

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4537059号
(P4537059)

(45) 発行日 平成22年9月1日(2010.9.1)

(24) 登録日 平成22年6月25日(2010.6.25)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 9/48 (2006.01)	C 1 2 N 9/48
C O 7 K 14/745 (2006.01)	C O 7 K 14/745
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15

請求項の数 9 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-530733 (P2003-530733)	(73) 特許権者	501497563
(86) (22) 出願日	平成14年9月26日(2002.9.26)		ノボ ノルディスク ヘルス ケア アク
(65) 公表番号	特表2005-509413 (P2005-509413A)		チェンゲゼルシャフト
(43) 公表日	平成17年4月14日(2005.4.14)		スイス国, ツェーハー ー 8050 チュー
(86) 国際出願番号	PCT/DK2002/000635		リッヒ, アンドレアシュトラーセ 15
(87) 国際公開番号	W02003/027147	(74) 代理人	100058479
(87) 国際公開日	平成15年4月3日(2003.4.3)		弁理士 鈴江 武彦
審査請求日	平成17年8月25日(2005.8.25)	(74) 代理人	100091351
(31) 優先権主張番号	PA 2001 01413		弁理士 河野 哲
(32) 優先日	平成13年9月27日(2001.9.27)	(74) 代理人	100088683
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		弁理士 中村 誠
		(74) 代理人	100084618
			弁理士 村松 貞男
		(74) 代理人	100092196
			弁理士 橋本 良郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト凝固第VII因子ポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

L 3 0 5 V 及び K 3 3 7 A の置換を含む配列番号1のヒト凝固第VIIa因子変異体であって、組織因子の非存在下において、前記変異体の活性と配列番号1で示される天然の第VI因子ポリペプチドの活性の比が、インピトロでの加水分解分析で試験したときに、4.0以上であることを特徴とするヒト凝固第VIIa因子変異体。

【請求項2】

L 3 0 5 V 及び K 3 3 7 A の置換を含む配列番号1のヒト凝固第VIIa因子変異体であって、組織因子の非存在下において、前記変異体の活性と配列番号1で示される天然の第VI因子ポリペプチドの活性の比が、インピトロでのタンパク質分解分析で試験したときに、4.0以上であることを特徴とするヒト凝固第VIIa因子変異体。

【請求項3】

さらに V 1 5 8 D の置換を含む、請求項1 ~ 2 の何れかに記載のヒト凝固第VIIa因子変異体。

【請求項4】

さらに E 2 9 6 V の置換を含む、請求項1 ~ 2 の何れかに記載のヒト凝固第VIIa因子変異体。

【請求項5】

さらに M 2 9 8 Q の置換を含む、請求項1 ~ 3 の何れかに記載のヒト凝固第VIIa因子変異体。

【請求項 6】

L 3 0 5 V / K 3 3 7 A - FVIIである、請求項 1 又は 2に記載のヒト凝固第VIIa因子変異体。

【請求項 7】

L 3 0 5 V / V 1 5 8 D / E 2 9 6 V / M 2 9 8 Q / K 3 3 7 A - FVIIである、請求項 1 ~ 5の何れか一項に記載のヒト凝固第VIIa因子変異体。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7の何れか一項に記載のヒト凝固第VIIa因子をコードする、ポリヌクレオチド構築物。

【請求項 9】

請求項 8に記載のポリヌクレオチド構築物を含む宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、凝固活性を有する新規のヒト凝固第VIIa因子ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド構築物、該ポリヌクレオチドを具備し発現するベクターおよび宿主細胞、製薬組成物、治療のための使用と方法に関する。

【背景技術】

【0002】

血液凝固は、種々の血液成分（または因子）の複雑な相互作用からなる過程であり、最終的にフィブリンの凝固を生じる。一般に、凝固「カスケード」と呼ばれているものに関与する血液成分は、活性化因子（それ自体が活性化された凝血因子である）の作用によってタンパク質分解酵素に転化される、酵素的に不活性なタンパク質（前酵素または酵素前駆体）である。そのような転化を受けた凝固因子は、一般に、「活性因子」と呼ばれ、その凝固因子の名称に「a」の文字を添えることによって示される（例えば、第VIIa因子）。

【0003】

止血過程の開始は、外傷によって血管壁と接触した組織因子と、第VIIa因子の間の複合体の形成によって媒介される。この複合体は、次に、第IX因子および第X因子を活性形態に転化させる。第Xa因子は、組織因子を含有する細胞において、有限量のプロトロンピンをトロンピンに転化させる。トロンピンは血小板を活性化させ、第V因子および第VII因子を第Va因子および第VIIa因子に活性化させる（両者は、完全なトロンピンバーストを導くさらなる過程におけるコファクターである）。この過程は、第IXa因子（第VIIa因子との複合体において）による第Xa因子の発生を含み、活性化された血小板の表面で生じる。トロンピンは最終的に、フィブリノゲンをフィブリンに転化させ、結果としてフィブリン凝固を形成させる。近年、第VII因子と組織因子が血液凝固の主要な開始剤であることが発見された。

【0004】

第VII因子は、単一鎖の酵素前駆体として血中を循環している微量の血漿糖タンパクである。この酵素前駆体は触媒的に不活性である。単一鎖第VII因子は、インビトロにおいて第Xa因子、第XIIa因子、第IXa因子、第VIIa因子、またはトロンピンによって、二本鎖の第VIIa因子に転化され得る。第Xa因子は、第VII因子の主要な生理学的活性化因子であると考えられている。止血に関与する他の幾つかの血漿糖タンパクと同様に、第VII因子はその活性をビタミンKに依存しており、これは、タンパク質のアミノ末端に近接して群集する複数のグルタミン酸残基のガンマ - カルボキシル化のために必要とされる。これらのガンマ - カルボキシル化されたグルタミン酸は、金属イオンが誘導する、第VII因子とリン脂質の相互作用のために必要とされる。酵素前駆体第VII因子は、Arg₁₅₂-Leu₁₅₃内ペプチド結合を切断されることによって活性化された二本鎖分子へ転化する。組織因子、リン脂質、およびカルシウムイオンの存在下において、二本鎖第VIIa因子は、限定的なタンパク質分解によって第X因子または第IX因子を速やかに活性化する。

10

20

30

40

50

【0005】

多くの場合、対象における凝固カスケードを刺激するかまたは改善することが望まれている。第VII a 因子は、凝固因子欠乏症（例えば血友病AおよびB、または凝固第XI因子または第VII因子の欠乏症）または凝固因子阻害物質のような幾つかの原因を有する出血性疾患を制御するために使用されている。第VII a 因子はまた、正常に機能する血液凝固カスケード（何れの凝固因子に対しても、凝固因子欠乏症または阻害物質がない）を有する対象において生じる過剰出血を制御するためにも使用されている。そのような出血は、例えば、血小板機能の欠損、血小板減少症、またはフォンウィルブランド症によって引き起こされ得る。出血は、手術および他の形の組織損傷と関わる主要な問題でもある。

【0006】

欧州特許番号第200,421 (ZymoGenetics) は、ヒト第VII因子をコードする核酸配列および哺乳類細胞における第VII因子の組換え体の発現に関する。

【0007】

Dickinson他 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93, 14379-14384) は、Leu305がAlaで置換された第VII因子の変異体 (FVII (Ala305)) を示している。

【0008】

Iwanaga他は (Thromb. Haemost. (supplement August 1999), 466, abstract 1474)、残基316 - 320が欠失した第VII a 因子の変異体、または残基311 - 322がトリプシンの対応する残基によって置換された第VII a 因子の変異体を示している。

【0009】

凝固活性を有する第VII a 因子の変異体、比較的少ない投与量で投与できる高活性の変異体、および、それぞれ従来の治療に付随する、全身の凝固系の活性化や出血のような望ましくない副作用を生じさせない変異体が必要とされている。

【発明の詳細な説明】

【0010】

アミノ酸Leu305および、配列番号1のLys157、Lys337、Asp334、Ser336、Val158、Glu296、およびMet298から成る群から独立に選択された少なくとも一つのアミノ酸が異なるアミノ酸で置換された、ヒト凝固第VII a 因子ポリペプチド変異体が、野生型のヒト凝固第VII a 因子よりも高い凝固活性を有することが発見された。

【0011】

ここで使用される「異なるアミノ酸」という用語は、その位置に本来存在するアミノ酸と異なる一つのアミノ酸を意味する。これは、ポリヌクレオチドによってコードされ得るアミノ酸を含むが、これに限定されない。この異なるアミノ酸は天然のL型で、ポリヌクレオチドによってコードされ得ることが好ましい。具体的な実施例ではL-システイン (Cys) である。

【0012】

ここで使用される「活性」という用語は、第VII因子ポリペプチドがその基質である第X因子を活性第X a 因子に転化させる転化能を意味する。第VII因子ポリペプチドの活性は、「インビトロにおけるタンパク質分解分析」によって測定できる（実施例6を参照）。

【0013】

「固有活性」という用語は、組織因子の非存在下において、活性化された血小板の表面上でトロンピンを生成する能力をも含む。

【0014】

Leu305は、組織因子と複合した形態の第VII a 因子に見られる - ヘリックスの末端に位置し、これは活性に重要であると考えられている。遊離の第VII a 因子（組織因子と結合していない第VII a 因子）ではヘリックスが歪み、それ故に恐らく不安定である。本発明のポリペプチド変異体は、通常は組織因子によって誘導される活性コンホメーションを達成した。野生型第VII a 因子より増大したポリペプチド変異体の活性は、 - ヘ

10

20

30

40

50

リックスの安定化、ヘリックスの再配向、または他の幾つかのコンホメーション変化のためであり得る。Leu 305の置換は、ヘリックスの再配向および/または安定化を誘導する。

【0015】

Lys 157、Lys 337、Asp 334、Ser 336、Val 158、Glu 296、およびMet 298を含むアミノ酸は、プロテアーゼドメインのアミノ末端の挿入に影響し、それ故、Ile 153の末端アミノ基とAsp 343の側鎖との間の塩橋に依存するVIIa因子の触媒活性コンホメーションの形成に影響すると考えられている領域に位置する。

【0016】

上述したVIIa因子ポリペプチド変異体は天然FVIIaよりも高い固有活性を有するため、低い投与量でも作用するサイトにおいて機能的に十分な濃度を得るのに十分であり、従って出血の発症した、または通常の止血系を増強することを必要としている対象に、低い投与量で投与することができる。

【0017】

本発明者らは、アミノ酸Leu 305を、157に位置するLys、337に位置するLys、158に位置するVal、296に位置するGlu、298に位置するMet、334に位置するAsp、および336に位置するSerの一以上と組み合わせることで置換することによって、VIIa因子が、通常は組織因子によって誘導されるさらに活性なコンホメーションを自発的に達成することを発見した。そのようなVIIa因子ポリペプチド変異体は、プロコアギュラントの活性が組織因子(第Xa因子は血小板の表面で発生する)とは無関係である状況、例えば高投与量のNovoSeven(R)が投与された場合のような状況において、治療的に有用である固有活性を示す。

【0018】

さらなる実施形態において、プロテアーゼドメインにおけるアミノ酸のさらなる置換は、分子の活性コンホメーションの形成をさらに促進する。しかしながら、最も明白な効果は、上記の変異がこれら後半の7つのアミノ酸の近く(配列的にまたは三次元的に)において起こったときに観察されるであろうと考えられる。

【0019】

本発明はさらに、膜リン脂質、例えば組織因子含有細胞の膜リン脂質または血小板の膜リン脂質に対して実質的に高い親和性を有するタンパク質を提供できる、VIIa因子のN末端Glaドメイン(配列番号1の1-37に対応する位置のアミノ酸)における幾つかのアミノ酸の置換を含み、それ故、改良されたプロコアギュラント効果を有するVII因子ポリペプチド変異体を生成する。

【0020】

このように、上述したVIIa因子ポリペプチド変異体は、既存のアミノ酸置換305と組み合わせられた157、158、296、298、334、336または337の位置における置換およびプロテアーゼドメインの他の位置での任意のアミノ酸の置換に加えて、N末端Glaドメインにおける少なくとも一つの置換されたアミノ酸を有し、これによって、天然のVII因子と比較して、高い活性の他に、高い膜リン脂質親和性を有するタンパク質が得られる。VII因子の10および32の位置(配列番号1参照)が異なるアミノ酸で置換されることが好ましい。上述の位置に挿入される好ましいアミノ酸の例は、10に位置するアミノ酸ProがGln、Arg、His、Gln、Asn、またはLysで置換され、および/または32に位置するアミノ酸LysがGlu、Gln、またはAsnで置換される。

