

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6234224号
(P6234224)

(45) 発行日 平成29年11月22日(2017.11.22)

(24) 登録日 平成29年11月2日(2017.11.2)

(51) Int. Cl.	F I				
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K	19/00	Z N A		
C 0 7 K 14/485 (2006.01)	C O 7 K	14/485			
C 1 2 N 9/70 (2006.01)	C 1 2 N	9/70			
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A		
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15			
請求項の数 20 (全 94 頁) 最終頁に続く					

(21) 出願番号	特願2013-522316 (P2013-522316)	(73) 特許権者	508176500
(86) (22) 出願日	平成23年8月5日(2011.8.5)		カウンスル オブ サイエントフィック
(65) 公表番号	特表2013-535211 (P2013-535211A)		アンド インダストリアル リサーチ
(43) 公表日	平成25年9月12日(2013.9.12)		インド 110001 ニューデリー ラ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2011/001825		フィ マーグ アヌサンダン バワン (
(87) 国際公開番号	W02012/017310		番地なし)
(87) 国際公開日	平成24年2月9日(2012.2.9)	(74) 代理人	100092093
審査請求日	平成26年8月4日(2014.8.4)		弁理士 辻居 幸一
(31) 優先権主張番号	1845/DEL/2010	(74) 代理人	100082005
(32) 優先日	平成22年8月5日(2010.8.5)		弁理士 熊倉 禎男
(33) 優先権主張国	インド (IN)	(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 血栓溶解及び抗凝固特性を有するタンパク質融合構築物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラタンパク質構築物であって、
 ストレプトキナーゼ、及び、前記ストレプトキナーゼの無修飾のタンパク質に対して少なくとも90%の配列同一性を有するストレプトキナーゼ相同体から成る群から選択される血栓溶解タンパク質に融合したトロンボモジュリンの4、5及び6上皮増殖因子様ドメイン(EGF4、5、6)を含み、
 前記トロンボモジュリンの4、5、6上皮増殖因子様ドメインが、前記血栓溶解タンパク質に、前記血栓溶解タンパク質のN末端、C末端又はN及びCの両方の末端で融合している
 ことを特徴とするキメラタンパク質構築物。

【請求項 2】

前記血栓溶解タンパク質が、ストレプトキナーゼ又は前記ストレプトキナーゼの無修飾のタンパク質に対して少なくとも95%の配列同一性を有するストレプトキナーゼ相同体である、請求項1に記載のキメラタンパク質構築物。

【請求項 3】

前記血栓溶解タンパク質が、配列番号112のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のキメラタンパク質構築物。

【請求項 4】

前記ストレプトキナーゼ相同体が、配列番号112の残基5~383又は残基5~41

4 又は残基 16 ~ 383 に及び、請求項 1 に記載のキメラタンパク質構築物。

【請求項 5】

前記構築物のトロンボモジュリンの 4、5 及び 6 上皮増殖因子様ドメインが、配列番号 111 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含み、

前記配列番号 111 の前記 EGF 4、5、6 ドメインの Met 41 の 1 つ以上がバリン、アラニン又はグルタミンに置き換えられており、

前記キメラタンパク質構築物が、抗トロンビン活性及びプラスミノゲン活性化活性を示す、

請求項 1 に記載のキメラタンパク質構築物。

【請求項 6】

少なくとも 1 つのトランスグルタミナーゼ認識可能架橋配列を更に含む、請求項 2 に記載のキメラタンパク質構築物。

【請求項 7】

前記 EGF 4、5、6 ドメインとストレプトキナーゼ又はストレプトキナーゼ相同体との接合部に 1 つ以上のトロンビン切断可能配列を更に含む、請求項 2 に記載のキメラタンパク質構築物。

【請求項 8】

細菌系又は真核生物系における発現により調製される、請求項 1 に記載のキメラタンパク質構築物。

【請求項 9】

前記真核生物系が、動物細胞系及び酵母細胞系からなる群より選択される、請求項 8 に記載のキメラタンパク質構築物。

【請求項 10】

前記キメラタンパク質構築物が、細胞外媒体に分泌される、請求項 9 に記載のキメラタンパク質構築物。

【請求項 11】

請求項 1 に記載のキメラタンパク質構築物をコードしている、核酸分子。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 13】

請求項 12 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 14】

宿主細胞発現系における請求項 11 に記載の核酸分子の発現によって調製される、請求項 1 に記載のキメラタンパク質構築物。

【請求項 15】

前記構築物をコードしている核酸分子が、配列番号 3、4、5、6 又は 7 から選択される、請求項 1 に記載のキメラタンパク質構築物。

【請求項 16】

前記酵母細胞がピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) である、請求項 9 に記載のキメラタンパク質構築物。

【請求項 17】

薬学的担体と共に、薬学的有効量の請求項 1 に記載のキメラタンパク質構築物を含む、医薬製剤。

【請求項 18】

請求項 1 に記載のキメラタンパク質構築物を含む、トロンビン阻害に使用するための医薬組成物。

【請求項 19】

請求項 1 に記載のキメラタンパク質構築物を含む、抗トロンビン及びプラスミノゲン活性化に使用するための医薬組成物。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

請求項 1 に記載のキメラタンパク質構築物を含む、血栓溶解に使用するための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血栓溶解タンパク質及びトロンボモジュリンの 4、5、6 上皮増殖因子様ドメイン (EGF 4、5、6) を含むキメラ融合タンパク質を含む血栓溶解剤に関する。本発明の融合タンパク質は、プラスミノゲン活性化、トロンピン阻害及び抗凝固タンパク質 C 経路活性化活性を有する。本発明の融合タンパク質は、血栓を砕き、血餅の部位での再閉塞を防止する治療的可能性を有する。

10

【背景技術】

【0002】

血管系内での血餅又は血栓の形成及び成長である血栓症は、出血時に起きるならば命を救う過程であるが、別の時に起きると命を脅かす場合がある。血栓は血管をブロックし、臓器又は他の身体部位への血液供給を停止させてしまう。血管からはがれると、血栓は塞栓となり、最初の部位から離れた位置にある血管を閉塞させてしまう可能性がある。血栓疾患は今や、世界中の発展途上国及び先進国の両方における主な死亡原因の 1 つである。依然として血栓性循環障害に対する最も好まれる救急 (SOS) 薬物療法でありながら、プラスミノゲン活性化因子タンパク質薬 (ストレプトキナーゼ (SK)、スタフィロキナーゼ (SAK)、組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA) 等) はその優位性を、富裕国においては緊急心臓インターベンション (ステント留置、バイパス手術等) に明け渡しつつある。これはそれらの使用に関連して出血のリスクがあり、またトロンピン活性及び/又はトロンピンの新たな産生による、血管損傷部位と同じ部位での血餅の再形成という問題に直面することが多いからである。このため、血餅特異性及び抗血栓特性等の追加の特徴を備えたより洗練され且つより効果的な血栓溶解剤を早急に開発する必要がある。

20

【0003】

血餅の形成は、複雑な一連のカスケード反応の結果であり、幾つかの生化学的な事象が損傷部位での封止又は修復を引き起こす (Butenas and Mann 2002)。血液凝固のカスケード開始に基づいて、外因性経路と内因性経路とに経路を分類しており、外因性経路は組織因子 (TF) の曝露によって開始され、内因性経路は第 XII 因子 (ハーゲマン因子)、高分子量キニノーゲン (HK) 又はプレカリクレインによって開始される。しかしながら、両方のカスケード経路は最終的には第 Xa 因子産生地点で合流し、続いて共通するトロンピンが介在するフィブリン産生をたどる (Cannon and Tracy 1995)。

30

【0004】

トロンピン産生は、脊椎動物における血液凝固過程の中心的なステップである。トロンピン産生過程においては、少量のトロンピンがフィブリン塊/網にその拡大と共に取り込まれ、このプロテアーゼの触媒部位 (この吸収されたトロンピン中で遊離である) は、血餅の成長を増幅することができる (Liu, Nossel et al. 1979; Vali and Scheraga 1988)。トロンピンは多様な基質と相互作用し、また幾つかの血餅形成促進因子を活性化し、例えば (a) 同種受容体の切断による血小板の活性化を引き起こす、(b) 第 V、VII 及び XI のフィードバック活性化を引き起こす、(c) トランスグルタミナーゼ (transglutaminase)、第 XII 因子の活性化を引き起こす、(d) フィブリノゲンをフィブリンに変換する。一旦血餅が形成され、ストランド間の架橋により安定すると、病的状況下、血餅は血管内での正常な血流を妨げ、これが動脈及び静脈の封鎖につながる。

40

【0005】

動物/ヒトにおける、病的血栓形成から生じる循環障害 (心筋梗塞等) に対する最も一般的且つ好まれる薬物療法の 1 つが、血栓溶解剤の静脈内注入である (Lijnen and Collen 1988; Collen and Lijnen 1990; Fr

50

ancis and Marder 1991)。使用できる血栓溶解剤（ストレプトキナーゼ（SK）、ウロキナーゼ（UK）、組織型プラスミノゲン活性化因子（tPA）等）は本質的に同じプラスミン依存性の機構を通じて作用し（これらはプラスミノゲン活性化因子であるため）、これらの血栓溶解剤は、プラスミノゲンの残基561と562との間の切断しやすいペプチドを切断し、プラスミノゲンをそのタンパク質分解性の活性型であるプラスミンに変換する。組織型プラスミノゲン活性化因子及びウロキナーゼは、ヒトプラスミノゲンにおける切断しやすいペプチド結合を特異的に認識するプロテアーゼ（直接的な活性化因子）であり、ストレプトキナーゼ及びスタフィロキナーゼ（プロテアーゼというよりタンパク質「補助因子」であるため、「間接的な」活性化因子である）（（De Renzo, Boggiano et al. 1967; Buck, Hummel et al. 1968; McClintock and Bell 1971を参照のこと）はまずプラスミン又はプラスミノゲンと緊密な1:1の複合体を形成し、その結果としてのタンパク質分解性活性複合体が、他の「遊離の」プラスミノゲン分子の切断しやすいペプチド結合を切断し、プラスミンを指数関数的に産生させる（（Wohl, Summaria et al. 1978; Castellino and Powell 1981; Wohl, Sinio et al. 1983; Davidson, Higgins et al. 1990による再考察）。現行の全ての血栓溶解剤、すなわちプラスミノゲン活性化因子タンパク質製剤の中でも、ストレプトキナーゼが最も高い血栓溶解力を示すが、（SAKのように）細菌由来であるため、ごく一部の患者において免疫反応を起こさせる制約がある。それでもなお、ストレプトキナーゼは、tPa及びUKより比較的低コストであるため、手ごろな価格の血栓溶解剤として広く使用されている。

【0006】

効果的な血栓溶解療法は正常な血流の維持に役立ち、またかなりの数の患者の生存率を改善する（Verstraete, 1990）が、多くの場合は同じ部位での早期再閉塞又は再血栓症が、血栓溶解剤の投与の成功を制限し続けてきた。幾つかの研究は、血栓溶解療法後、最高で30%の患者において早期再閉塞が起きることを実証している（Ohman, Califf et al. 1990）。再血栓症又は早期再閉塞の原因は、血液の過剰な凝固性を高めるプラスミン活性によって説明される（Eisenberg, Miletich et al. 1988）。プラスミンが接触因子（Ewald and Eisenberg 1995）、第V因子（Lee and Mann 1989）、そしておそらくはプロトロンビンをも（Seitz et al., 1993）活性化するとの説がある。唱えられている別の原因は、血餅に結合したトロンビンの後者の溶解に続く露出であり、これによってより多くのトロンビンが産生され、フィブリンに結合したトロンビンは比較的、抗トロンビン阻害薬に耐性である（Hogg and Jackson 1989; Weitz, Hudoba et al. 1990）。「放出された」トロンビンは再度、局所的に凝血原活性を活性化し、また血小板を活性化し始め（Kumar, Beguin et al. 1994, Puri, Kumar et al. 1995）、これによって再血栓症につながる生化学的な事象のサイクルが促進される。このため、トロンビンを損傷部位で直接、またその凝血原活性の「二次」レベルで阻害することが、上記の望ましくない一連の事象を大きく妨げるはずである。このような特性を血栓溶解剤と同じ分子にうまく組み込めたら、助かる命という観点から有利であることは明白である。

【0007】

プラスミノゲン活性化因子は、プラスミノゲンのプラスミンへの酵素的な変換を特徴的に触媒するプロテアーゼ類である。TPA、プラスミノゲンをプラスミンへと1つのアルギニン/パリン結合の加水分解を通じて酵素的に変換。

【0008】

組織プラスミノゲン活性化因子（フィブリノキナーゼ、外因性プラスミノゲン活性化因子、t-PA又はTPAとしても知られる）は糖タンパク質であり、また約70,0

10

20

30

40

50

00ダルトン(68,000ダルトン)のおおよその分子量(MW)を有する。プロ酵素プラスミノーゲンの活性化酵素プラスミンへの1つのアルギニン/バリン結合の加水分解による酵素的な変換を触媒するのはセリンプロテアーゼである。t-PAの触媒部位はアミノ酸His-322、Asp-371及びSer-478から構成される。t-PAは、フィブリン不在下では不良なプラスミノーゲン活性化因子である。アミノ末端領域は幾つかのドメインから構成され、これらのドメインは他のタンパク質に相同である。これらの異なるドメインは酵素の幾つかの機能に関係して、フィブリンへの結合、フィブリン特異性プラスミノーゲン活性化、内皮細胞受容体への結合及び生体内での迅速なクリアランスが含まれる。アミノ酸残基を50~87個含むこのようなドメインの1つ(EDドメイン)はヒト上皮増殖因子に相同であり、またフィブリン結合、フィブリン親和性及び生体内でのクリアランスに関与していると考えられる。t-PA cDNAをクローニングし、続いてチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞で発現させた。

【0009】

組織プラスミノーゲン活性化因子(t-PA)は、フィブリン塊に関係したプラスミノーゲンの特異的活性化に関与する哺乳動物の線維素溶解系の成分である(すなわち、血餅を溶解可能である)。組織プラスミノーゲン活性化因子が仲介する血餅溶解では、血漿中でのフィブリノペプチドAのレベルの上昇が見られ、この上昇が血餅に結合したトロンビンの直接的なマーカーである(Weitz, Leslie et al. 1998)。組織プラスミノーゲン活性化因子と現在知られている抗トロンピン剤(ヘパリン、ヒルジニス(hirudin)との組み合わせを薬物療法で使用することが多いが、この抗トロンピン剤は遊離のトロンピンにしか作用せず、血餅に結合したトロンピンは、ヘパリン及び他の阻害薬に対してその低親和性から耐性である。加えて、これらの薬剤は、更なるトロンピン産生の間接的な促進因子に影響しない(例えば、第V因子、第VII因子)。このため、プラスミノーゲンを活性化し、それと同時に血餅に結合したトロンピン及びトロンピンの間接的な促進因子(第V因子、第VII因子等)を阻害する新規なキメラタンパク質を設計する必要がある。

【0010】

血栓溶解後のプラスミン活性及びその結果としてのトロンピン産生についての研究は、病理学的な血餅が血栓溶解剤で除去された場合であっても凝固経路の再活性化につながる強力な因子があることをはっきりと示唆している。加えて、産生されたトロンピンは、それ自体が強力な凝固経路活性化因子である。トロンピンが抗凝固機能も果たすことは注目に値し、血管系全体を通して凝固が「暴走する」ことのない止血系の「自己制限的」制御機構の見事な例である。遊離のトロンピンは、細胞表面タンパク質であるトロンボモジュリンと1:1の高親和性の非共有結合複合体を形成する(Kurosawa, Galvin et al. 1987)。トロンピン/トロンボモジュリン複合体が一旦形成されると、その基質特異性の凝血原モードから抗凝固モードへの方向転換が行われて、タンパク質C抗凝固経路が活性化される。このため、トロンピンだけでタンパク質Cを活性化できるが、トロンピンが一旦トロンボモジュリンと複合体を形成すると、タンパク質C活性化が約1000倍加速される(Esmon and Owen 1981; Owen and Esmon 1981)。

【0011】

成熟したトロンボモジュリンは、異なる機能、すなわちトロンピン阻害及びタンパク質C活性化を担う異なるドメインを含有し、これらのドメインは、この大きなタンパク質の上皮増殖因子様ドメイン内に存在する。上皮増殖因子様(EGF)ドメイン5、6は主にトロンピン親和性に関与し、EGF4、5、6ドメインは共にタンパク質Cを活性化する(Kurosawa, Stearns et al. 1988; Stearns, Kurosawa et al. 1989)。トロンボモジュリン又はその単離したEGFドメイン4、5、6は、タンパク質Cを中心とした抗凝固経路を活性化し、またトロンピンの活性を直接阻害すると知られており、ただしそれ自体はフィブリン塊を溶解させることができない。このため、血栓溶解剤が必要となる。どちらのタイプの薬剤も、互いに独立し

10

20

30

40

50

て、心血栓症に使用することができる。しかしながら、両方のタイプの特質を備えた1つの薬剤（これはこれまで発表されたことがない）の利点は明らかである。

【0012】

用語「止血」とは、血液/血管系における抗凝固活性と凝固促進活性とのバランスのことであり、通常、血液成分、特に血小板は、血管の内壁と異常な相互作用を起こさない。損傷又は疾患状態では血小板が付着傾向を示し、その結果、血液凝固因子が蓄積し始め、この損傷部位で活性化され、損傷部位で修復を開始させるための応答ではあるものの、これが血管の閉塞をもたらす、この結果、血栓形成の危機を促進することが多い。

【0013】

血管内部での血液凝固及び血餅の溶解は両方共、正常な止血にとって必要な生理学的過程である。血管内部での血餅の形成及び溶解の機構は文献で周知であり、異なる凝固促進タンパク質（凝固促進）及び抗凝固タンパク質の役割も現在、十分に研究されている。血餅の形成は一連の複雑な反応の結果であり、反応においてはトロンビンがその開始及び凝固カスケードの加速において中心的な役割を果たしており、最終的に安定したフィブリンの網目構造が出現する。

【0014】

全ての最新の血栓溶解/線維素溶解療法において通常、抗血栓薬（アスピリン、ヘパリン等）も組み合わせ、これは血餅溶解中の凝固促進剤と抗凝固剤との間での正常な平衡を維持するのに必要である。血餅溶解中、一時的に放出されるトロンビンは自己産生ループを開始させて血餅の成長を増幅する。これは血餅の再形成へと平衡をシフトさせてしまう又は凝血源/血餅形成促進因子を活性化してしまう場合がある。

【0015】

血栓溶解剤は、循環器系において内因性プラスミノゲンを活性化させることによって病理学的な血餅を溶解させる。入手可能且つ治療的に有用な血栓溶解剤の中でも、ストレプトキナーゼは最も高い血栓溶解能を示すが、血餅特異性がないことから、薬物療法中の出血につながる場合もある。この問題は、他の血栓溶解剤（tPA及びSAK）には比較的關係がない。これはこれらの血栓溶解剤のフィブリン塊特異性が比較的高いからであるが、これらの血栓溶解剤の他の短所は低い線維素溶解能及び生体内での短い半減期である。全ての血栓溶解剤は本質的に同じ血栓溶解機構（プラスミノゲン活性化）を有するが、同じ問題も共有しており、血栓溶解後、産生されたトロンビンが、血液凝固第Va因子及び第VIIa因子によって制御されるフィードバック機構によりトロンビン産生を更に増幅する場合がある。血栓溶解工程において、血餅に結合したトロンビンも循環中に放出され、このトロンビンは元々生体が有する抗トロンビン物質及び他の外部から供給されたトロンビン阻害剤に比較耐性がある。「元々の」損傷の近辺に存在している、この血餅に結合したトロンビンもまた、血餅/損傷部位の近辺でのより多くのトロンビンの産生を、特に血餅の不完全な除去の後に支援し、これが臨床的に重篤な早期再開塞問題につながる。

【0016】

血餅溶解中のトロンビン産生及び他の内因性の凝血源の活性化は、止血の平衡の正常な一過程である。ヘパリン、ヒルジン及び化学合成薬等の抗トロンビン剤はトロンビンを阻害し且つその続く一時的な作用（血小板形成工程の応答性亢進の抑制、フィブリノゲンからフィブリンへの変換及び血液における凝固性亢進を惹起する他の血栓形成促進活性の阻害等）を防止することができる。しかしながら、とりわけ、これらの直接的な阻害薬は全て、一時的に産生されたトロンビンに作用するものであり、トロンビンの産生を実際に加速させ且つ凝固促進経路において重要な役割を果たす因子には作用しない。このため、これらの薬剤はどれも血液凝固第V因子及び第VII因子（トロンビン産生及び早期再開塞において極めて重要な役割を果たす）に望ましい有効性でもって作用はしない。

【0017】

トロンビンと1:1の複合体を形成し、また凝固促進機能を強力な抗凝固物質、すなわちタンパク質C活性化因子に向ける周知の細胞表面分子トロンボモジュリン。活性化され

10

20

30

40

50

たタンパク質Cとタンパク質Sの両方が、活性化された第V因子及び第VII因子を分解する(Esmon 1989)。

【0018】

利用できる全ての血栓溶解剤が血餅溶解能を有し、またその機構は文献で明らかになっているにも関わらず、血餅溶解中、血餅及びプラスミンの残遺物はトロンビンの産生につながる。同時に、これらの薬剤は血餅の溶解中に一時的に出現するトロンビンを不活性化しないため、血栓溶解療法後に再閉塞が起きると同じ問題を抱えることになる。これまで、再血栓症に大きく関与している「真犯人」を不活性化するために血栓溶解特性及び抗トロンピン特性、特に凝固促進活性を合わせ持った抗トロンピン剤はできていない。

【発明の概要】

【0019】

本発明は、プラスミノーゲンの活性化が可能であることとは別に、トロンピン産生阻害能も示す改善された血栓溶解剤の設計に関する。同じ分子におけるこれらの2つの特性の存在は、血栓溶解療法後の早期再閉塞問題を最小限に抑えるのに役立つことから、潜在的に臨床的に極めて有益である。本発明は戦略的に設計されたキメラポリペプチドを開示するものであり、トロンボモジュリン由来の抗トロンピン特性を有するドメイン/セグメントを様々な血栓溶解タンパク質に融合させているため、得られる融合/キメラポリペプチドは、血餅溶解(血栓溶解)及び抗トロンピン特性を同時に示す。これらの新規な融合構築物は、血栓溶解系をプラスミン及び/又はトロンピンに依存した形で活性化する能力を有する(このことが構築物を血餅特異性にする。これはフィブリン塊がプラスミン及びトロンピンを多く含有し、遊離のプラスミン及びトロンピンが循環においては短命であり、
- 2抗プラスミン、抗トロンピン等のセルピンによって速やかに不活性化されるからである)。同時に、これらの構築物は血餅溶解中に放出される一時的に産出されるトロンピンも阻害し、また脳卒中、心筋梗塞、深部静脈血栓症等の血栓疾患の事象時のこれらの薬剤での薬物療法中に、生体が持つ(内因性の)抗凝固性のタンパク質C経路も開始させる。

【0020】

現行の血栓溶解剤とは異なり、本発明は、凝固カスケードの第Va及びVIIa因子を標的とし(プラスミン依存性血栓溶解経路活性化能に加えて)、また内因性の生体が有する抗凝固タンパク質C経路も標的とすることができる新規な血栓溶解構築物を開示するものであり、同じ薬剤の分子中に幾つかの所望の能力が共存することで、その全体的な有効性が向上し、本発明の血栓溶解構築物は、命を危険にさらす可能性が最も高い血栓溶解後の事象の1つ、すなわち凝固過程の再発を最小限に抑えながら病理学的な血餅を溶解させることができる。

【0021】

抗トロンピン特性及び血栓溶解特性の両方を備えた融合タンパク質を設計し、試験し、その形成を検証するアプローチをとる。EGF4、5、6を血栓溶解分子にうまく「機能的に」融合させることで、潜在的に、前者が本来有しているトロンピン親和性から後者の標的をトロンピン高含有血餅とすることができる。同時に、この融合により、2つの元々「独立した」親生物学的活性(すなわち、抗トロンピン及びプラスミノーゲン活性化因子活性)の保持とは別に、プロドラッグ的性質が全身的にではなく血餅近辺で優先的に活性化されるハイブリッド分子に付与されるのならば、これもまた、その標的とする作用の性質により極めて有用且つ有利な特徴となる。

【0022】

本発明においては、現行の血栓溶解剤の有効性を大きく改善し、また血栓症再発現象の防止を支援するために、同じ分子内への効果的な組み込みによって、血栓溶解特性、トロンピン阻害及びタンパク質C活性化能を合わせ持つ幾つかのハイブリッドタンパク質分子の官能化に成功した。同じ薬剤/分子内にこれらの特性を全て組み込んだことによって、様々な血栓を原因とした病理学的症候群において、閉塞を起こしているフィブリン血塊でリアルタイム(一時的な)及び空間的(インシチュでの)の両方で有益な作用が得られる

10

20

30

40

50

からである。

【 0 0 2 3 】

本発明においては、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子及びスタフィロキナーゼをEGF 4、5、6と融合させることによって、プラスミン依存性血栓溶解系及びトロンピン介在タンパク質C抗凝固経路を開始させる特性の両方を有するキメラ分子を創り出した。更に、本発明の一部の実施形態においては、これまで報告されたことのない、血栓溶解、血餅特異性及び抗トロンピン活性をうまく統合することも成し遂げた。

【 0 0 2 4 】

異なる融合構築物において、血栓溶解剤とEGFドメインとの融合接合部(junction)をリンカー中の様々な好ましいアミノ酸残基を使用して慎重に設計し、異なるトロンピン及び/又はプラスミン切断可能部位を導入し、キメラからのEGF 4、5、6のタンパク質分解による放出に起因するインビトロでの異なる時間依存性プラスミノゲン活性化動力学及びその結果としての血栓溶解成分の活性化が得られた。血栓溶解剤とEGF 4、5、6との接合部での異なるトロンピン切断可能部位の存在により、これらの2つを互いに、局所的に存在する酵素(トロンピン又はプラスミン)によりトロンピン高含有血餅の近辺で分離することが可能になる。このため、切断後、各ドメインはその機能を独立して果たす。更に、一部の融合構築物においては、トランスグルタミナーゼを認識可能な架橋配列を、キメラポリペプチドにおける戦略的な位置で導入しているため、活性化されたドメインは血餅の残遺物に、上皮組織内外(そもそもこの上皮細胞の損傷が血餅の発生につながった)で、血液トランスグルタミナーゼ(transglutaminase)の作用により共有結合し、これによって最初の血餅が溶解した後も長い間、プラスミノゲン活性化及びトロンピン阻害の両方の観点から局所的に作用し続ける。このことが薬剤の「治癒」効果につながるのは明らかであり、現在使用されているどの血栓溶解タンパク質製剤でも得られない特性である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 5 】

【 図 1 】異なるインフレイム遺伝子融合構築物の概略図であり、トロンボモジュリンのEGF 4、5、6ドメインはストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子又はスタフィロキナーゼをコードしているDNAに、三重グリシン(GGG)、ハイブリッドタンパク質と他の組織又はフィブリン塊との凝固第XIII因子触媒共有結合架橋を促進するトランスグルタミナーゼ認識シグナル(TG)、トロンピン切断可能配列(TCS)を有するものを含めたドメイン間リンカーをコードしているインフレイム融合配列と共に融合する。

【 図 1 A 】概略設計図であり、AはSK(ストレプトキナーゼ)のN末端でのEGF 4、5、6融合をコードしているDNA配列を表す。

【 図 1 B 】概略設計図であり、Bは柔軟性促進残基(例えば、三重グリシン列GGG)を含有する適切なリンカーを介したSKのC末端でのEGF 4、5、6融合を表す。

【 図 1 C 】概略設計図であり、Cはトランスグルタミナーゼ認識部位/残基列を伴ったSKのN及びC末端での同時のEGF融合を表す。

【 図 1 D 】概略設計図であり、DはEGF 4、5、6ドメインのSKのC末端での融合を表し、SKの5個のアミノ酸が欠失している。

【 図 1 E 】概略設計図であり、EはSKのN及びC末端でのEGF 4、5、6の同時融合を表し、トロンピン認識及び切断可能配列(TCS)がEGF及びSKの接合部に存在している。

【 図 1 F 】概略設計図であり、FはSKのN及びC末端でのEGF 4、5、6の同時融合を表し、トロンピン認識配列はEGF及びSKの接合部に存在し、トランスグルタミナーゼ認識配列はEGFの最初の部分(N末端)に存在する。

【 図 1 G 】概略設計図であり、GはSKの 及び ドメインの接合部でのEGFドメインの融合を表す。

【 図 1 H 】概略設計図であり、HはSKの 及び ドメインの接合部で示されるようなE

10

20

30

40

50

G F ドメインの融合を表す。

【図 1 I】概略設計図であり、I は t P A (組織プラスミノゲン活性化因子) の N 及び C 末端での同時の E G F ドメイン融合を表す。全ての図及び明細書中でそのような用語が出現する場所において、「e g f」とは t P A の E G F 様ドメインのことであり、「E G F 4 5 6」とはトロンボモジュリンの E G F 4、5、6 ドメインのことである。

【図 1 J】概略設計図であり、J は t P A の C 末端での E G F 4、5、6 ドメイン融合を表す。

【図 1 K】概略設計図であり、K は t P A の N 末端での E G F 4、5、6 ドメイン融合を表す。

【図 1 L】概略設計図であり、L は t P A (組織プラスミノゲン活性化因子) の N 及び C の両方の末端での E G F 4、5、6 ドメインの融合を表し、t P A の内因性 e g f は欠失している。

10

【図 1 M】概略設計図であり、M は t P A の N 末端での E G F 4、5、6 融合を表し、t P A の内因性 e g f は欠失している。

【図 1 N】概略設計図であり、N は t P A の N 末端での E G F 4、5、6 融合を表し、t P A の内因性 e g f 及びクリングル 1 は欠失している。

【図 1 O】概略設計図であり、O は t P A の C 末端での E G F 融合を表し、t P A の内因性 e g f は欠失している。

【図 1 P】概略設計図であり、P は t P A の C 末端での E G F ドメイン 4、5、6 融合を表し、t P A の内因性 e g f 及びクリングル 1 は欠失している。

20

【図 1 Q】概略設計図であり、Q は t P A との E G F 4、5、6 ドメイン融合を表し、t P A の内因性 e g f は E G F 4、5、6 ドメインに置き換えられる。

【図 1 R】概略設計図であり、R は t P A との E G F 融合を表し、t P A の内因性 e g f 及びクリングル 1 は E G F 4、5、6 ドメインに置き換えられる。

【図 1 S】概略設計図であり、S は S A K の C 末端での E G F ドメインの融合を表す。

【図 1 T】概略設計図であり、T は S A K の N 末端での E G F ドメインの融合を表す。

【図 2】異なる融合構築物の調製に使用する P C R 法及びクローニングスキームの概略図である。

【図 2 A】概略設計図であり、N__E G F__S K 融合遺伝子ブロックの構築に使用する P C R、制限酵素消化及びクローニング戦略を示す。

30

【図 2 B】概略設計図であり、S K__E G F 融合遺伝子ブロックの形成に使用する P C R、制限酵素消化及びクローニング戦略を示す。

【図 2 C】概略設計図であり、N__E G F__S K__E G F 融合遺伝子ブロックの形成に使用する制限酵素消化及びクローニング戦略を示す。

【図 2 D】概略設計図であり、ドメイン間 S K__E G F (S K の 及び ドメイン間に融合した E G F 4、5、6) 融合遺伝子ブロックの形成に使用する P C R、制限酵素消化及びクローニング戦略を示す。

【図 2 E】概略設計図であり、ドメイン間 S K__E G F (すなわち、S K の 及び ドメイン間に融合した E G F 4、5、6) 融合遺伝子ブロックの形成に使用する P C R、制限酵素消化及びクローニング戦略を示す。

40

【図 2 F】概略設計図であり、t P A 遺伝子ブロックの形成に使用する P C R、制限酵素消化及びクローニング戦略を示す。

【図 2 G】概略設計図であり、N__E G F__t P A 及び t P A__E G F 融合遺伝子ブロックの形成に使用する制限酵素消化及びクローニング戦略を示す。

【図 2 H】概略設計図であり、t P A__E G F 融合遺伝子ブロックの形成に使用する P C R、制限酵素消化及びクローニング戦略を示し、t P A の内因性 e g f 及びクリングル 1 ドメインは選択的に欠失している。

【図 2 I】概略設計図であり、N__E G F__t P A 融合遺伝子ブロックの形成に使用する P C R、制限酵素消化及びクローニング戦略を示し、t P A の内因性 e g f 及びクリングル 1 ドメインは欠失している。

50

【図2J】概略設計図であり、t P A _ E G F融合遺伝子ブロックの形成に使用するP C R、制限酵素消化及びクローニング戦略を示し、t P Aの内因性e g fドメインはE G F 4、5、6ドメインに置き換えられる。

【図2K】概略設計図であり、t P A _ E G F融合遺伝子ブロックの形成に使用するP C R、制限酵素消化及びクローニング戦略を示し、t P Aの内因性e g f及びクリングル1ドメインはE G F 4、5、6ドメインに置き換えられる。

【図3】プラスミノゲン活性化(吸光度405nm)の分光光度走査は、N末端融合E G F 4、5、6及びS K構築物による遅延したプラスミノゲン活性化及び微量のプラスミンの存在下でのラグの減少を示す(詳細については、「実施例で用いた一般的な方法」を参照のこと)。未変性のS Kはプラスミノゲン活性化において著しいラグを示さないことに留意すること。

10

【図4】表記したような異なる融合構築物及びコントロールの量を変化させる(60~180nm)ことによる増加トロンビン凝固時間アッセイを表す。

【図5】表記したような異なるS K及びE G F融合構築物並びに適切なコントロールの存在下でのタンパク質C活性化プロファイル(詳細については、「一般的な方法」を参照のこと)。

【図6】表記したような異なるt P A融合構築物(等モル、2nm)及びコントロールでの凝固時間アッセイ。

【図7】表記したような様々なt P A融合構築物及びコントロールでの可溶性フィブリンの存在及び不在下でのプラスミノゲン活性化。

20

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明は、現在入手可能な形態(すなわち、組織プラスミノゲン活性化因子、S K、S A K、これらの誘導体/改良形)よりはっきりとした機能的利点を示す新規な血栓溶解融合ポリペプチドの設計及び調製に関する。現行の形態はプラスミノゲン活性化を通じてフィブリン塊を溶解させるだけで、本質的にトロンビン産生による血栓溶解療法中の早期再開塞問題につながる血栓溶解後の結果を防止することができないからである。

【0027】

本発明は、プラスミノゲンを活性化するだけではなくトロンビンを直接阻害し、またトロンビンが介在する抗凝固経路を通じたタンパク質C活性化の能力を保持する能力を保持する、トロンボモジュリンのE G F 4、5、6番ドメインと融合させた直接及び間接的なプラスミノゲン活性化因子で融合構築物を形成する方法を開示する。

30

【0028】

タンパク質のアミノ酸配列に関係した用語「バリエーション(variant)」、「相同体(homolog)」、「誘導体(derivative)」、「フラグメント(fragment)」又は「類似体(analog)」には、得られるタンパク質又は(ポリ)ペプチドが無修飾のタンパク質の活性と同等の活性を有する限り、配列からの又は配列への1つ(又は1つ以上)のアミノ酸の置換、変更、修飾、置き換え、欠失又は付加が含まれる。特に、用語「相同体」には、構造及び/又は機能についての相同性が含まれる。配列相同性に関しては、無修飾のタンパク質の配列に対して好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より一層好ましくは少なくとも85%の相同性がある。好ましくは、無修飾のタンパク質の配列に対して少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%の相同性がある。

40

【0029】

典型的には、本発明のバリエーション、相同体、誘導体、フラグメント又は類似体に関して、行い得るアミノ酸置換のタイプは、アミノ酸配列の疎水性/親水性を維持すべきである。アミノ酸置換は、修飾された配列が本発明に従って作用する能力を保持する限り、例えば1、2又は3~10、20又は30の置換から行われ得る。アミノ酸置換には、例えば治療を目的として投与するポリペプチドの血漿中半減期を延ばすために非天然の類似体を使用することが含まれ得る。

50

【0030】

保存的な置換は、例えば以下のように行われ得る。同じ行にあるアミノ酸を互いに置換し得る。

脂肪族、非極性：G A P I L V

極性、無荷電：C S T M N Q

極性、荷電：D E K R 芳香族 H F W Y

【0031】

上述したように、本発明のタンパク質は典型的には、例えば本明細書に記載するような組み換え手法及び/又は固相合成等の当業者に周知の合成手法を利用して行われる。

【0032】

本明細書において、「欠失 (deletion)」とは、1つ以上のヌクレオチド又はアミノ酸残基がそれぞれ不在である、ヌクレオチド又はアミノ酸配列における変更として定義される。

