていたことを示すことができる（レーン２および３）。この結果は明らかに、ｙＴＴ１０３０１により発現されたｒＴＦが膜結合していることを示す。

【０１８４】

１．５．　発酵プロセス

前工業レベルにおけるｙＴＴ１０３０１酵母抽出液の産生を試験するため、発明者らは２リットルのバイオリアクター(Biostat B-2L. BRAUN)で発酵を行った。操作条件および培養培地は次の通りである。

操作条件：　Ｔ：３０℃；攪拌速度：２５０～３００ｒｐｍ；ｐＨ：４．５；気流：６Ｌ／ｍ

培養培地：ＣＳＭ－ＵＲＡ：０．７８ｇ／Ｌ；ＹＮＢ：６．７ｇ／Ｌ；スクロース：２０ｇ／Ｌ

【０１８５】

図１０のグラフは、発酵プロセス中の主要パラメーターの進行を示す。唯一の制御されないパラメーターである酸素圧（PO_2）の変化は、プロセス中の細胞による酸素要求の変化を反映している。PO_2が定常状態に達した際に発酵を停止させた（矢印で示す）（１８時間）。

【０１８６】

発酵から生じた生成物を３，０００ｒｐｍ（１，２００ｘｇ）で１０分の遠心分離によりペレットとし、２００ｍｌの溶解バッファー（２５ｍＭ　ＰＩＰＥＳ（ｐＨ７．８）、５０ｍＭ　ＮａＣｌ）に再懸濁させた。酵母を高圧（１，０００バール（10^8Ｐａ））（ホモジナイザーNIRO SOAVIS. Panda 2K）によりホモジナイズし、ホモジネートを４℃、１３，０００ｒｐｍ（１３，０００ｘｇ）で３０分間遠心分離し、ペレット（５０ｍｌ）および清澄酵母抽出液（ＣＹＥ）上清（１５０ｍｌ）を個別回収した。この手順の一般スキームを図１１に示す。

【０１８７】

両調製物におけるタンパク質濃度を、標準的な比色定量ＢＣＡアッセイ(Pierce)により定量し、ｒＴＦの存在をウエスタンブロット分析により判定した。これらのアッセイの結果は、総タンパク質の濃度が両サンプル（ペレット：３．８ｍｇ／ｍｌおよびＣＹＥ：３．９ｍｇ／ｍｌ）で同等であり、従って、図１２に示されるように、ウエスタンブロットにより検出されたｒＴＦの量もＣＹＥとペレットで同等であったことを示した。

【０１８８】

実施例４に記載のように測定されたＣＹＥおよびペレットの凝固促進活性もまた、両サンプルを調製と同日に分析した場合には同等であった（活性ｒＴＦ１，４００ｎｇ／ｍｌ）が、ｒＴＦの安定性は、調製後４日目のペレット抽出液では、おそらくはこの画分にプロテアーゼが存在するために、はるかに低かった（１，５００に対して１９９ｎｇ／ｍｌ）。よって、ＣＹＥ画分を、次の薬剤生成物産生のために選択した。

【０１８９】
１．６．　電子顕微鏡
ＣＹＥ生成物をより浴特徴付けるために、免疫電子顕微鏡分析を行った。ＣＹＥサンプルを電子顕微鏡（ＥＭ）により調べたところ、種々のサイズ（０．１～０．０１μｍの範囲）の多数の酵母由来小胞が存在することが示された。周辺（矢印で示す）における金粒子の存在により見られるように（図１３）、これらの小胞の約５～１０％が抗ヒトＴＦｍＡｂにより標識された。他方、無関連のｍＡｂとともにインキュベートされた対照格子では、見られる金粒子は極めて少なく、それらは小胞と結合していなかった（示されていない）。
【０１９０】
最適な血液凝固活性にはＴＦと脂質の結合が必要であることは十分確立されたことであり(Thromb. Haemost. 2001; 86: 66-74)、ＴＦを発現しないｙＴＴ１０３００由来の酵母抽出液は凝固促進活性を示さなかったことから、これらの結果は、ＣＹＥの凝固促進活性が、ｒＴＦと酵母由来膜性微小胞の結合から生じる脂質化ｒＴＦ（以下、ＣＹＥ－ＴＦと呼ぶ（すなわち、凝固促進活性を有し、酵母由来膜性微小胞との結合においてｒＴＦを含むＣＹＥ画分））にあることを示唆した。
【０１９１】
実施例２
全長ＴＦを含む微小胞（ｍＴＦ）豊富な凝固促進生成物の産生
２．１　精製法
ｙＴＴ１０３０１から得られたｒＴＦを含有する清澄酵母抽出液（以下、ＣＹＥ－ＴＦと呼ぶ）をこれまでに記載されている手順に従って産生した（実施例１第１．１節～第１．５節）。このＣＹＥ－ＴＦに対して、孔径を徐々に小さくしたフィルター（０．４５μｍ、０．２μｍおよび０．１μｍ（Sartorius, ポリスルホン））を用いて、クロスフロー濾過システム(Sartorius sartoflow Slice 200 Benchtop)でタンジェンシャルフロー濾過の連続工程を施した。従った手順の概略図を部１４Ａに示す。
【０１９２】
ｒＴＦを含有する微小胞（ｍＴＦ）を精製するため、孔径０．１～０．２μＭ（０．１μＭ保持液）の微小胞に相当する濾過ＣＹＥ－ＴＦ抽出液を、予めリン酸バッファーで平衡化し、ＡＫＴＡ－ＦＰＬＣシステムに連結したサイズ排除クロマトグラフィーカラム（セファクリルＳ５００カラム－ＨＲ（６０ｃｍ－２６ｍｍ、３２０ｍＬ?General Electric）にのせた。同じバッファーを用い、流速１ｍＬ／分で溶出を行い。各４ｍＬの４２画分を回収した。２８０ｎｍにおける画分の吸光度を測定することにより溶出パターンをモニタリングした。異なる精製試験で得られたクロマトグラフィープロフィールは類似していた。図１５のグラフは、代表的なクロマトグラフィープロフィールを示す。
【０１９３】
各画分のアリコートをウエスタンブロットにより、また活性アッセイにより分析し、凝固促進活性を含む画分を同定した。図１６は、ウエスタンブロットにより見られたように、ｍＴＦを蓄積した画分５～２５は、活性が濃縮された画分でもあった（表１）。
【０１９４】

【表１】

表１

サイズ排除精製後に得られた画分５～４２のｍＴＦ凝固促進活性

画分	活性 ng TF/mL	画分	活性 ng TF/mL
F.5	169	F.23	171
F.6	236	F.24	146
F.7	353	F.25	106
F.8	298	F.26	32
F.9	261	F.27	3
F.10	246	F.28	0
F.11	197	F.29	0
F.12	237	F.30	0
F.13	239	F.31	0
F.14	261	F.32	0
F.15	241	F.33	0
F.16	125	F.34	0
F.17	269	F.35	0
F.18	312	F.36	0
F.19	263	F.37	0
F.20	265	F.38	0
F.21	282	F.39	0
F.22	248	F.40	0
F.23	171	F.41	0
F.24	146	F.42	0
F.25	106	F.43	0

【０１９５】

最後に、活性を濃縮するため、各精製工程からの画分５～４３をプールし、０．１μｍフィルターで再びＴＦＦを行った。これらの手段により、表２に示されるように、生物学的に活性なｍＴＦの再現性あるロット（１４．３１、１４．３２、１５．３２、１５．３６）を得ることができ、これらのロットは総て、同じタンパク質プロフィールを示す（図１７）。

【０１９６】

【表２】

表２：ロット間の総タンパク質含量と凝固促進活性の比較

	総タンパク質 μg/mL	活性タンパク質 ng/mL
mTF プール 14.31	346	709
mTF プール 14.32	283	659
mTF プール 15.32	271	745
mTF プール 15.36	342	718

【０１９７】

２．２．　サイズ排除クロマトグラフィーにより精製されたｒＴＦ含有微小胞の生化学的特性決定

２．２．１．　タンパク質含量

ｒＴＦが挿入されている微小胞は、ｒＴＦの他、酵母宿主細胞に由来する他の内在性膜タンパク質を含む。精製ｍＴＦの異なるロットのタンパク質含量をＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびクーマシーブルー染色により分析した（図１７Ａ）。染色されたゲルを目で比較すると、異なるロットのタンパク質プロフィールはほぼ同じであった。より厳密な比較分析を行うため、ゲルをスキャンし、ゲルの各レーンで濃度測定を行い、異なるタンパク質バンドに相当するピークを示すプロットと各タンパク質の相対強度を各ロットから得た。図１７（パネルＢ）に示されている４つのロットのタンパク質プロフィールは極めて類似していた。

【０１９８】

２．２．２．　脂質含量

精製ｍＴＦの脂質含量を、Hara and Radin (Anal. Biochem. 1978, 90: 420-426)により記載されている手順に改変を加えた(Rodriguez-Sureda y Peinado-Onsurbe, 2005, Anal. Biochem. 343: 277-282)ものに従い、薄層クロマトグラフィーにより分析した。基本的には、ガラス管中の１２０ｍｇの凍結乾燥生成物をヘキサンおよびイソプロパノール（３：２ｖ：ｖ）の混合物１ｍＬに溶解させた。液体の酸化を防ぐために遮光したこのバイアルをオービタルシェーカーで２４時間維持した。この時点で、０．３ｍＬの硫酸ナトリウム（０．４７Ｍ）を加えた。相分離を助けるために、サンプルを遠心分離した。上相（ヘキサン）は非極性脂質を含むが、境界近くには極性脂質がリン脂質として見られた。この上相を違うバイアルに移し、液体の酸化を防ぐために窒素ガスを用いて蒸発させた。脂質を含有する乾燥抽出物をクロロホルム（０．２ｍＬ）に溶解させた。ＴＬＣは、シリカゲルプレートで、移動相としてクロロホルム：メタノールおよび水（Ｃ：Ｍ：Ｗ　３４５：１３３：２１　ｖ：ｖ：ｖ）を用いて行った。これらのサンプルと並行して、脂質標品を同じ条件下で分析した。サンプルをプレート上で泳動させたところで、ヨウ素蒸気を加えることで脂質を可視化した。これらのサンプルの種々の液体成分の同定は、それらの移動度を標品の移動度と比較することによって行った。

【０１９９】

この技術によれば、５、１０および２０μｇ／ｍｌの種々の濃度のＣＹＥ－ＴＦ（ロット９１）ならびに精製品（ロット１４．３１、５、１０および２０μｇ／ｍｌ）の双方は、トリアシルグリセリド、エルゴステロール、ホスファチジルエタノールアミン(phosphatidylethanoamine)、カルジオリピン、ホスファチジン酸、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン／ホスファチジルイノシトールを含む複雑な複合脂質内容物を含む（図１８）。ｒＴＦ含有微小胞の脂質プロフィールは、とりわけ、Waters, E.K. and Morrisey, J.H. (Biochemistry, 2006, 45:3769-3774)、Brucato, C. et al (Protein Expressionand Ourification, 1998, 26:386-393)、ＷＯ９８４８２８３およびGuha, A. et al (Pr

oc. Natl. Acad. Sic. USA, 1986, 83:299-302)により記載されている手順に従い、ｒＴＦを合成リポソームへ組み込むことによって得られた再脂質化ｒＴＦとは異なる。これらの総ての文献に記載されている合成リポソームは本質的にホスファチジルコリンとホスファチジルセリン、またはホスファチジルコリンとホスファチジルセリンとホスファチジルエタノールアミンの組合せを含んでなるが、本発明に従って精製酵母由来微小胞は、ｒＴＦ含有リポソームには見られないエルゴステロールおよびカルジオリピンなどの付加的成分を含む。

