

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-538932

(P2005-538932A)

(43) 公表日 平成17年12月22日(2005.12.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 19/00	C O 7 K 19/00	4 B O 2 4
A61K 38/55	A 6 1 P 7/04	4 B O 6 4
A61P 7/04	A 6 1 P 7/10	4 B O 6 5
A61P 7/10	A 6 1 P 19/04	4 C O 8 4
A61P 19/04	A 6 1 P 35/00	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 94 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-566175 (P2003-566175)
 (86) (22) 出願日 平成15年2月7日(2003.2.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年10月5日(2004.10.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/003616
 (87) 国際公開番号 W02003/066824
 (87) 国際公開日 平成15年8月14日(2003.8.14)
 (31) 優先権主張番号 60/355,547
 (32) 優先日 平成14年2月7日(2002.2.7)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

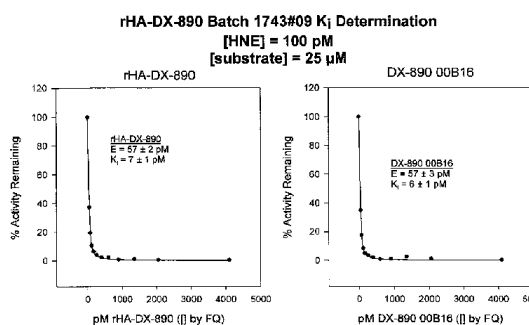
(71) 出願人 305038980
 アベンティス、ベーリング、ゲゼルシャフ
 ト、ミット、ベシュレンクテル、ハフツン
 グ
 AVENTIS BEHRING GMB
 H
 ドイツ連邦共和国マルブルク、エミール-
 フォン-ベーリング、シュトラッセ、76

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルブミン融合クニットドメインペプチド

(57) 【要約】

本発明は、クニットドメインペプチドのようなセリンプロテアーゼ阻害ペプチド(その断片および変種を含むが、それらに限定されない)をアルブミンまたはその断片もしくは変種へ融合させた、タンパク質に関する。これらの融合タンパク質は、ここでは“本発明のアルブミン融合タンパク質”として包括的に称される。これらの融合タンパク質は、溶解状態で長期貯蔵期間および/または長期または治療活性を示す。本発明は、治療用アルブミン融合タンパク質、組成物、医薬組成物、処方物およびキットを包含する。本発明は、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードする核酸分子、並びにこれらの核酸を含有したベクター、これらの核酸およびベクターで形質転換された宿主細胞、およびこれらの核酸、ベクターおよび/または宿主細胞を用いて本発明のアルブミン融合タンパク質を作製する方法も包含する。本発明はまた、好中球エラスターゼ、カリクレインおよびプラスミンを阻害するための組成物および方法にも関する。さらに本発明は、嚢胞性線維症および癌を治療するための組成物および方法にも関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

クニッツ (Kunitz) ドメインペプチドまたはその断片もしくは変種と、アルブミンまたはその断片もしくは変種とを含んでなる、アルブミン融合タンパク質。

【請求項 2】

クニッツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種が機能活性を有している、請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 3】

機能活性がセリンプロテアーゼを阻害することを含む、請求項 2 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 4】

機能活性がプラスミンを阻害することを含む、請求項 2 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 5】

機能活性がヒト好中球エラスターゼを阻害することを含む、請求項 2 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 6】

機能活性がカリクレインを阻害することを含む、請求項 2 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 7】

D X 890 またはその断片もしくは変種と、アルブミンまたはその断片もしくは変種とを含んでなる、請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 8】

D P I 14 またはその断片もしくは変種と、アルブミンまたはその断片もしくは変種とを含んでなる、請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 9】

D X 88 またはその断片もしくは変種と、アルブミンまたはその断片もしくは変種とを含んでなる、請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 10】

D X 1000 またはその断片もしくは変種と、アルブミンまたはその断片もしくは変種とを含んでなる、請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 11】

少なくとも 2 つのクニッツドメイン融合ペプチドまたはその断片もしくは変種を含んでなる、請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 12】

少なくとも 2 つのクニッツドメイン融合ペプチドまたはその断片もしくは変種の各々が、機能活性を有している、請求項 11 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 13】

少なくとも 2 つのクニッツドメイン融合ペプチドのうち 1 つの機能活性が、セリンプロテアーゼを阻害することを含む、請求項 12 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 14】

少なくとも 2 つのクニッツドメイン融合ペプチドのうち 1 つの機能活性が、プラスミンを阻害することを含む、請求項 12 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 15】

少なくとも 2 つのクニッツドメイン融合ペプチドのうち 1 つの機能活性が、ヒト好中球エラスターゼを阻害することを含む、請求項 12 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 16】

少なくとも 2 つのクニッツドメイン融合ペプチドのうち 1 つの機能活性が、カリクレインを阻害することを含む、請求項 12 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

クニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種のうち少なくとも2つが、異なるアミノ酸配列を有している、請求項11に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項18】

DX 890、DX 88、DX 1000およびDPI 14からなる群より選択されるペプチドの少なくとも1つの断片または変種と、アルブミンまたはその断片もしくは変種とを含んでなり、該アルブミン断片または変種がアルブミン活性を有し、該ペプチド断片または変種が機能活性を有している、請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項19】

アルブミン活性が、DX 890、DX 88、DX 1000およびDPI 14からなる群より選択されるペプチドまたはその断片もしくは変種のインビボ半減期を、非融合状態にあるペプチドまたはその断片もしくは変種のインビボ半減期と比較して、伸ばせる能力を有している、請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項20】

1以上の追加アルブミン部分を更に含んでなる、請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項21】

DX 890、DX 88、DX 1000およびDPI 14またはその断片もしくは変種からなる群より選択される1以上の部分、または1以上の追加アルブミン部分を含んでなる、請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項22】

融合タンパク質が化学的部分を更に含んでなる、請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項23】

クニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種が、アルブミンのN末端、またはアルブミンの断片もしくは変種のN末端へ融合されている、請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項24】

クニツドメインペプチドが、DX 890、DPI 14、DX 88またはDX 1000を含んでなる、請求項23に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項25】

クニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種が、アルブミンのC末端、またはアルブミンの断片もしくは変種のC末端へ融合されている、請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項26】

クニツドメインペプチドが、DX 890、DPI 14、DX 88またはDX 1000を含んでなる、請求項24に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項27】

クニツドメインペプチドが、第一のペプチドまたはその断片もしくは変種、および第二のペプチドまたはその断片もしくは変種を含んでなり、第一のペプチドまたはその断片もしくは変種が第二のペプチドまたはその断片もしくは変種とは異なるものである、請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項28】

第一のペプチドまたはその断片もしくは変種、および第二のペプチドまたはその断片もしくは変種が、DX 890、DX 88、DX 1000およびDPI 14からなる群より選択されるものである、請求項27に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項29】

クニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種が、リンカーにより、アルブミンまたはアルブミンの断片もしくは変種から離されている、請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項30】

10

20

30

40

50

アルブミン融合タンパク質が下記式を含んでなる、請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質：

R 2 R 1 ; R 1 R 2 ; R 2 R 1 R 2 ; R 2 L R 1 L R 2 ; R 1 L
R 2 ; R 2 L R 1 ; または R 1 L R 2 L R 1

[式中、R 1 は、D X 8 9 0、D X 8 8、D X 1 0 0 0 および D P I 1 4 からなる群より選択される少なくとも 1 つのペプチドまたはその断片もしくは変種であり、L はペプチドリinkerであり、かつ、R 2 はアルブミンである]。

【請求項 3 1】

アルブミンまたはその断片もしくは変種へ融合されたクニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種のインビトロ生物活性が、非融合状態にあるクニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種のインビトロ生物活性よりも大きい、請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質。

10

【請求項 3 2】

アルブミンまたはその断片もしくは変種へ融合されたクニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種の溶解性が、同一の貯蔵、取扱いまたは生理条件に付された、非融合状態にあるクニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種の溶解性よりも大きい、請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 3 3】

アルブミンまたはその断片もしくは変種へ融合された少なくとも 1 つのペプチドまたはその断片もしくは変種のインビボ生物活性が、非融合状態にある少なくとも 1 つのペプチドまたはその断片もしくは変種のインビボ生物活性よりも大きい、請求項 3 0 に記載のアルブミン融合タンパク質。

20

【請求項 3 4】

非グリコシル化されている、請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 3 5】

酵母で発現される、請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 3 6】

酵母がグリコシル化欠陥である、請求項 3 5 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 3 7】

酵母がプロテアーゼ欠陥である、請求項 3 6 に記載のアルブミン融合タンパク質。

30

【請求項 3 8】

哺乳動物細胞により発現される、請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 3 9】

培養で哺乳動物細胞により発現される、請求項 3 8 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 4 0】

請求項 1 ~ 3 9 のいずれか一項に記載のアルブミン融合タンパク質と、製薬上許容される担体とを含んでなる、組成物。

【請求項 4 1】

請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質を投与する工程を含んでなる、患者で疾患または障害を治療する方法。

40

【請求項 4 2】

D X 8 9 0 および / または D P I 1 4 により調節される嚢胞性線維症または嚢胞性線維症関連疾患または障害の患者を治療する方法であって、

請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質の有効量を投与する工程を含んでなり、クニツドメインペプチドが D X 8 9 0 または D P I 1 4、またはその断片もしくは変種である、方法。

【請求項 4 3】

非融合状態にある D X 8 9 0 および / または D P I 1 4 またはその断片もしくは変種のインビボ半減期と比較して、D X 8 9 0 および / または D P I 1 4 またはその断

50

片もしくは変種のインビボ半減期を延長させるのに十分な、アルブミンまたはアルブミンの断片もしくは変種へ、D X 890 および / または D P I 14 またはその断片もしくは変種を融合させる工程を含んでなる、D X 890 および / または D P I 14 またはその断片もしくは変種のインビボ半減期を延長する方法。

【請求項 4 4】

D X 88 により調節される遺伝性血管性浮腫または遺伝性血管性浮腫関連疾患または障害の患者を治療する方法であって、

請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質の有効量を投与する工程を含んでなり、クニツドメインペプチドが D X 88 またはその断片もしくは変種である、方法。

【請求項 4 5】

非融合状態にある D X 88 またはその断片もしくは変種のインビボ半減期と比較して、D X 88 またはその断片もしくは変種のインビボ半減期を延長させるのに十分な、アルブミンまたはアルブミンの断片もしくは変種へ、D X 88 またはその断片もしくは変種を融合させる工程を含んでなる、D X 88 またはその断片もしくは変種のインビボ半減期を延長する方法。

【請求項 4 6】

癌、癌関連疾患、出血、または D X 1000 により調節される障害の患者を治療する方法であって、

請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質の有効量を投与する工程を含んでなり、クニツドメインペプチドが D X 1000 またはその断片もしくは変種である、方法。

【請求項 4 7】

非融合状態にある D X 1000 またはその断片もしくは変種のインビボ半減期と比較して、D X 1000 またはその断片もしくは変種のインビボ半減期を延長させるのに十分な、アルブミンまたはアルブミンの断片もしくは変種へ、D X 1000 またはその断片もしくは変種を融合させる工程を含んでなる、D X 1000 またはその断片もしくは変種のインビボ半減期を延長する方法。

【請求項 4 8】

請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる、核酸分子。

【請求項 4 9】

請求項 4 8 に記載の核酸分子を含んでなる、ベクター。

【請求項 5 0】

請求項 4 8 に記載の核酸分子を含んでなる、宿主細胞。

【請求項 5 1】

請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質の有効量と、製薬上許容される担体または賦形剤とを含んでなる、医薬組成物。

【請求項 5 2】

請求項 1 に記載のアルブミン融合タンパク質の製造方法であって、

(a) 生物で発現しうるアルブミン融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなる核酸を用意し、

(b) 核酸を生物で発現させて、アルブミン融合タンパク質を形成させ、かつ

(c) アルブミン融合タンパク質を精製する、

ことを含んでなる、方法。

【請求項 5 3】

アルブミン融合タンパク質が、グリコシル化欠陥酵母株で発現される D X 890 および / または D P I 14 アルブミン融合体を含んでなる、請求項 5 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0001】

発明の分野

10

20

30

40

50

本発明は、クニッツ(Kunitz)ドメインペプチドおよびアルブミン融合タンパク質の分野に関する。更に詳しくは、本発明は、疾患または障害を治療、予防または改善するための、クニッツドメインペプチドおよびアルブミン融合タンパク質に関する。

【0002】

背景技術

クニッツドメインは、中央の逆平行シートと短いC末端ヘリックスを形成している、約51～64残基の折り畳みドメインである(例えば、米国特許第6,087,473参照、これは参考のためそれ全体でここに組み込まれる)。この特徴的ドメインは3つのジスルフィド結合を形成する6つのシステイン残基を含んでいるため、二重ループ構造をとる。N末端領域と最初の鎖との間に、活性阻害結合ループが存在する。この結合ループは、最後の2鎖間で形成されるヘアピンループへ、P2C₁₄残基を介してジスルフィド結合されている。様々なプロテイナーゼインヒビターから単離されたクニッツドメインが、阻害活性を有していることが示された(例えば、Petersen et al., Eur. J. Biochem. 125:310-316, 1996; Wagner et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 186:1138-1145, 1992; Denis et al., J. Biol. Chem. 270:25411-25417, 1995)。

10

【0003】

連結されたクニッツドメインも、例えば米国特許第6,087,473で記載されているように、阻害活性を有していることが示された。1以上のクニッツドメインを含んでなるプロテイナーゼインヒビターには、組織因子経路インヒビター(TFPI)、組織因子経路インヒビター2(TFPI-2)、アミロイド-タンパク質前駆体(APP)、アプロチニンおよび胎盤性ビクニンがある。TFPI、外因性経路インヒビターおよび自然抗凝固物質は、3つのタンデムに連結されたクニッツインヒビタードメインを含んでいる。アミノ末端クニッツドメインは、因子VIIa、プラスミンおよびカテプシンGを阻害し、第二のドメインは因子Xa、トリプシンおよびキモトリプシンを阻害し、第三のドメインは公知の活性を有していない(Petersen et al., 前掲)。

20

【0004】

セリンプロテアーゼに対するクニッツドメインペプチドの阻害活性は、以前のいくつかの研究で証明されていた。以下のサブセクションでは、クニッツドメインペプチドによるセリンプロテアーゼ、例えば血漿カリクレイン、プラスミンおよび好中球エラスターゼの阻害の研究について説明している。

30

【0005】

血漿カリクレインインヒビター

カリクレインは、組織および血漿の双方でみられるセリンプロテアーゼである(例えば、Marklandの米国特許第6,333,402参照、これは参考のためそれ全体でここに組み込まれる)。血漿カリクレインは、接触活性化(内因性経路)凝固、フィブリン溶解、血圧降下および炎症に関与する(Bhoola, K.D., C.D. Figueroa and K. Worthy, Pharmacological Reviews(1992)44(1)1-80参照)。カリクレインのこれら効果は、3種の別々な生理学的基質の活性化から媒介される:

- i) 因子XII(凝固)
- ii) プロウロキナーゼ/プラスミノゲン(フィブリン溶解)、および
- iii) キニノーゲン(血圧降下および炎症)

40

【0006】

キニノーゲンのカリクレイン開裂は、小さい高度に強力な生物活性ペプチド、キニンの産生に至る。キニンは、内皮、上皮、平滑筋、神経、腺および造血を含めた様々な細胞タイプに存在する、BK-1およびBK-2と称される細胞表面レセプターで作用する。細胞内ヘテロトリマーGタンパク質は、酸化窒素、アデニルシクラーゼ、ホスホリパーゼA₂およびホスホリパーゼCを含めた第二メッセンジャー経路へキニンレセプターを結合させる。キニンの重要な生理活性の中には:(i)血管透過性の増加;(ii)血管拡張;(iii)気管支痙攣;および(iv)痛み誘導がある。そのため、キニンは生命脅威性の血管性ショックおよび菌血症(敗血症)または外傷に伴う浮腫、喘息の浮腫および気道過剰反応、組織

50

傷害に伴う炎症および神経性双方の痛みを媒介する。不適当な血漿カリクレイン活性および得られるキニン産生の結果は、遺伝性血管性浮腫（HAE）の患者で劇的に実証される。HAEは、血漿カリクレインの主な内在性インヒビター、C1-インヒビターの遺伝的欠失に起因している。HAEの症状は、皮膚、皮下組織および胃腸管の浮腫と、腹痛および嘔吐がある。HAE患者のほぼ1/3は喉頭および上部呼吸管の浮腫のせいで、呼吸困難により死亡する。カリクレインは、タンパク質分解現象により活性化されるまで、不活性分子として循環するチモーゲン（プレカリクレイン）として分泌される〔GenebankエントリーP03952はヒト血漿プレカリクレインを示している〕。

【0007】

インビボで血漿カリクレイン（pKA）の重要なインヒビターはC1-インヒビターである（Schmaier, et al., "Contact Activation and Its Abnormalities", Chapter 2, Hemostasis and Thrombosis, Colman, R W, J Hirsh, V J Marder, and E W Salzman, Editors, Second Edition, 1987, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA., pp.27-28参照）。C1はセルピンであり、pKAと不可逆的またはほぼ不可逆的な複合体を形成する。ウシ臍臓トリプシンインヒビター（BPTI、アプロチニンまたはTrasyloTMとしても知られる）は、 $K_i = 320 \text{ pM}$ で強力なpKAインヒビターであると当初は思われていたが〔Auerswald, E.A., D.Hoerlein, G.Reinhardt, W.Schroder, and E.Schnabel, Bio.Chem.Hoppe-Seyler, (1988), 369(Supplement):27-35〕、更に最近のレポート〔Berndt, et al., Biochemistry, 32:4564-70, 1993〕は血漿カリクレインの K_i が 30 nM （即ち、 $30,000 \text{ pM}$ ）であることを示している。G36S変異体は 500 nM を超える K_i を有していた。

【0008】

Markland et al.〔米国特許第6,333,402、5,994,125、6,057,287および5,795,865；各レファレンスは参考のためそれ全体でここに組み込まれる〕は、ヒト血漿カリクレインを阻害する上で高い親和性および特異性を有したいくつかの誘導体を記載している。これらタンパク質のうち1種は、HAEを有するヒト患者で試験されている。初期試験事項は化合物が安全で有効かということであるが、効果の期間は期待よりも短かった。

【0009】

プラスミンインヒビター

プラスミンはプラスミノーゲンから誘導されるセリンプロテアーゼである。プラスミンの触媒ドメイン（または「CatDom」）は、特にアルギニン残基の後、それより少ない程度でリジンの後でペプチド結合を切断し、トリプシン、キモトリプシン、カリクレインおよび多くの他のセリンプロテアーゼと高度に相同的である：プラスミンの特異性のほとんどはフィブリンのクリングル結合に由来している（Lucas et al., J.Biological Chem.(1983)258(7)4249-56；Varadi & Patthy, Biochemistry(1983)22:2440-2446；Varadi & Patthy, Biochemistry(1984)23:2108-2112）。活性化により、Arg₅₆₁-Val₅₆₂間の結合が切断され、新たな遊離アミノ末端に塩橋を形成させる。それにもかかわらず、クリングルは2つのジスルフィドによりCatDomへ付着したままである（Colman, R W, J Hirsh, V J Marder, and E W Salzman, Editors, Hemostasis and Thrombosis, Second Edition, 1987, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, Pa., Bobbins, 1987, 前掲）。

【0010】

フィブリン溶解に主に関与する剤は、プラスミノーゲンの活性型、プラスミンである。活性化ハーゲマン因子、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ（uPA）、組織型プラスミノーゲンアクチベーター（tPA）および血漿カリクレイン（pKA）を含めた多くの物質が、プラスミノーゲンを活性化しうる。pKAは、ウロキナーゼのチモーゲン型のアクチベーター、および直接的なプラスミノーゲンアクチベーターの双方である。

【0011】

プラスミンは正常循環血で検出されないが、チモーゲンのプラスミノーゲンは約 $3 \mu\text{M}$ で存在する。それ以外の未検出分のプラスミノーゲンは細胞外マトリックスおよび細胞表面のフィブリンおよび他成分と結合している。正常血液は、約 $2 \mu\text{M}$ で、プラスミンの生

10

20

30

40

50

理学的インヒビター、 α_2 -プラスミンインヒビター(α_2 -PI)を含有している。プラスミンおよび α_2 -PIは1:1複合体を形成する。マトリックスまたは細胞結合プラスミンは、 α_2 -PIによる阻害を比較的うけにくい。そのため、プラスミンの活性化は α_2 -PIの中和能力を上回り、プロフィブリン溶解状態を引き起こすことがある。

【0012】

プラスミンは、一度形成されると；

i)時には早すぎて、フィブリン血餅を分解する；

ii)フィブリノーゲン(血餅の構築物質)を消化して、分解産物からもろい容易に溶解される血餅の形成と、フィブリノーゲン分解産物による血小板付着/凝集の阻害を引き起こすことで止血を害する；

iii)血小板と直接相互作用して糖タンパク質IbおよびIIb/IIIaを開裂し、高剪断血流の領域で損傷内皮への付着を妨げ、かつ血小板栓形成に必要な凝集応答を害する(Adelman et al., Blood(1986)68(6)1280-1284)；

iv)外因性凝固経路の酵素をタンパク質分解で不活化して、プロリチック状態を更に促す。Robbins(Robbins, Chapter 21 of Hemostasis and Thrombosis, Colman, R.W., J. Hirsh, V.J. Marder, and E.W. Salzman, Editors, Second Edition, 1987, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA)はプラスミノーゲン-プラスミン系を詳細に考察していた。この文献(即ち、Colman, R.W., J. Hirsh, V.J. Marder, and E.W. Salzman, Editors, Hemostasis and Thrombosis, Second Edition, 1987, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA)は参考のためここに組み込まれる。

【0013】

フィブリン分解およびフィブリノーゲン分解

過剰出血に至る不適当なフィブリン分解およびフィブリノーゲン分解は、心肺バイパスのような体外循環を要する外科処置でしばしば生じる合併症であり、血栓溶解療法および臓器移植、特に肝臓でも発生する。出血素質の高発症率で特徴付けられる他の臨床症状には、肝硬変、アミロイドーシス、急性前骨髄球性白血病および固形腫瘍がある。止血の回復には血漿および/または血漿製剤の注入を要し、免疫反応および病原体、例えば肝炎ウイルスおよびHIVへの露呈というリスクを負う。

【0014】

失血量が非常に多いと、大量注入でも解決しえないことがある。生命脅威的と判断されると、出血は-アミノカプロン酸(Hoover et al., Biochemistry(1993)32:10936-43参照)(EACA)、トラネキサム酸またはアプロチニン(Neuhaus et al., Lancet(1989)2(8668)924-5)のような抗フィブリン溶解剤で処理される。EACAおよびトラネキサム酸はクリングルと結合することでプラスミンがフィブリンと結合することを妨げるだけであり、こうして血漿中に遊離プロテアーゼとしてプラスミンを残留させる。BPTIはプラスミンの直接的インヒビターであり、これら剤の中では最も有効である。血栓合併症、腎毒性およびBPTIの場合には免疫原性の可能性のために、これらの剤は用心しながら用いられ、通常「最終選択肢」として留保される(Putterman, Acta Chir Scand(1989)155(6-7)367)。全3種の抗フィブリン溶解剤は標的特異性および親和性を欠き、特徴未解明の代謝経路により組織および臓器と相互作用する。低親和性のせいで要する大用量、親和性の欠如による副作用、免疫反応および臓器/組織毒性の可能性は、出血を防止するための予防的な、または輸血療法を回避または低減するルーチン術後療法としての、これら抗フィブリン溶解剤の使用に伴い増大する。そのため、安全な抗フィブリン溶解剤の必要性がある。このような剤の本質的属性は：

i)関連標的フィブリン溶解酵素の中和；

ii)用量を最少に抑えうる、標的酵素との高親和性結合；

iii)副作用を減少させうる、標的との高親和性；および

iv)潜在的免疫原性および臓器/組織毒性を減少させうる、ヒトタンパク質との高度の類似性である。

【0015】

10

20

30

40

50

有効抗フィブリン溶解剤による阻害用の標的候補であるすべてのフィブリン溶解酵素は、キモトリプシン相同性セリンプロテアーゼである。

【0016】

過剰出血

過剰出血は、凝固活性の欠失、フィブリン溶解活性の上昇またはその2状態の組合せに起因する。ほとんどの出血素質において、プラスミンの活性を抑制しなければならない。失血量を減少させる上でBPTIの臨床的に有益な効果は、プラスミン($K_i \sim 0.3 \text{ nM}$)、血漿カリクレイン($K_i \sim 100 \text{ nM}$)または双方の酵素の阻害に起因すると考えられている。

【0017】

Gardell [Toxicol. Pathol. (1993) 21(2) 190-8] は現在使用の血栓溶解剤について考察しており、血栓溶解剤(例えば、tPA)は血管を広げるが、過剰出血は深刻な安全上の問題であると述べている。tPAおよびストレプトキナーゼは短い血漿半減期を有しているが、それらが活性化するプラスミンは長時間にわたり系中へ留まり、前記のように、系はプラスミンインヒビターを潜在的に欠いている。そのため、プラスミノーゲンの過剰な活性化は、凝固能力の危険なまでの欠如と、致傷または致死性出血に至ることがある。強力な高い特異性のプラスミンインヒビターが、このような場合には有用であろう。

【0018】

BPTIは強力なプラスミンインヒビターである。しかしながら、それは2回目の使用に皮膚試験を要するほど抗原性であることがわかった。更に、出血を抑制するために必要なBPTIの用量は相当に高く、作用のメカニズムは不明である。ある者はBPTIがプラスミンに作用すると述べているが、他の者はそれが血漿カリクレインを阻害することで作用すると述べている。Fraedrich et al. [Thorac Cardiovasc Surg (1989) 37(2) 89-91] は、心臓切開手術患者80例へBPTI約840 mgの用量でほぼ半分まで失血を減らせ、平均輸血量が74%減った、と報告している。Miles Inc.は、手術で出血量の減少のために、USでTrasylolTMを最近導入した[TrasylolTMに関するMiles製品パンフレット参照、これは参考のためここに組み込まれる]。Lohmann and Marshall [Refract Corneal Surg (1993) 9(4) 300-2] は、プラスミンインヒビターが目の手術で出血を抑制する際に有用かもしれない、と述べている。Sheridan et al. [Dis Colon Rectum (1989) 32(6) 505-8] は、BPTIが結腸の手術で出血を抑制する際に有用かもしれない、と報告している。

【0019】

BPTIとはほぼ同程度かまたはそれより強力であるが、ヒトタンパク質ドメインとはほぼ同一であるプラスミンインヒビターは、類似の治療可能性を呈するが、抗原性の可能性は減る。

【0020】

血管形成:

プラスミンは血管形成に重要な酵素である。O'Reilly et al. [Cell (1994) 79:315-328] は、プラスミンの38 kDa断片(触媒ドメインを欠く)が転移の強力なインヒビターであると報告しており、プラスミンの阻害が腫瘍の転移を阻止する上で有用になりうることを示している[Fidler & Ellis, Cell (1994) 79:185-188; Ellis et al., Ann NY Acad Sci (1992) 667:13-31も参照; O'Reilly et al., Fidler & EllisおよびEllis et al.は参考のためここに組み込まれる]。

【0021】

好中球エラスターゼ阻害

嚢胞性線維症は、肺、胃腸および生殖系に影響を与える遺伝性の常染色体劣性障害である。世界中に80,000人の罹患者が存在し、CFの発病率は3500人に1人と見積もられている[Cystic Fibrosis Foundation, Patient Registry 1998 Annual Data Report, Bethesda, Maryland, September 1999]。CFの遺伝的欠失は1989年に508位で単一フェニルアラニンの欠失($\Delta F508$)として記載され、 Cl^- (ひいては Na^+ および水)の再吸収を阻害する、嚢胞性線維症貫膜コンダクタンスレギュレータータンパク質

10

20

30

40

50

(C F T R) の欠陥をもたらす [Rommens, J.M., et al., "Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping", Science 245:1059, 1989; Riordan, J.R., et al., "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and complementary DNA", Science 245:1066, 1989; Kerem, B., et al., "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis", Science 245:1073, 1989]。F 5 0 8 以外の変異も C F T R でみられ、C F を引き起こすことがある。その際に、粘液の枯渇が呼吸、胃腸および生殖系の多くの通路をふさいでしまう。

【0022】

C F の死亡者のうち 7 5 % 以上は呼吸合併症による [Cystic Fibrosis Foundation, Patient Registry 1998 Annual Data Report, Bethesda, Maryland, September 1999]。脾臓、肝臓および腸の疾患が誕生前に C F 個体に存在しているが、C F 肺は誕生時と感染および炎症の開始時まで正常である。C F 肺で C l⁻ 再吸収の欠陥は、気道からナトリウムを引き出し、受動的に水が追隨することで、気道分泌を枯渇させる。分泌の枯渇は、特有の微生物病原体のコロニー形成によく適した環境下に細菌を捕捉しておくことで、粘膜纖毛クリアランスを妨げることがある [Reynolds, H.Y., et al., "Mucoid Pseudomonas aeruginosa: a sign of cystic fibrosis in young adults with chronic pulmonary disease", J. A.M.A. 236:2190, 1976]。それに続く肺感染および炎症は、好中球エラスターゼ (N E) を放出する好中球を引き寄せて、活性化させる。呼吸上皮表面における好中球性炎症は、好中球エラスターゼの長期的上皮付着を招く。内在性抗プロテアーゼは、C F 肺で過剰の N E により急速に圧倒される。加えて、N E はプロ炎症伝達物質の産生を刺激し、補体レセプターおよび I g G を開裂することで、更なる細菌コロニー化を妨げる宿主防御メカニズムを無能化させてしまう [Tosi, M.F. et al., "Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized Pseudomonas as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch", J. Clin. Invest. 86:300, 1990]。こうして感染は慢性化し、大規模な炎症の進行と過剰レベルの N E が気道上皮を破壊して、気管支拡張、肺機能の進行性喪失および死へと至る。

【0023】

C F 患者の 1 つの治療アプローチは、トブラマイシンおよびシプロフロキシンのような全身抗菌剤による C F 病原体の撲滅である。これらの特別な抗菌剤は感染を治して肺機能を改善する上で有効であると示されたが、トブラマイシンおよびシプロフロキシンの対する抗生物質耐性は C F 患者で各々 7 . 5 % および 9 . 6 % と報告されている [Cystic Fibrosis Foundation, Patient Registry 1998 Annual Data Report, Bethesda, Maryland, September 1999]。C F に対するこれら抗菌剤の使用は患者で増しており、そのうち 6 0 % は P. aeruginosa、4 1 % は S. aureus に感染したため、薬物耐性選択圧力は増加している。

【0024】

肺機能も C F の患者で治療標的である。痰中の D N A を加水分解することで粘液粘弾性を減少させる組換えヒトデオキシリボヌクレアーゼ、Pulmozyme[®] (dornase alfa) は、治療の 8 日目以後に F E V₁ および F V C を増加させることが、臨床研究で示された。この変化は 6 月間にわたり続き、静脈内抗生物質の使用量の減少につながる [Fuchs, H.L., et al., "Effect of aerosolized recombinant human Dnase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis", N. Engl. J. Med., 331:637-642, 1994]。

【0025】

もう 1 つの治療アプローチは、エラスターゼ分解とその続発症に及ぼす N E の直接効果を消すために、プロテアーゼインヒビターを用いることである。過剰 N E の中和は、細胞外肺マトリックスを防御する正常ホメオスタシスバランスを回復しうる。肺の抗プロテアーゼ活性の正常化はエラスチンを保護し、好中球応答の減少で粘液粘度を低下させ、肺機能を保護して、C F の死亡率を減少させる。加えて、補体媒介食作用の回復は免疫系に細菌病原体を除去させて、肺感染の発生、期間および重篤度の減少をもたらす。例えば、C F のラットモデルの場合、抗トリプシン治療の 7 日目以後に、細菌数はプラセボ群の

10

20

30

40

50

85 ± 21と比較して0.2 ± 0.4に減少した〔Cantin,A.and Woods,D, " Aerosolized Prolastin Suppresses Bacterial Proliferation in a Model of Chronic Pseudomonas aeruginosa Lung Infection ",Am.J.Respir.Crit.Care Med.160:1130-1136,1999〕。

【発明の概要】

【0026】

本発明は、クニツドメインペプチドをアルブミンへ融合させたタンパク質に関する。これらの融合タンパク質は、ここでは「本発明のアルブミン融合タンパク質」として包括的に称される。本発明のこれら融合タンパク質は、溶解状態のとき、長期インビボ半減期および/または長期または治療活性を示す。

【0027】

本発明は、治療用アルブミン融合タンパク質、組成物、医薬組成物、処方物およびキットを包含する。本発明は、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードする核酸分子、並びにこれらの核酸を含有したベクター、これらの核酸およびベクターで形質転換された宿主細胞、およびこれらの核酸、ベクターおよび/または宿主細胞を用いて本発明のアルブミン融合タンパク質を作製する方法も包含する。

【0028】

本発明の目的は、クニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種と、アルブミンまたはその断片もしくは変種とを含んでなるアルブミン融合タンパク質を提供することである。このようなアルブミン融合タンパク質で使用に適したクニツドメインペプチドには、DX-890、DX-88、DX-1000およびDPI-14がある。クニツドメインペプチド部分は、必要に応じて、リンカーによりアルブミン部分から離してもよい。本発明の別な目的は、セリンプロテアーゼを阻害するためにアルブミン融合タンパク質を含んだ組成物および方法を提供することであり、その非制限例には血漿カリクレイン、プラスミンおよび好中球エラスターゼがある。

【0029】

本発明の別の態様は、クニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種のうち少なくとも1つが、プラスミン、カリクレインまたはヒト好中球エラスターゼを阻害するような機能活性を有している、少なくとも2つのクニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種を含んでなるアルブミン融合タンパク質を提供することである。

【0030】

本発明の更に別の態様は、アルブミンが、非融合状態にあるクニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種のインビボ半減期と比較して、DX-890、DX-88、DX-1000およびDPI-14のようなクニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種のインビボ半減期を伸ばすアルブミン活性を有している、クニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種、およびアルブミンまたはその断片もしくは変種を含んでなるアルブミン融合タンパク質を提供することである。

【0031】

本発明の更に別の態様は、本発明のアルブミン融合タンパク質が生理的pHで向上した溶解性を有している、クニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種、およびアルブミンまたはその断片もしくは変種を含んでなるアルブミン融合タンパク質を提供することである。

【0032】

本発明の1つの態様は、クニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種が、アルブミンのN末端、またはアルブミンの断片もしくは変種のN末端へ融合されている、クニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種、およびアルブミンまたはその断片もしくは変種を含んでなるアルブミン融合タンパク質を提供することである。一方、本発明は、クニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種が、アルブミンのC末端、またはアルブミンの断片もしくは変種のC末端へ融合されている、クニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種、およびアルブミンまたはその断片もしくは変種を含んでなるアルブミン融合タンパク質も提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 3 】

本発明は、アルブミン融合タンパク質と、製薬上許容される担体とを含んでなる組成物を提供する。本発明のもう1つの目的は、嚢胞性線維症、嚢胞性線維症関連疾患または障害、あるいはD X - 8 9 0 および / またはD P I - 1 4 を含むクニツドメインペプチドにより調節しうる疾患または障害の患者を治療する方法を提供することである。その方法は、D X - 8 9 0 および / またはD P I - 1 4 を含むクニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種、およびアルブミンまたはその断片もしくは変種を含んでなるアルブミン融合タンパク質の有効量を投与する工程を含んでなる。