【0021】

リン脂質親和性およびビタミンK依存性血漿タンパク質の配列の相違に基づいて、Glaドメインにおける他のアミノ酸も置換と見なされる。

【0022】

「N末端GLAドメイン」という用語は、VII因子のアミノ酸配列1-37を示す。

10

20

30

40

50

【0023】

3文字の表示「GLA」は、4-カルボキシグルタミン酸(-カルボキシグルタメート)を示す。

【0024】

「プロテアーゼドメイン」という用語は、第VII因子のアミノ酸配列153-406(第VIIa因子の重鎖)を示す。

【0025】

ここで使用される「第VII因子ポリペプチド」という用語は、天然の第VII因子のアミノ酸配列1-406(配列番号1)またはその変異体を具備する任意のタンパク質を意味する。

10

【0026】

ここで用いられる「第VII因子」という用語は、活性化された二重鎖の第VII因子分子(第VIIa因子)と同様に、不活性な単一鎖の酵素前駆体第VII因子分子を含むように意図される。これは、天然のヒト第VII因子または第VIIa因子のアミノ酸配列1-406を有するタンパク質を含む。これはまた、例えばN末端アミノ酸の欠失または付加を含む改変されたN末端のように、それらのタンパク質が実質的に第VIIa因子の活性を保持する限り、わずかに改変されたアミノ酸配列を有するタンパク質をも含む。ここで使用される「第VIIa因子」または「FVIIa」という用語は、活性化された形体(第VIIa因子)からなる生成物を意味する。上記の定義中の、「第VII因子」または「第VIIa因子」は、存在し得る天然の対立遺伝子変異体を含み、一方から他方へ個々に生じる。グリコシル化の程度と位置、または他の位置変換改変も、選択された宿主細胞および宿主細胞環境の性質に依存して変化し得る。

20

【0027】

ここで使用される「変異体」という用語は、配列番号1の配列を有し、親タンパクの1以上のアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている、および/または親タンパクの1以上のアミノ酸が欠失している、および/または1以上のアミノ酸がタンパクに挿入されている、および/または1以上のアミノ酸が親タンパクに加えられている、第VII因子を示すように意図される。そのような付加は、親タンパクのN末端またはC末端のいずれか、または両方で起こり得る。この定義中の「変異体」は、その活性形体において、なおFVII活性を有する。一実施形態において、変異体は配列番号1の配列と70%一致する。一実施形態において、変異体は配列番号1の配列と80%一致する。他の実施形態において、変異体は配列番号1の配列と90%一致する。さらなる実施形態において、変異体は配列番号1の配列と95%一致する。

30

【0028】

第一の側面において、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列に関して少なくとも二つの置換を含む第VII因子ポリペプチドであって、前記置換が(i)他の任意のアミノ酸によるL305の置換、および(ii)他の任意のアミノ酸による、K157、K337、D334、S336、V158、E296、およびM298からなる群から選択される1以上のアミノ酸の置換である、第VII因子ポリペプチドに関する。

【0029】

第二の側面において、本発明は配列番号1のアミノ酸配列に関して二つの置換を有する第VII因子ポリペプチドであって、前記置換が(i)他の任意のアミノ酸によるL305の置換、および(ii)他の任意のアミノ酸による、K157、K337、D334、S336、V158、E296、およびM298からなる群から選択される一つのアミノ酸の置換である、第VII因子ポリペプチドに関する。

40

【0030】

第三の側面において、本発明は配列番号1のアミノ酸配列に関して三つの置換を有する第VII因子ポリペプチドであって、前記置換が(i)他の任意のアミノ酸によるL305の置換、および(ii)他の任意のアミノ酸による、K157、K337、D334、S336、V158、E296、およびM298からなる群から選択される二つのアミノ酸の

50

置換である、第VII因子ポリペプチドに関する。

【0031】

さらなる側面において、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列に関して四つの置換を有する第VII因子ポリペプチドであって、前記置換が(i)他の任意のアミノ酸によるL305の置換、および(ii)他の任意のアミノ酸による、K157、K337、D334、S336、V158、E296、およびM298からなる群から選択される三つのアミノ酸の置換である、第VII因子ポリペプチドに関する。

【0032】

さらなる側面において、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列に関して五つの置換を有する第VII因子ポリペプチドであって、前記置換が(i)他の任意のアミノ酸によるL305の置換、および(ii)他の任意のアミノ酸による、K157、K337、D334、S336、V158、E296、およびM298からなる群から選択される四つのアミノ酸の置換である、第VII因子ポリペプチドに関する。

10

【0033】

さらなる側面において、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列に関して六つの置換を有する第VII因子ポリペプチドであって、前記置換が(i)他の任意のアミノ酸によるL305の置換、および(ii)他の任意のアミノ酸による、K157、K337、D334、S336、V158、E296、およびM298からなる群から選択される五つのアミノ酸の置換である、第VII因子ポリペプチドに関する。

【0034】

20

さらなる側面において、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列に関して七つの置換を有する第VII因子ポリペプチドであって、前記置換が(i)他の任意のアミノ酸によるL305の置換、および(ii)他の任意のアミノ酸による、K157、K337、D334、S336、V158、E296、およびM298からなる群から選択される六つのアミノ酸の置換である、第VII因子ポリペプチドに関する。

【0035】

さらなる側面において、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列に関して八つの置換を有する第VII因子ポリペプチドであって、前記置換が(i)他の任意のアミノ酸によるL305の置換、および(ii)他の任意のアミノ酸による、K157、K337、D334、S336、V158、E296、およびM298のアミノ酸の置換である、第VII因子ポリペプチドに関する。

30

【0036】

さらなる側面において、本発明は配列番号1のアミノ酸配列に関して少なくとも二つの置換を含む第VII因子ポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドに関し、前記置換は、(i)他の任意のアミノ酸によるL305の置換、および(ii)他の任意のアミノ酸による、K157、K337、D334、S336、V158、E296、およびM298からなる群から選択される一以上のアミノ酸の置換である。

【0037】

「構築物」という用語は、所望のポリペプチドをコードする、完全なまたは部分的な自然発生ヌクレオチド配列に基づいたポリヌクレオチドセグメントを示すように意図される。この構築物は、任意に、他のポリヌクレオチドセグメントを含んでもよい。同様に、「ポリヌクレオチド構築物によってコードされ得るアミノ酸」という用語は、上記で定義されたポリヌクレオチド構築物によってコードされ得るアミノ酸、即ち、Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp, およびGlnのようなアミノ酸を包含する。

40

【0038】

さらなる側面において、本発明は第VII因子ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド構築物を含む組換えベクターを提供する。

【0039】

50

ここで使用される「ベクター」という用語は、宿主細胞において増幅能力を有する何れの核酸独立体をも意味する。例えば、ベクターは、自己複製ベクター、即ち、染色体外の独立体として存在し、その複製が染色体の複製とは無関係であるベクター、例えばプラスミドであってよい。或いは、ベクターは、宿主細胞に導入されたとき、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それが組み込まれた染色体と共に複製されるものであってよい。ベクターの選択は、多くの場合、それが導入される宿主細胞による。ベクターは、プラスミドベクター、ファージベクター、ウイルスまたはコスミドベクターを含むが、これに限定されない。ベクターは通常、複製開始点と、少なくとも一つの、選択を可能にする遺伝子、即ち、容易に検出可能な生成物かまたは細胞増殖に必須なものをコードする遺伝子を含む。

【0040】

10

さらなる側面において、本発明は、ポリヌクレオチド構築物またはベクターを具備する組換え宿主細胞を提供する。一つの実施形態において、組換え宿主細胞は真核細胞である。他の実施形態において、組換え宿主細胞は哺乳類由来の細胞である。さらなる実施形態において、組換え宿主細胞はCHO細胞、HEK細胞、およびBHK細胞からなる群から選択される細胞である。

【0041】

ここで使用される「宿主細胞」という用語は、異種性のDNAが発現され得るハイブリッド細胞を含む何れの細胞をも意味する。典型的な宿主細胞は、昆虫細胞、酵母細胞、ヒト細胞を含む哺乳類細胞、例えばBHK、CHO、HEK、およびCOS細胞を含むが、これに限定されない。本発明の実行において、培養される宿主細胞は、好ましくは哺乳類細胞であり、さらに好ましくは、CHO（例えば、ATCC CCL 61）、COS-1（例えば、ATCC CRL 1650）、子ハムスターの腎臓（BHK）およびHEK 293（例えば、ATCC CRL 1573; Graham et al., J.Gen. Virol. 36:59-72, 1977）細胞株を含むがこれに限定されない確立された哺乳類細胞株である。好ましいBHK細胞株は、tk-ts 13BHK細胞株（Waechter and Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1106-1110, 1982）である（以下、BHK 570細胞と称す）。BHK 570細胞株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから、12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852、ATCC受付番号 CRL 10314で利用可能である。tk-ts 13BHK細胞株も、ATCCから、受付番号 CRL 1632で利用可能である。他の適切な細胞株は、Rat Hep I（ラット肝癌; ATCC CRL 1600）、Rat Hep II（ラット肝癌; ATCC CRL 1548）、TCMK（ATCC CCL 139）、ヒト肺（ATCC HB 8065）、NCTC 1469（ATCC CCL 9.1）およびDUKX細胞（Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, 1980）を含むが、これに限定されない。3T3細胞、Namalwa細胞、ミエロームおよびミエロームと他の細胞の融合も有用である。

20

30

【0042】

さらなる側面において、本発明は、ポリヌクレオチド構築物を具備し発現するトランスジェニック動物を提供する。

【0043】

さらなる側面において、本発明は、ポリヌクレオチド構築物を具備し発現するトランスジェニック植物を提供する。

40

【0044】

さらなる側面において、本発明は、本発明の第VII因子ポリペプチドを生成する方法に関し、該方法は、該ポリヌクレオチド構築物を含む細胞を、適正な増殖培地で、該ポリヌクレオチド構築物が発現可能な条件下で培養することと、得られたポリペプチドを該培養培地から回収する事とを含む。

【0045】

ここで使用される「適正な増殖培地」という用語は、栄養、並びに、細胞の増殖と本発明の第VII因子ポリペプチドをコードする核酸配列を発現させるために必要な他の成分を含む培地を意味する。

50

【0046】

さらなる側面において、本発明は、第VII因子ポリペプチドを生成する方法に関し、該方法は、トランスジェニック動物によって生産された乳から該ポリペプチドを回収することを含む。

【0047】

さらなる側面において、本発明は第VII因子ポリペプチドを生成する方法に関し、該方法は、ポリヌクレオチド構築物を具備するトランスジェニック植物の細胞を培養すること、得られた植物からポリペプチドを回収することを含む。

【0048】

さらなる側面において、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列に関して少なくとも二つの置換を含む第VII因子ポリペプチドであって、前記置換が(i)他の任意のアミノ酸によるL305の置換、および(ii)他の任意のアミノ酸による、K157、K337、D334、S336、V158、E296、およびM298からなる群から選択される一以上のアミノ酸の置換である第VII因子ポリペプチドと、製薬的に許容される担体を含む医薬組成物に関する。

10

【0049】

さらなる側面において、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列に関して少なくとも二つの置換を含む第VII因子ポリペプチドであって、前記置換が(i)他の任意のアミノ酸によるL305の置換、および(ii)他の任意のアミノ酸による、K157、K337、D334、S336、V158、E296、およびM298からなる群から選択される一以上のアミノ酸の置換である第VII因子ポリペプチドの、薬剤の調製のための使用に関する。一実施形態において、該薬剤は、出血性疾患または出血発症の治療のための、または正常な止血系を増強するための薬剤である。一実施形態において、該使用は、血友病AまたはBの治療のための使用である。

20

【0050】

本発明の状況において、「治療」という用語は、出血を抑制または最小限にすることを目的とした、例えば外科手術などでの予期される出血の予防、および例えば外傷によってすでに生じている出血の制御の両者を含む。本発明の第VIIa因子ポリペプチドの予防的な投与は、従って「治療」という用語に含まれる。

【0051】

「出血発症」という用語は、抑制不能な出血、および過剰な出血を含むことを意味する。出血発症は、外科手術および他の形態の組織傷害の両者に関連する主要な問題である。制御不能な出血および過剰な出血は、正常な凝固系を有する対象、および凝固障害または出血性疾患を有する対象において生じ得る。ここで使用される「出血性疾患」という用語は、出血において明らかになる、先天性、後天性の、または誘発性の細胞または分子系の何れの欠損をも示す。凝固因子欠損の例(例えば、血友病AおよびBまたは凝固第XI因子または第VII因子の欠損)は、凝固因子阻害、血小板機能欠陥、血小板減少症、またはフォンウィルブランド病である。

