



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 5 C12N 9/64, 15/58, A61K 37/547</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 93/24624</p> <p>(43) 国際公開日 1993年12月9日 (09.12.1993)</p>
--	-----------	--

(21) 国際出願番号 PCT/JP92/00679
 (22) 国際出願日 1992年5月26日(26. 05. 92)

(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について)
 住友製薬株式会社
 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED)
 [JP/JP]
 〒541 大阪府大阪市中央区道修町二丁目2番8号 Osaka, (JP)

(72) 発明者; および
 (75) 発明者/出願人(米国についてのみ)
 佐藤英史(SATO, Hideshi)[JP/JP]
 根来尚温(NEGORO, Takaharu)[JP/JP]
 安喰英夫(AGUI, Hideo)[JP/JP]
 〒554 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号
 住友製薬株式会社内 Osaka, (JP)
 高橋千絵(TAKAHASHI, Sene)[JP/JP]
 〒305 茨城県つくば市千現1丁目5-1 ハイネス千現402
 Ibaraki, (JP)
 須藤佳昭(SUDO, Yoshiaki)[JP/US]
 02111 マサチューセッツ州 ボストン トレモント ストリート
 151-#22J Massachusetts, (US)

(74) 代理人
 弁理士 浅村 皓, 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.)
 〒100 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331
 Tokyo, (JP)

(81) 指定国
 AT(欧州特許), BE(欧州特許), CH(欧州特許), DE(欧州特許),
 DK(欧州特許), ES(欧州特許), FR(欧州特許), GB(欧州特許),
 GR(欧州特許), IT(欧州特許), JP, LU(欧州特許),
 MC(欧州特許), NL(欧州特許), SE(欧州特許), US.

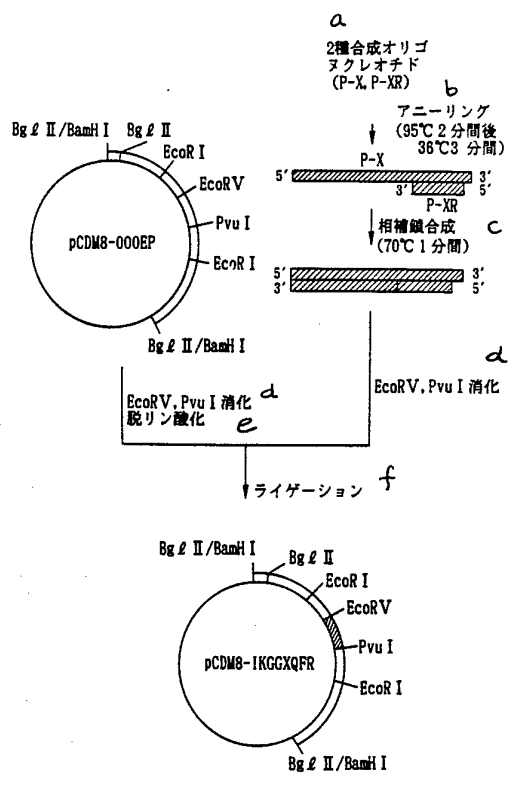
添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : t-PA MODIFICATION

- (54) 発明の名称 t-PA改変体
- a ... two synthetic oligonucleotides
 - b ... annealing
(2 min at 95 °C, then 3 min at 36 °C)
 - c ... complementary chain synthesis
(1 min at 70 °C)
 - d ... digestion
 - e ... dephosphorylation
 - f ... ligation

(57) Abstract

A tissue plasminogen activator (t-PA) modification prepared by inserting a spacer comprising an oligopeptide composed of several to tens of amino acid residues into a single-strand cleavage site of t-PA. When it is in the form of a single strand, it is lowly active and resistant to plasminogen activator inhibitor 1. When converted into the form of a double strand at a thrombotic part of a patient, it has an activity substantially equivalent to that of natural t-PA. Accordingly, it is remarkably excellent as a therapeutic thrombolytic agent, because it has an efficacy substantially equivalent to that of natural t-PA even in a smaller dose and has less side effects.



(57) 要約

組織プラスミノゲン活性化因子 (t-PA) の一本鎖開裂部位に数アミノ酸から数十アミノ酸のオリゴペプチドからなるスペーサーを挿入して得られる t-PA 改変体は、一本鎖の状態では活性は低く、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 に対して抵抗性を持っている。そして血栓局所で二本鎖に変換されると天然の t-PA とほぼ同等の活性を示す。従って、この t-PA 改変体は天然の t-PA と比較してより少量でほぼ同等の効果を発揮し、より副作用が少ないため、治療用血栓溶解剤として極めて有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	MW	マラウイ
AU	オーストラリア	GA	ガボン	NL	オランダ
BB	バルバドス	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BE	ベルギー	GN	ギニア	NZ	ニュージーランド
BF	ブルキナファソ	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー	PT	ポルトガル
BJ	ベナン	IE	アイルランド	RO	ルーマニア
BR	ブラジル	IT	イタリア	RU	ロシア連邦
CA	カナダ	JP	日本	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KR	大韓民国	SK	スロヴァキア共和国
CH	スイス	KZ	カザフスタン	SN	セネガル
CI	コートジボワール	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソヴィエト連邦
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TD	チャード
CS	チェコスロヴァキア	LU	ルクセンブルグ	TG	トーゴ
CZ	チェッコ共和国	MC	モナコ	UA	ウクライナ
DE	ドイツ	MG	マダガスカル	US	米国
DK	デンマーク	ML	マリ	VN	ヴェトナム
FI	フィンランド	MN	モンゴル		
ES	スペイン	MR	モーリタニア		

明 細 書

t - P A 改 変 体5 技 術 分 野

本発明は、新規な t - P A 改変体に関する。更に詳しくは、組織プラスミノゲン活性化因子（以下、t - P A）の一本鎖開裂部位に数アミノ酸から数十アミノ酸のオリゴペプチドからなるスペーサーを挿入することにより、一本鎖の状態では活性が低く、しかもプラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1（以下、P A I - 1）に対して抵抗性を有しているが、血栓局所で二本鎖に変換されると天然の t - P A と同等の活性を示すような新規な t - P A 改変体に関するものである。

15 背 景 技 術

t - P A は、血液中に存在する不活性型酵素前駆体であるプラスミノゲンを限定的加水分解することによって、活性型酵素であるプラスミンに変換する。プラスミンは、血管内に種々の原因で生じた血栓（フィブリン）を分解する。これを線溶という。

t - P A には数種の阻害因子の存在することが知られている。中でも P A I - 1 は、t - P A との反応速度が大きいこと（ $> 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ）（文献 1、2）および血管内皮細胞上や血小板中に高濃度で存在していること（文献 3）が知られており、生体内での主要な t - P A

阻害因子であると考えられる。P A I - 1 の生理的機能は、生体における線溶作用を制御することであると考えられている（文献 4）。

t - P A は他の血栓溶解剤に比べてフィブリン親和性
5 が高く、特異的にフィブリン、ひいては血栓を溶解するものとして注目されてきた。しかしながら、実際に臨床に用いられた場合、閉塞冠動脈の再開通には予想されていたよりも遙かに多量の投与量が必要であることが明らかとなった。現在、t - P A は初期ボラス投与とそれ
10 に引き続いた持続投与がなされているが、冠状動脈の再開通のためには患者あたり 1 0 0 ~ 1 5 0 mg という多量の投与が必要であるとも言われている（文献 5）。このような大量投与が必要とされる原因として、投与された t - P A が、1) 血漿中や血小板、血管内皮細胞上に高濃
15 度で存在する P A I - 1 により不活化されること（文献 6、7、8）、また、2) 肝細胞により循環血液中からクリアランスされること（文献 9）が指摘されている。

この大量投与の結果、t - P A はフィブリン親和性が高いとはいえ血液中のフィブリノーゲンをも分解してしま
20 まうため、結局全身性の出血傾向という副作用が生じてしまうことが、今もって無視できない問題となっている。

このようなことから、最近タンパク工学的手法を用いて、全身性の出血傾向の低減を目的とした t - P A 改変体の開発が試みられており、たとえばフィブリノーゲン
25 に対する作用が低い t - P A 改変体（文献 1 0）、ある

いは P A I - 1 に対して抵抗性を示す t - P A 改変体
(文献 1 1) の開発が試みられている。

発明の開示

t - P A には一本鎖と二本鎖のものが存在し、一本鎖
5 の t - P A はプラスミンによって二本鎖に変換されることが知られている。プラスミンは血栓局所に高濃度で存在しているため、一本鎖で投与された t - P A は、血栓局所で二本鎖に変換される。

本発明は、生体内での t - P A の一本鎖から二本鎖へ
10 の変換を利用することにより、一本鎖の状態では活性が低く、しかも P A I - 1 に対して抵抗性を有しているが、血栓局所で二本鎖に変換されると天然の t - P A と同等の活性を示すような、新規な t - P A 改変体を提供することを目的としている。

15 本明細書に記載の t - P A 改変体は、一本鎖として投与された場合活性が低いため、血中では副作用として考えられるフィブリノーゲンの分解が抑制され、しかも P A I - 1 による不活化を受けにくいことから、t - P A としての活性が保持された状態を保って血栓局所まで到達
20 することが予想される。一方、血栓局所で二本鎖に変換されると天然の t - P A と同等の活性を示す。従って本発明は、一本鎖として投与された場合、治療用血栓溶解剤として、天然 t - P A と比較してより少量で効果を発揮し、より副作用が少なく安全性の高い t - P A 改変
25 体を提供するものである。

図面の簡単な説明

第1図は、天然ヒトt-P AをコードするcDNA配列（白いボックス部分）を有するプラスミドpTZB-000の制限酵素地図を示す。

- 5 第2図は、一本鎖開裂部位周辺をランダムに重複したt-P Aをコードするプラスミドの構築概念図を示す。白いボックス及び斜線のボックス部分はそれぞれt-P A cDNAの一本鎖開裂部位（▽）の上流及び下流を示す。A及びBはそれぞれアミノ酸配列の258位及び3
10 53位に相当するDNA配列上に存在する制限酵素切断サイトを示す。Cはシステイン残基の位置を示す。

第3A～D図は、一本鎖開裂部位周辺をランダムに重複したt-P Aを発現するプラスミドの構築模式図を示す。

- 15 第4図は、変異或いは挿入配列を含有する合成オリゴヌクレオチドDNA配列を示す。P-Xの配列内のXおよびZは、各々4種（G, A, T, C）および2種（GとC）の混合塩基を示す。

第5図は、プラスミドpCDM8-D09～-D44
20 の重複領域の塩基配列より推定されるアミノ酸配列を示す。上部に抜き出した配列は、重複により結果として天然のt-P Aに挿入された配列を示す。

第6-(1)～(2)図は、プラスミドpCDM8-D09～-D44の構築模式図を示す。

- 25 第7-AおよびB図は、pCDM8-D1001～-

D 4 0 0 1 の構築模式図を示す。

第 8 図は、プラスミド p C D M 8 - I K G G X Q F R の構築模式図を示す。

発明を実施するための最良の形態

5 本発明者らは t - P A の一本鎖開裂部位に数アミノ酸から数十アミノ酸のオリゴペプチドからなるスペーサーを挿入することにより、一本鎖の状態では活性が低く、しかも P A I - 1 に対して抵抗性を有しているが、血栓局所で二本鎖に変換されると天然の t - P A と同等の活性を示すような新規な t - P A 改変体が得られることを
10 見出した。

