(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3805785号
(P3805785)
(45)発行日　平成18年8月9日(2006.8.9)　(24)登録日　平成18年5月19日(2006.5.19)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 14/81	(2006.01)	C07K	14/81	ZNA
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	
A61K 38/55	(2006.01)	A61K	37/64	
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	111

請求項の数 25　(全 40 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平7-518726
(86)(22)出願日　平成7年1月11日(1995.1.11)
(65)公表番号　特表平9-511131
(43)公表日　平成9年11月11日(1997.11.11)
(86)国際出願番号　PCT/US1995/000299
(87)国際公開番号　WO1995/021601
(87)国際公開日　平成7年8月17日(1995.8.17)
審査請求日　平成14年1月11日(2002.1.11)
(31)優先権主張番号　08/179,964
(32)優先日　平成6年1月11日(1994.1.11)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　08/208,264
(32)優先日　平成6年3月10日(1994.3.10)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
ダイアックス　コープ.
アメリカ合衆国. ０２１３９　マサチューセッツ, ケンブリッジ, ワン　ケンドール　スクエア, ビルディング　６００, フィフス　フロア
(74)代理人
弁理士　岡部　正夫
(74)代理人
弁理士　加藤　伸晃
(74)代理人
弁理士　産形　和央
(74)代理人
弁理士　岡部　讓

最終頁に続く

(54)【発明の名称】カリクレイン阻害クニッツドメイン蛋白質およびその相同体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
天然には見出されないクニッツドメインからなるカリクレイン阻害タンパク質において、クニッツドメインが下記のアミノ酸配列を有するもの：Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Xaa22-Xaa23-Xaa24-Xaa25-Xaa26-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31-Xaa32-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa-37-Xaa38-Xaa39-Xaa40-Xaa41-Xaa42-Xaa43-Xaa44-Xaa45-Xaa46-Xaa47-Xaa48-Xaa49-Xaa50-Xaa51-Xaa52-Xaa53-Xaa54-Xaa55-Xaa56-Xaa57-Xaa58
(ただし、Xaa1,Xaa2,Xaa3,Xaa4,Xaa56,Xaa57及びXaa58はいずれのアミノ酸でもよく、また、なくてもよく、
Xaa6,Xaa7,Xaa8,Xaa9,Xaa24,Xaa25,Xaa26,Xaa27,Xaa28,Xaa29,Xaa41,Xaa42,Xaa44,Xaa46,Xaa47,Xaa48,Xaa49,Xaa50,Xaa52,Xaa53及びXaa54はいずれのアミノ酸でもよく、
Xaa5はCysであり、
Xaa10はAsp,Glu,Ala,Gly,Ser及びThrからなる群より選ばれ、
Xaa11はAsp,Gly,Ser,Val,Glu,Leu,Met,Asn,Ile,Ala及びThrからなる群より選ばれ、
Xaa12はGlyであり、
Xaa13はArg,His,Pro,Asn,Ser,Thr,Ala,Gly,Lys及びGlnからなる群より選ばれ、
Xaa14はCysであり、
Xaa15はArg,Lys,Ala,Ser,Gly,Met,Asn及びGlnからなる群より選ばれ、Xaa16はAla,Gly,Ser,Asp及びAsnからなる群より選ばれ、

Xaa17はAla,Asn,Ser,Ile,Gly,Val,Gln及びThrからなる群より選ばれ、
Xaa18はHis,Leu,Gln及びAlaからなる群より選ばれ、
Xaa19はPro,Gln,Leu,Asn及びIleからなる群より選ばれ、
Xaa20はArg,Leu,Ala,Ser,Lys,Gln及びValからなる群より選ばれ、
Xaa21はTrp,Phe,Tyr,His及びIleからなる群より選ばれ、
Xaa22はPhe及びTyrからなる群より選ばれ、
Xaa23はPhe及びTyrからなる群より選ばれ、
Xaa30はCysであり、
Xaa31はGlu,Asp,Gln,Asn,Ser,Ala,Val,Leu,Ile及びThrからなる群より選ばれ、
Xaa32はGlu,Gln,Asp,Asn,Pro,Thr,Leu,Ser,Ala,Gly及びValからなる群より選ばれ、
Xaa33はPhe及びTyrからなる群より選ばれ、
Xaa34はSer,Thr,Ile,Val,Ala,Asn,Gly及びLeuからなる群より選ばれ、
Xaa35はTyr,Trp及びPheからなる群より選ばれ、
Xaa36はGly,Ser及びAlaからなる群より選ばれ、
Xaa37はGlyであり、
Xaa38はCysであり、
Xaa39はGly,Glu,Ala,Ser及びAspから選ばれ
Xaa40はGly及びAlaからなる群より選ばれ、
Xaa43はAsn及びGlyからなる群より選ばれ、
Xaa45はPhe及びTyrからなる群より選ばれ、
Xaa51はCysであり、
Xaa55はCysである）。

【請求項２】

天然には見出されないクニッツドメインからなるカリクレイン阻害タンパク質において、クニッツドメインが下記のアミノ酸配列を有するもの：Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Xaa22-Xaa23-Xaa24-Xaa25-Xaa26-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31-Xaa32-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa-37-Xaa38-Xaa39-Xaa40-Xaa41-Xaa42-Xaa43-Xaa44-Xaa45-Xaa46-Xaa47-Xaa48-Xaa49-Xaa50-Xaa51-Xaa52-Xaa53-Xaa54-Xaa55-Xaa56-Xaa57-Xaa58
(ただし、Xaa1,Xaa2,Xaa3,Xaa4,Xaa56,Xaa57及びXaa58はいずれのアミノ酸でもよく、また、なくてもよく、
Xaa6,Xaa7,Xaa8,Xaa9,Xaa24,Xaa25,Xaa26,Xaa27,Xaa28,Xaa29,Xaa41,Xaa42,Xaa44,Xaa46,Xaa47,Xaa48,Xaa49,Xaa50,Xaa52,Xaa53及びXaa54はいずれのアミノ酸でもよく、
Xaa5はCysであり、
Xaa10はAsp,Glu,Ala,Gly,Ser及びThrからなる群より選ばれ、
Xaa11はAsp,Gly,Ser,Val,Glu,Leu及びMetからなる群より選ばれ、
Xaa12はGlyであり、
Xaa13はArg,His,Pro,Asn及びSerからなる群より選ばれ、
Xaa14はCysであり、
Xaa15はArg及びLysからなる群より選ばれ、
Xaa16はAla及びGlyからなる群より選ばれ、
Xaa17はAla,Asn,Ser及びIleからなる群より選ばれ、
Xaa18はHis,Leu及びGlnからなる群より選ばれ、
Xaa19はPro,Gln及びLeuからなる群より選ばれ、
Xaa20はArg,Leu,Ala,Ser,Lys,Gln及びValからなる群より選ばれ、
Xaa21はTrp及びPheからなる群より選ばれ、
Xaa22はPhe及びTyrからなる群より選ばれ、
Xaa23はPhe及びTyrからなる群より選ばれ、
Xaa30はCysであり、
Xaa31はGluであり、

Xaa32はGlu及びGlnからなる群より選ばれ、
Xaa33はPheであり、
Xaa34はSer,Thr及びIleからなる群より選ばれ、
Xaa35はTyrであり、
Xaa36はGly,Ser及びAlaからなる群より選ばれ、
Xaa37はGlyであり、
Xaa38はCysであり、
Xaa39はGly,Glu及びAlaからなる群より選ばれ
Xaa40はGly及びAlaからなる群より選ばれ、
Xaa43はAsn及びGlyからなる群より選ばれ、
Xaa45はPhe及びTyrからなる群より選ばれ、
Xaa51はCysであり、
Xaa55はCysである）。

【請求項３】
請求項２のタンパク質であって、
Xaa10はAsp及びGluからなる群より選ばれ、
Xaa11はAsp,Gly,Ser及びValからなる群より選ばれ、
Xaa20はArgであり、
Xaa36はGlyであるもの。

【請求項４】
KKII/3 #1(SEQ.ID.NO.5),KKII/3 #2(SEQ.ID.NO.6),KKII/3 #3(SEQ.ID.NO.7),KKII/3 #4(SEQ.ID.NO.8),KKII/3 #5(SEQ.ID.NO.9),KKII/3 #6(SEQ.ID.NO.10),KKII/3 #7(SEQ.ID.NO.11),KKII/3 #8(SEQ.ID.NO.12),KKII/3 #9(SEQ.ID.NO.13),KKII/3 #10(SEQ.ID.NO.14),KK2/#11(SEQ ID NO.22),KK2/#13(SEQ ID NO.19),KK2/#1(SEQ ID NO.23),KK2/#3(SEQ ID NO.28),KK2/#4(SEQ ID NO.24),KK2/#6(SEQ ID NO.25),KK2/#7(SEQ ID NO.30),KK2/#8(SEQ ID NO.27),KK2/#9(SEQ ID NO.29),KK2/#10(SEQ ID NO.26),KK2/#12(SEQ ID NO.31),and KK2con1(SEQ ID NO.32)からなる群より選ばれる参照配列に実質的に相同である配列を有する、血漿カリクレイン阻害タンパク質。

【請求項５】
過剰のカリクレイン活性に帰せられる疾患を防止または治療するための医薬組成物であって、請求項１から４のいずれかに記載のタンパク質をカリクレイン阻害量有するもの。

【請求項６】
その疾患が、キニンの生産の上昇により特徴付けられる、請求項５に記載の組成物。

【請求項７】
その疾患が、遺伝性血管浮腫である、請求項５又は６に記載の組成物。

【請求項８】
請求項１から４のいずれかに記載のタンパク質を標識してまたは不溶化形態で提供し、前記タンパク質と試料中のカリクレインのコンプレックスが形成されるかどうかを決定することからなる、カリクレインのアッセイ方法。

【請求項９】
請求項１から４のいずれかに記載のタンパク質を不溶化形態で提供し、不溶化タンパク質と混合物を接触させて混合物中のカリクレインを不溶化タンパク質に結合させることからなる、カリクレインの精製方法。

【請求項１０】
50から60のアミノ酸よりなるカリクレイン結合性タンパク質であって、天然には見出されないクニッツドメインを有し、前記クニッツドメインがジスフィルド結合をCys5-Cys55,Cys14-Cys38,及びCys30-Cys51に有し、さらに次のアミノ酸配列を有するもの:Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Xaa22-Xaa23-Xaa24-Xaa25-Xaa26-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31-Xaa32-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa-37-Xaa38-Xaa39-Xaa40-Xaa41-Xaa42-Xaa43-X

aa44-Xaa45-Xaa46-Xaa47-Xaa48-Xaa49-Xaa50-Xaa51-Xaa52-Xaa53-Xaa54-Xaa55-Xaa56-Xaa57-Xaa58
(ただし、Xaa1,Xaa2,Xaa3,Xaa4,Xaa56,Xaa57及びXaa58はいずれのアミノ酸でもよく、また、なくてもよく、
Xaa6,Xaa7,Xaa8,Xaa9,Xaa10,Xaa11,Xaa15,Xaa20,Xaa24,Xaa25,Xaa26,Xaa27,Xaa28,Xaa29,Xaa31,Xaa32,Xaa34,Xaa39,Xaa41,Xaa42,Xaa44,Xaa46,Xaa47,Xaa48,Xaa49,Xaa50,Xaa52,Xaa53,及びXaa54はいずれのアミノ酸でもよく、
Xaa5はCysであり、
Xaa12はGlyであり、
Xaa13はHis及びProからなる群より選ばれ、
Xaa14はCysであり、
Xaa16はAla及びGlyからなる群より選ばれ、
Xaa17はAla,Asn及びSerからなる群より選ばれ、
Xaa18はHis及びLeuからなる群より選ばれ、
Xaa19はGln,Leu及びProからなる群より選ばれ、
Xaa21はTrp,Phe及びTyrからなる群より選ばれ、
Xaa22はTyr及びPheからなる群より選ばれ、
Xaa23はTyr及びPheからなる群より選ばれ、
Xaa30はCysであり、
Xaa33はPheであり、
Xaa35はTyr及びTrpからなる群より選ばれ、
Xaa36はGly及びSerからなる群より選ばれ、
Xaa37はGlyであり、
Xaa38はCysであり、
Xaa40はGly及びAlaからなる群より選ばれ、
Xaa43はAsn及びGlyからなる群より選ばれ、
Xaa45はPhe及びTyrからなる群より選ばれ、
Xaa51はCysであり、
Xaa55はCysである）。

【請求項１１】
請求項10に記載のタンパク質であって、さらに、
Xaa31はGluであり、
Xaa32はGlu及びGlnからなる群より選ばれ、
Xaa34はSer,Thr及びIleからなる群より選ばれ、
Xaa39はGly,Glu及びAlaからなる群より選ばれるタンパク質。

【請求項１２】
請求項10に記載のタンパク質であって、さらに、
Xaa13はProであり、
Xaa16はAlaであり、
Xaa17はAlaであり、
Xaa18はHisであり
Xaa19はProであるタンパク質。

【請求項１３】
請求項12に記載のタンパク質であって、さらに、
Xaa31はGluであり、
Xaa32はGlu及びGlnからなる群より選ばれ、
Xaa34はSer,Thr及びIleからなる群より選ばれ、
Xaa39はGly,Glu及びAlaからなる群より選ばれるタンパク質。