【 0 0 3 4 】

本発明の別な目的は、遺伝性血管性浮腫、遺伝性血管性浮腫関連疾患または障害、あるいはD X - 8 8 のようなクニツドメインペプチドにより調節しうる疾患の患者を治療する方法を提供することである。その方法は、アルブミン融合タンパク質がD X - 8 8 を含むクニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種、およびアルブミンまたはその断片もしくは変種を含んでなる、アルブミン融合タンパク質の有効量を投与する工程を含んでなる。

10

【 0 0 3 5 】

本発明の目的は、癌、癌関連疾患、出血、またはD X - 1 0 0 0 のようなクニツドメインペプチドにより調節される疾患の患者を治療する方法を提供することである。その方法は、アルブミン融合タンパク質がD X - 1 0 0 0 を含むクニツドメインペプチドまたはその断片もしくは変種、およびアルブミンまたはその断片もしくは変種を含んでなる、アルブミン融合タンパク質の有効量を投与する工程を含んでなる。

20

【 0 0 3 6 】

本発明の別な目的は、アルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子、およびこのような核酸分子を含んでなるベクターを提供することである。

【 0 0 3 7 】

本発明はまた、アルブミン融合タンパク質を製造する方法であって、

(a) 生物で発現しうるアルブミン融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなる核酸を用意し、

(b) 核酸を生物で発現させて、アルブミン融合タンパク質を形成させ、かつ

30

(c) アルブミン融合タンパク質を精製する、

ことを含んでなる方法も提供する。

【 発明の具体的説明 】

【 0 0 3 8 】

本発明はアルブミン融合クニツドメインペプチドに関する。本発明は、2つ（またはそれ以上）のクニツドメインペプチド、必要に応じて異なるクニツドメインペプチドにアルブミンがカップリングされた、二官能性（または多官能性）融合タンパク質にも関する。異なるクニツドメインペプチドを有するこのような二官能性（または多官能性）融合タンパク質は、1タイプのためのクニツドメインペプチドを含んでなるアルブミン融合タンパク質と比較して、改善された薬物耐性プロフィールを有すると予想される。一部の症状では2以上のプロテアーゼの阻害を要し、マルチクニツドメインの融合体であれば1つの化合物で2種以上のプロテアーゼの阻害に用いる。一方、2以上のクニツドメインを融合させて、グラム当たりのインヒビター活性が増すように各々を同一プロテアーゼへ向けてもよい。2つのクニツドメインを有するインヒビターの有用型は $K_1 :: S A :: K_2$ であり、ここで K_1 および K_2 はクニツドメインであり、S A はセリンアルブミンまたはその実質的部分である。このような二官能性（または多官能性）融合タンパク質は、1タイプのためのクニツドメインペプチドを含んでなるアルブミン融合タンパク質と比較して、相乗効果も示す。更に、化学的存在物も、生物活性を高めるため、または生物活性を調節するために、本発明の融合タンパク質へ共有結合させてよい。

40

【 0 0 3 9 】

50

本発明のアルブミン融合タンパク質は、インビボでクニットドメインペプチドの半減期を長期化させると予想される。上記アルブミン融合ペプチドのインビトロまたはインビボ半減期は、連結アルブミンを欠くペプチドの半減期よりも2倍、5倍またはそれ以上伸びている。更に、少なくとも一部はペプチドの半減期延長のおかげで、本発明のアルブミン融合タンパク質は治療用ペプチドの投薬スケジュールの頻度を減少させられると期待される。投薬スケジュール頻度は、連結アルブミンを欠く治療用ペプチドの投薬スケジュールの頻度と比較して、少なくとも1/4、または少なくとも1/2に減少する。

【0040】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、インビトロおよび/またはインビボにおいて、溶解状態（または医薬組成物中）のとき、ペプチドの貯蔵期間を長期化させる、および/またはペプチドおよび/またはその活性を安定化させる。治療剤でもあるこれらのアルブミン融合タンパク質は、非特異的結合のようなファクターによるタンパク質の喪失を防ぐために、大過剰のキャリアタンパク質（例えばアルブミン、未融合）でタンパク質溶液を処方する必要性を減らせると予想される。

10

【0041】

本発明は、アルブミン融合タンパク質をコードする核酸分子、これらの核酸を含有するベクター、これらの核酸ベクターで形質転換された宿主細胞、およびこれらの核酸、ベクターおよび/または宿主細胞を用いて本発明のアルブミン融合タンパク質を作製する方法も包含する。本発明は、核酸分子によりコードされたアルブミン融合タンパク質を発現するように必要に応じて修飾された、本発明の核酸分子を含有するように修飾されたトランスジェニック生物を更に含んでいる。

20

【0042】

アルブミン

ヒト血清アルブミン（HSA）およびヒトアルブミン（HA）という用語は、ここでは互換的に用いられる。「アルブミン」および「血清アルブミン」という用語は広く、ヒト血清アルブミン（とその断片および変種）および他種からのアルブミン（とその断片および変種）を包含する。

【0043】

ここで用いられている「アルブミン」とは、アルブミンの1以上の機能活性（例えば、生物活性）を有した、アルブミンタンパク質またはアミノ酸配列、またはアルブミン断片もしくは変種に包括的に関する。特に、「アルブミン」とは、ヒトアルブミンまたはその断片（EP201239、EP322094、WO97/24445、WO95/23857参照）、特にここでの配列番号18と、米国仮出願第60/355,547およびWO01/79480の表1および配列番号18で示されているようなヒトアルブミンの成熟型、あるいは他の脊椎動物からのアルブミンまたはその断片、あるいはこれら分子またはその断片のアナログまたは変種に関する。

30

【0044】

本発明のアルブミン融合タンパク質で用いられているヒト血清アルブミンタンパク質は、配列番号18において下記組の点変異のうち一方または双方を含んでいる：Leu-407->Ala、Leu-408->Val、Val-409->AlaおよびArg-410->Ala；またはArg-410->Ala、Lys-413->GlnおよびLys-414->Gln（例えば、参考のためそれ全体でここに組み込まれる国際公開第WO95/23857参照）。他の態様では、上記組の点変異のうち一方または双方を含んだ本発明のアルブミン融合タンパク質は、酵母Yap3pタンパク質分解に対して改善された安定性/耐性を有し、酵母宿主細胞で発現される組換えアルブミン融合タンパク質の産生を増す。

40

【0045】

ここで用いられている、治療用タンパク質のインビボ半減期、治療活性または貯蔵期間を長期化または延長する上で十分なアルブミンの部分とは、非融合状態にある治療用タンパク質のインビボ半減期、治療活性または貯蔵期間と比較して、アルブミン融合タンパク

50

質の治療用タンパク質部分のインビボ半減期、治療活性または貯蔵期間を安定化、長期化または延長するために、鎖長または構造上十分なアルブミンの部分に関する。アルブミン融合タンパク質のアルブミン部分は上記のようなH A配列の全鎖長を含んでもよく、または治療活性を安定化または長期化しうる1以上の断片を含んでもよい。このような断片は鎖長が10以上のアミノ酸でも、またはH A配列からの約15、20、25、30、50またはそれ以上の隣接アミノ酸を含んでも、またはH Aの特定ドメインの一部または全部を含んでもよい。

【0046】

本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミン部分は、正常H Aの変種でもよい。本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分も、ここで記載されているよう

10

【0047】

特に、本発明のアルブミン融合タンパク質は、ヒトアルブミンの天然多形性変種およびヒトアルブミンの断片、例えばEP322094で開示された断片（即ちH A（P_n）、ここでnは369～419である）を含んでもよい。アルブミンは、いかなる脊椎動物、特にいかなる哺乳動物、例えばヒト、ウシ、ヒツジまたはブタに由来するものでもよい。非哺乳動物アルブミンにはメンドリおよびサケのものがあるが、それらに限定されない。

20

【0048】

一般的に言うと、H A断片または変種は少なくとも100のアミノ酸鎖長、必要に応じて少なくとも150のアミノ酸鎖長である。H A変種はH Aの少なくとも1つの全ドメイン、例えばドメイン1（配列番号18のアミノ酸1-194）、2（配列番号18のアミノ酸195-387）、3（配列番号18のアミノ酸388-585）、1+2（配列番号18の1-387）、2+3（配列番号18の195-585）または1+3（配列番号18のアミノ酸1-194+配列番号18のアミノ酸388-585）からなるか、またはそれを含んでなる。各ドメインは、2つの相同的サブドメイン、即ち1-105、1

30

【0049】

本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミン部分は、H Aの少なくとも1つのサブドメインまたはドメイン、またはその保存的修飾物を含んでもよい。融合体がサブドメインをベースにしているならば、隣接リンカーの一部または全部が、治療用タンパク質部分へ連結するために、必要に応じて用いられる。

【0050】

40

アルブミン融合タンパク質

本発明は、一般的に、アルブミン融合タンパク質と、疾患または障害を治療、予防または改善する方法に関する。ここで用いられている「アルブミン融合タンパク質」とは、治療用タンパク質（またはその断片もしくは変種）の少なくとも1つの分子へアルブミン（またはその断片もしくは変種）の少なくとも1つの分子の融合により形成されるタンパク質に関する。本発明のアルブミン融合タンパク質は、例えば互いの遺伝子融合により（即ち、治療用タンパク質の全部または一部をコードするポリヌクレオチドがアルブミンの全部または一部をコードするポリヌクレオチドと枠内で結合された核酸の翻訳により、アルブミン融合タンパク質が形成される）、互いに結合された、治療用タンパク質の少なくとも1つの断片または変種とヒト血清アルブミンの少なくとも1つの断片または変種とを含

50

んでなる。アルブミン融合タンパク質の個別部分、治療用タンパク質およびアルブミンタンパク質は、アルブミン融合タンパク質の「一部分」、「領域」または「部分」と称されることもある。

【0051】

一つの態様において、本発明は、治療用タンパク質および血清アルブミンタンパク質を含んでなる、またはそれらからなる、アルブミン融合タンパク質を提供する。他の態様において、本発明は、治療用タンパク質および血清アルブミンタンパク質の生物活性および/または治療活性断片を含んでなる、またはそれらからなる、アルブミン融合タンパク質を提供する。他の態様において、本発明は、治療用タンパク質および血清アルブミンタンパク質の生物活性および/または治療活性変種を含んでなる、またはそれらからなる、アルブミン融合タンパク質を提供する。別な態様において、アルブミン融合タンパク質の血清アルブミンタンパク質成分は、血清アルブミンの成熟部分である。

10

【0052】

別な態様において、本発明は、治療用タンパク質と、血清アルブミンの生物活性および/または治療活性断片を含んでなる、またはそれらからなる、アルブミン融合タンパク質を提供する。別な態様において、本発明は、治療用タンパク質と、血清アルブミンの生物活性および/または治療活性変種を含んでなる、またはそれらからなる、アルブミン融合タンパク質を提供する。一部の態様において、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分は、治療用タンパク質の成熟部分である。

【0053】

別な態様において、本発明は、治療用タンパク質の生物活性および/または治療活性断片または変種と、血清アルブミンの生物活性および/または治療活性断片または変種とを含んでなる、またはそれらからなる、アルブミン融合タンパク質を提供する。一部の態様において、本発明は、治療用タンパク質の成熟部分および血清アルブミンの成熟部分を含んでなる、またはそれらからなる、アルブミン融合タンパク質を提供する。

20

【0054】

アルブミン融合タンパク質は、N末端部分としてHAおよびC末端部分として治療用タンパク質を含んでなる。一方、C末端部分としてHAおよびN末端部分として治療用タンパク質を含んでなるアルブミン融合タンパク質も用いてよい。

【0055】

他の態様において、アルブミン融合タンパク質はアルブミンのN末端およびC末端の双方へ治療用タンパク質を融合させている。一つの態様において、NおよびC末端で融合された治療用タンパク質は同一の治療用タンパク質である。別な態様において、NおよびC末端で融合された治療用タンパク質は異なる治療用タンパク質である。もう1つの態様において、NおよびC末端で融合された治療用タンパク質は、同様の疾患、障害または症状を治療または予防するために用いられる、異なる治療用タンパク質である。もう1つの態様において、NおよびC末端で融合された治療用タンパク質は、通常患者で同時に生じることが当業界で知られた疾患または障害を治療または予防するために用いられる、異なる治療用タンパク質である。

30

【0056】

アルブミン部分が治療用タンパク質部分のN末端および/またはC末端で融合されたアルブミン融合タンパク質に加えて、本発明のアルブミン融合タンパク質はHAの内部領域中へ対象の治療用タンパク質またはペプチドを挿入することにより作製してもよい。例えば、HA分子のタンパク質配列内には、ジスルフィド結合により安定化されるいくつかのループまたはターンが、 α -ヘリックスの最後と最初との間に存在している。HAの結晶構造(PDBアイデンティファイアー1A06、1BJ5、1BKE、1BM0、1E7E~1E7Iおよび1UOR)から調べたところ、そのループは大部分が分子の本体から離れて伸びている。これらのループは、特別な生物活性を有するアルブミン分子を本質的に作製する上で、治療活性ペプチド、特に機能化に二次構造を要するもの、または治療用タンパク質の挿入または内部融合に有用である。

40

50

【0057】

本発明のアルブミン融合タンパク質を作製するためにペプチドまたはポリペプチドが挿入されるヒトアルブミン構造中のループには、Val 54 - Asn 61、Thr 76 - Asp 89、Ala 92 - Glu 100、Gln 170 - Ala 176、His 247 - Glu 252、Glu 266 - Glu 277、Glu 280 - His 288、Ala 362 - Glu 368、Lys 439 - Pro 447、Val 462 - Lys 475、Thr 478 - Pro 486およびLys 560 - Thr 566がある。他の態様では、ペプチドまたはポリペプチドが成熟ヒトアルブミン（配列番号18）のVal 54 - Asn 61、Gln 170 - Ala 176および/またはLys 560 - Thr 566ループ中に挿入される。

10

【0058】

挿入される治療用タンパク質は、特定の生物活性についてスクリーニングされたファージディスプレイおよび合成ペプチドライブラリーを含むあらゆる供給源から、または望ましい機能を有した分子の活性部分から誘導される。加えて、治療用タンパク質向けの候補であるクニツドメインペプチドを含んでなるランダムペプチドライブラリーは特定ループ内で、またはHA分子の特定ループ中へのこのようなランダム化ペプチドの挿入により作製してもよく、そこではアミノ酸の多くの組合せ（例えば、 5×10^9 ）が表わされている。

【0059】

このようなライブラリーは、下記方法の1つにより、HAまたはHAのドメイン断片上で作製しうる：

20

(a) HAまたはHAドメイン断片の1以上のペプチドループ内におけるアミノ酸のランダム化変異。ループ内における1つ、それ以上または全部の残基はこうして変異させる；

(b) 鎖長 X_n （Xはアミノ酸であり、nは残基の数である）のランダム化ペプチドのHAまたはHAドメイン断片の1以上のループの置換またはその中への挿入（即ち、内部融合）；

(c) (a)および/または(b)に加えて、N、CまたはNおよびC末端ペプチド/タンパク質融合。

【0060】

HAまたはHAドメイン断片は、異なる標的に対する異なるループの異なるスクリーンから誘導されたペプチドを同一HAまたはHAドメイン断片へグラフトすることにより、多機能化してもよい。

30

【0061】

ヒト血清アルブミンのループ中へ挿入されるペプチドの非制限的な例は、DX - 890（ヒト好中球エラスターゼのインヒビター）、DPI - 14（ヒト好中球エラスターゼのインヒビター）、DX - 88ペプチド（ヒト血漿カリクレインのインヒビター、表2）およびDX - 1000（ヒトプラスミンのインヒビター、表2）またはそれらのペプチド断片もしくはペプチド変種である。更に詳しくは、本発明は、鎖長が少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35または少なくとも40のアミノ酸のペプチド断片またはペプチド変種をヒト血清アルブミンのループ中へ挿入したアルブミン融合タンパク質を包含する。本発明は、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35または少なくとも40のアミノ酸のペプチド断片またはペプチド変種をヒト血清アルブミンのN末端へ融合させたアルブミン融合タンパク質も包含する。本発明は、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35また

40

50

は少なくとも40のアミノ酸のペプチド断片またはペプチド変種をヒト血清アルブミンのC末端へ融合させたアルブミン融合タンパク質も包含する。

【0062】

通常、本発明のアルブミン融合タンパク質は1つのHA由来領域および1つの治療用タンパク質由来領域を有する。しかしながら、各タンパク質の複数領域も、本発明のアルブミン融合タンパク質を作製する上で用いてよい。同様に、2以上の治療用タンパク質も、本発明のアルブミン融合タンパク質を作製する上で用いてよい。例えば、治療用タンパク質はHAのNおよびC末端の双方へ融合される。各構造において、治療用タンパク質部分は同一でもまたは異なる治療用タンパク質分子でもよい。二官能性アルブミン融合タンパク質の構造は、X-HA-Y、Y-HA-X、X-Y-HA、HA-X-Y、HA-X-Y-HA、HA-Y-X-HA、HA-X-X-HA、HA-Y-Y-HA、HA-X-HA-Y、X-HA-Y-HAまたは複数の組合せ、またはHA配列内のいずれかの位置における挿入Xおよび/またはYとして表わせる。

10

【0063】

追加の態様では、クニッツドメインのような治療用タンパク質「X」と、HAをパート1および2に分離する治療用ペプチド「Y」とを有している。本発明の融合タンパク質は式：X-HA(パート1)-Y-HA(パート2)およびHA(パート1)-Y-HA(パート2)-Xを有する。追加の態様では2つの治療用タンパク質ドメイン「X」および「Z」と治療用ペプチド「Y」を有し、式：X-HA(パート1)-Y-HA(パート2)-ZおよびZ-HA(パート1)-Y-HA(パート2)-Xの融合タンパク質となる。

20

【0064】

二または多官能性アルブミン融合タンパク質は、機能、半減期などに応じて、様々な比率で作製しうる。

【0065】

二または多官能性アルブミン融合タンパク質は、HAの反対端にあるタンパク質またはペプチドを介して標的臓器または細胞タイプへ融合体の治療用タンパク質部分を向かわせるように作製してもよい。

【0066】

公知の治療用分子の融合体に代わるものとして、典型的には6、8、12、20、25または X_n (Xはアミノ酸であり、nは残基の数である)ランダム化アミノ酸のHAまたはHAのドメイン断片のN、CまたはNおよびC末端への融合体として構築されたライブラリーのスクリーニングにより、ペプチドは得ることができ、そこではアミノ酸のすべての可能な組合せが表わされた。このアプローチの特別な利点は、ペプチドがHA分子付きのままで選択され、したがって、ペプチドの性質が、可能性として変化することなく、いずれか他の方法により誘導されて後からHAへ付着されるペプチドの場合のように選択しうることである。このような選択は、HAの末端における、クニッツドメインのような、よく折り畳まれたドメインの付着には、不要である。付いたままでの選別は、ジスルフィドまたは単一ジスルフィドループを有しないペプチドにとり重要であるらしい。

30

【0067】

加えて、本発明のアルブミン融合タンパク質は、各部分間で物理的距離を大きくして、例えば同族レセプターと結合する際の、治療用タンパク質部分の接近性を最大化するために、融合部分間にリンカーペプチドを含有してもよい。リンカーペプチドは、それがフレキシブルまたはより硬くなるように、アミノ酸から構成される。

40

【0068】

したがって、上記のように、本発明のアルブミン融合タンパク質は下記式： $R_2 - R_1$; $R_1 - R_2$; $R_2 - R_1 - R_2$; $R_2 - L - R_1 - L - R_2$; $R_1 - L - R_2$; $R_2 - L - R_1$; または $R_1 - L - R_2 - L - R_1$ を有している：ここで R_1 は少なくとも1つの治療用タンパク質、ペプチドまたはポリペプチド配列(その断片または変種を含む)であるが、必ずしも同一の治療用タンパク質ではない；Lはリンカーである；および R_2 は

50

血清アルブミン配列（その断片または変種を含む）である。例示リンカーには、（ G G G G S ）_N（SEQ ID NO: ）、（ G G G S ）_N（SEQ ID NO: ）または（ G G S ）_Nがあり、ここでNは1以上の整数であり、Gはグリシンを表わし、Sはセリンを表わす。

【0069】

ある態様において、治療用タンパク質を含んでなる本発明のアルブミン融合タンパク質は、アルブミンへ融合されていない同治療用タンパク質の貯蔵期間、インビボ半減期または治療活性と比較して、長い貯蔵期間、インビボ半減期または治療活性を有している。貯蔵期間とは、典型的には、溶解状態またはある他の貯蔵処方時における治療用タンパク質の治療活性が治療活性の過度な喪失なしに安定である期間に関する。治療用タンパク質の多くは、それらの非融合状態時で高度に不安定である。下記のように、これら治療用タンパク質の典型的貯蔵期間は、本発明のアルブミン融合タンパク質中への組込みで著しく長期化している。

10

【0070】

貯蔵期間が「長期化」または「延長」された本発明のアルブミン融合タンパク質は、同一の貯蔵および取扱い条件に付された標準と比較して、大きな治療活性を示す。標準は非融合全鎖長治療用タンパク質である。アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分がアナログ、変種であるか、またはそれ以外に改変されているか、またはそのタンパク質の完全配列を含まないとき、治療活性の長期化はアナログ、変種、改変ペプチドまたは不完全配列の非融合相当物と比較される。例として、本発明のアルブミン融合タンパク質は、標準と同一の貯蔵および取扱い条件に付されて、所定の時点で比較されたとき、標準の治療活性の約100%以上、または治療活性の約105%、110%、120%、130%、150%または200%以上を留めている。しかしながら、治療活性は治療用タンパク質の安定性に依存しており、100%以下のこともある。

20

【0071】

貯蔵期間は、貯蔵が始まったときの治療活性を基準とした、貯蔵後に残留する治療活性として評価してもよい。治療活性の長期化または延長で示されるような、貯蔵期間が長期化または延長された本発明のアルブミン融合タンパク質は、同一条件に付されたとき、相当する非融合治療用タンパク質の治療活性の約50%以上、治療活性の約60%、70%、80%、90%またはそれ以上を留めている。

【0072】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、同一の貯蔵および取扱い条件に付された非融合治療用タンパク質標準と比較して、大きな溶解性を示す。

30

【0073】

治療用タンパク質

上記のように、本発明のアルブミン融合タンパク質は、遺伝子融合で互いに結合された、治療用タンパク質の少なくとも1つの断片または変種と、ヒト血清アルブミンの少なくとも1つの断片または変種とを含んでなる。

【0074】

ここで用いられている「治療用タンパク質」とは、1以上の治療および/または生物活性を有するクニツドメインペプチド（その非制限例には、DX-890、DPI-14、DX-88またはDX-1000がある）またはその断片もしくは変種に関する。クニツドメインは、中央の逆平行シートと短いC末端ヘリックスを形成している、約51~64残基の折り畳みドメインである。この特徴的ドメインは3つのジスルフィド結合を形成する6つのシステイン残基を含んでいるため、二重ループ構造をとる。N末端領域と最初の鎖との間に、活性阻害結合ループが存在する。この結合ループは、最後の2鎖間で形成されるヘアピンループへ、P2 C₁₄残基を介してジスルフィド結合されている。

40

【0075】

クニツドメインは、次の形の約51 AA~64 AAのポリペプチドである：

【化 1】

$$X_1X_2X_3X_4C_5X_6X_7X_8X_9X_{9a}X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}C_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_{25}X_{26}X_{26a}X_{26b}-$$

$$X_{26c}X_{27}X_{28}X_{29}C_{30}X_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}C_{38}X_{39}X_{40}X_{41}X_{42}X_{42a}X_{42b}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}X_{47}X_{48}X_{49}-$$

$$C_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}C_{55}X_{56}X_{57}X_{58} \text{ (SEQ ID NO: ______)}$$

【0076】

ジスルフィドは C_5 および C_{55} 間、 C_{14} および C_{38} 間と、 C_{30} および C_{51} 間で形成される。 C_{14} および C_{38} ジスルフィドは自然クニツドメインでいつもみられるが、人工クニツドメインではなくてもよい。 C_{14} が他のアミノ酸タイプへ変更されると、 C_{38} も非システインへ変更され、逆もある。いかなるポリペプチドもアミノ末端へ融合させてよい。 $X_1 - X_4$ は0～4つのアミノ酸を含む。 $X_6 - X_{13}$ は8または9つのアミノ酸を含む。 X_{9a} が不在ならば、 X_{12} はGlyである。 X_{26a} 、 X_{26b} および X_{26c} の各々は不在でもよい；即ち、 $X_{15} - X_{30}$ は16、17、18または19つのアミノ酸を含む。 X_{33} はPheまたはTyrである。 $X_{39} - X_{50}$ は12、13、14または15つのアミノ酸を含む；即ち、 X_{42a} 、 X_{42b} および X_{42c} の各々は不在でもよい。 X_{45} はPheまたはTyrである。 $X_{56} - X_{58}$ は0～3つのアミノ酸を含む。追加のシステインも50、53、54または58位に存在してよい。いかなるポリペプチドもカルボキシ末端へ融合させてよい。表3は21種公知ヒトクニツドメインのアミノ酸配列を示している。

10

20

【0077】

【表 1】

表3: 21種公知ヒトクニツドメインのアミノ酸配列

ドメイン	タンパク質	アミノ酸配列	受 入
シングル	A4 (アミロイド 前駆体PTN)	VREVCSEAETGPCRAMISRWFYFDVTEGK CAPFFYGGCGGNRNNFDTEEYCMVCGSA SEQ ID NO: ____	SP:A4_HUMAN A# P05067
シングル	embl loCus HS461P17 = "CAB37"	KQDVCEMPKETGPCLAYFLHWWYDKKDNT CSMFVYGGCQGNNNNFQSKANCLNTCKNK SEQ ID NO: ____	(CAB37635; g4467797)
シングル	アミロイド様 PTN2	VKAVCSQEAMTGPCRAVMRWFYFDLSKKG CVRFIYGGCGGNRNNFESEDYCMVCKAM SEQ ID NO: ____	Loc:1703344;S41082 g1082207 & g1703344 & g477608
K1	ITI	KEDSCQLGYSAGPCMGMTSRFYNGTSMA CETFQYGGCMGNGNNFVTEKECLQTCRTV SEQ ID NO: ____	SP:HC_HUMAN, A# P02760 (HI-8e) = gi 223133
K2	ITI	TVAACNLPIVRGPCRAFIQLWAFDAVKKG CVLFPIYGGCQGNNGNKFYSEKECREYCGVP SEQ ID NO: ____	SP:HC_HUMAN, A# P02760 (HI-8e) = gi 223133
K1	TFPI-1 = LACI	MHSFCAFKADDGPCKAIMKRFFFNIFTRQ CEEFIYGGCEGNQNRFSLEECKKMCTRD N SEQ ID NO: ____ (補正 2000.05.14)	SP:LACI_HUMAN, A# P10646 gim 14667
K2	TFPI-1	KPDFCFLEEDPGICRGYITRYFYNNQTKQ CERFKYGGCLGNMNNFETLEECKNICEDG SEQ ID NO: ____	SP:LACI_HUMAN, A# P10646 gim 14667
K3	TFPI-1	GPSWCLTPADRGLCRANENRFYNSVIGK CRPFKYSGCGGNENNFTSKQECLRACKKG SEQ ID NO: ____	SP:LACI_HUMAN, A# P10646 gim 14667
K1	TFPI-2	NAEICLLPLDYGPCRALLRYYYDRYTQS CRQFLYGGCEGNANNFYTWACDDACWRI SEQ ID NO: ____	Specher & al. PNAS 91:3353-3357 (1994)
K2	TFPI-2	VPKVCRLQVVDQCEGSTEKYFFNLSSMT CEKFFSGGCHRNRRNRFDEATCMGFCAPK SEQ ID NO: ____	Specher & al, PNAS 91:3353ff(1994)
K3	TFPI-2	IPSFICYSPKDEGLCSANVTRYFNPRTYRT CDAFTYTGCGGNDNNFVSREDCKRACAKA SEQ ID NO: ____	Specher & al, PNAS 91:3353ff(1994)

10

20

30

40

ドメイン	タンパク質	アミノ酸配列	受 入
K1	肝細胞GF アクチベーター インヒビター タイプ1	TEDYCLASNKVGRCRGSFPRWYYDPTEQI CKSFVYGGCLGNKNNYLREEECILACRGV SEQ ID NO: ____	Locus 2924601
K2	肝細胞GF アクチベーター インヒビター タイプ1	DKGHCVDLPDTGLCKESI PRWYYNPFSEH CARFTYGGCYGNKNNFEEEQQCLES CRGI SEQ ID NO: ____	Locus 2924601
K1	肝細胞GF アクチベーター インヒビター タイプ2	IHDFCLVSKVVGRCRASMPRWYNVTDGS CQLFVYGGCDGNSNNYLTKEECLKKCATV SEQ ID NO: ____	LOC. 2924620
K2	肝細胞GF アクチベーター インヒビター タイプ2	YEEYCTANAVTGPCRASFP RWYFDVERN S CNNFIYGGCRGNKNSYRSEEACMLRCFRQ SEQ ID NO: ____	LOC. 2924620
シングル	PRF	TVAACNLPVIRGPCRAFIQLWAFDAVKGK CVLFPYGGCQGNNGNFYSEKECREYCGVP SEQ ID NO: ____	gi 223132 Name: 0511271A
シングル	HKI B9 ドメイン	LPNVCAFPMEKGPCQTYMTRWFFNFETGE CELFA YGGCGGNSNNFLRKEKCEKFKCKFT SEQ ID NO: ____	gi 579567 WO93/14123-A; g542925
シングル	コラーゲン V1 (VII)	SDDPCSLPLDEGSCTAYTLRWYHRAVTEA CHPFVYGGCGGNANRFGTREACERRCPPR SEQ ID NO: ____	NCBI: gi 543915
シングル	コラーゲン α 1(VII)	EDDPCSLPLDEGSCTAYTLRWYHRAVTGS TEACHPFVYGGCGGNANRFGTREACERRC PPR SEQ ID NO: ____	g627406 - A54849 GI:627406
シングル	コラーゲンV3	ETDICKLPKDEGTCRDFILKWYDPNTKS CARFWYGGCGGNENKFGSQKECEKVCA PV SEQ ID NO: ____	NCBI Seq ID: 512802 WO93/14119-A. 2193976 (Xray)
シングル	染色体 20 ptn "Chrome20"	FQEP CMLPVRHGN CNHEAQRWHFDFKNYR CTPFKYRGCEGNANNFLNEDACRTACMLI SEQ ID NO: ____	CAB37634 PID g7024350

10

20

30

【 0 0 7 8 】

表 1 のいかなるドメインも、(特定のプロテアーゼを阻害するような) 特定の生物学的効果を有するように工学処理して、H A へ融合させることができる。そのため、本発明のアルブミン融合タンパク質は治療用タンパク質の少なくとも 1 つの断片または変種を含有してもよい。変種には変異体、アナログ、ミメティックおよびホモログを含み、内在または天然相関物を含める。

40

【 0 0 7 9 】

「治療活性」を示すポリペプチドまたは「治療活性」であるタンパク質とは、ここで記載されたまたは当業界で知られている 1 種以上の治療用タンパク質のような、治療用タンパク質に付随する 1 種以上の公知生物および / または治療活性を有したポリペプチドを意味する。非制限例として、「治療用タンパク質」は、疾患、症状または障害を治療、予防または改善する上で有用なタンパク質である。

50

【 0 0 8 0 】

ここで用いられている「治療活性」または「活性」とは、その効果がヒトで望まれる治療成果、あるいは非ヒト哺乳動物または他の種もしくは生物で望まれる効果と符合する、活性に関する。治療活性はインビボまたはインビトロで測定される。例えば、望ましい効果は細胞培養物でアッセイされる。このようなインビトロまたは細胞培養物アッセイは、当業界で記載されているように、多くの治療用タンパク質について通常利用しうる。

【 0 0 8 1 】

有用アッセイの例には、参考のためここで特に組み込まれる、表4のレファレンスおよび文献で記載されたもの、および本例で記載されたものがあるが、それらに限定されない。本発明の融合タンパク質により示される活性は、例えば、ここで記載されているような簡単にできるインビトロアッセイにより測定される。これらのアッセイを用いて、アルブミンへ融合されていない治療用タンパク質（またはその断片もしくは変種）と比較した、融合タンパク質が示す相対的な生物および/または治療活性のようなパラメーターが調べられる。

10

【 0 0 8 2 】

本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に相当する治療用タンパク質は、1以上のオリゴ糖基の結合で修飾してもよい。グリコシル化と称される修飾は、タンパク質の物理的性質に劇的な影響を与え、タンパク質の安定性、分泌および局在化に重要なこともある。このような修飾は、参考のためここに組み込まれる、米国仮出願第60/355,547およびWO01/79480で詳細に記載されている。

20

【 0 0 8 3 】

本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に相当する治療用タンパク質、並びにそのアナログおよび変種は、それらが発現される宿主細胞により、または他の発現条件により、1以上の部位におけるグリコシル化がそれら核酸配列の操作結果として改変されるように修飾してよい。例えば、グリコシル化異性体は、グリコシル化部位を除くまたは導入することにより、例えばアスパラギンからグルタミンへの置換のような、アミノ酸残基の置換または欠失により産生してもよく、あるいは非グリコシル化組換えタンパク質は、それらをグリコシル化しない宿主細胞、例えばE.coliまたはグリコシル化欠陥酵母で、タンパク質を発現させることにより産生してもよい。これらアプローチの例は、参考のため組み込まれる、当業界で知られた米国仮出願第60/355,547およびWO01/79480で更に詳細に記載されている。

30

【 0 0 8 4 】

表4は、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に相当する治療用タンパク質の非網羅リストを掲載している。「治療用タンパク質X」欄では、治療用タンパク質分子を開示しており、その後の括弧書では、その治療用タンパク質分子またはその断片もしくは変種を含んでなる、またはそれらからなる、科学およびブランド名を記載している。ここで用いられている「治療用タンパク質X」とは、(CASおよびGenebank受入番号から得られるアミノ酸配列により特定されるような)個別の治療用タンパク質分子、またはこの欄で開示された所定の治療用タンパク質分子に関連した治療用タンパク質の全体グループに関する。これら項目の各々に関連した情報は、特にそこで記載されたアミノ酸配列に関して、それら全体で参考のため各々組み込まれる。「PCT/特許レファレンス」欄では、治療用タンパク質分子について記載する特許および/または公開特許出願に対応した米国特許番号、またはPCT国際公開番号を掲載している。「PCT/特許レファレンス」欄で引用された特許および/または公開特許出願の各々は、参考のためそれら全体でここに組み込まれる。特に、各引用「PCT/特許レファレンス」の配列リストで掲載された特定ポリペプチドのアミノ酸配列、例えば各引用「PCT/特許レファレンス」の詳細な説明で掲載されたこれらアミノ酸配列の変種(変異体、断片など)、例えば各引用「PCT/特許レファレンス」の詳細な説明で掲載された治療適応症、および各引用「PCT/特許レファレンス」の詳細な説明、更に詳しくは実施例で掲載された特定ポリペプチドについての活性アッセイが、参考のためここに組み込まれる。「生物活性」欄

40

50

は、治療用タンパク質分子に伴う生物活性を記載している。「関連情報」欄で引用されたレファレンスの各々は、特に対応生物活性のアッセイについてレファレンス（例えば、方法セクション参照）で記載された各活性アッセイの記載に関して、参考のためそれら全体でここに組み込まれる。「好ましい適応症 Y」欄では、治療用タンパク質 X、または治療用タンパク質 X 部分を含んでなる本発明のアルブミン融合タンパク質により治療、予防、診断または改善される、疾患、障害および / または症状について記載している。

