(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2014-155506
(P2014-155506A)
(43)公開日　平成26年8月28日(2014.8.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12N 9/64	(2006.01)	C12N	9/64	Z	4B050
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B065
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4C084
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　外国語出願　（全 18 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-114538 (P2014-114538)
(22)出願日　平成26年6月3日 (2014.6.3)
(62)分割の表示　特願2011-142374 (P2011-142374)の分割
原出願日　平成13年5月25日 (2001.5.25)
(31)優先権主張番号　09/592,480
(32)優先日　平成12年6月9日 (2000.6.9)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　501056094
バクスター　アクチェンゲゼルシャフト
オーストリア国　ウィーン　アー－１２２１，　インドュストゥリーシュトラーセ６７
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　バルバラ　プライマウアー
オーストリア国　アー－１０６０　ビエナ，　リーニエンガッセ　１２
(72)発明者　ウヴェ　シュロカト
オーストリア国　アー－２３０４　オルス／ドナウ，　ハウプトシュトラーセ　５１
最終頁に続く

(54)【発明の名称】改良された特性を有するフリンポリペプチド

(57)【要約】
【課題】改良された特性を有するフリンポリペプチドを提供する。
【解決手段】本発明は、野生型フリンと比較して、ミドルドメイン（ホモ－Ｂ－ドメイン）と膜貫通ドメインとの間の改変されたアミノ酸配列を有するフリンポリペプチドを含み、このフリンポリペプチドは、タンパク質分解活性を保持するが、野生型フリンと比較して、低いレベルにおいて細胞培養物中に分泌される。さらに、本発明は、このようなフリンポリペプチドをコードする核酸分子、これらの核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞、これらのフリンポリペプチドを含有する組成物、ならびにこのような組成物を産生するための方法を含む。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
明細書中に記載の発明。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
（発明の背景）
本発明は、新規なフリンポリペプチドに関する。フリンは、（対合した塩基性アミノ酸切断酵素に因んで）ＰＡＣＥともまた称され、哺乳動物サブチリシン様プロタンパク質転換酵素（ＳＰＣまたはＰＣ）のファミリーに属する。これらのタンパク質は、分泌経路内において、単一か、対合しているか、または複数の塩基性コンセンサス部位において、不活性前駆体タンパク質の内部タンパク質分解（ｅｎｄｏｐｒｏｔｅｏｌｙｔｉｃ）変異プロセシングに関与する（Ｎａｋａｙａｍａ，１９９７，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．，３２７，６２５－６３５頁；ＳｅｉｄａｈおよびＣｈｒｅｔｉｅｎ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，８，１９９７，６０２－６０７頁に総説されている）。このファミリーの７つの別個のメンバーが、現在までに同定されており、フリン、ＰＣ１（ＰＣ３としてもまた公知）、ＰＣ２、ＰＡＣＥ４、ＰＣ４、ＰＣ５（ＰＣ６としてもまた公知）、ＰＣ７（またはＬＰＣ、ＰＣ８、もしくはＳＰＣ７）を含み、これらの各々が、独自の組織分布を示すが、いくつかの組織における種々のＰＣのオーバーラップした機能的縮重が起こり得る（Ｓｅｉｄａｈら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１９９４、７６、１９７－２０９頁）。
【０００２】
フリンは、試験された全ての哺乳動物組織および細胞株において遍在的に発現され、そして分泌経路において、広範な生物活性前駆体タンパク質（増殖因子、ホルモン、血漿タンパク質、レセプター、ウイルスエンベロープ糖タンパク質、および細菌毒素が挙げられる）をプロセシングし得る。フリンは、カルシウム依存型セリンエンドプロテアーゼであり、構造的にいくつかのドメイン（すなわち、シグナルペプチド、プロペプチド、触媒ドメイン、ミドルドメイン（ｍｉｄｄｌｅ ｄｏｍａｉｎ）（ホモ－ＢまたはＰドメインともまた称される）、Ｃ末端に位置するシステインリッチドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞質テイル）に配置されている。新規に合成されたフリン前駆体の、小胞体からゴルジ区画への遷移の際に、プロペプチドは、２段階プロセシング事象において、自己触媒反応的に除かれる（Ｌｅｄｕｃら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６７，１９９２，１４３０４－１４３０８頁；Ａｎｄｅｒｓｏｎら、ＥＭＢＯ Ｊ．，１９９７，１５０８－１５１８頁）。
【０００３】
フリンは、トランス－ゴルジ網（ＴＧＮ）に優先的に局在するが、これはまた、エンドソーム小胞を介してＴＧＮと細胞表面との間を循環し、これによって、構成的な分泌経路を介する前駆体タンパク質の移動の間に前駆体タンパク質をプロセシングし、かつ細胞外経路に入る分子をプロセシングする。種々のプロセシング区画への、フリンの細胞分布は、その細胞質テイル内での規定された構造的特性によって、明らかに方向付けられる（Ｓｃｈａｅｆｅｒら、ＥＭＢＯ Ｊ．，１１，１９９５，２４２４－２４３５頁；Ｖｏｏｒｈｅｅｓら、ＥＭＢＯ Ｊ．，２０，１９９５，４９６１－４９７５頁；Ｔｅｕｃｈｅｒｔら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７４，１９９９，８１９９－８２０７頁）。細胞質ドメインの欠失は、原形質膜に主として位置する短縮型フリンポリペプチドを生じ、この原形質膜へは、恐らくデフォルト経路によって、短縮型フリンポリペプチドが移送され、細胞質ドメインにおける調節配列モチーフの損失に起因して、ＴＧＮへの再循環が不可能である（Ｍｏｌｌｏｙら、ＥＭＢＯ Ｊ．，１３、１９９４、１８－３３頁；Ｓｃｈａｅｆｅｒら、ＥＭＢＯ Ｊ．，１４、１９９５、２４２４－２４３５頁）。
【０００４】
Ｃ末端ドメインは、フリンの機能的活性には必ずしも必要ではないことが見出された。

膜貫通ドメインおよび細胞質テイルを欠く変異体フリンは、細胞培養培地中に容易に放出され、一方で依然として重要な活性を示すことが見出された。全長組換えフリンの高レベルの発現は、膜貫通ドメインおよび細胞質テイルを欠く短縮型フリン形態（「流出（ｓｈｅｄ）」フリンと称される）の天然の分泌を生じた（Ｗｉｓｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，８７、１９９０、９３７８－９３８２頁；ＲｅｈｅｍｔｕｌｌａおよびＫａｕｆｍａｎ，Ｂｌｏｏｄ，７９，１９９２，２３４９－２３５５頁；Ｖｉｄｒｉｃａｉｒｅら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．，１９５，１９９３、１０１１－１０１８頁；Ｖｅｙら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１２７，１９９４，１８２９－１８４２頁；Ｐｒｅｉｎｉｎｇｅｒら、Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌ．，３０，１９９９，１－１５頁）。フリン流出（ｓｈｅｄｄｉｎｇ）が、飽和している細胞回復機構に起因するか否か、過剰なプロテアーゼに対する宿主細胞の保護機構を表すか否か、または分泌による細胞内フリン濃度／活性を調節する天然の調節プロセスの一部であるか否かに関しては、未解決のままである。ウシ腎臓細胞のゴルジ画分からの短縮型内因性フリンの単離は、切断が、単に、過剰発現によって引き起こされる人工的な分泌プロセスではないという考えを支持し得る（Ｖｅｙら、１９９４）。可溶性の分泌形態へのフリンの変換は、細胞内で、カルシウムの存在を必要とする酸性区画内で生じることが示された（Ｖｅｙら、１９９４）。