【請求項１４】
請求項13に記載のタンパク質であって、さらに、

Xaa32はGluであり、
Xaa34はIleであり、
Xaa39はGluであるタンパク質。
【請求項１５】
請求項14に記載のタンパク質であって、さらに、
Xaa15はArgであるタンパク質。
【請求項１６】
請求項15に記載のタンパク質であって、さらに、
Xaa47はThr及びSerからなる群より選ばれるタンパク質。
【請求項１７】
請求項16に記載のタンパク質であって、さらに、
Xaa21はTrpであり、
Xaa22はPheであり、
Xaa23はPheであり、
Xaa35はTyrであり、
Xaa36はGlyであり、
Xaa40はGlyであり、
Xaa43はAsnであり、
Xaa45はPheであり、
Xaa47はSerであるタンパク質。
【請求項１８】
請求項10に記載のタンパク質であって、さらに、
Xaa1はMetであり、Xaa2はHisであり、Xaa3はSerであり、Xaa4はPheであり、Xaa5はCysであり、Xaa6はAlaであり、Xaa7はPheであり、Xaa8はLysであり、Xaa9はAlaであり、Xaa10はAspであり、Xaa11はAspであり、Xaa12はGlyであり、Xaa13はProであり、Xaa14はCysであり、Xaa15はArgであり、Xaa16はAlaであり、Xaa17はAlaであり、Xaa18はHisであり、Xaa19はProであり、Xaa20はArgであり、Xaa22はPheであり、Xaa23はPheであり、Xaa24はAsnであり、Xaa25はIleであり、Xaa26はPheであり、Xaa27はThrであり、Xaa28はArgであり、Xaa29はGlnであり、Xaa30はCysであり、Xaa31はGluであり、Xaa32はGluであり、Xaa33はPheであり、Xaa34はIleであり、Xaa35はTyrであり、Xaa36はGlyであり、Xaa37はGlyであり、Xaa38はCysであり、Xaa39はGluであり、Xaa40はGlyであり、Xaa41はAsnであり、Xaa42はGlnであり、Xaa43はAsnであり、Xaa44はArgであり、Xaa45はPheであり、Xaa46はGluであり、Xaa47はSerであり、Xaa48はLeuであり、Xaa49はGluであり、Xaa50はGluであり、Xaa51はCysであり、Xaa52はLysであり、Xaa53はLysであり、Xaa54はMetであり、Xaa55はCysであり、Xaa56はThrであり、Xaa57はArgであり、Xaa58はAspであるタンパク質。
【請求項１９】
請求項１から４及び10から18のいずれかに記載のカリクレイン結合タンパク質をコードするポリ核酸。
【請求項２０】
請求項19に記載のポリ核酸を有する組み換え型発現ベクター。
【請求項２１】
請求項20に記載の発現ベクターにより形質転換された、組み換え型宿主細胞。
【請求項２２】
請求項21に記載の組み換え型宿主細胞であって、宿主細胞が、ピキア・パストリス（Pichia pastoris）、枯草菌（Bacillus subtilis）、バシラス・ブレビス（Bacillus brevis）、コウボキン（Saccharomyces cerevisiae）、大腸菌（Escherichia coli）、ヤロウィア・リプリティカ（Yarrowia liplytica）及び哺乳細胞、からなる群より選ばれるもの。
【請求項２３】
請求項21に記載の組み換え型宿主細胞であって、宿主細胞が、ピキア・パストリス（Pichia pastoris）であるもの。

【請求項２４】
カリクレイン結合タンパク質の生産方法であって：
(a)請求項21,22又は23に記載の宿主細胞を、前記カリクレイン結合タンパク質の発現を促進する条件下で培養し；
(b)前記カリクレイン結合タンパク質を宿主細胞から単離することよりなる方法。
【請求項２５】
請求項1から4及び10から18のいずれかに記載のカリクレイン結合タンパク質を有する過剰のカリクレイン活性に帰せられる疾患を防止又は治療するための医薬組成物で、製薬上許容される担体を含んでなるもの。
【発明の詳細な説明】
本発明は1994年１月11日に出願された米国特許出願第08/179,904号の一部継続出願である米国特許出願第08/208,264号（係属中）の一部継続出願である。これらの出願の各々はここに参考文献として組み込まれる。
発明の背景
発明の技術分野
本発明はヒト血漿カリクレインに結合し阻害する新しい種類の蛋白質および蛋白質相同体に関するものである。
背景技術の記載
カリクレインは、組織および血漿の両方に見出されるセリンプロテアーゼである。血漿カリクレインは接触活性化（内在経路）凝集、繊維素溶解、低血圧、および炎症に伴う。（ＢＨＯＯ92参照）。これらのカリクレインの効果は３種の異なる生理学的基質：i)因子XII（凝集）、ii)プロウロキナーゼ－プラスミノーゲン（繊維素溶解）、およびiii)キニノーゲン（低血圧および炎症）の活性によって取り次がれる。
キニノーゲンのカリクレイン開裂は、小さい有効性の高い生物に作用するペプチドであるキニンの生成をもたらす。キニンは種々の細胞に存在する細胞表面受容体を介して作用する。細胞内ヘテロ三量体Ｇ蛋白質はキニン受容体を、酸化窒素、アデニルシクラーゼ、ホスホリパーゼ$Ａ_2$、およびホスホリパーゼＣを含む第二のメッセンジャー経路に連結する。キニンの重要な生理活性の中には：(i)増大した管透過性；(ii)血管拡張；(iii)気管支痙攣；および(iv)陣痛誘発がある。従って、キニンは菌血（敗血症）または外傷に関連した生命を脅かす脈管ショックおよび浮腫、喘息の浮腫および気管の反応過多、および組織損傷に関連した炎症および神経痛の媒介となる。不適当な血漿カリクレイン活性および結果として生じるキニン生成の重要性は遺伝性血管浮腫（ＨＡ）で患者に劇的に示される。ＨＡは、血漿カリクレインの基本的内生阻害剤であるＣ１阻害剤の遺伝子欠失に起因する。ＨＡの症状は皮膚、皮下組織および胃腸系のの浮腫、および腹痛および嘔吐を含む。ＨＡ患者のほぼ３分の１は喉頭および上部気道の浮腫による窒息によって死ぬ。カリクレインは、カリクレインの＋$ＮＨ_3$-ＩＶＧＧＴＮＳＳ----配列を遊離する蛋白質分解によって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。ヒト血漿プレカリクレインはジーンバンク登録Ｐ03952に見出される。
成熟した血漿カリクレインは619個のアミノ酸を含む。$Ａｒｇ_{371}$-$Ｉｌｅ_{372}$ペプチド結合はジスルフィド結合によって接合された二本鎖プロテイナーゼを生成する。アミノ末端軽鎖（248残基）は接触部位を有する。
インヴィヴォの血漿カリクレイン（ｐＫＡ）の主阻害剤はＣ１阻害剤である；ＳＣＨＭ87、27－28頁参照。Ｃ１はserpinであり、ｐＫＡと本質的に不可逆性のコンプレックスを形成する。ウシ膵臓のトリプシン阻害剤（ＢＰＴＩ）は初め$Ｋ_i$＝320pM（ＡＵＥＲ88）の強いｐＫＡ阻害剤であると言われたが、ＢＥＲＮ93はｐＫＡに対する$Ｋ_i$は30ｎＭ（すなわち、30,000ｐＭ）であることを示している。Ｇ36Ｓ変異体は$Ｋ_i$が500ｎＭ以上である。従って、安全なカリクレイン阻害剤が必要である。このような薬剤の本質的特性は次の通りである。
ｉ．適切なカリクレイン酵素の中和；
ii．投薬量を最少にするため標的カリクレインへの結合の高い親和力；

iii. 副作用を減らすため、カリクレイン対する高い特異性；
iv. 潜在免疫原性および器官/組織毒性を最少にするためのヒト蛋白質への高度の類似性。
阻害されるべき候補標的カリクレインはキモトリピン相同のセリンプロテアーゼである。
過剰出血
過剰出血は不完全な凝固作用、高い繊維素溶解活性、またはこれら２つの組合せの結果起きる。大抵の体質ではプラスミンの活性を制御しなければならない。しかしながら、ｐＫＡはプラスミノーゲンの活性化物質であり、そして有効な選択的ｐＫＡ阻害剤はプラスミノーゲン活性化を防ぐことができる。血液のロスを減らす際にＢＰＴＩの臨床的に有益な効果はそのプラスミン（K_D～0.3nM）または血漿カリクレイン（K_D～100nM）または両方の酵素の阻害からの結果であると考えられる。しかしながら、ＢＰＴＩは副次的使用には皮膚試験を必要とするほど十分に抗原性であることが見出された。さらに、出血を抑えるために必要なＢＰＴＩの投与量はかなり高く作用機構は明らかでない。ＢＰＴＩはプラスミンに作用すると言う者もいるが、血漿カリクレインを阻害することにより作用すると言う者もいる。ＦＲＡＥ89はＢＰＴＩ約840㎎の投与量が80人の心臓切開手術の患者の血液のロスを略半分に減らし、平均輸血量を74％まで減らしたことを報告している。マイルス社は最近手術中の出血を減らすためトラシロールを米国に導入した（トラシロールのマイルス製品パンフレット参照、ここに参考文献として組み込む。）。ＬＯＨＭ93はプラスミン阻害剤が眼の手術の際の出血をコントロールするために有用であることを示唆している。ＳＨＥＲ89はＢＰＴＩが結腸手術の出血を制限する際に有効であることを報告している。
ＢＰＴＩよりもさらに有効でヒト蛋白質ドメインと略同一であるカリクレイン阻害剤は似た治療学的潜在性を与え、投与量が少なく、そして抗原性に対する潜在性が小さい。
組み換えＤＮＡ技法を用いると、親の蛋白質の変異体遺伝子を発現することによって新規の蛋白質を得ることが可能である。試験するために突然変異体を拾うための幾つかの戦略が知られている。一つの、「蛋白質手術」は、選択の遺伝子内に１またはそれ以上の予め定めれた突然変異体の導入を含む。完全に予め定めれた配列の単一のポリペプチドを発現させ、そして結合特性を評価する。
他の極端な手段は、放射線および種々の化学剤のような比較的非特異的突然変異源による、レートバーラの欧州特許出願285,123を参照、あるいは大きく変性したＤＮＡの発現によるランダムな突然変異源である。また、中間の戦略として幾つかの残基を一定に保持し、他の残基をランダムに突然変異させ、そしてさらに他の残基を予め定められた方法で突然変異させることもできる。これは「多様化」と呼ばれ、ラドナーらの米国特許5,220,409参照。
ＤＥＮＮ94aおよびＤＥＮＮ94bは因子VII_aで組織因子のコンプレックスに結合するＡＰＰ－Ｉに基づくクニッツドメインを選択することを報告している。これらは親としてリポプロテイン結合凝集阻害体」－Ｋ１（ＬＡＣＩ－Ｋ１）を使用せず、標的としてｐＫＡを使用しなかった。かれらが得た高い親和力の結合体は約２ｎＭの彼等の標的に対するK_Dを有する。ｐＫＡに結合するための我々の第一ラウンドの選択は約0.3ｎＭの親和力を有し、我々の第二ラウンドの選択は約0.1nM（＝100pM）またはそれ以上優れている。
特定の種からの蛋白質はその種の各々に注入したとき免疫反応をあまり起こさないように思われる。ネズミの抗体はヒトでは高い抗原性がある。ヒトの一定ドメインとネズミの変異性ドメインを有する「キメラの」抗体は抗原性が少ないことが明らかである。いわゆる「ヒト化」抗体はヒトの一定ドメインおよびネズミ抗体からのＣＤＲｓ中に可変ドメインを有し、可変ドメインの枠組みがヒトを起源とする。「ヒト化」抗体は「キメラの」抗体よりも抗原性がはるかに小さい。「ヒト化」抗体では、蛋白質の50ないし60個の残基が非ヒト起源である。この発明の蛋白質は、大抵の場合、約60個のアミノ酸のみからなり、通常は工学技術の蛋白質および親の蛋白質との間には10以下の相違点がある。ヒトはヒトインシュリンのようなヒト蛋白質にさえも抗体を発現するが、このような抗体は結合が弱く、その意図した生物学的機能を注入した蛋白質が示すことを妨げない場合が多い。処理す

べき種からの蛋白質を使用すると免疫反応がないという保証はない。けれども、ヒト蛋白質に配列が非常に近い蛋白質を取り出すと、ヒトの強い免疫反応の危険性を大きく減らす。

クニッツドメインは非常に安定であり、酵母または他のホスト器官中に有効に生成させることができる。少なくとも10個のヒトクニッツドメインが報告されている。ＢＰＴＩはかって有効なｐＫＡ阻害剤であると考えられていたが、実際には、ｐＫＡを非常に良く阻害するヒトクニッツドメインはない。従って、ｐＫＡの有効な阻害剤でありヒトクニッツドメインの配列に近いクニッツドメインの配列を提供することが本発明の目的である。

部位特異的の突然変異誘発を使用すると、非ランダムであろうとランダムであろうと、活性が改良された変異体結合蛋白質を得ることは当該分野では知られているが、突然変異体蛋白質が目的の標的特異性または親和力をもつという保証はない。ＢＰＴＩの抗カリクレイン活性が小さいので、ＢＰＴＩの突然変異体または他のクニッツドメイン蛋白質は、本発明より前には、阻害剤は勿論のこと、カリクレインの強い結合を得る好ましい方法を考慮されなかった。

発明の概要

本発明は１以上の血漿（および／または組織）カリクレインを阻害する新規のＢＰＴＩ相同クニッツドメイン、特にＬＡＣＩ相同体に関するものであり、また治療および診断にこれらの新規の蛋白質を使用すことに関するものである。特に本発明は、ヒト起源のクニッツドメインから誘導されるクニッツドメイン、そして特にＬＡＣＩの最初のクニッツドメインに関する；ヒト起源のクニッツドメインはヒトに非免疫原性であるらしい。本発明の蛋白質は20ｎＭよりも多くなく、好ましくは約５ｎＭよりも多くなく、さらに好ましくは、約300pMよりも多くなく、そして最も好ましくは、約100pMよりも多くないK_Dで血漿カリクレインを阻害する。

血漿カリクレイン（および、必要な場合には、組織カリクレイン）の特異的、高親和力の阻害体は、カリクレインが介在する全ての病理学上の状態、および特にキニンに関連した状態で、重要な治療の有用性を示す。キニンの触媒生成を阻害する治療上のアプローチは、カリクレイン阻害がないと受容体の拮抗作用がキニンの連続発生に匹敵するので、キニン受容体の拮抗作用よりも好ましいと考えられる。有意には、血漿カリクレインの遺伝子欠失は良性であり、従って血漿カリクレインの阻害は安全である。我々は最近リードｐＫＡ阻害剤を見出し、ＫＫII/3#6と名付けた。この阻害剤は天然産のヒト血漿蛋白質クニッツドメインの変異体であり、トラシオールよりもかなり大きいカリクレイン結合有効性を示す。ＫＫII/3#6はカリクレインに対するK_iが野性タイプのＬＡＣＩおよびＢＰＴＩよりも100倍以上であり、約300pMである。対照的に、プラスミンに対するK_iは10μＭである。蛋白質ＫＫ２/#11およびＫＫ２/#13は特に好ましいｐＫＡ阻害剤であり、K_i＜300pMを有し、多分100pMよりも小さい。可逆的阻害剤はＣ１阻害剤のような非可逆的阻害剤よりも有用性が大きい。

