

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4444821号  
(P4444821)

(45) 発行日 平成22年3月31日 (2010. 3. 31)

(24) 登録日 平成22年1月22日 (2010. 1. 22)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 10 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-510698 (P2004-510698)	(73) 特許権者	504412602
(86) (22) 出願日	平成15年6月4日 (2003. 6. 4)		ツェ・チェイン・ウン
(65) 公表番号	特表2005-528124 (P2005-528124A)		T z e C h e i n W U N
(43) 公表日	平成17年9月22日 (2005. 9. 22)		アメリカ合衆国63021-3020ミズ
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/017442		ーリ州ボールウィン、ハントレー・ハイッ
(87) 国際公開番号	W02003/103577		・ドライブ613番
(87) 国際公開日	平成15年12月18日 (2003. 12. 18)	(74) 代理人	100081422
審査請求日	平成18年6月5日 (2006. 6. 5)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	60/386, 932	(74) 代理人	100106518
(32) 優先日	平成14年6月6日 (2002. 6. 6)		弁理士 松谷 道子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100116311
			弁理士 元山 忠行
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子組み換えによる新しい抗凝血性蛋白質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T A P - A N V (SEQ ID NO: 1)、A N V - 6 L 1 5 (SEQ ID NO: 2)、A N V - K<sub>APP</sub> (SEQ ID NO: 3) と A N V - K K<sub>TFPI</sub> (SEQ ID NO: 4) からなるグループから選択した配列からなる遺伝子組み換えした抗凝固性蛋白質。

【請求項 2】

請求項 1 の遺伝子組み換えした抗凝固性蛋白質と、薬理学的に受諾できる賦形剤とを含む、抗血栓性合成物。

【請求項 3】

哺乳類被験者の血液凝固を阻害するための調製物の製造における、請求項 1 または 2 に記載の蛋白質または合成物の使用。

【請求項 4】

そのような治療又は予防を必要とする被験者の過剰な血栓活動を治療又は予防するための調製物の製造における、請求項 1 または 2 に記載の蛋白質または合成物の使用。

【請求項 5】

SEQ ID NO: 5 (TAP - A N V をコードする)、SEQ ID NO: 6 (A N V - 6L15 をコードする)、SEQ ID NO: 7 (A N V - K<sub>APP</sub> をコードする) および SEQ ID NO: 8 (A N V - K K<sub>TFPI</sub> をコードする) からなるグループから選択したシーケンスからなる遺伝子組み換えした DNA 分子。

【請求項 6】

10

20

安定的にトランスフェクトされた細胞を作製するために用いられる、請求項5の遺伝子組み換えしたDNA分子と、ANVおよびKPIの融合を含む遺伝子組み換えをした抗凝血性蛋白質の合成を促す付加のシーケンスとを含む、遺伝子組み換えした発現ベクター。

【請求項7】

請求項5に記載の遺伝子組み換えしたDNA分子を含む宿主細胞。

【請求項8】

請求項1に記載の遺伝子組み換えした抗凝血性蛋白質を発現している安定的にトランスフェクトされた細胞株。

【請求項9】

請求項8の細胞株の調製方法であって、宿主細胞を請求項6に記載の遺伝子組み換えした発現ベクターで安定的にトランスフェクトすることを含む方法。

【請求項10】

遺伝子組み換えした抗凝固性蛋白質の製造方法であって、(i)請求項5の遺伝子組み換えDNA分子の使用、(ii)請求項6の遺伝子組み換え発現ベクターの使用、(iii)請求項7の宿主細胞の使用、(iv)請求項8の安定してトランスフェクトされた細胞株の使用、または(v)請求項9の方法の使用を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本出願は、2002年6月6日に提出した米国仮出願No. 60/386932の、この中にその全文が参照として編入されている告知の優先権を主張するものである。

【0002】

(背景技術)

本発明は一般的に抗凝血性蛋白質、特に遺伝子組み換えによる新しい血液凝固阻害因子に関するものである。

組織因子(Tissue Factor, TF)は、一般に正常な恒常性における血液凝固と、種々の凝血異常及び血栓を伴った疾病の生理的引きがねと考えられている。TFはふつう特定の脈管外の細胞の表面に存在するが、刺激によって内皮細胞や単核細胞にも発現を誘導できる(1)。全血及び再構成した血漿を用いた研究(2-5)にもとづいたTFが開始する血液凝塊の要点の図解を1図に示した。TFは露出すると循環している血液に存在するVII/VIIa因子と複合体を形成する。結果として生じた表在性テナーゼ複合体(TF/VIIa)は血液凝固のカスケードを、TFを発現している細胞/小粒子に少量存在するIX因子とX因子を活性化することによって開始する。TF/VIIaが活性化したIXa因子とXa因子は、ひき続いて起きる凝血反応においてそれぞれ別個の役割をはたす。TFを発現している膜表面上のVa/V因子の複合体において、Xa因子は、血小板を部分的に活性化することができ、フィブリノーゲンを分割して初期の血餅を作り、そして、V、VII、及びXI因子を活性型に変換するトロンピンを少量作る。この開始相にひき続いてトロンピン発生の波及が始まる。この波及相の間に、活性化した血小板は、内在性のテナーゼ(VIIa/IXa)とプロトロンビナーゼ(Va/Xa)が複合体として集まれるように、陰イオン化した膜表面を供給する。内在性テナーゼ(VIIa/IXa)とプロトロンビナーゼ(Va/Xa)はそれぞれX因子とプロトロンピンをきわめて効果的に活性化し、爆発的なトロンピンの生産とフィブリン・血小板栓の膠着に至る。3種の血漿抗凝血系が、この血液凝固カスケードを規制している。組織因子経路抑制因子(tissue factor pathway inhibitor, TFPI)は、TF/VIIaをフィードバックによって阻害することができるTFPI-Xa阻害複合体を形成して、この開始相に影響を与える。抗トロンピンIII(AT-III)は、おもに波及相における遊離したトロンピンとXaを阻害して効果をあらわし、活性化蛋白C(APC)は、VaとVIIaを蛋白分解し不活化するため、波及

10

20

30

40

50

の時間的長さに影響を及ぼすことができる。

#### 【 0 0 0 3 】

陰イオン性の磷脂質、おもにフォスファチジル - L - セリン ( P S ) が利用できるかどうかということは、凝血カスケードの開始と増幅を推進する膜に結合した凝血酵素複合体 ( 表在性テナーゼ、内在性テナーゼ、プロトロンビナーゼ、及び X I a ) の触媒活性が集合し発現するために重要である。哺乳類細胞の原形質膜の磷脂質は普通には非対称的に分配されており P S は内膜小葉に隔離されている ( 6 )。この P S 隔離のため、無傷の静態細胞は、通常凝血を促進しない。細胞の活性化、細胞の傷害、又はアポトーシスを起こす刺激に反応して、原形質膜における磷脂質の非対称性が崩れ、P S が膜表面に曝され、膜の小粒子が脱落するにいたる。P S の暴露は、酵素 / 補因子複合体を集合させ、膜表面の基質との反応を許し、このため凝血反応の能率を高める ( 7 - 9 )。無傷の細胞上に形成された T F / V I I a 複合体は、基質に対する酵素活性がしばしば隠されている。T F / V I I a の活性の何倍もの増加 ( d e - e n c r y p t i o n ) は、細胞の破壊や様々な薬品処理、又はアポトーシスの誘導後に P S が膜表面で利用できるようになった時に見られる ( 1 0 - 1 4 )。フォスファチジルコリン ( P C ) のみからなる小胞に再構成した T F の X 因子活性化率は P S - P C 小胞で構成した場合の 5 % 以下である ( 1 5 )。このような観察は、T F の共動的な発現と P S の膜表面への暴露が、凝血が始まるためには重要であることを示唆している。恒常性 / 血栓症の過程では、血小板は、内在性テナーゼ ( V I I a / I X a ) とプロトロンビナーゼ ( V a / X a ) の集合できるように、陰イオン性の膜表面を供給するということが知られている ( 7 , 1 6 )。血小板が活性化されると P S がすぐに血小板の膜表面に現れる。V I I a 因子の陰イオン性脂質との反応は、I X a 因子のためにカルシウムイオン ( C a + + ) に依存した高親和性の結合部位を作り、内在性テナーゼ複合体の形成にいたる。同様に V a 因子の陰イオン性脂質との結合は、X a 因子の C a + + に依存した結合を推進して、プロトロンビナーゼ複合体を形成する。X I a 因子も、I X 因子を I X a 因子に効率よく変換するには、P S を露出した膜に依存している。

#### 【 0 0 0 4 】

T F P I は、多価のクーニッツ ( K u n i t z ) 型抑制因子で、ヒト血管系において組織因子経路による凝血の開始を規制している ( 1 7 )。T F P I は X a 因子を直接阻害し、X a 因子に依存して T F / V I I a 複合体をフィードバックによって抑制するため、組織因子経路の蛋白分解酵素のカスケードを弱める。T F P I は生理的には組織因子経路の規制にとって非常に重要ではあるが、臨床における抗血栓療法への拡張は、血管血栓を効果的に中断するには多量の投与を必要とするため、いまのところ限界がある ( 1 8 - 2 0 )。

#### 【 0 0 0 5 】

その他にもいくつかの自然に生じたクーニッツ型阻害因子があり、組織因子経路の V I I a , I X a , X a 及び X I a 因子に結合することが描写されている。これらは、X a 因子を特に阻害するものではヒル由来のアンチスタチン ( A T S ) ( 2 1 ) , ダニ ( T i c k ) 由来の抗凝血ペプチド ( T A P ) ( 2 2 ) , そして 2 種の犬猫鉤虫 ( A n c y l o s t o m a c a n i n u m ) 由来の抗凝血ペプチド ( A c A P 5 , A c A P 6 ) ( 2 3 ) があり、V I I a 因子を阻害するものではもうひとつ別の犬猫鉤虫 ( A n c y l o s t o m a c a n i n u m ) 由来の抗凝血ペプチド ( A c A P 2 ) ( 2 3 ) , V I I a , I X a , X a 及び X I a 因子を阻害するものではアミロイド 蛋白質前駆体のクーニッツ抑制部位 ( K A P P ) がある ( 2 4 - 2 7 )。部位に特異的な突然変異とファージディスプレイの技術を用いて、いろいろな凝血性蛋白分解酵素 ( T F / V I I a , X a , X I a とカリクレインなど) に対して非常に高い親和性 ( ナノモル以下の K i ) を示す K A P P とアプロチニン ( ウシすい臓トリプシン阻害因子 ) の 2 種の一連の同類体が創造された ( 2 8 - 3 1 )。しかし、これらの突然変異体の抗凝血効果は試験管内の ( i n v i t r o ) 凝血検定 ( 組織因子因子によって開始した凝血と活性化した部分トロンボプラスチン時間 ( A P T T ) ) ではきわめて低い。アプロチニンの同類体も、生体の ( i n v i v o ) 血

10

20

30

40

50

管傷害モデルで抗血栓効果を得るためには非常に多量の投与が必要である(31)。

【0006】

(発明の開示)

本発明にしたがって、遺伝子組み換えによる新しい抗凝血蛋白質、その生産に関連した方法と材料、及び治療におけるその使用法を述べる。

一連の新しい遺伝子組み換えによる抗凝血性の融合蛋白質が、アネキシンV (ANV) (SEQ ID NO: 10) というフォスファチジルセリン (PS) 結合蛋白質を、酵素複合体の中のセリン蛋白分解酵素を標的とするクーニッツ型の蛋白分解酵素阻害因子 (KPI) に結合することによって、選択的に創造される。結果として生じた融合蛋白質は、それぞれの構成蛋白質よりはるかに強い抗凝血活性を示す。これらのコンストラクトのいくつかは、血液中のTFが開始する凝血の自然の阻害因子であるTFPIよりもはるかに強力な効能を発揮する。アネキシンV：クーニッツ型阻害因子 (ANV：KPI) 融合体は、凝血を促進するPSを露出した膜表面の凝血酵素複合体を特異的に標的とする新しいクラスの抗凝血因子を代表し、血栓を作り出す血管壁とそれにつながった血栓を不活化できる抗血栓治療剤として利用できる。