30

【0052】

過剰出血はまた、正常に機能する血液凝固カスケードを有する対象(凝固因子欠損または凝固因子の何れかに対する阻害のない)でも生じ、血小板機能欠陥、血小板減少症、またはフォンウィルブランド病によって引き起こされ得る。血友病におけるような止血系は、欠損があるか、または主要な出血を引き起こす異常な必須凝固「化合物」(例えば、血小板またはフォンウィルブランド因子タンパク質)を有しているため、そのような場合における出血は、血友病によって引き起こされる出血と類似し得る。外科手術または大きな外傷に付随する広範な組織傷害を受けた対象において、正常な止血機構は、即時の止血要求に圧倒され、止血機構が正常であるにもかかわらず出血を生じてしまう。十分な止血を達成することは、例えば脳、内耳領域、および眼のような外科手術的止血の可能性が限定される器官で出血が生じた場合にも問題である。同様の問題は、腹腔鏡手術はもちろん、様々な器官(肝臓、肺、腫瘍組織、消化管)からのバイパスを通ず過程においても生じる

40

50

。これら全ての状況に共通することは、外科的技術（縫合、切除、その他）によって止血を施すことの困難性であり、出血が散在性である場合（出血性胃炎およびおびただしい子宮内出血）も同様である。急性でおびただしい出血は、与えられた治療によって止血の欠陥が誘発されている抗凝固治療の対象においても発生し得る。そのような対象は、抗凝固効果が速やかに相殺されるべき場合に外科的処置を必要とすることがある。局所的な前立腺癌を有する対象に、根治的な恥骨後の前立腺切除が一般に処置されている。この手術はしばしば、著しく、また時折は大量の血液損失によって複雑になる。前立腺切除の際のかなりの血液損失は主に、複雑な解剖学的状況、外科的止血が容易に届かない種々の密集した血管新生化サイトに関連し、広い領域から散在性の出血が生じるという結果になり得る。不十分な止血の場合に問題が起こり得る他の状況は、正常な止血機構を有する対象が、血栓塞栓性疾患を防ぐための抗凝固治療を受けた場合である。そのような治療は、アスピリンおよび他の血小板凝集阻害剤の他に、ヘパリン、他の形態のプロテオグリカン、ワルファリン、または他の形態のビタミンKアンタゴニストを含む。

10

【0053】

本発明の一実施形態において、出血は血友病に付随したものである。他の実施形態において、出血は、後天性の阻害を有する血友病に付随したものである。他の実施形態において、出血は血小板減少症に付随したものである。他の実施形態において、出血はフォンウィルブランド病に付随したものである。他の実施形態において、出血は深刻な組織損傷に付随したものである。他の実施形態において、出血は深刻な外傷に付随したものである。他の実施形態において、出血は外科手術に付随するものである。他の実施形態において、出血は腹腔鏡手術に付随するものである。他の実施形態において、出血は出血性胃炎に付随するものである。他の実施形態において、出血はおびただしい子宮内出血である。他の実施形態において、出血は、機械的な止血の可能性が制限される、器官において生じるものである。他の実施形態において、出血は、脳、内耳領域、または眼において生じるものである。他の実施形態において、出血は、バイパスを通す過程に付随するものである。他の実施形態において、出血は、抗凝固治療に付随するものである。

20

【0054】

ここで使用される「対象」という用語は、任意の動物、特にヒトのような哺乳類を意味するよう意図され、適切には、「患者」という用語が相互転換可能に使用される。

【0055】

「正常な止血系の増強」という用語は、トロンピンを産生する能力の増強を意味する。

30

【0056】

さらなる側面において、本発明は、対象における出血性疾患または出血発症を治療するための方法、または正常な止血系を増強するための方法に関し、該方法は、配列番号1のアミノ酸配列に関して少なくとも二つの置換を含む第VII因子ポリペプチドであって、前記置換が(i)他の任意のアミノ酸によるL305の置換、および(ii)他の任意のアミノ酸による、K157、K337、D334、S336、V158、E296、およびM298からなる群から選択される一以上のアミノ酸の置換である第VII因子ポリペプチドの治療的または予防的に有効な量を、それらを必要とする対象に投与することを含む。

【0057】

さらなる側面から、本発明は、本発明の第VII因子ポリペプチドの薬剤としての使用に関する。

40

【0058】

本発明の一実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305が他の任意のアミノ酸で置換され、K157が他の任意のアミノ酸で置換されたポリペプチドである。

【0059】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305が他の任意のアミノ酸で置換され、K337が他の任意のアミノ酸で置換されたポリペプチドである。

【0060】

50

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L 3 0 5 が他の任意のアミノ酸で置換され、D 3 3 4 が他の任意のアミノ酸で置換されたポリペプチドである。

【 0 0 6 1 】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L 3 0 5 が他の任意のアミノ酸で置換され、S 3 3 6 が他の任意のアミノ酸で置換されたポリペプチドである。

【 0 0 6 2 】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L 3 0 5 が他の任意のアミノ酸で置換され、V 1 5 8 が他の任意のアミノ酸で置換されたポリペプチドである。

10

【 0 0 6 3 】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L 3 0 5 が他の任意のアミノ酸で置換され、E 2 9 6 が他の任意のアミノ酸で置換されたポリペプチドである。

【 0 0 6 4 】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L 3 0 5 が他の任意のアミノ酸で置換され、M 2 9 8 が他の任意のアミノ酸で置換されたポリペプチドである。

【 0 0 6 5 】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、プロテアーゼドメインの残った位置において少なくとも一つのアミノ酸が他の任意のアミノ酸で置換されたポリペプチドである。

20

【 0 0 6 6 】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、プロテアーゼドメインの残った位置において少なくとも一つのアミノ酸が他の任意のアミノ酸で置換されたポリペプチドである。

【 0 0 6 7 】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、プロテアーゼドメインの残った位置において最大で20のさらなるアミノ酸が他の任意のアミノ酸で置換されたポリペプチドである。

30

【 0 0 6 8 】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、配列番号1の159 - 170から選択される位置のアミノ酸に対応する少なくとも一つのアミノ酸が他の任意のアミノ酸で置換されたポリペプチドである。

【 0 0 6 9 】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、配列番号1の290 - 304から選択される位置のアミノ酸に対応する少なくとも一つのアミノ酸が他の任意のアミノ酸で置換されたポリペプチドである。

【 0 0 7 0 】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、R 3 0 4 が、T y r、P h e、L e u、およびM e t からなる群から選択されるアミノ酸によって置換されたポリペプチドである。

40

【 0 0 7 1 】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、配列番号1の306 - 312から選択される位置のアミノ酸に対応する少なくとも一つのアミノ酸が他の任意のアミノ酸で置換されたポリペプチドである。

【 0 0 7 2 】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、M 3 0 6 が、A s p およびA s n からなる群から選択されるアミノ酸によって置換されたポリペプチドである。

50

。

【0073】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、D309が、SerおよびThrからなる群から選択されるアミノ酸によって置換されたポリペプチドである。

。

【0074】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、配列番号1の330-339から選択される位置のアミノ酸に対応する少なくとも一つのアミノ酸が他の任意のアミノ酸で置換されたポリペプチドである。

【0075】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、A274が他の任意のアミノ酸で置換されたポリペプチドである。

【0076】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、A274がMet、Leu、LysおよびArgからなる群から選択されるアミノ酸によって置換されたポリペプチドである。

【0077】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、K157がGly、Val、Ser、Thr、Asn、Gln、Asp、およびGluからなる群から選択されるアミノ酸によって置換されたポリペプチドである。

【0078】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、前記K337がAla、Gly、Val、Ser、Thr、Asn、Gln、Asp、およびGluからなる群から選択されるアミノ酸によって置換されたポリペプチドである。

【0079】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、前記D334がGlyおよびGluからなる群から選択されるアミノ酸によって置換されたポリペプチドである。

【0080】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、前記S336がGlyおよびGluからなる群から選択されるアミノ酸によって置換されたポリペプチドである。

【0081】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、前記V158がSer、Thr、Asn、Gln、Asp、およびGluからなる群から選択されるアミノ酸によって置換されたポリペプチドである。

【0082】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、前記E296がArg、Lys、およびValからなる群から選択されるアミノ酸によって置換されたポリペプチドである。

【0083】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、前記M298がLys、Arg、Gln、およびAsnからなる群から選択されるアミノ酸によって置換されたポリペプチドである。

【0084】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、前記L305がVal、TyrおよびIleからなる群から選択されるアミノ酸によって置換されたポリペプチドである。

【0085】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、前記L305がVa

10

20

30

40

50

1 によって置換されたポリペプチドである。

【0086】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、アミノ酸が、ポリヌクレオチド構築物によってコードされ得る他の任意のアミノ酸によって置換されたポリペプチドである。

【0087】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、前記第VII因子ポリペプチドがヒト第VII因子であるポリペプチドである。

【0088】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、前記第VII因子ポリペプチドがヒト第VII a 因子であるポリペプチドである。

【0089】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、前記第VII因子ポリペプチドの活性と、配列番号1で示される天然の第VII a 因子ポリペプチドの活性の間の比が、少なくとも約1.25であるポリペプチドである。一実施形態において、前記第VII因子ポリペプチドの活性と、配列番号1で示される天然の第VII a 因子ポリペプチドの活性の間の比は、少なくとも約2.0である。一実施形態において、前記第VII因子ポリペプチドの活性と、配列番号1で示される天然の第VII a 因子ポリペプチドの活性の間の比は、少なくとも約4.0である。

【0090】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、前記第VII因子ポリペプチドの活性と、配列番号1で示される天然の第VII a 因子ポリペプチドの活性の間の比が、第VII a 因子活性分析において試験したときに、少なくとも約1.25であるポリペプチドである。一実施形態において、前記第VII因子ポリペプチドの活性と、配列番号1で示される天然の第VII a 因子ポリペプチドの活性の間の比が、第VII a 因子活性分析において試験したときに、少なくとも約2.0である。さらなる実施形態において、前記第VII因子ポリペプチドの活性と、配列番号1で示される天然の第VII a 因子ポリペプチドの活性の間の比が、第VII a 因子活性分析において試験したときに、少なくとも約4.0である。第VII a 因子は、実施例5または6に記載された分析によって測定可能である。

【0091】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、前記第VII因子ポリペプチドの活性と、配列番号1で示される天然の第VII a 因子ポリペプチドの活性の間の比が、「インビトロでの加水分解分析」を試験したときに、少なくとも約1.25であるポリペプチドである。一実施形態において、前記第VII因子ポリペプチドの活性と、配列番号1で示される天然の第VII a 因子ポリペプチドの活性の間の比は、「インビトロでの加水分解分析」を試験したときに、少なくとも約2.0である。さらなる実施形態において、前記第VII因子ポリペプチドの活性と、配列番号1で示される天然の第VII a 因子ポリペプチドの活性の間の比は、「インビトロでの加水分解分析」を試験したときに、少なくとも約4.0である。

【0092】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、前記第VII因子ポリペプチドの活性と、配列番号1で示される天然の第VII a 因子ポリペプチドの活性の間の比が、「インビトロでのタンパク質分解分析」を試験したときに、少なくとも約1.25であるポリペプチドである。一実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、前記第VII因子ポリペプチドの活性と、配列番号1で示される天然の第VII a 因子ポリペプチドの活性の間の比が、「インビトロでのタンパク質分解分析」を試験したときに、少なくとも約2.0であるポリペプチドである。さらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、前記第VII因子ポリペプチドの活性と、配列番号1で示される天然の第VII a 因子ポリペプチドの活性の間の比が、「インビトロでのタンパク質分解分析」を試験したときに、少なくとも約4.0であるポリペプチドである。さらなる実施形態において、第VII因子ポリペ

10

20

30

40

50

プチドは、前記第VII因子ポリペプチドの活性と、配列番号1で示される天然の第VIIa因子ポリペプチドの活性の間の比が、「インビトロでのタンパク質分解分析」を試験したときに、少なくとも約8.0であるポリペプチドである。

【0093】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列に関連して少なくとも二つの置換を有するヒトFVIIであって、前記置換は(i) L305V、および(ii) K157X¹、K337A、D334X²、S336X³、V158X⁴、E296V、およびM298Qからなる群から選択される一以上の任意のアミノ酸である。ここで、X¹はGly、Val、Ser、Thr、Asn、Gln、Asp、またはGluであり、X²はGlyまたはGluであり、X³はGlyまたはGluであり、X⁴はThrまたはAspである。

10

【0094】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/K337A-FVIIである。

【0095】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/V158D-FVIIである。

【0096】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/E296V-FVIIである。

20

【0097】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/M298Q-FVIIである。

【0098】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/V158T-FVIIである。

【0099】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/K337A/V158T-FVIIである。

【0100】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/K337A/M298Q-FVIIである。

30

【0101】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/K337A/E296V-FVIIである。

【0102】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/K337A/V158D-FVIIである。

【0103】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/V158D/M298Q-FVIIである。

40

【0104】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/V158D/E296V-FVIIである。

【0105】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/V158T/M298Q-FVIIである。

【0106】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/V158T/E296V-FVIIである。

50

【0107】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/E296V/M298Q-FVIIである。

【0108】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/V158D/E296V/M298Q-FVIIである。

【0109】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/V158T/E296V/M298Q-FVIIである。

【0110】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/V158T/K337A/M298Q-FVIIである。

10

【0111】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/V158T/E296V/K337A-FVIIである。

【0112】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/V158D/K337A/M298Q-FVIIである。

【0113】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/E296V/M298Q/K337A-FVIIである。

20

【0114】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/V158D/E296V/K337A-FVIIである。

【0115】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVIIである。

【0116】

本発明のさらなる実施形態において、第VII因子ポリペプチドは、L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVIIである。

30

【0117】

さらなる側面において、本発明は、天然のヒト凝固第VIIa因子と比較して、組織因子非依存性活性が増大した、ヒト凝固第VIIa因子ポリペプチドを提供する。他の側面において、活性の増大は、基質特異性の変化を伴わないものである。本発明の他の側面において、ポリペプチド変異体の組織因子への結合は損なわれず、また、ポリペプチド変異体は、組織因子と結合したとき、少なくとも野生型第VIIa因子の活性を有する。

【0118】

この記述において使用されるアミノ酸の用語は、次の通りである。最初の文字は、配列番号1の位置に本来存在するアミノ酸を表す。次の数字は、配列番号1における位置を表す。二番目の文字は、本来のアミノ酸と置換した異なるアミノ酸を表す。例えば、L305V/K337A-FVIIは、配列番号1の305に位置するロイシンがバリンによって置換され、そして配列番号1の337に位置するリシンがアラニンによって置換され、両方の変異が同一の第VII因子ポリペプチド変異体にある。

40

【0119】

本発明の状況において、アミノ酸の3文字表示または1文字表示は、表1に示したように、それらの通常の意味において使用される。明示しない限り、ここで言及されるアミノ酸はL-アミノ酸である。さらに、他に特定しない限り、ペプチドのアミノ酸配列の左端および右端は、それぞれN末端およびC末端である。

【表1】

表1:アミノ酸略記法

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

10

20

【0120】

<第VII因子ポリペプチド変異体の調製>

本発明はまた、上記のようなヒト第VII因子ポリペプチド変異体を調製する方法に関する。ここで記載される第VII因子ポリペプチド変異体は、組換え核酸技術の方法によって生成され得る。通常、野生型第VII因子核酸配列が所望のタンパク質をコードするために改変される。次いで、この改変された配列は発現ベクターに挿入され、これは宿主細胞に形質転換されるか、トランスフェクションされる。高真核細胞、特に培養哺乳類細胞が宿主細胞として好ましい。ヒト第VII因子のヌクレオチドおよびアミノ酸の完全な配列は既知である（組換えヒト第VII因子のクローニングと発現が開示されている、U.S. 4,784,950を参照）。ウシの第VII因子配列は、Takeya他（J.Biol.Chem.263:14868-14872）が開示されている。

30

【0121】

アミノ酸配列の変更は、様々な技術によって行うことができる。核酸配列の改変は、サイト特異的突然変異誘発によって可能である。サイト特異的突然変異誘発の技術は、当該分野において周知であり、例えばZollerおよびSmith（DNA 3:479-488, 1984）または「伸長重複によるスプライシング」、Horton et al., Gene 77, 1989, pp.61-68が開示されている。このように、第VII因子のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を用いて、所望の変更を導入することができる。同様に、特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応法によるDNA構築物を調製する方法は、当該分野の技術者に周知である（PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, USAを参照）。

40

【0122】

本発明の第VII因子ポリペプチド変異体をコードする核酸構築物は、例えば、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーを調製し、標準的な技術によって合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いたハイブリダイゼーションによって、ポリペプチドの一部または全部をコードするDNA配列をスクリーニングすることによって得られた、ゲノムまたはcDNA由来のものが適している（Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

50

, 1989参照)。

【0123】

第VII因子ポリペプチド変異体をコードする核酸構築物は、確立された標準的な方法、例えば、Beaucage and Caruthers (Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859-1869, or the method described by Matthes et al., EMBO Journal 3 (1984), 801-805.) によって開示されたホスホアミド法によって合成的に調製されることも可能である。ホスホアミド法に従って、例えば自動DNA合成機においてオリゴヌクレオチドが合成され、精製され、アニールされ、結合され、適切なベクターでクローン化される。ヒト第VII因子ポリペプチド変異体をコードするDNA配列もまた、例えばUS 4,683, 202, Saiki et al., Science 239 (1988), 487-491, またはSambrook et al., supra. に開示されているような特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応法によって調製されることができる。

10

【0124】

さらにそのうえ、核酸構築物は、合成由来、ゲノム由来、またはcDNA由来(適宜)の断片(該断片は、完全な核酸構築物の種々の部分に対応する)を、標準的な技術に従って結合することによって調製された、合成とゲノムの混合物、合成とcDNAの混合物、またはゲノムとcDNAの混合物であってよい。

【0125】

核酸構築物は、DNA構築物であることが好ましい。本発明に従った第VII因子ポリペプチド変異体を調製するのに使用されるDNA配列は、典型的には、適切な翻訳後の処理を得る(例えば、グルタミン酸残基のガンマカルボキシル化)第VII因子のアミノ末端における前プロポリペプチド(pre-pro polypeptide)をコードし、宿主細胞から分泌される。前プロポリペプチドは、第VII因子、または他のビタミンK-依存性血漿タンパク、例えば第IX因子、第X因子、プロトロンビン、タンパク質Cまたはタンパク質Sのものであってよい。当該分野の技術者に認識されるように、第VII因子ポリペプチド変異体のアミノ酸配列中に、改変によってそのタンパクの凝固作用活性を著しく損なわないところに、追加の改変を行うことができる。例えば、第VII因子ポリペプチド変異体は、ここにおいて援用されるU.S. 5,288,629に一般に開示されているように、酵素前駆体第VII因子がその活性化された二重鎖形態に転化するのを阻害するために、活性化切断サイトにおいて改変されることができ。

20

【0126】

ヒト第VII因子ポリペプチド変異体をコードするDNA配列は、通常、組換えベクター(何れのベクターでも良い)に挿入され、これは便利に組換えDNA方法に供される。ベクターの選択は多くの場合、それが導入される宿主細胞に依存する。従って、ベクターは自己複製ベクター、即ち染色体外の存在として存在し、その複製が染色体の複製と無関係であるベクター、例えばプラスミドであってよい。或いは、ベクターは、宿主細胞に導入されたとき、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、その組み込まれた染色体と共に複製されるものであってよい。

30

【0127】

ベクターは、ヒト第VII因子ポリペプチド変異体をコードするDNA配列が、DNAの転写に必要なさらなるセグメントに結合可能である発現ベクターであることが好ましい。一般に、発現ベクターは、プラスミドまたはウイルスDNAに由来する。「結合可能」という用語は、セグメントが、それらに組み込まれた目的、例えばプロモーターにおける転写開始、およびポリペプチドをコードするDNA配列を通る進行などを協調して機能できるように配列されることを示す。

40

【0128】

第VIIa因子ポリペプチド変異体の発現に使用するベクターは、クローン化された遺伝子またはcDNAを直接転写する能力があるプロモーターを含む。このプロモーターは任意のDNA配列であってよく、これは所望の宿主細胞において転写活性を示し、その宿主細胞に相同性かまたは非相同性の何れかのタンパク質をコードする遺伝子に由来することができる。

50

【 0 1 2 9 】

哺乳類細胞において、ヒト第VII因子ポリペプチド変異体をコードするDNAの直接転写に適切なプロモーターの例は、SV40プロモーター (Subramani et al., Mol. Cell Biol. 1 (1981), 854-864)、MT-1 (メタロチオネイン遺伝子)プロモーター (Palmiter et al., Science 222 (1983), 809-814)、CMVプロモーター (Boshart et al., Cell 41 : 521-530, 1985)、またはアデノウイルス2メジャー・レート・プロモーター (Kaufman and Sharp, Mol. Cell. Biol., 2: 1304-1319, 1982)である。

【 0 1 3 0 】

昆虫細胞において使用するのに適したプロモーターの例は、ポリヘドリンプロモーター (US 4,745, 051; Vasuvedan et al., FEBS Lett. 311, (1992) 7-11)、P10プロモーター (J. M. Vlak et al., J. Gen. Virology 69, 1988, pp. 765-776)、オートグラフ・カリフォルニカ・ポリヘドロシス・ウイルス基本タンパクプロモーター (EP 397 485)、バキュロウイルス即時型初期遺伝子1プロモーター (US 5,155, 037; US 5,162, 222)、またはバキュロウイルス39K遅延型初期遺伝子プロモーター (US 5,155, 037; US 5,162, 222)である。

【 0 1 3 1 】

酵母宿主細胞において使用するのに適切なプロモーターの例は、酵母解糖遺伝子 (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255 (1980), 12073-12080; Alber and Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982), 419-434) またはアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (Young et al., in Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender et al., eds.), Plenum Press, New York, 1982)、またはTP11 (US 4, 599, 311) またはADH2-4c (Russell et al., Nature 304 (1983), 652-654)プロモーターからのプロモーターを含む。

【 0 1 3 2 】

糸状菌宿主細胞において使用するのに適切なプロモーターの例は、例えば、ADH3プロモーター (McKnight et al., The EMBO J. 4 (1985), 2093-2099) またはtpiAプロモーターである。他の有用なプロモーターの例は、A. oryzae TAKAアミラーゼ、Rhizomucormiehei asparticプロテイナーゼ、A. niger neutral a - アミラーゼ、A. niger acid stable a - アミラーゼ、A. niger または A. アワモリグルコアミラーゼ (gluA)、Rhizomucormiehei リパーゼ、A. oryzae アルカリプロテアーゼ、A. oryzae trioseリン酸イソメラーゼ、または A. nidulans アセトアミダーゼをコードする遺伝子に由来するものである。TAKA - アミラーゼおよびgluAプロモーターが好ましい。適切なプロモーターは、例えば、EP 238 023 および EP 383 779 に言及されている。

【 0 1 3 3 】

ヒト第VII因子ポリペプチド変異体をコードするDNA配列はまた、必要であれば、ヒト成長ホルモントーミネーター (Palmiter et al., Science 222, 1983, pp. 809-814) またはTP11 (Alber and Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1, 1982, pp. 419-434) またはADH3 (McKnight et al., The EMBO J. 4, 1985, pp. 2093-2099) トーミネーターのような、適切なターミネーターに結合可能である。発現ベクターはまた、プロモーターの下流に位置し、第VII因子配列自体を挿入するサイトの上流に位置するRNAスプライスサイトのセットを含んでもよい。RNAスプライスサイトは、アデノウイルスおよび/またはイムノグロブリン遺伝子から得ることが好ましい。発現ベクターには、挿入サイトの下流に位置するポリアデニル化信号も含まれる。特に好ましくは、ポリアデニル化信号は、SV40 (Kaufman and Sharp, ibid.) からの初期または後期の信号、アデノウイルス5E1b領域からのポリアデニル化信号、ヒト成長ホルモン遺伝子ターミネーター (DeNoto et al. Nucl. Acids Res. 9: 3719-3730, 1981) またはヒト第VII因子遺伝子またはウシ第VII因子からのポリアデニル化信号を含む。発現ベクターはまた、非翻訳のウイルスリーダー配列、例えばプロモーターとRNAスプライスサイトの間に位置するアデノウイルス2トリパルタイト (tripartite) リーダー、および転写促進因子、例えばSV40転写促進因子を含んでもよい。

【 0 1 3 4 】

本発明のヒト第VII因子ポリペプチド変異体を宿主細胞の分泌経路に方向付けるために、組換えベクター中に分泌信号配列（リーダー配列、前プロ配列、または前配列としても知られる）が提供され得る。分泌信号配列は、訂正リーディングフレーム中の、ヒト第VII因子ポリペプチド変異体をコードするDNA配列に連結される。分泌信号配列は、通常、ペプチドをコードするDNA配列の5'に位置する。分泌信号配列は、タンパク質に正常に付随したものであるか、または他の分泌性タンパクをコードする遺伝子からのものである。

【 0 1 3 5 】

酵母細胞から分泌させるために、分泌信号配列は任意の信号ペプチドをコードしてよく、これは、発現されたヒト第VII因子ポリペプチド変異体を細胞の分泌経路へ効率的に方向付けることを保証する。この信号ペプチドは、自然発生の信号ペプチドか、またはそれらの機能的な部分であってよく、または合成ペプチドであってよい。適切な信号ペプチドは、*α*-因子信号ペプチド（US 4,870,008参照）、マウスの唾液のアミラーゼの信号ペプチド（O. Hagenbuchle et al., Nature 289, 1981, pp. 643-646参照）、改変されたカルボキシペプチダーゼ信号ペプチド（L. A. Valls et al., Cell 48, 1987, pp. 887-897参照）、酵母BAR1信号ペプチド（WO 87/02670参照）、または酵母アスパラギン酸プロテアーゼ3（YAP3）信号ペプチド（M. Egel-Mitani et al., Yeast 6, 1990, pp. 127-137参照）として発見されている。

【 0 1 3 6 】

酵母における効率的な分泌のために、信号配列の下流、および、ヒト第VII因子ポリペプチド変異体をコードするDNA配列の上流にリーダーペプチドをコードする配列を挿入することもできる。リーダーペプチドの機能は、発現されたペプチドが小胞体からゴルジ体に、さらに培養培地へ分泌するための分泌性小胞に方向付けることを可能にする（即ち、細胞壁を超えての、または少なくとも細胞膜を酵母細胞の細胞膜周辺腔へ抜けての、ヒト第VII因子ポリペプチド変異体の輸出）。リーダーペプチドは、酵母アルファ-因子リーダー（US 4, 546, 082, US 4,870, 008, EP 16 201, EP 123 294, EP 123 544 およびEP 163 529 2 開示された使用）であってよい。あるいは、リーダーペプチドは、合成リーダーペプチドであってよく、つまり天然には発見されないリーダーペプチドであってよい。合成リーダーペプチドは、例えば、WO 8 9 / 0 2 4 6 3 または WO 9 2 / 1 1 3 7 8 に開示されている構築物であって良い。

【 0 1 3 7 】

糸状菌において使用するための信号ペプチドは、アスペルギウスsp.またはグルコアミラーゼをコードする遺伝子、Rhizomucor mieheiリパーゼまたはプロテアーゼまたはHumicola lanuginosaリパーゼをコードする遺伝子に由来することが都合よい。信号ペプチドは、*A. oryzae* TAKAアミラーゼ、*A. niger* neutral α -アミラーゼ、*A. niger* acid-stableアミラーゼ、または*A. niger*グルコアミラーゼをコードする遺伝子に由来することが好ましい。適切な信号ペプチドは、例えば、EP 238 023およびEP 215 594に開示されている。

【 0 1 3 8 】

昆虫細胞において使用するための信号ペプチドは、昆虫遺伝子（WO 9 0 / 0 5 7 8 3 参照）、例えばlepidopteran *Manduca sexta* asipokineticホルモン前駆体信号ペプチド（US 5, 0 2 3, 3 2 8 参照）に由来することが都合よい。

【 0 1 3 9 】

ヒト第VII因子ポリペプチド変異体をコードするDNA配列、プロモーターおよび任意にターミネーター、および/または分泌信号配列のそれぞれの結合に用いられる方法、および、それらの複製に必要な情報を含む適切なベクターに挿入するために用いられる方法は、当該分野の技術者には周知である（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989参照）。

【 0 1 4 0 】

哺乳類細胞のトランスフェクション方法および細胞に導入されたDNA配列の発現方法は、例えばKaufman and Sharp, *J. Mol. Biol.* 159 (1982), 601-621; Southern and Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (1982), 327-341; Loyter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982), 422-426; Wigler et al., *Cell* 14 (1978), 725; Corsaro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7 (1981), 603, Graham and van der Eb, *Virology* 52 (1973), 456; and Neumann et al., *EMBO J.* 1 (1982), 841-845.に開示されている。

【0141】

クローン化されたDNA配列は、例えば、カルシウムリン酸媒介トランスフェクション (Wigler et al., *Cell* 14: 725-732, 1978; Corsaro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7: 603-616, 1981; Graham and Van der Eb, *Virology* 52d: 456-467, 1973)、または電気穿孔法 (Neumann et al., *EMBO J.* 1: 841-845, 1982) によって、培養哺乳類細胞に導入される。外来性DNAを発現する細胞を同定し、選択するために、一般に、選択可能な表現型 (選択可能なマーカー) を与える遺伝子が、対象の遺伝子またはcDNAと共に細胞に導入される。選択可能なマーカーは、ネオマイシン、ハイグロマイシン、およびメトトレキサートのような薬剤耐性を与える遺伝子を含むことが好ましい。選択可能なマーカーは、増幅を可能とする選択マーカーであってよい。好ましい増幅可能なマーカーは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 配列である。選択可能なマーカーは、Thilly (*Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, MA, incorporated here in by reference) によって概説されている。当該分野の技術者は、適切な選択可能マーカーを容易に選択することができるであろう。

【0142】

選択可能なマーカーは、別個のプラスミドで所望の遺伝子と同時に細胞に導入してもよく、または同一のプラスミドで導入してもよい。同一のプラスミドである場合、選択可能マーカーおよび所望の遺伝子は、異なるプロモーターまたは同一のプロモーターの制御下にあり、後者の配列はジシストロンのメッセージ (dicistronic message) を生じる。このタイプの構築物は、当該分野で周知である (例えば、Levinson and Simonsen, *U.S.* 4,713,339)。細胞に導入される混合物に「担体DNA」として知られる追加のDNAを加えることもまた、有利なことである。

【0143】

細胞がDNAを取り込んだ後、それらは適切な増殖培地中で、典型的には1~2日間増殖され、所望の遺伝子の発現を開始する。ここで使用される「適切な増殖培地」という用語は、栄養と、細胞の増殖および所望のヒト第VII因子ポリペプチド変異体の発現に必要な他の成分を含む培地を意味する。培地は、通常、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、必須糖、ビタミン、塩、リン脂質、タンパク質および増殖因子を含む。ガンマカルボキシル化タンパクを生成するために、培地はビタミンKを、好ましくは約0.1 μg/mlから約5 μg/mlの濃度で含む。薬剤選別は、選択可能マーカーが安定して発現する細胞の増殖を選択するのに適用される。増幅可能である選択可能マーカーと共にトランスフェクションされた細胞のための薬剤濃度は、コピー数が上昇したクローン配列を選択するために上昇され、これによって、発現レベルが上昇される。次いで、安定したトランスフェクション細胞のクローンが、所望のヒト第VII因子ポリペプチド変異体の発現でスクリーニングされる。

【0144】

ヒト第VII因子ポリペプチド変異体をコードするDNA配列が導入される宿主細胞は、翻訳後の改変されたヒト第VII因子ポリペプチド変異体を生成可能であれば何れの細胞でもよく、酵母、菌類、および高真核細胞を含む。

【0145】

本発明に使用される哺乳類細胞株の例は、COS-1 (ATCC CRL 1650)、子ハムスター腎 (BHK) および293 (ATCC CRL 1573; Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36: 59-72, 1977) 細胞株である。好ましいBHK細胞株は、tk-ts13 BHK細胞株 (本明細書において援用される、Waechter and Baserga, *Proc. Natl. Acad. Sc*

10

20

30

40

50

i. USA 79: 1106-1110,1982) であり、以下 B H K 5 7 0 細胞と称す。B H K 5 7 0 細胞株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに、12301 Parklawn Dr. , Rockville,

Md. 20852、A T C C 受付番号 C R L 1 0 3 1 4 で寄託されている。tk-ts13 BHK細胞株もまた、A T C C 受付番号 C R L 1 6 3 2 で利用可能である。さらに、Rat Hep I (Rat 肝癌; A T C C C R L 1 6 0 0), Rat Hep II (Rat 肝癌; A T C C C R L 1 5 4 8), T C M K (A T C C C C L 1 3 9), Human lung (A T C C H B 8 0 6 5), N C T C 1 4 6 9 (A T C C C C L 9 . 1), C H O (A T C C C C L 6 1) および D U K X 細胞 (Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220,1980) を含む多くの他の細胞株を本発明において用いることができる。

10

【 0 1 4 6 】

適切な酵母細胞の例には、*Saccharomyces* spp. または *Schizosaccharomyces* spp.、特に *Saccharomyces cerevisiae* または *Saccharomyces kluyveri* の菌株の細胞が含まれる。酵母細胞に異種性 D N A を形質転換する方法、および異種製のポリペプチドを生成する方法は、例えば US 4,599, 311, US 4,931, 373, US 4,870, 008, 5,037, 743, および US 4,845, 075 に開示されており、それらは全て本明細書に援用される。形質転換された細胞は、選択可能マーカー、通常は薬剤耐性または特定の栄養、例えばロイシンの存在下における増殖能によって決定される表現型によって選択される。酵母中で使用するのに好ましいベクターは、US 4,931, 373 に開示されている P O T 1 ベクターである。ヒト第 VII 因子ポリペプチド変異体をコードする D N A 配列は、信号配列および任意に、上記のようなリー

20

【 0 1 4 7 】

他の菌類の細胞の例は、糸状菌、例えば *Aspergillus* spp.、*Neurospora* spp.、*Fusarium* spp.、または *Trichoderma* spp. であり、特に、*A. oryzae*、*A. nidulans*、または *A. niger* の菌株である。タンパク質の発現のための *Aspergillus* spp. の使用は、例えば EP 272 277、EP 238 023、EP 184 438 に開示されている。F. oxysporum の形質転換は、例えば Mardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 に開示されているように行うことができる。Trichoderma spp. の形質転換は、例えば EP 244 234 に開示されているように行うことができる。

30

【 0 1 4 8 】

真菌を宿主細胞として使用する場合、真菌は本発明の D N A 構築物を形質転換され、都合よいことには、D N A 構築物が宿主染色体に組み込まれることによって、組換え宿主細胞が得られる。この組み込みは、一般に、D N A 配列が細胞中で安定に維持される可能性が高いために有利であると見なされる。宿主染色体への D N A 構築物の組み込みは、例えば相同性組換えまたは非相同性組換えによる従来法に従って行える。

【 0 1 4 9 】

昆虫細胞の形質転換およびそこでの相同性ポリペプチドの生成は、US 4,745,051、US 4,879,236、US 5,155,037、5,162,222、EP 397,485 に開示されるように行うことができ、これらの全ては本明細書中に参照文献として援用される。宿主として使用される昆虫細胞株は、Lepidoptera 細胞株、例えば *Spodoptera frugiperda* 細胞、または *Trichoplusia ni* 細胞 (US 5,077,214 参照) が適切である。培養条件は、例えば W O 8 9 / 0 1 0 2 9 または W O 8 9 / 0 1 0 2 8、または上述の参照文献の何れかに開示されているものが適している。

40

【 0 1 5 0 】

上記の形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞は、次いで、後に得られたペプチドの全部または一部が培養物から回収可能である、ヒト第 VII 因子ポリペプチド変異体を発現させる条件下で、適切な培地中で培養される。細胞の培養に用いられる培地は、宿主細胞の増殖に適した都合の良い培地であれば何れのものでもよく、例えば最小培地また

50

は適切な補充物を含む複合培地であってよい。適切な培地は、商業的な供給業者から入手可能であり、または公開されている処方（例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログ）に従って調製できる。細胞によって生成されたヒト第VII因子ポリペプチド変異体は、次いで培養培地から、遠心分離または濾過によって宿主細胞を培地から分離させ、上清または濾液のタンパク水溶性成分を塩、例えば硫酸アンモニウムによって沈殿させ、種々のクロマトグラフィー法、例えばイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー等によって精製することを含む従来法によって回収される。

【0151】

トランスジェニック動物技術は、本発明の第VII因子ポリペプチド変異体を生成するために使用されることができる。このタンパク質は、宿主雌性哺乳類の乳腺で生成されることが好ましい。所望のタンパク質の乳腺内での発現とそれに続く乳への分泌は、他の源からタンパク質を単離する際に遭遇する多くの困難を克服する。乳は、容易に集められ、大量に入手可能であり、生化学的によく特徴づけられている。さらにその上、主要な乳タンパク質は、乳中に高濃度（一般に、約1～15 g/l）で存在する。

10

【0152】

商業的な観点から、多量の乳を産する種を宿主として用いることが明らかに好ましい。マウスおよびラットのような小さい動物を用いることができる（好ましくは、原理的な段階の証明において）が、家畜哺乳類、例えばブタ、ヤギ、ヒツジ、およびウシであるが、これには限定されない家畜哺乳類を用いることが好ましい。ヒツジは、この種における遺伝子導入のこれまでの歴史、乳生産量、経費、およびヒツジの乳を集めるための装備が用意に入手できることなどのような要因のために（例えば、WO 88/00239 宿主のための種の選択を含む要因の比較を参照）特に好ましい。イースト・フリースランド・シープのような乳用に繁殖された宿主動物の品種を選択すること、または、トランスジェニック系を繁殖によって後に乳用の系統に導入することが一般に望ましい。何れの場合でも、良好な健康状態が知られた動物が用いられるべきである。

20

【0153】

乳腺における発現を得るために、乳タンパク遺伝子の転写プロモーターを用いる。乳タンパク遺伝子は、カゼイン（U.S. 5,304,489参照）、ベータ-ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミン、および乳清の酸性タンパクをコードする遺伝子を含んでいる。ベータ-ラクトグロブリン（BLG）プロモーターが好ましい。ヒツジのベータ-ラクトグロブリン遺伝子の場合、該遺伝子配列に隣接する5'の少なくとも406bpの基部領域が通常使用されるが、5'に隣接する配列の大部分、約5kbpまで、例えば5'に隣接するプロモーターおよびベータ-ラクトグロブリン遺伝子の非コード部分を包囲している～4.25kbpのDNA断片（参照Whitelaw et al., Biochem. J. 286: 31-39 (1992)）が好ましい。

30

【0154】

ベータ-ラクトグロブリン遺伝子が発現するための遺伝子領域を組み入れてもよいのと同様に、該遺伝子の他の領域を構築物に組み入れてもよい。イントロンを欠いた構築物は、例えば、そのようなDNA配列を含むものと比較して発現が不十分であることは、当該分野では一般に認められている（Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 836-840 (1988); Palmiter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 478-482 (1991); Whitelaw et al., Transgenic Res. 1: 3-13 (1991); WO 89/01343; およびWO 91/02318を参照。それぞれ、本明細書中に援用される。）。これに関して、可能であれば、所望のタンパク質またはポリペプチドをコードする遺伝子の本来のイントロンの全てまたは幾つかを含むゲノム配列を用いることが通常は好ましく、従って、例えばベータ-ラクトグロブリン遺伝子の少なくとも幾つかのイントロンをさらに包含することが好ましい。そのような領域の一つは、イントロンのスプライスおよびヒツジのベータ-ラクトグロブリン遺伝子の3'非コード領域からRNAのポリアデニル化を提供するDNA断片である。遺伝子の天然の3'非コード配列が置換されたとき、このヒツジのベータ-ラクトグロブリン断片

40

50

は、所望のタンパク質またはポリペプチドの発現レベルを増強し安定化することができる。他の実施形態において、変異体第VII因子配列の開始ATGを囲む領域は、乳特異的タンパク質遺伝子の対応する配列で置換される。そのような置換は、発現を増強するための推定上の組織特異的開始環境を提供する。変異体第VII因子の前プロおよびそれらの5'非コード配列、例えばBLG遺伝子を完全に置換することは都合がよいが、より小さい領域が置換されてもよい。

【0155】

トランスジェニック動物における第VII因子ポリペプチド変異体の発現のために、変異体第VII因子をコードするDNA断片を、発現ユニットを生成するためにその発現が必要とされるさらなるDNA断片に結合する操作が可能である。そのようなさらなる断片は、mRNAの転写およびポリアデニル化の終結を与える配列の他に、上記のプロモーターを含む。この発現ユニットは、さらに、改変された第VII因子をコードする断片に結合することができる、分泌信号配列をコードするDNA断片を含む。この分泌信号配列は、天然の第VII因子分泌信号配列または乳タンパクのような他のタンパク質（例えば、von Heijne, Nucl. Acids Res. 14: 4683-4690 (1986); および Meade et al., U. S. 4,873, 316 を参照。これらは本明細書において援用される）のものであってよい。

【0156】

トランスジェニック動物で使用するための発現ユニットは、変異体のFVII配列をさらなるDNA断片を含むプラスミドまたはファージベクター内に挿入することによって都合よく構成することができるが、発現ユニットは必須である任意の結合（ligations）配列によって構成されてもよい。これは特に、乳タンパクをコードするDNA断片を含むベクターを提供するのに都合がよく、また、乳タンパクをコードする配列を第VII因子変異体のもので置換するのに都合がよい。これによって、乳タンパク遺伝子の発現制御配列を含む遺伝子融合が作成される。何れの場合でも、プラスミドまたは他のベクター中の発現ユニットのクローニングが、その変異体第VII配列の増幅を促進する。増幅は、細菌（例えば大腸菌）宿主細胞で実行されるのが都合よく、従ってベクターは、細菌宿主細胞において典型的には複製開始点と選択可能マーカー機能を含む。この発現ユニットは、次いで、選択された宿主種の受精卵（初期胚を含む）に導入される。非相同性DNAの導入は、マイクロインジェクション（例えば、米国特許番号4,873,191）、レトロウイルス感染（Jae nisch, Science 240: 1468-1474 (1988)）、または胚幹（ES）細胞を用いたサイト直接的な組み込み（Bradley et al., Bio/Technology 10: 534-539 (1992)によって概説されている）を含む、幾つかの経路のうちの一つによって達成可能である。次いで卵を、偽妊娠の雌の卵管または子宮に移植し、期間まで発達させる。導入されたDNAをその生殖系列に保有する子孫は、通常のメンデルの様式でその子孫に該DNAを渡すことができ、トランスジェニック家畜を可能にする。トランスジェニック動物を生産する通常の方法は、当該分野において既知である（例えば、Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo、A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986、Simons et al., Bio/Technology 6: 179-183 (1988)、Wall et al., Biol. Reprod. 32: 645-651 (1985)、Buhler et al., Bio/Technology 8: 140-143 (1990)、Ebert et al., Bio/Technology 9: 835-838 (1991)、Krimpenfort et al., Bio/Technology 9: 844-847 (1991)、Wall et al., J. Cell. Biochem. 49: 113-120 (1992)、U.S. 4,873,191、U.S. 4,873,316、WO 88/00239、WO 90/05188、WO 92/11757、およびGB 87/00458を参照）。外来DNA配列を哺乳類およびそれらの胚細胞に導入する技術は、元来マウスで発展した（例えば、Gordon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7380-7384 (1980)、Gordon and Ruddle, Science 214: 1244-1246 (1981)、Palmiter and Brinster, Cell 41: 343-345 (1985)、Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442 (1985)、およびHogan et al. (ibid.)を参照）。これらの技術は、続いて、家畜種を含むより大型の動物を用いた使用に適用された（例えば、WO 88/00239、WO 90/05188、およびWO 92/11757、およびSimons et al., Bio/Technology 6: 179-183 (1988)を参照）。要約を述べると、トランスジェニックマウスまたはトランスジェニック家畜を生産する現在まで最も効率の良い経路において、所望

10

20

30

40

50

のDNAの数百の直線分子は、確立された技術に従って受精卵の前核の一つに注入される。受精卵の細胞質に注入されたDNAもまた、利用され得る。

【0157】

トランスジェニック植物における生成も行うことができる。発現は一般化されるか、または特定の器官、例えば塊茎に配向される (Hiatt, Nature 344: 469-479 (1990); Edelbaum et al., J. Interferon Res. 12: 449-453 (1992); Sijmons et al., Bio/Technology 8: 217-221 (1990); およびEP 0 255 378参照。)。

【0158】

本発明の第VII因子ポリペプチド変異体は、細胞培養培地または乳から回収される。本発明の第VII因子ポリペプチド変異体は、クロマトグラフィー (例えば、イオン交換、親和性、疎水性、等電点電気泳動、およびサイズ排除)、電気泳動的方法 (例えば、等電点電気泳動 (IEF)、示差溶解性 (例えば、硫酸アンモニウム沈殿)、または抽出 (例えば、Protein Purification, J. -C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989参照)) を含むがこれに限定されない当該分野において既知の様々な方法によって精製される。好ましくは、これらは抗第VII因子抗体カラムで親和クロマトグラフィーによって精製される。Wakabayashi et al., J. Biol. Chem. 261: 11097-11108, (1986) および Thim et al., Biochemistry 27: 7785-7793, (1988) によって開示されたようなカルシウム依存性モノクローナル抗体が特に好ましい。さらなる精製は、従来の化学的精製手段、例えば高速液体クロマトグラフィーなどによって都合よく達成できる。他の精製法は、クエン酸バリウム沈殿を含み、当該分野で既知であり、ここで開示されている新規の第VII因子ポリペプチド変異体の精製に適用することができる (例えば、Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N. Y., (1982) を参照)。

【0159】

治療目的のために、本発明の第VII因子ポリペプチド変異体は十分に純粋であることが好ましい。従って、本発明の好ましい実施形態において、本発明の第VII因子ポリペプチド変異体は、少なくとも約90~95%均質に、好ましくは少なくとも約98%均質に精製される。純度は例えばゲル電気泳動およびアミノ末端アミノ酸配列によって評価することができる。

【0160】

第VII因子変異体はその活性化サイトで切断されてその二重鎖形態に転化する。活性化は、当該分野で既知の方法、例えばOsterud, et al., Biochemistry 11: 2853-2857 (1972); Thomas, U. S. Patent No. 4, 456,591; Hedner and Kisiel, J. Clin. Invest. 71: 1836-1841 (1983)、またはKisiel and Fujikawa, Behring Inst. Mitt. 73: 29-42 (1983) に開示されている方法によって行える。あるいは、Bjoern et al. (Research Disclosure, 269 September 1986, pp. 564-565) によって開示されているように、第VII因子は、イオン交換クロマトグラフィーカラム、例えばMono Q (R) (Pharmacia fine Chemicals) などを通して活性化されることもできる。得られた活性化第VII因子変異体は、次いで、上述したように処方され投与される。

【0161】

< 試験法 >

本発明はまた、本発明の好ましい第VII因子変異体を選択するための適切な試験法を提供する。これらの試験法は、インビトロでの簡単な予備試験として行うことができる。

【0162】

本明細書の実施例5は、このような本発明の第VII因子変異体の活性のための簡単な試験 (「インビトロでの加水分解試験」と題されている) を開示している。それに基づいて、特に望まれる第VIIa因子変異体は、「インビトロでの加水分解試験」で試験されたときに、該変異体の活性と図1の天然の第VII因子の活性との間の比が1.0以上、少なくとも1.25、好ましくは少なくとも約2.0、例えば少なくとも約3.0、またはよりいっそう好ましくは、少なくとも約4.0であるような変異体である。

【0163】

変異体の活性は、生理学的な基質、例えば第X因子（「インビトロでのタンパク分解試験」）（実施例6参照）を用いて測定されることもでき、適切には濃度が100～1000nMであり、ここで第Xa因子発生は、適切な色素生産性基質（例えばS-2765）を添加した後に測定される。さらに、活性試験は、生理学的温度で行われる。

【0164】

第VIIa因子変異体のトロンピン発生成は、全ての関連のある凝固因子、および生理学的濃度での阻害剤（擬血友病A状況でのマイナス第VIII因子）および活性化された血小板（本明細書に援用される、p.543 in Monroe et al. (1997) Brit. J. Haematol. 99,542-547に開示されているように）を含む試験において測定され得る。

【0165】

<投与および製薬組成物>

本発明の第VII因子ポリペプチド変異体は、凝固因子欠損（例えば、血友病AおよびB、または凝固第XI因子または第VII因子の欠損）または凝固因子阻害のような幾つかの原因を有する出血性疾患を制御するために使用され、または、正常に機能する血液凝固カスケードを有する（凝固因子欠損または何れの凝固因子に対する阻害も持たない）対象で発生した過剰出血を制御するために用いられる。出血は、血小板機能、血小板減少症、またはフォンウィルブランド病によって引き起こされ得る。それは、その繊維素溶解性活性が様々な刺激によって上昇した対象においても観察される。

【0166】

外科手術または広い外傷に伴って広範な組織傷害を受けた対象において、止血機構は迅速な止血要求によって圧倒されており、止血機構が正常であるにもかかわらず出血が生じる。十分な止血の達成は、例えば脳、内耳領域、および眼のような器官で出血が起こった時も問題であり、また、出所の確認が困難なときの散在性の出血（出血性胃炎およびおびただしい子宮出血）の場合にも問題である。同様の問題は、腹腔鏡手術と同様に様々な器官（肝臓、肺、腫瘍組織、消化管）からバイパスを通す処理の際にも生じる。これらの状況は、外科的技術（縫合、切除等）によって止血を施すことが困難であるという点が共通している。急性のおびただしい出血は、治療処置によって止血の欠陥が誘発されている抗凝固治療中の対象にも生じ得る。そのような対象は、抗凝固効果が速やかに相殺されるべきである場合に外科的処置を必要とする。止血が不十分な場合に問題を引き起こし得る他の状況は、正常な止血機構を有する対象が、血栓塞栓性疾患を予防するために抗凝固治療を施されたときである。そのような治療は、アスピリンおよび他の血小板凝集阻害剤と同様に、ヘパリン、他の形体のプロテオグリカン、ワルファリン、または他の形体のビタミンKアンタゴニストを含む。

【0167】

凝固カスケードの全身活性化は、汎発性の血管内凝集（DIC）を導き得る。しかしながら、そのような合併症は、その種の止血処理の局在化が、第VIIa因子および血管壁損傷サイトに曝されたTFとの間の複合体形成によって誘導されるために、組換え第VIIa因子を高投与量で処置された対象では観察されない。本発明の第VII因子ポリペプチド変異体は、このように、正常な止血機構に付随する過剰出血等を制御するための活性化形体でも使用され得る。

【0168】

慎重な介入と関連した処置のために、本発明の第VII因子ポリペプチド変異体は、典型的に、処置を行う前約24時間以内に投与され、最大で7日以上後に投与される。凝固剤としての投与は、本明細書に記載されたように様々な経路で行うことができる。

【0169】

70kgの対象に添加し維持される投与量のための、第VII因子ポリペプチド変異体の投与量は、対象の体重および状況の重篤度により、約0.05mg～500mg/日、好ましくは約1mg～200mg/日、およびさらに好ましくは約10mg～約175mg/日の範囲である。

【0170】

10

20

30

40

50

製薬組成物は、予防的および/または治療的処置のために、主に非経口投与を意図されている。好ましくは、製薬組成物は、非経口的に、即ち、静脈内、皮下、または筋肉内に投与され、あるいは連続的または脈動的注入によって投与されても良い。非経口投与のための組成物は、本発明の第VII因子変異体と、好ましくはそれが溶解される製薬的に許容される担体、好ましくは水性担体から成る。種々の水性担体、例えば水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシンなどが使用できる。本発明の第VII因子ポリペプチド変異体は、輸送するために、または損傷サイトを標的にするために、リポソーム製剤に処方されることもできる。リポソーム製剤は、一般に、例えばU.S. 4,837,028、U.S. 4,501,728、およびU.S. 4,975,282に開示されている。該組成物は、従来の、周知の滅菌技術によって滅菌される。得られた水性溶液は、使用のために包装されるかまたは無菌条件下で濾過され、凍結乾燥される。この凍結乾燥された製剤は、投与前に滅菌水性溶液と組み合わせられる。この組成物は、おおよその生理学的な条件、例えばpH調整剤および緩衝剤、張度調整剤等のために必要な、製薬的に許容される補助物質、例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム等を含む。

10

【0171】

それらの製剤中の第VII因子変異体の濃度は、広く変動可能であり、即ち、約0.5重量%以下から、通常少なくとも約1重量%、最大で15~20重量%であり、主に液体の体積、粘度等によって、特に選択された投与様式に従って選択される。

【0172】

このように、静脈内注入のための典型的な製薬組成物は、250mlの滅菌リンガー液および10mgの第VII因子変異体を含むように作成されてよい。非経口投与組成物を調製する実際の方法は、当該分野の技術者に既知であるか、明らかであり、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990)により詳細に開示されている。

20

【0173】

本発明の第VII因子ポリペプチド変異体を含む組成物は、予防のため、および/または治療処置のために投与されることができる。治療的な適用において、組成物は、病気とその合併症を治癒、緩和、または部分的に停止するのに十分な量で、病気で苦しんでいる対象に上述したように投与される。これを達成するのに十分な量は、「治療的な有効量」として定義される。当該分野の技術者には理解されるように、この目的のために有効な量は対照の体重と一般的な状態の他に、疾患または損傷の重症度に依存する。しかしながら一般に、有効量は、70kgの対象に1日当たり、第VII因子変異体が約0.05mgから約500mgまでの範囲で、第VII因子変異体の1日当たりの投与量が約1.0mg~約200mgであるのがより一般的である。

30

【0174】

本発明のFVIIaポリペプチドは、一般に、重篤な疾患または損傷状態、即ち生命が脅かされているか、または潜在的に脅かされている状況で使用される。そのような場合、外来性の物質を最小化し、またヒトにおいてヒト第VII因子ポリペプチド変異体の免疫原性が普遍的に欠乏している観点から、治療している医師がこれらの変異体第VII因子組成物をかなり過剰に投与することが望ましいと考えられる。

40

【0175】

予防的な適用において、本発明の第VII因子変異体を含む組成物は、対象自身の凝固能を増強させるために、病気または怪我をしやすいかその危険がある対象に投与される。そのような量は、「予防的に有効な投与量」として定義される。予防的な適用において、正確な量は対象の健康状態および体重によるが、投与量は通常、70kgの対象で、1日当たり、約0.05mg~約500mgの範囲、より一般には、約1.0mg~約200mgである。

【0176】

組成物の単一または複数投与は、治療する医師によって選択される投与レベルとパターンとで実行され得る。レベルが1日維持されることを必要とする通院の対象のために、第

50

VII因子ポリペプチド変異体は例えば移動式ポンプシステムを用いて連続的に注入することによって投与され得る。

【0177】

本発明の第VII因子変異体の局所的な送達、例えば局所的な適用が行われることができ、例えば、噴霧、灌流、二重バルーンカテーテル、ステント、人工血管またはステントへの組み込み、バルーンカテーテルをコートするのに用いるヒドロゲル、または他のよく確立された方法等の手段によって行われる。いずれにしても、製薬組成物は対象を治療するのに有効な第VII因子変異体の量を提供する。

【0178】

本発明は、以下の実施例によってさらに例証されるが、その構築物は保護範囲を限定するものではない。続く説明と実施例において開示される特徴は、個々に、およびそれらを組み合わせて、本発明を多様な形態で実現するために重要である。

【実施例】

【0179】

以下の実施例において用いたアミノ酸置換の用語法は次の通りである。

【0180】

最初の文字は、配列番号1の位置に本来存在するアミノ酸を表す。次の数字は、配列番号1における位置を表す。二番目の文字は、本来のアミノ酸と置換した異なるアミノ酸を表す。例えば、L305V/K337A-FVIIは、配列番号1の305に位置するロイシンがバリンによって置換され、そして配列番号1の337に位置するリシンがアラニンによって置換され、両方の変異が同一の第VII因子ポリペプチド変異体にある。

【0181】

<実施例1>

DNAは、L305V/K337A-FVII、L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII、L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVIIをコードする。

【0182】

L305V/K337A-FVII、L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII、およびL305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVIIをコードするDNA構築物は、所望の挿入断片を有するスーパーコイルの二重鎖DNAベクターと、所望の変異を含む二つの合成プライマーを用いたサイト特異的突然変異誘発によって調製された。

【0183】

以下のプライマーを使用した。

【0184】

L305V-FVI用

5'-CGT GCC CCG GGT GAT GAC CCA GGA C-3' (配列番号2)

5'-GTC CTG GGT CAT CAC CCG GGG CAC G-3' (配列番号3)

K337A-FVII用

5'-CGG ATG GCA GCG CGG ACT CCT GCA AGG G-3' (配列番号4)

5'-CCC TTG CAG GAG TCC GCG CTG CCA TCC G-3' (配列番号5)

V158D-FVII用

5'-GTG GGG GGC AAG GAC TGC CCC AAA GGG G-3' (配列番号6)

5'-CCC CTT TGG GGC AGT CCT TGC CCC CCA C-3' (配列番号7)

E296V/M298Q-FVII用

5'-GCC ACG GCC CTG GTG CTC CAG GTC CTC AAC GTG CCC-3' (配列番号8)

5'-GGG CAC GTT GAG GAC CTG GAG CAC CAG GGC CGT GGC-3' (配列番号9)

【0185】

オリゴヌクレオチドプライマーは、それぞれベクターの対になる鎖に相補的であり、Pfu DNAポリメラーゼの方法によって、温度サイクリングの間に伸長された。プライ

10

20

30

40

50

マーを組み込むことで、ねじれのニックを含む変異プラスミドが生成された。続く温度サイクルで、生成物は、メチル化およびヘミメチル化されたDNAに特異的であるDpnIによって処理され、親のDNAテンプレートを消化し、変異を含む合成されたDNAを選択する。

【0186】

特異的なプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応法によるDNA構築物の調製方法は、当該分野の技術者に周知である(PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, USA参照)。

【0187】

<実施例2>

L305V/K337A-FVIIの調製

基本的に従来開示されているように(Thim et al. (1988) Biochemistry 27,7785-7793; Persson and Nielsen (1996) FEBS Lett. 385,241-243)、BHK細胞をトランスフェクトし、変異体L305V/K337A-FVIIの発現を得た。第VII因子変異体は、次のように精製した。

条件付きの培地をQ Sepharose Fast Flowの25mLカラム(Pharmacia Biotech)にロードし、5mMのEDTA、0.1%のTriton X-100、および10mMのTrisを加えた後、pH8.0に調整し、水を加えて10-11mS/cmに伝導率を調整した。

【0188】

10mMのTris、50mMのNaCl、0.1% Triton X-100、pH8.0から、10mMのTris、50mMのNaCl、25mMのCaCl₂、0.1% Triton X-100、pH8.0にステップングしてタンパク質を溶出させた。L305V/K337A-FVIIを含む画分を貯蔵し、CNBr活性化Sepharose 4B(Pharmacia Biotech)と組み合わせたモノクローナル抗体F1A2(Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)を含む25mLカラムにアブライした。

【0189】

そのカラムを、10mMのCaCl₂、100mMのNaClおよび0.02% Triton X-100を含む50mMのHepes、pH7.5で平衡化した。平衡化バッファーで洗い流した後、物質と結合した2MのNaClを含む平衡化バッファーを、CaCl₂の代わりに10mMのEDTAを含む平衡化バッファーで溶出させた。使用または貯蔵する前に、EDTAを超過するCaCl₂を添加するか、またはL305V/K337A-FVIIをCa²⁺含有バッファーに移行させた。各工程の収量は、第VII因子ELISA測定により、精製タンパクはSDS-PAGEによって解析された。

【0190】

<実施例3>

L305V/V158D/E296V/M298Q-FVIIの調製

基本的に従来開示されているように(Thim et al. (1988) Biochemistry 27,7785-7793; Persson and Nielsen (1996) FEBS Lett. 385,241-243)、BHK細胞をトランスフェクトし、変異体L305V/V158D/E296V/M298Q-FVIIの発現を得た。第VII因子変異体は、次のように精製した。

条件付きの培地をQ Sepharose Fast Flowの25mLカラム(Pharmacia Biotech)にロードし、5mMのEDTA、0.1%のTriton X-100、および10mMのTrisを加えた後、pH8.0に調整し、水を加えて10-11mS/cmに伝導率を調整した。10mMのTris、50mMのNaCl、0.1% Triton X-100、pH8.0から、10mMのTris、50mMのNaCl、25mMのCaCl₂、0.1% Triton X-100、pH8.0にステップングしてタンパク質を溶出させた。L305V/V158D/E296V/M298Q-FVIIを含む画分を貯蔵し、CNBr活性化Sepharose 4B(Pharmacia Biotech)と組み合わせたモノクローナル抗体F1A2(Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)を含む2

10

20

30

40

50

5 ml カラムにアプライした。

【0191】

そのカラムを、10 mMのCaCl₂、100 mMのNaClおよび0.02% Triton X-100を含む50 mMのHepes, pH 7.5で平衡化した。平衡化バッファーで洗い流した後、物質と結合した2 MのNaClを含む平衡化バッファーを、CaCl₂の代わりに10 mMのEDTAを含む平衡化バッファーで溶出させた。使用または貯蔵する前に、EDTAを超過するCaCl₂を添加するか、またはL305V/V158D/E296V/M298Q-FVIIをCa²⁺含有バッファーに移行させた。各工程の収量は、第VII因子ELISA測定により、精製タンパクはSDS-PAGEによって解析された。

10

【0192】

<実施例4>

L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVIIの調製

基本的に従来開示されているように(Thim et al. (1988) Biochemistry 27,7785-7793; Persson and Nielsen (1996) FEBS Lett. 385,241-243)、BHK細胞をトランスフェクトし、変異体L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVIIの発現を得た。第VII因子変異体は、次のように精製した。

条件付きの培地をQ Sepharose Fast Flowの25 ml カラム(Pharmacia Biotech)にロードし、5 mMのEDTA、0.1%のTriton X-100、および10 mMのTrisを加えた後、pH 8.0に調整し、水を加えて10-11 mS/cmに伝導率を調整した。10 mMのTris、50 mMのNaCl、0.1% Triton X-100、pH 8.0から、10 mMのTris、50 mMのNaCl、25 mMのCaCl₂、0.1% Triton X-100、pH 8.0にステップングしてタンパク質を溶出させた。L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVIIを含む画分を貯蔵し、CNBr活性化Sepharose 4B(Pharmacia Biotech)と組み合わせたモノクローナル抗体F1A2(Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)を含む25 ml カラムにアプライした。

