

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5485873号
(P5485873)

(45) 発行日 平成26年5月7日(2014.5.7)

(24) 登録日 平成26年2月28日(2014.2.28)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	9/64	(2006.01)	C 1 2 N	9/64	Z N A Z
C O 7 K	1/18	(2006.01)	C O 7 K	1/18	
C O 7 K	1/20	(2006.01)	C O 7 K	1/20	
C O 7 K	1/22	(2006.01)	C O 7 K	1/22	

請求項の数 12 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2010-508741 (P2010-508741)
(86) (22) 出願日	平成20年5月21日 (2008.5.21)
(65) 公表番号	特表2010-527596 (P2010-527596A)
(43) 公表日	平成22年8月19日 (2010.8.19)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/004090
(87) 国際公開番号	W02008/141824
(87) 国際公開日	平成20年11月27日 (2008.11.27)
審査請求日	平成23年2月17日 (2011.2.17)
(31) 優先権主張番号	60/931, 301
(32) 優先日	平成19年5月22日 (2007.5.22)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	591013229
	バクスター・インターナショナル・インコーポレイテッド
	BAXTER INTERNATIONAL
	L INCORPORATED
	アメリカ合衆国 60015 イリノイ州
	、ディアフィールド、ワン・バクスター・
	パークウェイ (番地なし)

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトフェーリンのための予備的な精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タンパク質溶液からフェーリンポリペプチド又はフェーリンポリペプチド誘導体を精製する方法であって、以下：

(a) 該フェーリンポリペプチド又は該フェーリンポリペプチド誘導体を、pH 6.0でフェーリンポリペプチド又はフェーリンポリペプチド誘導体を結合可能である混合陽イオン交換/疎水性相互作用樹脂に結合させるステップ、

(b) 溶出によって該樹脂から該フェーリンポリペプチド又は該フェーリンポリペプチドフェーリン誘導体を回収するステップを含む、方法。

【請求項 2】

前記混合陽イオン交換/疎水性相互作用樹脂が Capt o (商標) MMC (GE Healthcare、Freiburg、Germany)であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記フェーリンポリペプチド誘導体が切断型フェーリンポリペプチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記切断型フェーリンポリペプチドが、配列番号 1 にしたがうフェーリンポリペプチドである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

10

20

前記溶出が段階溶出である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記フューリンポリペプチド、又は前記フューリンポリペプチド誘導体が、10 mM 酢酸ナトリウム、1 mM CaCl_2 pH 6.0 中で前記混合陽イオン交換 / 疎水性相互作用樹脂に結合し、30 mM 塩化ナトリウム、10 mM 酢酸ナトリウム、1 mM CaCl_2 pH 6.0 で洗浄され、230 mM 塩化ナトリウム、10 mM 酢酸ナトリウム、1 mM CaCl_2 pH 6.0 で溶出される、請求項 1 ~ 3 および 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記フューリンポリペプチド、又は前記フューリンポリペプチド誘導体が、50 mM H e p e s、1 mM CaCl_2 pH 6.0 中で前記混合陽イオン交換 / 疎水性相互作用樹脂に結合し、30 mM 塩化ナトリウム、50 mM H e p e s、1 mM CaCl_2 pH 6.0 で洗浄され、230 mM 塩化ナトリウム、50 mM H e p e s、1 mM CaCl_2 pH 6.0 で溶出される、請求項 1 ~ 3 および 5 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記溶出が勾配溶出である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記勾配溶出における勾配が 10 mM 酢酸ナトリウム、1 mM CaCl_2 pH 6.0 中の 0 ~ 500 mM NaCl であることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

20

【請求項 10】

フューリンポリペプチド又はフューリンポリペプチド誘導体を回収する方法であって、以下：

(a) 該フューリンポリペプチド又は該フューリンポリペプチド誘導体を、混合陽イオン交換 / 疎水性相互作用樹脂に結合させるステップ、

(b) 該混合陽イオン交換 / 疎水性相互作用樹脂から該フューリンポリペプチド又は該フューリンポリペプチド誘導体を溶出させるステップ、

(c) 溶出された該フューリンポリペプチド又は該フューリンポリペプチド誘導体を A r g i n i n e - S e p h a r o s e 樹脂に結合させるステップ、および

(d) 該 A r g i n i n e - S e p h a r o s e 樹脂から該フューリンポリペプチド又は該フューリンポリペプチド誘導体を溶出させるステップを含む、方法。

30

【請求項 11】

前記フューリンポリペプチド誘導体が切断型フューリンポリペプチドであることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記切断型フューリンポリペプチドが、配列番号 1 にしたがうフューリンポリペプチドである、請求項 11 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、不活性前駆体タンパク質から成熟タンパク質へのプロセッシングに使用される、組換えヒトフューリン、切断型ヒトフューリン又はフューリン誘導体の精製方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

発明の背景

タンパク質分解性哺乳動物サブチリシン様プロタンパク質コンバーターゼ (S P C 又は P C) ファミリーは、細菌サブチリシン及び酵母 K e x 2 p に類似している。現在まで、フューリン、(P C 3 としても知られる) P C 1、P C 2、P A C E 4、P C 4、(P C 6

50

としても知られる) PC5、PC7(LPC、PC8又はSPC7)を含めて、SPCファミリーの7種類のメンバーが同定され、その各々が独特の組織分布を示す。

【0003】

すべてのSPCは、アミノ末端プロペプチドと、サブチリシン様触媒ドメインと、中間ドメインと、1個以上のドメインで構成された独特のカルボキシ末端とで構成された、マルチドメイン酵素である。プロ、触媒及び中間ドメインは、触媒活性に必須であり、十分である。カルボキシ末端ドメインは、酵素が機能する分泌経路の区画を正確に標的にし、そこに集中するための情報を含むと考えられる。

【0004】

これらのタンパク質は、単一、対又は複数の基本コンセンサス部位において、ホルモン、成長因子、受容体、ウイルス及び細菌タンパク質を含めた不活性前駆体タンパク質、並びにアルブミン、フォンウィルブランド因子(VWF)、第VII因子、第IX因子、第X因子などの血漿タンパク質のエンド型タンパク質分解性(endoproteolytic)成熟プロセッシングに関係している(非特許文献1)。

【0005】

PACE(対の塩基性アミノ酸開裂酵素)とも称されるSPCメンバーのフューリンは、すべての哺乳動物の組織及び細胞系において一様に発現され、やはりホルモン、成長因子、受容体、ウイルス及び細菌タンパク質、並びに血漿タンパク質を含めて、分泌経路における広範囲の生理活性前駆体タンパク質をプロセッシングする能力がある。フューリンは、幾つかのドメイン、すなわち、シグナルペプチド、プロペプチド、触媒ドメイン、中間ドメイン、(ホモB又はPドメインとも称される)、C末端に位置するシステインリッチドメイン、膜貫通領域、及び細胞質側末端に構造的に配置されるカルシウム依存性セリンエンドプロテアーゼである。フューリンプロテアーゼ切断部位は、アミノ酸配列Arg-X-Lys/Arg-Argを特徴とする認識配列を含む(非特許文献2)。

【0006】

完全なフューリンは、ゴルジ装置の膜系中に取り込まれ、そこで機能的に活性である(非特許文献3)。新規合成されたフューリン前駆体が小胞体からゴルジ体領域に移行すると、プロペプチドは、2段階のプロセッシング現象で自己触媒的に除去される(非特許文献4)。

【0007】

フューリンは、トランスゴルジ網と細胞表面の間でもエンドソーム小胞を介して循環し、それによって構成的分泌経路を介した輸送中の前駆体タンパク質とエンドサイトーシス経路に入った分子の両方をプロセッシングする。プロセッシング区画へのフューリンの細胞分布は、その細胞質側末端内の明確な構造的特徴によって誘導される(非特許文献5)。