【０００５】

しかし、活性なままである、Ｃ末端短縮型であり、従って、可溶性形態のフリンの存在は、ネイティブな全長フリンを組換え的に過剰発現する細胞の馴化培地中でほぼ排他的に検出された（Ｗｉｓｅら、１９９０；ＲｅｈｅｍｔｕｌｌａおよびＫａｕｆｍａｎ、１９９２；Ｖｉｄｒｉｃａｉｒｅら、１９９３；Ｖｅｙら、１９９４；Ｐｒｅｉｎｉｎｇｅｒら、１９９９）。

【０００６】

フリンポリペプチドを記載する他の先行技術としては、ＷＯ９１／０６３１４が挙げられ、これは、アミノ酸１０８～４６４からなり、従って、ホモ－Ｂドメイン、システインリッチ領域、膜貫通ドメインおよび細胞質テイルの一部を欠失する、フリンのフラグメントを記載する。ＷＯ９２／０９６９８は、全長フリンおよび膜貫通ドメインを欠失するフリンを開示する。さらに、Ｐｒｅｉｎｉｎｇｅｒら（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３０、１９９９、ｐｐ．１－１５）は、システインリッチ領域、膜貫通ドメインおよびサイトゾルドメインを欠失する、フリン変異体を記載する。このような変異体を発現する細胞は、増加した細胞内濃度のフリン誘導体（しかし、分泌レベルは変化する）を含んだ。これらの著者らは、これらの分子の細胞外蓄積の欠失が、これらの分子がほぼおそらく分解されることを示唆すると述べている。さらに、著者らは、細胞内に位置する全長組換えフリンが、ほとんど不活性であるようであること、および、その宿主細胞に対するより多くの量の全長フリンの潜在的毒性が存在することを述べている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００７】

（発明の要旨）

本発明者らは、細胞培養培地中の可溶性フリンが、フリンによって天然でプロセシングされ非特異的に切断されないタンパク質を生じ得ることを見出した。例えば、ネイティブ第ＶＩＩＩ因子は、フリンによって天然でプロセシングされないが、第ＶＩＩＩ因子は、例えば、細胞培養培地中で長時間フリンに曝露された場合に、可溶性フリンによる誤ったプロセシングに対する標的となり得る。このことは、このような細胞培養培地中の構造的にインタクトな第ＶＩＩＩ因子タンパク質の収率の減少を導く。このことは、第ＶＩＩＩ因子を、フリンの天然の基質（例えば、フォン・ビルブラント因子）と共に同時発現させた場合か、またはフリンによって天然でプロセシングされる組換えタンパク質を、長時間フリンに対して曝露して、その結果、さらに、誤った部位が切断される場合に当てはまり得る。

【０００８】
本発明は、改変されたフリンポリペプチドの使用によって、細胞培養物中のタンパク質の非特異的切断を減少または阻害する。この改変されたフリンポリペプチドは、タンパク質分解活性を有するが、宿主細胞により培養培地中に分泌されないか、または野生型フリンの分泌と比較して減少した量で分泌される。このようなフリンポリペプチドは、大量に細胞内で発現された場合でさえ、宿主細胞に対して毒性ではないことが、見出されている。

【０００９】
従って、本発明は、野生型フリンと比較して、ホモＢドメインと膜貫通ドメインとの間（すなわち、図１および２に示されるアミノ酸配列に従うと、アミノ酸Ａｌａ５５７とＬｅｕ７１３との間）で改変されたアミノ酸配列を有するフリンポリペプチドを提供する。このような改変されたアミノ酸配列を有するフリンポリペプチドは、天然の（すなわち、野生型の）フリンと類似のタンパク質分解活性を有するが、このようなフリンポリペプチドを発現している宿主細胞によって、天然のフリンと比較して実質的に減少した量で培養培地中に分泌されるということは、驚くべき知見であった。

【００１０】
本発明によるフリンポリペプチドが、細胞への実質的な毒性なしに、この細胞内で大量に発現され得ることは、本発明の別の局面である。なおさらなる局面において、改変されたフリンタンパク質の生理学的な切断の性質はなお存在するが、培地中に存在するフリンが少ないか、または培地中にフリンが存在しないために、細胞培養培地中の分泌されたタンパク質または細胞外に局在するタンパク質の偶発的な切断が、非常に減少される。

【００１１】
さらに、本発明のフリンポリペプチドのさらなる利点は、フリン依存性タンパク質のタンパク質分解プロセシングは、細胞内で起こり得るが、フリンによるタンパク質の非特異的プロセシングは、これが完全に排除されない場合でも少なくとも減少され得るということである。従って、細胞培養の馴化培地中の可溶性フリンにタンパク質が暴露される場合に生じ得る、タンパク質の非特異的切断が、本発明によるフリンポリペプチドによって回避される。

別の局面において、本発明は、本発明によるフリンポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドを提供する。なお別の局面において、本発明は、本発明によるフリンポリペプチドを生成するための方法、本発明によるフリンポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む組換えベクター、このようなベクターを含む宿主細胞、および本発明のフリンポリペプチドを含む調製物を提供する。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する：

（項目１）　アミノ酸を含むフリンポリペプチドであって、該アミノ酸は、野生型フリンのアミノ酸配列と比較して、改変を含む配列を有し、ここで、該改変が、野生型フリンのアミノ酸Ａｌａ５５７とＬｅｕ７１３との間に存在している、フリンポリペプチド。

（項目２）　前記改変が、野生型フリンのアミノ酸Ａｌａ５５７とＬｅｕ７１３との間にループ構造またはα－ヘリックス構造の形成を生じる、項目１に記載のフリンポリペプチド。

（項目３）　前記改変がアミノ酸５７７と７１３との間である、項目１に記載のフリンポリペプチド。

（項目４）　前記改変が５～３０個のアミノ酸の置換である、項目１に記載のフリンポリペプチド。

（項目５）　前記改変が、変異フリンポリペプチドにヘリックス構造またはループ構造の形成を生じる１０個以上のアミノ酸の置換である、項目１に記載のフリンポリペプチド。

（項目６）　前記改変が、アラニン（Ａ）、ロイシン（Ｌ）、フェニルアラニン（Ｆ）、トリプトファン（Ｗ）、メチオニン（Ｍ）、ヒスチジン（Ｈ）、グルタミン（Ｑ）、およびバリン（Ｖ）からなる群より選択されるアミノ酸の付加または置換を含む、項目１に記載のフリンポリペプチド。