【0033】

本明細書において、「挿入 (insertion)」又は「付加 (addition)」とは、天然のタンパク質と比較して、1つ以上のヌクレオチド又はアミノ酸残基それぞれの追加に至ったヌクレオチド又はアミノ酸配列における変更である。

【0034】

本明細書において、「置換 (substitution)」は、異なるヌクレオチド又はアミノ酸それぞれによる1つ以上のヌクレオチド又はアミノ酸の置き換えによって起きる。

【0035】

本明細書において、用語「4、5及び6上皮増殖因子様ドメイン」又は「EGF 4、5、6」はトロンボモジュリンのEGF 4、5又は6ドメインのいずれにもなり得て、あるいはペプチド又はペプチドフラグメントとして共に共有結合したトロンボモジュリンの3つのEGF 4、5及び6ドメインの全てのことになり得る。4、5及び6上皮増殖因子様ドメインはそれぞれ、上皮増殖因子 (EGF) タンパク質の1つ以上のドメインに対する相同性を有する。

【0036】

本発明は、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子、スタフィロキナーゼ、ウロキナーゼ並びにこれらの誘導体及び類似体から成る群から選択される血栓溶解タンパク質に融合させたトロンボモジュリンの4、5、6上皮増殖因子様ドメイン (EGF 4、5、6) を含むキメラタンパク質構築物を開示するものである。

【0037】

本発明の実施形態においてキメラタンパク質構築物を開示し、トロンボモジュリン EGF 4、5、6ドメインは、血栓溶解タンパク質又はその誘導体若しくは類似体に血栓溶解タンパク質又はその誘導体若しくは類似体のN末端、C末端又はN末端及びC末端の両方で融合している。

【0038】

本発明は、血栓溶解タンパク質のN末端をコードしている部分で血栓溶解タンパク質 (SK、tPA又はSAK) と融合した、EGFの最小限で必須の抗血栓部を有する遺伝子構築物の設計も開示するものであり、翻訳 (得られる「キメラ」ORFにおいて) はEGFの4番ドメインで始まり、血栓溶解ポリペプチド合成をコードしている部位が続く。このため、成熟したポリペプチド又はフォールドされたタンパク質は2種類の異なるタイプのタンパク質を含有するだけでなく両方の機能性も有する。血栓溶解タンパク質とのこれらの構築物をEGF N末端融合構築物と称する。

【0039】

別の実施形態において、まず翻訳が血栓溶解タンパク質で開始され、EGFの6番ドメインで終了するように関連する部位 (血栓溶解剤 - EGF 4、5、6) をコードするオリゴヌクレオチドブロックを融合させ、次にオリゴヌクレオチドハイブリッドブロックを発

10

20

30

40

50

現系で発現させ、ハイブリッドを精製し、プラスミノゲン活性化及びトロンピン阻害等について試験することによる、血栓溶解タンパク質のC末端側で融合したEGFドメインの設計原理及び構築方法を定義した。ここで、翻訳されたポリペプチドは機能的に活性な血栓溶解タンパク質から開始し、またEGFドメインをC末端に有するため、抗トロンピン及びタンパク質C活性化能も有する。機能性ポリペプチドの調製につながる設計も開示されており、キメラポリペプチドは最初は不活性だが、そのプラスミノゲン活性化能を、プラスミン又はトロンピンでのタンパク質分解切断時に獲得する。

【0040】

本発明の別の実施形態において、1つ以上のアミノ酸置換、挿入、欠失又は切断を有するストレプトキナーゼを含む血栓溶解タンパク質を開示し、構築物は、プラスミノゲン活性化、トロンピン阻害及び抗凝固タンパク質C経路活性化活性を有する。

10

【0041】

別の実施形態はN及びC末端融合構築物の作製方法を含み、血栓溶解タンパク質は、血栓溶解タンパク質のN及びC末端に3個のEGFドメインを同時に含有する。これらの構築物は、共通の制限部位を介して接合されたN末端及びC末端EGF4、5、6融合構築物を有するオリゴヌクレオチドブロックの発現並びに定評のある遺伝子クローニング法等を用いたその発現の支援により設計された。

【0042】

更に別の実施形態において、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子等の血栓溶解剤内にEGFドメインを有するタンパク質内融合の設計を開示する。

20

【0043】

別の実施形態において、ハイブリッド/融合構築物は、EGF4、5、6ドメインがtPAのクリングル1ドメインにとってかわった組織プラスミノゲン活性化因子を有した。この構築物は良好なプラスミノゲン活性及び抗トロンピン特性を示した。

【0044】

別の実施形態は、EGF4、5、6のメチオニンをバリン、アラニン又はグルタミンアミノ酸残基に、上のセクションで記載の血栓溶解剤(SK、tPA、SAK)とのN末端、C末端及びN&C末端(同時)融合構築物において、定評のある部位特異的変異誘発法により置き換えたEGFドメインの酸化耐性形態を開示する。

【0045】

本発明の更に別の実施形態において、ストレプトキナーゼのアルファとベータ又はベータとガンマドメインの間、あるいはストレプトキナーゼ誘導体又は類似体のアルファとベータ又はベータとガンマドメインの間で融合したトロンボモジュリンEGF4、5、6ドメインを開示し、ストレプトキナーゼ誘導体又は類似体は1つ以上の変異、付加、挿入又は切断を含み、構築物はプラスミノゲンを活性化し、トロンピンを阻害し、抗凝固タンパク質C経路を活性化する。

30

【0046】

本発明の別の実施形態において、EGF4、5、6ドメインがインフレイムでストレプトキナーゼ又はストレプトキナーゼ誘導体若しくは類似体に、ストレプトキナーゼN末端、ストレプトキナーゼC末端、N及びCの両方のストレプトキナーゼ末端又はストレプトキナーゼのドメイン間位置(inter-domain position)から選択される1つ以上の位置で融合する構築物を開示する。

40

【0047】

本発明の更に別の実施形態において、ストレプトキナーゼ誘導体が残基5~383又は5~414に及びキメラタンパク質構築物を開示する。

【0048】

本発明の更なる実施形態において、ストレプトキナーゼ誘導体が残基16~383に及びキメラタンパク質構築物を開示する。

【0049】

本発明の更に別の実施形態において、EGF4、5、6ドメインがインフレイムでスト

50

レプトキナーゼN末端、ストレプトキナーゼC末端又はN及びCの両方のストレプトキナーゼ末端から選択される1つ以上の位置で融合するキメラタンパク質構築物を開示し、EGF4、5、6ドメインのMet41はバリン、アラニン又はグルタミンに置き換えられる、あるいはC末端Met435はバリン、アラニン又はグルタミンに置き換えられ、あるいは同時N及びC末端融合構築物(simultaneous N- and C-terminal fusion construct)において、Met41及びMet435は独立してバリン、アラニン又はグルタミンに置き換えられる。

【0050】

本発明の別の実施形態において、トランスグルタミナーゼ認識配列を更に含むキメラタンパク質構築物を開示する。

10

【0051】

本発明の更なる実施形態において、EGF4、5、6ドメインと血栓溶解タンパク質又はその誘導体若しくは類似体との接合部に1つ以上のトロンピン切断可能配列を更に含むキメラタンパク質構築物を開示する。

【0052】

別の実施形態において、ハイブリッド/融合構築物は、EGF4、5、6とその酸化耐性形態との接合部にトロンピン切断可能部位を含む。

【0053】

別の実施形態において、EGF4、5、6ドメイン含有ハイブリッド/融合構築物は、メチオニン酸化及びその結果としてのその調製中の活性の喪失による酸化耐性を有するように変異させられる。

20

【0054】

本発明の別の実施形態において、組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)誘導体、類似体又はフラグメントにtPA誘導体、類似体又はフラグメントのN末端で、tPA誘導体、類似体又はフラグメントのC末端で、tPA誘導体、類似体又はフラグメントの両方の末端で、あるいはtPA誘導体、類似体又はフラグメント内で内的に融合したトロンボモジュリンのEGF4、5、6ドメインを含むキメラタンパク質構築物を開示する。

【0055】

本発明の更に別の実施形態において、EGF4、5、6ドメインとtPA誘導体、類似体又はフラグメントとの融合が1つ以上のリンカーフラグメントを更に含むキメラタンパク質構築物を開示する。

30

【0056】

本発明の更なる実施形態において、1つ以上のリンカーフラグメントが、構築物の柔軟性(flexibility)を促進する1つ以上のアミノ酸を含むキメラタンパク質構築物を開示する。

【0057】

本発明の更に別の実施形態において、1つ以上のアミノ酸が、Gly、Asn、Pro、Ser、Gln、Arg及びLysから成る群から選択されるキメラタンパク質構築物を開示する。

【0058】

本発明の別の実施形態において、tPA誘導体、類似体又はフラグメントが1つ以上の変異、付加、挿入又は切断を含むキメラタンパク質構築物を開示し、tPA誘導体、類似体又はフラグメントはプラスミノゲンを活性化し、トロンピンを阻害し、抗凝固タンパク質Cを活性化する。

40

【0059】

本発明の更に別の実施形態において、1つ以上のトロンボモジュリンEGF4、5、6ドメインに融合した組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)のフラグメント又はその切断若しくは修飾形態を含み、tPAのEGFドメインが1つ以上のトロンボモジュリンEGF4、5、6ドメインに置き換えられるキメラタンパク質構築物を開示し、構築物は抗トロンピン及びプラスミノゲン活性化の両方の活性を有する。

50

【 0 0 6 0 】

本発明の更なる実施形態において、1つ以上のトロンプモジュリンEGF4、5、6ドメインに融合した組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)のフラグメント又はその切断若しくは修飾形態を含み、tPAのクリングル1及びEGFドメインが1つ以上のトロンプモジュリンEGF4、5、6ドメインに置き換えられるキメラタンパク質構築物を開示し、構築物は抗トロンプ及びプラスミノゲン活性化の両方の活性を有する。

【 0 0 6 1 】

本発明の更に別の実施形態において、tPA EGFドメイン及びクリングル1ドメインが1つ以上のトロンプモジュリンEGF4、5、6ドメインにtPAフラグメントのN末端又はC末端で置き換えられるキメラタンパク質構築物を開示する。

10

【 0 0 6 2 】

本発明の別の実施形態において、tPAフラグメント又はその切断若しくは修飾形態とトロンプモジュリンEGF4、5、6ドメインとの間に1つ以上のリンカーフラグメントを更に含むキメラタンパク質構築物を開示し、リンカーフラグメントは、構築物がトロンプ阻害、タンパク質C活性化及びプラスミノゲン活性化能を有するように構築物の柔軟性を促進するアミノ酸残基を含む。

【 0 0 6 3 】

本発明の更に別の実施形態において、EGF4、5、6成分のメチオニン41がアラニン、バリン又はグルタミンに置き換えられるキメラタンパク質構築物を開示する。

【 0 0 6 4 】

本発明の更なる実施形態において、スタフィロキナーゼ(SAK)のN末端又はC末端にインフレームで融合したトロンプモジュリンのEGF4、5、6ドメインを含むキメラタンパク質構築物を開示する。

20

【 0 0 6 5 】

本発明の更に別の実施形態において、トロンプモジュリンEGF4、5、6ドメインのメチオニン41がアラニン、バリン又はグルタミンに置き換えられるキメラタンパク質構築物を開示する。

【 0 0 6 6 】

本発明の別の実施形態において、SAKとEGF4、5、6ドメイン領域との間にトロンプ切断可能配列を更に含むキメラタンパク質構築物を開示する。

30

【 0 0 6 7 】

本発明の更に別の実施形態において、トランスグルタミナーゼ架橋配列を更に含むキメラタンパク質構築物を開示する。

【 0 0 6 8 】

本発明の別の実施形態において、水溶液又は生理食塩水に可溶性のキメラタンパク質構築物を開示する。

【 0 0 6 9 】

本発明において、別の実施形態において、組み換えキメラタンパク質を、厳格に調節されたプロモーターの制御下、プラスミドにより発現させる。

【 0 0 7 0 】

本発明の実施形態において、様々なキメラ構築物を、組み換えDNA技術を通じて細菌、真菌、酵母又は動物細胞等の適切な宿主において発現させた。

40

【 0 0 7 1 】

本発明の別の実施形態において、細胞外媒体に分泌されるキメラタンパク質構築物を開示する。

【 0 0 7 2 】

別の実施形態において、組織プラスミノゲン活性化因子及びEGF4、5、6融合構築物を、原核生物及び真核生物宿主において発現させ、そこからポリペプチドを収穫して活性ハイブリッド構築物を純粋な形態で得た。

【 0 0 7 3 】

50

別の実施形態において、EGFとの様々な組織プラスミノゲン活性化因子融合構築物を、発現カセットが宿主ゲノムに組み入れられた又は細胞質中にエピソードとして留まる動物細胞株、酵母発現系及び植物細胞等の真核生物系においても発現させた。発現させたハイブリッドタンパク質は、発現に使用した宿主に応じてグリコシル化又は非グリコシル化になり得る。

【0074】

本発明の別の実施形態において、哺乳動物における血栓症の治療方法を開示し、この方法は治療を必要とする哺乳動物に治療有効量のキメラタンパク質構築物を投与することを含む。

【0075】

本発明の別の実施形態において、トロンビンの阻害方法を開示し、この方法はキメラタンパク質構築物の使用を含む。

【0076】

本発明の更なる実施形態において、タンパク質Cの活性化方法を開示し、この方法はキメラタンパク質構築物の使用を含む。

【0077】

本発明の更に別の実施形態において、抗トロンピン及びプラスミノゲン活性化の両方をもたらす方法を開示し、この方法はキメラタンパク質構築物の使用を含む。

【0078】

本発明の別の実施形態において、薬学的有効量のキメラタンパク質構築物を含む医薬製剤を開示する。

【0079】

本発明の別の実施形態において、哺乳動物における血栓溶解方法を開示し、この方法はそれを必要とする哺乳動物に治療有効量のキメラタンパク質構築物を投与することを含む。

【0080】

別の実施形態において、ハイブリッド構築物のコード化DNA配列は適切な発現宿主に合わせ最適化された。

【0081】

別の実施形態において、上記のキメラタンパク質構築物をコードしている核酸配列。

【0082】

別の実施形態において、核酸配列を含むベクター。

【0083】

別の実施形態において、ベクターを含む宿主細胞。

【0084】

別の実施形態において、キメラタンパク質構築物を、宿主細胞発現系におけるタンパク質をコードしている核酸配列の発現により調製する。

【0085】

別の実施形態において、宿主細胞発現系におけるタンパク質をコードしている核酸配列の発現によるキメラタンパク質構築物の調製方法。

【0086】

別の実施形態において、宿主細胞発現系が真核生物発現系である方法。

【0087】

別の実施形態において、宿主細胞発現系が細菌発現系である方法。

【0088】

別の実施形態において、細菌が大腸菌である方法。

【0089】

別の実施形態において、真核生物発現系が動物細胞又は酵母細胞である方法。

【0090】

別の実施形態において、酵母がピスチア・パストリス (*Pischia pastor*)

10

20

30

40

50

i s) である方法。

【 0 0 9 1 】

別の実施形態において、キメラタンパク質構築物が宿主細胞から細胞外媒体に分泌される方法。

【 0 0 9 2 】

別の実施形態において、精製した構築物は、様々な血栓状態を有する哺乳動物を治療するための治療薬として及び医薬組成物において有用である。哺乳動物は、ヒト、げっ歯類又は家畜になり得る。

【 0 0 9 3 】

別の実施形態において、精製した構築物を、追加の安定剤及び賦形剤と共に又は伴うことなく、様々な循環器疾患を緩和するための治療薬として使用した。

10

【 0 0 9 4 】

本発明の別の実施形態において、精製した構築物を1種以上の医薬組成物に製剤する。1種であれ複数であれ、精製した構築物を含有する医薬組成物を、固体の形態(すなわち、バイアル内で凍結乾燥させて、後に適切な溶液中で再構成する)又は液体の形態の両方に製剤することができる。

【 0 0 9 5 】

1つの特定の実施形態において、精製した構築物を含有するこれらの組成物は血栓溶解療法又は治療用のキットを構成し、このキットは任意で他の構成要素、例えば有効成分の再構成用の溶液の入った容器、カニューレ、静脈内投与のための生理学的血清の入った点滴バッグ、使用説明書等を含み得る。

20

【 0 0 9 6 】

薬学的組み合わせを、組み合わせた形態(すなわち、全ての有効成分を組み合わせる1つの製剤とする)又は個々の形態(すなわち、有効成分を組み合わせる1つの製剤にしない(又は全て組み合わせない))で、経口投与用の錠剤、カプセル、エリキシル製剤、直腸内投与用の座薬、注射による投与用の滅菌溶液、懸濁液等として製剤し、また使用し得る。用量及び投与方法を最適な有効性が得られるように調整し得るが、患者の体重、食事、並行して受けている薬物療法等の要因及び医療技術者ならわかるその他の要因に左右される。

30

【 0 0 9 7 】

一般に、本発明の精製した構築物に関し(使用、方法、医薬組成物及び製品を含む)、使用する精製した構築物の効力に応じて、0.1~1000mgの量を投与する(必要に応じて1回の量として又は複数回の投与で)。

【 0 0 9 8 】

好ましい実施形態には、本明細書に記載されるような治療有効量の精製構築物又は精製構築物の濃縮組成物を薬学的許容可能な担体又は希釈剤中に含む、保管及びそれに続く投与のために調製した医薬組成物が含まれる。治療用の許容可能な担体又は希釈剤は製薬分野で周知であり、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)に記載されている。

40

【 0 0 9 9 】

保存料、安定剤、着色料、更には着香料をこの医薬組成物に配合し得る。例えば、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸及びp-ヒドロキシ安息香酸のエステルを保存料として添加し得る。加えて、酸化防止剤及び懸濁剤を使用し得る。

【 0 1 0 0 】

精製構築物又はその医薬組成物若しくは製品を併用療法においてインビボで使用するためにあたって、組成物/製品を哺乳動物に様々なやり方で投与することができ、非経口的投与(例えば、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、結腸内投与、直腸内投与、経鼻投与、頬側投与、経皮投与、腔内投与、腹腔内投与)が含まれ、多種多様な剤形を用いる。

【 0 1 0 1 】

50

当業者には極めて明白なように、有用な生体内投与量及び特定の投与方法は治療対象である哺乳動物の種、使用する特定の組成物及びこれらの組成物の具体的な用途に応じて変化する。有効投与レベル、すなわち所望の成果を得るのに必要な投与レベルの決定は当業者の領域内にある。典型的には、組成物の投与を低投与レベルで開始し、所望の効果が得られるまで投与レベルを上昇させる。

【 0 1 0 2 】

一般に、本発明の方法を行うにあたって、精製構築物又は医薬組成物の投与量は所望の効果及び治療適応に応じて大きく変化し得る。典型的には、精製構築物の適切な投与量は約 0 . 1 ~ 1 0 0 0 m g、好ましくは約 1 0 ~ 5 0 0 m g、より好ましくは約 1 0 ~ 1 5 0 m g、最も好ましくは約 1 0 ~ 1 2 0 m g である。投与は好ましくは非経口、例えば静脈内投与である。また、投与は好ましくは必要に応じて単回投与又は複数回投与である。投与は好ましくは非経口、例えば静脈内投与である。また、投与は好ましくは必要に応じて単回投与又は複数回投与である。

10

【 0 1 0 3 】

注射剤を、溶液若しくは懸濁液、注射前は溶液若しくは懸濁液に適した固体の形態又はエマルションの慣用の形態に調製することができる。適切な賦形剤は、例えば水 / 生理食塩水、デキストロース、マンニトール、ラクトース、レシチン、アルブミン、グルタミン酸ナトリウム、システイン塩酸塩等である。加えて、望ましいならば、注射可能な医薬組成物は少量の非毒性の補助物質（潤滑剤、pH緩衝剤等）等を含み得る。望ましいならば、吸収強化製剤（例えば、リポソーム）を利用し得る。

20

【 0 1 0 4 】

非経口投与の場合、本発明に従って使用するゴマ油、ピーナツ油又は水性プロピレングリコール中の薬学的に活性な剤の溶液を利用し得る。水溶液は必要に応じて適切に緩衝剤で処理され得て（好ましくはpH 4 ~ 9）、希釈液がまず等張性にした。例えばNIFをpH約7の水溶液で使用する。しかしながら、NIFはもっと低いpH約4の水溶液で安定である。好ましい「パートナー化合物（partner compound）」、t-PA（又はそのバリエーション）は一般にpH約5の水溶液で使用する。これらの水溶液は静脈内注射の目的に適している。油性溶液は関節内、筋肉内及び皮下注射の目的に適している。これらの溶液全ての滅菌条件下での調製は、当業者に周知の標準的な製薬技法で容易に成し遂げられる。

30

【 0 1 0 5 】

本発明の医薬組成物及び製品を、当業者に周知の方法を利用して、再構成及びその後の投与の前の保管のために凍結乾燥し得ることに留意すべきである。凍結乾燥されようと別の形で保管されようと、本発明の組み合わせの有効成分を凍結乾燥前又は再構成後に（後の同時投与のために）混合し得る、あるいは（後に同時に、別々に又は連続して投与するために）個別に保管し得る。

【 0 1 0 6 】

1つの特定の実施形態において、投与は、例えば静脈注射による又は血餅の近辺においてインシチュで投与するためのカテーテル留置での局所投与による非経口投与である。

【 0 1 0 7 】

本発明で提供する薬学的組み合わせの組成物に存在し得る精製構築物の量は広い範囲で変化し得るが、常に治療有効量である。

40

【 0 1 0 8 】

本発明の薬学的組み合わせの組成物を使用した各血栓溶解治療プロトコルの投与量は、各ケースにおける患者の年齢、病状、治療対象である臨床症状の重症度、投与する精製構築物の投与経路、投与頻度を含めた数多くの要因に左右される。

【 0 1 0 9 】

一態様において、本発明は、既に説明したように、血栓溶解療法用の本発明の薬学的組み合わせ又はキットに関する。

【 0 1 1 0 】

50

別の追加の態様において、本発明は治療及び血栓溶解療法の方法にも関係し、患者に治療有効量の1つ以上の精製構築物を投与することから成る。この関係で、本発明の組成物は、発病において炎症反応、組織の虚血、血栓症による血液レオロジー及び血管微小循環の障害が起きる虚血性心疾患、その合併症、虚血性脳卒中、リウマチ様疾患及び他の病態の治療に特に適格である。

【0111】

本発明は、6つのアミノ酸を含むリンカー配列を有するトロンボモジュリンのEGF4、5、6ドメインとの組織プラスミノゲン活性化因子の融合構築物を開示する。このリンカー配列の長さ及びアミノ酸配列順序を、両方の特性の機能を更に最適化するために変更又は調節することができる。最初に設計したリンカー配列のない構築物をリンカーを設計した構築物と比較したところ、最適化したリンカーを含有する異なる構築物におけるタンパク質C活性のごくわずかに約20~25%しか示さなかった。

10

【0112】

別の実施形態において、本発明は、非天然の融合タンパク質コード化遺伝子ブロック及びそのバリエーションの標準的な遺伝子工学法による作製を開示する。

【0113】

更に、タンパク質C結合及び活性化において重要な役割を果たすEGFの4番ドメインに必要な柔軟性を付与するために、タンパク質間融合リンカー配列は優先的に3個以上のグリシンアミノ酸残基をEGF4、5、6ドメインのプラスミノゲン活性化因子成分との接合部位に含有した。同様に、リンカーを、トロンピン結合が促進されるようにと、tPAのN末端領域で融合させる場合にEGFの6番ドメインのすぐ後に置いた。これはEGF4、5、6を組織プラスミノゲン活性化因子の秩序だった構造/ドメイン間に導入する場合に特にあてはまった。このため、リンカーの役割は、2つのパートナーを融合させて両方のパートナータンパク質の機能性を維持しようとする場合に明らかであった。

20

【0114】

リンカー配列は、1つの正に帯電したアミノ酸(リジン又はアルギニン)がVal残基とタンデムとなるが2又は3個のグリシン残基の前に置かれるように選択されるため、溶解中に一時的にトロンピンが形成される可能性が極めて高い血餅の近辺でプラスミンにより切断することができ、両方のドメインは損傷部位において独立してその役割を果たすことができる。

30

【0115】

リンカーは1つのプロリンアミノ酸も含有し、このアミノ酸は実際にEGF4、5、6ドメインがトロンピン及び活性化タンパク質Cに結合しながら最適に作用することができるようにEGF4、5、6ドメインの方向を変更するのに役立つ。

【0116】

別の実施形態において、設計された構築物リンカー長さを延長又は短縮することができ、またアミノ酸の配列を天然及び非天然のアミノ酸で変更することによって活性化速度を変更することができる。

【0117】

別の実施形態において、トロンピン切断可能配列、トランスグルタミナーゼ認識配列及び他の血液プロテアーゼ感受性部位を、線維素溶解及び抗血栓機能に影響を与えることなくリンカーに導入することができる。

40

【0118】

別の実施形態において、本発明は、様々な融合ポリペプチド及びそのより良好なバリエーションの発現及び精製方法を開示する。

【0119】

別の実施形態において、本発明は、血栓溶解剤の特性と抗トロンピン及びタンパク質C抗凝固特性を合わせ持つ様々な非天然のポリペプチドを開示する。

【0120】

別の実施形態において、EGF4、5、6の酸化耐性形態を、未変性のtPAと比較し

50

て変異による変化を有する組織プラスミノゲン活性化因子の機能的に改善されたバリエーションに融合させた（例えば、DNA SEQ ID 20）。

【0121】

別の実施形態において、EGF 4、5、6の酸化耐性形態をストレプトキナーゼのプラスミン耐性形態に融合させた。

【0122】

別の実施形態において、EGF 4、5、6の酸化耐性形態を1つ以上のシステイン残基が遊離の血栓溶解タンパク質に融合させた。

【0123】

別の実施形態において、発現した融合ポリペプチドを心血管疾患の治療に使用する。

10

【0124】

別の実施形態において、適切な医薬組成物は、FDAが認可した化学的安定剤、例えばマンニトール、ヒト血清アルブミン(HSA)等及び可溶化剤等と共に発現した融合ポリペプチドを有する。

【0125】

ヒトに静脈内投与するための発現した融合構築物製剤はFDAが認可した安定剤を含有し得る。

【0126】

別の実施形態において、EGF 4、5、6及びそのバリエーションを、ウロキナーゼタイプのプラスミノゲン活性化因子と融合することができる。

20

【0127】

別の実施形態において、異なるEGF融合構築物を、SK、tPA及びSAKと75~100%の相同性を示し、また未変性のタンパク質と比較して50~100%のプラスミノゲン活性化能を示すタンパク質で作製することができる。

【0128】

別の実施形態において、EGF 4、5、6バリエーションが独立して発現させた未変性のEGF 4、5、6ドメインと比較して75~100%の相同性/類似性並びに50~100%の抗トロンピン及びタンパク質C活性を示す、SK、tPA及びSAKと融合させたEGF 4、5、6のバリエーション。

【0129】

30

試薬

遺伝子構築物：

EGF 4、5、6ドメイン配列は、酵母ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)における最適な発現のために商業的にカスタム合成(GeneScript Inc、米国)されたヒトトロンボモジュリンcDNAのものであった。合成遺伝子セグメントを正しい順序でライゲーションし、細菌プラスミドでクローニングした。一方のトロンボモジュリンのEGF 4、5、6ドメインと血栓溶解剤(例えば、SAK、SK又はtPA(又はこれらの誘導体/変異体))との融合構築物を本質的に、(a)化学的手法を用いたカスタム遺伝子合成と、(b)適切なプラスミドから特異的に設計したプライマーを使用して選択された遺伝子セグメントを得るための定評のあるPCR技術の使用(以下の実施例で用いた方法を参照のこと)とを組み合わせ、続いてPCRで得られた遺伝子セグメントブロックを単離し、これらをオーバーラップエクステンションPCR等の特殊なPCR法を用いてインフレームで「融合」することによって行った。一般に、通常のPCRは、適切な高処理能力の熱安定性DNAポリメラーゼ(*Fermentas Inc*、又は*Stratagene Inc*のPfu DNAポリメラーゼ)又は高フィデリティpfuターボ(*Stratagene Inc*)酵素を使用して行われた。ハイブリッドDNA構築物を、タンパク質の同時発現のないルーチンのプラスミドサブクローニングのための適切な大腸菌株XL-Blue及びT7 RNA Polプロモーター下でのタンパク質発現のための株BL21(DE3)株(*Novagen Inc*、マディソン、WI、米国から調達)への形質変換によりT7 RNAポリメラーゼプロモーター

40

50

をベースとした発現ベクター pET23-d においてクローニング/発現させ、またベクター pPIC-9K にインフレーション 交配因子シグナル配列を有するメタノール誘導性プロモーター下で酵母 (ピチア・パストリス) において発現させ、GS115 細胞を発現に使用した (Invitrogen Life Technologies、カリフォルニア、米国)。様々な制限エンドヌクレアーゼ、T4 DNA リガーゼ及び他の DNA 修飾酵素を New England Biolabs (ビバリー、MA) から入手した。オリゴヌクレオチドプライマーは、Biobasic, Inc. (カナダ) から入手した。DNA の精製及び PCR 増幅産物のアガロースゲルからの抽出を、Qiagen GmbH (ドイツ) から入手可能なキットを使用して行った。蛍光色素を使用した自動 DNA シーケンシングを、16本のキャピラリの Applied Biosystems 3130 x1 ジェネティックアナライザで行った。Glu- プラスミノゲンは Roche Diagnostics GmbH (ペンツベルク、ドイツ) から購入するか、アフィニティクロマトグラフィによりヒト血漿から精製した (Deutsch and Mertz、1970)。ヒトタンパク質 C、トロンピン、ヒルジンは Calbiochem (米国) から購入し、ウサギの標準トロンボモジュリン及び組み換えトロンボモジュリンを両方共、American Diagnostica Inc. (米国) から購入した。N 末端気相アミノ酸シーケンシングを、Applied Biosystems シーケンサーモデル 491 を使用して行った。ウロキナーゼ、EACA、シアノ水素化ホウ素ナトリウム及び L- リジンを Sigma Chemical Co. (セントルイス、米国) から購入した。フェニルアガロース 6XL 及び DEAE セファロース (ファストフロー) を GE - Amer sham (ウプサラ、スウェーデン) から調達し、Ni-NTA ビーズを Qiagen から調達した。他の試薬は全て入手可能な範囲で最高の分析グレードであった。

【0130】

実施例で用いた一般的な方法：

1. 組み換え DNA 融合方法：

まとめて組み換え DNA 技術と称される様々な方法は分子生物学の分野で今や周知である。幾つかの技法、標準的なプロトコル及びこれらの変形は幾つかの参考文献、例えば Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (11th edition, Cold Spring Harbor Press, New York., 1989; McPherson, M. J., Quirke, P., and Taylor, G. R., [Ed.] PCR: A practical approach., IRL Press, Oxford., 1991) に詳しく記載されている。しかしながら、幾つかの変更が融合構築物の設計で必要であり、発行された文献から異なる刊行物を特定の用途に合わせて引用する。本発明において、発明者は 2 個の遺伝子を融合させたが、Hōra (Ho, Hunt et al. 1989) 及び Mehta 及び Singh (Mehta and Singh 1999) のオーバーラップエクステンション PCR として知られる方法に頼った。2 Kb までの小さい構築物の増幅には、pfu DNA ポリメラーゼ (Fermentas Inc., 米国) を使用し、点変異構築用に高フィデリティのポリメラーゼ作用が必要とされるより長い PCR には、pfu ターボ (Stratagene) を長さ 6~7 Kb のフラグメント増幅の増幅及び部位特異的変異誘発に使用した (Wang and Malcolm 1999)。

【0131】

2. 制限酵素切断及びライゲーション：

制限酵素切断及びライゲーション用の酵素は、New England Biolabs (米国) から入手し、Fermentas Inc. の「消化が速い」制限酵素を製造者のプロトコルに従って使用した。ほぼ全てのキメラ融合構築物例について述べるように、ライゲーションは、Xho I (四塩基カッター) 及び Not I (六塩基カッター) で消化されたベクターとインサートとの間で行われ、定方向クローニングの機会を最大にした。

【0132】

3. 大腸菌 X L 1 B コンピテント細胞におけるライゲーション混合物の電気穿孔及び p P I C - 9 K におけるベクター含有直線化インサートの形質転換：

反作用のライゲーション混合物を X L 1 B コンピテント細胞に電気穿孔した (S h a r m a a n d S c h i m k e 1 9 9 6) 。 Q i a g e n の M i d i p r e p キットで指示に従って調製した多量の DNA 。 M i d i 調製の最終ステップにおいて、DNA を高塩分濃度で溶出させ、ここで発明者は pH 5 の 0 . 3 M の酢酸ナトリウムを最終濃度で使用し、70% のエタノールを消化反応を妨害し得る余分な塩の除去に使用した (S a m b r o o k e t a l . , 1 9 8 9) 。この工程により、発明者は 50 ~ 60 μ g の DNA を得て、DNA は B g 1 I I 酵素を使用した直線化ステップに供され、消化後、再度酢酸ナトリウム及びエタノール沈殿ステップに供され、最後に乾燥させたペレットを 7 ~ 8 μ l のオートクレーブした塩非含有水に溶解させ、1 ~ 3 μ g / μ l の DNA が得られた。ここで 7 ~ 10 μ g の DNA をピチア・パストリスの H i s - G S 1 1 5 細胞のエレクトロコンピテント細胞における形質転換に使用し、最後に MD 培地上に蒔き、H i s + 形質転換体だけがプレート上で成長した。プラスミド p P I C - 9 k は、A O X 1 プロモーターを使用した相同組み換えを通じて所望の遺伝子のマルチコピー挿入が可能となるような形で設計される (R a m c h u r a n , M a t e u s e t a l . , 2 0 0 5) 。マルチコピーターゲット遺伝子挿入は、細菌カナマイシン耐性遺伝子 (T n 9 0 3) を介し、抗生物質濃度の上昇に伴うゲンチシン (g e n t i c i n) 耐性個体群をモニタすることによってモニタすることができる。ピチアはそのままゲンチシン耐性 0 . 2 5 m g / m l に耐えるが、0 . 5 m g / m l 及び 4 m g / m l は 1 ~ 2 コピー及び 7 ~ 1 2 コピー挿入をそれぞれ示す。ゲンチシン耐性は所望の遺伝子の複数挿入と直接の相関関係にある。遺伝子量効果により、所望の遺伝子産物の分泌量の多さはより多い挿入数に対応すると推論することができる (N o r d e n , A g e m a r k e t a l . 2 0 1 1) 。

【0133】

4. 融合構築物の封入体の発現、単離及びリフォールディング

E G F - S A K 、 S A K - E G F 等の一部の構築物を、p E T 2 3 - d 下で発現させ、キメラタンパク質は宿主である大腸菌 B L 2 1 - D E 3 細胞において封入体の形態で蓄積した。封入体が形成された場合は、最大量の過剰発現タンパク質が得られた (M i s a w a a n d K u m a g a i 1 9 9 9 ; Z h a n g , X u e t a l . 2 0 0 9) 。大腸菌 B L 2 1 D E 3 細胞をキメラ融合タンパク質の封入体の産生に使用し、一晚増殖させた B L 2 1 D E 3 細胞培養物からの 2 5 m l の L B (ルリアベルターニ) を一次接種材料として使用し、500 m l の L B (二次培養物) 培地に移した。O D₆₀₀ が一旦 0 . 6 ~ 0 . 8 に達したら、タンパク質生成を 1 m M の I P T_G の助けを借りて誘導した。誘導後、細胞を振盪条件下で 6 時間にわたって 400 rpm で維持した。6 時間のインキュベーション後、細胞を 6000 rpm での 10 分間にわたる 4000 rpm での遠心分離により収穫した。最後に、収穫した細胞を 50 m M の t r i s 、 100 m M の N a C l 及び 1 m M の E D T A 溶液で洗浄して細胞塊から培地成分を除去した。洗浄後、細胞を最終 O D₆₀₀ 3.5 ~ 4.0 まで洗浄液に懸濁させた。この希釈で、細胞をプローブタイプのソニケーターでの超音波処理に供し、30 秒のオン/オフサイクルを 45 分間にわたって行った。溶解サイクルの完了後、細胞ペレットを 12,000 rpm での 15 分間にわたる遠心分離により収穫した。得られたペレットを 2 回、100 m M の N a C l 、 50 m M の T r i s C l (p H 7 . 4) 、 1 m M の E D T A 、 0 . 1 % の T r i t o n X - 100 及び 2 M の尿素含有溶液で洗浄した。再度、これらの封入体を溶液に再懸濁させ、12000 rpm での 15 分間にわたる遠心分離により収穫した。収穫したペレットを 2 回、100 m M の N a C l 、 50 m M の T r i s C l (p H 7 . 4) 及び 1 m M の E D T A 溶液で洗浄すると、T r i t o n X - 100 が除去された。最後に、ペレットを 8 M の尿素 (20 m M の T r i s C l 中で調製、p H 7 . 4) 及び 1 m M の D T T に 2 時間にわたって再懸濁させた。この溶液中の溶解した封入体の殆どが、12000 rpm での 20 分間にわたる