【0008】

プロテアーゼの過剰発現は、連続的に増殖する細胞培養物の増殖に負の影響を及ぼすので、細胞に対するフューリンの毒性作用を低下させる解決策が求められてきた。C末端ドメインは、フューリンの機能活性に不必要であることが判明し、過剰発現された未変性フューリンの75~80kDの切断型を細胞上清中に分泌タンパク質として検出することができた(非特許文献6)この天然に分泌される切断型フューリンは、「脱落(shed)フューリン」としても知られ(非特許文献7;非特許文献8)、膜貫通部分のN末端が切断されている(非特許文献9)。

【0009】

膜貫通及び細胞質ドメインのコード部分が除去された、遺伝子操作によって切り詰められたフューリンタンパク質としては、例えば、アミノ酸714~794(非特許文献10;非特許文献11)、アミノ酸716~794("Sol-PACE",非特許文献12;非特許文献13)及びアミノ酸705~794(非特許文献14)が記述されている。さらにシステインリッチ領域の欠損を含むフューリン変異体も記述されている(非特許文献15;非特許文献16)。

【0010】

10

20

30

40

50

生物工学的用途に対しては、治療処置の枠組み内の適用例を含めて、SPCの*in vitro*及び*in vivo*の適用例が想定される。かかる適用例では、ヒトフューリン又は切断型フューリンは、非ヒト起源のエンドペプチダーゼよりも適切であり得る。

【0011】

フューリン又は切断型フューリンは、プロセッシングが商業生産の一生産段階である場合には、あらゆる種類の生物活性物質（例えば、他の酵素）の商業生産において適用できる可能性がある。例えば、University of Leuvenは、生物医学関連製品の工業生産におけるフューリンの適用の特許を有する（特許文献1、特許文献2及び特許文献3）。

【0012】

別の例は、プロVWFのプロセッシングである。実際、フューリンのエンド型タンパク質分解活性、及び塩基性アミノ酸に対するその選択性は、プロVWFを用いた実験において最初に測定された。プロVWFは、741個のアミノ酸を有するプロポリペプチドと2050個のアミノ酸を有する成熟VWFとからなり（非特許文献17）、内因性フューリンによってその成熟型にプロセッシングされる（非特許文献6；非特許文献18；非特許文献13）。下流プロセスにおいては、組換えVWF（rVWF）は最高50～70%のプロrVWFからなるので、完全に成熟していないプロrVWFは、次いで、*in vitro*で更にプロセッシングされる。プロrVWFは、未精製フューリンを含むCHO細胞上清を未精製プロrVWFの上清に添加することによって、成熟させることができる。しかし、プロrVWF及びフューリン濃度が低いため、この成熟過程は、最長数日間持続することがあり、余り再現性がない。したがって、精製フューリン又はフューリン誘導体が成熟過程には好ましいと考えられる。

【0013】

タンパク質成熟においてフューリン又は切断型フューリンが広範に使用される可能性があるにもかかわらず、驚くべきことに、フューリンの精製方法の開示はごく少数である。

【0014】

組換え切断型マウスフューリンは、陰イオン交換膜、続いてMono Q及びSuperose 12カラムを用いた精製によって、収率27%でわずかに7倍でしか精製されていない（非特許文献19）

非特許文献14は、硫酸アンモニウム分画、TOYOPEARL（登録商標）AF-B1ueバッチ式分画及びDEAE-TOYOPEARL（登録商標）クロマトグラフィーを使用することによって、CHO細胞における切断型マウスフューリンの100倍精製を約10%の比較的 low 収率で達成した。同方法は、Methods Enzymol. 1994；244：167～75に発表されたように、Nakayama等によっても使用された。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】米国特許第5,989,856号明細書

【特許文献2】米国特許第5,935,815号明細書

【特許文献3】米国特許第6,274,365号明細書

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】Nakayama, Biochem J., 1997；327：625～35

【非特許文献2】Hosakabara, J Biol Chem. 1991；266：12127～30

【非特許文献3】Bresnahan, J Cell Biol. 1990；111：2851～9

10

20

30

40

50

- 【非特許文献4】Andersonら、EMBO J. 1997; 16: 1508~18
- 【非特許文献5】Teuchertら、J Biol Chem. 1999; 274: 8199~07
- 【非特許文献6】Wiseら、PNAS. 1990; 87: 9378~82
- 【非特許文献7】Vidricaireら、Biochem Biophys Res Comm. 1993; 195: 1011~8
- 【非特許文献8】Plaimauerら、Biochem J. 2001; 354: 689~95
- 【非特許文献9】Veyら、J Cell Biol. 1994; 127: 1829~42
- 【非特許文献10】Leducら、J Biol Chem. 1992; 267: 14304~8
- 【非特許文献11】Molloyら、J Biol Chem. 1992; 267: 16396~402
- 【非特許文献12】Wasleyら、J Biol Chem. 1993; 268: 8458~65
- 【非特許文献13】RehmtullaおよびKaufman, Blood. 1992; 79: 2349~55
- 【非特許文献14】Hatsuzawaら、J Biol Chem. 1992; 267: 16094~9
- 【非特許文献15】Hatsuzawaら、J Biochem. 1992; 101: 296~301
- 【非特許文献16】Creemersら、J Biol Chem. 1993; 268: 21826~34
- 【非特許文献17】Verweijら、EMBO J. 1986; 5: 1839~47
- 【非特許文献18】Van de Venら、Mol Biol Rep. 1990; 14: 265~75
- 【非特許文献19】Cameronら、J Biol Chem. 2000; 275: 36741~9

10

20

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

しかし、これらの方法はすべて、幾つかの連続段階を使用するため、比較的時間がかかり、フェーリンの精製度又は収率が低い。かかるフェーリン精製方法は、フェーリンが、調製すべきタンパク質に加えて必要とされるにすぎない大規模工業プロセスでは役に立たない。したがって、高精製度及び高収率と合わせて迅速なフェーリン精製プロセスが当分野では大いに必要とされる。本発明の発明上の課題は、例えばプロrVWFなどのプロタンパク質を成熟させることができる、ヒト組換えフェーリン又は切断型フェーリンの高収率及び十分な精製度の簡単な単一カラム精製段階を開発することである。さらに、本質的に純粋なフェーリン又は切断型フェーリンを得るために、それに続く追加の精製段階を開発すべきである。

40

【課題を解決するための手段】

【0018】

サブチリシン様プロタンパク質コンバーターゼの一メンバーであるPACE（対の塩基性アミノ酸開裂酵素）とも称されるフェーリンは、すべての哺乳動物の組織及び細胞系において一様に発現され、分泌経路における広範囲の生理活性前駆体タンパク質をプロセシングする能力がある。フェーリン又は切断型フェーリンは、プロタンパク質のプロセシングが商業生産の一生産段階である場合には、あらゆる種類の生物活性物質の商業生産において適用できる可能性がある。タンパク質成熟においてフェーリン又は切断型フェーリンが広範に使用される可能性があるにもかかわらず、利用可能なフェーリンの精製方法はごく

50

少数であり、その方法は最適ではない。改善されたフューリン精製方法を開発するために、組換え切断型ヒトフューリンをCHO細胞中で発現させ、限外ろ過及び透析ろ過によって約50倍に濃縮した。濃縮物を、Capto(商標)MMCを用いたカラムクロマトグラフィーによって精製することができ、30~50倍の精製倍率(purification factor)、及び少なくとも60%の収率を得た。Capto(商標)MMCクロマトグラフィー後に得られた少なくとも20%純粋な切断型フューリン調製物は、既にプロフォンウィルブランド因子のオンカラム成熟が可能な精製度であった。追加のArginine Sepharoseクロマトグラフィー精製も実施した。切断型ヒトフューリンの精製のための2つのカラムプロセスによって、比活性約290,000 Uフューリン/mgタンパク質及び収率約50%でほぼ純粋な調製物が得られた。