（項目７）　前記改変が、セリン（Ｓ）、イソロイシン（Ｉ）、トレオニン（Ｔ）、グルタミン酸（Ｅ）、アスパラギン酸（Ｄ）、リジン（Ｋ）、アルギニン（Ｒ）、グリシン（Ｇ）、チロシン（Ｙ）、システイン（Ｃ）、アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）、プロリン（Ｐ）、およびヒドロキシプロリンからなる群より選択されるアミノ酸の付加または置換を含む、項目１に記載のフリンポリペプチド。
（項目８）　アミノ酸５７８～７１１が欠失している、項目１に記載のフリンポリペプチド。
（項目９）　アミノ酸５７７と７１３との間のアミノ酸が、配列ＡＥＭＷＨＱＡＭＥＶを含むアミノ酸で置換されている、項目１に記載のフリンポリペプチド。
（項目１０）　アミノ酸５７７と７１３との間のアミノ酸が、配列ＧＳＰＮＳＱＰＹＤＧを含むアミノ酸で置換されている、項目１に記載のフリンポリペプチド。
（項目１１）　前記改変がＡｒｇ６８３においてである、項目１に記載のフリンポリペプチド。
（項目１２）　項目１に記載のフリンポリペプチドをコードする、組換えＤＮＡ分子。
（項目１３）　前記フリンポリペプチドの発現を可能にする異種性発現コントロール配列に作動可能に連結されている項目１２に記載のＤＮＡ分子を含む、組換え発現ベクター。
（項目１４）　項目１３に記載の組換えＤＮＡ発現ベクターを含む、宿主細胞。
（項目１５）　少なくとも１つの組換え発現される前駆体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、項目１４に記載の宿主細胞であって、ここで該ポリペプチドが、コードされるフリンポリペプチドに対する基質である、宿主細胞。
（項目１６）　項目１に記載のフリンポリペプチドを産生するための方法であって、該方法は、以下：
（ａ）発現ベクターを含む宿主細胞を栄養培地中で増殖させる工程であり、該発現ベクターは、転写の方向に順番に、以下：
該宿主細胞において機能的である、転写調節領域および翻訳開始領域、
項目１に記載の変異フリンポリペプチドをコードするＤＮＡ配列、ならびに、
該宿主細胞において機能的な翻訳終止領域および転写終止領域、
を含み、
ここで、該ＤＮＡ配列の発現は、該開始領域および終止領域によって調節される、工程；
（ｂ）タンパク分解活性を有するフリンポリペプチドの分泌速度を測定する工程；ならびに、
（ｃ）減少した分泌を示すフリンポリペプチドを単離する工程、
を包含する、方法。
（項目１７）　項目１に記載のフリンポリペプチドを含有する、薬学的調製物。
【図面の簡単な説明】
【００１２】
【図１】図１は、ヒト野生型フリンのアミノ酸配列を示す。
【図２】図２は、野生型フリンおよびフリン変異体のアミノ酸配列の図式的表示である。
【図３】図３は、フリン構築物で一過性トランスフェクトされたＦＤ１１－ＣＨＯ－ｒｖＷＦ細胞を増殖させた馴化培地中での流出フリンを示すＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの写真である。
【図４】図４は、フリン構築物で一過性トランスフェクトされたＦＤ１１－ＣＨＯ－ｒｖＷＦ細胞中のｒｖＷＦ前駆体のプロセシングを示すＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの写真である。
【図５Ａ】図５Ａ～５Ｃは、一過性トランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞におけるフリンの発現を示す。図５Ａは、一過性トランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞の馴化培地における流出組換えフリン（ｒフリン）を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの写真である。
【図５Ｂ】図５Ａ～５Ｃは、一過性トランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞におけるフリンの発現を示す。図５Ｂは、ＨＥＫ２９３溶解物における細胞内ｒフリン発現を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの写真である。

【図５Ｃ】図５Ａ～５Ｃは、一過性トランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞におけるフリンの発現をしめす。図５Ｃは、馴化培地および蛍光原基質（任意の単位）を使用するインビトロフリンアッセイの結果を示す。
【図６】図６は、ｒｖＷＦ前駆体プロセシングの程度と馴化培地中の流出フリンの存在との間の相関を示す３つのＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの写真である。
【発明を実施するための形態】
【００１３】
（発明の詳細な説明）
（フリンポリペプチド）
本発明は、ヒトフリン（このアミノ酸配列は、図１に示されている）のような野生型哺乳動物フリンのアミノ酸配列と比較して、アミノ酸Ａｌａ５５７とＬｅｕ７１３との間で改変されたアミノ酸配列を有するフリンポリペプチドを含む。本開示の目的のために、フリンポリペプチドは、タンパク質分解活性を有する野生型哺乳動物フリンタンパク質のアミノ酸配列の少なくとも一部を含むポリペプチドをいう。好ましい実施形態において、本発明によるフリンポリペプチドの改変は、アミノ酸Ａｌａ５５７とＬｅｕ７１３との間に位置する。代替的な実施形態において、この改変はＡｒｇ６８３においてである。なお別の実施形態において、アミノ酸Ｇｌｙ５７７とＨｉｓ７１２との間が欠失される。
【００１４】
本開示において、用語「改変された（改変した）」および「改変」は、フリンポリペプチドのアミノ酸配列に関して、１以上のアミノ酸の付加、欠失または置換を意味する。このような改変は、例えば、指向された変異誘発もしくはＰＣＲ、または生じるポリペプチドのアミノ酸配列における変化を指向する目的でＤＮＡ配列を特異的に変化するために適切である、当該分野において公知の遺伝子工学の他の方法によって実施され得る（Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．１，ｃｈ．８（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，Ｊ．Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，１９８９＆Ｓｕｐｐ．１９９０－９３）；Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ（Ｏｘｅｎｄｅｒ＆Ｆｏｘ ｅｄｓ．，Ａ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，１９８７）。本発明の改変は、ホモＢドメインと膜貫通ドメインとの間の領域内（すなわち、フリン分子のアミノ酸Ａｌａ５５７とＬｅｕ７１３との間の領域）である。
【００１５】
好ましくは、本発明のフリンポリペプチドは、ループまたはαヘリックス構造を作製するアミノ酸置換および／または付加を有する。ポリペプチドにおいてアミノ酸がいくつかの異なる二次構造（すなわち、ヘリックス構造またはループ構造）を形成し得ることは、先行技術から周知である（Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ Ａ．，”Ｂｉｏｃｈｅｍｉｅ”，ＶＣＨ，１９８５，ｐｐ．１０２－１０７；Ｋａｒｌｓｏｎ Ｐ．ｅｔ ａｌ．，”Ｋｕｒｚｅｓ Ｌｅｈｒｂｕｃｈ ｄｅｒ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｅ，Ｇｅｏｒｇ Ｔｈｉｅｍｅ Ｖｅｒｌａｇ，１９９４，ｐｐ．２９－３２）。これらの構造は、例えば、αヘリックスまたはループを形成する特定のアミノ酸を選択し、それにより生じるポリペプチド内のαヘリックスまたはループのような構造を発生することによって生成され得る（Ｒｏｓｔ Ｂ．ａｎｄ Ｓａｎｄｅｒ Ｃ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，１９９３，ｐｐ．７５５８－７５６２，Ｒｏｓｔ Ｂ．ａｎｄ Ｓａｎｄｅｒ Ｃ．，１９９４，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｆｕｎｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１９，ｐｐ．５５－７２）。さらに、Ｋｙｔｅ Ｊ．ａｎｄ Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅ Ｒ．（１９８３，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１５７，ｐｐ．１０５－１３２）に従って、このようなアミノ酸は、これらのヒドロパシー値に基づいて選択され得る。これは、ネガティブヒドロパシー値を示すアミノ酸はこれらの側鎖が水性溶媒に接近し得る親水性であるが、ポジティブヒドロパシー値を示すアミノ酸はタンパク質内部に含まれる傾向のある疎水性アミノ酸であるという知識の観点からである。さらに、非常に高いポジティブヒドロパシー値またはネガティブヒドロパシー値を示すアミノ酸は、種々のプロテアーゼについて好ましい標的であることが公知である。