10

【0007】

それゆえに、実施例としては、アネキシンV (ANV) (SEQ ID NO: 10) とクーニッツ型蛋白分解酵素阻害因子 (KPI) の融合による遺伝子組み換えによる抗凝血蛋白質である。代替の実施例の遺伝子組み換えによる抗凝血蛋白質としては、たとえばANVとダニ (Tick) 由来の抗凝血ペプチド (TAP) (SEQ ID NO: 1) との融合、アプロチニン変化形 (6L15) (SEQ ID NO: 2) との融合、アミロイド 蛋白質前駆体のクーニッツ抑制部位 (KAPP) (SEQ ID NO: 3) との融合、及びKK<sub>TFPI 22-260</sub> (SEQ ID NO: 4) との融合である。

20

【0008】

別の実施例は、アネキシンV (ANV) (SEQ ID NO: 10) とクーニッツ型蛋白分解酵素阻害因子 (KPI) の融合による遺伝子組み換えによる抗凝血蛋白質から成立している抗血栓性合成物である。代替の実施例の抗血栓性合成物としては、たとえばTAP-ANV (SEQ ID NO: 1), ANV-6L15 (SEQ ID NO: 2), ANV-KAPP (SEQ ID NO: 3), 及びANV-KK<sub>TFPI 22-160</sub> (SEQ ID NO: 4) である。

30

【0009】

別の実施例は、哺乳類被検動物にアネキシンV (ANV) (SEQ ID NO: 10) とクーニッツ型蛋白分解酵素阻害因子 (KPI) の融合による遺伝子組み換えによる抗凝血蛋白質の有効量を投与して、被検動物の血液凝固を阻止する方法である。

【0010】

別の実施例は、アネキシンV (ANV) (SEQ ID NO: 10) とクーニッツ型蛋白分解酵素阻害因子 (KPI) を連結した遺伝子組み換えによる抗凝血蛋白質を生産する方法である。

別の実施例は、過剰の血栓活性を治療又は予防する必要がある被検者において、過剰の血栓活性を治療又は予防する方法である。この方法とは、アネキシンV (ANV) (SEQ ID NO: 10) とクーニッツ型蛋白分解酵素阻害因子 (KPI) を融合した遺伝子組み換えによる抗凝血蛋白質の有効量を被検者に投与することである。

40

【0011】

別の実施例は、最初のDNAシーケンスはアネキシンV (ANV) (SEQ ID NO: 9) をコードしており、二番目のDNAシーケンスはクーニッツ型蛋白分解酵素阻害因子 (KPI) をコードしている遺伝子組み換えによるDNA分子である。遺伝子組み換えによるDNA分子の代替の実施例としては、たとえばTAP-ANV (SEQ ID NO: 5), ANV-6L15 (SEQ ID NO: 6), ANV-KAPP (SEQ ID NO: 7), ANV-KK<sub>TFPI 22-160</sub> (SEQ ID NO: 8)、及びこれらを保存的に変換した変種の遺伝子組み換えによるDNA分子である。

50

## 【 0 0 1 2 】

別の実施例は、アネキシンV (ANV) (SEQ ID NO: 10) とクーニッツ型蛋白分解酵素阻害因子 (KPI) を連結した遺伝子組み換えによる抗凝血蛋白質を発現する細胞株を調製する過程である。この過程とは、ANV又はその保存的に変換した変種をコードするcDNAシーケンスとKPIをコードするcDNAシーケンスからなる遺伝子組み換えによる発現ベクターを宿主細胞にトランスフェクトすることである。

## 【 0 0 1 3 】

別の実施例は、最初のヌクレオチドシーケンスはアネキシンV (ANV) (SEQ ID NO: 9), ANVのCys<sup>315</sup>-to-Ala変異体 (SEQ ID NO: 14) 又はその保存的に変換した変種をコードしており、二番目のヌクレオチドシーケンスはクーニッツ型蛋白分解酵素阻害因子 (KPI) をコードし、さらに安定的にトランスフェクトした細胞の培養においてANVとKPIを融合した遺伝子組み換えによる抗凝血蛋白質の合成を促すシーケンスを含む遺伝子組み換えによる発現ベクターである。遺伝子組み換えによる発現ベクターの代替の実施例は、たとえばTAP-ANV (SEQ ID NO: 5), ANV-6L15 (SEQ ID NO: 6), ANV-KAPP (SEQ ID NO: 7), ANV-KKTFPI<sub>22-160</sub> (SEQ ID NO: 8)、及びこれらを保存的に変換した変種からなるグループから選択したヌクレオチドシーケンスである。

## 【 0 0 1 4 】

(発明の詳細な記載)

本発明の以下に述べる詳細な記述は、付随した図表とともに、本発明をさらに説明し、優先的な実施例を詳説する。

血液凝固カスケードはおもに凝血酵素複合体の形成によって進展する。各々の凝血酵素複合体は、陰イオン化した膜表面に結合したコファクター/受容体と連結したセリン蛋白分解酵素から成り立っている。これらの複合体は、習慣的に表在性テナーゼ (VIIa因子 組織因子)、内在性テナーゼ (IXa因子 VIIa因子)、プロトロンビナーゼ (Xa因子 Va因子) とXIa複合体と名づけられている。

ここに記述したように、新しい一連の遺伝子組み換えによる抗凝血性の融合蛋白質が創造される。たとえば、フォスファチジルセリン (PS) 結合蛋白であるアネキシンV (ANV) (SEQ ID NO: 10) をクーニッツ型蛋白分解酵素阻害因子 (KPI) と連結し、凝血酵素複合体のセリン蛋白分解酵素を標的とする。結果として生じた融合蛋白質は、そのひとつひとつの構成蛋白質のみの場合、又はすべての構成蛋白質を加えた場合ですらよりもはるかに強い抗凝血活性を示す。便宜上これらの遺伝子組み換えによる抗凝血性の融合蛋白質はANV:KPIと省略する。これらの融合蛋白質は、ANVのフォスファチジル-L-セリンに対する高親和性 (32) と、種々KPIによる血液凝血カスケード中の膜結合性の凝血性複合体におけるセリン蛋白分解酵素の阻害を利用している。これらの新しいコンストラクトのいくつかは、血液中のTFが開始する凝血に対する自然の阻害因子であるTFPIよりも、はるかに強力な効果を持つ。アネキシンV:クーニッツ型蛋白分解酵素阻害因子 (ANV:KPI) 融合蛋白質は、凝血促進傾向のあるPSを露出した膜表面の凝血性酵素複合体を特定の標的とする新しいクラスの抗凝血剤を代表し、血栓を促進する血管壁とそれに結合した血栓を弱める能力を備えた抗血栓治療薬品として有用である。新しい融合蛋白質は、過剰の血栓生成を伴う病気や状態、すなわち不安定性アンギナ、心筋梗塞症、突然心臓死、虚血性卒中、破裂性動脈瘤、間欠性は行症、重症虚血肢 (critical limb ischemia) などの動脈血栓症状や、深静脈性血栓症 (DVT)、肺動脈塞栓症、血栓性静脈炎や慢性静脈不全症などの静脈血栓症、およびそのほか手術性血栓症、人工心臓弁、動脈硬化、再狭窄症 (restenosis)、虚血再灌流傷害 (ischemic reperfusion injury)、敗血症、伝染性血管内凝固、急性肺傷害、悪性腫瘍、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、半月形系球体腎炎、糖尿病、鎌状赤血球貧血 (sickle cell anemia)、地中海貧血 (thalassemia)、抗リン脂質抗体症候群 (antiphosph

10

20

30

40

50

olipid syndrome), 体外循環 (extra-corporeal circulation), 血液透析、腹腔透析や、アネキシンの合成や機能の欠陥によって生じる病理的状态 (annexinopathies) などの臨床的状态の治療に有用である。

本発明をさらに説明するために、次に述べる特定のな実験室での実例が遂行された。しかしながら、本発明はこれらの特定実例やここに記述された詳細だけにとどまらないことを理解するべきである。

#### 【0015】

##### (実施例)

##### 材料と方法

##### 試薬

尿素 (シーケンス グレード) と Brij 35 はピアス (Pierce) から入手した。混合ベッドレジジン AG501-X8、SDS-PAGE 試薬、および分子量マーカーはバイオラド (BioRad) から購入した。デイドイノピン (Dade Innovin (登録商標)) はバクスターダイアグノスティック (Baxter Diagnostic, Inc., Deerfield, IL, USA) から入手した。APTT-SP はインストラメンテーションラボラトリー (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, USA) から得た。ウシ Xa 因子はアメリカンダイアグノスティカ (American Diagnostica, Inc., Greenwich, CT, USA) が供給した。トリプシン、p-ニトロフェニール p'-グアニディノベンゾエート HCL, ウシ脳抽出物、コレステロール、ジアセチル燐酸はシグマ (Sigma, St. Louis, MO, USA) から得た。合成基質の S2444 と S2765 はダイアファーマ (diaPharma, West Chester, OH, USA) から入手した。新しく凍結したヒト血漿は台北血液センター (Taipei Blood Center) から購入した。哺乳類 C127 細胞と大腸菌 (E. coli) から由来した遺伝子組み換えによる TFPI は以前に記述されたように (33、34) 調整した。遺伝子組み換えによる X-K1 (ヒト X 因子の C-末端ペプチドと TFPI の最初のクーニッツ部位の結合物) (35) と TFPI 1-160 はジョージ・ブローズ・ジュニア博士 (Dr. George Broze, Jr., Washington University, St. Louis, MO, USA) からのギフトである。酵母由来の遺伝子組み換えによる TAP はディナ・アーベンドシャイン博士 (Dr. Dana Abendschein, Washington University, St. Louis, MO, USA) からのギフトである。

#### 【0016】

##### アネキシン V cDNA のクローニング

停止コドンを含いた ANV cDNA はヒト胎盤 mRNA から ANV 逆行プライマー 1 (5'-ATCAAGCTTATGCAATGTCATCTTCTCCACAGAG-3') (SEQ ID NO: 11) と前進プライマー 2 (5'-GATCGGATCCAGTCTGGTCCCTGCTTCACCTT-3') (SEQ ID NO: 12) を使った PCR で製造した。ATGCAAT は 6L15, K<sub>APP</sub>, 又は K<sub>KTFPI22-161</sub> 遺伝子フラグメントを結合するために用いた制限酵素 Nsi I の部位である。Cys<sup>315</sup> から Ala への ANV cDNA 変異体はオリゴヌクレオチド X (5'-CGTGACATGCAATGTCATCTTCTCCAGCGAGCA-3') (SEQ ID NO: 13) を用いた PCR で製造した。この太字の GC は、Cys の本来のコドンから Ala に取り替えるために CA から変換した。遺伝子組み換えのよる ANV は Cys<sup>315</sup> の変異なしに発現した。その他全部の ANV: KPI 融合体には、Cys<sup>315</sup> から Ala に変異した ANV cDNA (SEQ ID NO: 14) を使った。Cys / Ala の位置は PCR で増幅した Met 開始コドンを含損した ANV cDNA 中で 315 と番号づけられた。