【 0 0 8 5 】

【 表 2 】

表4: 選択された治療用タンパク質のリスト

治療用 タンパク質X	PCT／特許 レファレンス	生物活性	関連文献	好ましい適応症Y
DX-890 DPI14	米国特許No. 5,663,143 配列番号20＝ DX-890	ヒト好中球 エラスターゼ の阻害 Ki～5pM	Rusckowski et al. (2000)J.Nuclear Medicine 41:363-74	気腫、 嚢胞性線維症COPD、 気管支炎、肺高血圧、 急性呼吸窮迫症候群、 間質性肺疾患、 喘息、煙草中毒、 気管支肺形成異常、 肺炎、熱傷、肺移植拒絶
DX-88	米国特許No. 6,333,402 5,994,125 6,057,287及び 5,795,865	ヒト血漿 カリクレイン の阻害	Markland et al. Biochemistry 35 (24):8058-67,1996 Ley et al.(1996) Mol.Divers 2(1-2) 119-24	HAE
DX-1000	米国特許No. 6,010,880 6,071,723及び 6,103,499	ヒトプラスミン を阻害する	Markland et al. Biochemistry 35 (24):8045-57,1996 Ley et al.(1996) Mol.Divers 2(1-2) 119-24	出血、癌

【 0 0 8 6 】

様々な態様において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、表 4 の対応列で掲載されたアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に相当する治療用タンパク質の治療活性および / または生物活性に相当する治療活性および / または生物活性を発揮しうる（例えば、表 4 の「生物活性」および「治療用タンパク質 X」欄参照）。別な態様において、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療活性タンパク質部分はレファレンス配列の断片または変種であり、表 4 の「生物活性」欄で開示された対応治療用タンパク質の治療活性および / または生物活性を発揮しうる。

【 0 0 8 7 】

ポリペプチドおよびポリヌクレオチド断片および変種

断片

本発明は、表 4 で記載された治療用タンパク質、アルブミンタンパク質および / または本発明のアルブミン融合タンパク質の断片に更に関する。

【 0 0 8 8 】

タンパク質の N 末端から 1 以上のアミノ酸の欠失が、治療用タンパク質、アルブミンタ

10

20

30

40

50

ンパク質および/またはアルブミン融合タンパク質の1以上の生物学的機能の変化または喪失をもたらすとしても、他の治療活性および/または機能活性(例えば、生物活性、マルチマー化する能力、リガンドと結合する能力)はなお留まることがある。例えば、ポリペプチドの完全または成熟型を認識する抗体を誘導しうることおよび/またはそれと結合しうること、N末端欠失ポリペプチドの能力は、完全ポリペプチドの残基が過半数に満たないでN末端から除去されたとき、通常留められる。完全ポリペプチドのN末端残基を欠く具体的なポリペプチドがこのような免疫活性を留めているかどうかは、ここで記載された当業界で知られる常法により、簡単に調べられる。多数の欠失N末端アミノ酸残基を有する変異タンパク質がある生物または免疫活性を留めていることは、ないわけではない。事実、わずか6アミノ酸残基から構成されるペプチドでも、しばしば免疫応答を励起する。

10

【0089】

したがって、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に相当する治療用タンパク質の断片には、全鎖長タンパク質、並びにレファレンスポリペプチド(例えば、表4で開示されているような治療用タンパク質)のアミノ酸配列のアミノ末端から1以上の残基を欠失させたポリペプチドを含む。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも、本発明に包含される。

【0090】

加えて、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分に相当する血清アルブミンポリペプチドの断片には、全鎖長タンパク質、並びにレファレンスポリペプチド(例えば、血清アルブミン)のアミノ酸配列のアミノ末端から1以上の残基を欠失させたポリペプチドを含む。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも、本発明に包含される。

20

【0091】

更に、本発明のアルブミン融合タンパク質の断片には、全鎖長アルブミン融合タンパク質、並びにアルブミン融合タンパク質のアミノ末端から1以上の残基を欠失させたポリペプチドを含む。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも、本発明に包含される。

【0092】

上記のように、レファレンスポリペプチド(例えば、治療用タンパク質および/または血清アルブミンタンパク質)のN末端またはC末端から1以上のアミノ酸の欠失が、タンパク質の1以上の生物学的機能の変化または喪失をもたらすとしても、他の機能活性(例えば、生物活性、マルチマー化する能力、リガンドと結合する能力)および/または治療活性はなお留まることがある。例えば、ポリペプチドの完全または成熟型を認識する抗体を誘導しうることおよび/またはそれと結合しうること、C末端欠失ポリペプチドの能力は、完全または成熟ポリペプチドの残基が過半数に満たないでC末端から除去されたとき、通常留められる。レファレンスポリペプチドのN末端および/またはC末端残基を欠く具体的なポリペプチドが治療活性を留めているかどうかは、ここで記載されたおよび/または当業界で知られた常法により、簡単に調べられる。

30

【0093】

本発明は、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に相当する治療用タンパク質(例えば、表4で掲載された治療用タンパク質)のアミノ酸配列のカルボキシ末端から1以上の残基を欠失させたポリペプチドを更に提供する。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも、本発明に包含される。

40

【0094】

加えて、本発明は、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分に相当するアルブミンタンパク質(例えば、血清アルブミン)のアミノ酸配列のカルボキシ末端から1以上の残基を欠失させたポリペプチドを提供する。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも、本発明に包含される。

【0095】

更に、本発明は、本発明のアルブミン融合タンパク質のカルボキシ末端から1以上の残

50

基を欠失させたポリペプチドを提供する。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも、本発明に包含される。

【0096】

加えて、上記いずれのNまたはC末端欠失も、NおよびC末端欠失レファレンスポリペプチド（例えば、表4で掲載された治療用タンパク質、または血清アルブミン（例えば、配列番号18、表1）、または本発明のアルブミン融合タンパク質）を作製するために組み合わせうる。本発明は、アミノおよびカルボキシル末端の双方から1以上のアミノ酸を欠失させたポリペプチドも提供する。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも、本発明に包含される。

【0097】

本出願は、ここで掲載されたレファレンスポリペプチド配列（例えば、治療用タンパク質、血清アルブミンタンパク質または本発明のアルブミン融合タンパク質）と少なくとも60%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一のポリペプチドを含有したタンパク質、またはその断片にも関する。一部の態様において、本出願は、上記のようなNおよびC末端欠失のアミノ酸配列を有するレファレンスポリペプチドと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一のポリペプチドを含んでなるタンパク質に関する。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも、本発明に包含される。

【0098】

本発明の他のポリペプチド断片は、アミノ酸配列が断片である、治療用タンパク質または血清アルブミンタンパク質のポリペプチド配列の治療活性および/または機能活性（例えば、生物活性）を示すアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる断片である。

【0099】

他のポリペプチド断片は生物活性断片である。生物活性断片とは、本発明のポリペプチドの活性と、必ずしも同一ではなく、類似した活性を示すものである。断片の生物活性には、望ましい活性の改善、または望ましくない活性の減少も含む。

【0100】

変種

「変種」とは、レファレンス核酸またはポリペプチドとは異なるが、その本質的性質を留めた、ポリヌクレオチドまたは核酸に関する。通常、変種はレファレンス核酸またはポリペプチドと全体的に近似し、多くの領域では同一である。

【0101】

ここで用いられている「変種」とは、治療用タンパク質（例えば、表4の「治療」欄参照）、アルブミンタンパク質および/または本発明のアルブミン融合タンパク質とは配列が異なるが、ここで他に記載されまたは当業界で他に知られているような、少なくとも1つのその機能性および/または治療性（例えば、表4の「生物活性」欄で開示されているような治療活性および/または生物活性）を留めた、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミン部分、またはアルブミン融合タンパク質に関する。通常、変種は、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に相当する治療用タンパク質、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分に相当するアルブミンタンパク質、および/または本発明のアルブミン融合タンパク質のアミノ酸配列と全体的に非常に類似しており、多くの領域では同一である。これらの変種をコードする核酸も本発明に包含される。

【0102】

本発明は、例えば、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に相当する治療用タンパク質のアミノ酸配列（例えば、表4のレファレンスで開示されたアミノ酸配列またはその断片もしくは変種）、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分に相当するアルブミンタンパク質のアミノ酸配列（例えば、表1またはその断片もしくは変種）、および/または本発明のアルブミン融合タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも60%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、9

10

20

30

40

50

9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなる、またはからなるタンパク質にも関する。これらポリペプチドの断片も提供される（例えば、ここで記載されている断片）。本発明に包含される別なポリペプチドは、ストリンジェントハイブリッド形成条件下（例えば、約 4 5 で 6 × 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム（SSC）で結合 DNA を濾過するハイブリッド形成、次いで約 5 0 ~ 6 5 で 0 . 2 × SSC、0 . 1 % SDS で 1 回以上の洗浄）、高ストリンジェント条件下（例えば、約 4 5 で 6 × 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム（SSC）で結合 DNA を濾過するハイブリッド形成、次いで約 6 8 で 0 . 1 × SSC、0 . 2 % SDS で 1 回以上の洗浄）または当業者に知られた他のストリンジェントハイブリッド形成条件下（例えば、Ausubel, F.M. et al., eds., 1989, Current protocol in Molecular Biology, Green publishing associates, Inc., and John Wiley & Sons Inc., New York, page 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3 参照）で、本発明のアミノ酸配列をコードする核酸分子の相補体とハイブリッド形成するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドである。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明に包含される。

【0103】

本発明の対象アミノ酸配列と少なくとも、例えば、95 % 「同一」のアミノ酸配列を有するポリペプチドとは、本ポリペプチドのアミノ酸配列が対象配列と同一であるが、本ポリペプチド配列が対象アミノ酸配列の 1 0 0 アミノ酸毎に 5 以内のアミノ酸改変を有しうることを意味する。換言すると、対象アミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るためには、本配列で 5 % 以内のアミノ酸残基が挿入、欠失または他のアミノ酸と置換しうる。レファレンス配列のこれら改変は、レファレンスアミノ酸配列のアミノまたはカルボキシ末端で、あるいはこれら末端間のいずれで生じても、レファレンス配列の各残基内でまたはレファレンス配列内の 1 以上の隣接基で個別に散在してもよい。

【0104】

実際問題として、いずれか具体的なポリペプチドが、例えば本発明のアルブミン融合タンパク質またはその断片（例えば、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分またはアルブミン融合タンパク質のアルブミン部分）のアミノ酸配列と少なくとも 6 0 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % または 9 9 % 同一であるかどうかは、従来どおりに公知のコンピュータープログラムを用いて調べることができる。このようなプログラムおよびそれらを用いる方法は、参考のためここに組み込まれる、例えば米国仮出願第 6 0 / 3 5 5 , 5 4 7 および WO 0 1 / 7 9 4 8 0 (p . 4 1 - 4 3) で記載されており、当業界で周知である。

【0105】

本発明のポリヌクレオチド変種は、コード領域、非コード領域または双方で改変を含んでよい。ポリヌクレオチド変種には、サイレント置換、付加または欠失を生じるが、コードされたポリペプチドの性質または活性は変えない改変をもつものも含む。このようなヌクレオチド変種は、遺伝コードの縮重に基づくサイレント置換により作製してもよい。ポリペプチド変種には、5 0 以下、4 0 以下、3 0 以下、2 0 以下、1 0 以下または 5 ~ 5 0 、 5 ~ 2 5 、 5 ~ 1 0 、 1 ~ 5 または 1 ~ 2 のアミノ酸がいずれかの組合せで置換、欠失または付加されたものを含む。ポリヌクレオチド変種は、様々な理由から、例えば具体的宿主でのコドン発現を最適化するために作製しうる（微生物宿主、例えば酵母または *E. coli* に好まれるものへヒト mRNA のコドンを変更する）。

【0106】

別な態様では、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミン部分をコードするポリヌクレオチドが、酵母または哺乳動物細胞での発現用に最適化されている。他の態様では、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分をコードするポリヌクレオチドが、酵母または哺乳動物細胞での発現用に最適化されている。更に別な態様では、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、酵母または哺乳動物細胞での発現用に最適化されている。

【0107】

別な態様において、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分をコードするコドン最適化ポリヌクレオチドは、ここで記載されているようなストリンジェントハイブリッド形成条件下で、治療用タンパク質をコードする野生型ポリヌクレオチドとハイブリッド形成しない。更に別な態様において、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミン部分をコードするコドン最適化ポリヌクレオチドは、ここで記載されているようなストリンジェントハイブリッド形成条件下で、アルブミンタンパク質をコードする野生型ポリヌクレオチドとハイブリッド形成しない。もう1つの態様において、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするコドン最適化ポリヌクレオチドは、ここで記載されているようなストリンジェントハイブリッド形成条件下で、治療用タンパク質部分またはアルブミンタンパク質部分をコードする野生型ポリヌクレオチドとハイブリッド形成しない。

【0108】

追加の態様において、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分をコードするポリヌクレオチドは、その治療用タンパク質の天然配列を含んでいるわけではなく、またはそれからなるわけでもない。別な態様において、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分をコードするポリヌクレオチドは、アルブミンタンパク質の天然配列を含んでいるわけではなく、またはそれからなるわけでもない。別な態様において、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、治療用タンパク質部分またはアルブミンタンパク質部分の天然配列を含んでいるわけではなく、またはそれからなるわけでもない。

【0109】

追加の態様において、治療用タンパク質は、天然野生型ポリヌクレオチドが存在しないように、バイオパニング(biopanning)によりランダムペプチドライブラリーから選択される。

【0110】

天然変種は「対立遺伝子変種」と称され、生物の染色体で所定の座を占める遺伝子の数種代替型のうち1つに関する(Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985))。これらの対立遺伝子変種はポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドレベルが様々であり、本発明に含まれる。一方、非天然変種は変異誘発技術または直接合成により作製しうる。

【0111】

タンパク質エンジニアリングおよび組換えDNAテクノロジーの公知方法を用いて、本発明のポリペプチドの特徴を改善または改変するために変種が作製される。例えば、1以上のアミノ酸が、生物学的機能の実質的喪失なしに、本発明のポリペプチドのN末端またはC末端から欠失される。例えば、Ron et al., J. Biol. Chem. 268:2984-2988 (1993) (KGF変種) および Dobeli et al., J. Biotechnology, 7:199-216 (1988) (インターフェロン変種) 参照。

【0112】

更に、変種が天然タンパク質の場合と類似した生物活性を多くの場合に留めていることを、十分な証拠が証明している(例えば、Gayle et al., J. Biol. Chem. 268:22105-22111 (1993) (IL-1a変種))。更に、ポリペプチドのN末端またはC末端から1以上のアミノ酸を欠失させて、1以上の生物学的機能の改変または喪失をもたらすとしても、他の生物活性はなお留められることがある。例えば、分泌型を認識する抗体を誘導しうる、および/またはそれと結合しうる欠失変種の能力は、分泌型の残基が過半数に満たないでN末端またはC末端から除去されたとき、おそらく留められるであろう。タンパク質のNまたはC末端残基を欠く具体的ポリペプチドがこのような免疫活性を留めているかどうかは、ここで記載され当業界で他に知られた常法により、簡単に調べられる。

【0113】

そのため、本発明は機能活性(例えば、生物活性および/または治療活性)を有したポ

リペプチド変種を更に含んでいる。別な態様において、本発明は、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に相当する治療用タンパク質の1以上の生物および/または治療活性に相当する機能活性(例えば、生物活性および/または治療活性、例えば表4の「生物活性」欄で開示されたもの)を有した、アルブミン融合タンパク質の変種を提供する。このような変種には、活性に影響をほとんど与えないような、当業界で知られた一般的規則に従い選択される欠失、挿入、逆転、反復および置換を含む。

【0114】

他の態様において、本発明の変種は保存的置換を有している。「保存的置換」とは、脂肪族または疎水性アミノ酸Ala、Val、LeuおよびIleの置換；ヒドロキシル残基SerおよびThrの置換；酸性残基AspおよびGluの置換；アミド残基AsnおよびGlnの置換；塩基性残基Lys、ArgおよびHisの置換；芳香族残基Phe、TyrおよびTrpの置換；小サイズアミノ酸Ala、Ser、Thr、MetおよびGlyの置換のような、グループ内の交換を意味する。

10

【0115】

表現型がサイレントのアミノ酸置換をどのように行うかに関するガイダンスは、例えばBowie et al., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions", Science, 247:1306-1310(1990)で示されており、そこでは改変するアミノ酸配列の許容性を研究するための主戦略が2つあることを著者は示している。

【0116】

著者が述べているように、タンパク質はアミノ酸置換に対して驚くほど許容性である。その著者は、どのアミノ酸変更がタンパク質のあるアミノ酸位置で許容されそうかを更に示している。例えば、(タンパク質の三次構造内に)ほとんど埋没されたアミノ酸残基は非極性側鎖を必要とし、表面側鎖の特徴は通常ほとんど保存されていない。更に、許容される保存的アミノ酸置換には、脂肪族または疎水性アミノ酸Ala、Val、LeuおよびIleの置換；ヒドロキシル残基SerおよびThrの置換；酸性残基AspおよびGluの置換；アミド残基AsnおよびGlnの置換；塩基性残基Lys、ArgおよびHisの置換；芳香族残基Phe、TyrおよびTrpの置換；小サイズアミノ酸Ala、Ser、Thr、MetおよびGlyの置換がある。保存的アミノ酸置換の他にも、本発明の変種には、(i)置換アミノ酸残基が遺伝コードでコードされたまたはそうでない、非保存アミノ酸残基の1以上の置換を含んだポリペプチド、(ii)置換基を有するアミノ酸残基の1以上の置換を含んだポリペプチド、(iii)他の化合物、例えばポリペプチドの安定性および/または溶解性を増す化合物(例えば、ポリエチレングリコール)と融合された、または化学的に接合されたポリペプチド、または(iv)例えばIgG-Fc融合領域ペプチドのような追加アミノ酸を含んだポリペプチドがある。このような変種ポリペプチドは、ここでの開示から当業者の範囲内に属すると思われる。

20

30

【0117】

例えば、他の荷電または中性アミノ酸による荷電アミノ酸のアミノ酸置換を含んだポリペプチド変種は、低凝集性のような、改善された特徴を有するタンパク質をもたらすことがある。医薬処方物の凝集は、凝集物の免疫活性のせいで、活性を減少させ、クリアランスを増加させる。Pinckard et al., Clin. Exp. Immunol. 2:331-340(1967); Robbins et al., Diabetes 36:838-845(1987); Cleland et al., Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377(1993)参照。

40

【0118】

特別な態様において、本発明のポリペプチドは、ここで記載された治療用タンパク質および/またはヒト血清アルブミンおよび/または本発明のアルブミン融合タンパク質のアミノ酸配列の断片または変種を含んでなるか、またはそれからなり、その断片または変種は、レファレンスアミノ酸配列と比較して、1~5、5~10、5~25、5~50、10~50または50~150アミノ酸残基の付加、置換および/または欠失を有している。ある態様において、アミノ酸置換は保存的である。これらのポリペプチドをコードする核酸も本発明に包含される。

50

【 0 1 1 9 】

本発明のポリペプチドは、ペプチド結合または修正ペプチド結合、即ちペプチドアイソスターで互いに結合されたアミノ酸から構成され、20 遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含有してもよい。ポリペプチドは、翻訳後プロセッシングのような自然プロセスまたは当業界で周知の化学的修飾技術により修飾してもよい。このような修飾は、基本テキスト、更に詳細な専門研究論文、および多数の研究文献で詳しく記載されている。修飾は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端を含めて、ポリペプチドのどの箇所で生じてもよい。同一タイプの修飾が所定ポリペプチドの数部位に同一または異なる程度で存在しうることが明らかであろう。しかも、所定ポリペプチドは多くのタイプの修飾を含んでよい。ポリペプチドは、例えばユビキチン化の結果として分岐させてもよく、それらは分岐があるまたはない環状でもよい。環状、分岐および分岐環状ポリペプチドは翻訳後自然プロセスから得ても、または合成法により作製してもよい。修飾には、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、 γ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、ペギル化、タンパク質分解プロセッシング、ホスホリル化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなタンパク質へのアミノ酸のトランスファーRNA媒介付加、およびユビキチン化がある。

【 0 1 2 0 】

更に、化学的存在物も、例えばBiotechnology, 10:324(1999)のCurrent Opinionsで開示された方法により、特定の機能または生物活性を高めるまたは調節するために、アルブミン融合タンパク質へ共有結合させてよい。

【 0 1 2 1 】

更に、向標的存在物も、特定の機能または生物活性を有する細胞またはステージ特異性タイプ、組織タイプまたは解剖学的構造へ向けるために、本発明のアルブミン融合タンパク質へ共有結合させてよい。本発明のアルブミン融合タンパク質を方向づけることにより、剤の作用は局在化される。更に、このような向標的化のおかげで、必要部位に本発明のアルブミン融合タンパク質を蓄積させることにより、より高い局在化濃度が得られることから、必要な本発明のアルブミン融合タンパク質の用量を減少させうる。本発明のアルブミン融合タンパク質は、架橋剤の使用により、および組換えDNA技術により、向標的部分と接合させることができ、こうすることにより、リガンドがタンパク質であるとき、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列、またはその機能部分がリガンドのヌクレオチド配列の近くでクローニングされて、複合体が融合タンパク質として発現される。

【 0 1 2 2 】

本発明に包含される追加の翻訳後修飾には、例えば、N連結またはO連結炭水化物鎖、N末端またはC末端のプロセッシング、アミノ酸主鎖への化学的部分の付着、N連結またはO連結炭水化物鎖の化学修飾、および原核宿主細胞発現の結果としてN末端メチオニン残基の付加または欠失がある。アルブミン融合タンパク質は、検出可能ラベル、例えばタンパク質の検出および単離を行える酵素、蛍光、アイソトープまたは親和性ラベルで修飾してもよい。このような修飾の例は、例えば、参考のためここに組み込まれる、当業界で周知の米国仮出願第60/355,547およびWO01/79480 (p. 105 - 106) で示されている。

【 0 1 2 3 】

機能活性

「機能活性を有するポリペプチド」とは、全鎖長プロタンパク質および/または治療用タンパク質の成熟型に伴う1以上の既知機能活性を示せるポリペプチドに関する。このような機能活性には、生物活性、酵素阻害、抗原性〔抗ポリペプチド抗体と結合しうる、ま

たは結合に際してポリペプチドと競合しうる能力)、免疫原性(本発明の特定ポリペプチドと結合する抗体を産生しうる能力)、本発明のポリペプチドとマルチマーを形成しうる能力、およびポリペプチドのレセプターまたはリガンドと結合しうる能力があるが、それらに限定されない。

【0124】

「生物活性を有するポリペプチド」とは、用量依存的にまたはそれなしで、特定の生物学的アッセイで測定されるような、成熟型を含めた、本発明の治療用タンパク質の活性と類似した、但し必ずしもそれと同一ではない、活性を示す、ポリペプチドに関する。用量依存性が存在する場合に、それはポリペプチドの場合と同一でなく、本発明のポリペプチドと比較して、むしろ所定活性で用量依存性と実質的に類似していることを要する。

10

【0125】

他の態様において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、アルブミンと融合していないときの治療用タンパク質(またはその断片もしくは変種)に伴う生物および/または治療活性を少なくとも1つ有している。

【0126】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、当業界で公知のルーチンな修飾アッセイ、およびここで記載されたアッセイを用いて、機能活性(例えば、生物活性)についてアッセイしうる。特に、アルブミン融合タンパク質は、表4の「関連文献」欄で掲載されたアッセイを用いて、機能活性(例えば、生物活性または治療活性)についてアッセイしうる。加えて、当業者は、表4の対応列に掲載されたアッセイを用いて、活性について、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に相当する治療用タンパク質の断片をルーチンでアッセイしうる。更に、当業者は、当業界で知られたおよび/または下記の実施例セクションで記載されたようなアッセイを用いて、活性について、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分に相当するアルブミンタンパク質の断片をルーチンでアッセイしてもよい。

20

【0127】

加えて、ここで記載された(例および表4参照)、そうでなければ当業界で知られたアッセイは、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分および/またはアルブミン部分に関連した生物活性および/または治療活性(インビトロまたはインビボ)を発揮しうる、本発明のアルブミン融合タンパク質とその断片、変種および誘導体の能力を測定するために、ルーチンで適用される。他の方法も当業者に公知であり、本発明の範囲内に属する。

30

【0128】

融合タンパク質の発現

本発明のアルブミン融合タンパク質は、酵母、微生物、例えば細菌、またはヒトもしくは動物細胞系からの分泌により、組換え分子として産生してもよい。必要に応じて、ポリペプチドは宿主細胞から分泌される。

【0129】

ここで例示されたアルブミン融合タンパク質の発現向けに、WO95/33833で例示されたようなHSP150遺伝子の酵母株分断物(disrupted)、WO00/44772で例示されたようなPMT1遺伝子の酵母株分断物[rHAプロセス](アルブミン融合体のO連結グリコシル化を減少/消失させるように働く)またはWO95/23857で例示されたようなYAP3遺伝子の酵母株分断物が、酵母PRB1プロモーター、WO90/01063で例示されたHSA/MF-1融合リーダー配列、酵母ADH1ターミネーター、LEU2選択マーカーおよびUS5,637,504で例示された崩壊ベクター-pSAC35と組み合わせて、好結果に用いられた。

40

【0130】

本発明で有用と期待される他の酵母株、プロモーター、リーダー配列、ターミネーター、マーカーおよびベクターは、参考のためここに組み込まれる、当業界で周知の米国仮出願第60/355,547およびWO01/74980(p.94-99)で記載されて

50

いる。

【0131】

本発明は、本発明のアルブミン融合タンパク質を発現するように形質転換された細胞、必要に応じて酵母細胞も含む。形質転換宿主細胞自体に加えて、本発明では、栄養培地中における、それら細胞の培養物、必要に応じてモノクローナル（クローンの均一な）培養物、またはモノクローナル培養物から誘導された培養物も考えている。そのポリペプチドが分泌されるならば、培地は細胞と一緒に、あるいはそれらが濾過または遠心で除去されるならば細胞なしで、そのポリペプチドを含有する。細菌（例えば、*E. coli* および *Bacillus subtilis*）、酵母（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Kluyveromyces lactis* および *Pichia pastoris*）、糸状菌（例えば、*Aspergillus*）、植物細胞、動物細胞および昆虫細胞を含めて、多くの発現系が公知であり、用いる。 10

【0132】

望ましいタンパク質は、例えば宿主染色体または遊離プラスミドに挿入されたコード配列から、従来の手法で産生される。酵母は、いずれかの常法、例えばエレクトロポレーションにより、望ましいタンパク質のコード配列で形質転換される。エレクトロポレーションによる酵母の形質転換のための方法は、Becker & Guarente(1990) *Methods Enzymol.* 194, 182で開示されている。

【0133】

好結果に形質転換された細胞、即ち本発明のDNA構築物を含有した細胞は、周知の技術により同定しうる。例えば、発現構築物の導入から得られた細胞は、望ましいポリペプチドを産生するために増殖させうる。細胞は回収および溶離され、それらのDNA分がSouthern(1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503またはBerent et al. (1985) *Biotech.* 3, 208により記載されたような方法を用いてDNAの存在について試験される。一方、上澄中におけるタンパク質の存在は抗体を用いて検出しうる。 20

【0134】

有用な酵母プラスミドベクターにはpRS403 - 406およびpRS413 - 416があり、これらはStratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USAから通常入手しうる。プラスミドpRS403、pRS404、pRS405およびpRS406は酵母組込みプラスミド（YIp）であり、酵母選択マーカーHIS3、TRP1、LEU2およびURA3を組み込んでいる。プラスミドpRS413 - 416は酵母動原体プラスミド（YCp）である。 30

【0135】

酵母で発現用のアルブミン融合タンパク質を作製するためのベクターにはpPPC0005、pScCHSA、pScNHSAおよびpC4: HSAがあるが、それらはAmerican Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209に2001年4月11日付で寄託され、参考のためここに組み込まれる仮出願第60/355,547およびWO01/79480で記載されている。

【0136】

酵母でアルブミン融合タンパク質を発現させるために有用であると期待されるもう1つのベクターは、参考のためそれ全体でここに組み込まれる、Sleep et al., *BioTechnology* 8:42(1990)で記載されたpSAC35ベクターである。プラスミドpSAC35は、US5,637,504で記載された崩壊クラスのベクターに属する。 40

【0137】

相補的付着末端を介してDNAをベクターへ作動可能に連結させるために、様々な方法が開発された。例えば、相補的ホモポリマー領域がベクターDNAへ挿入されるDNAセグメントへ加えられる。次いで、ベクターおよびDNAセグメントが、組換えDNA分子を形成するために、相補的ホモポリマーの尾部間で水素結合により結合される。

【0138】

1以上の制限部位を含んだ合成リンカーは、DNAセグメントをベクターへ結合させる代替法を提供する。エンドヌクレアーゼ制限切断で得られたDNAセグメントは、3', 50

5 - エキソヌクレアーゼ分解活性で突出 一本鎖末端を除去して、窪み3 末端を重合活性でふさぐ酵素、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼまたはE.coli DNAポリメラーゼIで処理される。したがって、これら活性の組合せで平滑末端DNAセグメントを得る。次いで、平滑末端セグメントは、バクテリオファージT4 DNAリガーゼのような平滑末端DNA分子の連結を触媒しうる酵素の存在下で、モル大過剰のリンカー分子とインキュベートされる。そのため、反応の産物は末端にポリマーリンカー配列を有するDNAセグメントである。次いで、これらのDNAセグメントは適切な制限酵素で開裂され、そのDNAセグメントのものと適合しうる末端を生じる酵素で開裂された発現ベクターへ連結される。

【0139】

10

様々な制限エンドヌクレアーゼ部位を含有する合成リンカーが、いくつかの市販元から商業的に入手しうる。

【0140】

本発明に従いDNAを修飾する望ましい手法は、例えばHA変種が作製されるのであれば、Saiki et al.(1988)Science 239,487-491で開示されたようなポリメラーゼ連鎖反応を用いることである。この方法において、酵素的に増幅されるDNAは、増幅DNA中へ自ら入り込む2種の特異的オリゴヌクレオチドプライマーにより隣接される。特異的プライマーは、当業界で公知の方法を用いて、発現ベクター中へのクローニングに用いる制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含有してもよい。

【0141】

20

アルブミン融合タンパク質を発現させるための宿主として本発明の実施に際して有用と考えられる酵母の例示属は、*Pichia* (以前は*Hansenula*として分類されていた)、*Saccharomyces*、*Kluyveromyces*、*Aspergillus*、*Candida*、*Torulopsis*、*Torulaspora*、*Schizosaccharomyces*、*Citeromyces*、*Pachysolen*、*Zygosaccharomyces*、*Debaromyces*、*Trichoderma*、*Cephalosporium*、*Humicola*、*Mucor*、*Neurospora*、*Yarrowia*、*Metschnikowia*、*Rhodospiridium*、*Leucosporidium*、*Botryosacculus*、*Sporidiobolus*、*Endomycopsis*などである。属には、*Saccharomyces*、*Schizosaccharomyces*、*Kluyveromyces*、*Pichia*および*Torulaspora*からなる群より選択されるものを含む。*Saccharomyces* spp.の例は*S.cerevisiae*、*S.italicus*および*S.rouxii*である。他の種類の例およびそれらの形質転換方法は、参考のためここに組み込まれる、米国仮出願第60/355,547およびWO01/79480 (p 30 .97-98)で記載されている。

【0142】

*S.cerevisiae*の形質転換方法はEP251744、EP258067およびWO90/01063で一般的に記載されており、それらすべてが参考のためここに組み込まれる。

【0143】

*S.cerevisiae*用の適切なプロモーターには、PGK1遺伝子、GAL1またはGAL10遺伝子、CYC1、PHO5、TRP1、ADH1、ADH2、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、グルコキナーゼ、-接合因子フェロモン(接合因子フェロモン)の遺伝子に伴うもの、PRB1プロモーター、GUT2プロモーター、GPD1プロモーター、および他のプロモーターの5'調節領域の一部または上流活性化部位との5'調節領域の一部のハイブリッドを要するハイブリッドプロモーター(例えば、EP-A-258067のプロモーター)がある。

40

【0144】

*Schizosaccharomyces pombe*で使用上便利な調節プロモーターは、Maundrell(1990)J.Biol.Chem.265,10857-10864で記載されたようなnmt遺伝子からのチアミン抑制性プロモーター、およびHoffman & Winston(1990)Genetics 124,807-816で記載されたようなグルコース抑制性jbp1遺伝子プロモーターである。

【0145】

50

外来遺伝子の発現用にPichiaを形質転換する方法は、例えば、Cregg et al.(1993)および様々なPhillips特許(例えば、参考のためここに組み込まれるUS 4,857,467)で開示され、Pichia発現キットはInvitrogen BV, Leek, NetherlandsおよびInvitrogen Corp., San Diego, Californiaから市販されている。適切なプロモーターにはAOX1およびAOX2がある。Gleeson et al.(1986)J.Gen.Microbiol.132,3459-3465はHansenulaベクターおよび形質転換の情報を含み、適切なプロモーターはMOX1およびFMD1である; EP 3 619 91、Fleer et al.(1991)およびRhone-Poulenc Rorerによる他の文献では、Kluyveromyces spp.で外来タンパク質を発現する方法を開示している。

【0146】

転写終結シグナルは、転写終結およびポリアデニル化用の適正なシグナルを含む真核生物遺伝子の3'隣接配列でもよい。適切な3'隣接配列は、例えば、用いられた発現コントロール配列へ自然に連結された遺伝子のものでもよく、即ちプロモーターに相当してもよい。一方、それらは異なってもよく、その際にはS.cerevisiae ADH1遺伝子の終結シグナルが必要に応じて用いられる。

【0147】

望ましいアルブミン融合タンパク質は分泌リーダー配列と一緒に初めは発現されることがあり、その配列は選択された酵母で有効ないかなるリーダーでもよい。S.cerevisiaeで有用なリーダーには、接合因子ポリペプチド(MF-1)からのもの、およびEP-A-3 873 19のハイブリッドリーダーがある。このようなリーダー(またはシグナル)は、成熟アルブミンが周辺培地中へ放出される前に、酵母により開裂される。別のこのようなリーダーには、JP 62-096086(911036516として許可)で開示されたS.cerevisiaeインベルターゼ(SUC2)、酸ホスファターゼ(PHO5)、MF-1,0グルカナーゼのプレ配列(BGL2)およびキラ毒素; S.diastaticusグルコアミラーゼII; S.carlsbergensis - ガラクトシダーゼ(MEL1); K.lactisキラ毒素; およびCandidaグルコアミラーゼのものがある。

【0148】

アルブミン融合タンパク質の組換えおよび合成産生の別法

本発明は、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、これらのポリヌクレオチドを含有するベクター、宿主細胞および生物を含む。本発明は、合成および組換え技術により、本発明のアルブミン融合タンパク質を産生する方法も含む。ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞および生物は、当業界で公知の方法により単離および精製される。

【0149】

本発明で有用なベクターは、例えば、ファージ、プラスミド、コスミド、ミニ染色体、ウイルスまたはレトロウイルスベクターである。

【0150】

本発明のポリヌクレオチドをクローニングおよび/または発現するために利用しうるベクターは、そのポリヌクレオチドの複製および/または発現が望まれる宿主細胞でポリヌクレオチドを複製および/または発現しうるベクターである。一般的に、ポリヌクレオチドおよび/またはベクターは、哺乳動物細胞(例えばヒト(例えばHeLa)、サル(例えばCos)、ウサギ(例えばウサギ網状赤血球)、ラット、ハムスター(例えば、CHO、NSOおよびベビーハムスター腎臓細胞)またはマウス細胞(例えばL細胞))、植物細胞、酵母細胞、昆虫細胞または細菌細胞(例えばE.coli)を含めて、真核または原核いずれの細胞でも利用しうる。例えば、様々なタイプの宿主細胞向けに適したベクターの例に関して、F.Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience(1992) and Sambrook et al.(1989)参照。しかしながら、複製欠失のあるレトロウイルスベクターが用いられた場合、ウイルス増殖は相補的宿主細胞のみで通常生じることに留意しなければならない。