すなわち本発明の対象は、

- 1) t - P A の一本鎖開裂部位に、オリゴペプチドがスペーサーとして挿入されていることを特徴とする t -
15 P A 改変体。
- 2) 形質転換された細菌、酵母または哺乳動物細胞中において、前記 1) 記載の t - P A 改変体をコードしている D N A を発現させ得る組み換え発現ベクター、
- 3) 前記 2) 記載の組み換え発現ベクターで形質転換され
20 た細菌、酵母または哺乳動物細胞、
- 4) 前記 1) 記載の t - P A 改変体を有効成分として含有することを特徴とする血栓症治療剤、
である。

前記 1) 記載の t - P A 改変体の好ましい形態としては、
25 t - P A の一本鎖開裂部位に、t - P A 及び / 又は尿由

来プラスミノーゲン活性化因子（以下、u-P A）の一本鎖開裂部位周辺部分のオリゴペプチドあるいはそれらの類似オリゴペプチドからなるスペーサーが挿入されたt-P A改変体が挙げられる。たとえば、① t-P Aの一本鎖開裂部位に、t-P Aの一本鎖開裂部位周辺の5 アミノ酸配列をランダムに重複したスペーサーが挿入されたt-P A改変体、② t-P Aの一本鎖開裂部位に、t-P A、u-P Aのいずれか或いは両者の一本鎖開裂部位周辺のアミノ酸配列からなるスペーサーが挿入された10 たt-P A改変体、③ t-P Aの一本鎖開裂部位に、8 アミノ酸I K G G X Q F R（Xは任意のアミノ酸）（アミノ酸一文字略号で表示、以下同様に記載）からなるスペーサーが挿入されたt-P A改変体が挙げられる。①の具体例としては、たとえば11個のアミノ酸からなる15 スペーサーが挿入されたD 1 1、或いは44個のアミノ酸からなるスペーサーが挿入されたD 4 4と称する改変体等が挙げられる（第5図）。②の具体例としては、スペーサーがI I G G R F KであるD 4 0 0 1と称する改変体等が挙げられる。③の具体例としては、スペーサー20 がI K G G E Q F RであるD 1 0 2 1と称する改変体等が挙げられる。

ここに言うt-P Aの一本鎖開裂部位とは、天然のt-P Aの一本鎖開裂部位である275位/276位を指す。また、u-P Aの一本鎖開裂部位とは、プロu-P A（一本鎖）のu-P A（二本鎖）への開裂部位である25

1 5 8 位 / 1 5 9 位を指す。

また、本発明でいうスペーサーとは、数アミノ酸から数十アミノ酸からなるオリゴペプチドであって、t-P Aが二本鎖に開裂する際に、切れて除かれ得るものを
5 指す。

本発明のt-P A改変体の調製は、例えば①t-P Aの一本鎖開裂部位周辺のアミノ酸配列を、該部位をコードする遺伝子或いはcDNAを用いて重複させるか、②t-P A及び/又はu-P Aの一本鎖開裂部位周辺のア
10 ミノ酸配列あるいはそれらの類似配列をコードする遺伝子、cDNA、あるいは合成オリゴヌクレオチドをt-P Aの一本鎖開裂部位をコードする遺伝子あるいはcDNA中に挿入することにより、行うことができる。目的とするアミノ酸配列が挿入されたt-P A改変体をコー
15 ドするcDNAは、適当なプラスミド又は発現ベクターと連結してこれを宿主内に導入し、本発明の最終目的物質の発現及び生産のために利用される。

以下、その詳細について述べる。

本発明のt-P A改変体の製造には、通常天然のt-P AをコードするcDNAを用いることができる。天然
20 t-P AをコードするcDNAは、たとえばボーズメラノーマ細胞からのクローニングによって、たとえば文献12に記載されているように既に取得されており、従ってそのcDNA配列、アミノ酸配列も知られている。そ
25 の他、天然t-P Aを改変すべく例えば半減期を長くし

た改変 t - P A (文 献 1 3 、 1 4 等) の c D N A 配 列 、
アミノ酸配列も知られており、これらも用いることができ
る。

本発明において、一本鎖開裂部位にスペーサー配列を
5 挿入する操作等のために都合の良い適当な制限酵素認識
部位を作製する手法の一つとして、ゾラー及びスミスら
による部位特異的突然変異誘発 (Sitedirected mutagen-
esis) (文 献 1 5) が有効に利用される。

これにより、例えば、 t - P A c D N A の 任 意 の 位 置
10 に 任 意 の 制 限 酵 素 切 断 サ イ ト を 導 入 す る こ と が で き る 。
即ち、天然の t - P A のアミノ酸配列をコードする c D
N A を M 1 3 系 の フェージベクターに組み込み、その結
果得られる二本鎖形 M 1 3 D N A で 形 質 転 換 し た 大 腸 菌
の培養液から一本鎖形 M 1 3 D N A を 調 製 し 、 こ れ に 任
15 意 の 制 限 酵 素 切 断 サ イ ト を 有 す る 変 異 誘 発 用 の 合 成 オ リ
ゴヌクレオチドをプライマーとしてアニーリング後相補
鎖合成反応を行い変異を誘発させればよい。このような、
部位特異的突然変異誘発システムとして、例えば、宝酒
造(株)の MutanTM-G を用いて行うことができる。

20 部位特異的突然変異誘発のもう一つの方法としてポリ
メラーゼ・チェイン・リアクション (P C R) 法 を 利 用
した変異誘発法が挙げられる (文 献 1 6) 。 即 ち 、 天 然
の t - P A のアミノ酸配列をコードする c D N A を 鋳 型
として、変異誘発用の 2 種 の 合 成 オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド を
25 プライマーとして Taqポリメラーゼを用いた P C R 法 に

よりDNA増幅装置を用いてインビトロで変異DNA断片を増幅することができる。

5 スペーサー配列に合成オリゴヌクレオチドを使用する場合、オリゴヌクレオチドのホスホアミダイト法による合成は、文献17に示される原理によりアプライドバイオシステムズ社のモデル381A DNAシンセサイザーを用いて行うことができる。また、精製は同社のオリゴヌクレオチド精製用OPCカートリッジを用いて行うことができる。

10 目的とする変異、並びに重複或いは挿入されたDNA配列を確認するためには、文献18に示されるジデオキシ法に従いDNA塩基配列の決定を行うことができる。

t-P Aの一本鎖開裂部位周辺のアミノ酸配列を重複したり該部位にt-P A或いはu-P A由来のアミノ酸
15 配列を挿入するためには、それらのアミノ酸配列をコードする遺伝子、cDNA、或いは合成オリゴヌクレオチドを用いて、実施例に記載されているような制限酵素によるDNAの切断、欠失、それらにより生ずるDNA断片のアガロース又はポリアクリルアミドゲル電気泳動に
20 による分離、回収、或いは連結等の遺伝子操作を利用して行うことができるが、それらの個々の技術については殆どが公知であり、主として文献19が参照される。

上記の操作により得られるスペーサー配列を有するt-P A cDNA領域を含む二本鎖形M13 DNAからt
25 -P A cDNA部分を切り出しプラスミド或いは発現ベ

クターと連結するのも、文献 19 に従って行うことができる。

またその様にして得られる発現プラスミドを用い適当な宿主を形質転換するには、電気パルス法（文献 20）
5 或いはチェーン-オカヤマ法（文献 21）を用いることができる。

形質転換された細胞の培養上清は、適当な希釈によりそのまま t-P A の活性測定に使用され得る程度の t-P A を含んでいる。

10 生産のための各過程で用いられる各種ベクター DNA（あるいはプラスミド DNA）及びそれらの宿主となる大腸菌株や動物細胞株の入手は特に記載のない限り既に広く普及しており入手は容易であり、例えばベクター DNA 及び大腸菌株は宝酒造(株)又は東洋紡績(株)より、又動物細胞株は大日本製薬(株)より容易に入手可能である。
15

本明細書の実施例で示した、発現ベクター CDM 8 (ori⁻) は原核性および真核性生物の宿主細胞内で用いることのできるシャトルベクターである。このベクターの使用に適した宿主原核性生物としては大腸菌 MC 1
20 061 / p 3（文献 22）をはじめとした宿主細胞内にサプレッサー (supF) で復帰される様なアンバー変異を含むマーカ-遺伝子を有する微生物株が有効である。

また真核性の宿主細胞として有用なものには COS-1, COS-7, COPS, WOP およびチャイニーズ
25 ・ハムスター・卵巣 (CHO) セルライン等の動物培養

細胞株が含まれる。

培養上清中に産生された t-P A 改変体は、亜鉛キレートアガロース、コンカナバリン A アガロース、セファデックス G-150 アガロース等を用いる公知の方法

5 (文献 23) 等によって、容易に精製することができる。

この様にして得られた本発明の t-P A 改変体は、常法により容器に必要量分注し、凍結乾燥を行うことにより製剤として極めて容易に得ることができる。この凍結乾燥品は、製剤学的に容認されるキャリアー物質、例えば生理食塩水に溶解し、静脈内又は動脈又は心臓内への注射によって投与される。投与方法は、持続静注あるいは投与予定量の一部を最初に静注し残りを持続静注する等の方法で行われる。

次に、本発明の一例として以下に実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

〔実施例〕

1. t-P A c D N A 領域をカセット化するためのプラスミド p T Z B - 0 0 0 の構築

ヒト t-P A の c D N A をプラスミド p T Z B (後述) に組み込むことによりプラスミド p T Z B - 0 0 0 を得た。

プラスミド p T Z B (文献 24) は市販プラスミド p T Z 18 R (東洋紡績(株)製) の B a m H I 以外のマルチクローニングサイト部分を全て除去して調製したプラスミドであり、プラスミド p T Z B - 0 0 0 (文献 24)

は p T Z B の BamH I サイトに t - P A 翻訳領域を完全に含む BamH I フラグメント (BamH I カセット) を挿入して調製した (第 1 図 (文献 2 4) 参照) 。

2. 一本鎖開裂部位 (2 7 5 / 2 7 6 位) 周辺をランダムに重複した t - P A をコードするプラスミドからなるランダム重複クローンバンクの構築

ここで以下に述べる内容の理解を容易にするために、本構築法の概念図を第 2 図に示す。図中には t - P A の一本鎖開裂部位 (2 7 5 / 2 7 6 位 : ▽ で示した位置) 周辺をコードする c D N A 領域を示している。 A および B はそれぞれ一本鎖開裂部位の上流側および下流側に部位特異的突然変異誘発により導入された制限酵素切断サイトを表す。一本鎖開裂部位 (2 7 5 / 2 7 6 位) 周辺をランダムに重複するためには、一本鎖開裂部位の上流側または下流側から一本鎖開裂部位までは削らないように様々な長さに欠失させた後、制限酵素 A または B で切断し 2 種の欠失フラグメント A および B を得る。得られた両フラグメントを、制限酵素 A および B で消化した t - P A の発現が可能なプラスミドと三者でライゲートすることにより、サイト A と B に挟まれた領域でランダムに重複した t - P A をコードするプラスミドが得られる。このようなプラスミドより生産される t - P A はプラスミンにより切断を受けると天然と同一の配列をもつ二本鎖形分子と成り得る。