#### 【0017】

6 L 1 5 , T A P と K<sub>A P P</sub> 遺伝子の構築

6 L 1 5 をコードする合成遺伝子は、3組の重なり合うオリゴヌクレオチドから作成した。3種の前進オリゴマーは：B P - 1 ( 5 ' T C C G G A C T T C T G C C T G G A A C C G C C G T A C G A C G G T C C G T G C C G T G C T C T G C A C C T G C G T T A C T T C - 3 ' ) ( S E Q I D N O : 1 5 ) ; B P - 2 ( 5 ' - T A C A A T G C A A A G G C A G G C C T G T G T C A G A C C T T C T A C T A C G G C G G T T G C C T G G C T A A G C G T - 3 ' ) ( S E Q I D N O : 1 6 ) ; と B P - 3 ( 5 ' - A A C A A C T T C G A A T C C G C G G A A C A C T G C A T G C G T A C T T G C G G T G G T G C T T A - 3 ' ) ( S E Q I D N O : 1 7 ) である。3種の逆行オリゴマーは；B P - 1 - 3 ' ( 5 ' - A C G C A G G T G C A G A G C A C G G C A C G G A C C G T C G T A C G G C G G T T C C A G G C A G A A G T C C G G A T G C A T - 3 ' ) ( S E Q I D N O : 1 8 ) ; B P - 2 - 3 ' ( 5 ' - A G C C A G G C A A C C G C C G T A G T A G A A G G T C T G A C A C A G G C C T G C C T T T G C A T T G T A G A A G T A - 3 ' ) ( S E Q I D N O : 1 9 ) ; と B P - 3 - 3 ' ( 5 ' - A G C T T A A G C A C C A C C G C A A G T A C G C A T G C A G T C T T C C G C G G A T T C G A A G T T G T T A C G C T T - 3 ' ) ( S E Q I D N O : 2 0 ) である。内部のオリゴマーは、T<sub>4</sub> - ポリヌクレオチドキナーゼで燐酸化した。この互いに補足しあう3組のオリゴヌクレオチドは、それぞれ別々に95度に加熱し、室温までゆっくりと冷却してアニールした。このアニールした対のオリゴヌクレオチドは、それからT<sub>4</sub> - DNAリガーゼで6 L 1 5 遺伝子を形成するように結合した。このN s i I 制限酵素部位A T G C A T はB P - 1 - 3 ' のオリゴマー・シーケンス中で本来のA r g<sup>1</sup> コドンをH i s に変えA N V 遺伝子フラグメントと結合するようにデザインした。6 L 1 5 の発現のためには、本来のA r g<sup>1</sup> コドンをA l a に変換した。6 L 1 5 の合成遺伝子は、次のシーケンスから成り立っている；

G C T	C C G	G A C	T T C	T						
G C	C T G	G A A	C C G	C C G	T A C	G A C	G G T	C C G	T G C	C
G T	G C T	C T G	C A C	C T G	C G T	T A C	T T C	T A C	A A T	G
C A	A A G	G C A	G G C	C T G	T G T	C A G	A C C	T T C	T A C	T
A C	G G C	G G T	T G C	C T G	G C T	A A G	C G T	A A C	A A C	T
T C	G A A	T C C	G C G	G A A	G A C	T G C	A T G	C G T	A C T	T
G C	G G T	G G T	G C T	T A A	( S E Q I D N O : 2 1 ) .					

## 【 0 0 1 8 】

a l a - T A P の合成遺伝子は、合成オリゴヌクレオチドからN e e p e r ら ( 3 6 ) に従って製造した。a l a - T A P の合成遺伝子は次のシーケンスから成り立っている；

G C T	T A C	A A C	C G T	C T G	T G C	A T C	A A A	C C G	C G T	
G A C	T G G	A T C	G A T	G A A	T G C	G A C	T C C	A A C	G A A	
G G T	G G T	G A A	C G T	G C T	T A C	T T C	C G T	A A C	G G T	
A A A	G G T	G G T	T G C	G A C	T C C	T T C	T G G	A T C	T G C	
C C G	G A A	G A C	C A C	A C C	G G T	G C T	G A C	T A C	T A C	
T C C	T C C	T A C	A A C	G A C	T G C	T T C	A A C	G C T	T G C	
A T C	T A A	( S E Q I D N O : 2 2 ) .								

## 【 0 0 1 9 】

フランキングシーケンスを伴ったK<sub>A P P</sub> の合成遺伝子は、2対の重なりあう合成オリゴヌクレオチドから構築した。この2種の前進オリゴマーは：K<sub>A P P</sub> - 1 ( 5 ' - G G C C C T A C C C C A C A G A T A C G G A G T T G C C A C C A C T G A A A C T T G A G G T T G T T A G A G A G G T T T G T T C T G A G C A A G C T G A G A C T G G T C C A T G T A G A G C T A T G A T T T C T A G A T G G T A C T T C G A C G T T - 3 ' ) ( S E Q I D N O : 2 3 ) ; K<sub>A P P</sub> - 2 ( 5 ' - A C T G A G G G T A A G T G T G C T C C A T T C T T C T A C G G T G G T T G T G G T G G T A A C A G A A A C A A C T T C G A C A C T G A G G A G T A C T G T A T G G C T G T T T G T G G T T C T G C T A T T T A A A T G C A T T G A T G A - 3 ' ) ( S E Q

ID NO: 24)である。この2種の逆行オリゴマーは: K<sub>APP</sub>-1-3' (5' - CTCAGTAAACGTCGAAGTACCATCTAGAAATCA TAGCTCTACATGGACCAGTCTCAGCTTGCTCAGAACAAACCTCTCTTAAACAACCTCAA GTTTCAGTGGTGGCAACTCCGTATCTGTGGGGTAG-3') (SEQ ID NO: 25); と K<sub>APP</sub>-2-3' (5' - AGCTTTCATCAATGCATTTAAATAGCAGAACCAACAACAGCCATACAGTACTCC TCAGTGTCTGAAGTTGTTTCTGTTTACCACCACAACCAACCGTAGAAGAATGGAGCACACTTACC-3') (SEQ ID NO: 26)である。下線部は、K<sub>APP</sub> 部位をコードするコンプリメンタリーシーケンスをあらわす。このオリゴマーは、T<sub>4</sub>-ポリヌクレオチド・キナーゼで燐酸化し、95度に加熱し、室温までゆっくりと冷却してアニールした。この対のアニールしたオリゴヌクレオチドは、それからT<sub>4</sub>-DNAリガーゼで結合した。このK<sub>APP</sub> 部位の合成遺伝子は、次のシーケンスから成り立っている。:

GAG GTT TGT TCT GAG CAA GCT GAG ACT GGT  
CCA TGT AGA GCT ATG ATT TCT AGA TGG TAC  
TTC GAC GTT ACT GAG GGT AAG TGT GCT CCA  
TTC TTC TAC GGT GGT TGT GGT GGT AAC AGA  
AAC AAC TTC GAC ACT GAG GAG TAC TGT ATG  
GCT GTT TGT GGT TCT GCT ATT TAA (SEQ ID NO: 27)

#### 【0020】

##### 大腸菌発現プラスミッドの構築

ANV-6L15およびANV-KK<sub>TFPI</sub>の発現のためのプラスミッドを構築するため、次のプライマーをPCRによる増幅とpET20b発現ベクターへのサブクロニングに用いたANV-nde (5' - GGAATTCCATATGGCACAGGTTCTCAGAGG-3') (SEQ ID NO: 28), ANV-nsi (5' - CCAATGCATGTCATCTTCTCCAGC-3') (SEQ ID NO: 29),

6L15-nsi (5' - CCAATGCATCCGGACTTCTGCCTG-3') (SEQ ID NO: 30),

KK<sub>TFPI</sub>-nsi (5' - CCAATGCATTTCAATTTTGTGCATTC-3') (SEQ ID NO: 31),

6L15-sal (5' - ACGCGTCTGACTTA AGCACCAACCGCAAG-3') (SEQ ID NO: 32), と

KK<sub>TFPI</sub>-sal (5' - ACGCGTCTGACTTAGGTTCCATA ATTATCC-3') (SEQ ID NO: 33)。

下線を引いた配列はNde I制限酵素部位で、箱で囲んだ配列はSal Iの切断部位である。下線を引いたATGCATは遺伝子融合に用いたNsi I制限酵素部位である。拡大したATGはメチオニンの開始コドンで、TTAはTAAの終止コドンのコンプリメンタリーシーケンスである。KK<sub>TFPI</sub>22-161遺伝子フラグメントは全長TFPI cDNA クローン(34)から、KK<sub>TFPI</sub>-nsi (SEQ ID NO: 31)とKK<sub>TFPI</sub>-sal (SEQ ID NO: 33)プライマーを使ってPCR増幅で得た。PCRで増幅したANVのフラグメントは、Nde IとNsi I制限酵素で消化し、Nsi IとSal Iで消化した6L15 (又はKK<sub>TFPI</sub>) PCRフラグメントにつないだ。この融合遺伝子はNde IとSal I制限酵素で直線化したpET20b (+) 発現ベクターに結合した。

#### 【0021】

TAP-ANVを発現するベクターを構築するために、次のプライマーを遺伝子融合に使い、pET20bの中へサブクローンした:

TAP-nde (5' - GGAATTCCATATGGCTTACAACCGTCTGT



G - 3' ) ( SEQ ID NO ; 34 ) ;  
 TAP - bam ( 5' - CGGGATCCGATGCAAGCGTTGAAGCAG - 3'  
 ' ) ( SEQ ID NO : 35 ) ;  
 ANV - bam ( 5' - CGGGATCCGCACAGGTTCTCAGAGGC - 3'  
 ) ( SEQ ID NO ; 36 ) ;  
 ANV - sal ( 5' - ACGCGTCTGACTTAGTCACTCTCTCCAGCG  
 - 3' ) ( SEQ ID NO ; 37 ) .

PCRで増幅したTAP遺伝子フラグメントは、Nde IとBamH I制限酵素で消化し、BamH IとSal Iで消化したANV遺伝子フラグメントにつないだ。この融合遺伝子はNde IとSal I制限酵素で直線化したpET20b (+) 発現ベクターに挿入した。

10

#### 【0022】

希望の遺伝子組み換えしたプラスミッドは、PCRとDNAシーケンスを測定し選別した。これらの発現プラスミッドはpET20b - AB8, pET20b - AKK11とpET20b - TAP - Aと命名し、これらは、それぞれ遺伝子組み換えしたANV - 6L15とANV - KK<sub>TFPI</sub>, とTAP - ANVの蛋白質をT7プロモーターのコントロール下で大腸菌の細胞中に発現する。

比較する目的でANVと6L15を発現するためには、PCRで製作したANVと6L15の遺伝子フラグメントを、大腸菌発現と同じ手段を使ってそれぞれプラスミッドに挿入した。

20

#### 【0023】

##### 大腸菌での発現

大腸菌BL21 (DE3) pLysS [ (F<sup>-</sup>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcM (DE3) pLysS (Cam)<sup>R</sup> ) ] (Novogene, Madison, WI) を遺伝子組み換えした蛋白質の発現のために使用した。大腸菌DH5 [ (F<sup>-</sup> (80d lacZ M15) (lacZYA - argF) U169endA1recA1hsdR17 (r<sub>K</sub> - m<sub>K</sub> +) deoR thi - 1supE44gyrA96relA1 ) ] は発現プラスミッドを構築するために使った。発現プラスミッドは増殖し、大腸菌DH5 から単離し、冷凍したコンピテントな大腸菌BL21へとトランスフォームした。単一のコロニーは25mlのLBブロス (100mg / Lアムピシリンと34mg / Lクロラムフェニコールを含む) に播種し、37度で激しく振動して一晚培養した。10mlのこの一夜培養液を2.8Lフラスコ (Nalgene) 中の1リットルの同培養液に播種し、培養液のOD<sub>600</sub>が0.5に至るまで37度に保った。培養はIPTG (Promega) を最終濃度が1mMになるように添加し、4時間37度で連続的に振動して誘導した。この大腸菌細胞は12分間7000rpmの遠心分離によって収獲した。この細胞ペレットは将来使用するため - 80度で冷凍した。

30

#### 【0024】

##### 酵母発現プラスミッドの構築

Pichia発現ベクターのpPIC9は、強力で非常に誘導しやすいP<sub>Aox1</sub>プロモーターと 因子シグナルペプチドを使い、標的とする蛋白質を高水準に発現し分泌する。目的の遺伝子を含んだフラグメントはXho IとNot I部位に囲まれた分泌シグナルペプチドと共にクローンした。KEX2の蛋白分解酵素部位をコードするXho I部位から標的の遺伝子の開始コドンへのシーケンスは、融合酵素が効率よく分割されるために作成されなければならない。pPIC9ベクターへクローンできるように、目的のPCRフラグメントを作り出すようにデザインしたプライマーは、ANV - xho (5' - CCG CTCGAG AAA AGA GCA CAG GTT CTC AGA G - 3' ) ( SEQ ID NO ; 38 ) , K<sub>APP</sub> - not (5' - ATA AGA AT GCGGCCGC TTA AAT AGC AGA ACC AC - 3' ) ( SEQ ID NO ; 39 ) , ANV - ecov (5' - CGC GAT ATC ATC TTC TCC AGC GAG - 3' ) ( SEQ ID NO ; 40 ) , 5' - K<sub>A</sub>