【０２００】

実施例３

酵母における全長ＴＦＨｉｓタグ修飾タンパク質（６ＨＴ－ＴＦ）の発現に基づく凝固促進生成物の産生

３．１．　カルボキシル末端に６ｘｈｉｓタグを含むｒＴＦの産生

Ｃ末端またはＮ末端のいずれかにヒスチジンタグ（ｈｉｓ－タグ）を含むタンパク質のアフィニティークロマトグラフィー精製は十分標準化された方法であり、多数のタンパク質の精製度の高い調製物を得るために広く用いられている。いずれのクロマトグラフィー法とも同様に、この手順は容易にスケールアップすることができる。このため、カルボキシル末端に６ｘｈｉｓタグを含むｒＴＦが作製された。

【０２０１】

３．２．　ｒＴＦ－ｈｉｓタグプラスミド発現ベクターの作製

３’末端に１８の付加的ヌクレオチド（６つのヒスチジンをコードする）を含む、成熟ｈＴＦタンパク質（ａａ３３～２９５）をコードするｃＤＮＡをＰＣＲにより８４２ｂｐのフラグメントとして増幅させた。この反応では、実施例１（第１．２節および第１．３節）と同様の戦略に従った。従って、ヒト胎盤ｃＤＮＡライブラリー(Marathon-Ready cDNA, Clontech Laboratories, Inc.)を鋳型として用い、オリゴヌクレオチドＡおよびＥをプライマーとして用いた。オリゴヌクレオチドＥでは、ｈＴＦ　ＤＮＡ配列の終結コドン（ＴＡＡ）を６つのヒスチジン残基とその後に新しい終結コドン（ＴＡＧ）をコードするヌクレオチド配列で置換した。図１９は、ｈＴＦ　ＤＮＡ配列（Ｇｅｎｅ　Ｂａｎｋ受託番号ＢＣ０１１０２９）におけるプライマーＡとＥの位置を示す。

【０２０２】

３５回のＰＣＲサイクル（９４℃３０秒、４５℃３０秒、７２℃１分）および最終伸張工程７２℃７分の後、予測された大きさのＤＮＡ生成物が精製された（Qiagen DNA Purificationシステム）。

【０２０３】

ＰＣＲにより増幅したＤＮＡフラグメントを、ＢａｍＨＩで消化して末端を除去し、エタノール沈降させ、予めＢａｍＨＩで消化したｐＴＴ１０３０１ベクターにクローニングした。いくつかのクローンのエンドヌクレアーゼ制限分析の後、ＧＤＰプロモーター（ｐＧＤＰ）に対して右向きに組換えｈＴＦ－ｈｉｓタグ遺伝子を含むプラスミドｐＴＴ１０３０３を選択した（図２０）。

【０２０４】

発明者らはさらに、ｐＴＴ１０３０１にクローニングされた組換えｈＴＦ－ｈｉｓ－タグのＤＮＡ配列がこれまでに公開されているｈＴＦＤＮＡ配列（Ｇｅｎｅ　Ｂａｎｋ　＃ＢＣ０１１０２９）と１００％同一であること、およびそれが３’末端に、予測された１８の付加的ヌクレオチドを含むことを確認した。この組換えｈＴＦ－ｈｉｓタグのＤＮＡ配列分析を自動シーケンサー(ABI prism 370, Applied Biosystems)にて、プライマーＡおよびＥならびにBig Dye Terminator試薬を用いて行った。ｐＴＴ１０３０３プラスミドを担持するＤＨ５α細胞を３７℃で一晩、ＬＢＡ培地で増殖させ、グリセロール保存株の調製に用いた。

【０２０５】

３．３．　ｒＴＦ－ｈｉｓタグの発現

組換え成熟ｈＴＦ－ｈｉｓタグ（ｒＴＦ－ｈｉｓタグ）を発現する組換え酵母を作製す

るため、発現ベクターｐＴＴ１０３０３を用い、実施例１（第１．４節）に記載のように、Ｔ７３　ｕｒａ３－酵母細胞を形質転換した。組換え酵母クローン（ｙＴＴ１０３０２と呼ぶ）を、ウラシルを欠く培地でのその増殖能によって選択した。ｙＴＴ１０３０２の５つの独立したクローンを単離し、一晩、ウラシルを含まない培地で培養した。ウエスタンブロット分析は、選択された総てのクローンが、抗ヒトＴＦｍＡｂにより認識されるポリペプチドを発現したことを示す（図２１）。図２２は、選択されたクローン（ｙＴＴ１０３０２クローン＃５）のｒＴＦ－ｈｉｓタグ発現パターンをｙＴＴ１０３００およびｙＴＴ１０３０１組換え酵母からの抽出液と比較して示す。示されているように、ｙＴＴ１０３０２により発現された抗ＴＦ免疫反応性生成物の分子サイズは約３６、３８、４５、４７および４９ｋＤａ（矢印で示す）であり、大きな分子量（約１００～１１５ｋＤａ）の他の凝集塊も見られる（矢印）。ｙＴＴ１０３０１酵母抽出液の場合と同様、これらの移動度の違いは、図２０に示されるように、ｒＴＦのグリコシル化度の違いに相当する。

【０２０６】

３．４．　クロマトグラフィーによるｒＴＦ－ｈｉｓタグの精製

３．４．１．　精製プロセス

ｒＴＦ－ｈｉｓタグの精製のため、発明者らは、これまでに記載されている手順に従い（実施例１第１．５節）、ｙＴＴ１０３０２から得られたｒＴＦ－ｈｉｓタグを含む清澄抽出液（以下、ＣＹＥ－６ＨＴ－ＴＦと呼ぶ）から出発した。該ＣＹＥ－６ＨＴ－ＴＦを孔径０．２μｍのフィルターでタンジェンシャルフロー濾過により濾過した後、予め水で洗浄し、開始バッファー（２０ｍＭリン酸バッファー、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）で平衡化した５ｍｌ　ＨｉＴｒａｐ（登録商標）アフィニティーカラム(Pharmacia Biotech)にのせた。サンプルを適用した後、流出液（非結合材料）を回収し、カラムを３回洗浄した：１回目の洗浄は、４０ｍｌの開始バッファー（２０ｍＭリン酸バッファー、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）；２回目の洗浄は、１０ｍＭのイミダゾールを含有する開始バッファー４０ｍｌ；３回目の洗浄は、１００ｍＭのイミダゾールを添加した開始バッファー４０ｍｌ。最後の洗浄の後、１Ｍイミダゾールを含有する開始バッファー２５ｍｌをカラムに加えることで、６ＨＴ－ＴＦと呼ばれる微小胞化ｒＴＦ－ｈｉｓタグタンパク質を溶出させ、２．５ｍｌの溶出画分（画分＃１、＃２、＃３および＃４）を回収した。このプロセスの一般スキームを図２３に示す。

【０２０７】

これらの画分を透析バッファー（２０ｍＭリン酸バッファー、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）中で透析し、出発抽出液、非結合材料、溶出前の最後の洗液および透析した４つの溶出画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥおよび銀染色により、またはｂｙウエスタンブロットにより分析した。図２４Ａのウエスタンブロットに示されるように、カラム６ＨＴ－ＴＦに結合した後、生成物は、主として最初の３つの溶出画分（レーン４～６）に首尾よく回収することができる。注目すべきは、同じサンプルからのタンパク質をゲルの銀染色により可視化した際（図２４Ｂ）、タンパク質バンドは出発酵母抽出液（レーン１）および非結合材料（レーン２）に相当するレーンでのみ見られ、溶出画分（レーン４～７）には見られなかったことである。さらに、これらのサンプル中の総タンパク質の量は、標準ＢＣＡ試薬限界（２０μｇ／ｍｌ）を下回った。

【０２０８】

これらの結果は、ウエスタンブロットの結果とともに、このアフィニティークロマトグラフィー手順によって精製度の高い６ＨＴ－ＴＦ生成物が得られることを明らかに示した。最も重要な、透析溶出画分＃１～３は、実施例４に記載のように測定される凝固促進活性を維持し、著しくは、画分＃１が出発抽出液ＣＹＥ－６ＨＴ－ＴＦと同様の凝固促進活性を示した。予測されたように、免疫反応性ｒＴＦタンパク質量の少ない画分（画分＃４、レーン７）は凝固促進活性を示さなかった。

【０２０９】

これら２つのサンプルにおける総タンパク質濃度と活性の間の違いは次のようにまとめることができる。

【０２１０】
【表３】

	総タンパク質の濃度 (mg/ml)	rTF の濃度 (ng/ml)
CYE-6HT-TF	6.2	275
画分番号１ 6HT-TF	ND*	252

ＮＤ*：標準的な比色分析（ＢＣＡ）では検出不能（検出限界２０μｇ／ｍｌ）

【０２１１】
３．４．２．　分析方法
図１９のウエスタンブロットに示されるように、溶出画分中の６ＨＴ－ＴＦ生成物は、全酵母抽出液と同様、ｒＴＦ－ｈｉｓタグタンパク質のグリコシル化の違いに起源すると思われる様々な大きさのいくつかのタンパク質バンドからなった。この可能性を検討するため、溶出画分＃１にエンドグリコシラーゼ処理を施した。要するに、３７℃で１時間、５００ユニット（Ｕ）のエンドグルコシダーゼＨ（Ｅｎｄｏ　Ｈ）またはＮ－グルコシダーゼＦ（ＰＮＧａｓｅ　Ｆ）で処理したｒＴＦ発現酵母（ｙＴＴ１０３０１）由来の抽出液を、抗ヒトＴＦｍＡｂを用い、ウエスタンブロットによりさらに分析した。図２５は、ＰＮＧａｓｅ　Ｆ（レーン２）またはＥｎｄｏ　Ｈ（レーン３）のいずれかで処理した後、両処理に伴って４５、４７および４９ｋＤａのタンパク質バンドが消失したことを示す。ＰＮＧａｓｅ　Ｆインキュベーション後、３６ｋＤａと３８ｋＤａの２つのポリペプチドが見られ、最もあり得る可能性として、４５、４７および４９ｋＤａの生成物の脱グリコシル化によるものではないかと議論された（レーン１と２の比較）。Ｅｎｄｏ　Ｈ処理により、３６ｋＤａのユニークな免疫反応性生成物が生じ（レーン３）、これは非グリコシル化ｒＴＦ－ｈｉｓタグタンパク質に相当するはずである。
【０２１２】
さらに、精製６ＨＴ－ＴＦを、実施例１（第１．６節）に記載されているように、抗ヒトＴＦｍＡｂで免疫染色した後にＥＭにより分析した。図２６に示されるように、多数の金粒子が見られ、その大部分は規定のサイズの小さな小胞と結合していた。並行して分析した非ｒＴＦ発現酵母からの同様のサンプルでは、金粒子の数は極端に少なかった（示されていない）。この結果は、６ＨＴ－ＴＦ生成物を精製するのに用いたアフィニティークロマトグラフィー手順が、酵母由来膜微小胞と結合した生物学的に活性な６ＨＴ－ＴＦの回収を可能とすることを示す。
【０２１３】
実施例４
酵母における末端切断型ｈＴＦタンパク質の発現に基づく凝固促進生成物（ＣＹＥ－ＴＴＦ）の産生
４．１．　末端切断型ＴＦ－ｈｉｓタグ（ＴＴＦ－ｈｉｓタグ）プラスミド発現ベクターの作製
因子Ｘに対する相互作用ドメイン（ａａ１７４～２５１）、膜貫通領域（ａａ２５２～２７４）および３’末端に１８の付加的ヌクレオチド（６つのヒスチジンをコードする）を含む細胞質テール（ａａ２７５～２９５）を含む末端切断型のｈＴＦタンパク質（ＴＴＦ）をコードするｃＤＮＡは、ＰＣＲにより３９８ｂｐのフラグメントとして増幅させた。実施例１（第１．２節および第１．３節）に記載されているものと同様の戦略に従った。従って、ヒト胎盤ｃＤＮＡライブラリー(Marathon-Ready cDNA, Clontech Laboratories, Inc.)を鋳型として用い、オリゴヌクレオチドＦおよびＥをプライマーとして用いた。オリゴヌクレオチドＥでは、ｈＴＦ　ＤＮＡ配列の終結コドン（ＴＡＡ）を６つのヒスチジン残基とその後に新しい終結コドン（ＴＡＧ）をコードするヌクレオチド配列で置換し