10

例えば、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目1)

タンパク質溶液からフューリン又はフューリン誘導体を精製する方法であって、以下：
(a) タンパク質溶液からの該フューリン又はフューリン誘導体を、pH6.0でフューリンを結合可能である陰イオン交換樹脂に結合させるステップ、(b) 溶出によって該フューリン又はフューリン誘導体を回収するステップを含む、方法。

(項目2)

上記陰イオン交換樹脂が、Fractogel(登録商標)EMD TMAE 650 M(Merck, Darmstadt, Germany)、Capto(商標)Q(GE Healthcare, Freiburg, Germany)及びCapto(商標)MMC(GE Healthcare, Freiburg, Germany)からなる群より選択されることを特徴とする、項目1に記載の方法。

20

(項目3)

上記陰イオン交換樹脂がCapto(商標)MMC(GE Healthcare, Freiburg, Germany)であることを特徴とする、項目1~2に記載の方法。

(項目4)

上記フューリン誘導体が切断型フューリンであることを特徴とする、項目1に記載の方法。

(項目5)

上記切断型フューリンが、アミノ酸578から794をC末端側で欠く配列番号1のフューリンであることを特徴とする、項目4に記載の方法。

30

(項目6)

上記フューリン、切断型フューリン又はフューリン誘導体がCapto MMC(商標)カラムに結合し、段階溶出によって回収されることを特徴とする、項目4に記載の方法。

(項目7)

上記フューリン、切断型フューリン又はフューリン誘導体が、10mM酢酸ナトリウム、1mM CaCl₂、pH6.0中で上記Capto(商標)MMCカラムに結合し、30mM塩化ナトリウム、10mM酢酸ナトリウム、1mM CaCl₂、pH6.0で洗浄され、230mM塩化ナトリウム、10mM酢酸ナトリウム、1mM CaCl₂、pH6.0で溶出される、項目6に記載の方法。

40

(項目8)

上記フューリン、切断型フューリン又はフューリン誘導体が、50mM HEPES、1mM CaCl₂、pH6.0中で上記Capto(商標)MMCカラムに結合し、30mM塩化ナトリウム、50mM HEPES、1mM CaCl₂、pH6.0で洗浄され、230mM塩化ナトリウム、50mM HEPES、1mM CaCl₂、pH6.0で溶出される、項目7に記載の方法。

(項目9)

Capto(商標)MMCカラムに結合した上記フューリン、切断型フューリン又はフューリン誘導体が勾配溶出によって回収されることを特徴とする、項目4に記載の方法。

50

(項目10)

C a p t o (商標) M M Cカラムに結合した上記フェーリン、切断型フェーリン又はフェーリン誘導体が勾配溶出によって回収され、該勾配が10 mM酢酸ナトリウム、1 mM C a C l₂、pH6.0中の0~500 mM N a C lであることを特徴とする、項目9に記載の方法。

(項目11)

項目1に従って精製されたフェーリン、切断型フェーリン又はフェーリン誘導体。

(項目12)

少なくとも100,000 U/mgタンパク質の比活性を有する、項目1に従って精製されたフェーリン、切断型フェーリン又はフェーリン誘導体。

10

(項目13)

エンド型タンパク質分解に活性な量の項目11に記載のフェーリン、切断型フェーリン又はフェーリン誘導体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

(項目14)

フェーリン又はフェーリン誘導体を回収する方法であって、以下：(a)タンパク質溶液からの該フェーリン又はフェーリン誘導体を、C a p t o (商標) M M Cカラムに結合させるステップ、(b)該フェーリン又はフェーリン誘導体を溶出させるステップ、(c)該フェーリン又はフェーリン誘導体をA r g i n i n e - S e p h a r o s eカラムに結合させるステップ、および(d)該フェーリン又はフェーリン誘導体を溶出させるステップを含む、方法。

20

(項目15)

上記フェーリン誘導体が切断型フェーリンであることを特徴とする、項目14に記載の方法。

(項目16)

上記切断型フェーリンが、アミノ酸578から794をC末端側で欠く配列番号1で示される配列を有することを特徴とする、項目15に記載の方法。

(項目17)

項目14に従って精製されたフェーリン、切断型フェーリン又はフェーリン誘導体。

(項目18)

少なくとも290,000 U/mgタンパク質の比活性を有する、項目17に従って精製されたフェーリン、切断型フェーリン又はフェーリン誘導体。

30

(項目19)

エンド型タンパク質分解に活性な量の項目18に記載のフェーリン、切断型フェーリン又はフェーリン誘導体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【図面の簡単な説明】**【0019】**

【図1】段階溶出を用いたC a p t o (商標) M M Cカラムクロマトグラフィーによる切断型フェーリンの精製(実施例5)を示すグラフである。

【図2】勾配溶出を用いたC a p t o (商標) M M Cカラムクロマトグラフィーによる切断型フェーリンの精製(実施例5)を示すグラフである。

40

【図3】追加のA r g i n i n e S e p h a r o s eクロマトグラフィーと一緒にC a p t o (商標) M M Cカラムクロマトグラフィーから得られた切断型フェーリンの精製(実施例6)を示すグラフである。

【図4】C a p t o (商標) M M C、及びA r g i n i n e S e p h a r o s eカラムと組み合わせたC a p t o (商標) M M Cによって精製された、切断型フェーリンのS D S - P A G E分離(実施例2及び実施例6)を示す図である。

【発明を実施するための形態】**【0020】**

「フェーリン」という用語は、当分野では明確に定義されており、例は、S w i s s -

50

Prot/TREMBLデータベースに見つけることができ(受託番号P09958、本発明の一実施形態においては、フェーリンは、米国特許第5,986,079号に開示され、米国特許第5,986,079号に開示されたDNA配列によってコードされる、ペプチドを意味する。

【0021】

「フェーリン誘導体」という用語は、(「脱落フェーリン」とも称される)フェーリンアミノ酸の切断型断片、その天然変種、又は計画的に改変されたその配列を含む。したがって、アミノ酸の挿入、欠失又は交換によってフェーリン又は切断型フェーリン類似体から生成され、フェーリン様生物学的活性を有するすべてのタンパク質も、本発明の方法によって精製することができる。

10

【0022】

本発明の一実施形態においては、フェーリン及びフェーリン誘導体は、組換え技術によって、すなわち、かかるDNAで形質転換された適切な宿主細胞においてかかるフェーリン又はフェーリン誘導体をコードするDNAを発現させることによって、製造することができる。

【0023】

本願の切断型フェーリンは、フェーリンエンドペプチダーゼ活性をコードする配列を保持しつつ、フェーリンをコードするDNAをその3'末端及び/又はその5'末端で切り詰めることによって、生成させることができる。膜貫通(TM)領域及び/又はシステインリッチ領域(CRR)のコード配列を欠失させることが望ましい場合もある。シグナル配列をコードする領域を除去すること、及び/又はそれを異種配列で置換することが望ましい場合もある本発明による切断型フェーリンは、ゴルジ装置の膜中に切断型フェーリンを固定するのに役立ち得る推定上の膜貫通領域を含むこともできる。

20

【0024】

フェーリンDNA配列の一部(特に、触媒ドメインのコード領域を含む部分)を異種コード配列に連結して、フェーリンの酵素特異性を有する融合ペプチドを作製することが望ましい場合もある。

【0025】

本発明の好ましい一実施形態においては、切断型フェーリンは、ヒト起源であり、例えば米国特許第5,986,079号に開示された野生型ヒトフェーリンのアミノ酸配列からアミノ酸578から794を欠くC末端切断型である。本発明による切断型フェーリンは、細胞に実質的に有毒ではなく、細胞中で多量に発現させることができるように切り詰められる。かかる切断型フェーリンは当分野で公知である。