40

50

p p ( 5 ' - G A G G T T T G T T C T T G A G C A A G C - 3 ' ) ( S E Q I D N O ; 4 1 ) であった。C T C G A G と G C G G C C G C の配列はそれぞれ X h o I と N o t I 制限酵素部位で、遺伝子フラグメントをエディット ( e d i t ) したり p P I C 9 ベクターへ組み込むため用いる。C T C G A G A A A A G A は K E X 2 蛋白分解酵素の典型的分割部位である4つのアミノ酸 L e u - G l u - L y s - A r g , をコードするので、それに続くプライマーのコドンは分泌される目的の蛋白質の最初のコドン ( 拡大した文字で表してある ) であるようにデザインした。A N V - K <sub>A P P</sub> 融合遺伝子を作成するためには、A N V - e c o v プライマーをデザインした。このプライマーは最後にコードされているアミノ酸 ( A s p ) を変化することなく A N V 遺伝子の 3 ' - 末端に位置する E c o R V 部位 ( G A T A T C ) を作り出す。5 ' - K <sub>A P P</sub> プライマーは G l u ( G A G ) の開始コドンからの K <sub>A P P</sub> 遺伝子の前進シーケンスである。5 ' - K <sub>A P P</sub> と K <sub>A P P</sub> - n o t プライマーで増幅した K <sub>A P P</sub> 遺伝子フラグメントは、A N V - x h o と A N V - e c o v で増幅した A N V 遺伝子とプラントエンドライゲーションし、A N V - K <sub>A P P</sub> 融合遺伝子を創造するため E c o R V で消化した。この融合遺伝子は X h o I と N o t I 制限酵素で消化し、同じ酵素を使って直線化した p P I C 9 へ組み込んだ。このライゲーション混合物は大腸菌 D H 5 へトランスフォームし、望ましいクローンは P C R で選択し、D N A 配列分析で確認して、フレーム中のアミノ酸配列と 因子シグナルペプチドを同定した、この結果、できあがったプラスミッドは p P I C 9 A N V - K <sub>A P P</sub> であった。

#### 【 0 0 2 5 】

##### P i c h i a での発現

酵母発現プラスミッドは大腸菌 D H 5 から再生産し単離した。トランスフォーメーションの前に、この発現プラスミッドは S a c I 制限酵素で消化して組み込みを行った。選択マーカーの H i s 4 を含む遺伝子カセットと融合した 因子を、エレクトロポレーション ( 3 7 ) でメタノール資化性酵母 ( P . p a s t o r i s ) G S 1 1 5 ( h i s 4 ) のゲノムの A O X 1 部位に挿入した。この遺伝子組み換えした菌株は、H i s 4 を補充した M D ( ミニマルデキストロース培養液, 1 . 3 4 % アミノ酸なしの酵母窒素ベース - 4 x 1 0 <sup>-5</sup> % ビオチン - 2 % デキストロース - 1 . 5 % バクト アガー ) プレートで培養し選択した。

M D プレートで育てたメタノール資化性酵母 G S 1 1 5 の遺伝子組み換えした菌株の単一コロニーを 1 0 c m のパイレックス試験管中の 2 m l の B M G Y 培養液 ( 緩衝化したグリセロール複合培養液, 1 % 酵母抽出物 - 2 % ペプトン - 1 0 0 m M リン酸カリウム, p H 6 . 0 - 1 . 3 4 % アミノ酸なしの酵母窒素ベース - 4 x 1 0 <sup>-5</sup> % ビオチン - 1 % グリセロール ) に播種し、O D <sub>6 0 0</sub> が 2 - 6 に達するまで 3 0 度で 2 0 0 r p m で激しく振動しながら培養した。1 m l の培養液は遠心分離で収穫し、1 5 c m のパイレックス試験管中の 3 m l の B M M Y 培養液 ( 緩衝化したメタノール複合培養液, 1 % 酵母抽出物 - 2 % ペプトン - 1 0 0 m M リン酸カリウム, p H 6 . 0 - 1 . 3 4 % アミノ酸なしの酵母窒素ベース - 4 x 1 0 <sup>-5</sup> % ビオチン - 0 . 5 % メタノール ) に再懸濁した。培養は分泌蛋白質が発現するように 2 4 時間 3 0 度で 2 0 0 r p m で激しく振動しながら保った。この細胞は 1 0 分間 1 2 , 0 0 0 r p m で遠心分離し、上清はトリブシンに対する阻害活性について分析した。1 0 μ l の上清で 1 2 % S D S - P A G E を行い、発現した A N V - K <sub>a p p</sub> はウェスタンブロットで検出した。

P i c h i a での大規模な A N V - K <sub>A P P</sub> 発現は、新しい M D プレートから単一のコロニーのメタノール資化性酵母 G S 1 1 5 の遺伝子組み換えした菌株を 3 0 0 - m l フラスコ中の 2 5 m l B M G Y 培養液に播種し、2 日間 3 0 度で 2 0 0 r p m で激しく振動しながら培養した。この後期の l o g フェーズの培養液を 1 - L フラスコ中の 4 0 0 m l の新しい B M G Y 培養液に最終の O D <sub>6 0 0</sub> が 0 . 1 になるように播種した。この培養液は O D <sub>6 0 0</sub> が 2 に達するまで 3 0 度で保った。この細胞は 1 0 分間 3 0 0 0 r p m で遠心分離して無菌のびんに収集し、1 L の B M M Y 培養液に再懸濁し、2 . 8 - L f l a s k に移した。培養は 3 0 度で振動して保ち、蛋白の誘導を開始した。2 4 時間の誘導後、

細胞は遠心分離で除去し、上清は80度で冷凍した。

#### 【0026】

大腸菌からの封入体の単離

凍った大腸菌のペーストは冷たいミリQ水に75mg/mlの濃度になるように懸濁した。大腸菌細胞は30分間氷の上でホモゲナイザーで分散した。細胞はそれからソニケーションで機械的に溶解した。溶解液は16,000xgで20分間遠心分離した。上澄み液は捨てた。沈殿物の封入体はひとつに集め、もう一度上記のように同量の冷たいミリQ水に懸濁し、均質化しソニケートし遠心分離した。この封入体は-80度で貯蔵した。

#### 【0027】

封入体のスルホン化と陰イオン交換クロマトグラフィー

スルホン化、陰イオン交換クロマトグラフィー、そして蛋白再生に用いた緩衝液は高濃度の尿素を含んでいた。尿素溶液は混合ベッドレジジンAG（登録商標）501-X8（Bio Rad）で室温で最低20分間処理し、緩衝液に混合する前に0.2μmフィルターを通してろ過した。1グラムの封入体（湿重量）は、40mlの50mMトリス/塩酸、pH8.0と7.5M尿素を含む溶液中にホモジェネーションとボルテックシングによって分散した。封入体がほとんど溶解した後、800mgの硫化ナトリウムを加え、この混合物は室温で30分間振動した。それから400mgのテトラシアン酸ナトリウムを加え、この混合物は4度で一晩振動した。この溶液は400mlの20mMトリス/塩酸、pH8.0と4M尿素を含む溶液に対して透析した。透析した溶液は、1時間48,000xgで遠心分離し、0.2μmフィルターを通してろ過し、-80度で貯蔵した。陰イオン交換クロマトグラフィーには、スルホン化して透析したサンプルを0.15M NaClを含むQバッファー（20mMトリス/塩酸、pH8-6M尿素-0.01%ブリジー35）で平衡化したHiLoad Q-セファロース16/10カラムに室温で搭載した。カラムは240mlの平衡化に用いた緩衝液で洗浄し、そしてQバッファー中の396mlの濃度勾配（0.15-0.4M NaCl）で流速3ml/minで溶出した。9mlフラクションが集められた。希望する蛋白質を含むピークのフラクションはSDS-PAGEで分析し、一つに集めリフォールドに使った。

#### 【0028】

ダイスルフィドを含む蛋白質のリフォールド

以前に記述した（34）大腸菌由来のTFPIをリフォールドするために開発した標準の再生条件をクーニッツ阻害因子とANV:KPI融合蛋白質のリフォールドに用いた。簡潔に言えば、スルホン化し陰イオン交換クロマトグラフィーして集めたサンプルは、280nmの吸収が0.07になるように0.3M NaClを含んだQバッファーで希釈した。固体のL-システインを最終濃度が2mMになるように添加した。この溶液は室温で24時間インキュベートし、さらに1mM L-システインを含む水で1:1に希釈し、室温でさらに24-48時間インキュベートした。単一領域のクーニッツ蛋白質は、リフォールドは高蛋白濃度（280nmの吸収が0.15）で行い、本質的に同じ結果が得られる。

#### 【0029】

6L15とANV-KK<sub>TFPI</sub>の精製

リフォールドした6L15混合物（18ml）は1Mクエン酸で滴定してpH3.0に酸性化し、水で1:1に希釈し、20mMクエン酸緩衝液、pH3.0で平衡化した1x8cmQ-セファロース（ファーストフロー）カラムに通過した。カラムはそれから同緩衝液中の0.1から1M NaClの濃度勾配で流出した。6L15は0.5M NaClあたりで対称的なピークとして溶出した。

リフォールドしたANV-KK<sub>TFPI</sub>混合物（600ml）は水で1:1に希釈し、75mMを含んだ5mMトリス緩衝液、pH8.0で平衡化した1x8cmQ-セファロース（ファーストフロー）カラムに通過した。カラムは50mlの平衡化に用いた緩衝液で洗浄した。ANV-KK<sub>TFPI</sub>はそれから0.25M NaClを含んだ5mMトリス緩衝液、pH8.0で溶出した。

## 【 0 0 3 0 】

TAP - ANV, ANV - 6 L 1 5, ANVとANV - K<sub>A P P</sub> の精製

リフォールドしたTAP - ANV混合物(160 ml)は20 mMトリス緩衝液、pH 7.4で平衡化した1 x 8 cm Q - セファロース(ファースト フロー)カラムに通過した。カラムは50 mlの0.15 M NaClを含んだ同緩衝液で洗浄し、同緩衝液中の0.15から0.35 M NaClの濃度勾配で流出した。

TAP - ANVは0.33 M NaClあたりで単一の対称的なピークとして溶出した。リフォールドしたTAP - 6 L 1 5混合物は2 M尿素、0.003%ブリジー35、0.1 M NaClを含んだ6.7 mMトリス緩衝液、pH 9.5で平衡化した1 x 8 cm Q - セファロース(ファースト フロー)カラムに積載した。カラムは40 mlの同緩衝液、さらに30 mlの20 mMトリス緩衝液、pH 7.4で洗浄し、それから180 mlの20 mMトリス緩衝液、pH 7.4、中で0.1 Mから1 M NaClの濃度勾配で流出した。Q - セファロースで精製したTAP - ANVとTAP - 6 L 1 5はさらに、ThiagarajanとBenedict(38)が記述した方法を変更した方法でPSを含んだリポソームに吸収して精製した。多層ラメラのリポソームはKinsky(39)の方法によって調製した。50%PSを含んだウシ脳抽出物(100 mg)、150 mgコレステロール、10 mgダイアセチル燐酸はクロロフォームに溶解し、40 mlのガラスバイアル中窒素ガス下で乾燥した。TBS(10 ml)をバイアルに加え、5分間ボルテックスミキサーで激しく振動した。リポソームは10分間10,000 x gで遠心分離し、沈殿した。Q - セファロースで精製したTAP - ANVとTAP - 6 L 1 5をこのリポソームに加え、CaCl<sub>2</sub>も最終濃度が5 mMになるように加えた。この混合物は40分間室温に置き、それから10分間10,000 x gで遠心分離した。沈殿物は上記のように5 mM CaCl<sub>2</sub>を含んだTBSで遠心分離と再懸濁のサイクルを4回繰り返して洗浄した。TAP - ANVまたはANV - 6 L 1 5は5 mM EDTAを含んだ10 mMトリス緩衝液、pH 8.0で溶出した。