た。図２８は、ｈＴＦ　ＤＮＡ配列（Ｇｅｎｅ　Ｂａｎｋ受託番号ＢＣ０１１０２９）におけるプライマーＦとＥの位置を示す。

【０２１４】

３５回のＰＣＲサイクル（９４℃３０秒、４５℃３０秒、７２℃１分）および最終伸張工程７２℃７分の後、予測された大きさのＤＮＡ生成物が精製された（Qiagen DNA Purificationシステム）。

【０２１５】

ＰＣＲにより増幅したＤＮＡフラグメントを、ＢａｍＨＩで消化して末端を除去し、エタノール沈降させ、予めＢａｍＨＩで消化したｐＴＴ１０３０１ベクターにクローニングした。いくつかのクローンのエンドヌクレアーゼ制限分析の後、ＧＤＰプロモーター（ｐＧＤＰ）に対して右向きに組換えＴＴＦ－ｈｉｓタグ遺伝子を含むプラスミドｐＴＴ１０３０４を選択した（図２９）。

【０２１６】

発明者らはさらに、ｐＴＴ１０３０１にクローニングされたｒＴＦ－ｈｉｓ－タグのＤＮＡ配列がこれまでに公開されている配列（Ｇｅｎｅ　Ｂａｎｋ　＃ＢＣ０１１０２９）と１００％同一であること、およびそれが３’末端に、予測された１８の付加的ヌクレオチドを含むことを確認した（図２５）。ｐＴＴ１０３０４プラスミドを担持するＤＨ５α細胞を３７℃で一晩、ＬＢＡ培地で増殖させ、グリセロール保存株の調製に用いた。

【０２１７】

４．２．　組換え酵母によるｒＴＴＦ－ｈｉｓタグの発現

組換えヒト末端切断型ＴＦ－ｈｉｓタグ（ｒＴＴＦ－ｈｉｓタグ）を発現する組換え酵母を作製するため、発現ベクターｐＴＴ１０３０４を用いて、実施例１（第１．４節）に記載されているようにＴ７３　ｕｒａ３⁻酵母細胞を形質転換した。組換え酵母クローン（ｙＴＴ１０３０４と呼ぶ）を、ウラシルを欠いた培地でのそれらの増殖能により選択した。

【０２１８】

ｒＴＴＦ－ｈｉｓタグ発現に関して、実施例１（第１．５節）に前記されている手順に従い、ｙＴＴ１０３０４から得られた、凝固促進活性を有する、清澄酵母抽出液（ＣＹＥ）（ＣＹＥ－ＴＴＦと呼ぶ、すなわち、微小胞化末端切断型組織因子（ＴＴＦ）を含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ））を調製し、実施例１に記載のように活性に関して分析した。

【０２１９】

実施例５

Ｎ－グリコシル化変異ＴＦプラスミド発現ベクターの作製

ＴＦは、Ｎ－グリコシル化が起こる３つの異なる残基、すなわち、Ｎ１１、Ｎ１２４およびＮ１３７を示す。これらの残基（Ｎ１１Ａ、Ｎ１２４ＡおよびＮ１３７Ａ）を損なう単一変異およびその起こり得る総ての可能性を、標準的な手順を用いて構築した。

オリゴヌクレオチド指定突然変異誘発

【０２２０】

表３に挙げられているオリゴヌクレオチドを用い、標準的なＰＣＲ反応を用いて種々の変異体を作製した(Current Protocols in Molecular Biology, chapter 15th)。プラスミドｐＴＴ１０３０２をＤＮＡ鋳型として用い、Ｐｆｕを、極めて高い適合度と低い誤り率を示すことから、ポリメラーゼとして用いた。

【０２２１】

【表４】

表３．ＴＦにおいてグリコシル化突然変異体を作製するために用いられたオリゴヌクレオチドの配列。Ａｌａはアラニンを意味し、Ａｓｎはアスパラギンを意味する。

名称 (配列番号)	アミノ酸 位置－変化	方向	オリゴ配列 5'-3'
TT-7071 (6)	11-Asn から Ala へ	順	TGACACCGTCGTATACGTAATTGAACCTTTAGT
TT-7075 (7)	11-Asn から Ala へ	逆	ACTGTGGCAGCATATCGATTAACTTGGAAATCA
TT-7072 (8)	124-Asn から Ala へ	順	ATCTTCTACGGTCACTGCCACTTTTGTTCCCAC
TT-7076 (9)	124-Asn から Ala へ	逆	GTGGGAACAAAAGTGGCAGTGACCGTAGAAGAT
TPM1 (10)	137-Asn から Ala へ	順	ACTTTAGTCAGTTGGGCAAACACTTTCCTAAGC
TPM2 (11)	137-Asn から Ala へ	逆	GCTTAGGAAAGTGTTTGCCCTTCTGACTAAAGT

【０２２２】

結果

グリコシル化部位に影響を及ぼすＴＦにおける点突然変異

図３１は、グリコシル化部位における種々の変異体と野生型のプロフィールを比較する抗ＴＦウエスタンブロットを示す。示されているように、このプロフィールは、それらの総てで異なり、グリコシラーゼで処理した際には総てのバンドが１つになり、これは見られたプロフィールがグリコシル化状態の違いによるものであることを意味する。

【０２２３】

これらの変異体の凝固活性を測定し、データを表４にまとめた。データは総て野生型に対してノーマライズし、野生型の活性および発現を１００とした。１１（ＰＭ１）および１２４（ＰＭ２）における単一変異は双方とも活性の増強を示したが、驚くべきことに、最も顕著な作用は、その活性および発現が有意に増強された（それぞれ６倍および２倍）ことから、残基１２４が変異した際に見られた。ＰＭ２が関わるその二重変異および三重変異の活性はもまた増強された。

【０２２４】

【表５】

表４

野生型６ＨＴ－ＴＦと比較した際のグリコシル化部位における種々の突然変異体の相対活性および相対発現

相対活性		相対発現
PM/6H-TF*100		PM/6H-TF*100
WT	100	100
PM1	190	48
PM2	602	194
PM3	64	67
PM1&2	206	52
PM1&3	0	15
PM2&3	114	108
PM1&2&3	294	12

ＰＭ＝点突然変異

【０２２５】

実施例６

微小胞化組織因子（ｍＴＦ）の凝固促進活性の評価

簡略のために、本実施例では、「微小胞化組織因子」、「微小胞化ＴＦ」または「ｍＴＦ」は一般に、特に断りのない限り、組織因子、修飾組織因子（１以上のアミノ酸の置換、排除、付加または交換による）、組織因子を含んでなる融合タンパク質、またはＦＶＩＩａに対するの一部または全部を欠いている末端切断型組織因子を指し、それらの総てが完全にまたは部分的にグリコシル化されており、酵母由来微小胞と結合している（すなわち、微小胞の脂質層に組み込まれている）。

【０２２６】

本発明によって提供される微小胞化組織因子の凝固促進活性を評価する目的で、一連のin vitroおよびin vivoアッセイを行った。具体的には、下記の通り。

１．　微小胞化ＴＦは健常状態および罹患状態の双方において繊維素血餅形成および血液凝固を起こすことを示すin vitroアッセイ

１．１　健常被検体からの血漿における凝固アッセイ

１．２　ゲル濾過により精製した小胞の凝固促進作用と再脂質化ＴＦの比較

１．３　ＦＶＩＩＩ、ＦＩＸまたはＦＸＩを欠損した血漿における凝固アッセイ

１．４　血小板減少症血漿における凝固アッセイ

１．５　抗ＦＶＩＩ抗体の存在下での、ＦＶＩＩＩ、ＦＩＸおよびＦＸＩ欠損血漿における凝固アッセイ

１．６　健常被検体からの非抗凝固処理全血における凝固アッセイ

１．７　血友病患者からの非抗凝固処理全血における凝固アッセイ（非抗凝固処理全血における凝固アッセイ）

【０２２７】

２．　微小胞化ＴＦが重度出血モデルにおける局所的抗血友病処置（予め切断された血管に直接適用することによる）に有用な薬剤であることを示すin vivoアッセイ

２．１　ラット尾の基部切断による重度出血動物モデルにおけるアッセイ

２．２　予めヘパリンで処理した重度出血動物モデルにおけるアッセイ

【０２２８】

３．　微小胞化ＴＦが致死的出血モデルにおける局所的抗血友病処置（予め切断された血管に直接適用することによる）に有用な薬剤であることを示すin vivoアッセイ

３．１　ＦＶＩＩＩ欠損マウス尾の基部切断による致死的出血モデル動物モデルにおけるアッセイ

Ｉ．　材料および方法

材料

微小胞化組織因子（ｍＴＦ）供給源として３つの異なる化合物を用いた。

（ｉ）実施例１に従って得られた微小胞化ＴＦを含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＦ）

（ｉｉ）実施例２に従って得られた精製微小胞化ＴＦ－ヘキサヒスチジンタグ融合タンパク質（６ＨＴ－ＴＦ）

（ｉｉｉ）実施例３に従って得られた微小胞化末端切断型組織因子を含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＴＦ）

【０２２９】

市販の凝固因子ＦＶＩＩＩ、ＦＩＸおよびＦＸＩ欠損血漿は、Dade Behring Marburg GmbHから購入した。

【０２３０】

市販のモノクローナル抗ヒトＦＶＩＩ抗体（クローンＨＶＩＩ－１）はSigma Aldrichから購入した。

【０２３１】

市販の血友病マウス（対立遺伝子：Ｆ８^{tm1Kaz}；一般名ＭＦＶＩＩＩ－１６；Haig H Kazazian; Reference: Bi L; Lawler AM; Antonarakis SE; High KA; Gearhart JD; Kazazian HH Jr. 1995. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A, Nat. Genet. 10:119-21により突然変異誘発されたもの）はJackson Laboratoryから購入した。

【０２３２】

市販のｒＴＦはAmerican Diagnosticaからのものであった。

【０２３３】

５個体の健常ドナーからの血漿サンプルは、the Blood Bank of Vall d'Hebron Hospital, Department "Banc de Sang i Teixits" (Pg, Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona)から入手した。血漿サンプルはＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、ＨＩＶおよびＴＰＨＡに関して確認し、総て陰性であった。これら５つの血漿サンプルをプールし、使用まで１．５ｍｌバイアルで－２０℃にて冷凍した。