遠視分離によりペレットから分離し、最終的な上清は最大量のキメラ融合タンパク質を含有していた。ここで、このタンパク質画分をリフォールディングのために供し、最高0.2 mg/mlまで希釈し、以下の条件下でリフォールドした：50 mMのNaCl、50 mMのTris-Cl、2%のグリセロール中の2 Mの尿素、酸化/還元グルタチオンモル比1.5:0.5、ごく軽く攪拌しながら4で36時間。このリフォールディングステップの完了後、混合物を20 mMのTris-Cl (pH 7.6) 及び50 mMの尿素に対して48時間にわたって透析し、透析した反応混合物を疎水及びイオン交換クロマトグラフィを用いたタンデムクロマトグラフィによる精製に供した。ジスルフィド結合形成を、ジスルフィド結合形成及びリフォールディングの直接的な指標であるDTNB反応によりモニタした (Riener, Kada et al., 2002)。最後に、精製した

10

【0134】

5. プラスミノゲン活性化検出のためのカゼイン/プラスミノゲンオーバーレイ：
融合構築物においては、予備レベルにおいて、プラスミノゲン活性化をこの方法でスクリーニングし、5% (w/v) のスキムミルクを15 mMのNaCl及び50 mMのTrisを1%のアガロースと共に含有している水中で沸騰させる。冷却後、約200~400 µgのプラスミノゲンをこの混合物に添加し、スクリーニング対象であるコロニー/クローンの入ったLBアンピシリン含有プレートにオーバーレイした (Malke and Ferretti, 1984)。プラスミノゲン活性化能を有する全ての融合組み換えタンパク質は、1~2時間から最高18時間にわたるインキュベーション後、カゼインを分解し、白色の背景に対して見えやすいクリアランス領域を生じさせるプラスミンの生成に起因する加水分解領域から容易に検出された。

20

【0135】

6. プラスミノゲン活性化プロファイルをチェックすることによる最良のプロデュースクローンのスクリーニング：
ゲンチシン耐性マーカーを使用してより多いコピー数を含有する形質転換体を選択した後、最良のプロデュースクローンの実際のスクリーニングに供した。この方法では、一次培養物は2.5 mlのBMGY培地 (1%酵母抽出物、2%ペプトン、1Xグリセロール、1Xアミノ酸非含有酵母ニトロゲンベース及び100 mMリン酸カリウム緩衝液 pH 5.5) において、30で16~18時間にわたって培養した。一旦光学密度 (OD₆₀₀) が最高3~4単位に達したら、7.5 mlのBMMY培地 (1%酵母抽出物、2%ペプトン、1Xメタノール、1Xアミノ酸非含有酵母ニトロゲンベース及び100 mMリン酸カリウム緩衝液 pH 5.5) を添加することによって培養物を誘導した。これらの培養物を、組み換え産物の産生のために最終の0.5 v/v%メタノールで5日間にわたって更に誘導すると、組み換え融合タンパク質が強力なメタノール誘導性プロモーターの影響下で産生された。

30

【0136】

7. 酵素電気泳動：
プラスミノゲン活性化能を有する細胞外分泌産物及び関心の対象である所望のバンドはこの方法により検出され、10~12.5% SDS-pageゲルを非還元サンプルバッファー中で行った。完了後、余分なドデシル硫酸ナトリウムを2.5%のTriton X-100溶液中での洗浄により除去した。次に、このゲルを2~3回、50 mMのTris (pH 7.4) ですすいだ。この洗浄したゲルをスキムミルクアガロース及びプラスミノゲン含有固形物面 (寒天ゲル) 上に置いた。5~7時間にわたるインキュベーション後、加水分解領域が広がって目に見えるようになり、分解されたタンパク質におけるプラスミノゲン活性化能を表している。

40

【0137】

8. ウェスタンブロット技法：
所望のタンパク質の検出は、ウェスタンブロット法の助けを借りて行われた。ピチア・パストリス細胞からの細胞外媒体に分泌された全ての融合構築物を6000 rpmでの遠

50

心分離により分離し、上清を所望の産物の同定のために取り出した。上清をウェスタンブロット法のためにそのまま直接取り出した。あるいはまず5 K D a又は10 K D aのカットオフ範囲のコンセントレーター (A m i c o n) で濃縮した。あるいは、トリクロ酢酸沈殿に供し、アセトンで洗浄し、10 ~ 12 . 5 % S D S ポリアクリルアミドゲル上に置いた。タンパク質を、25 mMのトリス、175 mMのグリシン及び20 %のメタノールを含有する転写バッファの助けを借りてニトロセルロース膜上で転写した。膜上でのゲルブロッティングを250 mAで35分間にわたって行った。ブロットした膜を10 %のスキムミルクで一晩、4 で浸漬させ、あるいは37 で2時間にわたってインキュベートした。このブロットを更に0 . 1 %のT w e e n - 20を含有するリン酸緩衝食塩水で3回洗浄し、これにより余分なスキムミルクが除去された。その後、ブロットを一次抗体又はポリセラ (p o l y s e r a) に推奨される希釈で1時間にわたって浸し、T w e e n - 20含有P B Sで3回洗浄した。更に、このブロットをH R Pコンジュゲート二次抗体でインキュベートし、続いてP B S洗浄を3回行った。最後に、ブロットをD A B (ジアミノベンジジン) 溶液の添加により現像した。

【0138】

9 . リジン / アガロースクロマトグラフィ :

E G F 4、5、6との様々な組織プラスミノゲン活性化因子融合構築物は、リジン残基への親和性で知られるクリングドメインを含有する (M c C a n c e , M e n h a r t e t a l . 1994 ; Y e , R a h m a n e t a l . 2001) 。この方法においては、組織プラスミノゲン活性化因子融合ポリペプチドを有する、ピチア・パストリス発酵から得られた上清をリン酸緩衝液 (p H 7 . 5) に対して3 ~ 4時間にわたって透析し、リン酸緩衝液で事前に平衡化したリジン / セファロースカラム (A m e r s h a m B i o s c i e n c e s、ウプサラ、スウェーデンから購入) に約0 . 5 ml / 分のゆっくりとした流速で装填した。装填完了後、カラムを再度4 ~ 5ベッド体積のリン酸緩衝液で洗浄すると、最終的にタンパク質が0 . 3 Mの - アミノカブロン酸及び100 mMのN a C l 溶液に溶出された (Q i u , S w a r t z e t a l . 1998) 。

【0139】

10 . トロンピンアフィニティクロマトグラフィ :

トロンピンカップリングを、上述の手順により臭化シアン活性化ビーズで行った (S a l e m , M a r u y a m a e t a l . 1984) 。ここで、異なる精製ステップで得られたタンパク質を最終的に、カラムが50 mMのT r i s C l (p H 7 . 4) で平衡化されたトロンピンアフィニティに供し、約0 . 5 ml / 分のゆっくりとした流速での装填に使用した50 mMのT r i s C l (p H 7 . 4) に対して透析した。装填完了後、カラムを同じ緩衝液で洗浄した。最後に、N a C l の勾配を上昇させることによってタンパク質を溶出させた (S a l e m , M a r u y a m a e t a l . 1984) 。次に、異なるタンパク質画分をタンパク質C活性化能について試験した。

【0140】

11 . 疎水性相互作用クロマトグラフィ :

E G F - S K、E G F - t P A及びE G F - S A Kの異なる融合遺伝子構築物の精製を異なるクロマトグラフィ法で行い、疎水及びイオン交換クロマトグラフィを異なる融合ポリペプチドの頻回の精製に用いた (G o y a l , S a h o o e t a l . 2007) 。疎水クロマトグラフィにおいては、平均粒径100 ~ 300 μ M直径のフェニルセファロース (A m e r s h a m B i o s c i e n c e s、ウプサラ、スウェーデン) 6 % 架橋ビーズをカラムの準備に使用した。単純なX K 16 / 20カラム (A m e r s h a m B i o s c i e n c e s、ウプサラ、スウェーデン) を蠕動ポンプの助けを借りてパックし、約25 mlのフェニルセファロースベッドを形成し、4 ~ 5ベッド体積の0 . 3 MのN a C l 及び50 mMのT r i sで平衡化し、ピチア・パストリス発酵中に得られた、所望の融合構築物を含有する隣接する上清を平衡化緩衝液と同じ緩衝強度及び塩の組成物に透析により維持した。平衡化された上清をパックされたカラムに流速40 ml / 時間で装填し、上清の装填完了後、4 ~ 5ベッド体積の平衡化緩衝液を通して培地成分及び非特異的

10

20

30

40

50

に結合した不純物を除去すると、最終的に所望の融合ポリペプチドが水に溶出した。溶出したタンパク質を2回目の精製に供し(以下を参照のこと)、プラスミノゲン活性化及びトロンピン阻害及びタンパク質C活性化アッセイについて試験した。

【0141】

12. DEAE (ジエチルアミノエチル) イオン交換クロマトグラフィ:

このクロマトグラフィ手順においては、DEAEセファロース(登録商標)ファストフローをXK16/20カラム(Amersham Biosciences、ウプサラ、スウェーデン)にパックし、概して、製造者の説明書に従い、殆どの場合、20mlの膨潤マトリックスをパッキングに使用した。このカラムを20mMのTris Cl緩衝液(pH7.4)で平衡化し、ピチア・パストリスから得られた上清を、20mMのTris Cl緩衝液(pH7.4)に対して十分に透析した後、平衡化したカラムに装填し(別々に実行)、あるいは疎水性相互作用クロマトグラフィによる精製後(上記)、またそのイオン強度を平衡化緩衝液と同じに維持したまま、それぞれのカラムに装填した。装填完了後、各カラムを4~5ベッド体積の平衡化緩衝液で洗浄し、この洗浄は非特異的に又は緩く結合した不純物及びポリペプチドの除去に役立つ。タンパク質の溶出を、1MのNaClの上昇勾配を5ベッド体積のマトリックスにかけて行った。タンパク質量子化(quantization)をブラッドフォード法の助けを借りて行い(Bradford 1976)、BSAの標準曲線と比較した。最後に、精製したタンパク質を20KDaのカットオフ値のコンセントレーター(Amicon)で濃縮し、様々な分析及び機能アッセイに使用した。

【0142】

13. EFG - 血栓溶解性融合構築物のプラスミノゲン活性化アッセイ:

全てのキメラ融合ポリペプチド構築物は血栓溶解成分(SK、SAK、tPA)を含有した為、これらの構築物のプラスミノゲン活性化能をプラスミン用の発色性ペプチド基質からの色素の放出によって測定した。ストレプトキナーゼ及び全ての融合構築物の一段階アッセイを2µMのヒトプラスミノゲン、50mMのTris、0.05%のBSA及び5mMの発色基質を使用する条件下で行い、発色基質の放出を時間の関数として分光光度的にモニタする。次に非線形回帰を行い、吸光度と時間²との間のプロットは直線方程式に従った。ストレプトキナーゼは速やかにプラスミノゲンのプラスミンへの変換を開始し、また事実上、活性化における遅延を示さないが、一部の融合構築物の場合、プラスミノゲンをプラスミンに活性化するのに長い時間がかかる。これはプラスミノゲンのプラスミンへの酵素前駆体活性化(経路I)がアクティブではなく、微量のプラスミンが活性複合体を形成することを示した。このことは、微量(ナノモル)の外部プラスミンの段階的な添加によりラグタイムが段階的に短くなった時、確認された。組織プラスミノゲン活性化因子によるプラスミノゲン活性化の場合は、迅速且つ単純な分光光度法に従い、単純な発色ペプチド(H-D-Val-Leu-Lys-pNA、S-2251、Chromogenix Inc. から購入)を、組織プラスミノゲン活性化因子の作用によって形成されるプラスミンの検出に使用した(Verheijen, Mullaret al. 1982)。この方法を、フィブリン及び組織プラスミノゲン活性化の存在下での強化されたプラスミノゲン活性化の検証にも用いた(van Zonneveld, Veerman et al. 1986)。この活性化アッセイにおいては、2µMのプラスミノゲン、0.05MのTris Cl(pH7.2)、100mMのNaCl、0.05%及び0.5mMのS-2251とインキュベートした異なる精製量のタンパク質を可溶性フィブリン(American Diagnostics、米国から購入)の存在下及び不在下及びフィブリンなしで使用した。1分の間隔で最高2時間にわたって405でモニタした吸光度。

【0143】

14. 異なる融合構築物での凝固時間実験:

異なるキメラ構築物の存在下でのトロンピン誘導血餅形成への作用を観察するために、異なるトロンピン濃度の標準曲線を作成し、6.6IUのトロンピンでの20秒の凝固時

間を得た。次に、同量のトロンピンを構築物の濃度を上昇させながらインキュベートすることによって凝固時間がコントロールの2倍になる濃度を測定した(Loughheed, Bowman et al. 1995)。

【0144】

15. 異なる融合/キメラ構築物によるタンパク質C活性化:

組織プラスミノーゲン活性化因子、スタフィロキナーゼ及びストレプトキナーゼの異なる融合構築物を用量依存的にトロンピン介在タンパク質C活性化アッセイに供した。このアッセイでは、異なる量のタンパク質(nMレンジ)を10nMのトロンピンと、50mMのTris-Cl、5mMのCaCl₂及び0.05%のBSAの存在下、37°Cで20分間にわたってインキュベートした。その後、0.5µMのタンパク質Cをウェルに添加し、20分間にわたって25°Cでインキュベートした。その後、0.5mMのヒルジンを添加することによってトロンピンを阻害し、インキュベーションを5分間にわたって25°Cで継続し、次に発色基質を0.5mMの最終濃度で添加し、着色されたpNAの放出を405nmで上で詳述したように時間に対してモニタした(Eisenberg, Miletich et al. 1988; Ewald and Eisenberg 1995; Loughheed, Bowman et al. 1995; Meininger, Hunter et al. 1995; Dahlback and Villoutreix 2005)。

【実施例】

【0145】

以下の実施例は本発明を説明するためのものであるため、本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。

【0146】

実施例1

ストレプトキナーゼとEGF4、5、6ドメインとの様々な融合遺伝子の調製:

(i) SKコード化オープンリーディングフレーム(ORF)の上流にインフレームで融合したEGFドメインの発現のためのハイブリッド遺伝子構築物:

EGF-SKタンパク質融合をコードしている二本鎖(ds)DNAブロック(EGF4、5、6コード化配列をインフレームでSK ORFのN末端コード化側に融合させた)を、プライマーN__EGF__SK Fp1及びN__EGF__SK Rp2(プライマーの配列に関しては表1を参照のこと)を使用して構築した。細菌発現ベクターpET23-d__SKの設計及び構築はNihalaniら(1998)により記載されている。構築は、pBR322におけるストレプトコッカス・エキシミリス(*Streptococcus equisimilis*)、H46AからのSK遺伝子のクローニングを伴い(Pratap et al., 1996)、ファージT7主要カプシドタンパク質からの高効率リボソーム結合部位を含有する発現ベクターであるpET-23dへのサブクローニング(Studier and Moffatt, 1986)及び二次構造体形成の傾向を最小限に抑えるための遺伝子の5'端の更なる修飾が続いた。pET23-d__SK構築物から発現したストレプトキナーゼはMet-SKである。更なる詳細は米国特許第7163817号明細書に記載される。この構築物を、SK遺伝子増幅のためのテンプレートとして使用した(DNA SEQ ID 1、対応するタンパク質SEQ ID 112)。

【0147】

EGF4、5、6ドメインに対応する二本鎖ポリヌクレオチドブロック(SEQ ID 2、対応するタンパク質SEQ ID 111)を、テンプレートとして配列ID2に対応する合成遺伝子(DNAポリヌクレオチド)を使用して選択的に増幅し、合成遺伝子はカスタムDNA合成により調製され、pET23-d(Novagen)ベクターにおけるクローニング後、配列ID2に対する自動DNAシーケンシングにより検証された。プライマーN__EGF__SK Fp1はまた(プライマーの詳細については表1を参照のこと)PCR後に得られる遺伝子ブロックを酵母発現プラスミドにドッキングできるよう

にXhoI制限部位をその5'端に含有した。プライマーN__EGF__SK Rp2は5'端に(EGF4、5、6の6番ドメインの端部とハイブリダイズしているヌクレオチドに加えて)配列、またSK遺伝子ORFの5'側とアニールする追加のヌクレオチドを含有した。PCRサイクル条件は以下の通りであった: 95 °Cでの5分間にわたるホットスタート、完全変性、95 °Cでの45秒間にわたる変性、続く45 °Cでの45秒間にわたるアニーリング、72 °Cでの1分間にわたる伸長(全部で28サイクル)及び72 °Cでの10分間にわたる最終伸長による不完全なPCR産物の増幅の完了。SK遺伝子ブロックの増幅に関しては、プライマーN__EGF__SK Fp3(上流)及びプライマーN__EGF__SK__Rp4(下流プライマー)(プライマーの詳細については表1を参照のこと)を使用した。PCR条件は以下の通りであった。PCR条件: 95 °Cでの5分間にわたるホットスタート、完全変性、95 °Cでの45秒間にわたる変性、45 °Cでの45秒間にわたるアニーリング、72 °Cでの3分間にわたる伸長(全部で28サイクル)及び72 °Cでの10分間にわたる最終伸長による不完全なPCR産物の完全増幅。両方のPCR産物をゲル抽出精製キット(Qiagen)によりアガロースゲルからゲル精製した。これらの2つの精製PCR産物をスプライスオーバーラップエクステンション(SOE)PCR(詳細については、上の「実施例で用いた一般的な方法」のセクションを参照のこと)に供することによってEGF4、5、6コード化配列が終止コドンで終了するSK遺伝子コード化配列とインフレイムで融合した隣接EGF4、5、6-SKハイブリッド遺伝子構築物を構築した。この遺伝子ブロックをアガロースゲルから精製された形態で単離し、XhoI及びNotI制限酵素(R.E.酵素)で消化し、同様にカットしたpET23-dプラスミドベクターにライゲーションし(図1A及び図2Aを参照のこと)、次に大腸菌XL1B(recA⁻及びendA⁻)細胞に形質転換させ、この細胞中、ポリペプチドは発現しないが、プラスミドDNAは増殖する。このプラスミドを、正しく融合したEGF&SK成分のDNA配列を検証するためにサンガーのジデオキシシーケンシング法に供した(SEQ ID 4、対応するタンパク質SEQ ID 113)。この構築物において、XhoI及びNotIで消化したカセットをアガロースゲルから単離し、pPIC-9Kに「ドッキング」した。この得られた構築物において、上流EGF4、5、6配列は分泌シグナル配列及びKex2プロセシング部位とインフレイムに置かれ、ハイブリッド遺伝子構築物EG-4、5、6-SKは、ピチア・パストリス(株GS115)においてベクター中に位置するアルコールオキシダーゼプロモーターからその宿主ゲノムへの組み込み後に発現する(Norden, Agemark et al., 2011)。この発現ベクターから発現したハイブリッドポリペプチドは効率的に膜を越えて輸送されもし(以下の実施例を参照のこと)、また純粋な形で単離することができる。

【0148】

(ii) EGF4、5、6コード化ドメインがSKコード化遺伝子の下流/C末端コード化端でインフレイムで融合したSK-EGF4、5、6コード化遺伝子構築物の構築

SK__EGF Fp1(上流)及びSK__EGF Rp2(下流)プライマー(プライマー配列については表1を参照のこと)セットを使用することによって、SKに対応するヌクレオチド配列(DNA SEQ ID 1、対応するタンパク質SEQ ID 114)をpET23-d-SKプラスミドをテンプレートとして使用して増幅した(「実施例で用いた一般的な方法」を参照のこと)。プライマーSK__EGF Fp1はXhoI制限部位をその5'端に含有し、SK__EGF Rp2はその5'端にSK配列を最高1149bpまで含有し、三重グリシン(Gly-Gly-Gly)コード化セグメント及びトランスグルタミナーゼ認識コード化配列が続き、最後にEGF4、5、6の4番ドメインをコードする5'端とオーバーラップする配列で終了している。得られる遺伝子ブロックは同じXhoI制限部位をその5'端を含有し、下流(3'端)は4番ドメインのためのオーバーラップヌクレオチド配列を含有する。第2のPCRにおいて、SK__EGF Fp3及びSK__EGF Rp4(プライマー配列については表1を参照のこと)のプライマーセットを、テンプレートとしてのpET23-d__EGF4、5、6(EGF4、5、6のための合成カスタムメイド遺伝子を含有する)からのEGF4、5、6ドメイ

10

20

30

40

50

ンの増幅に使用した。プライマーSK_EGF_Fp3はSKの下流配列、最高1149bpを含有し、三重グリシンコドンセグメント、トランスグルタミナーゼ認識部位コード化配列がその5'端に向って続いた。もう一方のプライマー、すなわちSK_EGF_Rp4は、その5'端にEGF4、5、6の6番ドメインの端部の部分配列及びNotI制限部位を含有した。PCR後、このプライマーセットを使用して得られた遺伝子ブロック2はその5'端に(SKの上流1149番bp、続いて三重グリシンコード化及びトランスグルタミナーゼ認識コード化配列を含有し、他方、その3'端にNotI制限部位を含有してpET23-dベクターへのクローニングを促進する。PCR条件は以下の通りであった：95 での5分間にわたる完全変性、次に28サイクルの：95 での45秒間、45 での45秒間にわたるプライマーのアニーリング及び72 での1分間、最後に72 での10分間にわたる伸長により部分長PCR産物を完了させる。

10

【0149】

両方のPCRブロック(SKのPCRブロック及び部分オーバーラップ配列を有するEGF4、5、6をコードするPCRブロック)を、Qiagenゲル抽出キットを使用してゲルから精製した。これらの精製PCR産物をスプライスオーバーラップエクステンションPCRに供して隣接SK_GGG_トランスグルタミナーゼ_EGF4、5、6ハイブリッド遺伝子構築物を構築し、最後にSK_EGF_Fp1及びSK_EGF_Rp4(プライマーの配列については表1を参照のこと)「エンド」プライマーセットの助けを借りて増幅した。最終的なPCR産物を次にXhoI及びNotI制限酵素で消化した(図1B及び図2Bを参照のこと)。ゲルからの精製後、最終的な消化及び精製済みのPCRブロックをpET23-d(事前に同様にXhoI及びNotIで消化し、ゲル精製した)にライゲーションした。得られたプラスミドをpET23-d_SK_GGG_TG_EGFと称し、大腸菌XL1B(recA⁻, endA⁻)細胞で増殖させた。このプラスミドをサンガーのジデオキシチエンターミネーション法に供し、また完全クローニングされたインサート配列を検証した(DNA SEQ ID 6、対応するタンパク質SEQ ID 114)。このプラスミド構築物から、XhoI及びNotI酵素を使用して、ハイブリッド遺伝子構築物を単離し、pPIC-9Kにライゲーションし、上流XhoI部位はSK-GGG-TG-EGF4、5、6ブロックの発現プラスミドにおけるハイブリッド遺伝子の上流で分泌シグナル配列へのインフレーションでのドッキングを支援した。このハイブリッド遺伝子構築物をピチア・パストリス(GS115)においてアルコールオキシダーゼプロモーターの制御下、宿主ゲノムへのその組み込み及び機能的スクリーニングによるプラスミノゲン活性化因子陽性クローンの選択後、発現させた。

20

30

【0150】

(iii) EGF4、5、6ドメインのストレプトキナーゼコード化遺伝子セグメントへのインフレーション挿入のためのDNAハイブリッド遺伝子の構築：

ハイブリッド遺伝子構築物を得るための、EGF4、5、6の配列を翻訳的にインフレーションなやり方でSKの配列内に散在させた「ドメイン間SK」-EGF構築物の構築も設計し、次に適切なプライマーを使用して形成した(プライマーの配列については表1を参照のこと)。EGF配列を、ドメイン間フレキシブルセグメント(Wang et al., 1998; Yadav & Sahni, 2009)をコードしているSK遺伝子の領域、すなわち一方でドメインとドメインとの間、あるいは他方でドメインとドメインとの間に挿入した。これを目的として、SKのドメインをコードしているDNAの増幅を最初に行い、プライマーセットID.Fp1及びID.Rp2を使用した(配列の詳細については、表1を参照のこと)。プライマーID.Fp1はXhoI制限部位をその5'端に含有し、他方、プライマーID.Rp2はEGFの4番ドメインのためのオーバーラップ配列をその5'端に含有する。この反応のために、以下のPCR条件を用いた：95 での5分間にわたるホットスタート、完全変性、続く28サイクルの95 での45秒間にわたる変性、45 での45秒間にわたるアニーリング、72 での1.5分間にわたる伸長及び最後に不完全なPCR産物を完成させるための72 での10分間にわたる「伸長セグメント」。EGF4、5、6をコードしているDNAブロッ

40

50

クも別々にプライマーセット I D E G F F p 3 及び I D E G F R p 4 (これらのプライマーの配列については表 1 を参照のこと) を使用して増幅した。このプライマーセットを使用して、E G F 4、5、6 配列をコードしている D N A ブロックを得て、5' 端に向かう上流配列は S K の - ドメインの下流配列と部分的にオーバーラップした。同様に、このブロックの 3' 端は S K - ドメインの上流配列とオーバーラップしている配列を含有した。S K の 及び ドメインの両方をコードしている第 3 の P C R ブロックを、プライマーセット I D F p 5 及び I D R p 6 (これらのプライマーの配列については表 1 を参照のこと) を使用して P C R により得た。この反応に関しては、以下の P C R 条件を用いた: 9 5 での 5 分間にわたるホットスタート、完全変性、続く 9 5 での 4 5 秒間にわたる変性、4 5 での 4 5 秒間にわたるアニーリング、7 2 での 1 . 5 分間にわたる伸長 (全部で 2 8 サイクル) 及び 7 2 での 1 0 分間にわたる最終伸長による不完全な P C R 産物の完全増幅。5' 端が E G F の 6 番ドメインの下流配列と相同となるように I D F p 5 プライマーを設計し、下流プライマー I D R p 6 は終止コドン、それに続く N o t I 制限部位を含有した。3 個の遺伝子ブロック全てをアガロースゲルからゲル精製キット (Q i a g e n) の助けを借りて精製し、ワンポットスプライスオーバーラップエクステンション反応に供して 1 つの隣接遺伝子産物を得て、遺伝子セグメントの順序は以下の通りであった: S K - E G F 4、5、6 - S K - S K 。単純な P C R 反応において 3 個のセグメント全てを 1 : 1 : 1 のモル比で添加し、最初の 1 0 サイクルはプライマーなしで行い、次の 1 8 サイクルをそれぞれ最終濃度 0 . 6 μ M の I D F p 1 及び I D R p 6 を添加して行うことによって 3 フラグメント S O E 中間体を更に増幅した。この反応のために、以下の P C R 条件を用いた: 9 5 での 5 分間にわたるホットスタート、完全変性、それに続く (各サイクルにおいて) 9 5 での 4 5 秒間にわたる変性、4 5 での 4 5 秒間にわたるアニーリング、7 2 での 3 分間にわたる伸長及び 7 2 での 1 0 分間にわたる最終伸長による不完全な P C R 産物の完成。最終 P C R 産物をゲル精製し、X h o I 及び N o t I 制限酵素で消化した (図 1 G 及び図 2 D を参照のこと)。このハイブリッド遺伝子構築物を次に p E T 2 3 - d ベクターにライゲーションし、大腸菌 X L 1 B (r e c A⁻ 及び e n d A⁻) コンピテント細胞に形質転換させ、D N A はタンパク質発現を起こすことなく増殖でき (宿主が必要とするファージコード化 R N A ポリメラーゼを提供しなかった為)、これをいわゆるジデオキシチエンターミネーション法でのサンガーの自動シーケンシングに供した (D N A S E Q I D 3、対応するタンパク質 S E Q I D 1 1 6)。結果によりハイブリッド遺伝子構築物が完全に検証された。その後、ハイブリッド遺伝子カセットを p E T 2 3 - d ドメイン間 S K _ E G F プラスミドから、X h o I 及び N o t I 酵素での消化により単離した。このカセットを次に - 分泌シグナル配列の上流且つインフレームで p P I C - 9 K にライゲーションし、ピチア・パストリス (G S 1 1 5) に形質転換させ、クローニングし、前回のようにプラスミノゲン活性化についての機能性スクリーニングにより選択し、発現は、方法のセクションで詳述しているように、宿主ゲノムにおける組み込み後、メタノール誘導後、ベクターのアルコールオキシダーゼプロモーターの影響下にあった。

【 0 1 5 1 】

(i v) S K 成分が E G F 4、5、6 コード化ドメインによって両側でフランキングされているハイブリッド S K - E G F 遺伝子の構築:

S K コード化配列がインフレームで融合した E G F 4、5、6 ドメインによって両側でフランキングされている別の構築物も、p E T 2 3 - d N _ E G F _ S K プラスミド構築物を取り (上のサブセクション i 及び i i を参照のこと)、これを X h o I 及び A f I I I (p E T 2 3 - d N _ E G F _ S K 構築物に特有の部位) による消化に供することによって構築され、同じ処理を p E T 2 3 - d - S K _ E G F 構築物にも行って、両方の消化産物がアガロースゲル上で分離した。N _ E G F _ S K 構築物から得られた X h o I 及び A f I - I I セグメントを S K _ E G F 消化の大きいほうのフラグメントにライゲーションすると N _ E G F _ S K _ E G F (D N A S E Q I D 7、対応するタンパク質 S E Q I D 1 1 5) が p E T 2 3 - d ベクター中に得られた (図 1 C 及び図 2 C を

10

20

30

40

50

参照のこと)。このプラスミドからの発現カセットをXhoI及びNotI消化により単離し(この構築物は前回のようにまずDNAシーケンシングにより検証される)、EGF-SK-EGFハイブリッドカセットの上流で分泌シグナル配列とインフレームでpPIC-9Kにライゲーションし、前回のように、宿主ゲノムにおける組み込み後、機能的スクリーニング後(以下を参照のこと)、アルコールオキシダーゼプロモーターの制御下、ピチア・パストリスにおいて発現させた。

【0152】

(v) EGF 4、5、6に対応する酸化耐性ポリペプチドセグメントをコードしている配列を含有するN__EGF__SK、SK__EGF及びN__EGF__SK__EGFコード化遺伝子セグメントの構築:

N__EGF__SK、SK__EGF及びN__EGF__SK__EGFポリペプチドにおいて、それぞれEGF 4、5、6ドメインの41番アミノ酸残基又はSK__EGFの434番アミノ酸残基並びにN__EGF__SK__EGFの41番及び434番アミノ酸位置に存在するメチオニン残基は、EGF 4、5、6ドメインの一部として、その酸化傾向で知られており、これらのドメインの抗トロンピン活性、特にタンパク質C活性化機能を妨げる。このため、このことに留意しつつ、様々なSK-EGF融合/遺伝子融合セグメントの設計において、発明者はこのメチオニンをバリン/アラニン/グルタミンアミノ酸残基に遺伝子レベルで置き換えた。この目標は、前回のように、高フィデリティ酵素pfuターボDNAポリメラーゼ(Stratagene)の使用及び適切なプライマーを使用した異なるテンプレートにおける部位特異的変異の導入によって達成された(Wang and Malcolm 1999)。これらの構築物を形成するために、3セットのプライマーを設計し、これらのプライマーがバリン、アラニン又はグルタミンを別々に異なる構築物に遺伝子構築物のEGF 4、5、6ドメイン/セグメントの本来のMet残基の位置に組み込むことを可能にする。プライマーセットを以下のように命名した。

i. M rep V Fp及びM rep V Rp(プライマーの配列については表1を参照のこと)

ii. M rep A Fp及びM rep A Rp(プライマーの配列については表1を参照のこと)

iii. M rep Q Fp及びM rep Q Rp(プライマーの配列については表1を参照のこと)

【0153】

次のステップにおいて、pET23-d__N__EGF__SK及びpET23-d__SK__EGFプラスミドを上記のプライマーセットと共にテンプレートとして使用した。各プライマーセットに関し、PCRサイクルスキームは以下の通りであった: 95 での完全変性、続く95 での45秒間にわたる変性、45 での45秒間にわたるアニーリング、68 での7分間にわたる伸長(28サイクル)及び更に10分間にわたる72 での伸長。この反応で得られた最終PCRブロックをDpnI制限酵素で消化し、この酵素はメチル化DNAを切断し、形質転換後に陽性クローンを得る可能性を上昇させる。このPCR産物を大腸菌XL1-Blue細胞に形質転換させ、アンピシリン含有LB寒天プレート上に蒔き、37 での16~18時間にわたってインキュベートした。幾つかのクローンをランダムに選択し、アンピシリン含有LB培地において7~10mlの培養物に成長させた。プラスミドを単離し、所望の変異の存在を検証するためにシーケンシングした。この手順を採用することによって、メチオニンがバリン、アラニン又はグルタミンアミノ酸に遺伝子レベルで両方の構築物において置き換えられた。これらの構築物を使用して、標準的なサブクローニング手順により、N__EGF__SK__EGF遺伝子におけるバリン、アラニン及びグルタミン変異を形成した。最後に、これらの変異体をpPIC-9Kに移し、その発現を、ピチア・パストリスのGS115株においてチェックした(「実施例で用いた一般的な方法」を参照のこと)。

【0154】

(vi) 5個のアミノ酸を欠失したSKのN末端とのSK__EGF構築物の構築:

この構築物において、最終的な目的はS KのN末端領域での5個のアミノ酸の除去であった。これらの5個のアミノ酸をコードするヌクレオチドを、PCRプライマー S K__E G F F p 1及び S K__E G F R p 2 (これらのプライマーの配列については表1を参照のこと)の助けを借り、p E T 2 3 - d__S K__G G G__T G__E G F (酸化耐性。E G F 4、5、6セグメントのm e t 4 1番をバリンで置き換えた。上記を参照のこと)をテンプレートとして使用して除去した。プライマー S K__E G F F p 1はX h o I制限部位及び16番塩基対から始まるS Kのオーバーラップ配列をその5'端に含有する。S K__E G F R p 2はE G F 4、5、6の6番ドメインの配列及びN o t I部位をその5'端に含有する。PCRサイクルをこの反応に以下のようにして用いた：95

10 での5分間にわたる完全変性、次の28サイクル：95 での45秒間にわたる変性、55 での45秒間にわたるアニーリング、72 での3分間にわたる伸長及び72 での10分間にわたる最終伸長による不完全なPCR産物の完全増幅。最終PCR産物をゲル溶出させ、X h o I及びN o t I酵素で消化し、p E T 2 3 - dベクターにライゲーションし、完全且つ正しいオープンリーディングフレームの検証のためにシーケンシングした。最後に、S K__E G F (図1Dを参照のこと)カセットをp P I C - 9 Kにおいてライゲーションし、上述したような標準化手順でその発現についてチェックした。

【0155】

(vii) 酸化耐性N__E G F__S K及びN__E G F__S K__E G Fコード化遺伝子ブロックの接合部でのトロンピン切断可能部位をコードするDNA配列のインフレーム導入：N__E G F__S Kの発現、精製及びプラスミノゲン活性化の動態解析から(プラスミノゲン活性化が遅れることを証明した)、未変性/無修飾S Kとは異なり、この構築物は直接、ヒトプラスミノゲンを活性化できなかったが、事前に生成されたプラスミンの存在を必要としたことが明らかであった。これによって自動的にこのような構築物における血餅特異的な活性化の利点をもたらされる。これは生体内の血餅はプラスミンを多く含有するが、プラスミンは全身循環においては迅速に不活性化されるからである。同様に、フィブリン塊もトロンピンを多く含有する。このため、発明者は構築物中の適切な部位を変異させて構築物をトロンピン活性化可能にもした。これを行うために、発明者はトロンピン切断可能部位によりE G F及びS Kのドメイン間接合領域を変異させ、この結果、プラスミノゲン活性化におけるトロンピン切断可能活性化スイッチが得られる。このことは漸増的に少量のトロンピンを添加し、(上述した同様のプラスミン富化実験の場合と同様に)、N末端E G F 4、5、6融合S K構築物のプラスミノゲン活性化におけるラグの段階的な減少を観察することによって一段階アッセイでモニタすることができる。第X I因子のトロンピン切断可能配列をE G F及びS K遺伝子構築物の接合部に導入した。これはオーバーラップエクステンションPCRで達成され、オーバーラップ配列及びトロンピン切断可能アミノ酸コード化ヌクレオチドを含有するジャンクションプライマーを使用した。最初のPCR反応において、プライマーN__E G F__T C S F p 1及びN__E G F__T C S R p 2 (これらのプライマーの配列については表1を参照のこと)をE G F 4、5、6ドメインの増幅に使用した。プライマーN__E G F__T C S F p 1はX h o I制限部位及びE G Fの4番ドメインの配列をその5'端に含有し、他方、N__E G F__T C S R p 2はE G Fの6番ドメインの配列、それに続くトロンピン切断可能部位コード化配列及びそれに続くS Kの上流部を含有する。PCR条件は以下の通りであった：95 での5分間にわたる変性、次の28サイクルにおいて95 での45秒間にわたる変性、50 での45秒間にわたるアニーリング、72 での1分間にわたる伸長及び72 での10分間にわたる最終伸長による不完全なPCRフラグメントの完成。この反応によって得られたPCRブロックはX h o I制限部位をその5'端に含有し、トロンピン切断可能コード化ヌクレオチド配列及びS Kのオーバーラップ部を3'端に含有する。次のPCR反応において、T C S__S K F p 3及びS K R p 4 (これらのプライマーの配列については表1を参照のこと)を使用し、上流プライマー(T C S__S K F p 3)は6番ドメインの配列、E G F 4、5、6のオーバーラップ部、トロンピン切断可能コード化ヌクレオチド配列及びS Kコード化ヌクレオチド配列を5'から3'の順序で含有する