## 【 0 0 3 1 】

遺伝子組み換えによるANVは、以前に記述された方法(38)を多少変更した方法によって、大腸菌溶解物をリポソームに結合し直接単離した。要点を言えば、大腸菌細胞ペレットは10 mM EDTAを含んだ50 mMトリス緩衝液、pH 7.4に懸濁し、溶解物を得るため氷の上でソニケートした。この溶解物は-80度で貯蔵した。この溶解物の分割部分の一つは溶かして、TBSに対して透析し、30分間15,000 x gで遠心分離し透明化した。この溶解物は5 mM CaCl<sub>2</sub>の存在下でリポソームと40分間インキュベートし、続いて上記のように洗浄、遠心分離、EDTAによる溶出をおこなった。

## 【 0 0 3 2 】

遺伝子組み換えによるANV - K<sub>A P P</sub>は発現し*p i c h i a*の培養液に分泌された。培養液は約10倍に濃縮して0.15 M NaClを含んだ10 mMトリス緩衝液、pH 7.4と交換し、1時間40,000 x gで遠心分離し透明化した。この培養液濃縮液は5 mM CaCl<sub>2</sub>の存在下でリポソームとインキュベートし、続いて上記のように洗浄、遠心分離、EDTAによる溶出をおこなった。EDTA溶液でリポソームから溶出したすべての蛋白質は1時間20,000 x gで遠心分離し、大部分のリポソームから蛋白質を分離した。残ったベシクルを取り除くため、この蛋白溶液はさらにセントリプラスYM - 100(Amicon)でろ過した。

## 【 0 0 3 3 】

## 蛋白質測定

蛋白質の濃度は、Gillとvon Hippel(40)が記述したようにアミノ酸配列データから計算した理論的吸光係数を使って、280 nmの吸収から測定した。次のモル吸光係数を使用した：ANV(21,050)；TAP - ANV(39,550)；ANV - 6 L 1 5(28,170)；ANV - K<sub>A P P</sub>(31,300)；ANV - K<sub>K T F P I</sub>(30,170)；TAP(18,500)；6 L 1 5(7,120)；C127 - と大腸菌由来のFL - TFP I(20,650)；C127をランケートしたTF

PI ( 19 , 370 ) ; TFPI 1 - 160 ( 7 , 840 ) ; X - K1 ( 14 , 490 )  
・  
【 0034 】

トリプシンとXa因子阻害活性のアミド分解分析：疎外因子 蛋白分解酵素相互作用の  
ストイキオメトリーの測定

ウシXa因子 ( American Diagnostica から ) とブタトリプシン ( Sigma から ) は、活性のあるXa因子とトリプシンの濃度を測定するため、それぞれ Smith ( 41 ) と Chase と Shaw ( 42 ) に従って p - ニトロフェニール p ' - グアニディノベンゾエートで滴定した。TAP, TAP - ANV と ANV - KKT<sub>TFPI</sub> のXa因子に対する阻害活性はS2765のアミド分解によって分析した。10  $\mu$  l の DB - バッファー ( 10 mM トリス pH 7.5 - 0.15 M NaCl - 1 mg / ml BSA - 0.002 % Tween 20 - 0.02 % NaN<sub>3</sub> ) に溶解した50 nM ウシXa因子は、同バッファーで希釈した10  $\mu$  l の阻害因子と混合した。室温で30分インキュベートした後、10  $\mu$  l の反応混合液は96穴プレートにとり85  $\mu$  l の5 mM CaCl<sub>2</sub> を含むTBS - バッファー ( 50 mM トリス, pH 7.5 - 0.15 M NaCl - 0.02 % NaN<sub>3</sub> ) と混合した。405 nmの吸収の変化は、SPECTRAMax ( 登録商標 ) PLUS<sup>384</sup> ( Molecular Devices, Sunnyvale, CA ) マイクロプレート吸光計で、室温で60秒記録した。ブタトリプシンのストック溶液は、50 % グリセロール - 1 mM HCl - 20 mM CaCl<sub>2</sub> で調製し、-20度で貯蔵した。トリプシンに対する6 L15, ANV - 6 - L15, およびANV - K<sub>APP</sub> の阻害活性はS2444のアミド分解によって分析した。希釈したトリプシン溶液 ( 23 nM ) は、ストック溶液からTBS - 0.1 mg / ml BSA - 20 mM CaCl<sub>2</sub> を含むバッファーで新しく調製した。10  $\mu$  l のこのトリプシン溶液は、マイクロプレートのウェル中で10  $\mu$  l の同バッファーで希釈した阻害因子と混合した。室温で10分間インキュベートした後、この混合液に75  $\mu$  l のTBS - 20 mM CaCl<sub>2</sub> と5  $\mu$  l の10 mM S2444を添加し、405 nmの吸収の変化をマイクロプレート吸光計で、室温で2分記録した。両方の分析は、阻害因子存在下の部分的活性は、阻害因子を含まない場合のパーセンテージとして計算した。

#### 【 0035 】

血漿凝塊時間分析

ヒト血漿凝塊分析はACL200コアギュレーションアナライザー ( Instrumentation Laboratory, Lexington MA ) で行った。4人の供給者からの正常な血漿は一つに集め用いた。組織因子によって開始する血漿凝塊分析には、各々のサンプルは、100  $\mu$  l の一つに集めた血漿を、異なった濃度の阻害因子を溶解した同量のDB - バッファー ( 10 mM トリス, pH 7.4 - 0.15 M NaCl - 1 mg / ml BSA - 0.002 % NaN<sub>3</sub> ) と混合した。阻害因子の濃度は、最終の血漿バッファー混合液ではなく血漿中のみでナノモル ( nM ) として計算した。イノビン ( Innovin ( 登録商標 ) ) ( 合成リン脂質で再構成した遺伝子組み換えしたヒト組織因子 ) は分析のためPT - バッファー ( 75 mM NaCl - 12.5 mM CaCl<sub>2</sub> - 0.5 mg / ml BSA - 0.002 % NaN<sub>3</sub> ) で1 : 100に希釈した。活性化した部分トロンボプラスチン時間 ( APTT ) 分析には、各々のサンプルは180  $\mu$  l の血漿に20  $\mu$  l のDB - バッファーに溶解して異なった濃度の阻害因子を混合した。阻害因子の濃度は血漿 バッファー混合液の最終濃度として計算した。APTT - SP試薬 ( Instrumentation Laboratory ) は希釈せずに分析に用いた。

#### 【 0036 】

結果

遺伝子組み換えしたANVとANV : KPI融合蛋白の構築と発現

プラスミッドベクターは、遺伝子組み換えしたANVとそれを凝塊カスケード中の4つの重要な凝固酵素、つまりVIIa因子、IXa因子、Xa因子そしてXIa因子に対して特異的阻害活性のある様々なクーニッツ型蛋白分解酵素阻害因子と融合した蛋白質を

発現するように構築され用られた。図2は、3種の蛋白質の分子構造を図解的に描いている。ANVは、全長で変異なしの分子が大腸菌中に発現した。他のANV-KPI融合物では、蛋白再生中にクーニッツ領域中のシステインとダイスルフィド結合を形成するのを避けるためANVのCys<sup>315</sup>がAlaに変化した。TAP-ANVの融合蛋白質は、全体が382のアミノ酸から成り、Ala残基から始まり、続いてTAPのTyr<sup>1</sup>からIle<sup>60</sup>の60のアミノ酸、Gly-Serのダイペプチド、そしてANV(Cys<sup>315</sup>-to-Ala)の319のアミノ酸から成る。ANV-6L15融合蛋白質は、全体が378のアミノ酸から成り、最初のAlaから最後のアミノ酸(Asp)のANV(Cys<sup>315</sup>-to-Ala)の319のアミノ酸とそれに引き続くMet<sup>1</sup>からAla<sup>60</sup>の6L15の60のアミノ酸から成る。遺伝子編集や連結のためNsiI制限酵素部位を製作するには、融合蛋白質中の6L15の2番目のアミノ酸がAlaからHisに変化した。ANV-K<sub>APP</sub>融合蛋白質は全長が376のアミノ酸のポリペプチドである。N-末端は全長のANV(Cys<sup>315</sup>-to-Ala)で、C-末端はAsp<sup>1</sup>からIle<sup>57</sup>のK<sub>APP</sub>ポリペプチドの57のアミノ酸から成る。ANV-KK<sub>TFPI</sub>融合蛋白質は、長さが459のアミノ酸残基のポリペプチドである。この融合蛋白質のN-末端は全長のANV(Cys<sup>315</sup>-to-Ala)で、クーニッツ領域1と2を含むTFPI蛋白のMet<sup>22</sup>から始まりThr<sup>161</sup>で終わるの140のアミノ酸ポリペプチドと融合している。

#### 【0037】

ANVとANV:KPI融合蛋白質の精製

遺伝子組み換えしたANV, TAP-ANV, ANV-6L15とANV-KK<sub>TFPI</sub>は大腸菌の細胞中に発現した。SDS-PAGEで分析すると、本質的に大腸菌溶解液中のすべてのANV分子はCa<sup>++</sup>の存在下でPSを含むリポソームと結合できる。これは発現した蛋白質が活性型へと自発的にリフォールドしたことを示唆している。その他の大腸菌によって発現したANV:KPI融合物は、発現した蛋白のほとんどは封入体中に生じ、活性のある分子を得るためにはリフォールドすることが必要とされる。TFPIのために以前に発展したスルホン化リフォールド過程(34)を用いて、リフォールド中にトリプシン又はXa因子に対する阻害活性が増加することから明らかなように、ANV:KPI融合蛋白質をリフォールドすることができた。単一過程のリフォールド混合液のQ-セファロースクロマトグラフィーで高度の精製を達成できた、というのは期待した分子量を示す単一の主要バンドがSDS-PAGE分析で見られたからである。さらにCa<sup>++</sup>の存在下でPSを含むリポソームに結合し、引き続いてEDTAで溶出して、さらに精製を行った。遺伝子組み換えしたANV-K<sub>APP</sub>はメタノール資化性酵母の溶媒液中に活性型として発現され分泌される。活性のあるANV-K<sub>APP</sub>は、濃縮した培養液をCa<sup>++</sup>の存在下でPSを含むリポソームに結合しEDTAで溶出して精製した。最終的な精製産物のSDS-PAGE分析を図3に示した。非還元下では(図3A)一つの主要バンドがそれぞれの標品に見られた。ANV-KK<sub>TFPI</sub>(レーン2)とANV(レーン6)の両方は微量の二量体を含んでいた。還元下では(図3B)二量体は消え、融合蛋白質は少しゆっくりと移動した。これはおそらくダイスルフィド結合が開裂しクーニッツ領域が解けるからである。

#### 【0038】

精製した阻害因子とトリプシン又はXa因子との反応のストイキオメトリー

図4はトリプシン又はXa因子活性と精製した阻害因子による滴定を示す。ANV-KK<sub>TFPI</sub>, 以外は精製した融合阻害因子(ANV-6L15, TAP-ANV, and ANV-K<sub>APP</sub>)とクーニッツ阻害因子(6L15およびTAP)は、トリプシン又はXa因子をすべて明らかに1:1のストイキオメトリーで阻害する。これらの結果は、すべての精製した単一のクーニッツ領域を含む阻害因子は実質的に純粋で完全に活性があることを表示している。阻害因子と酵素がほとんど同モル濃度の時に見られるストイキオメトリーの1:1からの逸脱は、反応の親和性の違いを反映している。ANV-6L15, 6L15とANV-K<sub>APP</sub>のトリプシンに対する親和性(図4A, B, およびE)は

高く、TAP-ANVとTAPのXa因子との結合（図4C，およびD）は弱いようである。TAP-ANVとTAPのXa因子との親和性が低いという証拠は、基質とバッファーを分析液に添加するとアミド溶解活性が時間に依存してゆっくりと増加することからも推測できる。XaをANV-KK<sub>TFPI</sub>で滴定すると1：1のストイキオメトリーから逸脱する（図4F）。これはおそらくTFPI-K2のXaに対する弱い結合親和性（ $K_i = 90 \text{ nM}$ ）（43）による、したがって反応のストイキオメトリーは用いた実験条件下では測定できない。ほかの可能性は、精製したANV-KK<sub>TFPI</sub>は、不活性な間違っリフォールドした蛋白種を含んでいるのかもしれない。