25 A. プラスミド p U C E E (A N) および p U C E E

(AN) r の構築

天然の t-PAC DNA 上には前述の制限酵素切断サイト A および B として適当なものが見当たらないため、サイト A として Aat II サイト、サイト B として Nsp7
5 5 2 4 V サイト (以下、単に NspV サイトと記す) を合成オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的突然変異誘発により cDNA 上に導入した。これらの変異は共にアミノ酸を変化させない同義的塩基置換である。その構築模式図を第 3-A 図に示す。

10 部位特異的突然変異誘発のための鋳型として一本鎖形 M13 tv19EE を文献 24 に記載の方法に従って得た。この M13 tv19EE は t-PAC のアミノ酸 205 から 362 番目に対するコドンを含んでいる。

M13 tv19EE (AN) は一本鎖形 M13 tv1
15 9EE を鋳型として、第 4 図に示した合成オリゴヌクレオチド P-Aat II および P-NspV とアニールさせ、既述の MutanTM-G システムを用いて得られた。これらの合成オリゴヌクレオチドは先に記載した方法と同様の方法により合成・精製して得られた。この M13 tv1
20 9EE (AN) を EcoRI で消化したものと市販のプラスミド pUC118 を EcoRI で消化し 5' 末端を脱リン酸化したものとをライゲートさせ、大腸菌 JM109 株を形質転換して EcoRI-EcoRI (AN) フラグメントが互いに異なる方向に挿入されたプラスミド pUC
25 EE (AN) および pUCEE (AN) r を得た。pU

C E E (A N) は挿入 t - P A c D N A 配列の下流側に p U C 系ベクターのマルチクローニングサイト内の X b a I および P s t I サイトを、一方 p U C E E (A N) r は c D N A 配列の上流側に両サイトを有している。

5 B. 欠失フラグメント A および N の調製 (第 3 - B 図)

プラスミド p U C E E (A N) 或いは p U C E E (A N) r を X b a I および P s t I サイトで切断後、Exo-nuclease III および Mung bean nuclease と様々な時間反
10 応させることにより、それぞれ一本鎖開裂部位の下流側
或いは上流側から様々な長さに欠失させることができる。
この際 D N A の欠失は、アミノ酸配列における一本鎖開
裂部位を残すような範囲で行った (第 2 図参照)。その
後図中に示されるように A a t II 或いは N s p V で切断し
15 て生ずるランダムな欠失フラグメント A および N をポリ
アクリルアミドゲルより標準的手法により単離した。

C. プラスミド p E U K C - 0 0 0 (A N · T G A)
の構築

上述の方法で得られた両欠失フラグメントを完全長の
20 t - P A c D N A を有する発現プラスミドの相当領域と
乗せ換えることにより、一本鎖開裂部位周辺がランダム
に重複した t - P A をコードする発現プラスミドが得ら
れる。この際、乗せ換えに用いる発現プラスミドの乗せ
換え領域内に部位特異的突然変異誘発により翻訳終止コ
25 ドンを導入することにより、発現プラスミド由来のフラ

グメントが復帰したものは活性を発現し得ないので、乗せ換えの後発現させた時に活性を有するものだけを選択すれば欠失フラグメントが乗せ換わったもののみをスクリーニングすることができる。

- 5 第3-C図に翻訳終止コドン(TGA)が導入された発現プラスミドpEUKC-000(AN・TGA)の構築模式図を示す。先ず、翻訳終止コドン(TGA)を部位特異的突然変異誘発により導入するため、鑄型として既述のM13tv19EE(AN)の一本鎖形を用いた。

M13tv19EE(AN・TGA)は、一本鎖形M13tv19EE(AN)を鑄型として、第4図に示した合成オリゴヌクレオチドP-TGAとアニールさせ、既述のMutanTM-Gシステムを用いて得られた。このM13tv19EE(AN・TGA)をEcoRIで消化したものとpTZB-000△EE(後述)をEcoRIで消化して脱リン酸化処理したものとをライゲートさせ、pTZB-000(AN・TGA)を得た。pTZB-000△EEは既述のpTZB-000をEcoRIで消化後セルフライゲートさせることによりt-PAのアミノ酸205から362番目に対するコドンを含むEcoRI-EcoRI領域を欠失させたものである。

発現ベクターとしては市販のプラスミドpEUK-1(東洋紡績(株)製)を用いた。このベクターはCOS細胞内で真核細胞の遺伝子を高発現させるのに適している。

しかしながら、このベクターは以後の乗せ換えの際に不都合となる Aat II サイトを元来一ヶ所所有しているので、先ず Aat II で消化後 DNA ポリメラーゼ I (Klenow フラグメント) で末端を平滑化しセルフライゲートし、大腸菌 JM109 株を形質転換することにより Aat II サイトの消失したプラスミド pEUK-C1 (A⁻) を得た。このプラスミドを BamHI で消化後脱リン酸化処理したものと既述の pTZB-000 (AN·TGA) を BamHI で消化したものとをライゲートさせ、大腸菌 JM109 株を形質転換して pEUKC-000 (AN·TGA) を得た。

D. ランダム重複クローンバンクの構築 (第 3-D 図)

ランダム重複クローンバンクは先に記述した 2 種の欠失フラグメント A および N と pEUKC-000 (AN·TGA) を Aat II および NspV で消化し脱リン酸化処理したものとを三者でライゲートさせ、大腸菌 JM109 株を形質転換することにより得られた。約 1800 個の形質転換体を得られた。それらを LB-寒天プレート上にプレート 1 枚あたり縦横それぞれ 8 個ずつ (64 個/プレート) 配置したものをマスタープレートとした。

3. 活性ポジティブクローンのスクリーニング

先ず二本鎖で活性を有する重複クローンのスクリーニングを行った。上述のランダムクローンの内 704 クローンを任意に選びスクリーニングに用いた。スクリーニ

ングを効率的に行うため、先ず一次スクリーニングとして8クローンずつを一纏めにして、その8個の中に活性を有するクローンが含まれているかどうかを調べた。予備検討により8個一纏めにしてもその中に一つでも活性を有するクローンが含まれていれば以下のアッセイで検出可能であることを確認した。

先ず8クローンずつ菌体培養液を一纏めにしてそこから調製した混合DNAをCOS-7細胞の形質転換に用いた。即ち、各マスタープレートの縦8個或いは横8個のクローンの培養液を一纏めにしたものを一つの群とし（従ってプレートあたり縦横計16個）、その混合培養液より通常のアルカリ法により8クローンの混合DNAを調製した。

これら混合DNAを用いて既述のチェン-オカヤマ法によりCOS-7細胞を形質転換した。この際形質転換は24穴マルチタイタープレートを用いたスモールスケールで行った。

活性は文献25に記載のフィブリンオーバーレイアッセイ法を応用した方法により調べられた。

即ち、ウェル内の形質転換された細胞の上に血清（FCS）10%を添加したDMEM培地、寒天、プラスミノゲン、フィブリノーゲン、およびトロンビンの混合液をかけてフィブリン固相を形成させCO₂インキュベーター内でインキュベートした。血清の存在により細胞から分泌されるt-PAはある程度二本鎖化することが

分かっている。704クローン（従って計176群）に関してこのアッセイを行った結果、35群に活性が検出された。

次に二次スクリーニングとして、マスタープレート上で縦の群でも横の群でも活性が検出されたクローンおよび縦横のいずれかしか活性が検出されなかったクローン計66クローンに関して先と同様な方法を用いて各クローンよりDNAを調製し、COS-7細胞の形質転換およびアッセイを行った。その結果、22個の活性ポジティブクローンが選出された。フィブリン溶解の程度はクローン間で様々であった。

4. 活性を有する重複クローンの重複領域の塩基配列の決定

フィブリン溶解活性が検出された22個のクローンに関して重複領域の塩基配列を既述のジデオキシ法により決定した。異なる7種の重複配列を有するクローンが含まれていた。それら7種の重複領域の塩基配列およびそこから推定されるアミノ酸配列を第5図に示す。それぞれのクローンをpEUKC-D09, -D11, -D(1+11), -D14, -D28, -D30, および-D44と命名した。

5. プラスミドpCDM8-D09, -D11, -D(1+11), -D14, -D28, -D30, および-D44の構築（第6図）

以後の活性測定に必要な量のt-PA改変体を生産さ

せるために、上記7種のクローンの重複領域を含むcDNA領域をpEUK-C1からより高発現ベクターのCDM8 (ori⁻) に乗せ換えた。

A. pCDM8-000の構築

- 5 乗せ換えにあたり、天然のt-PAをコードするcDNAを含有するプラスミドpCDM8-000を構築した。その構築法は文献24に記載されている。

- B. プラスミドpCDM8-D09, -D11, -D(1+11), -D14, -D28, -D30, および
10 -D44の構築

- 既述のプラスミドpEUKC-D09~-D44をCsCl密度勾配遠心を用いて精製した。これらの精製プラスミドをScaIおよびEcoRIで消化し、それにより生ずる重複領域を含むDNAフラグメント(重複フラグメント)
15 ント)を標準的な手法によりポリアクリルアミドゲルよりそれぞれ単離した。同様に、既述のプラスミドpTZB-000をBglIIおよびScaIで消化し、それにより生ずる765塩基対のフラグメントBglII-ScaIを単離した。既述のプラスミドpCDM8-000を
20 ScaIおよびEcoRIで消化後、5'末端を脱リン酸化し、これと、上記7種の重複フラグメントおよびフラグメントBglII-ScaIとの三者でそれぞれライゲートさせ、これで大腸菌MC1061/p3株をそれぞれ形質転換して、目的とするt-PA改変体を高発現させる
25 ためのプラスミドpCDM8-D09, -D11, -D

(1 + 1 1), -D 1 4, -D 2 8, -D 3 0, および
-D 4 4 を得た。

6. 一本鎖開裂部位 (2 7 5 / 2 7 6 位) に t - P A 型、
u - P A 型、或いは t - P A / u - P A ハイブリッド型
5 の挿入アミノ酸配列を有する t - P A をコードするプラ
スミド p C D M 8 - D 1 0 0 1, -D 2 0 0 1, -D 3
0 0 1, -D 4 0 0 1 の構築

天然の t - P A の一本鎖開裂部位に t - P A、u - P
A のいずれか或いは両者の一本鎖開裂部位周辺のアミノ
10 酸配列に由来する 4 種の 7 アミノ酸配列、I K G G Q F
R, I K G G R F K, I I G G Q F R および I I G G R
F K の挿入を行った。

A. アミノ酸配列を挿入するためのプラスミド p C D
M 8 - 0 0 0 E P の構築 (第 7 - A 図)

- 15 4 種のアミノ酸配列を天然の t - P A の一本鎖開裂部
位に挿入するために、p C D M 8 - 0 0 0 の c D N A 上
に E c o R V および P v u I サイトを合成オリゴヌクレオチ
ドを用いた部位特異的突然変異誘発により導入した。