他のクニッツドメインに結合するｐＫＡを与えるサブシークエンスの伝達、特にヒトクニッツドメインを開示する。

本発明の好ましいｐＫＡ阻害剤は次の必須条件を１またはそれ以上満足する。

１）阻害剤は20ｎＭよりも多くなく、好ましくは約５ｎＭ以下、さらに好ましくは約300pM以下、そして最も好ましくは100pM以下のK_iで血漿カリクレインを阻害する。

２）阻害剤はＢＰＴＩを参照した残基数をもつ表１４に示される要件に合うクニッツドメインからなる、

３）阻害剤はクニッツドメイン位置12－21および32－39にて、表１５のその位置に対してまとめたアミノ酸タイプのひとつを有する、そして

４）この阻害剤は、群ＫＫII/3#6、ＫＫ２/#11、ＫＫ２/#13、ＫＫ２/#１、ＫＫ２/#２、ＫＫ２/#３、ＫＫ２/#４、ＫＫ２/#６、ＫＫ２/#７、ＫＫ２/#８、ＫＫ２/#９、ＫＫ２/#10、ＫＫ２/#12、ＫＫ２con1、ヒトＬＡＣＩ－Ｋ２、ヒトＬＡＣＩ－Ｋ３、ヒトコラーゲンα３ＫｕＤｏｍ、ヒトＴＦＰＩ－２ドメイン１、ヒトＴＦＰＩ－２ドメイン２、ヒトＴＦＰＩ－２ドメイン３、ヒトＩＴＩ－Ｋ１、ヒトＩＴＩ－Ｋ２、ヒトプロテアーゼＮＥＸ

ＩＮ－II、ヒトＡＰＰ－Ｉ、ＤＫＩ－1.2.1、ＤＫＩ－1.3.1、ＤＫＩ－2.1、ＤＫＩ－3.1.1、ＤＫＩ－3.2.1、ＤＫＩ－3.3.1、ＤＫＩ－4.1.1、ＤＫＩ－4.2.1、ＤＫＩ－4.2.2、ＤＫＩ－5.1、およびＤＫＩ－6.1から選択される本質的にヒト起源の参照配列に対して実質的に相同である。

命名法

ここで、親和力はK_D（K_D（Ａ，Ｂ）＝〔Ａ〕〔Ｂ〕／〔Ａ－Ｂ〕）。数字の小さいK_Dは高い親和力を表す。本発明のために、「カリクレイン阻害蛋白質」は特定のカリクレインを約20ｎＭ以下のK_iで結合し阻害するものである。「阻害」はカリクレインの触媒作用を阻止し、インヴイトロで発色体または螢光発生体物質を用いるアッセイまたは高分子を含むアッセイにおいて測定できることを示す。

アミノ酸残基は３種類の方法で検討される：アミノ酸のフルネーム、標準３文字コード、および標準１文字コード。表は１文字コードのみを使用する。はっきりさせる必要がある場合にはテキストはフルネームと３文字コードを使用する。

A＝Ala	G＝Gly	M＝Met	S＝Ser
C＝Cys	H＝His	N＝Asn	T＝Thr
D＝Asp	I＝Ile	P＝Pro	V＝Val
E＝Glu	K＝Lys	Q＝Gln	W＝Trp
F＝Phe	L＝Leu	R＝Arg	Y－Tyr

本発明の目的のために、「実質的に相同の」配列は、任意特定の領域にわたって、少なくとも51%、さらに好ましくは80%、同一である。この発明では、「実質的に相同」はまさに同一を含む。配列は少なくとも20個のアミノ酸の１領域内で十分に似ている（51%以上）が比較の領域の外では全体として異なる場合に、配列はなおも「実質的に相同」である。他の配列に関して１の配列の１のアミノ酸の挿入は１のミスマッチとして数える。最も好ましくは、末端とは別の、６個よりも多くない残基が異なる。好ましくは、配列の、特に特定領域の分岐は「保守的改変」の形態にある。

「保守的改変」は次のように定義される。

（ａ）表９に定義されるようなアミノ酸の保守的置換」；および

（ｂ）末端、ドメイン境界、ループ、または移動度が比較的高い他の部分でのアミノ酸の単一または複数の挿入または削除。

好ましくは、末端を除いて、約６個よりも少ないアミノ酸を任意の位置で挿入または削除し、この改変部は重要な結合部位を含むことが知られている領域の外側にある。

クニッツドメイン

ここで、「クニッツドメイン」および「ＫｕＤｏｍ」は、（クニッツ大豆トリプシン阻害剤ではなく）ＢＰＴＩの相同体を意味するように交代で使用される。ＫｕＤｏｍは、少なくとも２個、そして好ましくは３個のジスルフィドを含む少なくとも51個のアミノ酸（そして約61個までのアミノ酸）を有する蛋白質のドメインである。ここで、全クニッツドメインの残基はＢＰＴＩ（すなわち、残基１－58）を参照して番号を付けられる。従って第一のシステイン残基は残基５であり、最後のシステインは55である。アミノ酸配列は、本配列の目的のために、表１４に示される配列に対して、３以下のミスマッチで配列されるならば、クニッツドメインと考えられる。１個の残基の挿入または削除は１個のミスマッチとして数える。表１４において、「ｘ」は任意のアミノ酸に一致し「Ｘ」はその位置に対してリストされたタイプに一致する。ジスルフィドボンドは、５と55、14と38、そして30と51の少なくとも２個を結合する。ジスルフィドの数は１によって減らされ得るが、標準システインの数はいずれも対にならないでは残らない。従って、１個のシステインを変える場合、次に償うシステインを適当な場所に加えるかマッチするシステインを非システインによって置き換える（後者が一般に好ましい）。例えば、ショウジョウバエDrosophi

la funebris雄補助腺プロテアーゼ阻害剤は位置５にシステインがないが、位置－１（位置１の直前）にシステインがある；恐らく、これはCYS_{55}に対してジスルフィドを形成する。Cys_{14}およびCys_{38}を置換すると、Gly_{12}、（GlyまたはSer）$_{37}$、およびGly_{36}の必要性が落ちる。追加のドメイン（他のクニッツドメインを含めて）を含むゼロから多数の残基までクニッツドメインのいずれかの末端に結合することができる。

好適例の詳細な説明

クニッツドメインのようなプロテアーゼ阻害剤は、プロテアーゼの活性部位に結合して機能し、その結果、ペプチドボンド（「切れやすいボンド」）は：１）開裂しない、２）非常に遅く開裂する、または３）阻害剤の構造が開裂した部分の放出または分離を妨げるので効果がないように開裂する。クニッツドメインでは、ジスルフィドボンドは露出したペプチドボンドが開裂したとしても共に蛋白質を保持するように働く。切れやすいボンドのアミノ酸部位の残基からの、ボンドから移動してしまった残基は、慣習によりＰ１、Ｐ２、Ｐ３等と呼ばれる。切れやすいボンドに続く残基はP1'、P2'、P3'等と呼ばれる（ＳＣＨＥ67、ＳＣＨＥ68）。一般に各セリンプロテアーゼは、基質または阻害剤の残基Ｐ１、Ｐ２等の側鎖基と主鎖原子を受け取る部位（数種の残基からなる）Ｓ１、Ｓ２等、および基質または阻害剤の残基P1'、P2'等の側鎖基と主鎖原子を受け取る部位S1'、S2'等を受け入れる。基質に関してプロテアーゼ特異性をそしてプロテアーゼに関して阻害剤特異性を与えることは、Ｓ部位とＰ側鎖基と主鎖原子との間の相互作用である。新しいアミノ末端をもつ断片がまずプロテアーゼを残すため、小さい分子のプロテアーゼの阻害剤を設計する多くの作業者は部位Ｓ１、Ｓ２、Ｓ３等を結合する化合物に集中した。

ＬＡＳＫ80は蛋白質プロテアーゼ阻害剤を概説する。若干の阻害剤はポリペプチド鎖上に複数の反応性部位を有し、通常これらのドメインは異なる配列、特異性、およびトポロジーさえも有する。P_5およびP'_5領域のアミノ酸置換は阻害剤の特異性に影響することが知られている。これらは１の酵素クラスから他のクラスに特異性を変化することができるので、かっては、Ｐ１残基に焦点が合わされ、これらが非常に近いことに注意が向けられた。ＬＡＳＫ80はＫｕＤｏｍｓの中で、Ｐ１＝ＬｙｓまたはＡｒｇをもつ阻害剤はトリプシンを阻害し、Ｐ１＝Ｔｙｒ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、ＬｅｕおよびＭｅｔをもつものはキモトリプシンを阻害し、そしてＰ１＝ＡｌａまたはＳｅｒをもつものはエラスターゼを阻害すると示唆している。ＬＡＳＫ80は続けて言っているが、カザル阻害剤の中で、Ｐ１＝ＬｅｕまたはＭｅｔをもつものはエラスターゼの強い阻害剤であり、そしてボウマン－キルク族ではエラスターゼはＰ１＝Ａｌａで阻害されるが、Ｐ１＝Ｌｅｕでは阻害されない。このような制限された変化は本当に高い親和力（すなわち、１ないし10ｎＭよりも良い）の阻害剤を提供しない。

ＫｕＤｏｍは上記のように定義される。ＢＰＴＩ（原型的なクニッツドメイン）の３Ｄ構造（高分解にて）が知られている。Ｘ線構造の１つがブルックハーベンプロテインデーターバンクに「６ＰＴＩ」として寄託されている。若干のＢＰＴＩ相同体（ＥＩＧＥ90、ＨＹＮＥ90）の３Ｄ構造が知られている。少なくとも70個のＫｕＤｏｍ配列が知られている。既知のヒト相同体はＬＡＣＩの３個のＫｕＤｏｍ（ＷＵＮＴ88、ＧＩＲＡ89、ＮＯＶＯ89）、インター－α－トリプシン阻害剤の２個のＫｕＤｏｍ、ＡＰＰ－Ｉ（ＫＩＤＯ88）、コラーゲンからの１個のＫｕＤｏｍ、およびＴＦＰＩ－２（ＳＰＲＥ94）の３個のＫｕＤｏｍを含む。

ＬＡＣＩ

リポプロテイン結合凝集阻害体（ＬＡＣＩ）は３個のＫｕＤｏｍを含む分子量39ｋＤａ（表１のアミノ酸配列）のヒト血清ホスホグリココプロテインである。以下このプロテインをＬＡＣＩと呼び、そのクニッツドメインをＬＡＣＩ－Ｋ１（残基50ないし107）、ＬＡＣＩ－Ｋ２（残基121ないし178）、およびＬＡＣＩ－Ｋ３（残基213ないし270）と呼ぶ。ＬＡＣＩのｃＤＮＡ配列はＷＵＮＴ88に報告されている。ＧＩＲＡ89は３個のＫｕＤｏｍの各々のＰ１残基を変更した突然変異体の研究を報告している。ＬＡＣＩ－Ｋ１は$F.VII_a$が組織因子に結合するとき因子VIIa（$F.VII_a$）を阻害し、ＬＡＣＩ－Ｋ２は因子X_aを阻害する。ＬＡＣＩ－Ｋ３が何かを阻害するか否かは知られていない。ＬＡＣＩもＬＡＣＩ

のＫｕＤｏｍのいずれも、有効な血漿カリクレイン阻害剤ではない。
本発明の好適例のひとつでは、ＫｕＤｏｍは実質的にＬＡＣＩ－Ｋ１と相同であるが、以下に記述される強い血漿カリクレイン阻害活性を与える方法では異なる。本発明の他のＫｕＤｏｍは他の天然に生じるＫｕＤｏｍ、特に他のヒトＫｕＤｏｍと相同である。ヒトに使用するには、本発明の蛋白質は、免疫反応を引き起こす危険を減らすため、１または別のヒトＫｕＤｏｍに配列が大いに似ているように設計される。
蛋白質の多様化は、一般に相応じて多様化したＤＮＡ混合物を（種々の残基を符号化する可変コドンで）調製し、これを適当なベクターにクローニングを行い、ＤＮＡを適当なホスト細胞で発現することにより行われる。ライブラリーの任意に与えられた蛋白質分子に対して、各可変残基でのアミノ酸の選択は、上記制約を条件として、ランダムであり、その偶然の結果ＤＮＡはその蛋白分子を発現した。
ｐＫＡ結合に対してスクリーニングを行った第１のＬＡＣＩ－Ｋ１ライブラリー
出願人は、ＬＡＣＩ－Ｋ１ドメイン（多様化パターンを表２１に示す）の第１の大きいライブラリーをスクリーニングして表３に示す結果を得た。表３において、「ライブラリー残基」は、ランダムに、その位置で、ライブラリー中に生じることができる残基であり、「好ましい残基」はヒトカリクレインに結合すると同定された10個の変異体の少なくとも１個においてその位置で出現するものである。
残基13、16、17、18、31、および32で、選択は非常に強い。位置34で、ＳＥＲまたはＴＨＲに対する選択は全く強い。位置39で、ＧＬＹに対する選択は強い。位置19はむしろ耐性があるように見える。
可能な変異体蛋白質の幾つかは検出できる分量がなかったので、ある位置では若干の可能なアミノ酸のみをライブラリーに含ませるつもりだったので、ここに開示された複数のライブラリーの中でポジティブの単離物すべてを配列分析したわけではない。
ＬＡＣＩ－Ｋ１の第２ライブラリーおよび新しいカリクレイン阻害剤の選択
表７５０に示されるように第２のＬＡＣＩ－Ｋ１ライブラリーを調製した。このライブラリーは第１の選択の観察を利用し、位置10、11、13、15、16、17、18、19および21にて変異性を許す。位置34および39での残基はS_{34}およびG_{39}で固定された。選択体ＫＫ２/#1からＫＫ２/#13までは、表２に示されるように第１のスクリーニングのための実施例で記載したと同じ方法で得られた。ここに記載したＭａｔαシステム中のS.cerevisiae中に蛋白質ＫＫ２/#11とＫＫ２/#13を調製した。予備的測定はこれらの蛋白質が300pMよりも小さい恐らくは100pMよりも小さいK_iで非常に有効なｐＫＡ阻害体であることを示す。
選択されたＫｕＤｏｍｓの選択された配列および結合データーを使用して、他のヒトＫｕＤｏｍ親に応用できる高親和力のｐＫＡ阻害ＫｕＤｏｍのための方法を記載できる。先ず、ＫｕＤｏｍは表１４の要件に合わなければならない。表１５に示される置換体はどのＫｕＤｏｍにも高親和力のｐＫＡ阻害活性を与える。従って、表１４に示されるように、ＫｕＤｏｍである配列を含み、そして位置12－21および32－39に対して表１５に示されるアミノ酸タイプをその位置に含む蛋白質は、ヒトｐＫＡの有効な阻害体である。さらに好ましくは、この蛋白質は表１５に挙げた位置の全部に対して表１５に示されるアミノ酸タイプをもつ。免疫反応に対する潜在性を減らすため、親の蛋白質として１または別のヒトＫｕＤｏｍを使用し、結合領域の外に配列を与える必要がある。
残基５から残基55まで（表２に示す）ＫＫ２/#13、ＫＫ２/#11、またはＫＫII/3#6のひとつに実質的に相同であるアミノ酸配列からなり、位置13－19、31、32、34、および39にてＫＫ２/#13、ＫＫ２/#11、またはＫＫII/3#6の一つに一致する蛋白質は、５ｎＭ以下のK_IでヒトｐＫＡを阻害する。ＫＫ２/#13、ＫＫ２/#11、およびＫＫII/3#6は、それぞれ、10、８、および７の位置でＬＡＣＩ－Ｋ１とは異なる。これらの置換体がｐＫＡ結合および阻害を助長する際に等しく重要てあるかは明らかではない。挙げられた既知のｐＫＡ阻害剤から、ＬＡＣＩ－Ｋ１に段々に戻る一連の分子を調製することができる。分子はｐＫＡに対する親和力が小さいが抗原性に対する潜在性も少ないことが期待される。当業者は十分な有効性と低い免疫原性の蛋白質をこのコレクションから取り出すことができる。また、ＬＡＣＩ－Ｋ１とは異なるアミノ酸によって挙げられたｐＫＡ阻害剤の一つの中の置