【０２３４】

方法

ｒＴＦの再脂質化

市販のｒＴＦ(American Diagnostica)は、Morrissey (http://www.tf7.org/relipidation2.pdf)により記載されている標準的な手順に従って再質化した（この場合、ｒＴＦはリン脂質リポソームに組み込まれている）。サンプル中に存在するｒＴＦの量は、American Diagnostica Inc.（Ｎｏ．８４５）からのIMUBIND Tissue Factor ELISAキットにより、販売者の明細に従って定量した。

【０２３５】

in vitroアッセイ

微小胞化末端切断型組織因子がＦＶＩＩとの結合ドメインの一部または全部を欠いているかどうかをする判定するため、また、それがなお活性があるかどうかを知るために、まず、ＦＶＩＩａに対する微小胞化末端切断型組織因子の結合が検出できるかどうかを判定するために、ＦＶＩＩａに対する微小胞化末端切断型組織因子の結合アッセイを行い、次に、微小胞化末端切断型組織因子が凝固促進剤としてなお活性があるかどうかを判定する

ためには凝固アッセイを使用することができる。

【０２３６】

ＦＶＩＩａに対する微小胞化末端切断型組織因子の結合アッセイ

精製微小胞化ＴＦ－ヘキサヒスチジンタグ付き融合タンパク質（６ＨＴ－ＴＦ）、微小胞化ＴＦを含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＦ）または微小胞化末端切断型ＴＦを含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＴＦ）のいずれかと凝固因子ＶＩＩａ（ＦＶＩＩａ）の間の相互作用を判定するため、本発明の著者らは、国際公開公報ＷＯ００／０４１４８に記載されている方法の改変法に従った。これらの手段により、ビオチニル化ＦＶＩＩａに対する６Ｈ－ＴＦ、ＣＹＥ－ＴＦまたはＣＹＥ－ＴＴＦの結合をＥＬＩＳＡ試験によりアッセイした。このため、これまでに記載されているように(Kelley et ah, 1995 Biochem. 34:10383-10392)、ビオチニル化ＦＶＩＩａ（ＢＥＧＲ－７ａ）を作製した。次に、９６ウェルマイクロタイタープレートを、捕捉薬剤としてストレプトアビジンを用い、ＢＥＧＲ－７ａでコーティングした。ウェルを蒸留水中０．０５％のＴｗｅｅｎ　２０で２回洗浄し、１％脱脂粉乳を含有するＰＢＳ（ブロッキング溶液）で２時間ブロッキングした。その後、一定量のストレプトアビジンコンジュゲートＢＥＧＲ－７ａまたはストレプトアビジン単独のいずれかを含有するＴＮＣバッファー（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ７．５、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　$CaCl_2$）で調製した１０μｇ／ｍｌ濃度で始まる１０倍希釈の６ＨＴ－ＴＦ、ＣＹＥ－ＴＦまたはＣＹＥ－ＴＴＦをウェルに加えた。室温で２時間インキュベートした後、ウェルを０．０５％Ｔｗｅｅｎ　２０で再び洗浄して非結合材料を排除した。種々のＴＦ含有溶液においてＴＦ－ＦＶＩＩａ複合体を検出するために、特異的抗ＴＦウサギポリクローナル抗血清を用いた。このため、抗ＴＦ血清希釈液の１：５００希釈液をウェルに加え、３７℃で２時間インキュベートした。プレートを５回洗浄した後、検出抗体を加えた。ペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ウサギ免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）抗体(Southern Biotechnology Associated)ブロッキング溶液で１：１０００希釈し、３７℃で１時間インキュベートした。これらのプレートを再び５回洗浄し、過酸化水素およびオルトフェニレンジアミン（ＯＰＤ）０．０５％を用いて反応を開始させた。室温で１０～１５分インキュベートした後、H_2SO_4（２Ｎ）を加えることで反応を停止させ、Ｍｕｌｔｉｓｋａｎ　Ｐｌｕｓプレートリーダー(labsystem)にて４９２ｎｍで吸光度を測定した。

【０２３７】

血漿における凝固アッセイ

血漿における自発的凝固促進活性（無刺激）を、４チャネル凝固計(Start 4, Diagnostica Stago)にて二段階凝固アッセイにより測定した。要するに、５０μｌの血小板プール血漿を、予め強化したキュベットに加え、５０μｌのサンプル（ｍＴＦまたは対照としての蒸留水）を加えた。この混合物を３７℃で６０秒インキュベートし、５０μｌの２５ｍＭ炭酸カルシウムをすぐに加え、凝固計で凝固時間を秒数として測定し、血餅の形成により確認した。血小板プール血漿を遠心分離により得、血小板の数を計数器で測定した。

【０２３８】

それぞれ血友病Ａ、ＢまたはＣ相当する凝固因子欠損血漿（ＦＶＩＩＩ、ＦＩＸまたはＦＸＩ）に対するｍＴＦの凝固促進作用を、イムノアフィニティー技術により枯渇させた市販の血漿(Dade Behring Marburg GmbH)を用いることで調べた。各場合で、凝固因子の最終含量は１％未満であった。

【０２３９】

一連の遠心分離プロセスで血小板から奪った血漿において、血小板減少様症状における凝固促進作用を調べた。

【０２４０】

全血における凝固アッセイ

非抗凝固処理全血における凝固促進活性を凝固法により測定した。試験する種々の薬剤（ｍＴＦ）を、０．８ｍｌの非抗凝固処理全血に０．２ｍｌ加え、抽出の始めから安定かつ固化した血餅が表れるまでクロノメーターで凝固時間を測定した。種々の薬剤の作用を

、血液凝固時間の短長で評価した。
【０２４１】
全血サンプルは患者または健常なボランティアから得た。
【０２４２】
in vivoアッセイ
ラット尾の基部の切断による重度出血モデル
体重３００～６００グラムのＳｐｒａｇｅ－Ｄａｗｌｅｙ雄ラットを２つの処理群に無作為に分けた。
・対照群、生理食塩水で局所的処理を受けた少なくとも３匹からなる
・第二群、ｍＴＦで局所的処理を受けたこれもなくとも３匹からなる
【０２４３】
これらの化合物は総て、ラットを仰臥位にして創傷表面に直接１ｍｌ／分で施し、動物の尾の基部切断部と恒常的に作用するように局所接触させた。安定かつ固化した血餅の形成を、さらなる出血がないことを確認する手段により評価した。
【０２４４】
抗凝固薬で処置した動物におけるラットの尾の基部切断による重度出血モデル
ａ）６ＨＴ－ＴＦ処理動物
体重３００～６００グラムのＳｐｒａｇｅ－Ｄａｗｌｅｙ雄ラットを２つの処理群に無作為に分けた。
・対照群、生理食塩水で局所的処理を受けた少なくとも１４匹からなる
・第二群、尾の横断切断術を開始する１５分前にヘパリン２００Ｕ／ｋｇの静脈内（ｉ．ｖ．）投与を受けた５個体からなる。この群は１５分後にｍＴＦ（６ＨＴ－ＴＦ）１４９４ｎｇ／ｍｌで処理した。ｍＴＦは、プラスチックエッペンドルフピペットで滴下して、動物の尾の基部切断部と恒常的に作用するように局所接触させた。安定かつ固化した血餅の形成を、さらなる出血がないことを確認する手段により評価した。
ｂ）ＣＹＥ－ＴＦ処理動物
体重３００～６００グラムのＳｐｒａｇｅ－Ｄａｗｌｅｙ雄ラット２７匹を５つの処理群に無作為に分けた。
・対照群、生理食塩水で局所的処理を受けた少なくとも１４匹からなる
・尾の横断切断術を開始する１５分前にヘパリン２００Ｕ／ｋｇのｉ．ｖ．投与を受けた２群（ＣＹＥ－ＴＦで処理（ｎ＝３）および生理食塩水溶液で処理（ｎ＝５））
・尾の横断切断術を開始する前３日間、ワーファリン０．１ｍｇ／ｋｇ／日を蛍光投与した他の２群（ＣＹＥ－ＴＦで処理（ｎ＝３）および生理食塩水溶液で処理（ｎ＝２））
【０２４５】
よって、各抗凝固処理の対照処理群があった。ＣＹＥ－ＴＦは、プラスチックエッペンドルフピペットで施して、動物の尾の基部切断部と恒常的に作用するように局所接触させた。安定かつ固化した血餅の形成を、さらなる出血がないことを確認する手段により評価した。
【０２４６】
因子ＶＩＩＩ欠損マウスを用いたマウスの尾の基部切断による致死的出血モデル
このアッセイの目的は、遺伝子標的変異によって得られた因子ＶＩＩＩ欠損マウス（血友病Ａ）を用いた致死的出血モデル（尾静脈の横断切断）におけるｍＴＦの局所投与の作用を評価することである。
【０２４７】
標的とされるＸ染色体関連変異体対立遺伝子に関して同形接合性であったマウスは活力があり、繁殖能力があった。同形接合性雌およびキャリアー雄は、正常な因子ＶＩＩＩ活性の１％未満であり、長い凝固時間を示した。これらのマウスは血友病Ａの重要な特徴を発生反復し、選択的治療戦略を検索する際に用いられる優れたモデルを提供する。
【０２４８】
各群３～５匹の下記のような５つの処理群とした。

Ａ群：対照マウス　　ビヒクル　０ｎｇ／ｍｌ
Ｂ群：血友病雄マウス　ビヒクル　０ｎｇ／ｍｌ
Ｃ群：血友病雄マウス　ｍＴＦ　１，４９４ｎｇ／ｍｌ
Ｄ群：血友病雌マウス　ビヒクル　０ｎｇ／ｍｌ
Ｅ群：血友病雌マウス　ｍＴＦ　１，４９４ｎｇ／ｍｌ
ｍＴＦ保存液タンパク質濃度は生物学的に活性な材料１，４９４ｎｇ／ｍｌであった。

【０２４９】

１用量のみを保存容器から直接用い、希釈は行わなかった。試験品の用量は２段階凝固アッセイを用い、生物学的に活性なタンパク質濃度に基づき算出した。ｍＴＦおよびビヒクルをマウス尾の出血部位に、０．２５ｍｌ／分の速度で最大２０分間（５ｍｌ）、滴下により局所投与した。

【０２５０】

ＩＩ．　結果

１．　微小胞化ＴＦが健常状態および罹患状態の双方において血液凝固を起こすことを示すin vitroアッセイ

健常被検体および血友病被検体において繊維素血餅を生じるｍＴＦの能力を種々の濃度で評価する目的でいくつかのin vitroアッセイを行った。これまでに述べたように、「凝固時間」とは、非抗凝固処理血液サンプル中で血餅が固化するのにかかる時間を指す。

【０２５１】

１．１　微小胞化ＴＦは健常被検体からの血漿を凝固させることができる（血漿における凝固アッセイ）

健常血漿におけるｍＴＦ凝固促進活性に関する種々の濃度での直接的アッセイは、ｍＴＦが、明らかに用量応答的に、健常血漿条件での凝固時間を極めて有意に短縮できることを示す。極めて低いｍＴＦ濃度（２ｎｇ／ｍｌ）であっても、健常血漿の凝固時間はほぼ３倍時間短縮される。高濃度（１００ｎｇ／ｍｌ）では、５倍を超えて時間短縮される。表５は、精製微小胞化ＴＦ－ヘキサヒスチジンタグ融合タンパク質（６ＨＴ－ＴＦ）の３回の独立した実験の結果を示し、表６は微小胞化ＴＦを含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＦ）、表７は微小胞化末端切断型ＴＦを含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＴＦ）に関して示す。

【０２５２】

【表６】

表５

精製微小胞化ＴＦ－ヘキサヒスチジンタグ融合タンパク質（６ＨＴ－ＴＦ）は健常な血漿において凝固時間を用量応答的に短縮する

6HT-TF（ng/ml）	凝固時間（秒）
0.00	168.60±6.06
2.00	63.27±2.17
5.00	55.56±0.76
20.00	45.47±0.92
50.00	37.50±0.75
100.00	31.10±0.12

平均±ＳＥＭ（ｎ＝３）

【０２５３】

【表７】

表６

微小胞化ＴＦを含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＦ）は健常な血漿において凝固時間を用量応答的に短縮する

CYE-TF（ng/ml）	凝固時間（秒）
0.00	320.4±81.3
0.43	67.35±4.6
4.30	37.6±1.9
43.00	23.1±1.09
209	18.08±0.26

平均±ＳＥＭ（ｎ＝４）

【０２５４】

【表８】

表７

微小胞化末端切断型ＴＦを含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＴＦ）は健常な血漿において凝固時間を短縮する

CYE-TTF（ng/ml）	凝固時間（秒）
0.00	233.4±2.65
20.00	85.6±1.1

平均±ＳＥＭ（ｎ＝２）

【０２５５】

１．２　微小胞化ＴＦは、標準手順に従って再脂質化されたｒＴＦと比較した際、改善された有効性で血漿を凝固させることができる

１．２．１．　標準手順に従って再脂質化された市販のｒＴＦ再脂質化と比較したｍＴＦの凝固促進活性

市販のｒＴＦ(American Diagnostica)は、Morrissey (http://www.tf7.org/relipidation2.pdf)により記載されている標準的な手順に従って再質化した（この場合、ｒＴＦはリン脂質リポソームに組み込まれている）。５人の健常なドナーからの血漿サンプルをthe Blood Bank of Vall d'Hebron Hospital, Department "Banc de Sang i Teixits" (Pg,Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona)から入手した。血漿サンプルはＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、ＨＩＶおよびＴＰＨＡに関して確認し、総て陰性であった。これら５つの血漿サンプルをプールし、使用まで１．５ｍｌバイアルで－２０℃にて冷凍した。サンプル中に存在するｒＴＦの量は、American Diagnostica Inc.（Ｎｏ．８４５）からのIMUBIND Tissue Factor ELISAキットにより、販売者の明細に従って定量した。

【０２５６】

まず、酵母微小胞に組み込まれたｒＴＦまたは合成リポソームに挿入された場合の間の活性のあり得る違いを分析した。これらの実験では、ｍＴＦの４つの異なるロット（ロットＰ４、Ｐ７、Ｐ８およびＰ）と１ロットのin vitro再脂質化ｒＴＦ（総て、ＥＬＩＳＡ

により測定された既知濃度のｒＴＦを有する）を凝固活性に関して試験した。従って、ｍＴＦ（４つの異なるロットから）または再脂質化された市販のｒＴＦのいずれかの連続希釈液を、標準的な凝固試験で活性に関して試験した。結果は、試験した全濃度範囲で、供試プールとは独立に、ｍＴＦサンプルにおける凝固促進活性は、再脂質化ｒＴＦの希釈液に相当するものよりも常に高かった（１桁または２桁の間）（図３２）。

【０２５７】

１．２．２．　合成リポソームに挿入された同じｒＴＦと比較した、酵母由来微小胞（ｍＴＦ）に挿入されたｒＴＦ（ｍＴＦ）の凝固促進活性

ｍＴＦ微小胞から抽出されたｒＴＦを再脂質化する試みでは、ｒＴＦ活性が、ｒＴＦを含有する元の酵母微小胞と比較した場合、極めて低いことが示された（図３３）。最適な組織因子活性のためにはコンフォメーション的な必要条件があると思われる。

【０２５８】

１．２．３．　ヘパリン処理血漿におけるｍＴＦの凝固促進活性

さらに、再構成調製物中に存在する活性は、出血の特定のin vivoモデル（ヘパリン処理動物）では無視できるものであった（図３４）。

【０２５９】

これらを考え合わせると、１．２に示される結果は、本発明のｍＴＦまたは６Ｈ－ＴＦ微小胞中に存在する組織因子および酵母膜のユニークな組合せは、従来の合成リポソームへのｒＴＦのin vitro挿入では達成できない一連の止血活性を呈することを示唆する。

【０２６０】

１．３．　微小胞化ＴＦはＦＶＩＩＩ、ＦＩＸおよびＦＸＩ欠損患者からの血漿を凝固させることができる（血漿における凝固アッセイ）

免疫枯渇により得られた凝固因子ＦＶＩＩＩ欠損（血友病Ａ）、ＦＩＸ欠損（血友病Ｂ）およびＦＸＩ欠損（血友病Ｃ）血漿における種々の濃度でのｍＴＦ凝固促進活性の直接的アッセイでは、ｍＴＦが、明らかに用量応答的に、血友病条件での凝固時間を極めて有意に短縮できることを示す。極めて低いｍＴＦ濃度（２ｎｇ／ｍｌ）であっても、ＦＶＩＩ、ＦＩＸまたはＦＸＩ欠損血漿の凝固の促進に成功した。高濃度（１００ｎｇ／ｍｌ）では、ｍＴＦは、健常血漿と同じレベルで、枯渇血漿の凝固時間を短縮する。表８は、精製微小胞化ＴＦ－ヘキサヒスチジンタグ融合タンパク質（６ＨＴ－ＴＦ）の３回の独立した実験の結果を示し、表９は、微小胞化ＴＦを含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＦ）の結果を示す。

【０２６１】

【表９】

表８

精製微小胞化ＴＦ－ヘキサヒスチジンタグ融合タンパク質（６ＨＴ－ＴＦ）は凝固因子ＦＶＩＩＩ欠損（血友病Ａ）、ＦＩＸ欠損（血友病Ｂ）およびＦＸＩ欠損（血友病Ｃ）血漿において凝固時間を用量応答的に短縮する

6HT-TF (ng/ml)	FVIII（血友病Ａ）凝固時間（秒）	FIX（血友病Ｂ）凝固時間（秒）	FXI（血友病Ｃ）凝固時間（秒）
0.00	600±0.0	600±0.0	600±0.0
2.00	87.43±3.01	78.37±0.82	66.43±2.17
5.00	57.43±1.68	52.20±0.69	51.67±0.64
20.00	48.57±1.23	41.70±1.18	46.07±1.70
50.00	39.80±0.67	34.40±0.42	38.93±1.23
100.00	32.77±0.38	29.17±0.43	32.50±0.85

平均±ＳＥＭ（ｎ＝３）

【０２６２】

【表１０】

表９

微小胞化ＴＦを含有する清澄酵母抽出液は凝固因子ＦＶＩＩＩ欠損（血友病Ａ）、ＦＩＸ欠損（血友病Ｂ）およびＦＸＩ欠損（血友病Ｃ型）欠損血漿において凝固時間を用量反応的に短縮する

CYE-TF (ng/ml)	FVIII（血友病Ａ）凝固時間（秒）	FIX（血友病Ｂ）凝固時間（秒）	FXI（血友病Ｃ）凝固時間（秒）
0.00	>600	>600	<600
0.043	127.9±0	126.7±1.2	-
0.43	63.25±5	64.15±5	130.2±0
4.3	34.65±2.65	35.47±2.57	36.9±4.0
43.0	20.15±1.05	20.6±1.4	20.85±1.15

平均±ＳＥＭ（ｎ＝２）

【０２６３】

１．４．　微小胞化ＴＦは後天性血小板欠乏症からの血漿を凝固させることができる（血小板減少症血漿における凝固アッセイ）

後天性血小板欠乏症からの血漿におけるｍＴＦ凝固促進活性の直接的アッセイでは、ｍ

ＴＦが、種々の血小板数を有する血小板減少症血漿において凝固時間を極めて有意に短縮できる。表１０に示されるように、極めて少ない血小板数（＜１，０００／μｌ）であっても、微小胞化ＴＦを含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＦ）により、凝固時間は劇的に短縮される。

【０２６４】

【表１１】

表１０

微小胞化ＴＦを含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＦ）は血小板減少症血漿において凝固時間を短縮する

血小板数	mTF なし 凝固時間（秒）	CYE-TF (60 ng/ml)含有 凝固時間（秒）
350,000/μl	226.3	21.9
150,000/μl	232.6	22.8
50,000/μl	253.9	22.4
9,000/μl	321.2	21.3
<1,000/μl	>400	21.3

平均±ＳＥＭ（ｎ＝１）

【０２６５】

１．５．　微小胞化ＴＦは抗ＦＶＩＩ抗体の存在下で、ＦＶＩＩＩ、ＦＩＸおよびＦＸＩ欠損血漿からの血漿を凝固させることができる（血漿における凝固アッセイ）

血漿凝固に対する微小胞化ＴＦの作用を、ＦＶＩＩに対するモノクローナル抗体の存在下で、健常なボランティアからのＦＶＩＩＩ、ＦＩＸおよびＦＸＩ欠損血漿（ＦＶＩＩＩ　ＤＰ、ＦＩＸ　ＤＰおよびＦＸＩ　ＤＰ）を用い、凝固アッセイにより調べた。これらの結果は明らかに、微小胞化ＴＦを含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＦ）は血漿凝固をもたらすことができ、さらには、表１１に示されているように、ＦＶＩＩに対するモノクローナル抗体の存在下、ＦＶＩＩＩ、ＦＩＸまたはＦＸＩの不在下であっても、凝固時間を著しく短縮ことを示す。～ＦＸの不在下、ＦＶＩＩ抗体の存在下での凝固は、驚くべきことに、ｍＴＦが内因性凝固経路を介して作用するのでもなく、外因性凝固経路を介して作用するのでもないことを意味する。

【０２６６】

【表１２】

表１１

微小胞化ＴＦを含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＦ）は、抗ＦＶＩＩ抗体の存在下でＦＶＩＩＩ、ＦＩＸおよびＦＸＩ欠損血漿を凝固させる

	mTF なし 凝固時間（秒）	CYE-TF（70ng/ml）含有 凝固時間（秒）
FVIII DP	308.17±5.41	29.6±4.85
FIIIV DP+抗 FVII	>395	45.9±0.86
FIX DP	347.4±23.03	26.77±3.97
FIX DP+抗 FVII	>400	41.67±0.55
FXI DP	331±5.43	32.9±5.8
FXI DP+抗 FVII	>400	49.17±1.2
正常血漿	126.28±85	28.15±0.05
正常血漿+抗 FVII	216.8±0	42.55±2.05

平均±ＳＥＭ（ｎ＝４）

【０２６７】

１．６　微小胞化ＴＦは健常被検体からの血液を凝固させることができる（非抗凝固処理全血における凝固アッセイ）

健常被検体からの全血における種々の濃度でのｍＴＦ凝固促進活性の直接的アッセイでは、ｍＴＦが、明らかに用量応答的に、凝固時間を極めて有意に短縮できることを示す。極めて低いｍＴＦ濃度（１ｎｇ／ｍｌ）であっても、健常被検体からの全血の凝固時間の短縮に成功した。高濃度（１００ｎｇ／ｍｌ）では、ｍＴＦは、枯渇血漿の凝固時間を８倍を超えて短縮する。表１２は、精製微小胞化ＴＦ－ヘキサヒスチジンタグ融合タンパク質（６ＨＴ－ＴＦ）の３回の独立した実験の結果を示し、表１３は、微小胞化ＴＦを含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＦ）の結果を示す。

【０２６８】

【表１３】

表１２

精製微小胞化ＴＦ－ヘキサヒスチジンタグ融合タンパク質は健常患者の全血において凝固時間を用量応答的に短縮する

6HT-TF（ng/ml）	凝固時間（分）
0.00	4.23±0.54
1.00	2.03±0.14
10.00	1.17±0.12
100.00	0.33±0.03

平均±ＳＥＭ（ｎ＝３）

【０２６９】

【表１４】

表１３

微小胞化ＴＦを含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＦ）は健常患者の全血において凝固時間を用量応答的に短縮する

CYE-TF（ng/ml）	凝固時間（秒）
0.00	264.7±33.4
0.043	235.0±37.5
0.43	168.3±14.2
4.30	76.6±12.1
43.0	43.3±8.8
208	23.0±3.0

平均±ＳＥＭ（ｎ＝３）

【０２７０】

１．７　微小胞化ＴＦは血友病患者からの血液を凝固させることができる（非抗凝固処理全血における凝固アッセイ）

血友病患者からの全血における種々の濃度でのｍＴＦ凝固促進活性の直接的アッセイでは、ｍＴＦが、明らかに用量応答的に、凝固時間を極めて有意に短縮できることを示す。極めて低いｍＴＦ濃度（２～５ｎｇ／ｍｌ）であっても、血友病患者からの全血の凝固時間のノーマライズに成功した。高濃度（２０ｎｇ／ｍｌ）では、ｍＴＦは、血友病全血の凝固時間を１分未満にまで短縮する。表１４は、精製微小胞化ＴＦ－ヘキサヒスチジンタグ融合タンパク質（６ＨＴ－ＴＦ）の３回の独立した実験の結果を示し、表１５は、微小胞化ＴＦを含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＦ）の結果を示す。

【０２７１】

【表１５】

表１４

精製微小胞化ＴＦ－ヘキサヒスチジンタグ融合タンパク質（６ＨＴ－ＴＦ）は血友病ＡおよびＢ患者の全血において凝固時間を用量応答的に短縮する

6HT-TF (ng/ml)	FVIII（血友病Ａ）凝固時間（分）	FXI（血友病Ｂ）凝固時間（分）
0.00	17.17±1.56	19.27±0.84
1.00	8.50±0.47	11.23±0.65
10.00	3.93±0.30	6.40±0.32
100.00	0.80±0.12	0.77±0.15

平均±ＳＥＭ（ｎ＝３）

【０２７２】

【表１６】

表１５

微小胞化ＴＦを含有する清澄酵母抽出液（ＣＹＥ－ＴＦ）は血友病ＡおよびＢ患者の全血において凝固時間を用量応答的に短縮する

CYE-TF (ng/ml)	FVIII（血友病Ａ）凝固時間（分）	FXI（血友病Ｂ）凝固時間（分）
0.00	15.3±1.2	18.4±2.1
1.00	9.8±1.3	11.2±0.1
10.00	5.7±0.7	5.8±0.3
100.00	1.4±0.2	1.5±0.1

平均±ＳＥＭ（血友病Ａ　ｎ＝３；血友病Ｂ　ｎ＝２）

【０２７３】

２．微小胞化ＴＦが重度出血モデルにおける局所的抗血友病処置（予め切断した血管への直接的適用による）に有用な薬剤であることを示すin vivoアッセイ

健常被検体および血友病被検体において該ｍＴＦの種々の濃度での繊維素血餅生成能を評価する目的でいくつかのin vivoアッセイを行った。

【０２７４】

２．１　微小胞化ＴＦはラット尾の基部切断による重度出血動物モデルにおいて局所的止血薬として有用である

ラットにおける尾の全横断切断による重度出血モデルを用いたin vivo研究では、出血時間の有意な短縮示された：動物を総タンパク質濃度１４９４ｎｇ／ｍｌ～１．７μｇまでの６ＨＴ－ＴＦで処置した場合には１８．１６±１．６１から８．３６±０．８２分、２００ｎｇ／ｍｌ／分のＣＹＥ－ＴＦで処置した場合には１８．１６±５．９８から９．

３３±１．０５分。

【０２７５】

２．２　微小胞化ＴＦはあらかじめヘパリンで処理した重度出血動物モデルにおいて局所的止血薬として有用である

抗凝固薬（すなわち、ヘパリン２００ＩＵ）で前処理したラットにおける、尾の全切断による重度出血モデルを用いたin vivo研究では、極めて有意な抗出血作用が示された。６ＨＴ－ＴＦで処理しなかったラットは放血して９０分後に死に至ったが、１４９４ｎｇ／ｍｌの６ＨＴ－ＴＦで処理したラットは１５．４６±１．２０分で出血が止まり、１００％の生存率を示した。他方、ＣＹＥ－ＴＦの使用もまた、同様の抗出血作用を示した。ヘパリンで前処理したラットは放血して９０分後に死に至ったが、ＣＹＥ－ＴＦで処理したラットは１４．２±２．４（ｎ＝５）分で出血が止まり、これもまた１００％の生存率を示した。ワーファリンで前処理したラットは、ＣＹＥ－ＴＦ（２００ｎｇ／ｍｌ）で処理した場合に４１．６±１６．４５から５．８±０．６４（ｎ＝３）へへ凝固時間を短縮した。

【０２７６】

３．　微小胞化ＴＦが致死的出血モデルにおける局所的抗血友病処置（予め切断した血管への直接的適用による）に有用な薬剤であることを示すin vivoアッセイ

３．１　微小胞化ＴＦはＦＶＩＩＩ欠損マウス尾の基部切断による致死的出血動物モデルにおいて局所的止血薬として有用である

血友病マウス（ＦＶＩＩＩ欠損マウス）の致死的出血モデルにおいて、６ＨＴ－ＴＦの局所投与は、正常な非血友病マウスで得られた出血時間（５．０±０．６５分）と比較して出血時間の劇的な短縮をもたらした（血友病雄マウスでは３１．４±４．７４から５．１４±０．６９分、雌マウスでは４３．３３±１３．４８から５．０±２．０分）。この出血時間の短縮は、６ＨＴ－ＴＦで処理した群では死亡は無かったが、ビヒクルで処理した血友病マウスは総て死亡した。表１６は、精製微小胞化ＴＦ－ヘキサヒスチジンタグ融合タンパク質（６ＨＴ－ＴＦ）の５回／３回の独立した実験の結果を示す。

【０２７７】

【表１７】

表１６

精製微小胞化ＴＦ－ヘキサヒスチジンタグ融合タンパク質（６ＨＴ－ＴＦ）はＦＶＩＩＩ欠損マウスの尾の基部切断による致死的出血モデルにおいて出血時間を短縮する

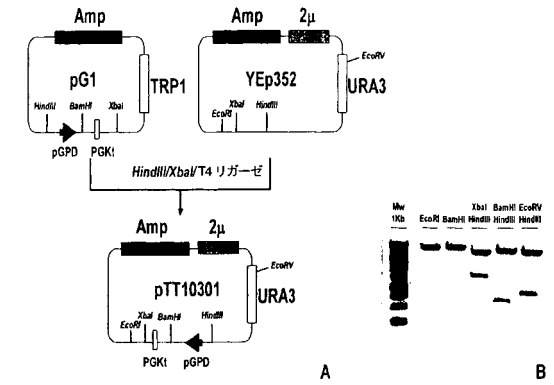
処理		動物の体重(g)	6HT-TF (ng/マウス)	出血時間 (分)		死亡率	
		平均+SEM	平均+SEM	平均+SEM	N	%	平均（分）
対照雄マウス	ビヒクル	23.56±0.74	0+/-0	5±0.65	5	0	-
血友病雄マウス	ビヒクル	20.94±0.35	0+/-0	31.4±4.74	5	100	44.8±8.43
血友病雄マウス	6HT-TF	21.04±0.49	1807+/-291	5.14±0.69	5	0	-
血友病雌マウス	ビヒクル	19.7±1	0+/-0	43.33±13.48	3	100	50±16.04
血友病雌マウス	6HT-TF	19.43±0.29	1618+/-498	5±2	3	0	-

平均±ＳＥＭ（対照および血友病雄　ｎ＝５；血友病雌　ｎ＝３）

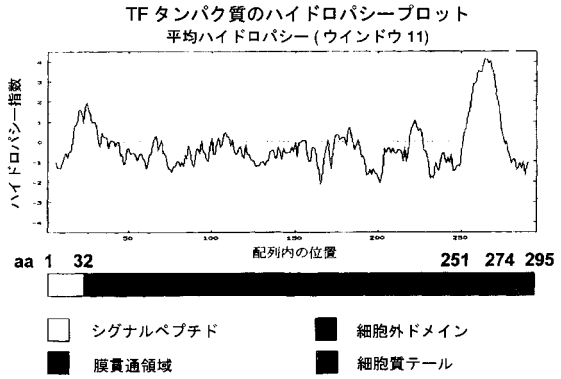
【０２７８】

全体としての結果は、健常被検体において、さらには血友病患者であってもｍＴＦの有効な止血能を示し、これは、in vitro（血友病患者からの血漿および全血）ならびに血友病Ａ遺伝子欠損マウスモデルを用いたin vivoモデルにより実証された。さらに、ｍＴＦは内因性経路と外因性経路の双方が遮断されても血漿を凝固させることができる。

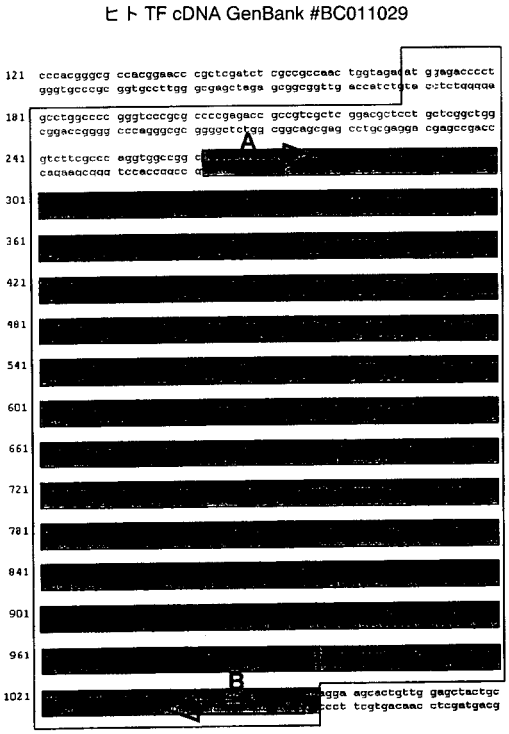
【図１】



【図２】



【図３】



【図４】

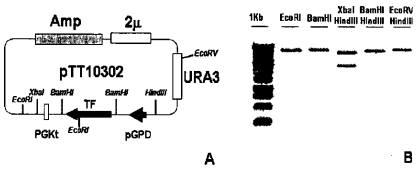


Figure 4

【図５】

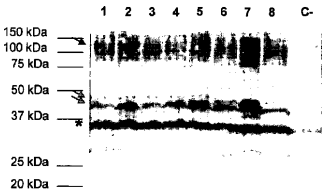


Figure 5

【図６】

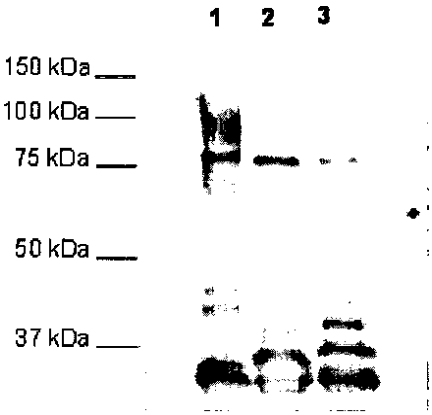
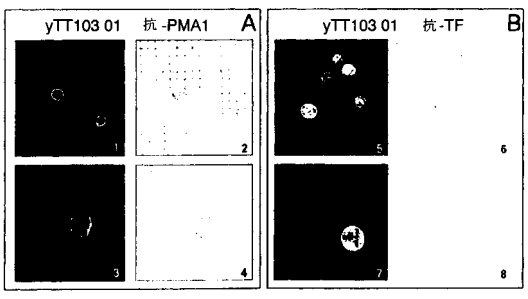
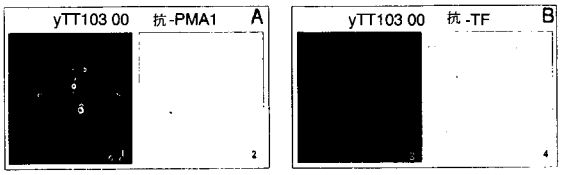


Figure 6

【図７】



【図８】



【図９】

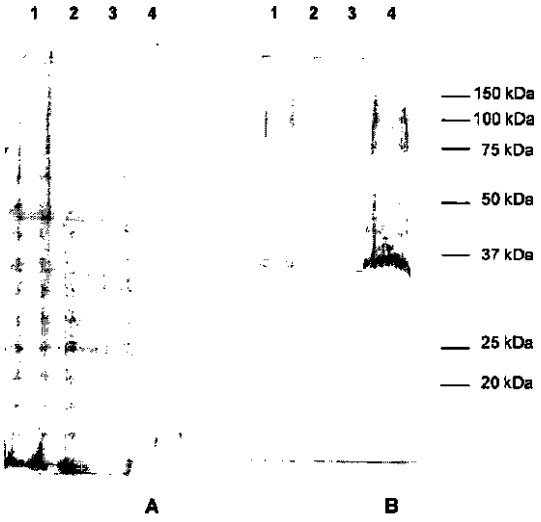
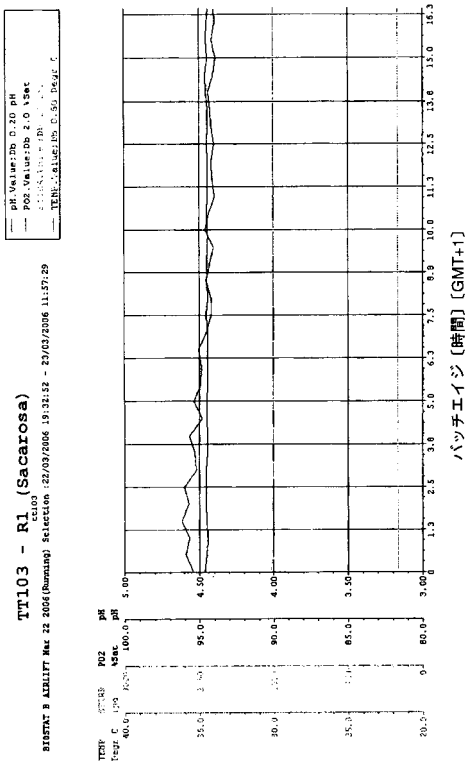
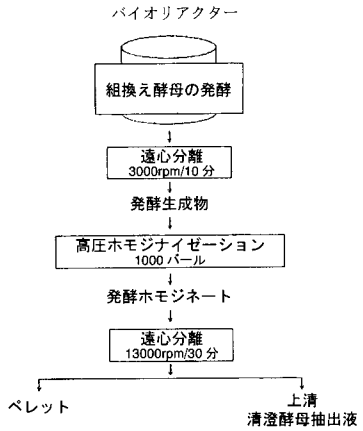


Figure 9

【図１０】



【図１１】



【図１２】

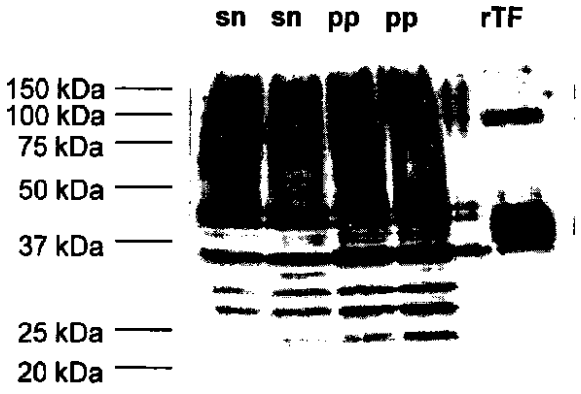


Figure 12

【図１３】

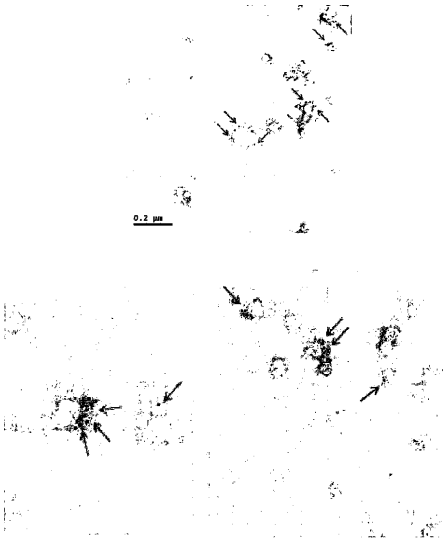
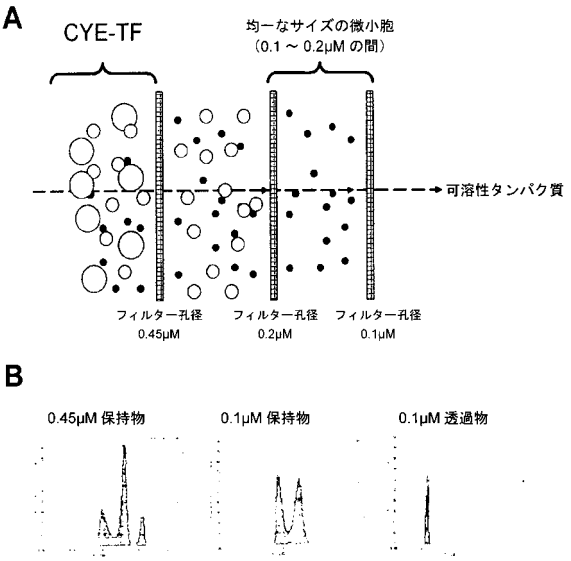


Figure 13

【図１４】



【図１５】

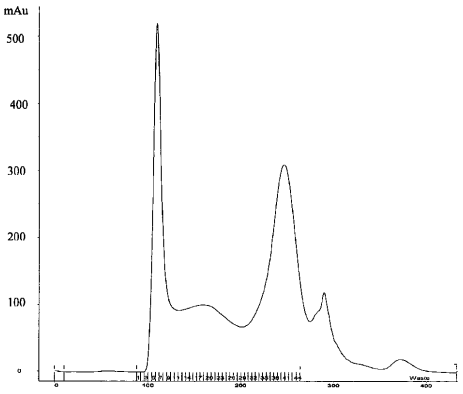
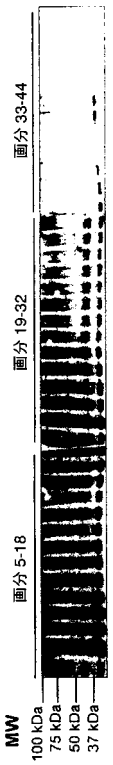
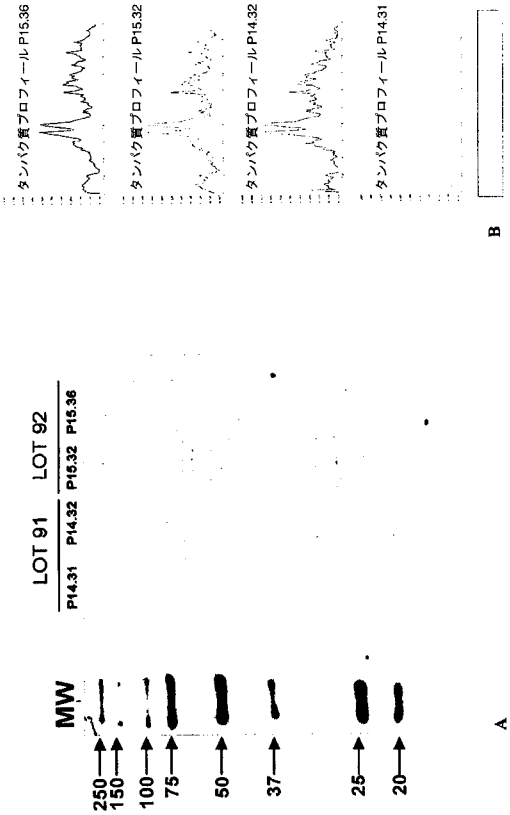


Figure 15

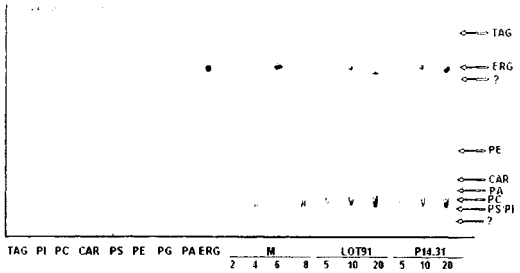
【図１６】



【図１７】



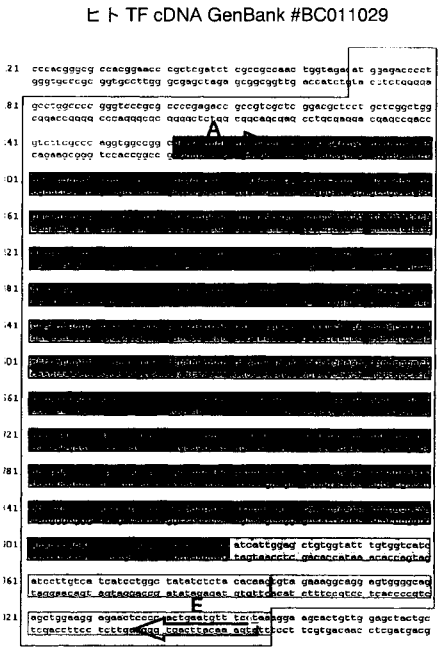
【図１８】



TAG：トリアシルグリセリド
ERG：エルゴステロール
PE：ホスファチジルエタノールアミン
CAR：カルジオリピン
PA：ホスファチジン酸
PC：ホスファチジルコリン
PS／PI：ホスファチジルセリン／ホスファチジルイノシトール

TLC：クロロホルム：メタノール：水 (C : M : W, 345 : 133 : 21, vv)