20

30

40

50

。他方、SK Rp4はNotI切断可能部位をその5'端に含有する。PCR条件は以下の通りであった：95 での5分間にわたる変性、次の28サイクルにおいて95 での45秒間にわたる変性、50 での45秒間にわたるアニーリング、72 での1分間にわたる伸長及び72 での10分間にわたる最終伸長による部分長娘フラグメントの合成の完了。得られたPCRブロックは6番ドメインのオーバーラップ配列及びトロンピン切断可能コード化ヌクレオチドを上流に含有するはずであり、下流においてはNotI制限部位を含有するはずである。両方のPCRブロックをゲル精製し、1：1のモル比でシングルポット反応において混合し、エンドプライマーTCS Fp1及びSK Rp6により増幅すると、必要とするN_EGF_TCS_SK PCRブロックが得られ（図1Eを参照のこと）（TCS：トロンピン切断可能配列）、これをゲル精製し、XhoI及びNotI酵素で消化し、最後に同様に消化したpET23-dに標準的な手順でライゲーションした。この構築物配列を、大腸菌XL Blueにおけるサブクローニング後、オープンリーディングフレームについて検証した。これにより、EGF4、5、6及びSKの接合部に以下のアミノ酸配列を有する第XI因子トロンピン切断可能部位が遺伝子中に創り出されたことが証明された：Ile-Lys-Pro-Arg-Ile-Val-Gly。この配列において、トロンピン特異性はアルギニンとイソロイシンの接合部での切断につながり、トロンピンの作用後、1つのアミノ酸がSKのN末端から除去された。また第2のアミノ酸がバリンに変更され得る（未変性のSKにおいて、N末端残基はIle-Ala-Gly-である）。その後、N_EGF_TCS_SKカセットをpPIC-9Kにライゲーションし、その発現をピチア・パストリスで行った。トロンピンでの処理後、トロンピン切断が精製構築物において本当であると確かに判明し、N末端タンパク質シーケンシングにより確認された。

【0156】

(viii) SKの 及び ドメインの接合部で翻訳的にインフレームで融合したEGF4、5、6ドメイン

これを目的として、 -ドメインの増幅をプライマーID Fp1及びID Rp2（これらのプライマーの配列については表1を参照のこと）を利用し、pET23-d_SKをテンプレートとして使用して行った。プライマーID Fp1はXhoI制限部位をその5'端に含有し、他方、ID Rp2はSKの ドメインの下流配列及びEGF4、5、6の4番ドメインの部分オーバーラップ配列を含有する。これらのプライマーセットで得られたPCRブロックはXhoI制限部位を上流配列に含有し、下流には -ドメインの末端配列及びEGFの4番ドメインのオーバーラップ配列を含有する。次のステップにおいて、EGF4、5、6をコードするPCRブロック2をIDE4 Fp3及びIDE6 Rp4（これらのプライマーの配列については表1を参照のこと）プライマーセットを使用して単離した。プライマーIDE4 Fp3はSKの -ドメインの下流配列をその5'端に含有し、IDE6 Rp4は ドメイン上流オーバーラップ配列をその5'端に含有する。これらのプライマーセットで得られたPCRブロック2は下流 -ドメインのオーバーラップ配列を5'端に含有し、他方の端は ドメインの上流配列を含有する。この増幅のためのPCR条件は以下の通りである：95 での5分間にわたる完全変性、次の27サイクル：95 での45秒間、45 での45秒間にわたるアニーリング、72 での1分間にわたる伸長及び72 での10分間にわたる最終伸長。次のステップにおいて、SKの ドメインをID Fp5及びID Rp6（これらのプライマーの配列については表1を参照のこと）プライマーセットを使用して単離した。ID Fp5'の5'端がEGF4、5、6の6番ドメインの相同下流配列を含有するようにプライマーID Fp5を設計し、ID Rp6は終止コドンとそれに続くNotI制限部位を含有する。以下のpcrスキームをブロック3の増幅に用いた：95 での5分間にわたるホットスタート、95 での45秒間にわたる変性、47 での45秒間にわたるアニーリング及び72 での1.5分間にわたる伸長。全部で28サイクルを行い、72 での10分間にわたる最終伸長により不完全な増幅産物を完成させた。得られた全てのPCR産物をゲル抽出キット（Qiagen）によりゲル精製し、A₂₆₀によ

10

20

30

40

50

り分光光度的に定量化した。最終 p c r 反応において、3 個の遺伝子ブロックの全てをシングルポットでプライスオーバーラップエクステンション反応に供して 1 個の隣接遺伝子ブロックを得て、得られた構築物の順序は以下：S K - S K - E G F 4、5、6 - S K であり、3 個の p c r 産物の全てが 1 : 1 : 1 のモル比でポリメラーゼ連鎖反応において混合され、最初の 10 サイクルはプライマーなしで行われ、次の 18 サイクルは最終濃度 0 . 6 μ M の I D F p 1 及び I D R p 6 プライマーを添加して行われ、3 フラグメント中間体完全遺伝子ブロックを増幅した。P C R 条件は以下の通りであった：95 °C での 5 分間にわたるホットスタート、95 °C での 45 秒間にわたる変性 (denaturation)、45 °C での 45 秒間にわたるアニーリング、72 °C での 3 分間にわたる伸長。全部で 28 サイクルを行い、最初の 10 サイクルをプライマーなしで行い、最終増幅を 72 °C での 10 分間にわたって行った。最終的に得られた遺伝子ブロックは X h o I 部位をその 5' 端に含有し、N o t I 部位をその 3' 端に含有する。この遺伝子ブロックを X h o I 及び N o t I 酵素で消化し、p E T 23 - d 及び p P I C 9 K にクローニングした。その発現、精製及びキャラクタリゼーションをピチア・パストリスにおいてチェックした。この遺伝子ブロックは E G F 4、5、6 ドメインを S K の 及び ドメインの間に含有する (D N A S E Q I D 5、対応するタンパク質 S E Q I D 129；図 1 H 及び図 2 E を参照のこと)。

【0157】

(i x) N _ E G F _ T C S _ S K ハイブリッド遺伝子ブロックの N 末端コード化端でのトランスグルタミナーゼ認識配列の組み込み (メチオニン酸化耐性変異を含有) :

E G F - S K 構築物における E G F 4、5、6 ドメインの 4 番目のドメインの始まり又は前にトランスグルタミナーゼ認識配列を組み込むために、プライマー T G _ N _ E G F _ F p 1 及び A f l I I R p 2 (プライマーの詳細な配列については表 1 を参照のこと) を設計し、T G F p 1 は X h o I 制限部位及び第 X I I I 血液因子トランスグルタミナーゼ認識アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列をその上流領域に含有し、プライマー A f l I I R p 2 は A f l I I 制限消化部位を含有するその領域のヌクレオチド配列を含有する (S K の 165 ~ 170 番ヌクレオチドはこのプライマーの中心に位置する A f l I I 制限部位を含有する)。これらのプライマーから、P C R により、発明者は X h o I 制限部位、トランスグルタミナーゼ認識コード化ヌクレオチド及び E G F 4、5、6 の 4 番目のドメインの配列を含有する遺伝子ブロックを得て、このブロックの下流部は A f l I I 制限部位を含有する。この遺伝子ブロック (酸化耐性及びトロンピン切断可能配列含有) をゲルから抽出した。プラスミド p E T 23 - d N _ E G F _ T C S _ S K 及び p E T 23 - d N _ E G F _ T C S _ S K _ E G F を X h o I 及び A f l I I で消化した。この結果、両方のプラスミド構築物から X h o I 及び A f l I I 遺伝子ブロック及び大小の部位が得られた。消化された遺伝子ブロックを構築物の大きいほうの部位とライゲーションし、大腸菌 X L B l u e に形質転換させて T G _ N _ E G F _ T C S _ S K 及び T G _ N _ E G F _ T C S _ S K _ E G F 含有プラスミドが得られた (図 1 F を参照のこと)。これらを、正しいオープンリーディングフレーム、すなわち上述の E G F - S K 構築物との関連でトランスグルタミナーゼコード化配列の存在についてシーケンシングし、検証した。両方のカセットを次にピチア・パストリスにおいてライゲーションし、これらの構築物の発現についてチェックした (「実施例で用いた方法」を参照のこと)。

【0158】

表 1 . 様々な E G F 4、5、6 及びストレプトキナーゼ遺伝子融合構築物の調製に使用するプライマー

【表 1 - 1】

番号	SEQ ID 番号	プライマー名	プライマー配列
1	SEQ ID 21	N_EGF_SK Fp 1	5' GAATATCTCGAGAAAAGAGTGGACCCGTGCTTCA- GAGCCA 3'
2	SEQ ID 22	N_EGF_SK Rp 2	5'GTCTAGCAGCCACTCAGGTCCAGCAATGCCGGAGTCA CAGTCGGTGCC 3'
3	SEQ ID 23	N_EGF_SK Fp3	5'GGCACCGACTGTGACTCCGGCATTGCTGGACCTG AGTGGCTGCTAGAC 3'
4	SEQ ID 24	N_EGF_SK Rp 4	5' CCTATACGCGGCCGCTTATTTGTCGTTAGGGTTAT- CAGGTAT 3'
5	SEQ ID 25	SK_EGF Fp 1	5' GCATATCTCGAGAAAA- GAATTGCTGGACCTGAGTGGCTGCTA 3'
6	SEQ ID 26	SK_EGF Rp 2	5'GAAGCACGGGTCCACCACAATTTGTTGAGCTTGCCG CCACCGGCTAAATGATAGCTAGC 3'
7	SEQ ID 27	SK_EGF Fp 3	5'GCTAGCTATCATTTAGCCGGTGGCGGACAAGCTCAAC AAATTGTGGTGGACCCGTGCTTC 3'
8	SEQ ID 28	SK_EGF Rp 4	5' CCATATCGCGGCCGCGCCGGAGTCA- CAGTCGGTGCCAAT 3'

10

20

30

40

【表 1 - 2】

9	SEQ ID 29	ID α Fp 1	5' GGATATCTCGAGAAAA-GAATTGCTGGACCTGAGTGGCTGCTA 3'
10	SEQ ID 30	ID α Rp 2	5' AAGCACGGGTCCACGGGCTCAGATTCGCTTGGTTTTGTATT 3'
11	SEQ ID 31	ID EGF Fp 3	5'AATACAAAACCAAGCGAAATCTGAGCCCGTGGACCCGTGCTT 3'
12	SEQ ID 32	ID EGF Rp 4	5'TACAGTATATTCCACATCAACGCCGGAGTCACAGTCAGTGCCAA3'
13	SEQ ID 33	ID β Fp 5	5'ATTGGCACTGACTGTGACTCCGGCGTTGATGTGGAATATACTGT3'
14	SEQ ID 34	ID γ Rp 6	5' AAATATCGCGCCGCTTTGTCGTTAGGGTTATCAGGTATA 3'
15	SEQ ID 35	M rep V Fp	5' CACAGGTGTCAGGTGTTTTGCAATCAGACTG 3'
16	SEQ ID 36	M rep V Rp	5' CAGTCTGATTGCAAAACACCTGACACCTGTG 3'
17	SEQ ID 37	M rep A Fp	5'CCGCACAGGTGCCAGGCTTTTTGCAACCAGACTGCTTGTTCCA 3'

10

20

30

40

【表 1 - 3】

18	SEQ ID 38	M rep A Rp	5' TGGACAAG- CAGTCTGGTTGCAAAAAGCCTGGCACCTGTGCGG 3'	
19	SEQ ID 39	M rep Q Fp	5' CACAGGTGTCAGCAATTTTGAACCAGA- CAGCCTGT 3'	10
20	SEQ ID 40	M rep Q Rp	5' ACAGGCTGTCTGGTTGCAAAATTGCTGA- CACCTGTG 3'	
21	SEQ ID 41	Δ SK_EGF Fp 1	5' GCATAACTCGAGAAAAGAGAGGCTTGGCTGCTA- GACCGTCCA 3'	20
22	SEQ ID 42	Δ SK_EGF Rp 2	5' CCATATCGCGGCCGCGCCGGAGTCA- CAGTCGGTGCCAAT 3'	
23	SEQ ID 43	N_EGF_TC S Fp 1	5' GCCTAACTCGAGAAAAGA- GAGCCCGTGGACCCGTGCTTCAGA 3'	30
24	SEQ ID 44	N_EGF_TC S_Rp2	5 'GACAATTCTAGGTTTAATGCCAGAGTCA- CAGTCGGTGCCAAT 3'	
25	SEQ ID 45	TCS_SK Fp 3	5' GGCATTAAACCTA- GAATTGTCGGACCTGAGTGGCTGCTAGA 3'	40

【表 1 - 4】

26	SEQ ID 46	SK Rp 4	5' CCTATACGCGGCCGCTTATTTGTCGTTAGGGTTAT-CAGGTAT 3'	
27	SEQ ID 47	ID $\alpha\beta$ Fp1	5 'GGATATCTCGAGAAAA-GAATTGCTGGACCTGAGTGGCTGCTA ' 3	10
28	SEQ ID 48	ID $\alpha\beta$ Rp2	5'CTCTGAAGCACGGGTCCACGGGCTCCAAGTGACTGCG ATCAAA 3'	
29	SEQ ID 49	IDE4Fp3	5'TTTGATCGCAGTCACTTGGAGCCCGTGGACCCGTGCTT CAGAG 3'	
30	SEQ ID 50	IDE6Rp4	5'AACGTATTTGATGGTGAACAGTTTGCCGGAGTCA CAGTCG 3'	20
31	SEQ ID 51	ID γ Fp5	5'CGACTGTGACTCCGGCAAAGTTCACCATCAAATAC GTT 3'	30
32	SEQ ID 52	ID γ Rp6	5' AAATATCGCGGCCGCTTTGTCGTTAGGGTTATCAGG-TATA 3'	
33	SEQ ID 53	TG_ N_EGF_ Fp 1	5'GGTATCCTCGAGAAAAGAGTTCAAGCGCAACAGA TCGTGGAACCCGTGGACCCGTGCTTCAGA3'	
34	SEQ ID 54	Afl-II Rp2	5' GGTTTTGATTTTGGACTTAAGCCTTGCTCTGTCT 3'	40

【 0 1 5 9 】

実施例 2

様々な EGF - SK ハイブリッドポリペプチドの発現及び機能的キャラクタリゼーション
 実施例 1 に記載の異なる遺伝子ブロック、例えば N__EGF - SK、SK - EGF 及び
 N__EGF__SK__EGF 並びに別種のドメイン間融合構築物、例えばドメイン間 EGF

— S K、ドメイン間 E G F — S K、切断 S K — E G F 並びに N — E G F — S K、S K — E G F 及び N — E G F — S K — E G F の酸化耐性形態（トランスグルタミナーゼ及びトロンピン切断部位等が組み込まれ、また全て発現ベクター p P I C - 9 K においてクローニングされ、またそれぞれの遺伝子融合体の配列から期待される発現した機能的に活性なハイブリッド遺伝子産物に関して検証した）を次に比較的多量の培養物からその更なるキャラクタリゼーションに先立って単離した。実施例 1 に記載したように、ピチアクローンを最初にルーチンでカゼインオーバーレイ法によりプラスミノゲン活性化能について試験し、幾つかの（それぞれ 10 ~ 20）陽性のものを次に B M G Y、B M M Y 培地（B M G Y = 1 % 酵母抽出物、2 % ペプトン、1 X グリセロール、1 X アミノ酸非含有酵母ニトロゲンベース及び 100 m M リン酸カリウム緩衝液 p H 5 . 5、B M M Y = 1 % 酵母抽出物、2 % ペプトン、1 X メタノール、1 X アミノ酸非含有酵母ニトロゲンベース及び 100 m M リン酸カリウム緩衝液 p H 5 . 5）上で成長させ、次に「方法」で前述したようにメタノールで誘導し、細胞非含有上清をカゼインオーバーレイアッセイ（再確認のために）及びペプチド発色基質の存在下でのプラスミノゲン活性化（分光光度）アッセイに使用した。比較的高いプロデューサーであると判明したものを次に 1 リットルレベルで成長させ、タンパク質を疎水性相互作用（例えば、フェニル - アガロース）及びイオン交換（D E A E - アガロース）クロマトグラフィのタンデムで精製した（詳細は「実施例で用いた一般的な方法」のセクションに記載）。これら 2 種類の精製方法で得られたハイブリッド S K - E G F ポリペプチドは概して S D S - P A G E で 90 ~ 95 % 純粋であった。精製された全ての構築物をプラスミノゲン活性化能（ヒトプラスミノゲンを使用した一段階アッセイ）について試験し、凝固時間を測定するためにトロンピン阻害アッセイを行い、タンパク質 C 活性化について発色アッセイを行った（「実施例で用いた方法」を参照のこと）。S K — E G F 及び酸化耐性 S K — E G F は S K と極めて似た、ただし活性化動態における 2 ~ 3 分多いラグを伴った P G 活性化動態を示したが、N — E G F — S K 並びに酸化耐性 N — E G F — S K、N — E G F — T C S — S K 及び T G — N — E G F — S K の場合、活性化におけるラグはかなり大きく（20 ~ 25 分）、その後、プラスミノゲン活性化動態は未変性の S K 様であった。これは構築物による P G の初期活性化が遅延したが、無修飾の S K の場合は事実上、即時であることを示唆した。しかしながら、一旦 S K 構築物が活性化されると、ラグの後ではあるが、完全なプラスミノゲン活性化特性を示した。若干大きいラグ（30 ~ 35 分）が双極性 E G F 融合タンパク質、すなわち N — E G F — S K — E G F、酸化耐性 N — E G F — S K — E G F、N — E G F — T C S — S K — E G F 及びそのバリエーション T G — N — E G F — T C S — S K — E G F において見られた。しかしながら、上述したように、ラグの消失後、タンパク質 1 ミリグラムあたりのプラスミノゲン活性化率（比活性）は無修飾の S K のものと同様であった。N — E G F — S K、N — E G F — S K — E G F 及び同様の種類の構築物におけるラグの理由は酵素前駆体の自己活性化機構の喪失であると判明した（B a j a j a n d C a s t e l l i n o 1977 ; B o x r u d , V e r h a m m e e t a l . 2004 ; A n e j a , D a t t e t a l . 2009）。このことは、少量の（ナノモル量）プラスミンを反応アッセイに若干添加することによるラグの漸進的な喪失があったという観察結果により証明された。加えて、これらの構築物の事前に生成されたプラスミン複合体をアッセイで使用した場合はラグがなく、これは S K で観察された即時のプラスミノゲン活性化機構のかわりに、ラグのある融合構築物が今はプラスミンと複合体を一旦形成しさえすればプラスミノゲン活性化可能であることをはっきりと示唆している。同様のプラスミン依存性活性化が、ドメイン間 E G F — S K 構築物においても見られた。しかしながら、活性化後、その総比活性は無修飾のストレプトキナーゼのもの 40 ~ 50 % にすぎないことが判明した。特筆すべきことに、E G F 4、5、6 セグメントが S K の 及び ドメインの接合部に置かれた他方のドメイン間構築物の場合、精製されたタンパク質は無修飾の S K と比較して 5 % 未満のプラスミノゲン活性を示した。このことは、E G F の S K との融合が自動的に機能性となるわけではなく、正しく設計したもののだけがそうなることをはっきりと示している。正しく設計されたものは、プラスミノゲン活性化、トロンピ

10

20

30

40

50

ン阻害等についての、高スループットスクリーニングシステムに簡単に適合させ得るプレート/分光光度アッセイを利用してスクリーニング（設計が実験に基づいて又は構造的な仮定により行われた時）することによって選択することができる。このため、設計されたSKの部位特異的置換、欠失又はドメイン付加変異体あるいはストレプトキナーゼの天然のバリエーションを使用し、ここで採用するアプローチにより同様のSK - EGFタンパク質を得ることができる。

【0160】

また、精製された構築物を、ヒト血液因子を使用した凝固時間アッセイによりトロンビン阻害の測定について試験した（上述の実施例で用いた方法を参照のこと）。特筆すべきことに、構築物は全て、これらのアッセイにおいて、構築物を有さない又は別のコントロールとしての未変性のSKを有するコントロールアッセイのものと比較して凝固時間において著しい増加（約2.5～3倍）を示した。更に、凝固時間の増加は低ナノモル濃度範囲で線形用量依存性挙動に従うと判明しており、これは陽性コントロールとして使用したピチアにおける発現で得られたEGF4、5、6ドメインで観察されたものと極めて似ていた。これらの結果はプラスミノゲン活性化能を有するEGF融合構築物（また、極めて低い活性を有するものとして）が強力なトロンビン阻害能も示したことを証明した。

【0161】

実施例3

様々なEGF4、5、6及びTPAハイブリッド遺伝子をコードするDNAの構築：

コード化tpA（SEQ ID 9、対応するタンパク質SEQ ID 120）及びインフレイムで融合したEGF4、5、6をコードしているDNAの別のセグメント（SEQ ID 8、対応するタンパク質SEQ ID 111）にインフレイムで融合したEGF4、5、6配列をコードしているDNAセグメント（SEQ ID 2、対応するタンパク質SEQ ID 111）を化学的に合成、精製及びpUC19においてクローニングした。シーケンシングにかけることによってその妥当性（SEQ ID 8、対応するタンパク質SEQ ID 111）を証明した。この構築物をEGF - tpA - EGF（SEQ ID 10、対応するタンパク質SEQ ID 121）と称する。EGF4、5、6ドメイン遺伝子コード化セグメントがtpAのN末端部位で融合した（SEQ ID 11、対応するタンパク質SEQ ID 122）又はtpAのC末端で融合した（SEQ ID 12、対応するタンパク質SEQ ID 123）この遺伝子構築物に加えて、tpAコード化配列をまずプライマーtpAFp1及びtpARp2プライマーで増幅した（プライマー配列については表2を参照のこと）。この反応で用いたPCR条件は以下の通りである：95 での5分間にわたるホットスタート、完全変性、95 での45秒間にわたる変性、55 での45秒間にわたるアニーリング、72 での4分間にわたる伸長（全部で28サイクル）及び72 での10分間にわたる最終伸長による不完全なPCR産物の完全増幅。このため、この反応に使用したプライマーtpAFp1はXhoI制限部位をその5'端に含有し、tpARp2はNotI制限部位を含有する。得られたPCR産物をXhoI及びNotI制限酵素で消化し、pET23-dにライゲーションした。この工程で形成された最終構築物をpET23-d tpAと称し（図2Fを参照のこと）、シーケンシングによりtpAオープンリーディングフレームを検証した。N末端（N__EGF__tpA）及びC末端（tpA__EGF）融合体を形成するために、単純な制限酵素消化及びライゲーションスキームに従った。両方の構築物を1つのステップで形成するために、pET23-d tpA及びpUC-19__N__EGF__tpA__EGFを共に特有のカッターであるXhoI及びBsrGIで切断した。これにより小さいフラグメント及び大きいフラグメントが得られた。小さいフラグメントのpUC-19__N__EGF__tpA__EGF消化物はN__EGF__tpA配列を含有し、pET23-d__tpAの大きいフラグメントにライゲーションされ、このステップによりN__EGF__tpA（DNA SEQ ID 11、対応するタンパク質SEQ ID 122）構築物が得られた。tpA__EGF（DNA SEQ ID 12、対応するタンパク質SEQ ID 123）構築物は、pUC-19__N__EGF__tpA__EGFの大き

10

20

30

40

50

いフラグメントと p E T 2 3 - d _ t P A の小さいフラグメントとのライゲーションにより形成され、この構築について t P A _ E G F (図 1 J を参照のこと) が得られた。 N _ E G F _ t P A (図 1 K を参照のこと) 及び t P A _ E G F (図 2 G を参照のこと) を X h o I 及び N o t I 制限酵素で消化し、単離したインサートフラグメントを p P I C - 9 K にライゲーションし、構築物は - 分泌シグナル配列にインフレームで置かれた。全てのこれらの構築物を、ピチア・パストリス (G S 1 1 5) においてベクター内に置かれたメタノール誘導性プロモーターの影響下で宿主ゲノムへの組み込み後に発現させた。

【 0 1 6 2 】

表 2 . 様々な E G F 4 , 5 , 6 及び組織プラスミノゲン活性化因子遺伝子融合構築物の調製に使用するプライマー

【表 2 - 1】

番号	SEQ ID 番号	プライマー名	プライマー配列
1	SEQ ID 71	iPA_Fp 1	5' GGATAACTCGAGAAAAGAGAGGCTCAAGAGATTCATGCTA-GATTCAGA 3'
2	SEQ ID 72	iPA_Rp 2	5' TCATATCGCGCCGCTGGTCTCATGTTATCTCTGATCCAGTCCA 3'
3	SEQ ID 73	Fin_Fp 1	5' GGATAACTCGAGAAAAGAGAGGCTCAAGAGATTCATGCTA-GATTCAGA 3'
4	SEQ ID 74	Fin_Rp 2	5' GGCTCTAAAGCAAGGGTCAACTGATTAACTGGAACAC-TATG3'
5	SEQ ID 75	EGF_Fp 3	5' CATAGTGTTCCAGTTAAATCAGTTGACCCTTGCTTTAGAGCC3'
6	SEQ ID 76	EGF_RP 4	5 AGCTCTGGTTCCGGAATCACAGTCAGTACCTA-TATGTCTTGCCAA3
7	SEQ ID 77	K1_Fp 5	5' TTGGCAAGACATATAGGTACTGACTGTGATTCCGGAACCA-GAGCT 3'
8	SEQ ID 78	CD_Rp 2	5' TCATATCGCGCCGCTGGTCTCATGTTATCTCTGATCCAGTCCA 3'
9	SEQ ID 79	Fg_Fp 1	5' GGATAACTCGAGAAAAGAGAGGCTCAAGAGATTCATGCTA-GATTCAGA 3'
10	SEQ ID 80	Fg_Rp 2	5' TCTAAAGCAAGGGTCAACTGATTAACTGGAACACTATGACA3'
11	SEQ ID 81	EFI_Fp 3	5' TGTCATAGTGTTCCAGTTAAATCAGTTGACCCTTGCTTTAGA3'

10

20

30

【表 2 - 2】

12	SEQ ID 82	EFI RP 4	5'ATCACTGTTTCCGGAATCACAATCAGTACCAATATGTCTTGCC AA 3'
13	SEQ ID 83	K2 Fp 5	5'TTGGCAAGACATATTGGTACTGATTGTGATTCCGGAAACAGTG AT 3'
14	SEQ ID 84	K2CD Rp 6	5'TCATATCGCGGCCGCTGGTCTCATGTTATCTCTGATCCAGTCCA 3'
15	SEQ ID 85	N_EtPA Fp1	5'GGATATCTCGAGAAAAGAGTTGACCCTTGCTTCAGAGCCAAC 3'
16	SEQ ID 86	N_EtPA Rp 2	5' AAAGTAACAATCACTATTTGACTTGACTGGAACACTATGACA 3'
17	SEQ ID 87	EK2 CD Fp 3	5' TGTCATAGTGTTCCAGTCAAGTCAAATAGTGATTGTTACTTT 3'
18	SEQ ID 88	K2 CD Rp 4	5'TCATATCGCGGCCGCTGGTCTCATGTTATCTCTGATCCAGTCCA 3'
19	SEQ ID 89	Finger Fp1	5' GGATAACTCGAGAAAAGAGAGGCTCAAGAGATTCATGCTA- GATTCAGA 3'
20	SEQ ID 90	Finger Rp 2	5' AAAGTAACAATCACTATTTGACTTGACTGGAACACTATGACA 3'
21	SEQ ID 91	K2 CD Fp 3	5' TGTCATAGTGTTCCAGTCAAGTCAAATAGTGATTGTTACTTT 3'
22	SEQ ID 92	EGF Rp 4	5'CCATATCGCGGCCGCTTAACCTGAGTCACAATCTGTTCCAATA 3'
23	SEQ ID 93	EGF CD Fp1	5' GTTGACCCTTGCTTTAGAGCCAACGTGAATACCAATGCCAG 3'
24	SEQ ID 94	EF CD Rp 2	5' CTGGCATTGGTATTCACAGTTGGCTCTAAAGCAAGGGTCAAC 3'
25	SEQ ID 95	K2 CD Fp 3	5'GTTGACCCTTGCTTTAGAGCCAACGTGAATACCAATGCCAG 3'
26	SEQ ID 96	K2 CD Rp 4	5' TTTATACGCGGCCGCTGGTCTCATGTTATCTCTGATCCAGT 3'
27	SEQ ID 97	Met rep Val Fp	5'CATGAACCACATAGATGTCAAGTATTCTGCAACCAGACTG 3'
28	SEQ ID 98	Met rep Val Rp	5' CAGTCTGGTTGCAGAATACTTGACATCTATGTGGTTCATG3'
29	SEQ ID 99	Met rep Ala Fp	5' CATGAACCACATAGATGTCAAGCATTCTGCAACCAGACTG 3'
30	SEQ	Met rep Ala Rp	5' CAGTCTGGTTGCAGAATGCTTGACATCTATGTGGTTCATG 3'

10

20

30

【表 2 - 3】

	ID 100		
31	SEQ ID 101	Met rep Glu Fp	5' CATGAACCACATAGATGTCAACAATTCTGCAACCAGACTG 3'
32	SEQ ID 102	Met rep Glu Rp	5' CAGTCTGGTTGCAGAATTGTTGACATCTATGTGGTTCATG 3'
33	SEQ ID 103	T 115 N Fp	5' CAGGGAATCTCATATAGAGGTAATTGGTCTACAGCTGAGT 3'
34	SEQ ID 104	T 115 N Rp	5' ACTCAGCTGTAGACCAATTACCTCTATATGAGATTCCCTG 3'
35	SEQ ID 105	N129 Q Fp	5' AATGTACTAACTGGCAATCTTCCGCTTTGGC 3'
36	SEQ ID 106	N129 Q Rp	5' GCCAAAGCGGAAGATTGCCAGTTAGTACATT 3'
37	SEQ ID 107	KH Fp 1	5' GGATAACTCGAGAAAAGAGAGGCTCAAGAGATTCATGCTA- GATTCAGA 3'
38	SEQ ID 108	KH Rp 2	5' AGCAGCGGCAGCAGCAAAAATGGCAGCCTGCCA3'
39	SEQ ID 109	KH Fp 3	5' GCTGCTGCCGCTGCTTCCCCTGGAGAGAGATTCCCTT 3''
40	SEQ ID 110	KH Rp4	5' TCATATCGCGGCCGCTGGTCTCATGTTATCTCTGATCCAGTCCA 3'

【 0 1 6 3 】

実施例 4

組織プラスミノゲン活性化因子とヒトトロポモジュリンの EGF 4、5、6 ドメインとの様々なハイブリッド遺伝子の構築

(i) ドメイン間 EGF 4、5、6 - tPA 構築物の構築

組織プラスミノゲン活性化因子は異なるドメインを以下の順序：N末端ペプチド - フィンガードメイン - EGF 様ドメイン - クリングル 1 - クリングル 2 - 触媒ドメインで含有する。新規な非天然のハイブリッド設計を遺伝子レベルで構築し、tPA の内因性 EGF ドメインをトロポモジュリンの EGF 4、5、6 ドメインで置き換えた。これらの構築物を他のハイブリッド遺伝子の産生に関して上で用いたオーバーラップエクステンション PCR 戦略により形成した。

【 0 1 6 4 】

(a) tPA の内因性 e g f ドメインをヒトトロポモジュリンの EGF 4、5、6 ドメインで置き換えたハイブリッド遺伝子ブロックの構築

この構築物を形成するために、pET23 - d__tPA (SEQ ID 9、対応するタンパク質 SEQ ID 120) を、内因性 e g f コード化領域が 187 bp から 297 bp までの基準として使用した。第 1 のステップにおいて、フィンガードメインコード化 DNA を以下のプライマー：Fin Fp 1 及び Fin Rp 2 (これらのプライマー

の配列については表2を参照のこと)を使用して単離し、上流プライマーはXhoI制限部位をその5'末端に含有し、他方、第2プライマーは、EGF4、5、6ドメインの4番ドメインのためのオーバーラップ配列と共にフィンガードメインをコードする下流配列を含有する。PCR条件は以下の通りであった: 95 °Cでの5分間にわたる完全変性、続く次の28サイクル: 95 °Cでの45秒間、48 °Cでの45秒間にわたるアニーリング、72 °Cでの1分間にわたる伸長及び72 °Cでの10分間にわたる最終伸長。第2のPCRにおいて、EGF4、5、6ドメインセグメントを増幅し、EGF Fp3及びEGF Rp4(これらのプライマーの配列については表2を参照のこと)プライマーセットを使用した。プライマーEGF Fp3はEGFのフィンガードメインの下流配列及びEGFの4番ドメインを含有し、他方、下流プライマーEGF Rp4はクリングル1のオーバーラップ配列をその5'末端に含有する。PCR条件は以下の通りであった: 95 °Cでの5分間にわたる完全変性、続く次の28サイクル: 95 °Cでの45秒間、48 °Cでの45秒間にわたるアニーリング、72 °Cでの1分間にわたる伸長、最後に72 °Cでの10分間にわたる伸長セグメントで終了。このプライマーセットで得られた遺伝子ブロックはフィンガードメイン配列を5'末端に、またその3'端にクリングル1のオーバーラップ配列を含有する。第3のPCR反応において、クリングル1を触媒ドメインの最後までコードしている配列を、K1 Fp5及びCD Rp6(これらのプライマーの配列については表2を参照のこと)プライマーセットの使用により選択的に増幅した。プライマーK1 Fp1はEGF4、5、6の6番ドメインのオーバーラップ配列をその5'末端に含有し、プライマーCD Rp6は終止コドン及びNotI制限部位を5'端に含有する。PCR条件は以下の通りであった: 95 °Cでの5分間にわたる完全変性、続く次の28サイクル: 95 °Cでの45秒間、48 °Cでの45秒間にわたるアニーリング、72 °Cでの3分間にわたる伸長及び72 °Cでの10分間にわたる最終伸長による全ての部分長フラグメントの合成完了。この反応で得られた遺伝子ブロックはEGF6番ドメインオーバーラップ配列を5'末端に、また触媒ドメインコード化配列、終止コドン及びNotI部位をその3'端に含有する。3個のPCR産物の全てをゲル精製し、シングルポットSOEに供することによって完全ハイブリッド遺伝子構築物を増幅し、アセンブリの順序は以下の通りであった: フィンガードメイン - EGF4、5、6ドメイン - クリングル1 - クリングル2及びtPA(図1Q及び図2Jを参照のこと)。触媒ドメイン。これをFin Fp1及びCD Rp6(これらのプライマーの配列については表2を参照のこと)プライマーセットを使用して行った。最終PCR条件は以下の通りであった: 95 °Cでの5分間にわたる完全変性、次の28サイクル: 95 °Cでの45秒間、48 °Cでの45秒間にわたるアニーリング、72 °Cでの4分間にわたる伸長及び72 °Cでの10分間にわたる最終伸長(単一セグメント)。この遺伝子ブロックを、上述したように、ゲル抽出で精製し、XhoI及びNotI酵素で消化し、同様に消化及び精製したpET23-dベクターとライゲーションし、大腸菌XL Blueにクローニングした。幾つかのランダムに選択したクローンを、完全インサート/遺伝子ブロックについてサンガー法によるシーケンシングに供し、tPAのものへのEGF4、5、6ドメインの正しいインフレームでの組み込みを検証した(DNA SEQ ID 13、対応するタンパク質SEQ ID 124)。この遺伝子ブロックを次に、前回のようにpPIC-9Kベクターに移し、ピチア・パストリスへとクローニングし、「実施例で用いた一般的な方法」に記載したように高レベルのプラスミノーゲン活性化因子活性についてスクリーニングした。

【0165】

(b) tPAの内因性egf及びクリングル1ドメインがヒトトロポモジュリンのEGF4、5、6ドメインに置き換えられたドメイン間tPA及びEGFハイブリッド遺伝子構築物の構築:

この構築物を形成するために、3つの異なるPCRを別々に行い、得られた遺伝子ブロックはオーバーラップ配列を各遺伝子ブロックの末端に含有し、次にこれらをシングルポットSOE反応で増幅して以下のハイブリッド構築物: tPAフィンガードメイン - EGF4、5、6 - tPAクリングル2 - tPA触媒(セリンプロテアーゼ)ドメイン(図1

10

20

30

40

50

R及び図2Hを参照のこと)を形成した。この構築物を形成するために、pET23-d__tPA(SEQ ID 9、対応するタンパク質SEQ ID 120)を内因性egf及びクリングル1コード化ヌクレオチド領域が187bpから564bpまでのテンプレートとして使用した。第1のステップにおいて、フィンガードメインコード化セグメントを以下のプライマー：Fg Fp1及びFg Rp2(これらのプライマーの配列については表2を参照のこと)を使用して単離し、上流プライマーはXhoI制限部位を5'末端に含有し、他方、第2プライマーはフィンガードメインの下流配列及びEGF4、5、6ドメインの4番ドメインのオーバーラップ配列を含有する。PCR条件は以下の通りである：95 での5分間にわたる完全変性、次の28サイクル：95 での45秒間、48 での45秒間にわたるアニーリング、72 での1分間にわたる伸長及び72 での10分間にわたる最終伸長。第2のPCRにおいて、EGF4、5、6ドメインをプライマーEFI Fp3及びEFI Rp4(これらのプライマーの配列については表2を参照のこと)で増幅した。プライマーEFI Fp3はフィンガードメインの下流配列及びEGFの4番ドメインを含有し、他方、下流プライマーはクリングル2のオーバーラップ配列をその5'末端に含有した。PCR条件は以下の通りであった：95 での5分間にわたる完全変性、次の28サイクル：95 での45秒間、48 での45秒間にわたるアニーリング、72 での1分間にわたる伸長及び72 での10分間にわたる最終伸長。このプライマーセットで得られた遺伝子ブロックはフィンガードメイン配列を5'末端に含有し、クリングル2のオーバーラップ配列をその3'端に含有した。第3のPCR反応において、クリングル2からtPA触媒ドメインへの配列を、K2 Fp5及びK2 CD Rp6(これらのプライマーの配列については表2を参照のこと)の2個のプライマーのセットを使用して増幅した。プライマーK2 Fp5はEGF4、5、6の6番ドメインのオーバーラップ配列をその5'末端に含有し、プライマーK2 CD Rp6は終止コドン及びNotI制限部位を5'端に含有する。PCR条件は以下の通りであった：95 での5分間にわたる完全変性による「ホットスタート」、次の28サイクル：95 での45秒間、48 での45秒間にわたるアニーリング、72 での3分間にわたる伸長及び72 での10分間にわたる最終伸長。この反応で得られた遺伝子ブロックは6番ドメインオーバーラップ配列をその5'末端に、また触媒ドメインコード化配列、続く終止コドン及びNotI部位をその3'端に含有した。3個のPCR産物の全てをゲル精製し、Fg Fp1及びK2 CD Rp6プライマーセット(これらのプライマーの配列については表2を参照のこと)によるシングルポットSOE反応に供して増幅して完全ハイブリッド遺伝子構築物を得て、様々なタンパク質コード化セグメントのアセンブリの順序は以下の通りであった(最終的にクローニング後にDNAシーケンシングにより確認された)：フィンガードメイン-EGF4、5、6ドメイン-クリングル2及び触媒ドメイン(DNA SEQ ID 14、対応するタンパク質SEQ ID 126)。最終PCR条件は以下の通りであった：95 での5分間にわたる完全変性、次の28サイクル：95 での45秒間、48 での45秒間にわたるアニーリング、72 での4分間にわたる伸長及び72 での10分間にわたる最終伸長。この遺伝子ブロックをゲル抽出により精製し、XhoI及びNotI酵素で消化し、pET23-dベクターとライゲーションし、大腸菌XL Blueにおいてクローニングし、完全遺伝子ブロックを次にシーケンシングし、部分切断tPA遺伝子へのEGF4、5、6ドメインの正しいインフレーム組み込みについて検証した。上述したように、この最終ハイブリッド遺伝子ブロックをpPIC-9Kベクターに移し、ピチア・パストリスにおけるそのORF発現を標準化手順を用いてチェックした。

【0166】

(c)EGF4、5、6コード化セグメントがインフレームでtPAのN末端及びC末端コード化端で融合したtPAの切断型をコードするハイブリッド遺伝子ブロックの構築：これらの構築物を、事前に形成したpET23-dN__EGF__tPA(SEQ ID 11、対応するタンパク質SEQ ID 121)及びpET23-d__tPA__EGF(SEQ ID 12、対応するタンパク質SEQ ID 123)をテンプレートと

10

20

30

40

50

して使用して調製した。両方の構築物において、内因性 e g f 及びクリングル 1 ドメインをオーバーラップ P C R スキームの助けを借りて除去した。t P A の内因性 e g f 及びクリングル 1 ドメインを N _ E G F _ t P A 構築物から除去するために (図 1 N を参照のこと)、2 セットのプライマーを設計した。第 1 のプライマーセット N _ E t P A F p 1 及び N _ E t P A R p 2 (これらのプライマーの配列については表 2 を参照のこと) を E G F 4、5、6 ドメイン及び t P A フィンガードメインの隣接ヌクレオチド配列の増幅に使用した。この場合、上流プライマーは E G F の 4 番ドメイン配列及び X h o I 制限部位をその 5 ' 端に含有し、プライマー N _ E t P A R p 2 は t P A クリングル 2 のオーバーラップ配列を含有した。第 2 のプライマーセット、すなわち E K 2 C D F p 3 及び K 2 C D R p 4 (これらのプライマーの配列については表 2 を参照のこと) を t P A のクリングル 2 及び触媒ドメインの増幅に使用した。プライマー E K 2 C D F p 3 はフィンガードメインの下流オーバーラップ配列を 5 ' 端に含有し、もう一方のプライマーは t P A 触媒ドメインの下流配列及び N o t I 制限部位を含有する (P C R 条件 : 9 5 での 5 分間にわたるホットスタート、2 8 サイクルの 9 5 での 4 5 秒間、5 2 での 4 5 秒間、7 2 での 2 分間及び 7 2 での 1 0 分間にわたる最終伸長)。この反応で得られた遺伝子ブロックは t P A フィンガードメインオーバーラップ配列をその 5 ' 端に、N o t I 制限部位をその 3 ' 端に含有した。両方の P C R 産物をゲル精製し、完全遺伝子ブロックの構築に供し、内因性 e g f 及びクリングル 1 をプライマー N _ E t P A F p 1 及び K 2 C D R p 4 (これらのプライマーの配列については表 2 を参照のこと) プライマーセットの助けを借りて欠失させた。得られた遺伝子ブロックを精製し、X h o I 及び N o t I 制限酵素で消化し、p E T 2 3 - d ベクターにライゲーションし、大腸菌においてサブクローニングし、t P A (D N A S E Q I D 1 5、対応するタンパク質 S E Q I D 1 2 6 ; 図 2 . I) コード化遺伝子ブロックからの e g f 及びクリングル 1 の除去後の正しいインフレーム接合について D N A シーケンシングした。遺伝子ブロックの正しいオープンリーディングフレームについてシーケンシングによる検証後、このカセットを p P I C - 9 K にライゲーションし、前回のようにピチアに形質転換させ、活性についてスクリーニングし、細胞外発現についてチェックした。同様のやり方で、内因性 e g f 及びクリングル 1 を構築物 t P A _ E G F 中の t P A コード化遺伝子ブロックから欠失させた (図 1 P 及び図 2 H を参照のこと)。ここで、p E T 2 3 - d - t P A _ E G F プラスミド D N A を切断 t P A ヌクレオチド配列増幅用のテンプレートとして使用した。フィンガードメインの増幅にフィンガー F p 1 及びフィンガー R p 2 のプライマーセットを使用し (これらのプライマーの配列については表 2 を参照のこと)、フィンガー F p 1 プライマーは X h o I 制限部位をその 5 ' 端に含有し、もう一方のプライマーフィンガー R p 2 はフィンガードメインの下流配列及び t P A のクリングル 2 のオーバーラップ配列を含有した。P C R 条件は以下の通りであった : 9 5 での 5 分間にわたる完全変性、続く 3 0 サイクルの : 9 5 での 4 5 秒間にわたる変性、4 4 での 4 5 秒間にわたるアニーリング、7 2 での 1 分間にわたる伸長及び 7 2 での 1 0 分間にわたる最終伸長による終了。これにより t P A フィンガードメインオーバーラップ配列、続く X h o I 制限部位をその 5 ' 端に含有する遺伝子ブロックが得られ、その 3 ' 端はクリングル 2 オ - ーラップ配列を含有した。第 2 のプライマーセットをクリングル 2 触媒コード化ドメイン及び E G F 4、5、6 ドメインの増幅に使用した。第 1 のプライマー K 2 C D F p 3 (これらのプライマーの配列については表 2 を参照のこと) は t P A フィンガードメインの下流端及びクリングル 2 の小部分までのオーバーラップ配列を含有した。他方、第 2 のプライマー E G F R p 4 (これらのプライマーの配列については表 2 を参照のこと) は E G F の下流配列及び N o t I 制限部位を含有した。P C R 条件は以下の通りであった : 9 5 での 5 分間にわたる完全変性、3 0 サイクルの : 9 5 での 4 5 秒間にわたる変性、4 4 での 4 5 秒間にわたるアニーリング、7 2 での 1 分間にわたる伸長及び 7 2 での 1 0 分間にわたる最終伸長。両方の遺伝子ブロックをゲルから精製し、プライマーフィンガー F p 1 及び E G F R p 4 (これらのプライマーの配列については表 2 を参照のこと) の存在下でのオーバーラップエクステンション反応に供し、この反応から得られた P

10

20

30

40

50

CR産物をゲル精製し、前回のようにpET23-d(DNA SEQ ID 16、対応するタンパク質SEQ ID 127)に大腸菌においてライゲーションし、シーケンシングして完全遺伝子ブロックを検証した。最後に、この遺伝子ブロックをpPIC-9Kにライゲーションし、上述したように発現及び機能的特性のスクリーニングのためにピチア・パストリスに形質転換させた。

【0167】

(d) 様々なEGF含有組織プラスミノゲン活性化因子遺伝子構築物における異なる変異の組み込み：

上述のEGF4、5、6及びtPAの異なる融合構築物において、以下のアミノ酸変更を行った：スレオニン115番アミノ酸をアスパラギン(T115N)に変更し、アスパラギン129番アミノ酸をグルタミン(N129Q)に変更し、tPA308~311のKHRRコード化領域を、4重アラニン変異列(KHRR(308-311)AAAA)で置き換えた(DNA SEQ ID 20、対応するタンパク質SEQ ID 128)。これらの変異により追加のフィブリン特異性が得られる分子に付与され、生体内でのtPAの半減期が上昇することが知られている(Keyt et al., 1994)。これらの変異を導入するために、発明者は部位特異的変異誘発アプローチ(「実施例で用いた方法」を参照のこと)を用いて、これらの変更を酸化耐性(EGF4、5、6ドメインの129番メチオニンをバリン/アラニン/グルタミンに置き換えた)遺伝子テンプレートにも組み込んだ。以下のプライマーを部位特異的変異誘発に使用した：1. T115 N Fp及びT115 N Rp(これらのプライマーの配列については表2を参照のこと)、2. N129 Q Fp及びN129 Q Rp(これらのプライマーの配列については表2を参照のこと)。

【0168】

tPA変異KHRR(tPAの残基308~311が4重アラニンアミノ酸残基に置き換えられた)の場合、KHFP1及びKHRRp2をエンドプライマー(これらのプライマーの配列については表2、すなわち37、38番を参照のこと)として使用したオーバーラップエクステンションPCR(実施例で用いた方法を参照のこと)を長さ1~933bpのポリヌクレオチドの増幅に使用し、KHFP1プライマーはXhoI制限部位及びtPAの上流配列を含有し、他方、プライマーKHRRp2は4重アラニン変異をその5'端に含有する。以下のPCR条件を用いた：95 での5分間にわたるホットスタート、完全変性、続く95 での45秒間にわたる変性、45 での45秒間にわたるアニーリング、72 での1.5分間にわたる伸長(全部で28サイクル)及び72 での10分間にわたる最終伸長による不完全なPCR産物の完全増幅。最後に、この方法で得られた遺伝子ブロックはXhoI制限部位を5'端に含有し、その3'端は4重アラニン変異を含有した。別のPCR反応セットにおいて、KHFP3及びKHRRp4(これらのプライマーの配列については表2を参照のこと)を、tPAの918番bpから1617番bpの間のDNAの増幅に使用した。プライマーKHFP3は4重アラニン変異をその5'端に含有し、第2のプライマーKHRRp4はXhoI制限部位を含有する。以下のPCR条件を反応に用いた：95 での5分間にわたるホットスタート、完全変性、続く95 での45秒間にわたる変性、45 での45秒間にわたるアニーリング、72 での1.5分間にわたる伸長(全部で28サイクル)及び72 での10分間にわたる最終伸長による不完全なPCR産物の完全増幅。得られた遺伝子ブロックは4重アラニン変異をその5'端に含有し、その3'端はNotI制限部位を含有する。両方のPCR産物をゲル精製し、一般的な「オーバーラップ」PCR反応シングルポットで混合し、KHFP1及びKHRRp4(これらのプライマーの配列については表2を参照のこと)を全遺伝子ブロックの増幅に使用した。最後に、得られた遺伝子ブロックをpET23-dに移し、DNA配列及び正しいオープンリーディングフレームの検証後、pPIC9Kに移し、ハイブリッドポリペプチドを発現させ、ピチアにおいて標準条件によりチェックした(「実施例で用いた方法」を参照のこと)。

【0169】

10

20

30

40

50

実施例 5

スタフィロキナーゼとトロンボモジュリンドメインEGF 4、5、6とのハイブリッド遺伝子の構築：

SAK__EGF及びEGF__SAKコード化ハイブリッド遺伝子ブロックの構築

EGF - SAK融合体の構築のために、EGF 4、5、6 PCRブロックをN__EGF__SAK Fp 1及びN__EGF__SAK Rp 2プライマーセット（これらのプライマーの配列については表3を参照のこと）の助けを借りて単離し、pET23-d__EGF 4、5、6 (Seq ID 2、対応するタンパク質SEQ ID 111)をテンプレートとして使用した。ここでN__EGF__SAK Fp 1はXhoI制限部位をその5'端に含有し、N__EGF__SAK Rp 2はSAKヌクレオチドのオーバーラップ配列を5'端に含有した。PCR条件は以下の通りであった：第1の（ホットスタート）サイクルにおける95 での5分間にわたる完全変性、次の28サイクル：95 での45秒間にわたる変性、50 での45秒間にわたるアニーリング、72 での1分間にわたる伸長及び72 での10分間にわたる最終ステップによる不完全なPCR産物の完成。PCR産物はXhoI制限部位をその5'端に含有し、3'端はSAKのオーバーラップ配列を含有した。第2のステップにおいて、SAK PCRブロックをN__EGF__SAK Fp 3及びN__EGF__SAK Rp 4プライマーセットの助けを借りて増幅し、pGMEX__SAK (SEQ ID 17、対応するタンパク質SEQ ID 130)構築物をテンプレートとして使用した。この反応において、プライマーN__EGF__SAK Fp 3はEGF 4、5、6の6番ドメインの下流オーバーラップ配列を含有し、N__EGF__SAK Rp 4は終止コドンとそれに続くNotI制限部位を含有した。PCR条件は以下の通りであった：95 での5分間にわたる1サイクルの完全変性、続く28サイクルの95 での45秒間にわたる変性、50 での45秒間にわたるアニーリング、72 での1分間にわたる伸長及び72 での10分間にわたる最終ステップによる不完全なPCR産物の完成。これによって6番EGFドメインオーバーラップ配列を5'端に有する遺伝子ブロックが得られ、3'端は終止コドンとそれに続くNotI制限部位を含有した。両方のPCR産物をゲル精製キットの助けを借りてゲル抽出及び精製し、ハイブリッド遺伝子中間体（オーバーラップエクステンションで得られる）増幅に使用するN__EGF__SAK上流Fp 1及びN__EGF__SAK Rp 4下流プライマーとモル比1：1でシングルSOE PCR反応において混合した。この結果、N__EGF__SAK (DNA SEQ ID 18、対応するタンパク質SEQ ID 118)配列を含有する隣接遺伝子フラグメントが得られた。この遺伝子ブロックを次にXhoI及びNotIで消化し、pPIC-9Kベクターに移した。DNAシーケンシングによりEGF__SAK (図1Tを参照のこと)構築物で期待されるインフレーム融合及び他の変異の不在を検証した。この構築物をピチア・パストリスのGS115株に形質転換させ、前回のように、宿主ゲノムへの組み込み後、アルコールオキシダーゼプロモーターの影響下での発現についてチェックした。

【0170】

SAK__EGF (図1Sを参照のこと)構築物の構築を同様に行い、EGF 4、5、6ドメインセグメントをSAKのC末端で融合した。第1のステップにおいて、SAK遺伝子ブロックをSAK__EGF Fp 1及びSAK__EGF Rp 2プライマーセットの助けを借りて単離した。プライマーSAK__EGF Fp 1はXhoI制限部位を5'端に含有し、他方、SAK__EGF Rp 2はEGF 4、5、6の4番ドメインのオーバーラップ配列を含有する。得られた遺伝子ブロックは、その上流配列中のXhoI部位及びその下流配列中のオーバーラップ4番ドメインEGF配列を含有する。第2のステップにおいて、SAK遺伝子ブロックをSAK__EGF Fp 3及びSAK__EGF Rp 4プライマーを使用して単離し、SAK__EGF Fp 3はSAKのオーバーラップ配列を含有し、SAK__EGF Rp 4は終止コドン及びNotI制限部位を含有する。これらのプライマーセットを使用してPCRから単離した遺伝子ブロックはSAKオーバーラップ配列を上流に、また終止コドン及びNotI部位をその下流端に含有した。両方の遺伝子ブ

10

20

30

40

50

ロックをアガロースゲルから精製し、S A K__E G F F p 1及びS A K__E G F R p 4とシングルS O E反応において混合して完全S A K__E G F (D N A S E Q I D 1 9、対応するタンパク質S E Q I D 1 1 9) 遺伝子ブロックを得た。このため、最終P C R産物はS A K__E G F配列を含有するハイブリッド遺伝子ブロックをもたらし、ゲルから精製し、X h o I及びN o t I制限酵素で消化し、p P I C - 9 Kに移し、シーケンシング後、正しいインフレーム検証が行われた。この構築物をピチア・パストリスのG S 1 1 5株に形質転換させ、標準化手順によるゲノム組み込み後、発現プラスミドp P I C - 9 Kに位置するアルコールオキシダーゼプロモーターの影響下のその発現 (S D S - P A G E及びカゼイン - オーバーレイプラスミノゲン活性化因子アッセイによりチェックした)。S A K__E G F構築物全体を、 - 分泌シグナル配列の上流にインフレーム

10

【 0 1 7 1 】

N__E G F__S A K及びS A K__E G Fの細菌発現：

上記のN__E G F__S A K及びS A K__E G F D N A構築物をまた、I P T G誘導性l a cプロモーターの影響下で発現させた。これらの構築物を作製するために、p P I C - 9 K__N__E G F__S A K及びp P I C - 9 K__S A K__E G Fプラスミドをテンプレートとして使用した。

【 0 1 7 2 】

(i) N__E G F__S A K遺伝子ブロックの細菌発現カセットの構築：

N__E G F__S A K遺伝子ブロックをまずB a c F p 1及びB a c R p 2プライマーの助けを借り、p P I C - 9 K__N__E G F__S A Kをテンプレートとして使用して増幅した。B a c F p 1プライマーはN c o I部位をその5'端に、必要するA U Gコドン遺伝子ブロックの最初に配置するのを支援するために、またイニシエーターM e t残基コード化コドンをm R N Aに配置するために含有した。プライマーB a c R p 2はX h o I制限部位を含有し、6ヒスチジンアミノ酸コード化ヌクレオチドを転写したm R N Aの端部に遺伝子産物の検出及びその精製に役立つ終止コドンの前にインフレームで導入することを促進した。この遺伝子ブロックをゲルから単離し、N c o I及びX h o I制限酵素で消化し、最後にT 7プロモーターをベースとしたp E T 2 3 - dベクターとライゲーションし、大腸菌に形質転換させた。特有であるこれらの2つの部位は、T 7 R N Aポリメラーゼプロモーターの影響下でのハイブリッド遺伝子構築物の挿入に役立つ (S t u d i e r a n d M o f f a t t , 1 9 8 6)。この構築物p E T 2 3 - d__N__E G F__S A KをX L 1 B細胞に形質転換させ (r e c A⁻及びe n d A⁻)、プラスミドは増殖し、シーケンシングにかけられた。ここでこのプラスミドをB L 2 1 (D E 3) 細胞 (発現宿主)に移し、T 7 R N Aポリメラーゼの誘導をI P T Gにより行い、封入体として細胞内形態で発現させた (発現条件、封入体の単離及びリフォールディングプロトコルに関しては「実施例で用いた方法」を参照のこと)。最後に、リフォールディングしたタンパク質をクロマトグラフィにより高精製形態で得て、活性アッセイに供した。

20

30

【 0 1 7 3 】

(i i) 細菌発現のためのS A K__E G F遺伝子ブロックの構築：

S A K__E G F構築物をS A K__E G F F p 1及びS A K__E G F R p 2プライマーの助けを借りて調製し、p P I C - 9 K__S A K__E G Fを増幅のためのテンプレートに使用した。プライマーS A K__b a c F p 1はN c o I制限部位を5'端に含有し、A U Gコドンの導入を支援した。他方、S A K__b a c R p 2はX h o I制限部位を含有し、6ヒスチジンアミノ酸コード化ヌクレオチドの意図したS A K__E G F遺伝子構築物の下流端の終止コドンに先立っての導入を促進した。P C R条件は以下の通りであった：第1サイクルにおける9 5 °での5分間にわたる完全変性、次の2 8サイクル：9 5 °での4 5秒間にわたる変性、5 0 °での4 5秒間にわたるアニーリング、7 2 °での1 . 5分間にわたる伸長及び7 2 °での1 0分間にわたる最終ステップによる部分長P C R産物の完成。得られた遺伝子ブロックはN c o I部位をその上流端に含有し、X h o I部位はその下流端に存在し、ゲル抽出により精製し、p E T 2 3 - dベクターにライゲーション

40

50

ンした。このライゲーション産物を電気穿孔法により大腸菌 X L 1 B 細胞に形質転換し (r e c A⁺ 及び e n d A⁺)、得られたプラスミドを正しいオープンリーディングフレームの検証のためにシーケンシングした。プラスミドの増殖は X L 1 B 細胞で行われたが、ハイブリッド遺伝子産物の発現のために、プラスミドを大腸菌 B L 2 1 (D E 3) 細胞 (N o v a g e n I n c .) に形質転換した。最後に、タンパク質を I P T G の存在下で発現させ、封入体が形成され、これらを単離し、「実施例で用いた方法」で詳述したように酸化/還元グルタチオンの存在下でリフォールディングし、上記の E G F _ S A K 構築物についてのプラスミノーゲン活性化因子及びトロンピン阻害活性アッセイに供した。

【 0 1 7 4 】

(i i i) E G F と S A K との接合部でのトロンピン切断可能配列の導入：

トロンピン切断可能配列を、N 末端融合構築物において E G F と S A K との接合部で導入した。この構築物に関し、プラスミド p E T - 2 3 - d における E G F _ S A K D N A を E G F 及び S A K の増幅のためのテンプレートとして使用した。トロンピン切断可能プライマーを設計した。E G F 増幅のために、指定の E 4 F p 1 及び E 6 R p 2 (これらのプライマーの配列については表 3 の番号 1 3、1 4 を参照のこと) プライマーを使用した。E 4 F p 1 プライマーは X h o I 制限部位及び E G F 4、5、6 ドメインの上流配列をその 5' 端に含有し、他方、E 6 R p 2 は E G F 4、5、6 の下流配列及びトロンピン切断可能ヌクレオチド配列をその 5' 端に含有する。以下の P C R 条件を増幅に用いた：9 5 °C での完全変性、続く次の 2 8 サイクル：9 5 °C での 4 5 秒間、4 5 °C での 4 5 秒間のアニーリング、7 2 °C での 1 分間にわたる伸長及び最後に 7 2 °C での更に 1 0 分間にわたる伸長。この P C R 反応で得られた遺伝子ブロックは E G F の 4 番ドメインをインフレームでコードしている配列をその 5' 端に含有し、その 3' 端は E G F 4、5、6 の下流配列及びトロンピン切断可能配列を含有する。第 2 の P C R 反応において、S A K 遺伝子ブロックを T C S _ S A K F p 3 及び T C S _ S A K R p 4 (これらのプライマーの配列については表 3、すなわち配列番号 1 5、1 6 を参照のこと) の助けを借りて増幅した。T C S _ S A K F p 3 はトロンピン切断可能配列及び S A K ヌクレオチドの上流配列を含有する。同様に、他方のプライマー T C S _ S A K R p 4 は S A K の下流配列及び終止コドン、それに続く N o t I 制限部位を含有する。得られる増幅された遺伝子ブロックはトロンピン切断可能ヌクレオチド配列をその 5' 端に、また終止コドン及び N o t I 部位をその 3' 端に含有する。以下の P C R 条件を S A K 遺伝子ブロックの増幅に用いた：9 5 °C での完全変性、続く以下の通りの次の 2 8 サイクル：9 5 °C での 4 5 秒間にわたる変性、4 5 °C での 4 5 秒間にわたるアニーリング、7 2 °C での 1 分間にわたる伸長及び 7 2 °C での更に 1 0 分間にわたる最終伸長。両方の P C R 産物をゲル溶出させ、E 4 F p 1 及び T C S _ S A K R p 4 (これらのプライマーの配列については表 3、すなわち表の配列番号 1 3 及び 1 6 番を参照のこと) の助けを借りた、E G F _ T C S _ S A K 遺伝子ブロックの増幅のための一般的なオーバーラップエクステンション P C R 反応に以下の条件下で供した：9 5 °C での完全変性、続く 9 5 °C での 4 5 秒間にわたる変性、4 5 °C での 4 5 秒間にわたるアニーリング、7 2 °C での 2 分間にわたる伸長 (2 8 サイクル) 及び 7 2 °C での更に 1 0 分間にわたる最終伸長。得られた遺伝子ブロックは X h o I 制限部位をその 5' 端に、また N o t I 部位をその 3' 端に含有した。この P C R 産物を X h o I 及び N o t I 酵素で消化し、p E T 2 3 - d におけるクローニングに続くトロンピン切断可能配列の正しいインフレーム挿入についてシーケンシングした後、p P I C - 9 K にライゲーションした。

【 0 1 7 5 】

表 3 . 様々な E G F 4、5、6 及び S A K 融合構築物の調製に使用するプライマー

10

20

30

40

【表 3 - 1】

番号	SEQ ID 番号	プライマー 名	プライマー配列
1	SEQ Q	N_EGF_S AK Fp 1	5'ATGGATCTCGAGAAAAGAGTGGACCCGTGCTTCAGA 3'

【表 3 - 2】

	ID 55		
2	SE Q ID 56	N_EGF_S AK Rp 2	5'ATATTTTCTTTGTCTGAATGAACTTGACATGCCGGAGTCACA GTC 3'
3	SE Q ID 57	N_EGF_S AK Fp3	5'GACTGTGACTCCGGCATGTCAAGTTCATTTCGACAAAGGAAA ATAT 3'
4	SE Q ID 58	N_EGF_S AK Rp 4	5'TTATATCGCGGCCGCTTATTTCTTTTCTATAACAACCTTT 3'
5	SE Q ID 59	SAK_EGF Fp 1	5'ATCCCTCTCGAGAAAAGATCAAGTTCATTTCGACAAAGGAA 3'
6	SE Q ID 60	SAK_EGF Rp 2	5'AGTTGGCTCTGAAGCACGGGTCCACGGGCTCTTTCTTTTCTA TAACAACCTT3'
7	SE	SAK_EGF	5'AAGGTTGTTATAGAAAAGAAAGAGCCCGTGGACCCGTGCTT

10

20

30

40

【表 3 - 3】

	Q ID 61	Fp 3	CAGAGCCAACT 3'
8	SE Q ID 62	SAK_EGF Rp 4	5'TTTTACGCGGCCGCTCCTGAGTCACAGTCTGTGCCAATGT 3'
9	SE Q ID 63	BacFp 1	5'ATATAGGCCATGGGTGGACCCGTGCTTCAGAGCCAACT 3'
10	SE Q ID 64	BacRp 2	5'CCTATATCTCGAGTTTCTTTTCTATAACAACCTTT 3'
11	SE Q ID 65	SAK_bac Fp1	5'ATGGATCCATGGTCAAGTTCATTCGACAAAGGAAAATATA 3'
12	SE Q ID 66	SAK_bac Rp2	5'TATATTCTCGAGTCCTGAGTCACAGTCTGTGCCAATGT 3'

10

20

30

40

【表 3 - 4】

13	SE Q ID 67	E 4 Fp 1	5'ATGGATCTCGAGAAAAGAGTGGACCCGTGCTTCAGA 3'
14	SE Q ID 68	E6 Rp 2	5' CCGACAATTCTAGGTTTAATGCCGGAGTCACAGT-CAGTGCCAA3'
15	SE Q ID 69	TCS SAK Fp 3	5'GGCATTAAACCTAGAATTGTCGGATCAAGTTCATTTCGATAA AGGAAAAT 3
16	SE Q ID 70	TCS SAK Rp4	5'TTATATCGCGCCGCTTATTTCTTTTCTATAACAACCTTT 3'

10

20

30

【 0 1 7 6 】

実施例 6

T P A - E G F 及び S A K - E G F 融合構築物の生物学的活性：

E G F と t P A との異なるハイブリッド遺伝子構築物（化学的に合成した（N__E G F__t P A__E G F）ハイブリッド t P A 融合構築物（E G F 4、5、6 を挿入して t P A の内因性ドメイン、すなわち e g f 及びクリングル 1 を置き換えた）、内的欠失型の t P A と E G F との融合体（内因性 e g f 及びクリングル 1 が欠失し、E G F 4、5、6 は N 又は C 末端（at either N and C terminii）で融合）及び上記の構築物の酸化耐性バリエーション）を、本質的に上述したように p P I C - 9 K ベクターの - 分泌シグナル配列の上流でインフレームでクローニングした。各構築物を制限エンドヌクレアーゼにより別々にチェックし、また D N A シーケンシングにより検証した。これらの構築物全てを個々にピチア・パストリス（G S 1 1 5）に電気穿孔法により移した（「実施例で用いた一般的な方法」のセクションを参照のこと）。個々のクローンを B M G Y 及び B M M Y 培地（B M G Y = 1 % 酵母抽出物、2 % ペプトン、1 X グリセロール、1 X アミノ酸非含有酵母ニトロゲンベース及び 1 0 0 m M リン酸カリウム緩衝液 p H 5 . 5、B M M Y = 1 % 酵母抽出物、2 % ペプトン、1 X メタノール、1 X アミノ酸非含有酵母ニトロゲンベース及び 1 0 0 m M リン酸カリウム緩衝液 p H 5 . 5）上で 5 日間にわたって、メタノールで誘導しながら成長させ、上清をカゼインオーバーレイ法によりプラスミノーゲン活性化能について試験した（「実施例で用いた方法」のセクションを参照のこと）。これとは別に、各陽性クローンの上清をプラスミノーゲン活性化について一段階アッセイにおいて試験し

40

50

た。次に、各高活性クローンを1リットルレベルで成長させ、各タンパク質中のtPAポリペプチドの存在をウェスタンブロット法により検証し、リジン親和性及びイオン交換クロマトグラフィが続いた(詳細なプロトコルについては「実施例で用いた方法」を参照のこと)。クロマトグラフィにより得られた異なる融合構築物は、SDS-PAGEにより92~95%純粋であった。これらの精製されたタンパク質をプラスミノーゲン活性化アッセイに供した。精製された各タンパク質の比活性はピチア由来の未変性の組織プラスミノーゲン活性化因子と極めて似ていた。しかしながら、フィンガー、e.g.f、クリングル1及びクリングル2ドメインを欠失させてEGF4、5、6ドメインに置き換えた構築物はカゼインオーバーレイ法では比較的弱い加水分解領域を示し、また概して、プラスミノーゲン及び発色基質を使用した定量的マイクロタイタープレートベースとしたアッセイでは比較的低いプラスミノーゲン活性化因子活性を示した。更に、内的に欠失した構築物における可溶性フィブリンの存在下で見られる活性における刺激の程度は、EGFの融合がtPAの末端であったtPA/tPA変異体と比較してはるかに低かった。tPA変異体(アスパラギンに変更となったスレオニン115番アミノ酸(T115N)、グルタミンに変更となったアスパラギン129番アミノ酸(N129Q)及びtPAのKHRRコード化領域、すなわち4重アラニン変異列に置き換えられた残基308~311(KHRR(308~311AAAA、上の実施例を参照のこと))を含有)の場合、プラスミノーゲン活性化因子活性は「基礎」活性及び可溶性フィブリンの存在下でのその刺激の両方の観点で未変性様であった。同時に、この構築物は、トロンピン阻害及びタンパク質C活性化の明確に定義されたアッセイにおいて最も高いトロンピン阻害特性を示した(「実施例で用いた方法」のセクションを参照のこと)。対照的に、凝固時間アッセイでチェックするトロンピン阻害(高マイクロモル濃度による未変性のtPAの存在又は不在下のフィブリン網形成)は本質的に緩衝液のコントロールと比較して変化せず、ナノモル濃度の、上記の「四重アラニン」変異体あるいはEGF4、5、6をtPAに異なる場所に内的に又は端部で組み込むことを含めた異なる精製キメラ構築物の添加により凝固時間が用量依存的に著しく増加した。凝固における観察された増加は、いずれかの端部で融合したEGFドメインと比較してN__EGF__tPA__EGF構築物においてより顕著であった。このタイプの作用はトロンピン介在タンパク質C活性化アッセイでも観察され、N__EGF__tPA__EGにより産生されたタンパク質Cの量は1つのEGF4、5、6ドメインを含有するtPA融合構築物及び内的に融合したEGF-tPA構築物より概して2~4倍高かった。別の結果では、EGF-tPA融合体のEGF部位にメチオニン置換がある酸化耐性形態をそのトロンピン介在タンパク質C活性化能について比較した場合、メチオニンをバリンで置き換えた酸化耐性形態は常に15~20%高いタンパク質C活性化を示した。

【0177】

同様に、スタフィロキナーゼ及びEGF融合構築物を調製し、ピチア・パストリス及びBL21 DE3細胞において発現させた。ピチア・パストリスにおけるストレプトキナーゼ発現及びその26番アミノ酸のグリコシル化は文献において報告されており、このグリコシル化はプラスミノーゲン活性化機能を妨げるようであり、ただし培養物をツニカマイシン含有培地の存在下で成長させると、未変性の細菌精製SAKと同様のプラスミノーゲン活性化プロファイルが得られる。この事実を考慮して、同じ遺伝子ブロックを細菌及びピチアの両方の発現について調製及び設計した。N末端及びC末端でのSAK-EGF融合のためにSAK及びEGF融合遺伝子ブロックを使用し、初期発現を大腸菌BL21 DE細胞において行い、ポリペプチド合成を1mM濃度のIPTGで誘導した(「実施例で用いた方法」を参照のこと)。最後に、EGF__SAK及びSAK__EGFが封入体の形態で得られ、これらのポリペプチドのためのリフォールディング条件を異なる比の酸化/還元グルタチオン及び他の溶液条件で最適化した(「実施例で用いた方法」を参照のこと)。並行させて、両方の構築物をピチア・パストリスにおいてツニカマイシンの存在下で発現させた。最後に、両方の方法を通じて得られた融合ポリペプチドを精製し、プラスミノーゲン活性化、トロンピン阻害及びタンパク質C活性化アッセイに供した。一方の

10

20

30

40

50

ピチア由来構築物のプラスミノゲン活性化、他方の大腸菌封入体から得られたリフォルディングされた融合構築物は本質的に同じであるが、トロンピン阻害及びタンパク質C活性化の場合、ピチア由来EGF__SAK及びSAK__EGFポリペプチドは大腸菌由来タンパク質と比較して約2倍、活性が高いだけであった。背景にある原因、すなわち酸化条件の存在下、特にリフォルディング中のEGFのメチオニン酸化を定量アミノ酸分析により検証した。酸化及び活性の減退(dimunition)問題は、上の実施例で記載したように、ハイブリッドのEGFセクションにおける部位特異的変異誘発によりメチオニンの代わりにバリンを置くことによって解決した。

