

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5539896号
(P5539896)

(45) 発行日 平成26年7月2日(2014.7.2)

(24) 登録日 平成26年5月9日(2014.5.9)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 12 N 9/68	(2006.01)	C 12 N 9/68	
C 12 N 1/15	(2006.01)	C 12 N 1/15	
C 12 N 1/19	(2006.01)	C 12 N 1/19	
C 12 N 1/21	(2006.01)	C 12 N 1/21	

請求項の数 16 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-536117 (P2010-536117)
 (86) (22) 出願日 平成20年11月25日 (2008.11.25)
 (65) 公表番号 特表2011-505140 (P2011-505140A)
 (43) 公表日 平成23年2月24日 (2011.2.24)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2008/084645
 (87) 國際公開番号 WO2009/073471
 (87) 國際公開日 平成21年6月11日 (2009.6.11)
 審査請求日 平成23年11月24日 (2011.11.24)
 (31) 優先権主張番号 60/991,148
 (32) 優先日 平成19年11月29日 (2007.11.29)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 506074484
 グリフォルス・セラピューティクス・イン
 コーポレーテッド
 G r i f o l s T h e r a p e u t i c
 s, I n c.
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ 27
 709 リサーチ トライアングル パー
 ク, ティー. ダブリュ. アレクサンダ
 ラードライブ 79, リサーチ コモンズ
 4101
 (74) 代理人 100098759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組換え的に改変されたプラスミン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 の配列に少なくとも 95 % 同一であるポリペプチドであって、
 a) 天然ヒトプラスミノーゲンのクリングルドメインに対応する单一の N 末端クリング
 ルドメインであって、該クリングルドメイン内の最後の 4 個のアミノ酸配列が V P Q C で
 ある、N 末端クリングルドメイン；そして
 b) 天然ヒトプラスミノーゲンの対応するドメインに一致する C 末端ドメイン活性化部
 位およびセリンプロテアーゼドメイン

を含み、固定化リシンに結合するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポ
 リヌクレオチド。

【請求項 2】

コードされるポリペプチドが配列番号 2 に示される配列である、請求項 1 に記載のポリ
 ヌクレオチド。

【請求項 3】

前記ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、配列番号 1 に示される配列又はその縮重
 バリアントである、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

前記ポリペプチドが、ミニ - プラスミンのフィブリノーゲンに対する結合親和性より低
 いフィブリノーゲンに対する結合親和性を示す、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

10

20

前記ポリペプチドが、ミニ - プラスミンの部分的に切断されたフィブリンに対する結合親和性より高い部分的に切断されたフィブリンに対する結合親和性を示す、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

前記ポリペプチドが、参考ポリペプチドと比較して減少した免疫原性を有し、該参考ポリペプチドが前記ポリペプチドの一次アミノ酸配列と、参考ポリペプチドの単一のN末端クリングルドメインの最後の4個のアミノ酸配列がV P Q Cではない点を除き、同一である一次アミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

前記ポリペプチドが、クリングルドメインとセリンプロテアーゼドメインとの間に位置するA r g - V a lペプチド結合のタンパク質分解性切断に少なくとも関与する活性化事象の後に機能的プラスミンへと活性化できる、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。

【請求項 9】

前記ポリペプチドが、 I_2 - アンチプラスミンによるミニプラスミンの線維素溶解活性の阻害の速度よりも、少なくとも 5 倍速い阻害の速度で、 I_2 - アンチプラスミンにより阻害される線維素溶解活性を示す、請求項 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

20

前記ポリペプチドが、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を有する請求項 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

前記ポリペプチドが、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の位置 8 5 と同等の相対的位置にアルギニンを有する、請求項 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

請求項 1 のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の発現ベクターを含んでなる細胞。

【請求項 14】

30

異なる N 末端を有する 1 又は複数の組換えプラスミンポリペプチドを製造する方法であつて、当該方法が以下の：

a) 請求項 8 に記載のポリペプチドを提供し；

b) 工程 a) で提供されたポリペプチドを、1 又は複数のペプチド結合を切断するために十分な条件下でプロテアーゼと接触させて、それにより異なる N - 末端を有する 1 又は複数の組換えプラスミンポリペプチドを形成する

を含む、前記方法。

【請求項 15】

前記ポリペプチドが、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 14 に記載の方法。

40

【請求項 16】

前記提供工程が、配列番号 1 で示される D N A 配列又はその縮重バリアントを大腸菌において発現させることを含む、請求項 14 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願へのクロスリファレンス

本願は、引用することにより本明細書に組み込まれる、2007年11月29日に出願された米国仮出願 60 / 991, 148 に対する 35 U S C § 119 の下で優先権を請求する。

50

【背景技術】**【0002】**

ヒトプラスミノーゲンは、791アミノ酸残基を含有する1本鎖タンパク質である。プラスミンへのプラスミノーゲンの活性化は、チモーゲンにおけるArg561-Va1562ペプチド結合の單一切断によって起こる。得られるプラスミン分子は、トリプシン様特異性(LysおよびArgの後で切断する)を有する2本鎖のジスルフィド結合したセリンプロテアーゼである。

【0003】

プラスミンのアミノ末端重鎖(残基1~561、~60kDa)は、各々約80アミノ酸残基を含有する5個のクリングルドメインからなる。クリングルドメインは、活性化阻害剤、例えばC1⁻¹イオンとの活性化刺激剤、例えば-アミノカブロン酸との;哺乳類および細菌細胞との;そしてプラスミン生理的基質フィブリンおよびプラスミン阻害剤2-抗プラスミンのような他のタンパク質との相互作用のような、プラスミノーゲンの調節特性に関与する。全ての5個のクリングルのうち、クリングル1は最も多機能性の1つであり:そのリシン結合活性は2-抗プラスミンおよびフィブリンとのプラスミン相互作用に関与することが示されている。非特許文献1;および非特許文献2を参照。

【0004】

プラスミンのC末端軽鎖(残基562~791、~25kDa)は、トリプシンに相同なそして古典的なセリンプロテアーゼ触媒トライアド:His603、Asp646およびSer741を含有する典型的なセリンプロテアーゼである。プラスミノーゲンは、24個のジスルフィド架橋ならびにAsn289およびThr346上の2個のグリコシリ化部位を含有する。

【0005】

エラスターーゼによるプラスミノーゲンの限定タンパク質分解は、3つの主要フラグメントをもたらすことが示されている(非特許文献3)。第一のフラグメント、K1-3は最初の3個のクリングルを含み、そして2つのバージョン、Tyr80-Va1338およびTyr80-Va1354において単離することができる。第二のフラグメント、K4は4番目のクリングルに対応し、そして残基Va1355-Ala440を含む。最後のC末端フラグメント(いわゆる、ミニ-プラスミノーゲン)は残基Va1443-Asn791を含み、そして5番目のクリングルおよびセリンプロテアーゼドメインからなる。ミニ-プラスミノーゲンは、プラスミノーゲンと同じように活性化することができ、ミニ-プラスミンを生成せしめる。

【0006】

全長プラスミノーゲン分子の複雑な構造のために、細菌発現系は組換えプラスミノーゲン生産に有用であると判明していない。プラスミノーゲンは不溶性の封入体の形態において生産され、そしてその状態からリフォールディングできない。さらに、哺乳類細胞におけるプラスミノーゲンの発現は、プラスミンへのプラスミノーゲンの細胞内活性化および結果として生じる細胞毒性により複雑化される。昆虫細胞を用いた完全に活性のプラスミノーゲンの生産は可能であり、しかしながら、この系は低収率のために大規模生産に適していない。さらに、任意の組換えタンパク質スキームのように、治療用組換えタンパク質を与える患者において免疫原性問題に直面する可能性がある。

【0007】

免疫原性は、ある種の組換えタンパク質治療スキームの有効なそして/もしくは効率の良い利用に対する障害であり得る。免疫原性は外来と認識される物質(例えば、アミノ酸配列を包含するタンパク質の化学構造)に対する複雑な一連の反応であり、そして中和および非中和抗体の生産、免疫複合体の形成、補体活性化、マスト細胞活性化、炎症ならびにアナフィラキシーを包含することができる。免疫原性は、多様にタンパク質治療の効能および安全性を限定し得る。効能は、中和抗体の形成により直接的に減少され得る。中和もしくは非中和抗体のいずれかへの結合は典型的に血清からの迅速なクリアランスをもたらすので、効能はまた間接的にも減少され得る。免疫反応が引き起こされると重度の副作用

10

20

30

40

50

用および死亡さえ起こり得る。中和抗体が内在性タンパク質と交差反応しそしてその機能を阻止するとある特定のクラスの副作用が起こる。

【0008】

従って、プラスミン／プラスミノーゲンの望ましい特性（例えば、天然様化学構造を有する領域）を保有し、一方である種の負の特性を欠きそして相当量で細菌細胞を包含する組換えタンパク質発現系において生産することができる改変された組換えタンパク質が望ましい。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Wiman, B., et al., *Biochim. Biophys. Acta* 579: 142-154 (1979)

10

【非特許文献2】Lucas, M. A., et al., *J. Biol. Chem.* 258: 4249-4256 (1983)

【非特許文献3】Sottrup-Jensen, L., et al., *Prog. Chem. Fibrinol. Thrombol.*, 3: 191-209 (1978)

【発明の概要】

【0010】

発明の要約

1つの態様において、本発明は

20

a) 天然ヒトプラスミノーゲンのクリングルドメインに相同的な单一のN末端クリングルドメイン、ここで、クリングルドメイン内の最後の4個のアミノ酸残基はV、P、QおよびCである；および

b) ヒトプラスミノーゲンにおける対応するドメインに相同的なC末端ドメイン活性化部位およびセリンプロテアーゼドメインを有するポリペプチド（ここで、該ポリペプチドは固定化リシンに結合する）をコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドを提供する。

【0011】

別の態様において、本発明は：

a) 天然ヒトプラスミノーゲンのクリングルドメインに相同的な单一のN末端クリングルドメイン、ここで、クリングルドメイン内の最後の4個のアミノ酸残基はV、P、QおよびCである；および

30

b) ヒトプラスミノーゲンにおける対応するドメインに相同的なC末端ドメイン活性化部位およびセリンプロテアーゼドメインを含んでなるポリペプチド（ここで、該ポリペプチドは固定化リシンに結合する）を提供する。

【0012】

他の態様において、本発明は本発明のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターを提供する。1つの態様において、ポリヌクレオチドは配列番号：1に示されるようなヌクレオチド配列を含んでなる。

40

【0013】

ある態様において、本発明は本発明のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターを含んでなる培養細胞を提供する。1つの態様において、ポリヌクレオチドは配列番号：1に示されるようなヌクレオチド配列を含んでなる。別の態様において、培養細胞は原核生物である。1つの態様において、原核生物はエシェリキア・コリ（E. coli）である。

【0014】

1つの態様において、本発明は1つもしくはそれ以上の組換えプラスミンポリペプチドを製造する方法を提供する。該方法は：

a) 天然ヒトプラスミノーゲンのクリングルドメインに相同的な单一のN末端クリングルドメイン（ここで、クリングルドメイン内の最後の4個のアミノ酸残基はV、P、Qおよ

50

び C である) ; ならびにヒトプラスミノーゲンにおける対応するドメインに相同な C 末端ドメイン活性化部位およびセリンプロテアーゼドメインを有するポリペプチド(ここで、該ポリペプチドは固定化リシンに結合する)を提供すること; ならびに

b) 段階 a) において提供されるポリペプチドを 1 つもしくはそれ以上のペプチド結合を切断するために十分な条件下でプロテアーゼと接触させ、それにより 1 つもしくはそれ以上の組換えプラスミンポリペプチドを生成せしめること

を含んでなる。1 つの態様において、提供することは適当な宿主において配列番号: 1 に示されるような配列に対応する配列もしくはその縮重バリアントを有するオープンリーディングフレームを発現させることを含んでなる。別の態様において、ポリペプチドは配列番号: 2 に示されるようなアミノ酸配列を有する。

10

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図 1】図 1 は、タンパク質分解切断による活性化後の天然プラスミンの略図である。K 1 ~ K 5 はクリングル領域 1 ~ 5 であり; そして S P はセリンプロテアーゼドメインである。「2 - A P」はクリングル 1 上の Arg^1 - 抗プラスミン結合部位である。

【図 2】図 1 におけるのと同じ用語を用いる、そして K 2 ~ 5 の欠失を示す本発明のプラスミノーゲン欠失突然変異体の略図である。

【図 3】- 1 9 ~ - 1 として番号が付けられた 1 9 残基リーダー配列、および残基 1 ~ 7 9 1 (配列番号: 3、ヒトプラスミノーゲンの c D N A 配列; および図 3 に示されるような、配列番号: 4、コードされるアミノ酸配列を参照) として示されるプラスミノーゲン配列を示すヒトプラスミノーゲンのアミノ酸配列を示す。以下のもの: (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲン配列の 1 つの態様(網掛け); クリングルドメイン 1 ~ 5 (二重下線); グリコシル化部位 A s n 2 8 9 および T h r 3 4 6 (ボールド体); A r g - V a 1 活性化部位(ボールド体の R 5 6 1 V 5 6 2); ならびにクリングル 1 におけるリシン結合部位(下線のそして特定位置番号付けを有する)を包含する多数の特徴が示される。

20

【図 4】天然ヒトプラスミン(オーゲン)(p l a s m i n (o g e n))の 5 個のクリングルドメイン(1 ~ 5)間のポリペプチド配列比較(すなわち、ギャップアラインメント)を示す。クリングル 1 における同じ相対的位置のものと同一であるアミノ酸残基は下線で示される。

【図 5】血漿由来のプラスミン(レーン 1 = 非還元(N R) : レーン 2 = 還元(R))および(T A L 6 0 0 3) - プラスミン(レーン 3 = 非還元(N R) : レーン 4 = 還元(R))調製物の 8 ~ 2 5 % 勾配 S D S - P A G E を示す。それぞれ、天然プラスミンおよび組換え(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンへの血漿由来のプラスミノーゲンおよび(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンのストレプトキナーゼ活性化は、クリングルおよびセリンプロテアーゼドメインに対応する 2 本のバンドの形成をもたらす。従って、電気泳動の前の還元剤ジチオスレイトール(D T T)とのインキュベーションの後に、非還元ゲル上で単一バンドである血漿由来のプラスミンおよび(T A L 6 0 0 3) - プラスミンは、同じ非還元ゲルにおいてクリングル 1(下側のバンド)およびセリンプロテアーゼドメイン(上側のバンド)に対応する 2 本のバンドに還元する。

30

【図 6】ストレプトキナーゼによる(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンの活性化のグラフ表示である。

40

【図 7】リシン - セファロース 4 B への(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンの結合を示すクロマトグラムである: 0.5 m g の精製された(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンを T r i s 緩衝食塩水、p H 7.4 で平衡化したリシン - セファロース 4 B カラム(1 x 3 c m) 上にかけた。結合タンパク質は、単一ピークとして - A C A の 0 ~ 2 0 m M 勾配によりカラムから溶出された。流出容量の関数として、2 8 0 n m での吸光度および - A C A の濃度をグラフ上に提示する。

【図 8】t P A によるその後の活性化および結果として起こる血栓溶解により評価した場合のフィブリンへの(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンの結合を示す。

【図 9】血漿由来のプラスミンと(T A L 6 0 0 3) - プラスミンとの血栓溶解効能のイ

50

ンビトロ比較を示す。

【図10】(T A L 6 0 0 3) - プラスミン(配列番号: 2)のジスルフィド結合パターンを例示する。図において、(X)はアミノ酸配列 R D V V L F E Kを表す。

【0016】

発明の記述

本発明者等は、その構造からの4個のクリングルの欠失にもかかわらず天然プラスミノーゲン様特性を有する(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンと本明細書において呼ばれる新規組換えプラスミノーゲンポリペプチドもしくはそのバリアントを見出した。これらの(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンもしくはそのバリアントは、チモーゲンのクリングルドメインとセリンプロテアーゼドメインとの間に位置する Arg - Valペプチド結合のタンパク質分解切断を少なくとも伴う活性化事象の後に機能性プラスミン酵素(本明細書において(T A L 6 0 0 3) - プラスミンと呼ばれる)に活性化されるようになることができるチモーゲンである。

【0017】

本発明の(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンもしくはそのバリアントは、全長天然ヒトプラスミノーゲンのフィブリンおよび抗プラスミン結合ならびに活性化特性を有する。さらに、(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンは、組換え生産における高レベル発現およびヒト血漿由来のプラスミノーゲンの天然に存在する形態と同一であるかもしくは非常に類似したある種のタンパク質化学構造を包含する多数の新規のそして望ましい特性を有する。

【0018】

本発明の(T A L 6 0 0 3) - プラスミン(オーゲン)は、少なくとも下記の事項を特徴とすることができます:

i) (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンの活性化後に生成される(T A L 6 0 0 3) - プラスミンのより低い分子量(例えば、1つの態様において約36, 911 ~ 約37, 039 Da)は、増加した比活性(タンパク質のmg当たり)をもたらす;

ii) 比較的低い分子量と合わせて、天然タンパク質に存在する少なくとも2個のグリコシル化部位(図3参照、すなわち、N^{2,8,9}およびT^{3,4,6})の欠如は、比較的安価な細菌および酵母発現系を用いたこのタンパク質の組換え生産を容易にする;

iii) (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンは、プラスミノーゲンアクチベーター tPA、ウロキナーゼおよびストレプトキナーゼにより活性化することができる;

iv) 天然ヒトプラスミノーゲンのクリングルドメインに相同的な单一のN末端クリングルドメインの存在は、血栓溶解効能に重要であるプラスミンのフィブリン結合特性を維持する;

v) 天然ヒトプラスミノーゲンのクリングルドメインに相同的な单一のN末端クリングルドメイン上の2 - 抗プラスミン結合部位の存在は、(T A L 6 0 0 3) - プラスミンがプラスミンのこの生理的阻害剤により迅速に阻害されることを可能にする(出血を防ぐことができる特性);

vi) (T A L 6 0 0 3) - プラスミンのより小さいサイズは、₂ - マクログロブリンによるそれらの阻害を容易にし、さらに天然プラスミンと比較して出血性合併症の機会を減らすことができる。特定の態様において、完全な消化されていないフィブリン(オーゲン)(fibrinogen)の主要結合部位を保持するクリングル5の欠如は、循環するフィブリノーゲンの減少した枯渇を伴って(T A L 6 0 0 3) - プラスミンの使用を可能にすることができる;

vii) 天然ヒトプラスミノーゲンのクリングルドメインに相同的な单一のN末端クリングルドメイン(ここで、クリングルドメイン内の最後の4個のアミノ酸残基はV、P、QおよびCである)の存在は、セリンプロテアーゼドメインへの天然様連結(すなわち、ヒトプラスミノーゲンのクリングル5ドメインとセリンプロテアーゼドメインとの間に天然に存在するドメイン連結点と同様の連結)を提供する; そして

viii) 組換え(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンの発現後に、そのN末端を切

10

20

30

40

50

断し戻して (c l e a v e d b a c k) (例えば、活性化中に切断し戻して) 天然様 N 末端を提供し得る。

【0019】

一般に、本発明は、ミニ - プラスミン (オーゲン) と比較してある種の利点を有する、活性化部位およびセリンプロテアーゼドメインに対して N 末端の単一のクリングル領域を有する組換え (T A L 6 0 0 3) - プラスミン (オーゲン) ポリペプチドを提供する。本発明の (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンは活性化部位に対して N 末端のそのようなものとして 1 個のクリングルドメインのみを有するが、ある態様には活性化部位に対して N 末端の追加の配列が含まれる。追加の N 末端配列は、プラスミノーゲンの天然クリングル領域のもの由来であることができる。

10

【0020】

本発明の N 末端クリングルドメインは、天然プラスミン (オーゲン) のクリングル 1 および 4 のクリングル配列ならびにその機能的同等物を含む。特に、リシン結合に関与するかもしくは影響を与える残基の維持を包含する、ポリペプチドバリエントにおける機能の維持に関するガイダンスを提供する以下の説明を参照。

【0021】

さらに、本発明のポリペプチドの特定の態様は、天然様構造のために減少した免疫原性を示すことができる。例えば、ある態様において、本発明の組換えプラスミノーゲンはヒト血漿由来のプラスミノーゲンの天然に存在する形態の 1 つのものと同一の N 末端を有し、それはストレプトキナーゼによる活性化の際に、天然様 N 末端を含んでなるプラスミンポリペプチドを生成する。従って、本発明の新規ポリペプチドは、天然に存在するヒトプラスミンにおけるクリングル 5 と S P ドメインとの間の連結点と同様のクリングルとセリンプロテアーゼドメインとの間の配列を有する。

20

【0022】

定義

他にそれに反して示されない限り、ポリペプチドの「ドメイン」および「領域」という用語は、本明細書において用いる場合に一般に同義語である。「クリングル」もしくは「セリンプロテアーゼ」などのようによく認識された構造もしくは機能表示と一緒に列挙される場合、そのような用語はそのような表示に対応するポリペプチド構造と関連する一般に認識されそして理解される少なくともいくつかの特徴 (1 つもしくは複数) に関連するポリペプチド特性を導入する。

30

【0023】

「培養宿主細胞」は、本明細書において用いる場合、任意の手段、例えば電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、微量注入、形質転換、ウイルス感染などにより細胞中に導入されている異種 DNA を含有する原核もしくは真核細胞をさす。

【0024】

「異種の」は、本明細書において用いる場合、「異なる天然起源のもの」もしくは非天然状態を表すことを意味する。例えば、培養宿主細胞が別の生物由来の、特に別の種由来の DNA もしくは遺伝子で形質転換される場合、その遺伝子はその培養宿主細胞に関してそしてまたその遺伝子を保有する培養宿主細胞の子孫に関しても異種である。同様に、「異種の」は同じ天然の元の細胞タイプに由来しそして挿入されるが、非天然状態、例えば異なるコピー数においてもしくは異なる調節要素の制御下で存在するヌクレオチド配列をさす。さらに、核酸もしくはアミノ酸配列との関連で用いる場合、「異種の」という用語はまた同じ配列の別の領域と異なる天然起源のものである配列の任意の領域をさすことができる。例えば、組換えタンパク質がアボリポタンパク質 (a) 由来のクリングルドメインおよびプラスミノーゲン由来のセリンプロテアーゼドメインを含んでなる場合、特に各ドメインが異なる種もしくは生物由来である場合、クリングルドメインおよびセリンプロテアーゼドメインは相互に対して「異種」である。

40

【0025】

「ベクター」分子は、異種核酸を挿入することができ、それを次に適切な培養宿主細胞

50

に導入することができる核酸分子である。ベクターは好ましくは1つもしくはそれ以上の複製起点、および組換えDNAを挿入することができる1つもしくはそれ以上の部位を有する。ベクターは、ベクターを有する細胞を有さないものから選択することができる都合のよい手段を有するが多く、例えば、それらは薬剤耐性遺伝子をコードする。一般的なベクターにはプラスミド、ウイルスゲノムおよび（主に酵母および細菌における）「人工染色体」が含まれる。

【0026】

本明細書において用いる場合、「転写制御配列」という用語はそれらが操作可能に連結される核酸配列をコードするタンパク質の転写を誘導するか、抑制するかもしくはそうでなければ制御する、イニシエーター配列、エンハンサー配列およびプロモーター配列のような核酸配列をさす。

10

【0027】

「ポリペプチド」という用語は、「ペプチド」および「タンパク質」という用語と互換可能に本明細書において用いられる。

【0028】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は互換可能に本明細書において用いられ、そして文脈により示される目的のために必要な情報を含有する任意の核酸をさすことができる。すなわち、ポリマーが例えばコードされるペプチドに関して適切な情報を表すことができそして相補的な配列、例えば核酸ポリマーのセンス鎖およびアンチセンス鎖を含むことができる限り、核酸は一本鎖もしくは二本鎖のいずれかのDNAもしくはRNA、または他の核酸であることができる。

20

【0029】

ポリペプチドの「バリエント」という用語は、1つもしくはそれ以上のアミノ酸により改変されるアミノ酸配列をさす。バリエントは「保存的」変化を有することができ、ここで、置換されたアミノ酸は類似構造もしくは化学特性を有する、例えばイソロイシンでのロイシンの置換。あるいはまた、バリエントは「非保存的」変化を有することができる、例えばトリプトファンでのグリシンの置換。類似したわずかなバリエーションにはまた、アミノ酸欠失もしくは挿入、または両方を包含することもできる。「バリエント」ポリペプチドの特定の形態は「機能的に同等な」ポリペプチド、すなわち、以下にさらに詳細に記述されるように、本発明のポリペプチドの例と実質的に同様のインビポもしくはインビトロ活性を示すポリペプチドである。生物学的もしくは免疫学的活性を除かずにどのアミノ酸残基を置換するか、挿入するか、もしくは欠失させるかを決定することにおけるガイダンスは、当該技術分野において周知であるコンピュータープログラム、例えばDNASTARソフトウェア（DNASTAR, Inc., Madison, WI）を用いて見出すことができる。さらに、引用することにより本明細書に完全に組み込まれる引用文献内に提供されるものを包含する、特定のガイダンスが以下に提供される。

30

【0030】

「N末端の」および「C末端の」という用語は、それらが適用される任意のアミノ酸配列またはポリペプチドメインもしくは構造の相対的位置を示すために本明細書において用いられる。相対的位置決めは、文脈から明らかである。すなわち、「N末端の」特徴は、同じ文脈において説明される別の特徴（第一の特徴に対して「C末端の」と呼ばれる可能性がある他の特徴）よりポリペプチド分子のN末端に少なくとも近く位置している。同様に、「5' -」および「3' -」という用語はポリヌクレオチドの特徴の相対的位置を示すために本明細書において用いることができる。

40

【0031】

「天然ヒトプラスミノーゲンのクリングルドメインに相同な」N末端ドメインを有すると本明細書において呼ばれるポリペプチドは、プラスミノーゲンの天然クリングルドメインと同様の構造および機能特性を示す。さらに、「クリングル1に相同な」N末端ドメインを有すると本明細書において呼ばれるポリペプチドは、少なくともポリペプチドがクリングル5より - アミノカルボン酸（およびトランス-4-アミノメチルシクロヘキサン

50

- 1 - カルボン酸、環状酸のような機能的ホモログ) に対して高い親和性を有することができる程度に、天然クリングル1と同様の特性を示す。5 - アミノペンタン酸(5 - A P n A) ; - アミノカプロン酸(A C A) としても知られている6 - アミノヘキサン酸(6 - A H x A) ; 7 - アミノヘプタン酸(7 - A H p A) ; およびトランス - 4 - アミノメチルシクロヘキサン - 1 - カルボン酸(t - A M C H A) への単離されたクリングルドメインポリペプチドの結合の比較のための条件およびプロトコルについては、例えは、引用することにより本明細書に組み込まれる、Chang, Y., et al., *Biochemistry* 37: 3258 - 3271 (1998) を参照。

【0032】

「クリングル4に相同な」クリングルドメインへの言及は、「クリングル1に相同な」という語句に関する上記の通り、同様に定義される。すなわち、それらは上記に説明したような天然ヒトプラスミノーゲンのクリングル4と同様の機能特性を示す。これらのポリペプチドはまた、上記のように固定化リシンにも結合する。

【0033】

本発明のポリペプチドは、固定化リシンに結合する。本明細書において用いる場合、「固定化リシンに結合する」という語句は、そのように特性化されるポリペプチドが、クロマトグラフィー媒質としてリシン - セファロースを用いてカラムクロマトグラフィーに供される場合にミニ - プラスミノーゲンと比較してそれらの進行が停滞することを意味する。典型的に、本発明のポリペプチドは、溶離剤として特定のリガンド、例えは A C A を含有する溶液を用いてそのようなクロマトグラフィー媒質(リシン親和性樹脂)から溶出することができる。

【0034】

さらに、Chang et al., 上記に加えて、保存的もしくは非保存的置換、欠失もしくは付加によりどの残基を変えることができるかを決定するために当業者は他の参考文献を調べて本発明の範囲内の欠失突然変異体を生成せしめることができる。例えは、以下の参考文献は、アミノカルボン酸の結合に重要であり得る天然クリングルドメインの特定の残基に関する情報を提供する：全てそれらの全部が引用することにより本明細書に組み込まれる、Ji, et al.への米国特許第6,538,103号；Suzukiへの米国特許第6,218,517号；Douglas, J. T., et al., *Biochemistry* 41(10): 3302 - 10 (2002)；Zajicek, J., et al., *J. Mol. Biol.*, 301(2): 333 - 47 (2000)；Lee, H., et al., *Arch Biochem Biophys.*, 375(2): 359 - 63 (2000)；Castellino, F. and S. McCance, Ciba Found Symp. 212: 46 - 60 (1997)；McCance, S., et al., *J. Biol. Chem.*, 269: 32405 - 32410 (1994)；Rejante, M. R. and M. Llinas, *Eur. J. Biochem.*, 221(3): 939 - 49 (1994)；Wu, T. P., et al., *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 5(2): 157 - 66 (1994)；Hoover, C. J., et al., *Biochemistry*, 32(41): 10936 - 43 (1993)；Menhart, N., et al., *Biochemistry*, 32: 8799 - 8806 (1993)；Thewes, T., et al., *J. Biol. Chem.*, 265(7): 3906 - 3915 (1990)；Novokhatny, V., et al., *Thromb Res.*, 53(3): 243 - 52 (1989)；Motta, A., et al., *Biochemistry*, 26(13): 3827 - 36 (1987)；Novokhatny, V., et al., *J. Mol. Biol.*, 179: 215 - 232 (1984)；Lerch, P. G., et al., *Eur. J. Biochem.*, 107(1): 7 - 13 (1980)；Sottrup-Jensen, L., et al., *Prog. Chem. Fibrinol. Thrombol.*, 3: 191 - 209 (1978)；およびWiman, B. and D. Collen, *Nature* 272, 549 - 50

45 (1978)。

【0035】

(1 つには、本明細書に記載の通り固定化リシンの結合について試験することにより評価することができる) 有益な機能特性を有する単一の N 末端クリングルドメインを有して有益な簡素化プラスミン (オーゲン) 分子を製造できることを本発明者等は認識しているので、本発明には活性化部位に対して N 末端の他のフィブリン結合ドメインもしくは領域を包含することができる。例えば、本発明には、ヒトプラスミノーゲンのクリングル 4 、 t P A のクリングル 2 もしくはアポリポタンパク質 (a) のクリングルが包含されるがこれらに限定されるものではない群から選択されるフィブリン結合クリングルにプラスミンのセリンプロテアーゼドメインが結合しているポリペプチドを包含することができる。さらには、本発明には、 t P A もしくはフィブロネクチンの「フィンガー」ドメイン、またはフィブリン特異的 I g G の F A B フラグメントのような任意の他の既知のフィブリン結合モジュールにプラスミンのセリンプロテアーゼドメインが結合しているポリペプチドを包含することができる。

10

【0036】

ある態様において、本発明のポリペプチドは、ヒト血漿由来のプラスミン (オーゲン) の天然に存在する形態に存在する化学構造と同一であるタンパク質化学構造 (例えば、天然様 N 末端およびクリングルとセリンプロテアーゼドメインとの間の天然様連結点) を有する。特定の理論にとらわれずに、そのアミノ酸配列が包含されるがそれに限定されるものではない、タンパク質のある種の特徴はその免疫原性の一因となり得ると考えられる。従って、本発明は、天然ヒトプラスミノーゲン配列に似ているアミノ酸配列の導入によって (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンの潜在的免疫原性を先制的に減らすことにより組換え (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンに基づく有効なタンパク質治療法を提供する。

20

【0037】

1 つの態様において、本発明の組換え (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンポリペプチドは、 a) 天然ヒトプラスミノーゲンのクリングルドメインに相同的な単一の N 末端クリングルドメイン、ここで、クリングルドメイン内の最後の 4 個のアミノ酸残基は V 、 P 、 Q および C である ; および b) ヒトプラスミノーゲンにおける対応するドメインに相同的な C 末端ドメイン活性化部位およびセリンプロテアーゼドメインを含んでなり ; ここで、該ポリペプチドは固定化リシンに結合する。1 つの態様において、単一の N 末端クリングルドメインは天然ヒトプラスミノーゲンのクリングル 1 もしくはクリングル 4 に相同である。ある態様において、固定化リシンはリシン - アガロース、リシン - ヒドロゲル、リシン - 架橋アガロースよりなる群から選択される固体支持マトリックスに結合したリシンである。別の態様において、固定化リシンはリシン架橋アガロースである。

30

【0038】

本発明の組換え (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンポリペプチドは、当業者により活性化されて (T A L 6 0 0 3) - プラスミンポリペプチドを提供することができる。1 つの態様において、 (T A L 6 0 0 3) - プラスミンポリペプチドは、 IgG_2 - 抗プラスミンによるミニ - プラスミンの線維素溶解活性の阻害の速度より少なくとも約 5 倍速い阻害の速度で IgG_2 - 抗プラスミンにより阻害される線維素溶解活性を示す。別の態様において、阻害の速度はミニ - プラスミンの阻害の速度より少なくとも約 10 倍、 20 倍、 30 倍もしくは 40 倍速い。

40

【0039】

1 つの態様において、組換え (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンポリペプチドは配列番号 : 2 に示される配列と少なくとも 90 % もしくは 95 % 、または 98 % 同一である。別の態様において、単一の N 末端クリングルドメインは天然ヒトプラスミノーゲンのクリングル 1 もしくはクリングル 4 ドメインと少なくとも 90 % 同一であり ; そして C 末端ドメインはヒトプラスミノーゲンの活性化部位およびセリンプロテアーゼドメインと少なくとも 90 % 同一である。ある態様において、ポリペプチドは配列番号 : 2 に示されるよ

50

うなアミノ酸配列およびその保存的置換を有する。他の態様において、ポリペプチドは、配列番号：2に示されるアミノ酸配列の位置85のものと同様の相対的位置でアルギニン残基を有する。

【0040】

さらなる態様において、単一のN末端クリングルドメインは天然ヒトプラスミノーゲンのクリングル5よりも天然ヒトプラスミノーゲンのクリングル1もしくはクリングル4と少なくとも1残基大きいアミノ酸配列同一性を有し、そしてここで、ヒトプラスミノーゲンのクリングル1および4の天然配列に対する単一のN末端クリングルドメインの保存的置換は、クリングル5との同一性比較の目的のために天然配列と異なると見なされない。

10

【0041】

例えば、本発明において記述される(TAL6003)-プラスミノーゲンは単一のクリングルドメインとセリンプロテアーゼドメインを連結する連結領域にアミノ酸残基改変を利用する。従って、これら2つのドメイン間のこの連結点は、ヒトプラスミノーゲンのクリングル5ドメインとセリンプロテアーゼドメインとの間の天然に存在する連結点に一層酷似している。

【0042】

別の態様において、本発明において記述される(TAL6003)-プラスミノーゲンは天然様N末端配列をさらに含んでなる。組換え的に製造された(TAL6003)-プラスミノーゲンは活性化の際に切断されて天然様N末端も有する組換え(TAL6003)-プラスミンポリペプチドを提供することができる。

20

【0043】

特定の態様において、(TAL6003)-プラスミノーゲンの単一のN末端クリングルドメインのある位置の残基は、天然ヒトプラスミノーゲンのクリングル1に対して保存される。これらはジスルフィド架橋およびリシン結合と関連する位置の残基ができる、そしてそれぞれ、Cys84、Cys105、Cys133、Cys145、Cys157およびCys162、ならびにPro136-Pro140、Pro143-Tyr146およびArg153-Tyr156が含まれる(図3に示されるように番号付けられた位置)。従って、本発明の特定の態様は、同様のドメイン組成(すなわち、クリングル-セリンプロテアーゼ(K-SP)(Sottrup-Jensen, L., et al., Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolytic, Vol. 3, (Eds: J. F. Davidson, et al.) Raven Press, New York(1978)を参照)を有するが、とりわけ、配列番号：2に示されるアミノ酸配列の位置85のものと同様の相対的位置でアルギニン(Arg)を欠くミニ-プラスミン(オーゲン)との対照によって化学的に特性化することができる。ある態様において、本発明の(TAL6003)-プラスミノーゲンは、配列番号：2に示されるアミノ酸配列の位置85のものと同様の相対的位置でArg残基を含んでなる単一のN末端クリングルドメインを含んでなる。配列番号：2に示されるアミノ酸配列の位置85のものと同様の相対的位置の限定されない例には、配列番号：4に示されるアミノ酸配列のArg(153)、Arg(234)、Arg(324)およびArg(426)位置が含まれる。

30

【0044】

他の態様において、指定残基の特定の位置は、構造的にそして機能的に同様な位置(すなわち、N末端ドメインのクリングル構造に対して；上記に説明したようなChang, Y., et al.を参照)でポリペプチドに依然として存在しながらくらか異なることができる。ある態様において、(TAL6003)-プラスミン(オーゲン)ポリペプチドの単一のN末端クリングルドメインは天然ヒトプラスミノーゲンのクリングル5よりも天然ヒトプラスミノーゲンのクリングル1もしくはクリングル4と少なくとも1残基大きい同一性パーセントを有する。

【0045】

40

50

さらに、本発明の特定の態様はミニ - プラスミン (オーゲン) との対照によって機能的に特性能化することができる。好ましい態様において、本発明の (T A L 6 0 0 3) - プラスミンは N_2 - 抗プラスミンによる例えはミニ - プラスミンの阻害の速度より約 1 もしくは 2 桁分速い程度の増加した阻害速度を示す。さらに、特定の態様において、(T A L 6 0 0 3) - プラスミンは固定化リシン (例えは、リシン - セファロース) に結合する。

【0046】

「N末端」としての (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンの単一の N 末端クリングルドメインの特性化は、該ドメインが活性化部位に対して N 末端に存在することのみを意味し、そしてドメイン自体に対して N 末端の追加のアミノ酸残基が存在しないことを意味しない。さらに、単一の N 末端クリングルドメインの最も C 末端のシステイン残基 (すなわち、図 4 に示される最も C 末端の Cys 残基) とプラスミノーゲンの活性化部位との間にに入る残基の数および同一性は、本発明の範囲からそれずに変えることができる。当業者は、本明細書における開示ならびにクリングル 1 機能および構造に関するガイダンスのために本明細書に引用される参考文献に基づいて過度の実験なしに本発明の利益 (欠失突然変異体のサイズの実質的な増加もしくは潜在的に問題のあるグリコシル化部位の導入なしに、アミノカルボン酸のクリングル 1 様結合) を得るこれらのバリエーションを決定することができる。

【0047】

従って、本発明はポリヌクレオチド、ポリペプチド、ポリペプチドを製造するための組換え方法、ポリヌクレオチドを含有するベクター、ポリペプチドを製造するための発現系、およびそのような発現系を含んでなる培養宿主細胞に関する。

【0048】

記載の通り、1 つの態様において、本発明は本明細書に開示されるポリペプチドもしくはその保存的アミノ酸置換を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。「保存的」アミノ酸置換の選択に関するガイダンスは、以下にさらに詳細に提供される。1 つの態様において、ポリヌクレオチドは DNA である。

【0049】

別の態様において、本発明はベクターに本発明のポリヌクレオチドを挿入することを含んでなるベクターを製造する方法に関する。別の態様において、本発明は本発明の方法により製造されるベクターに関する。

【0050】

別の態様において、本発明は培養宿主細胞に本発明のベクターを導入することを含んでなる培養宿主細胞を製造する方法に関する。別の態様において、本発明は本発明の方法により製造される培養宿主細胞に関する。

【0051】

別の態様において、本発明は：(a) 培養宿主細胞にポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含んでなるベクターを導入すること；(b) 該宿主細胞を培養すること；および(c) ポリペプチドを回収することを含んでなる方法により製造される本発明の単離されたポリペプチドに関する。別の態様において、本発明は：(a) ベクターが発現される条件下で本発明の宿主細胞を培養すること；および(b) ポリペプチドを回収することを含んでなるポリペプチドを製造する方法に関する。

【0052】

別の態様において、本発明は本発明の少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含有する細胞に関する。

【0053】

1 つの態様において、ポリヌクレオチドは配列番号：1 に示されるようなヌクレオチド配列を含んでなる。別の態様において、ポリヌクレオチドは配列番号：1 に示されるヌクレオチド配列のヌクレオチド 4 ~ 1032 を含んでなる。他の態様において、ポリペプチドは配列番号：2 に示されるようなアミノ酸配列を含んでなる。

【0054】

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチド

本発明のポリヌクレオチドには、1個もしくはそれ以上のヌクレオチドを伴い得る置換、欠失および／もしくは付加を有するバリエントが含まれる。バリエントは、コーディング領域、非コーディング領域もしくは両方において変更することができる。コーディング領域における変更は、保存的もしくは非保存的アミノ酸置換、欠失もしくは付加をもたらすことができる。これらの中で特に好みいのは、(T A L 6 0 0 3) - プラスミン(オーゲン)タンパク質もしくはその一部の特性および活性を変更しない、サイレント置換、付加および欠失である。またこれに関して特に好みいのは保存的置換である(以下を参照)。

【0055】

10

本発明のさらなる態様には、(a)配列番号: 2における完全なアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(b)配列番号: 2におけるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；および(c)上記の(a)もしくは(b)におけるヌクレオチド配列のいずれかに相補的なヌクレオチド配列に少なくとも90%同一である、そしてより好みいは少なくとも95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含んでなる核酸分子が含まれる。

【0056】

1つの態様において、本発明の核酸分子は配列番号: 2に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含んでなる。他の態様において、核酸分子は配列番号: 1に示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドもしくはその縮重バリエントを含んでなる。

20

【0057】

(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンをコードする参照ヌクレオチド配列に少なくとも例えれば95%「同一である」ヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドにより、ポリヌクレオチド配列が(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンポリペプチドをコードする参照ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチド当たり5個までの点突然変異を含むことができる除いてポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が参照配列と同一であることが意図される。言い換えれば、参照ヌクレオチド配列と少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るために、参照配列におけるヌクレオチドの5%までを欠失させるかもしくは別のヌクレオチドで置換することができ、または参照配列における全ヌクレオチドの5%までのヌクレオチドの数を参照配列に挿入することができる。参照配列のこれらの突然変異は、参照配列におけるヌクレオチド間で個々にまたは参照配列内の1つもしくはそれ以上の隣接する群において散在して、参照ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端位置もしくはこれらの末端位置の間のどこかに存在することができる。

30

【0058】

上記の通り、2つもしくはそれ以上のポリヌクレオチド配列はそれらの同一性パーセントを決定することにより比較することができる。同様に2つもしくはそれ以上のアミノ酸配列はそれらの同一性パーセントを決定することにより比較することができる。2つの配列の同一性パーセントは、核酸配列であろうとペプチド配列であろうと、短い方の配列の長さで割りそして100を掛けた2つの整列配列間の完全な一致の数として一般に記述される。核酸配列の近似アラインメントは、Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2: 482 - 489 (1981)の局所相同性アルゴリズムにより提供される。このアルゴリズムは、Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure, M. O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3: 353 - 358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C., USAにより開発され、そしてGribskov, Nucleic Acids Res. 14 (6): 6745 - 6763 (1986)により正規化

40

50

されたスコアリングマトリックスを用いてペプチド配列での使用に拡張することができる。核酸およびペプチド配列についてのこのアルゴリズムの実施は、Genetics Computer Group (Madison, Wis.) によりそれらのBESTFIT実用アプリケーションにおいて提供される。この方法のデフォルトパラメーターは、Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995) (Genetics Computer Group, Madison, Wis. から入手可能) に記述される。

【0059】

例えは、遺伝暗号の縮重のために、配列番号：1に示される核酸配列と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一である配列を有する多数の核酸分子が (TAL6003) - プラスミノーゲンポリペプチドをコードすることを当業者は即座に認識する。実際に、これらのヌクレオチド配列の縮重バリアントは全て同じポリペプチドをコードするので、本明細書に記述される任意の機能アッセイもしくは測定を行わずともこれは当業者に明らかである。縮重バリアントではないような核酸分子について、妥当な数もまた (TAL6003) - プラスミノーゲンポリペプチド活性を有するポリペプチドをコードすることが当該技術分野においてさらに認識される。これは、タンパク質機能に有意に影響を及ぼす可能性が低いかもしくは可能性があまりないアミノ酸置換 (例えは、ある脂肪族アミノ酸を第二の脂肪族アミノ酸で置換すること) を当業者は完全に認識しているからである。

【0060】

最近、より長いポリヌクレオチド配列の合成製造における進歩により、伝統的なクローニング技術を使用せずに有意により長いポリペプチドをコードする核酸の合成製造が可能になっている。そのようなサービスの商業的供給業者には、Blue Heron, Inc., Bothell, WA (<http://www.blueheronbio.com>) が含まれる。Blue Heron, Inc. により利用される技術は、全て引用することにより本明細書に組み込まれる、米国特許第6,664,112号；第6,623,928号；第6,613,508号；第6,444,422号；第6,312,893号；第4,652,639号；米国公開特許出願第20020119456A1号；第20020077471A1号；および公開国際特許出願 (公開番号) WO03054232A3；WO0194366A1；WO9727331A2；およびWO9905322A1に記述される。

【0061】

もちろん、分子生物学、微生物学および組換え核酸の伝統的な技術もまた本発明のポリヌクレオチドを製造するために用いることができる。これらの技術は周知であり、そして全て引用することにより本明細書に組み込まれる、例えはCurrent Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel, ed., Vols. I, II および III (1997)；Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)；DNA Cloning: A Practical Approach, D. N. Glover, ed., Vols. I および II (1985)；Oligonucleotide Synthesis, M. L. Gait, ed. (1984)；Nucleic Acid Hybridization, Hames and Higgins, eds. (1985)；Transcription and Translation, Hames and Higgins, eds. (1984)；Animal Cell Culture, R. I. Freshney, ed. (1986)；Immobilized Cells and Enzymes, IRL Press (1986)；Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning"；シリーズ, Methods in Enzymology, Academic Press, Inc. (1984) 50

4) ; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, J. H. Miller and M. P. Calos, eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); ならびにMethods in Enzymology, Wu and Grossman and Wu, eds., それぞれ、Vols. 154 および 155 において説明される。

【0062】

ベクターおよび培養宿主細胞

本発明はまた、本発明の単離された核酸分子を含むベクター、組換えベクターで遺伝子操作される培養宿主細胞および組換え技術による (TAL6003) - プラスミン (オーゲン) ポリペプチドの製造にも関する。

10

【0063】

組換え構築物は、感染、形質導入、トランスフェクション、トランスベクション、電気穿孔および形質転換のような周知の技術を用いて培養宿主細胞に導入することができる。ベクターは、例えばファージ、プラスミド、ウイルスもしくはレトロウイルスベクターであることができる。レトロウイルスベクターは複数可能もしくは複製欠損であることができる。後者の場合、ウイルス増殖は一般に相補培養宿主細胞においてのみ起こる。

【0064】

ポリヌクレオチドは、培養宿主における増殖に関して選択可能なマーカーを含有するベクターに連結することができる。一般に、プラスミドベクターはリン酸カルシウム沈殿のような沈殿においてもしくは荷電脂質との複合体において導入される。ベクターがウイルスである場合、適切なパッケージング細胞系を用いてそれをインビトロでパッケージングし、そして次に培養宿主細胞に形質導入することができる。

20

【0065】

好ましいのは、興味のあるポリヌクレオチドにシスに作用する制御領域を含んでなるベクターである。適切なトランスに作用する因子は、培養宿主により供給されるか、相補ベクターにより供給されるかもしくは培養宿主への導入の際にベクター自体により供給されることができる。

【0066】

これに関するある態様において、ベクターは、誘導できそして / もしくは細胞タイプ特異的であることができる特異的発現をもたらす。そのようなベクターの中で特に好ましいのは、温度および栄養素添加物のような、操作するのが容易な環境因子により誘導できるものである。

30

【0067】

本発明において有用な発現ベクターには、染色体由来の、エピソーム由来のおよびウイルス由来のベクター、例えば細菌プラスミド、バクテリオファージ、酵母エピソーム、酵母染色体要素、バキュロウイルス、パポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、家禽ジフテリアウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスのようなウイルス由来のベクター、ならびにコスミドおよびファージミドのようなその組み合わせ由来のベクターが含まれる。

【0068】

40

DNAインサートは、数例を挙げると、ファージラムダPLプロモーター、エシェリキア・コリ lac、trp および tac プロモーター、SV40 初期および後期プロモーターならびにレトロウイルスLTRのプロモーターのような適切なプロモーターに操作可能に連結されるべきである。他の適当なプロモーターは当業者に既知である。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おいて翻訳のためのリボソーム結合部位をさらに含有する。構築物により発現される成熟転写産物のコーディング部分は、翻訳されるポリペプチドの最初に翻訳開始そして最後に適切に位置する終止コドン (UAA、UGA もしくは UAG) を含むことができる。

【0069】

示されるように、発現ベクターは好ましくは少なくとも 1 つの選択可能なマーカーを含

50

む。そのようなマーカーには、真核細胞培養のためのジヒドロ葉酸還元酵素もしくはネオマイシン耐性ならびにエシェリキア・コリおよび他の細菌における培養のためのテトラサイクリンもしくはアンピシリン耐性遺伝子が包含される。適切な培養宿主の代表例には細菌細胞、例えばエシェリキア・コリ、ストレプトミセス (*Streptomyces*) およびサルモネラ・チフイムリウム (*Salmonella typhimurium*) 細胞；真菌細胞、例えば酵母細胞；昆虫細胞、例えばドロソフィラ (*Drosophila*) S2 およびス Podoptera (*Spodoptera*) Sf9 細胞；動物細胞、例えば CHO、COS および Bowes 黒色腫細胞；ならびに植物細胞が包含されるがこれらに限定されるものではない。上記の培養宿主細胞用の適切な培養培地および条件は、当該技術分野において既知である。

10

【0070】

細菌における使用に好ましいベクターの中には、例えば、Novagen、Madison, WI から入手可能な pET24b もしくは pET22b (それぞれ、pET-24b (+) および pET-22b (+) = pET Expression System 24b (カタログ番号 69750) および 22b (カタログ番号 70765)、EMD Biosciences, Inc., Novagen Brand, Madison, WI；ベクターに関する詳細については <http://www.emdbiosciences.com> pET-24b および pET-22b に関する製品情報セクションを参照)、Qiagen Inc., Valencia, CA から入手可能な pQE70、pQE60 および pQE-9；Stratagene, La Jolla, CA から入手可能な pBSベクター、PHAGESCRIPTベクター、BLUESCRIPTベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46；ならびにPharmacia (今は Pfizer, Inc., New York, NY) から入手可能な ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 が包含される。好ましい真核生物ベクターの中には、Stratagene から入手可能な pWLNNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1 および pSG；ならびにPharmacia から入手可能な pSVK3、pBPV、pMSG および pSVL がある。他の適当なベクターは、当業者に容易に明らかである。

20

【0071】

本発明における使用に適当な細菌プロモーターには、エシェリキア・コリ lacI および lacZ プロモーター、T3 および T7 プロモーター、gpt プロモーター、ラムダ PR および PL プロモーター、ならびに trp プロモーターが包含される。適当な真核生物プロモーターには、CMV 前初期プロモーター、HSV チミジンキナーゼプロモーター、初期および後期 SV40 プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (RSV) のもののようなレトロウイルスLTRのプロモーター、ならびにマウスマタロチオネイン-I プロモーターのようなメタロチオネインプロモーターが包含される。

30

【0072】

培養宿主細胞へのベクター構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-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、電気穿孔、形質導入、感染もしくは他の方法によりもたらすことができる。そのような方法は、Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology, 第2版 (1995) のような多数の標準的な実験室マニュアルに記述される。

40

【0073】

高等真核生物による本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクターにエンハンサー配列を挿入することにより増加することができる。エンハンサーは、既定の培養宿主細胞タイプにおいてプロモーターの転写活性を増加するように働く通常は約10～300bpのDNAのシスに作用する要素である。エンハンサーの例には、bp100～270で複製起点の後期側上に位置するSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側上のポリオーマエンハンサー、およびア

50

デノウイルスエンハンサーが包含される。

【0074】

小胞体の内腔への、ペリプラズムへのもしくは細胞外環境への翻訳タンパク質の分泌のために、適切な分泌シグナルを発現ポリペプチドに導入することができる。シグナルはポリペプチドに内因性であることができ、もしくはそれらは異種シグナルであることができる。

【0075】

ポリペプチドは、融合タンパク質のような改変された形態において発現することができ、そして分泌シグナルだけでなく追加の異種機能領域も含むことができる。例えば、精製中にもしくはその後の取り扱いおよび貯蔵中に、培養宿主細胞における安定性および持続を改善するためにポリペプチドの例えばN末端に追加のアミノ酸、特に荷電アミノ酸の領域を付加することができる。また、精製を容易にするためにポリペプチドにペプチド部分を付加することもできる。そのような領域は、ポリペプチドの最終調製の前に取り除くことができる。とりわけ、分泌もしくは排出を引き起こすための、安定性を改善するためのそして精製を容易にするためのポリペプチドへのペプチド部分の付加は、当該技術分野においてよく知られておりそして日常的な技術である。好ましい融合タンパク質は、タンパク質を可溶化するために有用である免疫グロブリンからの異種領域を含んでなる。例えば、E P 0 4 6 4 5 3 3 A 1 (カナダの対応物、2,045,869)は、別のヒトタンパク質もしくはその一部と一緒に免疫グロブリン分子の定常領域の様々な部分を含んでなる融合タンパク質を開示する。多くの場合において、融合タンパク質におけるF c部分は治療および診断における使用にとって全く好都合であり、従って、例えば改善された薬物動態特性をもたらす。一方、ある用途には、融合タンパク質が記載の都合の良い方法において発現され、検出されそして精製された後にF c部分を取り除くことができることが望ましい。これは、F c部分が治療および診断において使用するために障害であると判明する場合に、例えば融合タンパク質が免疫のための抗原として用いられる場合に当たる。例えば創薬において、ヒトタンパク質はハイスループットスクリーニングアッセイの目的のためにF c部分と融合されている(h I L - 5のアンタゴニストを同定するために、h I L 5受容体のような)。Bennett, D., et al., J. Molecular Recognition, 8:52-58 (1995)およびJohansson, K. et al., J. Biol. Chem., 270 (16): 9459-9471 (1995)を参照。

【0076】

(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンは、本明細書の実施例に特に記述されるものを包含する周知の方法により組換え細胞培養物から回収そして精製することができる。本発明のポリペプチドには天然精製産物、化学合成方法の産物、ならびに例えば細菌、酵母、高等植物、昆虫および哺乳類細胞を包含する原核生物もしくは真核生物培養宿主から組換え技術により製造される産物が包含される。さらに、本発明のポリペプチドはまた、ある場合において宿主媒介過程の結果として、最初の修飾されたメチオニン残基を含むことができる。

【0077】

ポリペプチド

本発明のポリヌクレオチドには、本発明のポリペプチドのバリエーションおよび特定の例をコードするものが包含される。例えば、表現型の上でサイレントのアミノ酸置換を行う方法に関するガイダンスは、Bowie, J. U. et al., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions," Science 247:1306-1310 (1990)に提供され、ここで、著者等はタンパク質がアミノ酸置換に驚くほど寛容であることを示す。本発明の範囲内の置換のいくつでもそのような一般的原理の適用により得ることができると示す。本発明の範囲内の置換には、クリングル1ドメインの構造および機能について本明細書に引用される参考文献

10

20

30

40

50

を当業者は調べることができる。

【0078】

使用する基準により、(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンのクリングル、活性化部位およびセリンプロテアーゼドメインの正確な「位置」もしくは配列は、本発明の範囲内の特定のバリエーションにおいてわずかに異なり得ることがさらに理解される。例えば、活性化部位に対するクリングルドメインの正確な位置はわずかに異なることができ、そして／もしくはクリングルドメインに対してN末端の配列は長さが異なることができる。従って、本発明には本明細書に開示されるような(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンポリペプチド活性を示す(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンポリペプチドのそのようなバリエーションが含まれる。そのようなバリエントは、欠失、挿入、逆位、反復および置換を含む。上記に示されるように、どのアミノ酸変化が表現型の上でサイレントであると思われるかに関するガイダンスは、Bowie, J. U., et al., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions," *Science* 247: 1306 - 1310 (1990)に見出すことができる。

【0079】

従って、配列番号：2のポリペプチドのフラグメント、誘導体もしくはアナログは、(i)アミノ酸残基の1つもしくはそれ以上(例えば、3、5、8、10、15もしくは20残基)が保存的もしくは非保存的アミノ酸残基(好ましくは保存的アミノ酸残基)で置換されるもの(そのような置換されたアミノ酸残基は遺伝暗号によりコードされるものであるかもしくはそうでない可能性がある)、あるいは(ii)アミノ酸残基の1つもしくはそれ以上が置換基を含むもの(例えば、3、5、8、10、15もしくは20)、あるいは(iii)成熟ポリペプチドがポリペプチドの半減期を増加するための化合物(例えば、ポリエチレングリコール)のような別の化合物と融合しているもの、あるいは(iv) Ig G Fc融合領域ペプチドまたはリーダーもしくは分泌配列または成熟ポリペプチドの精製に用いられる配列または前駆タンパク質配列のような、追加のアミノ酸が成熟ポリペプチドに融合しているものであることができる。そのようなフラグメント、誘導体およびアナログは、本明細書における教示から当業者の範囲内であると考えられる。

【0080】

示されるように、変化は好ましくはタンパク質のフォールディングもしくは活性に有意に影響を及ぼさない保存的アミノ酸置換のようなわずかな性質のものである。もちろん、熟練した技術者が行うアミノ酸置換の数は上記のものを包含する多数の因子により決まる。一般的に言えば、任意の既定の(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンポリペプチドの置換の数は50、40、30、25、20、15、10、5もしくは3より多くない。

【0081】

機能に必須である本発明の(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンにおけるアミノ酸は、部位特異的突然変異誘発もしくはアラニン走査突然変異誘発(Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081 - 1085 (1989))のような当該技術分野において既知である方法により同定することができる。後者の方法は、分子におけるあらゆる残基で単一のアラニン突然変異を導入する。次に、得られる突然変異体分子は、例えば本明細書に提供される実施例において示されるように、生物学的活性について試験される。リガンド結合に重要である部位もまた、結晶化、核磁気共鳴もしくは光親和性標識(Smith, et al., *J. Mol. Biol.* 224: 399 - 904 (1992)およびde Vos, et al. *Science* 255: 306 - 312 (1992))のような構造解析により決定することができる。タンパク質のN末端からの1個もしくはそれ以上のアミノ酸の欠失がタンパク質の1つもしくはそれ以上の生物学的機能の変化もしくは喪失をたとえもたらしても、他の生物学的活性を依然として保持することができる。

【0082】

本発明の「単離されたポリペプチド」の製造において有用なポリペプチドは固相合成法

により製造できることもまた意図される。Houghten, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5131 - 5135 (1985); およびHoughten et al. (1986)への米国特許第4,631,211号を参照。

【0083】

本発明のポリペプチドは、単離された形態において提供することができる。「単離されたポリペプチド」により、その天然環境から取り除かれたポリペプチドが意図される。従って、組換え培養宿主細胞内で生産されそして/もしくは含有されるポリペプチドは、本発明の目的のために単離されたと見なされる。また「単離されたポリペプチド」として意図されるのは、組換え培養宿主から部分的にもしくは実質的に精製されているポリペプチドである。

10

【0084】

(TAL6003) - プラスミノーゲンポリペプチドの参照アミノ酸配列に対して示される同一性パーセントのアミノ酸配列を有するポリペプチドは、ポリヌクレオチドに関して上記に示されるコンピューター支援方法を包含する方法を用いて決定することができる。前述の説明におけるヌクレオチド配列と同様にポリペプチドアミノ酸配列を調べそして比較する。当業者は、ポリペプチド分析のためのそのような方法およびプログラムの対応する使用を考える場合にポリヌクレオチドについて説明した分子終点のような概念が直接的アナログを有することを認識する。例えば、ポリヌクレオチドに関して説明した手動補正是核酸の5'および3'終点をさすが、同じ説明はポリペプチドのN末端およびC末端に適用可能と認識される。

20

【0085】

本発明には、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護/保護(protecting/blocking)基による誘導体化、タンパク質分解切断、抗体分子もしくは他の細胞リガンドへの連結などにより、翻訳中もしくは後に異なって修飾される(TAL6003) - プラスミノーゲンポリペプチドが包含される。多数の化学修飾のいずれも、臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、スタヒロコッカス・アウレウス(S. aureus) V8プロテアーゼ、NaBH₄による特異的化学切断;アセチル化、ホルミル化、酸化、還元;ツニカマイシンの存在下での代謝合成;などが包含されるがこれらに限定されるものではない既知の技術により実施することができる。

30

【0086】

例えば、本発明により包含されるさらなる翻訳後修飾には、例えばN結合型もしくはO結合型炭水化物鎖、N末端もしくはC末端終端のプロセシング、アミノ酸バックボーンへの化学部分の連結、N結合型もしくはO結合型炭水化物鎖の化学修飾、ならびに原核生物培養宿主細胞における(TAL6003) - プラスミノーゲンポリペプチドの発現に適応させたベクターおよび構築物の結果としてのN末端メチオニン残基の付加が包含される。ポリペプチドはまた、タンパク質の検出および単離を可能にするために酵素、蛍光、同位体もしくは親和性標識のような検出可能な標識で修飾することもできる。

【0087】

製薬学的組成物および処置の方法

40

(TAL6003) - プラスミン(オーゲン)は、両方とも引用することにより本明細書に組み込まれる、米国特許出願第10/143,112号;およびNovokhatny, V., et al., J. Thromb. Haemost. 1(5): 1034-41(2003)に記述される方法および組成物に従って治療用途に調合することができる。例えば、低pH(約2.5~約4)、低緩衝能バッファーを(TAL6003) - プラスミンの調合に用いることができる。さらに、プラスミン、ミニ-プラスミンおよび/もしくはミクロ-プラスミンで実施されるような、当業者に既知である他の方法および調合を治療的投与用の本発明の(TAL6003) - プラスミンを調合するために用いることができる。

【0088】

50

(T A L 6 0 0 3) - プラスミン(オーゲン)は、例えば、全て引用することにより本明細書に組み込まれる、米国特許第6,355,243号、第6,964,764号および第6,969,515号に記述されるような方法に従って、様々な血栓性疾患もしくは症状を処置するために用いることができる。この場合もやはり、(T A L 6 0 0 3) - プラスミンに適用できる可能な製薬学的製剤のように、(T A L 6 0 0 3) - プラスミンはまた当該技術分野において既知である方法、例えばプラスミン、ミニ-プラスミンおよび/もしくはミクロ-プラスミンで現在実施することができるものにより治療的に投与することもできる。

【実施例】

【0089】

発現ベクター設計

(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンのアミノ酸配列を配列番号：2に示す。(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンをコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドをエシェリキア・コリ発現およびmRNA安定性のためにコドンを最適化して配列番号：1に示されるようなDNA配列を提供した。このポリヌクレオチドをエシェリキア・コリ発現ベクターpET24b(+) (Novagen; Madison, WI)のNde IおよびBamH I部位にクローン化して細胞質タンパク質を生成せしめた。

【0090】

表1に例示されるように、細菌(例えばエシェリキア・コリ)における発現は、配列番号：2に示されるようなアミノ酸配列を有する組換え(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンポリペプチド(すなわち、配列番号：4(例えば図3もまた参照)に示される天然ヒトプラスミノーゲンアミノ酸配列の位置70のアルギニン(すなわち、R⁷⁰)に対応するアルギニンアミノ酸残基(すなわち、R²)の直前にN末端メチオニン(すなわち、M¹)を有する組換え(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲン)をもたらした。そのような組換え産物はさらなる切断を受けやすく天然ヒトプラスミノーゲンの位置78のリシン(すなわち、K⁷⁸)もしくは位置79のバリン(すなわち、V⁷⁹)にそれぞれ対応するN末端リシン(すなわち、K¹⁰)もしくはバリン(すなわち、V¹¹)を有するタンパク質を包含する異なるN末端を有するさらなるタンパク質を生成せしめた。

【0091】

10

20

【表1】

表1:天然プラスミン(オーゲン)(例えば、配列番号:4に基づく)および(TAL6003)－プラスミン(オーゲン)(例えば、配列番号:2もしくはそのバリントに基づく)のN末端

19アミノ酸リーダー配列を含んでなる天然プラスミノーゲン(例えば、配列番号:4に基づく)

\downarrow \downarrow \downarrow \downarrow
M⁻¹⁹EHKE ... E⁰¹PLDDY ... M⁶⁹R⁷⁰DVVLFEKK⁷⁸V⁷⁹YLSEC

天然「Lys-プラスミノーゲン」(すなわち、リーダー配列の切断):

\downarrow \downarrow
E⁰¹PLDDY ... M⁶⁹R⁷⁰DVVLFEKK⁷⁸V⁷⁹YLSEC

(配列番号:5)

もしあれば、Lys-プラスミノーゲンの切断に基づいて可能な天然プラスミン種:

(配列番号:6) M⁶⁹R⁷⁰DVVLFEKK⁷⁸V⁷⁹YLSEC

(配列番号:7) K⁷⁸V⁷⁹YLSEC

(配列番号:8) V⁷⁹YLSEC

本発明の組換え(TAL6003)－プラスミノーゲンポリペプチド:

(例えば、配列番号:2に基づく) M⁰¹R⁰²DVVLFEKK¹⁰V¹¹YLSEC

(TAL6003)－プラスミノーゲンのさらなる切断に基づくさらなるタンパク質:

(配列番号:9) K¹⁰V¹¹YLSEC

(配列番号:10) V¹¹YLSEC

↓は潜在的切断部位を示す。

10

20

【0092】

(TAL6003)－プラスミノーゲン発現および精製

(TAL6003)－プラスミノーゲンをコードするDNAを含んでなる発現ベクターをBL21(DE3)RIL(Stratagene, La Jolla, CA)、BL21(DE3)(遺伝子型: F'ompT hsdSB(r_B⁻m_B⁻)gal dcm(DE3))(EMB Biosciences, Inc., San Diego, CA)およびBLR(DE3)(遺伝子型: F'ompT hsdSB(r_B⁻m_B⁻)gal dcm(DE3)(srl-reCA)306::Tn10(Tet^R))を包含する様々な細胞に形質転換し、そして1mMのIPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)による誘導後のタンパク質過剰発現をSDS-PAGEにより分析した。発現概算は、振盪フラスコにおける1Lの細胞培養物当たり少なくとも約250mgであった。

30

【0093】

細胞タイプBL21(DE3)RILをArg、IleおよびLeuをコードするまれなエシェリキア・コリtRNAを発現するように設計する。さらに、BL21(DE3)およびBLR(DE3)は両方とも、毒性および定着因子がないことにに基づいてヒトおよび動物に対して非病原性と分類されるB株エシェリキア・コリである。BLR(DE3)細胞はDNA組換えのためのreCA遺伝子を欠き、そしてラムダファージの誘導はこれらの細胞で報告されていない。BLR(DE3)細胞における(TAL6003)－プラスミノーゲン構築物の研究用細胞バンクを製造し、そしてCharles River Laboratories(Malvern, PA)で純度、同一性およびバクテリオファージの誘導について試験した。試験により研究用細胞バンクの同一性および純度が確認され、そしてファージは認められずに細胞はファージ誘導試験を通過した(データは示されない)。

40

【0094】

(TAL6003)－プラスミノーゲン(すなわち、配列番号:2に基づく)の生産は、細胞を溶解しそして可溶性タンパク質および精製された封入体の両方をSDS-PAGEにより調べるより大規模の発現において確かめられた。

50

【0095】

以下の典型的なプロトコルは、(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンの発現に用いられている：

(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンベクターを含有するエシェリキア・コリ細胞(例えば、B L 2 1 (D E 3) R I L、B L 2 1 (D E 3) もしくはB L R (D E 3))の単一コロニーを用いて5 m l のL B / カナマイシン(30 μ g / m l)に接種し、そして振盪器上で37で8時間インキュベーションした。その後で、新しい培地におけるさらなる培養用に50 μ l のアリコートを培養細菌懸濁液から取った。6 m l の細菌培養物および250 m l の培地で16時間後に該手順を繰り返した。培養物を振盪しながら37で~1.0のOD 600 nmまで培養し、そしてI P T Gを1 mMの最終濃度になるように加えた。培養物をさらに5時間培養した。細胞を5,000 \times gで遠心分離により採取し、そして細胞ペレットを20 mMのE D T Aを含有する20 mMのT r i s p H 8.0に溶解し、そして-80で凍結させた。 10

【0096】

(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンを精製するために、細胞ペレットを融解し、そして溶液容量が最初の細胞培養物容量の約1/20になるまでバッファーを加えた。その後に、リゾチームを0.5 mg / m l の最終濃度になるように加え、そして細胞を4で10~15分間急速に攪拌した。次に、T r i t o n X - 1 0 0を1%の最終濃度になるように加え、そして攪拌をさらに10分間続けた。D N A s e I (0.05 mg / m l)およびM g C l ₂ (2.5 mM)を加え、そして攪拌を4で30分間もしくは溶液がもはや粘性でなくなるまで続けた。最終溶液を15,000 \times gで4で30分間遠心分離し、そして上清を捨てた。 20

【0097】

細胞ペレットを洗浄溶液(10 mM E D T A、1% T r i t o n - X - 1 0 0および0.5 M 尿素を含有する50 mM T r i s - H C l、p H 7.4)で3回洗浄し、そして最終ペレットを40 m l の抽出バッファー(10 mM E D T A、20 mM D T Tおよび6 M グアニジン - H C l を含有するP B S、p H 7.4)に溶解し、そして4で一晩保存した。16時間後に、溶液を15,000 \times gで30分間遠心分離して固体を除き、そして上清を4で攪拌しながらリフォールディング溶液(50 mM T r i s - H C l、p H 8.3、3.5 M グアニジン H C l、0.5 M アルギニン H C l、10 mM E D T A、3 mM G S H、0.3 mM G S S G)にゆっくりと加えた。リフォールディング方法は、約0.29 g / L のタンパク質濃度で実施した。 30

【0098】

リフォールディング溶液をそのままにして4で2日間維持し、そして次にバッファー溶液を頻繁に変えながら8~10時間の期間にわたって、10 mM E D T A、0.15 M N a C l、0.15 M アルギニン - H C l を含有する8倍容量の0.1 M T r i s - H C l p H 8.0に対して透析した。

【0099】

次に、タンパク質溶液を透析から取り出し、そして約10~20 m l まで10 k D a の膜カットオフを有するA M I C O N フィルターを用いて濃縮し、そして10 mM E D T A、0.15 M N a C l を含有する100倍容量の0.1 M T r i s p H 8.0に対して一晩透析した。この物質を遠心分離して微粒子を除き、次にリシン親和性樹脂(リシン - セファロース4 B; A m e r s h a m B i o s c i e n c e s , P i s c a t a w a y , N J)上に通した。0.2 M イブシロンアミノカプロン酸(A C A)を含有するT r i s 緩衝食塩水、p H 8.0を用いて(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンを樹脂から溶出した。 40

【0100】

典型的に、1リットルの細胞培養物から80 mg の封入体を単離することができ、そしてリシン - セファロースクロマトグラフィー工程において40 mg を溶出することができた。 50

【0101】

(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンの特性

精製された (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンは、還元 (ジチオスレイトールで処理する) および非還元タンパク質の SDS - PAGE 分析により 35 ~ 40 kDa 領域におけるバンドとして現れた。MALDI 質量分析により決定されるその分子量は約 38, 140 Da であり、それは予想される値に近い。

【0102】

ストレプトキナーゼによる (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンの活性化の速度を決定するために、1 mg / ml の組換え (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンを 1 : 100 の (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲン : ストレプトキナーゼの比率でストレプトキナーゼと混合し、pH 7 で室温でインキュベーションした。様々な時間点で、サンプルを取り除き、SDS - PAGE バッファーでクエンチし、そして還元 SDS - PAGE、続いてデンシトメトリー上で分析して 2 本鎖 (T A L 6 0 0 3) - プラスミンへの 1 本鎖 (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンの転化を測定した。ストレプトキナーゼによる (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンの活性化パーセントは、SDS - PAGE により測定した場合の経時的な全長 (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンの喪失として図 6 に示される。

10

【0103】

クリングル 1 の機能性を確かめるために、リシン - セファロース 4 B への T A L 6 0 0 3 - プラスミノーゲンの結合を測定した。図 7 に示されるように、(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンはリシン - セファロースに結合し、そして約 4 mM で単一ピークとして 0 ~ 20 mM の ACA 勾配によりカラムから溶出することができた。リフォールディングした (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンのリシン - セファロースに結合する能力は、該分子のクリングルドメインが適切にフォールディングされそしてリシン結合部位が完全に活性であることを示す。

20

【0104】

クリングル 1 の機能性をさらに確かめるために、(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンへの ACA の結合を、全て引用することにより本明細書に組み込まれる、Matsuoka et al., Eur. J. Biochem., 190: 93 - 97 (1990) および Douglas et al., J. Biochemistry 41: 3302 - 3310 (2002) により記述されるようにタンパク質蛍光の付随する変化をモニターすることにより測定した。(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンのクリングル 1 への ACA の結合は、おそらくリシン結合部位の一部であるトリプトファン残基の消光のために、蛍光の減少をもたらす。

30

【0105】

この過程をモニターするために、ACA の濃縮溶液の 4 μ l ~ 16 μ l アリコートを 20 mM の NaCl を含有する 50 mM の Tris バッファー、pH 8.0、25 中 5 μ M の (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲン 2 ml に加えた。FLUOROMAX 蛍光分光光度計 (Jobin Yvon, Inc., Edison, NJ) において 298 nm の励起波長および 340 nm の発光波長で蛍光をモニターし；ACA の各添加後に、蛍光のさらなる変化が認められなくなるまで溶液を平衡化させた。

40

【0106】

得られる蛍光値を希釈に関して補正し、そして 0 ~ 50 μ M の ACA の範囲にわたって ACA の濃度に対してプロットした。データを非線形回帰により適合させて約 19 μ M の K_d を得た。

【0107】

プラスミノーゲンの 1 つの特性は、フィブリンに結合するその能力である。(T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンがフィブリンと相互作用する能力を保持するかどうかを決定するために、フィブリンへの (T A L 6 0 0 3) - プラスミノーゲンの結合を tPA によるその後の活性化および結果として起こる血栓溶解により評価するマイクロタイタープレ

50

ートアッセイにおいてそのフィブリン結合特性を試験した。この目的のために、 100μ lの5 mg / mlフィブリノーゲンをマイクロタイタープレートの各ウェルにおいてトロンビンで重合させた。様々な濃度の(TAL6003) - プラスミノーゲンをフィブリン血栓の上部に加え、そして37℃で1時間インキュベーションした。プレートをPBSで十分に洗浄し、その間にフィブリン血栓は依然として完全なままでありそしてウェルに結合している。洗浄した後に、tPAの0.1 mg / ml溶液を各ウェルに加え、そしてプレートを37℃で2時間インキュベーションした。結果として、血栓のいくらかは完全に溶解され、そしていくらかは部分的に溶解され、一方、非常に少量の(TAL6003) - プラスミノーゲンを有するウェルおよびコントロールウェルは実質的に元のままであった。線維素溶解の程度は、1MのNaOHにおいて再構成した最初の血栓の残りの280 nmの吸光度を測定することによりモニターした。吸光度値を(TAL6003) - プラスミノーゲン濃度の関数としてプロットした。
10

【0108】

図8に示されるように、フィブリンへの(TAL6003) - プラスミノーゲンの結合は古典的なS字形結合曲線をとどった。このアッセイを用いて、(TAL6003) - プラスミノーゲンは全長プラスミノーゲンのものに匹敵する親和性でフィブリンに結合しそしてこの相互作用の C_{50} (~0.3 μM)は全長プラスミノーゲンのフィブリン結合の K_d に匹敵することが見出された。

【0109】

これらの実験は、(TAL6003) - プラスミノーゲンがフィブリンに結合できることを示す。さらに、少なくともリシン - セファロースと(TAL6003) - プラスミノーゲンとの相互作用、予想される K_d でACAに結合するその能力、フィブリンに結合するその能力、そしてプラスミノーゲンアクチベーターにより活性化されるその能力は全て、この分子が完全に機能性形態においてエシェリキア・コリ系で生産されることを示した。
20

【0110】

(TAL6003) - プラスミン精製および製剤

精製された(TAL6003) - プラスミノーゲン溶液へのSKの添加は、(TAL6003) - プラスミンへの(TAL6003) - プラスミノーゲンの転化をもたらす。タンパク質を2 mg / mlに濃縮し、そして50%グリセロールで1:1に希釈して25%グリセロール中1 mg / mlの溶液を生成せしめた。溶液を室温にし、そしてストレプトキナーゼを1:100のモル比のSK:(TAL6003) - プラスミノーゲンで加えた。反応物を攪拌せずに室温で4.5 hrインキュベーションした。次に、0.5 Mの最終濃度になるようにNaClを加えて反応を遅くした。SDS-PAGEによる活性化の分析により、90%の収率の活性化タンパク質が示された。
30

【0111】

活性化(TAL6003) - プラスミンをベンズアミジンアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。ベンズアミジンアフィニティー精製の目的は、活性(TAL6003) - プラスミンからの、(TAL6003) - プラスミン分解産物を包含する、非活性化(TAL6003) - プラスミノーゲンおよび不純物の分離であった。平衡化したベンズアミジン - セファロース4 Fast FlowカラムにSK活性化溶液をかけた。短縮されたそして完全な両方の(TAL6003) - プラスミンは親和性樹脂により捕獲され、一方、上記の不純物はカラムを通過した。280 nmでの吸光度がベースラインに到達するまでカラムを平衡化バッファーで洗浄した。次に、結合した(TAL6003) - プラスミンを低pHのACA段階を用いて溶出してカラムから全ての残留タンパク質を剥離した。発色性プラスミン効能アッセイにより測定した場合に95%活性であるタンパク質で、典型的な収率は75%であった。
40

【0112】

全長プラスミンと同様に、(TAL6003) - プラスミンは生理的pHで自己分解する傾向があるので、最終製剤にはpH 3.6を選択した(酢酸 - 食塩水で酸性化した)。
50

引用することにより組み込まれる、Novokhatny et al. , J Thromb Haemost. , 1 (5) : 1034 - 41 (2003) によりプラスミンについて以前に示され、そして (TAL6003) - プラスミンでの実験において確かめられるように、この低緩衝能、低 pH 製剤は長期間にわたる活性プラスミンの安全な貯蔵を可能にするだけでなく、これらの直接的血栓溶解剤の非経口投与とも適合する。血漿もしくは中性 pH バッファーと混合すると、(TAL6003) - プラスミンは迅速に再活性化される。

【0113】

(TAL6003) - プラスミンの酵素特性

プラスミン基質 D - Val - Leu - Lys - p - ニトロアニリド (S - 2251) (DiaPharma , West Chester , OH) を用いて (TAL6003) - プラスミンのアミド分解活性を調べた。

【0114】

(TAL6003) - プラスミンについて、PBS バッファー中 pH 7.4、25 で、S - 2251 のミカエリス・メンテン定数 (K_M) が同様に $141 \mu\text{M}$ であることが見出された (表 3)。製剤の k_{cat} は、約 725 min^{-1} であることが見出された。4 - グアニジノ安息香酸 4 - ニトロフェニル塩酸塩 (pNPGB) 滴定 (Chase, T. and E. Shaw, Methods Enzymol. 197 : 20 - 27 (1970)) を用いて、機能活性部位のパーセントは 67 % であることが見出された。活性部位パーセントについて k_{cat} を補正して、約 725 min^{-1} の k_{cat} が決定された。この値は、全長プラスミンについて ($820 +/- 23 \text{ min}^{-1}$) そしてミクロ - プラスミン (全ての 5 個のクリングルを欠く) について ($795 +/- 24 \text{ min}^{-1}$) 同じアッセイにおいて決定された値に非常に近かった。これらのデータは、クリングルの存在もしくは不在がセリンプロテアーゼドメインの触媒活性に影響を及ぼさないことを示す。

【0115】

【表 2】

表3. PBS バッファー、pH 7.4、25°C における、基質 S - 2251 での
様々なプラスミン種の定常状態速度論的パラメーター

	K_M	K_{CAT}
プラスミン	$220 +/- 9 \mu\text{M}$	$820 +/- 23 \text{ min}^{-1}$
ミニープラスミン	$160 +/- 30 \mu\text{M}$	$770 +/- 70 \text{ min}^{-1}$
ミクロープラスミン	$145 +/- 13 \mu\text{M}$	$795 +/- 24 \text{ min}^{-1}$
(TAL6003) - プラスミン	$141 +/- 9 \mu\text{M}$	725 min^{-1}

【0116】

IgG_2 - 抗プラスミンによる (TAL6003) - プラスミンの阻害の速度は、プラスミンおよび IgG_2 - 抗プラスミンを混合し次に特定の時間点で S - 2251 活性についてアッセイする Wiman および Collen の方法 (Wiman, B. and D. Collen, Eur. J. Biochem. 84 : 573 - 578 (1978)) を用いて $1.8 +/- 0.06 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であると決定された (表 4)。この値は、 $2.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ のプラスミンについて報告された値 (Anonick, et al. , Thrombosis Res. 59 : 449 (1990) から) に匹敵する。

【0117】

10

20

30

40

【表3】

表4. 様々なプラスミン種および阻害剤の阻害速度をPBS/バッファー、
pH7.4において22°Cで決定した。

	α_2 -抗プラスミン
プラスミン	$2.5+/-0.5 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (lit.)
ミニ-プラスミン	$2.4+/-0.5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
ミクロ-プラスミン	$1.8+/-0.2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
(TAL6003)-プラスミン	$1.8 \pm 0.06 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$

10

【0118】

ミクロ-プラスミンで行った同じ実験により、2つの別個の実験において $1.8 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ および $3.1 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ の α_2 -抗プラスミン阻害速度が示された。ミニ-プラスミン(ミニ-プラスミンドメイン組成、K5-SP)の α_2 -抗プラスミン阻害の速度は、 $2.4 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ であると決定された。これらのデータはミクロ-およびミニ-プラスミンの文献値と合理的に一致し、そして α_2 -抗プラスミンによる(TAL6003)-プラスミンの阻害がミクロ-プラスミンもしくはミニ-プラスミンのいずれかの阻害より40倍速いことを示す。従って、これらの結果は、(TAL6003)-プラスミンがその構造におけるクリングル1の存在のために α_2 -抗プラスミンにより迅速に阻害されるはずであることを示す。全体として、この節に提示されるデータは、(TAL6003)-プラスミンの酵素および阻害特性が全長プラスミンと同様であることを示す。

20

【0119】

文献値は、Anonick, et al., Thrombosis Res. 59: 449 (1990) から取られる。全ての速度は、Anonick, et al. に公開される方法に従って測定した。

30

【0120】

インピトロ線維素溶解効能

(TAL6003)-プラスミンの線維素溶解効能は、以下の実験プロトコルを用いて血栓溶解アッセイのインピトロモデルにおいて試験した。

【0121】

血漿由来のプラスミンと(TAL6003)-プラスミンとの血栓溶解効能のインピトロ比較。等モル量の血漿由来のプラスミン(0.25 mg/ml)および(TAL6003)-プラスミン(0.11 mg/ml)を試験管において血栓と混合し、そして血栓溶解の程度を血栓から遊離される物質の A_{280} 吸光度によりモニターした。

40

【0122】

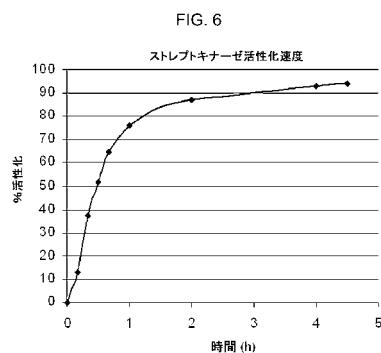
フィブリンの存在下で血漿阻害剤に打ち勝ちそして血栓溶解を開始するために必要なプラスミンもしくは(TAL6003)-プラスミンの濃度を図9に示す。

【図4】

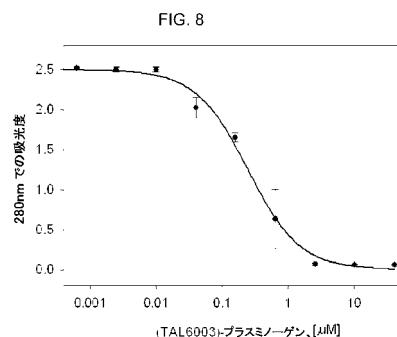
FIG. 4

HK1	CKTGNGKNYR	GTMSKTKNGI	TCQKWSSTSP	HR-PRFSPAT	HPSEGLEENY
HK2	CNHCSGENYD	GKISKTMGL	ECQAMDSQSP	HA-HGYIPSK	FPNKNLKKNY
HK3	CLKGTGENYR	GNVAVTVSQH	TCQHWSACTP	HT-HNRTFEN	FCCKNLDENY
HK4	CYHGDGQSYR	GTSSTTTGK	KCQSQSSMTP	HR-HQKTFEN	YPNAGLTMNY
HK5	CMFNGNGKGR	GKRATITCT	PCQDWAAQEP	HRHSIFTFET	NPRAGLEKNY
(con't)					
HK1	CRNPDPNDPQG	PWCYTTDPEK	RYDYCDILEC	(配列番号: 11)	
HK2	CRNPDRH-LR	PWCPTTDPNK	RWBLCDIPRC	(配列番号: 12)	
HK3	CRNPDGK-RA	PWCCTTNSQK	RWBYCKIPSC	(配列番号: 13)	
HK4	CRNPAD-KG	PWCPTTDPNV	RWBYCNLKKC	(配列番号: 14)	
HK5	CRNPDGDVGS	PWCYTTNPDK	LYDYCDVPOC	(配列番号: 15)	

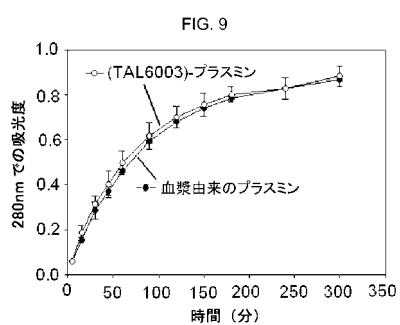
【図6】



【図8】



【図9】



【図10】

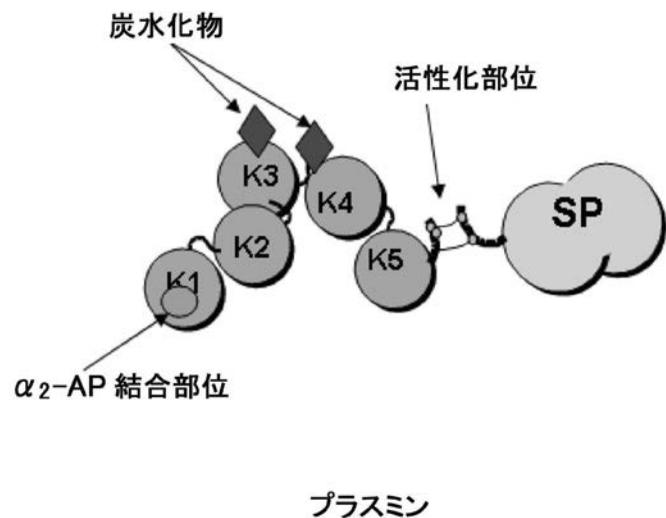
FIGURE 10

1 M (X) KVYLSE CKTGNGKNYR GTMSKTKNGI CQKWSSTSPHRPRFSPATHPSE
 59 GLEENY CRNPDPNDPQGPW CYTTOPEKRYDY CQDVPO CAAPSFQ CGKPQVEP
 109 KK CQGRVVGQ SVAHPHSWPWQVSLSRTRGMHF CQGGTLISPEWVLAHH QL
 169 EKSPRSPSYKVILGAHOEVNLEPHVQEIEVSRFLFLEPTRKDIALLKLSPP
 209 AVITDKVIPA CLPSPNVYVADRT ECFITGWGETQGTFGAGLLKEAQLPVI
 259 ENKV CNRYEFLNGRVOSTEL CAGHLAGGTDS CGGDGGPLV CFEKDQYIL
 309 QGVTSGWGLS CARPNKPGVYVRYSERFVWIEGVMRNN
 X=RDVVLFEK

(配列番号: 2)

【図1】

FIG. 1



【図2】

FIG. 2



(TAL6003)- プラスミノーゲン

【図3】

FIG. 3

-19 1
MEHKEVVLLLLLFLKSGQGEPLDDYVNTQGASLFSVTKKQLGAGSIEECAAKCEEDEEFTCRAFQ

78
YHSKEQQCVIMAENRKSSIIIRMRDVVLFEKKVYLSECKTGNGKNYRGTMSTKNGITCQKWSST

136 143 153 162
SPHRPRFSPATHPSEGLEENYCRNPNDPQGPWCYTTDPEKRYDYCDILECEEEMHCSGENYDG
クリングル1

234
KISKTMSGLECQAWDSQSPhAHGYIPSKFPNKNLKKNYCRNPDRRELPCFTTDPNKRWELCDIP
クリングル2

RCTTPPPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTSGHTCQHWSAQTPHTHNRTPENFPCKNLDENYCR
クリングル3

324
NPDGKRAPWCHTTNSQVRWEYCKIPSCDSSPVSTEQLAPTAPELTPVVQDCYHGDGQSRYGTSS

426
TTTGKKCQSWSMTPHRHQKTPENYPNAGLTMNMYCRNPADKGPCFTDPSVRWEYCNLKKCS
クリングル4

GTEASVVAPPVVLVPDVEVPSEEDCMFGNGKGYRGKRATTVTGTPCQDWAAQEPRHISIFTPET
クリングル5

532 542 561
NPRAGLEKNYCRNPDGDVGGPWCYTTNPRKLYDYCDVPQCAAPSFDGKPVEPKKCPGRVVGGC

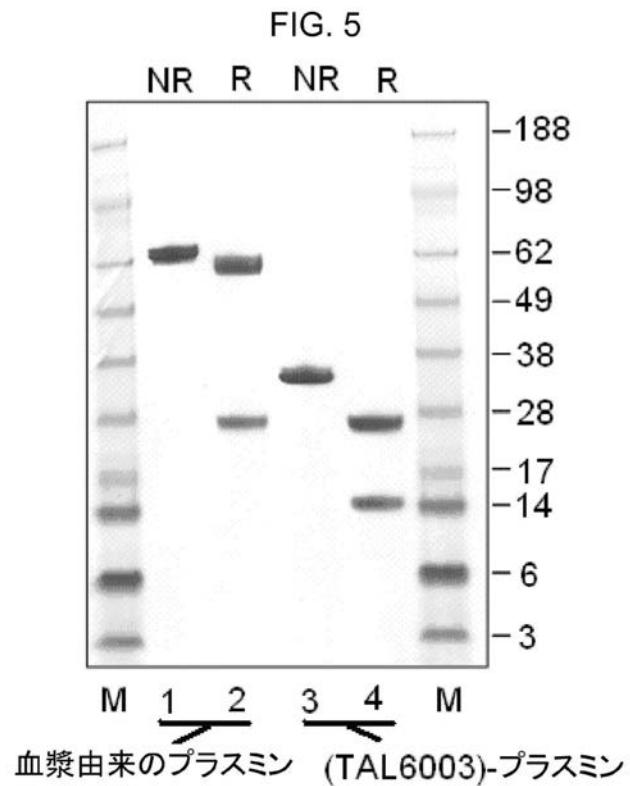
VAHPHSWPWQVSLRTRFGMHFCGGTLISPEWVLTAAHCLEKSPRPSSYKVLGAHQEVNLEPHVQ

EIEVSRLFLEPTRKDIALLKLSSPAVITDKVIPAACLPSPNYVVADRTECFITGWGETQGTFGAGL

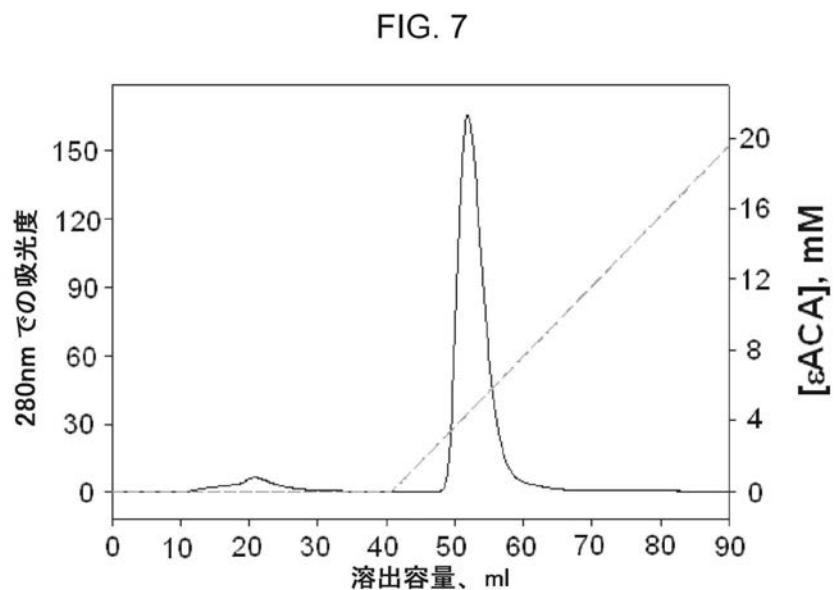
LKEAQLPVIENKVCNRYEFLNGRVQSTELCAGHLAGGTDSCQGDSGGPLVCFEKDKYILQGVTSW

791
GLGCARPNKPGVYVRVSRFVTWIEGVMRNN (配列番号: 4)

【図5】



【図7】



【配列表】

0005539896000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 12 N	5/10 (2006.01)	C 12 N	5/00 101
C 12 P	21/02 (2006.01)	C 12 P	21/02 C
A 61 K	38/46 (2006.01)	A 61 K	37/54
A 61 P	7/02 (2006.01)	A 61 P	7/02

(74)代理人 100087871

弁理士 福本 積

(74)代理人 100087413

弁理士 古賀 哲次

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100166165

弁理士 津田 英直

(72)発明者 ノボカトニ, バレリー

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 27613 ローリー・ラスリングリー・フレーン 4217

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 国際公開第2007/047874 (WO, A1)

特表2007-533327 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 15/00 - 15/90

C a p l u s / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d