30

【0026】

本発明に開示する方法によって精製されるフェーリン、切断型フェーリン又はフェーリン誘導体を使用して、タンパク質分解性切断によってプロタンパク質からタンパク質を調製することができる。プロタンパク質は、適切なタンパク質分解処理によって機能タンパク質に変換することができるタンパク質の全前駆体を含むものとする。特に、プロタンパク質は、プロ酵素、プレプロ酵素、又は生化学的、生理学的若しくは生物工学的に使用可能なタンパク質若しくは酵素の他の(不活性)前駆体とすることができる。

40

【0027】

前駆体ポリペプチドの例としては、VWF、第IX因子、プロテインC、プロテインS、プロトロンピン、第X因子、第VII因子、骨ガンマカルボキシグルタマートタンパク質などの凝固因子、インスリン、血小板由来成長因子(PDGF)、神経成長因子(NGF)などの成長因子が挙げられるが、それだけに限定されない。

【0028】

本願によるフェーリン、切断型フェーリン又はフェーリン誘導体の製造は、かかるタンパク質をコードする組換えDNAの遺伝子操作の当分野で公知の任意の方法、例えば、RNAの逆転写、及び/又はDNAの増幅、続いてベクターの移入、及びタンパク質の組換え発現の種々の方法を含むことができる。種々のベクター、永久細胞系、ウイルス発現系

50

などの通常の真核生物発現系のすべてを使用することができる。フューリン、切断型フューリン又はフューリン誘導体をコードする組換えDNA、例えば、プラスミドは、プラスミドが首尾よく移入された細胞を選択する選択マーカーをコードするDNA配列も含むことができる。

【0029】

本発明によるフューリン、フューリン誘導体又は切断型フューリンを組換え製造するための細胞系は、外来DNAを宿主細胞の染色体に安定に組み込むことによって製造することができる。宿主細胞型は、任意の真核細胞とすることができる。一実施形態においては、細胞は、フューリン、切断型フューリン又はフューリン誘導体の翻訳後修飾を実行する能力を有する哺乳動物細胞である。例えば、前記哺乳動物細胞は、例えば、SkHep-10、CHO-、HEK293-及びBHK細胞からなる群より選択される細胞系のような哺乳動物細胞系に由来する。真核生物発現系として、酵母、及び内因性フューリン、切断型フューリン又はフューリン誘導体を発現する他の細胞型も使用することができる。トランスジェニック動物もフューリン又はその誘導体の発現に使用することができる。組換えタンパク質の発現の場合、CHO-DUXS B11細胞が特に適切であることが証明された(Urlaubら、PNAS 1980; 77: 4216~20)。この細胞は、任意の規模で培養することができる。一具体例においては、CHO細胞は、80~200L規模のケモスタット発酵によって培養された。

【0030】

本発明において細胞培養に使用する培地、試薬及び条件に特別な制限はない。細胞は、血清を用いて、さらに、無血清条件下、又は無血清及び無タンパク質条件下で、連続式又はバッチ式で培養することができる。

【0031】

本発明によるフューリンは、場合によってはプロテアーゼ阻害剤の存在下で、溶解によって細胞から単離し、従来法によって更に精製することができる。フューリンは、分泌顆粒中で生じるようなpH5.5の比較的酸性の培地において活性であるが、このタンパク質はpH7.5でもその活性を維持する。フューリンの活性は、Ca²⁺イオンの存在に依存する。in vitro酵素活性の場合、2~5mMのカルシウム濃度が最適であることが判明した。EDTAなどの金属キレート剤の存在は、フューリンの活性を大きく阻害する。

【0032】

フューリン、切断型フューリン又はフューリン誘導体のタンパク質分解活性の評価は、任意の適切な試験によって、例えば、フューリンが特異的である二塩基性切断部位を含む蛍光発生基質を用いることによって、実施することができる(Schlokotら、Biotechnol Appl Biochem. 1996; 24: 257~67)。前記アッセイでは、1単位は、蛍光発生基質Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMCから30分間で7-アミノ-4-メチルクマリン(AMC)1pmolを放出するフューリンの量として定義される。或いは、タンパク質分解活性は、フューリンをプロタンパク質、例えばプロrvWFと一緒に十分な時間インキュベートすることによって測定することもできる。プロrvWFプロセシングの程度は、例えばウエスタンブロット法によって、分析することができる。

【0033】

本発明は、組換え製造されたフューリンを細胞培養培地から精製する方法を規定する。フューリン、切断型フューリン又はフューリン誘導体は、圧力に対して安定なクロマトグラフィーゲルFractogel(登録商標)EMD TMAE 650M(Merck、Darmstadt、Germany)、Captol(商標)Q(GE Healthcare、Freiburg、Germany)など、pH6.0でフューリンを結合可能である陰イオン交換樹脂によって、驚くべきことに有利に精製することができる。

【0034】

10

20

30

40

50

本発明の一実施形態においては、C a p t o (商標) Qは、フューリン、切断型フューリン又はフューリン誘導体の高発現及び高体積供給の捕捉及び中間精製における使用に驚くほど効率的であることが判明した。極めて硬いマトリックスは、より広い作業範囲の流速、層高及び試料粘度が可能であり、そのすべてがプロセッシングコストに正の影響を及ぼす。高流速は、処理体積を増加させ、工程所要時間を短縮する。層高が長いと、大きい装置が不要になり、設置面積が小さく維持される。粘ちゅう性試料の高流量処理とは、希釈が少なく、サイクル時間が短いことを意味する。

【 0 0 3 5 】

本願の別の実施形態においては、C a p t o (商標) M M C (G E H e a l t h c a r e , F r e i b u r g , G e r m a n y)樹脂を使用した。前記樹脂を使用することによって、30～50の驚くほど高い精製倍率、少なくとも60%の高収率、及び少なくとも100,000 U/mgタンパク質の比活性を単一精製段階で得ることができた。

10

【 0 0 3 6 】

本発明の更に別の実施形態においては、C a p t o (商標) M M C樹脂を用いて精製された切断型フューリンを、A r g i n i n e - S e p h a r o s e (商標) 4 Bカラム (G E H e a l t h c a r e) などの A r g i n i n e S e p h a r o s e樹脂を用いて更に精製した。前記2種類の樹脂を使用することによって、140の驚くほど高い精製倍率、50%の高収率、約140の精製倍率、少なくとも90～95%の純度、及び290,000 U/mgタンパク質の比活性を得ることができる。

20

【 0 0 3 7 】

種々の緩衝系を使用して、フューリン、切断型フューリン又はフューリン誘導体を緩衝し、本発明に使用されるカラムを平衡化することができる。一般に、pH 6.0で緩衝能を有するあらゆる緩衝剤を使用することができる。これには、例えば、リン酸塩、クエン酸塩及び T r i s 緩衝剤が含まれる。本発明の一実施形態においては、緩衝剤は50 mM H e p e s / 1 m M C a C l 2 であり、別の実施形態においては、10 mM 酢酸ナトリウム / 1 mM C a C l 2 である。pHは5.5から8.0の範囲であり、別の実施形態においては、pHは6.0である。

30

【 0 0 3 8 】

本発明は、本発明に従って精製されたフューリン、切断型フューリン又はフューリン誘導体のエンド型タンパク質分解に活性な量と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物も含む。担体は、好ましくは液剤とすることができ、好ましくは緩衝等張水溶液である。本発明に従って精製されたフューリン、切断型フューリン又はフューリン誘導体は、単一成分調製物として、又は複数成分系として、例えばVWFのプロタンパク質として、他の成分と組み合わせて、フューリンポリペプチドを含む薬剤として提供することができる。