【００１６】
従って、好ましい実施形態において、いくつかのアミノ酸（好ましくは、５と３０との間、より好ましくは、１０と２０との間）の挿入が存在する。これは、本発明の改変されたフリンポリペプチドにおいてループ構造またはヘリックス構造を生成する。
【００１７】
代替の実施形態において、アミノ酸の挿入は、ヘリックス構造を生じる。このような実施形態において、アミノ酸は、好ましくは、アラニン（Ａ）、ロイシン（Ｌ）、フェニルアラニン（Ｆ）、トリプトファン（Ｗ）、メチオニン（Ｍ）、ヒスチジン（Ｈ）、グルタミン（Ｑ）、バリン（Ｖ）およびグルタミン酸（Ｅ）からなる群より選択される。例えば、アミノ酸５５８～７３８、好ましくはアミノ酸５７８～７１１は、アミノ酸配列ＥＡＭＨＡ（配列番号１）、ＡＷＦＱＷ（配列番号２）またはＡＱＭＷＨＥＡＭＥＦＷＡＭＱＦＥＡＭＨＡ（配列番号３）によって置換される。好ましい実施形態において、フリンポリペプチドのアミノ酸５７８～７１１は、アミノ酸配列ＡＥＭＷＨＱＡＭＥＶ（配列番号４）によって置換される。
【００１８】
なお別の実施形態において、アミノ酸挿入は、ループ構造を形成し、ここで、このアミノ酸は、好ましくはセリン（Ｓ）、イソロイシン（Ｉ）、スレオニン（Ｔ）、グルタミン酸（Ｅ）、アスパラギン酸（Ｄ）、リジン（Ｋ）、アルギニン（Ｒ）、グリシン（Ｇ）、チロシン（Ｙ）、システイン（Ｃ）、アスパラギン（Ｎ）、プロリン（Ｐ）、グルタミン（Ｑ）およびヒドロキシプロリンからなる群より選択される。例えば、アミノ酸５５８～７３８、好ましくは、アミノ酸５７８～７１１は、アミノ酸配列ＳＹＮＰＧ、ＳＹＱＰＤまたはＧＳＰＹＱＴＮＧＰＳによって置換される。好ましい実施形態において、フリンポリペプチドのアミノ酸５７８～７１１は、アミノ酸配列ＧＳＰＮＳＱＰＹＤＧ（配列番号５）によって置換される。
【００１９】
ループ構造またはヘリックス構造を形成するためのアミノ酸の選択は、当業者に周知である（Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ　Ａ．，”Ｂｉｏｃｈｅｍｉｅ”，ＶＣＨ，１９８５，ｐｐ．１０２－１０７）。
【００２０】
代替の実施形態において、フリン配列のアミノ酸位６８３のアルギニンは、任意のアミノ酸、好ましくはリジン、グルタミン酸またはイソロイシンによって置換され得る。
【００２１】
（核酸およびベクター）
本発明の別の実施形態は、本発明のフリンポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。このようなポリヌクレオチドに使用される核酸は、ＤＮＡおよび／またはＲＮＡであり得る。
【００２２】
全長フリンポリヌクレオチド、およびタンパク質分解活性を有するフリンポリペプチドをコードするこの任意の誘導体は、本発明のフリンポリペプチドの構築のための出発物質として使用され得る。ネイティブなヒトフリンをコードするｃＤＮＡ配列は、ｖａｎ　ｄｅｎ　Ｏｕｗｅｌａｎｄ，Ａ．Ｍ．Ｗ．ｅｔ　ａｌ．（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．，１９９０，１８（３），ｐ．６６４）およびＦｕｌｌｅｒ　Ｒ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．（Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９８９，２４６：４８２）によって公表された。このようなフリンポリヌクレオチドは、任意の哺乳動物種、好ましくは、ヒト供給源、ブタ供給源またはウシ供給源由来であり得る。
【００２３】
ポリヌクレオチドは、上記ＤＮＡまたはＲＮＡの異種性発現のために適切なエレメントを提供するベクターによって発現される。発現ベクターは、例えば、宿主細胞において機能的な転写調節領域および翻訳開始領域、本発明のフリンポリヌクレオチドをコードするＤＮＡ配列、ならびに上記宿主細胞において機能的な翻訳終止領域および転写終止領域を

含む。ここで、上記核酸配列の発現は、上記開始領域および終止領域によって調節される。

【００２４】

発現ベクターはまた、上記ＤＮＡまたはＲＮＡの複製についてのエレメントを含み得る。発現ベクターは、ＤＮＡベクターまたはＲＮＡベクターであり得る。ＤＮＡクローニングベクターおよび発現ベクターの例は、以下である：ｐＢＳＳＫＩＩ（Ｓｈｏｒｔ，Ｊ．Ｍ．，Ｆｅｒｎａｎｄｅｚ，Ｊ．Ｍ．，Ｓｏｒｇｅ，Ｊ．Ａ．ａｎｄ Ｈｕｓｅ，Ｗ．Ｄ．Ｌａｍｂｄａ ＺＡＰ，１９８８，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １６（１５），７５８３－７６００；Ａｌｔｉｎｇ．Ｍｅｅｓ，Ｍ．Ａ．，ａｎｄ Ｓｈｏｒｔ，Ｊ．Ｍ．，１９８９，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １７（２２），９４９４）、ｐＢＰＶ、ｐＳＶＬ、ｐＣＭＶ、ｐＲｃ／ＲＳＶ、筋原性ベクター系（ＷＯ９３／０９２３６）またはウイルス系（例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルスまたはバキュロウイルス）由来のベクター。ＲＮＡ発現ベクターの例は、レトロウイルスまたはフラビウイルスのようなＲＮＡウイルス由来のベクターである。

【００２５】

いくつかの場合において、フリンポリペプチドに対してタンパク質前駆体を発現する遺伝子の複数のコピーまたはその逆のコピーを有することが望ましい。これは、従来技術に十分に記載される様式で達成され得る。あるいは、異なる転写開始速度または異なるプロモーターを有する２つの転写調節領域を使用して、本発明に従うフリンポリペプチド、または前駆体ポリペプチドおよび／もしくはフリンによってタンパク質分解処理されないさらなるポリペプチドのいずれかの増大した発現を提供する。

【００２６】

本発明に従う改変されたフリンポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを使用して、宿主細胞を形質転換し、次いでこのポリペプチドを産生し得る。この形質転換した宿主細胞を、細胞培養系中で増殖して、インビトロでこのポリペプチドを産生し得る。

【００２７】

遺伝子治療におけるいくつかの特定の適用について、すなわち、核酸自体が、哺乳動物の器官に注射される場合、この核酸、ＤＮＡおよびＲＮＡは、化学的に改変され得る。この化学的改変は、例えば、骨格または末端を安定化することによって、ヌクレアーゼ消化から核酸を保護する改変であり得る。

【００２８】

本発明のフリンポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターは、宿主細胞にインビトロで予め形質転換することなく、哺乳動物にさらに投与され得る。このタイプの遺伝子治療の実際の背景は、いくつかの特許出願（例えば、ＷＯ９０／１１０９２）に開示される。この核酸を含む発現ベクターは、適切なキャリア（例えば、生理学的緩衝溶液）と混合され、そして器官（好ましくは、哺乳動物の骨格筋、皮膚または肝臓）に注射される。