換は、薬として不適当な蛋白質を作る程度までｐＫＡに対する親和力を減らすことなく免疫原性を減らすことができる。

設計されたＫｕＤｏｍｐＫＡ阻害剤

以下、「ＤＫＩ」は、分子のＳＰＩシリーズ、特にＫＫ２/#13、ＫＫ２/#11、またはＫＫII/3#6からのアミノ酸配列情報を組み込むＫｕＤｏｍｓである「設計されたｐＫＡ阻害剤、Designed pKA Inhibitor」を意味する。幾つかのＤＫＩの配列およびその親の蛋白質が表２に示されている。以下、「突然変異体ＸｎｎＹ$_1$，ＸｎｎＹ$_2$，----は必要ない」の記述は、突然変異体の各々が別々に見出されることは不必要であることを意味する。すなわち、このリストはブロックとして一緒に応用されることはないが、試験されるべき物のリストとして利用される。同様に追加の変異体のリストは単独にテストされるべきである。

蛋白質ＤＫＩ-1.2.1はヒトＬＡＣＩ－Ｋ２に基づき、表２に示される。突然変異体Ｐ11Ｇ、Ｉ13Ｒ、Ｙ17Ａ、Ｉ18Ｈ、Ｔ19Ｐ、Ｙ21Ｗ、Ｒ32Ｅ、Ｋ34Ｓ、およびＬ39ＧはｐＫＡに対して高い親和力を与える。これらの置換体の幾つかは必要がないかも知れない；特に、Ｐ11ＧおよびＴ19Ｐは必要がない。ｐＫＡ親和力を改善する他の突然変異体はＥ９Ａ、Ｄ10Ｅ、Ｇ16Ａ、Ｙ21Ｆ、Ｌ39Ｅを含む。

蛋白質ＤＫＩ-1.3.1（表２）はＬＡＣＩ－Ｋ３に基づく。突然変異体Ｒ11Ｄ、Ｌ13Ｐ、Ｎ17Ａ、Ｅ18Ｈ、Ｎ19Ｐ、Ｒ31Ｅ、Ｋ34Ｓ、およびＳ36ＧはｐＫＡに対し高い親和力を与えるつもりである。これらの置換体の幾つかは必要ではないかも知れない；特にＮ19Ｐは必要ではない。K_Dを改善する他の変化はＤ10Ｅ、Ｆ21ＷおよびＧ39Ｅを含む。

蛋白質ＤＫＩ-2.1（表２）はヒトコラーゲンα３ＫｕＤｏｍに基づく。突然変異体Ｄ16Ａ、Ｆ17Ａ、Ｉ18Ｈ、Ｒ32Ｅ、およびＷ34ＳはｐＫＡに対して高い親和力を与える。これらの置換体の幾つかは必要ではないかも知れない；特に、Ｒ32Ｅは必要ではない。ｐＫＡ親和力を改善する他の突然変異体は、Ｋ９Ａ、Ｄ10Ｅ、Ｄ16Ｇ、Ｋ20Ｒ、Ｒ32Ｔ、Ｗ34Ｖ、およびＧ39Ｅを含む。

蛋白質ＤＫＩ-3.1.1（表２）はヒトＴＦＰＩ－２ドメイン１から誘導される。交換体Ｙ11Ｇ、Ｌ17Ａ、Ｌ18Ｈ、Ｒ31Ｅ、およびＬ34ＳはｐＫＡに対して高い親和力を与える。突然変異体Ｌ34Ｓは必要ではないかも知れない。ｐＫＡ結合を促進する他の突然変異体は、Ｙ21Ｗ、Ｙ21Ｆ、Ｑ32Ｅ、Ｌ34Ｔ、Ｌ34Ｉ、およびＥ39Ｇを含む。

蛋白質ＤＫＩ-3.2.1（表２）はヒトＴＦＰＩ－２ドメイン２から誘導される。この親ドメインは残基９（１個の残基）および42（２個の残基）の後の挿入を含む。突然変異体Ｅ15Ｒ、Ｇ16Ａ、Ｓ17Ａ、Ｔ18Ｈ、Ｅ19Ｐ、Ｋ32Ｔ、およびＦ34ＶはｐＫＡに対して高い親和力を与える。ＴＦＰＩドメイン２に基づくｐＫＡ阻害剤を必要とするとき、好ましい経路は所定および他の置換体を与えるドメインのライブラリーを作り次に結合剤を選択する。

蛋白質ＤＫＩ-3.3.1（表２）はヒトＴＦＰＩ－２ドメイン３から誘導される。交換体Ｌ13Ｈ、Ｓ15Ｒ、およびＮ17ＡはｐＫＡに対して高い親和力を与える。ｐＫＡ結合を促進する他の突然変異体は、Ｄ10Ｅ、Ｔ19Ｑ、Ｙ21Ｗ、Ｔ36Ｇ、およびＧ39Ｅを含む。

ＤＫＩ-4.1.1（表２）はＳ10Ｄ、Ｍ15Ｒ、Ｍ17Ａ、Ｔ18Ｈ、Ｑ34Ｓ、およびＭ39Ｇの断定によるヒトＩＴＩ－Ｋ１からである。突然変異体Ｍ39ＧおよびＱ34Ｖは必要ではないかも知れない。ｐＫＡ結合を促進する他の突然変異体は次のものを含む：Ｇ16Ａ、Ｍ17Ｎ、Ｓ19Ｑ、Ｙ21Ｗ、およびＹ21Ｆ。

ＤＫＩ-4.2.1（表２）はヒトＩＴＩ－Ｋ２から突然変異体Ｖ10Ｄ、Ｒ11Ｄ、Ｆ17Ａ、Ｉ18Ｈ、Ｖ31Ｅ、Ｌ32Ｅ、Ｐ34Ｓ、およびＱ39Ｅまでである。突然変異体Ｖ31Ｅ、Ｌ32Ｅ、およびＱ39Ｅは必要ではないかも知れない。ｐＫＡ結合を促進する他の突然変異体は次のものを含む：Ｖ10Ｅ、Ｑ19Ｐ、Ｌ20Ｒ、Ｗ21Ｆ、Ｐ34Ｉ、およびＱ39Ｇ。ＤＫＩ-4.2.2は８個の突然変異体をもつ：Ｖ10Ｄ、Ｒ11Ｄ、Ｆ17Ａ、Ｉ18Ｈ、Ｌ20Ｒ、Ｖ31Ｅ、Ｌ32Ｅ、およびＰ34Ｓ。

ＤＫＩ-5.1は突然変異体Ｍ17Ａ、Ｉ18Ｈ、Ｓ19Ｐ、Ａ31Ｅ、およびＰ32ＥによってヒトＡＰＰ－Ｉ（プロテアーゼネキシン－IIとして知られている）から誘導される。突然変異体Ｓ19Ｐ、Ａ31Ｅ、およびＰ32Ｅは必要でないかも知れない。ｐＫＡ結合を促進する他の突然変異体はＴ11Ｄを含む。

ＤＫＩ-6.1は５個の置換体：K11D、Q15R、T16A、M17A、M18H、T19P、およびL32EによってＨＫＩ Ｂ９ ＫｕＤｏｍ（ＮＯＲＲ９）から誘導される。ＤＫＩ-6.1は有効なｐＫＡ阻害剤である。突然変異体L32E、T19Pは必要でないかも知れない。
ＢＰＴＩは特に良いｐＫＡ阻害剤ではないが、一つにすることができる。ＤＫＩ-7.1はｐＫＡに対する親和力を増加する突然変異体Y10E、K15R、R17A、ＲＩ18H、Ｉ19P、Q31E、T32E、およびR39EによってＢＰＴＩから誘導される。突然変異体Y10E、K15R、Ｉ19P、Q31E、T32E、およびR39Eは必要でないかも知れない；真に必要な突然変異体はR17AおよびＲＩ18Hである。

クニッツドメインの改変

ＫｕＤｏｍは全く小さい；循環からの除去が速すぎるような、製薬学的問題の原因であるならば、２以上のドメインを結合することができる。好ましいリンカーは１個以上のアミノ酸の配列である。好ましいリンカーはヒト蛋白質の繰り返しのドメインの間に見出されるものであり、特にリンカーはヒトＢＰＴＩ相同体に見出され、その１つは２個のドメイン（ＢＡＬＤ85、ＡＬＢＲ83a、ＡＬＢＲ83b）を有し他のものは３個（ＷＵＮＴ88）を有する。ペプチドリンカーは全体の蛋白質が組み換えＤＮＡ技法によって発現される利点を有する。また免疫原共役体を形成するために通常使用されるもののような、非ペプチジルリンカーを使用することもできる。ＢＰＴＩ様ＫｕＤｏｍの血清滞在を増加させる代わりの手段はポリエチレングリコールにこれを連結することである、いわゆるＰＥＧ化（ＤＡＶＩ79）。

血漿カリクレインに対するＫＫII/3#7、ＫＫ２/#11、およびＫＫ２/#13の、実施例に対して、特異性を改良する方法：

ＫＫII/3#6、ＫＫ２/#11、およびＫＫ２/#13の表面の大部分をｐＫＡの表面に相補的にしたので、R_{15}はｐＫＡに特異的結合するために必須ではない。凝固および繊維素溶解の経路で酵素の多くはＡｒｇまたはＬｙｓの後で選択的に切断する。Ｐ１位置に塩基性残基を持たないと特異性が一層大きくなる。変異体ＫＫII/3#7－K15A（表２７に示される）は、Ｐ１でＡｌａを有し、良好なｐＫＡ阻害体であり、ＫＫII/3#7よりも他のプロテアーゼに関連してｐＫＡに対して高い特異性を有することができる。ｐＫＡに対するＫＫII/3#7－K15Aの親和力はｐＫＡに対するＫＫII/3#7の親和力よりも小さいが、他のＡｒｇ／Ｌｙｓ好適酵素に対する親和力のロスはより大きく、多くの応用で、特異性は親和力よりも一層重要である。良い親和力と非常に高い特異性をもつ他の突然変異体はＫＫ２/#13－R15AおよびＫＫ２/#11－R15Sを含む。このアプローチは他の高い親和力のｐＫＡ阻害剤に応用することができる。

生成の方法

本発明の蛋白質は次の方法を含む従来の技術のいずれによっても生成することができる。
ａ）成分アミノ酸の一連のカップリングによる非生物学の合成
ｂ）適当なホスト細胞での組み換えＤＮＡ技法による生成、および
ｃ）ＬＡＣＩから望まない配列を除去して合成置換配列をカップリングする
ここに開示される蛋白質は、属Bacillus,Escherichia,Salmonella,Erwiniaからのバクテリア、属Hansenula,Kluyveromyces,Pichia,Rhinosporidium,SaccharomycesおよびSchzosaccharomycesのような酵母菌類、またはＣＯＳ－１のような培養した哺乳類動物の細胞のような適当なホスト中で組み換えにより好ましく生成される。さらに好ましいホストは種Pichia pastoris,Bacillus subtilis,Bacillusbrevis,Saccharomyces cerevisiae,Escherichia coliおよびYarrowia lipolyticaの微生物である。ホスト細胞中で機能的な、制御できまたは構造性の、任意のプロモーターを使用して遺伝子発現をコントロールすることができる。
好ましくは蛋白質は分泌される。最も好ましくは、条件付の媒体から得られる。ここに記載された蛋白質を分泌することは必要ない。分泌は、蛋白質が正確に折りたたまれて数個の菌で条件付の媒体中に生成され、そしてホスト細胞に対し毒性が少ないので、好ましいルートである。分泌は要求されない。
グリコグループを含む特別の理由がない限り、グリコグループの抗原性に対して潜在性を

減らすようにＮ－結合グリコシル化部位を欠くように設計された蛋白質が好ましく、その結果等量の蛋白質を、1)E.coli,2)B.subtilis,3)P.pastoris,4)S.cerevisiae,および5)哺乳動物の細胞を含む広範囲の器官の中に発現させることができる。
組み換え型生成物を分解するプロテアーゼを生成するホスト細胞の問題を減らすには幾つかの意味がある；特にＢＡＮＥ90およびＢＡＮＥ91参照。ＶＡＮＤ92はE.coli中のB.subtilis信号ペプチダーゼの過剰発現が異種の融合蛋白質の発現を増大させることを報告している。ＡＮＢＡ88はＰＭＳＦ（セリンプロテアーゼ阻害剤）を培養基に添加すると融合蛋白質の収率が改善されることを報告している。
ここに開示されているこれらの蛋白質および他の蛋白質の生成に影響する他の因子は次のものを含む：１）コドンの使用（ホストに対するコドンを最適化することが好ましい）、２）シグナル配列、３）意図したプロセシング部位でのアミノ酸配列、プロセシング酵素の存在と局在性、処理生成物を部分的に変えまたは分解する種々の酵素の欠失、突然変異、または阻害、および分泌（許容分泌ホストが好ましい）においてホストをさらに複製できるようにする突然変異体。
組み換えＤＮＡ技術の一般的原則の参照作業はワストンらのMolecular Biology of the Gene,ＩおよびII巻、The Benjamin/Cummings Publishing Company,Inc.,Menlo Park,CA(1987);ダーネルらのMolecular Cell Biology,Scientific American Books,Inc.,New York,N.Y.(1986);Lewin,Genes II,John Wiley&Sons,New York,N.Y.(1985);オールドら、Principles of Gene Manipulation:An Introduction to Genetic Engineering,2d edition,University of California Press, Berkeley,CA(1981);サムブルックらのMolecular Cloning;A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY(1989);およびアウスベルらのCurrent Protocols in Molecular Biology,Wiley Interscience,NY,(1987,1992)を含む。これらの文献および引用された文献はここに参考文献として組み込まれる。

ペプチドの調製

化学的ポリペプチド合成はこの分野で急速に展開している領域であり、固相ポリペプチド合成の方法は次の文献に良く記述されているので、これらの参考文献として組み込む。（Merrifield,J Amer Chem Soc 85:2149-2154(1963);Merrifield,Science 232:341-347(1986);Wade et al.,Biopolymers 25:S21-S37(1986);Fields,Int J Polypeptide Prot Res 35:161(1990);MilliGen Report Nos.2 and 2a,Millipore Corporation,Bedford,MA,1987）Ausubel et al,同上,and Sambrook et al,同上。タンとカイザーは（Biochemistry,1977,16:1531-41）18年前にＢＰＴＩと相同体を合成した。
この分野で知られているように、この種の方法は反応性機能基、例えば遊離アミノ、カルボキシルおよびチオ基をブロッキングしまたは保護することを含む。ポリペプチドボンドを形成後、保護基を除去する。従って、各アミノ酸残基の添加は保護および脱保護のための幾つかの反応工程を必要とする。最近の方法は固相合成を利用し、Ｃ－末端アミノ酸を、濾過できる不溶性樹脂粒子に共有結合させる。反応物は、自動化機械を用いて樹脂粒子を適当な溶媒で洗浄して除く。「ｔＢｏｃ」法および「Ｆｍｏｃ」法を含めて種々の方法がこの分野では良く知られている。特に、Atherton et al.,J Chem Soc Perkin Trns 1:538-546(1981)およびSheppard et al.,Int J Polypeptide Prot Res 20:451-454(1982)参照。

血漿カリクレイン結合および阻害のためのアッセイ

適当な方法を使用して本発明の化合物を試験することができる。スカッチャード（Ann NY Acad Sci(1949)51:660-669）は蛋白質結合に応用できる結合を測定し分析する古典的方法を記載している。この方法は比較的純粋な蛋白質、および結合した蛋白質を結合していない蛋白質から区別する能力を要する。
K_Dを測定する第二の適当な方法は、酵素に対して阻害活性を測定することである。測定すべきK_Dが１ｎＭないし１μＭの範囲にあると、この方法は発色体または螢光基質および比較的純粋な阻害剤を数十マイクログラムないしミリグラム必要とする。K_Dが５ｎＭないし50ｐＭの範囲の本発明の蛋白質に対し、ナノグラムないしマイクログラムの阻害剤

で十分である。この方法を使用するとき、阻害剤と酵素基質との間の競合は真のK_iよりも高い測定したK_iを与えることができる。ここに報告された測定は、補正が非常に小さくどの補正もK_iを小さくするのであまり正確ではない。ここに、我々はK_Dの直接の測定値として測定されたK_iを使用する。

第二の物質の蛋白質の親和力を決定する第三の方法は、M13のような遺伝子パッケージに蛋白質を表示し、固定化した「第二の物質」に接着する蛋白質の能力を測定することである。この方法は遺伝子パッケージを増幅することができるので非常に鋭敏である。ｐＨステップグラジエントを使用して結合定数に対する少なくとも半定量的な値を得る。プロテアーゼに対する既知の親和力の阻害剤を使用して他のファージ表示阻害剤に判断されるものをに対して標準のプロフィルを確立する。他の適当な蛋白質結合の測定方法はいずれも使用することができる。

好ましくは、本発明の蛋白質はｐＫＡに対するK_Dが多くて約５ｎＭ、さらに好ましくは多くて約300ｐＭ、そして最も好ましくは100ｐＭ以下である。好ましくは、結合はK_iがK_Dと同じであるように阻害する。ＫＫII/3#6のK_iは約300pMであり、ＫＫ２/#11およびＫＫ２/#13のK_iは300pMよりも小さく恐らくは100pMよりも小さい。

製薬学的方法および調製

本発明の好ましい対象は哺乳動物である。本発明は特にヒトの治療に有用であるが、また獣医学的応用にも適している。

ここで「保護」は「予防(preventing)」、「抑止」、および「治療」を含む。「予防」は病気の誘発前に薬剤を投与することを含む。「抑止」は病気が臨床上現れる前に薬剤を投与することを含む。「治療」は病気が現れた後に薬剤を投与することを含む。

ヒトおよび獣医の薬では、誘導事象が未知であるか潜伏しているか、または患者が誘導事象の発生した後まで確かめられないので、「予防」と「抑止」との間を区別することはできない。我々は「予防」と「抑止」を含むように「治療」とは区別して「予防(prophylaxis)」の語を使用する。ここで、「保護」は「予防(prophylaxis)」を含む。保護は無制限に使用される必要はない。

本発明の蛋白質は、どんな方法でも、系統的にまたは局所的に投与することができ、対象を病気または不都合な状態から保護する。例えば、この種の組成物を非経口投与、巨丸剤注入または逐次灌流によって投与することができる。代わりに、または同時に、経口投与することができる。適当な摂生は有効量の蛋白質の投与からなり、時間、日、月、または年の期間にわたる１回の投与または複数回の投与で行われる。

本発明の蛋白質の適当な投与量は受容者の年齢、性別、健康、および体重、同時治療の種類、あるいは、治療回数、および望まれる効果に依存する。しかしながら、最も好ましい投与量は、当業者によって理解され決定できるので、この分野で知られている方法で投与量を調整して過度の実験をすることなく、各対象に合わせて調整することができる。

蛋白質を含む薬剤の臨床前および臨床時のテスト方法は、例えば、ベルコウらのThe Merck Manual,15th edition,Merck and Co.,Rahway,N.J.,1987;グッドマンら著のGoodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,8th edition,Pergamon Press,Inc.,Elmsford,N.Y.,(1990);Avery's Drug Treatment:Principles and Practice of Clinical Pharmcology and Therapeutics,3rd edition,ADIS Press,LTD.,Williams and Wilkins,Baltimore,MD.(1987),エバジのPharmacology,Little,Brown and Co.,Boston,(1985)、これらの文献および引用された文献は、ここに参考文献として組み込まれる。

ここに開示した蛋白質の他に、製薬組成物は製薬学的に受入られる担体、賦形薬、または補助薬を含む。例えば前記各文献を参照。

インヴィトロ診断方法および試薬

本発明の蛋白質はインヴィトロで、血漿カリクレインを含む任意適当な試料に応用して存在するｐＫＡを測定することができる。このようにするため、アッセイは存在するｐＫＡの分量に依存する検出できるシグナルを与えるシグナル生成システム（ＳＰＳ）を含まなければならない。シグナルは視覚であるいは機械で検出される。可能なシグナルは着色、螢光、または発光生成物の生成、アッセイ成分または製品による発光の吸収または放射の

特性の変更、および成分または製品の沈澱または凝集を含む。
診断試薬と最も密接に接合するＳＰＳの成分は「標識」と呼ばれる。標識は、例えば、放射性同位元素、螢光団、酵素、補酵素、酵素基質、電子密集化合物、または凝集性粒子である。放射性同位元素は、例えば、γカウンターまたはシンチレーションカウンターを使用して、またはオートラジオグラフィーによって検出できる。特に有用な同位元素は^{3}Ｈ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ、および、好ましくは^{125}Ｉである。また化合物を螢光化合物で標識を付けることもできる。螢光による標識を付けた化合物は適当な長さの光に露光させ、その存在を検出することができる。最も普通に使用される螢光標識化合物はフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、ｏ－フタルアルデヒド、およびフルオレサミンである。代わりに、螢光放出金属、例えば^{125}Ｅｕまたは他のランタナイドを、ジエチレントリアミン５酢酸またはエチレンジアミン４酢酸のような金属キレート基を用いて結合蛋白質に結合させる。また蛋白質は化学ルミネセンス化合物、例えばルミノール、イソルミノール、theromaticアクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、およびオキザレートエステルにカップリングすることによって検出できるように標識を付けることができる。同様に、生物発光化合物、例えばルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンを使用して結合蛋白質に標識を付けることができる。生物発光蛋白質の存在は発光の存在を検出して決定される。酵素標識、例えば西洋ワサビパーオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼが好ましい。
２つの基本タイプのアッセイがある：異種および同種。異種アッセイでは、分析物への類縁分子の結合は標識に影響を与えない；従って、分析物の分量を決定するため、結合した標識を遊離標識から分離しなければならない。同種アッセイでは、相互作用は標識の活性に影響を与え、分析物は分離しないで測定することができる。
一般に、カリクレイン結合蛋白質（ＫＢＰ）は、抗ｐＫＡ抗体を使用する同じ方法で診断に利用することができる。従って、アッセイ形式によって、または、競合阻害によって、ｐＫＡを結合する他の物質によって、ｐＫＡをアッセイするために使用することができる。
通常試料は生物学的流体、例えば血液、尿、リンパ液、精液、乳、または脳脊髄液、またはそれらの誘導体、または生物学的組織、例えば組織切片または均等質である。試料は何でもよい。試料が生物学的流体または組織であるならば、ヒトまたは他の哺乳動物、脊椎動物または動物、または植物から取り出すことができる。好ましい試料は血液、またはその断片または誘導体である。
１つの好適例では、ＫＢＰを固定化し、試料中のｐＫＡを既知量の標識を付けたまたは特異的に標識を付けたｐＫＡ類似体を競合させる。「ｐＫＡ類似体」はｐＫＡそれ自体を含むＫＢＰに結合するためのｐＫＡと競合できる分子である。前に標識を付けてもよく、または標識をｐＫＡからｐｋａ類似体を区別する部分に特異的に結合することによって後で標識を付けてもよい。相を分離して、一つの相の中の標識を付けたｐＫＡ類似体を定量する。
「サンドウイッチアッセイ」では、不溶化ｐＫＡ結合剤（ＫＢＡ）、および標識ＫＢＡの両方を用いる。ｐＫＡ分析物は不溶化ＫＢＡによって捕捉され、標識ＫＢＡによって標識を付けられ、第三コンプレックスを形成する。試薬を任意の順番で試料に添加することができる。それらのＫＢＡは同じかまたは異なり、１つだけのＫＢＡは本配列によるＫＢＡでなければならない（他のものは例えば、抗体であってもよい）。第三コンプレックスの標識を付けたＫＢＡの量は試料中のｐＫＡの量に正比例する。
上述の２つの好適例は両方とも異種アッセイである。同種アッセイはＫＢＰをｐＫＡに結合して標識が影響を受けることだけが必要である。ｐＫＡ阻害剤を診断試薬として使用するならばｐＫＡ分析物はそれ自体標識として働くことができる。
標識は直接または間接に（例えば、標識を付けた抗ＫＢＰ抗体を介して）、共有結合的に（例えばＳＰＤＰと）または非共有結合的に、ｐＫＡ結合蛋白質に結合させることができ、診断試薬を生成する。同様にｐＫＡ結合蛋白質は固相支持体に結合し固相（「捕獲」）

診断試薬を生成する。適当な支持体はガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、およびマグネタイトを含む。本発明の目的のために、担体はある程度まで溶解でき、または溶解しない。支持体材料は結合した分子がｐＫＡを結合できる限りどんな構造でもよい。

インヴィヴォ診断用途

ｐＫＡに緊密に結合するクニッツドメインはインヴィヴォ映像のために使用できる。病巣の診断映像はモノクローナル抗体のための最大の商業的好機の一つと考えられたが、この好機は達成されなかった。かなり努力したにもかかわらず、２種のモノクローナル抗体を基礎とした映像剤のみが認められた。モノクローナル抗体を用いて得られるこの失望させられる結果は大部分次の理由による：

ｉ）不十分な親和力および／または特異性；

ii）標的部位への弱い浸透；

iii）非標的部位からの遅いクリアランス；

iv）免疫原性（大部分はネズミ）；および

ｖ）高い生成コストおよび低い安定性。

これらの制限が診断映像分野においてペプチドを基礎とした映像剤の開発の開始へと最も導かれた。弱い浸透と遅いクリアランスの問題を潜在的に解決すると同時に、ペプチドを基礎とした映像剤は十分な親和力、特異性およびインヴィヴォ安定性を有し最も応用に有効である。

製作された蛋白質は映像剤としての要求に非常に適している。特に、既知のインヴィヴォクリアランス率と機構を有する小さく安定なヒト起源蛋白質ドメインを工学技術によって得られる異例の親和力と特異性は、初期の、さらに信頼性のある結果、小さい毒性／副作用、さらに低い生産と貯蔵のコスト、および標識調製のさらに大きい便利さに加わる。実際に、工学処理された蛋白質映像剤を用いて実時間の映像のゴールを達成できる必要がある。カリクレイン結合蛋白質、例えばＫＫII/3#6、ＫＫ２/#11、およびＫＫ２/#13は過剰なｐＫＡ活性の部位を制限するために用いられる。

放射性同位元素の標識を付けた結合蛋白質は、ヒトまたは動物の対象に投与できる。次の動的および／または静的映像に適当な放射性同位元素検出装置を用いることができるように、一般に注射、例えば、静脈注射または動脈注射または十分な量の投与手段によって投与は行われる。投与量は診断に有効な映像を与えることができる最少量であり、既知の放射性同位元素映像剤をガイドとして用いるこの分野で普通の手段で決定することができる。

一般に、映像は対象の全体で、または健康状態または検討される病気に関連した身体または器官の一部で行われる。放射性同位元素結合蛋白質は蓄積する。関連する標的器官で時間で所定点にて蓄積された放射性同位元素の標識を付けた結合蛋白質の量を次に定量することができる。

特に適当な放射性同位元素検出装置はシンチレーションカメラ、例えばγカメラである。カメラでの検出装置は放射性崩壊を検知し、記録し、（そして任意にディジタル化する）。ディジタル化情報は適当な方法で分析することができ、その多くはこの分野で知られている。例えば、時間－放射性分析は、時間と共に標的器官によって、放射性同位元素の標識を付けた結合蛋白質のクリアランスによる取り込みを示すことができる。

適当な放射性同位元素を選ぶ際に種々の因子を考慮に入れる。アイソトープを選ぶには、映像の際に解像度を良い品質にする、ヒトや動物の診断用に安全である、そして好ましくは、身体に受ける放射線の分量を減らすように半減期が短いことである。使用する放射性同位元素は好ましくは製薬学的に不活性であり、投与量は実質的な生理学的効果をもたせない。結合蛋白質は異なる沃素アイソトープ、例えば、^{123}Ｉ、^{125}Ｉまたは^{131}Ｉ（例えば米国特許4,609,725参照）を用いて放射性同位元素標識を付けることができる。標識の分量は適当にモニターされる必要がある。

ヒト対象に応用する際には、身体の全暴露量を減らし、標識分子の検出可能性を最適にするため、標識用の^{125}Ｉとは別のラジオアイソトープを使用することが望ましい。ヒトに

使用するため臨床的に入手できることを考慮すると、好ましい放射性同位元素の標識には次のものを含む：^{99m}Ｔｃ、^{67}Ｇａ、^{68}Ｇａ、^{90}Ｙ、^{111}Ｉｎ、^{113m}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅまたは^{21}Ａｔ。放射性同位元素の標識を付けた蛋白質は種々の方法で調製することができる。これらはクロラミン－Ｔまたはラクトパーオキシダーゼ法による放射性同位元素ハロゲン化、および続く高圧液体クロマトグラフィーによる精製を含む、例えば、GutkowskaらのEndocrinology and Metabolism Clinisc of America:(1987) 16(1):183参照。放射性同位元素標識の他の方法は、例えばＩＯＤＯＢＥＡＤＳ（登録商標）を使用することができる。

放射性同位元素標識蛋白質は、活性剤を哺乳動物の薬剤の作用部位に到達するようにする任意の手段によって投与することができる。蛋白質は経口投与するとき消化されてしまうので、非経口投与、すなわち、静脈内の皮下注射、筋肉内注射が通常吸収を最適にするために使用される。

高親和力の、高特異性の阻害剤はまた過剰のヒトｐＫＡ活性のインヴィヴォ診断に有用である。

他の用途

本発明のカリクレイン結合蛋白質はまたカリクレインを流体、例えば血液から精製するために使用することができる。このために、ＫＢＰは好ましくは不溶性支持体に固定化される。このような支持体は固相診断試薬を調製する際に有用なものとして既に記述されたものを含む。

蛋白質は、蛋白質の分離または精製の際の表示のために分子量マーカーとして使用することができる。蛋白質は分子良マーカーとして使うために変性する必要がある。蛋白質の第二の一般的効用は加水分解した蛋白質を栄養源として使用することである。蛋白質はまた溶液の粘度を上げるために使用することもできる。

本発明の蛋白質は上記の目的のいずれにも、またさらにこの明細書の初めに議論したような治療および診断の目的にも使用することができる。

実施例１：第１のＬＡＣＩ－Ｋ１ライブラリーの構築

ＮｓｉＩ－およびＭｌｕＩ－適合化末端をもつ合成オリゴヌクレオチド二本鎖ＤＮＡ分子を、上記２個の酵素で予め開裂した親ベクター（ＬＡＣＩ－Ｋ１：III）にクローンした。得られた連結物質をＸＬＩＭＲ(Ｆ$^{-}$) Eacherichia coli株に電気穿孔法によりトランスフェクションし、アンピリシン(Ap)プレートで培養し、ファージ発生Ap^{R}コロニーを得た。段階１に対する斑図はＰ１領域に集中し、残基13、16、17、18および19に影響を及ぼした。6.6×10^{5}の異なるＤＮＡ配列（3.1×10^{5}の異なる蛋白質配列）を見込んだ。得られたライブラリーは1.4×10^{6}の独立したcfu'sからなり、ライブラリー全体のほぼ二倍の表示である。この培養から生成したファージストックは約3.9ml中に1.4×10^{13}のpfu'sの全滴定量を与え、平均で、全体で１×10^{7}そしてファージストックml当たり2.6×10^{6}倍の各独立したクローンが表示された。

残基31、32、34および39（段階II）の斑を与えるため、ＭｌｕＩ－およびＢｓｔＥII－適合化末端を用いた合成オリゴヌクレオチド二本鎖ＤＮＡ分子を、次の１つから誘導された予め開裂した$Ｒ_{f}$ＤＮＡにクローニングをした。

i)親構築物、

ii)段階Ｉライブラリー、または

iii)所定の標的に結合する第一の段階から選択された表示ファージ。

段階IIのための斑図は、残基31、32、34および39にて変更による4096の異なるＤＮＡ配列を見込んだ。最後の段階II斑は、段階Ｉにおいて所定の標的を用いる３ラウンドの結合と溶離に続いて残っている斑の水準に依存する。

両段階について合わせた可能な斑は2.7×10^{8}の異なるＤＮＡ配列または5.0×10^{7}の異なる蛋白質配列に等しい。予め選択した表示ファージは段階IIの斑に対して$Ｒ_{f}$ＤＮＡの起源として使用され、最後の斑の水準は恐らく10^{5}ないし10^{6}の範囲内であろう。

実施例２：カリクレインに結合するためのＬＡＣＩ－Ｋ１ライブラリーのスクリーニング

与えられたプロテアーゼに結合するＬＡＣＩ－Ｋ１変異体を選択するための全体図は、緩

衝液中（１mg/ml ＢＳＡ含有ＰＢＳ）のカリクレイン－ビーズでファージ表示ライブラリーをインキュベーションし、結合せず不十分に保持された表示ファージ変異体を0.1% Tween 20を含有するＰＢＳで洗浄することを含む。カリクレインビーズはヒト血漿カリクレイン（Calbiochem,San Diego,CA,#420302）をReactigel(６×)(Pierce,Rockford,II,#202606)を用いてアガロースゲルにカップリングすることによって作製した。さらに強く結合した表示ファージは低いｐＨの溶離緩衝液、一般には１mg/ml ＢＳＡ含有のクエン酸緩衝液（ｐＨ2.0）で溶離し、直ちにトリス緩衝液でｐＨ7.5まで中和する。この工程は選択の１ラウンドを構成する。

中和した溶離表示ファージは次のいずれにも使用できる：

i)E.coliのF^+株を植付けて新しい表示ファージストックを生成し、選択の次のラウンドに使用する（いわゆる従来のスクリーニング）、または

ii)プロテアーゼビーズを用いて選択の他の直接のラウンドに直接使用する（いわゆるクイックスクリーニング）。

一般に、いずれかの方法の３ラウンド、または２つの組合せが、最終の選択された表示ファージを生じるように行われ、そこから代表する数に配列分析をして、表示ファージのプールとしてまたは各クローンとして結合性を分析する。

選択の２段階が行われ、各々は結合と溶離の３ラウンドからなる。クローンの副次集団を生じる標的プロテアーゼに対して結合と溶離の３ラウンドを通過した段階Ｉライブラリー（斑入り残基13、16、17、18、および19）を、段階Ｉの選択は使用した。この選択した副次集団から誘導されたR_fＤＮＡを使用して段階IIライブラリー（斑入り残基31、32、34および39の追加）を生成した。約1.8×10^7の独立した形質転換細胞が段階ＩＩライブラリーの各々について得られた。最終選択を起こす同じ標的プロテアーゼを用いて結合と溶離のさらに３ラウンドを、段階IIライブラリーは受けた。

ヒト血漿カリクレイン－アガロースビーズに対する選択の２段階に続いて、最終選択表示ファージの代表的な数（10）に配列分析をした。アミノ酸配列が表２に示され、ＫＢＰcon1からＫＫII/3#Cを記載する。

表２３はＫkII/3(D)がヒトカリクレインの高い特異性の阻害剤であることを示す。ＬＡＣＩ－Ｋ１誘導ＫkII/3(D)を表示するファージは、それが他のプロテアーゼ標的に結合するよりも少なくとも50倍でカリクレインビーズに結合する。

予備測定はＫＫII/3#6が500pMよりも恐らく小さいK_iでｐＫＡの有効な阻害剤であることを示している。

発現、精製および動力学的分析

３単離物ＫＫII/3#6、ＫＫ２/#11、およびＫＫ２/#13は酵母発現ベクターに再クローンした。酵母発現ベクターはｐＭＦアルファ８（ＫＵＲＪ82およびＭＩＹＡ85）から誘導した。ＬＡＣＩ変異体遺伝子はｍａｔα１遺伝子の部分に融合し、ｍａｔα１プロモーター－シグナルペプチドおよびＬＡＣＩ変異体にシークェンス融合されたリーダーからなるハイブリッド遺伝子を生成した。クローニング部位を表２４に示す。特に、正しく処理したＬＡＣＩ－Ｋ１変異体蛋白質は表２に詳述するように、Ｎ－末端ｍｅｔに残基ｇｌｕ－ａｌａ－ａｌａ－ｇｌｕを付加する（表２の残基１）。S.cerevisiaeでの発現はこのシステムを代表する受入られる収率であった。酵母発現ＬＡＣＩ（クニッツドメイン１）、ＢＰＴＩおよびＬＡＣＩ変異体：ＫＫII/3#6、ＫＫ２/#11、およびＫＫ２/#13はトリプシンアガロースビーズを用いるアフィニティクロマトグラフィーによって精製した。

大量生産では、Pichia pastorisは好ましいホストである。P.pastorisの最も好ましい生産系はアルコールオキシダーゼ系である。他のものは酵母Pichia pastorisに多くの蛋白質を生成した。例えば、ヴェドヴィックら（ＶＥＤ91）およびワグナーら（ＷＡＧＮ92）は

$\approx$ 1 mg/ml

で培養基に分泌蛋白質としてメタノールによって誘導したアルコールオキシダーゼプロモーターからアプロチニンを生成した。グレッグら（ＧＲＥＧ93）はP.pastorisで多くの蛋白質の生成を検討した。ＧＲＥＧ93の表１はP.pastorisでの蛋白質の生成および収率を示

す。
米国および外国の特許または特許出願、および未特許の開示物を含めて、ここに全文献の全体を参考文献として組み込まれる。

表１：全ＬＡＣＩの配列

```
    1    5          5          5          5          5
  1 MIYTMKKVHA LWASVCLLLN LAPAPLNAds eedeehtiit dtelpplklM
 51 HSFCAFKADD GPCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFIYGGCEGN QNRFESLEEC
101 KKMCTRDnan riikttlqqe kpdfcfleed pgicrgyitr yfynnqtkqc
151 erfkyggclg nmnnfetlee cknicedgpn gfqvdnygtq lnavnnsltp
201 qstkvpslfe fhgpswcltp adrglcrane nrfyynsvig kcrpfkysgc
251 ggnennftsk qeclrackkg fiqriskggl iktkrkrkkq rvkiayeeif
301 vknm    (SEQ ID NO. 18)
```

シグナル配列（１－28）は大文字で下線を引いてある。
ＬＡＣＩ－Ｋ１は大文字である。
ＬＡＣＩ－Ｋ２は下線を引いてある。
ＬＡＣＩ－Ｋ３は太字である。
表２は以下の通りである。

表３：pＫＡに結合するためのＬＡＣＩ－ＫＩドメインの第１選択のまとめ

BPTI #	(LACI)	ライブラリー残基	好ましい残基
13	P	LHPR	HP
16	A	AG	AG
17	I	FYLHINA SCPRTVD G	NSA
18	M	全部	HL
19	K	LWQMKAG SPRTVE	QLP
31	E	EQ	E
32	E	EQ	EQ
34	I	all	STI
39	E	all	GEA

表２：クニッツドメインの配列、ヒトｐＫＡを阻害する若干のもの

Ident	アミノ酸配列 1111111111222222222233333333334444444445555555551234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	SEQ ID NO.
BPTI	RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGA	SEQ ID NO. 2
LACI-K1	mhsfcafkaddgpckaimkrfffniftrqceefiyggcegnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 3
KBPcon1	mhsfcafkaddgHckaNHQrfffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 4
KKII/3#1	mhsfcafkaddgHckASLPrfffniftrqcEEfIyggcEgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 5
KKII/3#2	mhsfcafkaddgPckANHLrfffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 6
KKII/3#3	mhsfcafkaddgHckANHQrfffniftrqcEEfTyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 7
KKII/3#4	mhsfcafkaddgHckANHQrfffniftrqcEQfTyggcAgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 8
KKII/3#5	mhsfcafkaddgHckASLPrfffniftrqcEEfIyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 9
KKII/3#6	mhsfcafkaddgHckANHQrfffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 10
KKII/3#7	mhsfcafkaddgHckANHQrfffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 11
KKII/3#8	mhsfcafkaddgHckANHQrfffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 12
KKII/3#9	mhsfcafkaddgHckANHQrfffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 13
KKII/3#10	mhsfcafkaddgHckGAHLrfffniftrqcEEfIyggcEgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 14
KKI/3(a)	mhsfcafkaddgRckGAHLrfffniftrqceefiyggcegnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 15

表2：クニッツドメインの配列、ヒトｐＫＡを阻害する若干のもの

Ident	アミノ酸配列 1111111111222222222333333333444444444555555555 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	SEQ ID NO.
KKI/3(b)	mhsfcafkaddgPckAIHLrfffnifttrqceefiyggcegnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 16
KKII/3#C	mhsfcafkaddgHckANHQrfffnifttrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 17
KK2/#13	mhsfcafkaDGgRcRGAHPrWffnifttrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 19
KK2/#14	mhsfcafkaDGgRcRGAHPrWffnifttrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 20
KK2/#5	mhsfcafkaDDgPcRAAHPrWffnifttrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 21
KK2/#11	mhsfcafkaDDgPcRAAHPrWffnifttrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 22
KK2/#1	mhsfcafkaDVgRcRGAHPrWffnifttrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 23
KK2/#4	mhsfcafkaDVgRcRGAQPrFffnifttrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 24
KK2/#6	mhsfcafkaDDgScRAAHLrWffnifttrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 25
KK2/#10	mhsfcafkaEGgScRAAHQrWffnifttrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 26
KK2/#8	mhsfcafkaDDgPcRGAHLrFffnifttrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 27
KK2/#3	mhsfcafkaDDgHcRGALPrWffnifttrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 28
KK2/#9	mhsfcafkaDSgNcRGNLPrFffnifttrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 29
KK2/#7	mhsfcafkaDSgRcRGNHQrFffnifttrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 30

表２：クニッツドメインの配列、ヒトｐＫＡを阻害する若干のもの

Ident	アミノ酸配列 1111111111222222222233333333334444444444555555555 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	SEQ ID NO.
KK2/#12	mhsfcafkaDGgRcRAIQPrWffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 31
KK2con1	mhsfcafkaDDgRcRGAHPrWffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 32
ヒトLACI-K2	KPDFCFLEEDPGICRGYITRYFYNNQTKQCERFKYGGCLGNMNNFETLEECKNICEDG	SEQ ID NO. 33
DKI-1.2.1	kpdfcfleedGgRcrgAHPrWfynnqtkqceEfSyggcGgnmnnfetleecknicedg	SEQ ID NO. 34
ヒトLACI-K3	GPSWCLTPADRGLCRANENRFYYNSVIGKCRPFKYSGCGGNENNFTSKQECLRACKKG	SEQ ID NO. 35
DKI-1.3.1	gpswcltpadDgPcraAHPrfyynsvigkcEpfSysgcggnennftskqeclrackkg	SEQ ID NO. 36
ヒトコラーゲンα3 KuDom	ETDICKLPKDEGTCRDFILKWYYDPNTKSCARFWYGGCGGNENKFGSQKECEKVCAPV	SEQ ID NO. 37
DKI-2.1	etdicklpkdegtcrAAHlkwyydpntkscaEfSyggcggnenkfgsqkecekvcapv	SEQ ID NO. 38
TFPI-2ドメイン1	NAEICLLPLDYGPCRALLLRYYYDRYTQSCRQFLYGGCEGNANNFYTWEACDDACWRI	SEQ ID NO. 39
DKI-3.1.1	naeicllpldGgpcraAHlryyydrytqscEqfSyggcegnannfytweacddacwri	SEQ ID NO. 40
TFPI-2ドメイン2	VPKVCRLQVS- VDDQCEGSTEKYFFNLSSMTCEKFFSGGCHRNR- IENRFPDEATCMGFCAPK	SEQ ID NO. 41

表２：クニッツドメインの配列、ヒトｐＫＡを阻害する若干のもの

Ident	アミノ酸配列 1111111111222222222233333333334444444444555555555 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	SEQ ID NO.
DKI-3.2.1	vpkvcrlqvs- vddqcRAAHPkyffnlssmtceEffsggchrnr- ienrfpdeatcmgfcapk	SEQ ID NO. 42
TFPI-2ドメイン３	IPSFCYSPKDEGLCSANVTRYYFNPRYRTCDAFTYTGCGGNDNNFVSREDCKRACAKA	SEQ ID NO. 43
DKI-3.3.1	ipsfcyspkdegHcRaAHQryyfnpryrtcdaftytgcggndnnfvsredckracaka	SEQ ID NO. 44
ヒト ITI-K1	KEDSCQLGYSAGPCMGMTSRYFYNGTSMACETFQYGGCMGNGNNFVTEKECLQTCRTV	SEQ ID NO. 45
DKI-4.1.1	kedscqlgyDagpcRgAHPryfyngtsmacetfSyggcGgngnnfvtekeclqtcrtv	SEQ ID NO. 46
ヒト ITI-K2	TVAACNLPIVRGPCRAFIQLWAFDAVKGKCVLFPYGGCQGNGNKFYSEKECREYCGVP	SEQ ID NO. 47
DKI-4.2.1	tvaacnlpiDDgpcraAHqlwafdavkgkcEEfSyggcEgngnkfysekecreycgvp	SEQ ID NO. 48
DKI-4.2.2	tvaacnlpiDDgpcraAHqRwafdavkgkcEEfSyggcqgngnkfysekecreycgvp	SEQ ID NO. 49
ヒト プロテアーゼ NEXIN-II	VREVCSEQAETGPCRAMISRWYFDVTEGKCAPFFYGGCGGNRNNFDTEEYCMAVCGSA	SEQ ID NO. 50
DKI-5.1	vrevcseqaetgpcraAHPrwyfdvtegkcEEfSyggcggnrnnfdteeycmavcgsa	SEQ ID NO. 51
HKI B9ドメイン	LPNVCAFPMEKGPCQTYMTRWFFNFETGECELFAYGGCGGNSNNFLRKEKCEKFCKFT	SEQ ID NO. 53
DKI-6.1	lpnvcafpmeDgpcRAAHPrwffnfetgeceEfayggcggnsnnflrkekcekfckft	SEQ ID NO. 54

表２：クニッツドメインの配列、ヒトｐＫＡを阻害する若干のもの		
	アミノ酸配列 1111111111222222222233333333334444444444555555555	
Ident	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	SEQ ID NO.
DKI-7.1	rpdfcleppEtgpcRaAHPryfynakaglcEEfvyggcGakrnnfksaedcmrtcgga	SEQ ID NO. 55

表３は上記にある。

表８：選択されたカリクレイン結合表示ファージに対する結合データー

表示ファージ (a)	結合した画分 (b)	相対結合 (c)
LACI	4.2×10^{-6}	1.0
BPTI	2.5×10^{-5}	6.0
KKI/3(a)	3.2×10^{-3}	761
KKI/3(b)	2.2×10^{-3}	524
KKII/3#5	3.9×10^{-3}	928
KKII/3#6	8.7×10^{-3}	2071

（ａ）表示ファージのクローン単離物。ＬＡＣＩ－Ｋ１は親分子、ＢＰＴＩ（ウシ膵臓のトリプシン阻害剤）はコントロールおよびＫＫII/3（５および６）およびＫＫＩ/3（ａおよびｂ）を標的プロテアーゼへの結合によって選択した。

（ｂ）入力数（10^{10}pfu's)の画分として結合実験後に溶離したpfu's の数。

（ｃ）親表示ファージ、ＬＡＣＩ－Ｋ１に対して結合した画分。

表９：保守的および半保守的置換

初期のＡＡタイプ	区分	保守的置換	半保守的置換
A	小非極性または僅かな極性	G，S，T	N，V，P，（C）
C	遊離ＳＨ	A，M，L，V，I	F，G
	ジスルフィド	なし	なし
D	酸性、親水性	E，N，S，T，Q	K，R，H，A
E	酸性、親水性	D，Q，S，T，N	K，R，H，A
F	芳香族	W，Y，H，L，M	I，V，（C）
G	Ｇｌｙのみ構造	なし	なし
	「通常」構造	A，S，N，T	D，E，H，I，K，L，M Q，R，V
H	両性の芳香族	Y，F，K，R	L，M，A，（C）
I	脂肪族、分枝 β 炭素	V，L，M，A	F，Y，W，G，（C）
K	塩基性	R，H	Q，N，S，T，D，E，A
L	脂肪族	M，I，V，A	F，Y，W，H，（C）
M	疎水性	L，I，V，A	Q，F，Y，W，（C），(R)（K），(E)
N	非極性親水性	S，T，（D），Q A，G，（E）	K，R
P	不撓性	V，I	A，（C），(D)，(E)，F，H，（K），L，M，N，Q（R），S，T，W，Y

表９：保守的および半保守的置換

初期のＡＡタイプ	区分	保守的置換	半保守的置換
Q	脂肪族　プラスアミド	N，E，A，S，TD	M，L，K，R
R	塩基性	K，Q，H	S，T，E，D，A
S	親水性	A，T，G，N	D，E，R，K
T	親水性	A，S，G，N，V	D，E，R，K，I
V	脂肪族、分枝　β炭素	I，L，M，A，T	P，（C）
W	芳香族	F，Y，H	L，M，I，V，（C）
Y	芳香族	F，W，H	L，M，I，V，（C）

Ａ，Ｆ，Ｈ，Ｉ，Ｌ，Ｍ，Ｐ，Ｖ，Ｗ，またはＹからＣまでの変化は、新しいシステインが遊離チオールとして残存するならば半保守的である。
ＭからＥ，Ｒ，Ｋまでの変化は、新しい側鎖基のイオン先端が蛋白質表面に届くことができ、メチレン基が疎水性の接触をするならば、半保守的である。
ＰからＫ，Ｒ，Ｅ，またはＤの１までの変化は、側鎖基が蛋白質の上または近くにあるならば、半保守的である。

表１４：クニッツドメインの定義（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．５２）

1 2 3 4 5 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678 xxxxCxxxxxxGxCxxxxxxxXXXxxxxxxxCxxFxXXGCxXxxXxXxxxxxCxxxCxxx
ここで：
X1，X2，X3，X4，X58，X57，及び X56 は存在しない、
X21 = Phe，Tyr，Trp，
X22 = Tyr又はPhe，
X23 = Tyr又はPhe，
X35 = Tyr又はTrp，
X36 = Gly又はSer，
X40 = Gly又はAla，
X43 = Asn又はGly，及び
X45 = Phe又はTyr

表１５：ＫｕＤｏｍ上のｐＫＡに対して高親和力を与える置換基

位置	好ましい	許される	うまく働かない
10	**Asp**, Glu	Ala, Gly, Ser, Thr	Lys, Asn, (Arg, Cys, Phe, His, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, Val, Trp, Tyr)
11	**Asp, Gly**, Ser, Val	Glu, Leu, Met, [Asn, Ile, Ala, Thr]	(Cys, Phe, His, Lys, Pro, Gln, Arg, Trp, Tyr)
12	**Gly**	（他のアミノ酸によってC_{14}-C_{38} ジスルフィドが置換された場合のみの他のアミノ酸）	

表１５：ＫｕＤｏｍ上のｐＫＡに対して高親和力を与える置換基

位置	好ましい	許される	うまく働かない
13	**Arg, His**, Pro, Asn, Ser	[Thr, Ala, Gly, Lys, Gln]	Phe, Tyr, Cys, Leu, Ile, Val, Asp (Glu, Met, Trp)
14	**Cys**	（C_{38} もまた変わった場合のみの他のアミノ酸）	
15	**Arg**, Lys	[Ala, Ser, Gly, Met, Asn, Gln]	(Cys, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Leu, Pro, Thr, Val, Trp, Tyr)
16	**Ala, Gly**	[Ser, Asp, Asn]	(Cys, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr)
17	**Ala, Asn**, Ser, Ile	[Gly, Val, Gln, Thr	Cys, Asp, Phe, His, Pro, Arg, Tyr, (Glu, Lys, Met, Trp)
18	**His**, Leu, Gln	[Ala,	Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr
19	**Pro, Gln, Leu**	[Asn, Ile]	Ala, Glu, Gly, Met, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, (Cys, Asp, Phe, His, Tyr)
20	**Arg**	Leu, Ala, Ser, Lys, Gln, Val	(Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Met, Asn, Pro, Thr, Trp, Tyr)

表１５：ＫｕＤｏｍ上のｐＫＡに対して高親和力を与える置換基

位置	好ましい	許される	うまく働かない
21	**Trp, Phe**	[Tyr, His, Ile]	Cys, Leu (Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val)
31	**Glu**	[Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Thr]	(Arg, Lys, Cys, Phe, Gly, His, Met, Pro, Trp, Tyr)
32	**Glu, Gln**	[Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly, Val]	(Cys, Phe, His, Ile, Lys, Met, Arg, Trp, Tyr)
33	**Phe**	[Tyr]	他の18は排除
34	**Ser, Thr, Ile**	[Val, Ala, Asn, Gly, Leu]	Cys, Asp, Glu, Phe, His, Lys, Met, Pro, Gln, Arg, Trp, Tyr
35	**Tyr**	[Trp, Phe]	(他の 17)
36	**Gly**	Ser, Ala	(他の 17)
37	**Gly**	（他のタイプによってC_{14}-C_{38}が置換された場合のみ許される他のアミノ酸タイプ）	
38	**Cys**	（C_{14}もまた変わった場合のみの他のアミノ酸）	
39	**Gly, Glu, Ala**	[Ser, Asp]	他の 15.

「好ましい」は、最も高い好ましいタイプは太字である。
「許される」は、実際にテストしなかったが、受入れられると判断されるタイプである。角括弧で示されるタイプは許されるが選択されない、しかしｐＫＡ結合をうまく破壊しないタイプに似ている。このようなタイプは好ましくないが、ｐＫＡ結合蛋白質はこのようなタイプをもつことができる。
「うまく働かない」は、括弧以外を試みたがそのタイプの単離物はなかったことを示す；括弧内のタイプは試験しなかったが、実際に排除したタイプを考慮して不適当であると判断される。

表２１：ＬＡＣＩ－Ｋ１の第１の多様化（斑）

```
   a    b    1    2    3    4    5    6    7    8    9   10
   A    E    M    H    S    F    C    A    F    K    A    D
|gcc|gag|atg|cat|tcc|ttc|tgc|gcc|ttc|aag|gct|gat|
          | NsiI  |

                                I|N
                                C|H
                            F|S F|Y
                            Y|C L|S L|S
                            L|P W|P W|P
                            H|R Q|R Q|R
                            I|T M|T M|T
                            N|V K|V K|V
        L|P                 A|D A|E A|E
  D    G   H|R  C    K   A|G  G   D|G  G    R
 11   12   13  14   15   16  17   18  19   20
|gat|ggt|cNt|tgt|aaa|gSt|NNt|NNS|NNg|cgt|

  F    F    F    N    I    F    T    R    Q    C
 21   22   23   24   25   26   27   28   29   30
|ttc|ttc|ttc|aac|atc|ttc|acg|cgt|cag|tgc|
                          | MluI  |

             Q|E                  N|H
             M|K                  C|I
             F|S                  F|Y
             Y|C                  L|S
             L|P                  W|P
             H|R                  Q|R
             I|T                  M|T
             N|V                  K|V
             A|D                  A|E
E|Q E|Q  F  G|W  Y   G   G   C  G|D  G   N   Q
31  32  33  34  35  36  37  38  39  40  41  42
|Sag|Saa|ttc|NNS|tac|ggt|ggt|tgt|NNS|ggt|aac|cag|
                                    | BstEII |
```

表２１、続き

```
  N   R   F   E   S   L   E   E
 43  44  45  46  47  48  49  50
|aac|cgg|ttc|gaa|tct|cta|gag|gaa|
        | BstBI |   | XbaI |
  | AgeI |
```

```
 51  52  53  54  55  56  57  58  59  60
  C   K   K   M   C   T   R   D   G   A
|tgt|aag|aag|atg|tgc|act|cgt|gac|ggc gcc
                                | KasI  |
```

NsiIからMluIの部分は65,536個の配列および31,200個の蛋白質配列を与える。斑の第２群は21,840および32,768個の変異体を与える。この斑はMluIおよびAgeI、BstBI、またはXbaI末端の一つをもつ画分に入ることができる。コドン42と3'制限部位との間が近いため、自己プライミングオリゴヌクレオチドを作り、充塡し、MluI、そして例えば、BstBIで切断する。全変異体は2.726 $\times 10^9$ および8.59×10^9 である。

ＤＮＡ配列は ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ．56である。

アミノ酸配列は ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ．57である。

表２３：特異性の結果

M13 gIIIp に表示された蛋白質	試験した固定化酵素				
	プラスミン	トロンビン	ｐＫＡ	トリプシン	トリプシン２回洗浄
ＬＡＣＩ－Ｋ１	1	1	1	1	1
KkII/3(D)	3.4	1.5	196.	2.	1.4
ＢＰＴＩ	88.	1.1	1.7	0.3	.8

数字は親のファージの表示と比較したファージ表示クローンの相対結合に関連している。

KkII/3(D)（カリクレイン）クローンはトリプシンに対する親の分子の親和力を保持する。KkII/3(D)はｐＫＡへの結合に対して選択された。

表２４：Ｍａｔα S. cerevisiae 発現ベクター：

```
Matα1 (Mfα8)

          K   R   P   R                                  SEQ ID NO. 58
  5'-...|AAA|AGG|CCT|CGA|G...-3'                         SEQ ID NO. 59
            | StuI  |
                  | XhoI |

Matα2 (StuI-cut DNA にリンカーを導入後)

                                          アミノ酸：      SEQ ID NO. 60
    K   R   E   A   A   E   P   W   G   A   .   .   L   E
5'|AAA|AGG|GAA|GCG|GCC|GAG|CCA|TGG|GGC|GCC|TAA|TAG|CTC|GAG|3'
                | EagI |  | StyI  | KasI  |          | XhoI  |
                                                DNA: SEQ ID NO. 61

Matα-LACI-K1, amino acids: SEQ ID NO. 62, DNA: SEQ ID NO. 63
             a   b   c   d   1   2   3   4   5   6   7   8
    K   R   E   A   A   E   M   H   S   F   C   A   F   K
 5'|AAA|AGG|GAA|GCG|GCC|GAG|atg|cat|tcc|ttc|tgc|gct|ttc|aaa|
                | EagI |  | NsiI  |

    9  10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20
    A   D   D   G   P   C   K   A   I   M   K   R
  |gct|gat|gaC|ggT|ccG|tgt|aaa|gct|atc|atg|aaa|cgt|
            | RsrII |              | BspHI|

   21  22  23  24  25  26  27  28  29  30
    F   F   F   N   I   F   T   R   Q   C
  |ttc|ttc|ttc|aac|att|ttc|acG|cgt|cag|tgc|
                          | MluI  |

   31  32  33  34  35  36  37  38  39  40  41  42
    E   E   F   I   Y   G   G   C   E   G   N   Q
  |gag|gaA|ttC|att|tac|ggt|ggt|tgt|gaa|ggt|aac|cag|
      | EcoRI |                      | BstEII |

           43  44  45  46  47  48  49  50
            N   R   F   E   S   L   E   E
          |aac|cgG|ttc|gaa|tct|ctA|gag|gaa|
            |     | BstBI |  | XbaI |
            | AgeI |

  51  52  53  54  55  56  57  58  59  60
   C   K   K   M   C   T   R   D   G   A
 |tgt|aag|aag|atg|tgc|act|cgt|gac|ggc|gcc|TAA|TAG|CTC|GAG|-3'
                                | KasI  |        | XhoI  |
```

我々はＭａｔαプレ配列がＧＬＵ$_a$－ＡＬＡ$_b$－前に開裂することを期待する。

表２７：高特異性血漿カリクレイン阻害剤

LACI-K1 (SEQ ID NO. 3)

MHSFCAFKADDGPCKAIMKRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD

KKII/3#7 (SEQ ID NO. 11)

mhsfcafkaddg**H**ck**ANHQ**rfffniftrqc**EE**f**S**yggc**G**gnqnrfesleeckkmctrd

KKII/3#7-K15A (SEQ ID NO. 64)

mhsfcafkaddgh**cA**anhqrfffniftrqceefsyggcggnqnrfesleeckkmctrd

KK2/#13-R15A (SEQ ID NO. 65)

mhsfcafkaDGgRc**A**GAHPrWffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd

KK2/#11-R15S (SEQ ID NO. 66)

mhsfcafkaddgpc**S**aahprwffniftrqceefsyggcggnqnrfesleeckkmctrd

表４９

	残基数											
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
LACI-K1	D	D	G	P	C	K	A	I	M	K	R	F
ＫＫII/3選択体の一致	d	d	g	H	c	k	A	N	H	Q	r	f
ＫＫライブラリー＃２	NK DE	NI AD ST GV	g	FS YC LP HR IT NV AD G	c	KR	AG	NI AD ST GV	QL HP R	QL HP R	r	FW CL
KK2/#13	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KK2/#14	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KK2/#5	-	-	-	P	-	-	A	-	-	-	-	-
KK2/#11	-	-	-	P	-	-	A	-	-	-	-	-
KK2/#1	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KK2/#4	-	V	-	-	-	-	-	-	Q	-	-	F
KK2/#6	-	-	-	S	-	-	A	-	-	L	-	-
KK2/#10	E	G	-	S	-	-	A	-	-	Q	-	-
KK2/#8	-	-	-	P	-	-	-	-	-	L	-	F
KK2/#3	-	-	-	H	-	-	-	-	L	-	-	-
KK2/#9	-	S	-	N	-	-	-	N	L	-	-	F
KK2/#7	-	S	-	-	-	-	-	N	-	Q	-	F
KK2/#12	-	G	-	-	-	-	A	I	Q	-	-	-
一致　＃２	D	D	g	R	c	R	G	A	H	P	r	W

表７５０：ライブラリーＫＫＦを具体化するＤＮＡ

```
                                                                N|K
                M   H   S   F   C   A   F   K   A   D|E
                1   2   3   4   5   6   7   8   9   10
  5'-cctcct atg cat tcc ttc tgc gcc ttc aag gct RaS
            | NsiI  |

        F|S
        Y|C
        L|H
        R|I
I|V     V|T                V|T (M) (K)
T|A     A|G                A|S L|P L|P
S|G     D|N                G|D Q|R R|H
D|N  G   P   C  K|R A|G I|N  H   Q   R
11  12  13  14  15  16  17  18  19  20
RNt ggt NNt tgt aRa gSt RNt cNS cNS cgt

W|L
F|C  F   F   N   I   F   T   R  (SEQ ID NO. 69)
21  22  23  24  25  26  27  28
tKS ttc ttc aac atc ttc acg cgt tccctcc-3' (SEQ ID NO. 67)
       3'-g ttg tag aag tgc gca agggagg-5' (SEQ ID NO. 68)
                        | MluI  |
```

親のＬＡＣＩ－Ｋ１表示遺伝子（表６）に見出されるＲsrIIおよびＢspＨＩ部位はライブラリーＫＫＦには存在しない。

1,536,000のアミノ酸配列および4,194,304のＤＮＡ配列がある。Met_{18}およびLys_{19}はライブラリーＫＫＦでは許容されない。

引例

ADEL86: Adelman *et al.*, *Blood* (1986) **68**(6)1280-1284.

ALBR83a: Albrecht *et al.*, *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* (1983), **364**:1697-1702.

ALBR83b: Albrecht *et al.*, *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* (1983), **364**:1703-1708.

ANBA88: Anba *et al.*, *Biochimie* (1988) **70**(6)727 -733.

ANGL87: Angliker *et al.*, *Biochem J* (1987) **241**(3)871-5.

AUER88: Auerswald *et al.*, *Bio Chem Hoppe-Seyler* (1988), **369**(Supplement):27-35.

BALD85: Balduyck *et al.*, *Biol Chem Hoppe-Seyler* (1985) **366**:9-14.

BANE90: Baneyx & Georgiou, *J Bacteriol* (1990) **172**(1)491-494.

BANE91: Baneyx & Georgiou, *J Bacteriol* (1991) **173**(8)2696-2703.

BERN93: Berndt *et al.*, *Biochemistry* (1993) **32**:4564-70.

BHOO92: Bhoola *et al.*, *Pharmacological Reviews* (1992) **44**(1)1-80.

BROW91: Browne *et al.*, *GeneBank* entry M74220.

BROZ90: Broze *et al.*, *Biochemistry* (1990) **29**:7539-7546.

COLM87: Colman *et al.*, Editors, **Hemostasis and Thrombosis**, Second Edition, 1987, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA.

COLM87a: Colman *et al.*, Chapter 1 of COLM87.

DAVI79: Davis *et al.*, US Patent 4,179,337 (1979).

DENN94a: Dennis & Lazarus, *J Biological Chem* (1994) **269**:22129-22136.

DENN94b: Dennis & Lazarus, *J Biological Chem* (1994) **269**:22137-22144.

EIGE90: Eigenbrot *et al.*, *Protein Engineering* (1990), **3**(7)591-598.

ELLI92: Ellis *et al.*, *Ann N Y Acad Sci* (1992) **667**:13-31.

FIDL94: Fidler & Ellis, *Cell* (1994) **79**:185-188.

FRAE89: Fraedrich *et al.*, *Thorac Cardiovasc Surg* (1989) **37**(2)89-91.

GARD93: Gardell, *Toxicol Pathol* (1993) **21**(2)190-8.

GIRA89: Girard *et al.*, *Nature* (1989), **338**:518-20.

GIRA91: Girard *et al.*, *J. BIOL. CHEM.* (1991) **266**:5036-5041.

HOOV93: Hoover *et al.*, *Biochemistry* (1993) **32**:10936-43.

HORT91: Hortin & Trimpe, *J Biol Chem* (1991) **266**(11)6866-71.

HYNE90: Hynes *et al.*, *Biochemistry* (1990), **29**:10018-10022.

KEMP88b: Kemp & Bowen, *Tetrahedron Letts* (1988) **29**:5077-5080.

KIDO88: Kido *et al.*, *J Biol Chem* (1988), **263**:18104-7.

KIDO90: Kido *et al.*, *Biochem & Biophys Res Comm* (1990), **167**(2)716-21.

KLIN91: Kline *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* (1991) **177**(3)1049-55.

LASK80: Laskowski & Kato, *Ann Rev Biochem* (1980), **49**:593-626.

LEAT91: Leatherbarrow & Salacinski, *Biochemistry* (1991) **30**(44)10717-21.

LOHM93: Lohmann & J Marshall, *Refract Corneal Surg* (1993) **9**(4)300-2.

LUCA83: Lucas *et al.*, *J Biological Chem* (1983) **258**(7)4249-56.

MANN87: Mann & Foster, Chapter 10 of COLM87.

MARC85: **Advanced Organic Chemistry, Third Edition** March, J, John Wiley and Sons, New York, 1985; ISBN 0-471-88841-9.

MIYA85: Miyajima *et al.*, *Gene* (1985) **37**:155-161.

NEUH89: Neuhaus *et al.*, *Lancet* (1989) **2**(8668)924-5.

NOVO89: Novotny *et al.*, *J. BIOL. CHEM.* (1989) **264**:18832-18837.

PARK86: Park & Tulinsky, *Biochemistry* (1986) **25**(14)3977-3982.

PUTT89: Putterman, *Acta Chir Scand* (1989) **155**(6-7)367.

ROBB87: Robbins, Chapter 21 of COLM87

SCHE67: Schechter & Berger. *Biochem Biophys Res Commun* (1967) **27**:157-162.

SCHE68: Schechter & Berger. *Biochem Biophys Res Commun* (1968) **32**:898-902.

SCHM87: Schmaier *et al.*, Chapter 2 in COLM87.

SCHN86: Schnabel *et al.*, *Biol Chem Hoppe-Seyler* (1986), **367**:1167-76.

SHER89: Sheridan *et al.*, *Dis Colon Rectum* (1989) **32**(6)505-8.

TIAN92: Tian *et al.*, *Int J Pept Protein Res* (1992) **40**(2)119-26.

VAND91: van der Logt *et al.*, *BIOCHEMISTRY* (1991) **30**:1571-1577.

VAND92: van Dijl *et al.*, *EMBO J* (1992) **11**(8)2819-2828.

VARA83: Varadi & Patthy, *Biochemistry* (1983) **22**:2440-2446.

VARA84: Varadi & Patthy, *Biochemistry* (1984) **23**:2108-2112.

WILS93: Wilson *et al.*, *Tetrahedron* (1993)**49**(17)3655-63.

WUNT88: Wun *et al.*, *J. BIOL. CHEM.* (1988) **263**:6001-6004.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
A61P 9/00	***(2006.01)***	A61P	9/00	
A61P 11/00	***(2006.01)***	A61P	11/00	
A61K 51/00	***(2006.01)***	A61K	49/02	A
C12P 21/02	***(2006.01)***	C12P	21/02	C
C12Q 1/37	***(2006.01)***	C12Q	1/37	

(74)代理人
弁理士 臼井 伸一
(74)代理人
弁理士 藤野 育男
(74)代理人
弁理士 越智 隆夫
(74)代理人
弁理士 本宮 照久
(74)代理人
弁理士 高梨 憲通
(74)代理人
弁理士 朝日 伸光
(74)代理人
弁理士 高橋 誠一郎
(74)代理人
弁理士 吉澤 弘司
(72)発明者 マークランド，ウイリアム
アメリカ合衆国 マサチュセッツ州 ０１７５７ ミルフォード，ウインザー ロード ２６
(72)発明者 ラドナー，ロバート，チャールス
アメリカ合衆国 メイランド州 ２１７５４，イジャムスビル，グリーン バレイ ロード ３８２７

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 国際公開第９３／０１４１２２（WO，Ａ１）
国際公開第９３／０１４１２１（WO，Ａ１）
国際公開第９３／０１４１２０（WO，Ａ１）
GIRARD T.J. et al., Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation , Nature, 英国, １９８９年 ４月 ６日, Vol.338, No.5, 518-520

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C07K 14/81
A61K 38/55
A61K 51/00
A61P 9/00
A61P 11/00
A61P 43/00
C12N 1/19
C12N 15/09
C12P 21/02

C12Q 1/37
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
CA(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq
PubMed