【0151】

これらのポリヌクレオチドを含有した宿主細胞は、例えば医薬、診断試薬、ワクチンお

10

20

30

40

50

よび治療剤に有用なタンパク質を大量に発現させるために用いる。タンパク質は、当業界で知られたまたはここで記載された方法により、単離および精製される。

【0152】

本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、宿主で増殖用の選択マーカーを含有したベクターへ結合させてもよい。通常、プラスミドベクターは、沈降物、例えばリン酸カルシウム沈降物、または荷電脂質との複合物中に導入される。ベクターがウイルスであるならば、それは適切なパッケージング細胞系を用いてインビトロでパッケージングされ、次いで宿主細胞中へ導入される。

【0153】

ポリヌクレオチドインサートは、ポリヌクレオチドが発現される宿主細胞と適合しうる適切なプロモーターへ作働可能に連結すべきである。そのプロモーターは強プロモーターおよび/または誘導プロモーターである。プロモーターの例として、いくつか挙げると、ファージラムダP_Lプロモーター、*E. coli* lac、trp、phoAおよびtacプロモーター、SV40初期および後期プロモーター、およびレトロウイルスLTRのプロモーターがある。他の適切なプロモーターも当業者にはわかるであろう。発現構築物は、転写開始、終結のための部位、および転写領域には、翻訳のためのリボソーム結合部位を更に含有する。その構築物により発現される転写物のコード部分は、翻訳されるポリペプチドの始めに翻訳開始コドン、およびその終わりに終止コドン(UAA、UGAまたはUAG)を適切な部位で含有しうる。

【0154】

示されたように、発現ベクターは少なくとも1つの選択マーカーを含有しうる。このようなマーカーには、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、G418、グルタミンシンターゼ、または真核細胞培養用のネオマイシン耐性、および*E. coli*および他の細菌で培養向けのテトラサイクリン、カナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子がある。適切な宿主の代表例には、細菌細胞、例えば*E. coli*、*Streptomyces*および*Salmonella typhimurium*細胞；真菌細胞、例えば酵母細胞(例えば、*Saccharomyces cerevisiae*または*Pichia pastoris*(ATCC受入No. 201178))；昆虫細胞、例えば*Drosophila* S2および*Spodoptera Sf* 9細胞；動物細胞、例えばCHO、COS、NSO、293およびBowesメラノーマ細胞；および植物細胞があるが、それらに限定されない。上記宿主細胞用に適した培地および条件は、当業界で公知である。

【0155】

一つの態様において、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、原核または真核細胞の特定分画へ本発明のタンパク質を局在化させる、および/または原核または真核細胞から本発明のタンパク質を分泌させる、シグナル配列へ融合させてもよい。例えば、*E. coli*の場合では、タンパク質の発現を周辺腔へ向けたいと思うことがある。細菌の周辺腔へポリペプチドの発現を向けるために、本発明のアルブミン融合タンパク質が融合されるシグナル配列またはタンパク質(またはその断片)の例には、pelBシグナル配列、マルトース結合タンパク質(MBP)シグナル配列、MBP、ompAシグナル配列、ペリプラズム*E. coli*熱不安定エンテロトキシンBサブユニットのシグナル配列、およびアルカリホスファターゼのシグナル配列があるが、それらに限定されない。いくつかのベクターが、New England Biolabs市販のpMALシリーズのベクター(特に、pMAL-pシリーズ)のように、タンパク質の局在化を指示する融合タンパク質の構築向けに市販されている。特別な態様において、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、グラム陰性菌でこのようなポリペプチドの発現および精製の効力を高めるために、pelBペクチン酸リアーゼシグナル配列へ融合される。米国特許第5,576,195および5,846,818参照；その内容は参考のためそれら全体でここに組み込まれる。

【0156】

哺乳動物細胞で分泌を指示するために本発明のアルブミン融合タンパク質へ融合されるシグナルペプチドの例には、MPIF-1シグナル配列(例えば、GenBank受入No. A

10

20

30

40

50

A B 5 1 1 3 4 のアミノ酸 1 - 2 1)、スタンニオカルシンシグナル配列 (M L Q N S A V L L L L V I S A S A、SEQ ID NO:) およびコンセンサスシグナル配列 (M P T W A W W L F L V L L L A L W A P A R G、SEQ ID NO:) があるが、それらに限定されない。バキュロウイルス発現系と共に用いる適切なシグナル配列は、g p 6 7 シグナル配列 (例えば、GenBank受入 No. A A A 7 2 7 5 9 のアミノ酸 1 - 1 9) である。

【 0 1 5 7 】

選択マーカーとしてグルタミンシンターゼ (G S) または D H F R を用いたベクターは、各々薬物メチオニンスルホキシミンまたはメソトレキセートの存在下で増幅させる。グルタミンシンターゼベースベクターの利点は、グルタミンシンターゼ陰性の細胞系 (例えば、ネズミミエローマ細胞系 N S O) の利用可能性である。グルタミンシンターゼ発現系は、追加インヒビターを入れて内在遺伝子の機能を妨げることにより、グルタミンシンターゼ発現細胞 (例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞) でも機能しうる。グルタミンシンターゼ発現系およびその成分は P C T 文献: W O 8 7 / 0 4 4 6 2、W O 8 6 / 0 5 8 0 7、W O 8 9 / 0 1 0 3 6、W O 8 9 / 1 0 4 0 4 および W O 9 1 / 0 6 6 5 7 で詳述されており、これらは参考のためそれら全体でここに組み込まれる。加えて、グルタミンシンターゼ発現ベクターは Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH) から得られる。ネズミミエローマ細胞で G S 発現系を用いたモノクローナル抗体の発現および産生は、参考のためここに組み込まれる Bebbington et al., Bio/technology 10:169(1992) および Biblia and Robinson Biotechnol. Prog. 11:1(1995) で記載されている。

【 0 1 5 8 】

本発明は、ベクター構築物を含有した宿主細胞、例えばここで記載されているものにも関し、当業界で公知の技術を用いて 1 以上の異種コントロール領域 (例えば、プロモーターおよび/またはエンハンサー) と作働可能に結合された本発明のヌクレオチド配列を含有する宿主細胞を更に包含する。宿主細胞は哺乳動物細胞 (例えば、ヒト由来細胞) のような高等真核細胞でもまたは酵母細胞のような下等真核細胞でもよく、あるいは宿主細胞は細菌細胞のような原核細胞でもよい。挿入遺伝子配列の発現を調節するか、または望ましい特別な方式で遺伝子産物を修飾およびプロセッシングする宿主株が選択される。あるプロモーターからの発現はあるインデューサーの存在下で高められる; こうして遺伝子工学ポリペプチドの発現が制御しうる。更に、異なる宿主細胞はタンパク質の翻訳および翻訳後プロセッシングおよび修飾 (例えば、リン酸化、開裂) について特徴および特別なメカニズムを有している。発現される外来タンパク質の望ましい修飾およびプロセッシングを保証するために、適切な細胞系が選択される。

【 0 1 5 9 】

本発明の核酸および核酸構築物の宿主細胞中への導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、D E A E - デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、感染または他の方法により行える。このような方法は多くの標準実験マニュアル、例えば Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology(1986) で記載されている。本発明のポリペプチドは組換えベクターを欠く宿主細胞により実際に発現させる、と特に考えられている。

【 0 1 6 0 】

ここで記載されたベクター構築物を含有した宿主細胞を包含することに加えて、本発明は、内在遺伝物質を欠失または置き換える (例えば、治療用タンパク質に相当するコード配列は、治療用タンパク質に相当するアルブミン融合タンパク質で置き換えてもよい) および/または遺伝物質を含有する (例えば、例えば治療用タンパク質に相当する本発明のアルブミン融合タンパク質のような異種ポリヌクレオチド配列が含有させる) ように工学処理された脊椎動物源、特に哺乳動物源の一次、二次および不死化宿主細胞も包含する。内在ポリヌクレオチドと作働可能に結合された遺伝物質は、内在ポリヌクレオチドを活性化、変化および/または増幅させる。

【 0 1 6 1 】

加えて、当業界で公知の技術は、相同的組換え (例えば、1997年6月24日付で発

10

20

30

40

50

行された米国特許第 5,641,670 ; 国際公開第 WO 96/29411 ; 国際公開第 WO 94/12650 ; Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935(1989) ; Zijlstra et al., Nature 342:435-438(1989) 参照 ; それら各々の開示は参考のためそれら全体でここに組み込まれる) により、治療用タンパク質をコードする内在ポリヌクレオチド配列と、異種ポリヌクレオチド (例えば、アルブミンタンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはその断片もしくは変種) および / または異種コントロール領域 (例えば、プロモーターおよび / またはエンハンサー) を作動可能に結合させるために用いてもよい。

【0162】

有利には、本発明のアルブミン融合タンパク質は、硫酸アンモニウムまたはエタノール 10
沈降、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、疎水性電荷相互作用クロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた周知の方法により、組換え細胞培養物から回収および精製しうる。一部の態様では、高性能液体クロマトグラフィー (「HPLC」) が精製に用いられる。一部の場合には、治療用タンパク質は低い溶解性を有するか、あるいは低もしくは高 pH のみでまたは高もしくは低塩のみに可溶性である。HSA への治療用タンパク質の融合は、治療用タンパク質の溶解特徴を改善するようである。

【0163】

一部の態様において、本発明のアルブミン融合タンパク質は上記の 1 以上のクロマトグ 20
ラフィー法を用いて精製される。他の態様では、本発明のアルブミン融合タンパク質は次のクロマトグラフィーカラム、Qセファロース FF カラム、SPセファロース FF カラム、Qセファロース高性能カラム、ブルーセファロース FF カラム、ブルーカラム、フェニルセファロース FF カラム、DEAEセファロース FF またはメチルカラムのうち 1 以上を用いて精製される。

【0164】

加えて、本発明のアルブミン融合タンパク質は、参考のためそれ全体でここに組み込ま 30
れる国際公開第 WO 00/44772 で記載されたプロセスを用いて精製してもよい。当業者であれば、本発明のアルブミン融合タンパク質の精製で使用するのために、ここで記載されたプロセスを容易に改変しうるであろう。

【0165】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、例えば細菌、酵母、高等植物、昆虫および哺乳 40
動物細胞を含めた原核または真核宿主から組換え技術により産生された産物より回収しうる。組換え産生操作で用いられた宿主に応じて、本発明のポリペプチドはグリコシル化されても、またはグリコシル化されなくてもよい。加えて、本発明のアルブミン融合タンパク質は、一部の場合には宿主媒介プロセスの結果として、開始修飾メチオニン残基も含有してよい。こうすると、翻訳開始コドンによりコードされた N 末端メチオニンが、すべての真核細胞で翻訳後にタンパク質から高効力で通常除去されることは、当業界で周知である。ほとんどのタンパク質の N 末端メチオニンはほとんどの原核細胞で効率的に除去されるが、一部のタンパク質の場合には、N 末端メチオニンが共有結合されたアミノ酸の性質 40
に応じて、この原核除去プロセスは非効率的である。

【0166】

本発明のアルブミン融合タンパク質、および治療用タンパク質またはその断片もしくは 50
変種と結合する抗体は、マーカー配列、例えば精製を促すためのペプチドへ融合させてもよい。一つの態様において、マーカーアミノ酸配列はヘキサヒスチジンペプチド、例えば pQE ベクターでもたらされるタグ (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311) であり、特にその多くが市販されている。例えば Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824(1989) で記載されているように、ヘキサヒスチジンは融合タンパク質の精製に便宜をもたらす。精製に有用な他のペプチドタグには、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質から誘導されるエピトープに相当する「HA」タグ (Wilson et al., Cell 37:

767(1984)) および「F L A G」タグがあるが、それらに限定されない。

【0167】

更に、本発明のアルブミン融合タンパク質は、治療部分、例えば、細胞毒素、例えば細胞静止または細胞致死剤、治療剤または放射性金属イオン、例えば ^{213}Bi のような放出体へ接合してもよい。このような剤の例は、参考のためここに組み込まれる、米国仮出願第60/355,547およびWO 01/79480 (p. 107)で記載されている。

【0168】

アルブミン融合タンパク質は、本発明のアルブミン融合タンパク質により結合されている、それと結合または会合するポリペプチドのイムノアッセイまたは精製に特に有用な固形担体へ付着させてもよい。このような固形担体には、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリビニルクロリドまたはポリプロピレンがあるが、それらに限定されない。

10

【0169】

ポリペプチドの溶解性、安定性および循環時間の向上、または免疫原性の低下のような追加の利点を発揮しうる、本発明のアルブミン融合タンパク質の化学的修飾誘導体も、本発明により提供される(米国特許第4,179,337参照)。ポリエチレングリコールの使用を伴う例は、参考のためここに組み込まれる、WO 01/79480 (p. 109-111)で記載されている。

【0170】

本発明のアルブミン融合タンパク質の存在および量は、当業界で知られている周知のイムノアッセイ、E L I S Aを用いて調べてもよい。

20

【0171】

ポリペプチドの使用

ここで特定されたポリペプチドの各々は様々な手法で用いうる。以下の記載は例示とみなすべきであり、公知の技術を利用している。

本発明のアルブミン融合タンパク質は、哺乳動物、好ましくはヒトで様々な障害の治療、予防および/または予後に有用である。このような障害には表4の「生物活性」欄に記載されたものがあるが、それらに限定されない。例えば、本発明のアルブミン融合タンパク質は、セリンプロテアーゼ、プラスミン、ヒト好中球エラスターゼおよび/またはカリクレインのインヒビターとして用いうる。

30

【0172】

アルブミン融合タンパク質は、生物学的サンプルポリペプチドのレベルをアッセイするために用いうる。例えば、本発明の放射線標識アルブミン融合タンパク質は身体におけるポリペプチドの画像診断に用いうる。アッセイの例は、例えば、参考のためここに組み込まれる米国仮出願第60/355,547およびWO 01/79480 (p. 112-122)で記載されており、当業界で周知である。タンパク質のインビボ画像診断用のラベルまたはマーカには、X-ラジオグラフィー、核磁気共鳴(NMR)、電子スピン緩和(ESR)、陽電子放射断層撮影法(PET)またはコンピューター断層撮影法(CT)により検出しうるものがあるが、それらに限定されない。X-ラジオグラフィーの場合、適切なラベルには、検出可能な放射線を放射するが、被験者に過度に有害でない、バリウムまたはセシウムのような放射性同位元素がある。NMRおよびESRに適したマーカには、本発明のアルブミン融合タンパク質を発現する細胞系へ入れられる栄養素のラベリングによりアルブミン融合タンパク質中へ取り込まれる、重水素のような、検出可能な特徴的スピンをもつものがある。

40

【0173】

適切な検出可能画像化部分、例えば放射性同位元素、例えば ^{131}I 、 ^{112}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、炭素(^{14}C)、イオウ(^{35}S)、トリチウム(^3H)、インジウム($^{115\text{m}}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、テクネチウム(^{99}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、タリウム(^{201}Tl)、ガリウ

50

ム (^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、パラジウム (^{103}Pd)、モリブデン (^{99}Mo)、キセノン (^{133}Xe)、フッ素 (^{18}F 、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru)、放射線不透過性物質、または核磁気共鳴により検出する物質で標識されたアルブミン融合タンパク質は、免疫系障害について試験される哺乳動物へ（例えば、非経口、皮下または腹腔内）導入される。被験者のサイズおよび用いられる画像化システムが診断画像を作るために必要な画像化部分の量を決定する、と当業界では理解されるであろう。放射性同位元素部分について、ヒト被験者の場合では、投入される放射線の量が $^{99\text{m}}\text{Tc}$ で通常約 5 ~ 20 ミリキュリーである。その際に、標識されたアルブミン融合タンパク質は、1 以上のレセプター、リガンドまたは基質（本発明のアルブミン融合タンパク質を作製するために用いられる治療用タンパク質のものに相当する）が位置する体内部位（例えば、臓器、細胞、細胞外空間またはマトリックス）で、優先的に蓄積してくる。一方、アルブミン融合タンパク質が治療用抗体の少なくとも 1 つの断片または変種を含んでなる場合に、標識されたアルブミン融合タンパク質は、（本発明のアルブミン融合タンパク質を作製するために用いられる）治療用抗体により結合されるものに相当するポリペプチド/エピトープが位置する体内部位（例えば、臓器、細胞、細胞外空間またはマトリックス）で、優先的に蓄積してくる。インビボ腫瘍画像診断は S.W.Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments" (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W.Burchiel and B.A.Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)) で記載されている。そこで記載されたプロトコールは、本発明のアルブミン融合タンパク質向けに、当業者により簡単に修正しうる。

10

20

【0174】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、宿主細胞の形質転換を評価する手法として、または生物学的サンプルにおいて、組換え細胞からの治療用タンパク質、アルブミンタンパク質および/または本発明のアルブミン融合タンパク質のタンパク質発現を測定するために用いられる抗体を産生するために用いることもできる。更に、本発明のアルブミン融合タンパク質は、ここで記載された生物活性を試験するために用いうる。

【0175】

トランスジェニック生物

本発明のアルブミン融合タンパク質を発現するトランスジェニック生物も本発明に含まれる。トランスジェニック生物は、組換え、外来またはクローン化遺伝物質が移入された遺伝子修飾生物である。このような遺伝物質はトランスジーンと称されることが多い。トランスジーンは、コードされたタンパク質の最良発現および分泌に必要なかもしれない、1 以上の転写調節配列および他の核酸配列、例えばイントロンを含有しうる。トランスジーンは、生物からの、または生物により産生された産物からの、例えば生物の乳、血液、尿、卵、毛または種子からの回収を促すやり方で、コードタンパク質の発現を指示するようにデザインしてもよい。トランスジーンは、標的動物の種と同様の種またはそれとは異なる種のゲノムから誘導される核酸配列からなる。トランスジーンは、特定の核酸配列が通常みられないゲノムの座に、またはトランスジーンは、特定の核酸配列が通常みられないゲノムの座に、またはトランスジーンは、特定の核酸配列が通常みられないゲノムの座に、またはトランスジーンは、特定の核酸配列が通常みられないゲノムの座に組み込まれる。

30

40

【0176】

「生殖細胞系トランスジェニック生物」という用語は、遺伝子改変または遺伝情報が生殖系細胞中へ導入されることで、遺伝情報を子孫へ伝えうるトランスジェニック生物の能力を付与した、トランスジェニック生物に関する。このような子孫がその改変または遺伝情報の一部または全部を実際に有しているならば、それらもトランスジェニック生物である。その改変または遺伝情報は、レシピエントが属する生物の種に外来でも、具体的な個別のレシピエントのみに外来であっても、またはレシピエントにより既に保有された遺伝情報でもよい。最後の場合に、改変または導入された遺伝子は、在来遺伝子とは別に発現されることもある。

50

【0177】

トランスジェニック生物は、トランスジェニックのヒト、動物または植物である。トランスジェニックは、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、胚幹細胞での遺伝子標的化と組換えウイルスおよびレトロウイルス感染を含めた様々な異なる方法により作製しうる（例えば、米国特許第4,736,866；米国特許第5,602,307；Mullins et al.(1993)Hypertension 22(4):630-633；Brenin et al.(1997)Surg.Oncol.6(2)99-111；Tuan(ed.),Recombinant Gene Expression Protocols,Methods in Molecular Biology No.62,Humana Press(1997)参照）。組換えコンピテン ト哺乳動物細胞中への核酸断片の導入方法は、マルチ核酸分子の同時形質転換を行わせる、どのような方法によるものでもよい。トランスジェニック動物を作製するための詳細な操作は、米国特許第5,489,743および米国特許第5,602,307の開示を含めて、当業者に容易に利用しうる。追加の情報は、参考のためここに組み込まれる、米国仮出願第60/355,547およびWO 01/79480（p.151-162）で記載されている。

10

【0178】

遺伝子療法

本発明のアルブミン融合タンパク質をコードする構築物は、治療有効量のアルブミン融合タンパク質を送達する遺伝子療法プロトコールの一部として用いうる。細胞中への核酸のインビボ導入のための1つのアプローチは、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードする核酸を含有したウイルスベクターの使用による。ウイルスベクターによる細胞の感染は、標的細胞の大部分がその核酸を受け取れる、という利点を有している。加えて、ウイルスベクター内でコードされた分子は、例えばウイルスベクターに含有されたcDNAにより、ウイルスベクター核酸を取り込んだ細胞で効率的に発現される。望ましいアルブミン融合タンパク質の血漿半減期延長は、潜在的な低発現レベルすら補えるかもしれない。

20

【0179】

レトロウイルスベクターおよびアデノ関連ウイルスベクターは、インビボでアルブミン融合タンパク質をコードする外来核酸分子の移入用の組換え遺伝子送達系として用いうる。これらのベクターは細胞中への核酸の効率的送達を行い、移入された核酸は宿主の染色体DNA中へ安定的に組み込まれる。このようなベクターの例、それらを用いる方法、それらの利点および非ウイルス送達法は、参考のためここに組み込まれる、米国仮出願第60/355,547およびWO 01/79480（p.151-153）で詳細に記載されている。

30

【0180】

本発明のアルブミン融合タンパク質をコードする遺伝子用の遺伝子送達系は、いくつかの方法で患者へ導入される。例えば、遺伝子送達系の医薬製剤は、例えば静脈注射により全身導入でき、標的細胞へのタンパク質の特異的導入は、遺伝子送達ビヒクルにより得られるトランスフェクションの特異性、レセプター遺伝子の転写調節配列制御発現による細胞タイプまたは組織タイプ発現、またはそれらの組合せから優先的に生じる。他の態様において、組換え遺伝子の初期送達は更に制限されており、動物への導入は全く局在化されている。例えば、遺伝子送達ビヒクルはカテーテル（米国特許5,328,470）または定位注射（例えば、Chen et al.(1994)PNAS 91:3054-3057）により導入しうる。遺伝子療法構築物の医薬製剤は許容される希釈物中の遺伝子送達系から本質的になるか、または遺伝子送達ビヒクルが埋め込まれた徐放性マトリックスを含むことができる。アルブミン融合タンパク質が組換え細胞、例えばレトロウイルスベクターから完全なままで産生される場合は、医薬製剤はアルブミン融合タンパク質を産生する1以上の細胞を含むことができる。別な遺伝子療法は、参考のためここに組み込まれる、米国仮出願第60/355,547およびWO 01/79480（p.153-162）で記載されている。

40

【0181】

医薬または治療組成物

50

本発明のアルブミン融合タンパク質またはその処方物は、非経口（例えば、皮下または筋肉内）注射または静脈内注入を含めた、いずれかの常法により投与される。治療は所定の期間にわたり1回の投薬または複数回の投薬からなる。更に、1回分の用量または複数回分の用量が、アルブミンへ融合されていない治療用タンパク質の場合よりも少ない回数で投与される。

【0182】

本発明のアルブミン融合タンパク質は単独で投与することが可能であるが、1種以上の許容される担体と一緒に医薬処方物としてそれを提供することが望ましい。担体は、アルブミン融合タンパク質と適合できて、そのレシピエントに有害でないという意味で、「許容しうる」ものでなければならない。典型的には、担体は無菌で無発熱物質の水または塩水である。本発明のアルブミン融合タンパク質は、溶液中での貯蔵期間延長のおかげで、無菌無発熱物質水、塩水または他の等張液のような水性担体中での処方に特によく合う。例えば、本発明の医薬組成物は、例えば分配される数週間、数ヶ月間前またはそれ以上前に、予め水性形で適宜に処方される。

10

【0183】

アルブミン融合タンパク質を含有した処方物は、水性処方物中でのアルブミン融合タンパク質の貯蔵期間延長を考慮にいれて製造される。上記のように、これら治療用タンパク質の多くの貯蔵期間はHAへの融合後に著しく増加または長期化する。

【0184】

エアゾール投与が適する場合に、本発明のアルブミン融合タンパク質は標準操作を用いてエアゾールとして処方しうる。「エアゾール」という用語は、細気管支または鼻腔中へ吸入されうる、本発明のアルブミン融合タンパク質のガス入り懸濁相を含有している。特に、エアゾールは、計量吸入器もしくはネブライザー、またはミストスプレー器で生じさせるように、本発明のアルブミン融合タンパク質の液滴のガス入り懸濁物を含有している。エアゾールは、例えば吸入器から吸入により送達される、空気または他のキャリアガス中に懸濁された本発明の化合物の乾燥粉末組成物も含有している。

20

【0185】

処方物は便宜上単位剤形で供与し、製剤業界で周知の方法により製造してもよい。このような方法は、1種以上の補助成分からなる担体とアルブミン融合タンパク質とを混合する工程を含んでいる。一般的に、処方物は、液体担体、微細固形担体または双方と活性成分を均一かつ完全に混合し、必要であれば、製品に成形することにより製造される。

30

【0186】

非経口投与に適した処方物には、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤および処方物を所定のレシピエントに適合させる溶質を含有した水性および非水性無菌注射液；懸濁剤および増粘剤を含有した水性および非水性無菌懸濁液がある。処方物は単位用量またはマルチ用量容器、例えば密封アンプル、バイアルまたはシリンジで供与され、フリーズドライ（凍結乾燥）条件下で貯蔵されて、使用直前に無菌液体担体、例えば注射用水の添加のみを要する。即時注射溶液および懸濁液は無菌粉末から調製される。投薬処方物は、血清半減期の延長が本発明のアルブミン融合タンパク質の多くにより示されるとすれば、治療用タンパク質の非融合標準処方物と比較して低いモル濃度または低い用量で、治療用タンパク質部分を含有しうる。

40

【0187】

例として、本発明のアルブミン融合タンパク質が1以上の治療用タンパク質領域を含んでなるとき、投薬剤形は、治療用タンパク質そのものの場合と比べたアルブミン融合タンパク質の血清半減期および貯蔵期間の長期化を考慮しながら、治療用タンパク質の効力と比較したアルブミン融合タンパク質の効力に基づき計算できる。例えば、全鎖長治療用タンパク質に融合された全鎖長HAからなるアルブミン融合タンパク質において、相当用量が単位の関係で剤の重量増加に繋がるが、投与回数は減少しうる。

【0188】

本発明の処方物または組成物は、アルブミン融合タンパク質成分の貯蔵期間延長に関す

50

る説明書またはパッケージインサートと一緒にパッケージングされるか、またはそれと共にキットへ入れられる。例えば、このような説明書またはパッケージインサートは、本発明のアルブミン融合タンパク質の貯蔵期間延長または長期化を考慮にいた、時間、温度および光のような推奨貯蔵条件を扱う。このような説明書またはパッケージインサートは、管理された病院、診療所またはオフィス条件の外部、野外で使用を要することもある処方物での貯蔵の容易性のような、本発明のアルブミン融合タンパク質の特別な利点についても扱える。上記のように、本発明の処方物は水性形でもよく、治療活性の過大な喪失なしに、理想とはいかない環境下でも貯蔵しうる。

【0189】

本発明は、製薬上許容される担体中で本発明のアルブミン融合タンパク質または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド（「アルブミン融合ポリヌクレオチド」）の有効量の対象者への投与による、疾患または障害（例えば、ここで開示された疾患または障害のうち1以上）の治療および/または予防の方法も提供する。

10

【0190】

投与される本発明のアルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドの有効量は、当業者に周知の方法を用いた、表4のレファレンスに記載されたようなルーチンのインビトロおよびインビボ研究からのデータを用いることを含めて、生物学的半減期、バイオアベイラビリティおよび毒性のようなパラメーターを扱う当業者に周知の操作から決定しうる。

【0191】

アルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドは、個別患者の臨床条件（特に、アルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチド単独での治療の副作用）、送達の部位、投与の方法、投与のスケジュール、および従事者に公知の他のファクターを考慮にいて、良好な医療実務に従い処方および投与される。こうして、ここでの目的に合わせた「有効量」がこのような考慮により定められる。

20

【0192】

例えば、送達される物質の有効量の決定は、例えば、物質の化学構造および生物活性、動物の年齢および体重、治療を要する正確な症状およびその重篤度、および投与の経路を含めたいくつかのファクターに依存しうる。治療の頻度は、1回当たりで投与されるポリヌクレオチド構築物の量、対象者の健康および病歴のようないくつかのファクターに依存する。正確な量、投与の回数および投与のタイミングは、担当医または獣医師により決定される。

30

【0193】

本発明のアルブミン融合タンパク質およびポリヌクレオチドは、あらゆる動物、好ましくは哺乳動物および鳥へ投与しうる。好ましい哺乳動物には、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ウマおよびブタがあるが、ヒトが特に好ましい。

【0194】

一般論として、本発明のアルブミン融合タンパク質は、非融合治療用タンパク質よりも少ない用量で、または少ない頻度で投与される。治療有効量とは、患者でインビボHIV力価の低下、症状の改善、病状の安定化または生存期間の延長、または生活の質の改善をもたらすために十分な化合物の量に関する。

40

【0195】

アルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドは、経口、経直腸、非経口、槽内、腔内、腹腔内、局所（粉末、軟膏、ゲル、滴剤または経皮パッチとして）、経口腔で、または経口もしくは経鼻スプレーとして投与しうる。「製薬上許容される担体」とは、無毒性固形、半固形または液体フィラー、希釈物、封入物質または処方補助物のあらゆるものに関する。ここで用いられている「非経口」という用語は、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下および関節腔内注射および注入を含めた投与様式に関する。

【0196】

本発明のアルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドは、参考のためこ

50

ここに組み込まれる米国仮出願第 60 / 355 , 547 および WO 01 / 79480 (p . 129 - 130) で記載されたような持続的放出系でも、適切に投与される。

【0197】

非経口投与の場合、一つの態様において、アルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドは、製薬上許容される担体、即ち用いられる用量および濃度でレシピエントに無毒性であって処方物の他成分と適合しうるものと、単位注射剤形（溶液、懸濁液または乳濁液）で、望ましい純度でそれを混合することにより、通常処方される。例えば、処方物は、治療剤に有害であることが知られた酸化剤および他の化合物を必要に応じて含有しない。

【0198】

本発明のアルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドは、単独で、または他の治療剤と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与しうるアルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチド剤には、化学療法剤、抗生物質、ステロイドおよび非ステロイド抗炎症剤、慣用的免疫療法剤、および/または、例えば、参考のためここに組み込まれる米国仮出願第 60 / 355 , 547 および WO 01 / 79480 (p . 132 - 151) で記載されたような治療剤があるが、それらに限定されない。組合せ剤は、協同して、例えば混合物として、別々に但し同時または併合して；または連続的に投与される。これには、組合せ剤が治療用混合物として一緒に投与される方式、更には、組合せ剤が別々に但し同時に、例えば同一個体へ別々な静脈系を介して投与される処置も含む。「組合せ」投与には、初回、次いで 2 回目に行われる化合物または剤の 1 種の別々な投与を更に含む。

【0199】

本発明で使用に適した医薬組成物には、活性成分がその所定目的を果たせる有効量で含有された組成物を含む。

【0200】

本発明は、本発明のアルブミン融合タンパク質を含んでなる医薬組成物の 1 種以上の諸成分で 1 以上の容器を満たした、製薬パックまたはキットも提供する。必要に応じて、医薬または生物学的製剤の製造、使用または販売を規制する政府機関により規定された告知書がこのような容器に付されており、その告知書はヒト投与用の製造、使用または販売について機関による承認を表示している。

【0201】

本発明のこの一般的記載から、当業者であれば、これまでの記載および以下の実施例を用いて、本発明で認められた改変を行いおよび利用して、請求項記載の方法を実施しうる、と考えられる。したがって、下記研究例は本発明の異なる態様を特に示しており、開示の残りを制限するとは決して解釈すべきでない。

【実施例】

【0202】

例 1 : N 末端および C 末端アルブミン - (G G S)₄ G G リンカークローニングベクターの構築

組換えアルブミン発現ベクター p D B 2 2 4 3 および p D B 2 2 4 4 は、特許出願 WO 00 / 44772 で以前に記載されている。組換えアルブミン発現ベクター p A Y E 6 4 5 および p A Y E 6 4 6 は、U K 特許出願 0 2 1 7 0 3 3 . 0 で以前に記載されている。アルブミンポリペプチドの C 末端で 1 4 アミノ酸ポリペプチドリナー N - G G S G G S G G S G G S G G - C ((G G S)₄ G G : 「N」および「C」はポリペプチド配列の向きを表わす) をコードする DNA 配列を導入し、次いで (G G S)₄ G G リンカーの C 末端にもう 1 つのポリペプチド鎖を挿入して、全体構造、アルブミン - (G G S)₄ G G - ポリペプチドの C 末端アルブミン融合体を作製するように、プラスミド p D B 2 2 4 3 を修飾した。同様に、アルブミンポリペプチドの N 末端で (G G S)₄ G G ポリペプチドリナーをコードする DNA 配列を導入し、次いで (G G S)₄ G G リンカーの N 末端にもう 1 つのポリペプチド鎖を挿入して、ポリペプチド - (G G S)₄ G G - アルブミンの全

10

20

30

40

50

体構造でN末端アルブミン融合体を作製するように、プラスミド p A Y E 6 4 5 を修飾した。

【 0 2 0 3 】

適切な転写プロモーターおよび転写ターミネーター配列を供与する酵母 P R B 1 プロモーターおよび酵母 A D H 1 ターミネーターを含有したプラスミド p D B 2 2 4 3 が、Sleep, D. et al. (1991) Bio/Technology 9, 183-187 および特許出願 W O 0 0 / 4 4 7 7 2 で記載されている。プラスミド p D B 2 2 4 3 を B a m H I で完全に切断し、窪み末端を T 4 D N A ポリメラーゼおよび d N T P で平滑末端化し、最後に再連結して、プラスミド p D B 2 5 6 6 を作製した。

【 0 2 0 4 】

2 本鎖合成オリゴヌクレオチドリンカー B s u 3 6 I / H i n d I I I リンカーを、合成オリゴヌクレオチド J H 0 3 3 A および J H 0 3 3 B をアニールすることにより合成した。

【 化 2 】

JH033A

5-TTAGGCTTAGGTGGTTCTGGTGGTTCGGTGGTTCTGGTGG
ATCCGGTGGTTAATA-3'

(SEQ ID NO:___)

JH033B

5'-AGCTTATTAACCAACCGGATCCACCAGAACCACCGGAACCA
CCAGAACCACCTAAGCC-3'

(SEQ ID NO:___)

【 0 2 0 5 】

アニールされた B s u 3 6 I / H i n d I I I リンカーを H i n d I I I / B s u 3 6 I 切断 p D B 2 5 6 6 へ連結して、C 末端に (G G S) ₄ G G ペプチドリンカーをもつアルブミンコード領域を含んでなるプラスミド p D B 2 5 7 5 X を作製した。

【 0 2 0 6 】

適切な転写プロモーターおよび転写ターミネーター配列を供与する酵母 P R B 1 プロモーターおよび酵母 A D H 1 ターミネーターを含有したプラスミド p A Y E 6 4 5 が、U K 特許出願 0 2 1 7 0 3 3 . 0 で記載されている。プラスミド p A Y E 6 4 5 を制限酵素 A f l I I で完全に切断し、制限酵素 H i n d I I I で部分的に切断し、3 側の酵母 P R B 1 プロモーターおよび r H A コード配列を含んでなる D N A 断片を単離した。特許出願 W O 0 0 / 4 4 7 7 2 で記載されたプラスミド p D B 2 2 4 1 を A f l I I / H i n d I I I で切断し、5 側の酵母 P R B 1 プロモーターおよび酵母 A D H 1 ターミネーターを含んでなる D N A 断片を単離した。次いで、p A Y E 6 4 5 からの A f l I I / H i n d I I I D N A 断片を A f l I I / H i n d I I I p D B 2 2 4 1 ベクター D N A 断片へクローニングして、プラスミド p D B 2 3 0 2 を作製した。プラスミド p D B 2 3 0 2 を P a c I / X h o I で完全に切断し、6 . 1 9 k b 断片を単離し、窪み末端を T 4 D N A ポリメラーゼおよび d N T P で平滑末端化し、再連結して、プラスミド p D B 2 4 6 5 を作製した。プラスミド p D B 2 4 6 5 を C l a I で直線化し、窪み末端を T 4 D N A ポリメラーゼおよび d N T P で平滑末端化し、再連結して、プラスミド p D B 2 5 3 3 を作製した。プラスミド p D B 2 5 3 3 を B l n I で直線化し、窪み末端を T 4 D N A ポリメラーゼおよび d N

TPで平滑末端化し、再連結して、プラスミドpDB2534を作製した。プラスミドpDB2534をBmgBI/BglIIで完全に切断し、6.96kb DNA断片を単離し、2種の2本鎖オリゴヌクレオチドリンカーのうち一方、即ちVC053/VC054およびVC057/VC058へ連結してプラスミドpDB2540を作製し、またはVC055/VC056およびVC057/VC058へ連結してプラスミドpDB2541を作製した。

【0207】

【化3】

VC053

5'-GATCTTTGGATAAAGAGAGACGCTCACAAGTCCGAAGTCGCTCACCGGT-3'

10

(SEQ ID NO:___)

VC054

5'-pCCTTGAACCGGTGAGCGACTTCGGACTTGTGAGCGTCTCTCTTATCCAAA-3'

(SEQ ID NO:___)

20

VC055

5'-GATCTTTGGATAAAGAGAGACGCTCACAAGTCCGAAGTCGCTCATCGAT-3'

(SEQ ID NO:___)

VC056

5'-pCCTTGAATCGATGAGCGACTTCGGACTTGTGAGCGTCTCTCTTATCCAAA-3'

30

(SEQ ID NO:___)

VC057

5'-pTCAAGGACCTAGGTGAGGAAAACCTCAAGGCTTTGGTCTTGATCGCTTTCGCTCAATACTTGCAACAATGTCCATTCGAAGATCAC-3'

(SEQ ID NO:___)

40

VC058

5'-GTGATCTTCGAATGGACATTGTTGCAAGTATTGAGCGAAAGCGATCAAGACC
AAAGCCTTGAAGTTTTCCTCACCTAGGT-3'

(SEQ ID NO:___)

【0208】

2本鎖合成オリゴヌクレオチドリンカーBglII/AgeIリンカーを、合成オリゴヌクレオチドJH035AおよびJH035Bをアニールすることにより合成した。

50

【化 4】

JH035A

5'-GATCTTTGGATAAGAGAGGTGGATCCGGTGGTTCCGGTGGTTCTGGTGGTTCCG
GTGGTGACGCTCACAAGTCCGAAGTCGCTCA-3'
(SEQ ID NO:___)

JH035B

5'-
CCGGTGAGCGACTTCGGACTTGTGAGCGTCACCACCGGAACCACCAGAACCACC
GGAACCACCGGATCCACCTCTCTTATCCAAA-3'
(SEQ ID NO:___)

10

【0209】

アニールされた B g l I I / A g e I リンカーを B g l I I / A g e I 切断 p D B 2 5 4 0
へ連結して、N 末端に (G G S)₄ G G ペプチドリンカーをもつアルブミンコード領域を
含んでなるプラスミド p D B 2 5 7 3 X を作製した。 20

【0210】

例 2 : 非融合 D P I - 1 4 の平衡阻害定数

D P I - 1 4 のアミノ酸配列はか下記のとおりである :

【化 5】

EAVREVCSEQAETGPCIAFFPRWYFDVTEGKCAPFFYGGCGGNRNNFDTEEYCMVCGSA

(SEQ ID NO:)。DNA 配列を逆翻訳のプロセスによりこのポリペプチド配列から誘
導した。D P I - 1 4 を Pichia で発現させ、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互
作用クロマトグラフィーおよび限外濾過を用いて発酵ブロス上澄から抽出した。ヒト好中
球エラスターゼ (H N E) の D P I - 1 4 阻害に関する平衡阻害定数 (K_i) は 15 ± 2
p M、[H N E] = 57 ± 7 p M であることがわかった。 K_i 測定は例 1 5 で記載された
方法を用いて行った。 30

【0211】

例 3 : N 末端および C 末端アルブミン - D P I - 1 4 融合体の構築

N 末端 D P I - 1 4 - (G G S)₄ G G - アルブミンまたは C 末端アルブミン - (G G
S)₄ G G - D P I - 1 4 融合体で適合するような D P I - 1 4 コード領域、アルブミン
コード領域またはリーダー配列間の架橋配列をコードする DNA 配列を 5 または 3 末
端で用意した。N 末端 B g l I I - B a m H I D P I - 1 4 c D N A (表 5) および C 末
端 B a m H I - H i n d I I I D P I - 1 4 c D N A (表 6) をオーバーラップオリゴヌ
クレオチドから構築した。 40

【0212】

例 4 : N 末端 D P I - 1 4 - (G G S)₄ G G - アルブミン発現プラスミドの構築

プラスミド p D B 2 5 7 3 X を B g l I I および B a m H I で完全に切断し、6 . 2 1 k
b DNA 断片を単離し、仔ウシ腸ホスファターゼで処理し、次いで 0 . 2 k b B g l I
I / B a m H I N 末端 D P I - 1 4 c D N A と連結して、p D B 2 6 6 6 を作製した。
N 末端 D P I - 1 4 - (G G S)₄ G G - アルブミン融合体の DNA およびアミノ酸配列
は表 7 および表 8 で各々示されている。適切な酵母ベクター配列を、E P - A - 2 8 6 4
2 4 で一般的に開示され、Sleep, D. et al. (1991) Bio/Technology 9, 183-187 で記載された 50

「崩壊」プラスミド pSAC35 により得た。NotI N末端 DPI-14-(GGSS)₄GG-rHA 発現カセットを pDB2666 から単離し、精製し、仔ウシ腸ホスファターゼで処理された NotI 切断 pSAC35 へ連結させて、2 種のプラスミドを作製した；第一 (pDB2679) は LEU2 と同じ発現方向で NotI 発現カセットを含有し、第二 (pDB2680) は LEU2 と反対の方向で NotI 発現カセットを含有していた。pDB2679 および pDB2680 は双方とも望ましい融合タンパク質の良いプロデューサーである。

【0213】

例 5： C 末端アルブミン-(GGSS)₄GG-DPI-14 発現プラスミドの構築

プラスミド pDB2575X を HindIII で部分的に切断し、次いで BamHI で完全に切断した。望ましい 6.55 kb DNA 断片を単離し、0.2 kb BamHI/HindIII C 末端 DPI-14 cDNA と連結して、pDB2648 を作製した。C 末端アルブミン-(GGSS)₄GG-DPI-14 融合体の DNA およびアミノ酸配列は表 9 および表 10 で各々示されている。適切な酵母ベクター配列を、EP-A-286424 で一般的に開示され、Sleep,D. et al. (1991) Bio/Technology 9, 183-187 で記載された「崩壊」プラスミド pSAC35 により得た。NotI C 末端アルブミン-(GGSS)₄GG-DPI-14 発現カセットを pDB2648 から単離し、精製し、仔ウシ腸ホスファターゼで処理された NotI 切断 pSAC35 へ連結させて、LEU2 と同じ発現方向で NotI 発現カセットを含有する pDB2651 を作製した。

【0214】

例 6： C 末端アルブミン-(GGSS)₄GG-DX-1000 発現プラスミドの構築

プラスミド pDB2575X を HindIII で部分的に切断し、次いで BamHI で完全に切断した。望ましい 6.55 kb DNA 断片を単離し、表 11 で示されているような 0.2 kb BamHI/HindIII C 末端 DX-1000 cDNA と連結して、pDB2648X-1000 を作製した。適切な酵母ベクター配列を、EP-A-286424 で一般的に開示され、Sleep,D. et al. (1991) Bio/Technology 9, 183-187 で記載された「崩壊」プラスミド pSAC35 により得た。NotI C 末端アルブミン-(GGSS)₄GG-DX-1000 発現カセットを pDB2648X-1000 から単離し、精製し、仔ウシ腸ホスファターゼで処理された NotI 切断 pSAC35 へ連結させて、LEU2 と同じ発現方向で NotI 発現カセットを含有する pDB2651X-1000 を作製した。

【0215】

例 7： N 末端および C 末端アルブミン-DX-890 融合体の構築

基本クローンの作製

DX-890 のアミノ酸配列は下記のとおりである：

【化 6】

EACNLPIVRGPCIAFFPRWAFDAVKGKCVLFPYGGCQGNNGNKFYSEKECREYCGVP

(SEQ ID NO:)。DNA 配列を逆翻訳のプロセスによりこのポリペプチド配列から誘導した。N 末端 DX-890-(GGSS)₄GG-アルブミンまたは C 末端アルブミン-(GGSS)₄GG-DX-890 融合体で適合するような DX-890 コード領域、アルブミンコード領域またはリーダー配列間の架橋配列をコードする DNA 配列を 5' または 3' 末端で用意した。N 末端 BglII-BamHI DX-890 cDNA (表 12) および C 末端 BamHI-HindIII DX-890 cDNA (表 13) をオーバーラップオリゴヌクレオチドから構築した。

【0216】

例 8： N 末端 DX-890-(GGSS)₄GG-アルブミン発現プラスミドの構築

プラスミド pDB2573X を BglII および BamHI で完全に切断し、6.21 kb DNA 断片を単離し、仔ウシ腸ホスファターゼで処理し、次いで 0.2 kb BglII

10

20

30

40

50

/ B a m H I N末端 D X - 8 9 0 c D N Aと連結して、p D B 2 6 8 3 を作製した。N末端 D X - 8 9 0 - (G G S)₄ G G - アルブミン融合体の D N A およびアミノ酸配列は表 1 4 および表 1 5 で各々示されている。適切な酵母ベクター配列を、E P - A - 2 8 6 4 2 4 で一般的に開示され、Sleep,D.et al.(1991)Bio/Technology 9,183-187で記載された「崩壊」プラスミド p S A C 3 5 により得た。N o t I N末端 D X - 8 9 0 - (G G S)₄ G G - r H A 発現カセットを p D B 2 6 8 3 から単離し、精製し、仔ウシ腸ホスファターゼで処理された N o t I 切断 p S A C 3 5 へ連結させて、L E U 2 と反対の方向で N o t I 発現カセットを含有する p D B 2 6 8 4 を作製した。

【 0 2 1 7 】

例 9 : C末端アルブミン - (G G S)₄ G G - D X - 8 9 0 発現プラスミドの構築

プラスミド p D B 2 5 7 5 X を H i n d I I I で部分的に切断し、次いで B a m H I で完全に切断した。望ましい 6 . 5 5 k b D N A 断片を単離し、0 . 2 k b B a m H I / H i n d I I I C末端 D X - 8 9 0 c D N A と連結して、p D B 2 6 4 9 を作製した。C末端アルブミン - (G G S)₄ G G - D X - 8 9 0 融合体の D N A およびアミノ酸配列は表 1 6 および表 1 7 で各々示されている。適切な酵母ベクター配列を、E P - A - 2 8 6 4 2 4 で一般的に開示され、Sleep,D.et al.(1991)Bio/Technology 9,183-187で記載された「崩壊」プラスミド p S A C 3 5 により得た。N o t I C末端アルブミン - (G G S)₄ G G - D X - 8 9 0 発現カセットを p D B 2 6 4 9 から単離し、精製し、仔ウシ腸ホスファターゼで処理された N o t I 切断 p S A C 3 5 へ連結させて、2 種のプラスミドを作製した；第一の p D B 2 6 5 2 は L E U 2 と同じ発現方向で N o t I 発現カセットを含有し、第二の p D B 2 6 5 3 は L E U 2 と反対の方向で N o t I 発現カセットを含有していた。

【 0 2 1 8 】

例 1 0 : 融合タンパク質を産生するための発酵

D X - 8 9 0 - H S A 融合タンパク質を W O 0 0 / 4 4 7 7 2 で記載されているような発酵培養で発現させた。W O 0 0 / 4 4 7 7 2 で記載されているような標準 H A 精製 S P - F F (Pharmacia) 条件を用いて発酵培養上澄から D X - 8 9 0 - H S A 融合タンパク質を精製したが、但し追加 2 0 0 m M N a C l が溶離用緩衝液に必要とされた。

【 0 2 1 9 】

例 1 1 : 酵母形質転換および培養条件

W O 9 5 / 2 3 8 5 7 、W O 9 5 / 3 3 8 3 3 および W O 9 4 / 0 4 6 8 7 で開示された酵母株を、Sleep,D.et al.(2001)Yeast 18,403-421で記載されているように、ロイシン原栄養体性に形質転換させた。形質転換株を緩衝化最少培地 (B M M 、Kerry-Williams,S .M.et al.(1998)Yeast 14,161-169で記載) 上に点在させ、更なる分析用に十分増殖するまで 3 0 でインキュベートした。

【 0 2 2 0 】

例 1 2 : D X - 8 9 0 サンプルの K_i 測定

H N E の D X - 8 9 0 および D X - 8 9 0 - H S A 阻害に関する平衡阻害定数 (K_i) を、可逆的複合体 (1 : 1 化学量論) の形成による強結合阻害モデルに従い調べた。h N E の阻害は 5 0 m M H E P E S , p H 7 . 5 、1 5 0 m M N a C l および 0 . 1 % T r i t o n X - 1 0 0 中 3 0 で調べた。すべての反応 (全容量 = 2 0 0 μ L) をマイクロタイタープレート (Coster #3789) で行った。h N E を様々な濃度の添加インヒビターと共に 2 4 時間インキュベートした。残留酵素活性を基質加水分解の相対速度から調べた。加水分解反応は基質として N - メトキシスクシニル - A l a - A l a - P r o - V a l - 7 - アミノメチルクマリンの添加により開始させた。この基質の酵素開裂がメチルクマリן部分を放出させ、同時にサンプル蛍光を増加させる。基質加水分解の速度を 3 6 0 n m の励起および 4 6 0 n m の放射でモニターした。残留活性率 vs. インヒビター濃度のプロットを非直線回帰分析により式 1 へあてはめ、平衡解離定数を求めた。

【数 1】

$$\%A = 100 - \left(\frac{(I + E + K_i) - \sqrt{(I + E + K_i)^2 - 4 \cdot E \cdot I}}{2 \cdot E} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

ここで：

% A = 活性率

I = D X - 8 9 0

E = H N E 濃度

K_i = 平衡阻害定数

【0 2 2 1】

自然 D X - 8 9 0 の K_i を陽性コントロールとして同時に測定した。ヒト好中球エラストラーゼ (HNE) に対する D X - 8 9 0 および D X - 8 9 0 - H S A 融合体の K_i は互いに類似していた (図 1)。類似した結果が、シェークフラスコ酵母培養物または発酵槽からの上澄中における D X - 8 9 0 - H S A 融合体でみられた。両上澄とも Aventis から Dya x へ供給された。この結果は、H S A への融合が H N E のインヒビターとして D X - 8 9 0 の効力に影響を与えないことを示している。

【0 2 2 2】

例 1 3 : H S A の N 末端への D X - 8 8 の融合

D X - 8 8 は、K_i ~ 4 0 p M でヒト血漿カリクレインを阻害するヒト L A C I の第一クニツドメインから誘導されるクニツドメインである。D X - 8 8 の血清半減期は 1 時間以下である。D X - 8 8 は遺伝性血管性浮腫 (H A E) の治療についてクリニックで現在試験されている。初期データは、D X - 8 8 が安全で有効なことを示している。H A E は、発作が時々起きて、長期作用型があれば反応性治療の代わりに予防処置を施せるような症状である。

【0 2 2 3】

D X - 8 8 の D N A 配列は入手可能であり、H A の N 末端への融合用に用意した。N 末端 D X - 8 8 - (G G S)₄ G G - アルブミンで適合するような D X - 8 8 コード領域、アルブミンコード領域またはリーダー配列間の架橋配列をコードする D N A 配列を 5 または 3 末端で用意した (表 1 8)。

【0 2 2 4】

プラスミド p D B 2 5 7 3 X を B g 1 I I および B a m H I で完全に切断し、6 . 2 1 k b D N A 断片を単離し、仔ウシ腸ホスファターゼで処理し、次いで 0 . 2 k b B g 1 I I / B a m H I N 末端 D X - 8 8 c D N A と連結して、p D B 2 6 6 6 - 8 8 を作製した。N 末端 D X - 8 8 - (G G S)₄ G G - アルブミン融合体の D N A およびアミノ酸配列は表 1 9 および表 2 0 で各々示されている。適切な酵母ベクター配列を、E P - A - 2 8 6 4 2 4 で一般的に開示され、Sleep, D. et al. (1991) Bio/Technology 9, 183-187 で記載された「崩壊」プラスミド p S A C 3 5 により得た。N o t I N 末端 D X - 8 8 - (G G S)₄ G G - r H A 発現カセットを p D B 2 6 6 6 - 8 8 から単離し、精製し、仔ウシ腸ホスファターゼで処理された N o t I 切断 p S A C 3 5 へ連結させて、2 種のプラスミドを作製した；第一の p D B 2 6 7 9 - 8 8 は L E U 2 と同じ発現方向で N o t I 発現カセットを含有し、第二の p D B 2 6 8 0 - 8 8 は L E U 2 と反対の方向で N o t I 発現カセットを含有していた。

【0 2 2 5】

例 1 4 : C 末端アルブミン - (G G S)₄ G G - D X - 8 8 発現プラスミドの構築

例 5 のように、プラスミド p D B 2 5 7 5 X を H i n d I I I で部分的に切断し、次いで B a m H I で完全に切断した。望ましい 6 . 5 5 k b D N A 断片を単離し、0 . 2 k b B a m H I / H i n d I I I C 末端 D X - 8 8 c D N A (表 2 1) と連結して、p D B 2 6 4 8 - 8 8 を作製した。C 末端アルブミン - (G G S)₄ G G - D X - 8 8 融合体の D

10

20

30

40

50

N A およびアミノ酸配列は表 2 2 および表 2 3 で各々示されている。適切な酵母ベクター配列を、E P - A - 2 8 6 4 2 4 で一般的に開示され、Sleep, D. et al. (1991) Bio/Technology 9, 183-187 で記載された「崩壊」プラスミド p S A C 3 5 により得た。N o t I C 末端アルブミン - (G G S)₄ G G - D X - 8 8 発現カセットを p D B 2 6 4 8 - 8 8 から単離し、精製し、仔ウシ腸ホスファターゼで処理された N o t I 切断 p S A C 3 5 へ連結させて、L E U 2 と同じ発現方向で N o t I 発現カセットを含有する p D B 2 6 5 1 - 8 8 を作製した。

【 0 2 2 6 】

例 1 5 : マウスでの薬物動態研究

D X - 8 9 0 - H S A 融合タンパク質を W O 0 0 / 4 4 7 7 2 で記載されているような発酵培養で発現させた。W O 0 0 / 4 4 7 7 2 で記載されているような標準 H A 精製 S P - F F (Pharmacia) 条件を用いて発酵培養上澄から D X - 8 9 0 - H S A 融合タンパク質を精製したが、但し追加 2 0 0 m M N a C l が溶離用緩衝液に必要とされた。

【 0 2 2 7 】

約 1 0 m g の r H A - D X - 8 9 0 融合体を S E C - H P L C によりダイアフィльтраーション保持物質から精製し、S C S - P A G E および R P - H P L C 法により特徴付けたところ、約 9 2 % モノマー形であった。この物質を次の^{1 2 5}I 放射線標識およびインビボ血漿クリアランス研究に用いた。

【 0 2 2 8 】

マウスを用いる研究用に、動物を尾静脈で注射し、動物 4 匹を注射から約 0、7、1 5、3 0 および 9 0 分、4 h、8 h、1 6 h、2 4 h 後に、そのおそらく短い半減期のために自然 D X - 8 9 0 について 4 以内の時点で犠牲にして調べた。注射の時間およびサンプリングの時間を記録した。犠牲時、~ 0 . 5 m l のサンプルを抗凝固液 (0 . 0 2 m l E D T A) 中へ集めた。細胞を回転沈降させ、血漿から分離させた。血漿を 2 つに分け、1 つは凍結し、他は即時分析用に 4 で貯蔵した。分析には全サンプルのガンマ計数を含めた。加えて、各時点、即ち^{1 2 5}I - D X - 8 9 0 については 0 および 3 0 分間目に、^{1 2 5}I - D X - 8 9 0 - H S A 融合体については 0、3 0 分間目および 2 4 時間目に、2 つの血漿サンプル (N = 2) で分析を行った。インライン放射線検出器装備の S E C - H P L C Superose- 1 2 カラムを用いて、血漿フラクションを分析した。

【 0 2 2 9 】

結果は、H S A へ D X - 8 9 0 を融合させると、~ 5 x までその (消失) 半減期を劇的に改善することを示している (図 2)。加えて、D X - 8 9 0 - H S A 融合体はマウス血漿中で D X - 8 9 0 よりも安定であるらしい (図 3 および 4)。

【 0 2 3 0 】

例 1 6 : ウサギでの薬物動態研究

タンパク質をヨウ素化し、ウサギで循環からの放射線標識のクリアランスを測定することにより、D X - 8 9 0 および D X - 8 9 0 - H S A の薬物動態を調べた。ヨードゲン法を用いて、2 種の D X - 8 9 0 調製物をヨウ素 - 1 2 5 でヨウ素化した。放射線標識後、2 種の標識されたタンパク質調製物をサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) により未結合標識から精製した。最大放射能を有する S E C カラムからのフラクションをプールした。精製された放射線標識調製物は、シンチレーション計数により比活性について、およびインライン放射線検出器装備の Superose- 1 2 カラムを用いて S E C により純度について特徴付けた。

【 0 2 3 1 】

New Zealand White ウサギ (約 2 . 5 k g) をクリアランス測定に用い、各々 1 匹の動物を 2 種の標識タンパク質調製物に用いた。放射線標識調製物を耳静脈から動物に注射した。初めの時点は約 0、7、1 5、3 0 および 9 0 分間目に、後の時点では 4、8、1 6、2 4、4 8、7 2、9 6、1 4 4、1 6 8 および 1 9 2 時間目に、各時点で動物 1 匹につき 1 つの血液サンプルを集めた。サンプル (約 0 . 5 m l) を抗凝固液 (E D T A) 管に集めた。細胞を遠心により血漿 / 血清フラクションから分離させた。血漿フラクション

を2つに分けた。1つの血漿分を - 70 で貯蔵し、他は即時分析用に4 で保った。サンプル分析には、クリアランス速度測定用に放射線計数、およびインビボ安定性用にSECクロマトグラフィーを含めた。ウサギクリアランス研究の結果は図5および6と表24でまとめられている。

【0232】

HSA-DX-890融合タンパク質は、未修飾DX-890の場合と比較して、インビボ循環性で実質的改善を示す。血漿クリアランス速度は融合タンパク質の場合に大きく減少し、1日後における放射線標識の相対的循環レベルは未修飾タンパク質の場合よりもHSA-DX-890融合体で100倍高い(図5)。データへの単純二指数あてはめでは、クリアランス曲線の および 双方の部分で大きな増加を示す(表24)。特に、 $T_{1/2}$ の値は、未修飾タンパク質の約165分間(2.75時間)から、HSA-DX-890融合体の約3500分間(~60時間、~2.5日)へと、20倍以上増加している。加えて、曲線の遅いクリアランス部分に關与する全物質のフラクションは、未修飾DX-890と比較して、融合タンパク質でほぼ2倍である(表24)。

10

【0233】

【表3】

表24
ウサギでのクリアランス時間

化合物	用 量		クリアランス時間(分)			
	μgm	μCi	$T_{1/2\alpha}$	% α	$T_{1/2\beta}$	% β
DX-890	50	83	0.4	75	165	25
HSA-DX-890	151	105	270	60	3500	40

20

【0234】

最後に、インビボ安定性は、未修飾DX-890と比較して、融合タンパク質で改善されているようである(図6)。¹²⁵I-DX-890で注射されたウサギからの血漿のSEC分析(図6、パートA)では、高分子量血漿成分(早期溶出ピーク)との標識の比較的早い結合を示している。更に、高分子量物質と結合する全残留循環標識の相対的割合は、注射後の時間が経過するにつれて増加する(30分間 vs. 4時間の溶出プロフィール)。逆に、¹²⁵I-HSA-DX-890で注射されたウサギからの血漿サンプルのSEC分析(図6、パートB)では、ほぼすべての循環標識が注射液でみられるHSA-DX-890ピークと結合し、標識が少なくとも72時間にわたりこのピークと安定的に結合したままであることを示している。

30

【0235】

例17：二重融合HSAを作製するためのベクター

ベクターpDB2300X1は、rHA遺伝子の5'末端近くにBglII/BamHIカセット、および3'末端近くにBspEI/KpnIカセットが存在した、pDB2575Xの修飾体である。この遺伝子を含むNotIカセットが表25で示されており、ここではDNA、コードされたAA配列および有用な制限部位を示している。表25の各ラインで、記号の後はすべて注釈であり、DNA配列は番号が付され、デザインの理解に役立てるために間隔が設けられている。

40

【0236】

例18：DX890の第一部分をpDB2300X1へ付加する

表12で示されたDNAを、BglIIおよびBamHIで切断されたpDB2300X1へ導入して、新たなベクターpDB2300X2を作製する。pDB2300X2のNotIカセットのDNA、コードされたAA配列および有用な制限部位が表26で示されている。

50

【 0 2 3 7 】

例 1 9 : D X 8 9 0 の第二部分を p D B 2 3 0 0 X 2 へ付加する

表 2 7 で示された D N A を、B s p E I および K p n I で切断された p D B 2 3 0 0 X 2 へ導入して、新たなベクター p D B 2 3 0 0 X 3 を作製する。この D N A は表 1 2 の D N A と同様の A A 配列をコードしているが、2 つの D X 8 9 0 コード領域間で組換えの可能性を減らすために多くのコドンが変更されていた。この構築物の D N A、コードされた A A 配列および有用な制限部位が表 2 8 で示されている。コードされた A A 配列は表 2 9 で示されている。このタンパク質は本発明の他の構築物と同様に発現される。表 1 0 3 のタンパク質「D x 8 9 0 - H A - D x 8 9 0」は D X 8 9 0 の H N E 中和活性の ~ 1 6 % であるが、かなり長い半減期を有している。そのため、H N E の阻害に関する曲線下面積は、裸の D X 8 9 0 よりもかなり高い。

【 0 2 3 8 】

例 2 0 : D X 1 0 0 0 :: (G G S) ₄ G G :: H S A

表 3 0 で示された D N A を、B g l I I および B a m H I で切断された p D B 2 5 7 3 X へ導入して、p D X 1 0 0 0 を作製する。コードされたタンパク質の A A 配列が表 3 1 で示されている。このタンパク質の発現は、本発明の他の H A 融合体の場合と本質的に同様である。

【 0 2 3 9 】

例 2 1 : D X - 8 8 :: (G G S) ₄ G G :: H S A :: (G G S) ₄ G G :: D X - 8 8

D X - 8 9 0 - H S A - D X - 8 9 0 をコードする遺伝子の構築と同様に、表 1 8 の D N A を B g l I I および B a m H I で切断された p D B 2 3 0 0 X 1 へ導入して、新たなベクター p D B 2 3 0 0 X 8 8 a を作製する。表 3 2 で示された D N A を E s p E I / K p n I 断片として p D B 2 3 0 0 X 8 8 a へ導入して、D X - 8 8 をコードする D N A の 2 部分を含む p D B 2 3 0 0 X 8 8 b を作製する。表 3 2 の D N A は表 1 8 の D N A とは実質的に異なり、組換えは起こりそうもない。

【 0 2 4 0 】

例 2 2 : マルチアルブミン融合

ここで記載されているような N 末端融合発現プラスミド p D B 2 5 4 0 は、C 末端で唯一の B s u 3 6 I を導入するように修飾しうる；新たなプラスミドを p D B 2 3 0 1 X と名づけた。p D B 2 3 0 1 X からの N o t I 発現カセットの D N A 配列は次の通りである：

p D B 2 5 4 0 + B s u 3 6 I

【化 7】

NotI

1 GCGGCCGCcc gtaatgCGgt atcgtgaaag cgaaaaaaa actaacagta gataagacag
61 atagacagat agagatggac gagaaacagg gggggagaaa aggggaaaag agaaggaaa

NarI

121 aaagactcat ctatcgCaga taagacaatc aaccctcatG GCGCCTccaa ccaccatccg
181 cactagggac caagcgctcg caccgttagc aacgcttgac tcacaaacca actgccggct
241 gaaagagctt gtgcaatggg agtgccaatt caaaggagcc gaatacgtct gctcgctttt
301 taagaggctt tttgaacact gcattgcacc cgacaaatca gccactaact acgaggtcac
361 ggacacatat accaatagtt aaaaattaca tatactctat atagcacagt agtgtgataa
421 ataaaaaatt ttgccaagac ttttttaaac tgcacccgac agatcaggtc tgtgcttact
481 atgcaottat gccgggggtc ccgggaggag aaaaaacgag ggctgggaaa tgtccgtgga
541 ctttaaacgc tccgggttag cagagtagca gggctttcgg ctttggaat ttaggtgact
601 tgttgaaaaa gcaaaatttg ggctcagtaa tgcactgca gtggcttatc acgccaggac
661 tgggggagtg gcgggggcaa acacaccgc gataaagagc gcgatgaata taaaaggggg
721 ccaatgttac gtcccgttat attggagttc ttcccatata aacttaagag tccaattagc

HindIII

781 ttcacgcca ataaaaaac AAGCTTaacc taattctaac aagcaaagat gaagtgggtt
>>.....>

BglII

841 ttcacgtct ccattttgtt cttgttctcc tetgcttact ctAGATCTtt ggataagaga
>.....Fusion Leader.....>>

AgeI

901 gacgctcaca agtccgaagt cgctcACCGG Ttcaaggacc taggtgagga aaacttcaag
>>.....rHA synth. gene ..Continues to base 2655.....>
961 gctttggtct tgatcgcttt cgctcaatac ttgcaacaat gtccattcga agatcacgtc
1021 aagttaggtca acgaagttac cgaattcgct aagacttggt ttgctgacga atctgtcgaa
1081 aactgtgaca agtccttgca caccttggtt ggtgataagt tgtgtactgt tgctaccttg
1141 agagaaacct acggtgaaat ggctgactgt tgtgctaagc aagaaccaga aagaaacgaa
1201 tgtttcttgc aacacaagga cgacaacca aacttgccaa gattgggttag accagaagtt
1261 gacgtcatgt gtactgcttt ccacgacaac gaagaaacct tcttgaagaa gtactgttac
1321 gaaattgcta gaagacaccc atactctctac gctccagaat tgttgttctt cgctaagaga
1381 tacaaggctg ctttcaccga atgttgtcaa gctgctgata aggtgcttg tttgttgcca
1441 aagttaggat aattgagaga cgaaggtaag gcttcttccg ctaagcaaag attgaagtgt
1501 gcttccctgc aaaagttcgg tgaaagagct ttcaaggctt gggctgtcgc tagattgtct
1561 caaagattcc caaaggctga attcgctgaa gtttctaagt tggttactga cttgactaag
1621 gttcacactg aatgttgtca cggtgacttg ttggaatgtg ctgatgacag agctgacttg
1681 gctaagtaca tctgtgaaaa ccaagactct atctcttcca agttgaagga atgttgtgaa
1741 aagccattgt tggaaaagtc tcaactgtatt gctgaagttg aaaacgatga aatgccagct
1801 gacttgccat ctttggtctg tgacttcgtt gaactaagg acgtttgtaa gaactacgtc
1861 gaagctaagg acgtcttctt gggtatgttc ttgtacgaat acgctagaag acaccagac
1921 tactccgttg tcttgttgtt gagattggct aagacctacg aaactacctt ggaaaagtgt
1981 tgtgctgctg ctgacccaca cgaatgttac gctaagggtt tcgatgaatt caagccattg
2041 gtcgaagaac caaaaactt gatcaagcaa aactgtgaat tgttcgaaca attgggtgaa
2101 tacaagttcc aaaacgcttt gttggttaga tacactaaga aggtcccaca agtctccacc
2161 ccaacttttg ttgaagtctc tagaaacttg ggttaaggct gttctaagt ttgtaagcac
2221 ccagaagcta agagaatgcc atgtgtgtaa gattacttgt ccgtcgttt gaaccaattg
2281 tgtgttttgc acgaaaagac ccagctctct gatagagtca ccaagtgttg tactgaatct
2341 ttggttaaca gaagaccatg tttctctgct ttggaagtcg acgaaactta cgttccaaag

EcoRV

2401 gaattcaacg ctgaaacttt caccttccac gctGATATCt gtaccttgct cgaaaaggaa
2461 agacaaatta agaagcaaac tgctttgggt gaattgggtc agcacaagcc aaaggctact
2521 aaggaacaat tgaaggtgt catggatgat ttcgctgct tcggtgaaa gtgttgtaa
2581 gctgatgata aggaaacttg tttcgctgaa gaaggtaaga agttggctgc tgcttcccaa

10

20

30

40

```

          Bsu36I          HindIII
2641  gctgCCTTAG GcttataatA AGCTTaattc ttatgattta tgatttttat tattaaataa
      >.....>>
2701  gttataaaaa aaataagtgt atacaaattt taaagtgact cttagggtttt aaaacgaaaa
2761  ttcttattct tgagtaactc tttcctgtag gtcagggttgc tttctcaggt atagcatgag

                                SphI
2821  gtcgctctta ttgaccacac ctctaccgGC ATGCcgagca aatgcctgca aatcgctccc
2881  catttcaccc aattgtagat atgctaactc cagcaatgag ttgatgaatc tcgggtgtgta

                                NotI
2941  ttttatgtcc tcagaggaca acacctgttg taatcgttct tccacacgga tcGCGGCCGC

```

10

【 0 2 4 1 】

DNAコードポリペプチドは、N末端アルブミン融合体を発現するためにB g l IIおよびA g e I部位間で、またはC末端アルブミン融合体を発現するためにB s u 3 6 IおよびH i n d III部位間で（唯一ではないため、部分的H i n d III切断を要する）、または両NおよびC末端アルブミン融合体を作製するために両対の部位間で挿入しうる。

【 0 2 4 2 】

ポリペプチドスペーサーも必要に応じて組み込める。修飾p D B 2 5 4 0からのN o t I発現カセットのDNA配列は次の通りに予想される：

p D B 2 5 4 0 + 2 × G S リンカー

20

【化 8】

NotI
 1 GCGGCCGCcc gtaatgcggt atcgtgaaag cgaaaaaaaa actaacagta gataagacag
 61 atagacagat agagatggac gagaaacagg gggggagaaa aggggaaaag agaaggaaaag

NarI
 121 aaagactcat ctatcgca ga taagacaatc aaccctcatG GCGCCTccaa ccaccatccg
 181 cactagggac caagegctcg caccgttagc aacgcttgac tcacaaacca actgccggct
 241 gaaagagctt gtgcaatggg agtgccaatt caaaggagcc gaatacgtct gctgcgcttt
 301 taagaggctt tttgaacact gcattgcacc cgacaaatca gccactaact acgaggtcac
 361 ggacacatat accaatagtt aaaaattaca tatactctat atagcacagt agtgtgataa
 421 ataaaaaatt ttgccaaagac ttttttaaac tgcacccgac agatcaggtc tgtgcctact
 481 atgcacttat gcccggggtc ccgggaggag aaaaaacgag ggctgggaaa tgtccgtgga
 541 ctttaaacgc tccgggttag cagagtagca gggctttcgg ctttggaat ttaggtgact
 601 tgttgaaaaa gcaaaatttg ggctcagtaa tgccactgca gtggcttatc acgccaggac
 661 tgcgggagtg gcgggggcaa acacacccgc gataaagagc gcgatgaata taaaaggggg
 721 ccaatgttac gtcccgttat attggagttc ttcccatata aacttaagag tccaattagc

HindIII
 781 ttcacgcga ataaaaaac AAGCTTaacc taattctaac aagcaaagat gaagtgggtt
 >>.....>

BglII
 841 ttcacgtct ccattttgtt cttgttctcc tctgcttact ctAGATCTtt ggataagaga
 >.....Fusion Leader.....>>

BamHI
 901 ggtGGATCCg gtgggtccgg tgggtctggt ggttcgggtg gtgacgtca caagtccgaa
 >>.....GS linker.....>|>>.....rHA.....>

AgeI
 961 gtcgctcACC GGTtcaagga cctaggtgag gaaaacttca aggccttgggt cttgatcgct
 >.....rHA synth. gene continues to base 2739.....>

1021 ttcgctcaat acttgcaaca atgtccattc gaagatcacg tcaagttggt caacgaagtt
 1081 accgaattcg ctaagacttg tgttgctgac gaatctgctg aaaactgtga caagtccttg
 1141 cacaccttgt tcggtgataa gttgtgtact gttgctacct tgagagaaac ctacggtgaa
 1201 atggctgact gttgtgctaa gcaagaacca gaaagaaacg aatgtttctt gcaacacaag
 1261 gacgacaacc caaacttgcc aagattggtt agaccagaag ttgacgtcat gtgtactgct
 1321 ttccacgaca acgaagaaac cttcttgaag aagtacttgt acgaaattgc tagaagacac
 1381 ccatacttct acgtccaga attgtgttgc ttcgctaaga gatacaaggc tgctttcacc
 1441 gaatgttgct aagctgctga taaggctgct tgtttgttgc caaagttgga tgaattgaga
 1501 gacgaaggta aggcctcttc cgctaagcaa agattgaagt gtgcttcctt gcaaaagttc
 1561 ggtgaaagag ctttcaaggc ttgggctgct gctagattgt ctcaaagatt cccaaaggct
 1621 gaattcgctg aagtttctaa gttggttact gacttgacta aggttcacac tgaatgttgt
 1681 cacggtgact tgttggaatg tgctgatgac agagctgact tggctaagta catctgtgaa
 1741 aaccaagact ctatctcttc caagttgaag gaatgttgtg aaaagccatt gttggaaaag
 1801 tctcactgta ttgctgaagt tgaaaacgat gaaatgccag ctgacttgcc atctttggct
 1861 gctgacttcg ttgaatctaa ggacgttgtt agaactacg ctgaagctaa ggacgtcttc
 1921 ttgggtatgt tcttgtacga atacgctaga agacacccag actactccgt tgtcttgtg
 1981 ttgagattgg ctaagaccta cgaaactacc ttggaaaagt gttgtgtgct tgtgaccca
 2041 cacgaatggt acgctaaggt ttcgatgaa ttcaagccat tggctgaaga accacaaaac
 2101 ttgatcaagc aaaactgtga attgttcgaa caattgggtg aatacaagtt ccaaaacgct
 2161 ttgttggtta gatacactaa gaagggtcca caagtctcca ccccaacttt ggttgaaagtc
 2221 tctagaaact tgggtaaggt cggttctaag tgttgtaagc acccagaagc taagagaatg
 2281 ccatgtgctg aagattactt gtcgctgctt ttgaaccaat tgtgtgtttt gcacgaaaag
 2341 accccagctc ctgatagagt caccaagtggt tgtactgaat ctttggttaa cagaagacca
 2401 tgtttctctg ctttggaagt cgacgaaact tacgttccaa aggaattcaa cgctgaaact

EcoRV
 2461 ttcaccttcc acgctGATAT Ctgtaccttg tccgaaaagg aaagacaaat taagaagcaa
 2521 actgcttttg ttgaattggt caagcacaag ccaaaggcta ctaaggaaca attgaaggct
 2581 gtcattgatg atttcgctgc tttcgttgaa aagtgttgta aggcctgatg taaggaaact

```

                                Bsu36I
2641  tgtttcgctg aagaaggtaa gaagttggtc gctgcttccc aagctgCCTT AGGcttaggt
>.....rHA synth. gene .....>|>>>

                                BspEI          KpnI          HindIII
2701  ggttctgggtg gtTCCGGAgg ttctgggGGT ACCggtgggtt aatAAGCTTa attcttatga
>.....GS linker.....>>

2761  tttatgattt ttattattaa ataagttata aaaaaaataa gtgtatacaa attttaaagt
2821  gactcttagg ttttaaaacg aaaattctta ttcttgagta actctttcct gtaggtcagg

                                SphI
2881  ttgctttctc aggtatagca tgaaggcgct cttattgacc acacctctac cgGCATGCcg
2941  agcaaatgcc tgcaaatcgc tccccatttc acccaattgt agatatgcta actccagcaa
3001  tgagttgatg aatctcgggtg tgtattttat gtcctcagag gacaacacct gttgtaatcg

                                NotI
3061  ttcttccaca cggatcGCGG CCGC

```

10

【 0 2 4 3 】

DNAコードポリペプチドは、N末端アルブミン融合体を発現するためにBglIIおよびBamHI部位間で、またはC末端アルブミン融合体を発現するために唯一のEspEIおよびKpnI部位間で、または両NおよびC末端アルブミン融合体を作製するために両対の部位間で挿入しうる。これは、ここで記載されているようなBglII-BamHI D P I - 1 4 cDNAおよびBamHI-HindIII DX - 890 cDNAを用いることで、最も簡単に例示される。これらのcDNAを適切な部位へ連結させることにより、下記DNA配列のD P I - 1 4 - (G G S)₄ G G - r H A - (G G S)₄ G G - D X - 890融合体が構築される。

20

【化 9】

```

      NotI
1   GCGGCCGCcc gtaatgcggt atcgtgaaag cgaaaaaaaa actaacagta gataagacag
61  atagacagat agagatggac gagaaacagg ggggggagaaa aggggaaaaag agaaggaaaag

      NarI
121 aaagactcat ctatcgaga taagacaatc aaccctcatG GCGCCTccaa ccaccatccg
181 cactagggac caagcgctcg caccgttagc aacgcttgac tcacaaacca actgccggct
241 gaaagagctt gtgcaatggg agtgccaatt caaaggagcc gaatacgtct gctcgccctt
301 taagaggctt tttgaacact gcattgcacc cgacaaatca gccactaact acgaggtcac
361 ggacacatat accaatagtt aaaaattaca tatactctat atagcacagt agtgtgataa
421 ataaaaaatt ttgccaagac ttttttaaac tgcacccgac agatcaggtc tgtgcctact
481 atgcacttat gccgggggtc ccgggaggag aaaaaacgag ggctgggaaa tgtccgtgga
541 ctttaaacgc tccgggttag cagagtagca gggctttcgg ctttggaat ttaggtgact
601 tgttgaaaaa gcaaaatttg ggctcagtaa tgccactgca gtggcttatc acgccaggac
661 tgcgggagtg gcgggggcaa acacaccgc gataaagagc gcgatgaata taaaaggggg
721 ccaatgttac gtcccgttat attggagttc ttcccataca aacttaagag tccaattagc

      HindIII
781 ttcacgcca ataaaaaac AAGCTTaacc taattctaac aagcaaagat gaagtgggtt
      >>.....>

      BglII
841 ttcacgtct ccattttgtt cttgttctcc tctgcttact ctAGATCTtt ggataagaga
>.....Fusion Leader.....>>

901 gaagctgtta gagaagtttg ttctgaacaa gctgaaactg gtccatgtat tgctttcttc
>>.....DPI-14 up to base 1080.....>

961 ccaagatggt acttcgatgt tactgaagg aagtgcgcgc cattcttcta cgggtggttgt
1021 ggtggttaaca gaaacaactt cgatactgaa gaatactgta tggctgtttg tggttctgct
>.....DPI-14.....>>

      BamHI
1081 ggtGGATCCg gtggttccgg tggttctggt ggttccggtg gtgacgctca caagtccgaa
>>.....GS linker.....>|>>...rHA synth gene.>

      AgeI
1141 gtcgctcACC GGTtcaagga cctaggtgag gaaaacttca aggctttggt cttgatcgct
>.....rHA synth. gene continues to base 2877.....>

```

10

20

30

```

1201   ttcgctcaat acttgcaaca atgtccattc gaagatcacg tcaagttggt caacgaagtt
1261   accgaattcg ctaagacttg tgttgctgac gaatctgctg aaaactgtga caagtccttg
1321   cacaccttgt tcggtgataa gttgtgtact gttgctacct tgagagaaac ctacggtgaa
1381   atggctgact gttgtgctaa gcaagaacca gaaagaaacg aatgtttctt gcaacacaag
1441   gacgacaacc caaacttgcc aagattgggt agaccagaag ttgacgtcat ggtactgct
1501   ttccacgaca acgaagaaac cttcttgaag aagtacttgt acgaaattgc tagaagacac
1561   ccatacttct acgctccaga attgtgttgc ttcgctaaga gatacaaggc tgctttcacc
1621   gaatgttgct aagctgctga taaggctgct tgtttgttgc caaagttgga tgaattgaga
1681   gacgaaggta aggccttcttc cgctaagcaa agattgaagt gtgcttcctt gcaaaagttc
1741   ggtgaaagag ctttcaaggc ttgggtgctc gctagattgt ctcaaagatt cccaaaggct
1801   gaattcgctg aagtttctaa gttggttact gacttgacta aggttcacac tgaatgttgt
1861   cacggtgact tgttggaatg tgctgatgac agagctgact tggctaagta catctgtgaa
1921   aaccaagact ctatctcttc caagtgaag gaattgtgtg aaaagccatt gttggaaaag
1981   tctcactgta ttgctgaagt tgaatacgt gaaatgccag ctgacttgcc atctttggt
2041   gctgacttcg ttgaatctaa ggacgtttgt aagaactacg ctgaagctaa ggacgtcttc
2101   ttgggtatgt tcttgtagca atacgctaga agacacccag actactccgt tgtctgttg
2161   ttgagattgg ctaagacctc cgaaactacc ttggaaaagt gttgtgctgc tgctgaccca
2221   caogaatgtt acgctaaggt ttctgatgaa ttcaagccat tgggtcgaaga accacaaaac
2281   ttgatcaagc aaaactgtga attgttcgaa caattgggtg aatacaagtt ccaaaacgct
2341   ttgttggtta gatacactaa gaaggtccca caagtctcca cccaactttt ggttgaagtc
2401   tctagaaact tgggtaaggt cggttctaa gttgtgaagc acccagaagc taagagaatg
2461   ccatgtgctg aagattactt gtccgtcgtt ttgaaccaat tgtgtgtttt gcacgaaaag
2521   accccagtc ctgatagagt caccaagtg tgtactgaat ctttggttaa cagaagacca
2581   tgtttctctg ctttggaagt cgacgaaact tgcgttccaa aggaattcaa cgctgaaact
2641   ttcaccttcc acgctGATAT CTgtaccttg tccgaaaagg aaagacaaat taagaagcaa
2701   actgctttgg ttgaattggt caagcacaag ccaaaggcta ctaaggaaca attgaaggct
2761   gtcattgatg atttcgctgc tttcgttgaa aagtgttgta aggcctgatga taaggaaact

```

10

20

Bsu36I

```

2821   tgtttcgctg aagaaggtaa gaagttggtc gctgcttccc aagctgCCTT AGGcttaggt
>.....rHA synth. gene .....>|>>>

```

BspEI

```

2881   ggttctgggtg gtTCCGGAGg tagtgggtggc tccggtgggtg aggccttgcaa tcttcctatc
Linker----->|--DX-890(second coding)-->

```

```

2941   gtccgtggcc cttgcacgc cttttttcct cgttggggcct ttgacgcctg caaaggcaaa
3001   tgcgtccttt ttccttacgg cggttgccag ggcaatggca ataaatttta tagcgagaaa
3061   gagtgcctg agtattgcgg cgctcccttaa taaGGTACCT aatAAGCTTa attcttatga
----DX-890 (2nd coding)---->|

```

30

```

3121   tttatgattt ttattattaa ataagttata aaaaaataa gtgtatacaa attttaaagt
3181   gactcttagg ttttaaaacg aaaattctta ttcttgagta actctttcct gtaggtcagg

```

SphI

```

3241   ttgctttctc aggtatagca tgaggctgct cttattgacc acacctctac cgGCATGCcg
3301   agcaaatgcc tgcaaatcgc tccccatttc acccaattgt agatatgcta actccagcaa
3361   tgagttgatg aatctcggtg tgtattttat gtcctcagag gacaacacct gttgtaatcg

```

NotI

```

3421   ttcttccaca cggatcGCGG CCGC

```

40

【 0 2 4 4 】

このDPI - 14 - (GGS)₄ GG - rHA - (GGS)₄ GG - DX - 890融合体の一次翻訳産物は次の通りである。

【化 1 0】

```

1  MKWVFIVSIL FLFSSAYSRS LDKREAVREV CSEQAETGPC IAFFPRWYFD
51  VTEGKCAPFF YGGCGGNRNN FDTEEYCMAY CGSAGGSGGS GGSGSGGDA
101 HKSEVAHRFK DLGEENFKAL VLIAFAQYLQ QCPFEDHVKL VNEVTEFAKT
151 CVADESAENC DKSLHTLFGD KLCTVATLRE TYGEMADCCA KQEPERNECF
201 LQHKDDNP NL PRLVRPEVDV MCTAFHDNEE TFLKKYLYEI ARRHPYFYAP
251 ELLFFAKRYK AAFTECCQAA DKAACLLPKL DELRDEGKAS SAKQRLKCAS
301 LQKFGERAFF AWAVARLSQR FPKAEFAEVS KLVTDLT KVH TECCHGDLLE
351 CADDRADLAK YICENQDSIS SKLKECCEKP LLEKSHCIAE VENDEMPADL
401 PSLAADFVES KDVCKNYAEA KDVFLGMFLY EYARRHPDYS VVLLLRLAKT
451 YETTLKCCA AADPHECYAK VFDEFKPLVE EPQNLIKQNC ELFEQLGEYK
501 FQNALLVRYT KKVPQVSTPT LVEVSRNLGK VGSCKCKHPE AKRMPCAEDY
551 LSVVLNQLCV LHEKTPVSDR VTKCTESLV NRRPCFSALE VDETYVPKEF
601 NAETFTFHAD ICTLSEKERQ IKKQTALVEL VKHKPKATKE QLKAVMDDFA
651 AFVEKCKKAD DKETCFAEEG KKLVAASQAA LGLGGSGGSG GSGSGSGEAC
701 NLPIVRGPCI AFFPRWAFDA VKGKCVLFPY GGCQGNNGKF YSEKECREYC
751 GVP

```

10

【0 2 4 5】

初めの24アミノ酸は、ここで記載されているように、融合リーダー配列を構成しているが、分泌される産物のアミノ酸配列は次の通りである。

【化 1 1】

20

```

1  EAVREVCSEQ AETGPCIAFF PRWYFDVTEG KCAPFFYGGC GGNRNNFDTE
51  EYCMVCGSA GGSGSGSGSG GSGGDAHKSE VAHRFKDLGE ENFKALVLIA
101 FAQYLQQCPF EDHVKLVNEV TEFAKTCVAD ESAENC DKSL HTLFGDKLCT
151 VATLRETYGE MADCCAKQEP ERNECFLQHK DDNP NL PRLV RPEVDVMCTA
201 FHDNEETFLK KYLYEIARRH PYFYAPELLF FAKRYKAAFT ECCQAADKAA
251 CLLPKLDEL R DEGKASSAQ RLKASLQKF GERAFFKAWAV ARLSQRFPKA
301 EFAEVSKLVT DLT KVHTECC HGD LLE CADD RADLAKYICE NQDSISSKLK
351 ECCEKPLLEK SHCIAEVEND EMPADLPSLA ADFVESKDVC KNYAEAKDVF
401 LGMFLY EYAR RHPDYSV VLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP HECYAKVFDE
451 FKPLVEEPQN LIQNCELFE QLGEYKFQNA LLVRYTKKVP QVSTPTLVEV
501 SRNLGKVGSK CCKHPEAKRM PCAEDYLSVV LNQLCVLHEK TPVSDRVT KC
551 CTESLVNRRP CFSALEVDET YVPKEFNAET FTFHADICTL SEKERQIKKQ
601 TALVELVKHK PKATKEQLKA VMDDFAAFVE KCCKADDKET CFAEEGKKLV
651 AASQAALGLG GSGSGSGSGG SGGEACNLPI VRGPCIAFFP RWAFFDAVKGK
701 CVLFPYGGCQ GNGNKFYSEK ECREYCGVP

```

30

【0 2 4 6】

例 2 3 : D P I - 1 4 - (G G S)₄ G G - H S A 融合タンパク質のアミノ酸配列

表 3 3 は、(G G S)₄ G G を含むリンカーで D P I - 1 4 を H S A へ連結させた融合体のアミノ酸配列を示している。所定の配列をコードする遺伝子の構築は簡単であり、ここで記載された方法およびベクターを用いる。D P I - 1 4 は H N E の強力なインヒビターであり、H S A への融合で血清滞留時間の長い分子を生じる。

40

【0 2 4 7】

表 :

表 1 : GenBank エントリー A A N 1 7 8 2 5 からの成熟 H S A のアミノ酸配列

【化 1 2】

DAHKSEVAHR FKDLGEENFK ALVLIAFAQY LQQCPFEDHV KLVNEVTEFA
 KTCVADESAE NCDKSLHTLF GDKLCTVATL RETYGEMADC CAKQEPERNE
 CFLQHKDDNP NLPLRVPEV DVMCTAFHDN EETFLKKYLY EIARRHPYFY
 APELLFFAKR YKAAFTECCQ AADKAACLLP KLDELDEGK ASSAKQRLKC
 ASLQKFGERA FKAWAVARLS QRFPKAEFAE VSKLVTDLTk VHTECCHGDL
 LECADDRADL AKYICENQDS ISSKLKECCE KPLLEKSHCI AEVENDEMPA
 DLPSLAADFV ESKDVCKNYA EAKDVFLGMF LYEYARRHPD YSVVLLLRLLA
 KTYKTTLEKC CAAADPHECY AKVFDEFKPL VEEPQNLIKQ NCELFEQLGE
 YKFQNALLLVR YTKKVPQVST PTLVEVSRNL GKVGSCKCKH PEAKRMPCAE
 DYLSVVLNQL CVLHEKTPVS DRVTKCTES LVNRRPCFSA LEVDETYVPK
 EFNAETFTFH ADICTLSEKE RQIKKQTALV ELVKHKPKAT KEQLKAVMDD
 FAAFVEKCCK ADDKETCF AE EGKKLVAASR AALGL

10

(配列番号 1 8)

【0 2 4 8】

表 2 : DX - 1 0 0 0 および DX - 8 8 のアミノ酸配列

【化 1 3】

DX-1000

20

EAMHSFCAFKAETGPCRARFDRWFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESELEECKKMCTRD
 (SEQ ID NO: ____)

DX-88

EAMHSFCAFKADDGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESELEECKKMCTRD
 (SEQ ID NO: ____)

【0 2 4 9】

表 5 : N 末端 B g l I I - B a m H I D P I - 1 4 c D N A の D N A 配列

30

【化 1 4】

AGATCTTTGGATAAGAGAGAAGCTGTTAGAGAAGTTTGTCTGAACAAGCTGAACTGGTCCAT
 GTATTGCTTTCTTCCCAAGATGGTACTTCGATGTTACTGAAGGTAAGTGCGCGCCATTCTTCTA
 CGGTGGTTGTGGTGGTAACAGAAACAACCTTCGATACTGAAGAATACTGTATGGCTGTTTGTGGT
 TCTGCTGGTGGATCC (SEQ ID NO: ____)

【0 2 5 0】

表 6 : C 末端 B a m H I - H i n d I I I D P I - 1 4 c D N A の D N A 配列

40

【化 1 5】

GGATCCGGTGGTGAAGCTGTTAGAGAAGTTTGTCTGAACAAGCTGAACTGGTCCATGTATTG
 CTTTCTTCCCAAGATGGTACTTCGATGTTACTGAAGGTAAGTGCGCGCCATTCTTCTACGGTGG
 TTGTGGTGGTAACAGAAACAACCTTCGATACTGAAGAATACTGTATGGCTGTTTGTGGTTCTGCT
 TAATAAGCTT (SEQ ID NO: ____)

【0 2 5 1】

表 7 : N 末端 D P I - 1 4 - (G G S) ₄ G G - アルブミン融合体コード領域の D N A 配列

50

【化 1 6】

GAAGCTGTTAGAGAAGTTTGTCTGAACAAGCTGAAACTGGTCCATGTATTGCTTTCTTCCCAA
GATGGTACTTCGATGTTACTGAAGGTAAGTGC GCGCCATTCTTCTACGGTGGTTGTGGTGGTAA
CAGAAACAACTTCGATACTGAAGAATACTGTATGGCTGTTTGTGGTTCTGCTGGTGGATCCGGT
GGTTCCGGTGGTTCTGGTGGTTCCGGTGGTGACGCTCACAAGTCCGAAGTCGCTCACC GGTTCA
AGGACCTAGGTGAGGAAAACCTTCAAGGCTTTGGTCTTGATCGCTTTTCGCTCAATACTTGCAACA
ATGTCCATTCTGAAGATCACGTCAAGTTGGTCAACGAAGTTACCGAATTCGCTAAGACTTGTGTT
GCTGACGAATCTGCTGAAAACCTGTGACAAGTCCTTGACACCTTGTTCCGGTGATAAGTTGTGTA
CTGTTGCTACCTTGAGAGAAACCTACGGTGAAATGGCTGACTGTTGTGCTAAGCAAGAACCAGA
AAGAAACGAATGTTTCTTGCAACACAAGGACGACAACCCAACTTGCCAAGATTGGTTAGACCA
GAAGTTGACGTCATGTGTACTGCTTTCACGACAACGAAGAAACCTTCTTGAAGAAGTACTTGT
ACGAAATTGCTAGAAAGACACCCATACTTCTACGCTCCAGAATTGTTGTTCTTCGCTAAGAGATA
CAAGGCTGCTTTCACCGAATGTTGTCAAGCTGCTGATAAGGCTGCTTGTGTTGTTGCCAAAGTTG
GATGAATTGAGAGACGAAGGTAAGGCTTCTTCCGCTAAGCAAAGATTGAAGTGTGCTTCCCTTGC
AAAAGTTCGGTGAAAGAGCTTTC AAGGCTTGGGCTGTGCTAGATTGTCTCAAAGATTCCCAAA
GGCTGAATTTCGCTGAAGTTTCTAAGTTGGTTACTGACTTGACTAAGGTTCACTGAATGTTGT
CACGGTGACTTGTGGAATGTGCTGATGACAGAGCTGACTTGGCTAAGTACATCTGTGAAAACC
AAGACTCTATCTCTTCCAAGTTGAAGGAATGTTGTGAAAAGCCATTGTTGGAAAAGTCTCACTG
TATTGCTGAAGTTGAAAACGATGAAATGCCAGCTGACTTGCCATCTTGGCTGCTGACTTCGTT
GAATCTAAGGACGTTTGTAAGAACTACGCTGAAGCTAAGGACGCTTCTTGGGTATGTTCTTGT
ACGAATACGCTAGAAGACACCCAGACTACTCCGTTGTCTTGTGTTGAGATTGGCTAAGACCTA
CGAACTACCTTGGAAAAGTGTGCTGCTGCTGACCCACACGAATGTTACGCTAAGGTTTTTC
GATGAATTCAAGCCATTGGTCTGAAGAACCACAAAACCTTGATCAAGCAAACTGTGAATTGTTCTG
AACAAATTGGGTGAATACAAGTTCCAAAACGCTTGTGTTGGTTAGATACACTAAGAAGGTCCCACA
AGTCTCCACCCCAACTTTGGTTGAAGTCTCTAGAACTTGGGTAAGGTCGGTTCTAAGTGTGTTGT
AAGCACCACAGAAGCTAAGAGAATGCCATGTGCTGAAGATTACTTGTCCGTCGTTTTGAACCAAT
TGTGTGTTTTGACGAAAAGACCCAGTCTCTGATAGAGTCACCAAGTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTT
GGTTAACAGAAGACCATGTTTCTCTGCTTTGGAAGTCGACGAACTTACGTTCCAAAGGAATTC
AACGCTGAACTTTCACCTTCCACGCTGATATCTGTACCTTGTCCGAAAAGGAAAGACAAATTA
AGAAGCAAACCTGCTTTGGTTGAATTGGTCAAGCACAAGCCAAAGGCTACTAAGGAACAATTGAA
GGCTGTCATGGATGATTTTCGCTGCTTTCGTTGAAAAGTGTGTTGTAAGGCTGATGATAAGGAACT
TGTTTCGCTGAAGAAGGTAAGAAGTTGGTCGCTGCTTCCCAAGCTGCTTTGGGTTTG (SEQ
ID NO: ____)

10

20

30

40

【0 2 5 2】

表 8 : N 末端 D P I - 1 4 - (G G S) ₄ G G - アルブミン融合タンパク質のアミノ酸配
列

【化 1 7】

EAVREVCSEQAETGPCIAFFPRWYFDVTEGKCAPFFYGGCGGNRNNFDTEEYCMVCGSAGGSG
GSGGSGGSGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCV
ADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNP NLPRLVRP
EVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKL
DELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECC
HGDLL ECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV
ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVF
DEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCC
KHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF
NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKET
CFAEEGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO: ____)

10

【 0 2 5 3 】

表 9 : C 末端アルブミン - (G G S) ₄ G G - D P I - 1 4 融合体コード領域の D N A 配
列

20

【化 1 8】

GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTGTTGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCT
TGGTGTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGT
GAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAA
TCACTTCATAACCTTTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTG
AAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGA
TGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCAT
GACAATGAAGAGACATTTTTTGAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTT
ATGCCCCGGAACCTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGC
TGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCG
TCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCAT
GGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGT
GACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGAC
AGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAAACTGAAGGAAT
GCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAATGATGAGATGCC
TGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACATGCT
GAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACT
CTGTCTGTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGC
TGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCT
CAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGAGAGTACAAATTCAGAATG
CGCTATTAGTTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTGTAGAGGTCTC
AAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGT
GCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCCCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAA
GTGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCT
GGAAGTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAAATGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGAT
ATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAACTGCACTTGTTGAGCTCGTGA
AACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATGATTTTCGCAGCTTTTGT
AGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAAGCTTGT
GCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAGGCTTAGGTGGTTCTGGTGGTTCCGGTGGTTCTGGTGGATCCG
GTGGTGAAGCTGTTAGAGAAGTTTGTCTGAACAAGCTGAACTGGTCCATGTATTGCTTTCTT
CCCAAGATGGTACTTCGATGTTACTGAAGGTAAGTGCGCGCCATTCTTCTACGGTGGTTGTGGT
GGTAACAGAAACAACTTCGATACTGAAGAATACTGTATGGCTGTTTGTGGTTCTGCT (SEQ
ID NO: ____)

10

20

30

40

【0 2 5 4】

表 1 0 : C 末端アルブミン - (G G S) ₄ G G - D P I - 1 4 融合タンパク質のアミノ酸
配列

【化 1 9】

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK
 SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFH
 DNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKAS
 SAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRF PKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADD
 RADLAKY ICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA
 EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP
 QNLIKQNC ELF EQLG EYKFQNAL LVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMP C
 AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHAD
 ICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLV
 AASQAALGLGGSGGSGGSGGSGGEAVREVCSEQAETGPCIAFFPRWYFDVTEGKCAPFFYGGCG
 GNRNNFDTEEYCMVCGSA (SEQ ID NO: ____)

10

【0 2 5 5】

表 1 1 : C 末端 B a m H I - H i n d I I I D X - 1 0 0 0 c D N A の D N A 配列

【化 2 0】

20

GGA TCC GGT GGT
 gag gct atg cat tcc ttc tgc gcc ttc aag
 gct gag act ggt cct tgt aga gct agg ttc
 gac cgt tgg ttc ttc aac atc ttc acg cgt
 cag tgc gag gaa ttc att tac ggt ggt tgt
 gaa ggt aac cag aac cgg ttc gaa tct cta
 gag gaa tgt aag aag atg tgc act cgt gac
 TAA TAA GCT T (SEQ ID NO: ____)

【0 2 5 6】

30

表 1 2 : N 末端 B g l I I - B a m H I D X - 8 9 0 c D N A の D N A 配列

【化 2 1】

AGATCTTTGGATAAGAGAGAAGCCTGTAACTTGCCAATTGTTAGAGGTCCATGTATTGCTTTCT
 TCCCAAGATGGGCTTTTCGATGCTGTTAAGGGTAAGTGTGTTTTGTTCCCATATGGTGGTTGTCA
 AGGTAACGGTAACAAGTTCTACTCTGAAAAGGAATGTAGAGAATACTGTGGTGTTCAGGTGGA
 TCC (SEQ ID NO: ____)

【0 2 5 7】

40

表 1 3 : C 末端 B a m H I - H i n d I I I D X - 8 9 0 c D N A の D N A 配列

【化 2 2】

GGATCCGGTGGTGAAGCCTGTAACTTGCCAATTGTTAGAGGTCCATGTATTGCTTTCTTCCCAA
 GATGGGCTTTTCGATGCTGTTAAGGGTAAGTGTGTTTTGTTCCCATATGGTGGTTGTCAAGGTAA
 CGGTAACAAGTTCTACTCTGAAAAGGAATGTAGAGAATACTGTGGTGTTCATAATAAGCTT
 (SEQ ID NO: ____)

【0 2 5 8】

表 1 4 : N 末端 D X - 8 9 0 - (G G S) ₄ G G - アルブミン融合体コード領域の D N A

50

配列

【化 2 3】

GAAGCCTGTAAC TTGCCAATTGTTAGAGGTCCATGTATTGCTTTCTTCCCAAGATGGGCTTTTCG
ATGCTGTTAAGGGTAAGTGTGTTTTGTTCCCATATGGTGGTTGTCAAGGTAACGGTAACAAGTT
CTACTCTGAAAAGGAATGTAGAGAATACTGTGGTGTTCAGGTGGATCCGGTGGTTCCGGTGGT
TCTGGTGGTTCCGGTGGTGACGCTCACAAAGTCCGAAGTCGCTCACCGGTTCAAGGACCTAGGTG
AGGAAAAC TTCAAGGCTTTGGTCTTGATCGCTTTTCGCTCAATACTTGCAACAATGTCCATTCTGA
AGATCACGTCAAGTTGGTCAACGAAGTTACCGAATTCGCTAAGACTTGTGTTGCTGACGAATCT
GCTGAAAAC TGTGACAAGTCCTTGACACCTTGTTCCGGTGATAAGTTGTGTACTGTTGCTACCT
TGAGAGAAACCTACGGTGAAATGGCTGACTGTTGTGCTAAGCAAGAACCAGAAAGAAACGAATG
TTTCTTGCAACACAAGGACGACAACCCAAACTTGCCAAGATTGGTTAGACCAGAAGTTGACGTC
ATGTGTACTGCTTTCCACGACAACGAAGAAACCTTCTTGAAGAAGTACTTGTACGAAATTGCTA
GAAGACACCCATACTTCTACGCTCCAGAATTGTTGTTCTTCGCTAAGAGATACAAGGCTGCTTT
CACCGAATGTTGTCAAGCTGCTGATAAGGCTGCTTGTTTGGTGCCAAAGTTGGATGAATTGAGA
GACGAAGGTAAGGCTTCTTCCGCTAAGCAAAGATTGAAGTGTGCTTCTTGCAAAAGTTCCGGTG
AAAGAGCTTTCAAGGCTTGGGCTGTGCTAGATTGTCTCAAAGATTCCCAAAGGCTGAATTCGC
TGAAGTTTCTAAGTTGGTTACTGACTTGACTAAGGTTCACTGAATGTTGTACGGTGACTTG
TTGGAATGTGCTGATGACAGAGCTGACTTGGCTAAGTACATCTGTGAAAACCAAGACTCTATCT
CTTCCAAGTTGAAGGAATGTTGTGAAAAGCCATTGTTGGAAAAGTCTCACTGTATTGCTGAAGT
TGAAAACGATGAAATGCCAGCTGACTTGCCATCTTTGGCTGCTGACTTCGTTGAATCTAAGGAC
GTTTGTAGAAGTACGCTGAAGCTAAGGACGCTTCTTGGGTATGTTCTTGTACGAATACGCTA
GAAGACACCCAGACTACTCCGTTGTCTTGTGTTGAGATTGGCTAAGACCTACGAAACTACCTT
GGAAAAGTGTGTGCTGCTGCTGACCCACACGAATGTTACGCTAAGGTTTTCGATGAATTCAAG
CCATTGGTCTGAAGAACCACAAAAC TTGATCAAGCAAAACTGTGAATTGTTCTGAACAATTGGGTG
AATACAAGTTCCAAAACGCTTTGTTGGTTAGATACACTAAGAAGGTCCCACAAGTCTCCACCCC
AACTTTGGTTGAAGTCTCTAGAAACTTGGGTAAGGTCGGTTCTAAGTGTGTAAGCACCCAGAA
GCTAAGAGAATGCCATGTGCTGAAGATTACTTGTCCGTCGTTTTGAACCAATTGTGTGTTTTGC
ACGAAAAGACCCAGTCTCTGATAGAGTACCAAGTGTGTACTGAATCTTTGGTTAACAGAAG
ACCATGTTTCTCTGCTTTGGAAGTCGACGAACTTACGTTCCAAAGGAATTCAACGCTGAAACT
TTCACCTTCCACGCTGATATCTGTACCTTGTCGAAAAGGAAAGACAAATTAAGAAGCAAAC TG
CTTTGGTTGAATTGGTCAAGCACAAGCCAAAGGCTACTAAGGAACAATTGAAGGCTGTCATGGA
TGATTTGCTGCTTTCGTTGAAAAGTGTGTAAGGCTGATGATAAGGAACTTGTTTCGCTGAA
GAAGGTAAGAAGTTGGTCGCTGCTTCCCAAGCTGCTTTGGGTTTG (SEQ ID NO: ____)

10

20

30

40

【 0 2 5 9】

表 1 5 : N 末端 D X - 8 9 0 - (G G S) ₄ G G - アルブミン融合タンパク質のアミノ酸
配列

【化 2 4】

EACNLPIVRGPCIAFFPRWAFDAVKGKCVLFPYGGCQGNNGKFYSEKECREYCGVPGGSGGSGG
 SGGSGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
 AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPRLVRPEVDV
 MCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDEL
 DEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECHGDL
 LECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKD
 VCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFK
 PLVEEPQONLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPE
 AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAET
 FTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKCKADDKETCFAE
 EGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO: ____)

10

【 0 2 6 0】

表 1 6 : C 末端アルブミン - (G G S) ₄ G G - D X - 8 9 0 融合体コード領域の D N A
 配列

20

【化 2 5】

GATGCACACA AGAGTGAGGT TGCTCATCGG TTTAAAGATT TGGGAGAAGA
 AAATTTCAAA GCCTTGGTGT TGATTGCCTT TGCTCAGTAT CTTCAGCAGT
 GTCCATTTGA AGATCATGTA AAATTAGTGA ATGAAGTAAC TGAATTTGCA
 AAAACATGTG TTGCTGATGA GTCAGCTGAA AATTGTGACA AATCACTTCA
 TACCCTTTTT GGAGACAAAT TATGCACAGT TGCAACTCTT CGTGAAACCT
 ATGGTGAAAT GGCTGACTGC TGTGCAAAAC AAGAACCTGA GAGAAATGAA
 TGCTTCTTGC AACACAAAGA TGACAACCCA AACCTCCCC GATTGGTGAG
 ACCAGAGGTT GATGTGATGT GCACTGCTTT TCATGACAAT GAAGAGACAT
 TTTTGAAAAA ATACTTATAT GAAATTGCCA GAAGACATCC TTA CTTTAT
 GCCCCGGAAC TCCTTTTCTT TGCTAAAAGG TATAAAGCTG CTTTACAGA
 ATGTTGCCAA GCTGCTGATA AAGCTGCCTG CCTGTTGCCA AAGCTCGATG
 AACTTCGGGA TGAAGGGAAG GCTTCGTCTG CCAAACAGAG ACTCAAGTGT
 GCCAGTCTCC AAAAATTTGG AGAAAGAGCT TTCAAAGCAT GGGCAGTAGC
 TCGCCTGAGC CAGAGATTTT CCAAAGCTGA GTTTGCAGAA GTTTCCAAGT
 TAGTGACAGA TCTTACCAA GTCCACACGG AATGCTGCCA TGGAGATCTG
 CTTGAATGTG CTGATGACAG GGCGGACCTT GCCAAGTATA TCTGTGAAAA
 TCAAGATTCG ATCTCCAGTA AACTGAAGGA ATGCTGTGAA AAACCTCTGT
 TGGAAAAATC CCACTGCATT GCCGAAGTGG AAAATGATGA GATGCCTGCT
 GACTTGCTT CATTAGCTGC TGATTTTGTT GAAAGTAAGG ATGTTTGCAA

30

40

AAACTATGCT GAGGCAAAGG ATGTCTTCCT GGGCATGTTT TTGTATGAAT
 ATGCAAGAAG GCATCCTGAT TACTCTGTCG TGCTGCTGCT GAGACTTGCC
 AAGACATATG AAACCACTCT AGAGAAAGTGC TGTGCCGCTG CAGATCCTCA
 TGAATGCTAT GCCAAAGTGT TCGATGAATT TAAACCTCTT GTGGAAGAGC
 CTCAGAATTT AATCAAACAA AATTGTGAGC TTTTGTGAGCA GCTTGGAGAG
 TACAAATTCC AGAATGCGCT ATTAGTTCGT TACACCAAGA AAGTACCCCA
 AGTGTCAACT CCAACTCTTG TAGAGGTCTC AAGAAACCTA GGAAAAGTGG
 GCAGCAAATG TTGTAAACAT CCTGAAGCAA AAAGAATGCC CTGTGCAGAA
 GACTATCTAT CCGTGGTCCT GAACCAGTTA TGTGTGTTGC ATGAGAAAAC
 GCCAGTAAGT GACAGAGTCA CCAAATGCTG CACAGAATCC TTGGTGAACA
 GGCGACCATG CTTTTCAGCT CTGGAAGTCG ATGAAACATA CGTCCCCAAA
 GAGTTTAATG CTGAAACATT CACCTTCCAT GCAGATATAT GCACACTTTC
 TGAGAAGGAG AGACAAATCA AGAAACAAAC TGCACTTGTT GAGCTCGTGA
 AACACAAGCC CAAGGCAACA AAAGAGCAAC TGAAAGCTGT TATGGATGAT
 TTCGCAGCTT TTGTAGAGAA GTGCTGCAAG GCTGACGATA AGGAGACCTG
 CTTTGCCGAG GAGGGTAAAA AACTTGTTGC TGCAAGTCAA GCTGCCTTAG
 GCTTAGGTGG TTCTGGTGGT TCCGGTGGTT CTGGTGGATC CGGTGGTGAA
 GCCTGTAACT TGCCAATTGT TAGAGGTCCA TGTATTGCTT TCTTCCAAG
 ATGGGCTTTC GATGCTGTTA AGGGTAAGTG TGTTTTGTTC CCATATGGTG
 GTTGTCAAGG TAACGGTAAC AAGTTCTACT CTGAAAAGGA ATGTAGAGAA
 TACTGTGGTG TTCCA (SEQ ID NO: ____)

10

20

30

【 0 2 6 1 】

表 1 7 : C 末端アルブミン - (G G S) ₄ G G - D X - 8 9 0 融合タンパク質のアミノ酸
 配列

【 化 2 6 】

DAHKSEVAHR FKDLGEENFK ALVLIAFAQY LQQCPFEDHV KLVNEVTEFA KTCVADESAE
 NCDKSLHTLF GDKLCTVATL RETYGEMADC CAKQEPERNE CFLQHKDDNP NLPRLVRPEV
 DVMCTAFHDN EETFLKKYLY EIARRHPYFY APELLFFAKR YKAAFTECCQ AADKAACLLP
 KLDELRLDEGK ASSAKQRLKC ASLQKFGERA FKAWAVARLS QRFPAEFAE VSKLVTDLT
 VHTECCHGDL LECADDRADL AKYICENQDS ISSKLKECCE KPLLEKSHCI AEVENDEMPA
 DLPSLAADFV ESKDVCKNYA EAKDVFLGMF LYEYARRHPD YSVVLLLRLA KTYETTLEKC
 CAAADPHECY AKVFDEFKPL VEEPQNLIKQ NCELFEQLGE YKFQNALVR YTKKVPQVST
 PTLVEVSRNL GKVGSCKCKH PEAKRMPCAE DYLSVVLNQL CVLHEKTPVS DRVTKCCTES
 LVNRRPCFSA LEVDETYVPK EFNAETFTFH ADICTLSEKE RQIKKQTALV ELVKHKPKAT
 KEQLKAVMDD FAAFVEKCKK ADDKETCFAE EGKKLVAASQ AALGLGGSGG SGGSGGSGGE
 ACNLPIVRGP CIAFFPRWAF DAVKGKCVLF PYGGCQGNNGN KFYSEKECREY CGVP
 (SEQ ID NO: ____)

40

【 0 2 6 2 】

50

表 18 : N 末端 B g l I I - B a m H I D X - 8 8 c D N A の D N A 配列
【 化 2 7 】

AGA TCT TTG GAT AAG AGA

GAA GCT ATG CAC

TCT TTC TGT GCT TTC AAG GCT GAC GAC GGT

CCG TGC AGA GCT GCT CAC CCA AGA TGG TTC

TTC AAC ATC TTC ACG CGA CAA TGC GAG GAG

TTC ATC TAC GGT GGT TGT GAG GGT AAC CAA

AAC AGA TTC GAG TCT CTA GAG GAG TGT AAG

AAG ATG TGT ACT AGA GAC GGT GGA TCC (SEQ ID NO:____)

10

【 0 2 6 3 】

表 19 : N 末端 D X - 8 8 - (G G S) ₄ G G - アルブミン融合体コード領域の D N A 配
列

【化 2 8】

GAA GCT ATG CAC TCT TTC TGT GCT TTC AAG GCT GAC GAC GGT CCG
TGC AGA GCT GCT CAC CCA AGA TGG TTC TTC AAC ATC TTC ACG CGA
CAA TGC GAG GAG TTC ATC TAC GGT GGT TGT GAG GGT AAC CAA AAC
AGA TTC GAG TCT CTA GAG GAG TGT AAG AAG ATG TGT ACT AGA GAC GGT
GGATCC

GGTGGTTC CGGTGGTTCTGGTGGTTC CGGTGGTGACGCTCACAAGTCCGAAGTCGCTCACCGGT
TCAAGGACCTAGGTGAGGAAAACCTTCAAGGCTTTGGTCTTGATCGCTTTCGCTCAATACTTGCA
ACAATGTCCATTCTGAAGATCACGTCAAGTTGGTCAACGAAGTTACCGAATTCGCTAAGACTTGT
GTTGCTGACGAATCTGCTGAAAACCTGTGACAAGTCCTTGACACCTTGTTCGGTGATAAGTTGT
GTACTGTTGCTACCTTGAGAGAAACCTACGGTGAAATGGCTGACTGTTGTGCTAAGCAAGAACC
AGAAAGAAACGAATGTTTCTTGCAACACAAGGACGACAACCCAAACTTGCCAAGATTGGTTAGA
CCAGAAGTTGACGTCATGTGTACTGCTTTCACGACAACGAAGAAACCTTCTGAAGAAGTACT
TGTAACGAAATTGCTAGAAGACACCCATACTTCTACGCTCCAGAATTGTTGTTCTTCGCTAAGAG
ATACAAGGCTGCTTTCACCGAATGTTGTCAAGCTGCTGATAAGGCTGCTTGTGTTGTTGCCAAAG
TTGGATGAATTGAGAGACGAAGGTAAGGCTTCTTCGCTAAGCAAAGATTGAAGTGTGCTTCCT
TGCAAAAGTTCGGTGAAAGAGCTTTCAGGCTTGGGCTGTCGCTAGATTGTCTCAAAGATTCCC
AAAGGCTGAATTCGCTGAAGTTTCTAAGTTGGTTACTGACTTGACTAAGGTTCACTGAATGT
TGTCACGGTGACTTGTGGAATGTGCTGATGACAGAGCTGACTTGGCTAAGTACATCTGTGAAA
ACCAAGACTCTATCTCTTCCAAGTTGAAGGAATGTTGTGAAAAGCCATTGTTGGAAAAGTCTCA
CTGTATTGCTGAAGTTGAAAACGATGAAATGCCAGCTGACTTGCCATCTTGGCTGCTGACTTC
GTTGAATCTAAGGACGTTTGTAGAAGTACGCTGAAGCTAAGGACGCTTCTTGGGTATGTTCT
TGTAACGAATACGCTAGAAGACACCCAGACTACTCCGTTGTCTTGTGTTGAGATTGGCTAAGAC
CTACGAAACTACCTTGGAAAAGTGTGCTGCTGCTGACCCACACGAATGTTACGCTAAGGTT
TTCGATGAATTCAAGCCATTGGTCAAGAACCACAAAACCTTGATCAAGCAAACTGTGAATTGT
TCGAACAATTGGGTGAATACAAGTTCCAAAACGCTTGTGTTGGTTAGATACACTAAGAAGGTCCC
ACAAGTCTCCACCCCACTTTGGTTGAAGTCTCTAGAACTTGGGTAAGGTCGGTTCTAAGTGT
TGTAAGCACCCAGAAGCTAAGAGAATGCCATGTGCTGAAGATTACTTGTCCGTCGTTTTGAACC
AATTGTGTGTTTTGCACGAAAAGACCCAGTCTCTGATAGAGTCACCAAGTGTGTACTGAATC
TTTGGTTAACAGAAGACCATGTTTCTCTGCTTTGGAAGTCGACGAACTTACGTTCCAAAGGAA
TTCAACGCTGAACTTTCACCTTCCACGCTGATATCTGTACCTTGTCCGAAAAGGAAAGACAAA
TTAAGAAGCAAACTGCTTTGGTTGAATTGGTCAAGCACAAGCCAAAGGCTACTAAGGAACAATT
GAAGGCTGTCATGGATGATTTTCGCTGCTTTCGTTGAAAAGTGTGTAAGGCTGATGATAAGGAA
ACTTGTTCGCTGAAGAAGGTAAGAAGTTGGTCGCTGCTTCCCAAGCTGCTTTGGGTTTG

(SEQ ID NO: _____)

【0 2 6 4】

表 2 0 : D X - 8 8 :: H S A の A A 配列

10

20

30

40

50

【化 2 9】

EAMHSFCAFK ADDGPCRAAH PRWFFNIFTR QCEEFIYGGC EGNQNRFESL
 EECKKMCTRD GSGGGSGGSG GSGGDAHKSE VAHRFKDLGE ENFKALVLIA
 FAQYLQQCPF EDHVKLNEV TEFAKTCVAD ESAENCDSKL HTLFGDKLCT
 VATLRETYGE MADCCAKQEP ERNECFLQHK DDNPNLPRLV RPEVDVMCTA
 FHDNEETFLK KYLYEIARRH PYFYAPELLF FAKRYKAAFT ECCQAADKAA
 CLLPKLDEL R DEGKASSAKQ RLKASLQKF GERAFAKAWAV ARLSQRFPA
 EFAEVSKLVT DLTKVHTECC HGDLLCADD RADLAKYICE NQDSISSKLK
 ECCEKPLLEK SHCIAEVEND EMPADLPSLA ADFVESKDVC KNYAEAKDVF
 LGMFLYEYAR RHPDYSVLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP HECYAKVFDE
 FKPLVEEPQN LIKQNCLEFE QLGEYKFQNA LLVRYTKKVP QVSTPTLVEV
 SRNLGKVGSK CCKHPEAKRM PCAEDYLSVV LNQLCVLHEK TPVSDRVTKC
 CTESLVNRRP CFSALEVDET YVPKEFNAET FTFHADICTL SEKERQIKKQ
 TALVELVKHK PKATKEH (SEQ ID NO:____)

10

20

【0 2 6 5】

表 2 1 : C 末端 B a m H I - H i n d I I I D X - 8 8 c D N A の D N A 配列

【化 3 0】

GGA TCC GGT GGT GAA GCT ATG CAC
 TCT TTC TGT GCT TTC AAG GCT GAC GAC GGT
 CCG TGC AGA GCT GCT CAC CCA AGA TGG TTC
 TTC AAC ATC TTC ACG CGA CAA TGC GAG GAG
 TTC ATC TAC GGT GGT TGT GAG GGT AAC CAA
 AAC AGA TTC GAG TCT CTA GAG GAG TGT AAG
 AAG ATG TGT ACT AGA GAC
 TAA TAA GCT T (SEQ ID NO:____)

30

【0 2 6 6】

表 2 2 : H S A :: (G G S) ₄ G G :: D X - 8 8

【化 3 1】

gat gca cac aag agt gag gtt gct cat cgg ttt aaa gat ttg gga
gaa gaa aat ttc aaa gcc ttg gtg ttg att gcc ttt gct cag tat
ctt cag cag tgt cca ttt gaa gat cat gta aaa tta gtg aat gaa
gta act gaa ttt gca aaa aca tgt gtt gct gat gag tca gct gaa
aat tgt gac aaa tca ctt cat acc ctt ttt gga gac aaa tta tgc
aca gtt gca act ctt cgt gaa acc tat ggt gaa atg gct gac tgc
tgt gca aaa caa gaa cct gag aga aat gaa tgc ttc ttg caa cac
aaa gat gac aac cca aac ctc ccc cga ttg gtg aga cca gag gtt
gat gtg atg tgc act gct ttt cat gac aat gaa gag aca ttt ttg
aaa aaa tac tta tat gaa att gcc aga aga cat cct tac ttt tat
gcc ccg gaa ctc ctt ttc ttt gct aaa agg tat aaa gct gct ttt
aca gaa tgt tgc caa gct gct gat aaa gct gcc tgc ctg ttg cca
aag ctc gat gaa ctt cgg gat gaa ggg aag gct tgc tct gcc aaa
cag aga ctc aag tgt gcc agt ctc caa aaa ttt gga gaa aga gct
ttc aaa gca tgg gca gta gct cgc ctg agc cag aga ttt ccc aaa
gct gag ttt gca gaa gtt tcc aag tta gtg aca gat ctt acc aaa
gtc cac acg gaa tgc tgc cat gga gat ctg ctt gaa tgt gct gat
gac agg gcg gac ctt gcc aag tat atc tgt gaa aat caa gat tgc
atc tcc agt aaa ctg aag gaa tgc tgt gaa aaa cct ctg ttg gaa
aaa tcc cac tgc att gcc gaa gtg gaa aat gat gag atg cct gct
gac ttg cct tca tta gct gct gat ttt gtt gaa agt aag gat gtt
tgc aaa aac tat gct gag gca aag gat gtc ttc ctg ggc atg ttt
ttg tat gaa tat gca aga agg cat cct gat tac tct gtc gtg ctg
ctg ctg aga ctt gcc aag aca tat gaa acc act cta gag aag tgc
tgt gcc gct gca gat cct cat gaa tgc tat gcc aaa gtg ttc gat
gaa ttt aaa cct ctt gtg gaa gag cct cag aat tta atc aaa caa
aat tgt gag ctt ttt gag cag ctt gga gag tac aaa ttc cag aat
gcg cta tta gtt cgt tac acc aag aaa gta ccc caa gtg tca act
cca act ctt gta gag gtc tca aga aac cta gga aaa gtg ggc agc
aaa tgt tgt aaa cat cct gaa gca aaa aga atg ccc tgt gca gaa
gac tat cta tcc gtg gtc ctg aac cag tta tgt gtg ttg cat gag

10

20

30

40

aaa acg cca gta agt gac aga gtc acc aaa tgc tgc aca gaa tcc
 ttg gtg aac agg cga cca tgc ttt tca gct ctg gaa gtc gat gaa
 aca tac gtt ccc aaa gag ttt aat gct gaa aca ttc acc ttc cat
 gca gat ata tgc aca ctt tct gag aag gag aga caa atc aag aaa
 caa act gca ctt gtt gag ctg gtg aaa cac aag ccc aag gca aca
 aaa gag caa ctg aaa gct gtt atg gat gat ttc gca gct ttt gta
 gag aag tgc tgc aag gct gac gat aag gag acc tgc ttt gcc gag
 gag ggt aaa aaa ctt gtt gct gca agt caa gct gcc tta ggc tta
 ggt ggt tct ggt ggt tcc ggt ggt tct ggt gga tcc ggt ggt
 GAA GCT ATG CAC TCT TTC TGT GCT TTC AAG GCT GAC GAC GGT CCG
 TGC AGA GCT GCT CAC CCA AGA TGG TTC TTC AAC ATC TTC ACG CGA
 CAA TGC GAG GAG TTC ATC TAC GGT GGT TGT GAG GGT AAC CAA AAC
 AGA TTC GAG TCT CTA GAG GAG TGT AAG AAG ATG TGT ACT AGA GAC
 (SEQ ID NO:____)

10

20

【 0 2 6 7 】

表 2 3 : 表 2 2 でコードされた成熟タンパク質の A A 配列

【 化 3 2 】

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQY
LQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES AE
NCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADC
CAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEV
DVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFY
APELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA CLLP
KLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA
FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTD LTK
VHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDS
ISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA
DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMF
LYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKC
CAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN LIKQ
NCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVST
PTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAE
DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES
LVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFH
ADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKAT
KEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAE
EGKKLVAASQAALGLGGSGGSGGSGGSGGE
AMHSFCAFKADDGPCRAAHPRWFFNI FTRQ
CEEFIYGGCEGNQNR FESLEECKKMCTRD
(SEQ. ID NO: _____)

10

20

30

40

【 0 2 6 8 】

表 2 5 : 2 × G S リンカー付加 p D B 2 3 0 0 X 1 の N o t I カセット

【化 3 3】

```

!
!   1  GCGGCCGCcc gtaatgcggt atcgtgaaag cgaaaaaaaa actaacagta gataagacag
!   NotI....
!
!   61  atagacagat agagatggac gagaaacagg gggggagaaa aggggaaaag agaaggaaaag
121  aaagactcat ctatcgaga taagacaatc aaccctcatG GCGCctccaa ccaccatccg
!                                     NarI...
!
!   181 cactagggac caAGCGCTcg caccgttagc aacgcttgac tcacaaacca actGCCGGCt
!                                     AfeI..                               NgoMIV
!
!   241 gaaagagctt gtgcaatggg agtgccaatt caaaggagcc gaatacgtct gctcgccttt
301  taagaggctt ttgaacact gcattgcacc cgacaaatca gccactaact acgaggtcac
361  ggacacatat accaatagtt aaaaattaca tatactctat atagcacagt agtgtgataa
421  ataaaaaatt ttgccaagac ttttttaaaC TGCACccgac agatcaggtc tgtgcctact
!                                     BsgI...
!
!   481 atgcacttat gcccggggtc cggggaggag aaaaaacgag ggctgggaaa tgtccgtgga
541  ctttaaacgc tccgggttag cagagtaGCA gggcttTCGg ctttggaat ttaggtgact
!                                     BcgI.....
!
!   601 tgttgaaaaa gcaaaatttg ggctcagtaa tgCCAActgca gTGGcttatac acgccaggac
!                                     BstXI.....
!                                     PStI...
!
!   661 tgcgggagtg gcgggggcaa acacacccgc gataaagagc gcgatgaata taaaaggggg
721  ccaatgttac gtcccgttat attggagttc ttcccatata aaCTTAAGag tccaattagc
!                                     AflII.
!
!   781 ttcacgcga ataaaaaac AAGCTTaacc taattctaac aagcaaag
!                                     HindIII (1/2)
!
!       1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13  14  15
!       M   K   W   V   F   I   V   S   I   L   F   L   F   S   S
!   829  atg aag tgg gtt ttc atc gtc tcc att ttg ttc ttg ttc tcc tct
!
!       16  17  18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28  29  30
!       A   Y   S   R   S   L   D   K   R   G   G   S   G   G   S
!   874  gct tac tct AGA TCT ttg gat aag aga ggt GGA TCC ggt ggt tcc
!                                     BglII..                               BamHI..
!
!       31  32  33  34  35  36  37  38  39  40  41  42  43  44  45
!       G   G   S   G   G   S   G   G   D   A   H   K   S   E   V
!   919  ggt ggt tct ggt ggt tcc ggt ggt gac gct cac aag tcc gaa gtc
!
!       46  47  48  49  50  51  52  53  54  55  56  57  58  59  60
!       A   H   R   F   K   D   L   G   E   E   N   F   K   A   L
!   964  gct cAC CGG Ttc aag gaC CTA Ggt gag gaa aac ttc aag gct ttg
!                                     AgeI....                               AvrII...

```

10

20

30

```

!
!
!   61  62  63  64  65  66  67  68  69  70  71  72  73  74  75
!   V   L   I   A   F   A   Q   Y   L   Q   Q   C   P   F   E
1009 gtc ttg atc gct ttc gct caa tac ttg caa caa tgt cca ttc gaa
!
!   76  77  78  79  80  81  82  83  84  85  86  87  88  89  90
!   D   H   V   K   L   V   N   E   V   T   E   F   A   K   T
1054 gat CAC GTC aag ttg gtc aac gaa gtt acc gaa ttc gct aag act
!       BmgBI..
!
!   91  92  93  94  95  96  97  98  99 100 101 102 103 104 105
!   C   V   A   D   E   S   A   E   N   C   D   K   S   L   H
1099 tgt gtt gct gac gaa tct gct gaa aac tgt gac aag tcc ttg cac
!
!   106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120
!   T   L   F   G   D   K   L   C   T   V   A   T   L   R   E
1144 acc ttg ttc ggt gat aag ttg tgt act gtt gct acc ttg aga gaa
!
!   121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135
!   T   Y   G   E   M   A   D   C   C   A   K   Q   E   P   E
1189 acc tac ggt gaa atg gct gac tgt tgt gct aag caa gaa cca gaa
!
!   136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150
!   R   N   E   C   F   L   Q   H   K   D   D   N   P   N   L
1234 aga aac gaa tgt ttc ttg caa cac aag gac gac aac cca aac ttg
!
!   151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165
!   P   R   L   V   R   P   E   V   D   V   M   C   T   A   F
1279 cca aga ttg gtt aga cca gaa gtt gac gtc atg tgt act gct ttc
!
!   166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180
!   H   D   N   E   E   T   F   L   K   K   Y   L   Y   E   I
1324 cac gac aac gaa gaa acc ttc ttg aag aAG TAC Ttg tac gaa att
!       ScaI....
!
!   181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195
!   A   R   R   H   P   Y   F   Y   A   P   E   L   L   F   F
1369 gct aga aga cac cca tac ttc tac gct cca gaa ttg ttg ttc ttc
!
!   196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
!   A   K   R   Y   K   A   A   F   T   E   C   C   Q   A   A
1414 gct aag aga tac aag gct gct ttc acc gaa tgt tgt caa gct gct
!
!   211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225
!   D   K   A   A   C   L   L   P   K   L   D   E   L   R   D
1459 gat aag gct gct tgt ttg ttg cca aag ttg gat gaa ttg aga gac
!
!   226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240
!   E   G   K   A   S   S   A   K   Q   R   L   K   C   A   S
1504 gaa ggt aag gct tct tcc gct aag caa aga ttg aag tgt gct tcc
!
!   241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255
!   L   Q   K   F   G   E   R   A   F   K   A   W   A   V   A
1549 ttg caa aag ttc ggt gaa aga gct ttc aag gct tgg gct gtc gct
!
!   256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270
!   R   L   S   Q   R   F   P   K   A   E   F   A   E   V   S
1594 aga ttg tct caa aga ttc cca aag gct gaa ttc gct gaa gtt tct
!
!   271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285
!   K   L   V   T   D   L   T   K   V   H   T   E   C   C   H

```

10

20

30

40

```

1639  aag ttg gtt act gac ttg act aag gtt 'cac act gaa tgt tgt cac
!
!
!
286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300
!  G  D  L  L  E  C  A  D  D  R  A  D  L  A  K
1684  ggt gac ttg ttg gaa tgt gct gat gac aga gct gac ttg gct aag
!
!
!
301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315
!  Y  I  C  E  N  Q  D  S  I  S  S  K  L  K  E
1729  tac atc tgt gaa aac caa gac tct atC TCT TCc aag ttg aag gaa
!
!
!
!
!
!
316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330
!  C  C  E  K  P  L  L  E  K  S  H  C  I  A  E
1774  tgt tgt gaa aag cca ttg ttg gaa aag tct cac tgt att gct gaa
!
!
!
331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345
!  V  E  N  D  E  M  P  A  D  L  P  S  L  A  A
1819  gtt gaa aac gat gaa atg cCA GCT Gac ttg cca tct ttg gct gct
!
!
!
!
!
!
346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360
!  D  F  V  E  S  K  D  V  C  K  N  Y  A  E  A
1864  gac ttc gtt gaa tct aag gac gtt tgt aag aac tac gct gaa gct
!
!
!
361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375
!  K  D  V  F  L  G  M  F  L  Y  E  Y  A  R  R
1909  aag gac gtc ttc ttg ggt atg ttc ttg tac gaa tac gct aga aga
!
!
!
376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390
!  H  P  D  Y  S  V  V  L  L  L  R  L  A  K  T
1954  cac cca gac tac tcc gtt gtc ttg ttg ttg aga ttg gct aag acc
!
!
!
391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405
!  Y  E  T  T  L  E  K  C  C  A  A  A  D  P  H
1999  tac gaa act acc ttg gaa aag tgt tgt gct gct gct gac cca cac
!
!
!
406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420
!  E  C  Y  A  K  V  F  D  E  F  K  P  L  V  E
2044  gaa tgt tac gct aag gtt ttc gat gaa ttc aag cca ttg gtc gaa
!
!
!
421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435
!  E  P  Q  N  L  I  K  Q  N  C  E  L  F  E  Q
2089  gaa cca caa aac tTG ATC Aag caa aac tgt gaa ttg ttc gaa caa
!
!
!
!
!
!
436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450
!  L  G  E  Y  K  F  Q  N  A  L  L  V  R  Y  T
2134  ttg ggt gaa tac aag ttc caa aac gct ttg ttg gtt aga tac act
!
!
!
451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465
!  K  K  V  P  Q  V  S  T  P  T  L  V  E  V  S
2179  aag aag gtc cca caa gtc tCC Acc cca act tTG Gtt gaa gtc TCT
!
!
!
!
!
!
!
!
!
!
!
466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480
!  R  N  L  G  K  V  G  S  K  C  C  K  H  P  E
2224  AGA aac ttg ggt aag gtc ggt tct aag tgt tgt aag cac cca gaa
!
!
!
481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495
!  A  K  R  M  P  C  A  E  D  Y  L  S  V  V  L
2269  gct aag aGA ATG Cca tgt gct gaa gat tac ttg tcc gtc gtt ttg

```

```

!
!           BsmI....
!
! 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510
!  N   Q   L   C   V   L   H   E   K   T   P   V   S   D   R
! 2314 aac caa ttg tgt gtt ttg cac gaa aaG ACc cca GTC tct gat aga
!                                     PshAI.....
!                                     AlwNI.....
!
! 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525
!  V   T   K   C   C   T   E   S   L   V   N   R   R   P   C
! 2359 gtC ACc aaG TGT tgt act gaa tct ttg GTT AAC aga aga cca tgt
!                                     DraIII.....
!                                     HpaI...
!
! 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540
!  F   S   A   L   E   V   D   E   T   Y   V   P   K   E   F
! 2404 ttc tct gct ttg gaa GTC GAC gaa act tac gtt cca aag GAA TTC
!                                     SalI...
!
! 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555
!  N   A   E   T   F   T   F   H   A   D   I   C   T   L   S
! 2449 aac gct gaa act ttc acc ttc cac gct GAT ATC tgt acc ttg tcc
!                                     EcoRV..
!
! 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570
!  E   K   E   R   Q   I   K   K   Q   T   A   L   V   E   L
! 2494 gaa aag gaa aga caa att aag aag caa act gct ttg gtt gaa ttg
!
! 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585
!  V   K   H   K   P   K   A   T   K   E   Q   L   K   A   V
! 2539 gtc aag cac aag cca aag gct act aag gaa caa ttg aag gct gtc
!
! 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600
!  M   D   D   F   A   A   F   V   E   K   C   C   K   A   D
! 2584 atg gat gat ttc gct gct ttc gtt gaa aag tgt tgt aag gct gat
!
! 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615
!  D   K   E   T   C   F   A   E   E   G   K   K   L   V   A
! 2629 gat aag gaa act tgt ttc gct gaa gaa ggt aag aag ttg gtc gct
!
! 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630
!  A   S   Q   A   A   L   G   L   G   G   S   G   G   S   G
! 2674 gct tcc caa gct gCC TTA GGc tta ggt ggt tct ggt ggt tcc ggt
!                                     Bsu36I...
!
! 631 632 633 634 635 636 637 638
!  G   S   G   G   S   G   G   T
! 2719 ggt TCC GGA ggt tcc ggt GGT ACC          taa tAA GCTTa attcctatga
!                                     BspEI..          KpnI...          Stop Stop
!                                     HindIII (2/2)
!
! 2764 tttatgattt ttattattaa ataagTTATA Aaaaaaataa gtGTATACaa attttaaagt
!                                     PsiI...          BstZ17I
!
! 2824 gactcttagg ttttaaaacg aaaattctta ttcttgagta actctttcct gtaggtcagg
! 2884 ttgctttctc aggtatagca tgaggctcgct cttattgacc acacctctac cgGCATGCcg
!                                     SphI..
!
! 2944 agcaaatgcc tgcaaatcgc tccccatttc acccaattgt agatatgeta actccagcaa
! 3004 tgagttgatg aatctcgggtg tgtattttat gtcctcagag gacaacacct gttgtaatcg
! 3064 ttcttccaca cggatCGCGG CCGC
!                                     NotI.....
!

```

【 0 2 6 9 】

表 2 6 : 第二 D X 8 9 0 の用意ができた D X 8 9 0 (N 末端) および C 末端リンカー付加
p D B 2 3 0 0 X 2 の N o t I カセット

【 化 3 4 】

```

!
!   1  GCGGCCGCcc gtaatgcggt atcgtgaaag cgaaaaaaaa actaacagta gataagacag
!   NotI....
!
!   61  atagacagat agagatggac gagaaacagg gggggagaaa aggggaaaag agaaggaaaag
121  aaagactcat ctatcgaga taagacaatc aaccctcatG GCGCctccaa ccaccatccg
!                                     NarI...
!
!   181 cactagggac caAGCGCTcg caccgttagc aacgcttgac tcacaaacca actGCCGGCT
!                                     AfeI..
!                                     NgoMIV
!
!   241 gaaagagctt gtgcaatggg agtgccaatt caaaggagcc gaatacgtct gctcgctttt
301  taagaggctt tttgaacact gcattgcacc cgacaaatca gccactaact acgagggtcac
361  ggacacatat accaatagtt aaaaattaca tatactctat atagcacagt agtgtgataa
421  ataaaaaatt ttgccaagac ttttttaaaC TGCAcccgac agatcagggtc tgtgcctact
!                                     BsgI...
!
!   481 atgcacttat gcccggggtc ccgggaggag aaaaaacgag ggctgggaaa tgtccgtgga
541  ctttaaacgc tccggggttag cagagtaGCA gggcttTCGg ctttggaat ttaggtgact
!                                     BcgI.....
!
!   601 tgttgaaaaa gcaaaatttg ggctcagtaa tgCCAActgca gTGGcttatc acgccaggac
!                                     BstXI.....
!                                     PStI...
!
!   661 tgcgggagtg gcgggggcaa acacacccgc gataaagagc gcgatgaata taaaaggggg
721  ccaatgttac gtcccgttat attggagttc ttcccataca aaCTTAAGag tccaattagc
!                                     AflII.
!
!   781 ttcacgcca ataaaaaac AAGCTTaacc taattctaac aagcaaaag
!                                     HindIII (1/2)
!
!   Signal sequence-----
!   1  2  3  4  5  6  7  8  9  10 11 12 13 14 15
!   M  K  W  V  F  I  V  S  I  L  F  L  F  S  S
!   829 atg aag tgg gtt ttc atc gtc tcc att ttg ttc ttg ttc tcc tct
!
!   Signal sequence-----> DX-890-----
!   16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
!   A  Y  S  R  S  L  D  K  R  E  A  C  N  L  P
!   874 gct tac tct AGA TCT ttg gat aag aga gaa gcc tgt aac ttg cca
!                                     BglII..
!                                     XbaI... (1/2)
!
!   DX890 continued-----
!   31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45
!   I  V  R  G  P  C  I  A  F  F  P  R  W  A  F
!   919 att gtt aga ggt cca tgt att gct ttc ttc cca aga tgg gct ttc

```

10

20

30

40

```

! DX890 continued-----
!   46  47  48  49  50  51  52  53  54  55  56  57  58  59  60
!   D   A   V   K   G   K   C   V   L   F   P   Y   G   G   C
! 964   gat gct gtt aag ggt aag tgt gtt ttg ttc CCA tat ggT GGt tgt
!                                     PflMI.....
!                                     NdeI....
!
! DX890 continued-----
!   61  62  63  64  65  66  67  68  69  70  71  72  73  74  75
!   Q   G   N   G   N   K   F   Y   S   E   K   E   C   R   E
! 1009  caa ggt aac ggt aac aag ttc tac tct gaa aag gaa tgt aga gaa
!
! DX890 continued---> Linker-----
!   76  77  78  79  80  81  82  83  84  85  86  87  88  89  90
!   Y   C   G   V   P   G   G   S   G   G   S   G   G   S   G
! 1054  tac tgt ggt gtt cca ggt GGA TCC ggt ggt tcc ggt ggt tct ggt
!                                     BamHI..
!
!   Linker-----> rHA-----> to residue 679
!   91  92  93  94  95  96  97  98  99 100 101 102 103 104 105
!   G   S   G   G   D   A   H   K   S   E   V   A   H   R   F
! 1099  ggt tcc ggt ggt gac gct cac aag tcc gaa gtc gct cAC CGG Ttc
!                                     AgeI....
!
!   106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120
!   K   D   L   G   E   E   N   F   K   A   L   V   L   I   A
! 1144  aag gaC CTA GGt gag gaa aac ttc aag gct ttg gtc ttg atc gct
!                                     AvrII...
!
!   121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135
!   F   A   Q   Y   L   Q   Q   C   P   F   E   D   H   V   K
! 1189  ttc gct caa tac ttg caa caa tgt cca ttc gaa gat CAC GTC aag
!                                     BmgBI..
!
!   136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150
!   L   V   N   E   V   T   E   F   A   K   T   C   V   A   D
! 1234  ttg gtc aac gaa gtt acc gaa ttc gct aag act tgt gtt gct gac
!
!   151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165
!   E   S   A   E   N   C   D   K   S   L   H   T   L   F   G
! 1279  gaa tct gct gaa aac tgt gac aag tcc ttg cac acc ttg ttc ggt
!
!   166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180
!   D   K   L   C   T   V   A   T   L   R   E   T   Y   G   E
! 1324  gat aag ttg tgt act gtt gct acc ttg aga gaa acc tac ggt gaa
!
!   181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195
!   M   A   D   C   C   A   K   Q   E   P   E   R   N   E   C
! 1369  atg gct gac tgt tgt gct aag caa gaa cca gaa aga aac gaa tgt
!
!   196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
!   F   L   Q   H   K   D   D   N   P   N   L   P   R   L   V
! 1414  ttc ttg caa cac aag gac gac aac cca aac ttg cca aga ttg gtt
!
!   211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225
!   R   P   E   V   D   V   M   C   T   A   F   H   D   N   E
! 1459  aga cca gaa gtt gac gtc atg tgt act gct ttc cac gac aac gaa
!
!   226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240
!   E   T   F   L   K   K   Y   L   Y   E   I   A   R   R   H
! 1504  gaa acc ttc ttg aag aAG TAC Ttg tac gaa att gct aga aga cac

```

10

20

30

40

40

```

!      451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465
!      L   E   K   C   C   A   A   A   D   P   H   E   C   Y   A
2179   ttg gaa aag tgt tgt gct gct gct gac cca cac gaa tgt tac gct
!
!      466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480
!      K   V   F   D   E   F   K   P   L   V   E   E   P   Q   N
2224   aag gtt ttc gat gaa ttc aag cca ttg gtc gaa gaa cca caa aac
!
!      481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495
!      L   I   K   Q   N   C   E   L   F   E   Q   L   G   E   Y
2269   tTG ATC Aag caa aac tgt gaa ttg ttc gaa caa ttg ggt gaa tac
!      BclI....
!
!      496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510
!      K   F   Q   N   A   L   L   V   R   Y   T   K   K   V   P
2314   aag ttc caa aac gct ttg ttg gtt aga tac act aag aag gtc cca
!
!      511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525
!      Q   V   S   T   P   T   L   V   E   V   S   R   N   L   G
2359   caa gtc tCC Acc cca act tTG Gtt gaa gtc TCT AGA aac ttg ggt
!      XcmI..... XbaI... (2/2)
!
!      526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540
!      K   V   G   S   K   C   C   K   H   P   E   A   K   R   M
2404   aag gtc ggt tct aag tgt tgt aag cac cca gaa gct aag aGA ATG
!      BsmI....
!
!      541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555
!      P   C   A   E   D   Y   L   S   V   V   L   N   Q   L   C
2449   Cca tgt gct gaa gat tac ttg tcc gtc gtt ttg aac caa ttg tgt
!      BsmI..
!
!      556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570
!      V   L   H   E   K   T   P   V   S   D   R   V   T   K   C
2494   gtt ttg cac gaa aaG ACc cca GTC tct gat aga gtC ACc aaG TGt
!      PshAI..... DraIII.....
!      AlwNI.....
!
!      571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585
!      C   T   E   S   L   V   N   R   R   P   C   F   S   A   L
2539   tgt act gaa tct ttg GTT AAC aga aga cca tgt ttc tct gct ttg
!      HpaI...
!
!      586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600
!      E   V   D   E   T   Y   V   P   K   E   F   N   A   E   T
2584   gaa GTC GAC gaa act tac gtt cca aag gaa ttc aac gct gaa act
!      SalI...
!
!      601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615
!      F   T   F   H   A   D   I   C   T   L   S   E   K   E   R
2629   ttc acc ttc cac gct GAT ATC tgt acc ttg tcc gaa aag gaa aga
!      EcoRV..
!
!      616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630
!      Q   I   K   K   Q   T   A   L   V   E   L   V   K   H   K
2674   caa att aag aag caa act gct ttg gtt gaa ttg gtc aag cac aag
!
!      631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645
!      P   K   A   T   K   E   Q   L   K   A   V   M   D   D   F
2719   cca aag gct act aag gaa caa ttg aag gct gtc atg gat gat ttc

```

10

20

30

40

```

!      646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660
!      A  A  F  V  E  K  C  C  K  A  D  D  K  E  T
2764   gct gct ttc gtt gaa aag tgt tgt aag gct gat gat aag gaa act
!
!      661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675
!      C  F  A  E  E  G  K  K  L  V  A  A  S  Q  A
2809   tgt ttc gct gaa gaa ggt aag aag ttg gtc gct gct tcc caa gct
!
!      676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690
!      A  L  G  L  G  G  S  G  G  S  G  G  S  G  G
2854   gCC TTA GGc tta ggt ggt tct ggt ggt tcc ggt ggt TCC GGA ggt
!      Bsu36I...                               BspEI..
!
!      691 692 693 694
!      S  G  G  T
2899   tcc ggt GGT ACC          taa tAA GCTTa attccttatga
!              KpnI...          Stop Stop
!                      HindIII(2/2)
!
2932   tttatgattt ttattattaa ataagTTATA Aaaaaaataa gtGTATACaa attttaaagt
!              PsiI...                               BstZ17I
!
2992   gactcctagg ttttaaaacg aaaattccta ttcttgagta actccttcct gtaggtcagg
3052   ttgctttctc aggtatagca tgaggtcgct cttattgacc acacctctac cgGCATGCCg
!              SphI..
!
3112   agcaaatgcc tgcaaatcgc tccccatttc acccaattgt agatatgcta actccagcaa
3172   tgagttgatg aatctcggtg tgtattttat gtcctcagag gacaacacct gttgtaatcg
3232   ttcttcaca cgcatCGCGG CCGC
!              NotI.....