#### 【0039】

組織因子によって開始した凝固時間の延長

10

TFが血液凝固の生理的な引きがねであることは、すでに確立している。それゆえ、種々の阻害因子の抗凝固効果を、TFによって開始した血漿凝塊分析で検査した。精製した阻害因子は、集めたヒト血漿にいろいろ異なった濃度で加え、血漿凝塊は希釈したトロンボプラスチン試薬（Dade Innovin（登録商標）の1：100希釈）を添加して開始した。イノピン（Innovin（登録商標））は遺伝子組み換えしたヒトTFを最適のリン脂質混合液で再構成した市販の調整品である。この分析試薬は、TFと陰イオンのリン脂質の両方を含むので、凝固カスケードの開始と増幅を起こす。そしてこの分析試薬は、活性化したTFを表面に発現した細胞／小粒子と血小板の存在下での血漿凝塊をまね単純化したシステムである。対照としてバッファーを加えた場合、集めた血漿の凝塊時間は40.7秒であった。阻害因子の濃度を増加しながら加えると、凝塊時間は漸進的に長くなる。凝塊時間を1.5倍（つまり、40.7秒から61.1秒へ）長引かせる阻害因子の濃度は、濃度凝塊時間の曲線から決定できる。表1は、種々の阻害因子の凝塊時間を1.5倍長引かせるのに必要な濃度とその相対的効力の評価を表している。TFPIは血液で組織因子による凝固経路の最も重要な生理的規制因子であり、哺乳類細胞由来のTFPIが最も前者をまねるのであろうから、比較のための対照基準として遺伝子組み換えによって得たC127FL-TFPIを選択した。おそらくプロトロンビナーゼを標的としているTAP-ANVはC127FL-TFPIと比べて86倍強力である。TF/VIIaを阻害するようにデザインしたANV-6L15はC127FL-TFPIより12倍強力である。ANV-K<sub>APP</sub>（たぶんTF/VIIa，XIa，VIIa/IXaとVa/Xaを標的としている）、ANV-KK<sub>TFPI</sub>（おそらくTF/VIIaとVa/Xaを阻害している）およびX-K1<sub>TFPI</sub>ハイブリッド（TF/VIIaを阻害していると思われる）はC127FL-TFPIより6-7倍強力である。大腸菌由来の多糖化していないTFPIおよびANVはC127FL-TFPIより2-3倍強力である。TAPはC127FL-TFPIと同じ効力を示す。クーニッツ型阻害因子のみでは、C127FL-TFPI、TFPI1-160および6-L15で例示されるように、各々、C127FL-TFPIより19倍、40倍および86倍活性が少ない。

20

30

#### 【0040】

種々の阻害因子のAPTTに対する効果

いろいろな阻害因子の抗凝固効果は活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）分析でも検査した。APTTは内在的な経路の活性を測定する。いろいろな阻害因子のAPTTを長引かせる効果が図5に示してある。比較の目的で、ANVを対照基準として選んだ。最も強力な分子、TAP-ANVはANVよりおよそ一桁強力である。この効果は、おそらくプロトロンビナーゼの阻害によって生じる。ANV-K<sub>APP</sub>（たぶんXIa，VIIa/IXa，とVa/Xaを阻害している）、ANV-KK<sub>TFPI</sub>（たぶんVa/Xaを阻害する）およびANV-6L15（たぶん、カリクレインおよびXIaを阻害している）はANVよりも数倍強力である。クーニッツ阻害剤単独（6L15、TAPおよびTFPI1-160）ではAPTTを長引かせる効果が極めて弱い。興味深いことに、多糖化されている哺乳類C127FL-TFPIは多糖化していない大腸菌由来のTFPIの強さと略同じ大きさであり（図5）、その強さも組織誘発の凝固の効力と比べて逆転されている（表1）。これらの結果は哺乳動物と大腸菌由来のTFPIの間で有意な

40

50

違いのあることを示唆するものである。

【0041】

【表1】

表1：

ヒト血漿中の組織因子によって開始した凝固時間に対する種々の阻害因子の効果

阻害因子	<sup>a</sup> [阻害因子] <sub>1.5×CT</sub> , (nM)	<sup>b</sup> 相対的効力
TAP-ANV	0.80	86
ANV-6L15	6.0	12
ANV-K <sub>APP</sub>	9.4	7.3
X-K1 <sub>TFPI</sub>	10	6.9
ANV-KK <sub>TFPI22-1</sub>	11	6.3
<sup>60</sup> E. coli ala -TFPI	19	3.6
ANV	29	2.4
TAP	68	1
C127FL-TFPI	69	1
<sup>c</sup> C127CT-TFPI	1300	0.053
E. coli TFP I1-160	2750	0.025
6L15	5900	0.012

<sup>a</sup> [阻害因子] <sub>1.5×CT</sub>は、コントロールと比較して組織因子によって開始した凝固時間を1.5倍延長（40.7秒から61.1秒へ）できる阻害因子の濃度で、その濃度は各々の阻害因子の濃度に依存した凝固時間の曲線から測定して求めた

<sup>b</sup> 相対的効力は哺乳類C127FL-TFPIを基準として（C127FL-TFPIの濃度を1として）使い、[阻害因子] <sub>1.5×CT</sub> から計算した

<sup>c</sup> C127FL-TFPIは全長分子をさし、CT-TFPIは以前に記述した（33）ようにカルボキシル末端を切断した分子をさす。

【0042】

本発明者は理論によって制限されているわけではないが、前記の結果は、次のように説明し発展できると信じる。

表在性テナーゼ（TF/VIIa）、内在性テナーゼ（VIIa/IXa）、プロトロンビナーゼ（Va/Xa）とXIIa酵素複合体の陰イオン化した膜表面での形成は、組織因子による凝固経路の開始と増幅が生じるために重要な過程である。TFPIは凝固の開始の基本的生理的規制因子である。TFPIはTF/VIIa複合体そのものを直接阻害するわけではない、しかしその代わり、4種の分子から成る不活性なTFPI/Xa/TF/VIIa複合体を形成する前にXa因子の生成を待たなければならない（17）。Xa因子の生成はプロトロンビナーゼ（Va/Xa）の形成に至り、一度形成されるとプロトロンビナーゼは生理的な濃度のTFPIによる不活性化から保護されている（44、45）。この過程の間、いくらかの内在性テナーゼ（VIIa/IXa）も生じ、これはTFPIによって阻害されない。この結果、TFPIは、組織因子経路をどちらかと言うと“水もれしたように”弱く規制する。1:100希釈した市販のトロンボプラスチン試薬を用いたin vitroの凝塊分析では、凝塊時間をたった1.5倍引き延ばすのに69nMの哺乳類細胞由来の全長のTFPIを必要とする（表1）。in vivoの血栓モデルでは、効果は高濃度のTFPI（100-200nM）が循環血液か、局部的に存在する時のみに見られる（18, 19, 46）。これらの治療的なTFPI投与量は、正常な血漿中の量の約100-200倍である。この明らかに低い効力と希望する血液



中量に達するために必要な多量の投与量の注入は、TFPIを治療法に応用するにはあまり理想的ではない。そこで、組織因子による凝固経路をもっとうまく規制できる別の分子が高度に要求される。ここに製造されたANV:KPI融合蛋白質は、TFが開始した凝固をTFPIよりもはるかに効果的に阻害し、治療的抗凝固剤としてTFPIよりその他にも有用性を発揮する。

#### 【0043】

凝固カスケード反応は、凝固複合体の集合をうながし触媒の効率を高めるPSを露出した膜表面に局在する。この現在の研究は、PSを露出した膜表面に自身を向けることのできる酵素阻害剤は、凝固複合体の阻害において血栓生成促進部位に特異的で、より効果的であると仮説をたてた。この仮説を検査するため、遺伝子組み換えのDNAテクノロジーを用いて、共通のANV領域を共有し、異なるKPI領域(TAP, 6L15, KAPP, およびKKTFPI)と連結した4種の融合蛋白質が作成された。ANV部分はPSを含む膜に対して高い親和性を示す( $K_d < 0.1 \text{ nM}$ ) (32)。この研究のために選択した4種のKPIsは、様々の凝固セリン蛋白分解酵素に対して次のような阻害定数( $K_i$ )を示す; TAP(Xaに対して $0.18 \text{ nM}$ ) (22); 6L15(TF/VIIaに対して $0.2 \text{ nM}$ , 血漿カリクレインに対して $0.02 \text{ nM}$ そしてXIaに対して $13 \text{ nM}$ ) (30, 31); KAPP(TF<sub>219</sub>/VIIaに対して $68 \text{ nM}$ ; Xaに対して $13 \text{ nM}$ ; IXaに対して $190 \text{ nM}$ ; そしてXIaに対して $0.01 \text{ nM}$ ) (24-27); およびKKTFPI(Xaに対して $90 \text{ nM}$ そしてTF/VIIaに対して $240 \text{ nM}$ ) (43)。これらのKPIの特異性に基づいて、融合蛋白質は、次のように選択的に種々の膜結合性の凝固酵素複合体を標的とすると推定される; TAP-ANVはVa/Xaへ; 6L15-ANVはTF/VIIa, kallikreinとXIaへ; KAPPはXIa, Va/Xa, TF/VIIa, とVIIa/IXaへ; そしてANV-KKTFPIはVa/XaとTF/VIIaへ。in vitroの凝塊分析では、凝塊時間を延長するためには、KPIはすべて血漿中にかなり高濃度を必要とする(30, 47, 表1と図5)。4種のすべてのANV:KPI融合蛋白質は、対照的にその構成物のANVとKPIに比べて非常に減少した濃度で血漿凝塊の時間を延長する(表1と図5)。TFによって誘導した血漿凝塊とAPTの両方の分析で、最も有効な融合蛋白はTAP-ANVである。TAPはXa因子に対して高度に特異的阻害因子であるので、この分子はプロトロンビナーゼを阻害する。この結果は、凝固カスケードの中で、Xa因子とプロトロンビナーゼの生成が速度を制御するステップであるという発見(3)と一致する。6L15は、TF/VIIaと高親和性の結合( $K_i 0.2 \text{ nM}$ )をするにもかかわらず(30)、TFが開始した血漿凝塊には非常に弱い阻害剤である(表1)ということは意味が深い。このように、TF/VIIaと高親和性の結合をするだけでは、TFが開始した血漿凝塊カスケードを阻害する効果とは相関関係はない。反対に、ANV-6L15融合阻害因子はTFが開始した凝塊を6L15に比べて約3桁(1000倍)強力に阻害し、PSに結合すると6L15によるTF/VIIaの阻害を大いに促進することを示している。ここに製造した4種のANV:KPI融合分子は、TFによって開始した血漿凝塊とAPT分析で評価すると、皆ANV, KPIsとTFPIよりもはるかに高い抗凝固活性を示す。このようにこれらの分子は、自然の抗凝固剤の活性よりも優秀な抗凝血効果を持っている。

#### 【0044】

In vivo動物研究ではANVは血小板を含む血栓を標的として特異的に集まることが表示された(48)。さらに、ANVは血管傷害の部位に選択的に集まり、動脈や静脈の血栓モデルでは投与量に依存して血栓形成を阻害する(38, 49, 50)。ここに記述したANV:KPIの融合蛋白質の重要な特性は、ANV部分の存在がPSと特異的に高親和性の結合をする性質を与えることである。このように、これらの分子は、PSが凝固複合体の集合のために利用できるようになった血栓形成の場所に自身を向ける内在的な性質を持つ。これらの分子の血栓形成部位を標的とするこの能力のおかげで、これらの抗凝固剤を全身の循環系に高レベルで保つことなく抗血栓効果を達成できる、それゆえ、

全身的出血の副作用の危険を最小に保てる。

【0045】

ここに用いた“薬理的に受諾できる”という用語は、病気や状態の治療のため被験者に投与する薬品調合品を、製品化するため通常用いられる担体、賦形剤又はその他の添加物の特徴をさす。