M 1 3 t v 1 9 E E (E P) は既述の一本鎖形 M 1 3
20 t v 1 9 E E を鋳型として、第 4 図に示した合成オリゴ
ヌクレオチド P - E c o R V および P - P v u I とアニール
させ、既述の MutanTM-G システムを用いて得られた。

この M 1 3 t v 1 9 E E (E P) を E c o R I で消化し
たものと p C D M 8 - 0 0 0 を E c o R I で消化して脱リ
25 ン酸化したものとをライゲートさせ、大腸菌 M C 1 0 6

1 / p 3 株を形質転換することにより p C D M 8 - 0 0
0 E P を得た。

B. プラスミド p C D M 8 - D 1 0 0 1, - D 2 0 0
1, - D 3 0 0 1, - D 4 0 0 1 の構築

5 t - P A および u - P A の一本鎖開裂部位周辺のアミ
ノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチド、イ〜チを合
成した。その配列は第 4 図に示す。これら 8 種の合成オ
リゴヌクレオチドを第 7 - B 図に示す様な 4 通りの組み
合わせでアニールさせた後、これらと p C D M 8 - 0 0
10 0 E P を E c o R V および P v u I で消化後 5' 末端を脱リ
ン酸化したものとをライゲートさせた。これらで大腸菌
M C 1 0 6 1 / p 3 株を形質転換して、4 種の挿入アミ
ノ酸配列、I K G G Q F R, I K G G R F K, I I G G
Q F R および I I G G R F K を有する t - P A をそれぞ
15 れコードするプラスミド p C D M 8 - D 1 0 0 1, - D
2 0 0 1, - D 3 0 0 1, - D 4 0 0 1 を得た。

7. 一本鎖開裂部位 (2 7 5 / 2 7 6 位) に 8 アミノ酸
I K G G X Q F R (X は任意のアミノ酸) の挿入配列を
有する t - P A をコードするプラスミド p C D M 8 - I
20 K G G X Q F R の構築 (第 8 図)

天然の t - P A の一本鎖開裂部位に 8 アミノ酸配列 I
K G G X Q F R (X は任意のアミノ酸) を挿入した。

X が任意のアミノ酸である様なアミノ酸配列 I K G G
X Q F R I K G G L F A D I をコードするオリゴヌクレ
25 オチドを既述の P C R 法を利用して合成した。即ち、第

4 図に示すようなオリゴヌクレオチド P - X R および 3
2 通りの混合塩基配列を有する P - X を合成した。その
後、前記オリゴヌクレオチドを既述の PCR 法を応用し
て 95 °C 2 分間 → 36 °C 3 分間 → 70 °C 1 分間反応を行
5 いアニーリングおよび相補鎖合成を行った。

上記 PCR 反応物を EcoRV および PvuI で消化し、
これと、既述の pCDM8 - 000EP を同制限酵素に
より消化後 5' 末端を脱リン酸化したものとをライゲー
トさせた。これで大腸菌 MC1061 / p3 株を形質転
10 換した。得られた形質転換体よりプラスミド DNA を調
製し、制限酵素による消化或いはジデオキシ法を用いた
塩基配列の決定によって X のアミノ酸を推定した。

その結果、X が P, E, W, S, L, I, T, M, V,
或いは A であるような 10 種のクローンが得られた。こ
15 れらのクローンをそれぞれ順に pCDM8 - D1011,
- D1021, - D1031, - D1041, - D10
51, - D1061, - D1071, - D1081, -
D1091, - および - D1101 と命名した。

8. 天然の t - PA および t - PA 変異体の COS - 1

20 細胞内での発現

上記 t - PA 変異体の中から 4 種のプラスミド - pC
DM8 - D11, pCDM8 - D44, pCDM8 - D
4001, pCDM8 - D1021 を選抜し、これらと
天然 t - PA を発現するプラスミド pCDM8 - 000
25 とを用いて既述の電気パルス法により COS - 1 細胞を

形質転換した。リジンセファロースクロマト処理した牛胎児血清 10% 及びアプロチニン 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有する DMEM 培地で 24 時間培養後、培地を無血清かつアプロチニン無含有の DMEM 培地に交換し、更に 96 時間培養を継続した。培養液を遠心後その上清を回収して t-PA 改変体 D11, D44, D4001, D1021 及び天然 t-PA を得た。このようにして得られた培養上清中に含まれる各 t-PA 改変体及び天然 t-PA は、その 90% 以上が一本鎖の状態で存在していた。この培養上清を t-PA 試料とし以後の評価系に用いた。

〔評価実施例〕

評価実施例 1. アミドリティック活性の測定

前述の t-PA 試料の一本鎖および二本鎖におけるアミドリティック活性を測定するために、発色性合成基質 S-2288 (カビ社) を用いた反応を行った。

二本鎖活性の測定のために、一本鎖 t-PA 試料をあらかじめプラスミンにより二本鎖化したものを用いた。二本鎖化処理は、0.75 nM に希釈された t-PA 試料を用い、最終的に 0.68 nM の t-PA に対し 10 nM のプラスミンを添加し 37°C で 30 分間インキュベートすることにより行った。その後、プラスミン処理あるいは未処理の t-PA 試料を 50 ng/ml に希釈したもの 20 μl を反応混合液 (S-2288 130 μM 、アプロチニン 500 nM (0.09% (v/v)) Tween 80 および 4.5 mg/ml ゼラチン含有 0.14 M トリス塩酸 pH7.8 溶液)]

200 μ l と混合し、37°Cで19時間加温後、プレートリーダーを用いて405nmにおける吸光 (OD_{405})を測定し、その吸光値をアミドリティック活性値とした。

第1表に各t-PA試料の一本鎖(プラスミン0nM)および二本鎖(プラスミン10nM)におけるアミドリティック活性値および二本鎖/一本鎖値を示す。

第1表

10	試料	プラスミン(nM)		二本鎖/一本鎖
		0	10	
	天然	0.117	0.560	4.79 (1.00)
	D11	0.060	0.522	8.70 (1.82)
	D44	0.063	0.537	8.52 (1.78)
	D4001	0.060	0.467	7.78 (1.62)
15	D1021	0.067	0.505	7.54 (1.57)

・各値はOD値を示す。

・()内は天然の二本鎖/一本鎖を1.00とした場合の各倍率を示す。

評価実施例2. PAI-1抵抗性の評価

t-PA試料の一本鎖あるいは二本鎖でのPAI-1抵抗性は、文献11に示される方法に準じて行われた。

25 プラスミンによる二本鎖化処理あるいは未処理の50ng

／mlの t - P A 試料 2 0 μ l (終濃度 0.5 nM) を P A I - 1 (終濃度 1.67 nM) あるいは水 1 0 μ l と混合し、室温で 2 0 分間反応させた。その後、評価実施例 1. に記載の S - 2 2 8 8 反応混合液 2 0 0 μ l を添加し、プレートリーダーを用いて 3 7. 5 時間後の 4 0 5 nm における吸光 ($O D_{405}$) を測定し、その吸光値を活性値とした。

第 2 表に t - P A 試料の P A I - 1 無添加時の活性値に対する P A I - 1 添加時の活性値を、P A I - 1 無添加時の活性を 1 0 0 % とした時の残存活性 (%) として示す。

第 2 表

一本鎖 試料	P A I - 1 (nM)	
	0	1.67
天然	100 (0.14)	32.4
D 11	100 (0.09)	77.5
D 44	100 (0.09)	108
D 4001	100 (0.12)	97.4
D 1021	100 (0.06)	80.6

単位：%

	二本鎖 試料	P A I - 1 (nM)	
		0	1.67
5	天然	100 (0.47)	11.0
	D 11	100 (0.46)	12.6
	D 44	100 (0.40)	33.2
	D 4001	100 (0.44)	23.1
	D 1021	100 (0.43)	11.4

単位：%

10 ・ () 内は P A I - 1 無添加時の O D 値を示す。

引用文献

- 1) C. Hekman et al. : Arch. Biochem. Biophys.,
2 6 2 1 9 9 (1 9 8 8)
- 15 2) D. Collen : Thromb. Haemostasis, 5 6 4
1 5 (1 9 8 6)
- 3) Y. Sakata et al. : J. Biol. Chem. , 2 6 3
1 9 6 0 (1 9 8 8)
- 4) 治療学 2 3 5 6 9 (1 9 8 9)
- 20 5) The TIMI study group : N. Engl. J. Med. 3 2
0 6 1 8 (1 9 8 9)
- 6) J. Chmielewska et al. : Thromb. Res. 3 6
4 2 7 (1 9 8 3)
- 7) C. L. Lucore et al. : Circulation 7 7 6
25 6 0 (1 9 8 8)

- 8) J. H. Verheijen : Thromb. Haemostasis. 5 1
3 9 2 (1 9 8 4)
- 9) Fuchs et al. : Blood 6 5 5 3 9 (1 9 8
5)
- 5 10) 国際公開 No. 9 0 0 2 7 9 8
- 11) E. L. Madison et al. : Nature , 3 3 9 7 2
1 (1 9 8 9)
- 12) Pennica et al., Nature 3 0 1 2 1 4 - 2 2
1 (1 9 8 3)
- 10 13) 特表昭 6 3 - 5 0 1 3 3 5
- 14) Yoshitake S., et al Thromb. Haemostasis
6 2 5 4 2 - 5 4 3 (1 9 8 9)
- 15) M. J. Zoller et al., Methods in Enzymology
1 0 0 4 6 8 (1 9 8 3)
- 15 16) R. Higuchi et al. , Nucleic Acids Res. 1 6
7 3 5 1 (1 9 8 8)
- 17) S. L. Beaucage et al., Tetrahedron Letters
2 2 (2 0) 1 8 5 9 (1 9 8 1)
- 18) F. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA
20 7 4 5 4 6 3 (1 9 7 7)
- 19) T. Maniatis et al., Molecular Cloning, A
Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labo-
ratory (1 9 8 2)
- 20) 高山慎一郎、細胞工学 6 7 7 1 (1 9 8 7)
- 25 21) C. Chen et al., Mol. Cell. Biol. 7 2 7 4

- 5 (1 9 8 7)
- 22) B. Seed, Nature 3 2 9 8 4 0 - 8 4 2 (1
9 8 7)
- 23) D. C. Rijken et al., Biochemica Biophysica
5 Acta 5 8 0 1 4 0 - 1 5 3 (1 9 7 9)
- 24) 特願平 2 - 8 7 0 0 5 号
- 25) J. H. Kenten et al., DNA 5 2 5 7 (1 9 8
6)

産業上の利用可能性

- 10 本発明の t - P A 改変体は、t - P A の一本鎖開裂部
位にオリゴペプチドがスペーサーとして挿入されたも
のであり、かかる t - P A 改変体は天然 t - P A と比較
してより少量でほぼ同等の効果を発揮し、より副作用が
少なく安全性が高い。従って、治療用血栓溶解剤として
15 極めて有用である。

請 求 の 範 囲

1. 組織プラスミノゲン活性化因子の一本鎖開裂部位に、オリゴペプチドがスペーサーとして挿入されていることを特徴とする t - P A 改変体。
5
2. スペーサーが組織プラスミノゲン活性化因子および／または尿由来プラスミノゲン活性化因子の一本鎖開裂部位周辺部分のオリゴペプチドあるいはそれらの類似オリゴペプチドである、請求の範囲 1 記載の t
10 - P A 改変体。
3. 形質転換された細菌、酵母または哺乳動物細胞中において、請求の範囲 1 または 2 に記載の t - P A 改変体をコードしている DNA を発現させ得る組み換え発現ベクター。
15
4. 請求の範囲 3 記載の組み換え発現ベクターで形質転換された細菌、酵母または哺乳動物細胞。
5. 請求の範囲 1 または 2 に記載の t - P A 改変体を有効成分として含有することを特徴とする血栓症治療剤。

FIG.1

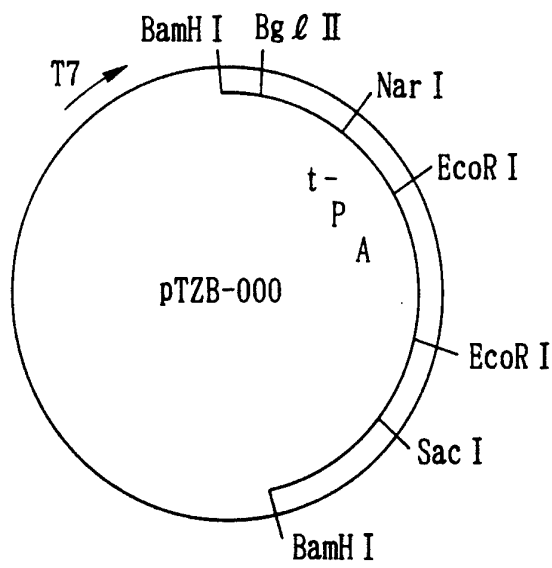


FIG.2

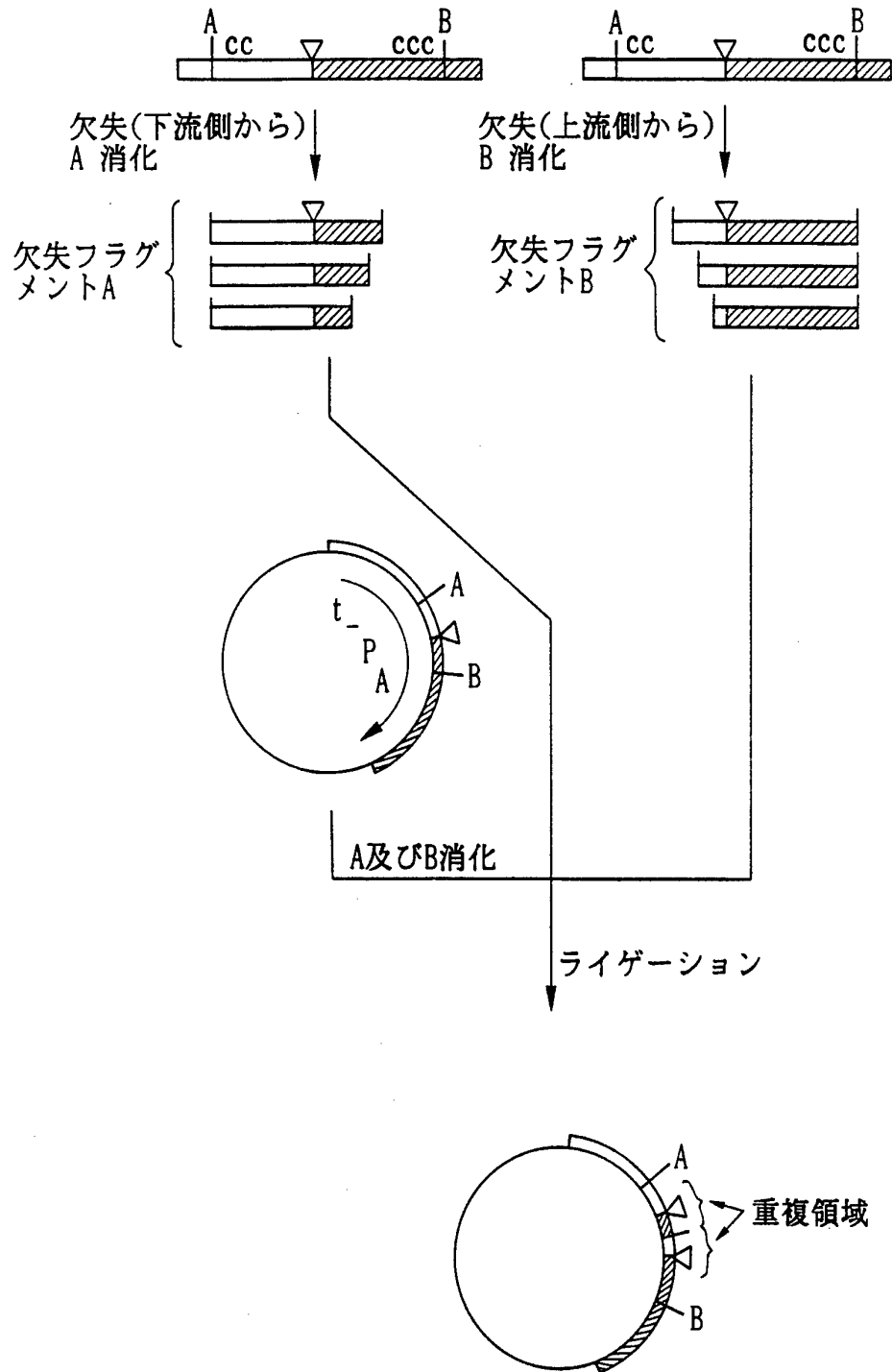


FIG.3A

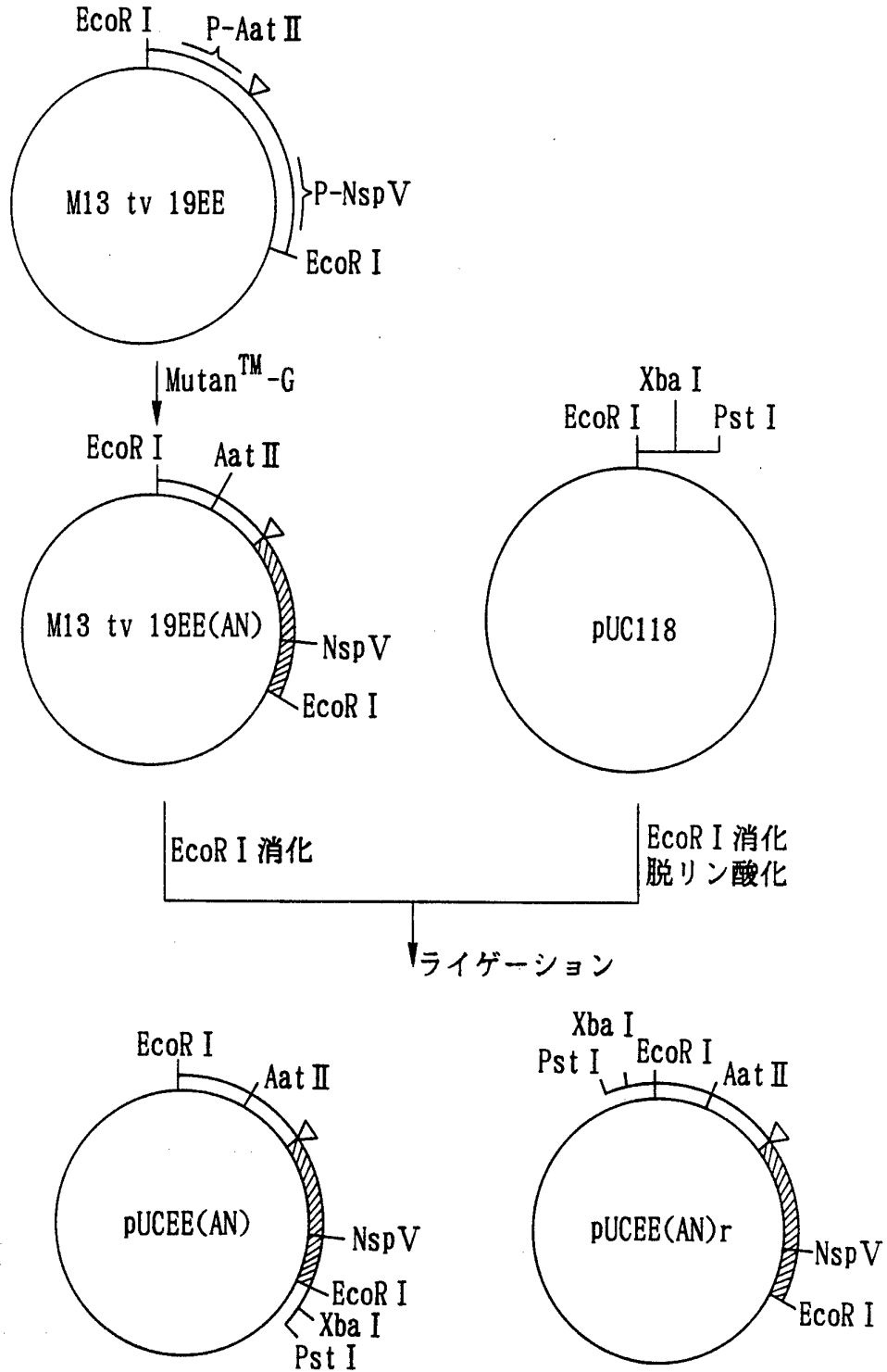


FIG.3B

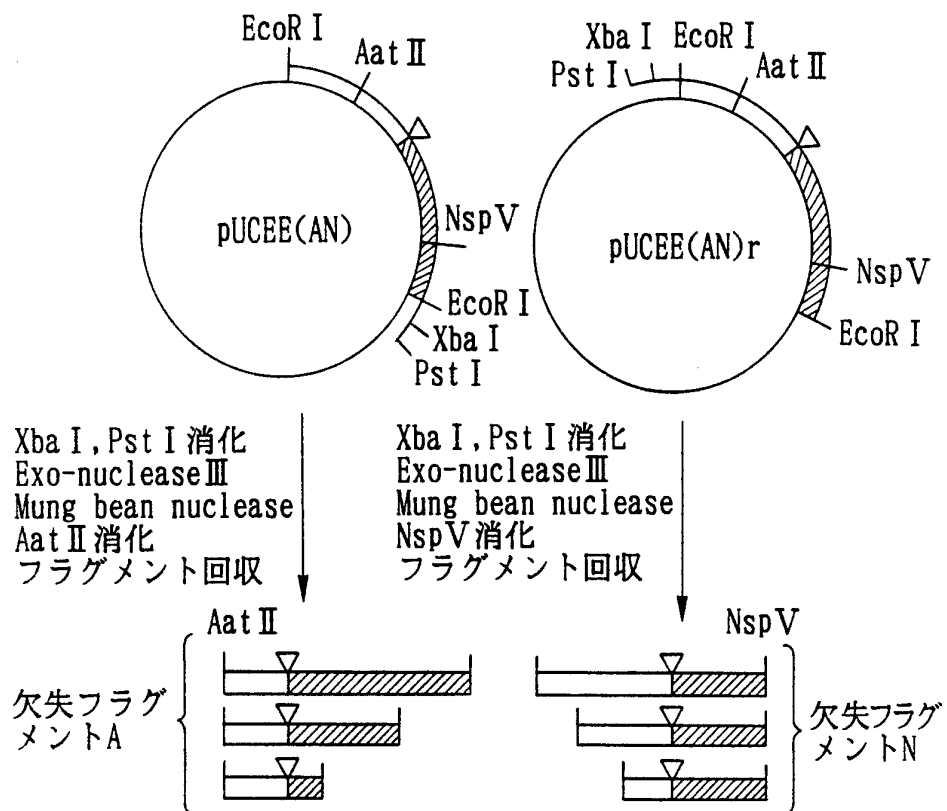


FIG.3C-1

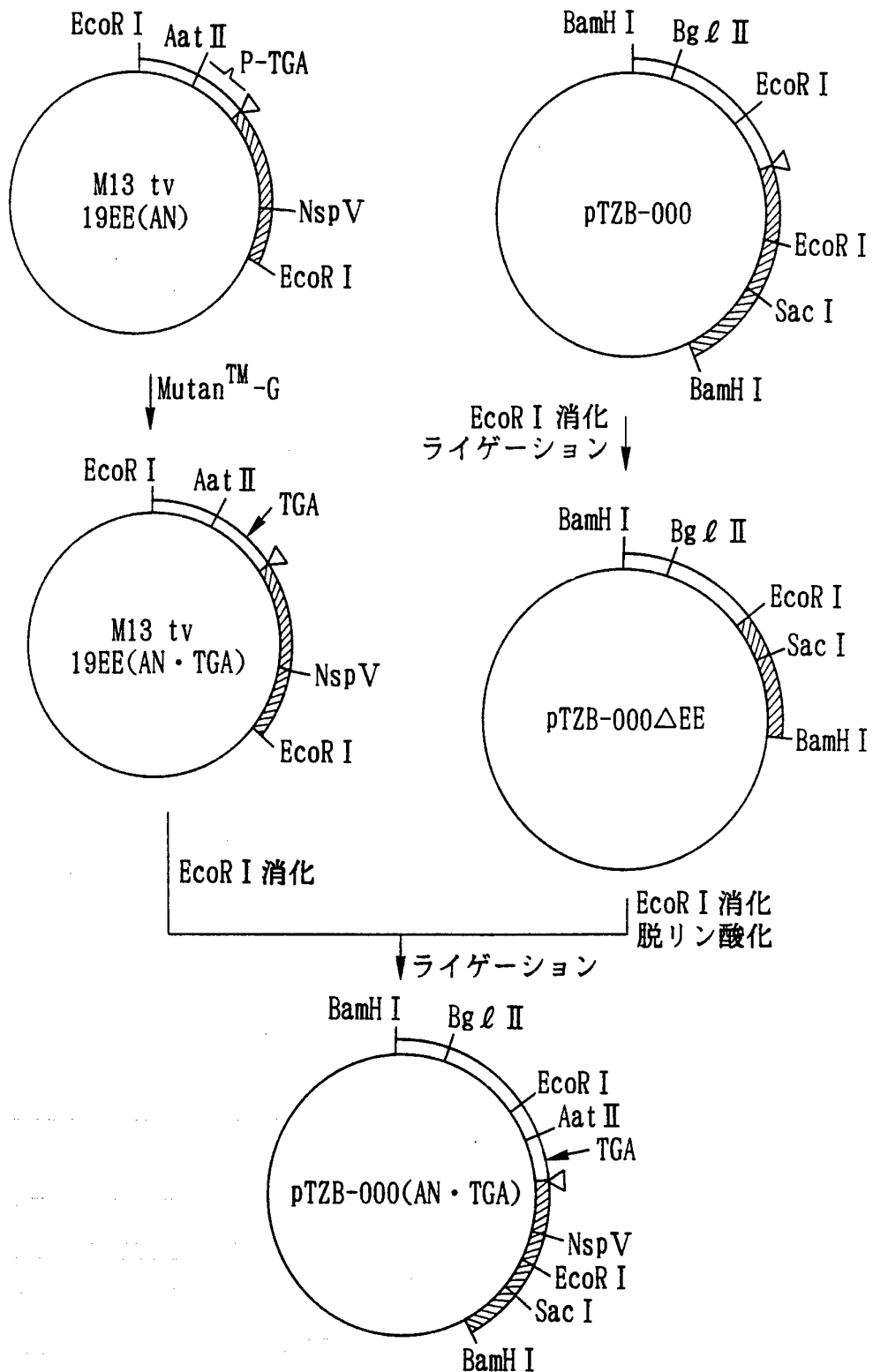


FIG.3C-2

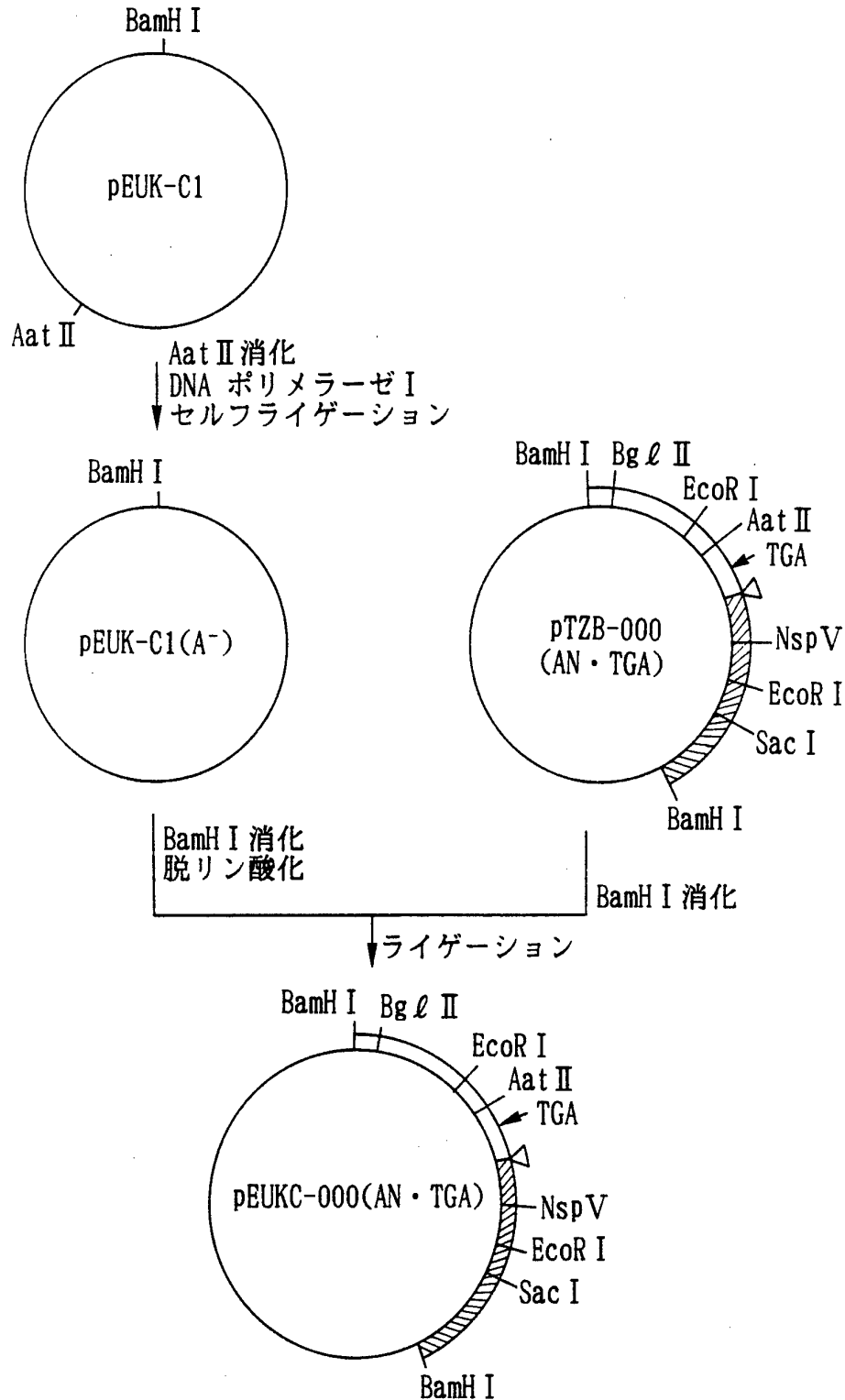
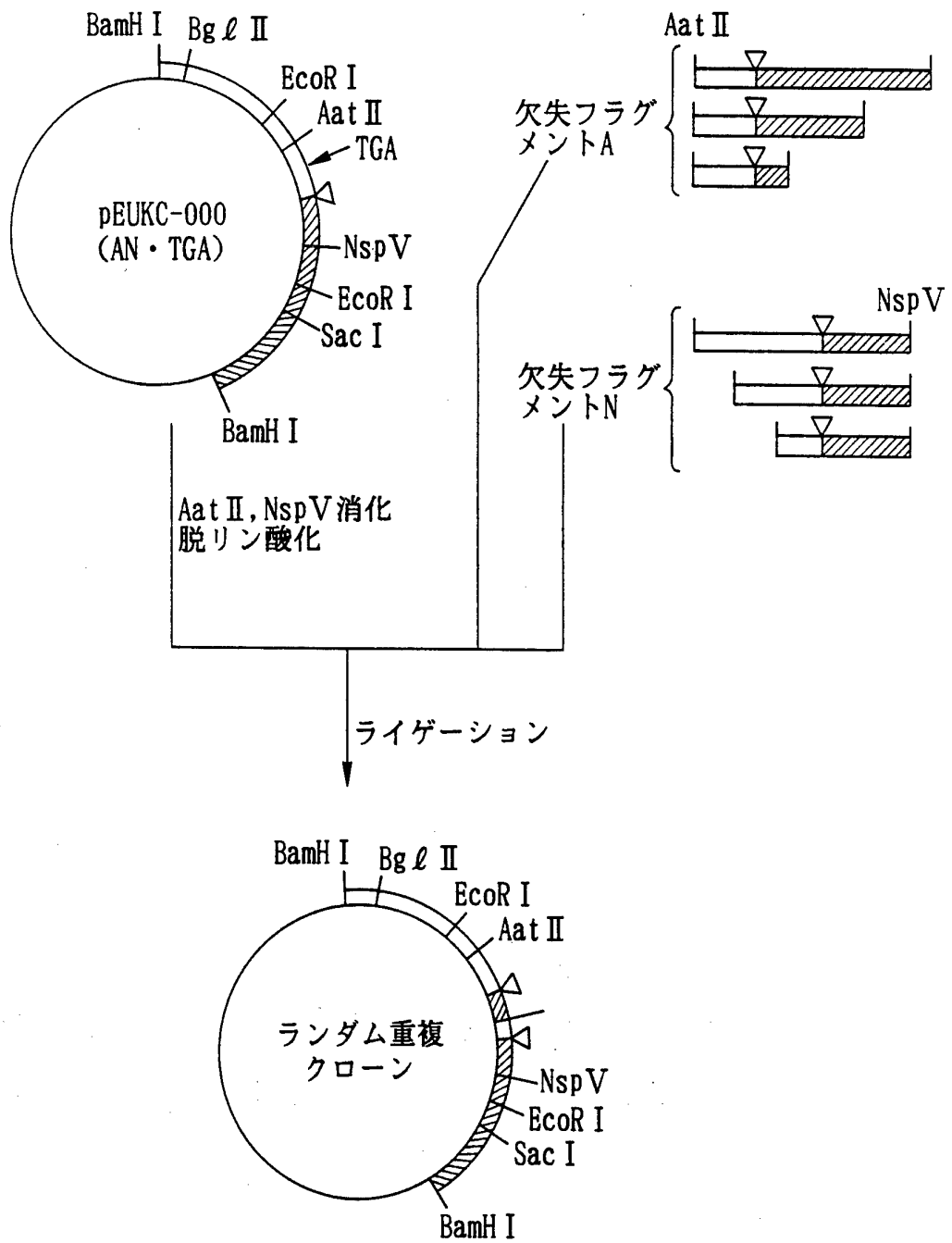


FIG.3D



8 / 14

FIG.4

- P-Aat II 5' -GGGAGTACTGTGACGTCCCCTCCTGCTCC-3'
- P-Nsp V 5' -AGGAGCAGAAATTCGAAGTCGAAAATAC-3'
- P-TGA 5' -CCTGCTCCACCTGAGGCCTGAGACAGTAC-3'
- P-EcoRV 5' -CCTCAGTTTCGGATATCAGGAGGGCTCT-3'
- P-Pvu I 5' -TCGCCGCGATCGCCTCC-3'
- イ 5' -CAAAGGAGGGCAGTTTTCGCATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGACAT-3'
- ロ 5' -GTCGGCGAAGAGCCCTCCTTTGATGCGAAACTGCCCTCCTTTG-3'
- ハ 5' -CAAAGGAGGGCGCTTTAAGATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGACAT-3'
- ニ 5' -GTCGGCGAAGAGCCCTCCTTTGATCTTAAAGCGCCCTCCTTTG-3'
- ホ 5' -CATAGGAGGGCAGTTTTCGCATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGACAT-3'
- ヘ 5' -GTCGGCGAAGAGCCCTCCTTTGATGCGAAACTGCCCTCCTATG-3'
- ト 5' -CATAGGAGGGCGCTTTAAGATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGACAT-3'
- チ 5' -GTCGGCGAAGAGCCCTCCTTTGATCTTAAAGCGCCCTCCTATG-3'
- P-X 5' -CAAAGGAGGGXXXZCAGTTTTCGCATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGACAT-3'
- P-XR 5' -GTCGGCGAAGAGCC-3'

FIG.5



FIG.6-1

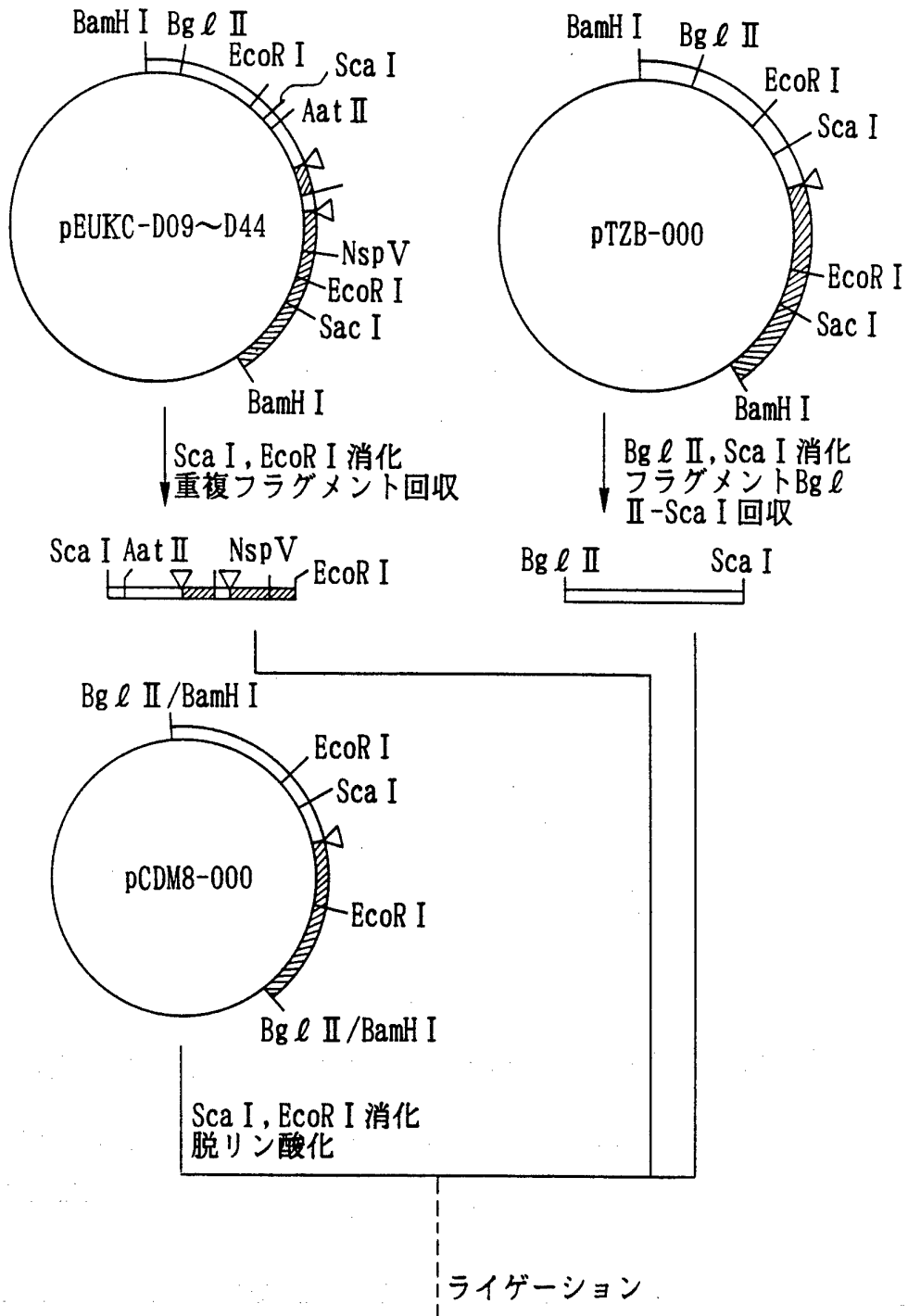


FIG.6-2

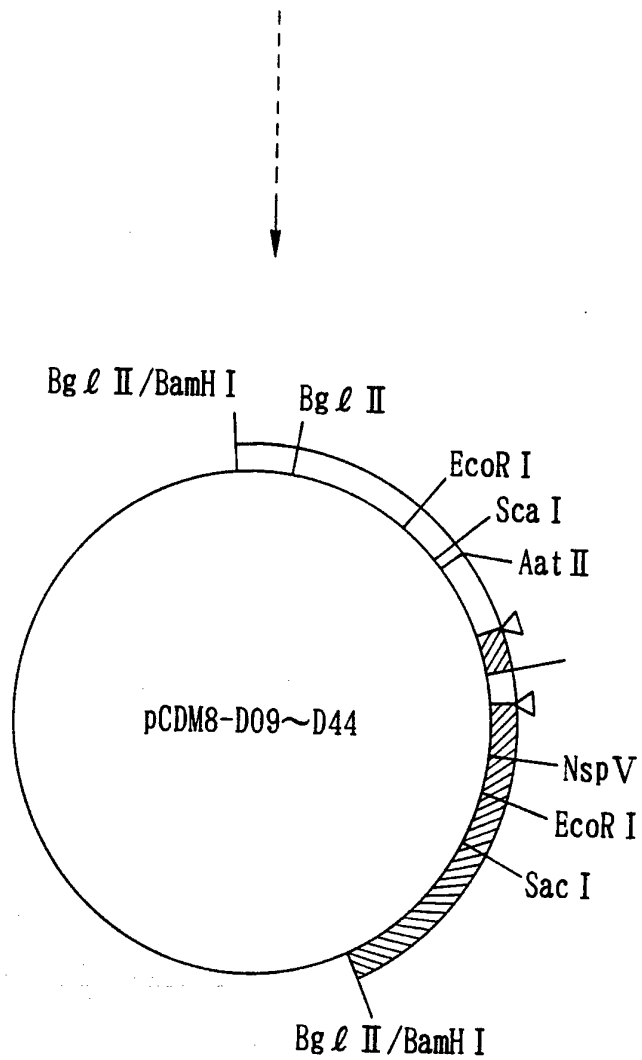


FIG.7A

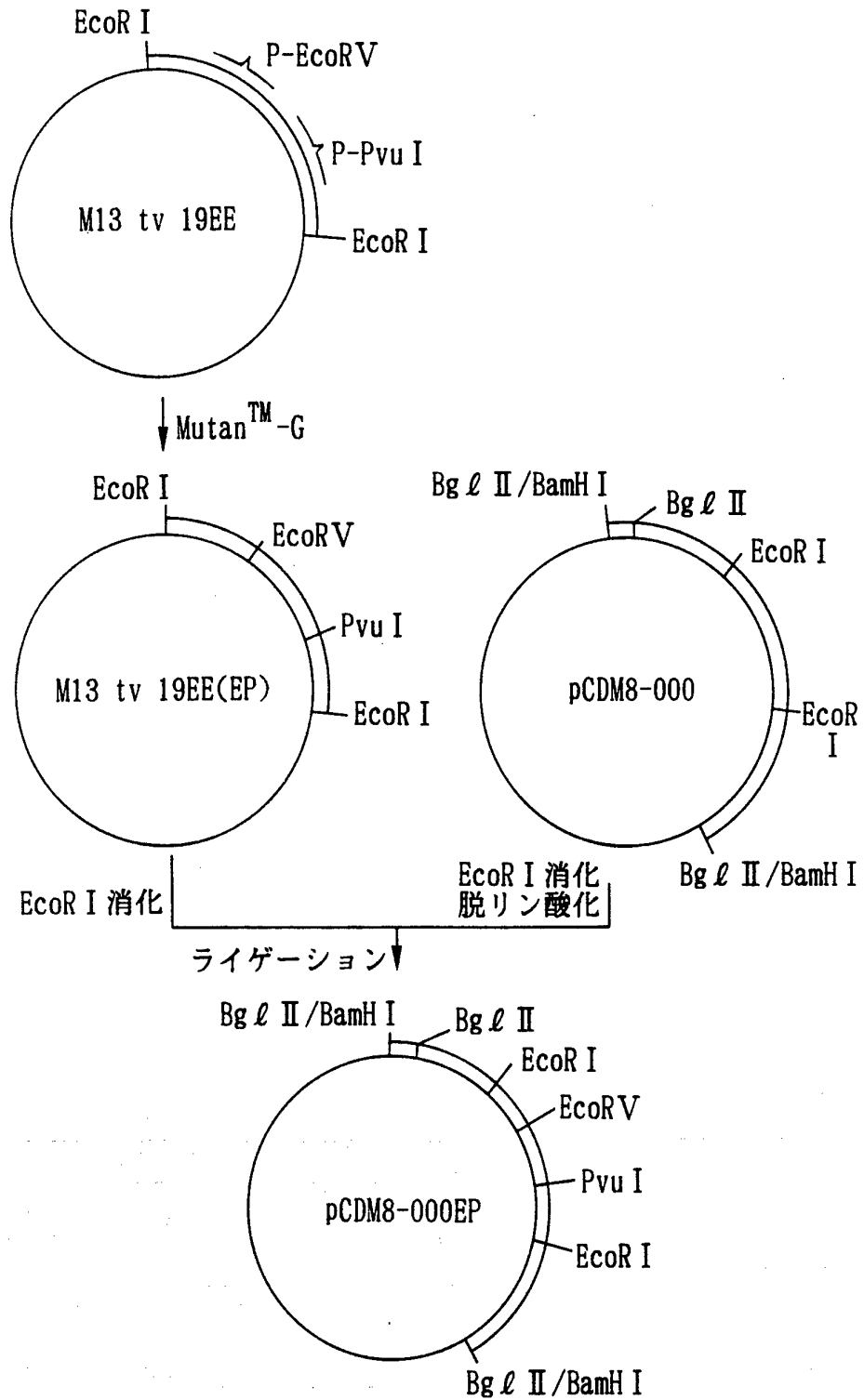


FIG. 7B

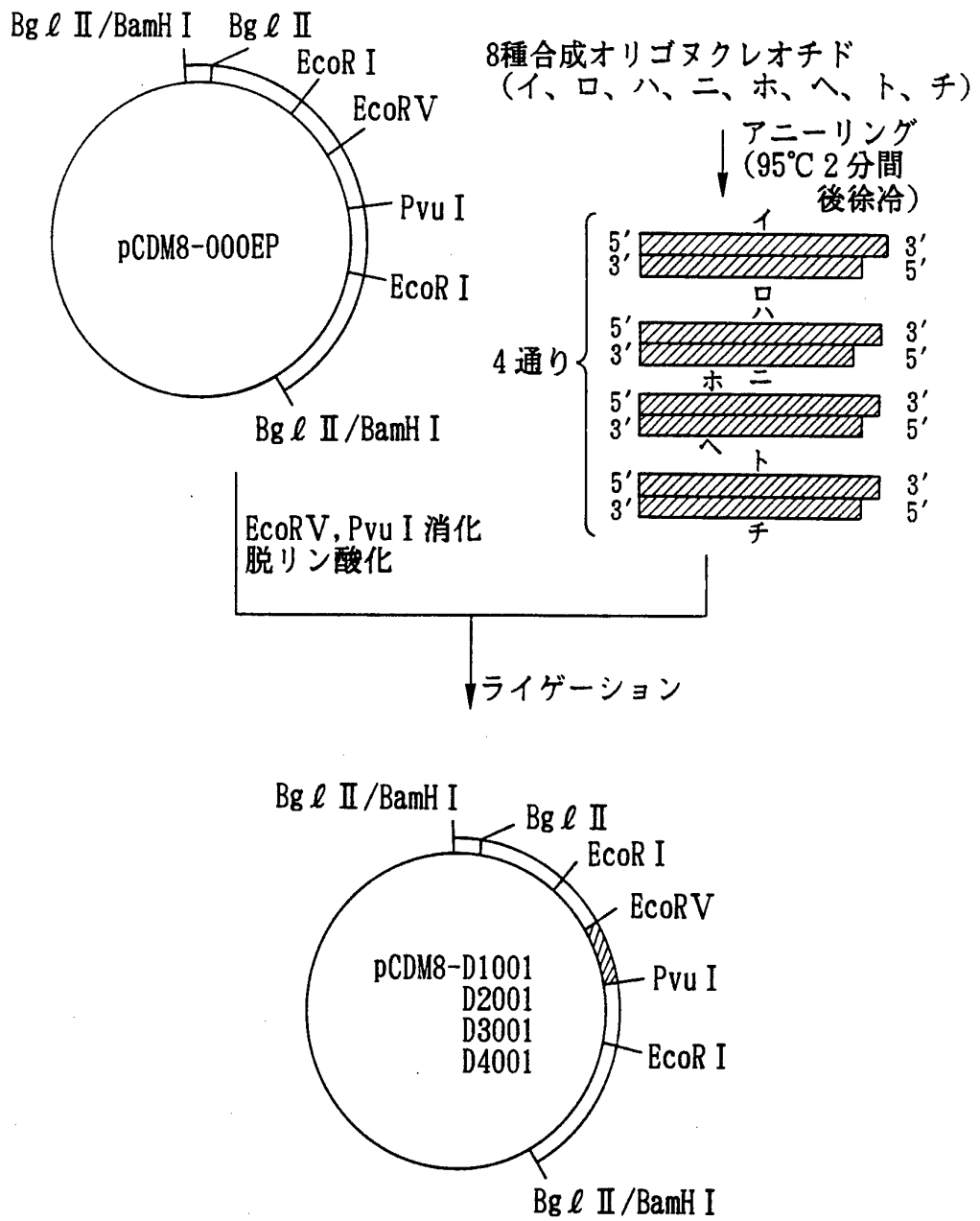
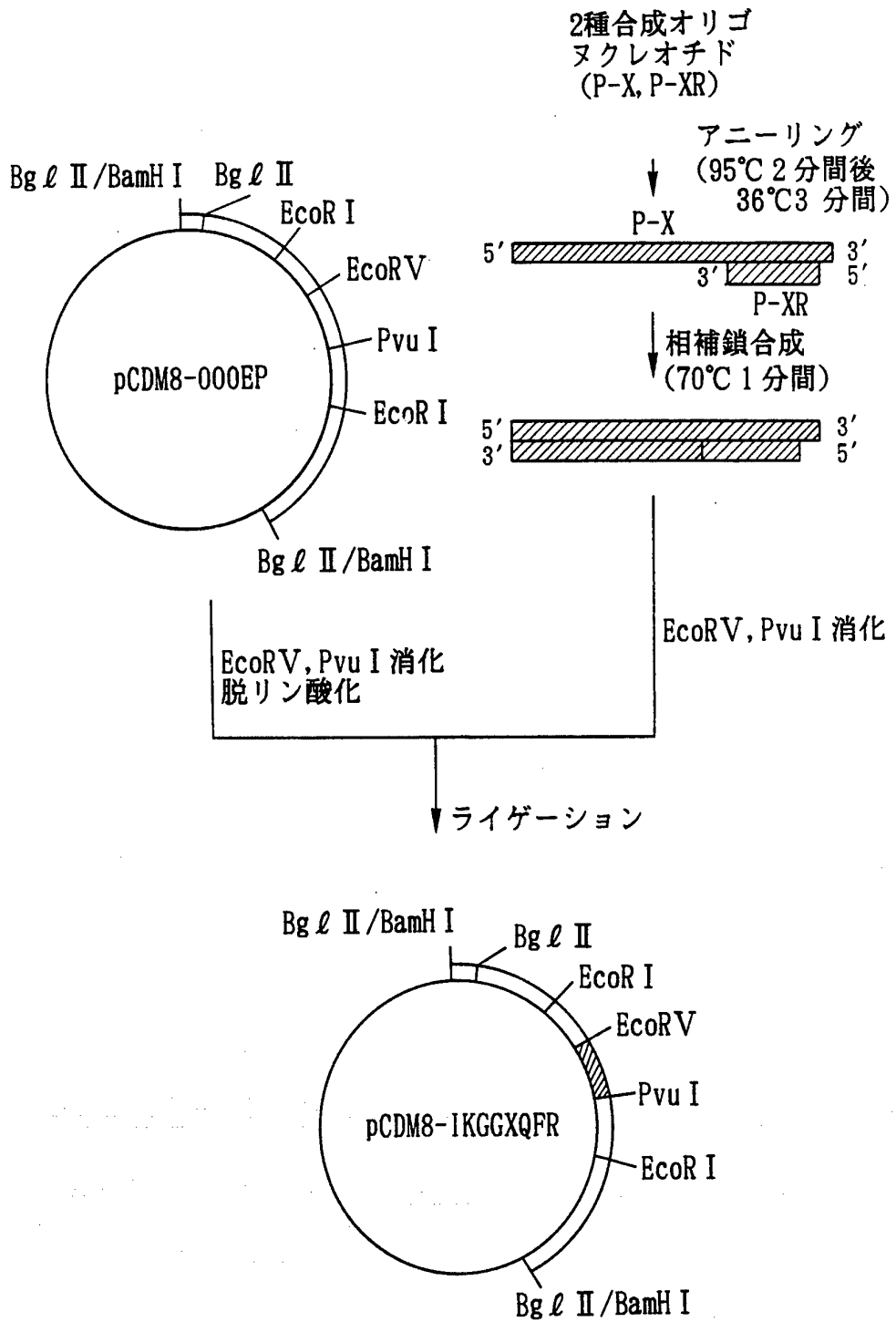


FIG.8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP92/00679

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶				
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC				
Int. Cl ⁵ C12N9/64, C12N15/58, A61K37/547				
II. FIELDS SEARCHED				
Minimum Documentation Searched ⁷				
Classification System	Classification Symbols			
IPC	C12N9/64, C12N15/00, A61K37/547			
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸				
BIOSIS DATABASE				
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹				
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³		
A	Fibrinolysis, Vol. 2 (1988), H. Pannekoek et al., "Mutants of Human Tissue - Type Plasminogen Activator (t-PA) : Structural Aspects and Functional Properties" p. 123-132	1-5		
A	Annu Rev. Pharmacol Toxicol., Vol. 30 (1990), D. H. Higgins et al., "Tissue Plasminogen Activator : The Biochemistry and Pharmacology of Variants Produced by Mutagenesis" p. 91-121	1-5		
<p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>			
IV. CERTIFICATION				
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report			
July 23, 1992 (23. 07. 92)	August 18, 1992 (18. 08. 92)			
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer			
Japanese Patent Office				

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP92/00679

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int Cl⁵ C12N9/64, C12N15/58, A61K37/547		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C12N9/64, C12N15/00, A61K37/547	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
BIOSIS DATABASE		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	Fibrinolysis, 第2巻 (1988) H. Pannekoek, et al 「Mutants of Human Tissue - Type Plasminogen Activator (t-PA) : Structural Aspects and Functional Properties」 p. 123-132	1-5
A	Annu Rev. Pharmacol Toxicol., 第30巻 (1990) D. H. Higgins, et al 「Tissue Plasminogen Activator : The Biochemistry and Pharmacology of Variants Produced by Mutagenesis」 P. 91-121	1-5
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
23.07.92	18.08.92	
国際調査機関	権限のある職員	4 B 7 8 2 3
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	平 田 和 男 