【 0 0 3 9 】

薬学的に許容される担体としては、希釈剤などの賦形剤、及び安定剤、防腐剤、可溶化剤などの添加剤も挙げられる。本発明のポリペプチドは、任意の薬学的に許容される塩の形とすることもできる。

40

【 0 0 4 0 】

本明細書では「薬学的に許容される」という用語は、米国若しくは欧州連合政府の規制行政機関によって認可された、又は米国薬局方、若しくは動物用、より具体的にはヒト用の他の一般に認知された薬局方に記載されていることを意味する。

【 0 0 4 1 】

以下の実施例は、本発明を説明するものであるが、本発明の範囲を決して限定するものではない。当業者の知識内の変更は、本発明の範囲内であると考えべきである。

【 実施例 】

50

【0042】

実施例1 組換え切断型フューリンの発現及び分析

アミノ酸578から794を欠く切断型ヒトフューリン(配列番号1)を、80~200L規模のケモスタット発酵によって培養されたCHO細胞において発現させた。フューリン含有CHO細胞上清を約50倍に濃縮し(0.6m² Hydrosart 30kDa膜を備えた限外ろ過ユニット、Sartorius Goettingen, Germany)、50mM HEPES、1mM CaCl₂、pH6.0に対して透析ろ過し、使用するまで(1週間以内)-20℃で貯蔵した。

【0043】

試料のタンパク質含有量を、Bio-Rad Laboratories製Protein Assay Dye Reagent Concentrate(Hercules, CA, USA)を用いて、Bradfordによって記述された原理によって測定した(Anal Biochem. 1976; 72: 248~54)。微量検定手順を製造者の指示に従って実施し、認証ヒト血清調製物(Qualitrol HS-N, Diasys Diagnostics, Holzheim, Germany)を用いて校正し、20から1.8µgタンパク質/mLの校正範囲を得た。濃縮試料を0.9%NaClで希釈した。

【0044】

酵素フューリン活性を蛍光発生アッセイにおいて測定した。このアッセイでは、1単位は、蛍光発生基質Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMCから30分間で7-アミノ-4-メチルクマリン(AMC)1pmolを放出するフューリンの量として定義される。組換えフューリン標準(New England Biolabs, Ipswich, MA, U.S.A.)を100mM HEPES、0.5%Triton X-100、1mM CaCl₂、1mM 2-メルカプトエタノール、pH7.5で1:10、1:20、1:40、1:80、1:160及び1:320希釈した)。希釈試料150µLを基質(Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC酢酸塩; Bachem Distribution Service GmbH; Weil am Rhein, Germany)50µLと一緒に、蛍光を適用するための黒色マイクロタイタープレート中で30分間で120分間振とうした。インキュベーション後10分以内にAMCの放出を分光蛍光光度計によって360nm/460nmで測定した。フューリン濃度をフューリンを用いた基準曲線によって計算した。

【0045】

過剰の検出抗体を用いた2部位(two-site)サンドイッチELISAアッセイ形式、及び単一インキュベーション多層免疫技術(single incubation multilayer immune technique)SIMIT(Naser, Immunol Methods. 1990; 129: 151~7)において汚染CHOタンパク質を測定した。宿主細胞抗原を非組換え前駆体CHO細胞系DUKXの細胞培養上清から調製した。宿主細胞抗原に対するポリクローナル抗体をヤギにおいて産生させた。コーティングのために、コーティング緩衝剤(HClでpH9.5に調節した100mM炭酸ナトリウム、100mM炭酸水素ナトリウム)中のヤギ抗CHO抗体(所内調製物)の1:500溶液を使用した。PBST(137mM NaCl、2.7mM KCl、1.5mMリン酸二水素カリウム、7mM無水リン酸水素二ナトリウム、0.5mL Tween 20、0.1%ウシ血清アルブミン及び2mMベンズアミジン)を試料希釈及びブロッキングに使用した。所内ビオチン化抗体(ヤギ抗CHOビオチン)とストレプトアビジンペルオキシダーゼ(Dako, Glostrup, Denmark)の組合せを、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を基質として用いた検出に使用した。親和性精製された宿主細胞調製物を、95ng/mLから3ng/mL CHOタンパク質のアッセイ校正範囲を扱うアッセイ標準(CHOタンパク質アッセイ標準、380ng/mL、所内調製物)として使用した。標準希釈物のOD及びCHOタンパク質濃度の対数変換、並びに線形回帰曲線の計算の後に、試料を測定した。

10

20

30

40

50

【0046】

切断型フューリン調製物の内毒素含有量をLimulus血球抽出成分(Amebocyte Lysate)(LAL)アッセイにおいて測定した。LALは、内毒素の存在下で活性化された酵素系を含む。手短に述べると、活性化された酵素は、パラニトロアニリン(pNA)を発色基質S-2423(Ac-Ile-Gly-Arg-pNA.HCl、CoaChrom Diagnostica GmbH、Vienna、Austria)から分裂させて、黄色を発する。pNAの遊離は、ELISAリーダーにおいて405nmで動力学的に測定される。内毒素濃度は、内毒素標準(E.coli 0111:B4)を用いた基準曲線によって計算される。

【0047】

実施例2 単一カラム精製段階としてのCapto(商標)MMC樹脂の確認

上述したように発現させ、分析した切断型フューリンを、フューリン又は切断型フューリン調製物にはこれまで使用されなかった異なるクロマトグラフィー樹脂を用いて、比較しながら精製した。2種類の陰イオン交換樹脂、すなわち、Fractogel(登録商標)EMD TMAE 650(Merck、Darmstadt、Germany)とCapto(商標)Q(GE Healthcare、Freiburg、Germany)、及び混合陽イオン交換/疎水性相互作用ゲル(Capto(商標)MMC)(GE Healthcare)を、CHO細胞上清に由来する切断型フューリンの精製及び濃淡膜電位について試験した。クロマトグラフィーの運転を、50mM HEPES/1mM CaCl₂緩衝剤を用いて、pH7.5(Fractogel(登録商標)EMD TMAE 650及びCapto(商標)Q)及び5.5~8.0(Capto(商標)MMC)で実施した。切断型フューリンカラムロード及び導電率は、個々のクロマトグラフィー運転ごとに異なった(表1)。結合したフューリンをローディングバッファー中の線形0~500mM NaCl勾配によって15CV以内で溶出させた。調製されたすべての切断型フューリン試料は、内毒素を含まないことに留意されたい。

【0048】

【表1】

表1 異なるクロマトグラフィー樹脂を用いた切断型フューリン精製の比較

カラム	ロード (U/mL ゲル)	導電率 (mS/cm)	回収 (%)	比活性 (U/mg)	精製(倍率)	CHO タンパク質 除去 (係数)
TMAE	2,705	6.7	36	n.d.	n.d.	1.3
TMAE	4,016	5.2	57	2,248	2.4	1.7
TMAE	4,403	4.8	46	2,533	3.0	1.7
TMAE	10,635	5.2	37	2,049	2.5	2.4
TMAE	32,625	5.0	68	10,011	5.3	2.4
Capto Q	16,847	4.5	45	8,797	7.4	5.5
Capto Q	33,781	4.8	51	14,138	8.9	5.0
Capto Q	21,860	4.5	71	7,789	7.1	4.5
Capto MMC	5,358	4.3	56	38,611	30.3	96
Capto MMC	13,218	3.9	63	110,424	37.6	56
Capto MMC	6,972	7.8	76	27,693	27.1	45