20

【0193】

そのカラムを、10 mMのCaCl₂、100 mMのNaClおよび0.02% Triton X-100を含む50 mMのHepes、pH 7.5で平衡化した。平衡化バッファーで洗い流した後、物質と結合した2 MのNaClを含む平衡化バッファーを、CaCl₂の代わりに10 mMのEDTAを含む平衡化バッファーで溶出させた。使用または貯蔵する前に、EDTAを超過するCaCl₂を添加するか、またはL305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVIIをCa²⁺含有バッファーに移行させた。各工程の収量は、第VII因子ELISA測定により、精製タンパクはSDS-PAGEによって解析された。

30

【0194】

<実施例5>

インビトロで加水分解試験

天然(野生型)の第VIIa因子および第VIIa因子変異体(以下、両者をあわせて「第VIIa因子」と称す。)を平行して試験し、それらの特異的活性を直接比較する。この試験は、マイクロリッタープレート(MaxiSorp, Nunc, Denmark)で行われる。色素生産性基質D-11e-Pro-Arg-p-ニトロアニリド(S-2288, Chromogenix, Sweden)、最終濃度1 mMを、0.1 MのNaCl、5 mMのCaCl₂および1 mg/mlのウシ血清アルブミンを含む50 mMのHepes、pH 7.4中の第VIIa因子(最終濃度100 nM)に添加する。405 nmの吸光度を、SpectraMaxTM340プレートリーダー(Molecular Devices, USA)で連続的に測定する。20分のインキュベーションの間に発生した吸光度を、酵素を含まない空のウェルの吸光度を減算した後、変異体と野生型の第VIIa因子の間の活性比を算出するために用いる。

40

比率 = (A_{405nm}第VIIa因子変異体) / (A_{405nm}第VIIa野生型)

50

【 0 1 9 5 】

< 実施例 6 >

インビトロでのタンパク質分解試験

天然（野生型）の第VIIa因子および第VIIa因子変異体（以下、両者をあわせて「第VIIa因子」と称す。）を平行して試験し、それらの特異的活性を直接比較する。この試験は、マイクロリッタープレート（MaxiSorp, Nunc, Denmark）で行われる。0.1MのNaCl、5mMのCaCl₂および1mg/mlのウシ血清アルブミンを含む100マイクロLの50mM HEPES、pH7.4中の第VIIa因子（10nM）および第X因子（0.8μM）を15分間インキュベートする。次いで、0.1MのNaCl、20mMのEDTAおよび1mg/mlのウシ血清アルブミンを含む50μLの50mM HEPES、pH7.4を添加して、第X因子の切断を停止する。生成した第Xa因子の量は、色素生産性基質Z-D-Arg-Gly-Arg-p-ニトロアニリド（S-2765, Chromogenix, Sweden）を最終濃度0.5mMで添加して測定する。405nmの吸光度を、SpectraMax™340プレートリーダー（Molecular Devices, USA）で連続的に測定する。

10

【 0 1 9 6 】

10分のインキュベーションの間に発生した吸光度を、FVIIを含まない空のウェルの吸光度を減算した後、変異体と野生型の第VIIa因子の間のタンパク質分解活性比を算出するために用いる。

比率 = (A_{405nm} 第VIIa因子変異体) / (A_{405nm} 第VIIa野生型)

20

【 0 1 9 7 】

< 実施例 7 >

実施例5および6の試験で測定された、FVIIa変異体の相対活性。

【表2】

変異体	実施例5の比	実施例6の比
L305V/K337A-FVII	7.2	6.2
L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII	6.7	45
L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII	11.5	72
wt-FVIIa	1.0	1.0

30

【化 1 - 2】

Asp-Gly-Asp-Glu-Gln-Ser-Arg-Arg-Val-Ala-Gln-Val-Ile-Ile-Pro-Ser-Thr-Tyr-				
220	225	230		
Val-Pro-Gly-Thr-Thr-Asn-His-Asp-Ile-Ala-Leu-Leu-Arg-Leu-His-Gln-Pro-Val-				
235	240	245	250	
Val-Leu-Thr-Asp-His-Val-Val-Pro-Leu-Cys-Leu-Pro-Glu-Arg-Thr-Phe-Ser-Glu-				
255	260	265	270	10
Arg-Thr-Leu-Ala-Phe-Val-Arg-Phe-Ser-Leu-Val-Ser-Gly-Trp-Gly-Gln-Leu-Leu-				
275	280	285		
Asp-Arg-Gly-Ala-Thr-Ala-Leu-Glu-Leu-Met-Val-Leu-Asn-Val-Pro-Arg-Leu-Met-				
290	295	300	305 306	
Thr-Gln-Asp-Cys-Leu-Gln-Gln-Ser-Arg-Lys-Val-Gly-Asp-Ser-Pro-Asn-Ile-Thr-				
310	315	320		20
Glu-Tyr-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-Ser-Asp-Gly-Ser-Lys-Asp-Ser-Cys-Lys-Gly-				
325	330	335	340	
Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-His-Ala-Thr-His-Tyr-Arg-Gly-Thr-Trp-Tyr-Leu-Thr-Gly-				
345	350	355	360	
Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Gln-Gly-Cys-Ala-Thr-Val-Gly-His-Phe-Gly-Val-Tyr-Thr-				
365	370	375		30
Arg-Val-Ser-Gln-Tyr-Ile-Glu-Trp-Leu-Gln-Lys-Leu-Met-Arg-Ser-Glu-Pro-Arg-				
380	385	390	395	
Pro-Gly-Val-Leu-Leu-Arg-Ala-Pro-Phe-Pro				
400	405 406			

【化2】

配列番号 2 (L305V-FVII の調製のためのDNAプライマー):

5'-CGT GCC CCG GGT GAT GAC CCA GGA C-3'

配列番号 3 (L305V-FVII の調製のためのDNAプライマー):

5'-GTC CTG GGT CAT CAC CCG GGG CAC G-3'

10

配列番号 4 (K337A-FVII の調製のためのDNAプライマー):

5'-CGG ATG GCA GCG CGG ACT CCT GCA AGG G-3'

配列番号 5 (K337A-FVII の調製のためのDNAプライマー):

5'-CCC TTG CAG GAG TCC GCG CTG CCA TCC G-3'

20

配列番号 6 (V158D-FVII の調製のためのDNAプライマー):

5'-GTG GGG GGC AAG GAC TGC CCC AAA GGG G-3'

配列番号 7 (V158D-FVII の調製のためのDNAプライマー):

5'-CCC CTT TGG GGC AGT CCT TGC CCC CCA C-3'

30

配列番号 8 (E296V/M298Q-FVII の調製のためのDNAプライマー):

5'-GCC ACG GCC CTG GTG CTC CAG GTC CTC AAC GTG CCC-3'

配列番号 9 (E296V/M298Q-FVII の調製のためのDNAプライマー):

5'-GGG CAC GTT GAG GAC CTG GAG CAC CAG GGC CGT GGC-3'

40

【図面の簡単な説明】

【0198】

50

【図1-1】天然(野生型)のヒト凝固第VII因子の全アミノ酸配列(配列番号1)。

【図1-2】図1-1の続きである。

【図1-1】

図1-天然ヒト凝固第VII因子のアミノ酸配列

Ala-Asn-Ala-Phe-Leu-GLA-GLA-Leu-Arg-Pro-Gly-Ser-Leu-GLA-Arg-GLA-Cys-Lys-
5 10 15

GLA-GLA-Gln-Cys-Ser-Phe-GLA-GLA-Ala-Arg-GLA-Ile-Phe-Lys-Asp-Ala-GLA-Arg-
20 25 30 35

Thr-Lys-Leu-Phe-Trp-Ile-Ser-Tyr-Ser-Asp-Gly-Asp-Gln-Cys-Ala-Ser-Ser-Pro-
40 45 50

Cys-Gln-Asn-Gly-Gly-Ser-Cys-Lys-Asp-Gln-Leu-Gln-Ser-Tyr-Ile-Cys-Phe-Cys-
55 60 65 70

Leu-Pro-Ala-Phe-Glu-Gly-Arg-Asn-Cys-Glu-Thr-His-Lys-Asp-Asp-Gln-Leu-Ile-
75 80 85 90

Cys-Val-Asn-Glu-Asn-Gly-Gly-Cys-Glu-Gln-Tyr-Cys-Ser-Asp-His-Thr-Gly-Thr-
95 100 105

Lys-Arg-Ser-Cys-Arg-Cys-His-Glu-Gly-Tyr-Ser-Leu-Leu-Ala-Asp-Gly-Val-Ser-
110 115 120 125

Cys-Thr-Pro-Thr-Val-Glu-Tyr-Pro-Cys-Gly-Lys-Ile-Pro-Ile-Leu-Glu-Lys-Arg-
130 135 140

Asn-Ala-Ser-Lys-Pro-Gln-Gly-Arg-Ile-Val-Gly-Gly-Lys-Val-Cys-Pro-Lys-Gly-
145 150 155 160

Glu-Cys-Pro-Trp-Gln-Val-Leu-Leu-Leu-Val-Asn-Gly-Ala-Gln-Leu-Cys-Gly-Gly-
165 170 175 180

Thr-Leu-Ile-Asn-Thr-Ile-Trp-Val-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Phe-Asp-Lys-Ile-
185 190 195

【図1-2】

Lys-Asn-Trp-Arg-Asn-Leu-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-His-Asp-Leu-Ser-Glu-His-
200 205 210 215

Asp-Gly-Asp-Glu-Gln-Ser-Arg-Arg-Val-Ala-Gln-Val-Ile-Ile-Pro-Ser-Thr-Tyr-
220 225 230

Val-Pro-Gly-Thr-Thr-Asn-His-Asp-Ile-Ala-Leu-Leu-Arg-Leu-His-Gln-Pro-Val-
235 240 245 250

Val-Leu-Thr-Asp-His-Val-Val-Pro-Leu-Cys-Leu-Pro-Glu-Arg-Thr-Phe-Ser-Glu-
255 260 265 270

Arg-Thr-Leu-Ala-Phe-Val-Arg-Phe-Ser-Leu-Val-Ser-Gly-Trp-Gly-Gln-Leu-Leu-
275 280 285

Asp-Arg-Gly-Ala-Thr-Ala-Leu-Glu-Leu-Met-Val-Leu-Asn-Val-Pro-Arg-Leu-Met-
290 295 300 305 306

Thr-Gln-Asp-Cys-Leu-Gln-Gln-Ser-Arg-Lys-Val-Gly-Asp-Ser-Pro-Asn-Ile-Thr-
310 315 320

Glu-Tyr-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-Ser-Asp-Gly-Ser-Lys-Asp-Ser-Cys-Lys-Gly-
325 330 335 340

Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-His-Ala-Thr-His-Tyr-Arg-Gly-Thr-Trp-Tyr-Leu-Thr-Gly-
345 350 355 360

Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Gln-Gly-Cys-Ala-Thr-Val-Gly-His-Phe-Gly-Val-Tyr-Thr-
365 370 375

Arg-Val-Ser-Gln-Tyr-Ile-Glu-Trp-Leu-Gln-Lys-Leu-Met-Arg-Ser-Glu-Pro-Arg-
380 385 390 395

Pro-Gly-Val-Leu-Leu-Arg-Ala-Pro-Phe-Pro
400 405 406

【配列表】

0004537059000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
A 6 1 P	7/04	(2006.01)
A 6 1 K	38/46	(2006.01)

C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21
A 6 1 P	7/04
A 6 1 K	37/54

(72)発明者 パーソン、エゴン
 スウェーデン国、エス - 2 1 7 5 1 マルモ、レジエメンツガタン 7 2

(72)発明者 オルセン、オレ・フビルステッド
 デンマーク国、ディーケー - 2 7 0 0 ブロンショイ、バエッケスコブベイ 3 8

審査官 中村 正展

(56)参考文献 国際公開第 0 1 / 0 5 8 9 3 5 (W O , A 1)
 国際公開第 8 8 / 0 1 0 2 9 5 (W O , A 1)
 特開 2 0 0 1 - 0 6 1 4 7 9 (J P , A)
 J. Biol. Chem. , 2 0 0 1 年 8 月 , vol. 276 , 29195-29199
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 1 9 9 6 年 , vol. 93 , 14379-14384
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 1 9 9 9 年 , vol. 96 , 8925-8930

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 9/48
 C07K 14/745
 C12N 15/00-15/90
 C12N 1/00- 1/38
 A61K 38/46
 A61P 7/04
 JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)
 PubMed
 MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 CA/CONFSCI/SCISEARCH(STN)
 WPIDS/DISSABS(STN)