【0178】

本発明の利点

本発明は、当該分野で使用されている抗トロンピン血栓溶解剤より有利である。組織プラスミノゲン活性化因子のクリングル、アルギニン(R)、グリシン(G)及びアスパラギン酸(D)を含有するペプチド配列並びにヒルジンの抗トロンピン部をスタフィロキナーゼのC末端に導入して抗トロンピン血栓溶解剤を作ろうとの試みがこれまでなされてきて、これはこの形態のスタフィロキナーゼが、「RGDペプチド」、tPA由来クリングルによるフィブリン親和性上昇及び早期の一時的に生成されるトロンピンの阻害を通じて抗トロンピン特性を付与するトロンピン不活性化ヒルジン部による血小板阻害に役立つということを前提としている(Szemraj, Walkowiak et al. 2005)。血栓溶解後の再閉塞問題に対抗するために、組織因子及び第VII因子を阻害する組み換えリポタンパク質関連凝固阻害因子(LACI)を通じた試みもなされた(Haskell, Torret et al. 1991)。これは組織因子との不活性複合体の形成に役立つが、一時的な血餅に結合したトロンピンを妨害することはできない。

【0179】

しかしながら、本発明において、両方の種類(早期の一時的なトロンピン、また凝血原産タンパク質C経路)のプラスミノゲン活性化及びトロンピン阻害特性を有する戦略的に設計した新世代の血栓溶解剤を設計し、検証した。

【0180】

心筋梗塞/循環器疾患に現在適用できる薬物療法では、ヘパリン、ヒルジン及び他のトロンピン阻害剤の同時投与を必要とするが、入手可能な/市販のトロンピン阻害剤は一時的に産生されたトロンピンを標的としており、トロンピンのフィードバック産生を阻害しない。

【0181】

現在利用できる薬物療法とは対照的に、発明者は、新種の改善された血栓溶解剤を戦略的に設計した。この血栓溶解剤はトロンピン阻害機能を同時に、そのプラスミノゲン活性化特性特異性とは別に発揮することができるため、フィブリン強化(tPAの場合のように)等の本来の特性を損なわないことだけでなく追加の特性(「親」分子に何も存在しない場合のプラスミン及びトロンピン依存性活性化等)も伴うことなく血餅溶解中の望ましくない副作用を防止するのに役立つ。元々の分子に非特異的プラスミノゲン活性化がある場合(ストレプトキナーゼの場合のように)、発明者は、抗トロンピン特性とは別に血餅特異性を示すハイブリッド構築物を設計した。

【0182】

本発明において、発明者はストレプトキナーゼ、スタフィロキナーゼ及び組織プラスミノゲン活性化因子等の血栓溶解剤の非天然のキメラ型を開示し、これらは線維素溶解及び抗トロンピンの両方の能力を有する。既に知られている、第2及び第3世代組み換え物を含むこれらの構築物の「親」分子は血餅を溶解させることはできるが、再血栓症の主な原因であるトロンピンの活性を抑制することはできない。本発明の構築物はフィブリン塊を溶解させるだけではなく、直接トロンピンを抑制し、またトロンピンが平衡を内因性トロンボモジュリン触媒抗凝固経路を通じてシフトさせる場合にタンパク質Cを活性化する。

【0183】

10

20

30

40

50

本発明において、一実施形態において、EGF 4、5、6ドメインをストレプトキナーゼ分子内の異なるドメイン接合部に、適切なリンカーの配置の後に又は天然のドメイン間リンカーの代わりに導入した。異なる活性構築物を次にプラスミノゲン活性化プロファイル及びトロンピン阻害特性に基づいて選択した。同様に、様々な組み合わせ/モチーフのEGFドメインと融合したSKの様々なムテインを創り出し、発現させ、次に単純なアッセイ系を用いてスクリーニングし、所望の特性を有する機能的に存続しているキメラを選択した。

【0184】

EGF 4、5、6をそのN末端で融合させた場合のストレプトキナーゼ(最も高い血栓溶解能を有する薬剤分子)で観察される興味深くも有用な現象は、キメラ構築物が遅延したプラスミノゲン活性化動態を示し、この活性化の遅延が、少量のプラスミンが反応混合物中に存在する場合に著しく減少したことである。これらのキメラ構築物がプラスミン依存性活性化(無修飾の未変性のストレプトキナーゼによるプラスミノゲンの「自発的な」酵素原活性化とは反対に)を示したという偶然の観察結果は、得られた分子を血餅特異性にもし、最初は不活性な状態で循環するが(抗プラスミンセルピンによって迅速に不活性化されるため、通常、血中に遊離のプラスミンはないため)、血餅に結合したプラスミンに遭遇すると、そのプラスミン依存性作用機序により活性化される。この結果、SKの出血リスクが大きく抑制され、またEGFドメインの機能的融合によって付与されるものに加えて、広く使用されている薬剤に更なる利点加わる。

【0185】

本発明による他の興味深い構築物は、一方でストレプトキナーゼのアルファ()及びベータ()ドメイン、また他方でベータ()及びガンマ()ドメインのドメイン間接合部でのEGF 4、5、6ドメインの融合によって得られた。これらの構築物の中でも、発明者は、EGFをドメインとドメインとの間に融合した場合にのみプラスミノゲン活性化及び抗トロンピン活性を発見した。興味深いことに、EGFドメインをドメインとドメインとの間に導入した融合構築物はプラスミン活性を示さなかった。これらの結果は、所定のドメイン融合設計により「親」特性が共存できるか否かは、実際に実験により試験しない限り、アプライオリに予測できないことを示唆している。

【0186】

N末端EGF-SK融合構築物及び短縮SK(残基5~383)とのEGFドメインのN末端融合構築物で観察された利点は、トロンピン不活性化に加えたそのはっきりとしたプラスミン依存性活性化特性であり、これは血餅特異的な血栓溶解及びトロンピン不活性化にとって潜在的に大きな利点である。

【0187】

EGF 4、5、6ドメインをスタフィロキナーゼのN末端及びC末端領域と融合させた場合、N末端部が1:1プラスミン複合体の形成中に除去されることが観察された。これは溶解中のEGFドメインの独立した機能及び高レベルの血餅特異性を生み出すことにおいて有用であると考えられる。C末端EGF融合の場合、SAKに付着したままであることが判明した。このため、両方のケースにおいて、プラスミノゲン活性化及び抗血栓特性はキメラポリペプチドにうまく組み込まれたと判明した。

【0188】

本発明の化合物を含む組成物はプロドラッグ形態をとり得る。本発明の化合物のプロドラッグは本発明の方法において有用である。生体内で変換されて本発明の化合物の生物学的、薬学的又は治療的に活性な形態になる化合物がプロドラッグである。プロドラッグの様々な例及び形態が当該分野で周知である。前駆体タンパク質又は前駆体核酸等の生体分子がプロドラッグになり得る。プロドラッグの例は、とりわけ、H. Bundgaard 編集の *Design of Prodrugs* (Elsevier, 1985)、K. Widders が編集の *Methods in Enzymology, Vol. 42, pp. 309-396* (Academic Press, 1985)、Krosgaard-Larsen 及び H. Bundgaard が編集の *A Textbook of Dr*

10

20

30

40

50

ug Design and Development, Chapter 5、H. Bundgaardによる” Design and Application of Prodrugs, ” pp. 113 - 191, 1991、H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 8, p. 1 - 38 (1992)、H. Bundgaard, et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 77, p. 285 (1988)及びNogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, pp. 388 - 392に記載される。

【0189】

本発明を様々な具体的且つ好ましい実施形態及び技法を参照しながら説明してきた。しかしながら、本発明の趣旨及び範囲内に留まりながらも多くの変更及び修正を加え得ることを理解すべきである。当業者には、本明細書で具体的に記載したものの以外の組成物、方法、デバイス、デバイス構成要素、材料、手順及び技法を、過度に実験をしなくても本明細書において広く開示した本発明の実施に適用できることが明らかである。本明細書に記載の組成物、方法、デバイス、デバイス構成要素、材料、手順及び技法の当該分野で公知の全ての機能的均等物が本発明に含まれるとする。範囲を開示する場合、全ての部分範囲及び個々の値が含まれるとする。図面において図示した又は明細書において例示したものの全てを含め、本発明は開示の実施形態によって限定されることがなく、これらは例として又は図解として提供され、限定のためのものではない。本発明の範囲は請求項によってのみ限定される。

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔1〕キメラタンパク質構築物であって、

ストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子、スタフィロキナーゼ、ウロキナーゼ並びにこれらの誘導体及び類似体から成る群から選択される血栓溶解タンパク質に融合したトロンボモジュリンの4、5及び6上皮増殖因子様ドメイン(EGF4、5、6)を含むことを特徴とするキメラタンパク質構築物。

〔2〕前記トロンボモジュリンEGF4、5、6ドメインが、前記血栓溶解タンパク質又はその誘導体若しくは類似体に、前記血栓溶解タンパク質又はその誘導体若しくは類似体のN末端、C末端又はN及びCの両方の末端で融合する、前記〔1〕に記載のキメラタンパク質構築物。

〔3〕前記血栓溶解タンパク質が1つ以上のアミノ酸置換、挿入、欠失又は切断を有するストレプトキナーゼを含み、また前記構築物がプラスミノゲン活性化、トロンピン阻害及び抗凝固タンパク質C経路活性化活性を有する、前記〔1〕に記載のキメラタンパク質構築物。

〔4〕前記トロンボモジュリンEGF4、5、6ドメインが前記ストレプトキナーゼのアルファドメインとベータドメインとの間又はベータドメインとガンマドメインとの間、あるいはストレプトキナーゼ誘導体又は類似体のアルファドメインとベータドメインとの間又はベータドメインとガンマドメインとの間で融合し、前記ストレプトキナーゼ誘導体又は類似体が1つ以上の変異、付加、挿入又は切断を含み、また前記構築物がプラスミノゲンを活性化し、トロンピンを阻害し、抗凝固タンパク質C経路を活性化する、前記〔1〕に記載のキメラタンパク質構築物。

〔5〕前記EGF4、5、6ドメインがストレプトキナーゼ又はストレプトキナーゼ誘導体若しくは類似体に、ストレプトキナーゼN末端、ストレプトキナーゼC末端、N及びCの両方のストレプトキナーゼ末端又はストレプトキナーゼのドメイン間位置から選択される1つ以上の位置にてインフレームで融合する、前記〔2〕に記載のキメラタンパク質構築物。

〔6〕前記ストレプトキナーゼ誘導体が残基5～383又は5～414に及び、前記〔5〕に記載のキメラタンパク質構築物。

〔 7 〕前記ストレプトキナーゼ誘導体が残基 1 6 ~ 3 8 3 に及ぶ、前記〔 6 〕に記載のキメラタンパク質構築物。

〔 8 〕前記 E G F 4、5、6 ドメインがストレプトキナーゼ N 末端、ストレプトキナーゼ C 末端又は N 及び C の両方のストレプトキナーゼ末端から選択される 1 つ以上の位置にてインフレームで融合し、前記 E G F 4、5、6 ドメインの M e t 4 1 がバリン、アラニン又はグルタミンに置き換えられ、あるいは C 末端 M e t 4 3 5 がバリン、アラニン又はグルタミンに置き換えられ、あるいは同時 N 及び C 末端融合構築物において、M e t 4 1 及び M e t 4 3 5 が独立してバリン、アラニン又はグルタミンに置き換えられる、前記〔 2 〕に記載のキメラタンパク質構築物。

〔 9 〕トランスグルタミナーゼ認識配列を更に含む、前記〔 1 〕に記載のキメラタンパク質構築物。

10

〔 1 0 〕前記 E G F 4、5、6 ドメインと前記血栓溶解タンパク質又はその誘導体若しくは類似体との接合部に 1 つ以上のトロンピン切断可能配列を更に含む、前記〔 1 〕に記載のキメラタンパク質構築物。

〔 1 1 〕哺乳動物において血栓症を治療する方法であって、治療を必要とする該哺乳動物に治療有効量の前記〔 1 〕~〔 1 0 〕のいずれかに記載のキメラタンパク質構築物を投与することを含むことを特徴とする方法。

〔 1 2 〕キメラタンパク質構築物であって、組織プラスミノゲン活性化因子 (t P A) 誘導体、類似体又はフラグメントに、前記 t P A 誘導体、類似体又はフラグメントの N 末端で融合、前記 t P A 誘導体、類似体又はフラグメントの C 末端で融合、前記 t P A 誘導体、類似体又はフラグメントの両方の末端で融合、あるいは前記 t P A 誘導体、類似体又はフラグメント内で内的に融合したトロンボモジュリンの E G F 4、5、6 ドメインを含むことを特徴とするキメラタンパク質構築物。

20

〔 1 3 〕前記 E G F 4、5、6 ドメインと前記 t P A 誘導体、類似体又はフラグメントとの融合が 1 つ以上のリンカーフラグメントを更に含む、前記〔 1 2 〕に記載のキメラタンパク質構築物。

〔 1 4 〕前記 1 つ以上のリンカーフラグメントが構築物の柔軟性を促進する 1 つ以上のアミノ酸を含む、前記〔 1 3 〕に記載のキメラタンパク質構築物。

〔 1 5 〕前記 t P A 誘導体、類似体又はフラグメントが 1 つ以上の変異、付加、挿入又は切断を含み、前記 t P A 誘導体、類似体又はフラグメントがプラスミノゲンを活性化し、トロンピンを阻害し、抗凝固タンパク質 C を活性化させる、前記〔 1 2 〕に記載のキメラタンパク質構築物。

30

〔 1 6 〕1 つ以上のトロンボモジュリン E G F 4、5、6 ドメインに融合した組織プラスミノゲン活性化因子 (t P A) のフラグメント又はその切断若しくは修飾形態を含むため、t P A の E G F ドメインが前記 1 つ以上のトロンボモジュリン E G F 4、5、6 ドメインに置き換えられ、また抗トロンピン及びプラスミノゲン活性化の両方の活性を有する、前記〔 1 2 〕に記載のキメラタンパク質構築物。

〔 1 7 〕1 つ以上のトロンボモジュリン E G F 4、5、6 ドメインに融合した組織プラスミノゲン活性化因子 (t P A) のフラグメント又はその切断若しくは修飾形態を含むため、t P A のクリングル 1 及び E G F ドメインが前記 1 つ以上のトロンボモジュリン E G F 4、5、6 ドメインに置き換えられ、また抗トロンピン及びプラスミノゲン活性化の両方の活性を有する、前記〔 1 2 〕に記載のキメラタンパク質構築物。

40

〔 1 8 〕前記 t P A E G F ドメイン及びクリングル 1 ドメインが前記 t P A フラグメントの N 末端又は C 末端で 1 つ以上のトロンボモジュリン E G F 4、5、6 ドメインに置き換えられる、前記〔 1 7 〕に記載のキメラタンパク質構築物。

〔 1 9 〕1 つ以上のリンカーフラグメントを前記 t P A フラグメント又はその切断若しくは修飾形態と前記トロンボモジュリン E G F 4、5、6 ドメインとの間に更に含み、前記リンカーフラグメントが、構築物がトロンピン阻害、タンパク質 C 活性化及びプラスミノゲン活性化能を有するように構築物の柔軟性を促進するアミノ酸残基を含む、前記〔 1

50

7) 又は〔18〕のいずれかに記載のキメラタンパク質構築物。

〔20〕前記EGF4、5、6成分のメチオニン41がアラニン、バリン又はグルタミンに置き換えられる、前記〔17〕～〔19〕のいずれかに記載のキメラタンパク質構築物。

〔21〕キメラタンパク質構築物であって、

スタフィロキナーゼ(SAK)のN末端側又はC末端側の端にインフレームで融合したトロンボモジュリンのEGF4、5、6ドメインを含むことを特徴とするキメラタンパク質構築物。

〔22〕前記トロンボモジュリンEGF4、5、6ドメインのメチオニン41がアラニン、バリン又はグルタミンに置き換えられる、前記〔21〕に記載のキメラタンパク質構築物。

10

〔23〕トロンピン切断可能配列を前記SAKと前記EGF4、5、6ドメイン領域との間に更に含む、前記〔21〕又は〔22〕のいずれかに記載のキメラタンパク質構築物。

〔24〕トランスグルタミナーゼ架橋配列を更に含む、前記〔22〕～〔23〕のいずれかに記載のキメラタンパク質構築物。

〔25〕水溶液又は生理食塩水に可溶性である、前記〔1〕～〔10〕又は〔12〕～〔24〕のいずれかに記載のキメラタンパク質構築物。

〔26〕トロンピンを阻害する方法であって、

前記〔1〕～〔10〕又は〔12〕～〔24〕のいずれかに記載のキメラタンパク質構築物の使用を含むことを特徴とする方法。

20

〔27〕タンパク質Cを活性化する方法であって、

前記〔1〕～〔10〕又は〔12〕～〔24〕のいずれかに記載のキメラタンパク質構築物の使用を含むことを特徴とする方法。

〔28〕抗トロンピン及びプラスミノゲン活性化の両方をもたらす方法であって、

前記〔1〕～〔10〕又は〔12〕～〔24〕のいずれかに記載のキメラタンパク質構築物の使用を含むことを特徴とする方法。

〔29〕医薬製剤であって、

薬学的有効量の前記〔1〕～〔10〕又は〔12〕～〔24〕のいずれかに記載のキメラタンパク質構築物を含むことを特徴とする医薬製剤。

〔30〕哺乳動物における血栓溶解の方法であって、

それを必要とする該哺乳動物に治療有効量の前記〔1〕～〔10〕又は〔12〕～〔24〕のいずれかに記載のキメラタンパク質構築物をそれを必要とする患者に投与することを特徴とする方法。

30

〔31〕細菌系における発現によって調製される、前記〔1〕～〔10〕又は〔12〕～〔24〕のいずれかに記載のキメラ構築物。

〔32〕真核生物系における発現によって調製される、前記〔1〕～〔10〕又は〔12〕～〔24〕のいずれかに記載のキメラ構築物。

〔33〕前記真核生物発現系が、動物細胞、ピチア・パストリス及び真菌から成る群から選択される、前記〔32〕に記載のキメラ構築物。

〔34〕細胞外媒体に分泌される、前記〔33〕に記載のキメラタンパク質構築物。

40

〔35〕1つ以上のアミノ酸が、Gly、Asn、Pro、Ser、Gln、Arg及びLysから成る群から選択される、前記〔13〕に記載のキメラタンパク質構築物。

〔36〕核酸配列であって、

前記〔1〕～〔10〕、〔12〕～〔25〕又は31～35のいずれかに記載のキメラタンパク質構築物をコードしていることを特徴とする核酸配列。

〔37〕ベクターであって、

前記〔36〕に記載の核酸配列を含むことを特徴とするベクター。

〔38〕宿主細胞であって、

前記〔37〕に記載のベクターを含むことを特徴とする宿主細胞。

〔39〕宿主細胞発現系における前記タンパク質をコードしている核酸配列の発現によ

50

て調製される、前記〔1〕～〔10〕、〔12〕～〔25〕又は31～35のいずれかに記載のキメラタンパク質構築物。

〔40〕前記〔1〕～〔10〕及び〔12〕～〔25〕又は31～35のいずれかに記載のキメラタンパク質構築物を調製する方法であって、

宿主細胞発現系における該タンパク質をコードしている核酸配列の発現によることを特徴とする方法。

〔41〕前記宿主細胞発現系が真核生物発現系である、前記〔40〕に記載の方法。

〔42〕前記宿主細胞発現系が細菌発現系である、前記〔41〕に記載の方法。

〔43〕前記細菌が大腸菌である、前記〔42〕に記載の方法。

〔44〕前記真核生物発現系が動物細胞又は酵母細胞である、前記〔43〕に記載の方法

10

。

〔45〕前記酵母がピチア・パストリスである、前記〔44〕に記載の方法。

〔46〕前記キメラタンパク質構築物が前記宿主細胞から細胞外媒体に分泌される、前記〔40〕～〔45〕のいずれかに記載の方法。

【0190】

参考文献

- Aneja, R., M. Datt, et al. (2009). "Identification of a new exosite involved in catalytic turnover by the streptokinase-plasmin activator complex during human plasminogen activation." J Biol Chem**284**(47): 32642-32650.
- Bajaj, A. P. and F. J. Castellino (1977). "Activation of human plasminogen by equimolar levels of streptokinase." J Biol Chem**252**(2): 492-498.
- Boxrud, P. D., I. M. Verhamme, et al. (2004). "Resolution of conformational activation in the kinetic mechanism of plasminogen activation by streptokinase." J Biol Chem**279**(35): 36633-36641. 10
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem**72**: 248-254.
- Buck, F. F., B. C. Hummel, et al. (1968). "Interaction of streptokinase and human plasminogen. V. Studies on the nature and mechanism of formation of the enzymatic site of the activator complex." J Biol Chem**243**(13): 3648-3654. 20
- Butenas, S. and K. G. Mann (2002). "Blood coagulation." Biochemistry (Mosc)**67**(1): 3-12.
- Cannon, C. P. and R. Tracy (1995). "Clotting for the Clinician: An Overview of Thrombosis and Antithrombotic Therapy." J Thromb Thrombolysis**2**(2): 95-106.
- Castellino, F. J. and J. R. Powell (1981). "Human plasminogen." Methods Enzymol**80 Pt C**: 365-378. 30
- Collen, D. and H. R. Lijnen (1990). "Molecular mechanisms of thrombolysis: implications for therapy." Biochem Pharmacol**40**(2): 177-186.
- Dahlback, B. and B. O. Villoutreix (2005). "The anticoagulant protein C pathway." FEBS Lett**579**(15): 3310-3316.
- Davidson, D. J., D. L. Higgins, et al. (1990). "Plasminogen activator activities of equimolar complexes of streptokinase with variant recombinant plasminogens." Biochemistry**29**(14): 3585-3590. 40

- De Renzo, E. C., E. Boggiano, et al. (1967). "Interaction of streptokinase and human plasminogen. IV. Further gel electrophoretic studies on the combination of streptokinase with human plasminogen or human plasmin." J Biol Chem**242**(10): 2428-2434.
- Eisenberg, P. R., J. P. Miletich, et al. (1988). "Differential effects of activation of prothrombin by streptokinase compared with urokinase and tissue-type plasminogen activator (t-PA)." Thromb Res**50**(5): 707-717.
- Esmon, C. T. (1989). "The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation." J Biol Chem**264**(9): 4743-4746. 10
- Esmon, C. T. and W. G. Owen (1981). "Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C." Proc Natl Acad Sci U S A**78**(4): 2249-2252.
- Ewald, G. A. and P. R. Eisenberg (1995). "Plasmin-mediated activation of contact system in response to pharmacological thrombolysis." Circulation**91**(1): 28-36. 20
- Francis, C. W. and V. J. Marder (1991). "Fibrinolytic therapy for venous thrombosis." Prog Cardiovasc Dis**34**(3): 193-204.
- Goyal, D., D. K. Sahoo, et al. (2007). "Hydrophobic interaction expanded bed adsorption chromatography (HI-EBAC) based facile purification of recombinant streptokinase from E. coli inclusion bodies." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**850**(1-2): 384-391.
- Grella, D. K. and F. J. Castellino (1997). "Activation of human plasminogen by staphylokinase. Direct evidence that preformed plasmin is necessary for activation to occur." Blood**89**(5): 1585-1589. 30
- Haskel, E. J., S. R. Torr, et al. (1991). "Prevention of arterial reocclusion after thrombolysis with recombinant lipoprotein-associated coagulation inhibitor." Circulation**84**(2): 821-827.
- Ho, S. N., H. D. Hunt, et al. (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." Gene**77**(1): 51-59. 40

- Hogg, P. J. and C. M. Jackson (1989). "Fibrin monomer protects thrombin from inactivation by heparin-antithrombin III: implications for heparin efficacy." Proc Natl Acad Sci U S A86(10): 3619-3623.
- Huntington, J. A. (2003). "Mechanisms of glycosaminoglycan activation of the serpins in hemostasis." J Thromb Haemost1(7): 1535-1549.
- Kumar, R., S. Beguin, et al. (1994). "The influence of fibrinogen and fibrin on thrombin generation--evidence for feedback activation of the clotting system by clot bound thrombin." Thromb Haemost72(5): 713-721. 10
- Kurosawa, S., J. B. Galvin, et al. (1987). "Proteolytic formation and properties of functional domains of thrombomodulin." J Biol Chem262(5): 2206-2212.
- Kurosawa, S., D. J. Stearns, et al. (1988). "A 10-kDa cyanogen bromide fragment from the epidermal growth factor homology domain of rabbit thrombomodulin contains the primary thrombin binding site." J Biol Chem263(13): 5993-5996. 20
- Lee, C. D. and K. G. Mann (1989). "Activation/inactivation of human factor V by plasmin." Blood73(1): 185-190.
- Lijnen, H. R. and D. Collen (1988). "New strategies in the development of thrombolytic agents." Blut57(4): 147-162.
- Liu, C. Y., H. L. Nossel, et al. (1979). "The binding of thrombin by fibrin." J Biol Chem254(20): 10421-10425. 30
- Lougheed, J. C., C. L. Bowman, et al. (1995). "Thrombin inhibition by cyclic peptides from thrombomodulin." Protein Sci4(4): 773-780.
- Loy, J. A., X. Lin, et al. (2001). "Domain interactions between streptokinase and human plasminogen." Biochemistry40(48): 14686-14695.
- Malke, H. and J. J. Ferretti (1984). "Streptokinase: cloning, expression, and excretion by *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A81(11): 3557-3561. 40

- McCance, S. G., N. Menhart, et al. (1994). "Amino acid residues of the kringle-4 and kringle-5 domains of human plasminogen that stabilize their interactions with omega-amino acid ligands." J Biol Chem**269**(51): 32405-32410.
- McClintock, D. K. and P. H. Bell (1971). "The mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase." Biochem Biophys Res Commun**43**(3): 694-702.
- Mehta, R. K. and J. Singh (1999). "Bridge-overlap-extension PCR method for constructing chimeric genes." Biotechniques**26**(6): 1082-1086. 10
- Meininger, D. P., M. J. Hunter, et al. (1995). "Synthesis, activity, and preliminary structure of the fourth EGF-like domain of thrombomodulin." Protein Sci**4**(9): 1683-1695.
- Misawa, S. and I. Kumagai (1999). "Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies." Biopolymers**51**(4): 297-307.
- Norden, K., M. Agemark, et al. (2011). "Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*." BMC Biotechnol**11**(1): 47. 20
- Ohman, E. M., R. M. Califf, et al. (1990). "Consequences of reocclusion after successful reperfusion therapy in acute myocardial infarction. TAMI Study Group." Circulation**82**(3): 781-791.
- Owen, W. G. and C. T. Esmon (1981). "Functional properties of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C." J Biol Chem**256**(11): 5532-5535. 30
- Parry, M. A., X. C. Zhang, et al. (2000). "Molecular mechanisms of plasminogen activation: bacterial cofactors provide clues." Trends Biochem Sci**25**(2): 53-59.
- Puri, R. N., A. Kumar, et al. (1995). "Inhibition of ADP-induced platelet responses by covalent modification of aggregin, a putative ADP receptor, by 8-(4-bromo-2,3-dioxobutylthio)ADP." J Biol Chem**270**(41): 24482-24488.
- Qiu, J., J. R. Swartz, et al. (1998). "Expression of active human tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*." Appl Environ Microbiol**64**(12): 4891-4896. 40

- Ramchuran, S. O., B. Mateus, et al. (2005). "The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a host for the expression and production of thermostable xylanase from the bacterium *Rhodothermus marinus*." FEMS Yeast Res5(9): 839-850.
- Riener, C. K., G. Kada, et al. (2002). "Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine." Anal Bioanal Chem373(4-5): 266-276.
- Salem, H. H., I. Maruyama, et al. (1984). "Isolation and characterization of thrombomodulin from human placenta." J Biol Chem259(19): 12246-12251. 10
- Sazonova, I. Y., A. K. Houg, et al. (2001). "The mechanism of a bacterial plasminogen activator intermediate between streptokinase and staphylokinase." J Biol Chem276(16): 12609-12613.
- Schaller, J. and S. S. Gerber (2011). "The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects." Cell Mol Life Sci68(5): 785-801. 20
- Sharma, R. C. and R. T. Schimke (1996). "Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium." Biotechniques20(1): 42-44.
- Stearns, D. J., S. Kurosawa, et al. (1989). "Microthrombomodulin. Residues 310-486 from the epidermal growth factor precursor homology domain of thrombomodulin will accelerate protein C activation." J Biol Chem264(6): 3352-3356.
- Szemraj, J., B. Walkowiak, et al. (2005). "A new recombinant thrombolytic and antithrombotic agent with higher fibrin affinity--a staphylokinase variant. I. In vitro study." J Thromb Haemost3(10): 2156-2165. 30
- Vali, Z. and H. A. Scheraga (1988). "Localization of the binding site on fibrin for the secondary binding site of thrombin." Biochemistry27(6): 1956-1963.
- van Zonneveld, A. J., H. Veerman, et al. (1986). "Autonomous functions of structural domains on human tissue-type plasminogen activator." Proc Natl Acad Sci U S A83(13): 4670-4674. 40
- Verheijen, J. H., E. Mullaart, et al. (1982). "A simple, sensitive spectrophotometric assay for extrinsic (tissue-type) plasminogen activator applicable to measurements in plasma." Thromb Haemost48(3): 266-269.

- Verstraete, M. (1990). "Thrombolytic treatment in acute myocardial infarction." Circulation**82**(3 Suppl): II96-109.
- Wang, W. and B. A. Malcolm (1999). "Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis." Biotechniques**26**(4): 680-682.
- Wang, X., X. Lin, et al. (1998). "Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase." Science**281**(5383): 1662-1665. 10
- Wang, X., J. Tang, et al. (1999). "Crystal structure of streptokinase beta-domain." FEBS Lett**459**(1): 85-89.
- Weitz, J. I., M. Hudoba, et al. (1990). "Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors." J Clin Invest**86**(2): 385-391. 20
- Weitz, J. I., B. Leslie, et al. (1998). "Thrombin binds to soluble fibrin degradation products where it is protected from inhibition by heparin-antithrombin but susceptible to inactivation by antithrombin-independent inhibitors." Circulation**97**(6): 544-552.
- Wohl, R. C., L. Sinio, et al. (1983). "Comparative activation kinetics of mammalian plasminogens." Biochim Biophys Acta**745**(1): 20-31.
- Wohl, R. C., L. Summaria, et al. (1978). "Steady state kinetics of activation of human and bovine plasminogens by streptokinase and its equimolar complexes with various activated forms of human plasminogen." J Biol Chem**253**(5): 1402-1407. 30
- Yadav, S. and G. Sahni (2010). "Probing the primary structural determinants of streptokinase inter-domain linkers by site-specific substitution and deletion mutagenesis." Biochim Biophys Acta**1804**(9): 1730-1737.
- Ye, Q., M. N. Rahman, et al. (2001). "High-resolution crystal structure of apolipoprotein(a) kringle IV type 7: insights into ligand binding." Protein Sci**10**(6): 1124-1129. 40
- Zhang, T., X. Xu, et al. (2009). "Modeling of protein refolding from inclusion bodies." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**41**(12): 1044-1052.

【 0 1 9 1 】

(配列表)

S e q I D 1 = S K

attgctggac ctgagtggct gctagaccgt ccatctgtca acaacagcca attagttggt	60	
agcgttgctg gtactggtga ggggacgaat caagacatta gtcttaaatt ttttgaaatc	120	
gatctaacat cacgacctgc tcatggagga aagacagagc aaggcttaag tccaaaatca	180	
aaaccatttg ctactgatag tggcgcgatg tcacataaac ttgagaaagc tgacttacta	240	
aaggctattc aagaacaatt gatcgctaac gtccacagta acgacgacta ctttgaggtc	300	10
attgattttg caagcgatgc aaccattact gatcgaaacg gcaaggctca ctttgctgac	360	
aaagatggtt cggtaacctt gccgacccaa cctgtccaag aatttttgct aagcggacat	420	
gtgcgcgta gaccatataa agaaaaacca atacaaaacc aagcgaatc tgttgatgtg	480	
gaatatactg tacagtttac tcccttaaac cctgatgacg atttcagacc aggtctcaaa	540	
gatactaagc tattgaaaac actagctatc ggtgacacca tcacatctca agaattacta	600	
gctcaagcac aaagcatttt aaacaaaaac caccaggct atacgattta tgaacgtgac	660	20
tcctcaatcg tcaactcatga caatgacatt ttccgtacga tttaccaat ggatcaagag	720	
tttacttacc gtgttaaaaa tcgggaacaa gcttatagga tcaataaaaa atctggtctg	780	
aatgaagaaa taaacaacac tgacctgatc tctgagaaat attacgtcct taaaaaggg	840	
gaaaagccgt atgatccctt tgatcgcagt cacttgaaac tgttcacat caaatcgtt	900	
gatgtcgata ccaacgaatt gctaaaaagt gagcagctct taacagctag cgaacgtaac	960	30
ttagacttca gagatttata cgatcctcgt gataaggcta aactactcta caacaatctc	1020	
gatgcttttg gtattatgga ctatacctta actggaaaag tagaggataa tcacgatgac	1080	
accaaccgta tcataaccgt ttatatgggc aagcgaccgg aaggagagaa tgctagctat	1140	
catttagcct atgataaaga tcgttatacc gaagaagaac gagaagtta cagctacctg	1200	
cgttatacag ggacacctat acctgataac cctaacgaca aataa	1245	

Seq ID 2 = E G F

40

gtggacccgt gcttcagagc caactgcgag taccagtgcc agcccctgaa ccaaactagc	60
tacctctgcg tctgcgccga gggcttcgcg cccattcccc acgagccgca caggtgccag	120
atgttttgca accagactgc ctgtccagcc gactgcgacc ccaacaccca ggctagctgt	180
gagtgccttg aaggctacat cctggacgac ggtttcatct gcacggacat cgacgagtgc	240
gaaaacggcg gcttctgctc cggggtgtgc cacaacctcc ccggtacctt cgagtgcac	300
tgcgggcccg actcggccct tgcccgccac attggcaccg actgtgactc cggc	354

10

S e q I d 3 = ドメイン間 S K _ E G F
アルファ / ベータ間

attgctggac ctgagtggct gctagaccgt ccctctgtca acaacagcca attagttggt	60	
agcgttgctg gtactgttga ggggacgaat caagacatta gtcttaaatt ttttgaatc	120	
gatctaacat cacgacctgc tcatggagga aagacagagc aaggcttaag tccaaaatca	180	
aaaccatttg ctactgatag tggcgcgatg tcacataaac ttgagaaagc tgacttacta	240	
aaggctattc aagaacaatt gatcgtctaac gtccacagta acgacgacta ctttgaggtc	300	
attgattttg caagcgatgc aaccattact gatcgaaaag gcaaggtcta ctttgetgac	360	10
aaagatgggt cgtaacctt gccgacccaa cctgtccaag aatttttgct aagcggacat	420	
gtgcgcqcta gaccatataa agaaaaacca atacaaaacc aagcgaaatc tgagcccgtg	480	
gacccgtgct tcagagccaa ctgcgagtac cagtgcacgc ccctgaacca aactagctac	540	
ctctgcgtct gcgccgaggg ctctgcgcc attccccagc agccgcacag gtgccagatg	600	
ttttgcaacc agactgcctg tccagccgac tgcgacccca acaccaggc tagctgtgag	660	
tgccctgaag gctacatcct ggacgacggg ttcctctgca cggacatcga cgagtgcgaa	720	20
aacggcggct tctgctccgg ggtgtgccac aacctccccg gtaccttcga gtgcatctgc	780	
gggcccgact cggcccttgc ccgccacatt ggcactgact gtgactccgg cgttgatgtg	840	
gaatatactg tacagtttac tcccttaaac cctgatgacg atttcagacc aggtctcaaa	900	
gatactaagc tattgaaaac actagctatc ggtgacacca tcacatctca agaattacta	960	
gctcaagcac aaagcatttt aaacaaaaac caccaggct atacgattta tgaacgtgac	1020	
tcctcaatcg tcaactcatga caatgacatt ttccgtacga tttaccaat ggatcaagag	1080	30
tttacttacc gtgttaaaaa tcgggaacaa gcttatagga tcaataaaaa atctggtctg	1140	
aatgaagaaa taaacaacac tgacctgatc tctgagaaat attacgtcct taaaaaagg	1200	
gaaaagccgt atgatccctt tgatcgcagt cacttgaaac tgttcaccat caaatacgtt	1260	
gatgtcgata ccaacgaatt gctaaaaagt gagcagctct taacagctag cgaacgtaac	1320	
ttagacttca gagatttata cgatcctcgt gataaggcta aactactcta caacaatctc	1380	
gatgcttttg gtattatgga ctatacctta actggaaaag tagaggataa tcacgatgac	1440	40
accaaccgta tcataaccgt ttatatgggc aagcgaccog aaggagagaa tgctagctat	1500	
catttagcct atgataaaga tcgttatacc gaagaagaac gagaagtta cagctacctg	1560	
cgttatacag ggacacctat acctgataac cctaacgaca aataa	1605	

S e q I D 4 = N _ E G F _ S K

gtggaccogt gcttcagagc caactgcgag taccagtgcc agccocctgaa ccaaactagc	60	
tacctctgog tctgcgcoga gggcttcogc cccattcccc acgagccgca caggtgocag	120	
atgttttgca accagactgc ctgtccagcc gactgcgacc ccaacaccca ggctagctgt	180	
gagtgcocctg aaggctacat cctggacgac ggtttcatct gcaacggacat cgacgagtgc	240	
gaaaaacggcg gcttctgctc cggggtgtgc cacaacctcc ccggtacctt cgagtgcctc	300	
tgccggcccg actcggccct tgcccggcac attggcaacg actgtgactc cggcattgct	360	10
ggacctgagt ggctgctaga ccgtccatct gtcaacaaca gcccaattagt tgttagcgtt	420	
gctggctactg ttgaggggac gaatcaagac attagtctta aattttttga aatcgatcta	480	
acatcacgac ctgctcatgg aggaaagaca gagcaaggct taagtccaaa atcaaaaacca	540	
tttgcctactg atagtggcgc gatgtcacat aaacttgaga aagctgactt actaaaggct	600	
attcaagaac aattgatcgc taacgtccac agtaacgacg actactttga ggtcattgat	660	
tttcaagcg atgcaaccat tactgatcga aacggcaagg tctactttgc tgacaaaagat	720	20
ggttcggtaa ccttgccgac ccaacctgtc caagaatfff tgctaagcgg acatgtgcgc	780	
gtagaccat ataaagaaaa accaatacaa aaccaagcga aatctgttga tgtggaatat	840	
actgtacagt ttactccctt aaacctgat gacgatttca gaccaggtct caaagatact	900	
aagctattga aaactactagc tctcggtgac accatcacat ctcaagaatt actagctcaa	960	
gcacaaagca ttttaacaaa aaaccaccca gcctatacga tttatgaacg tgactcctca	1020	
atcgtcactc atgacaatga cttttccgt acgattttac caatggatca agagtttact	1080	30
taccgtgfta aaaatcggga acaagcttat aggatcaata aaaaatctgg tctgaatgaa	1140	
gaaataaaca aactgacct gatctctgag aatattacg tocttaaaaa aggggaaaag	1200	
ccgtatgac cctttgatcg cagtcaactg aaactgttca ccatcaata cgttgatgtc	1260	
galaccaacg aattgctaaa aagtgagcag ctcttaacag ctacggaacg taacttagac	1320	
ttcagagatt tatacgatec tctgtataag gctaaactac tctacaacaa tctcgatgct	1380	
tttggattaa tggactatac cttaactgga aaagttagag ataatcacga tgacaccaac	1440	40
cgtatcataa ccgtttatat gggcaagcga cccgaaggag agaatgctag ctatcattta	1500	
gcctatgata aagatcgtta taccgaagaa gaacgagaag ttacageta cctgcgttat	1560	
acagggacac ctatacctga taacctaac gacaaataa	1599	

attgctggac ctgagtggct gctagaccgt ccactctgtca acaacagcca attagttggt	60	
agcgttgctg gtactggtga ggggacgaat caagacatta gtcttaaatt ttttgaatc	120	
gatctaacat cacgacctgc tcatggagga aagacagagc aaggcttaag tccaaaatca	180	
aaaccatttg ctactgatag tggcgcgatg tcacataaac ttgagaaagc tgacttacta	240	
aaggctattc aagaacaatt gatcgcctaac gtccacagta acgacgacta ctttgaggtc	300	10
attgattttg caagcgatgc aaccattact gatcgaacg gcaaggtcta ctttgctgac	360	
aaagatgggt cggtaacctt gccgacccaa cctgtccaag aatTTTTgct aagcggacat	420	
gtgcgcggtta gaccatataa agaaaaacca atacaaaacc aagcgaatc tgttgatgtg	480	
gaatatactg tacagtttac tcccttaaac cctgatgacg atttcagacc aggtctcaaa	540	
gataactaagc tattgaaaac actagctatc ggtgacacca tcacatctca agaattacta	600	
gctcaagcac aaagcatttt aaacaaaaac caccagggt atacgattta tgaacgtgac	660	20
tcctcaatcg tcaactcatga caatgacatt tcccgtaga ttttaccat ggatcaagag	720	
tttacttacc gtgttaaaaa tcgggaacaa gcttatagga tcaataaaaa atctggtctg	780	
aatgaagaaa taaacaacac tgacctgac tctgagaaat attacgtcct taaaaaggg	840	
gaaaagccgt atgatccctt tgatcgcagt cacttgaac tgttcacat caaatcgtt	900	
gatgtcgata ccaacgaatt gctaaaaagt gagcagctct taacagctag cgaacgtaac	960	30
ttagacttca gagatttata cgatcctcgt gataaggcta aactactcta caacaatctc	1020	
gatgcttttg gtattatgga ctatacctta actggaaaag tagaggataa tcacgatgac	1080	
accaaccgta tcataaccgt ttatatgggc aagcgcaccg aaggagagaa tgctagctat	1140	
catttagcct atgataaaga tcgttatacc gaagaagaac gagaagtta cagctacctg	1200	
cgttatacag ggacacctat acctgataac cctaacgaca aataa	1245	40

S E Q I D 6 = S K _ E G F

attgctggac ctgagtggct gctagaccgt ccactctgtca acaacagcca attagttggt	60	
agcgttgctg gtaactgttga ggggacgaat caagacatta gtcttaaatt ttttgaaatc	120	
gatctaacat cacgacctgc tcatggagga aagacagagc aaggcttaag tccaaaatca	180	
aaaccatttg ctactgatag tggcgcgatg tcacataaac ttgagaaagc tgacttacta	240	
aaggctatcc aagaacaatt gatcgctaac gtccacagta acgacgacta ctttgaggtc	300	
attgattttg caagcgatgc aaccattact gatcgaaacg gcaaggctca ctttgctgac	360	10
aaagatgggt cggtaacctt gccgacccaa cctgtccaag aatTTTTgct aagcggacat	420	
gtgcgcgtta gaccatataa agaaaaacca atacaaaacc aagcgaatc tgttgatgtg	480	
gaatatactg tacagtttac tcccttaaac cctgatgacg atttcagacc aggtctcaaa	540	
gatactaagc tattgaaaac actagctatc ggtgacacca tcacatctca agaattacta	600	
gctcaagcac aaagcatttt aaacaaaaac caccaggt atacgattta tgaacgtgac	660	
tctcaatcg tcaactcatga caatgacatt ttccgtacga ttttaccat ggatcaagag	720	20
tttacttacc gtgttaaaaa tcgggaacaa gcttatagga tcaataaaaa atctggtctg	780	
aatgaagaaa taaacaacac tgacctgac tctgagaaat attacgtcct taaaaaggg	840	
gaaaagccgt atgatccctt tgatcgcagt cacttgaaac tgttcaccat caaatacgtt	900	
gatgtcgata ccaacgaatt gctaaaaagt gagcagctct taacagctag cgaacgtaac	960	
ttagacttca gagatttata cgatcctcgt gataaggcta aactactcta caacaatctc	1020	30
gatgcttttg gtattatgga ctatacctta actgaaaag tagaggataa tcacgatgac	1080	
accaaccgta tcataaccgt ttatatgggc aagcgaccog aaggagagaa tgctagetat	1140	
catttagccg gtggcggaca agctcaacaa attgtggtgg acccgtgctt cagagccaac	1200	
tgcgagtacc agtgccagcc cctgaaccaa actagetacc tetgcgtctg cgcgagggc	1260	
ttcgcgcca ttccccacga gccgcacagg tgccaqatgt ttgcaacca gactgcctgt	1320	
ccagccgact gcgaccccaa caccaggt agctgtgagt gcctgaagg ctacatcctg	1380	40
gacgacggtt tcatctgcac ggacatcgac gagtgcgaaa acggcggctt ctgctccggg	1440	
gtgtgccaca acctccccgg taccttcgag tgcactctgc qgccgactc ggccttgc	1500	
cgccacattg gcaccgactg tgactccggc	1530	

S E Q I D 7 = N _ E G F _ S K _ E G F

gtggaccctg gcttcagagc caactgcgag taccagtgcc agcccctgaa ccaaactagc	60	
tacctctgcg tctgcccga gggcttcgcg cccattcccc acgagccgca caggtgccag	120	
atgttttgca accagactgc ctgtccagcc gactgcgacc ccaacaccca ggctagctgt	180	
gagtgcctg aaggctacat cctggacgac ggtttcatct gcacggacat cgacgagtgc	240	
gaaaacggcg gcttctgctc cgggggtgtgc cacaacctcc ccggtacctt cgagtgcac	300	10
tgcgggcccg actcggccct tgcccgccac attggcaccg actgtgactc cggcattgct	360	
ggacctgagt ggctgctaga ccgtccatct gtcaacaaca gccaatagtg tgttagcgtt	420	
gctggtactg ttgaggggac gaatcaagac attagtctta aatTTTTTga aatcgatcta	480	
acatcacgac ctgctcatgg aggaaagaca gagcaaggct taagtccaaa atcaaaacca	540	
tttgctactg atagtggcgc gatgtcacat aaacttgaga aagctgactt actaaaggct	600	
attcaagaac aattgatcgc taacgtccac agtaacgacg actactttga ggtcattgat	660	20
tttgcaagcg atgcaacat tactgatcga aacggcaagg tctactttgc tgacaaagat	720	
ggttcggtaa ccttgccgac ccaacctgtc caagaatTTT tgctaagcgg acatgtgcgc	780	
gtagaccat ataaagaaaa accaatacaa aaccaagcga aatctgttga tgtggaatat	840	
actgtacagt ttactocctt aaaccctgat gacgatttca gaccaggctc caagatact	900	
aagctattga aaacactagc tatcggtgac accatcacat ctcaagaatt actagctcaa	960	30

gcacaaagca ttttaacaa aaaccaccca ggctatacga tttatgaacg tgactcctca	1020	
atcgtcactc atgacaatga cattttccgt acgattttac caatggatca agagtttact	1080	
taccgtgtta aaaatcgga acaagettat aggatcaata aaaaatctgg tctgaatgaa	1140	
gaaataaaca aactgacct gatctctgag aaatattacg tccttaaaaa aggggaaaag	1200	
ccgtatgac cctttgatcg cagtcacttg aaactgttca ccatcaata cgttgatgtc	1260	10
gataccaacg aattgctaaa aagtgagcag ctcttaacag ctagcgaacg taacttagac	1320	
ttcagagatt tatacgatcc tcgtgataag gctaaactac tctacaacia tctcgatgct	1380	
tttggattaa tggactatac cttaactgga aaagtagagg ataatcacga tgacaccaac	1440	
cgtatcataa ccgtttatat gggcaagcga cccgaaggag agaatgctag ctatcattta	1500	
gccggtggcg gacaagctca acaaatgtg gtggaccctg gcttcagagc caactgcgag	1560	
taccagtgcc agcccctgaa ccaaactagc tacctctgcg tctgcgccga gggcttcgcg	1620	20
cccattcccc acgagccgca caggtgccag atgttttgca accagactgc ctgtccagcc	1680	
gactgcgacc ccaacaccca ggctagctgt gactgcccctg aaggctacat cctggacgac	1740	
ggtttcatct gcacggacat cgacgagtgc gaaaacggcg gcttctgctc cggggtgtgc	1800	
cacaacctcc ccggtacctt cgagtgcac tgccggcccg actcggccct tgcccgccac	1860	
attggcaccg actgtgactc cggc	1884	30

SEQ ID 8 = EGF456人工

gttgaccctt gctttagagc caactgtgaa taccaatgcc agcctttgaa ccagacctca	60	
tacttggtg tttgtgccga gggttttgca ccaattcctc atgaaccaca cagatgtcaa	120	
atgttctgca accagactgc ctgtccagca gactgcgatc ctaatacaca agcttcttgt	180	
gagtgccctg aaggatacat cttggatgac ggttttattt gtactgacat cgatgagtgc	240	40
gaaaacggtg gattttgtag tgggttttgc cataatcttc caggaacctt cgaatgtatt	300	
tgccgtcctg actctgcctt ggcaagacac atcggactg actgtgatc cgga	354	

SEQ ID 9 = 人工合成TPA

caagagatc atgctagatt cagaagaggt gotagatcct accaggtcat ttgtagagat	60	
gaaaagacac aatgatcta tcaacagcac cagtcatggc ttagacctgt tttgagaagt	120	
aacagagtcg agtactgttg gtgcaattct ggtagagccc aatgtcatag tgttccagtc	180	
aatcatgta gtgaacctag atgctttaac ggtggaactt gtcaacaggc tttgtacttc	240	
tctgatttcg tttgtcaatg cccagagggg ttcgctggta aatggtgcga aattgacacc	300	
agagctactt gttacgaaga tcagggaaac tcatatagag gtacatggtc taccgctgag	360	10
tccggagccg aatgtactaa ctggaattct tccgctttgg cccaaaaacc atactctggt	420	
agaagacctg atgctattag acttggtttg ggaaccaca attattgcag aaatccagac	480	
agagattcta agccttggtg ttacgttttt aaggccggaa aatattcaag tgaattctgt	540	
tccaccctcg catgctcaga gggtaacagt gattgttact ttggtaatgg atctgcttat	600	
agaggaaccc attccttgac tgagtcaggt gccagttgtc ttccatggaa ctcaatgatt	660	
ttgatcggaa aagtttacac tgcacaaaat cctagtgcac aggcctctgg tttgggaaag	720	20
cataactact gtagaatcc agacggagat gccaaacctt ggtgtcacgt tcttaagaac	780	
agaagattga catgggaata ctgtgacgtc ccactctggt ccacctgagg tttgagacia	840	
tactcacaac ctcagtttag aattaaaggt ggattgttcg ctgatatcgc ctctcalcca	900	
tggcagctcg ccatttttgc taagcacaga agatccctcg gagagagatt cctttgtggt	960	
ggaattttga tctcttcctg ctggattttg tccgcagctc actgttttca agaaagatc	1020	
ccacctcacc accttacagt tatcttggga agaacctaca gagttgtccc aggtgaagag	1080	30
gaacagaagt ttgagttga aaaatacatt gtccataagg agttcagatga cgatacttat	1140	
gacaatgata tgcactttt gcaattgaag tctgattcaa gtagatgtgc tcaggaatct	1200	
tccgttgcga gaactgtttg tttgccacct gctgaccttc aattgcctga ttggacagag	1260	
tgtgaacttt ctggttacgg aaaacacgaa gccttgtctc cattttatcc cgagagactt	1320	
aagggaagcac atgttagatt gtatccttca agtagatgta catccaaca ccttttgaac	1380	
agaactgtca cagacaatat gttgtgtgct ggagatacca gatcaggtgg accacaagcc	1440	40
aacttgcctg acgcatgccg gggagatagt ggtggacctc ttgtttgttt gaatgacggt	1500	
agaatgactc ttgtcggaaat tatctcttgg ggtttgggat gtggcaaaa agatgttcca	1560	
ggtgtctaca ctaaggttac aaactatttg gactggatca gagataacat gagacca	1617	

S E Q I D 1 0 = N _ E G F _ T P A _ E G F

gtcgatccat gtttagagc taattgagag tatcaatgcc agcctcttaa ccaaacttct	60	
tatttgtgtg tttgagcaga gggttttgct cctatcccac acgagcctca tagatgccag	120	
atgttttgca accagaccgc atgtccagct gactgagatc ctaatactca agcttctctgt	180	
gagtgccttg aaggttacat tttggacgat ggattcattt gcaccgatat tgacgaatgt	240	
gagaacggtg gatthttgttc aggagtttgc cacaatttgc caggtacatt cgaatgtatt	300	10
tgtggacctg atagtgtctt tgccagacat attggaacag attgtgactc cggtaagag	360	
attcatgcta gattcagaag aggtgctaga tcctaccagg tcattttag agatgaaaag	420	
acacaaatga tctatcaaca gcaccagtca tggcttagac ctgttttgag aagtaacaga	480	
gtcagagtact gttggtgcaa ttctggtaga gcccaatgtc atagtgttc agtcaaatca	540	
tgtagtgaac ctagatgctt taacggtgga acttgtcaac aggctttgta cttctctgat	600	
ttcgthttgtc aatgcccaga gggattcgtt ggtaaatgtt gcgaaattga caccagagct	660	20
acttgttacg aagatcaggg aatctcatat agaggtacat ggtctaccgc tgagtccgga	720	
gccgaatgta ctaactgga ttcttccgct ttggcccaaa aaccatactc tggtagaaga	780	
cctgatgcta ttagacttgg tttgggaaac cacaattatt gcagaaatcc agacagagat	840	
tctaagcctt ggtgttacgt ttttaaggcc ggaaaatatt caagtgaatt ctgttccacc	900	
cctgcatgct cagagggtaa cagtgattgt tactttggtat atggatctgc ttatagagga	960	30
accatttctt tgactgagtc aggtgccagt tgtcttccat ggaactcaat gattttgatc	1020	
ggaaaagttt aactgcaca aaatctagt gcacaggctc ttggtttggg aaagcataac	1080	
tactgtagaa atccagacgg agatgccaaa ccttgggtgc acgttcttaa gaacagaaga	1140	

ttgacatggg aatactgtga cgteccatct tgttccacct gcggttgag acaatactca	1200	
caacctcagt ttagaattaa aggtggattg ttcgctgata tcgcctctca tccatggcag	1260	
gctgccattt ttgctaagca cagaagatcc cctggagaga gattcctttg tgggtgaatt	1320	
ttgatctctt cctgctggat tttgtccgca gctcaactgt ttcaagaaag attcccacct	1380	
catcacetta cagttatctt ggaagaacc tacagagtgt tcccaggtga agaggaacag	1440	10
aagtttgagg ttgaaaaata cattgtccat aaggagtctg atgacgatac ttatgacaat	1500	
gatatcgac ttttgcaatt gaagtctgat tcaagtagat gtgctcagga atcttccggt	1560	
gtcagaactg tttgtttgcc acctgctgac cttcaattgc ctgattggac agagtgtgaa	1620	
ctttctggtt acggaaaaca cgaagccttg tctccatttt attccgagag acttaaggaa	1680	
gcacatgtta gattgtatcc ttcaagtaga tgtacatccc aacacctttt gaacagaact	1740	
gtcacagaca atatgtttgtg tgctggagat accagatcag gtggaccaca agccaacttg	1800	20
catgacgcat gccagggaga tagtgggtga cctcttgttt gtttgaatga cggtagaatg	1860	
actcttctcg gaattatctc ttggggtttg ggatgtggtc aaaaagatgt tccaggtgtc	1920	
tacactaagg ttacaaacta tttggactgg atcagagata acatgagacc agtcgatcca	1980	
tgttttagag ctaattgcga gtatcaatgc cagcctctta accaaacttc ttatttgtgt	2040	
gtttgcgcag agggttttgc tcctatccca cagcagcctc atagatgcca gatgttttgc	2100	30
aaccagaccg catgtccagc tgactgcgat cctaatactc aagcttctctg tgagtgcct	2160	
gaaggttaca ttttgacga tggattcatt tgcaccgata ttgacgaatg tgagaacggt	2220	
ggattttgtt caggagtttg ccacaatttg ccaggtacat tcgaatgtat ttgtggacct	2280	
gatagtgtct ttgccagaca tattggaaca gattgtgact ccggt	2325	

SEQ ID 11 = N_EGF_TPA

40

gtcgatccat gttttagagc taattgagag tatcaatgcc agcctcttaa ccaaacttct	60	
tatttggtg tttgagcaga gggttttgct cctatcccac acgagcctca tagatgccag	120	
atgttttgca accagaccgc atgtccagct gactgagatc ctaatactca agcttcctgt	180	
gagtgccctg aaggttacat tttggacgat ggattcattt gcaccgatat tgacgaatgt	240	
gagaacggtg gattttgttc aggagtttgc cacaatttgc caggtagatt cgaatgtatt	300	10
tgtggacctg atagtgtctt tgccagacat attggaacag attgtgactc cggtagaag	360	
attcatgcta gattcagaag aggtgctaga tctaccagg tcattttag agatgaaaag	420	
acacaaatga tctatcaaca gcaccagtca tggcttagac ctgttttgag aagtaacaga	480	
gtcgagtact gttggtgcaa ttctggtaga gcccaatgac atagtgttcc agtcaaatca	540	
tgtagtgaac ctagatgctt taacggtgga acttgtcaac aggctttgta cttctctgat	600	
ttcgtttgc aatgcccaga gggattcgtt ggtaaattgt gcgaaattga caccagagct	660	20
acttgttacg aagatcaggg aatctcatat agaggtacat ggtctaccgc tgagtccgga	720	
gccgaatgta ctaactggaa ttcttccgct ttggcccaaa aaccatactc tggtagaaga	780	
cctgatgcta ttagacttgg tttgggaaac cacaattatt gcagaaatcc agacagagat	840	
tctaagcctt ggtgttacgt ttttaaggcc ggaaaatatt caagtgaatt ctgttcacc	900	
cctgcatgct cagagggtaa cagtgattgt tacttttgta atggatctgc ttatagagga	960	30
accattcct tgactgagtc aggtgccagt tgtcttccat ggaactcaat gattttgatc	1020	

ggaaaagttt	acactgcaca	aaatcctagt	gcacaggctc	ttggtttggg	aaagcataac	1080	
tactgtagaa	atccagacgg	agatgccaaa	ccttggtgtc	acgttcttaa	gaacagaaga	1140	
ttgacatggg	aatactgtga	cgccccatct	tgttccacct	gcggtttgag	acaatactca	1200	
caacctcagt	ttagaattaa	aggtggattg	ttcgtgata	tcgcctctca	tccatggcag	1260	
gctgccattt	ttgctaagca	cagaagatcc	cctggagaga	gattcctttg	tggtggaatt	1320	10
ttgatctctt	cctgctggat	tttgtccgca	gctcactgtt	ttcaagaaag	attcccacct	1380	
catcacctta	cagttatctt	gggaagaacc	tacagagttg	tcccaggtga	agaggaacag	1440	
aagtttgagg	ttgaaaaata	cattgtccat	aaggagtctg	atgacgatac	ttatgacaat	1500	
gatatcgcac	ttttgcaatt	gaagtctgat	tcaagtagat	gtgctcagga	atcttccggt	1560	
gtcagaactg	tttgtttgcc	acctgctgac	cttcaattgc	ctgattggac	agagtgtgaa	1620	20
ctttctgggt	acggaaaaca	cgaagccttg	tctccatttt	attccgagag	acttaaggaa	1680	
gcacatgtta	gattgtatcc	ttcaagtaga	tgtacatccc	aacacctttt	gaacagaact	1740	
gtcacagaca	atatgttgty	tgctggagat	accagatcag	gtggaccaca	agccaacttg	1800	
catgacgcat	gccagggaga	tagtgggtga	cctcttggtt	gtttgaatga	cggtagaatg	1860	
actcttgctg	gaattatctc	ttggggtttg	ggatgtggtc	aaaaagatgt	tccaggtgtc	1920	
tacactaagg	ttacaaacta	ttggactgg	atcagagata	acatgagacc	a	1971	30

SEQ ID 12 = TPA_EGF

caagagattc atgctagatt cagaagaggt gctagatcct accaggtcat ttgtagagat	60	
gaaaagacac aatgatcta tcaacagcac cagtcatggc ttagacctgt ttgagaagt	120	
aacagagtcg agtactgttg gtgcaattct ggtagagccc aatgtcatag tgtccagtc	180	
aatcatgta gtgaacctag atgctttaac ggtggaactt gtcaacaggc ttgtacttc	240	
tctgatttcg tttgtcaatg cccagagga ttcgctggta aatggtcga aattgacacc	300	10
agagctactt gttacgaaga tcaggaatc tcatatagag gtacatggc taccgctgag	360	
tccggagccg aatgtactaa ctggaattct tccgctttgg cccaaaaacc atactctggt	420	
agaagacctg atgctattag acttggttg gaaaccaca attattgcag aaatccagac	480	
agagattcta agccttggtg ttacgttttt aaggccggaa aatattcaag tgaattctgt	540	
tccaccctg catgctoaga ggtaacagt gattgttact ttgtaatgg atctgcttat	600	
agaggaacc attccttgac tgagtcaggt gccagttgc ttccatggaa ctcaatgatt	660	20
ttgatcggaa aagtttacac tgcacaaaat cctagtgcac aggctcttg tttgggaaag	720	
cataactact gtagaaatcc agacggagat gccaaacctt ggtgtcacgt tcttaagaac	780	
agaagattga catgggaata ctgtgacgtc ccatcttgtt ccacctgcg tttgagacia	840	
tactcacaac ctgagtttag aattaaaggt ggattgttcg ctgatatgc ctctcatcca	900	

tggcaggctg ccatttttgc taagcacaga agatcccctg gagagagatt cctttgtggt	960	
ggaattttga tctcttcctg ctggattttg tccgcagctc actgttttca agaaagattc	1020	
ccacctcatc accttacagt tatcttggga agaacctaca gagttgtccc aggtgaagag	1080	
gaacagaagt ttgaggttga aaaatacatt gtccataagg agttcgatga cgatacttat	1140	
gacaatgata tcgcactttt gcaattgaag tctgattcaa gtagatgtgc tcaggaatct	1200	10
tccgttgtca gaactgtttg tttgccacct gctgaccttc aattgcctga ttggacagag	1260	
tgtgaacttt ctggttacgg aaaacacgaa gccttgtctc cattttattc cgagagactt	1320	
aaggaagcac atggttagatt gtatccttca agtagatgta catccaaca ccttttgaac	1380	
agaactgtca cagacaatat gttgtgtgct ggagatacca gatcaggtgg accacaagcc	1440	
aacttgcacg acgcatgcca gggagatagt ggtggacctc ttgtttgttt gaatgacggt	1500	
agaatgactc ttgtcggaat tatctcttgg ggtttgggat gtggtcaaaa agatgttcca	1560	20
ggtgtctaca ctaaggttac aaactatttg gactggatca gagataacat gagaccagtc	1620	
gatccatggt ttagagctaa ttgcgagtat caatgccagc ctcttaacca aacttcttat	1680	
ttgtgtgttt gcgcagaggg ttttgcctct atcccacacg agcctcatag atgccagatg	1740	
ttttgcaacc agaccgcatg tccagctgac tgcgatccta atactcaagc ttctctgtgag	1800	
tgcctgaag gttacatttt ggacgatgga ttcatttgca ccgatattga cgaatgtgag	1860	30
aacggtggat tttgttcagg agtttggcac aatttggcag gtacattcga atgtatttgt	1920	
ggacctgata gtgctcttgc cagacatatt ggaacagatt gtgactccgg t	1971	

S E Q I D 13 = I D E G F T P A (e g f 欠失)

caagagattc atgctagatt cagaagaggt gctagatcct accaggatcat ttgtagagat	60	
gaaaagacac aaatgatcta tcaacagcac cagtcattggc ttagacctgt tttgagaagt	120	
aacagagtcg agtactggtg gtgcaattct ggtagagccc aatgtcatag tgttccagtt	180	
aaatcagttg acccttgctt tagagccaac tgtgaatacc aatgccagcc tttgaaccag	240	
acctcactact tgtgtggttg tgccgagggt tttgcaccaa ttctcatga accacacaga	300	10
tgcaaatgt tctgcaacca gactgcctgt ccagcagact gcgatcctaa tacacaagct	360	
tcttgtgagt gccctgaagg atacatcttg gatgacgggt ttatttgtac tgacatcgat	420	
gagtgcgaaa acggtggatt ttgtagtgtt gtttgccata atcttccagg aaccttcgaa	480	
tgtatttgcg gtcttgactc tgccttgcca agacatatag gtactgactg tgattccgga	540	
accagagcta cttgttacga agatcaggga atctcatata gaggtacatg gtctaccgct	600	
gagtccggag ccgaatgtac taactggaat tcttccgctt tggcccaaaa accatactct	660	20
ggtagaagac ctgatgctat tagacttggg ttgggaaacc acaattattg cagaaatcca	720	
gacagagatt ctaagccttg gtgttacggt ttttaaggccg gaaaatattc aagtgaattc	780	
tgttccacc ctcgatgctc agagggtaac agtgattggt actttggtaa tggatctgct	840	
tatagaggaa cccattcctt gactgagtca ggtgccagtt gtcttccatg gaactcaatg	900	
atcttgatcg gaaaagtta cactgcacaa aatcctagtg cacaggctct tggtttggga	960	30

aagcataact actgtagaaa tccagacgga gatgccaaac cttggtgtca cgttcttaag	1020	
aacagaagat tgacatggga atactgtgac gtcccatctt gttccacctg cggtttgaga	1080	
caatactcac aacctcagtt tagaattaa ggtggattgt tcgctgatat cgcctctcat	1140	
ccatggcagg ctgccatfff tgctaagcac agaagatccc ctggagagag attcctttgt	1200	
ggtggaatff tgatctcttc ctgctggatt ttgtccgcag ctcaactgtff tcaagaaaga	1260	10
ttcccacctc atcaccttac agttatcttg ggaagaacct acagagttgt cccaggtgaa	1320	
gaggaacaga agtttgaggt tgaaaaatac attgtccata aggagttcga tgacgatact	1380	
tatgacaatg atatcgcact tttgcaattg aagtctgatt caagtagatg tgctcaggaa	1440	
tcttccgttg tcagaactgt ttgtttgcca cctgctgacc ttcaattgcc tgattggaca	1500	
gagtgtgaac tttctggtta cggaaaacac gaagccttgt ctccatttta ttccgagaga	1560	
cttaaggaag cacatgtag attgtatcct tcaagtagat gtacatccca acaccttttg	1620	20
aacagaactg tcacagacaa tatgttgtgt gctggagata ccagatcagg tggaccacaa	1680	
gccaaactgc atgacgcacg ccagggagat agtgggtggac ctcttgtttg tttgaatgac	1740	
ggtagaatga ctcttgctcg aattatctct tggggtttg gatgtgttca aaaagatgtt	1800	
ccaggtgtct aactaaggt tacaactat ttggactgga tcagagataa catgagacca	1860	
SEQ ID 14 = ID EGF TPA (e g f、K 1 欠失)		30

caagagattc atgctagatt cagaagaggt gctagatcct accaggtcat ttgtagagat	60	
gaaaagacac aaatgatcta tcaacagcac cagtcatggc ttagacctgt ttgagaagt	120	
aacagagtcg agtactgttg gtgcaattct ggtagagccc aatgtcatag tgttccagtt	180	
aaatcagttg acccttgctt tagagccaac tgtgaatacc aatgccagcc ttggaaccag	240	
acctcatact tgrgtgtttg tgccgagggt ttgacacaa ttctctatga accacacaga	300	
tgtaaatgt tctgcaacca gactgcctgt ccagcagact gcgatacctaa tacacaagct	360	10
tcttgtgagt gccctgaagg atacatcttg gatgacggtt ttatttgtac tgacatogat	420	
gagtcgaaa acggtggatt ttgtagtggg gtttgccata atcttccagg aaccttcgaa	480	
tgtatttgcg gtctgactc tgcttggca agacatattg gtactgattg tgattccgga	540	
aacagtgatt gttacttttg taatggatct gcttatagag gaacccttc cttgactgag	600	
tcaggtgcca gttgtcttcc atggaactca atgattttga tcggaaaagt ttacactgca	660	
caaaatccta gtgcacaggc tcttggtttg ggaaagcata actactgtag aaatccagac	720	20
ggagatgcca aaccttggtg tcacgttctt aagaacagaa gattgacatg ggaatactgt	780	
gacgtcccat cttgttccac ctgcggtttg agacaatact cacaacctca gtttagaatt	840	
aaaggtggat tgttgcctga tatgcctct catccatggc aggtgccc ttttgctaag	900	
cacagaagat cccttgaga gagattcctt tgtggtgaa ttttgatctc ttctgctgg	960	
atttgtccg cagctcactg tttcaagaa agattccac ctcatcact tacagttatc	1020	
ttggaagaa cctacagagt tgtcccagg gaagaggaac agaagtttga ggttgaaaa	1080	30
tacattgtcc ataaggagt cgatgacgat acttatgaca atgatatgc acttttgcaa	1140	
ttgaagtctg attcaagtag atgtgctcag gaatcttccg ttgtcagaac tgtttgtttg	1200	
ccacctgctg accttcaatt gctgattgg acagagtgtg aactttctgg ttaccgaaaa	1260	
cacgaagcct tgtctccatt ttattccgag agacttaag aagcacatgt tagattgtat	1320	
ccttaagta gatgtacatc ccaacacctt ttgaacagaa ctgtcacaga caatatgttg	1380	
tgtgtggag ataccagatc aggtggacca caagccaact tgcatacgc atgccaggga	1440	40
gatagtggg gacctcttgt ttgtttgaat gacggtagaa tgactcttgt cgggaattatc	1500	
tcttggggtt tgggatgttg tcaaaaagat gttccagtg tctacactaa ggttcaaac	1560	
tatttgact ggatcayaga taacatgaga cca	1593	

S E Q I D 15 = N__E G F (e g f、k 1 欠失)

gttgaccctt gcttcagagc caactgtgaa taccaatgcc agcctttgaa ccagacctca	60	
tacttggtg tttgtgccga gggttttgca ccaattcctc atgaaccaca cagatgtcaa	120	
atgttctgca accagactgc ctgtccagca gactgcgac ctaatacaca agcttcttgt	180	
gagtgccttg aaggatacat cttggatgac ggttttattt gtactgacat cgatgagtgc	240	
gaaaacggtg gattttgtag tgggttttg cataatcttc caggaacctt cgaatgtatt	300	
tgggtctctg actctgcctt ggcaagacac atcggaactg actgtgatcc cggacaagag	360	10
attcatgcta gattcagaag aggtgctaga tctaccagg tcattttag agatgaaaag	420	
acacaaatga tctatcaaca gcaccagtoa tggcttagac ctgttttgag aagtaacaga	480	
gtcagtgact gttggtgcaa ttctggtaga gcccaatgac atagtgttcc agtcaagtca	540	
aatagtgatt gttactttgg taatggatct gcttatagag gaaccattc cttgactgag	600	
tcaggtgcca gttgtcttcc atggaactca atgattttga tcggaaaagt ttacactgca	660	
caaaaactca gtgcacaggc tcttggtttg ggaaagcata actactgtag aaatccagac	720	20
ggagatgcca aaccttggtg tcacgttctt aagaacagaa gattgacatg ggaatactgt	780	
gacgtcccat cttgttccac ctgcggtttg agacaatact cacaacctca gtttagaatt	840	
aaaggtgat tgttcgctga tctgcctct catccatggc aggtgccat tttgctaag	900	
cacagaagat cccctggaga gagattcctt tgtggtggaa tttgatctc ttctgctgg	960	
atlttgctcg cagctcactg tttcaagaa agattcccac ctcatcact tacagttatc	1020	
ttgggaagaa cctacagagt tgtcccagg gaagaggaac agaagtttga ggttgaaaaa	1080	30
tacattgtcc ataaggagt cgatgacgat acttatgaca atgatatgc acttttcaa	1140	
ttgaagtctg attcaagtag atgtgctcag gaatcttccg ttgtcagaac tgtttgtttg	1200	
ccacctgctg accttcaatt gcctgattgg acagagtgtg aactttctgg ttacggaaaa	1260	
cacgaagct tgtctccatt ttattccgag agacttaagg aagcacatgt tagattgtat	1320	
ccttcaagta gatgtacatc ccaacacctt ttgaacagaa ctgtcacaga caatagtgtg	1380	
tgtgctggag ataccagatc aggtggacca caagccaact tgcattgacgc atgccaggga	1440	40
gatagtgtg gacctcttgt ttgtttgaat gacggtagaa tgactcttgt cggattatc	1500	
tcttggggtl tgggatgtg tcaaaaagat gttccaggtg tctacactaa ggttacaac	1560	
tatttgact ggatcagaga taacatgaga cca	1593	

SEQ ID 16 = TPA__EGF (e g f、k 1 欠失)

caagagattc atgctagatt cagaagaggt gctagatcct accaggtcat ttgtagagat	60	
gaaaagacac aaatgatcta tcaacagcac cagtcacggc ttagacctgt tttgagaagt	120	
aacagagtcg agtactgttg gtgcaattct ggtagagccc aatgtcatag tgttccagtc	180	
aagtcaaata gtgattgta ctttggtaat ggatctgctt atagaggaac ccattccttg	240	
actgagtcag gtgccagttg tcttccatgg aactcaatga tttgatcgg aaaagtttac	300	
actgcacaaa atcctagtgc acaggctctt ggtttggaag agcataacta ctgtagaaat	360	10
ccagacggag atgccaaacc ttggtgtcac gttcttaaga acagaagatt gacatgggaa	420	
tactgtgacg tcccatcttg tccacctgc ggtttgagac aatactcaca acctcagttt	480	
agaattaaag gtggattggt cgctgataac gcctctcacc catggcaggc tgccattttt	540	
gctaagcaca gaagatcccc tggagagaga ttcccttggt gtggaatttt gatctcttcc	600	
tgctggattt tgtccgcagc tcaactgttt caagaaagat tcccacctca tcaccttaca	660	
gttatcttgg gaagaacctc cagagttgtc ccaggtgaag aggaacagaa gtttgaggtt	720	20
gaaaaataca ttgtccataa ggagtccgat gacgatactt atgacaatga tatcgcactt	780	
ttgcaattga agtctgatcc aagtagatgt gctcaggaat cttccgttgt cagaactggt	840	
tgtttgccac ctgctgacct tcaattgcct gattggacag agtgtgaact ttctggttac	900	
ggaaaacacg aagccttgtc tccattttat tccgagagac ttaaggaagc acatgttaga	960	
ttgtatcctt caagtagatg tacatcccaa caccttttga acagaactgt cacagacaat	1020	
atgttgtgtg ctggagatac cagatcaggt ggaccacaag ccaacttgca tgacgcacgc	1080	30
caggagata gtggtggacc tcttgtttgt ttgaatgacg gtagaatgac tcttgtcgga	1140	
atratctctt ggggtttggg atgtggtcaa aaagatgttc caggtgtcta cactaaggtt	1200	
acaaactatt tggactggat cagagataac atgagaccag togatccatg ttttagagct	1260	
aattgcgagt atcaatgcca gcctctaac caaactctt atttgtgtgt ttgcccagag	1320	
ggttttgctc ctatcccaca cgagcctcat agatgccaga tgttttgcaa ccagaccgca	1380	
tgteacagtg actgcgatcc taatactcaa gcttccctgt agtgccctga aggttacatt	1440	40
ttggacgatg gattcatttg caccgatatt gacgaatgtg agaacggtgg attttgttca	1500	
ggagtttgc acaatttgc aggtacatcc gaatgtattt gtggacctga tagtgctctt	1560	
gccagacata ttggaacaga ttgtgactca ggt	1593	

S E Q I D 1 7 = S A K

ATGTCAAGTTCATTTCGACAAAGGAAAATATAAAAAAGGCGATGACGCGAGTTATTTTGAAC-
 CAACAGGCCCGTATTTGATGGTAAATGTGACTGGAGTTGATAGTAAAGGAAAT-
 GAATTGCTATCCCCCATTATGTGCGAGTTTCCTATTAACCTGGGACTACACTTACAAAA-
 GAAAAAATTGAATACTATGTGCGAATGGGCATTAGATGCGACAGCATATAAAGAGTTTAGAG-
 TAGTTGAATTAGATCCAAGCGCAAAGATCGAAGTCACTTATTATGATAAGAATAAGAAAAAA-
 GAAGAAACGAAGTCTTTCCCTATAACAGAAAAAGGTTTTGTGTGCCAGATTTATCAGAGCA-
 TATTA AAAACCCTGGATTCAACTTAATTACAAAGGTTGTTATAGAAAAGAAATAA

SEQ ID 18 = N_EGF_SAK

10

GTGGACCCGTGCTTCAGAGCCAACTGCGAGTACCAGTGCCAGCCCCTGAACCAAACCTAGC-
 TACCTCTGCGTCTGCGCCGAGGGCTTCGCGCCCATTCACACGAGCCGCACAGGTGCCA-
 GATGTTTTGCAACCAGACTGCCTGTCCAGCCGACTGCGACCCCAACACC-
 CAGGCTAGCTGTGAGTGCCCTGAAGGCTACATCCTGGACGACGGTTTTCATCTGCACGGACATC-
 GACGACTGCGAAAACGGCGGCTTCTGCTCCGGGGTGTGCCA-
 CAACCTCCCCGGTACCTTCGAGTGCATCTGCGGGCCCGACTCGGCCCTTGCCCCGCA-
 CATTGGCACCAGACTGTGACTCCGGCTCAAGTTCATTTCGACAAAGGAAAATATAAAAAAGGCGATGACGCGAGTTATTTGAACCAA-
 TAAAAAAGGCGATGACGCGAGTTATTTGAACCAACAGGCCCGTATTGATGGTAAATGTGACTGGAGTTGATAGTAAAGGAAAT-
 CAGGCCCGTATTTGATGGTAAATGTGACTGGAGTTGATAGTAAAGGAAAT-
 GAATTGCTATCCCCCATTATGTGCGAGTTTCCTATTAACCTGGGACTACACTTACAAAA-
 GAAAAAATTGAATACTATGTGCGAATGGGCATTAGATGCGACAGCATATAAAGAGTTTAGAG-
 TAGTTGAATTAGATCCAAGCGCAAAGATCGAAGTCACTTATTATGATAAGAATAAGAAAAAA-
 GAAGAAACGAAGTCTTTCCCTATAACAGAAAAAGGTTTTGTGTGCCAGATTTATCAGAGCA-
 TATTA AAAACCCTGGATTCAACTTAATTACAAAGGTTGTTATAGAAAAGAAA

20

SEQ ID 19 = SAK_EGF

TCAAGTTCATTTCGACAAAGGAAAATATAAAAAAGGCGATGACGCGAGTTATTTTGAACCAA-
 CAGGCCCGTATTTGATGGTAAATGTGACTGGAGTTGATAGTAAAGGAAAT-
 GAATTGCTATCCCCCATTATGTGCGAGTTTCCTATTAACCTGGGACTACACTTACAAAA-
 GAAAAAATTGAATACTATGTGCGAATGGGCATTAGATGCGACAGCATATAAAGAGTTTAGAG-
 TAGTTGAATTAGATCCAAGCGCAAAGATCGAAGTCACTTATTATGATAAGAATAAGAAAAAA-
 GAAGAAACGAAGTCTTTCCCTATAACAGAAAAAGGTTTTGTGTGCCAGATTTATCAGAGCA-
 TATTA AAAACCCTGGATTCAACTTAATTACAAAGGTTGTTATAGAAAAGAAA-
 GAGCCCGTGGACCCGTGCTTCAGAGCCAACTGCGAGTACCAGTGCCAGCCCCTGAACCAAAC-
 TAGCTACCTCTGCGTCTGCGCCGAGGGCTTCGCGCCCATTCACACGAGCCGCACAGGTGCCA-
 GATGTTTTGCAACCAGACTGCCTGTCCAGCCGACTGCGACCCCAACACC-
 CAGGCTAGCTGTGAGTGCCCTGAAGGCTACATCCTGGACGACGGTTTTCATCTGCACGGACATC-
 GACGAGTGCAGAAAACGGCGGCTTCTGCTCCGGGGTGTGCCA-
 CAACCTCCCCGGTACCTTCGAGTGCATCTGCGGGCCCGACTCGGCCCTTGCCCCCACATTTGGCACCAGACTGTGACTCCGGC

30

40

SEQ ID 20 = tPAのバリエント
 (テネクテプラーゼ)

CAAGAGATTGCTAGATTGAGAAAGAGGTGCTAGATCCTACCAGGTCATTTGTAGAGAT-
 GAAAAGACACAAATGATCTATCAACAGCACCAGTCATGGCTTAGACCTGTTTTGAGAAGTAA-
 CAGAGTCGAGTACTGTTGGTGCAATTCTGGTAGAGCCCAATGTCATAGTGTCCAGTCAAAT-
 CATGTAGTGAACCTAGATGCTTTAACGGTGGAAGTGTCAACAGGCTTTGACTTCTCTGATTTGTTTGTCAATGCCAGAGG-
 CAGGCTTTGACTTCTCTGATTTGCTTTGTCATGCCAGAGG-
 GATTCGCTGGTAAATGTTGCGAAATGACACCAGAGCTACTGTTACGAAGATCAGG-
 GAATCTCATATAGAGGTAATGGTCTACAGCTGAGTCCGGAGCCGAATGTACTCAATG-
 GAATTCCTCCGCTTTGGCCCAAAAACCATACTCTGGTAGAAGACCTGATGCTATTA-
 GACTTGGTTTGGGAAACCACAATTATTGCAGAAATCCAGACAGA-
 GATTCCTAAGCCTTGGTGTACGTTTTTAAGGCCGGAAAATATTCAAGT-
 GAATTCCTGTTCCACCCCTGCATGCTCAGAGGGTAACAGTGAATGTTACTTTGGTAATG-
 GATCTGCTTATAGAGGAACCCATTCCTTGACTGAGTCAGGTGCCAGTTGCTTCCATGGAAGT-
 CAATGATTTGATCGGAAAAGTTTACACTGCACAAAATCCTAGTGCA-
 CAGGCTCTGGTTTGGGAAAGCATAACTACTGTAGAAATCCAGACGGA-
 GATGCCAAACCTTGGTGTACGTTCTTAAGAACAGAAGATTGACATGGGAA-
 TACTGTGACGTCCCATCTTGTTCACCTGCGGTTTGAGACAATACTCACAACCTCAGTTTA-
 GAATTAAGGTGGATTGTTGCTGATATCGCCTCTCATCCATGGCAGGCTGCCATTTTGTCTGCTGCCGCTGCTTCCCCTGGAGAGA-
 CATGGCAGGCTGCCATTTTGTCTGCTGCCGCTGCTTCCCCTGGAGAGA-
 GATTCCTTTGTGGTGGAAATTTTGTCTCTTCTGCTGGATTTTGTCCGAGCTCACTGTTTTCAAGAAAGATTCCCACCTCATCACCTTAC
 AGTTATCTTGGGAAGAACCACAGACTTGCTCCAGGTGAAGAGGAACA-
 GAAGTTGAGGTTGAAAATACATTGTCCATAAGGAGTTCGATGACGATACTTATGACAATGA-
 TATCGCACTTTTGAATGAAGTCTGATTCAAGTAGATGTGCTCAGGAATCTTCCGTTGTCA-
 GAACTGTTTGTGGCCACCTGCTGACCTTCAATGCCTGATTGGACA-
 GAGTGTGAACCTTTGTTTACGGAAAACACGAAGCCTTGTCTCCATTTTATCCGAGAGACT-
 TAAGGAAGCACATGTTAGATTGTATCCTTCAAGTAGATGTACATCCCAACACCTTTTGAACA-
 GAACTGTCACAGACAATATGTTGTGTGCTGGAGATACCAGATCAGGTGGACCACAAGC-
 CAACTGTCATGACGCATGCCAGGAGATAGTGGTGGACCTCTTGTTTGTTTGAATGACGGTA-
 GAATGACTCTTGTCGGAATTATCTCTTGGGGTTGGGATGTGGTCAAAA-
 GATGTTCCAGGTGCTTACACTAAGGTTACAARCTATTTGGACTGGATCAGAGATAACATGAGACCA

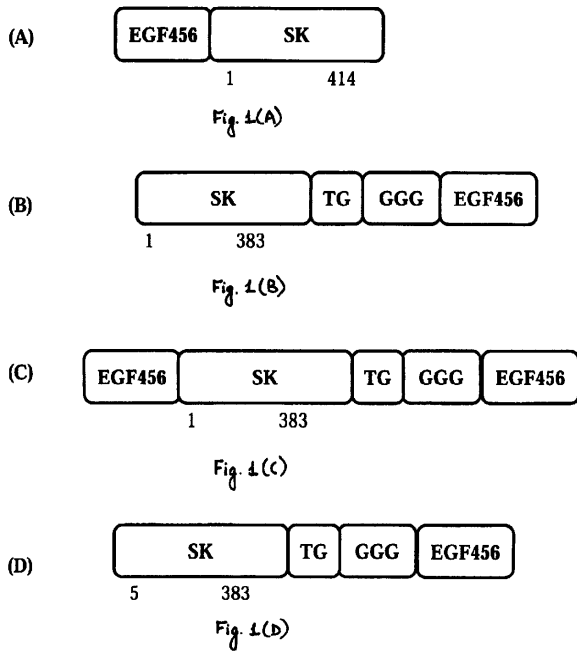
10

20

【 図 1 - 1 】

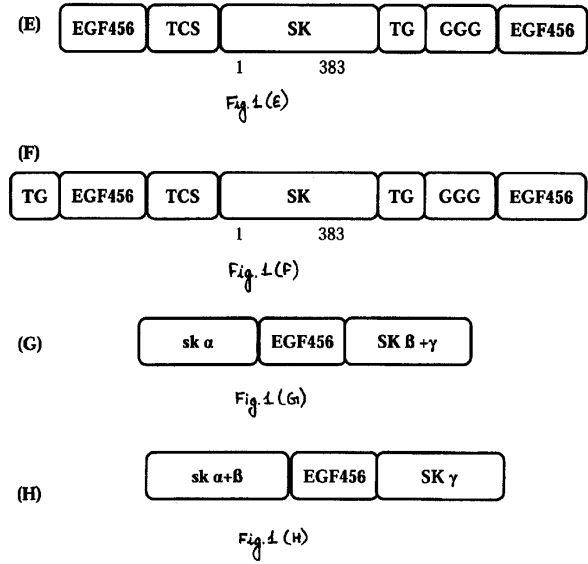
Figure 1.

様々な構築物の概略図



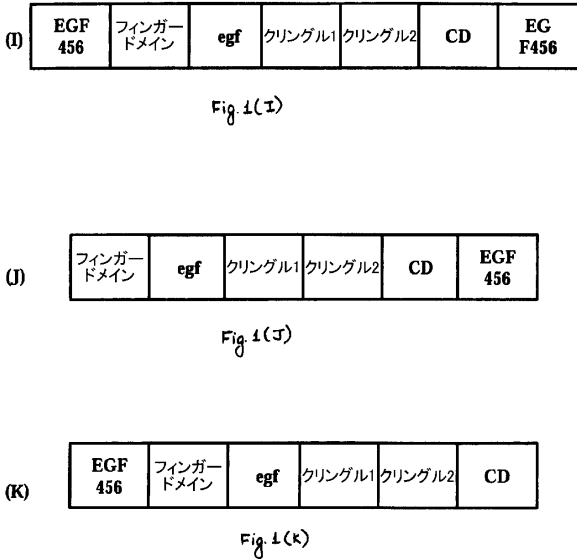
【 図 1 - 2 】

様々な構築物の概略図(続き)



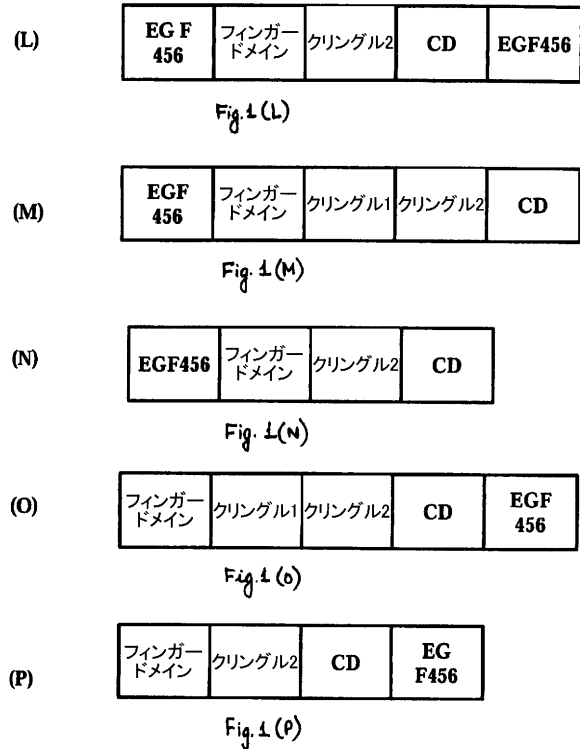
【 図 1 - 3 】

様々な構築物の概略図



【 図 1 - 4 】

様々な構築物の概略図(図1の続き)



【 図 1 - 5 】

様々な構築物の概略図(続き)



Fig. 1(Q)

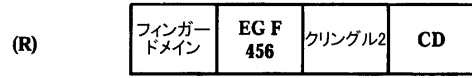


Fig. 1(R)



Fig. 1(S)

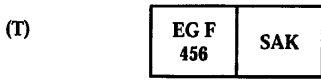
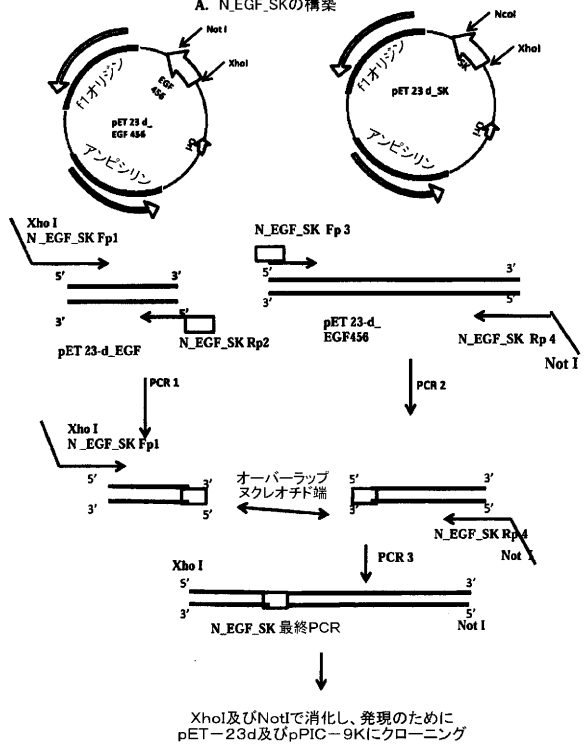


Fig. 1(T)

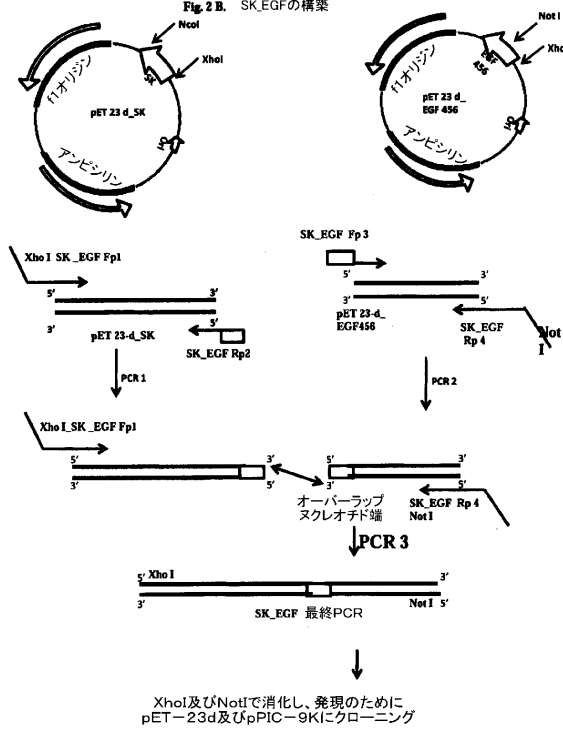
【 図 2 A 】

Fig. 2 様々な融合構築物のクローニングスキーム



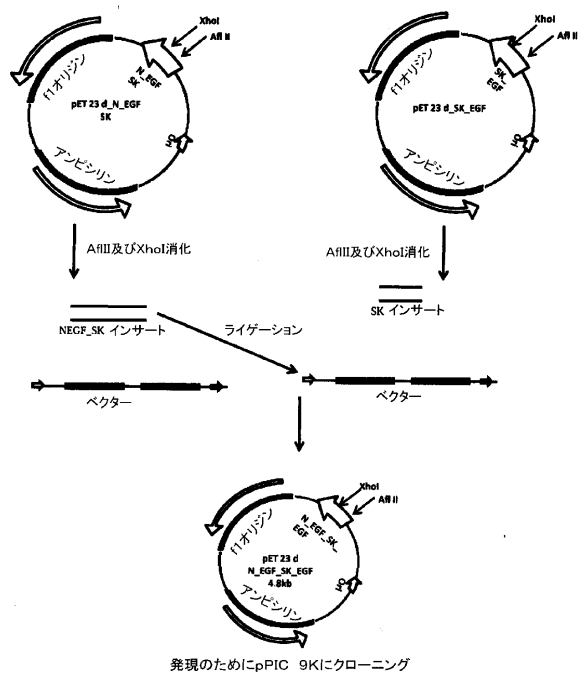
【 図 2 B 】

Fig. 2 B. SK_EGFの構築

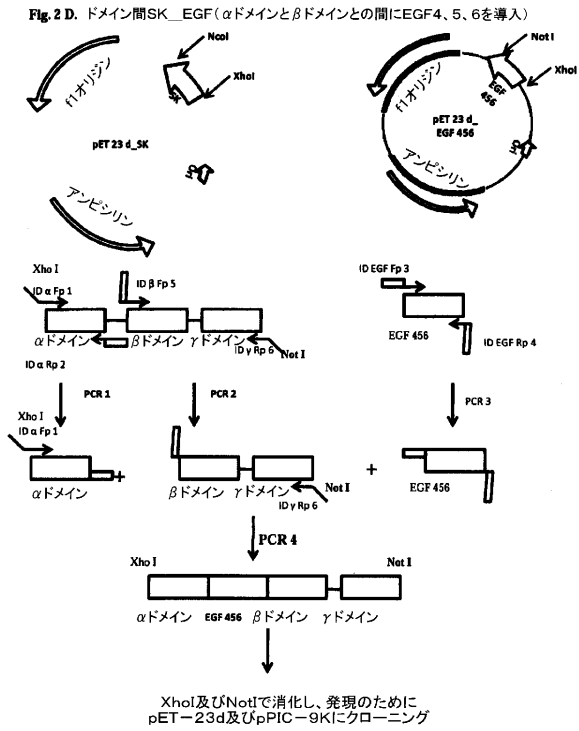


【 図 2 C 】

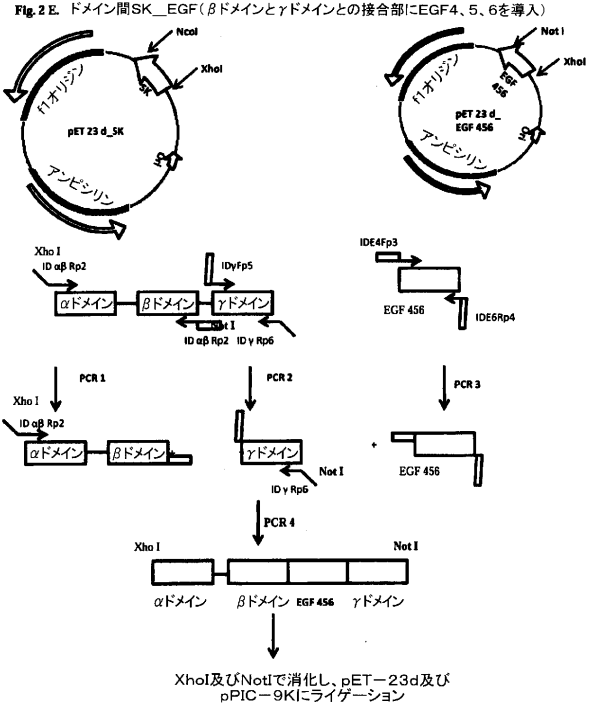
Fig. 2 C. N_EGF_SK_EGFの構築



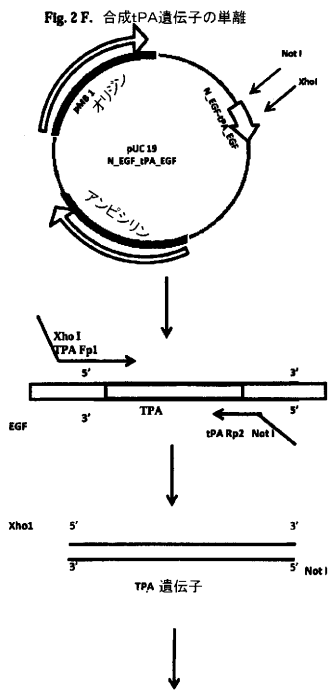
【 図 2 D 】



【 図 2 E 】

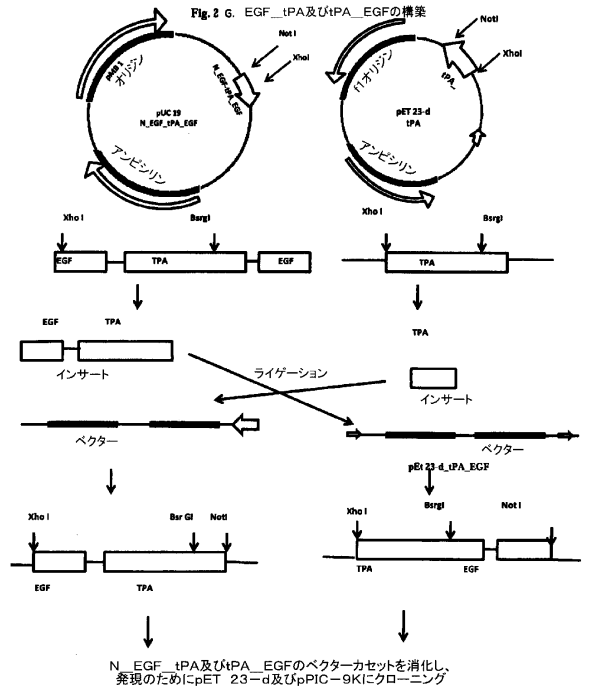


【 図 2 F 】



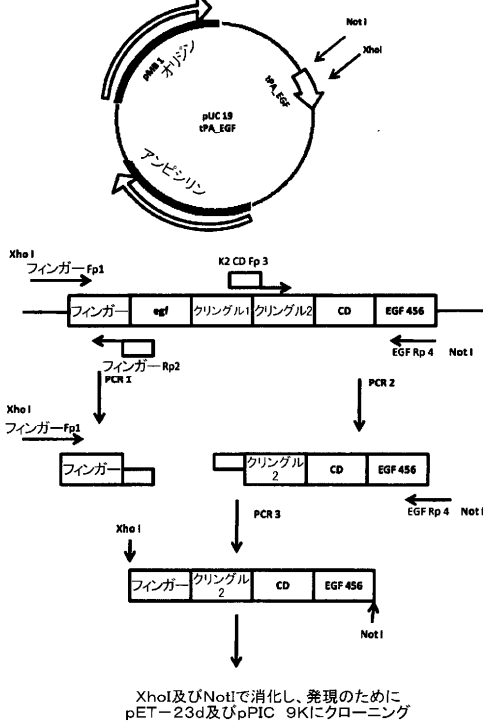
tPA遺伝子(合成で調製し、pUC19ベクターでクローニング)をXhoI及びNotIで消化し、発現のためにpET23-d及びpPIC-9Kにクローニング

【 図 2 G 】



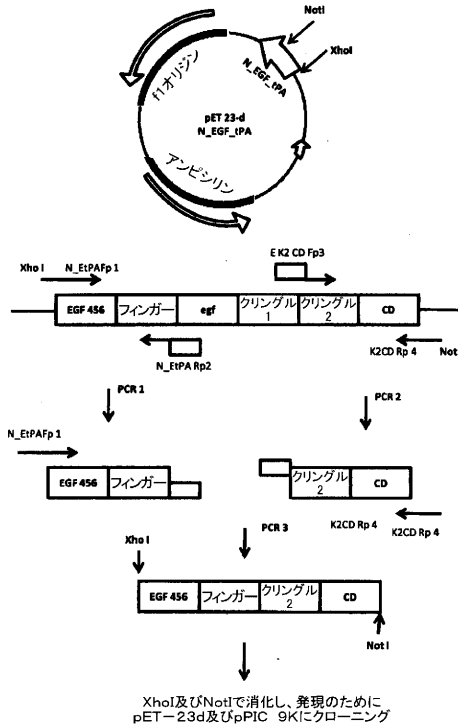
【 図 2 H 】

Fig. 2 H. egf及びクリングル1を欠失したtPA_EGF構築物の構築



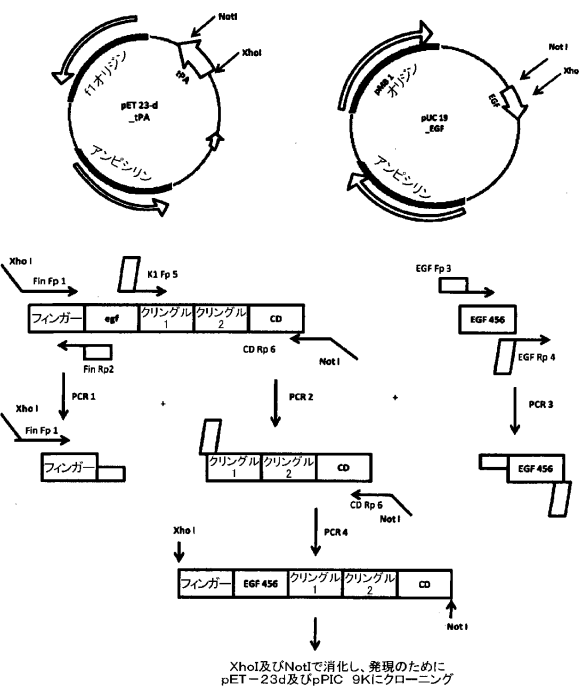
【 図 2 I 】

Fig. 2 I. egf及びクリングル1を欠失したN_EGF_tPA構築物の構築



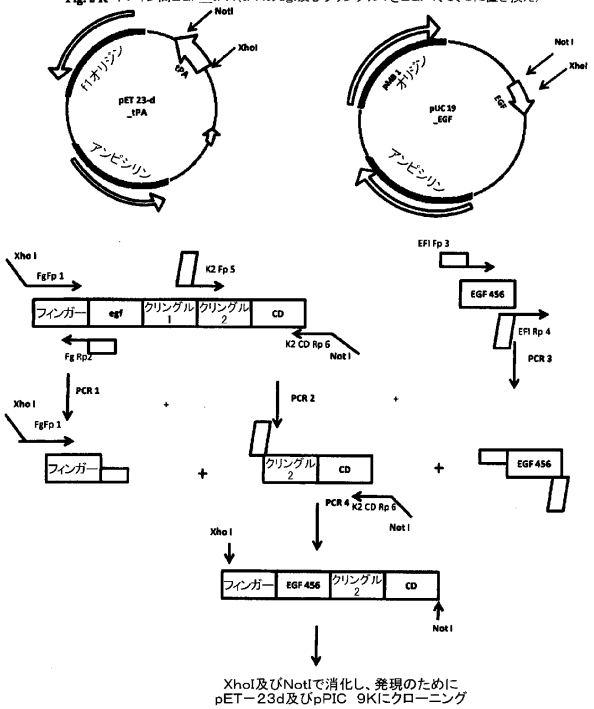
【 図 2 J 】

Fig. 2 J. ドメイン間EGF_tPA (tPAのegfをEGF4、5、6に置き換え)



【 図 2 K 】

Fig. 2 K. ドメイン間EGF_tPA (tPAのegf及びクリングル1をEGF4、5、6に置き換え)



【 図 3 】

ブラスミン依存性プラスミノーゲン活性化

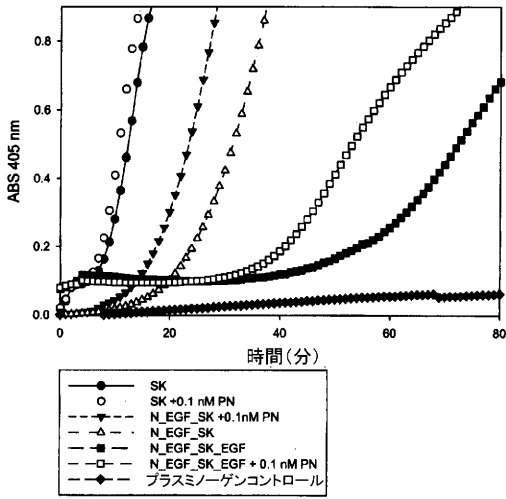
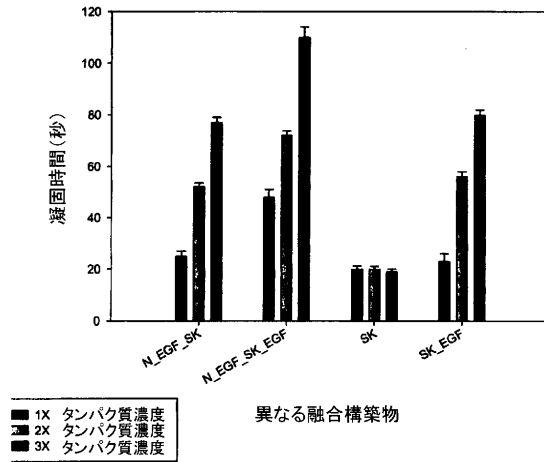


Fig. 3

【 図 4 】

異なる融合構築物の存在下での凝固時間アッセイ



異なる融合構築物

Fig. 4

【 図 5 】

異なるSK-EGF融合構築物の存在下でのタンパク質C活性化

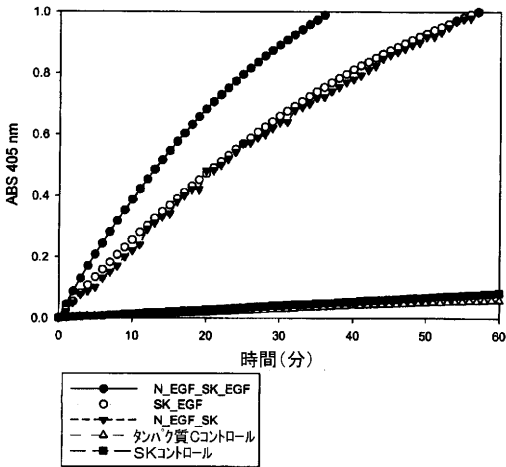
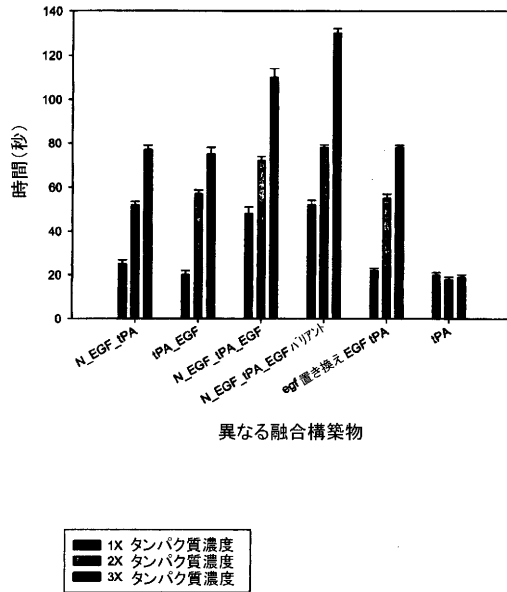


Fig. 5

【 図 6 】

様々なEGF-tPA構築物の存在下での凝固時間アッセイ



異なる融合構築物

Fig. 6

【 図 7 】

EGF及びtPA融合構築物での可溶性フィブリンの
存在及び不在下でのプラスミノゲン活性化

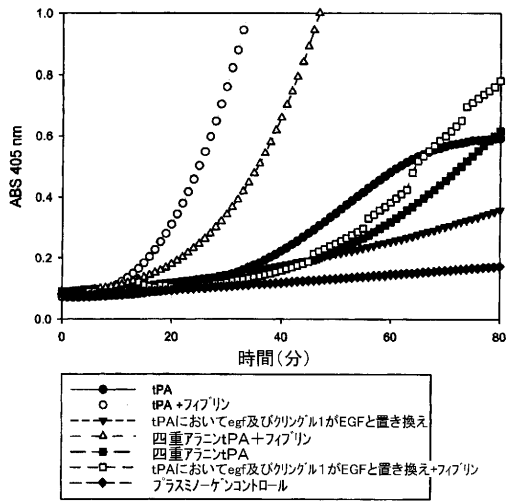


Fig.7

【 配列表 】

0006234224000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02 C
A 6 1 K	38/48 (2006.01)	A 6 1 K	38/48 1 0 0
A 6 1 P	7/02 (2006.01)	A 6 1 P	7/02
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100136249

弁理士 星野 貴光

(72)発明者 マヘシュワリ ニラジ

インド 160036 チャンディガル ポスト ボックス ナンバー 1304 セクター 3
9 - エイ インスティテュート オブ マイクロバイアル テクノロジー内

(72)発明者 サニ ギリシュ

インド 160036 チャンディガル ポスト ボックス ナンバー 1304 セクター 3
9 - エイ インスティテュート オブ マイクロバイアル テクノロジー内

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 特表平04 - 505554 (JP, A)

特表平05 - 508150 (JP, A)

特表平03 - 503757 (JP, A)

特表2006 - 516113 (JP, A)

特開平11 - 180894 (JP, A)

特表2008 - 500001 (JP, A)

特表2005 - 538046 (JP, A)

血栓止血誌 (2000) Vol.11, No.4, pp.385-390

Fibrinolysis (1994) Vol.8, pp.229-237

J Biol. Chem. (1989) Vol.264, No.18, pp.10351-10353

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 9 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0

Thomson Innovation

PubMed

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN
)