異なるカラムに対する結果は各グループ内で比較的均一であったので、概観しやすいように平均を計算した。Fractogel(登録商標)EMD TMAE 650を用い

た5つの実験、Capto (商標) Qを用いた3つの実験、及びCapto (商標) MMCを用いた3つの実験の平均をそれぞれ表2に示す。

【0049】

【表2】

表2 異なるクロマトグラフィー樹脂を用いた切断型フューリン精製の比較の概要

カラム	回収 (%)	比活性 (U/mg)	精製(倍率)	CHOタンパク質除去(係数)
TMAE	49	4,210	3.3	1.9
Capto Q	56	10,241	7.8	5.0
Capto MMC	65	58,909	32	66

10

Fractogel (登録商標) EMD TMAE 650及びCapto (商標) Qは、切断型フューリンの純度をそれぞれ3倍及び8倍増加させることができたのに対して、Capto (商標) MMCでは32の精製倍率が得られた。カラム溶出物における切断型フューリン収率は、Capto (商標) MMCでは65%、Capto (商標) Qでは56%、Fractogel (登録商標) EMD TMAE 650では49%であった。

20

【0050】

切断型フューリンの高精製倍率に加えて、Capto (商標) MMCを使用すると、汚染CHOタンパク質の除去係数 (factor of removal) も最高になった。8~18%勾配SDSゲル上のCoomassie (登録商標)染色バンドで測定して、切断型フューリンは少なくとも20%純粋であった。典型例を図4に示す。Capto (商標) MMC溶出物のうち異なる切断型フューリン調製物3µgをレーン4~7に充填した(レーン1:フューリン標準、レーン2及び3:Arginine Sepharose溶出物、M=分子量マーカ)。

30

【0051】

実施例3 酢酸ナトリウム緩衝剤によるHepes緩衝剤の置換

緩衝剤コスト(約500ユーロ/1Lカラム)を削減するために、代替緩衝系を試験した。Hepes濃度の減少は、カラム流液及び洗浄画分中の切断型フューリンがかなり急増したので、不可能であった。Capto (商標) MMCカラムに5,000~30,000Uフューリン/mLゲルを充填し、ローディングバッファー中の0~500mM NaCl勾配によって15CV以内で溶出させた。

【0052】

幾つかの緩衝系を試験し、10mM酢酸ナトリウムによって50mM Hepes緩衝剤と少なくとも類似した精製倍率、収率及び能力が得られることが判明した。Hepes又は酢酸ナトリウム緩衝剤を用いた3つの実験の平均を表3に示す。

40

【0053】

【表 3】

表3 Hepesと酢酸ナトリウム緩衝剤の比較

緩衝剤	回収 (%)	比活性 (U/mg)	精製(倍率)	CHOタンパク質除去(係数)
Hepes	65	58,909	32	66
酢酸ナトリウム	95	50,951	24	30

10

実施例 4 導電率の変更による、Capt o (商標) MMCカラムを用いた切断型フューリン精製の最適化

Capt o (商標) MMCカラムに70,000~100,000 Uフューリン/mgゲルを充填した。充填液を10 mM酢酸ナトリウム、1 mM CaCl₂、pH 6.0で透析して、導電率約1 mS/cmを得た。導電率を1 mS/cmに調節することによって、Capt o (商標) MMCカラムの流液及び洗浄画分中の切断型フューリンの損失を約17%から検出不可能なレベルにまでかなり減少させることができた。さらに、カラムロードを約100,000 Uフューリン/mLゲルまで増加させることができた(表4)。150,000 Uフューリン/mLゲルの適用後に、かなりの切断型フューリンの急増が認められた。しかし、大規模調製のための最適化中にカラムロードを150,000 U/mLゲルに増加することができると期待できる。

20

【0054】

【表 4】

表4 Capt o (商標) MMCカラムを導電率1mS/cmで用いた切断型フューリンの精製

ロードしたフューリン (U/mL ゲル)	回収 (%)	比活性 (U/mg)	精製(倍率)	CHOタンパク質除去(係数)
105,700	19	57,692	23.7	18.8
70,400	97	96,896	37.7	29.4
74,700	94	138,299	55.3	41.8
91,500	90	140,866	53.8	n.d.
平均	61	87,474	34.4	22.9

30

実施例 5 勾配又は段階溶出によるCapt o (商標) MMCカラムからの切断型フューリンの回収

カラムクロマトグラフィーの堅牢性を高めるために、切断型フューリンの溶出のための塩化ナトリウム勾配の代わりに段階勾配を使用した。(10 mM酢酸ナトリウム、1 mM CaCl₂、pH 6.0に対して透析された)切断型フューリン約80,000 U/mLゲル(勾配)及び30,000 U/mLゲル(段階勾配)をCapt o (商標) MMCカラムに充填した。クロマトグラフィーの運転を、10 mM酢酸ナトリウム/1 mM CaCl₂緩衝剤を用いてpH 6で実施した。15カラム体積以内の酢酸ナトリウムローディングバッファー中の0~500 mM NaClの勾配溶出に加えて、30 mM塩化ナトリウム含有平衡緩衝剤における追加の洗浄段階、及び同じ緩衝剤中の230 mM塩化ナトリウムによる溶出を実施した。カラムを平衡緩衝剤30体積、次いで30 mM塩化ナトリウム含有平衡緩衝剤10体積で洗浄した。切断型フューリンを230 mM塩化ナトリウム含有平衡緩衝剤14体積で溶出させた。最初の230 mM塩化ナトリウム溶出物3体積を

40

50

収集した。その結果、精製倍率が低下し、溶出物中の切断型フューリン絶対濃度が減少した。それぞれ2つの実験の平均を表5に示す。これとは対照的に、段階溶出から溶出した切断型フューリンのピーク収集 (peak collection) (図1) は、勾配溶出から得られたピーク収集 (図2) よりも良好であった。

【0055】

【表5】

表5 Capto (商標) MMCカラムからの切断型フューリンの勾配又は段階勾配溶出

溶出	回収 (%)	比活性 (U/mg)	精製(倍率)
勾配	92	139,592	55
段階勾配	92	31,725	14

10

実施例6 Capto (商標) MMCカラムから溶出した切断型フューリンの更なる Arginine - Sepharoseカラム精製

Capto (商標) MMCクロマトグラフィー後に得られた少なくとも20%純粋な切断型フューリン調製物は、既にプロVWFのオンカラム成熟が可能な精製度であった。精製倍率を高めるために、追加の Arginine - Sepharoseクロマトグラフィー精製を実施することができる。

20

【0056】

Capto (商標) MMCクロマトグラフィー段階からの切断型フューリン含有溶出物を50mM Hepes緩衝剤、1mM CaCl_2 、pH7.0に対して透析し、約33,000Uフューリン/mLゲルを、同じ緩衝剤で平衡化された Arginine - Sepharose (商標) 4Bカラム (GE Healthcare) に充填した。切断型フューリンを平衡緩衝剤中の0~250mM NaCl 勾配で25カラム体積以内で溶出させた。クロマトグラフィー運転結果を図3に示す。約60mM NaCl において溶出した切断型フューリンピークを、10kDaカットオフポリスルホン膜を用いた限外ろ過によって5倍濃縮し、150mM NaCl に調節した。Sartobran (登録商標) P (Sartorius, Goettingen, Germany)上で無菌ろ過後、切断型フューリンを-20℃で貯蔵した。切断型フューリンの比活性は、約290,000+/-60,000U/mgタンパク質 (n=3) であった。超濃縮 (ultrac concentration) 前 (図4、レーン3) 及び超濃縮後 (図4、レーン2) の Coomassie (登録商標)染色によって測定して、出発材料としての発酵上清に比べた全収率は約50% (n=3) であり、全精製倍率は約140倍であり、純度は少なくとも90~95%であった。

