

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-518801

(P2005-518801A)

(43) 公表日 平成17年6月30日(2005.6.30)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	2 G 0 4 5
<b>A 6 1 K 38/36</b>	A 6 1 P 7/02	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 P 7/02</b>	C 1 2 N 9/50	4 B 0 5 0
<b>C 1 2 N 5/10</b>	C 1 2 Q 1/37	4 B 0 6 3
<b>C 1 2 N 9/50</b>	C 1 2 N 5/00	4 B 0 6 5
		B
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 83 頁) 最終頁に続く	

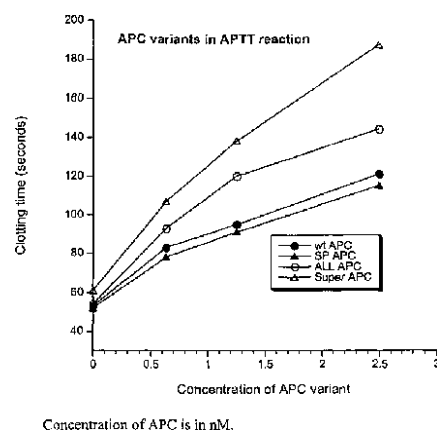
(21) 出願番号 特願2003-572502 (P2003-572502)  
 (86) (22) 出願日 平成15年2月28日 (2003.2.28)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年8月25日 (2004.8.25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/SE2003/000331  
 (87) 国際公開番号 W02003/073980  
 (87) 国際公開日 平成15年9月12日 (2003.9.12)  
 (31) 優先権主張番号 60/360, 181  
 (32) 優先日 平成14年3月1日 (2002.3.1)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/401, 042  
 (32) 優先日 平成14年8月6日 (2002.8.6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504323261  
 テイ・エイ・シー・スロムボシス・アンド  
 ・コアグラシヨン・アクティエボラーク  
 スウェーデン・エスー2 1 7 7 4 マルメ  
 ・エスタンベグ 1 2  
 (74) 代理人 100060782  
 弁理士 小田島 平吉  
 (72) 発明者 ダールベク, ビヨルン  
 スウェーデン・エスー2 1 7 7 4 マルメ  
 ・エスタンベグ 1 2  
 Fターム(参考) 2G045 AA25 BB03 BB20 BB34 CB01  
 CB17 DA13 DA77  
 4B024 AA01 AA11 BA14 CA04 DA02  
 EA02 EA04 FA02 GA11 HA01  
 HA03 HA11  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えプロテインCバリエント

## (57) 【要約】

本発明は、血液のプロテインC - 抗凝固系において抗凝固活性を現すことができる野生型血液凝固成分に対してアミノ酸配列が実質的に相同的であり、そしてプロテインC (PC) および活性化プロテインC (APC) から選択されるバリエント血液凝固成分に関し、該バリエント成分は対応する野生型の血液凝固成分により発現された抗凝固活性に比べて強化され抗凝固活性を現すことができ、そして該バリエント成分は該野生型の成分と比較して、プロテインCのG1a - ドメインを構成するそのN - 末端アミノ酸残基配列に少なくとも1つアミノ酸残基の修飾、およびプロテインCのセリン - プロテアーゼドメインに少なくとも1つのアミノ酸残基の修飾を含む点が異なる。また本発明は、DNA技術に基づくそのようなバリエントの生産法；該方法で使用することを意図するDNAセグメント；および治療および診断目的のための該バリエントの使用に関する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

血液のプロテイン C - 抗凝固系において抗凝固活性を現すことができる野生型血液凝固成分に対してアミノ酸配列が実質的に相同であり、そしてプロテイン C ( P C ) および活性化プロテイン C ( A P C ) から選択されるバリエーション血液凝固成分であって、該バリエーション成分は対応する野生型の血液凝固成分により発現される抗凝固活性に比べて強化された抗凝固活性を現すことができ、そして該バリエーション成分は該野生型の成分と比較して、最初の 45 N - 末端アミノ酸残基を含んでなり、そして G 1 a - ドメインと命名された N - 末端アミノ酸残基配列に少なくとも 1 つのアミノ酸残基修飾、および野生型成分のセリン - プロテアーゼ ( S P ) ドメインに対応するアミノ酸残基配列の領域中に少なくとも 1 つのアミノ酸残基の修飾を含む点が各野生型成分とは異なる、上記バリエーション血液凝固成分。

10

## 【請求項 2】

対応する野生型成分と少なくとも 90 % のアミノ酸残基配列の同一性を有する、請求項 1 に記載のバリエーション成分。

## 【請求項 3】

対応する野生型成分と少なくとも 95 % のアミノ酸残基配列の同一性を有する、請求項 1 に記載のバリエーション成分。

## 【請求項 4】

対応する野生型成分と少なくとも 97 % のアミノ酸残基配列の同一性を有する、請求項 1 に記載のバリエーション成分。

20

## 【請求項 5】

上記の少なくとも 1 つのアミノ酸残基の修飾が置換、削除または挿入されたアミノ酸残基を含んでなる、前記請求項のいずれかに記載のバリエーション成分。

## 【請求項 6】

上記成分が野生型成分と比較して強化された膜 - 結合親和性を現すバリエーション P C またはバリエーション A P C である、前記請求項のいずれかに記載のバリエーション成分。

## 【請求項 7】

野生型プロテイン C に比較して強化されたカルシウム親和性をさらに現す、請求項 6 に記載のバリエーション成分。

30

## 【請求項 8】

上記バリエーション成分が少なくとも 6 個、そして場合により 7 ~ 10 個のアミノ酸残基の修飾を上記 G 1 a - ドメインに含む、前記請求項のいずれかに記載のバリエーション成分。

## 【請求項 9】

上記バリエーション成分が、置換突然変異 H 10 Q、S 11 G、S 12 N、D 23 S、Q 32 E、N 33 D および H 44 Y を含む修飾された G 1 a - ドメインを含み、該修飾された G 1 a - ドメインが以下のアミノ酸配列：

## 【表 1】

ANSFLEELRQ GNLERECIEE ICSFEEAKEI FEDVDDTLAF WSKYV (配列番号 5)

40

を有する、請求項 1 に記載のバリエーション成分。

## 【請求項 10】

上記 G 1 a - ドメインが 10、11、28、32 または 33 位から選択される位置にアミノ酸置換を含み、そして少なくとも 1 つのさらなる修飾を G 1 a - ドメインに含み、場合により該少なくとも 1 つのさらなる修飾が 12、23 または 44 位から選択される、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のバリエーション成分。

## 【請求項 11】

G 1 a - ドメイン中の上記の少なくとも 1 つのアミノ酸修飾が 12、23 および 44 位から選択される位置での置換突然変異であり、該置換突然変異が S 12 N、D 23 S およ

50

び H 4 4 Y から選択される、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のバリエーション成分。

【請求項 1 2】

G 1 a - ドメイン中の上記の少なくとも 1 つのアミノ酸修飾が 1 0、1 1、1 2、2 3、3 2、3 3 および 4 4 位から選択される位置に配置され、そして場合によっては置換突然変異であり、そして場合により 1 0、1 1、1 2、2 3、3 2、3 3 および 4 4 位のすべてが修飾されている、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のバリエーション成分。

【請求項 1 3】

上記成分が野生型成分と比べて、強化されたタンパク質分解活性、適切にはアミド分解活性を現すバリエーション P C またはバリエーション A P C である、前記請求項のいずれかに記載のバリエーション成分。

【請求項 1 4】

野生型プロテイン C と同じグリコシル化部位を含み、該部位のアミノ酸残基が A s n である、請求項 1 に記載のバリエーション成分。

【請求項 1 5】

S P - ドメイン中の上記少なくとも 1 つのアミノ酸残基の修飾が、野生型成分のアミノ酸残基番号 2 9 0 ~ 3 2 0、適切には 3 0 0 から 3 1 4 の間のアミノ酸範囲に対応する領域に含まれる、請求項 1 に記載のバリエーション成分。

【請求項 1 6】

野生型のアミノ酸残基番号 3 0 0 ~ 3 1 4 に対応する修飾された領域が、削除<sup>3 0 3</sup>、3 0 4、3 0 5、3 0 8 および置換 E 3 0 7 D / A 3 1 0 T を含み、そして式 W G Y R D E T K R N R ( 配列番号 7 ) により表される、請求項 1 5 に記載のバリエーション成分。

【請求項 1 7】

上記バリエーション成分が、置換突然変異 H 1 0 Q、S 1 1 G、S 1 2 N、D 2 3 S、Q 3 2 E、N 3 3 D および H 4 4 Y を含む修飾された G 1 a - ドメインを含み、そして該修飾された G 1 a - ドメインが以下のアミノ酸配列：

【表 2】

ANSFLEELRQ GNLERECIEE ICSFEEAKEI FEDVDDTLAF WSKYV ( 配列番号 5 )

を有する、請求項 1 6 に記載のバリエーション成分。

【請求項 1 8】

G 1 a - ドメイン中の上記修飾 ( 1 つまたは複数 ) が置換である、前記請求項のいずれかに記載のバリエーション成分。

【請求項 1 9】

さらに少なくとも 1 つの保存的置換を含む、前記請求項のいずれかに記載のバリエーション成分。

【請求項 2 0】

上記の野生型血液凝固成分がヒト起源である、請求項 1 ないし 1 9 のいずれか 1 項に記載のバリエーション成分。

【請求項 2 1】

前記請求項のいずれかに記載のバリエーション血液凝固成分をコードするヌクレオチド配列を含んでなる D N A セグメント。

【請求項 2 2】

適切には発現ベクターである複製可能なベクター、およびその中に挿入された請求項 2 1 に記載の D N A セグメントを含んでなる組換え D N A 分子。

【請求項 2 3】

適切には中に安定に包含された請求項 2 2 に記載の組換え D N A 分子を持つ微生物または動物細胞、適切には培養された動物細胞系を含んでなる宿主細胞。

【請求項 2 4】

アデノウイルスでトランスフェクトしたヒトの腎臓細胞である、請求項 2 3 に記載の宿主細胞。

10

20

30

40

50

## 【請求項 25】

請求項 1 ないし 20 のいずれか 1 項に記載のバリエーション血液凝固成分をコードする請求項 21 に記載の DNA セグメントの生産法であって；

(a) 野生型血液凝固成分をコードする DNA を準備し；

(b) ヌクレオチドの修飾を該野生型 DNA に導入して、該バリエーション血液凝固成分をコードする修飾された DNA セグメントを形成し；そして

(c) 該修飾された DNA セグメントを複製させる、

ことを含んでなる上記方法。

## 【請求項 26】

請求項 1 ないし 20 のいずれか 1 項に記載のバリエーション血液凝固成分の生産法であって 10

(a) 該バリエーション成分をコードする DNA - セグメントを準備し；

(b) 工程 (a) で準備した該 DNA セグメントを発現ベクターに導入し；

(c) 該 DNA セグメントを含む該ベクターを、コンパチブルな宿主細胞に導入し；

(d) 工程 (c) で準備された宿主細胞を、該バリエーション成分の発現に必要な条件下で培養し；そして

(e) 発現したバリエーション成分を培養した宿主細胞から単離する、

ことを含んでなる上記方法。

## 【請求項 27】

有効量の請求項 1 ないし 20 のいずれか 1 項に記載のバリエーション血液凝固成分および製 20  
薬学的に許容され得る担体、希釈剤または賦形剤を含んでなる製薬学的組成物。

## 【請求項 28】

血液のプロテイン C - 抗凝固系に参加する成分をアッセイするための診断試験システム、適切にはキット形態であって、該システムが請求項 1 ないし 20 のいずれか 1 項に記載のバリエーション血液凝固成分を含んでなる上記システム。

## 【請求項 29】

バリエーション血液凝固成分がバリエーション APC であり、そして上記試験システムがプロテイン S または完全な抗凝固第 V 因子の機能活性をアッセイするシステムである、請求項 28 に記載の診断試験システム。

## 【請求項 30】

患者の凝血を抑制する方法であって、該患者に凝固抑制量の請求項 1 ないし 20 のいずれか 1 項に記載のバリエーション血液凝固成分を含んでなる生理学的に耐容可能な組成物を投与することを含んでなる上記方法。 30

## 【請求項 31】

血栓症が抑制される、請求項 30 に記載の方法。

## 【請求項 32】

血液凝固障害 APC 耐性を有する患者で凝血が抑制される、請求項 31 に記載の方法。

## 【請求項 33】

血栓症のような凝固障害を処置または防止するための薬剤の製造における請求項 1 ないし 20 のいずれか 1 項に記載のバリエーション成分の使用。 40

## 【請求項 34】

バリエーション成分がバリエーション PC またはバリエーション APC をバリエーション PS と組み合わせて含んでなる、請求項 33 に記載の使用。

## 【請求項 35】

APC 耐性の処置のための薬剤の製造ににおける請求項 33 に記載の使用。

## 【請求項 36】

G1a - ドメインが突然変異 S11G、S12N、Q32E および N33D を含む、請求項 16 に記載のバリエーション成分。

## 【請求項 37】

SP ドメイン中の上記の少なくとも 1 つの修飾が 302 または 316 位の修飾である、 50

請求項 9 に記載のバリエーション成分。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、強化された抗凝固 (anticoagulant) 活性を現す機能的組換えプロテイン C バリエーション (protein C variant)、およびそのようなバリエーションの治療または診断目的のための使用を対象とする。より詳細には、本発明は修飾された Gla - ドメインおよび修飾されたセリンプロテアーゼ (SP) ドメインの両方を含むプロテイン C バリエーション、およびそのようなバリエーションの治療または診断目的のための使用を対象とする。

10

【背景技術】

【0002】

発明の背景

プロテイン C は、一般にプロテイン C - 抗凝固系と名付けられている血液の抗凝固系に参加する主要な生理学的に重要なビタミン K - 依存性タンパク質である。すべてのビタミン K - 依存性タンパク質のようにプロテイン C は N - 末端の 45 アミノ酸残基を含んでなる Gla - ドメインまたは Gla - モジュールを含み、該ドメインは以下にさらに詳細に検討するように膜結合親和性に重要である。プロテイン C の SP - ドメインは、i . a . プロテイン C のタンパク質分解活性およびセルピン耐性に関与する。

20

【0003】

このようなプロテイン C - 抗凝固系において、プロテイン C はコファクターであるプロテイン S、および血液凝固のダウン - レギュレーターとしてその活性化状態 (APC、Activated Protein C) のプロテイン C に対する相乗的コファクターとして作用する完全な第 V 因子 (FV) を含む他のタンパク質と協調して機能し、これにより血液の過剰な凝固を防止し、すなわち血栓症を抑制する。プロテイン C の活性化形により現される抗凝固活性は、血液凝固系の別のコファクターである活性化第 VII 因子 (FVIIa) および活性化第 V 因子 (FVa) の特異的開裂および分解により、血液凝固反応を阻害する能力から発する。それらの結果として、血液凝固に必要な成分、すなわち第 X 因子 (FX) およびプロトロンビンの活性化は阻害され、そして凝固系の活性の勢いは削がれる。このようにプロテイン C は血液凝固系が正しく機能するために主に生理学的に重要である。

30

【0004】

プロテイン C の重要性は、臨床的な所見から推定することができる。例えば重篤な血栓塞栓症はホモ接合性プロテイン C 欠損症の個体に影響を及ぼし、そして影響を受けた個体はすでに彼らの新生児の段階 (neonatal life) で血栓症を発症する。生じる臨床的状态である電撃性紫斑症は通常、この状態をプロテイン C で処置しなければ致命的である。一方、ヘテロ接合性プロテイン C 欠損症は、それほど重篤ではない血栓塞栓症の表現型を伴い、そして静脈血栓症の比較的穏やかな危険因子を構成するだけである。この遺伝的形質の保有者は正常なプロテイン C レベルの個体と比較して、5 ~ 10 倍高い血栓症のリスクを有すると予想された。しかしより重要なことは血栓症に関する最も多い遺伝的欠損が、プロテイン C 系にも影響を及ぼすということである。この状態は通常、APC 耐性 (APC resistance) と呼ばれ、そして最も多くは FV - 遺伝子中の 1 つの点突然変異により引き起こされ、この突然変異は FV アミノ酸配列中のアミノ酸残基 Arg 506 の Gln 残基への置換を導く。Arg 506 は APC による開裂作用に感受性である活性化 FV (FVa) の 3 つの開裂部位の 1 つを構成し、そしてそのような突然変異した FVa は正常な FVa よりも APC により効率的に分解されにくい (非特許文献 1)。この突然変異した FVa は R 506 Q FVa、FVa Leiden および Q 506 変異体 FVa と命名されている。

40

【0005】

50

血液凝固系における抗凝固成分としてプロテインCおよび活性化プロテインC (APC) の生理学的重要性は、これらの物質の治療目的のための使用の可能性を示す。

【0006】

実際にプロテインCおよびその活性化形態であるAPCは、すでにある程度、治療目的に使用されてきた(非特許文献2; 非特許文献3; 非特許文献4; 非特許文献5)。より詳細にはヒト血漿から精製したプロテインCがホモ接合性プロテインC欠損症の補充療法として使用され(非特許文献6)、そして髄膜炎菌血症による重篤な播種性血管内凝固症候群の場合にも成功裏に使用されてきた(非特許文献7)。さらに(大腸菌(E. coli)を使用した)敗血症のヒヒのモデルでは、APCは保護効果を有することが示され、これはAPCが大腸菌(E. coli)の侵襲前に与えられた時に特に際立った(非特許文献8)。いずれの場合でも今日までに得られた結果は、プロテインCが上記の状態の処置にのみ有用な薬剤となるだけでなく、凝固系が活性化される多くの他の状態、例えば静脈血栓症、心筋梗塞(MI)後および血管形成術後の冠状血管の再疎通後の血管閉塞の防止および処置に有用となることを示唆している。

10

【0007】

血液凝固障害に関連する種々の状態の治療的処置は、改善された抗凝固特性を有するプロテインCのバリエーションを利用できれば改善され得ると構想されている。さらにそのようなバリエーションは、改善された性能を有するアッセイを得るための、プロテインC系の他の成分の様々な生物学的アッセイを改善するために試薬として有用となるだろう。

【0008】

過去数十年の組換えDNA技術の進歩は、所望する生物学的物質を効率的に生産するための、かつ/または所望する、そして場合により特別に設計された特性を有する生物学的物質を作成するための可能性に莫大な影響を持っていた。実際にプロテインCの機能的バリエーションだけでなく、本質的に野生型プロテインCも以下の参考文献で報告されたように組換え技術により生産された。

20

【0009】

特許文献1(Bang et al)では、ヒトプロテインC誘導体の組換え生産が開示されている。しかし本質的にヒトの野生型プロテインCに相当する機能的活性を有するプロテインCポリペプチドの生産だけが開示されている。最近、この参考文献に従い生産された野生型プロテインCが重篤な敗血症の処置に成功裏に使用された(非特許文献9)

30

【0010】

組換え技術で調製されたプロテインCの使用も、非特許文献10および非特許文献11に開示された。

【0011】

残基158~169を含む活性化ペプチド領域に向けられた突然変異誘発法により得られるプロテインCの機能的バリエーションは、トロンビンに対して強化された感度を有することができ、そのようなバリエーションは野生型プロテインCよりも早くトロンビンにより活性化される(非特許文献12; および非特許文献13)。これらの研究の1つ(非特許文献13)では、たとえトロンビンによるプロテインCの効率的活性化に通常必要とされる膜タンパク質であるトロンボ-モジュリンが存在しなくても、血液の凝固中に形成されるトロンビンにより比較的容易に活性化される変異体プロテインCを導く多数の突然変異が活性化部位の回りに導入された。

40

【0012】

より具体的には、非特許文献13に開示されているトロンビンと強化された相互作用を有するこれらプロテインCバリエーションは、活性化ペプチド領域中に突然変異を含んでなり、トロンビン開裂部位に近い2つの推定される阻害酸性残基が改変されている。Grinnell et al. (以下)に開示された、該改変された残基を活性化ペプチド領域内に、そしてまたAsn313Gln突然変異を含んでなる1つのプロテインCバリエーションが、インビボで行われた実験で抗凝固物質としても機能することが最近示された(非特

50

許文献 14)。しかしこのプロテイン C バリエーションでは、強化された抗凝固活性は A s n 313 G l n 突然変異によるものであり、他の突然変異はトロンビンとの強化された相互作用を生じた。

【0013】

非特許文献 15 では、ヒトプロテイン C の機能におけるグリコシル化の役割が調査され、位置指定突然変異誘発法を使用して、4 つの潜在的 N - 連結グリコシル化部位、すなわち 97、248、313 および 329 位の各々が 1 つずつ排除されている。ここに開示されるプロテイン C バリエーションでは、G l n が 97、248 および 313 位でそれぞれ A s n から代わり、そして 248 および 313 位でこの置換変異を有するプロテイン C 変異体は、他の修飾された特性に加えて 2 ~ 3 倍強化された抗凝固活性を現すことが示されている。

10

【0014】

野生型プロテイン C のアミノ酸配列中、例えばセリンプロテアーゼ ( S P ) モジュールに、少なくとも 1 つのアミノ酸残基の修飾の導入により強化された抗凝固活性を現すプロテイン C および A P C の機能的バリエーションが ( この修飾はプロテイン C のグリコシル化を改変しない )、特許文献 2 に開示されている。ここに具体的に開示されている 1 つのバリエーションは、残基 n o . 300 から 314 の間の短いアミノ酸残基の範囲 ( s t r e t c h ) の中に位置する S P モジュール中に数個の突然変異を含み、該バリエーションは野生型のヒトプロテイン C に比べて約 200 % 強化された抗凝固活性を現す。

【0015】

20

非特許文献 16 は、G l u 357 G l n 突然変異 ( すなわちキモトリプシンの番号付けを使用するならば G l u 192 G l n ) を含んでなるプロテイン C 変異体を開示する。この変異体は純粋系において約 2 ~ 3 倍強化された速度で F V a を不活性化する一方、血漿では抗凝固活性は変異体がアルファ 1 - アンチトリプシンおよびアノチトロンビン I I I のようなプロテアーゼインヒビターにより急速に阻害されるので、野生型プロテイン C に比べて強化されない。

【0016】

天然のプロテイン C の G l a - ドメインに修飾または欠損を有するプロテイン C バリエーションも以前に報告された。

【0017】

30

例えば天然のプロテイン C の G l a - ドメインを欠き、しかも T h r 254 T y r 突然変異 ( すなわちキモトリプシンの番号付けに基づき T h r 99 T y r ) を含んでなるプロテイン C バリエーションが、非特許文献 17 に開示されている。このバリエーションプロテイン C はリン脂質の不存在下で純粋な F V a、すなわち可溶性 F V a に対して 2 倍強化された活性を有するが、G l a - ドメインが無いことにより血漿中での抗凝固活性を欠いている。

【0018】

最近、修飾された G l a - ドメインを有する幾つかのプロテイン C バリエーションが、S h e n e t a l . ( 非特許文献 18 ) により報告された。これらプロテイン C バリエーションは G l a - ドメインに幾つかの置換を含み、そして強化された C a および / または膜結合特性を現し、すなわち活性化プロテイン C ( A P C ) の強化された抗凝固活性も現す。これらのバリエーションの中には特許文献 3 に G l a - ドメインに置換修飾を含む他のプロテイン C バリエーションと一緒に開示されたものもある。後者の参考文献は一般に、それらの G l a - ドメインに修飾、すなわち置換により改変、例えば強化された膜結合親和性を現す修飾されたビタミン - K 依存性ポリペプチドに関する。ビタミン - K 依存性ポリペプチドは第 V I I 因子または任意の他のビタミン - K 依存性タンパク質、例えばプロテイン C を含んでなることができる。G l a - ドメイン残基の番号付けは、特許文献 3 によればプロテイン C 配列の 4 位がいかなる残基にも占有されていない点で S h e n e t a l とこの特許文献 3 の間で異なることに注目すべきであり、これは例えば S h e n ( および本発明 ) による 10 位が特許文献 3 による 11 位に対応する。

40

【0019】

50

特許文献4は、野生型プロテインCと比べて重要な生物学的活性を保持するが、野生型プロテインCと比べた時に上昇した抗凝固活性、セルピン不活性化に対する耐性およびトロンビンに対する上昇した感度も有するヒトプロテインC誘導体に関する。これらプロテインC誘導体はA s p 1 6 7 P h e置換(D 1 6 7 F)、A s p 1 7 2 L y s置換(D 1 7 2 K)、および特にG l a - ドメインまたはS P - ドメイン中で特異的に定められ、そして含まれる少なくとも1つのさらなる置換を含む。Y 3 0 2 QまたはY 3 0 2 E(すなわちS P - ドメイン中)の置換はここに開示されているが、試験データを用いて改善された特性が確認されない。さらにこの置換はセルピンに対する耐性を提供することを構想しているが、真に強化された抗凝固活性、すなわち分子毎に強化されるものであり、時間経過を必要としない抗凝固活性を提供することを構想していない。

10

#### 【0020】

特許文献5では、修飾されたG l a - ドメインを含むプロテインCバリエーションが開示され、ここでS e r 1 2(リン酸化可能)を非リン酸化可能なアミノ酸残基に交換する目的で、1以上の位置指定突然変異誘発がアミノ酸10、11および12位(H i s、S e r、S e r)、すなわちアミノ酸12、アミノ酸12および11、またはアミノ酸12、11および10で行われた。実験結果は数個のバリエーションについてのみ開示され、そして抗凝固活性は活性化部分トロンボプラスチン時間アッセイにおける凝固時間の延長としてみ評価される。

#### 【0021】

たとえ強化された抗凝固活性および/または他の修飾された特性を有するプロテインCバリエーションがすでに開示されても、未だに強化された抗凝固活性および/または治療および/または診断目的に有用となり得る他の有益な特性を現すプロテインCバリエーションの必要性が存在する。

20

#### 【0022】

さらに修飾されたG l a - ドメインおよび修飾されたS P - ドメインの両方を含むプロテインCバリエーション(このバリエーションは分子毎に強化され、時間経過の延長を必要としない抗凝固活性に加えて、強化された膜結合親和性を現す)は、今まで報告されなかった。そのようなバリエーションはより低用量の必要性またはより低い頻度の投与および/または例えば野生型のプロテインCに比べて抗凝固活性の迅速な開始のような利点を提供することができる。上に挙げた特許文献4はセルピンに対して強化された耐性を有するプロテインC誘導体を指し、そして他の改善された特性に加えて、延長された、しかし強化されていない抗凝固活性を有することに注目されたい。

30

【特許文献1】米国特許第A 4 7 7 5 6 2 4号明細書

【特許文献2】国際公開第9 8 / 4 4 0 0 0号パンフレット

【特許文献3】国際公開第9 9 / 2 0 7 6 7号パンフレット

【特許文献4】国際公開第0 1 / 5 9 0 8 4号パンフレット

【特許文献5】国際公開第0 1 / 3 6 4 6 2号パンフレット

【非特許文献1】D a h l b a e c k, J. Clin. Invest. 1994, 94: 923 - 927

【非特許文献2】V e r s t r a e t e and Z o l d h o l y i, Drugs 1995, 49: 856 - 884

【非特許文献3】E s m o n et al., Dev. Biol. Stand. 1987, 67: 51 - 57

【非特許文献4】O k a j i m a et al., Am. J. Hematol. 1990, 33: 277 - 278

【非特許文献5】D r e f y s et al., N. Engl. J. Med. 1991, 325: 1565 - 1568

【非特許文献6】M a r l a r and N e u m a n, Semin. Thromb. Haemostas. 1990, 16: 299 - 309

【非特許文献7】R i v a r d et al., J. Pediatr. 1995, 126

50



: 6 4 6 - 6 5 2

【非特許文献 8】Taylor et al., J. Clin. Invest. 1987, 79: 918 - 925

【非特許文献 9】Bernard, G. R. et al. 重篤な敗血症のための組換えヒト活性化プロテイン C の効力および安全性 (Efficacy and Safety of Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis), New England Journal of Medicine, March, 8, 2001; 344 (10): 699 - 709

【非特許文献 10】Berg et al., Biotechnology, 1993, 14: 972 - 978

【非特許文献 11】Hoyer et al., Vox Sang. 1994, 67: Suppl. 3: 217 - 220

【非特許文献 12】Erllich et al., Embol. J. 1990, 9: 2367 - 2373

【非特許文献 13】Richardson et al., Nature 1992, 360: 261 - 264

【非特許文献 14】Kurz et al., Blood, 1997, 89: 534 - 540

【非特許文献 15】Grinnell et al., J. Biol. Chem., 1991, 266: 9778 - 9785

【非特許文献 16】Rezaie et al., J. Biol. Chem. 1993, 268: 19943 - 19948

【非特許文献 17】J. Biol. Chem., 1996, 271: 23807 - 23814

【非特許文献 18】Shen et al., J. Biol. Chem., 1998, Vol. 273, No. 47: 31086 - 31091

【発明の開示】

【0023】

発明の要約

本発明は、修飾された Gla - ドメインおよび修飾された SP - ドメインを含むプロテイン C の機能的バリエーション (このバリエーションは活性化された時、好ましくは分子毎に強化される強化された抗凝固活性を現す) に関する。本発明のプロテイン C バリエーションの強化された抗凝固活性は本質的に、修飾された Gla - ドメインによる強化されたカルシウムおよび / または膜結合特性、あるいは修飾された SP - ドメインによる強化されたタンパク質分解、適当にはアミド分解活性、または好ましくは両方から発する。さらに該活性は主にプロテイン C チモーゲンの活性形である APC により発現され、該チモーゲンはほとんど不活性である。したがって本発明は修飾された Gla - ドメインおよび修飾された SP - ドメインを含み、そして強化された抗凝固活性を現す APC のバリエーションにも関する。Gla - ドメインはプロテイン C の最初のアミノ - 末端 45 残基を含んでなり、そしてその構造および機能は、以下でさらに詳細に検討する。ヒトに由来するプロテイン C 中の SP - ドメインは、262 アミノ酸残基 (no. 158 ~ 419) を含んでなり、これも以下でさらに詳細に検討する。

【0024】

本発明に従い少なくとも 1 個、しかし好ましくは 1 個より多くのアミノ酸残基の修飾の各 Gla - および SP - ドメインへの導入、適当には少なくとも 4 個、そして特に 7 個以上の修飾を Gla - ドメインに、そして 6 以上の修飾を SP - ドメインに導入することにより、野生型タンパク質に比べて改善された特性を有するプロテイン C または APC バリエーション、そして特に改善された抗凝固活性 (それ自体または活性化された時) を有するバリエーションを提供することが見いだされた。

【0025】

10

20

30

40

50

適当には本バリエーションはそれらのG1a - ドメイン中に10個より多くのアミノ酸修飾を含まず、そしてそれらのSP - ドメイン中に10個より多くのアミノ酸修飾を含まず、そして好ましくはハイブリッドが野生型のプロテインCと高度な相同性を有するほど、他のG1a - ドメインとプロテインCのG1a - ドメインとの間の差異が数個のアミノ酸残基しか構成しないかぎり、プロトロンビンまたは第X因子に由来するG1a - ドメインを有するハイブリッドプロテインCバリエーションのような異なるビタミンK - 依存性タンパク質間のハイブリッドは包含しない。同様に、SP - ドメインおよびプロテインCの残りが異なる種に由来するハイブリッドは通常、本発明に包含しない。

#### 【0026】

より一層強化された抗凝固活性のような改善された特性を現す本発明のプロテインCバリエーションは、例えば治療目的に使用する時、投薬用量または投与頻度を下げることにより利点を提供することができる。

#### 【0027】

また本発明は、DNA技術に基づきそのようなバリエーションを生産する方法、該方法での使用を意図するDNAセグメント、および治療および/または診断目的のための該バリエーションの使用に関する。

#### 【0028】

本発明に従い、野生型物質の抗凝固活性に比べて強化された抗凝固活性とは、分子あたり強化された活性を意味し、例えば分子を安定化することにより時間経過が延長される必要はないことを意味する。

発明の詳細な説明

#### A. プロテインCの分子配列

プロテインC分子は4種の型のモジュールまたはドメインからなる。アミノ末端からカルボキシ末端の方向に、G1a - モジュール、2つのEGF - 様モジュール、すなわち上皮増殖因子相同体モジュール、および最後に典型的なセリンプロテアーゼ (SP) モジュールからなる。血漿では、循環しているほとんどのプロテインCが、限定タンパク質分解により1本鎖前駆体から生じる、成熟した2本鎖のジスルフィド結合したプロテインCチモーゲンからなる。これらの2本の鎖は20kDaの軽鎖 (これはG1a - およびEGF - モジュールを含む) とSP - モジュールを構成する40kDaの重鎖である。トロンボモジュリンに結合したトロンビンによる活性化中、Arg - Leu (残基169および170) のペプチド結合が重鎖のN - 末端部分で開裂され、そして12個のアミノ酸残基 (残基158 ~ 169) を含んでなる活性化ペプチドが放出される。本発明と関連して、プロテインCおよびそのバリエーションのアミノ酸配列中の残基の番号付けは、成熟プロテインCに基づく。

#### 【0029】

プロテインCのアミノ酸配列は、対応するcDNAヌクレオチド配列から推定され、そして技術文献に報告された。さらにプロテインCに関するcDNAヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列は、HSPROTと命名されたヒトプロテインCについて寄託番号X02750で、およびBTBCと命名されたウシプロテインCについて寄託番号K02435で、EMBL遺伝子データベースから利用可能である (ハイデルベルグ、ドイツ)。

#### 【0030】

上に述べたように、ビタミンK - 依存性タンパク質のG1a - ドメインは、N - 末端45アミノ酸残基を含んでなる。すなわち全G1a - ドメインのアミノ酸配列は、ヒトおよびウシプロテインCのようなタンパク質について知られており、その全アミノ酸配列またはそのN - 末端部分 (45残基) が決定された。上記のデータベースの配列に基づき、ヒトプロテインCおよびウシプロテインCのG1a - ドメインは、以下のように具体的に説明することができる (それぞれ配列番号1および配列番号2)。

#### 【0031】

10

20

30

40

## 【表 1】

ANSFLEELRH SSLERECIEE ICDFEEAKEI FQNVDDTLAF WSKHV (配列番号:1)

ANSFLEELRP GNVERECSEE VCEFEEAREI FQNTEDTMAF WSKYS (配列番号:2)

## 【0032】

同様に、SP - ドメインのアミノ酸配列（それぞれヒトおよびウシ）は、これらデータベースの配列から得られ、ここでヒトプロテインCのSP - ドメインは、アミノ酸残基no. 158 ~ 419を含んでなり、そしてウシSP - ドメインは、アミノ酸残基158 ~ 417を含んでなる。好ましくはSP - ドメイン中の修飾はヒトSP - ドメインのアミノ酸no. 290と320との間およびその全てを含むアミノ酸残基の範囲に位置し、該範囲は以下のアミノ酸配列：

## 【0033】

## 【表 2】

QAGQETLV TG WGYHSSREKE AKRNRTFVLN F (配列番号:3)

## 【0034】

に対応する。

## 【0035】

ウシプロテインCのSP - ドメイン中、アミノ酸no. 292と318との間およびその全てを含む、対応するがより短いアミノ酸範囲は、以下のアミノ酸配列：

## 【0036】

## 【表 3】

QVGQETVV TGW GYRDETKRNR TFVLSF (配列番号:4)

## 【0037】

を有する。

## 【0038】

Gla - ドメイン中の修飾標的の選択に関連して、個々の配列間（異なるビタミンK依存性タンパク質に由来、および/または異なる種に由来する）の類似性および片寄りに関して、そのようなN - 末端配列の比較は、突然変異誘発（すなわち修飾）標的として適する可能性があるプロテインCのGla - ドメイン中の位置を示すことができる。そのような比較について、Gla - ドメインの全アミノ酸配列を知る必要はなく、抗凝固活性に潜在的に重要な位置のアミノ酸残基が決定されていれば十分となるだろう。異なる種、例えばヒトとウシとのSP - ドメイン間のプロテインC中のSP - ドメイン、またはそれらの特別な部分の配列の同様の比較は、適切な突然変異誘発標的となり得るSP - ドメイン中の位置を示すことができる。

## 【0039】

本発明と関連して、アミノ酸に関する略号として通常の1文字または3文字記号を以下の対応表に示すように使用する：

## 【0040】

10

20

30

40

【表 4】

## 対応表

記号			
1-文字	3-文字	アミノ酸	
Y	Tyr	チロシン	
G	Gly	グリシン	
F	Phe	フェニルアラニン	10
M	Met	メチオニン	
A	Ala	アラニン	
S	Ser	セリン	
I	Ile	イソロイシン	
L	Leu	ロイシン	
T	Thr	トレオニン	
V	Val	バリン	20
P	Pro	プロリン	
K	Lys	リシン	
H	His	ヒスチジン	
Q	Gln	グルタミン	
E	Glu	グルタミン酸	
Z	Glx	Gluおよび/またはGln	
W	Trp	トリプトファン	30
R	Arg	アルギニン	
D	Asp	アスパラギン酸	
N	Asn	アスパラギン	
B	Asx	Asnおよび/またはAsp	
C	Cys	システイン	
J	Xaa	未知またはその他	

40

## 【0041】

## B. プロテインCのバリエーション

上に述べたように、本発明は組換えプロテインCの機能的バリエーションに関し、該バリエーションは修飾されたG1a-ドメインおよび修飾されたSP-ドメインを含み、そして該バリエーションは強化された抗凝固活性を表す。これらのバリエーションは1個以上、適当には数個の、そして好ましくは10～15個のアミノ酸残基について野生型組換えプロテインCとは異なり、該残基は対応する野生型配列のG1a-ドメインおよびSP-ドメイン中の両方に挿入され、削除されまたは置換（すなわち置き換え）されており、これにより本発明のプロテインCバリエーションを生じる。該差異はプロテインCのAPCへの活性化後にも維持されるので、本発明は強化された抗凝固活性を有するAPCバリエーションにも関する。本

50

発明の適切な態様に従い、G1a - ドメイン中の修飾（１つまたは複数）は、置換（１つまたは複数）であり、そしてSP - ドメインは少なくとも１つの置換および少なくとも１つの削除を含む。

【0042】

現在、そのようなバリエーションは突然変異誘発法、特にオリゴヌクレオチドプライマーの使用を含む位置指定突然変異誘発法により都合よく得られる。しかし本発明はこれらのバリエーションを得る様式にかかわらず機能的バリエーション自体に関する。

【0043】

PCとAPCとの間の緊密な関係の観点から、しばしば本発明と関連してPCとAPCとの間で明確な区別はせず、しかしPC/APCの名称を使用し、そしてこれら物質の１つまたは両方を考察すれば、内容は明らかとなるだろう。さらにプロテインCチモージェンはほとんど不活性であり、すなわちプロテインCの強化された抗凝固活性は、該チモージェンのインビボまたはインビトロでの活性化後にのみ本質的に現れる。したがって本発明と関連して「強化された抗凝固活性を現すプロテインCバリエーション」等の表現は、この強化された活性がプロテインC（チモージェン）バリエーションの活性化後に現れるか、または該バリエーションがAPCバリエーションであることを意味する。

10

【0044】

本発明と関連して「バリエーション」という表現は、一般に野生型分子と比べて高度な相溶性、適当には少なくとも90%の相溶性を有する変異体分子のような修飾された野生型分子を意味する。

20

【0045】

したがって、そのようなバリエーションは野生型物質に関する実質的相溶性を保存するために、適切にはわずかな修飾されたアミノ酸残基、そして可能ならばわずか１個のアミノ酸残基を各G1a - およびSP - ドメインに包含する。これは処置に使用するバリエーションに対する可能な免疫応答を回避し、または少なくとも減らすために、インビボでの処置について本バリエーションの使用と関連して特に重要である。

【0046】

このように製薬学的目的には、好ましくは本バリエーションは対応する野生型物質と実質的に相同的であり、そして点突然変異、例えば１もしくは数個の単一アミノ酸残基の置換、削除および/または挿入を該各ドメインに含むだけである。好ましくはバリエーションは該各ドメインに１個より多くのアミノ酸残基の修飾を含み、そしてインビボの使用には多くて最高10個以上のアミノ酸残基修飾を該各ドメインに含むことができる。

30

【0047】

したがってPC/APCの適切なバリエーションは、野生型の成熟PC/APCと高度、すなわち少なくとも90%、適切には少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%、そして特別には少なくとも98%のアミノ酸配列の同一性を有する。

【0048】

本発明の診断的態様と関連して、高度な相溶性はもちろんそれほど重要ではないが、主要な要件は機能的バリエーションが１以上の所望する活性を、野生型タンパク質と比べて強化されたレベルで現すことである。

40

【0049】

製薬学的目的には、本発明の好適な態様はヒトPC/APCバリエーションに関する。しかしまた本発明は、修飾されたG1a - ドメインおよび修飾されたSP - ドメインにより強化された膜結合特性および強化された抗凝固活性を有する、マウスもしくはラット起源のバリエーションのような哺乳動物起源、例えばウシ起源またはマウス起源の他のPC/APCバリエーションに関する。

【0050】

上記のように、G1a - ドメインまたはG1a - モジュールはビタミンK依存性タンパク質ファミリーに特異的であり、その員は特異的タンパク質モジュール（該G1a - モジュール）を含み、ここでグルタミン酸（E）残基が - カルボキシグルタミン酸残基（G

50

1 a) に修飾される。この修飾は、ビタミン K を使用してプロテイン C 前駆体のグルタミン酸残基の側鎖をカルボキシル化する酵素により肝臓で行われる。配列では (配列番号 1 および 2)、ヒトおよびウシプロテイン C の G 1 a - ドメインについてそれぞれ上記を仮定し、E 残基はこのように循環しているタンパク質では G 1 a - 残基に転換されている。

#### 【0051】

G 1 a - ドメインは、ビタミン K - 依存性タンパク質の最初のアミノ末端 45 残基を含んでなり、そしてカルシウムに結合し、そして負に荷電したプロコアグラント (procoagulant) リン脂質に結合する能力を持つタンパク質を提供する。さらに F V a および F V I I I a のタンパク質分解において、活性化プロテイン C (APC) の機能に極めて重要な膜接触部位が該 G 1 a - ドメインに含まれ、APC の活性は APC と他のタンパク質、すなわち第 V 因子およびプロテイン S コファクターとの膜表面上の会合で現れる。しかし種々のビタミン K - 依存性タンパク質の G 1 a - 含有領域間の高度な配列相同性にかかわらず、これらのタンパク質は広い範囲の膜親和性を表す。これは低い親和性タンパク質であるプロテイン C、例えばヒトプロテイン C の膜親和性を修飾し、そしてより具体的には強化することが可能となることを示している。

10

#### 【0052】

このために、高親和性ビタミン K 依存性タンパク質の構造は、Shen et al. (同上) に示唆されるように、膜結合親和性、すなわちプロテイン C のような低親和性タンパク質の抗凝固活性を強化することができる修飾の可能性を示唆するための鋳型として役立つことができる。例えば位置指定突然変異誘発法を野生型プロテイン C に行って、プロテイン Z のような高親和性ビタミン K 依存性タンパク質の構造に近づく構造を有するプロテイン C バリエーションを生産することができる。

20

#### 【0053】

しかしすべてのビタミン K 依存性タンパク質に有効であり、そして強化された膜結合親和性を生じることができるアミノ酸修飾の可能な位置を予測する静電的分布について、共通の原型の存在が国際公開第 99/20767 号パンフレットに示唆されているが、この原型は G 1 a - ドメインの数個の位置、すなわち 10、11、28、32 および 33 (本発明に関連して使用する番号付けに従う) に関するだけである。さらに Shen et al. (同上) に報告されているように、プロテイン C は独特な特徴を有し、そして必ずしもそのような共通の仮説に当てはまらないことが示された。

30

#### 【0054】

プロテイン C の S P - ドメインは、APC - インヒビター、例えば 1 A T (アルファ 1 - アンチ - トリプシン) および P C I (プロテイン C インヒビター) 中の配列と相互作用する配列、および F V a または F V I I I a 中の配列と相互作用する配列も含む。APC / P C のそのような配列は、分子毎に強化される抗凝固活性を有し、そして場合によってはセルピンおよび他の APC - インヒビターに耐性でもある APC / P C バリエーションを生成するために行う位置指定突然変異誘発法の推定上の標的を構成する。

#### 【0055】

本発明に従い、修飾 (1 つまたは複数) がプロテイン C の G 1 a - ドメインおよび S P - ドメインの両方に導入されて、強化された膜結合親和性または強化された抗凝固活性および好ましくは両方のようなインビボおよびインビトロでの改善された特性を現すと同時に、繊維溶解および抗炎症活性のような他の望ましい生物学的特性を維持するバリエーションプロテイン C を生成することが予期せずに見いだされた。

40

#### B (1) G 1 a - ドメインの修飾

この章では、G 1 a - ドメインにおける適切な修飾を開示する。これにより得られる修飾されたバリエーションは、さらに以下の B (2) に開示するように、それらの S P - ドメイン中にも少なくとも 1 つの修飾を含む。

#### 【0056】

本バリエーションは G 1 a - ドメイン中に置換 (置き換え)、削除または挿入 (付加) のよ

50

うな少なくとも１個、適切には少なくとも４個、例えば４～６個または７～１０個のアミノ酸修飾（１つまたは複数）を含む。

【００５７】

本発明の１つの観点に従い、G1a - ドメイン中の該少なくとも１つのアミノ酸修飾は、プロテインCのG1a - ドメインの任意の位置で、１つのアミノ酸残基の別のアミノ酸残基への置換である。本発明のさらなる観点に従い、該位置は１０、１１、２８、３２または３３位以外の位置である。本発明の適切な態様に従い、該少なくとも１つのアミノ酸修飾は、２３または４４位に位置する。

【００５８】

本発明のさらなる観点は、上記の少なくとも１つのアミノ酸修飾がD23SおよびH44Yから選択される置換突然変異であるプロテインCバリエーションに関する。

【００５９】

本発明の１つの態様は、上記の少なくとも１つのアミノ酸修飾がアミノ酸残基no. 1～9、13～27、29、30、31および34～45からなる群から選択される位置、またはアミノ酸残基no. 1～3、5～7、9、12～27、29～31および36～45からなる群から選択される位置に位置するプロテインCバリエーションに関する。

【００６０】

本発明の他の態様は、G1a - ドメイン中の該少なくとも１つのアミノ酸修飾がアミノ酸残基no. 10、11、12、23、32、33および44から選択される位置に位置するプロテインCバリエーションに関する。適切には１より多くの、そして好ましくはすべてのアミノ酸残基10、11、12、23、32、33および44が例えば置換により修飾されている。

【００６１】

本発明の１つの観点に従い、該少なくとも１つのアミノ酸修飾は、１つの修飾以外の１以上のアミノ酸修飾、あるいは配列E10G11E32D33、Q10G11E32D33、G11N12E32D33、G11E32D33、E32D33およびE32中で定められる修飾の組み合わせを含んでなる。共通する実施に従い、例えばE32D33は32位でEが野生型残基（Q）から置き換えられ、そして33位でDが野生型（N）から置き換えられた突然変異した配列を意味する。あるいは本バリエーションはG1a - ドメイン中に１以上のこれら修飾（直前に述べた）、およびSP - ドメイン中の少なくとも１つ、そして適切には１より多くの修飾を含むことができる。場合によりそのようなバリエーションはG1a - ドメイン中に少なくとも１つのさらなる修飾、例えばY44も含む。

【００６２】

さらに一層強化された抗凝固活性を有する具体的なヒトプロテインCバリエーションは、すべての置換突然変異H10Q、S11G、S12N、D23S、Q32E、N33DおよびH44Yを含む。このようにSP - ドメイン中の少なくとも１つの修飾に加えて、このプロテインCバリエーションは、以下のアミノ酸配列：

【００６３】

【表５】

ANSFLEELRQGNLERECIEE ICSFEEAKEI FEDVDDTLAF WSKYV (配列番号:5)

40

【００６４】

を有する修飾されたG1a - ドメインを有する。

【００６５】

本発明の別の観点は、G1a - ドメイン中に単一の突然変異として１以上の前記置換を含むプロテインCバリエーション、および適切には置換S11G、S12N、Q32EおよびN33Dを含むバリエーションに関する。

B(2) SP - ドメインの修飾

本発明に従い、G1a - ドメイン中の１以上の修飾は、SP - ドメイン中の少なくとも

50

1つの修飾と組み合わされる。

【0066】

ヒトPCの機能におけるグリコシル化の役割に関するGrinnell et al. (同上)の研究、および国際公開第98/44 000号パンフレットを除いて、このモジュール、すなわちPC/APC分子のセリンプロテアーゼ(SP)モジュール中の1以上の突然変異が、強化されたタンパク質分解および分子毎に強化される抗凝固活性を導くことを示す従来技術の参考文献は無い。しかし一方では以前に、ヒトAPCが幾つかのセルピン、すなわち蛇毒タンパク質により、プロテインCインヒビター(PCI)により、およびアルファ1-アンチ-トリプシン(1AT)により阻害されることが知られ、さらに他方では、ウシAPCが1ATにより阻害されないことが知られていた。この現象を理解するための努力では、Holly and Foster (Biochemistry, 1994, 33: 1876-1880)がヒトとウシのプロテインC間のハイブリッド分子を構築し、そしてプロテインCのSP-モジュール中のどこか異なる残基について、分子的背景を示すことができた。しかしこの報告からはSP-モジュール中の突然変異が強化されたタンパク質分解および抗凝固活性を導くことをそこに示唆していないし、またはそれらから明らかではない。たとえHolly and Fosterが、PCバリエントが修飾されたSPドメイン(ここでアミノ酸残基no. 300~314は以下に開示する配列番号6と同じである)を含むと実際に解釈しても、彼らはこのバリエントのいかなる強化された抗凝固活性も、延長された抗凝固活性さえも開示しなかった。

10

【0067】

本発明者は、ヒトおよびウシAPCと1ATとの異なる反応性の原因であるSP-モジュール中の部位を厳密に同定することを企図して、さらに詳細にSP-モジュールを研究した。これらの研究に関連して、ヒト野生型プロテインC中の残基番号300と314の間(およびその全てを含む)のアミノ酸配列がタンパク質分解およびアミド分解活性、すなわちPC/APCの抗凝固活性に必須であり、そしてこのアミノ酸範囲中に突然変異(1つまたは複数)を導入することは、野生型物質に比べてより高速で該活性を現すPC/APCの機能的バリエントを生じることが全く予期せずに見いだされた。この知見は上に引用した国際公開第98/44 000号パンフレットの主題である。

20

【0068】

たゆまぬ科学実験、分析および革新を通じて、本発明者はSP-ドメイン中の修飾(1つまたは複数)とGla-ドメイン中の修飾(1つまたは複数)とを組み合わせ、Gla-ドメインおよびSP-ドメインの両方の中に突然変異を含み、そして強化された膜結合親和性および強化されたタンパク質分解および/またはアミド分解活性、すなわち強化された抗凝固活性を現すと同時に、他の望ましい特性を維持するPCバリエントを生成することが可能であることを見いだした。

30

【0069】

このように本発明の適切な態様は、強化されたタンパク質分解および抗凝固活性を発現するPC/APCの機能的バリエントを対象とし、このバリエントは上で検討した修飾されたGla-ドメインに加えて、1以上の突然変異をSP-モジュール中にも含む点で野生型PC/APCとは異なる。特別な態様に従い、本発明はPC/APCのバリエントを企図し、ここでSP-モジュール中の突然変異(1つまたは複数)、適当には点突然変異(1つまたは複数)は、野生型ヒトプロテインCの残基番号290~320、そして適切には残基番号300~314からなるアミノ酸範囲内に位置する。

40

【0070】

ヒトPC/APCでは、残基番号300~314からなる上に挙げた配列は、アミノ酸に関する1文字暗号を使用した配列WGYHSSREKEAKRNR(配列番号6)を含んでなる。本発明の1つの好適な態様は、Gla-ドメイン、および該アミノ酸配列(配列番号6)に含まれる突然変異(1つまたは複数)を除いて野生型PC/APC分子と同一のアミノ酸配列を有するヒトPC/APCバリエント対象とし、SP-ドメイン中の突然変異した配列はWGYRDETKRNR(配列番号7)を含んでなる。

50



## 【0071】

野生型分子中の突然変異の位置は、以下に表示する突然変異した配列：W G Y . . . R D . E T K R N R（配列番号7）から明らかであり、ここで点は削除されたアミノ酸を具体的に示し、そして置換には下線を付す。このようにこの特別な態様のP C / A P C バリエーションは、野生型のP C / A P C モジュールと比較して4個のアミノ酸残基が短縮化され、そして2つの置換を含むS P モジュール中のアミノ酸範囲を含む。

## 【0072】

このように本発明の適切な態様は、G l a - ドメイン中に少なくとも1つの修飾を含み、そしてS P - モジュール中のアミノ酸残基300～314からなる範囲内に削除および置換突然変異を含むP C / A P C バリエーションに関する。好ましくはアミノ酸残基n o . 303、304、305および308が削除され、そしてアミノ酸残基n o . 307および310が置換されて（E 307 D / A 310 T）、配列番号7の突然変異した配列を含んでなる上に挙げたP C / A P C バリエーションを生成する。したがって該配列内に突然変異を含む好適なバリエーションは、配列番号6の配列により表される野生型の配列の代わりに配列番号7の配列により表される突然変異した配列をS P - ドメイン中に含む。

10

B（3）G l a - ドメインおよびS P - ドメイン中の修飾

本P C バリエーションはG l a - ドメインに少なくとも1つの修飾を、そしてS P - ドメインに少なくとも1つの修飾を含み、そして適当には各ドメインに1より多くの修飾を含む。より詳細には本発明はB（1）で述べたようなG l a - ドメイン中の修飾を、そしてB（2）で述べたようなS P - ドメイン中の修飾を有するP C バリエーションに関する。本バリエーションはこれらの修飾を任意の組み合わせで含むことができる。さらに具体的に述べたアミノ酸置換を、同じ効果を提供する他の置換に置き換えることができ、すなわち同様な特徴の他のアミノ酸残基を使用して野生型の残基を置き換えることができる。さらに削除、付加または置換突然変異を加えることができ、この突然変異は本発明の基本的特徴に影響を及ぼさない変化を生じる。そのような修飾は以下のB（4）章の突然変異誘発法の考察から明らかである。例えば野生型アミノ酸残基をB（4）章に掲げる群1から選択される具体的アミノ酸へ置換することは、該野生型残基をこの群に属する他の任意のアミノ酸残基へ置換することに代えることができる。

20

## 【0073】

本発明の適当な態様は、G l a - ドメイン中の10、11、12、23、32、33および44位に置換を有し、そしてS P - ドメイン中の290から320位の間および全てを含む、好ましくは300から314位の間および全てを含むアミノ酸範囲に、そしてより特別には303、304、305、307、308および310位に突然変異を含むプロテインCバリエーションに関する。他の適切なプロテインCバリエーションは、303から310位の間および全てを含むアミノ酸範囲内、または302から316位の間および全てを含むアミノ酸範囲内に修飾を含む。S P - ドメイン中の適切な修飾は、場合によっては少なくとも1つの置換と一緒に削除である。

30

## 【0074】

1つの好適な態様に従い、プロテインCバリエーションはG l a - ドメイン中に置換H 10 Q、S 11 G、S 12 N、D 23 S、Q 32 E、N 33 DおよびH 44 Yを、そしてS P - ドメインの303、304、305および308位に削除および置換E 307 DおよびA 310 Tを含む。ここで該バリエーションはしばしば「スーパー - A P C」と呼ぶ。さらなる態様に従い、プロテインCバリエーションはスーパー - A P Cと同じS P - ドメイン突然変異を含むが、G l a - ドメインは置換S 11 G、S 12 N、Q 32 EおよびN 33 Dのみを含む。

40

## 【0075】

組み合わせて強力に強化された抗凝固活性を有するP C / A P C バリエーションを生成することができるS P - ドメイン中およびG l a - ドメイン中の他の突然変異を以下で検討する。

## 【0076】

50

S Pドメイン中の突然変異は少なくともわずかに上昇した抗凝固活性、および場合により強化されたアミド分解活性を伴うはずである。主要な例は本明細書中ですでに記載したS P変異体である(B(2)章)。しかし多くの他のバリエーションを、プロテインC中のこの領域、すなわちセリンプロテアーゼドメイン中の所謂148ループを含んでなる300~314アミノ酸残基の領域の突然変異誘発により作成することができる。

【0077】

G1a - ドメイン中の突然変異も多くの異なる突然変異を含んでなることができるが、原理的にはそれらは自身により強化、または改変されたリン脂質 - 結合能をもたらすはずである。G1aドメイン中の適当な突然変異はその幾つかが本明細書にすでに記載され、それらにはE32; E32D33; G11; Q10G11; G11N12; Q10G11N12; S23; S23E32D33Y44、Q10G11E32D33、G11N12E32D33、Q10G11N12S23E32D33Y44を含むが、多くの他のバリエーションも可能である。G1a - ドメインを突然変異させるために挿入する問題の位置は、このようにNo. 10、11、12、23、28、32、33、34、35および44を含む。

10

【0078】

原理的には、本明細書中および従来技術ですでに検討したありとあらゆるG1a - ドメインバリエーション、およびこれまでの既知の突然変異、例えばGrinnell et al. (同上)にすでに記載された炭水化物に影響を及ぼす突然変異および/または国際公開第01/59084号パンフレットに開示された突然変異をさらに含むようなバリエーションも、B(2)および以下に開示するS P突然変異と一緒に使用することができる。

20

【0079】

本明細書に特別に記載する1つのS P変異体は、この領域、すなわちWGYHSSREKEAKRNR(配列番号6)中のwtヒトプロテインC配列に比べて、配列WGY...RD...ETKRNR(配列番号7)を含む。ループは短縮されるべきであるという考えに基づき、多数の選択的突然変異を以下に掲げる。

【0080】

【表 6】

## アミノ酸残基の削除:

アミノ酸配列	削除の位置	配列番号	
WGY.SSREKEAKRNR	303	8	
WGYH.SREKEAKRNR	304	9	
WGYHS.REKEAKRNR	305	10	
WGYHSS.EKEAKRNR	306	11	
WGYHSSR.KEAKRNR	307	12	
WGYHSSRE.EAKRNR	308	13	
WGYHSSREK.AKRNR	309	14	10

## 二重削除:

アミノ酸配列	削除の位置	配列番号	
WGY..SREKEAKRNR	303,304	15	
WGYH..REKEAKRNR	304, 305	16	
WGYHS..EKEAKRNR	305, 306	17	
WGYHSS..KEAKRNR	306, 307	18	
WGYHSSR..EAKRNR	307, 308	19	
WGYHSSRE..AKRNR	308, 309	20	20

## 三重削除:

アミノ酸配列	削除の位置	配列番号	
WGY...REKEAKRNR	303, 304, 305	21	
WGYH...EKEAKRNR	304, 305, 306	22	
WGYHS...KEAKRNR	305, 306, 307	23	
WGYHSS...EAKRNR	306, 307, 308	24	
WGYHSSR...AKRNR	307, 308, 309	25	

## 他のバリエーション:

アミノ酸配列	削除の位置	置換位置/残基	配列番号	
WGY... RE . EAKRNR	303, 304, 305, 308		26	
WGY... RE . ETKRNR	303, 304, 305, 308	310T	27	30
WGYH . . . . REAKRNR	304, 305, 306, 307	308R	28	
WGY . . . KE . EAKRNR	303, 304, 305, 308	306K	29	
WGY . . . KD . EAKRNR	303, 304, 305, 308	306K, 307D	30	
WGY . . . KE . ETKRNR	303, 304, 305, 308	306K, 310T	31	
WGY... RQ . ETKRNR	303, 304, 305, 308	307Q, 310T	32	
WGY... RQ . EAKRNR	303, 304, 305, 308	307Q	33	

## 【0081】

40

以下の方法に従い、可能な大変多数の変化が存在する。理論的には、これらは削除または置換に供する7個のアミノ酸残基の無作為な変化を可能とする現代の分子生物学的道具を介して見いだすことができる。スクリーニングは合成基質に対して強化された触媒活性を生じる興味深い変異体の能力に基づき構築することができる。

## 【0082】

修飾することができるSP-ドメイン中の他の位置は、302および316位である。これらの位置でwtアミノ酸はSer、Ala、Thr、His、Leu、Lys、Arg、Asn、Asp、Glu、GlyおよびGlnから選択されるアミノ酸と置換することができ、例えば置換はY302QまたはY302Eである。

## 【0083】

50

上で述べたように、修飾された、すなわち G l a - ドメインに少なくとも 1 つの修飾を、そして S P - ドメインに少なくとも 1 つの修飾を含むバリエーションまたは変異体である本発明の P C / A P C は、強化された膜結合親和性および強化されたタンパク質分解および / またはアミド分解活性、すなわち強化された抗凝固活性を有する。そのような抗凝固活性は、すなわち本バリエーションがインビトロの標準的な凝固アッセイにおいて凝固時間を上昇させる能力として決定することができる。強化された抗凝固活性は、血漿に由来するか、または組換え D N A 技術により得ることができる野生型 P C / A P C と比べて測定される。このように本発明に従い有用となるには、P C / A P C バリエーションは野生型物質の抗凝固活性よりも高い抗凝固活性を現すべきである。適当には本バリエーションは少なくとも約 5 0 %、そして適切には少なくとも約 1 0 0 % 強化された抗凝固活性を現す。好適な P C / A P C バリエーションは、野生型のプロテイン C よりも約 4 0 0 % 以上、例えば 1 0 0 0 % まで、またはさらに 3 0 0 0 % まで強化された抗凝固活性を現す。

10

#### 【 0 0 8 4 】

強化された膜結合とは別に、G l a - ドメイン中の突然変異は他の改善された特性も提供することができることを構想する。例えば G l a - ドメインは幾つかの他のタンパク質との相互作用に関する部位を有するので、G l a - ドメインはおそらくプロテイン S および第 V および V I I I 因子と相互作用することができる。このようにこれらのタンパク質との相互作用は、G l a - ドメイン中の突然変異により改善され得ると構想する。

#### 【 0 0 8 5 】

上で述べたように、本バリエーションは好ましくは対応する野生型物質と高度な相同性を有する。すなわち本バリエーションは好ましくは点突然変異、すなわち 1 または数個の単一アミノ酸残基の置換、削除および / または挿入のみを含む。

20

#### 【 0 0 8 6 】

本発明の好適な態様は、ヒト P C / A P C バリエーションに関する。しかし本発明は、マウスおよびラットのような哺乳動物起源、例えばウシおよびマウスの強化された抗凝固活性を有する P C / A P C バリエーションに関する。

#### 【 0 0 8 7 】

本発明の別の態様に従い、これらのバリエーションがさらに野生型物質に比べて強化された抗凝固活性を有するならば、バリエーションはプロテイン C について前に記載した 1 または数個の突然変異をさらに含むことができる。そのような突然変異は G l a - ドメイン、S P - ドメインおよび / またはプロテイン C 分子の他のドメインに位置することができる。

30

#### 【 0 0 8 8 】

本修飾は A P C 中の活性部位の修飾と組み合わせてもよい。A P C の活性部位は、活性部位の位置指定突然変異誘発法により、または例えば N - ダンシル - グルタミル - グリシル - アルギニル - クロロメチル - ケトンにより化学的に不活性化することができる。S o r e n s e n e t a l . , 1 9 9 7 , J . B i o l . C h e m . , 2 7 2 : 1 1 8 6 3 - 1 1 8 6 8 を参照にされたい。活性化部位が修飾された A P C はプロトロンビナーゼ複合体のインヒビターであるので、強化された膜親和性を現す活性化部位が修飾された A P C は、治療的に有利な A P C バリエーションを提供する。

40

#### B ( 4 ) 突然変異誘発法

当業者には置換以外の G l a - ドメイン中の修飾および削除以外の修飾および S P - ドメイン中の置換が、上記のように改善された特性を有するプロテイン C バリエーションを提供することが明らかである。さらに本明細書に具体的に挙げた置換以外の置換もそのような改善されたバリエーションを提供することができる。そのような置換は保存的または非保存的である。共通の側鎖特性に基づき、自然に存在する残基は以下の種類に分類される：

- 1 ) ノルロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u および I l e を含んでなる疎水性残基；
- 2 ) C y s、S e r および T h r を含んでなる中性の疎水性残基；
- 3 ) A s p および G l u を含んでなる酸性残基；
- 4 ) A s n、G l n、H i s、L y s および A r g を含んでなる塩基性残基；

50

5) GlyおよびProを含んでなる鎖の方向に影響を及ぼす残基；および

6) Trp、TyrおよびPheを含んでなる芳香族残基。

非保存的置換はこれらの1種類の員が別の種類の員に置き換えることを含み、一方、保存的置換はアミノ酸残基を同じ種類の員と置き換えることを含むことができる。置換突然変異誘発法に興味深い位置は、異なる種に由来する野生型プロテインCに見いだされるアミノ酸残基が、例えば側鎖の嵩、荷電および/または疎水性に関して異なる位置を含む。しかし興味深い他の位置は、特定のアミノ酸残基が少なくとも幾つかの異なる種間では異ならず、同一であるような位置であり、なぜならばそのような位置は生物学的活性に潜在的に重要であるからである。最初に候補位置を比較的保存的な様式で置換する。次いでそのような置換が生物学的活性に変化をもたらす場合、より実質的な置換を導入し、かつ/または付加、削除または挿入のような他の修飾を作成し、そして生じたバリエーションを生物学的活性についてスクリーニングする。

10

#### 【0089】

アミノ酸配列の保存的置換または修飾は、野生型プロテインCに類似する機能的および化学的特徴を有するバリエーションを生じることが期待できるので、適切には本プロテインCバリエーションは少なくとも1つの非保存的置換、例えば塩基性残基の代わりに芳香族残基への、または酸性残基の代わりに塩基性残基への置換を含む。

#### 【0090】

修飾した、すなわちバリエーションもしくは変異体である本発明のPC/APCは、強化された抗凝固活性を有するので、生物学的活性に関する上記のスクリーニングは、抗凝固活性の測定に適切に関連する。そのような抗凝固活性はi. a.、本バリエーションが標準的なインビトロ凝固アッセイにおいて凝固時間を上げる能力として決定することができる。強化された凝固活性は、血漿に由来するか、または組換えDNA技術により得られる野生型PC/APCに対する比較で測定される。このように本発明に従い有用となるには、PC/APCバリエーションは野生型の物質の抗凝固活性よりも高い抗凝固活性を現すべきである。適当には本バリエーションは野生型のプロテインCよりも少なくとも約400%以上、例えば1000%まで、またはさらに3000%まで強化された抗凝固活性を現す。

20

#### 【0091】

上記の、そして類似の原理に基づき、本発明のバリエーションのGla-ドメイン(配列番号5)中の好適な突然変異を決定した。より詳細にはMacDonald et al (Biochemistry 1997; 36: 5120-5127)による理論的文献で、すべてが既知のGla-ドメインの配列が比較され、そしてこれらGla-ドメインが負に荷電したリン脂質に結合する能力を持つ配列と関連させることを試みた。この分析から、種々のGlaドメインの中でも負に荷電したリン脂質に関する親和性に関する大きな変動が、主に10および32および33位の残基周辺のアミノ酸配列の差異に関連することが示唆された。

30

#### 【0092】

Shen et al (J Biol Chem 1998, 273: 31086-31091)による以前の文献では、数個の異なる変異体を作成され、そしてMacDonald et alの理論的考察に従い試験された。これらの変異体に関する共通のテーマは、11位をセリン(S)からグリシン(G)に、そして32位をグルタミン(G)からグルタミン酸(E、成熟タンパク質ではGlaに転換されるだろう)に、そして33位をアスパラギン(N)からアスパラギン酸(D)へ変えることであった。さらに10および12位をその時点で1つ、一緒にではなく変えた。すなわち試験した変異体はG11E32D33(GED)、E32D33(ED)およびE32(E)に加えて、E10G11E32D33(EGED)、Q10G11E32D33(QGED)、G11N12E32D33(GNED)であった。

40

#### 【0093】

QGEDおよびGNEDは抗凝固物質として本質的に等しく効果的であり、そして両方がwtAPCよりも抗凝固的であることが観察された。wtAPCと比較して、両方の変

50

異体が優れた様式で負に荷電したリン脂質を含むリン脂質小胞に結合し、そしてまた  $\text{Ca}^{2+}$  にも強固に結合した。たとえその試験の最も効率的な変異体が wt APC よりも抗凝固的であっても、これは低濃度のリン脂質を使用した時にのみ見いだされた。すなわちたとえ APC の改善された酵素活性が使用したすべての膜について増加した膜親和性と関連したことが見いだされても、負に荷電したリン脂質に関する APC の強化された親和性は、低濃度の負に荷電したリン脂質で APC の抗凝固（酵素）活性を改善しただけであることを示唆した。

#### 【0094】

Shen et al (J Biol Chem 1998, 273:31086-31091) の研究により刺激されて、本調査を開始した。この考えは 10、11 および 12 位での突然変異を 1 つのパリアントに組み合わせ、そして加えて 23 および 44 位での突然変異が変異体 APC の効力に影響を及ぼすことができるかどうかを試験することにより、恐らくより効率的な突然変異を作成することができるということであった。32 および 33 位は Shen et al. による研究から重要であると考えられたが (J Biol Chem 1998, 273:31086-31091)、これは示されて無かった。Shen et al. により試験された変異体、すなわち GED、ED (32、33 位) および E (32 位) に加えて EGED、QGED、GNED は、以下の理由から 32 および 33 位の重要性を確実に証明できなかった。変異体 EGED、QGED、GNED および GED はすべて、wt APC よりも効率的であったが、2 つの変異体 ED および E はより効率的ではなかった。これは 10 ~ 12 位周辺の突然変異がより効率的なタンパク質を生じるものであり、32 および 33 突然変異が必要無い可能性を生じた。証明されてはいないが、10 ~ 12 位周辺の突然変異は、32 および 33 位での突然変異と組み合わせられなければならないと仮定された。しかし Shen et al (J Biol Chem 1998, 273:31086-31091) の研究から、32 および 33 位のみでの突然変異では強化された抗凝固活性を現すプロテイン C パリアントの作成には不十分であることは明らかであった。以下に示すように、10 ~ 12 位 (QGN パリアント) も 23、32、33 および 44 位 (SEDY パリアント) の突然変異誘発も、わずかに改善された抗凝固活性以上の分子を作成しなかった。上に確認されるすべての修飾 (QGNSEDY または "ALL" と命名) を含む特別な変異体 (配列番号 3) のみが高度に効率的であった。

#### 【0095】

野生型残基を野生型プロテイン C の上で確認した位置で置換するために使用する適切なアミノ酸残基に関して、これらのアミノ酸配列と種々のビタミン K 依存性タンパク質のリン脂質結合能との間の相関分析を含め、種々の Gla - ドメインのアミノ酸配列の比較を行った。これによりヒトプロテイン S およびウシ第 X 因子の両方がこれらの配列を含んでなり、そしてこれらタンパク質の両方が負に荷電したリン脂質に高親和性で結合するので、QGN が 10、11 および 12 位の興味深い選択であることが示唆された。多くの Gla ドメインにおいて、23 位はセリン (S) 残基に占有され、そしてこれはなぜプロテイン C の野生型残基が本発明の適切なパリアントを作成する時にセリン残基と置き換えられたのかの理由である。44 位での修飾はこれまでに考えられなかったことに注目されたい。しかし 44 位にヒスチジン (H) 残基を含む Gla ドメインはヒトプロテイン C の Gla ドメインだけであるので、44 位にチロシン残基を有するすべての他の Gla ドメインでは、44 位でヒスチジン残基をチロシン (Y) と置き換えることが有用な修飾となり得るのが合理的と思われる。

#### 【0096】

このように Gla - ドメイン中の突然変異の選択に関する適切な方法は、類似の Gla ドメインを有する幾つかのビタミン K 依存性タンパク質が存在するという事実に基づく。実際に、すべての Gla - ドメインは同じ基本フォールド (fold) を有する。ドメインのこのフォールディングに重要なアミノ酸残基は高度に保存されており、これはカルシウムに結合する多数の Gla 残基を含み、これによりドメインのフォールディングに決定

的となる。また幾つかの他のアミノ酸残基も、ドメインのフォールディングに関与している。すべての既知の G l a - ドメインを含むタンパク質に由来する配列のアライメントは、G l a - ドメインの配列の自然な変化を示し、そして保存されたアミノ酸残基がそのような分析で強調されている。これらのアミノ酸残基はドメインの内部に位置する傾向がある。対照的に露出したアミノ酸残基により占有されている位置は、より高度に多様性であり、そしてこれらの位置は突然変異がフォールディングの問題を引き起こす見込みが低いので突然変異誘発法に好適な位置である。これらの位置のアミノ酸残基も G l a - ドメインのファミリー内で高度に可変性である。これらの位置は例えば 10 ~ 12、23、32 および 33 位である。種々の G l a - ドメインは負に荷電したリン脂質膜に高度に異なる親和性を有し、これは可変性位置におけるアミノ酸の差異によるはずである。G l a - ドメインのアミノ酸配列を負に荷電したリン脂質に対する親和性と比較することにより、突然変異誘発法に有用となり得る情報を引き出すことができ、これは以前に調製され、そして上で考察した種々のプロテイン C バリエーションについて証明されている。これらには 10 ~ 12、23、32 および 33 位で突然変異したタンパク質を含む。これらの位置をすでに試されたもの以外のアミノ酸残基に突然変異させる多くのさらなるバリエーションが可能である。置換のためのアミノ酸の選択において、アミノ酸のファミリー内にあるものを試することができるが、ファミリーの境界を越えて行くことも興味深いかもしれない。44 位で H i s から T y r への突然変異誘発は、すべての他の G l a - ドメインが 44 位に T y r を有するように行った。

10

20

#### 【0097】

G l a - ドメインを修飾する主な目的は、負に荷電したリン脂質膜に対して増加した親和性を有するプロテイン C バリエーションを得ることである。この利点はより多くの A P C がリン脂質膜上に存在し、すなわち凝固に及ぼす阻害効果がより顕著になるということである。この利点は A P C の効果がプロテイン S および第 V 因子のようなコファクターの存在に依存しなくなることである。多くの病理学的状況において、コファクターは病理的タンパク質分解に消費される。高効率の「スーパー A P C」バリエーションは、コファクターの不在下でも w t - A P C より明らかに有利であろう。

#### 【0098】

上記の検討から、たとえ G l a - ドメインが 45 アミノ酸残基を含んでも、その各々が独立して、または組み合わされて修飾されることができ、そしてこれにより生成された A P C バリエーションは強化された抗凝固活性を有するさらなるバリエーションに関する調査で特徴付けられなければならない、そのような調査は実際に当業者の技術的範囲内にある。さらに当該技術分野の状況に基づき、例えば前駆体として本明細書に具体的に開示したバリエーションを使用して、前駆体バリエーション（例えば実験の部で具体的に調製されるようなバリエーション）と同じ特性を本質的に有するさらなるバリエーションを、1 または数個の保存的置換を導入することにより、または G l a - ドメインの部分またはプロテイン C 分子の他の部分に修飾を導入することにより（ここでそのような修飾は、修飾されることを意図する前駆体の特性に影響を及ぼさない）生成することができる。本質的に変化していないか、または本バリエーションと同じ特性を現すようなバリエーションは本バリエーションと均等であると考え、すなわち本発明により包含される。これは少なくとも突然変異の誘発の標的がアミノ酸残基 n o . 290 ~ 320、または特別にはアミノ酸残基 n o . 300 ~ 314 から選択されるならば、S P - ドメインについてもあてはまる。

30

40

#### C . D N A セグメントおよびその調製

本発明は P C / A P C バリエーションに係するデオキシリボ核酸 ( D N A ) セグメントまたは配列、例えばこれらバリエーションをコードする構造遺伝子、修飾されるアミノ酸範囲等のコード配列を含んでなる突然変異誘発プライマー等に関する。

#### 【0099】

これに関連して、遺伝子暗号の周知の重複を考慮しなければならない。すなわちタンパク質を作るために使用するほとんどのアミノ酸について、1 以上のコーディングヌクレオチドトリプレット ( コドン ) が特定のアミノ酸残基をコードするか、または定めること

50

ができる。したがって多数の異なるヌクレオチド配列が特定のアミノ酸残基配列をコードすることができる。しかしそのようなヌクレオチド配列は、それらが同じアミノ酸残基配列の生成をもたらすことができるので、機能的に均等であると考えられる。さらに場合により、プリンまたはピリミジンのメチル化バリエーションを上記ヌクレオチド配列に包含することができるが、そのようなメチル化はいかなる様式でもコード関係に影響を与えない。すなわちメチル化バリエーションを含んでなるか、または含まないそのような機能的に均等な配列も本発明により包含される。

#### 【0100】

本発明の適切なDNAセグメントは、本発明の修飾された（バリエーションまたは変異体）PC/APCをコードするDNA配列を含んでなり、すなわちDNAセグメントは、修飾PC/APCをコードする構造遺伝子を含んでなる。しかし本発明のDNAセグメントは例えば突然変異誘発プライマーとして使用するために、修飾されたアミノ酸範囲を含む数個から約15個のアミノ酸残基をコードするヌクレオチドトリプレットを含んでなる比較的短い配列からなることができる。

10

#### 【0101】

本発明の構造遺伝子は好ましくはイントロンを含まず、すなわち遺伝子はコドンの非中断配列からなり、各コドンが該修飾PC/APC中に存在するアミノ酸残基をコードする。しかし遺伝子はイントロンおよび自然な遺伝子中に存在する遺伝子発現の他の制御要素を含んでなってもよい。

#### 【0102】

本発明の1つの適切なDNAセグメントは、野生型タンパク質のGla-ドメインに対応するアミノ酸配列中の少なくとも1つのアミノ酸修飾（挿入、削除、置換）、および野生型タンパク質のSP-モジュールに対応するアミノ酸配列中の少なくとも1つのアミノ酸修飾（挿入、削除、置換）を除き、野生型ヒトPC/APCに対する配列に対応するPC/APCバリエーションを定めるアミノ酸残基配列をコードする。

20

#### 【0103】

他の適当なDNAセグメントはPC/APCバリエーションをコードし、ここでGla-ドメインの該修飾（1つまたは複数）は、10、11、28、32または33位以外の位置でそのアミノ酸残基配列中に含まれる。好適なDNA-セグメントは、そのGla-ドメイン中に修飾H10Q、S11G、S12N、D23S、Q32E、N33DおよびH44Yまたは修飾S11G、S12N、Q32EおよびN33Dを、そしてそのSP-ドメインのアミノ酸残基の範囲に修飾された範囲がWGYRDETKRNR（配列番号7）を含んでなる残基no. 300～314を含んでなる修飾を含むPCバリエーションをコードする。

30

#### 【0104】

加えて本発明は、本PC/APCバリエーションをコードする相同的および類似的DNA配列、およびそれらに相補的なRNA配列に関する。

#### 【0105】

本DNAセグメントは、以下（D章）でさらに説明するように、従来の発現ベクター/宿主細胞系に適するPC/APCバリエーションを生産するために使用することができる。

40

#### 【0106】

DNAセグメント自体に関して、これらは周知技術に従い得ることができる。例えば、いったんジデオキシチエンターミネーションシーケンシング法（Sanger et al., 1977）のような通例のシーケンシング法を使用してヌクレオチド配列を決定すれば、該セグメントは、特に大きなDNAセグメントを調製する場合、適当には自動化合成法に従い化学的に合成することができる。大きなDNAセグメントは、周知技術を使用して、本DNAセグメントを構成する数個の小さいオリゴヌクレオチドを合成し、続いてこのオリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーションおよび連結して大きなDNAセグメントを形成することにより調製することができる。

#### 【0107】

50



本DNAセグメントを合成するために化学的方法を使用する場合、もちろん野生型分子中の1以上のアミノ酸残基をコードする適切な塩基の置換、挿入および/または削除により野生型PC/APCをコードするDNA配列を修飾することは容易である。

#### 【0108】

適切には組換えDNA技術を使用して、修飾された構造遺伝子を含んでなる本DNAセグメントを調製する。このように遺伝子、すなわち野生型PC/APCをコードするcDNAを含んでなる組換えDNA分子から出発して、修飾されたPC/APCをコードする構造遺伝子を含んでなる本発明のDNAセグメントは、該修飾された組換えDNA分子の発現後に、置換（置き換え）、削除および/または挿入（付加）のような所望するアミノ酸残基の変化を導入するために該組換えDNA分子の修飾により得ることができる。これらの変化を達成するために都合が良い1つの方法は、例えばPCR技術を用いて行う位置指定突然変異誘発法による。PCRはPolymerase Chain Reactionの略であり、そしてMullis and Faloona (1987)により最初に報告された。

#### 【0109】

部位特異的プライマー指定突然変異誘発法は今では当該技術分野で標準的であり、そして合成オリゴヌクレオチドプライマーを使用して行われ、このプライマーは所望する突然変異（1つまたは複数）を表す限定された誤対合を除き、突然変異させるDNAを含んでなる一本鎖ファージDNAに相補的である。簡単に説明すると、ヘテロロガスなDNAを含むファージDNAに相補的な鎖の直接的合成に対するプライマーとして合成オリゴヌクレオチドを使用し、そして生じた二本鎖DNAをファージが支援する宿主細菌中で形質転換させる。形質転換した細菌のカルチャーをトップアガー（top agar）にまき、ファージを有する単一細胞からプラークが形成するようにする。この方法では、突然変異させるDNAは一本鎖形で利用できなければならず、これはM13ファージでのクローニング後に得ることができる。位置指定突然変異誘発法も、“ギャップ化二本鎖（gapped duplex）”法により達成することができる（Vandeyar et al., 1988; Raleigh and Wilson, 1986）。

#### 【0110】

本発明の適当な態様に従い、位置指定突然変異誘発法を標準的なPCR技術で行う（Mullis and Faloona (1987)）。例示的なPCRに基づく突然変異誘発法は、本明細書中の実験の部に記載する。これらの実施例では、変異体DNAセグメントの複製がインビトロで行われ、原核でも真核でもなく無細胞を使用する。

#### 【0111】

明らかに位置指定突然変異誘発法は、例えば野生型PC/APCをコードし、そして発現するcDNA配列または構造遺伝子を含むベクターから始め（該ベクターは少なくともDNAを複製することができる）、そして選択したヌクレオチドを本明細書に記載するように突然変異させて、本発明のバリエーションをコードする1以上の本DNAセグメントを形成することにより、本明細書に記載するPC/APCバリエーションをコードする本DNAセグメントを構築するための便利な道具として使用することができる。突然変異したDNAを含む該ベクターの複製は、通常は該ベクターを含む原核細胞である宿主細胞の形質転換後に得ることができる。突然変異誘発、複製、発現およびスクリーニング法の具体的説明は、本明細書の実験の部に記載する。

#### D. PC/APCバリエーションの調製

PC/APCバリエーションをコードする完全なcDNA配列または構造遺伝子を含んでなるようなDNAセグメントは、適切な宿主細胞、好ましくは真核細胞中で該cDNAの発現によりコードされたバリエーションを生産するために使用することができる。一般にそのような本発明のバリエーションの調製は、本発明のバリエーションをコードするDNAセグメントを提供し；提供されたDNAセグメントを発現ベクターに導入し；ベクターをコンパチブルな宿主細胞に導入し；宿主細胞を該バリエーションの発現に必要な条件下で培養し；そして発現したバリエーションを宿主細胞から回収する工程を含んでなる。上に挙げた各工程に適切な

方法は、本明細書の実験の部に記載する。

【0112】

本発明に従い使用することができるベクターはDNA複製ベクターを含んでなり、このベクターは通常は適切な宿主細胞中でベクターの自律複製能によりこのDNAセグメントの複製をもたらすことができるように、本発明のDNAセグメントに操作可能に連結され得る。

【0113】

DNAの複製だけでなく、本発明のDNAセグメントによりコードされるバリエーションの生産も達成するために、該DNAセグメントは発現ベクター、すなわち中に導入されたDNAセグメントの発現を支配することができるベクターに操作可能に連結される。DNAの複製および発現は、同じかまたは異なるベクターから達成することができる。

10

【0114】

本発明は組換えDNA分子も対象とし、これはDNA複製および/または発現ベクターに操作可能に連結された本発明のDNAのセグメントを含む。

【0115】

本発明のDNAのセグメントが操作可能に連結され得るベクターの選択は、例えばタンパク質発現について組換えDNA分子に望まれる機能的特性、および形質転換される宿主細胞に直接依存することは周知である。市販されている、および/または従来の技術文献に開示された種々のベクターは、そのようなベクターが該DNAセグメントの複製を支配することができる限り、本DNAセグメントと共に使用することができる。PC/APCバリエーションの構造遺伝子を含むDNAセグメントの場合、好ましくはベクターはベクターが該DNAセグメントまたは遺伝子に操作可能に連結された時、構造遺伝子も発現することができる。

20

【0116】

本発明の適切な態様は真核細胞発現系、適切には脊椎動物、例えば哺乳動物の細胞発現系に関する。真核細胞で使用することができる発現ベクターは当該技術分野では周知であり、そして幾つかの市販の供給元から入手可能である。一般にそのようなベクターは所望するDNAセグメントの挿入に都合の良い制限部位を含む。典型的なそのようなベクターは、pSVLおよびpKSV-10 (ファルマシア (Pharmacia)、スウェーデン)、pBPV1/pML2d (インターナショナルバイオテクノロジーズ (International Biotechnology) 社)、ストラタジーン (ラジョラ、カリフォルニア州) から入手可能なpXT1、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC; ロックヴィル、メリーランド州) から寄託番号ATCC37722で入手可能なpJ5、pTDT1 (ATCC31255) 等の真核発現ベクターである。本開示の実験の部では、pRc/CMV (インビトロジェン (Invitrogen) から入手可能、カリフォルニア州、米国) を使用してアデノウイルスでトランスフェクトしたヒト腎臓細胞で使用するための発現プラスミドを得た。

30

【0117】

本発明の組換えDNA分子を構築するために使用する適当な真核細胞発現ベクターは、真核細胞中で効果的である選択マーカー、好ましくは薬剤耐性選択マーカーを含む。適当な薬剤耐性マーカーは、その発現がネオマイシン耐性を生じる遺伝子、すなわちネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (neo) 遺伝子である、Southern et al., J. Mol. Appl. Genet., 1: 327-341 (1982)。さらに適切な薬剤耐性マーカーはジェネティシン (G418) に耐性を生じるマーカーである。あるいは選択性マーカーは別のプラスミド上に存在することができ、この場合、2つのベクターが宿主細胞のコトランスフェクションにより導入され、そして選択は選択性マーカーについて適切な薬剤中で培養することにより成される。

40

【0118】

本発明の組換えDNA分子で形質転換される宿主細胞として使用することができる真核細胞は、細胞培養法、発現ベクターの増殖法および意図する遺伝子産物の発現法と適合す

50

る細胞系を使用する限り、どのようにも限定されることはない。適当な宿主細胞には酵母および動物細胞を含む。脊椎動物細胞、そして特に哺乳動物細胞、例えばサル、マウス、ハムスターまたはヒト細胞系が好ましい。適当な真核宿主細胞には、ATCCからCCL 61で入手可能なチャニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ATCCからCRL 1658で入手可能なNIHスィスマウス胚細胞NIH/3T3、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）等の真核組織培養細胞系を含む。本明細書の実験の部では、アデノウイルスでトランスフェクトしたヒト腎臓細胞系293（アメリカンタイプカルチャーコレクションから入手可能、ロックビル、メリーランド州、米国）を使用した。

#### 【0119】

本発明に従い発現系を得るためには、真核細胞、好ましくは哺乳動物の宿主細胞のような適当な宿主細胞は本組換えDNA分子を用いて、例えばGraham et al., Virology, 52:456 (1973); Wigler et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 76:1373-76 (1979)に開示されている方法のような既知の方法を使用して形質転換される。

10

#### 【0120】

このように本発明のDNAセグメントを真核宿主細胞中で発現させるために、一般に複製起点、本発明のDNAセグメントの上流に位置するプロモーター、リボゾーム結合部位、ポリアデニレーション部位および転写終結部位のような遺伝子発現を制御する機能的配列を含む本発明の組換えDNA分子を使用する。真核細胞中で本発明のDNAセグメントを発現するために使用するそのような機能的配列は、ウイルスまたはウイルス性物質から得ることができ、または例えば該セグメントが完全な構造遺伝子を含んでなる時、本DNAセグメント中に本来含まれてもよい。

20

#### 【0121】

真核発現系で 사용할 ことができるプロモーターは、このようにアデノウイルス2、ポリオーマウイルス、シミアンウイルス40（SV40）等のようなウイルスから得ることができる。特にアデノウイルス2の主要後期プロモーターおよびSV40の初期プロモーターおよび後期プロモーターが好適である。

#### 【0122】

適当な複製起点は、アデノウイルス、ポリオーマウイルス、SV40、水泡性口内炎ウイルス（VSV）およびウシパピローマウイルス（BPV）のようなウイルスに由来することもできる。あるいはもし宿主の染色体に組み込むことができるベクターを発現ベクターとして使用する場合、宿主染色体の複製起点を利用してもよい。

30

#### 【0123】

たとえ真核発現系が好適であっても、原核発現系を本発明と共に使用することもできる。さらに原核系は本発明のDNAセグメントの複製または増幅を行うために有利に使用し、続いて該原核系で生産されたDNAセグメントを、コードされた産物の発現に例えば真核発現系で使用する ことができる。

#### 【0124】

このように本発明の原核ベクターには原核レプリコン、すなわちそれらで形質転換される細菌宿主細胞のような原核宿主細胞中での自律複製および組換えDNA分子の染色体外での維持を支配する能力を有するDNA配列を含む。そのようなレプリコンは当該技術分野では周知である。加えて、原核レプリコンを含むそれら態様は遺伝子も含み、この発現はそれにより形質転換される細胞宿主に薬剤耐性を付与する。典型的な細菌薬剤耐性遺伝子は、アンピシリンまたはテトラサイクリンに対する耐性を付与するものである。

40

#### 【0125】

原核系を使用する場合、DNA複製のためだけでなく発現系としても原核レプリコンを含むこれらベクターは、それにより形質転換される大腸菌（E. coli）のような細菌宿主細胞中で、構造遺伝子を含む本DNAセグメントの発現、すなわち転写および翻訳を支配することができる原核プロモーターも含む。プロモーターはRNAポリメラーゼの結合および転写が起こることを可能とするDNA配列により形成される発現制御要素である

50

。

## 【0126】

細菌宿主と適合性があるプロモーター配列は、典型的には本発明のDNAセグメントの挿入に都合が良い制限部位を含むプラスミドベクター中に提供される。そのようなベクタープラスミドの典型は、カリフォルニア州、リッチモンドのバイオラッド (BioRad) から入手可能な pUC8、pUC9、pUC18、pBR322 および pBR329、およびスウェーデンのファルマシアから入手可能な pPL および pKK223 である。

## 【0127】

したがって本発明の遺伝子産物を発現することができる原核発現系を得るために、適切な原核宿主細胞は、例えば Maniatis et al. モレキュラークローニング、アラボラトリーマニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual)、コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク (1982) に開示されているように、典型的には使用するベクターの種類に依存する周知の方法に従い、本発明の組換えDNA分子で形質転換される。

10

## 【0128】

もちろん成功裏に形質転換された原核または真核細胞を、非形質転換細胞から区別し、そして分離することが必要である。このために様々な方法が知られ、そして従来技術文献に記載されたきた。

## 【0129】

そのような方法に従い、組換えDNAの存在は形質転換手順に供された細胞に由来するモノクローナルコロニーのDNA含量を調査することによりアッセイされる。そのような方法は Southern, J. Mol. Biol. 98:503 (1975) および Berent et al., Biotech, 3:208 (1985) により開示された。

20

## 【0130】

成功裏の形質転換は、例えば発現した遺伝子産物に特異的なモノクローナルまたはポリクローナル抗体を使用した周知の免疫学的方法により、あるいは発現した遺伝子産物の生物学的活性の検出により確認することもできる。

## 【0131】

このように発現ベクターで成功裏に形質転換された細胞は、表示される抗原性または生物学的活性により同定することができる。このために、形質転換したと思われる細胞のサンプルを回収し、そして該生物学的活性または抗原性のいずれかについてアッセイする。

30

## 【0132】

そのように選択された、成功裏に形質転換された細胞を使用して、上に開示した所望のPC/APCバリエーションを生産する。

## E. 生物学的活性のアッセイ

本発明のPC/APCバリエーションの生物学的活性をアッセイするために適当な方法は、APT系のような血漿凝固系、および精製された第VII因子および第Va因子の分解に関する試験に基づく。そのような方法は本明細書の実験の部により詳細に開示する。

40

## F. 組成物

本PC/APCバリエーションは典型的には意図する使用に適する組成物の形態で提供される。そのような組成物はPC/APCバリエーションの生物学的活性を保存し、そしてそれらの安定性が与えられるべきである。適当な組成物は、例えば生理学的に耐容され得る担体と組み合わせた治療的に活性な量の本発明のバリエーションを含む治療用組成物である。適切にはそのような組成物は凍結乾燥されている。さらに該組成物はそれらの抗凝固活性を強化するために、プロテインSおよび/または第V因子のような治療に活性な量のさらなる有効成分も含むことができる。プロテインCはカルシウム依存性タンパク質であるので、適当には本発明の組成物は二価のカルシウムも好ましくは生理学的な量で含む。

## 【0133】

50

一般に、そして具体的な治療用組成物において、組成物の形態の設計に関連して考慮する配慮は当業者には周知であり、これらをさらに詳細に記載する必要はない。

#### G. 治療法

本発明に従い、本PC/APCバリエーションは強化された抗凝固活性を現すことが示された。すなわち本発明は個体、例えばヒトの凝血を抑制する方法にも関し、該方法は該個体に治療的に有効量の本発明のバリエーションPC/APCを含んでなる組成物を投与することを含んでなる。処置することができる状態は、本明細書のいたるところに開示する。

##### 【0134】

組成物について、治療法の計画に関連して考慮する配慮、例えば適当な投薬用量範囲および投与経路は当業者には周知であり、したがってこれらの方法をさらに詳細に記載する必要はない。

##### 【0135】

しかし簡単に説明すると、本プロテインCバリエーションは種々の投与経路を介して投与することができる。例えばプロテインCバリエーションは非経口投与、経口投与、または鼻内投与のための組成物として調製することができる。このように血流への効果的送達を確実にするために、プロテインCバリエーションを静脈内注射、連続注入、ボラス注射またはそれらの組み合わせにより投与することができる。あるいはプロテインCバリエーションは血流へのゆっくりとした放出を望む場合、皮下に投与することができる。

##### 【0136】

プロテインCバリエーションの適切な用量は、処置する個体の年齢、性別および全体的な健康状態のような様々な状況を考慮して担当医師により容易に決定され得る。有効な用量は0.02 ng/ml ~ 100 ng/ml未満の血漿範囲、適当には0.2 ~ 50 ng/ml、好ましくは2 ~ 60 ng/ml、そして特に40 ~ 50 ng/mlを生じるべきである。このように望ましくない血液凝固を抑制するために、多くの血栓塞栓状態の処置法で、0.01 mg/kg/日から少なくとも約1.0 mg/kg/日の用量の注射を、1日に1 ~ 6回、1 ~ 10日間使用することができる。

##### 【0137】

好ましくは非経口投与用の調製物は、水性の生理学的バッファー溶液中の液体溶液または懸濁液からなる。経口投与には、錠剤またはカプセルが適当な単位剤形である。

#### H. 考察

本発明は少なくとも1つの修飾を、野生型PCの各G1a-およびSP-ドメインを含むPC-バリエーションに関する。

##### 【0138】

本明細書の実験の部で調製した本発明の具体的なバリエーションは、突然変異した配列番号5の配列を含むバリエーションのG1a-ドメイン中の突然変異を、300 ~ 314位を含んでなるアミノ酸残基の範囲中のSP-ドメイン中の突然変異と組み合わせ、この突然変異した配列は突然変異した配列番号7の配列に対応する。さらなるバリエーションはSP-ドメイン中の前記突然変異、すなわち突然変異した配列番号7を、G1a-ドメイン中の突然変異S11G、S12N、Q32EおよびN33Dと組み合わせる。

##### 【0139】

以前に発明者はG1a-ドメインにのみ突然変異を含むPC-バリエーション、およびSP-ドメインにのみ突然変異を含むPC-バリエーションも研究した。後者のPC-バリエーション(“SP-変異体”)は国際公開第98/44000号パンフレットに記載されたが、“G1a-変異体”は2001年3月2日に出願された米国特許仮出願第60/272,466号明細書に開示されている。

#### H(1) G1a-突然変異

G1a-変異体に関する上に挙げた研究では、配列番号5の配列を有し、そしてQGNS E D Y ( A L L ) と命名した突然変異したG1a-ドメインを含むバリエーションが、wt APCよりも抗凝固的であり、そしてまた以前に報告されたGNEDまたはQG E D ( S h e n e t a l . 、 同 上 に よ り 記 載 さ れ て い る ) の よ う な G 1 a - ド メ イ ン より も 抗

10

20

30

40

50

凝固的であることが分かった。i . a . 2つのバリエーションQ G NおよびS E D Yのいずれも増加した抗凝固活性、増加した抗凝固活性または負に荷電したリン脂質膜に対する増加した親和性を現さないか、またはわずかに現すだけなので、このバリエーションがさらに強化された活性を現すことは極めて驚くべきことである。これはG l a - ドメインの膜結合能が大変複雑であり、そして単一のアミノ酸置換により容易に影響を受けないことを示唆している。G l a - ドメインの多くの領域が突然変異した時のみ、一層強化されたリン脂質親和性および一層増加した抗凝固活性を現すQ G N S E D Y ( A L L ) のような独自のバリエーションを得ることが可能である。

#### 【 0 1 4 0 】

Q G N S E D Y ( A L L ) の抗凝固活性はプロテインSにより強化され ( p o t e n t i a t e d ) 、これはS m i r n o v a n d E s m o nにより米国特許第5 , 8 3 7 , 8 4 3号明細書に記載されたキメラA P Cバリエーションの活性とは対照的である。このバリエーションはプロテインCとプロトロンビンとの間のハイブリッドであり、ここでプロトロンビンG l a - ドメインはプロテインC ( P C ) 中の対応するG l a - ドメインに置き換えられている。強化されたリン脂質結合により、このP C / A P Cバリエーションは野生型A P Cよりも抗凝固的であるが、その活性はプロテインSにより強化されない。

10

#### 【 0 1 4 1 】

また欧州特許第0 2 9 6 4 1 3 A 2号明細書は、プロトロンビンとP CだけでなくF V I I、F I XまたはF XとP Cとの間のプロテインCとのハイブリッドに関する。これらのバリエーションはプロトロンビン、F V I I、F I XまたはF Xに由来するG l a - ドメインおよびP Cに由来する残りを含む。しかしこれらのバリエーション中、G l a - ドメインは最初のN - 末端4 3アミノ酸残基に限られ、すなわちこれらのバリエーションはw tプロテインCの4 4位の修飾されたアミノ酸残基を含まない。そこではこれらのバリエーションが凝血形成に対して改善された活性、または改善された繊維溶解促進効果を有すると述べられているが、これらのバリエーションはそのような活性に関して十分に特性が決定されなかった。F X / P Cハイブリッドのみが調製そして特性決定され、そしてこのハイブリッドが第V a因子の改善された不活性化とは別に、w t P Cよりも改善された抗凝固特性を有することは見いだされなかった。

20

#### 【 0 1 4 2 】

本バリエーションQ G N S E D Y ( A L L ) が持つさらに全く予期せぬ利点は、A r g 3 0 6でF V aを開裂することができるので、A P Cにより攻撃される主要な開裂部位、すなわちA r g 5 0 6位で突然変異した突然変異F V a ( F V : Q 5 0 6またはF V L e i d e nと命名) を正に開裂することができるということである。この突然変異した第V a因子は、A P C - 耐性と名付けられた共通の血液凝固障害に存在する。したがってQ G N S E D Y ( A L L ) がF V aをA r g 3 0 6で開裂する能力は、開裂した時、F V aの完全な不活性化をもたらす部位であるA r g 3 0 6の開裂が大変悪い野生型A P Cよりも有利である。このように野生型A P Cとは対照的に、本バリエーションQ G N S E D Y ( A L L ) は活性化F V : Q 5 0 6を開裂し、そして不活性化することができる。A r g 5 0 6での開裂とは対照的に、A r g 3 0 6での開裂はプロテインSにより強化される。しかし本バリエーションQ G N S E D Y ( A L L ) のさらなる利点は、これがたとえプロテインSが不在でも活性化F V : Q 5 0 6を開裂することである。さらにこの開裂はたとえプロテインSが必要でなくてもプロテインSにより刺激される。本バリエーションQ G N S E D Y ( A L L ) が活性化第V因子をA r g 3 0 6で開裂する能力は、A P C - 耐性の患者にも抗凝固物質として魅力的となる。

30

40

#### H ( 2 ) S P - 変異体

国際公開第9 8 / 4 4 0 0 0号パンフレットでは、発明者はP CのS P - ドメイン中の修飾、そして具体的には配列番号7の突然変異した配列を含む修飾S P - ドメインに関する調査を報告する。

#### 【 0 1 4 3 】

これはウシS Pモジュールの対応するアミノ酸配列と同一である野生型ヒトプロテイン

50

Cに比べて短縮化されたアミノ酸配列（配列番号7）である。SPモジュールのヒト、ウシ、ラットおよびマウスの配列間の比較により、ラットおよびマウスのPC/APC分子がウシPC/APCの場合よりもヒトPC/APCに類似することが明らかになったので、ヒトPC/APC中に削除および置換突然変異を含んでなり、300～314アミノ酸配列をウシPC/APCの対応する配列と同一とした変異体を調製し、そして調査した。反対に挿入および置換突然変異をウシPC/APCに導入してヒトPC/APCのアミノ酸300～314番に相当するウシの配列を延長し、そしてその配列をヒトのアミノ酸配列No. 300～314と同一とした。本明細書の実験の部および国際公開第98/44000号パンフレットでは、ヒトPC/APCおよびウシPC/APCの変異体の単離および特性決定が記載されている。標準的なPCR技術（Mullis and Faloona (1987), Meth. Enzymol. 155, 335-350）を使用して、上記の削除、置換および挿入突然変異を、ヒトPC/APCおよびウシPC/APCのcDNAに作成した。このように真核系でこれら突然変異したcDNAの発現後、配列番号7の配列を含んでなる突然変異ヒトPC/APC分子および配列番号6の配列を含んでなる突然変異ウシPC/APC分子が生産され、そして均一に精製された。さらに野生型ヒトおよびウシプロテインC/APCのcDNAをこの真核系で発現し、そして発現産物を均一に精製した。これらの手順で得られた精製した野生型PC/APC分子およびそのバリエーションを特性決定するために、これらの分子をトロンピンで活性化し、そしてトロンピン活性化産物をS-Sepharoseクロマトグラフィーにより分離した。次いで単離されたPC/APC分子の機能的特性を特性決定した。上に述べたcDNAの発現、そして続く精製手順により得られた種々のPC/APC構築物は以下のように称する：wt-hPC/APC、野生型ヒトPC/APC；-hPC/APC、配列番号7の配列に対応する短縮化配列を含んでなるヒトプロテインC；wt-bPC/APC、野生型ウシPC/APC；ins-bPC/APC、配列番号6の配列に対応する延長された配列を含んでなるウシPC/APC。これらの変異体、-hPC/APCおよびins-bPC/APCはそれぞれヒトAPC-SPおよびウシAPC-SPとも命名し、後者の名称を以下の実施例1およびこの実施例に関する図面で主に使用する。

#### 【0144】

以下の実施例1から明らかであるように、標準的なSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、これら組換えPC/APC構築物は還元および非還元条件下の両方で泳動した時、予想された分子量を有した。アミド分解活性、すなわちS-2238（クロモジェニックス（Chromogenix）社、メルンダル、スウェーデン）のような低分子量物質に対するタンパク質分解活性を特性決定し、そして突然変異したヒトPC/APC（-hPC/APC）が野生型ヒトPC/APCよりもこの基質に対して一層高い活性を有することが観察された。一方、ウシの突然変異（ins-bPC/APC）は、合成基質に対して一層低い活性を有し、これはたとえ突然変異が活性部位から幾らか離れて位置しても、削除/挿入突然変異がPC/APCの触媒部位に影響を及ぼすことを示唆した。

#### 【0145】

すなわちこの以前の調査では、突然変異がPC/APCの活性部位から幾らか離れて位置するPC/APCのSP-モジュール中の突然変異が、強化されたタンパク質分解、そしてより具体的には強化されたアミド分解活性により強化された抗凝固活性を有するPC/APCバリエーションを生じることができるということが予期せずに明らかとなった。本突然変異はこの活性部位内またはそれに隣接して位置しないという結論は、APCの公開された仮説の分子モデルおよびAPCのSP-モジュールの3次元構造について説明されたモデルに基づき、これはEMBO Journal, 1996, 15: 6810-6821 (Mather et al.)に開示されている。これらのモデルから、上で述べた構築物中に含まれる突然変異は、SP-モジュールのループ5に位置し、このループは活性部位の領域と直接接触していない。

#### 【0146】

本明細書の実験の部では、上記組換えPC/APC分子の合成的基質開裂のキネティッ

クスが、国際公開第98/44000号パンフレットに報告されたように特性決定され、すなわち  $K_m$ 、 $V_{max}$  および  $k_{cat}$  の値が以下の実施例1により詳細に説明されているように基質濃度を变化させることにより決定された。国際公開第98/44000号パンフレットに報告されたように、 $K_m$  値の減少が見いだされ、この基質に対する種々の APC - 分子の親和性がより高いことが示唆された。さらに  $V_{max}$  値は大変異なり、 $-hPC/APC$  は  $wt-hPC/APC$  の  $V_{max}$  より少なくとも7倍高い  $V_{max}$  値を有し；一方、 $ins-bPC/APC$  は明らかに低い  $V_{max}$  値を有したが、 $K_m$  値はほとんど影響を受けなかった。これらの結果は  $-hPC/APC$  の上昇した活性が、突然変異により引き起こされた上昇した触媒活性と基質に対する上昇した親和性の組み合わせに依ったことを示唆している。

10

#### 【0147】

さらに国際公開第98/44000号パンフレットおよび以下の実施例1に報告されるように、上で述べた突然変異 PC/APC 分子の抗凝固活性を APTT に基づく血漿凝固系（活性化部分トロンボプラスチン時間：activated partial thromboplastin time）反応（本来の経路による活性化）で測定した。これらの試験では、ヒト血漿に加えた時、 $-hPC/APC$  は  $wt-hPC/APC$  に比べて抗凝固応答を強化したことが観察された。加えるウシプロテインSが存在しなければ、 $wt-bPC/APC$  および  $ins-bPC/APC$  は両方とも大変悪い抗凝固応答を有するが、これら両方のウシ組換え化合物は反応混合物にウシプロテインSも含めた時、明らかな抗凝固活性を現した。

20

#### 【0148】

上記の結果は報告されたヒト APC 中の削除 - 突然変異がヒト血漿に存在する天然の基質に対して強化された活性を導いたが（FVa および FVIIa）、報告されたウシ APC 中の挿入 - 突然変異はたとえ合成基質に対する活性が損なわれても天然基質に対する反応性に有意に影響を及ぼさなかったことを示す。ヒト APC 中の削除突然変異が実際に天然基質 FVIIa に対するタンパク質分解活性の上昇を導くことを確認するために、精製された成分（以前に記載された系、Shen and Dahlbeack, J. Biol. Chem. 1994, 269: 18735 - 18738）を使用して FVIIa 分解系における組換え APC の効果を、国際公開第98/44000号パンフレットに報告されたように調査した。この系は FIXa、FVIIa、リン脂質小胞およびカルシウムを含み、そして FVIIa の活性は FX の添加により、そして短いインキュベーション時間の後、FIXa に対する合成基質の添加でも測定した。種々の APC 分子の効果は、APC をその相乗的コファクターであるプロテインS（APC と同じ種の）およびウシ FV と一緒に加えることにより試験した。この系では、 $-hPC/APC$  が  $wt-hPC/APC$  よりも高い活性を有することが明らかであったが、2つのウシ PC/APC は互いに比較的類似していた。精製した FVa の分解に関して、種々の APC は試験しなかったが、 $-hPC/APC$  は  $wt-hPC/APC$  よりも高い活性を有することが予想される。ヒトおよびウシ APC に導入された変化は阻害速度に影響するかもしれないので、突然変異 APC 分子の阻害速度をヒト血漿中で試験した。すなわち APC を血漿に加え、そして種々の間隔で、残るアミド分解活性を測定した。突然変異したヒトの分子が野生型ヒト APC と同じ半減期を有することが分かり、突然変異はセルピンによる阻害速度に影響しないことが示唆された。これをさらに試験するために、突然変異および野生型 APC の精製 PCI および 1AT による阻害速度を試験し、そして本質的に同一であることが分かった。他方、ウシ APC および突然変異ウシ APC は 1AT により阻害されず、これは阻害速度の決定に関与する突然変異した領域についての仮説が正しくないこと、すなわちヒトおよびウシ APC の異なる阻害パターンに関する説明は、同定された配列の差異により生じなかったが、別の配列の差異をさらに定めるべきであることを示している。

30

40

#### 【0149】

結論すると、実施例1で報告する結果は、hAPC 中の削除 - 突然変異が天然基質 FV

50



I I I a および F V a に対して、ならびに低分子量基質に対して、より高い触媒活性を有する分子を導く一方、この突然変異はセルピンによる阻害速度に影響をおよぼさなかったことを示す。

H ( 3 ) 組み合わせた G l a - および S P - ドメイン変異体

G l a - および S P - モジュールに関する知見に基づき、発明者は G l a - ドメインおよび S P - ドメインの両方に修飾を含む P C / A P C バリエーションが、w t P C / A P C だけでなく、好ましくは上に挙げた P C / A P C の G l a - および S P - 変異体よりも改善された特性を有する P C / A P C バリエーションを提供できることを認識した。

【 0 1 5 0 】

修飾された G l a - ドメインおよび修飾された S P - ドメインの組み合わせが、G l a - ドメインまたは S P - ドメイン中の修飾により該変異体に付与される改善された特性を完全に破壊し得る相互作用を導かなければ、該組み合わせ変異体は、G l a - および S P - 変異体の一方によっては現されない、さらに強化された抗凝固活性および / または w t P C / A P C よりも改善された特性の組み合わせを示すであろう。 10

【 0 1 5 1 】

例えば上記 H ( 1 ) で示したように、F V L e i d e n を開裂する強化された能力、およびまた強化されたタンパク質分解、例えばアミド分解活性により強化された抗凝固活性を有する A P C バリエーションを得ることができる。

【 0 1 5 2 】

したがって実施例 8 に具体的に説明するように、発明者は配列番号 5 の修飾された G l a - ドメインおよび配列番号 7 の修飾された配列を含む S P - ドメインを含む好適な P C / A P C バリエーションを調製した。実施例 8 に示すように A P T T 試験では、このバリエーションが w t P C / A P C よりも一層強化された抗凝固活性を有する。 20

【 0 1 5 3 】

さらに発明者は、G l a - ドメインが突然変異 G 1 1 N 1 2 E 3 2 D 3 3 を含み、そして S P - ドメインが配列番号 7 の修飾された配列を含む P C / A P C バリエーションを調製した。このバリエーションも w t P C / A P C よりも改善された抗凝固活性を現す ( 実施例 9 を参照にされたい ) 。

I 本 P C / A P C バリエーションの潜在的用途

A P C への活性化後に強化された抗凝固活性を現す組換えプロテイン C 分子が、可能性のある治療用化合物、およびプロテイン C 系の他の成分のための種々の生物学的アッセイで使用される試薬としての両方で大きな潜在的用途を有することは明らかである。本発明に従い、突然変異がプロテイン C 分子の G l a モジュールおよび S P - モジュールの両方に存在する場合、例えば強化された膜結合活性、および強化されたタンパク質分解、例えばアミド分解活性によっても実質的に強化された抗凝固活性を有するバリエーションプロテイン C を得ることができると示された。すなわちそのような突然変異の系統的調査により、さらに良い特性を有する他のプロテイン C 分子を生産することができると期待できる。例えば G l a - ドメイン中の特別な突然変異を選択することにより、より高い特異的機能を持つ A P C 分子、例えば F V a を A r g 3 0 6 で開裂するさらなる分子を設計し、すなわち血液凝固障害である A P C - 耐性に存在する該突然変異 F V を十分よく分解するさらなる A P C バリエーションを生産することが可能となり得る。S P - ドメイン中の特別な突然変異の選択は、F V I I I a に対して主に働く、または F V a を主に開裂する A P C 分子を設計することを可能にすることができる。 30 40

【 0 1 5 4 】

強化された抗凝固活性を発現する本プロテイン C バリエーションは、望ましくない血液凝固が抑制されるすべての状況に有用になると想定する。すなわち本バリエーションは血栓症および他の血栓塞栓状態を防止または処置するために使用することができる。そのような状態の具体例は、播種性血管内凝固症候群 ( D I C ) 、アテローム硬化症、心筋梗塞、種々の凝固能亢進性状態および血栓塞栓症、およびまた敗血症 ( s e p s i s ) および敗血症 ( s e p t i c a e m i a ) である。本バリエーションは、例えば心筋梗塞に関連した、および 50

手術に関連した血栓溶解治療後の血栓症の予防に、およびAPC-耐性（先天的または後天的）またはプロテインC欠損症（先天的または後天的）の処置に使用することもできる。本プロテインCバリエーションとプロテインS（野生型プロテインSまたはそのバリエーション）との組み合わせは有用であり、この組み合わせにはAPCのコファクターとしての活性を現す第V因子を含むこともできる。

【0155】

さらにAPCは多くの活性を有し、例えばこれは抗血栓活性を現すだけでなく、プロフィリン溶解、抗炎症および抗アポトーシス活性も現すので、本APCバリエーションは重篤な敗血症、血栓症および発作のような種々の複雑な医学的障害の処置に有力な役割を有する。APCは全身的な抗凝固物質および抗炎症因子でもあり、そして敗血症、虚血、損傷および発作の動物モデルでは臓器の損傷を減らすことが見いだされた。これはまた、重篤な敗血症患者において、死亡率を実質的に下げる。

10

【0156】

APCバリエーションのさらなる潜在的用途は、神経病理的障害または脳炎症疾患、例えば発作、アルツハイマー病のような様々な種類の神経障害がある神経変性疾患および種々の自己免疫疾患を有する個体の処置である。

【0157】

本PC/APCバリエーションは天然APCと同じ条件の処置にも使用することができると構想する。

【0158】

本PC/APCバリエーションの診断的用途に関して、プロテインSに関する改善された機能的アッセイおよびまた第V因子の抗凝固活性にも大きな必要性がある。強化された膜結合および強化されたタンパク質分解、適当にはアミド分解活性により、強化された抗凝固活性を有する突然変異APCは、そのようなAPCがより強いシグナルを与え、そしてこれが種々のアッセイでノイズに対して増加したシグナル比を導くので、そのようなアッセイに大変有用となるだろう。SP-変異体について、これはアミド分解活性がここに開示する変異体hAPCが正常(normal)APCよりも高く、そしてまた抗凝固効果も該変異体hAPCが標準APCよりも一層高いことを示す実施例1で報告された突然変異APC分子の最初のインビトロ特性決定により確認される。この突然変異分子とそのコファクターであるプロテインSおよび完全なFVとの相互作用は、SP-モジュール中の突然変異にはより影響を受けなかったようであり、これはインビトロ試験で突然変異hAPC(-hAPC)を使用する概念が正しいことを示唆している。

20

30

【0159】

GlA-モジュールおよびSP-モジュール中の突然変異の組み合わせを、プロテインCの他の部分中のさらなる突然変異と組み合わせて、大変独特な特性を持つプロテインCを生成することも可能となる。イーライリリー(Ely Lilly)の科学者(Ehrlich et al, Embo. J. 1990, 9: 2367-2373; Richardson et al, Nature 1992, 360: 261-264)および他のグループは、活性化ペプチド領域周辺の突然変異がTM(トロンボモジュリン)の不存在下でも容易に活性化されるプロテインCを生じたことをすでに示した。同様に、活性化ペプチド領域中の別の組の突然変異が、合成している細胞から活性化形で分泌されるプロテインC分子を導いた(Ehrlich et al, J. Biol. Chem. 1989, 264: 14298-14304)。また本突然変異と、APCとそのコファクターとの間の相互作用を強化することができる将来の突然変異との組み合わせも企図する。

40

【0160】

もちろん本発明はそれらの生産様式とは無関係に本明細書に定めるプロテインCバリエーションを対象とする。前の章、例えばD章では、幾つかの適切な方法を開示する。

【0161】

しかしトランスジェニック動物に関する方法のような他の方法が有用になると予見する。例えばヒトプロテインCを乳の中に生産するトランスジェニックブタが開示されている

50

サイエンティフィックアメリカン (Scientific American)、1997年1月、の Velandar, et al., 「薬剤工場としてのトランスジェニック家畜 (Transgenic Livestock as Drug Factories)」を引用する。このように本プロテインCバリエーションを生産するトランスジェニック動物を得ることができると思われる。

#### 実験の部

以下の実施例では、本発明を具体的に説明する適切な態様を開示する。しかしこれらの実施例は本発明を限定すると解釈されるべきではない。この中で特に言及しない限り、ヒトPC/APCバリエーションを調製し、そしてヒト凝固因子、血漿等を使用した。

#### 【0162】

これらの実施例で以下の材料を使用した。

#### 【0163】

ヒト 1 - アンチトリプシン (1AT) およびプロテインCインヒビター (PCI) は、それぞれ Carl - B. Laurell and Margareta Kjellberg 博士からの好意により与えられた (スウェーデン、マルメの大学病院の臨床化学部)。HPC<sub>4</sub> 免疫アフィニティーカラムは Charles T. Esmon 博士 (ハーワード ヒュー医学研究所、オクラホマ医学調査基金、米国) から得た。Fast Flow Q - Sepharose (FFQ) および Octonative M (第VIII因子の供給源として) は、スウェーデンのファルマシアから購入した。リポフェクチンおよびジェネティシン (G418) は、スウェーデンのライフテクノロジーズ (Life Technologies) 社から入手することができ、そしてダルベッコの改良イーグル培地 (DMEM) はギブコ (Gibco) 社から入手可能である。精製されたウシ第IXa因子、第X因子、リン脂質小胞および発色基質 S - 2222 は、スウェーデンのクロモジェニック社の Steffen Rosen 博士の好意により贈られた。ヒルジンは米国のシグマケミカル (Sigma Chemical) 社から得、そして D - Phe - Pro - Arg クロロメチルケトン (PPACK) は米国のカルビオケム (Calbiochem) から得た。ウシ第V因子、 - トロンビンおよびヒトプロテインSならびにウシプロテインSは以前に記載された方法に従い精製した (Dahlbaek et al., 1990: Dahlbaek and Hildebrand, 1994)。

#### 【実施例1】

#### 【0164】

プロテインCのSP - 変異体

この実施例は国際公開第98/4400号パンフレットに対応する。

#### (a) 位置指定突然変異誘発法

Johan Stenflo 博士 (スウェーデン、マルメの大学病院の臨床化学部) の好意により贈られた完全長のヒトプロテインCのcDNAクローン、および Donald Foster 博士 (ザイモジェネティクス: Zymo Genetics) 社、米国) から親切にも提供された完全長のウシプロテインCのcDNAクローンは、制限酵素 HindIII および XbaI により別々に消化し、そして生成した完全長のプロテインCのcDNAであるヒトまたはウシのいずれかの完全なPCコード領域を含んでなる制限断片を、HindIII および XbaI で消化した発現ベクター pRc / CMV にクローン化した。

#### 【0165】

野生型のヒトまたはウシプロテインCのコード配列を含む生成した発現ベクターを、プロテインCのSP - モジュールの位置指定突然変異誘発法に使用し、ここで標的DNAの増幅のためのPCR手順を以下に記載し、そして以下の反応スキームに示すように行った (スキームI)。この手順に使用したプライマーのヌクレオチド配列を、以下の表Iに掲げる。

#### 【0166】

10

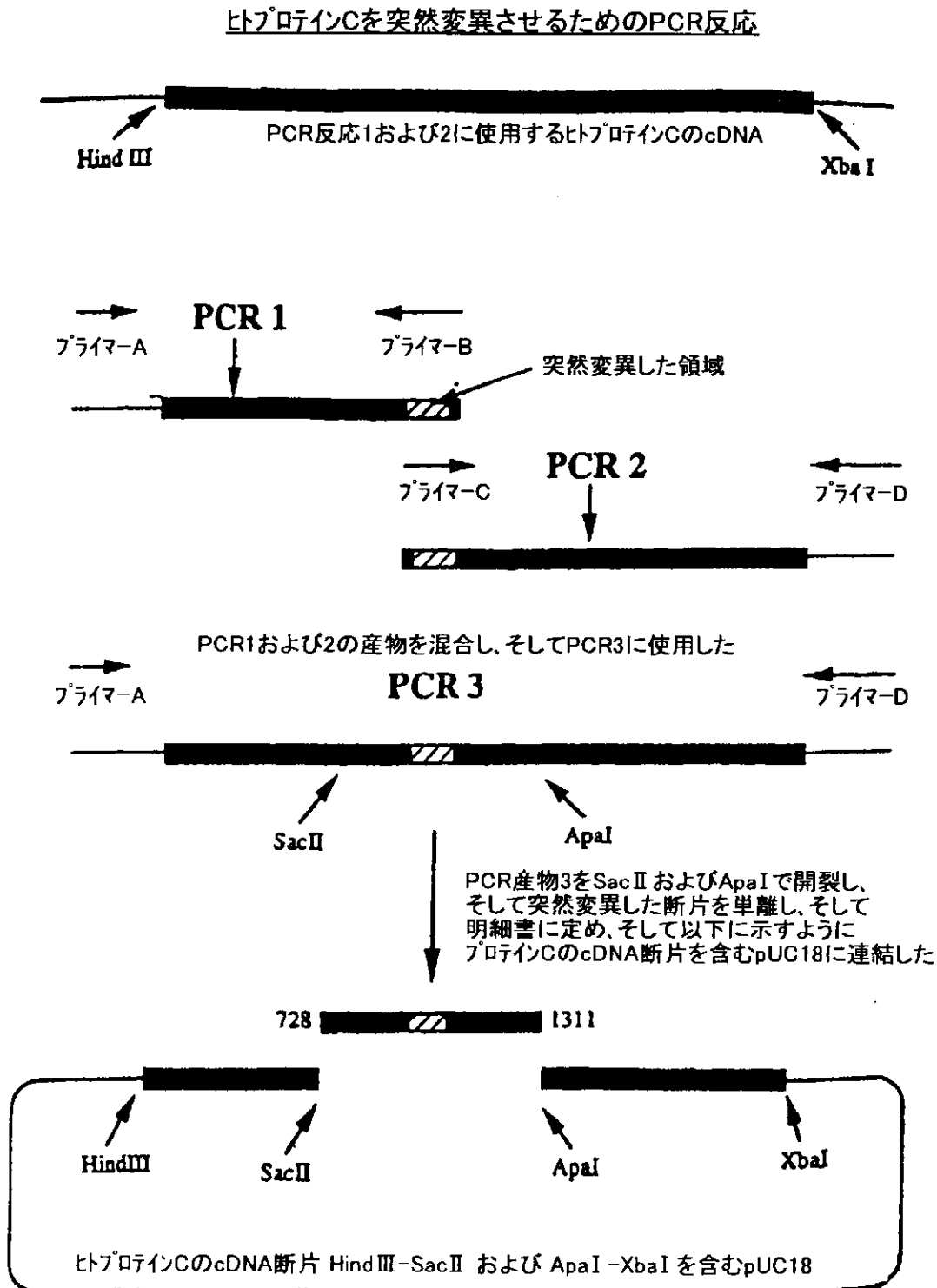
20

30

40

【表 7】

## スキーム1



完全長の突然変異プロテインCのcDNAは、HindIII-XbaI消化後に単離し、そしてHindIII-XbaI開裂pRc/CMVベクターに連結し、そして293細胞をトランスフェクションするために使用した。

## 【0167】

突然変異したヒトプロテインCのcDNAを得るために、5'末端アミノ酸から313位までのコード領域を含むヒトプロテインCのcDNAの断片を、鋳型として完全なヒトプロテインCのcDNAおよび1対のプライマーAおよびBを使用して増幅した。プライマーBは突然変異誘発性オリゴヌクレオチドであった(スキーム1のPCR1)。一部が

第1断片と重複する303位後の残りのアミノ酸を含むヒトプロテインCのcDNAの第2断片は、鋳型として完全なヒトプロテインCのcDNAおよび1対のプライマーCおよびDを使用して増幅し、プライマーCは突然変異誘発性オリゴヌクレオチドであった(スキーム1のPCR2)。

#### 【0168】

上記PCR増幅手順から、2つの部分的に重複した二本鎖cDNA断片が得られ、この両方が突然変異したDNA配列を含んだ。これら2つのcDNAは、さらなるPCR手順で2つのプライマーAおよびDと一緒に鋳型として使用して、所望する突然変異アミノ酸を含む完全長のヒトプロテインCのcDNAを増幅した(スキーム1のPCR3)。

#### 【0169】

上記各PCR反応の試薬混合物は、0.25 μgの鋳型DNA、200 μMの各デオキシリボヌクレオシドトリホスフェート(dNTP: dATP / dCTP / dGTP / dTTP)、0.5 μMの各プライマーおよび2.5 UのPwo-DNAポリメラーゼ(ベリンガーマンハイム: Boehringer Mannheim)をTris-HClバッファー(10 mM Tris、25 mM KCl、5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> および2 mM MgSO<sub>4</sub>、pH 8.85)中に含む100 μlであった。サンプルは、94で2分の変性期間、55で2分のアニーリング期間、そして72で2分の延長期間からなる30サイクルのPCRにかけた。増幅後、DNAは1 mM EDTAを含有する40 mM Tris-酢酸バッファー中で0.8%アガロースゲルの電気泳動にかけた。すべてのPCR増幅産物は、JETプラスミドMiniprep-キット(サビーンバイオテック(Saveen Biotech)社、スウェーデン)を使用することにより精製した。

#### 【0170】

所望する突然変異を含有する生成したヒトプロテインCのcDNAは、SacIIおよびApaIで消化し、そして次いでSacIIおよびApaI消化からの断片(ヌクレオチド728~1311)を、完全なヒトプロテインC断片を含むベクターpUC18にクローン化して(HindIII-SacII、5'末端-ヌクレオチド728; およびApaI-XbaI、ヌクレオチド1311-3'末端)、所望の突然変異、すなわち配列番号6のヒト野生型配列の代わりに突然変異した配列番号7の配列を含んでなるヒトプロテインCをコードするヒトプロテインCの完全長cDNAを生成した。

#### 【0171】

さらにウシプロテインCのcDNAを突然変異させ、そして突然変異したcDNAは、異なるプライマーおよび鋳型を使用したことを除き、本質的に上記に開示したように増幅させた。所望の突然変異を含むウシプロテインCのcDNAのPCR増幅産物は、SalIおよびBglIIで開裂し、そしてSalIおよびBglIIでの消化に由来する断片(ヌクレオチド600~1123)を、完全なウシプロテインC断片を含むベクターpUC18にクローン化して(HindIII-SalI、5'末端-ヌクレオチド600; およびBglII-XbaI、ヌクレオチド1123-3'末端)、ベクターpUC18中に突然変異したウシプロテインCの完全長cDNAを生成し、その後HindIIIおよびXbaIを使用して所望の突然変異を含む、すなわち配列番号7のウシ野生型配列の代わりに突然変異した配列番号6の配列を含んでなるウシプロテインC変異体をコードするウシプロテインCの完全長cDNAを開裂した。

#### 【0172】

次いで上記突然変異した各ヒトおよびウシプロテインCのcDNAを、HindIIIおよびXbaIで消化し、そして適切な制限断片をベクターpRc/CMVにクローン化し、これを同じ制限酵素で消化した。得られたベクターは突然変異したヒトまたはウシプロテインCの真核細胞中での発現に使用した。

#### 【0173】

適切な宿主細胞のトランスフェクション前に、すべての突然変異はSanger et al., 同上のジデオキシチエンターミネーション法によるDNAシーケンシング

10

20

30

40

50

により確認した。

【 0 1 7 4 】

上記の位置指定突然変異誘発法について、表 I に 5' から 3' 方向で掲げた以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用した。

【 0 1 7 5 】

【 表 8 】

表 I

プライマー名	ヌクレオチド配列	
A	5'-AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CCC AAG CTT-3' (配列番号:34)	10
B	5'-GTT TCT CTT <u>GGT CTC GTC ACG</u> GTA GCC CCA GCC CGT CAC GAG-3' (配列番号:35)	
C	5'- <u>CGT GAC GAG</u> ACC AAG AGA AAC CGC ACC TTC GTC CTC-3' (配列番号:36)	
D	5'-GCA TTT AGG TGA CAC TAT AGA ATA GGG CCC TCT AGA-3' (配列番号:37)	
E	5'- <u>GGC CTC CTT CTC TCG GCT GCT GTG</u> GTA GCC CCA GCC CGT CAC-3' (配列番号:38)	20
F	5'- <u>CAC AGC AGC CGA GAG AAG GAG GCC</u> AAG AGA AAC CGC ACC TTC-3' (配列番号:39)	

【 0 1 7 6 】

プライマー A ~ D は、上に開示したようにヒトプロテイン C の c D N A を突然変異させ、そして増幅させるために使用した。ウシプロテイン C の c D N A を突然変異させ、そして増幅させるために、同様に 2 組のプライマー、すなわちプライマー A および E およびプライマー F および D を使用し、プライマー E および F は突然変異誘発性プライマーである。これらプライマーのヌクレオチド配列は以下に説明するように、ベクターのヌクレオチド配列の一部またはプロテイン C の c D N A ヌクレオチド配列の一部に関連している。

【 0 1 7 7 】

プライマー A は、ベクター p R c / C M V 中のヌクレオチド 8 6 0 ~ 8 9 5 に対応し、そして p R c / C M V ベクター D N A とプロテイン C の c D N A との間に H i n d I I I 制限部位を提供する。

【 0 1 7 8 】

プライマー B は、ヒトプロテイン C の c D N A の部分的な修飾されたアンチセンスヌクレオチド配列に対応し、修飾されたセンス配列は： L V T G W G Y R D E T K R N ( 配列番号 4 0 ) をコードする。

【 0 1 7 9 】

このアミノ酸残基の配列は、包括的なアミノ酸残基番号 2 9 6 ~ 3 1 3 に由来するヒトプロテイン C の修飾された配列に対応し、ここで残基 3 0 3 ~ 3 1 0 の配列は突然変異を含み、すなわち残基 3 0 3、3 0 4、3 0 5 および 3 0 8 が削除され、そして残基 3 0 7 および 3 1 0 は置換され、生じる配列 R D E T ( 配列番号 4 3 ) はウシプロテイン C の対応する部分と同一である ( 残基 3 0 5 ~ 3 0 8 )。

【 0 1 8 0 】

プライマー C は、R D E T K R N R T F V L ( 配列番号 4 1 ) をコードするヒトプロテイン C の c D N A の部分的な修飾されたヌクレオチド配列に対応する。

【 0 1 8 1 】

10

20

30

40

50

このアミノ酸残基の配列は、包括的なアミノ酸残基番号303～318に由来するヒトプロテインCの修飾された配列に対応し、これは上記プライマーBについて開示されたものと同じ突然変異を含み、すなわち残基番号303～305および308が削除され、そして残基番号307および310は置換されている。すなわちプライマーCはウシプロテインCの対応する配列と同一の短縮化配列RDE Tをコードする。

【0182】

プライマーDは、ベクターpRc / CMV中のヌクレオチド984～1019の配列に対するアンチセンス配列に対応し、そしてpRc / CMVベクターDNAとプロテインCのcDNAとの間にXba I制限部位を提供する。

【0183】

プライマーEは、ウシプロテインCのcDNAの部分的な修飾されたアンチセンスヌクレオチド配列に対応し、修飾されたセンス配列は；VTGWGY HSSREKEA (配列番号42)をコードする。

【0184】

このアミノ酸残基の配列は、包括的なアミノ酸残基番号299～308に由来するウシプロテインCの修飾された配列に対応し、ここで残基番号305～308 (RDE T) (配列番号43)に対応する配列は突然変異、すなわち4つの挿入および2つの置換を含み、突然変異した配列はヒトプロテインC (残基番号303～310)の対応する部分と同一のHSSREKEA (配列番号44)である。

【0185】

プライマーFは、HSSREKEAKRNRTF (配列番号45)をコードするウシプロテインCのcDNAの部分的な修飾されたアンチセンスヌクレオチド配列に対応する。このアミノ酸残基配列は、包括的なアミノ酸残基番号305～314に由来するウシプロテインCの修飾された配列に対応し、これは上記プライマーEで述べたものと同じ突然変異を305と308位の間に含む。すなわちプライマーFは、ヒトプロテインCの対応する配列と同一である延長された配列HSSREKEA (配列番号46)をコードする。

(b) バリエーションまたは野生型プロテインCを生産する安定な形質転換体の生産

バリエーションまたは野生型プロテインCを生産する安定な形質転換体を生産するために、アデノウイルスでトランスフェクトしたヒト腎細胞系293を、10%のウシ胎児血清、2 mMのL-グルタミン、100 U / mlのペニシリン、100 U / mlのストレプトマイシンおよび10 μg / mlのビタミンK<sub>1</sub>を含有するDEME培地中で成長させ、そして工程(a)からの野生型または突然変異したプロテインCのcDNAを含んでなる発現ベクターでトランスフェクトした。トランスフェクションは以前に記載された(Felgner et al., 1987)のようにリポフェクション法に従った。簡単に説明すると、2 mMのL-グルタミンを含有するDEMEで100 μlに希釈した2 μgのベクターDNAを、同じバッファーで100 μlに希釈した10 μlリポフェクション(1 μg / μl)と混合した。混合物を室温に10～15分間維持し、そして1.8 mlに培地で希釈し、そして次いで同じ培地で2回洗浄した細胞(5 cmのペトリ皿中、25～50%の集密度)に加えた。

(c) バリエーションまたは野生型プロテインCの発現。(b)章のトランスフェクトした細胞を16時間インキュベーションし、その後、培地を10%のウシ血清を含有する完全培地に交換し、そして細胞をさらに48～72時間インキュベーションした。次いで細胞をトリプシン処理し、そして選択培地(10%血清、400 μg / mlのG418、2 mMのL-グルタミン、100 U / mlのペニシリン、100 U / mlのストレプトマイシンおよび10 μg / mlのビタミンK<sub>1</sub>を含んでなるDMEM)を含む10 cmの皿に播種した(Grinnell et al., 1990)。G418耐性コロニーは3～5週の後選択後に得た。各DNAトランスフェクション手順から、24コロニーを選択し、そしてコンフルエンスになるまで成長させた。すべてのコロニーは、モノクローナル抗体HPC<sub>4</sub>(ヒトプロテインCについて)またはモノクローナル抗体BPC<sub>5</sub>(ウシプロテインCについて)を使用したドット-プロットアッセイによりスクリーニングしてプロテ

10

20

30

40

50

ンCの発現を調査した。高発現細胞コロニーを選択し、そして選択培地中でコンフルエンスになるまで成長させた。その後、これらの細胞をならし培地（血清を欠く選択培地）中で成長させて、プロテインCまたはそのバリエーションの発現を開始させ、この培地は選択培地のように72時間毎に交換した。適当な時間後、各発現産物を含有するならし培地は該産物を（d）章で精製するために集めた。

（d）組換え野生型および突然変異タンパク質の精製

（i）ウシ組換えプロテインCおよびその変異体は、以前に記載されたように精製した（Yen et al., 1990）。5 mMのEDTAおよび0.2 μMのPPACKを、（c）章で集めたならし培地に加えた。次いで培地をファルマシアFFQアニオン-交換カラムにのせ、そして室温でCaCl<sub>2</sub> 勾配で溶出した（出発溶液、20 mMのTris-HCl / 150 mMのNaCl、pH 7.4；限定溶液、20 mMのTris-HCl / 150 mMのNaCl / 30 mMのCaCl<sub>2</sub>、pH 7.4）。CaCl<sub>2</sub>はChelex 100処理と組み合わせで一晩透析することにより除去した（20 mMのTris-HCl、150 mMのNaCl、pH 7.4）。透析物を2回目のFFQカラムにのせてプロテインCまたはその変異体をカラムに吸着させ、その後タンパク質をNaCl勾配溶液（出発溶液、20 mMのTris-HCl / 150 mMのNaCl、pH 7.4；限定溶液、20 mMのTris-HCl / 500 mMのNaCl、pH 7.4）で溶出した。

（ii）ヒト野生型または変異体プロテインCを生産する形質転換体から（c）章で得られた培養基を最初にカラム精製に供し、次いでわずかに変更した（He et al., 1994）したことを除き以前に記載されたように（Rezaie and Esmon, 1994）、モノクローナル抗体HPC<sub>4</sub>を持つアフィニティークラムにのせた。

【0186】

（i）および（ii）で得た精製タンパク質をYM10フィルター（アミコン）で濃縮し、TBSバッファー（50 mMのTris-HClおよび150 mMのNaCl、pH 7.4）に対して12時間透析し、そしてその使用まで-80℃で保存した。

【0187】

上記野生型および変異体プロテインCの純度および均一性を、SDS-PAGEにより確立した。この電気泳動手順はポリアクリルアミド（10～15%）のスラブ-ゲル電気泳動として、0.1%のSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）の存在下、還元および非還元条件下で行い、ここで該タンパク質は銀染色により視覚化された（Morrissey, 1981）。

【0188】

5～15%のアクリルアミド濃度勾配を使用したSDS-PAGE分析および上記のように精製したタンパク質の泳動の結果は、実施例1（c）での発現から得られたすべての組換えプロテインCが単一バンドとして非還元条件下で各血漿由来タンパク質の分子量に類似する相対的分子量で移動することを示した。ヒトプロテインCは62 kDaの見かけの分子量を有し、一方ウシプロテインCは幾分か小さかった。以前の報告と一致して、血漿由来ヒトプロテインC、組換え野生型プロテインCおよび変異体プロテインCは、グリコシル化バリエーションとして および プロテインCに相当する2つのサブフォームを現した（Miletich and Broze, 1990）。しかしこれら2つのサブフォームはウシプロテインCでは明らかではなかった。還元条件下で、各組換えプロテインCに由来する重鎖は二本鎖として移動した（Mr 41 kDa）。軽鎖（Mr 21 kDa）も観察された。これは実施例1（b）からの形質転換細胞が組換え野生型および変異体プロテインC誘導体を類似様式で生産することを示す。

（e）プロテインC変異体の特性決定

（1）前記工程で得られたプロテインC変異体を特性決定するために、変異体および野生型プロテインCを活性化し、そしてそれらの活性を以下の試験法に従い測定した。以下に記載するような活性阻害試験も行った。

（1）（i）プロテインCの活性化およびアミド分解活性アッセイ

10

20

30

40

50



トロンビンによるプロテインCの活性化形（活性化プロテインC、APC）への活性化は、わずかな変更を除き以前に記載されたように行った（Solymos et al., 1988）。簡単に説明すると、プロテインCをトロンビン（1:10、重量/重量）と37で2時間、5 mMのEDTAの存在下でTBS中にてインキュベーションした。インキュベーション後、混合物をスルホプロピル-Sepharoseカラムに通してトロンビンを除去した。SDS-PAGEで還元したプロテインCとAPCとの間の移動度の差異により、プロテインCが完全に活性化されたことを確認した。APCのアミド分解活性は、合成基質S2238（クロモジェニックス社、スウェーデン）の加水分解の決定により測定し、この過程はVmaxキネティックマイクロプレートリーダー（Victor、モレキュラーデバイス（Molecular Devices）社、米国）中、室温にて405 nmで監視した。

10

#### (1)(ii) 活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）アッセイ

APC活性の定量的測定は、APT時間の延長に基づいた。Coatest APC耐性キット（クロモジェニックス社、メルンダー、スウェーデン）をAPCのAPTTアッセイに使用した。50 µlのヒトまたはウシクエン酸処理正常血漿を50 µlのAPT試薬と37で200秒間インキュベーションし、そして次いでAPC（0~10 nMの最終濃度）を含有する100 µlのCaCl<sub>2</sub>（12.5 mM）を加えた。凝固時間はAmelung-Coagulometer KC10（スウェディッシュ ラベックス（Swedish Labex）社）を使用して測定した。すべての希釈はTBSバッファ中、0.1%のウシ血清アルブミン（BSA）の存在下で作成した。

20

#### (1)(iii) FVIIa不活性化アッセイ

種々の濃度のヒトまたはウシ組換えAPC（0~32 nM）を、プロテインS（20 nM）および第V因子（20 nM）とマイクロタイタープレートウェル（Linbro、フローラボラトリーズ（Flow Laboratories））内で、25 µlの最終容量の50 mM Tris-HCl、150 mM NaClバッファ中（10.5 mMのCaCl<sub>2</sub>、0.1% BSAを含有する、pH 7.4）を用いて混合した。80 µlのFVIIa試薬（ウシ第IXa因子、ヒト第VIIa因子、CaCl<sub>2</sub> およびリン脂質を含む）を混合物に加えた。室温で5分間インキュベーションした後、ウシ第X因子を加えた。続いて形成された活性化第X因子の量は、5分間のインキュベーション後に50 µlの合成基質S-2222を加えることにより測定した。反応は暗中、室温で5分間のインキュベーション後に50 µlの20%酢酸を加えることにより停止し、そして405 nmの吸収を監視した。第Xa因子の生産は第VIIa因子の活性に直線的に相関し、これを各対照の活性の割合として表す（Shen and Dahlbaeck, 1994）。上に与えたすべての試薬濃度は最終濃度である。

30

#### (1)(iv) プロトロンビン時間（PT）アッセイ

APCによる第V因子の不活性化は、PTアッセイに従い測定した。100 µlのヒトまたはウシ血漿（1:3希釈）を37で120秒間インキュベーションし、その後、凝固は300 µlのネオプラスチン（Neoplastin）およびAPCの混合物（ネオプラスチン: APC、2:1、容量/容量）を加えることにより開始した。APCの最終濃度は0~30 nMであった。このアッセイはAmelung-Coagulometer KC10で行った。

40

#### (1)(v) ヒト血漿中でのプロテインCおよびプロテインC変異体の不活性化

プロテインCの活性化に由来するAPC（ヒトまたはウシ野生型またはそれらの変異体のいずれか）は、300 µlのクエン酸処理ヒト血漿を用いて37で70 nMに希釈した。サンプル（40 µl）を集め、そして0~60分の範囲の時点で冷TBS中で5倍に希釈した。各希釈したサンプルから、60 µlをマイクロタイタープレート上のウェル中の50 µlの合成基質S-2238（クロモジェニックス社、スウェーデン）（1 mM）に加えた。APCによるS-2238のアミド分解速度は、405 nmで0~10分間、連続的に記録した（Holly and Foster, 1994）。

#### (1)(vi) プロテインCおよびその変異体の1ATによる不活性化

50

野生型または突然変異ヒトAPCまたはウシAPC（各々170 nM）を、ヒト 1AT（0～16 μM）と80 μlのTBSバッファ（0.1% BSAを含む）と37で一晩、別個にインキュベーションした（Holly and Foster, 1994）。サンプル（20 μl）を集め、そしてマイクロタイタープレート上のウェル中の100 μlのS-2238（1 mM）に加えた。S-2238の加水分解速度は、405 nmで室温にて0～10分間、Vmaxキネティックプレートリーダー中で監視した。

（1）（vii）プロテインCおよびプロテインC変異体のPCIによる不活性化

種々の組換えAPC（40 nM）を、88 nMのPCIと1 mlのTBSバッファ（0.1% BSAを含む）中に37でインキュベーションした。インキュベーション後、サンプル（50 μl）を集め、そして0～120分の時間範囲の時点で氷上に置き、次いで50 μlのS-2238（1 mM）に加えた。S-2238の加水分解速度は、405 nmで室温にて0～10分間、測定した。

10

（2）上に開示したように行った活性試験の結果を以下にまとめる。

（2）（i）実施例1（d）からのプロテインCの活性化後、活性化プロテインCについて泳動したSDS-PAGEは、すべての組換え野生型および変異体APCの分子量が対応する血漿由来のAPCに類似したが、各不活性化形よりも小さいことを示した。完全なプロテインCのバンドはAPCサンプル中には観察されず、そしてこれらすべてのタンパク質の純度はゲル上で90%より高かった。すべてのAPCのアミド分解活性は、合成基質S-2238を用いて測定した。野生型ヒトおよびウシAPCについて、初速度は本質的に同じであるが、変異体組換えヒト活性化プロテインC（ヒトAPC-SPと命名）の初速度は野生型APCよりも約5倍高かった。しかし変異体組換えウシ活性化プロテインC（ウシAPC-SPと命名）については、初速度は野生型APCのわずか約1/10であった。これらの結果を図1に示す。

20

（2）（ii）APTTアッセイでは、組換え野生型および変異体APCの抗凝固活性をヒト血漿、ウシプロテインSを補充したヒト血漿およびウシ血漿中で分析した。図2Aから明らかであるように、ヒト血漿中でヒトAPC-SPは野生型ヒトAPCよりも高い抗凝固活性を現すが、野生型APCもウシAPC-SPもいかなる実質的な抗凝固活性を現さなかった。一方、これらすべてのAPCはウシ血漿中およびウシプロテインSを補充したヒト血漿中で抗凝固機能を現した。しかしウシAPCおよびヒトAPC-SPはヒトAPCおよびウシAPC-SPよりも高い抗凝固活性を示した（図2B、2C）。

30

（2）（iii）ヒトプロテインSおよび第V因子の存在下で行った第VIIa因子不活性化アッセイにおいて、第VIIa因子の活性は上の（2）（i）章からのすべてのAPCにより不活性化されたが、高濃度が必要であった。低濃度で、ウシ野生型APCもウシAPC-SPも第VIIa因子を不活性化できなかった。ヒトAPC-SPは野生型ヒトAPCよりも強力な抗凝固活性を現した（図3A、3B）。野生型ヒトおよびウシAPCならびにそれらの変異体は、ウシプロテインSおよびウシ第V因子の存在下で第VIIa因子活性を阻害することができたが、野生型ウシAPCおよびウシAPC-SPは両方とも野生型ヒトAPCおよびヒトAPC-SPよりも効率的に働いた（図3C）。

（2）（iv）（1）（iv）のPTアッセイに従い、野生型APCおよびその変異体による第Va因子の不活性化を、ヒト血漿およびウシ血漿中で試験した。両野生型ヒトAPCおよびヒトAPC-SPともこのPTアッセイにおいて凝固時間を本質的に上げた。さらにヒトAPC-SPは野生型ヒトAPCよりも活性であった。野生型ウシAPCもウシAPC-SPもヒト血漿にいかなる効果も及ぼさなかった（図4A）。図4Bから明らかであるように、野生型ヒトAPCおよびヒトAPC-SPはウシ血漿中で凝固時間を効率的に延長したが、野生型ウシAPCおよびその変異体は、ウシ血漿中で弱い抗凝固活性を現しただけであった（図4B）。

40

（2）（v）-（vii）APC不活性化試験の結果

上記APC不活性化試験（1）（v）は、野生型および変異体APCのアミド分解活性が0～60分で60～90%下降したことを示した（図5）。すなわちこれらAPCはPCI、1AT、<sub>2</sub>-マクログロブリン等のような数種のセリンプロテアーゼインヒビ

50

ターにより不活性化されるはずである。

#### 【0189】

実際に両野生型ヒトAPCおよびヒトAPC-SPとも、試験(1)(vi)で高濃度の1ATにより実質的に阻害された。しかし野生型ウシAPCおよびウシAPC-SPはこの阻害に対してほぼ完全に耐性であった。

#### 【0190】

(1)(vii)に従い得られた試験結果は、ウシ野生型APCがヒトPCIにより効率的に分解されるが、ウシAPC-SPはヒトPCIによりさほど効率的に阻害されなかったことを示した。一方、ヒトAPC-SPのアミド分解活性は、野生型ヒトAPCよりもはるかに早かったが、その速度は野生型ウシAPCの速度に類似した。

10

#### 【実施例2】

#### 【0191】

プロテインCのGla-ドメイン変異体の調製

#### (a) 位置指定突然変異誘発法

Gla-ドメインに修飾を含む種々のプロテインCバリエーションは、以前にShen et al (J. Biol. Chem. 1998, 273: 31086-31091およびBiochemistry 1997, 36: 16025-16031)により本質的に記載されたように、組換え技術を用いて作成した。

#### 【0192】

Johan Stenflo博士(スウェーデン、マルメの大学病院、臨床化学部)の好意により贈られた完全長のヒトプロテインCのcDNAクローンを、制限酵素HindIIIおよびXbaIで消化し、そして完全なPCRコード領域、すなわち完全長のプロテインCのcDNAを含んでなる生成した制限断片を、HindIIIおよびXbaIで消化した発現ベクターpRc/CMVにクローン化した。

20

#### 【0193】

野生型ヒトプロテインCのコード配列を含む生成した発現ベクターを、プロテインCのGla-モジュールの位置指定突然変異誘発法に使用し、ここで標的DNAを増幅するためのPCR手順を以前に記載されたように行った(Shen et al., 同上)。

#### 【0194】

突然変異誘発プライマーをこの手順に使用するために設計して、10、11、12、23、32、33および44位での野生型アミノ酸残基の種々の別のアミノ酸に交換した。より具体的には10位でヒスチジン(H)をグルタミン(Q)に置き換え；11位でセリン(S)をグリシン(G)に置き換え；12位でセリン(S)をアスパラギン(N)に置き換え；23位でアスパラギン酸(D)をセリン(S)に置き換え；32位でグルタミン(Q)をグルタミン酸(E)に置き換え、これは成熟タンパク質でGla(ガンマ-カルボキシグルタミン酸に転換される)；33位でアスパラギン(N)をアスパラギン酸(D)に置き換え；そして最後に44位でヒスチジン(H)をチロシン(Y)に置き換えた。これらのプライマーは以下のバリエーション(または変異体)を生産するために使用した：

30

変異体1)はQGNと命名した(10、11、12位を突然変異させた)。

変異体2)はSEDと命名した(23、32および33位を突然変異させた)。

40

変異体3)はSEDYと命名した(23、32、33および44位を突然変異させた)。

変異体4)はQGNSEDYと命名し、これは変異体1)と3)の組み合わせである(QGNおよびSEDY)。

変異体5)はGNEDと命名し、そして変異体6)はQGEDと命名した(両方ともShen et alにより以前に記載された)を比較として使用した。

#### 【0195】

QGN変異体を作成するために、2つの以下のオリゴヌクレオチドを合成し、そして第1のPCR手順に使用した、すなわちプライマーAはヌクレオチド配列：5'-AAATTAATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CCC AAG CTT-3'(配列番号34)(HindIIIクローニング部位を含むベクターpRc

50

／CMV中のヌクレオチド860～895のセンスに対応)を有し、そしてプライマーBはヌクレオチド配列：G C A C T C C C G C T C C A G G T T G C C T T G A C G G A G C T C C T C C A G G A A (配列番号47)(対応するヌクレオチドを下線により示す突然変異した10～12位を含むアミノ酸4～17をコードするDNA範囲の第2鎖に対応する)。これらプライマーAおよびBはPCR反応に使用し、ここでwtヒトプロテインCのcDNAを鋳型として使用した。PCR産物は、変異体アミノ酸残基を含む適切な約200bp長の断片を生じるHindIIIおよびBsrBIで開裂した。この断片を2つの他のDNA片に連結し、その1つはwtヒトプロテインCのcDNAの大きな部分をコードするBsrBI-XbaI断片であり、そしてもう1つはHindIII-XbaI開裂pRc/CMVベクターであった。連結したcDNAは制限酵素開裂(HindIII/BsrBI)で検査し、そしてシーケンシングによりQGN突然変異を確認した。 10

#### 【0196】

幾つかの工程を作ってSE DYを作成した。第1はすでにE32D33突然変異を有するcDNAにS23突然変異を作成することであった(Shen et al J. Biol. Chem. 1998, 273: 31086-31091)。S23突然変異には1つはプライマーCと命名し、そしてもう1つはプライマーDと命名した2つのプライマーを作成した。プライマーCはヌクレオチド配列：A T A G A G G A G A T G T G T A G C T T C G A G G A G G G C C A A G (配列番号48)(突然変異には下線を付す)を有し；そしてプライマーDはヌクレオチド配列：C T T G G C C T C C T C G A A G C T A C A G A T C T C C T C T A T (配列番号49)(突然変異には下線を付す)を有した。変異体cDNAを作成するために、2つのPCR反応を行い、ここで変異体cDNA EDを鋳型として使用し、そしてプライマーAおよびCは第1反応で使用する一方、プライマーDおよびEは第2反応で使用した。プライマーEはヌクレオチド配列：5'-G C A T T T A G G T G A C A C T A T A G A A T A G G G C C C T C T A G A -3'(配列番号37)(XbaIクロニング部位を含むベクターpRc/CMV中のヌクレオチド984～1019に対するアンチセンス)を有した。プライマーAおよびCが関与した第1PCR反応は、プロテインCのcDNAの5'部分を増幅し(アミノ酸28までをコードする)、一方プライマーDおよびEが関与した第2PCR反応は、アミノ酸18からプロテインCの終わりまでをコードするcDNAの3'部分を生成した。この反応で生産されたこれら2つの産物は、次いでプライマーAおよびEを使用するさらなるPCR反応で合わされた。この手順に由来する最終産物は、23、32および33位に突然変異を持つ全プロテインCをコードするcDNAであった。次いでこのPCR産物をHindIIIおよびSalIで開裂し、これは360bpの5'断片を与え、これを精製し、そしてwtプロテインCのSalI-XbaI断片とHindIII-XbaIで開裂したpRc/CMVベクター中で連結した。このベクターはこのように完全長変異体SE DのcDNAを含んだ。このcDNAをPCR反応の鋳型として使用して、変異体SE DY(すなわち44位がヒスチジンからチロシン(Y)に突然変異した)を作成した。この反応で、プライマーAは44位が突然変異するように設計し、そして以下のヌクレオチド配列：C T G G T C A C C G T C G A C G T A C T T G G A C C A G A A G G C C A G (配列番号50)(アミノ酸残基39～49をコードする第2鎖に対応する-下線を付したコドンは突然変異スポットである)を有するプライマーFと合わせた。このPCR産物をHindIIIおよびSalIで開裂し、そして約360bp長の断片をプロテインCのcDNAの残りの部分、すなわちSalI-XbaI断片およびHindIII-XbaIで開裂したpRc/CMVに連結した。 40

#### 【0197】

次いで変異体QGNSE DYをコードする完全に突然変異したプロテインCのcDNAは、QGNおよびSE DY変異体のcDNAを使用して作成した。この組み合わせは制限酵素消化および適切な断片の連結を使用して作成した。すなわちQGN変異体のcDNA 50

はH i n d I I IおよびB s r B Iで開裂し、そして約200bp長の5'断片を単離し、そしてS E D Yのc D N Aに由来するB s r B I - X b a I断片(約1000bp長)と一緒に使用した。2つの断片をH i n d I I I - X b a Iで開裂したp R c / C V Mと連結して、Q G N S E D Y(本明細書中では“ A L L ”とも呼ぶ)をコードする完全長の変異体プロテインCのc D N Aを生成した。最終産物はシーケンシングで試験し、そして正しい突然変異を含むことが分かった。

#### 【0198】

記録のために、E 3 2 D 3 3変異体はプライマーG : 5' - C A G T G T G T C A T C C A C A T C T T C G A A A A T T T C C T T G G C - 3' (配列番号51) (アミノ酸27~38に関するアンチセンス、E 3 2 D 3 3の突然変異に下線を付した)を使用して、類似様式で作成した(この変異体はS h e n e t a l J . B i o l . C h e m 1998, 273:31086-31091に記載されている)。

#### 【0199】

D N Aシーケンシングですべての突然変異を確認した。ヒト293細胞での細胞培養、発現、精製およびプロテインC分子の特性決定は、以前に記載したように(S h e n , L e t a l J . B i o l . C h e m 1998; 273:31086-31091)に記載されているように行った。

#### 【0200】

簡単に説明すると、望ましい突然変異を含む生成したヒトプロテインCのc D N Aを、S a c I I IおよびA p a Iで消化し、次いでS a c I I IおよびA p a I消化からの断片(ヌクレオチド728~1311)を、完全なヒトプロテインC断片(H i n d I I I I - S a c I I I、5'末端-ヌクレオチド728;およびA p a I - X b a I、ヌクレオチド1311-3'末端)を含むベクターp U C 18にクローン化して、所望する突然変異を含んでなる、すなわちヒト野生型配列の代わりに突然変異した配列を含んでなるヒトプロテインC変異体をコードするヒトプロテインC完全長c D N Aを生成した。

#### 【0201】

次いで上記の各突然変異ヒトプロテインCのc D N AをH i n d I I I IおよびX b a Iで消化し、そして適切な制限断片をすでに同じ制限酵素で消化したベクターp R c / C M Vにクローン化した。得られたベクターは真核細胞中での突然変異ヒトプロテインCの発現に使用した。

#### 【0202】

適切な宿主細胞のトランスフェクション前に、すべての突然変異はS a n g e r e t a l . , 同上のジデオキシチェンターミネーション法によるD N Aシーケンシングにより確認した。

#### (b) バリエーションまたは野生型プロテインCを生産する安定な形質転換体の生産

バリエーションまたは野生型プロテインCを生産する安定な形質転換体を生産するために、アデノウイルスでトランスフェクトしたヒト腎臓細胞系293を、10%のウシ胎児血清、2mMのL-グルタミン、100U/mlのペニシリン、100U/mlのストレプトマイシンおよび10μg/mlのビタミンK<sub>1</sub>を含有するD M E M培地中で成長させ、そして工程(a)からの野生型または突然変異したプロテインCのc D N Aを含んでなる発現ベクターでトランスフェクトした。トランスフェクションは以前に記載された(F e l g n e r e t a l . , 1987)のようにリポフェクティン法に従って行った。簡単に説明すると、2mMのL-グルタミンを含有するD M E Mで100μlに希釈した2μgのベクターD N Aを、同じバッファーで100μlに希釈した10μlリポフェクティン(1μg/μl)と混合した。混合物を室温に10~15分間維持し、そして1.8mlに培地で希釈し、そして次いで同じ培地で2回洗浄した細胞(5cmのペトリ皿中、25~50%の集密度)に加えた。

#### (c) バリエーションまたは野生型プロテインCの発現。

#### 【0203】

工程 ( b ) のトランスフェクトした細胞を 16 時間インキューベーションし、その後、培地を 10 % のウシ血清を含有する完全培地に交換し、そして細胞をさらに 48 ~ 72 時間インキューベーションした。次いで細胞をトリプシン処理し、そして選択培地 ( 10 % 血清、400  $\mu$ g / ml の G418、2 mM の L - グルタミン、100 U / ml のペニシリン、100 U / ml のストレプトマイシンおよび 10  $\mu$ g / ml のビタミン K<sub>1</sub> を含んでなる DMEM ) を含む 10 cm の皿に播種した ( Grinnell, et al. 1990 )。G418 耐性コロニーは 3 ~ 5 週間の選択後に得た。各 DNA トランスフェクション手順から、24 個のコロニーを選択し、そしてコンフルエンスになるまで成長させた。すべてのコロニーは、モノクローナル抗体 HPC<sub>4</sub> ( ヒトプロテイン C について特異的 ) を使用したドット - プロットアッセイによりスクリーニングしてプロテイン C の発現を調査した。高発現細胞コロニーを選択し、そして選択培地中でコンフルエンスになるまで成長させた。その後、これらの細胞をならし培地 ( 血清を欠く選択培地 ) 中で成長させて、プロテイン C またはそのバリエーションの発現を開始させ、この培地は選択培地のように 72 時間毎に交換した。適当な時間後、各発現産物を含有するならし培地は該産物を以下の工程 ( d ) で精製するために集めた。

10

( d ) 組換え野生型および突然変異タンパク質の精製

ヒト野生型または変異体プロテイン C を生産する形質転換体から、( c ) 章で得た培養基は、「プソイド - アフィニティー ( pseudo - affinity ) 」と命名されたクロマトグラフィー法を含んでなり、そして以前に記載された簡便かつ好都合の精製法 ( Yan et al., Biotechnology 1990, Vol. 8, 665 - 661 ) にかけた。

20

【 0204 】

上記で得た精製したタンパク質を、YM10 フィルター ( アミコン : Amicon ) で濃縮し、TBS バッファー ( 50 mM Tris - HCl および 150 mM NaCl、pH 7.4 ) に対して 12 時間透析し、そしてそれらを使用するまで - 80 °C で保存した。

【 0205 】

上記野生型および変異体プロテイン C の純度および均一性を、SDS - PAGE により確立した。この電気泳動手順はポリアクリルアミド ( 10 ~ 15 % ) のスラブ - ゲル電気泳動として、0.1 % の SDS ( ドデシル硫酸ナトリウム ) の存在下、還元および非還元条件下で泳動し、ここで該タンパク質は銀染色により視覚化された ( Morrissey, 1981 )。

30

【 実施例 3 】

【 0206 】

プロテイン C の Glu - ドメイン 変異体の特性決定

前記工程で得られたプロテイン C 変異体を特性決定するために、変異体および野生型プロテイン C を活性化し、そしてそれらの抗凝固活性を、血漿に基づくアッセイおよび精製した成分を用いた装置を含む種々の実験系で試験した。

【 0207 】

2 つの血漿系、1 つは活性化部分トロンボプラスチン時間 ( APTT ) 系およびもう 1 つはトロンボプラスチン時間 ( TP ) 系を試験した。APTT および TP 系の両方において、濃度を増加させて wt または変異体 APC の抗凝固活性を試験した。APTT 系では、APC の抗凝固活性は FVIIa および FVa の両方の分解に依存する一方、TP 系は主に FVa の分解に感受性である。しかし希釈した TP 系はある程度、FVIIa の分解にも感受性である。

40

( a ) APTT 反応により監視した APC バリエーションによる凝固阻害

( i ) 方法 : 血漿 ( 50  $\mu$ l ) を 50  $\mu$ l の APTT 試薬 ( オルガノン テクニカ ( Organon Technica ) からの APTT Platelet LS ) と混合し、そして 37 °C で 200 秒間インキューベーションした。凝固は 50  $\mu$ l の APC ( 図 6 に与える最終濃度 ) および 50  $\mu$ l の 25 mM の CaCl<sub>2</sub> との混合物により開始した。凝

50

固時間は *Amelung coagulometer* で測定した。

( i i ) 結果：この APTT に基づくアッセイで、wt APC の活性は変異体 1 )、3 ) および 4 )、すなわち QGN、SE DY および QGNSE DY ( ALL ) の活性、ならびに Shen et al ( *J. Biol. Chem.* 1998, 273 : 31086 - 31091 ) により以前に記載された 2 つの変異体、すなわちそれぞれ GNE D および QGE D と命名された変異体 5 ) および 6 ) の活性と比較した。

#### 【 0 2 0 8 】

図 6 に関して、ALL の抗凝固活性が wt APC の抗凝固活性に比べてかなり強化されることが明らかである。使用した最高濃度で、ALL は 1000 秒を越える凝固時間を生じるが、wt APC はわずか約 200 秒の凝固時間を与えただけであった。APC を加えない基本の標準凝固時間は、約 30 ~ 45 秒である。一方、2 つの以前に記載された変異体 QGE D および GNE D は、大変異なる結果を与えた。GNE D は wt APC よりもかなり活性である一方、QGE D は実際には wt APC よりも活性が低かった。バリエーション QGN および SE DY は GNE D と同程度に活性であったが、ALL よりも活性が低かった。

10

#### 【 0 2 0 9 】

この APTT アッセイで、試薬は標準的な市販の試薬であり、これは Shen et al ( *J. Biol. Chem.* 1998, 273 : 31086 - 31091 ) による実験で使用された試薬とは対照的である。この実験では、希釈しないと APC バリエーションが wt APC よりもより活性な抗凝固物質とならないので、希釈した APTT 試薬を使用した。Shen et al の参考文献の検討では、これは試薬中のリン脂質のレベルによると説明された。高レベルのリン脂質を使用すると、Shen et al による実験で使用した APC バリエーションの上昇した活性は容易に認識されなかった。希釈した試薬を使用した時のみ、著者は APC バリエーションの抗凝固活性における強い上昇を証明することができた。

20

#### 【 0 2 1 0 】

本バリエーション QGNSE DY ( ALL ) は、標準的レベルのリン脂質でも wt APC よりも明らかに一層活性であるので、独特であると思われる。

#### ( b ) APTT アッセイにおけるヒトプロテイン S の影響

( i ) 方法：プロテイン S の濃度を増加させながらプロテイン S 欠損血漿に加えて、図 7 に示す最終濃度を得た。血漿アリコート ( 50  $\mu$  l ) を APTT 試薬と混合し、次いで 37 で 200 秒間インキュベーションした。その後、wt または ALL 変異体 ( QGNSE DY ) のいずれかの APC を 50  $\mu$  l ( 20 nM 濃度 ) の容量で加え、次いで 50  $\mu$  l の 25 mM の  $\text{CaCl}_2$  を加えることにより凝固を直ちに開始した。結果はプロテイン S 欠損血漿中のプロテイン S の濃度に対して凝固時間をプロットした図 7 に示す。

30

#### 【 0 2 1 1 】

これらの実験は本質的に図 6 を参照にして上記のように行い、プロテイン S 欠損血漿を正常血漿の代わりに使用した。このプロテイン S 欠損は血漿ヒト起源であり、そしてプロテイン S の消耗はヒトプロテイン S に対する高度に効率的なモノクローナル抗体 ( HPS 54 - Dahlbeack et al ( *J. Biol. Chem.* 1990 265 : 8127 - 35 ) ) を使用した免疫 - 吸着の結果であった。

40

( i i ) 結果：図 7 に関連して、好適な Gl a - ドメインバリエーション、すなわち QGNSE DY バリエーションは、プロテイン S 欠乏血漿を使用した時でも wt APC よりかなり活性であったことは明らかである。特に興味深い考察は、外因性プロテイン S の添加が QGNSE DY ならびに wt APC の抗凝固活性を強化したことである。プロテイン S の不存在下では、変異体 ALL は約 160 秒の凝固時間を生じ、そしてこの凝固時間は試験系にプロテイン S を加えることにより 350 秒まで延長された。wt APC で得られた対応する値は、プロテイン S の不存在下で約 100 秒の基本凝固時間、そしてこの試験で使用した最高のプロテイン S 濃度の存在下で 150 秒の延長された凝固時間であった。このように ALL はプロテイン S の存在および不存在下の両方で本質的に wt APC よりも活性であ

50

り、そしてA L LはプロテインSの存在によりさらに強化されることは明らかである。これは、プロテインSにより刺激されなかったE s m o n a n d S m i r n o vにより彼らのA P Cバリエーションで得られた結果とは対照的である（米国特許第98/20118号明細書）。明らかに本バリエーションQ G N S E D YはプロテインSにより刺激されるので、E s m o n a n d S m i r n o vにより開示されたバリエーションよりも優れている。

（c）T P系により監視したA P Cバリエーションによる凝固阻害

（i）方法：正常血漿（50  $\mu$  l）を濃度を増加させた種々のA P Cバリエーション（50  $\mu$  lアリコート）と混合し、その後、凝固は組織因子の供給元として1/50に希釈したトロンボプラスチンの添加により開始した。凝固を開始するために、希釈したトロンボプラスチンは25 mMのC a C l<sub>2</sub>も含んだ。

（i i）結果：図8から明らかであるように、このアッセイで得られた結果はA P T T系で得られた結果に類似した。すなわちバリエーションQ G N S E D Yはw t A P Cよりもかなり活性であった。より具体的には使用した最高濃度で、バリエーションQ G N S E D Y（図8でA L Lと命名する）は、600秒に近い凝固時間を生じた。2番目に高いバリエーションはG N E Dであり、これは最高濃度で約180秒の凝固時間を生じた。対照的に、w t A P Cは約70秒の凝固時間を生じただけであった。外因性のA P Cを加えずに得られる基本凝固時間は、約40秒であった。

#### 【0212】

明らかにこの実験結果は、たとえw t A P Cの濃度を上げててもw t A P CがバリエーションQ G N S E D Yの抗凝固活性ほど高い抗凝固活性を現さないのので、w t A P Cと比べた時、バリエーションQ G N S E D Yは独自の特性を有することを示唆している。これはバリエーションQ G N S E D YのG l a - ドメインを作成するために行った突然変異誘発法により、w t A P Cに比べて新規かつ独自の機能を現す分子が作成されたことを示唆するのかもしれない。1つのそのような機能はF X aにより提供されるF V a中のA r g 506部位の保護に関する可能性がある。F X aはF V aにA r g 506に近い部位で結合し、そしてこれによりA r g 506部位の保護を生じることが知られている。恐らくQ G N S E D Yの独自かつ高リン - 脂質結合能は、F X aにより提供される保護を排除する。凝固アッセイ中、特定量のF X aが形成され、そしてこれはw t A P CがF V a中のA r g 506部位を開裂する能力を制限するかもしれない。Q G N S E D Yバリエーションのリン脂質膜だけでなくF V a分子に対する高い親和性により、F X aを置き換えることができる可能性がある。さらにこの試験で使用したA P Cの最高濃度で、Q G N S E D Yバリエーションはw t A P Cよりもかなり長く凝固時間を延長することができる。これはA P CバリエーションQ G N S E D Yが独自のインビボ特性を有し、すでに進行している凝固反応を阻害することができるかもしれないことを示唆している。

（d）P TアッセイにおけるプロテインSの影響

実施例3（b）（i）に記載したもののようなプロテインS欠損血漿を用いた実験も行い、実施例3（c）（i）のトロンボプラスチン系を使用した。これにより得られた結果は、実施例3（b）（i i）のA P T T系に記載した結果に類似した。簡単に説明すると、Q G N S E D YバリエーションはプロテインSの不存在下で活性であるが、さらにその活性はプロテインSにより強化される。

#### 【実施例4】

##### 【0213】

A P CによるF V aの不活性化

この実施例ではA P CバリエーションQ G N S E D Yの強化された活性が、F V a活性の損失が経時的に示されるF V aの分解をより具体的に特徴付けるように計画された系で確立された。

（i）方法：血漿F V a（0.76 nM）（血漿を1/25に希釈し、そしてそれに含まれるF Vをトロンビン添加により活性化する - これはF V aの供給源として使用した）をA P C（0.39 nM）と、25  $\mu$  Mのリン脂質小胞（10%のホスファチジルセリンおよび90%のホスファチジルコリンの混合物）の存在下でインキュベーションした。バ

10

20

30

40

50



ッファーは25 mM H e p e s、0.15 M N a C l、5 mM C a C l<sub>2</sub>、pH 7.5、および5 mg / ml B S Aであり、そして温度は37 であつた。

#### 【0214】

種々の時点で、アリコートを取り出し、そして残るF V a活性をF V aアッセイにより決定した。このアッセイはF V aが、F X aが媒介するプロトロンビン活性化を強化する能力に基づいた。このアッセイはウシF X a (5 n Mの最終濃度)、50 μ Mリン脂質小胞 (10 %のホスファチジルセリンおよび90 %のホスファチジルコリンの混合物) および0.5 μ Mのウシプロトロンビンを含んだ。トロンビンの生成は発色基質S 2 2 3 8 (クロモジェニックス社から入手可能) を使用して測定した。

( i i ) 結果: F V aとw t A P Cとのインキューベーション後のF V a活性の損失は、主に2つの開裂反応、すなわちA r g 5 0 6およびA r g 3 0 6での開裂反応の結果である。キネティク的に優先される反応はA r g 5 0 6で起こる反応であり、これはインキューベーションの最初の5分間に観察されるF V a活性の初期の迅速な損失をもたらす。A r g 5 0 6開裂はN i c o l a e s e t a l .により示されたように( J . B i o l . C h e m 1995 270:21158-66)、A r g 5 0 6で開裂されたF V aはF X aのコファクターとして未だ部分的に活性であり、その活性の約40 %は維持されているので、F V aの部分阻害をもたらすだけである。一方、A r g 3 0 6でのよりゆっくりとした開裂は、F V a活性の完全な損失をもたらす。このA r g 3 0 6開裂はインキューベーションの5分から25分の間に観察されるF V a活性のゆっくりとした減少に反映されるようにゆっくりと進行する。図9から明らかであるように、バリエーションQ G N およびS E D Yはw t A P Cよりもわずかに良いだけだが、バリエーションQ G N S E D Yの存在はさらにはかなり有力である。バリエーションQ G N S E D Yの存在は最初の5分間に約20 %のF V a活性までF V a活性の大変迅速な低下をもたらすだけでなく、最終的にはF V aをほぼ完全に阻害する。これらの結果は本バリエーションQ G N S E D Yがw t A P Cで見られるよりも迅速にA r g 5 0 6でF V aを開裂するだけでなく、w t A P Cに反して、A r g 3 0 6でもF V aを開裂することを示唆している。

#### 【0215】

バリエーションQ G N S E D Yおよびw t A P CがF V aを不活性化する能力を、以前に特性決定したバリエーションG N E Dの能力と比較する、上記に記載したものと同様な実験 (結果は示さず) を行った (図6および図8を参照にされたい)。G N E Dバリエーションは他の2つのA P Cについて得られた曲線のほとんど中間に位置する曲線を与えることが分かり、すなわちG N E Dはw t A P Cよりも有力であるが、本バリエーションQ G N S E D Yよりも効率が低かった。これらの実験はすべて、外因性プロテインSを加えずに行った。得られた結果は実施例3 ( a ) および ( c ) で行い、そしてそれぞれ図6および8で具体的に説明する実験結果と一致し、そして以前に開示したG N E Dバリエーションが中間の活性を有することも示す。

#### 【実施例5】

#### 【0216】

A P CによるF V aの不活性化

この実施例ではA P C濃度を変動させ、そして残るF V a活性を実施例4 ( i ) に記載したプロトロンビナーゼアッセイを使用してインキューベーションの10分後に測定した。

( i ) 方法: 希釈した正常混合血漿 (0.76 n M) から得たF V aを、濃度を上昇させたA P C (図10に与える最終濃度)、および25 μ Mのリン脂質小胞 (ホスファチジルセリン / ホスファチジルコリン、10 / 90、モル / モル) と、25 mMのH e p e s (pH 7.5)、150 mMのN a C l、5 mMのC a C l<sub>2</sub> および5 mg / mlのB S A中にて37 でインキューベーションした。F V a活性は実施例4 ( i ) に記載したプロトロンビナーゼアッセイで測定した。

( i i ) 結果: 図10から、これらの実験が変異体A L L、すなわちバリエーションQ G N S E D Yの優れた効力を明らかに証明していることは明白である。大変低濃度のA P Cでも

、F V a 活性の有力な阻害がもたらされた。さらに図 10 の曲線から、変異体 A L L は約 40 % の活性を現す F V a の中間分解産物を生じる A r g 506 部位で開裂するだけでなく、F V a 活性のほぼ完全な損失をもたらす A r g 306 部位でも開裂することは明らかである。

#### 【実施例 6】

##### 【0217】

A P C による正常および Q 506 変異体 F V a の不活性化

この実施例では、正常血漿 F V a を A P C 耐性血漿 ( F V : Q 506 - F V L e i d e n についてホモ接合性の個体から得た ) に由来する F V a に置き換えた。この実験は外因性プロテイン S の存在および不存在下で行った。

( i ) 方法 : 正常プール血漿から、またはホモ接合性 A P C 耐性 ( F V : Q 506 または F V L e i d e n ) の個体のいずれかから得た血漿 F V a を、0.4 n M の A P C および 25  $\mu$  M のリン脂質小胞と、精製することを除き実施例 ( 4 ) ( i ) に記載したようにインキューベーションした。ヒトプロテイン S ( 100 n M ) を加えて A r g 306 での開裂を確実にした。図 11 に示す時点で、残る F V a 活性を測定した。

( i i ) 結果 : w t A P C の添加は A r g 306 での開裂に相当する F V a 活性にゆっくりとした減少をもたらした。図 11 の曲線に相当するその傾斜は、図 9 で具体的に説明した w t A P C の曲線の第 2 部分に類似した。対照的に、本バリエーション Q G N S E D Y ( または A L L ) は、A P C バリエーションによる A r g 306 での F V a の強化された開裂と一致する F V a 活性に、より迅速な低下をもたらした。プロテイン S の添加は w t A P C および Q G N S E D Y を両方の効果を強化したが、それでも 2 つのタンパク質間の差異が残った。このようにプロテイン S は w t A P C を刺激するだけでなく、本 A P C バリエーションも刺激し、後者はリン脂質に対してかなり強化された結合親和性を現す。これはプロテイン S が A P C のリン脂質に関する結合親和性を強化することにより機能することを示唆したので興味深い。これがプロテイン S が働く唯一のメカニズムとなるならば、プロテイン S の添加は w t A P C と Q G N S E D Y バリエーションとの間の差異を減らすと期待される。

#### 【実施例 7】

##### 【0218】

A P C の膜結合親和性

w t およびバリエーションプロテイン C がリン脂質膜に結合する能力を調査するために、表面プラズマ共鳴法 ( s u r f a c e p l a s m a r e s o n a n c e t e c h n i q u e ) を使用した。この技法の市販のバリエーションは、B I A c o r e から入手可能である。この実施例では B I A c o r e 2000 を使用した。

( i ) 方法 : リン脂質小胞は B I A c o r e から L1 センサーチップの表面上で捕捉した。これらのチップは共有的に結合した疎水性の脂肪族基を持つデキストランヒドロゲルからなる。3 つの異なる種類の小胞は押し出し法を使用して ( A v e s t i n L i p o f a c t 基本押し出し装置を使用して ) 調製され、3 種類の小胞は異なるリン脂質組成、すなわち 1 ) 100 % のホスファチジルコリン ( 図 12 )、2 ) 80 % のホスファチジルコリンおよび 20 % のホスファチジルセリン ( 図 13 ) および 3 ) 20 % のホスファチジルセリン、20 % のホスファチジルエタノールアミンおよび 60 % のホスファチジルコリン ( 図 14 ) を有した。4 つのプロテイン C 変異体、すなわち H P C A L L ( すなわち Q G N S E D Y )、S E D Y、Q G N および S E D、および w t H P C を試験した。これらの実験ではプロテイン C 濃度は 0.5  $\mu$  M であり、そして使用したバッファーは 5 m M の C a C l<sub>2</sub> を含む 10 m M H e p e s、0.15 M N a C l、p H 7.5 であった。

##### 【0219】

ホスファチジルコリンを含有する膜は、負に荷電したホスファチジルセリンが膜の一部でなければビタミン K 依存性タンパク質に結合しない。ホスファチジルエタノールアミンは、膜中のこの種のリン脂質の存在がプロテイン C の結合を強化し、そして F V a の分解速度を強化することが示されたので特に興味深い。このように本実施例では、プロテイン C バリエーションがリン脂質の型に対して変化した特異性を示すかどうかを調査する。種々の

組換えプロテインCバリエーションをB I A c o r e 機に注入し、この機械は3種のリン脂質膜により覆われた異なる表面積を含むチップを装備していた。

( i i ) 結果：プロテインCの負に荷電したリン脂質膜に対するK<sub>d</sub>は約15 μMであるので、0.5 μMのプロテインC濃度（この濃度ではw t プロテインCが任意の特に強力な結合を与えると予想されないの）を使用した。このようにこれらの実験では、プロテインCバリエーションの結合能のいかなる上昇も見ることが可能なはずである。図12から明らかであるように、あるとしても大変少ないプロテインCバリエーションの100%ホスファチジルコリンを含有する膜への結合があった。達成された最大の応答単位は、わずか約160であった。図13から、明らかに20%のホスファチジルセリンを含む膜上で、Y-軸上にプロットされる応答で鋭い上昇により反映されるようなプロテインCの迅速な会合を示す特にバリエーションQ G N S E D Y（またはA L L）によるかなり良い結合が存在した。他のバリエーション、すなわちQ G N、S E D YおよびS E Dはw t プロテインCと同様に挙動した。図14に示すこの結果は、Q G N S E D Y（またはA L L）バリエーションとw t プロテインCとの間の最も顕著な差異が、ホスファチジルエタノールアミンを含有する膜を使用した時に観察されたことを具体的に説明している。Q G N S E D Yバリエーションは膜への結合において鋭い上昇を示し、そして大変急速に約700単位の応答に達した。続く200秒間、約850応答単位まで上がった。解離に続いてプロテインC注入の中止、そして結合したタンパク質が比較的迅速に膜から放出された。結合はE D T Aが結合を完全に逆行するので、カルシウム依存的であった。この挙動はビタミンK依存性タンパク質から予想される。

#### 実施例8～10

上記で調製したプロテインCのS P - 変異体およびG l a - ドメイン変異体を、都合よく前駆体として使用して、プロテインCのG l a - およびS P ドメインの両方に突然変異を含むプロテインCの組み合わせバリエーションを作成する。これは標準的なD N A 分子生物学法を使用してc D N A レベルでなされる。

#### 【0220】

好ましくは制限酵素開裂、断片の単離および断片の連結を使用する。

#### 【実施例8】

#### 【0221】

#### 組換えバリエーションの調製

個々のプロテインCバリエーションに関するc D N A はP c D N A 3ベクター中に存在し、そしてH i n d I I I - X b a I 部位を使用してベクターにクローン化する。プロテインCバリエーションに関する全c D N A はそれ故に、制限酵素H i n d I I I およびX b a I の消化によりベクターから放出され得る。このc D N A はさらに特異的酵素により断片化される。組み合わせバリエーションの作成に特に有用な酵素はS a l I であり、これはプロテインCのc D N A を2つの断片、c D N A の5'部分に対応する小さい断片（コード配列の最初の259ヌクレオチド）、すなわちG l a - ドメインを含むタンパク質のN-末端をコードする部分、およびプロテインCの残りをコードするより大きな3'断片に開裂する。S a l I の開裂部位は44位のコードのちょうど3'位に位置し、したがってより小さい断片が完全長のG l a - ドメインをコードする。G l a - ドメインおよびS P ドメインの両方に突然変異を有する組み合わせバリエーションは、G l a - ドメインが変異したプロテインCからのより小さい5'断片を、S P ドメインに突然変異を有するプロテインCバリエーションのより大きな3'断片とを組み合わせることにより作成することができる。2つのプロテインCのc D N A 断片をH i n d I I I - X b a I 開裂P c D N A 3ベクターと連結反応で組み合わせ、そして連結したD N A は細菌を形質転換させるために使用する。抗生物質耐性クローンを標準技術で選択し、そしてプラスミドD N A を単離し、そして配列をc D N A 中の突然変異の存在について確認する。次いでD N A はH E K 293細胞をトランスフェクトするために使用し、そして組換えプロテインCが発現され、精製され、そして他のプロテインCバリエーションについて記載したように特性決定される。

#### 【0222】

この方法に従い、G1a - ドメイン突然変異 QGNSEDY および配列番号 7 の修飾された配列からなる SP - ドメイン突然変異を含む「スーパー PC / APC」を調製する。

#### 【0223】

組換えプロテイン C は トロンビンにより活性化され、そして APTT 反応で試験される。スーパー - APC は野生型 APC によりも顕著な凝固時間の延長をもたらした (図 15)。この実験では、上昇した濃度の wt - またはスーパー - APC を APTT 凝固時間反応に加え、そして凝固時間を監視する。wt - プロテイン C は期待どおり凝固時間を延長し、そして試験した最高濃度 (20 nM) で、約 100 秒の凝固時間を生じ、これは APC の不存在下で観察される時間のおよそ倍である。スーパー APC はさらにはかなり活性であり、そしてすでに 5 nM の APC 濃度で凝固時間は同様のレベルまで延長される。より高いスーパー APC 濃度で、凝固時間はさらに延長され、そして 20 nM のスーパー - APC で、血漿は 200 秒の観察時間内に凝固しない。

10

#### 【0224】

APTT 試験は以下の手順に従いヒト血漿中で行った。

#### 【0225】

ヒトのクエン酸処理血漿 (50  $\mu$ l) を 50  $\mu$ l の APTT 試薬と混合した。37 で 180 秒のインキュベーション後、50  $\mu$ l の APC を図 15 に示した濃度で加えた。APC は 50 mM Tris - HCl、0.15 M NaCl バッファー、pH 7.5 中に含まれ、また 30 mM CaCl<sub>2</sub> および 0.1 % BSA (ウシ血清アルブミン) も含んだ。図 15 では、点は 2 回の測定の平均を表す。

20

#### 【実施例 9】

#### 【0226】

この実施例では、GNED と呼ばれる G1a バリエーション中の突然変異を SP 突然変異と組み合わせることによる効果、ここで修飾された領域 WGYRDETKRNR (配列番号 7) に、包括的な 300 から 314 位からの野生型配列を置き換える。GNED 変異体は突然変異 G11、N12、E32 および D33 を G1a ドメインに持つ (このバリエーションは Shen et al JBC 1998 に記載されている)。この組み合わせは、負に荷電したリン脂質膜に対して強化された親和性、および例えば国際公開第 99/20767 号パンフレットに記載されているような希釈された APTT および希釈された組織因子依存的アッセイにおいて、低濃度のリン脂質を含む凝固アッセイで強化された抗凝固活性が示されたバリエーションの活性化形を有するプロテイン C バリエーションを生じた。しかし通常の APTT 反応では、GNED - APC は wt - APC ほどに活性であるか、またはわずかに良いだけである。実施例 1 では、SP バリエーションが強化された抗凝固活性 (少なくとも 100 % の増加) を生じることが示されたが、幾つかの凝固アッセイ条件下では (特定の APTT 試薬)、SP 変異体の強化された抗凝固活性を明らかに示すことは難しかった。この意図は今、GNED および SP 突然変異を 1 つの新たなプロテイン C バリエーションに組み合わせることであった。上で検討したように、仮定は G1a 突然変異の強化されたリン脂質結合能力が、より効率的な SP 変異体と組み合わせられた時、有意に強化された抗凝固能力を持つプロテイン C ハイブリッドを生じるだろうということであった。そのようなバリエーションは血栓塞栓障害、敗血症等のような強化された凝固活性の状況において治療薬として有用となり得る。この新規バリエーションは GNED - SP と表し、そして GNED バリエーションに由来する G1a ドメインをコードする cDNA を、SP 変異体のセリンプロテアーゼドメインをコードする cDNA と組み合わせることにより作成された。これは方法の章で概説した標準的な DNA 技術で行った。次いで変異体 cDNA は 293 HEK 細胞をトランスフェクトするために使用し、そして高発現コロニーを単離し、そして拡大し、そして組換えタンパク質を含有するならし培地を集めた。組換えタンパク質を精製し、そして特性決定し、そして トロンビンにより活性化して、前の章に記載した APC を生成した。

30

40

#### 【0227】

APTT に基づくアッセイは以下のように行った: 正常な個体に由来する 50  $\mu$ l のヒ

50

ト血漿を、50  $\mu$ l の APTT 試薬（2部のオルガノンの Plateletin および 0.1% BSA を含む 1部の TBS バッファー）（TBS は 50 mM の Tris-HCl、0.15 M の NaCl、pH 7.5 を表す）と混合した。37 で 180 秒間インキュベーションした後、上昇する濃度の APC を含む 50  $\mu$ l の 25 mM  $\text{CaCl}_2$  を加え、そして凝固時間を記録した。結果を図 16 に示す。この実験で、SP バリエーションは wt APC と同様に活性であったが、GNED-APC バリエーションは wt APC よりも明らかに良かった。しかし GNED-SP が最高であり、そして試験した他のどのバリエーションよりも明らかに抗凝固的であった。

#### 【0228】

次のアッセイでは、正常な個体に由来する 50  $\mu$ l のヒト血漿を、濃度が上昇する APC も含む 100  $\mu$ l の希釈したシムプラスチン（Simplastin）（1:50 に希釈して約 35 秒の凝固時間を与える組織因子を含有する試薬）と混合した。SP および wt バリエーションはほぼ同等に活性であるが、GNED-APC は wt-APC よりも抗凝固的であった。しかし GNED-APC バリエーションは大変効率的であり、そしてすでに 1~2 nM の GNED-SP で APC は明らかに延長された凝固時間を生じた（図 17）。

#### 【実施例 10】

#### 【0229】

この実施例では、実施例 8 のバリエーション、すなわち QGNSEDY（ALL）に由来する GLA ドメインを実施例 1 の SP 変異体の SPD ドメインと組み合わせることにより作成し、スーパー-APC と呼ぶこのハイブリッドをさらに試験する。スーパー-APC は GNED-SP APC よりも徹底的に試験し、血小板が支持する凝固に及ぼす APC の効果も関与する全血を使用した試験を含める。ヒト血漿だけでなく、ラットおよびマウス血漿も試験した。スーパー-APC の抗凝固効果は、動物の血漿中で特に強力であった。これら動物血漿実験は、スーパー-APC が QGNSEDY-APC よりも効率的である点を証明するために取ることができる。スーパー-APC のインビボ効果は予測することが難しいが、スーパー-APC は QGNSEDY-APC よりも抗凝固物質として効率的であるようである。

#### 【0230】

APTT 反応では（図 18）（同じ APTT を用いて上記のように行った実験）、スーパー-APC が APTT 凝固時間の延長において任意の他のバリエーションより効率的であった。QGNSEDY-APC と同じである ALL-APC は、wt APC および SP-APC よりも効率的であった。スーパー-APC は高度に効率的であり、そしてすでに 1 nM の濃度未満の APC で明らかな抗凝固効果が観察されることは注目すべきである。

#### 【0231】

組織因子に基づくアッセイでは（図 19）類似の結果が得られ、スーパー-APC は任意の他のバリエーションよりも効率的な抗凝固物であった。最低濃度のスーパー-APC は、wt APC の 10 倍高いレベルとおおよしく、スーパー-APC バリエーションの高い効率を証明する。

#### 【0232】

スーパー-APC の抗凝固効果がプロテイン S の存在に依存的であるかどうかを試験するために、血漿プロテイン S が HPS54（これはプロテイン S の APC コファクター活性の阻害に効率的であることが知られている）と表される過剰のモノクローナル抗体で阻害されるさらなる実験を行った。この実験では、血漿を HPS54（50  $\mu$ g/ml の最終濃度）と室温で 1 時間インキュベーションし、これは以前に示されたように（Dahlbaeck, B., Hildebrand, B., and Malm, J., モノクローナル抗体を使用したビタミン K 依存性プロテイン S 中の機能的に重要なドメインの特性決定（Characterization of functionally important domains in vitamin K-dependent protein S using monoclonal antibodies）（1990）, J. Biol. Chem. 265, 8127-8135）、プロテイン S コファクター

10

20

30

40

50

活性を阻害するために十分である。次いで血漿を APTT 反応に使用し、そしてこの場合、スウェーデンのクロモジェニックス社の APTT 試薬を使用した。他の観点では、実験は図 16 について記載したように行った。wt APC および SP - APC の両方が凝固時間を延長するのにむしろ非効率的であった (図 20)。対照的に、ALL - APC およびスーパー - APC の両方が、すでに 1 nM 未満の濃度で凝固時間を効率的に延長した。スーパー - APC の効果は ALL - APC よりも強力であった。この実験では、スーパー - APC バリエーションがプロテイン S の不存在的下でも効率的な抗凝固物質であることを示す。プロテイン S の不存在的下でのスーパー - APC のこの強力な抗凝固効果は、治療的に高度に興味深い特徴となるかもしれない。またスーパー - APC がプロテイン S の存在下で刺激されたことにも注目することが重要である。

10

#### 【0233】

通常の APC は血小板の存在下では抗凝固物質としてむしろ非効率的である。すなわち正常な生理学的条件下で、APC は血小板表面上で起こる反応に及ぼす効果は無いが、または弱い効果を有するだけらしい。動脈血栓症は一般に血小板が関与するので、血小板上の凝固反応の阻害に効率的である APC バリエーションを得ることは興味深いかもしれない。これを試験するために、全血凝固試験を考案し、これは第 Xa 因子 (FXa) による凝固の開始に依存する。クエン酸処理した全血 (75  $\mu$ l) を 37 で 180 秒間インキュベーションした後、25 mM の CaCl<sub>2</sub> および濃度が上昇する種々の APC バリエーションを含む 75  $\mu$ l の FXa (1 nM) を加えた。バッファーは上で述べた TBS - BSA であった。APC の不存在的下で、凝固時間は約 33 秒であった。wt APC の添加 (図 21) はむしろ非効率的であり、そして延長した凝固時間は  $\geq 20$  nM の APC でのみ観察された。SP - APC バリエーションは wt APC とほぼ同等に効率的であった。対照的に ALL およびスーパーバリエーションは、より一層効率的であった。ALL - APC の場合、wt APC よりも約 20 倍活性であるが、スーパー - APC はさらにより活性であると推定される。図 21 から、スーパー - APC は全血系で wt APC よりも約 40 倍活性であると推定される。

20

#### 【0234】

動物血漿実験は、APTT - および組織因子に基づくアッセイ系の両方を使用して行った。ラット血漿を用いて APTT 反応で得られた凝固時間は、一般にヒトの系で観察された時間よりも短かった。APTT 試薬を TBS - BSA で 1 : 2 に希釈して、約 25 秒周辺の合理的な凝固時間を得ることが十分であると分かった (図 22)。wt APC の添加はラット血漿の凝固時間の延長には非効率的であることが分かった。対照的に、SP - APC および ALL - APC の両方が効果は穏やかでも効果的であった。対照的にスーパー - APC は高度に効率的であり、そして試験した最低濃度 (2.5 nM) でも、凝固時間を効果的に延長した。たとえラット血漿に基づくものであっても、この実験はスーパー - APC が SP - APC または ALL - APC のいずれよりも大変良いことを証明した。組織因子が誘導する系で得られた結果は、類似の結論をもたらした (図 23)。この系で、wt - APC および SP - APC は同様であり、一方、ALL - APC はより有力な抗凝固物質であった。しかしスーパー - APC は他のどのバリエーションよりも明らかに大変効率的であった。

30

40

#### 【0235】

マウス血漿を使用して、APTT および組織因子系の両方で得られた結果は、ラット血漿で得られた結果に類似した (図 24 および 25)。両系で、効率に関してはスーパー - APC が最も有力であり、ALL - APC が次に並ぶ。APTT 系では、SP - APC が wt APC よりもわずかに効率的であったが、2 つとも組織因子に基づく系での効率は類似した。特に組織因子に基づく系は、大変明瞭な結果をもたらした、スーパー - APC が試験した他のすべてのバリエーションよりも優れていた。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0236】

以下では、本発明を図面を参照にしてより詳細に開示し、ここで図 1 ~ 5 は SP - ドメ

50

インにのみ突然変異を有するバリエーションに関する、すなわち：

【図 1】ヒトおよびウシ野生型 APC および APC 変異体のアミド分解活性を具体的に説明する。ヒト APC (○)、ヒト APC - SP ( )、ウシ APC ( )、ウシ APC - SP ( )。

【図 2】A ~ C は種々の APC がヒトおよびウシ血漿の活性化部分トロンボプラスチン時間に及ぼす効果を具体的に説明する。A) ヒト血漿では：ヒト APC (○)、ヒト APC - SP ( )、ウシ APC ( )、ウシ APC - SP ( )。B) ウシプロテイン S (5  $\mu$ g/ml の最終濃度) を補充したヒト血漿において：ヒト APC (○)、ヒト APC - SP ( )、ウシ APC ( )、ウシ APC - SP ( )。C) ウシ血漿では：ヒト APC (○)、ヒト APC - SP ( )、ウシ APC ( )、ウシ APC - SP ( )。

【図 3】A ~ C は種々の APC がヒト第 VIIa 因子の不活性化に及ぼす効果を具体的に説明する。異なる濃度の種々の APC を第 VIIa 因子、第 IXa 因子、リン脂質および Ca<sup>2+</sup> 混合物と 5 分間、ウシ第 V 因子およびヒトもしくはウシプロテイン S の存在下でブレインキューベーションした。第 X 因子はこの溶液により活性化され、そして第 Xa 因子の形成速度を合成基質で測定した。吸収は第 VIIa 因子の活性に直線的に相関し、そして結果を各対照の割合として表した。A) ヒトプロテイン S およびウシ第 V 因子の存在下での高濃度の APC (最終濃度を示す) による第 VIIa 因子の不活性化；ヒト APC (○)、ヒト APC - SP ( )、ウシ APC ( )、ウシ APC - SP ( )。B) ヒトプロテイン S またはウシ第 V 因子の存在下での低濃度の APC (最終濃度を示す) による第 VIIa 因子の不活性化；ヒト APC (○)、ヒト APC - SP ( )、ウシ APC ( )、ウシ APC - SP ( )。C) ウシプロテイン S およびウシ第 V 因子の存在下での APC (最終濃度を示す) による第 VIIa 因子の不活性化；ヒト APC (○)、ヒト APC - SP ( )、ウシ APC ( )、ウシ APC - SP ( )。

【図 4】A および B は種々の APC がヒトおよびウシ血漿のプロトロンビン時間に及ぼす効果を具体的に説明する。A) ヒト血漿では：ヒト APC (○)、ヒト APC - SP ( )、ウシ APC ( )、ウシ APC - SP ( )。B) ウシ血漿では：ヒト APC (○)、ヒト APC - SP ( )、ウシ APC ( )、ウシ APC - SP ( )。

【図 5】種々の APC、すなわちヒト APC (○)、ヒト APC - SP ( )、ウシ APC ( ) およびウシ APC - SP ( ) のヒト血漿による不活性化を具体的に説明する。

【0237】

図 6 ~ 14 は、Gla - ドメインに突然変異を有するバリエーションに関する。すなわち：

【図 6】種々の APC バリエーション (変異体) がヒト血漿で活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) に及ぼす効果を具体的に説明する。以下の APC バリエーションを調査した：ヒト野生型 (wt) APC ( )、APC 変異体 QGN ( )、APC 変異体 QGED ( )、APC 変異体 GNED (x)、APC 変異体 SEDY (|) および APC 変異体 ALL (または QGNSEDY) ( )。

【図 7】APTT アッセイにおいてヒトプロテイン S が APC (wt および変異体) の効果に及ぼす影響を具体的に説明する。以下の APC バリエーションを調査した：wt APC ( ) および APC 変異体 QGNSEDY (ALL) ( )。

【図 8】種々の APC バリエーションがヒト血漿におけるプロトロンビンに及ぼす効果を具体的に説明する。以下の APC バリエーションを調査した：wt APC ( )、APC 変異体 QGN ( )、APC 変異体 QGED ( )、APC 変異体 GNED (x)、APC 変異体 SEDY (|) および APC 変異体 QGNSEDY ( )。

【図 9】プロトロンビンの FXa が媒介する活性化 (該活性化は FVa により強化される) により生成されるトロンビンにより測定される、種々の APC バリエーションがヒト第 Va 因子を不活性化する能力を具体的に説明する。以下の APC バリエーションを調査した：wt APC ( )、APC 変異体 QGN ( )、APC 変異体 SEDY (+)、および APC 変異体 QGNSEDY (ALL) ( )。

【図 10】種々の APC バリエーションがヒト第 Va 因子を不活性化する能力を具体的に説明し、FVa の活性はプロトロンビナーゼアッセイにより測定される。以下の APC バリア

ントを調査した：w t A P C ( )、A P C 変異体 Q G N ( )、A P C 変異体 S E D Y ( )、および A P C 変異体 Q G N S E D Y ( A L L ) ( )。

【図 1 1】A P C による正常、すなわち野生型 ( w t )、F V a および Q 5 0 6 変異体 F V a ( F V a L e i d e n ) の不活性化を具体的に説明する。値は：w t A P C による w t F V a ( )；A P C 変異体 Q G N S E D Y ( A L L ) による w t F V a ( )；w t A P C による R 5 0 6 Q F V a ( )；および A P C 変異体 Q G N S E D Y ( A L L ) による R 5 0 6 Q F V a ( x ) の不活性化について表す。

【図 1 2 - 1 4】w t および変異体プロテイン C がホスホ - 膜に結合する能力を具体的に説明する。B I A c o r e からの表面プラズマ共鳴法を使用した。これらの図面で異なるリン脂質、すなわち 1 0 0 % ホスホァチジルコリン ( 図 1 2 )；2 0 % ホスホァチジルセリンおよび 8 0 % ホスホァチジルコリンの混合物 ( 図 1 3 )；および 2 0 % ホスホァチジルセリン、2 0 % ホスファチジルエタノールアミンおよび 6 0 % ホスホァチジルコリンの混合物 ( 図 1 4 ) を使用した。すべての試験でヒト野生型プロテイン C ( w t ) および A P バリエーション Q G N S E D Y ( A L L )、S E D Y、S E D および Q G N を分析した。

10

【 0 2 3 8 】

図 1 5 ~ 2 5 は本発明のバリエーション、すなわち S P - ドメインおよび G l a - ドメインの両方に突然変異を含むバリエーションに関する。すなわち：

【図 1 5】Q G N S E D Y ( A L L ) の突然変異した G l a - ドメインおよび突然変異した S P - ドメインを含んでなる変異体 ( スーパー - A p c ) が、ヒト血漿における活性化部分トロンボプラスチン時間 ( A P T T ) に及ぼす効果を具体的に説明する。

20

【図 1 6】A P T T 反応における組換え A P C バリエーションの効果を具体的に説明する。

【図 1 7】G N E D - S P が、組織因子が誘導する凝固に及ぼす効果を具体的に説明する。

【図 1 8】A P T T 反応における A P C バリエーションの効果を具体的に説明する。

【図 1 9】A P C バリエーションが、T F が誘導する凝固に及ぼす効果を具体的に説明する。

【図 2 0】A P C バリエーションが、M a b H P S 5 4 ( プロテイン S 特異的 ) の存在下で A P T T 凝固時間に及ぼす効果を具体的に説明する。

【図 2 1】A P C バリエーションが全血凝固に及ぼす効果を具体的に説明する。

【図 2 2】r a t 血漿を使用した A P T T 反応における A P C バリエーションの効果を具体的に説明する。

30

【図 2 3】r a t 血漿を使用した T F が誘導する凝固における A P C バリエーションの効果を具体的に説明する。

【図 2 4】マウス A P T T 反応における A P C バリエーションの効果を具体的に説明する。

【図 2 5】マウス血漿の組織因子が誘導する凝固に及ぼす A P C バリエーションの効果を具体的に説明する。

【配列表】



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; TAC Thrombosis and Coagulation AB

&lt;120&gt; Recombinant protein C variants

&lt;130&gt; 110084101

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; US 60/360,181

&lt;151&gt; 2002-03-01

10

&lt;150&gt; US 60/401,042

&lt;151&gt; 2002-08-06

&lt;160&gt; 51

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

20

&lt;400&gt; 1

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg His Ser Ser Leu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15

Cys Ile Glu Glu Ile Cys Asp Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile Phe Gln  
 20 25 30

Asn Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His Val  
 35 40 45

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bovine sp.

30

&lt;400&gt; 2

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Asn Val Glu Arg Glu  
 1 5 10 15

Cys Ser Glu Glu Val Cys Glu Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Gln  
 20 25 30

Asn Thr Glu Asp Thr Met Ala Phe Trp Ser Lys Tyr Ser  
           35                          40                          45

<210> 3  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 Gln Ala Gly Gln Glu Thr Leu Val Thr Gly Trp Gly Tyr His Ser Ser  
       1                          5                          10                          15

10

Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val Leu Asn Phe  
                           20                          25                          30

<210> 4  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Bovine sp.

<400> 4  
 Gln Val Gly Gln Glu Thr Val Val Thr Gly Trp Gly Tyr Arg Asp Glu  
       1                          5                          10                          15

20

Thr Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val Leu Ser Phe  
                           20                          25

<210> 5  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Partial  
           modified human PC/APC sequence

30

<400> 5  
 Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu  
       1                          5                          10                          15

Cys Ile Glu Glu Ile Cys Ser Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile Phe Glu  
                           20                          25                          30

Asp Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys Tyr Val

35

40

45

<210> 6  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 6  
Trp Gly Tyr His Ser Ser Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10 15

10

<210> 7  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

20

<400> 7  
Trp Gly Tyr Arg Asp Glu Thr Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 8  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

30

<400> 8  
Trp Gly Tyr Ser Ser Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 9  
<211> 14  
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 9

Trp Gly Tyr Ser Ser Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 10

Trp Gly Tyr His Ser Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 11

Trp Gly Tyr His Ser Ser Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

10

20

30

&lt;400&gt; 12

Trp Gly Tyr His Ser Ser Arg Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

10

&lt;400&gt; 13

Trp Gly Tyr His Ser Ser Arg Glu Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

20

&lt;400&gt; 14

Trp Gly Tyr His Ser Ser Arg Glu Lys Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

30

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

&lt;400&gt; 15

Trp Gly Tyr Ser Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

&lt;210&gt; 16

<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 16  
Trp Gly Tyr His Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

10

<210> 17  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 17  
Trp Gly Tyr His Ser Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

20

<210> 18  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 18  
Trp Gly Tyr His Ser Ser Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

30

<210> 19  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial

modified human PC/APC sequence

<400> 19

Trp Gly Tyr His Ser Ser Arg Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

10

<400> 20

Trp Gly Tyr His Ser Ser Arg Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 21

Trp Gly Tyr Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 22

Trp Gly Tyr His Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 23  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 23  
Trp Gly Tyr His Ser Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

10

<210> 24  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 24  
Trp Gly Tyr His Ser Ser Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

20

<210> 25  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 25  
Trp Gly Tyr His Ser Ser Arg Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

30

<210> 26  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 26

Trp Gly Tyr Arg Glu Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 27

Trp Gly Tyr Arg Glu Glu Thr Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 28

Trp Gly Tyr His Arg Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 29

Trp Gly Tyr Lys Glu Glu Ala Lys Arg Asn Arg

1 5 10

<210> 30  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 30  
Trp Gly Tyr Lys Asp Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 31  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 31  
Trp Gly Tyr Lys Glu Glu Thr Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 32  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 32  
Trp Gly Tyr Arg Gln Glu Thr Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 33  
<211> 11  
<212> PRT

10

20

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified human PC/APC sequence

<400> 33

Trp Gly Tyr Arg Gln Glu Ala Lys Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 34

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide primer

<400> 34

aaattaatac gactcactat agggagaccc aagctt

36

<210> 35

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide primer

<400> 35

gtttctcttg gtctcgtcac ggtagcccca gcccgtcacg ag

42

<210> 36

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide primer

<400> 36

cgtgacgaga ccaagagaaa ccgcaccttc gtcctc

36

10

20

30

<210> 37  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide primer

<400> 37  
gcatttaggt gacactatag aatagggccc tctaga 36

10

<210> 38  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide primer

<400> 38  
ggcctccttc tctcggtgc tgtggtagcc ccagcccgtc ac 42

20

<210> 39  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide primer

<400> 39  
cacagcagcc gagagaagga ggccaagaga aaccgacctt c 41

30

<210> 40  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial

## modified protein C sequence

&lt;400&gt; 40

Leu Val Thr Gly Trp Gly Tyr Arg Asp Glu Thr Lys Arg Asn  
1 5 10

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified protein C sequence

10

&lt;400&gt; 41

Arg Asp Glu Thr Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val Leu  
1 5 10

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

20

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified protein C sequence

&lt;400&gt; 42

Val Thr Gly Trp Gly Tyr His Ser Ser Arg Glu Lys Glu Ala  
1 5 10

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

30

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified protein C sequence

&lt;400&gt; 43

Arg Asp Glu Thr  
1

<210> 44  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified protein C sequence

<400> 44  
His Ser Ser Arg Glu Lys Glu Ala  
1 5

10

<210> 45  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified protein C sequence

<400> 45  
His Ser Ser Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg Thr Phe  
1 5 10

20

<210> 46  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Partial  
modified protein C sequence

<400> 46  
His Ser Ser Arg Glu Lys Glu Ala  
1 5

30

<210> 47  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:  
Oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 47

gcactcccgc tccaggttgc cttgacggag ctctccagg aa

42

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

10

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:  
Oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 48

atagaggaga tctgtagctt cgaggaggcc aag

33

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

20

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:  
Oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 49

cttggcctcc tcgaagctac agatctcctc tat

33

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

30

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:  
Oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 50

ctggtcaccg tcgacgtact tggaccagaa ggccag

36

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

40

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:  
Oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 51

cagtgtgtca tccacatctt cgaaaatttc cttggc

36

【図 1】

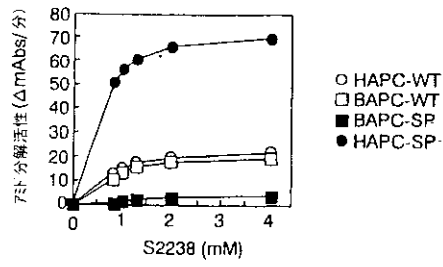


FIG. 1

【図 2】

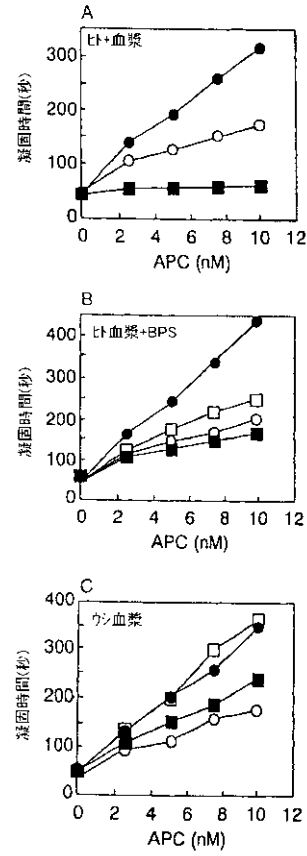


FIG. 2

【図 3】

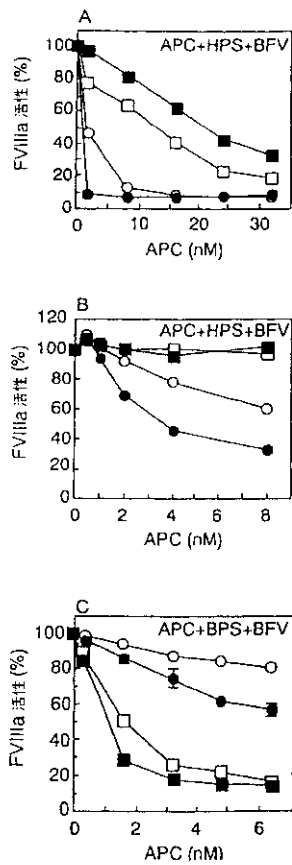


FIG. 3

【図 4】

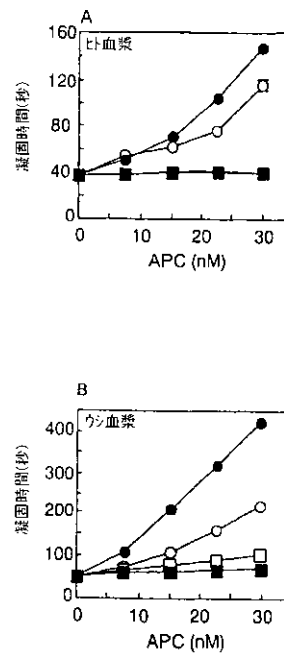


FIG. 4



【 図 5 】

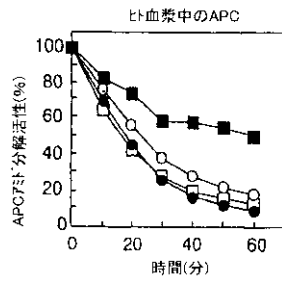


FIG. 5

【 図 6 】

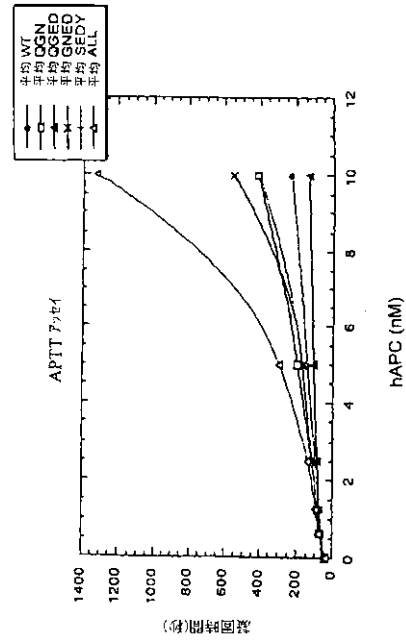


Fig. 6

【 図 7 】

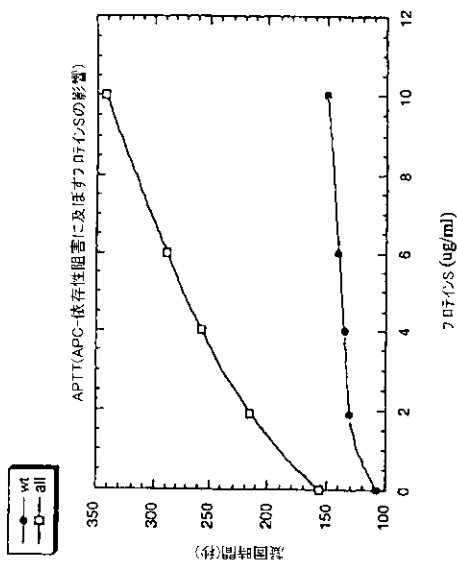


Fig. 7

【 図 8 】

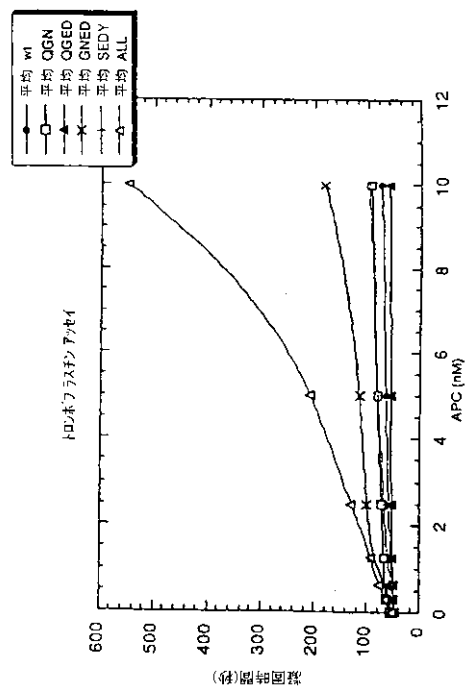


Fig. 8

【図 9】

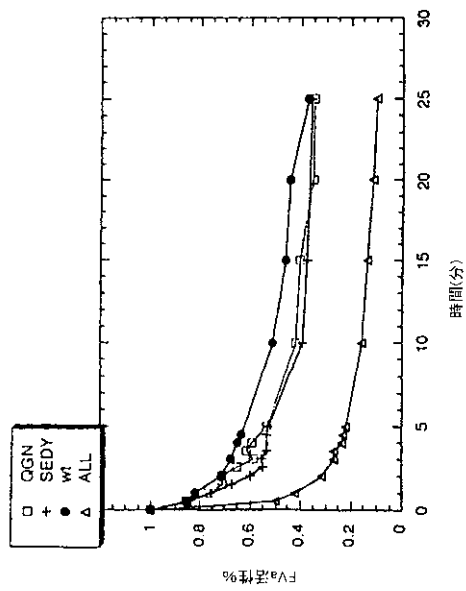


Fig. 9

【図 10】

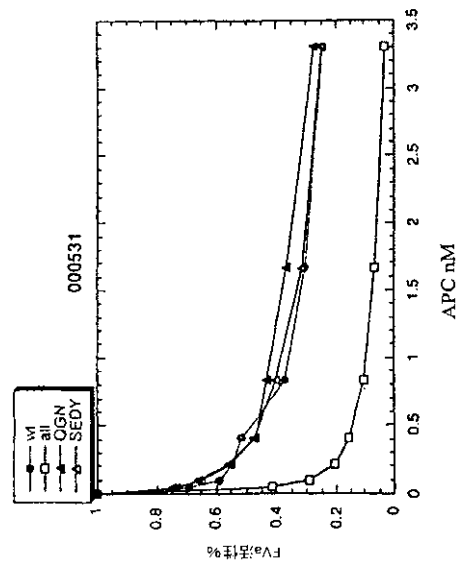


Fig. 10

【図 11】

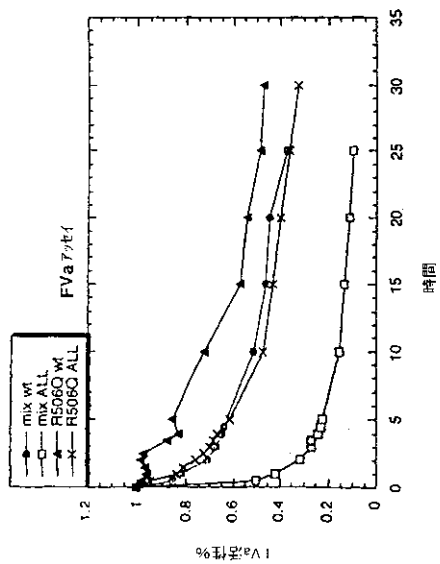


Fig. 11

【図 12】

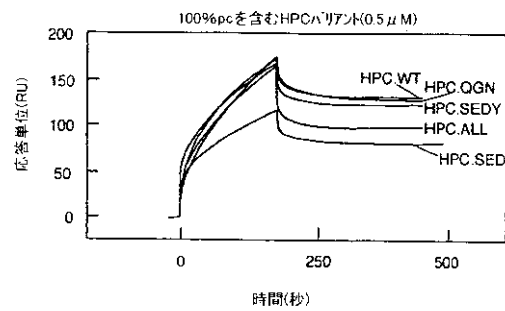


Fig. 12

【図 13】

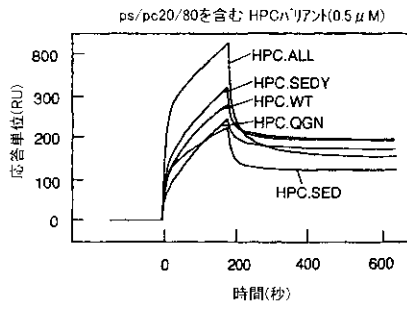


Fig. 13

【図 14】

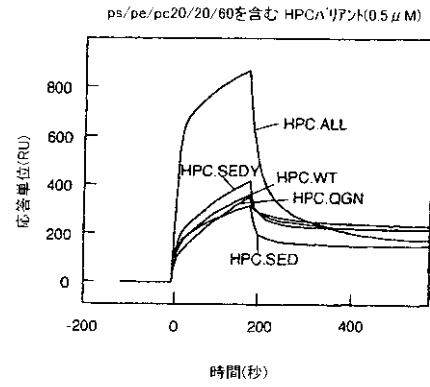


Fig. 14

【図 15】

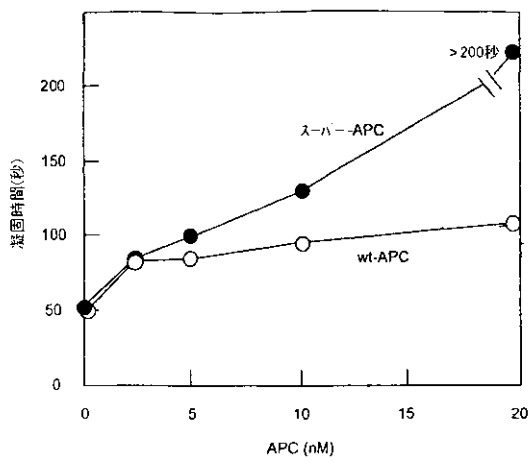


FIG. 15

【図 16】

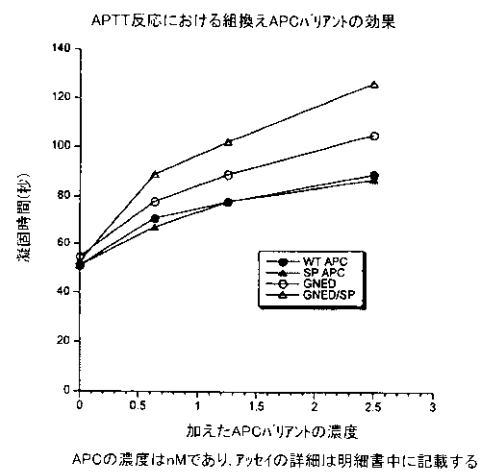


FIG. 16

【図 17】

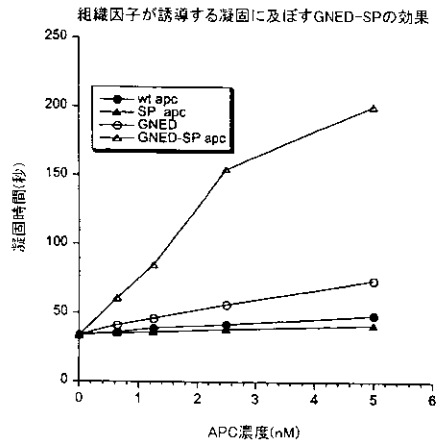


FIG. 17

【図 18】

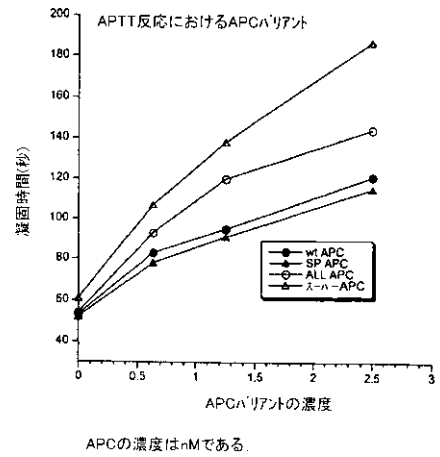


FIG. 18

【図 19】

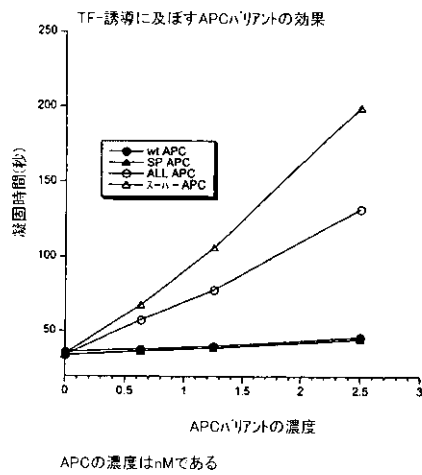


FIG. 19

【図 20】

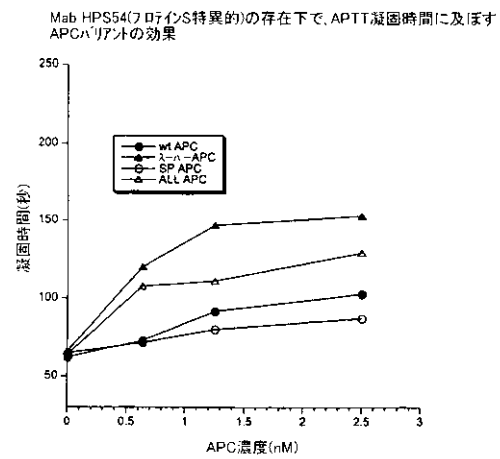


FIG. 20

【図 2 1】

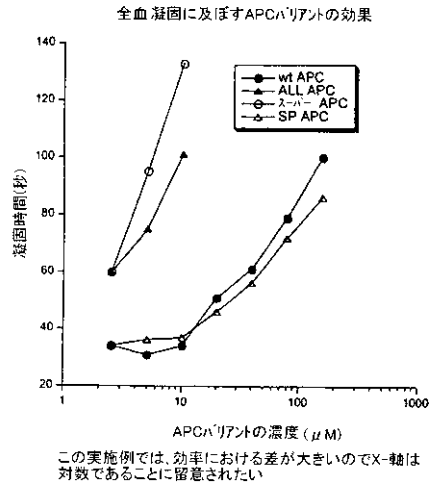


FIG. 21

【図 2 2】

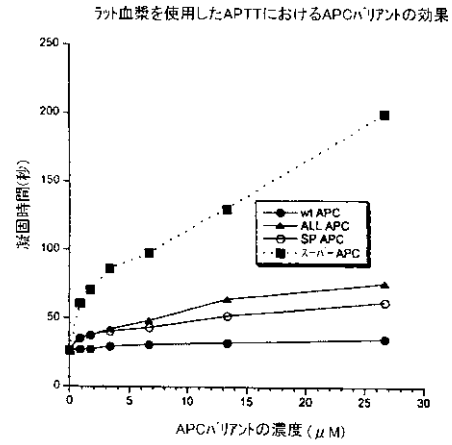


FIG. 22

【図 2 3】

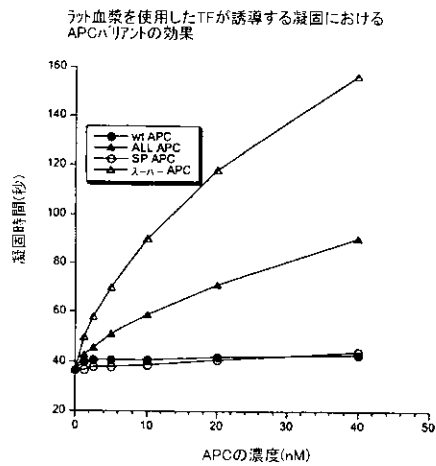


FIG. 23

【図 2 4】

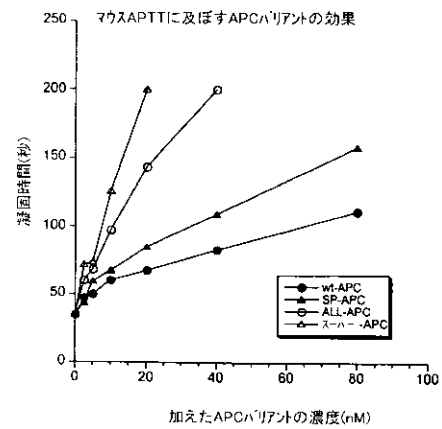


FIG. 24

## 【 図 2 5 】

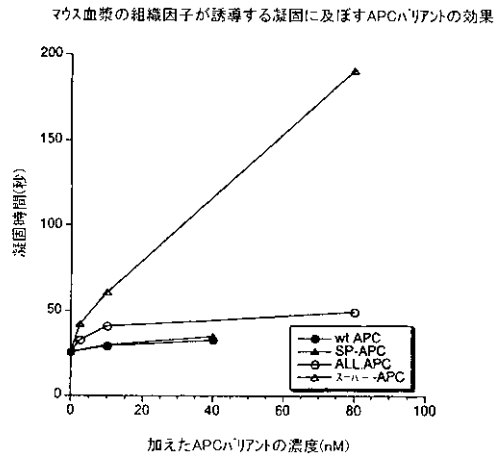


FIG. 25

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 03/00331

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: C12N 9/64, A61K 38/36, A61P 7/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7: C12N, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI DATA, EPO-INTERNAL, MEDLINE, BIOSIS, EBI, EMBASE, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 0157193 A2 (ELI LILLY AND COMPANY), 9 August 2001 (09.08.01), claim 1; page 6, line 18 - page 7, line 9 --	1-37
Y	WO 9844000 A1 (T.A.C. THROMBOSIS AND COAGULATION AKTIEBOLAG), 8 October 1998 (08.10.98), the whole document --	1-37
Y	WO 9920767 A1 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA), 29 April 1999 (29.04.99), the claims; page 14, line 31 - page 15, line 6 --	1-37

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 June 2003

Date of mailing of the international search report

23-06-2003

Name and mailing address of the ISA/

Swedish Patent Office

Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM

Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

CAROLINA PALMCRANTZ/BS

Telephone No. +46 8 782 25 00

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 03/00331

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 0136462 A2 (ELI LILLY AND COMPANY), 25 May 2001 (25.05.01), the claims; the abstract  -- -----	1-37



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/SE03/00331

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **30-32**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Claims 30-32 relate to methods for treatment of the human or animal body by therapy (PCT Rule 39.1.(iv)). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds.**
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

02/06/03

International application No.

PCT/SE 03/00331

Patent document cited in search report			Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO	0157193	A2	09/08/01	AU	3273601 A	14/08/01
				CA	2399267 A	09/08/01
				EP	1255821 A	13/11/02
WO	9844000	A1	08/10/98	AU	717555 B	30/03/00
				AU	741798 B	13/12/01
				AU	3638797 A	02/02/98
				AU	6934598 A	22/10/98
				DE	19781921 T	08/07/99
				EP	0996637 A	03/05/00
				FI	990030 A	05/03/99
				GB	2330489 A,B	21/04/99
				JP	2000514966 T	07/11/00
				JP	2002501373 T	15/01/02
				NZ	337800 A	30/03/01
				SE	9701228 D	00/00/00
WO	9920767	A1	29/04/99	AP	200001811 D	00/00/00
				AU	749279 B	20/06/02
				AU	2702499 A	10/05/99
				BR	9814611 A	03/10/00
				CA	2307175 A	29/04/99
				CN	1283231 T	07/02/01
				EP	1090128 A	11/04/01
				HR	20000234 A	31/08/01
				HU	0102257 A	28/09/01
				IL	135603 D	00/00/00
				JP	2001520042 T	30/10/01
				NO	20002025 A	19/06/00
				NZ	504114 A	25/10/02
				PL	340284 A	29/01/01
				TR	200001105 T	00/00/00
				US	6017882 A	25/01/00
				US	2001018414 A	30/08/01
				ZA	9809597 A	23/04/99
WO	0136462	A2	25/05/01	AU	1751801 A	30/05/01
				CA	2391651 A	25/05/01
				EP	1237917 A	11/09/02
				JP	2003514545 T	22/04/03

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/37	A 6 1 K 37/46	4 C 0 8 4
// G 0 1 N 33/48	G 0 1 N 33/48	K

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

F ターム(参考) 4B050 CC03 CC04 DD07 DD11 FF14 LL01 LL03  
 4B063 QA01 QA05 QQ36 QR16 QR57 QS26 QS36 QX01  
 4B065 AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01 BA01 CA33 CA44 CA46  
 4C084 AA01 AA02 BA01 BA08 BA22 BA23 DC50 NA14 ZA54