【００２９】

（宿主細胞）

本発明に従う改変されたフリンポリペプチドは、好ましくは、組換え発現によって産生される。これは、当該分野で公知の発現系（例えば、永久細胞株またはウイルス発現系）を用いる遺伝子操作によって調製され得る。永久細胞株は、例えば、ｖｅｒｏ、ＭＲＣ５、ＣＨＯ、ＢＨＫ、２９３、ＨＥＫ ２９３、Ｓｋ－Ｈｅｐ１、肝臓細胞、腎臓細胞、線維芽細胞、ケラチノサイトまたは筋芽細胞、肝細胞または幹細胞（例えば、造血幹細胞）の宿主細胞ゲノムに、異種ＤＮＡを安定に組み込むことによって、または例えば、パピローマウイルス由来のエピソームベクターによって、調製される。

【００３０】

あるいは、内在性フリン活性を有さない細胞株が使用され得る（Ｍｏｅｈｒｉｎｇ Ｊ

．Ｍ．およびＭｏｅｈｒｉｎｇ　Ｔ．Ｊ．，Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．，４１，１９８３，９９８～１００９頁）。例えば、ＣＨＯ－ＲＰＥ４０またはＦＤ１１－ＣＨＯ細胞が使用され得る。ここで、本発明のトランスフェクトされたフリンのタンパク質分解活性は、内在性フリンのバックグラウンド活性を回避して、容易に測定され得る。

【００３１】

ウイルス発現系（例えば、ワクシニアウイルス系、バキュロウイルス系またはレトロウイルス系）もまた用いられ得る。ｖｅｒｏ、ＭＲＣ５、ＣＨＯ、ＢＨＫ、２９３、Ｓｋ－Ｈｅｐ１、腺、肝臓または腎臓の細胞が、細胞株として、一般的に使用される。真核生物発現系（例えば、酵母、内在性腺（例えば、トランスジェニック動物の腺）、およびトランスジェニック動物）もまた、本発明に従うフリンポリペプチドの発現のために使用され得る。組換えタンパク質の発現について、ＣＨＯ－ＤＨＦＲ細胞が、特に有用であることが判明している（Ｕｒｌａｕｂら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，第７７巻、４２１６～４２２０頁、１９８０）。

【００３２】

本発明に従うフリンポリペプチドは、適切なプロモーターの制御下で、それぞれの発現系において発現される。真核生物における発現について、公知のプロモーター（例えば、ＳＶ４０、ＣＭＶ、ＲＳＶ、ＨＳＶ、ＥＢＶ、β－アクチン、ｈＧＨまたは誘導性プロモーター（例えば、ｈｓｐまたはメタロチオネインプロモーター））が適切である。

【００３３】

好ましい実施形態において、本発明は、本発明に従うフリンポリペプチドおよび前駆体ポリペプチドを生成するための方法を提供する。好ましくは、このフリンポリペプチドは、フォン・ビルブラント因子タンパク質および／または第ＶＩＩＩ因子タンパク質と同時発現される。

【００３４】

さらなる局面において、本発明は、本発明に従うフリンポリペプチドを生成するための方法を提供する。この方法は、栄養培地中で、発現ベクターを含む宿主細胞を増殖させる工程を包含し、この発現ベクターは、宿主細胞において機能的な転写調節領域および翻訳開始領域、本発明のフリンポリペプチドをコードするＤＮＡ配列、ならびにこの宿主細胞において機能的な翻訳終止領域および転写終止領域を、転写の方向で含む。このＤＮＡ配列の発現は、この開始領域および終止領域によって調節される。この方法は、タンパク質分解活性を有する発現されたフリンポリペプチドの分泌速度を測定する工程、および野生型フリンを発現する宿主細胞と比較して減少した分泌を示すフリンポリペプチドを発現する宿主細胞を単離する工程をさらに包含する。

【００３５】

（薬学的調製物）

本発明に従うフリンポリペプチドは、本発明に従う改変されたフリンポリペプチドを、一成分調製物として有するか、または多成分系として他の成分と組み合わせて有する薬学的調製物として提供され得る。特定の実施形態において、本発明のフリンポリペプチドは、プロタンパク質（例えば、フォン・ビルブラント因子）と合わされ得る。

【００３６】

（特異的活性）

本発明の１つの局面によると、本発明のフリンポリペプチドは、野生型フリンタンパク質（例えば、野生型ヒトフリン）のタンパク質分解活性と比較して、少なくとも５０％、好ましくは少なくとも１００％のフリンタンパク質分解活性を有する。

【００３７】

タンパク質分解活性の評価は、任意の適切な試験によって（例えば、フリンが特異的である二塩基性切断部位からなる蛍光発生性基質を使用することによって）行われ得る（Ｐｒｅｉｎｉｎｇｅｒ　Ａ．ら、１９９９，Ｓｃｈｌｏｋａｔ　Ｕ．ら、１９９６，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，第２４巻、２５７～２６７頁）。あるいは、タンパク質分解活性はまた、プロタンパク質（例えば、プロｒｖＷＦ）と共にフリン

を十分な時間インキュベートすることによって測定され得る。プロｒｖＷＦのプロセシングの程度は、ウエスタンブロッドによって分析され得る。

【００３８】

（分泌速度）

この分泌速度は、所定の時間内で細胞培養培地中に蓄積する、分泌したフリンポリペプチド（流出フリン）の量として規定され得る。本発明に従う改変されたフリンポリペプチドの分泌速度の減少は、野生型配列を有する、組換え発現されたフリン（例えば、野生型ヒトフリン）または膜貫通領域および／もしくは細胞質領域を欠くフリンの分泌速度と比較して、少なくとも２５％、好ましくは、少なくとも５０％、より好ましくは、少なくとも９０％、最も好ましくは、少なくとも１００％である。

【００３９】

例えば、この分泌速度は、抗フリン抗体との免疫反応性によって測定され得る。適切な抗体は、フリンの触媒ドメインに対して指向され得る（Ｐｒｅｉｎｉｎｇｅｒら、１９９９）。

【００４０】

（単離方法）

本発明に従うフリンポリペプチドを、溶解によって細胞から単離し、そして従来の方法によって、必要に応じて、プロテアーゼインヒビターの存在下でさらに精製し得る。この精製は、当該分野で公知のクロマトグラフィー方法、好ましくは、フリンポリペプチドに対する抗体を使用する、アフィニティークロマトグラフィーによって、またはＨｉｓ－Ｔａｇ基にフリンポリペプチドを連結し、そしてNi^{2+}－ＮＴＡアガロース上にタンパク質を選択的に結合することによって、なされ得る（Ｐｒｅｉｎｉｎｇｅｒら、１９９９）。

【００４１】

野生型フリンと比較して本発明のフリンポリペプチドのタンパク質分解特性が、実質的に変更されていないという事実に起因して、野生型フリンによって処理されるタンパク質もまた、本発明のフリンポリペプチドによって処理され得る。すなわち、対のアミノ酸残基を有するタンパク質は、基質として役立ち得る。本発明の使用のための前駆体分子の例としては、以下が挙げられ得るが、これらに限定されない：フォン・ビルブラント因子、第ＸＩ因子、プロテインＣ、プロテインＳ、プロトロンビン、第Ｘ因子、第ＶＩＩ因子、トランスホーミング増殖因子（ＴＦＦ）βおよびそれらのスーパーファミリー（アクチビンおよびインヒビンを含む）、骨形態形成タンパク質（ＢＭＰ）、インスリン、レラキシン、増殖因子様血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、神経発育因子（ＮＧＦ）、およびウイルスポリペプチド（サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）由来のポリペプチドを含む）、ヒト免疫不全ウイルスならびに単純疱疹ウイルス。