30

40

【0057】

本発明において示す実施例によれば、切断型フューリンの最良の精製方法は、切断型フューリン濃縮物 (80,000~100,000U/mLゲル) 約15千万単位をpH6.0+/-0.1に調節し、それを10mM酢酸ナトリウム、1mM CaCl_2 、pH6.0に対して平衡化された1.5L BPG100/20 Capto (商標) MMCカラムに適用することである。カラムを平衡緩衝剤30体積、次いで30mM塩化ナトリウム含有平衡緩衝剤10体積で洗浄する。切断型フューリンを230mM塩化ナトリウム含有平衡緩衝剤14体積で溶出させる。最初の230mM塩化ナトリウム溶出物3体積の収集が、最も濃縮されたフューリン溶液になる。より高い精製度が望まれる場合には、追加の Arginine - Sepharoseクロマトグラフィー精製を実施することがで

50

きる。

【 0 0 5 8 】

【 化 1 】

ファイル参照#6382からの配列表

配列番号1

切断型フェーリン

MELRPWLLWV	VAATGTLVLL	AADAQQQKVF	TNTWAVRIPG	GPAVANSVAR	KHGFLNLGQI	60
FGDYHFWHR	GVTKRSLSPH	RPRHSRLQRE	PQVQWLEQQV	AKRRTKRDVY	QEPTDPKFPQ	120
QWYLSGVTQR	DLNVKAAWAQ	GYTGHGIVVS	ILDDGIEKNH	PDLAGNYDPG	ASFVNDQDP	180
DPQPRYTQMN	DNRHGTRCAG	EVAAVANNGV	CGVGVAYNAR	IGGVRMLDGE	VTDAVEARSL	240
GLNPNHIHIY	SASWGPEDDG	KTVDGPARLA	EEAFFRGVSQ	GRGGLGSIFV	WASGNNGREH	300
DSCNCDGYTN	SIYTLSSISA	TQFGMVPWYS	EACSSLATT	YSSGNQNEKQ	IVTIDLQKQK	360
TESHTGTSAS	APLAAGIAL	TLEANKNLTW	RDMQHLVVQT	SKPAHLNAND	WATNGVGRKV	420
SHSYGYGLLD	AGAMVALAQN	WITVAPQRKC	IIDILTEPKD	IGKRLEVRKT	VTACLGEPNH	480
ITRLEHAQAR	LTLSYNRRGD	LAIHLVSPMG	TRSTLLAARP	HDYSADGFND	WAFMTTHSWD	540
EDPSGEWVLE	IENTSEANNY	GTLTKFTLVL	YGTAPEG			577