【図１９】



【図２０】

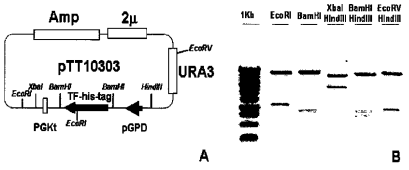


Figure 20

【図２１】

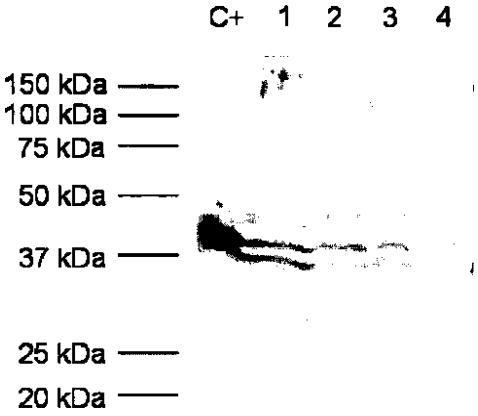


Figure 21

【図２２】

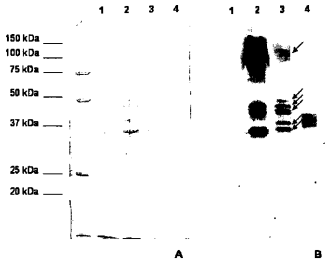
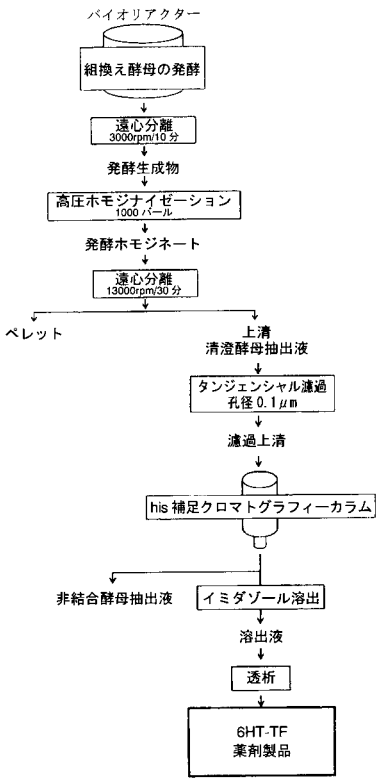


Figure 22

【図２３】



【図２４】

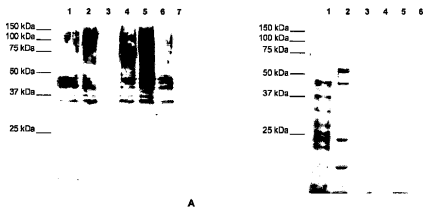


Figure 24

【図２５】

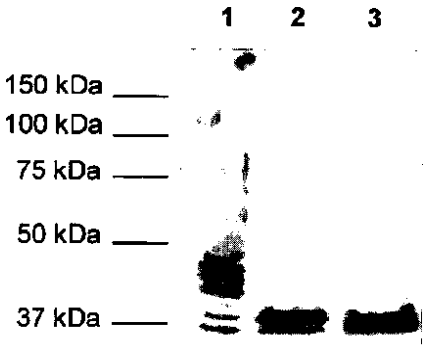


Figure 25

【図２６】

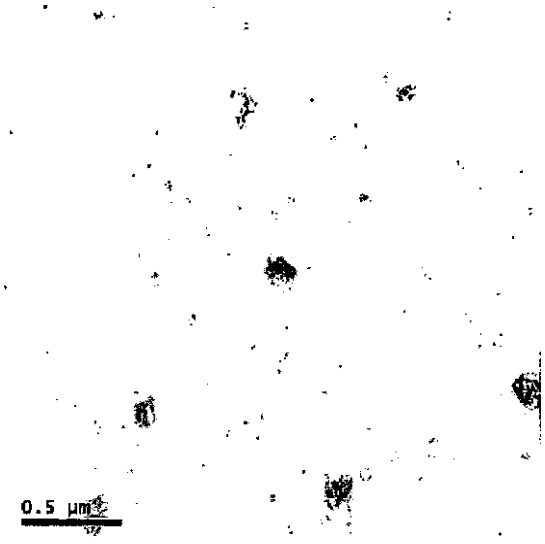


Figure 26

【図２７】

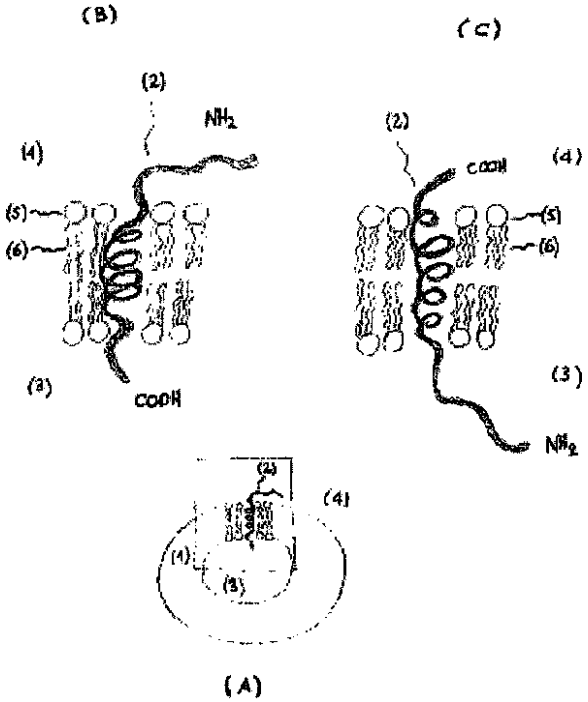
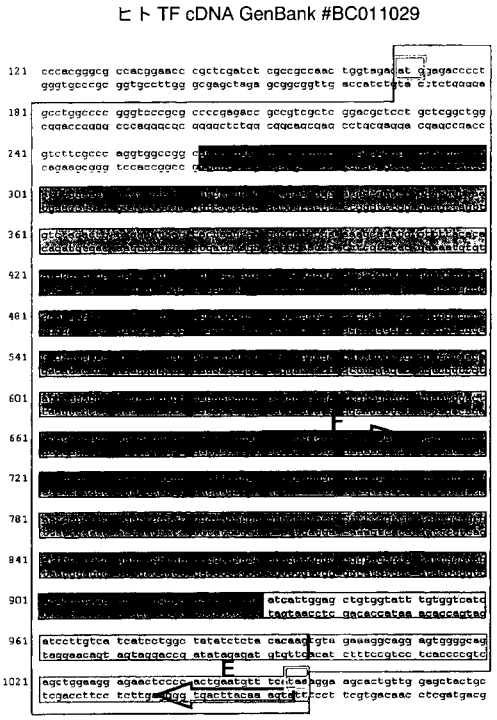


Figure 27

【図２８】



【図２９】

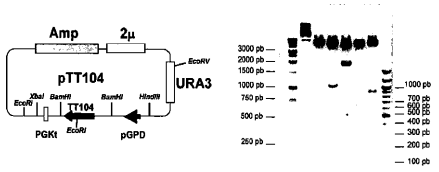


Figure 29

【図３０】

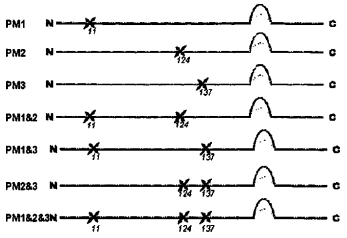


Figure 30

【図３１】

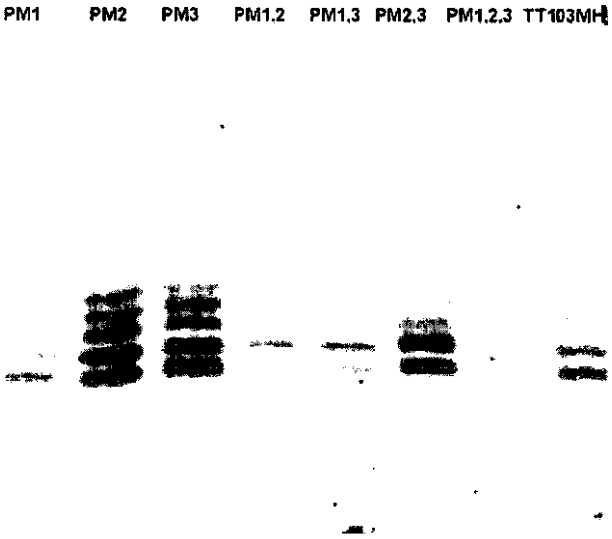
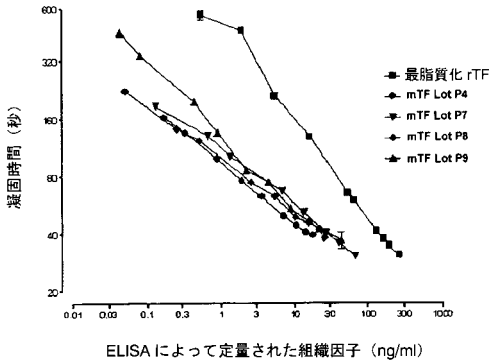
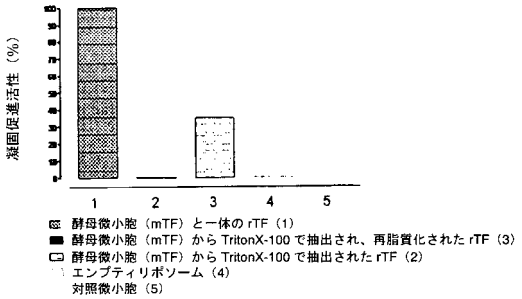


Figure 31

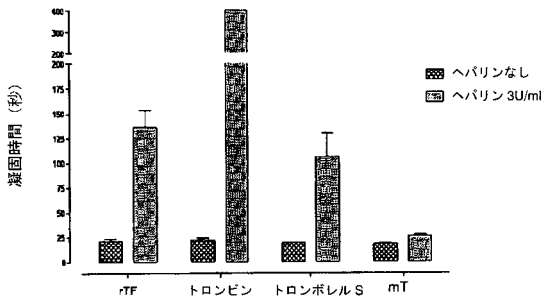
【図３２】



【図３３】



【図３４】



【配列表】
0004813603000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
Ｃ１２Ｎ 15/09 (2006.01) Ｃ１２Ｎ 15/00 Ａ

(74)代理人 100094640
弁理士 紺野 昭男
(74)代理人 100107342
弁理士 横田 修孝
(72)発明者 ハビエル、ペドレニョ、エゲア
スペイン国バルセロナ、カステルデフェルス、２ア、プランタ、エディフィシ、ベ６、アビングーダ、デル、カナル、オリンピク、エセ／エネ、パルク、メディテラニ、デ、ラ、テクノロヒア
(72)発明者 ルイス、カベダ、カタスス
スペイン国バルセロナ、カステルデフェルス、２ア、プランタ、エディフィシ、ベ６、アビングーダ、デル、カナル、オリンピク、エセ／エネ、パルク、メディテラニ、デ、ラ、テクノロヒア
(72)発明者 フアン、ラモン、ロドリゲス、フェルナンデス‐アルバ
スペイン国バルセロナ、カステルデフェルス、２ア、プランタ、エディフィシ、ベ６、アビングーダ、デル、カナル、オリンピク、エセ／エネ、パルク、メディテラニ、デ、ラ、テクノロヒア

審査官 中村 正展

(56)参考文献 国際公開第９８／０４８２８３（WO，Ａ１）
国際公開第０１／０２４６２６（WO，Ａ１）
国際公開第０２／０９４０１６（WO，Ａ１）
国際公開第０２／０８７５９４（WO，Ａ１）
FASEB J.，２００３年 １月 ２日，10.1096/fj.02-0574fje，ＵＲＬ，http://dx.doi.org/10.1096/fj.02-0574fje
Biochemistry，２００６年 ３月，vol. 45，3769-3774
Protein Exp. Purif.，２００２年，vol. 26，386-393

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 1/00- 1/38
A61K 38/00
C12N 5/00- 5/28
C07K 14/745
C07K 19/00
C12N 15/00-15/90
C12P 21/02
MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
CA/CONFSCI/SCISEARCH(STN)
WPIDS(STN)
PubMed
JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)