【００４２】

本発明は、続いて記載される実施例において例示される。当業者の範囲内の改変は、本発明の範囲内にあると考えられるべきである。他に規定されない限り、本明細書で使用される全ての技術的な用語および科学的な用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されるものと同一の意味を有する。本明細書中に記載される材料と類似または等価な任意の方法および材料は、本発明の実施または処理の際に使用され得るが、好ましい方法および材料が、ここに記載される。以下の実施例は、本発明を例示するが、いずれの方法においても本範囲を限定するものではない。

【実施例】

【００４３】

（実施例）

（１．フリンＲ６８３Ａの構築）

６８３位にある天然アルギニンの代わりにアミノ酸アラニンを含む、全長フリン変異体Ｒ６８３Ａを、伸長したオーバーラッププライマーを用いるＰＣＲベースのアプローチを使用して、構築した（Ｈｏら、１９８９、Ｇｅｎｅ、７７、５１～５９頁）。最初に、２

種の標準的なＰＣＲ反応を、鋳型としてプラスミドｐＣＭＶフリンｗｔ（フリン野生型ｃＤＮＡを含む）および以下のプライマー対を使用して実施した：４９５３（５’ＧＧＧＧＧＡＴＣＣＣ　ＴＣＴＧＧＣＧＡＧＴ　ＧＧ３’）（配列番号６）および５２１０（５’ＣＧＧＧＧＡＣＴＣＴ　ＧＣＧＣＴＧＣＴＣＴ　Ｇ３’）（配列番号７）または５２０９（５’ＣＡＧＡＧＣＡＧＣＧ　ＣＡＧＡＧＴＣＣＣＣ　Ｇ３’）（配列番号８）および４９５４（５’ＧＧＧＧＧＡＴＣＣＣ　ＣＧＣＧＧＣＣＴＡＧ　Ｇ３’）（配列番号９）。ここで、５２１０および５２０９は、変異を誘導する相補的に伸長される内部プライマーであり、そして４９５３および４９５４は、Ｂａｍ　ＨＩ制限部位を含む外部プライマーである。第二のＰＣＲラウンドにおいて、最初のＰＣＲ反応の２種の精製された増幅産物を、２種の外部プライマー４９５３および４９５４の存在下でオーバーラップ伸長のために合わせた。最後の精製されたＰＣＲ産物を、Ｂａｍ　ＨＩで消化し、そしてプラスミドｐＣＭＶ－フリンｗｔ中の野生型Ｂａｍ　ＨＩフラグメントを置換するために使用した。

【００４４】

（２．フリン欠失変異体のヘリックス１０、ループ１０およびΔ５７８－７１１の構築）

フリン発現構築物のヘリックス１０（１０個の螺旋構造の残基によって置換Ｓなれたアミノ酸残基５７８－７１１の欠失を含む）、ループ１０（１０個のループ構造の残基によって置換されたアミノ酸残基５７８－７１１の欠失を含む）およびΔ５７８－７１１（アミノ酸残基５７８－７１１の欠失を含む）を、逆ＰＣＲによって産生した。このために、野生型フリンの内部の１１７６ｂｐ　Ｂａｍ　ＨＩフラグメントを、ベクターｐＢＳ　ＳＫＩＩ（＋）（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）のＢａｍ　ＨＩ部位にサブクローングした。得られたプラスミドｐＢＳ／ｆｕｒ１１７６を、個々の構築物の逆ＰＣＲ反応のための鋳型として使用した。ヘリックス１０およびループ１０の場合において、特定のセンスプライマーおよび逆方向プライマーの各々は、それらの５’末端に、５個の螺旋構造アミノ酸またはループ構造アミノ酸をコードする、さらなる１５個のオーバーハングヌクレオチドを含んだ。以下のプライマーセットを使用した：ヘリックス１０について：センスプライマー５６９９（５’ＣＡＧＧＣＣＡＴＧＧ　ＡＧＧＴＧＣＡＣＣＴ　ＧＣＣＴＧＡＧＧＴＧ　ＧＴＧＧＣＣＧＧＣＣ　ＴＣＡＧＣ３’）（配列番号１０）および逆方向プライマー５７００（５’ＧＴＧＣＣＡＣＡＴＣ　ＴＣＧＧＣＣＣＣＣＣＴ　ＣＡＧＧＧＧＣＧＧＴ　ＧＣ　ＣＡＴＡＧＡＧＴ　ＡＣＧＡＧ３’）（配列番号１１）、ループ１０について：センスプライマー５７０１（５’ＣＡＧＣＣＣＴＡＣＧ　ＡＣＧＧＣＣＡＣＣＴ　ＧＣＣＴＧＡＧ　ＧＴＧ　ＧＴＧＧＣＣＧＧＣＣ　ＴＣＡＧＣ３’）（配列番号１２）および逆方向プライマー５７０２（５’ＧＣＴＧＴＴＧＧＧＧ　ＣＴＧＣＣＣＣＣＣＴ　ＣＡＧＧＧＧＣＧＧＴ　ＧＣＣＡＴＡＧＡＧＴ　ＡＣＧＡＧ３’）（配列番号１３）、ならびにΔ５７８－７１１について：センスプライマー５７２３（５’ＣＡＣＣＴＧＣＣＴＧ　ＡＧＧＴＧＧＴ　ＧＧＣ　Ｃ３’）（配列番号１４）および逆方向プライマー５７２４（５’ＣＣＣＣＴＣ　ＡＧＧＧ　ＧＣＧＧＴＧＣＣＡＴ　Ａ３’）（配列番号１５）。得られたＰＣＲフラグメントを精製し、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）で処理し、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼ（Ｒｏｃｈｅ）で再連結し、そしてＥ．ｃｏｌｉ株ＸＬ１　Ｂｌｕｅ　ＭＲＦ’（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）中に形質転換した。導入された改変を含む、ポジティブクローンを、配列決定により選択し、そして変異したＢａｍＨＩフラグメントを、ｐＣＭＶ－フリンｗｔ中のｗｔ　１１７６ｂｐ　ＢａｍＨＩフラグメントを置換するために使用した。

【００４５】

一般に、標的配列の増幅は、市販の１０×ＰＣＲ緩衝液および２．５Ｕ　Ｖｅｎｔ$_{R}$（登録商標）ＤＮＡポリメラーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）中の３０ｐＭｏｌの各プライマー、２００μＭの各ｄＮＴＰ、２ｍＭのＭｇＳＯ$_{4}$を含む、全容積１００μｌの１０～２０ｎｇの鋳型ＤＮＡを使用する、３０サイクルのＰＣＲを、５５℃でのアニーリングおよび７２℃での伸長温度で慣用的に実施した。ＰＣＲフラグメントを、ＱＩＡＥＸ　ＩＩ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して

、供給者の指示書に従って精製した。
【００４６】
フリン欠失改変体Δ５７８－７１１中へのヘリックス１０の挿入は、アミノ酸配列ＡＥＭＷＨＱＡＭＥＶ（配列番号４）を含む。
【００４７】
フリン欠失改変体Δ５７８－７１１中へのループ１０の挿入は、アミノ酸配列ＧＳＰＮＳＱＰＹＤＧ（配列番号５）を含む。
【００４８】
（３．トランスフェクション、細胞培養およびタンパク質収集）
フリン構築物は、２９３ＨＥＫ細胞（ヒト胚性腎臓線維芽細胞；ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１５７３）およびＦＤ１１－ＣＨＯ－ｒｖＷＦ細胞（ＦＤ１１－ＣＨＯは、フリン欠損細胞である）において一過性発現された。１０％ウシ胎仔血清（完全培地）を補充したＤＭＥＭ／ＨａｍのＦ１２（１：１）培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）において、細胞を増殖させた。トランスフェクションのために、細胞を５ｃｍ培養ディッシュ（Ｃｏｓｔａｒ）上で５０～７５％のコンフルエンシーまで増殖させ、そして以前に記載（Ｆｉｓｃｈｅｒら、１９９４）のように、リン酸カルシウム共沈によってトランスフェクトした。一過性トランスフェクションを、２０μｇの発現プラスミドを用いて実行した。
【００４９】
無血清完全培地をコンフルエンシー（一般的に、トランスフェクションの４８時間後）のトランスフェクトされた細胞に適用し、それらをＰＢＳ（Ca^{2+}およびMg^{2+}を含まない、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で２回洗浄した後に、組換えタンパク質を収集した。馴化培地を収集し、そして遠心分離によって浄化した。接着細胞を、トリプシン処理し、ＰＢＳで洗浄し、そして細胞の総数を、３０μｍキャピラリーを使用して、ＣＡＳＹカウンター（Ｓｃｈａｒｆｅ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｇｅｒｍａｎｙ）によって決定した。細胞抽出物を、その細胞を5×10^{7}細胞／ｍｌの濃度の溶解緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡおよび０．５％Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１００を含有する）で溶解させることによって調製した。３０分間４℃でのインキュベーションの後に、溶解物を、１５分間、１０，０００×ｇ、４℃で遠心分離することによって浄化した。
【００５０】
（４．ウェスタンブロット）
サンプルを還元し、そして変性させ、４％スタッキング／８％または１０％分離ゲル上でのＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離し、そして記載されるように（Ｓｃｈｌｏｋａｔら、１９９６）、ウェスタンブロッティングによって視覚化した。ＦＤ１１－ＣＨＯ－ｒｖＷＦの一過性トランスフェクションから誘導される馴化培地は、充填の前に、ｓｐｅｅｄ－ｖａｃ遠心分離によって２０倍に濃縮された。溶解物を、７．５×１０細胞等量で、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上にスロット毎に適用した。フリン分子の検出のために、フリンの触媒ドメインに指向するマウスモノクローナル抗体ＭＯＮ－１４８（Ａｌｅｘｉｓ）および第２抗体としての抗マウスＩｇＧヤギ血清（Ｓｉｇｍａ）に結合したアルカリホスファターゼを、使用した。組換えｖＷＦを、ウサギ抗ｖＷＦ抗血清（ＤＡＫＯ）および第２抗体としての抗ウサギＩｇＧヤギ血清（Ｐｒｏｍｅｇａ）に結合したアルカリホスファターゼを使用して視覚化した。
【００５１】
図３は、一過性トランスフェクトされたＦＤ１１－ＣＨＯ－ｒｖＷＦ細胞の馴化培地における流出フリンの量を示す。馴化培地を、２０倍に濃縮し、そして４％スタッキング／１０％分離ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルに適用し、変性させた。ウェスタンブロットを、ＭＯＮ－１４８およびＡＰ結合抗マウスＩｇＧ抗体で視覚化した。
【００５２】
コントロールとして、ｐＣＭＶベクター、野生型フリンポリペプチドおよびΔ５７７Ｇ－４ｘＧ－１０ｘＨを使用した。フリン構築物Δ５７７Ｇ－４ｘＧ－１０ｘＨを、Ｐｒｅ

ｉｎｉｎｇｅｒら（１９９９）に従って調製した。
【００５３】
図は、明かに、本発明に従うフリン構築物が、いかなる流出も示さない（すなわち、培地への分子の分泌速度が、野生型配列を有するｒフリンまたは膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを欠くフリンと比較して実質的に減少する）ことを示す。
【００５４】
（５．馴化培地におけるインビトロフリン活性の分析）
流出フリン分子の機能的活性を、以前に記載された（Ｓｃｈｌｏｋａｔら、１９９６）ように、螢光原基質によって決定した。
【００５５】
（６．細胞内ｒフリン活性の証拠）
フリン変異体Ｒ６８３Ａまたは野生型フリンを安定に発現するＦＤ１１－ＣＨＯ－ｒｖＷＦ細胞を、２０μｇフリン発現プラスミドおよび１μｇの選択プラスミドｐＣＭＶ－ｈｙｇ（ハイグロマイシンＢ（Ｒｏｃｈｅ）に対する耐性を媒介する）を使用して同時トランスフェクションによって確立した。耐性クローンを、トランスフェクションの２週間後に単離し、そして選択圧下でサブクローニングすることによって安定化した。３つのＦＤ１１－ＣＨＯ－ｒｖＷＦ／Ｒ６８３Ａクローン（クローン１、２、および３）（分泌されるｒフリンの量で異なり、結果として種々の程度のｒｖＷＦ前駆体プロセシングを示す）を選択した。
【００５６】
細胞内フリン活性を、ｒｖＷＦ前駆体プロセシングの程度と２４時間にわたるＦＤ１１－ＣＨＯ－ｒｖＷＦ／Ｒ６８３Ａ馴化培地存在とを相関させることによって実証した。コントロールとして、ＦＤ１１－ＣＨＯ－ｒｖＷＦ／フリン　ｗｔおよびＦＤ１１－ＣＨＯ－ｒｖＷＦ細胞を使用した。細胞を、コンフルエンシーになるまで６ウェルディッシュ（１ウェル／タイムポイント）で増殖させ、そしてＰＢＳで２回洗浄し、その後、無血清培地を、４時間、８時間、１６時間および２４時間に適用した。馴化培地を遠心分離によって浄化し、そして流出ｒフリンの検出のために２０倍に濃縮した。ｒｖＷＦ前駆体プロセシングの評価をウェスタンブロットによって行った。
【００５７】
図４は、一過性トランスフェクトされたＦＤ１１－ＣＨＯ－ｒｖＷＦ細胞におけるｒｖＷＦ前駆体のプロセシングを示す。１００ｎｇ　ｒｖＷＦをレーンごとに適用した。プローブを還元し、変性し、そして４％スタッキング／５％分離ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルに適用した。ウェスタンブロットを、ポリクローナルウサギ抗ｖＷＦおよびＡＰ結合抗ウサギＩｇＧ抗体を用いて展開した。細胞は一過性トランスフェクトされたのみであったが、Ｒ６８３Ａ、Ｈｅｌｉｘ　１０、Ｌｏｏｐ１０およびΔ５７８－７１１フリン構築物は、タンパク質分解活性を明示した。用語、一過性トランスフェクトされたとは、遺伝的に不均一な混合細胞集団を反映する。トランスフェクション効率に依存して、細胞のうちのいくつかのみがトランスフェクトされる。
【００５８】
図５（図５Ａ～５Ｃを含む）は、一過性トランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞におけるフリン発現を示す：
図５Ａは、一過性トランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞の馴化培地における流出フリンを示す。１５μｌの馴化培地をスロット毎に適用した。プローブを還元し、変性し、そして４％スタッキング／１０％分離ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルに適用した。ウェスタンブロットを、ＭＯＮ－１４８およびＡＰ結合抗マウスＩｇＧ抗体を用いて展開した。
【００５９】
図５Ｂは、ＨＥＫ２９３溶解物における細胞内ｒフリンの測定を示す。７．５×１０ｅ５細胞等量をスロット毎に適用した。
【００６０】
図５Ｃは、馴化培地および螢光原基質を使用するインビトロアッセイの結果を示す。

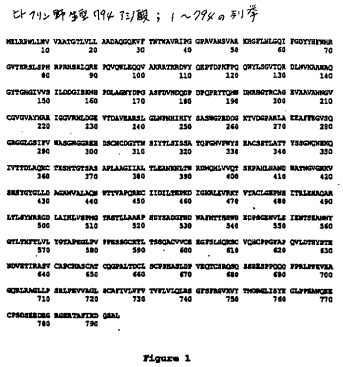
【００６１】
図５Ａは、特異的抗体によって検出可能な培地における分泌されたフリンポリペプチドの量が、非常に減少することを示す。これは、図５Ｃに示されるインビトロ活性測定によって確認された。図５Ｂのデータは、フリンポリペプチドが細胞内に位置することを示す。

【００６２】
図６は、フリン構築物Ｒ６８３Ａの細胞内タンパク質分解活性を示す。馴化培地におけるｒｖＷＦ前駆体タンパク質プロセシングの程度および流出ｒフリンの存在を比較する。この図は、流出フリンが培地において検出されないとしても、ｖＷＦタンパク質の有意なタンパク質分解プロセシングが生じることを示す。これは、このフリンポリペプチドが、培地に分泌されなくても、タンパク質分解的に活性であることを示す。

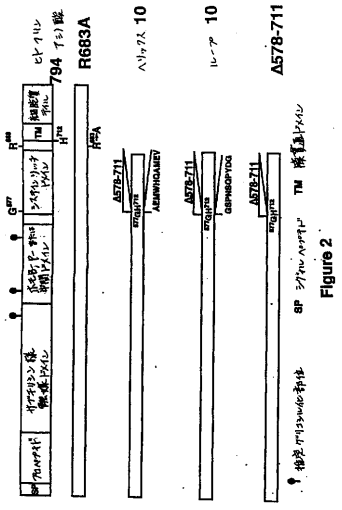
【００６３】
上側のレーンは、ｖＷＦウェスタンブロットであり、ここで、１００ｎｇ　ｒｖＷＦは、レーン毎に適用される。ポジティブコントロールとして、ＣＨＯ－ｒｖＷＦを使用した。

【００６４】
下側のレーンは、馴化培地のフリンウェスタンブロットである。この物質は、レーン毎に２０倍に濃縮される。ポジティブコントロールとして、流出野生型ｒｖＷＦを使用した。

【図１】



【図２】



【図３】

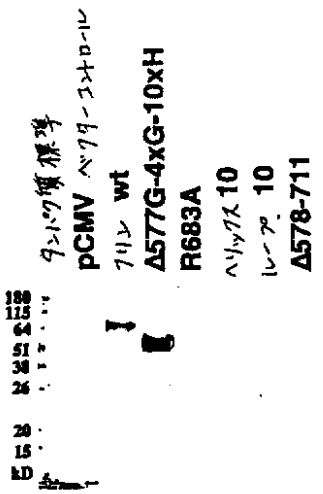


Figure 3

【図４】

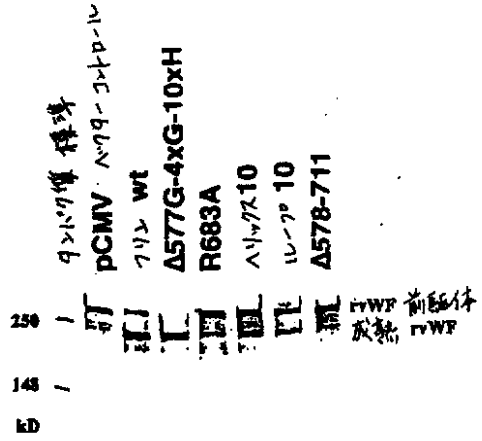


Figure 4

【図５Ａ】

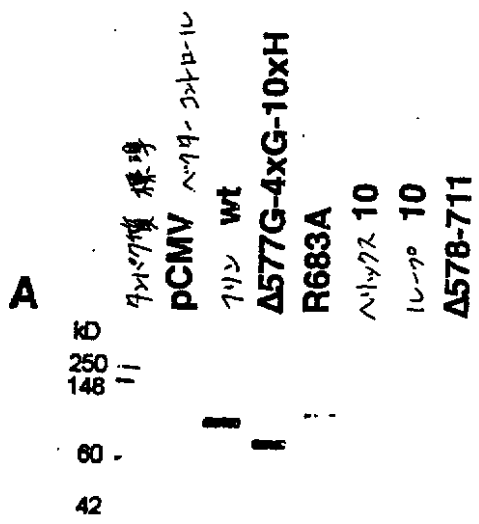


Figure 5

【図５Ｂ】

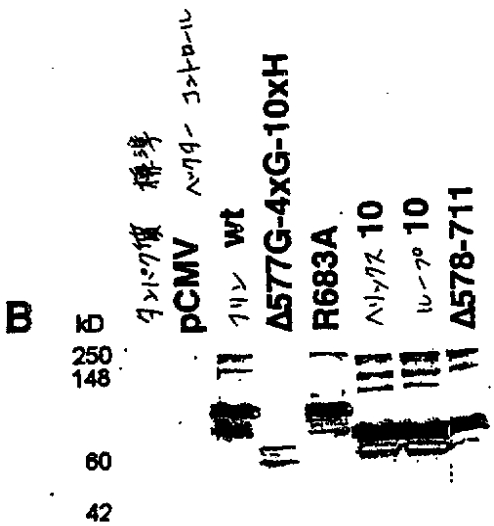


Figure 5

【図５Ｃ】

c

培養物	細胞x10e6	プリン nM/100μl	プリン /10e6 細胞
維持液コントロール	7.89	17.1	43
pCMV	6.60	17.0	52
プリン wt	5.39	621.3	2305
Δ577G-4xG-10xH	7.00	630.0	1800
R833A	7.80	160.5	412
ハリックス10	5.58	141.9	509
ループ10	4.95	78.1	316
Δ578-711	6.86	20.6	60

Figure 5

【図６】

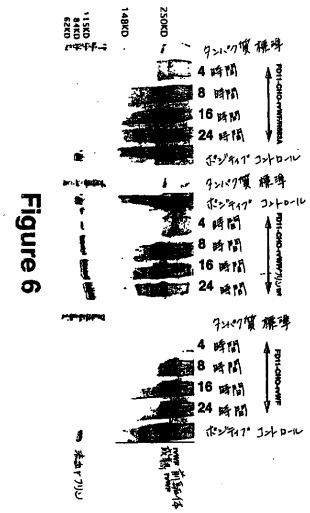


Figure 6

【配列表】

2014155506000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　5/10	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ　5/00	１０２	
Ａ６１Ｋ　38/00	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ　5/00	１０１	
Ａ６１Ｐ　43/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ　37/02		
		Ａ６１Ｐ　43/00	１０５	

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA14 CA04 CA06 DA02 EA04 GA11 GA18 HA01
HA20
4B050 CC04 DD07 FF01 FF02 LL01 LL03
4B065 AA91X AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA33 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 BA02 BA22 CA17 CA53 CA56 NA14 ZB212

【外国語明細書】
2014155506000001.pdf