10

【 図 4 】

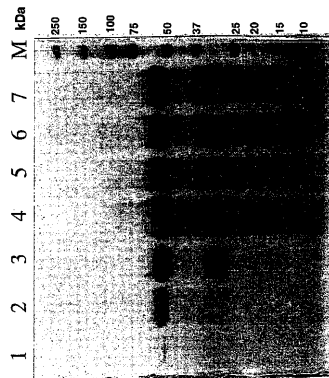


Figure 4

【 図 1 】

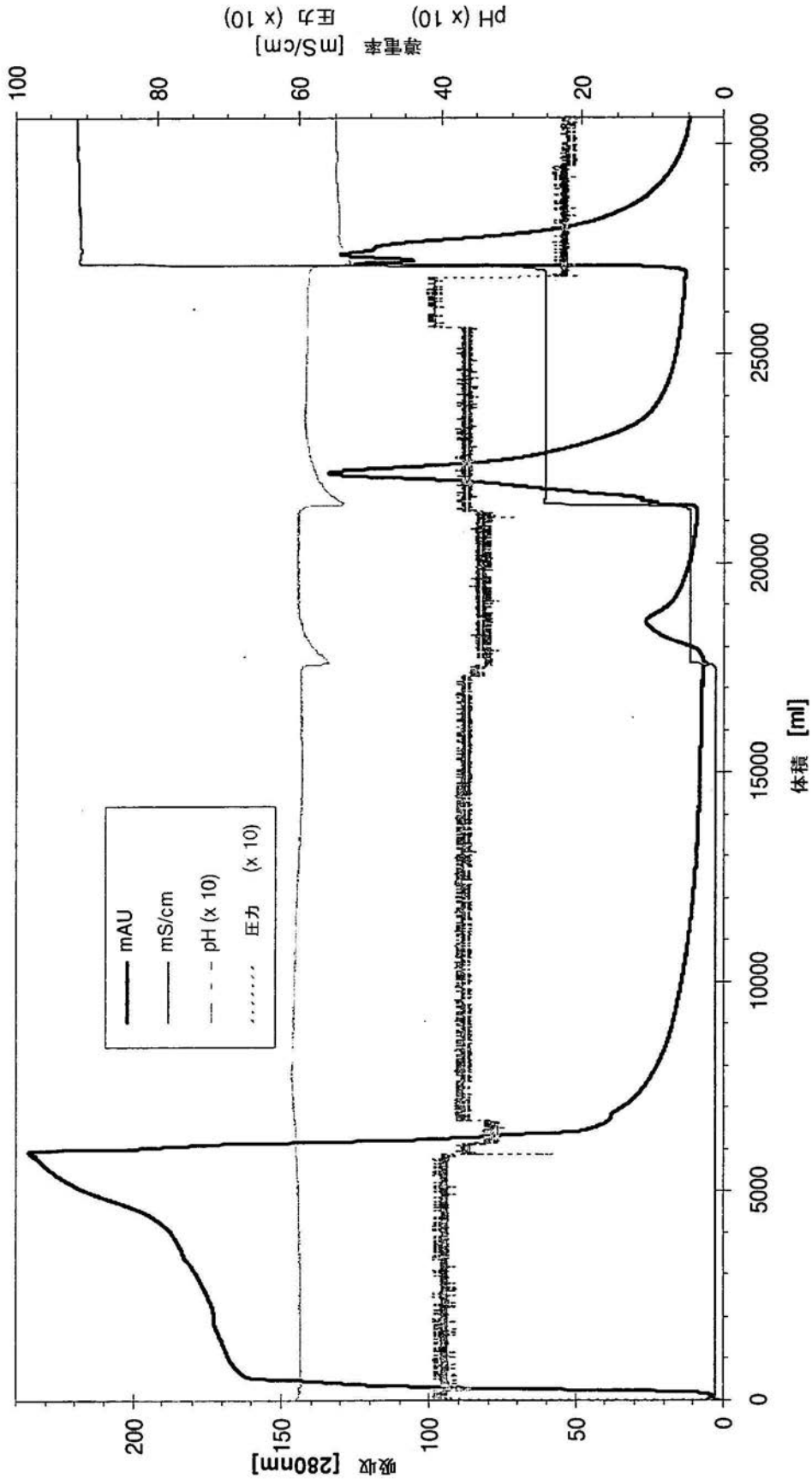


Figure 1

【図2】

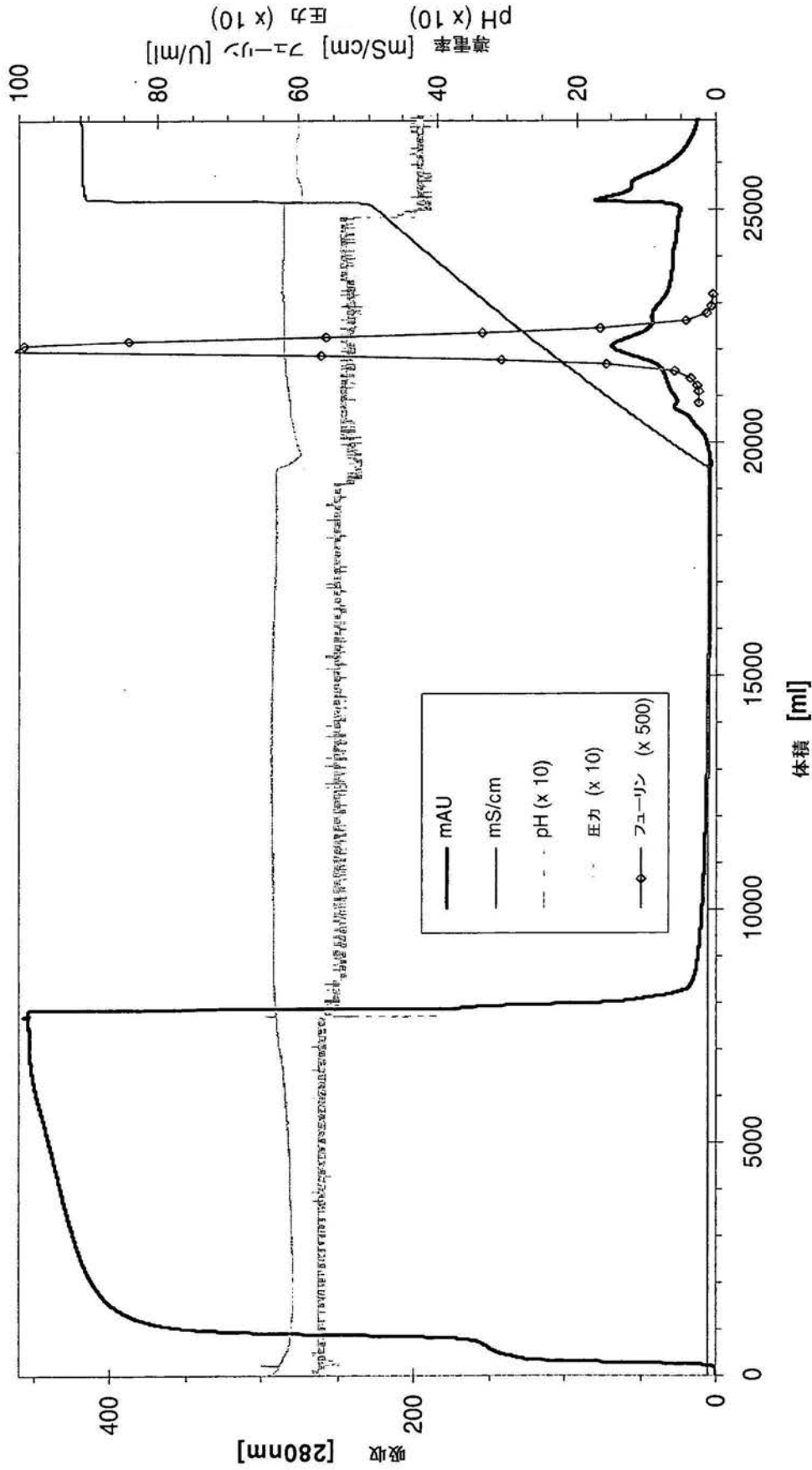


Figure 2

【 図 3 】

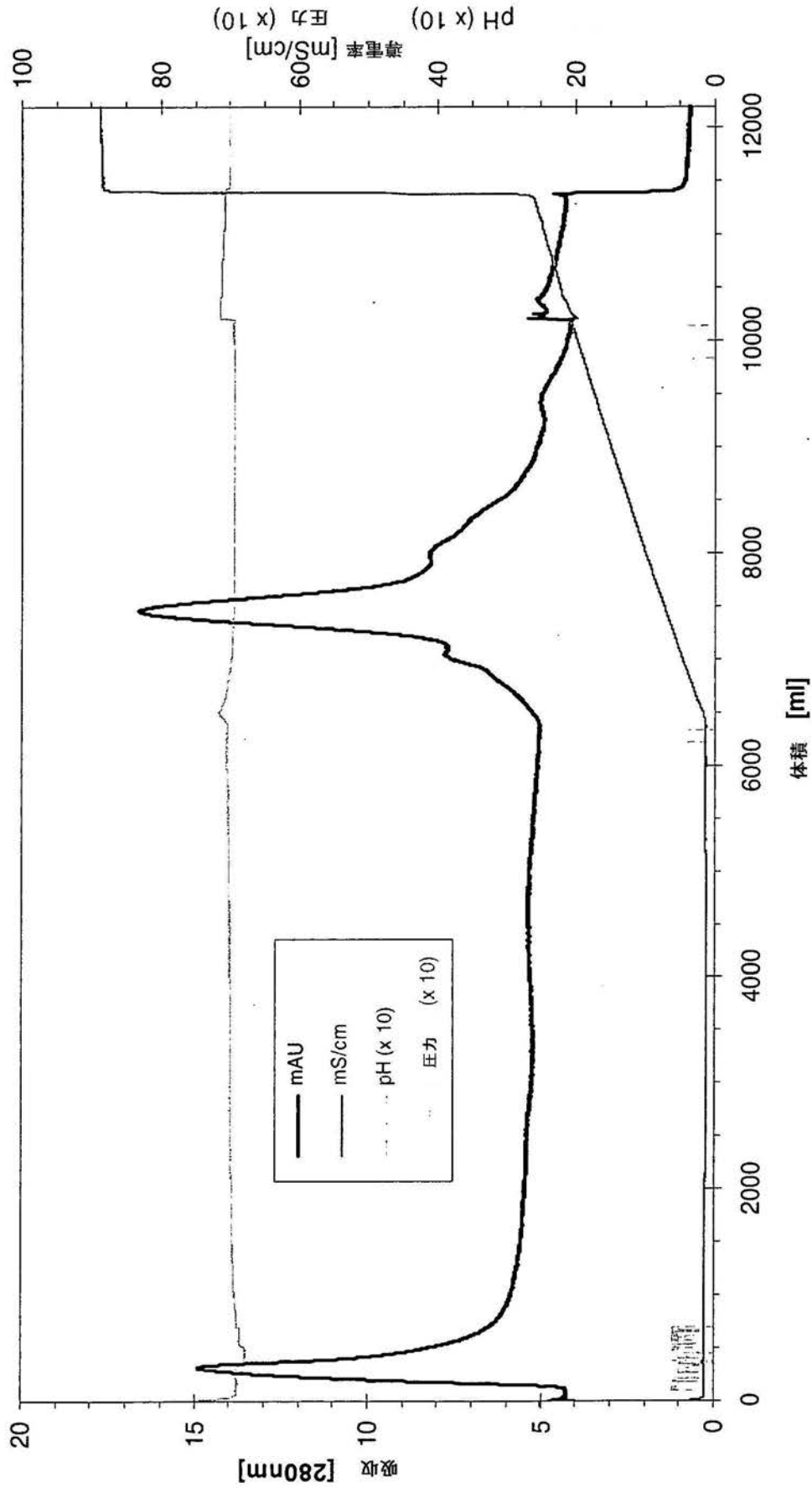


Figure 3

【 配列表 】

0005485873000001.app

フロントページの続き

(73)特許権者 501453189

バクスター・ヘルスケア・ソシエテ・アノニム

Baxter Healthcare SA

スイス国 8152 グラットパーク (オブフィコン), サーガウアーシュトラッセ 130

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 マティエッセン, ペーター

オーストリア国 アー - 1020 ウィーン, フォアガルテンシュトラッセ 129 - 143 / 1 / 5

(72)発明者 ロームデール - フィンガー, シュテファン

オーストリア国 アー - 1220 ウィーン, ルドルフ ヌレジュー プロムナーデ 3 / 12

(72)発明者 タレセク, ペーター

オーストリア国 アー - 3400 クロスターノイブルク, ヴァイトリンク ハウプトシュトラッセ 59ジー

(72)発明者 シュワルツ, ハンス - ペーター

オーストリア国 アー - 1180 ウィーン, ポエッツラインスドルファー シュトラッセ 50 / 9 / 2

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 特表平05 - 504051 (JP, A)

J. Biol. Chem. (1994) vol.269, no.41, p.25830-25837

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 9 / 64

PubMed

CAplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

WPI