ここに用いた“被験者”という用語は過剰の血栓活動があるか又は疑われるヒトと動物の両方をさす。

ここに用いた“効果的”と“治療的に効果的”という用語は、治療製剤又は調合品の特徴を言い表す；それは、被験者に投与したとき、その用量が、被験者中に治療されている病気や状態を、予防、阻害、減少又は除去するという目標を一つ又はそれ以上達成できることをさす。この現在の申請を考慮して、ここに供給した方法や材料によって治療する病気や状態とは、過剰の血栓形成を伴う病気や状態である。そのような病気や状態は、例えば、不安定性アンギナ、心筋梗塞症、突然心臓死、虚血性卒中、破裂性動脈瘤、間欠性は行症、重症虚血肢(critical limb ischemia)、深静脈性血栓症(DVT)、肺動脈塞栓症、血栓性静脈、慢性静脈不全症、手術性血栓症、人工心臓弁、動脈硬化、再狭窄症(restenosis)、虚血再灌流傷害(ischemic reperfusion injury)、敗血症、伝染性血管内凝固、急性肺傷害、悪性腫瘍、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、半月形糸球体腎炎、糖尿病、鎌状赤血球貧血(sickle cell anemia)、地中海貧血(thalassemia)、抗リン脂質抗体症候群(antiphospholipid syndrome)、体外循環(extra-corporeal circulation)、血液透析、腹腔透析や、アネキシンの合成や機能の欠陥によって生じる病理的状态(annexinopathies)を含む。

ここに用いた“投与”と“治療”という用語は、すべての過程、行動、応用、療法又は同様の事柄を言い表す、それは、被験者が、ことにヒトの場合、被験者の状態を直接的又は間接的に改善することを目的として医学的援助を受けることをさす。

ここに用いた“治療的調合品”は、血栓形成に関連した病気や状態の予防や治療に有用な混合物をさす。

【0046】

ここに表示したように、この一連の遺伝子組み換えによる蛋白質は大腸菌と酵母によって生産できる。大腸菌システムでは、この蛋白質は非常に高レベルに封入体中に発現する、そして活性のある分子は、簡単なリフォールドと精製方法によって得られる。酵母システムではこの蛋白質は培養液中に活性型で分泌され、同様の簡単な方法で精製できる。製造の見地からみて、生産が容易で低コストであることは大きな利点である。しかし、例えば Sambrook, らによる Molecular Cloning - - A Laboratory Manual, Second Edition, (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) に記述されたような、よく知られた一般的な分子生物学の手順に従って他の有核細胞や前核細胞の細胞株が使えることが予想される。

【0047】

この現在の研究に基づいて、同様の概念に基づくデザインの他の融合分子が創造できると思われる。例えば複数のANV領域やKPI領域から構成される融合蛋白質、ANVと他の凝固因子に対する自然の阻害因子、例えばアンチスタシン(Antistasin)、エコチン(ecotin)(51)、Ancylostoma caninum抗凝血ペプチドとの融合物、ANVとKPIsの同類体や変種との融合物、ANVとVIIa, IXa, Xa, とXIa因子に対する低分子阻害剤との融合物である。その他の変化として、他のアネキシン類や、ラカドヘリン(lac adherin)(52)、V因子、VII因子やフォスホリパーゼA<sub>2</sub>のリン脂質結合部分のような他のPS結合蛋白質をANVの代わりに用いて融合分子を創造することができる。その上の例として、ディスインテグリン(disintegrin)領域をANVかANV-KPIsに連結し、血栓

が生じている部位で凝固反応と血小板凝集の両方を阻害する融合分子を創造できる。

この現在の告知を読んだ後、分子生物学の技術のある者にとって明らかであるようなすべて他の例は、本発明の範囲内に含まれる。

#### 【 0 0 4 8 】

要約すると、ここに新しく発展した A N V : K P I 融合蛋白質は次の特徴を持った血栓形成部位を標的とした新しいクラスの抗凝固剤を代表している：( a ) これらは T F / V I I a , 内在性テナーゼ ( V I I I a / I X a ) , プロトロンビナーゼ ( V a / X a ) と P S を露出した血栓を形成する膜に結合した X I a を標的とするようデザインされた；( b ) これらは T F が開始した凝固の自然の凝固開始阻害因子である T F P I より 6 - 8 6 倍高い抗凝固効力を持つ；( c ) 生産は容易で低コスト、なぜなら完全に活性のある分子は、微生物システムで生産でき、P S を含むリボソームに簡単に  $Ca^{++}$  に依存して結合し、続いて  $Ca^{++}$  キレート溶液で溶出して精製できる；そして( d ) P S を露出した膜とそれに結合した凝固複合体は、血管病変部位での重要な血栓形成の刺激なので、A N V : K P I s は、血栓を作り出す血管壁とそれに連結した血栓を、局部的に不活化することのできる有効な抗血栓薬である可能性がある。

#### 【 0 0 4 9 】

##### 参照

1. Morrissey JH. Tissue factor;An enzyme cofactor and a true receptor. Thromb Haemost2001;86;66-74.
2. Rand MD,Lock JB,van't Veer C,Gaffney DP,Mann KG. Blood clotting in minimally altered whole blood. Blood1996;88;3432-45.
3. Mann KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation. Thromb Haemost1999;82;165-74.
4. Hoffman M,Monroe DM,Oliver JA,Roberts HR. Factors IXa andXa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. Blood1995;86:1794-801.
5. Monroe DM,Hoffman M,Allen GA,Roberts HR. The factor VII-platelet interplay;effectiveness of recombinant factor VIIa in the treatment of bleeding in severe thrombocytopathia. Sem Thromb Haemost2000;26;373-7.
6. Sims PJ,Wiedmer T. Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. Thromb Haemost2001;86;266-75.
7. Zwaal RFA,Comfurius P,Bevers EM. Lipid-protein interactions in blood coagulation. Biochim Biophys Acta1998;1376;433-53.
8. Zwaal RFA,Schroit AJ. Pathophysiological implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. Blood1997;89;1121-32.
9. Dachary-Prigent J,Toti F,Satta N,Pasquet J-M,Uzan A,Freyssinet J-M. Physiological significance of catalytic phospholipids in the generation of thrombin. Sem Thromb Hemost1996;22;157-64.
10. Bach R,Rifkin DB. Expression of tissue factor procoagulant activity;Regulation by cytosolic calcium. Proc Natl Acad Sci USA1990;87;6995-9.
11. Le DT,Rapaport SI,Rao LVM. Studies of the mechanism for enhanced cell surface factor VIIa/tissue factor activation of factor X on fibroblast monolayers after their exposure to N-ethylmaleimide. Thromb Haemost1994;72;848-55.
12. Hansen CB,van Deurs B,Petersen LC,Rao LVM. Discordant expression of tissue factor and its activity in polarized epithelial cells. Asymmetry in anionic phospholipid availability as a possible explanation. Blood1999;94;1657-64.
13. Greeno EW,Bach R,Moldow CF. Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity. Lab Invest1996;75;281-9.
14. Bombeli T,Karsan A,Tait JF,Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. Blood1997;89;2429-42.

15. Krishnaswamy S, Field KA, Edgington TS, Morrissey JH, Mann KG. Role of the membrane surface in the activation of human coagulation factor X. *J Biol Chem* 1992; 267:26110-20.
16. Bevers EM, Comfurius P, VanRijn JLM, Hemker HC, Zwaal RFA. Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. *Eur J Biochem* 1982; 122:429-36.
17. Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. *Blood Coagul Fibrinol* 1995; 6:7-13.
- Haskel EJ, Torr SR, Day KC, Palmier MO, Wun TC, Sobel BE, Abendschein DR. Prevention of arterial reocclusion after thrombolysis with recombinant lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Circulation* 1991; 84:821-7. 10
18. Jang Y, Guzman LA, Linkoff AM, Gottsauer-Wolf M, Forudi F, Hart CE, Courtman DW, Ezbani M, Ellis SG, Topol EJ. Influence of blockade at specific levels of the coagulation cascade on restenosis in a rabbit atherosclerotic femoral artery injury model. *Circulation* 1995; 92:3041-50.
19. Girard TJ. Tissue factor pathway inhibitor. In Sasahara AA, Loscalzo J (eds); *New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis*. New York, Marcel Dekker, 1997, p225.
20. Tuszyński GP, Gasic TB, Gasic GJ. Isolation and characterization of antistasin. *J Biol Chem* 1987; 262:9718-23. 20
21. Waxman L, Smith DE, Arcuri KE, Vlasuk GP. Tick anticoagulant peptide is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science* 1990; 248:593-6.
22. Stassen P, Bergum PW, Gansemans Y, Jespers L, Laroche Y, Huang S, Maki S, Messens J, Lauwereys M, Cappello M, Hotez PJ, Lasters I, Vlasuk GP. Anticoagulant repertoire of the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:2149-54.
23. Mahdi F, Rehmtulla A, Wan Nostrand WE, Bajaj SP, Schmaier AH. Protease nexin-2/amyloid-protein precursor regulates factor VIIa and the factor VIIa-tissue factor complex. *Thromb Res* 2000; 99:267-76.
24. Schmaier AH, Dahl LD, Hasan AAK, Cines DB, Bauer KA, Van Nostrand WE. Factor IXa inhibition by protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor on phospholipid vesicles and cell membranes. *Biochemistry* 1995; 34:1171-8. 30
25. Mahdi F, Van Nostrand WE, Schmaier AH. Protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor inhibits factor Xa in the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 1995; 270:23468-74.
26. Smith RP, Higuchi DA, Broze GJ Jr. Platelet coagulation factor XIa inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science* 1990; 248:1126-8.
27. Dennis MS, Lazarus RA. Kunitz domain inhibitors of tissue factor-factor VIIa. I. Potent inhibitors selected from libraries by phage display. *J Biol Chem* 1994; 269:22129-36.
28. Dennis MS, Lazarus RA. Kunitz domain inhibitors of tissue factor-factor VIIa. II. Potent and specific inhibitors by competitive phage selection. *J Biol Chem* 1994; 269:22137-44. 40
29. Stassen JM, Lambeir AM, Matthyssens G, Ripka WC, Nystrom A, Sixma JJ, Vermeylen J. Characterization of a novel series of aprotinin-derived anticoagulants. I. In vitro and pharmacological properties. *Thromb Haemost* 1995; 74:646-54.
30. Stassen JM, Lambeir AM, Vreys I, Deckmyn H, Matthyssens G, Nystrom A, Vermeylen J. Characterization of a novel series of aprotinin-derived anticoagulants. II. Comparative antithrombotic effects on primary thrombus formation in vivo. *Thromb Haemost* 1995; 74:655-59.
31. Reutelingsperger CPM, van Heerde WL. Annexin V, the regulator of phosphatidyl 50

serine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol Life Sci*1997;53;527-32.

32. Wun TC,Kretzmer KK,Palmier MO,Day KC,Huang MD,Welsch DJ,Lewis C,Wolfe RA,Zobel JF,Lange GW,Frazier RB,Bild GS,Peel MA,Shell RE,Horn NA,Junger KD,Foy BA,Gustafson ME,Leimgruber RM,Novotney WF,Broze GJ Jr. Pyla YE,Hippenmeyer PJ,Warren TG. Comparison of recombinant tissue factor pathway inhibitors expressed in human SK hepatoma,mouse C127,baby hamster kidney,and Chinese hamster ovary cells. *Thromb Haemost*1992;68;54-9.

33. Diaz-Collier JA,Palmier MO,Kretzmer KK,Bishop BF,Combs RG,Obukowiczmg,Frazier RB,Bild GS,Joy WD,Hill SR,Duffin KL,Gustafson ME,Junger KD,Grabner RW,Galluppi GR,Wun TC. Refold and characterization of recombinant tissue factor pathway inhibitor expressed in *E. coli*. *Thromb Haemost*1994;71;339-46.

34. Girard TJ,MacPhail LA,Likert KM,Novotny WF,Miletich JP,Broze GJ Jr. Inhibition of factor VIIa-tissue factor coagulation activity by a hybrid protein. *Science*1990;248;1421-4.

35. Neeper MP,Waxman L,Smith DE,Schulman CA,Sardana M,Ellis RW,Schaffer LW,Siegl PKS,Vlasuk GP. Characterization of recombinant tick anticoagulant peptide;A highly selective inhibitor of blood coagulation factorXa. *J Biol Chem*1990;265;17746-52.