```

10

20

(SEQ. ID NO: _____)

【 0 2 7 0 】

表 2 7 : D X - 8 9 0 の 2 回 目 の コード 向け に B s p E I / K p n I 部 位 で 挿 入 さ れ る D
N A

【 化 3 5 】

30

```

TCCGGAaggta gtggtggctc cgggtggtgag gcttgcaatc ttcctatcgt
Ccggtggccct tgcategcct tttttcctcg ttgggccttt gacgccgtca
Aaggcaaatg cgtccttttt ccttacggcg gttgccaggg caatggcaat
Aaattttata gcgagaaaga gtgccgtgag tattgcggcg tcccttaata
aGGTACC (SEQ. ID NO: _____)

```

【 0 2 7 1 】

表 2 8 : 2 × D X 8 9 0 付 加 p D B 2 3 0 0 X 3 の N o t I カ セ ッ ト

40

D N A 配 列 は S E Q I D N O : _____ を 有 し て い る。

A A 配 列 は S E Q I D N O : _____ を 有 し て い る。

1 ~ 3 回 切 断 さ れ た 酵 素

\$ = D A M 部 位、* = D C M 部 位、& = 双 方

【化 3 6】

```
!
! DNA sequence has SEQ ID NO: ____
! AA Sequence has SEQ ID NO:
! Enzymes that cut from 1 to 3 times.
!
! $ = DAM site, * = DCM site, & = both
!
!NotI GCggcgcg      2      1  3434
!EagI Cggccg        2      2  3435
!KasI Ggcgcc        1      .160
!AfeI AGCgct        1      193
!NaeI GCCggc        1      234
!NcoMIV Gccggc      1      234
```

!BsgI ctgcac	1	450	
!BcgI gcannnnntcg	1	568	
!BanII GRGCYc	1	620	
!PstI CTGCAG	1	636	
!AflIII Cttaag	1	763	
!HindIII Aagctt	2	801	3101
!BglIII Agatct	1	883\$	
!PflMI CCANNNNntgg	1	994	
!NdeI CATatg	1	995	
!BamHI Ggatcc	1	1072\$	
!AgeI Accggt	1	1136	
!AvrII Cctagg	1	1149	
!BmgBI CACgtc	1	1225\$	
!ScaI AGTact	1	1520	
!EarI CTCTTCNnnn	1	1923	
!PvuII CAGctg	1	2006	
!BclI Tgatca	1	2270\$	
!XcmI CCANNNNNnnntgg	1	2366	
!BsmI GAATGCN	1	2444	
!PshAI GACNNngtc	1	2508	
!AlwNI CAGNNNctg	1	2513	
!DraIII CACMNNgtg	1	2529	
!HpaI GTTaac	1	2554	
!SalI Gtcgac	1	2587	
!EcoRV GATatc	1	2644	
!Bsu36I CCtnagg	1	2855	
!BspEI Tccgga	1	2890	
!PflFI GACNngtc	1	2980	
!Tth111I GACNngtc	1	2980	
!Acc65I Ggtacc	1	3091	
!KpnI GGTACc	1	3091	
!PsiI TTAtaa	1	3143	
!BstZ17I GTAtac	1	3160	
!SphI GCATGc	1	3290	

```

-----
1  GCGGCCGCcc gtaatgcggt atcgtgaaag cgaaaaaaaa actaacagta gataagacag
!   NotI....
!
61  atagacagat agagatggac gagaaacagg gggggagaaa aggggaaaag agaaggaaaag
121 aaagactcat ctatcgaga taagacaatc aaccctcatG GCGCCTccaa ccaccatccg
!                                     NarI...
!
181 cactagggac caAGCGCTcg caccgttagc aacgcttgac tcacaaacca actGCCGGCt
!                               AfeI..                               NgoMIV
!
241 gaaagagctt gtgcaatggg agtgccaatt caaaggagcc gaatacgtct gctcgccctt
301 taagaggctt tttgaacact gcattgcacc cgacaaatca gccactaact acgagggtcac
361 ggacacatat accaatagtt aaaaattaca tatactctat atagcacagt agtgtgataa
421 ataaaaaatt ttgccaagac ttttttaaaC TGCAcccgac agatcagggtc tgtgcctact
!                                     BsgI...
!
481 atgcacttat gcccggggtc ccgggaggag aaaaaacgag ggctgggaaa tgtccgtgga
541 ctttaaacgc tccgggttag cagagtaGCA gggcttTCGg ctttggaat ttaggtgact
!                                     BcgI.....
!
601 tgttgaaaaa gcaaaatttg ggctcagtaa tgCCActgca gTGGcttatc acgccaggac
!                                     BstXI.....
!                                     PstI...
!
661 tgccgggagtg gccgggggcaa acacaccgc gataaagagc gcgatgaata taaaaggggg
721 ccaatgttac gtcccgttat attggagttc ttcccataca aaCTTAAGag tccaattagc

```

10

20

30

40

AflIII.

```

781  ttcatcgcca ataaaaaac AAGCTTaacc taattctaac aagcaaag
      HindIII (1/2)

      Signal sequence ----->
      1  2  3  4  5  6  7  8  9  10 11 12 13 14 15
      M  K  W  V  F  I  V  S  I  L  F  L  F  S  S
829  atg aag tgg gtt ttc atc gtc tcc att ttg ttc ttg ttc tcc tct

      Signal sequence -----> DX890, first instance -->
      16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
      A  Y  S  R  S  L  D  K  R  E  A  C  N  L  P
874  gct tac tct AGA TCT ttg gat aag aga gaa gcc tgt aac ttg cca
      BglIII..

      31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45
      I  V  R  G  P  C  I  A  F  F  P  R  W  A  F
919  att gtt aga ggt cca tgt att gct ttc ttc cca aga tgg gct ttc

      46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
      D  A  V  K  G  K  C  V  L  F  P  Y  G  G  C
964  gat gct gtt aag ggt aag tgt gtt ttg ttc CCA tat ggT GGt tgt
      PflMI.....
      NdeI....

      61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
      Q  G  N  G  N  K  F  Y  S  E  K  E  C  R  E
1009  caa ggt aac ggt aac aag ttc tac tct gaa aag gaa tgt aga gaa

      ----DX890#1-----> ----- Linker -----
      76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
      Y  C  G  V  P  G  G  S  G  G  S  G  G  S  G
1054  tac tgt ggt gtt cca ggt GGA TCC ggt ggt tcc ggt ggt tct ggt
      BamHI..

      --- Linker ----> ----- rHA gene ----until codon 679 -->
      91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105
      G  S  G  G  D  A  H  K  S  E  V  A  H  R  F
1099  ggt tcc ggt ggt gac gct cac aag tcc gaa gtc gct cAC CGG Ttc
      AgeI....

      106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120
      K  D  L  G  E  E  N  F  K  A  L  V  L  I  A
1144  aag gaC CTA GGt gag gaa aac ttc aag gct ttg gtc ttg atc gct
      AvrII...

      121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135
      F  A  Q  Y  L  Q  Q  C  P  F  E  D  H  V  K
1189  ttc gct caa tac ttg caa caa tgt cca ttc gaa gat cac gtc aag

      136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150
      L  V  N  E  V  T  E  F  A  K  T  C  V  A  D
1234  ttg gtc aac gaa gtt acc gaa ttc gct aag act tgt gtt gct gac

      151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165
      E  S  A  E  N  C  D  K  S  L  H  T  L  F  G
1279  gaa tct gct gaa aac tgt gac aag tcc ttg cac acc ttg ttc ggt

      166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180
      D  K  L  C  T  V  A  T  L  R  E  T  Y  G  E

```

10

20

30

40

```

1324  gat aag ttg tgt act gtt gct acc ttg 'aga gaa acc tac ggt gaa
!
!
181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195
! M  A  D  C  C  A  K  Q  E  P  E  R  N  E  C
1369  atg gct gac tgt tgt gct aag caa gaa cca gaa aga aac gaa tgt
!
!
196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
! F  L  Q  H  K  D  D  N  P  N  L  P  R  L  V
1414  ttc ttg caa cac aag gac gac aac cca aac ttg cca aga ttg gtt
!
!
211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225
! R  P  E  V  D  V  M  C  T  A  F  H  D  N  E
1459  aga cca gaa gtt gac gtc atg tgt act gct ttc cac gac aac gaa
!
!
226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240
! E  T  F  L  K  K  Y  L  Y  E  I  A  R  R  H
1504  gaa acc ttc ttg aag aag tac ttg tac gaa att gct aga aga cac
!
!
241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255
! P  Y  F  Y  A  P  E  L  L  F  F  A  K  R  Y
1549  cca tac ttc tac gct cca gaa ttg ttg ttc ttc gct aag aga tac
!
!
256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270
! K  A  A  F  T  E  C  C  Q  A  A  D  K  A  A
1594  aag gct gct ttc acc gaa tgt tgt caa gct gct gat aag gct gct
!
!
271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285
! C  L  L  P  K  L  D  E  L  R  D  E  G  K  A
1639  tgt ttg ttg cca aag ttg gat gaa ttg aga gac gaa ggt aag gct
!
!
286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300
! S  S  A  K  Q  R  L  K  C  A  S  L  Q  K  F
1684  tct tcc gct aag caa aga ttg aag tgt gct tcc ttg caa aag ttc
!
!
301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315
! G  E  R  A  F  K  A  W  A  V  A  R  L  S  Q
1729  ggt gaa aga gct ttc aag gct tgg gct gtc gct aga ttg tct caa
!
!
316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330
! R  F  P  K  A  E  F  A  E  V  S  K  L  V  T
1774  aga ttc cca aag gct gaa ttc gct gaa gtt tct aag ttg gtt act
!
!
331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345
! D  L  T  K  V  H  T  E  C  C  H  G  D  L  L
1819  gac ttg act aag gtt cac act gaa tgt tgt cac ggt gac ttg ttg
!
!
346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360
! E  C  A  D  D  R  A  D  L  A  K  Y  I  C  E
1864  gaa tgt gct gat gac aga gct gac ttg gct aag tac atc tgt gaa
!
!
361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375
! N  Q  D  S  I  S  S  K  L  K  E  C  C  E  K
1909  aac caa gac tct atc tct tcc aag ttg aag gaa tgt tgt gaa aag
!
!
376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390
! P  L  L  E  K  S  H  C  I  A  E  V  E  N  D
1954  cca ttg ttg gaa aag tct cac tgt att gct gaa gtt gaa aac gat
!
!
391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405
! E  M  P  A  D  L  P  S  L  A  A  D  F  V  E
1999  gaa atg cca gct gac ttg cca tct ttg gct gct gac ttc gtt gaa

```

10

20

30

40

```

!
!
!   406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420
!   S   K   D   V   C   K   N   Y   A   E   A   K   D   V   F
! 2044 tct aag gac gtt tgt aag aac tac gct gaa gct aag gac gtc ttc
!
!   421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435
!   L   G   M   F   L   Y   E   Y   A   R   R   H   P   D   Y
! 2089 ttg ggt atg ttc ttg tac gaa tac gct aga aga cac cca gac tac
!
!   436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450
!   S   V   V   L   L   L   R   L   A   K   T   Y   E   T   T
! 2134 tcc gtt gtc ttg ttg ttg aga ttg gct aag acc tac gaa act acc
!
!   451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465
!   L   E   K   C   C   A   A   A   D   P   H   E   C   Y   A
! 2179 ttg gaa aag tgt tgt gct gct gct gac cca cac gaa tgt tac gct
!
!   466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480
!   K   V   F   D   E   F   K   P   L   V   E   E   P   Q   N
! 2224 aag gtt ttc gat gaa ttc aag cca ttg gtc gaa gaa cca caa aac
!
!   481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495
!   L   I   K   Q   N   C   E   L   F   E   Q   L   G   E   Y
! 2269 ttg atc aag caa aac tgt gaa ttg ttc gaa caa ttg ggt gaa tac
!
!   496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510
!   K   F   Q   N   A   L   L   V   R   Y   T   K   K   V   P
! 2314 aag ttc caa aac gct ttg ttg gtt aga tac act aag aag gtc cca
!
!   511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525
!   Q   V   S   T   P   T   L   V   E   V   S   R   N   L   G
! 2359 caa gtc tcc acc cca act ttg gtt gaa gtc tct aga aac ttg ggt
!
!   526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540
!   K   V   G   S   K   C   C   K   H   P   E   A   K   R   M
! 2404 aag gtc ggt tct aag tgt tgt aag cac cca gaa gct aag aga atg
!
!   541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555
!   P   C   A   E   D   Y   L   S   V   V   L   N   Q   L   C
! 2449 cca tgt gct gaa gat tac ttg tcc gtc gtt ttg aac caa ttg tgt
!
!   556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570
!   V   L   H   E   K   T   P   V   S   D   R   V   T   K   C
! 2494 gtt ttg cac gaa aag acc cca gtc tct gat aga gtc acc aag tgt
!
!   571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585
!   C   T   E   S   L   V   N   R   R   P   C   F   S   A   L
! 2539 tgt act gaa tct ttg gtt aac aga aga cca tgt ttc tct gct ttg
!
!   586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600
!   E   V   D   E   T   Y   V   P   K   E   F   N   A   E   T
! 2584 gaa gtc gac gaa act tac gtt cca aag gaa ttc aac gct gaa act
!
!   601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615
!   F   T   F   H   A   D   I   C   T   L   S   E   K   E   R
! 2629 ttc acc ttc cac gct gat atc tgt acc ttg tcc gaa aag gaa aga
!
!   616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630
!   Q   I   K   K   Q   T   A   L   V   E   L   V   K   H   K
! 2674 caa att aag aag caa act gct ttg gtt gaa ttg gtc aag cac aag
!

```

10

20

30

40

```

!      631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645
!      P   K   A   T   K   E   Q   L   K   A   V   M   D   D   F
2719   cca aag gct act aag gaa caa ttg aag gct gtc atg gat gat ttc
!
!      646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660
!      A   A   F   V   E   K   C   C   K   A   D   D   K   E   T
2764   gct gct ttc gtt gaa aag tgt tgt aag gct gat gat aag gaa act
!
!      661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675
!      C   F   A   E   E   G   K   K   L   V   A   A   S   Q   A
2809   tgt ttc gct gaa gaa ggt aag aag ttg gtc gct gct tcc caa gct
!
!                               Linker----->
!      676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690
!      A   L   G   L   G   G   S   G   G   S   G   G   S   G   G
2854   gCC TTA GGc tta ggt ggt tct ggt ggt tcc ggt ggt TCC GGA ggt
      Bsu36I...                               BspEI..
!
!                               DX-890(second encoding)----to end-->>
!      691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705
!      S   G   G   S   G   G   E   A   C   N   L   P   I   V   R
2899   agt ggt ggc tcc ggt ggt gag gct tgc aat ctt cct atc gtc cgt
!
!      706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720
!      G   P   C   I   A   F   F   P   R   W   A   F   D   A   V
2944   ggc cct tgc atc gcc ttt ttt cct cgt tgg gcc ttt gac gcc gtc
!
!      721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735
!      K   G   K   C   V   L   F   P   Y   G   G   C   Q   G   N
2989   aaa ggc aaa tgc gtc ctt ttt cct tac ggc ggt tgc cag ggc aat
!
!      736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750
!      G   N   K   F   Y   S   E   K   E   C   R   E   Y   C   G
3034   ggc aat aaa ttt tat agc gag aaa gag tgc cgt gag tat tgc ggc
!
!      751 752
!      V   P
3079   gtc cct taa taa          GGT ACC          taa tAA GCTTa attcttatga
!                               KpnI...          Stop Stop
!                               HindIII(2/2)
!
3118   tttatgattt ttattattaa ataagTTATA Aaaaaaataa gtGTATACaa attttaaagt
!                               PsiI...          BstZ17I
!
3178   gactcttagg ttttaaaacg aaaattctta ttcttgagta actctttcct gtaggtcagg
3238   ttgctttctc aggtatagca tgaggteget cttattgacc acacctctac cgGCATGCcg
!                               SphI..
!
3298   agcaaatgcc tgcaaatcgc tccccatttc acccaattgt agatatgcta actccagcaa
3358   tgagttgatg aatctcggtg tgtattttat gtcctcagag gacaacacct gttgtaatcg
3418   ttcttcacac cggatCGCGG CCGC
!                               NotI.....

```

(SEQ. ID NO:_____).

10

20

30

40

【 0 2 7 2 】

表 2 9 : D X 8 9 0 :: (G G S) ₄ G G :: H A :: (G G S) ₄ G G :: D X 8 9 0 の A A 配
列

【化 3 7】

EACNLPIVRG PCIAFFPRWA FDAVKGKCVL FPYGGCQNG NKFYSEKECR
 EYCGVPGGSG GSGSGSGSGG DAHKSEVAHR FKDLGEENFK ALVLIAFAQY
 LQQCPFEDHV KLVNEVTEFA KTCVADESAR NCDKSLHTLF GDKLCTVATL
 RETYGEMADC CAKQEPERNE CFLQHKDDNP NLPRLVRPEV DVMCTAFHDN
 EETFLKKYLY EIARRHPYFY APELLFFAKR YKAAFTECCQ AADKAACLLP
 KLDELRLDEGK ASSAKQRLKC ASLQKFGERA FKAWAVARLS QRFPAEFAE
 VSKLVTDLTK VHTECCHGDL LECADDRADL AKYICENQDS ISSKLKECCE
 KPLLEKSHCI AEVENDEMPA DLPSLAADFV ESKDVCKNYA EAKDVFLGMF
 LYEYARRHPD YSVVLLLRLLA KTYETTLEKC CAAADPHECY AKVFDEFKPL
 VEEPQNLIKQ NCELFEQLGE YKFQNALLRV YTKKVPQVST PTLVEVSRNL
 GKVGSCKCKH PEAKRMPCAE DYLSVVLNQL CVLHEKTPVS DRVTKCCTES
 LVNRRPCFSA LEVDETYVPK EFNAETFTFH ADICTLSEKE RQIKKQTALV
 ELVKHKPKAT KEQLKAVMDD FAAFVEKCK ADDKETCFAE EGKKLVAAASQ
 AALGLGGSGG SGGSGSGSGS GGEACNLPIV RGPCIAFFPR WAFDAVKGKC
 VLFYGGCQG NGNKFYSEKE CREYCGVP (SEQ ID NO:____)

10

20

【0 2 7 3】

表 3 0 : N 末端 B g l I I - B a m H I D X - 1 0 0 0 c D N A の D N A 配列

【化 3 8】

AGA TCT TTG GAT AAG AGA
 gag gct atg cat tcc ttc tgc gcc ttc aag
 gct gag act ggt cct tgt aga gct agg ttc
 gac cgt tgg ttc ttc aac atc ttc acg cgt
 cag tgc gag gaa ttc att tac ggt ggt tgt
 gaa ggt aac cag aac cgg ttc gaa tct cta
 gag gaa tgt aag aag atg tgc act cgt gac
 GGA TCC (SEQ ID NO:____)

30

【0 2 7 4】

表 3 1 : D X 1 0 0 0 :: (G G S) ₄ G G :: H A の A A 配列

【化 3 9】

EAMHSFCAFK AETGPCRARF DRWFFNIFTR QCEEFIYGGC EGNQNRFESL
 EECKKMCTRD GSGGGSGGSG GSGGDAHKSE VAHRFKDLGE ENFKALVLIA
 FAQYLQQCPF EDHVKLNEV TEFATCTVAD ESAENCCKSL HTLFGDKLCT
 VATLRETYGE MADCCAKQEP ERNECFLOHK DDNPPLPRLV RPEVDVMCTA
 FHDNEETFLK KYLYEIARRH PYFYAPELLF FAKRYKAAFT ECCQAADKAA
 CLLPKLDELRL DEGKASSAKQ RLKCASLQKF GERAFAKAWAV ARLSQRFPA
 EFAEVSKLVT DLTQVHTECC HGDLLCADD RADLAKYICE NQDSISSKLK
 ECCEKPLLEK SHCIAEVEND EMPADLPSLA ADFVESKDVC KNYAEAKDVF
 LGMFLYFYAR RHPDYSVLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP HECYAKVFDE
 FKPLVEEPQN LIKQNCLEFE QLGEYKFQNA LLVRYTKKVP QVSTPTLVEV
 SRNLGKVGSK CCKHPEAKRM PCAEDYLSVV LNQLCVLHEK TPVSDRVTKC
 CTESLVNRRP CFSALEVDET YVPKEFNAET FTFHADICTL SEKERQIKKQ
 TALVELVKHK PKATKEH (SEQ ID NO:____)

10

20

【0 2 7 5】

表 3 2 : 2 回 目 の コード - N 末 端 B s p E I - K p n I D X - 8 8 c D N A の D N A 配列

【化 4 0】

TCC GGA ggt agt ggt ggc tcc ggt ggt
 GAg GCc ATG CAc
 TCT TTC TGT GCT TTC AAG GCT GAC GAC GGT
 CCG TGC AGA GCT GCT CAC CCA AGA TGG TTC
 TTC AAC ATC TTC ACG CGA CAA TGC GAG GAG
 TTC ATC TAC GGT GGT TGT GAG GGT AAC CAA
 AAC AGA TTC GAG TCT CTA GAG GAG TGT AAG
 AAG ATG TGT ACT AGA GAC GGT taa taa GGT ACC (SEQ ID NO:____)

30

【0 2 7 6】

表 3 3 : D P I 1 4 : : H S A の A A 配列

【化 4 1】

EAVREVCSEQ AETGPCIAFF PRWYFDVTEG KCAPFFYGGC GGNRNNFDTE
EYCMVAVCGSA GSGSGSGSGS GSGGDAHKSE VAHRFKDLGE ENFKALVLIA
FAQYLQQCPF EDHVKLNVNEV TEFAKTCVAD ESAENCCKSL HTLFGDKLCT
VATLRETYGE MADCCAKQEP ERNECFLQHK DDNPNLRLV RPEVDVMCTA
FHDNEETFLK KYLYEIARRH PYFYAPELLF FAKRYKAAFT ECCQAADKAA
CLLPKLDEL R DEGKASSAKQ RLKASLQKF GERAFAKAWAV ARLSQRFPKA
EFAEVSKLVT DLTQVHTECC HGDLLCADD RADLAKYICE NQDSISSKLK
ECCEKPLLEK SHCIAEVEND EMPADLPSLA ADFVESKDVC KNYAEAKDVF
LGMFLYEYAR RHPDYSVLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP HECYAKVFDE
FKPLVEEPQN LIQNCELFE QLGEYKFQNA LLVRYTKKVP QVSTPTLVEV
SRNLGKVGSK CCKHPEAKRM PCAEDYLSVV LNQLCVLHEK TPVSDRVTKC
CTESLVNRRP CFSALEVDET YVPKEFNAET FTFHADICTL SEKERQIKKQ
TALVELVKHK PKATKEH (SEQ ID NO: ____)

10

【図面の簡単な説明】

20

【0277】

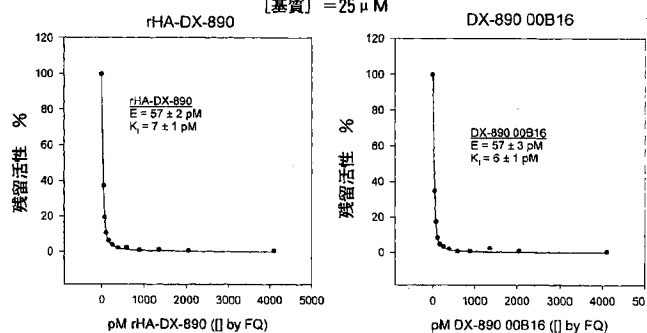
【図1】DX-890およびDX-890-HSA融合体の K_i 測定。【図2】 125 I-DX-890(左)および 125 I-DX-890-HSA融合体の血漿クリアランス曲線。【図3】SE-HPLC(Superose-12)による正常マウス血漿中の 125 I-DX890。【図4】正常マウス血漿中における 125 I-HAS-DX890のSE-HPLC(Superose-12)プロファイル。【図5】ウサギにおける 125 I標識DX-890およびHSA-DX-890の血漿クリアランス。

30

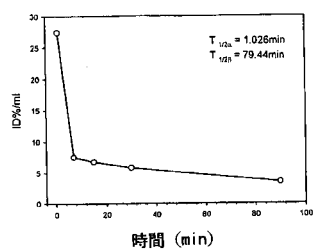
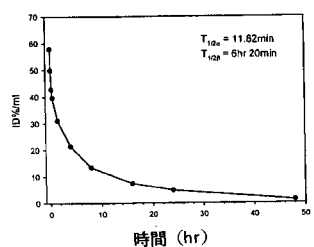
【図6】ウサギ血漿サンプルのSEC分析。

【图 1】

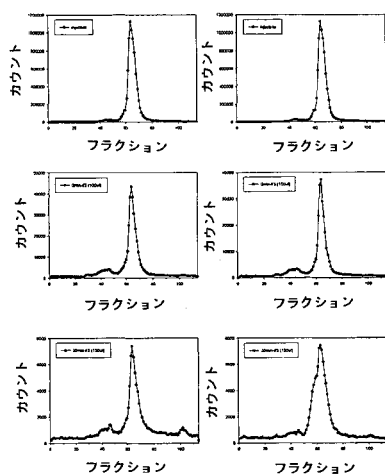
rHA-DX-890 バッチ 1743#09 K_i 測定
[HNE] = 100 pM
[基質] = 25 μM



【圖 2】

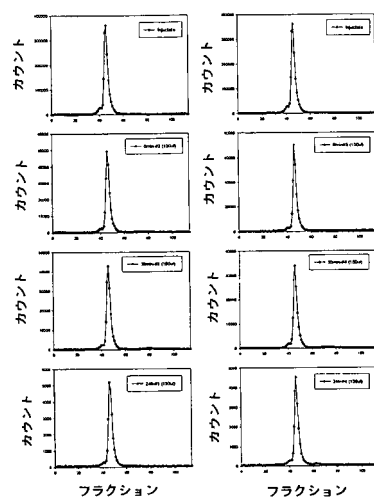
¹²⁵I-DX890 の血漿クリアランス¹²⁵I-HSA-DX890 の血漿クリアランス

【 図 3 】

SE-HPLC Superose-12による正常マウス血漿中の ^{125}I -DX890

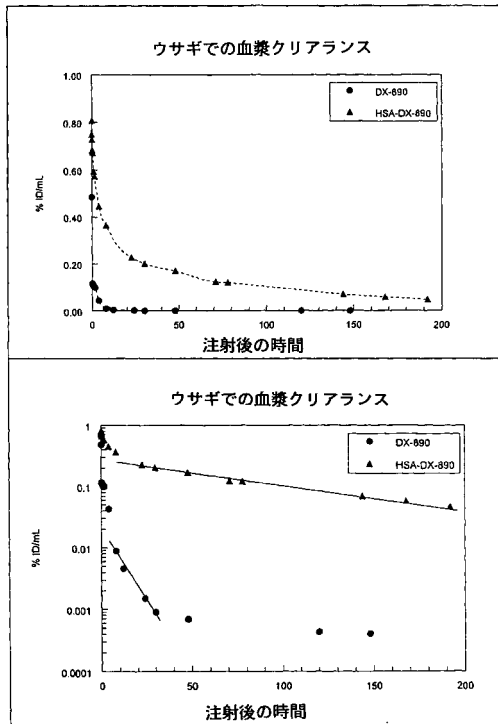
【 図 4 】

正常マウス血漿中における ^{125}I -HSA-DX890 の
SE-HPLC(Superose-12)プロファイル



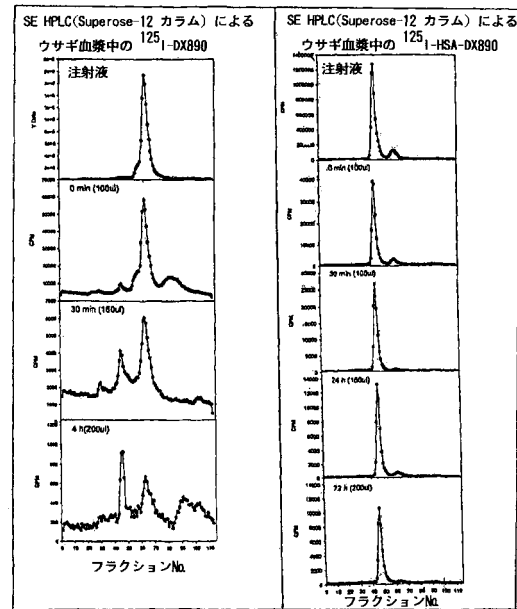
【図 5】

ウサギにおける ^{125}I 標識DX890 およびHSA-DX890 の血漿クリアランス



【図 6】

ウサギ血漿サンプルのSEC分析



【配列表】

2005538932000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 14/76	
C 0 7 K 14/76	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 9/99	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 9/99	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 P 21/02	A 6 1 K 37/64	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN, GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC, EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,M X,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (71)出願人 305038991
アベンティス、ベーリング、リミテッド、ライアビリティー、カンパニー
AVENTIS BEHRING L.L.C.
アメリカ合衆国ペンシルバニア州、キング、オブ、ブルッシア、ファースト、アベニュー、1020
- (71)出願人 591131523
デルタ バイオテクノロジー リミテッド
DELTA BIOTECHNOLOGY LIMITED
イギリス国ノッティンガム、キャッスル、ブルバード、59、キャッスル、コート
- (71)出願人 502352519
ダイアックス、コープ
DYAX CORP.
アメリカ合衆国マサチューセッツ州、ケンブリッジ、テクノロジー、スクエア、300
- (74)代理人 100075812
弁理士 吉武 賢次
- (74)代理人 100091487
弁理士 中村 行孝
- (74)代理人 100094640
弁理士 紺野 昭男
- (74)代理人 100107342
弁理士 横田 修孝
- (72)発明者 ハンス ペーター、ハウザー
ドイツ連邦共和国マールブルク、フォイエルドルンベーク、6
- (72)発明者 トーマス、バイメル
ドイツ連邦共和国グラードン、バッハ、リヒャルト ワグナー シュトラッセ、8
- (72)発明者 バル、ロンバーク
アメリカ合衆国ペンシルバニア州、パーカーフォード、オールド、シェイキル、ロード、1330
- (72)発明者 スコット、エム・キー
アメリカ合衆国イリノイ州、バーボンナイス、キャシー、ドライブ、218
- (72)発明者 ダレル、スリーブ
イギリス国ノッティンガム、ウェスト、ブリッジフォード、ブルーバード、レディーバッグ、ロー
ド、66

(72)発明者 ロバート、チャールズ、ラドナー

アメリカ合衆国メリーランド州、アイジヤムスビル、グリーン、パレー、ロード、3827

(72)発明者 アーサー、シー・レイ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州、ニュートン、アデナ、ロード、122

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA19 BA40 CA04 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA11
4B064 AG21 AG24 CA01 CA06 CA10 CA19 CC24 CE10 DA01
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 BA02 CA24 CA44
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA41 CA18 CA53 DC32 NA14
ZA51 ZA53 ZA96 ZB11 ZB26 ZC20
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA55 DA56 DA70 EA20
FA74 GA25