36. Scorer CA,Clare JJ,McCombie WR,Romanos MA,and Sreekrishna K. Rapid selection using G418of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Biotechnology*1994;12;181-4.

37. Thiagarajan P,Benedict CR. Inhibition of arterial thrombosis by recombinant annexin V in a rabbit carotid artery injury model. *Circulation*1997;96;2339-47.

38. Kinsky SC. Preparation of liposomes and a spectrometric assay for release of trapped glucose marker. *Methods Enzymol.*1974;32;501-514.

39. Gill SC,von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*1989;182;319-26.

40. Smith RL. Titration of activated bovine factor X. *J Biol Chem*1973;248;2418-23.

41. Chase T Jr,Shaw E. Titration of trypsin,plasmin,and thrombin with p-nitrophenyl p'-guanidinobenzoate HCl. *Methods Enzymol*1970;19;20-7.

42. Petersen LC,Bjorn SE,Olsen OH,Nordfang O,Norris F,Norris K. Inhibitory properties of separate recombinant Kunitz-type-protease-inhibitor domains from tissue factor pathway inhibitor. *Eur J Biochem*1996;235,310-6.

43. Mast A,Broze GJ Jr. Physiological concentrations of tissue factor pathway inhibitor do not inhibit prothrombinase. *Blood*1996;87;1845-50.

44. Franssen J,Salemink I,Willems GM,Wun TC,Hemker C,Lindhout T. Prothrombinase is protected from inactivation by tissue factor pathway inhibitor;competition between prothrombin and inhibitor. *Biochem J*1997;323;33-7.

45. Ozbeck MR,Brown DM,Deune EG,Lantieri LA,Kania NM,Pasia EN,Cooley BC,Wun T-C,Khoury RK. Topical tissue factor pathway inhibitor improves free flap survival in a model simulating free flap errors. *J Reconstr Microsurg*1995;11;185-188.

46. Schmaier AH,Dahl LD,Rozemuller AJM,Roos RAC,Wagner SL,Chung R,Van Nostrand WE. Protease Nexin-2/Amyloid protein precursor. A tight-binding inhibitor of coagulation factor IXa. *J Clin Invest*1993;2540-5.

47. Tait JF,Cerqueira MD,Dewhurst TA,Fujikawa K,Ritchie JL,Stratton JR. Evaluation of annexin V as a platelet-directed thrombus targeting agent. *Thromb Res*1994;75;491-501.

48. Romisch J,Seiffge D,Reiner G,Paques EP,Heimbürger N. In vivo antithrombotic

10

20

30

40

50

potency of placenta protein4(annexin V). Thromb Res1991;61;93-104.

49. Van Ryn McKenna J, Merk H, Muller TH, Buchanan MR, Eisert WG. The effect of heparin and annexin V on fibrin accretion after injury in the jugular vein of rabbit. Thromb Haemost1993;69;227-30.

50. McGrath ME, Gillmor SA, Fletterick RJ. Ecotin; lessons on survival in a protease-filled world. Protein Sci1995;4:141-8.

51. Shi J, Gilbert GE. Lactadherin inhibits enzyme complexes of blood coagulation by competing for phospholipid-binding sites. Blood2003;101:2628-36.

#### 【図面の簡単な説明】

【0050】

10

【図1】TFが開始する血液凝固の図解 VⅢ因子はTFと結合し、TFを発現している細胞/小粒子上で活性化されVⅢaとなる。TF/VⅢa複合体はⅩ因子とⅩ因子の両方とも活性化する。活性化したⅩa因子は局部的に少量のトロンビン(Ⅱa)を生産する。この少量のトロンビンは血小板を活性化し、V因子を活性化し、フォンビルブランド(von Willebrand)因子からVⅢⅢ因子を切り離して活性化し、そしてⅩⅢ因子を活性化する。TF/VⅢaによって活性化されたⅩaは、それから活性化した血小板上のVⅢⅢaと結合し、Ⅹ因子を効果的に活性化する内在性テナーゼ(VⅢⅢa/Ⅹa)を形成する。血小板が生産したⅩaはVaと結合し、大規模なプロトロンビン(Ⅱ)からトロンビンへの変換を推進するプロトロンビナーゼ(Va/Ⅹa)を形成する。3種の抗凝血系が凝血カスケードを規制している：TFPIはⅩaを阻害しⅩaに依存したTF/VⅢaのフィードバック制御をおこす；ATⅢはおもにⅩaとトロンビンを阻害する；APCは蛋白分解によってVaとVⅢⅢaを不活化する。Robertsonら(5)とMann Kら(3)の論文より抜粋。

20

【図2】アネキシンVとそれの種々のクーニッツ型阻害因子との融合産物 ANV, アネキシンV(SEQ ID NO:10); TAP-ANV(SEQ ID NO:1), ala-ダニ抗凝血ペプチドをGly-SerジペプチドでアネキシンVと結合したもの；ANV-6L15(SEQ ID NO:2), アネキシンVと6L15(TF/VⅢⅢaに対して高親和性を持つクーニッツ型阻害因子)を結合したもの；ANV-K<sub>APP</sub>(SEQ ID NO:3), アネキシンVとK<sub>APP</sub>(アミロイド 蛋白質前駆体のクーニッツ抑制部位)を結合したもの；ANV-KK<sub>TFPI22-160</sub>(SEQ ID NO:4)、アネキシンVとKK<sub>TFPI</sub>(クーニッツ部位1とクーニッツ部位2を含むTFPI<sub>22-161</sub>ペプチド)を結合したもの。

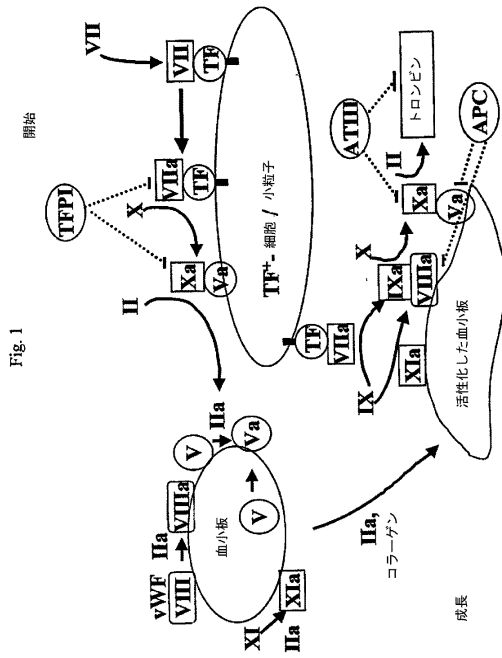
30

【図3】種々の精製した阻害因子によるブタトリプシンとウシⅩa因子の阻害 トリプシンとウシⅩa因子の阻害を、以下の方法に描写したアミド分解(amidolytic)分析によって測定した。活性のあるトリプシンとウシⅩa因子の濃度は4-ニトロフェニールp-グアニディノベンゾエートで活性部位の滴定をして測定した(41, 42)。精製した阻害因子の濃度は、280nmの吸収からモル吸光係数を使って測定した。モル吸光係数はそれぞれ28170(ANV-6L15)、7120(6L15)、39550(TAP-ANV)、18500(TAP)、31300(ANV-K<sub>APP</sub>)、と30170(ANV-KK<sub>TFPI</sub>)である。(A)ANV-6L15によるトリプシンの阻害；(B)6L15によるトリプシンの阻害；(C)TAP-ANVによるⅩa因子の阻害；(D)TAPによるⅩa因子の阻害；(E)ANV-K<sub>APP</sub>によるトリプシンの阻害；(F)ANV-KK<sub>TFPI</sub>によるⅩa因子の阻害。

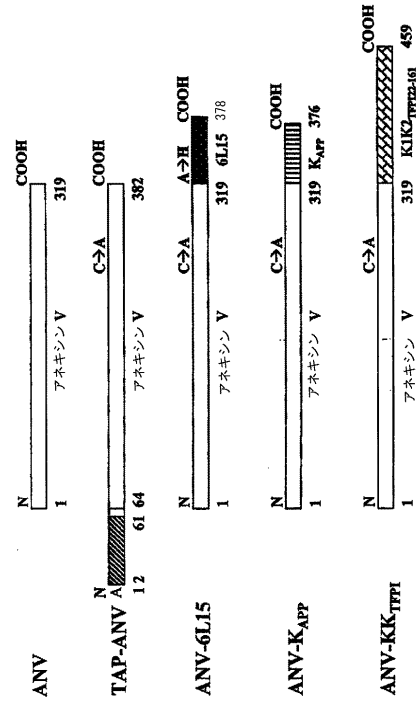
40

【図4】活性化した部分的トロンボプラスチン時間(APTT)分析における種々の阻害因子の効果 APTT分析はACL-200コアギュロメーターとAPTT-SP試薬(Instrument Laboratories)を用いて行った。集めたヒト血漿は、180μlづつ20μlのいろいろな阻害因子と混合し表記した最終濃度を得て分析した。コントロールの緩衝液を混ぜた血漿は、凝塊時間は40.7秒であった。TFPI(m)は哺乳類C127細胞から由来した全長のTFPIをさす。

【図 1】

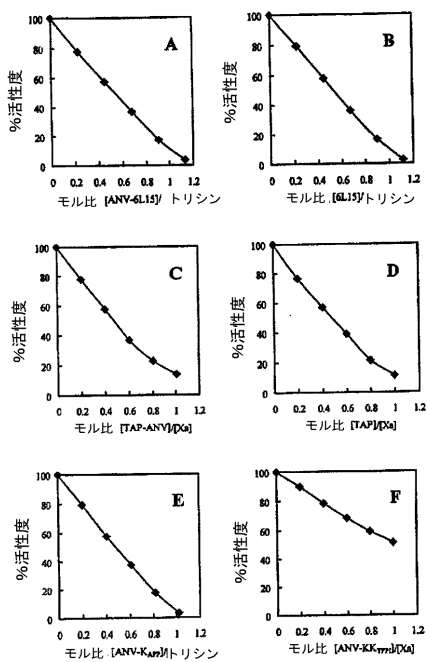


【図 2】



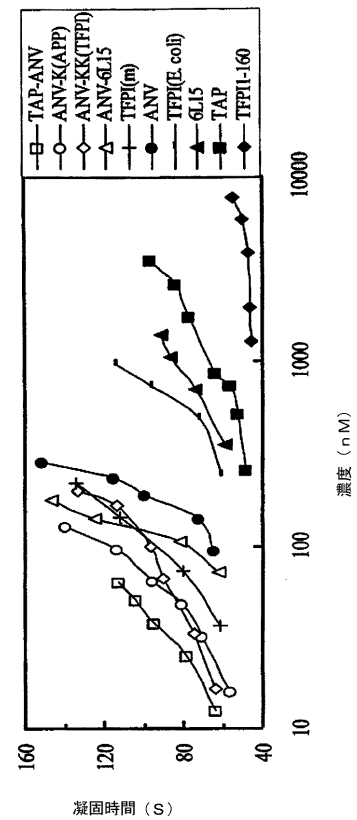
【図 3】

Fig. 4



【図 4】

Fig. 5



【配列表】

0004444821000001.app



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K 14/435 (2006.01)		C 0 7 K 14/435	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)		C 0 7 K 19/00	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)		C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 P 7/02 (2006.01)		A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)		A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)		A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 38/55 (2006.01)		A 6 1 K 37/64	

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(72)発明者 ツェ・チェイン・ウン

アメリカ合衆国 6 3 0 2 1 - 3 0 2 0 ミズーリ州ボールウィン、ハントレー・ハイツ・ドライブ 6  
1 3 番

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 欧州特許第 0 0 9 6 5 5 9 7 ( E P , B 1 )

"DNA sequence (gaa) for vascular anticoagulating protein.", Accession No. A01769, A017  
69.1, [online], National Center for Biotechnology Information, 1993年11月2日掲載, 2009  
年3月30日検索, インターネット, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/410787?ordinalpos=](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/410787?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence_ResultsPanel.Sequence_RVDocSum)  
[1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence\\_ResultsPanel.Sequence\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/410787?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence_ResultsPanel.Sequence_RVDocSum)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90

C07K 14/00-14/825

PubMed

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq