

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5855239号
(P5855239)

(45) 発行日 平成28年2月9日(2016.2.9)

(24) 登録日 平成27年12月18日(2015.12.18)

(51) Int.Cl.	F I					
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A			
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A			
C 0 7 K 14/79 (2006.01)	C 0 7 K	14/79				
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15				
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19				

請求項の数 16 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-512737 (P2014-512737)
 (86) (22) 出願日 平成25年4月23日(2013.4.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2013/062685
 (87) 国際公開番号 W02013/162050
 (87) 国際公開日 平成25年10月31日(2013.10.31)
 審査請求日 平成26年9月18日(2014.9.18)
 (31) 優先権主張番号 特願2012-98085 (P2012-98085)
 (32) 優先日 平成24年4月23日(2012.4.23)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 599012167
 株式会社N R Lファーマ
 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号
 かながわサイエンスパーク
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100147131
 弁理士 今里 崇之
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁
 (72) 発明者 佐藤 淳
 神奈川県藤沢市片瀬2-11-9
 (72) 発明者 加賀谷 伸治
 神奈川県川崎市高津区坂戸3-2-1 K
 S P 東棟

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラクトフェリン融合タンパク質及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

F c R n 結合領域を含むタンパク質又はペプチドとラクトフェリン又はラクトフェリンの生物活性断片もしくはペプチドとの融合タンパク質であって、

(L F - s - Y) n 又は (Y - s - L F) n

〔式中、L F はラクトフェリン又はラクトフェリンの生物活性断片もしくはペプチド、Y は F c R n 結合領域を含むタンパク質又はペプチド、s は 0 ~ 1 0 個の任意のアミノ酸の配列、n は 1 ~ 1 0 の整数を表す〕

で表され、Y のヒンジ領域は存在しない、融合タンパク質、又はその改変体。

【請求項2】

L F はラクトフェリンである、請求項1記載の融合タンパク質、又はその改変体。

【請求項3】

融合タンパク質が、単量体又は二量体 (n = 1 又は 2) である、請求項1又は2記載の融合タンパク質、又はその改変体。

【請求項4】

融合タンパク質が、単量体である、請求項1又は2記載の融合タンパク質、又はその改変体。

【請求項5】

融合タンパク質が、天然又は遺伝子組換え型ラクトフェリンの 5 0 % 以上の鉄キレート能を保持している、請求項1 ~ 4 のいずれか1項記載の融合タンパク質、又はその改変体

。

【請求項 6】

融合タンパク質は、ラクトフェリン受容体、IgG受容体及びアルブミン受容体からなる群より選択される少なくとも1つの受容体を介して取り込まれるものである、請求項1～5のいずれか1項記載の融合タンパク質、又はその改変体。

【請求項 7】

融合タンパク質は、天然又は遺伝子組換え型ラクトフェリンと比べてキモトリプシン耐性が向上したものである、請求項1～6のいずれか1項記載の融合タンパク質、又はその改変体。

【請求項 8】

配列番号5又は配列番号6に示すアミノ酸配列からなる請求項1記載の融合タンパク質、又はその改変体。

【請求項 9】

請求項1～8のいずれか1項記載の融合タンパク質又はその改変体をコードする核酸分子。

【請求項 10】

請求項9記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 11】

請求項10記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 12】

請求項9記載の核酸分子を含む非ヒト遺伝子組換え動物。

【請求項 13】

請求項9記載の核酸分子を含む遺伝子組換え植物。

【請求項 14】

請求項1～8のいずれか1項記載の融合タンパク質又はその改変体を含む、ラクトフェリンによって改善される疾患の治療剤。

【請求項 15】

請求項1～8のいずれか1項記載の融合タンパク質又はその改変体及び担体を含む、医薬品組成物。

【請求項 16】

請求項1～8のいずれか1項記載の融合タンパク質又はその改変体の製造方法であって、この融合タンパク質又はその改変体をコードする遺伝子を含む宿主細胞を培養して融合タンパク質を発現させ、この宿主細胞又はその培地から融合タンパク質又はその改変体を回収することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、改良された特性を有するラクトフェリン融合タンパク質、その用途及びその製造方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

ラクトフェリンは、主に哺乳動物の乳汁中に存在し、好中球、涙、唾液、鼻汁、胆汁、精液などにも見出されている、分子量約80,000の糖タンパク質である。ラクトフェリンは、鉄を結合することから、トランスフェリンファミリーに属する。ラクトフェリンの生理活性としては、抗菌作用、鉄代謝調節作用、細胞増殖活性化作用、造血作用、抗炎症作用、抗酸化作用、食作用亢進作用、抗ウイルス作用、ピフィズス菌生育促進作用、抗がん作用、がん転移阻止作用、トランスロケーション阻止作用などが知られている。さらに、最近、ラクトフェリンが脂質代謝改善作用、鎮痛・抗ストレス作用、アンチエイジング作用を有することも明らかにされている。このように、ラクトフェリンは、多様な機能

10

20

30

40

50

を示す多機能生理活性タンパク質であり、健康の回復又は増進のため、医薬品や食品などの用途に使用されることが期待されており、ラクトフェリンを含む食品は既に市販されている。

【0003】

ラクトフェリンは、経口的に摂取した場合、胃液中に存在する酸性プロテアーゼのペプシンにより加水分解を受け、ペプチドに分解されるため、ラクトフェリン分子としてはほとんど腸管まで到達することができない。しかし、ラクトフェリン受容体は消化管では小腸粘膜に存在することが知られており、最近、ラクトフェリンが腸管から体内に取り込まれて、生物活性を発現していることが明らかにされている。そのため、ラクトフェリンの持つ生物活性を發揮させるには、ラクトフェリンを胃液中でのペプシンによる加水分解を受けない状態で腸管まで到達させることが重要である。また、注射剤とした場合、キモトリプシンやエラスターゼといった組織、器官に含まれるプロテアーゼによる分解に曝されるため、体内での投与組織、器官での安定性を増加させるためには、これらのプロテアーゼに対する抵抗性を付与することが実用上重要である。

10

【0004】

IgG抗体は、生体内で新生児Fc受容体(neonatal Fc receptor; 以下「FcRn」という)を介したリサイクリング機構により分解が抑制されるため、血中半減期が長いことが知られている。また、抗体薬は、特定のタンパク質やペプチドなどに標的が限定され、作用メカニズムが限定されるため、従来の合成化合物と比べ、副作用は少ないと考えられている。

20

【0005】

IgG抗体やそのFc領域を用いた融合タンパク質を利用する生物学的製剤の概念自体は、従来知られており、例えば、腎移植後の急性拒絶反応を抑制する薬として1986年にCD3をターゲットとする抗体医薬品が承認され、長く使用されている。

【0006】

しかし、一般に融合タンパク質は、融合によって活性部位が影響を受けることにより、融合されていないタンパク質と比べ、生物活性が低減されることも頻繁に観察されている。例えば、TPOR結合擬似ペプチドは、内在性のTPOと比べ、TPORとの結合量には遜色はないが、インビトロ試験において生物活性は若干低い傾向があった。

30

【0007】

さらに、IFN- γ とFc領域とを結合してIFN- γ の血中半減期を増加させた融合タンパク質については、血中半減期は大幅に増加されたものの、IFN- γ の生理活性は低下してしまうという欠点がある。したがって、望ましい特性を備えた融合タンパク質を作製するための条件等については、タンパク質ごとに十分に検討されなければならない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2007-105044号公報

【特許文献2】特許第4234438号公報

【特許文献3】特表2011-523351号公報

【特許文献4】特表2004-521655号公報

【特許文献5】米国特許第5,723,125号公報

40

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Jazayeri, J. A. et al., *Biodrugs*, 22, 11-26 (2008)

【非特許文献2】Yeung, Y. A. et al., *J. Immunol.*, 182, 7663-7671 (2009)

【非特許文献3】Suzuki, T. et al., *J. Immunol.*, 184, 1968-1976 (2010)

50

【非特許文献4】Batra, J. K., et al., Mol Immunol., 30, 379 - 386, (1993)

【非特許文献5】Dimitrov, D. S., mAbs, 1, 26 - 28 (2009)

【非特許文献6】Gong, R. et al., J. Biol. Chem., 286, 7288 - 7293 (2011)

【発明の開示】

【0010】

本発明は、抗原性を低減し、プロテアーゼ耐性を付与し、経口、組織、器官投与を可能にし、体内寿命を延ばした、臨床的有用性の高いラクトフェリン融合タンパク質及びその製造方法等を提供することを目的とする。さらに、天然ラクトフェリンの生物活性を保持し、体内寿命が有意に延長されており、臨床的有用性が天然ラクトフェリン及び遺伝子組換え型ラクトフェリンよりも優れたラクトフェリン融合タンパク質及びその製造方法等を提供することを目的とする。

10

【0011】

本発明者らは、天然物と遜色ない高次構造を有するラクトフェリンであって、生理活性が損なわれていないうえに、長い半減期を維持するラクトフェリンを創出するべく鋭意努力し、ラクトフェリンタンパク質にFcRn結合タンパク質(Fc領域)を融合させたものを製造し、血中での安定性を調べた結果、Fc領域と融合させたラクトフェリンタンパク質は、融合をしていないもの比べて半減期が5.4倍に顕著に増大されたことを見出した。また、CDスペクトルと鉄結合能の測定の結果から、融合タンパク質において、Fc領域と融合されることによるラクトフェリン自体の立体構造の変化は見られず、熱安定性についても立体構造が少なくとも30以上、さらには65以上でも維持され、生物活性についても全く損なわれていないという全く予期しない結果であることを見出し、さらに、製造されたラクトフェリン融合タンパク質はプロテアーゼに対する抵抗性を有し、最も重要な生物活性である鉄キレート能も保存されているという結果を得、本発明を完成した。

20

【0012】

即ち、本発明は、

〔1〕 FcRn結合領域を含むタンパク質又はペプチドとラクトフェリンとの融合タンパク質であって、

30

(LF-s-Y)_n 又は (Y-s-LF)_n

〔式中、LFはラクトフェリン又はラクトフェリンの生物活性断片もしくはペプチド、YはFcRn結合領域を含むタンパク質又はペプチド、sは0~10個の任意のアミノ酸の配列、nは1~10の整数を表す〕

で表される融合タンパク質、又はその改変体；

〔2〕 FcRn結合領域を含むタンパク質又はペプチドが、IgG、IgGの重鎖、IgGの重鎖Fc領域、Fc領域のCH2ドメイン及びCH3ドメイン、Fc領域のCH2ドメイン、アルブミン又はアルブミンのFcRn結合領域のいずれかを含む、〔1〕記載の融合タンパク質、又はその改変体；

〔3〕 融合タンパク質が、単量体又は二量体(n=1又は2)である、〔1〕又は〔2〕記載の融合タンパク質、又はその改変体；

40

〔4〕 融合タンパク質が、単量体である、〔1〕又は〔2〕記載の融合タンパク質、又はその改変体、又はその改変体；

〔5〕 融合タンパク質が、天然ラクトフェリンの50%以上の鉄キレート能を保持している、〔1〕~〔4〕のいずれか1項記載の融合タンパク質、又はその改変体；

〔6〕 融合タンパク質は、ラクトフェリン受容体、または/かつIgG/アルブミン受容体を介して取り込まれるものである、〔1〕~〔5〕のいずれか1項記載の融合タンパク質、又はその改変体。

〔7〕 融合タンパク質は、天然又は遺伝子組換え型ラクトフェリンと比べてキモトリプシン耐性が向上したものである、〔1〕~〔6〕のいずれか1項記載の融合タンパク質、

50

又はその改変体。

〔 8 〕 〔 1 〕 ~ 〔 7 〕 のいずれか 1 項記載の融合タンパク質又はその改変体をコードする核酸分子；

〔 9 〕 〔 8 〕 記載の核酸分子を含む発現ベクター；

〔 10 〕 〔 9 〕 記載の発現ベクターを含む宿主細胞；

〔 11 〕 〔 8 〕 記載の核酸分子を含む非ヒト遺伝子組換え動物；

〔 12 〕 〔 8 〕 記載の核酸分子を含む遺伝子組換え植物；

〔 13 〕 〔 1 〕 ~ 〔 7 〕 のいずれか 1 項記載の融合タンパク質又はその改変体を含む、ラクトフェリンによって改善される疾患の治療剤；

〔 14 〕 〔 1 〕 ~ 〔 7 〕 のいずれか 1 項記載の融合タンパク質又はその改変体及び担体を含む、医薬品組成物；

〔 15 〕 〔 1 〕 ~ 〔 7 〕 のいずれか 1 項記載の融合タンパク質又はその改変体の製造方法であって、この融合タンパク質又はその改変体をコードする遺伝子を含む宿主細胞を培養して融合タンパク質又はその改変体を発現させ、この宿主細胞又はその培地から融合タンパク質又はその改変体を回収することを含む方法を提供する。

【 0 0 1 3 】

本発明の融合タンパク質又はその改変体（以下、「融合タンパク質等」と表記することがある）は、ラクトフェリンが有する鉄の結合能が保持されており、したがって、少なくとも鉄結合能に基づくラクトフェリンの重要な生物活性が保持されている。また、体内寿命が長く、プロテアーゼに対する抵抗性を有しているため、体内で長時間にわたって生物活性を発揮することができる。さらに、融合タンパク質にすることによって胃でのペプシンによる消化分解を受けにくくなっているため、さらなる腸溶化のための製剤的な処理を行わなくても、十分に腸内に到達しうる。

【 0 0 1 4 】

また、本発明の融合タンパク質等は、遺伝子組換えによって製造されることによって、製造管理・品質管理の点でも有利であり、医薬品成分としての使用に特に適している。即ち、本発明にしたがった融合タンパク質等及び融合タンパク質等の製造方法により、ラクトフェリンを医薬品成分としてさらに有用性の高い形とすることができる。ラクトフェリンは、安全性が非常に高く、多様な生物活性を有するので、本発明により、有効な治療薬がない疾患又は症状の治療薬又は予防薬として、さらに有利に適用が可能となる。例えば、生活習慣病（動脈硬化、高コレステロール血症、高脂血症、高血圧、糖尿病、脂肪肝など）、がん（発がん予防、がんの二次予防、転移抑制、制癌剤の作用増強など）、自己免疫疾患（シェーグレン症候群によるドライアイ及びドライマウス、リウマチ性関節炎、悪性関節リウマチ、膠原病、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、全身性紅斑性狼蒼など）、精神神経疾患（痴呆、アルツハイマー病、パーキンソン病、テンカン、うつ病、ヒキコモリ、統合失調症、各種ストレス性疾患、更年期障害など）、疼痛緩和（モルヒネ等のオピオイド増強作用、がん性疼痛、神経因性疼痛、ヘルペス後疼痛、線維筋痛症、術後疼痛、舌痛症、生理痛、歯痛、関節痛、更年期障害など）、肝炎（各種ウイルス性肝炎、非アルコール性肝炎、肝硬変など）、炎症性腸疾患（大腸性潰瘍炎、クローン病など）、過敏性腸症候群、前立腺肥大、頻尿、不眠症、便秘などへ適応を拡大できる。さらに、ラクトフェリンは、抗菌・抗ウイルス作用及び免疫能賦活作用があるので、本発明の融合タンパク質又はそれを含む医薬品組成物は、各種感染症及びそれに基づく炎症、例えば、ヘリコバクター・ピロリ菌の胃粘膜感染、歯周病、歯槽膿漏、口臭、口腔カンジダ症、口内炎、口角炎、鼻炎、食道炎、胆嚢炎、尿路感染症、膣感染症、水虫、ニキビ、ヘルペス属ウイルスの感染症、老人性肺炎、術後感染症などへの適用も可能であり、また、抗生物質の作用を増強する作用がある。一方、ラクトフェリンは免疫的な寛容をもたらす作用もあり、本発明の融合タンパク質又はそれを含む医薬品組成物は、花粉症、アトピー性皮膚炎、脂漏症、蕁麻疹等のアレルギー性疾患にも適用可能である。注目すべきことは、ラクトフェリンには鉄キレート作用に基づく強い抗酸化ストレス作用があり、本発明の融合タン

パク質又はそれを含む医薬品組成物は、ウィルソン病、劇症肝炎などや、肌や眼の抗加齢・若返り作用、加齢性黄斑変性症、糖尿病性網膜症、粘膜上皮細胞の角化抑制・若返り作用などへの適用も可能である。

また、本発明の融合タンパク質は、ラクトフェリン受容体、IgG受容体及びアルブミン受容体からなる群より選択される少なくとも1つの受容体を介して細胞に取り込まれるため、副作用が低いことが期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、全長ヒトラクトフェリン(hLF)cDNAを含むベクターpBSILfALにBamHIサイトを含有合成オリゴヌクレオチドを挿入し、pBSILfAL/BamIを作製する方法の概略を表す図である。

10

【図2】図2は、ヒトIgG1Fc領域のヒンジ、CH2、CH3のゲノム配列をもつベクターpTeuIgGの構造及びこのベクターへのhLFcDNAの挿入を表す図である。

【図3】図3は、ヒトIgG1Fc領域のCH2、CH3のcDNA配列をもつベクターpmIgGの構造及びこのベクターへのhLFcDNAの挿入を表す図である。

【図4】図4は、DG44細胞用発現ベクターpOpti-VECにベクターpBluescriptII(Stratagene社)のT7プライマー結合部位からT3プライマー結合部位までの領域を挿入し、ベクターpOpti-VEC-MCSを作製する方法の概略を表す図である。

20

【図5】図5は、ヒンジ付加型融合タンパク質d(hLF/hIgGFc)発現ベクター及びヒンジ欠損融合タンパク質hLF/mhIgGFc)発現ベクターの作製方法の概略を表す図である。pTeuIgG/hLFのhLF、ヒトIgG1Fc領域のヒンジ、CH2、CH3のゲノム配列を含有領域、又はpmIgG/hLFのヒトIgG1Fc領域のCH2、CH3のcDNA配列を含有領域をXhoI-NotI断片として切り出し、pOptiVEC-MCSのXhoI/NotIサイトにクローニングした。

【図6】図6は、ヒンジ付加型融合タンパク質d(hLF/hIgGFc)をDG44細胞に発現誘導させた際の発現量を表す図である。

【図7】図7は、ヒンジ欠損型融合タンパク質hLF/mhIgGFcをDG44細胞に発現誘導させた際の発現量を表す図である。

30

【図8】図8は、ヒンジ付加融合タンパク質d(hLF/hIgGFc)の精製を表す図である。

【図9】図9は、ヒンジ欠損型融合タンパク質hLF/mhIgGFcの精製を表す図である。

【図10】図10は、ヒンジ付加融合タンパク質d(hLF/hIgGFc)の硫酸アンモニウム沈殿による濃縮を表す図である。

【図11】図11は、ヒンジ欠損型融合タンパク質hLF/mhIgGFcの硫酸アンモニウム沈殿による濃縮を表す図である。

【図12-A】図12は、hLF、ヒンジ欠損型及びヒンジ付加hLF/hIgGFc融合タンパク質の二次構造の相同性を表す図である。パネルAはhLFのCDスペクトルを表す。

40

【図12-B】図12は、hLF、ヒンジ欠損型及びヒンジ付加hLF/hIgGFc融合タンパク質の二次構造の相同性を表す図である。パネルBはヒンジ欠損型融合タンパク質hLF/mhIgGFcのCDスペクトルを表す。

【図12-C】図12は、hLF、ヒンジ欠損型及びヒンジ付加hLF/hIgGFc融合タンパク質の二次構造の相同性を表す図である。パネルCはヒンジ付加融合タンパク質d(hLF/hIgGFc)のCDスペクトルを表す。

【図13-A】図13は、hLF、ヒンジ欠損型及びヒンジ付加hLF/hIgGFc融合タンパク質の熱安定性を表す図である。パネルAはhLFのCDスペクトルを表す。

【図13-B】図13は、hLF、ヒンジ欠損型及びヒンジ付加hLF/hIgGFc融

50

合タンパク質の熱安定性を表す図である。パネルBはヒンジ欠損型融合タンパク質h L F / m h I g G F cのC Dスペクトルを表す。

【図13 - C】図13は、h L F、ヒンジ欠損型及びヒンジ付加型h L F / h I g G F c融合タンパク質の熱安定性を表す図である。パネルCはヒンジ付加型融合タンパク質d (h L F / h I g G F c)のC Dスペクトルを表す。

【図14】図14は、ヒンジ付加h L F / h I g G F c融合タンパク質の分解を表す図である。

【図15 - A】図15 - Aは、ヒンジ付加h L F / h I g G F c融合タンパク質の37、3週間後の分解物を表す図である。

【図15 - B】図15 - Bは、ヒンジ付加h L F / h I g G F c融合タンパク質の模式図とその分解箇所を表す図である。

【図16】図16は、ヒンジ欠損型融合タンパク質h L F / m h I g G F cの血中安定性を表す図である。

【図17 - A】図17 - Aは、発現ベクターp O p t i V E C / h L F - d F cがコードするヒトラクtofエリン (h L F) / ヒトI g G F c融合タンパク質のアミノ酸配列 (配列表の配列番号5) を表す図である。二重線はスペーサーアミノ酸、斜字体はヒンジ領域のアミノ酸、下線付きの太字はC H 2ドメインのアミノ酸、太字はC H 3ドメインのアミノ酸の配列をそれぞれ表す。

【図17 - B】図17 - Bは、発現ベクターp O p t i V E C / h L F - m F cがコードするh L F / h I g G F c融合タンパク質のアミノ酸配列 (配列表の配列番号6) を表す図である。二重線はスペーサーアミノ酸、下線付きの太字はC H 2ドメインのアミノ酸、太字はC H 3ドメインのアミノ酸の配列をそれぞれ表す。

【図18】図18は、ヒンジ欠損型融合タンパク質h L F / m h I g G F cの血清溶液中での安定性を示す図である。

【図19】図19は、ヒンジ欠損型融合タンパク質h L F / m h I g G F cの小腸上皮様細胞への取り込みを表す図である。

【図20】図20は、ヒンジ欠損型融合タンパク質h L F / m h I g G F cのキモトリプシン耐性を表す電気泳動写真である。

【図21】図21は、ヒンジ欠損型融合タンパク質h L F / m h I g G F cのキモトリプシン耐性を表す図である。

【図22】図22は、ヒンジ欠損型融合タンパク質h L F / m h I g G F cが溶液中でホモダイマーを形成することを示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

以下、本発明を詳細に説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態のみに限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、様々な形態で実施をすることができる。

なお、本明細書において引用した全ての文献、および公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。また、本明細書は、2012年4月23日に出版された本願優先権主張の基礎となる日本国特許出願 (特願2012 - 098085号) の明細書及び図面に記載の内容を包含する。

【0017】

本発明の融合タンパク質は、F c R n結合領域を含むタンパク質又はペプチドとラクtofエリン又はラクtofエリンの生物活性断片もしくはペプチドとの生物学的に活性な融合タンパク質である。本発明の融合タンパク質においてラクtofエリン又はラクtofエリンの生物活性断片もしくはペプチドと結合されるタンパク質又はペプチドは、一般に、F c R nに結合することの知られている配列を含むタンパク質やペプチドであり、生体に対して適合可能又は薬理的に不活性であればよい。例えば、血液成分タンパク質であるI g G又はアルブミンはF c R nに結合することが知られている。したがって、本発明において使用されるF c R n結合領域を含むタンパク質又はペプチドとしては、I g G (I g G

10

20

30

40

50

1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG5、IgG6、IgG7)、IgGの重鎖、IgGの重鎖にあるFc領域、Fc領域のCH2ドメイン及びCH3ドメイン、CH2ドメイン、アルブミン、アルブミンのFcRn結合領域を含む領域が挙げられる。これらのタンパク質及びペプチドのアミノ酸配列は公知であり、本発明において使用される場合、天然の配列と同一であってもよく、また、変異を有していてもよい。

【0018】

好ましくは、本発明において使用されるFcRn結合領域を含むタンパク質又はペプチドは、ラクトフェリンと融合させた状態から分解しにくいものが良い。例えば、IgGのヒンジ領域を含むFc領域を使用するとヒンジ領域がジスルフィド結合を形成することにより二量体形態の融合タンパク質が形成されるが、ヒンジ領域はプロテアーゼに対して感受性が高いため、ヒンジ領域を含まないもの、又はヒンジ領域のシステインを他のアミノ酸で置換したり、システインの位置を変更したものを使用することができる。あるいは、糖鎖付加部位を含む他のアイソタイプ由来のヒンジ領域と入れ替えることで、糖鎖によりプロテアーゼ耐性を増大させてもよく(特許文献2)、これらもFcRn結合領域を含むタンパク質又はペプチドに含まれる。

ヒンジ領域のプロテアーゼによる分解を防ぐためには、ヒンジ領域を削除することにより、ヒンジ欠損型融合タンパク質を作製する方法が好ましい。この融合タンパク質はヒンジ領域を持たないことから、エフェクター機能に関わるFcレセプターや、補体への結合低下が考えられ、副作用につながるエフェクター機能を介した細胞障害や、血中からの融合タンパク質の排除につながるエフェクター機能を介した免疫反応の活性化が軽減し、ヒンジ領域を有するもの(ヒンジ付加型融合タンパク質等)と比較して有利である。

【0019】

このようなFcRn結合領域を含むタンパク質又はペプチドは、FcRn結合領域に加えて、他の配列を含んでもよく、例えば、IgA、IgMなどの多量体を形成するJ鎖が含まれる配列を付加することによって、さらに多量体化することができる。

ラクトフェリン又はラクトフェリンの生物活性断片もしくはペプチドとFcRn結合領域を含むタンパク質又はペプチドとは、融合タンパク質においてどちらをN末端側又はC末端側に位置させてもよいが、ラクトフェリン又はラクトフェリンの生物活性断片もしくはペプチドをN末端側、FcRn結合領域を含むタンパク質又はペプチドをC末端側とすることが好ましい。したがって、本発明の融合タンパク質としては、(LF-Y)_nで表されるもの、及び/又は前記〔1〕の式においてn=1又は2のものが好ましく、(LF-Y)_nで表されるものであってn=1のものがさらに好ましい。なお、後述するように、LFとYとの間に付加的な配列が存在してもよい。

【0020】

本発明の融合タンパク質等において使用される「ラクトフェリン」(LF)又はラクトフェリンの生物活性断片もしくはペプチドは、遺伝子組換え型(一部のアミノ酸が置換された改変型を含む)ラクトフェリンであって、使用される配列の由来する生物種及び改変の有無などは問わない。例えば、ラクトフェリンは、ヒト及び種々の動物(ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ等)から得られる天然のラクトフェリンと同一のアミノ酸配列を有していてもよいし、目的とするラクトフェリンの生理活性を有する限りにおいて、一部のアミノ酸が欠失、付加、置換していてもよい。ラクトフェリンの機能的(生物活性を有する)断片、ペプチドは、種々のものが公知であり(例えば、「プログラム・抄録集第2回 臨床ラクトフェリンシンポジウム2009」、21~27頁(島崎敬一)、Peptides. 2011 Sep; 32(9): 1953-63. Epub 2011 Jul 30, Discovery and development of a synthetic peptide derived from lactoferrin for clinical use, Brouwer CP, Rahman M, Welling MM, Biometals. 2010 Jun; 23(3): 493-505. Epub 2010 Mar 18, The human lactoferrin-derived peptide hLF1-11 primes monocytes

for an enhanced TLR-mediated immune response, van der Does AM, Bogaards SJ, Jonk L, Wulferink M, Velders MP, Nibbering PH, J Agric Food Chem. 2010 Jun 9; 58(11): 6721-7, Antihypertensive properties of lactoferricin B-derived peptides, Ruiz-Gimenez P, Ibanez A, Salom JB, Marcos JF, Lopez-Diez JJ, Valles S, Torregrosa G, Alborch E, Manzanares P)、必要に応じて設計することができる。

【0021】

本発明の融合タンパク質等に関して「生物(学的)活性」とは、特にことわらない限り、ラクトフェリンの生理薬理活性を意味する。特に、本発明の融合タンパク質等は、天然ラクトフェリン(又は天然と同等の配列を有する組換え型ラクトフェリン)と同等の鉄キレート(結合)能を有している。具体的には、後述する実施例の方法で測定して天然ラクトフェリン(又は天然と同等の配列を有する組換え型ラクトフェリン)の鉄結合能を100%とした場合に、本発明の融合タンパク質等は、少なくとも50%以上(例えば約50%~約150%又は約50%~約120%)の鉄結合能を保持しており、好ましい態様においては、本発明の融合タンパク質等は、天然ラクトフェリン(又は天然と同等の配列を有する組換え型ラクトフェリン)の約70%~約100%又はそれ以上(例えば約70%~約150%又は約70%~約120%)、さらには約90%以上に相当する鉄結合能を有する。なお、鉄結合能は、実施例に記載した方法又はそれと同等の方法によって測定する場合、±20%程度の誤差がありうる。

【0022】

本発明の融合タンパク質は、さらに、付加的なアミノ酸配列及び(又は)糖鎖等を含んでいてもよい。FcRn結合領域を含むタンパク質又はペプチドと、ラクトフェリン又はラクトフェリンの生物活性断片もしくはペプチドとの間に、スペーサー配列として適切な長さの任意のアミノ酸配列を有することができる。スペーサー配列(s)は、例えば0~10個、又は0~5個の任意のアミノ酸の配列であることができる。その他の付加的な配列は、スペーサー配列のような立体構造上の利点を提供するものであってもよく、また、例えばシグナルペプチドや精製に利用されるタグ配列のように、何らかの機能を融合タンパク質に与えるものであってもよく、これらを有するものを改変体と称する。

【0023】

本発明の融合タンパク質等は、遺伝子組換えにより製造することができる。所望のアミノ酸配列を有するラクトフェリン遺伝子とFcRn結合領域を含むタンパク質又はペプチドの遺伝子とを、常法により連結し、所望の宿主細胞において発現させるのに必要なその他の要素を含む発現ベクターを構築し、このベクターを宿主細胞に導入して融合タンパク質を発現させ、発現された融合タンパク質を細胞又は培地から回収することができる。

【0024】

本発明の融合タンパク質等をコードする核酸分子は、公知の配列及び標準的な遺伝子操作技術によって設計し、作製することができる。ラクトフェリン及びFcRn結合領域含有タンパク質をコードする遺伝子は、公知の核酸又はアミノ酸配列に基づくプローブを用いて、一般に利用可能な種々のゲノムライブラリー又はcDNAライブラリーからクローニングしたり、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法によって合成することにより、得ることができる。これらの遺伝子に所望の改変を加えたり変異を導入してもよい。

【0025】

核酸分子を複製するために使用する宿主細胞及びベクター系、及び融合タンパク質を発現させるために使用する宿主及びベクター系は、公知の多数の真核細胞(哺乳動物細胞、植物細胞、酵母、昆虫細胞など)及び原核細胞(細菌など)の系から適宜選択して使用することができる。

本発明の融合タンパク質を発現させるためのベクターは、ラクトフェリン又はラクトフ

10

20

30

40

50

ェリンの生物活性断片もしくはペプチドをコードする配列及びFcRn結合領域を含むタンパク質又はペプチドをコードする配列（又は、FcRn結合領域を含むタンパク質又はペプチドをコードする配列及びラクトフェリン又はラクトフェリンの生物活性断片もしくはペプチドをコードする配列）に加えて、一般に、作動可能に連結された状態で、転写プロモーター、分泌シグナルペプチド配列、転写ターミネーター、ポリAシグナルなどの要素を含み、さらに通常、薬剤耐性遺伝子などの選択マーカーを含む。

【0026】

これらのベクターを用いて、公知の種々の技術にしたがって宿主細胞を形質転換することができる。

【0027】

本発明の融合タンパク質等は、遺伝子組換え植物及び遺伝子組換え動物を製造することによって、これらの動物及び植物に産生させることができる。例えば、ヒツジ、ヤギなどの非ヒト動物のゲノムに本発明の融合タンパク質をコードする核酸分子を組み込むことにより、本発明の融合タンパク質を乳汁中に分泌させるようにすることができる。また、植物に組み込むことによって本発明の融合タンパク質等を産生する有用植物を製造することもできる（例えば特表2004-528022号公報）。

【0028】

本発明の融合タンパク質等は、本発明の発現ベクターで形質転換された宿主細胞の培地などから、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー及びアフィニティークロマトグラフィーなどの種々のクロマトグラフィー技術を適宜用いて単離精製することができる。特に好ましい精製方法としては、イオン交換クロマトグラフィーが挙げられる。

【0029】

ラクトフェリンは、抗菌作用、鉄代謝調節作用、細胞増殖活性化作用、造血作用、抗炎症作用、抗酸化作用、食作用亢進作用、抗ウイルス作用、ピフィズス菌生育促進作用、抗がん作用、がん転移阻止作用、トランスロケーション阻止作用、脂質代謝改善作用、鎮痛作用、抗ストレス作用などを含む広範な生理活性を有しており、これらの作用によって、生活習慣病（例えば、高コレステロール血症、高脂血症など）、疼痛管理（がん性疼痛、神経因性疼痛など）、膠原病（シェーグレン症候群によるドライアイ及びドライマウス、リウマチ性関節炎など）、歯周病、C型肝炎などを含む、多くの疾患又は症状の治療（改善を含む）及び予防が可能である。

【0030】

本発明の融合タンパク質等は、ラクトフェリンの生物活性を十分に保持しているため、単独で、又は他の薬剤と組合せて、ラクトフェリンが有効である疾患の予防又は治療剤として、投与することができる。また、本発明の融合タンパク質等は、製剤学の分野で公知の各種の担体、治療上不活性な基剤及び/又は添加物を配合することによって、所望の剤型の医薬品組成物とすることができる。便宜上、本発明に関して医薬品又は医薬品組成物というときは、投与対象が人の場合のほか、動物である場合（即ち、獣医薬等）も含む。このような医薬品組成物に含有させることができる各種成分及び剤型は当業者には十分に公知である。

【0031】

本発明の融合タンパク質等を含む治療剤又は医薬品組成物の有効投与量は、治療又は予防すべき疾患又は症状の種類や程度、投与対象の状態、剤型、投与経路などによって異なり、公知の有効ラクトフェリン量を目安に適宜選択することができる。一般に、公知の有効ラクトフェリン量と比較して有意に少ない用量（例えばラクトフェリン量換算で1/2～1/20量）とすることができ、同等の用量で用いるのであれば投与回数を減らすことが可能である。

【実施例】

【0032】

以下に、実施例及び試験例を掲げて、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明は実施

10

20

30

40

50

例に示される範囲に限定されるものではない。

【0033】

実施例1：ヒトラクトフェリン(hLF)とヒンジ領域を含むヒトIgGFc領域との融合タンパク質の作製及び生物活性評価

1. ヒトラクトフェリン(hLF)遺伝子のクローニング

ヒトラクトフェリン(hLF)cDNAは、ヒトcDNAライブラリー(商品名「Human Leukocyte Marathon-Ready cDNA」、クロンテック社)からPCR法により取得した。フォワード側プライマーとして、S_LFex_XhoI_ATG(配列番号1; 5'-CTCGAGATGAAACTTGTCTTCC TCGTC(開始コドンであるATGの上流に下線部XhoIサイトを導入)、リバース側プライマーとして、AS_LFex_TAA_XbaI(配列番号2; 5'-TCTAGATTACTTCCCTGAGGAATTCAC(終止コドンTAAの下流に下線部XbaIサイトを導入)を用い、DNA合成酵素は「KOD-plus」(商品名、東洋社)を使用して、hLF cDNAを増幅した。

10

【0034】

得られたDNA断片に、Aを付加し、「TOPO TAクローニングベクター」(商品名、インビトロジェン社)にクローニングした。その後、このベクターをXhoIとXbaIで消化することにより、hLF cDNAのDNA断片を切り出し、予めXhoIとXbaIで消化したベクター「pBluescript II」(商品名、Stratagene社)にクローニングした。このベクターを、「pBSIILfAL」と命名した。hLF cDNAの塩基配列は、ジデオキシ法シーケンシングで確認した。pBSIILfALには、hLF遺伝子全長がベクターのXhoI及びXbaI制限酵素サイトに挟まれる形でクローン化されている。pBSIILfALの構造を図1(左図)に示す。

20

【0035】

上記で作製した、hLF遺伝子全長を含むベクターpBSIILfALを用いて、hLF遺伝子3'末端側に存在するEcoRIとXbaIとの間にBamHIサイトを導入したベクター、pBSIILfAL/Bamを作製した。合成オリゴヌクレオチドEco_hLF_Bam-S(配列番号3; 5'-AATTCCTCAGGAAGGATCCT-3')及びEco_hLF_Bam-A(配列番号4; 5'-CTAGAGGATCCTTCCCTGAGG-3')を用意し、それぞれ100µMの濃度で滅菌水に溶解した。その後、以下の表1に示した試薬を混合して、サンプル溶液とした。

30

【0036】

【表 1】

表 1

100 μ M Eco_hLF_Bam-S (μ l)	10
100 μ M Eco_hLF_Bam-A (μ l)	10
1 M Tris HCl (pH7.5) (μ l)	0.8
5 M NaCl (μ l)	0.8
滅菌水 (μ l)	20.4
Total (μ l)	42

10

20

【0037】

このサンプル溶液を70 に加熱後、ゆっくり室温まで冷却させることでアニーリングさせ、二本鎖DNAを形成させた(アニーリングオリゴ)。EcoRIとXbaIとで完全消化したpBSII LfAL(10ng/ μ l)を用意し、以下の表2に示した試薬を混合して、16 で30分間ライゲーションした。

【0038】

【表 2】

表 2

アニーリングオリゴ (μ l)	2
pBS II LfAL (μ l)	5
Ligation High (TOYOBO)	7
Total (μ l)	14

30

40

【0039】

このライゲーション溶液5 μ lとコンピテントセルTOP10 50 μ lとを混合し、氷上で30分インキュベートした。その後、42 で40秒間、コンピテントセルにヒー

50

トショックをかけ、氷上で2分間静置後、SOC培地を100 μ l加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。1時間インキュベートしたサンプルを、アンピシリン入りLB寒天培地に播き、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。翌日、得られたコロニーを1.5mlのLB液体培地(100 μ g/mlアンピシリン入り)中で37 $^{\circ}$ C、200rpmの条件下で、一晩、振とう培養した。

【0040】

プラスミドDNA抽出は、「QIAprep Spin Miniprep Kit」(商品名、QIAGEN社)を用いて行った。アニーリングオリゴとpBSIIILfALとのライゲーションは、アニーリングオリゴ近傍の塩基配列を解読することで確認した。作製したベクターを、pBSIIILfAL/Bamと命名した(図1、右)。

10

【0041】

2. ヒンジ領域を含むhLF/hIgGfc融合タンパク質発現ベクターの構築

2-1 pTeuIgG/hLFの構築

hLFとヒトIgGfc(hIgGfc)との融合タンパク質(hLF/hIgGfc)がヒンジ領域でジスルフィド(s-s)結合により二量体化した構造の融合タンパク質(ヒンジ付加型融合タンパク質d(hLF/hIgGfc)と表記することがある)を動物細胞にて発現させるための発現ベクターを構築した。

【0042】

ヒトIgGfc領域のヒンジ、CH2、CH3のゲノム配列をもつ発現ベクター、pTeuIgG(図2)のXhoI/BamHIサイトに、pBSIIILfAL/BamのXhoI-BamHI断片をクローニングした。このヒンジ付加型融合タンパク質d(hLF/hIgGfc)発現ベクターを、pTeuIgG/hLFと命名した。発現ベクターの作製は、上記記載の方法に準じた。

20

なお、pTeuIgGは、強力な発現プロモーターであるSRの下流にヒトIgG1のヒンジ、CH2、CH3領域に対応するゲノムDNA配列を導入して構築した(Sato, A. et al., Biochem. J. 371, 603-608(2003))。

【0043】

hLF/hIgGfc融合タンパク質の安定発現細胞株構築のために、CHO細胞の一種であるDHFR欠損チャイニーズハムスター卵巣由来細胞(DG44)を用いた。DHFRとは、ジヒドロ葉酸還元酵素であり、核酸の生合成には必須である。DHFRのアンタゴニストであるメトトレキサート(MTX)の存在下で細胞を培養すると、DHFRの産生が阻害される。その際、細胞は生き残るためにDHFR遺伝子を増幅し、DHFR遺伝子の近傍に存在する遺伝子も増幅されるために、その遺伝子のタンパク質発現が増幅することが知られている。このようにして、目的とするタンパク質を高発現させることが可能である。

30

【0044】

DG44細胞用発現ベクターには、インビトロジェン社製pOptiVEC(商品名)を使用した。ベクターpBluescript II(商品名、Stratagene社)のT7プライマー結合部位からT3プライマー結合部位までの領域をPCR法で増幅して、TAKクローニング法でpOptiVECに連結することにより、ベクターpOptiVEC-MCS

40

Sを作製した(図4)。

【0045】

ヒンジ付加型融合タンパク質d(hLF/hIgGfc)発現ベクターを作製するために、ベクターpTeuIgG/hLFから、hLF、ヒトIgGfc領域のヒンジ、CH2、CH3のゲノム配列を含む領域をXhoI-NotI断片として切り出し、pOptiVEC-MCSのXhoI/NotIサイトにクローニングした。このベクターをpOptiVEC/hLF-dFcと命名した(図5)。発現ベクターの作製は、上記記載の方法に準じた。

【0046】

50

ヒンジ付加型融合タンパク質 d (h L F / h I g G F c) 発現ベクターである p O p t i V E C / h L F - d F c がコードするヒトラクトフェリン (h L F) / ヒト I g G F c 融合タンパク質のアミノ酸配列を、配列表の配列番号 5 に記載した。配列番号 5 において、それぞれ、アミノ酸番号 1 ~ 7 1 1 は h L F、7 1 2 ~ 7 1 4 はスパーサー、7 1 5 ~ 7 2 9 はヒンジ領域、7 3 0 ~ 8 3 9 は C H 2 ドメイン、8 4 0 ~ 9 4 6 は C H 3 ドメインのアミノ酸配列である (図 1 7 A : G e n b a n k 登録番号 A A B 6 0 3 2 4 . 1 . 及び A A A 0 2 9 1 4 . 1 配列に基づく)。

【 0 0 4 7 】

3 . ヒンジ付加型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質の発現及び精製

3 - 1 . D G 4 4 細胞を宿主とするヒンジ付加型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質安定発現細胞株の構築

作製した p O p t i V E C / h L F - d F c を D G 4 4 細胞へ導入して、ヒンジ付加型融合タンパク質 d (h L F / h I g G F c) 安定発現細胞株を樹立した。発現ベクターを効率的に細胞へ導入するために、ベクター 2 0 μ g 分を P v u I で制限酵素処理して直鎖状にした。このサンプルにフェノール/クロロホルム 1 容量分を加え、ミキサー (V o r t e x) で攪拌してタンパク質を除去した。1 5 0 0 0 r p m で 5 分間遠心後、上清を新しいチューブに移した。上清に 1 / 1 0 容量の 3 M 酢酸ナトリウム及び 2 . 5 容量の 1 0 0 % エタノールを加え、1 5 0 0 0 r p m で 2 0 分間遠心してベクターを沈殿させた。上清を除去したチューブに、7 0 % エタノールを 1 0 0 μ l 加えてリンスした。その後、1 5 0 0 0 r p m で 5 分間遠心して上清を捨て、1 0 分間風乾した。風乾したチューブに滅菌水 1 5 μ l を加え、発現ベクターを懸濁した。P v u I 処理した発現ベクターを、p O p t i V E C / h L F - d F c / P v u I と命名した。

【 0 0 4 8 】

作製した p O p t i V E C / h L F - d F c / P v u I を用いて D G 4 4 細胞へのトランスフェクションを行った。p O p t i V E C / h L F - d F c / P v u I 2 0 μ g 分を、「F r e e S t y l e M A X R e a g e n t」(商品名、インビトロジェン社) 1 5 μ l、「O p t i P r o S F M」(商品名、インビトロジェン社) 1 2 0 0 μ l と混合し、室温で 1 0 分間静置して、トランスフェクション溶液とした。D G 4 4 細胞 (1 5 × 1 0 ⁶ 細胞) を培地 (「 c o m p l e t e C D D G 4 4 m e d i u m」、インビトロジェン社) 3 0 m l に懸濁して、この中に予め用意したトランスフェクション溶液を混合して、C O ₂ インキュベーター (3 7 ° C、5 % C O ₂) で 4 8 時間培養した。その後、培地を「c o m p l e t e C D D G 4 4 m e d i u m」から「c o m p l e t e C D o p t i C H O m e d i u m」(インビトロジェン社) に交換した。この培地はヒポキサンチンやチミジン不含の培地であり、D H F R 欠損細胞は生育できない。一方、P v u I で制限酵素処理した発現ベクターは D H F R 遺伝子をコードしているため、D G 4 4 細胞の染色体に発現ベクターが組み込まれれば、細胞が生育可能となる。トランスフェクション後 4 8 時間経過した細胞を、4 0 0 × g で 5 分間遠心して集め、「c o m p l e t e C D o p t i C H O m e d i u m」3 0 m l に懸濁した (3 × 1 0 ⁶ 細胞 / m l)。その後、培地交換を 2 日毎に行いながら、C O ₂ インキュベーター (3 7 ° C、5 % C O ₂) で培養した。細胞密度が培養開始時の 9 0 % 以上になるまで培養した。

【 0 0 4 9 】

その後、メトトレキサート (M T X、和光純薬) による細胞内のゲノム増幅を行った。「C o m p l e t e C D o p t i C H O m e d i u m」で培養した D G 4 4 細胞の細胞数を計測し、1 . 2 × 1 0 ⁷ 細胞分を 4 0 0 × g で 5 分間遠心した。この細胞を、「c o m p l e t e C D o p t i C H O m e d i u m」3 0 m l と 1 m M M T X 1 . 5 μ l (終濃度 : 0 . 0 5 μ M) の混合培地に懸濁した。その後、C O ₂ インキュベーター (3 7 ° C、5 % C O ₂) で細胞密度が培養開始時の 9 0 % 以上になるまで培養した。その後は、M T X の濃度を 0 . 5 μ M、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M と段階的に上げて、同様の培養を行った。

10

20

30

40

50

【0050】

3 - 2 . ヒンジ付加型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質の発現確認

1 . 2×10^7 細胞分の細胞を、各濃度 (0 , 0 . 05 μ M , 0 . 5 μ M , 1 μ M , 2 μ M , 3 μ M , 4 μ M) の M T X を含む「complete CD opti CHO medium」に懸濁してCO₂ インキュベーター (37 °C , 5 % CO₂) で細胞密度が培養開始時の90%以上になるまで培養した。その時点で400 × g で5分間遠心して細胞を沈殿させ、その上清を回収した。上清15 μ l に非還元用の4 × サンプル緩衝液 (0 . 5 M Tris - HCl (pH 6 . 8) を2 ml , ラウリル硫酸ナトリウム (ナカライテスク社) を0 . 8 g , グリセリン (Wako社) を4 ml 混和し、純水で10 ml にメスアップして調製) を5 μ l 混合し、95 °C で5分間熱処理を行い、7 . 5 % SDS - PAGE で解析した。バンドの染色にはCBBを用いた。

10

【0051】

結果を図6に示す。目的であるd (h L F / h I g G F c) の分子量は、約210 kDaである。MTX濃度1 μ M から、矢印で示した約210 kDa付近にバンドが見られ、MTX濃度が上昇するにつれて、そのバンドは濃くなり、タンパク質の発現量が増加したことが確認できた。

MTX濃度4 μ M 存在下で樹立した細胞株を、DG44 - d (h L F / h I g G F c) と命名した。

【0052】

3 - 3 . ヒンジ付加型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質の大量発現

大量発現は、175 cm² のTフラスコ (グライナー社製、培地50 ml 使用) 、あるいはNunc社製トリプルフラスコ (培地200 ml 使用) を用いた静置培養で行った。ヒンジ付加型融合タンパク質安定発現株は、無血清培地「Complete CD Opti CHO medium」で継代培養した。タンパク質発現の際は、培地を「Hybridoma Serum Free Medium」 (商品名、Invitrogen社) + 4 μ M メトトレキセート (M T X) + 60 μ g / ml プロリン (以下「Hybridoma SFM」という) に換え、細胞濃度 1×10^6 細胞 / ml で播き、37 °C , 5 % CO₂ で7日間培養した。7日後、細胞培養液を400 × g で5分間遠心することにより、上清と細胞とを分けた。細胞は、再びHybridoma SFM 50 ml に懸濁して、37 °C , 5 % CO₂ でさらに1週間培養することによりタンパク質を発現させた。上清は、8000 rpm で5分間再遠心し、得られた上清に最終濃度0 . 02 % アジ化ナトリウムを加え、4 °C にて保存した。

20

30

【0053】

3 - 4 . ヒンジ付加型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質の精製

精製には、大量発現で得られた培地上清 (最終濃度0 . 02 % アジ化ナトリウムを含む) をそのまま使用した。陽イオン交換担体である「MacroCap SP」 (商品名、GEヘルスケア社) 400 μ l を「Poly - Prep Chromatography Columns」 (商品名、バイオラッド社) に充填して、5カラム容量 (CV) 分の10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7 . 6) で平衡化した。平衡化に使用した10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7 . 6) を捨てて、大量発現で得られた培地上清4 ml を加え、シーソーシェイカーで30分間反応させた。反応後、溶液は素通り画分として回収した。「Poly - Prep Chromatography Columns」を、「UV DETECTOR」 (東京理化学器械社、280 nm の吸光度を測定) 、マイクロチューブポンプ (東京理化学器械社) と接続し、ポンプの流速を1 ml / min に設定し、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7 . 6) を流して担体を洗浄した。「UV DETECTOR」の280 nm の吸光度が上昇し始めた時点から、排出液を回収した (Wash 画分) 。この回収は280 nm の吸光度が0になるまで続けた。その後、溶液を0 . 2 M NaCl + 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7 . 6) に換えて同様の操作を行った (0 . 2 M NaCl 溶出画分) 。この一連の操作を、NaCl濃度を0 . 1 M ずつ上げながら1 . 0 M NaCl まで続けた。回収した各溶出液は、4 °C にて保存した。

40

50

【0054】

各溶出画分15 μ lに非還元用の4 \times サンプル緩衝液を5 μ l混合し、95 $^{\circ}$ Cで5分間熱処理を行い、7.5% SDS-PAGEで解析した。バンドの染色にはCBBを用いた。

【0055】

その結果を、図8に示す。0.4M NaClの画分から目的タンパク質であるヒンジ付加型d(hLF/hIgGfc)が溶出していた。この結果から、「MacroCap SP」に結合したヒンジ付加型融合タンパク質d(hLF/hIgGfc)は、0.3M NaClで洗浄して、1.0M NaClで溶出することにより効率よく回収できることがわかった。

【0056】

3-5. ヒンジ付加型hLF/hIgGfc融合タンパク質の硫酸アンモニウム沈殿による濃縮

液量1mlに対し、硫酸アンモニウムが20、30、40、50、60、70、80、90%飽和になるように、それぞれ硫酸アンモニウム0.113g、0.176g、0.242g、0.314g、0.390g、0.472g、0.561g、0.657gを微量電子天秤で量りとり、2.0mlチューブに入れた。それぞれのチューブに、陽イオン交換担体で精製したPBSに懸濁したヒンジ付加型d(hLF/hIgGfc)タンパク質溶液を1mlずつ加え、硫酸アンモニウムが溶けるまで転倒混和した後、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。その後、15000rpm、30分間の条件で遠心を行い、タンパク質を沈殿させた。上清を回収し、沈殿は100 μ lのPBSに溶解した。PBSで溶かした各沈殿と回収した上清を7.5% SDS-PAGE及びCBB染色で調べた。

【0057】

その結果を図10に示す。50%から90%の飽和硫酸アンモニウムで沈殿が認められた。さらに、沈殿が認められた50%から90%の飽和硫酸アンモニウムの画分については、溶液中のタンパク質濃度を、既知濃度のBSAをスタンダードとしてブラッドフォード法(プロテインアッセイ、バイオラッド社)で測定して、硫酸アンモニウム沈殿での回収率を算出した(n=5)。hIgGfc融合タンパク質の場合は、分子量を用いてhLF換算濃度を算出した。具体的には、ヒンジ付加型融合タンパク質d(hLF/hIgGfc)の場合は、hLFの分子量が80kDa($\times 2$)、Fc部分の分子量は50kDaとして計算した。ヒンジ欠損型融合タンパク質hLF/mhIgGfcの場合は、hLFの分子量が80kDa、Fc部分の分子量は25kDaとして計算した。各硫酸アンモニウム濃度とその回収率(%)を以下の表3に示す。

【0058】

10

20

30

【表 3】

表 3

飽和硫酸アンモニウム濃度	回収率 (%)
50%	31 (±14.4)
60%	75 (±10.5)
70%	79 (± 3.7)
80%	72 (± 3.7)
90%	68 (± 8.1)

n=5 (±S.E.)

【 0 0 5 9 】

70%硫酸アンモニウムで回収率が最も高かった。硫酸アンモニウム沈殿後は、沈殿をPBSに懸濁して、PBSに対して透析を行うことで、硫酸アンモニウムを除去した。

【 0 0 6 0 】

4. 生物学的活性測定

4-1. ヒンジ付加型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質の鉄結合能の測定

ラクトフェリンは分子量8万の非ヘム性の鉄結合性糖タンパク質で、Nローブ、Cローブと呼ばれる二つの領域からなり、炭酸イオン (CO_3^{2-}) の存在下でタンパク質1分子当たり2個の鉄イオン (Fe^{3+}) を可逆的にキレート結合する能力を有する (Anderson, et al., Nature, 344, 784-78 (1990))。ラクトフェリンの鉄結合能の測定は、以下のように行った。ホロ (holo) 型ラクトフェリンから鉄イオン (Fe^{3+}) を遊離させ、アポ (apo) 型ラクトフェリンを調製する。次いで炭酸イオン (CO_3^{2-}) 存在下で鉄イオン (Fe^{3+}) を付加させた鉄再結合ラクトフェリンを調製した。apo型及び鉄再結合ラクトフェリンの鉄含量及びタンパク質濃度を測定し、鉄結合量の測定を行った。具体的には、apo型ラクトフェリンは、Aspergillus由来の組換え型ヒトLF、ヒンジ付加型融合タンパク質d (h L F / h I g G F c) を0.1Mクエン酸緩衝液 (pH 2.1) で24時間、さらに蒸留水で24時間透析を行い、調製した。鉄再結合型ラクトフェリンは、apo型ラクトフェリンを0.001%クエン酸鉄アンモニウム、50mM炭酸ナトリウム及び50mM塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液 (pH 7.5) で24時間透析を行った後、過剰の鉄イオンを除去するため、蒸留水、次いで50mM塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液 (pH 7.5) に対し24時間透析を行い、調製した。タンパク質に結合している鉄イオンを比色法で測定するため、血清鉄測定キット「Fe C - テストワコー」(商品名、和光純薬) を用いた。鉄の結合能は、ブラッドフォード法で定量したh L F タンパク質1mg (ヒト I g G F c 融合タンパク質の場合は、分子量を用いて算出したh L F 換算で1mg) あたりに結合している鉄の結合量として算出した。2回実験を行った結果を以下の表4に示す。

【 0 0 6 1 】

【表4】

表4

(1回目) 鉄結合能測定結果

サンプル名	L F 1 m g あたりの鉄結合量 (ng)			相対活性 (%)
	apo 型	holo 型	鉄結合能 (holo 型-apo 型)	
組換え型 hLF	154.8	1321.0	1166.1	100
ヒンジ付加型融合タンパク質 d (hLF / h I g G F c)	304.8	1362.2	1057.4	90.7
BSA	54.6	167.8	-	-

10

(2回目)

サンプル名	L F 1 m g あたりの鉄結合量 (ng)			相対活性 (%)
	apo 型	holo 型	鉄結合能 (holo 型-apo 型)	
組換え型 hLF	220.9	1655.5	1434.6	100
ヒンジ付加型融合タンパク質 d (hLF / h I g G F c)	207.1	1705.8	1498.7	104.5

20

30

【0062】

Aspergillus 由来の組換え型 hLF の鉄の結合活性を 100% とした場合、ヒンジ付加型融合タンパク質 d (hLF / h I g G F c) は、ほぼ 100% の活性を示した。

【0063】

4-2. CD スペクトルを用いたヒンジ付加型 hLF / h I g G F c 融合タンパク質の熱安定性の検討

Aspergillus 由来の組換え型 hLF とヒンジ付加型融合タンパク質 d (hLF / h I g G F c) の熱安定性を、円偏光二色性 (CD) スペクトルで解析した。円偏光二色性 (CD) スペクトルとは、物質にある波長をあてた場合の右円偏光と左円偏光の吸収の差を測定する方法で、タンパク質の二次構造の有無や種類、含量を推定することが可能である。

40

【0064】

まず、PBS (-) に 0.1 mg/ml で懸濁した Aspergillus 由来の組換え型 hLF、融合タンパク質 d (hLF / h I g G F c) を用意し、室温 (約 20) で、波長 200 nm ~ 250 nm の CD スペクトルを測定した (日本分光の J-720 使用)。

【0065】

その結果を、図 12 に示す。組換え型 hLF (パネル A) と、ヒンジ付加型融合タンバ

50

ク質 d (h L F / h I g G F c) (パネル C) の二次構造には、大きな違いは認められなかった。

【 0 0 6 6 】

次に、各タンパク質の熱安定性を調べた。タンパク質溶液の温度を低温から高温へ変化させながら CD スペクトルを測定すると、ある温度で [] が上昇し一定の値を取る。この現象は、熱によりタンパク質の変性が起きて、二次構造が変化することに起因している。熱安定性を観察する場合は、一般に測定する波長は 2 2 5 n m 付近を用いる。P B S (-) に 0 . 1 m g / m l で懸濁した A s p e r g i l l u s 由来の組換え型 h L F、ヒンジ付加型

融合タンパク質 d (h L F / h I g G F c) を用意し、3 0 ~ 9 0 まで 1 ずつ上昇させながら、波長 2 2 5 n m の CD スペクトルを測定した (日本分光の J - 7 2 0 使用) 。

【 0 0 6 7 】

結果を図 1 3 に示す。A s p e r g i l l u s 由来の組換え型 h L F (パネル A) は、6 7 付近で CD スペクトル値の大きな変化が観察された。一方、ヒンジ付加型融合タンパク質 d (h L F / h I g G F c) (パネル C) では、3 0 ~ 9 0 まで加熱しても 2 2 5 n m における CD スペクトルに大きな変化は観察されなかった。

【 0 0 6 8 】

以上より、A s p e r g i l l u s 由来の組換え型 h L F と比較して、ヒンジ付加型融合タンパク質 d (h L F / h I g G F c) は、熱に対する安定性が向上していることが示された。構造的に安定になったヒンジ付加型融合タンパク質 d (h L F / h I g G F c) は、インビボにおける血中安定性の向上も期待できると考えられる。

【 0 0 6 9 】

4 - 3 . ヒンジ付加型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質の安定性の検討

3 - 4 . で示した陽イオン交換担体「M a c r o C a p S P」で精製後のヒンジ付加型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質を、P B S に透析し、さらに P B S で希釈することで 3 3 6 μ g / m l の濃度のサンプルを調製した。このサンプルを 1 . 5 m l チューブに 1 0 0 μ l 加えて、3 7 で 3 週間静置反応させた。反応 0、1、2、3 週間後のサンプルを 3 μ l とり、非還元 4 x サンプル緩衝液を 1 μ l 混合し、9 5 、5 分熱処理を行った。その後、7 . 5 % S D S - P A G E で解析した。

C B B 染色の結果を図 1 4 に示す。図 1 4 において、M はマーカー、レーン 1 は h L F (1 μ g / レーン)、レーン 2 ~ 5 はそれぞれ 0、1、2、3 週間後のサンプルである。3 7 でも数週間は安定であるものの、時間経過と共に、* で示したヒンジ付加型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質のバンドが薄くなり、分解物と思われる * *、* * * のバンドが濃くなった。これは精製過程で混入したプロテアーゼにより分解したものと考えられる。なお、ヒンジ欠損型融合タンパク質 (後述) では、このような分解は観察されなかった。

【 0 0 7 0 】

4 - 4 . ヒンジ付加型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質の分解箇所の解析

ヒンジ付加型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質の分解箇所を特定するために、分解したバンドの N 末端アミノ酸配列を解析した。上述した方法で、ヒンジ付加型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質 (1 2 μ g 分) を 3 7 で 3 週間静置反応させ、その後、分解したサンプルを 1 0 % S D S - P A G E で泳動した。泳動後、定法に従いタンパク質を P V D F 膜 (ミリポア社) に転写した。P V D F 膜を C B B 染色した図を図 1 5 - A に示す。図 1 5 - A において、M はマーカー、レーン 1 は h L F (4 μ g)、レーン 2 ~ 6 はいずれも分解後のサンプル (各 2 μ g / レーン) である。この P V D F 膜から約 5 0 k D a のバンド (矢印) を切り出し、脱色した。そのバンドの N 末端アミノ酸配列を、p r o c i s e 4 9 1 H T (商品名、A B I 社) で解析した。得られたアミノ酸配列は、T - H - T - X - P (4 アミノ酸目は解読不能) であり、その配列を調べたところ、配列表の配列番号 5 のアミノ酸番号 7 2 2 ~ 7 2 6 (ヒンジ領域内) に対応していた (図 1 5 - B)

【 0 0 7 1 】

実施例 2：ヒトラクトフェリンとヒンジ領域を含まないヒト I g G F c 領域との融合タンパク質（「ヒンジ欠損型」）の作製、生物活性及び血中安定性評価

1．ヒンジ欠損型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質発現ベクターの構築

上記で作製したベクター p B S I I L f A L / B a m (図 1) を使用して、h L F とヒンジ領域を含まない h I g G F c との融合タンパク質（ヒンジ欠損型 h L F / m h I g G F c ）を動物細胞にて発現させるための発現ベクターを構築した。

【 0 0 7 2 】

ヒンジ欠損型融合タンパク質 h L F / m h I g G F c 発現ベクターを作製するために、ヒト I g G F c 領域の C H 2、C H 3 の c D N A 配列をもつ発現ベクター p m I g G (図 3) の X h o I / B a m H I サイトに、p B S I I L f A L / B a m の X h o I - B a m H I 断片をクローニングした。このベクターを p m I g G / h L F と命名した。各発現ベクターの作製は、上記記載の方法に準じた。

なお、p m I g G は、以下のようにして構築した。前述したヒンジ付加型融合タンパク質発現ベクターである p T e u I g G の B a m H I - X b a I に存在するヒト I g G 1 のヒンジ、C H 2、C H 3 領域に対応するゲノム D N A 配列を、ヒト I g G 1 の C H 2 と C H 3 領域に対応する c D N A 配列に入れ替えて作製した。

【 0 0 7 3 】

ヒンジ欠損型融合タンパク質 h L F / m h I g G F c 発現ベクターを作製するために、p m I g G / h L F の h L F、ヒト I g G F c 領域の C H 2、C H 3 の c D N A 配列を含む領域を X h o I - N o t I 断片として切り出し、上記で作製した p O p t i V E C - M C S (図 4) の X h o I / N o t I サイトにクローニングした。このベクターを、p O p t i V E C / h L F - m F c と命名した (図 5)。発現ベクターの作製は、上記記載の方法に準じた。ヒンジ欠損型融合タンパク質 h L F / m h I g G F c 発現ベクター p O p t i V E C / h L F - m F c がコードする h L F / h I g G F c 融合タンパク質のアミノ酸配列を配列表の配列番号 6 に記載した。配列番号 6 において、それぞれ、アミノ酸番号 1 ~ 7 1 1 は h L F、7 1 2 ~ 7 1 3 はスペーサー、7 1 4 ~ 8 2 3 は C H 2 ドメイン、8 2 4 ~ 9 3 0 は C H 3 ドメインのアミノ酸配列である (図 1 7 B : G e n b a n k 登録番号 A A B 6 0 3 2 4 . 1 及び A A A 0 2 9 1 4 . 1 の配列に基づく)。

【 0 0 7 4 】

2．ヒンジ欠損型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質の発現及び精製

2 - 1 . D G 4 4 細胞を宿主とするヒンジ欠損型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質安定発現細胞株の構築

ヒンジ付加型の場合と同様にして、作製した p O p t i V E C / h L F - m F c を D G 4 4 細胞へ導入して、h L F / h I g G F c 融合タンパク質安定発現細胞株を樹立した。P v u I 処理した発現ベクターを、p O p t i V E C / h L F - m F c / P v u I と命名した。

【 0 0 7 5 】

ヒンジ付加型の場合と同様にして、作製した p O p t i V E C / h L F - m F c / P v u I を用いて D G 4 4 細胞へのトランスフェクションを行い、M T X の濃度を段階的に上げて、同様の培養を行った。

【 0 0 7 6 】

2 - 2 . ヒンジ欠損型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質の発現確認

ヒンジ付加型の場合と同様にして、7 . 5 % S D S - P A G E 及び C B B 染色で解析した。

【 0 0 7 7 】

結果を図 7 に示す。目的である h L F / m h I g G F c の分子量は、約 1 0 5 k D a である。M T X 濃度 0 . 5 μ M から矢印で示した約 1 0 5 k D a 付近にバンドが見られ、M T X 濃度が上昇するにつれて、そのバンドは濃くなり、タンパク質の発現量が増加したことが確認できた。

10

20

30

40

50

MTX濃度4 μ M存在下で樹立した細胞株を、DG44-hLF/mhIgGFcと命名した。

【0078】

2-3. ヒンジ欠損型hLF/hIgGFc融合タンパク質の大量発現

ヒンジ付加型の場合と同様にして、細胞を継代培養し、融合タンパク質を大量発現させた。得られた上清を4にて保存した。

【0079】

2-4. ヒンジ欠損型hLF/hIgGFc融合タンパク質の精製

ヒンジ付加型の場合と同様にして、大量発現で得られた培地上清から融合タンパク質を精製した。

【0080】

その結果を、図9に示す。0.5Mから0.7M NaClで、目的タンパク質であるヒンジ欠損型hLF/mhIgGFcが溶出した。この結果から、その後は「MacroCap SP」に結合したヒンジ欠損型hLF/mhIgGFcは、0.4M NaClで洗浄して、1.0M NaClで溶出することにより効率よく回収できることがわかった。

【0081】

2-5. ヒンジ欠損型hLF/hIgGFc融合タンパク質の硫酸アンモニウム沈殿による濃縮

ヒンジ付加型の場合と同様にして、融合タンパク質を硫酸アンモニウム沈殿によって濃縮し、7.5% SDS-PAGE及びCBB染色で調べた。

【0082】

その結果を図11に示す。60%から90%の飽和硫酸アンモニウムで沈殿が認められた。さらにn沈殿が認められた60%から90%の飽和硫酸アンモニウムの画分については、溶液中のタンパク質濃度をブラッドフォード法で測定して、硫酸アンモニウム沈殿での回収率を算出した(n=2)。各硫酸アンモニウム濃度とその回収率(%)を以下の表5に示す。

【0083】

【表5】

表5

飽和硫酸アンモニウム濃度	回収率 (%)
60%	84.0、61.7
70%	73.4、58.8
80%	71.9、56.8
90%	78.4、64.2

【0084】

60%硫酸アンモニウムで回収率が最も高かった。硫酸アンモニウム沈殿後は、沈殿をPBSに懸濁して、PBSに対して透析を行うことで、硫酸アンモニウムを除去した。

【0085】

3. 生物活性測定

3-1. ヒンジ欠損型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質の鉄結合能の測定

ラクトフェリンの鉄結合能の測定は、ヒンジ付加型の場合と同様にして行った。2 回実験を行った結果を以下の表 6 に示す。

【0086】

【表6】

表6

(1回目)

鉄結合能測定結果

サンプル名	L F 1 m g あたりの鉄結合量 (ng)			相対活性 (%)
	apo 型	holo 型	鉄結合能 (holo 型-apo 型)	
組換え型 hLF	154.8	1321.0	1166.1	100
ヒンジ欠損型融合タンパク質 h L F / m h I g G F c	147.4	1540.0	1393.0	119
BSA	54.6	167.8	-	-

10

20

(2回目)

サンプル名	L F 1 m g あたりの鉄結合量 (ng)			相対活性 (%)
	apo 型	holo 型	鉄結合能 (holo 型-apo 型)	
組換え型 hLF	220.9	1655.5	1434.6	100
ヒンジ欠損型融合タンパク質 h L F / m h I g G F c	275.0	1790.0	1515.0	106

30

【0087】

A s p e r g i l l u s 由来の組換え型 h L F の鉄の結合活性を 100% とした場合、ヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) は 100% の活性を示した。

40

【0088】

3-2. C D スペクトルを用いたヒンジ欠損型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質の熱安定性の検討

A s p e r g i l l u s 由来の組換え型 h L F とヒンジ付加型、及びヒンジ欠損型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質の熱安定性を、ヒンジ付加型の場合と同様にして C D スペクトルで解析した。その結果を、図 12 に示す。A s p e r g i l l u s 由来の組換え型 h L F (パネル A) と、ヒンジ欠損型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質 (パネル B) の二次構造には、大きな違いは認められなかった。

【0089】

50

次に、ヒンジ付加型の場合と同様にして、各タンパク質の熱安定性を調べた。結果を図13に示す。Aspergillus由来の組換え型hLF（パネルA）は、67付近でCDスペクトル値の大きな変化が観察されたのに対し、ヒンジ欠損型hLF/hIgGFc融合タンパク質（パネルB）では、30～90まで加熱しても225nmにおけるCDスペクトルに大きな変化は観察されなかった。

【0090】

以上より、hLFと比較して、ヒンジ欠損型hLF/hIgGFc融合タンパク質は熱に対する安定性が向上していることが示され、インビボにおける血中安定性の向上も期待できると考えられる。

【0091】

3-3. ヒンジ欠損型hLF/hIgGFc融合タンパク質のラットを用いた血中安定性の検討

8週齢のWistar系ラット（雄）6頭に、ペントバルビタールナトリウムによる麻酔下にて、外頸静脈に採血用カニューレを留置した。大腿静脈内注射によりAspergillus由来の組換え型hLF（1mg/kg体重で投与）及びヒンジ欠損型融合タンパク質（hLF/mhIgGFc）（hLF換算で1mg/kg体重で投与）を投与した。投与前及び投与後5、10、15、30、60、120、180、240分後に外頸静脈に留置したカニューレから採血し、血漿中のhLF濃度はELISA（「AssayMax Human Lactoferrin ELISA kit」、Assaypro社製）により測定した。なお、予備検討により、採血時に使用した抗凝固剤であるEDTA、及び血漿は、このELISA測定に影響を及ぼさないことを確認している。また、使用したELISAキットは、ビオチン化抗ヒトラクトフェリン抗体（1次抗体）とペルオキシダーゼ標識ストレプトアジピンで構成されている。したがって、2次抗体を使用する一般的なELISAで問題となる2次抗体とヒンジ欠損型（hLF/mhIgGFc）のFc領域との交差反応を懸念する必要がない。

【0092】

まず、ブラッドフォード法で濃度既知であるAspergillus由来の組換え型hLF、及びヒンジ欠損型融合タンパク質（hLF/mhIgGFc）を用いて、検量線を作成した。Aspergillus由来の組換え型hLFは0.47～7.5ng/mlで、ヒンジ欠損型融合タンパク質（hLF/mhIgGFc）は0.235～30.0ng/mlで、それぞれ直線性が得られたので、この範囲に測定値が入るように各血漿サンプルを希釈してタンパク質濃度を測定した。

【0093】

その結果を、図16に示す。投与前はAspergillus由来の組換え型hLF、ヒンジ欠損型融合タンパク質（hLF/mhIgGFc）投与群ともに血中からLFは検出されなかった。Aspergillus由来の組換え型hLF投与群は投与後60分後には血中からほぼクリアランスされたが、ヒンジ欠損型融合タンパク質（hLF/mhIgGFc）投与群は240分後においても検出された。

【0094】

統計解析ソフトウェア「GraphPad Prism 4」（GraphPad Software社）を用いて、血中半減期と時間曲線下面積（area under the curve、AUC）を算出した。Aspergillus由来の組換え型hLF投与群の半減期は12.6分であるのに対し、ヒンジ欠損型融合タンパク質（hLF/mhIgGFc）投与群は67.7分と約5.4倍に延長した。AUCについては、ヒンジ欠損型融合タンパク質（hLF/mhIgGFc）投与群がhLF投与群の約7.4倍に増加していた。以上より、Aspergillus由来の組換え型hLFと比較して、ヒンジ欠損型融合タンパク質（hLF/mhIgGFc）は血中安定性の著しい向上を示した。

【0095】

3-4. ヒンジ欠損型hLF/hIgGFc融合タンパク質のインビトロでのプロテア

ーゼ耐性試験

ヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) を、75%ウシ血清 / P B S 中で、0.2 μg / μl の濃度で長期間37 °C で反応させた。0、14、21、38、55日後にサンプルを採取して、抗h L F抗体を用いたイムノプロットングにより残存するL Fのサイズ及び量を検出した。

その結果、55日間までの保存期間中、0日と比較してほとんど分解を受けずに当初の分子量を維持し、検出量も減少していなかった (図18)。したがって、本発明の融合タンパク質は、血中でのプロテアーゼによる分解に対し、十分な耐性を有する。

【0096】

実施例3：ヒトラクトフェリンとヒトI g G F c領域の融合タンパク質 (「ヒンジ欠損型」) のヒト小腸上皮様細胞への取り込み評価及びキモトリプシン耐性評価

10

1. ヒト小腸上皮様細胞C a c o 2への取り込み評価

L Fは腸管から取り込まれて胸管リンパに移行することが知られている。そこで、本研究で作製したヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) がこの経路より取り込まれるかを、ヒト小腸上皮様細胞C a c o 2細胞を用いて確認した。

h L Fとヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) は、蛍光プローブであるA l e x a F l u o r 488で標識した。1mgのA l e x a F l u o r 488にDMSO 100 μlを加え、その後、1M N a H C O₃を加えた各タンパク質とA l e x a F l u o r 488をモル比1:10で混合して、室温で、1h反応させた。反応後、反応液を1×P B S (-) に対して24時間透析を行い、未標識A l e x a F l u o r 488を除去した。

20

C a c o - 2細胞を12well plateに細胞濃度 5×10^4 cells / ml になるように撒き込み、37 °C, 5% C O₂ で1週間培養 (2日おきに培地交換) した。C a c o - 2細胞にP B S (-) を1ml / well加えて、3回洗浄を行い、培地成分を完全に取り除いた。次に、A l e x a標識済みの各タンパク質を15 μg / well加えて、1hr反応させた。1hr後、A l e x a標識済みの各タンパク質を取り除き、cold P B S (-) を1ml / well加えて、1回洗浄を行った。洗浄後、0.25% T r y p s i n / E D T Aを250 μl / well加えて、37 °C条件下で5min反応させた。5min後、細胞をtubeに全量回収して、遠心機を用いて、200 × g, 2min, 4 °C で遠心を行った。遠心後、上清液を取り除き、cold P B S (-) を1ml / tube加えて、軽く懸濁をして、200 × g, 2min, 4 °C で遠心を行った。遠心後、上清液を取り除き、4% P F A / P B S (-) を200 μl / tube加えて、軽く懸濁をして、室温で15min反応させた。15min後、200 × g, 2min, 4 °C で遠心を行った。遠心後、上清液を取り除き、1 μg / mlビスベンズイミド / P B S (-) を200 μl / tube加えて、軽く懸濁をして、室温で15min反応させた (核染色)。15min後、200 × g, 2min, 4 °C で遠心を行った。遠心後、上清液を取り除き、cold P B S (-) を200 μl / tube加えて、軽く懸濁をした。懸濁後、200 × g, 2min, 4 °C で遠心を行った。遠心後、上清液を取り除き、cold P B S (-) を200 μl / tube加えて、軽く懸濁をして、全量を8well chamber plateに移した。その後、共焦点レーザー顕微鏡L S M 510で取り込みの蛍光を観察した。

30

40

【0097】

その結果、h L F及びヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) は4条件下ではC a c o 2細胞へ取り込まれないが (図19A)、37 °C条件下ではC a c o 2細胞へ取り込まれていることが確認された (図19B)。また37 °Cにおける取り込みは、N a N₃ (図19C)、および過剰量の未標識ウシラクトフェリン (b L F) (図19D) で阻害されたため、この細胞内取り込みはレセプター介在性であり、ヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) はL Fの取り込みルートで細胞内に取り込まれることが確認された。すなわち、ヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) は、ラクトフェリン受容体、I g G受容体又はアルブミン受容体のいずれか1つ以上

50

の受容体を介して取り込まれるものと考えられる。

【0098】

2. ヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) のキモトリプシン消化耐性評価

本実験で用いた B u f f e r は、表7の通り調製し、その後 pH を 7 . 4 に調製した。

【表7】

表7

表7 Buffer の組成表

1M Tris-HCl (pH8.8)	2.5ml
5M NaCl	1ml
1M CaCl ₂ · 2H ₂ O	100 μl
Mess up to	50ml

10

h L F やヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) は 1 m g / m l となるように本 B u f f e r にサスペンドした。

20

【0099】

[消化酵素耐性試験]

150 μl の 1 m g / m l h L F、あるいはヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) を B u f f e r 120 μl と混合して、37 で5分間静置した。その後、16.7 μg / m l のキモトリプシン溶液 30 μl を加え、37 で静置反応した。経時的に反応サンプル 36 μl を回収し、あらかじめ用意しておいた S a m p l e B u f f e r (0.1 M T r i s - H C l (pH6.8)、4% S D S、20% G l y c e r o l、B P B 少量) 12 μl に加え、消化反応を停止させた。その後、反応液は 10% S D S - P A G E で泳動後 (15 μl / レーン使用)、C B B 染色した。

左から順に分子量マーカー、h L F のキモトリプシンを加えずに 37 で静置反応させたサンプル、h L F のキモトリプシンを加えて 37 静置反応させたサンプル、ヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) のキモトリプシンを加えずに 37 静置反応させたサンプル、ヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) のキモトリプシンを加えて 37 静置反応させたサンプルの泳動結果を図20に示す。

30

【0100】

各バンドの濃さを I m a g e J により解析した。キモトリプシンを加えないバンドの濃さの平均値を 100% としてグラフ化した (図21)。ヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) はほとんど分解されなかったが、コントロールである h L F は 30 秒で分解がおり、ヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) のキモトリプシンに対する消化耐性が示された。

40

また、表7に示す B u f f e r に溶解した h L F 及びヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) をゲルカラムクロマトグラフィー分析したところヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) はホモダイマーとして存在することが分かった (図22)。

図22パネルBは溶出時間とタンパク分子量の相関性を示すグラフである。クロマトグラフ (図22パネルA) で、青曲線 (「h L F / d h I g G F c」) は2量体を形成するための領域 (ヒンジ領域) を含むヒンジ付加型 h L F / h I g G F c 融合タンパク質の結果である。他方、緑曲線 (「h L F / m h I g G F c」) はヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) の結果である。h L F / m h I g G F c 及び h L F / d h I g G F c をゲルろ過すると、両者の溶出時間にほとんど差がないことが判明した。このこ

50

とから、ヒンジ欠損型融合タンパク質 (h L F / m h I g G F c) は、溶液中ではダイマーを形成していることが示された。

【産業上の利用可能性】

【 0 1 0 1 】

本発明は、改良された特性を有するラクトフェリン融合タンパク質、その用途及びその製造方法を提供する。

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> NRL PHARMA, INC.

<120> Lactoferrin-Fusion Protein and Method for Producing the Same

<130> PCT13-0023

10

<150> JP 2012-098085

<151> 2012-04-23

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer S_LFex_XhoI_ATG

<400> 1

30

ctcgagaatga aacttgcctt cctcgtc

27

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> primer AS_LFex_TAA_XbaI

<400> 2

tctagattac ttccctgagga attcac

26

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic oligonucleotide 10

 <400> 3
 aattctcag gaagatcct 20

 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 20

 <220>
 <223> synthetic oligonucleotide

 <400> 4
 ctagaggatc ctctctgagg 20

 30
 <210> 5
 <211> 946
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> hLF-hFc (Hinge-CH2-CH3) 40

 <400> 5

 Met Lys Leu Val Phe Leu Val Leu Leu Phe Leu Gly Ala Leu Gly Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Ala Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser
 20 25 30

Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys
 35 40 45

10

Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln
 50 55 60

Cys Ile Gln Ala Ile Ala Glu Asn Arg Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp
 65 70 75 80

20

Gly Gly Phe Ile Tyr Glu Ala Gly Leu Ala Pro Tyr Lys Leu Arg Pro
 85 90 95

Val Ala Ala Glu Val Tyr Gly Thr Glu Arg Gln Pro Arg Thr His Tyr
 100 105 110

30

Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Gly Ser Phe Gln Leu Asn Glu
 115 120 125

Leu Gln Gly Leu Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Arg Arg Thr Ala Gly
 130 135 140

40

Trp Asn Val Pro Ile Gly Thr Leu Arg Pro Phe Leu Asn Trp Thr Gly
 145 150 155 160

Pro Pro Glu Pro Ile Glu Ala Ala Val Ala Arg Phe Phe Ser Ala Ser

	165	170	175	
Cys Val Pro Gly Ala Asp Lys Gly Gln Phe Pro Asn Leu Cys Arg Leu				
	180	185	190	
Cys Ala Gly Thr Gly Glu Asn Lys Cys Ala Phe Ser Ser Gln Glu Pro				10
	195	200	205	
Tyr Phe Ser Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Arg Asp Gly Ala Gly				
	210	215	220	
Asp Val Ala Phe Ile Arg Glu Ser Thr Val Phe Glu Asp Leu Ser Asp				20
	225	230	235	240
Glu Ala Glu Arg Asp Glu Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asp Asn Thr Arg				
	245	250	255	
Lys Pro Val Asp Lys Phe Lys Asp Cys His Leu Ala Arg Val Pro Ser				30
	260	265	270	
His Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asn Gly Lys Glu Asp Ala Ile Trp				
	275	280	285	
Asn Leu Leu Arg Gln Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asp Lys Ser Pro				40
	290	295	300	
Lys Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro Ser Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe				
	305	310	315	320

Lys Asp Ser Ala Ile Gly Phe Ser Arg Val Pro Pro Arg Ile Asp Ser
 325 330 335

Gly Leu Tyr Leu Gly Ser Gly Tyr Phe Thr Ala Ile Gln Asn Leu Arg
 340 345 350

10

Lys Ser Glu Glu Glu Val Ala Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys
 355 360 365

Ala Val Gly Glu Gln Glu Leu Arg Lys Cys Asn Gln Trp Ser Gly Leu
 370 375 380

20

Ser Glu Gly Ser Val Thr Cys Ser Ser Ala Ser Thr Thr Glu Asp Cys
 385 390 395 400

Ile Ala Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly
 405 410 415

30

Gly Tyr Val Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala
 420 425 430

Glu Asn Tyr Lys Ser Gln Gln Ser Ser Asp Pro Asp Pro Asn Cys Val
 435 440 445

40

Asp Arg Pro Val Glu Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Arg Arg Ser
 450 455 460

Asp Thr Ser Leu Thr Trp Asn Ser Val Lys Gly Lys Lys Ser Cys His

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 930 935 940

Gly Lys
 945

10

<210> 6
 <211> 930
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> hLF-hFc (CH2-CH3)

20

<400> 6

Met Lys Leu Val Phe Leu Val Leu Leu Phe Leu Gly Ala Leu Gly Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Ala Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser
 20 25 30

30

Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys
 35 40 45

Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln
 50 55 60

40

Cys Ile Gln Ala Ile Ala Glu Asn Arg Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp
 65 70 75 80

Gly Gly Phe Ile Tyr Glu Ala Gly Leu Ala Pro Tyr Lys Leu Arg Pro
 85 90 95

Val Ala Ala Glu Val Tyr Gly Thr Glu Arg Gln Pro Arg Thr His Tyr
 100 105 110

10

Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Gly Ser Phe Gln Leu Asn Glu
 115 120 125

Leu Gln Gly Leu Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Arg Arg Thr Ala Gly
 130 135 140

20

Trp Asn Val Pro Ile Gly Thr Leu Arg Pro Phe Leu Asn Trp Thr Gly
 145 150 155 160

Pro Pro Glu Pro Ile Glu Ala Ala Val Ala Arg Phe Phe Ser Ala Ser
 165 170 175

30

Cys Val Pro Gly Ala Asp Lys Gly Gln Phe Pro Asn Leu Cys Arg Leu
 180 185 190

Cys Ala Gly Thr Gly Glu Asn Lys Cys Ala Phe Ser Ser Gln Glu Pro
 195 200 205

40

Tyr Phe Ser Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Arg Asp Gly Ala Gly
 210 215 220

Asp Val Ala Phe Ile Arg Glu Ser Thr Val Phe Glu Asp Leu Ser Asp

Ser Glu Gly Ser Val Thr Cys Ser Ser Ala Ser Thr Thr Glu Asp Cys
 385 390 395 400

Ile Ala Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly
 405 410 415

10

Gly Tyr Val Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala
 420 425 430

Glu Asn Tyr Lys Ser Gln Gln Ser Ser Asp Pro Asp Pro Asn Cys Val
 435 440 445

20

Asp Arg Pro Val Glu Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Arg Arg Ser
 450 455 460

Asp Thr Ser Leu Thr Trp Asn Ser Val Lys Gly Lys Lys Ser Cys His
 465 470 475 480

30

Thr Ala Val Asp Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Leu
 485 490 495

Phe Asn Gln Thr Gly Ser Cys Lys Phe Asp Glu Tyr Phe Ser Gln Ser
 500 505 510

40

Cys Ala Pro Gly Ser Asp Pro Arg Ser Asn Leu Cys Ala Leu Cys Ile
 515 520 525

Gly Asp Glu Gln Gly Glu Asn Lys Cys Val Pro Asn Ser Asn Glu Arg

530	535	540	
Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Asn Ala Gly			
545	550	555	560
Asp Val Ala Phe Val Lys Asp Val Thr Val Leu Gln Asn Thr Asp Gly			10
	565	570	575
Asn Asn Asn Glu Ala Trp Ala Lys Asp Leu Lys Leu Ala Asp Phe Ala			
	580	585	590
Leu Leu Cys Leu Asp Gly Lys Arg Lys Pro Val Thr Glu Ala Arg Ser			20
	595	600	605
Cys His Leu Ala Met Ala Pro Asn His Ala Val Val Ser Arg Met Asp			
610	615	620	
Lys Val Glu Arg Leu Lys Gln Val Leu Leu His Gln Gln Ala Lys Phe			30
625	630	635	640
Gly Arg Asn Gly Ser Asp Cys Pro Asp Lys Phe Cys Leu Phe Gln Ser			
	645	650	655
Glu Thr Lys Asn Leu Leu Phe Asn Asp Asn Thr Glu Cys Leu Ala Arg			40
	660	665	670
Leu His Gly Lys Thr Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Pro Gln Tyr Val			
	675	680	685

Ala Gly Ile Thr Asn Leu Lys Lys Cys Ser Thr Ser Pro Leu Leu Glu
 690 695 700

Ala Cys Glu Phe Leu Arg Lys Asp Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 705 710 715 720

10

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 725 730 735

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 740 745 750

20

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 755 760 765

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 770 775 780

30

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 785 790 795 800

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 805 810 815

40

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 820 825 830

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

835

840

845

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 850 855 860

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val 10
 865 870 875 880

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 885 890 895

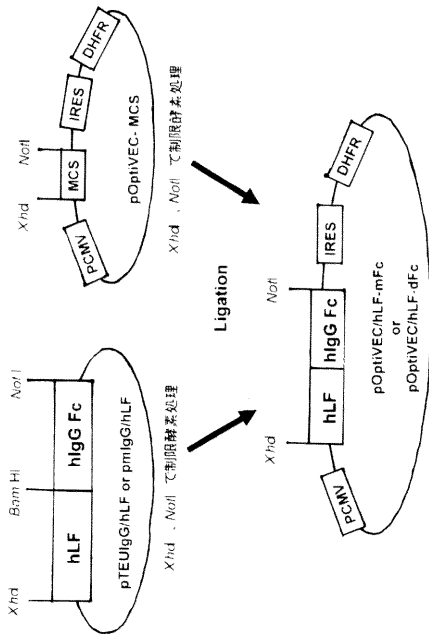
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His 20
 900 905 910

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 915 920 925

Gly Lys 30
 930

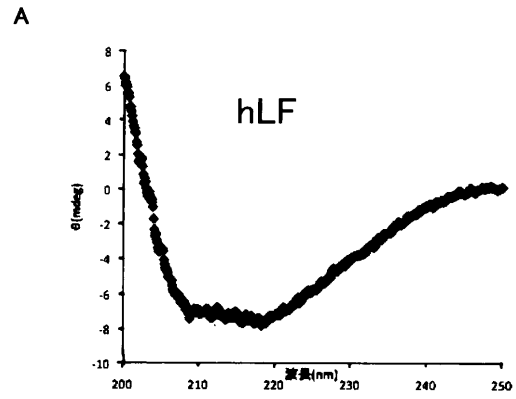
【 図 5 】

図 5



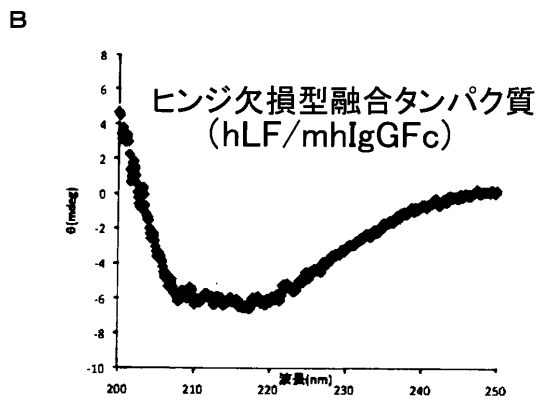
【 図 1 2 A 】

図 12A



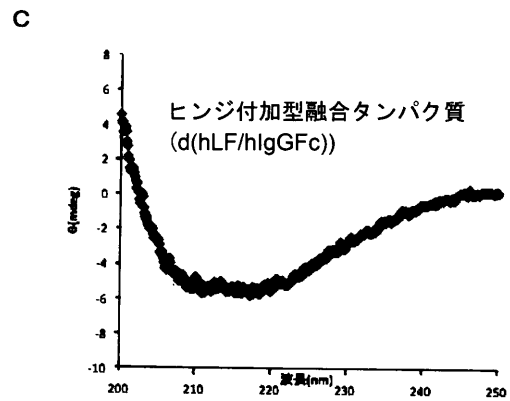
【 図 1 2 B 】

図 12B



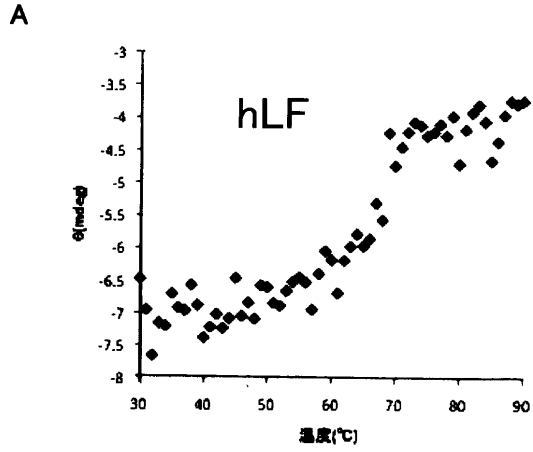
【 図 1 2 C 】

図 12C



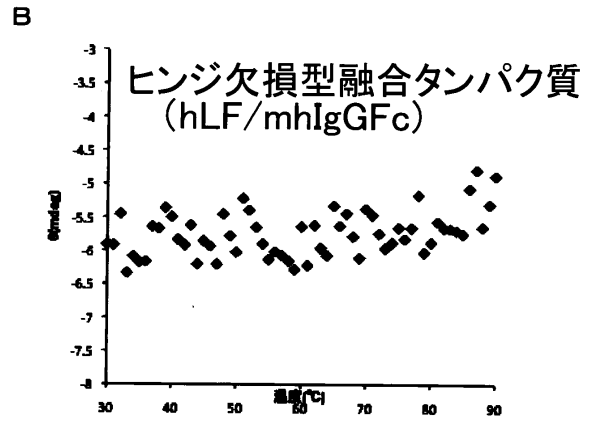
【 図 1 3 A 】

図 13A



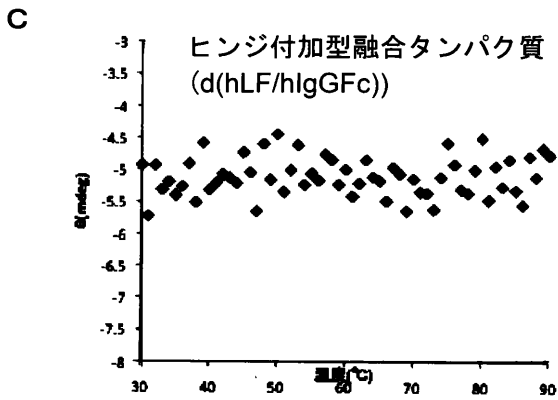
【 図 1 3 B 】

図 13B



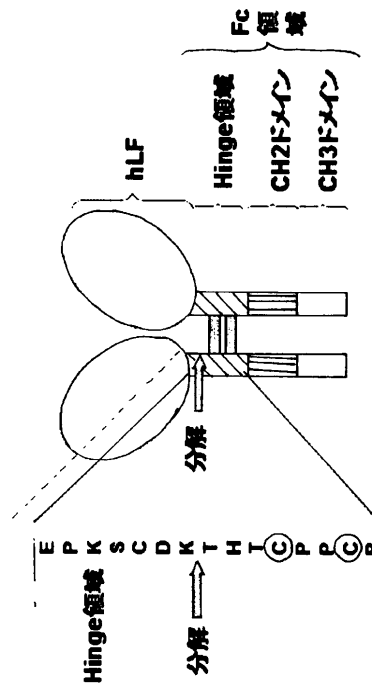
【 図 1 3 C 】

図 13C



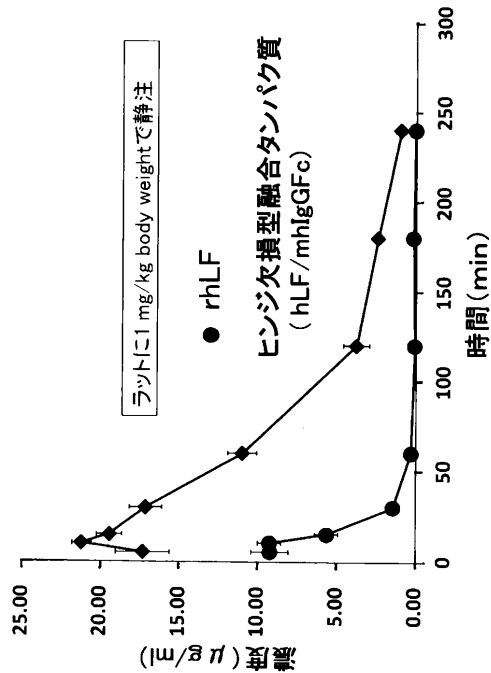
【 図 1 5 B 】

図 15B



【 図 16 】

図 16



【 図 17 A 】

図 17A

MKLVFLVLLFLGALGLCLAGRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRK
 VRGPPVSCIKRDSPIQCIQAIENRADAVTLDGGFIYEAGLAPYKLRPVAA
 EYVGTERQPRTHYYAVAVVKKGGSFQLNELQGLKSCHTGLRRTAGWNVP
 IGTLRPFLNWTGPPEIEAAVARFFSASCVPADKGGQFPNLCRLCAGTGE
 NKCAFSSQEPYFSYSGAFKCLRDGAGDVAFIRESTVFEDLSDEAERDEYE
 LLCPDNTRKPVDFKDKCHLARVP SHAVVARSVNGKEDAIWNLLRQAQE
 KFGKDKSPKFQFLGSPSGQKDLLFKDSAIGFSRVPPRIDSGLYLGSGYFT
 AIQNLRKSEEEVAARRARVVWCAVGEQELRKCQWWSGLSEGSVTCSSAS
 TTEDCIALVLKGEADAMSLDGGYVYTAGKCGLVPVLAENYKSSQSSDPD
 PNCVDRPVEGYLAVAVRRSDTSLTWN SVKGGKKSCHTAVDRTAGWNIPM
 GLLFNQGTGSKFDEYFSQSCAPGSDPRSNLCALCIGDEQGENKCPNSN
 ERYYGTYGAFRCLAENAGDVAFVKDVTVLQNTDGNNNEAWAKDLKLD
 FALLCLDGKRKPVTEARSCHLAMAPNHAVVSRMDKVERLKQVLLHQQA
 KFRNGSDCPDKFCLFQSETKNLLFNDNTECLARLHGKTTYEKYLG PQ
 YVAGITNLKCCSTSPLEACEFLRKDPEEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALH
 NHYTKLSLSLSPGK

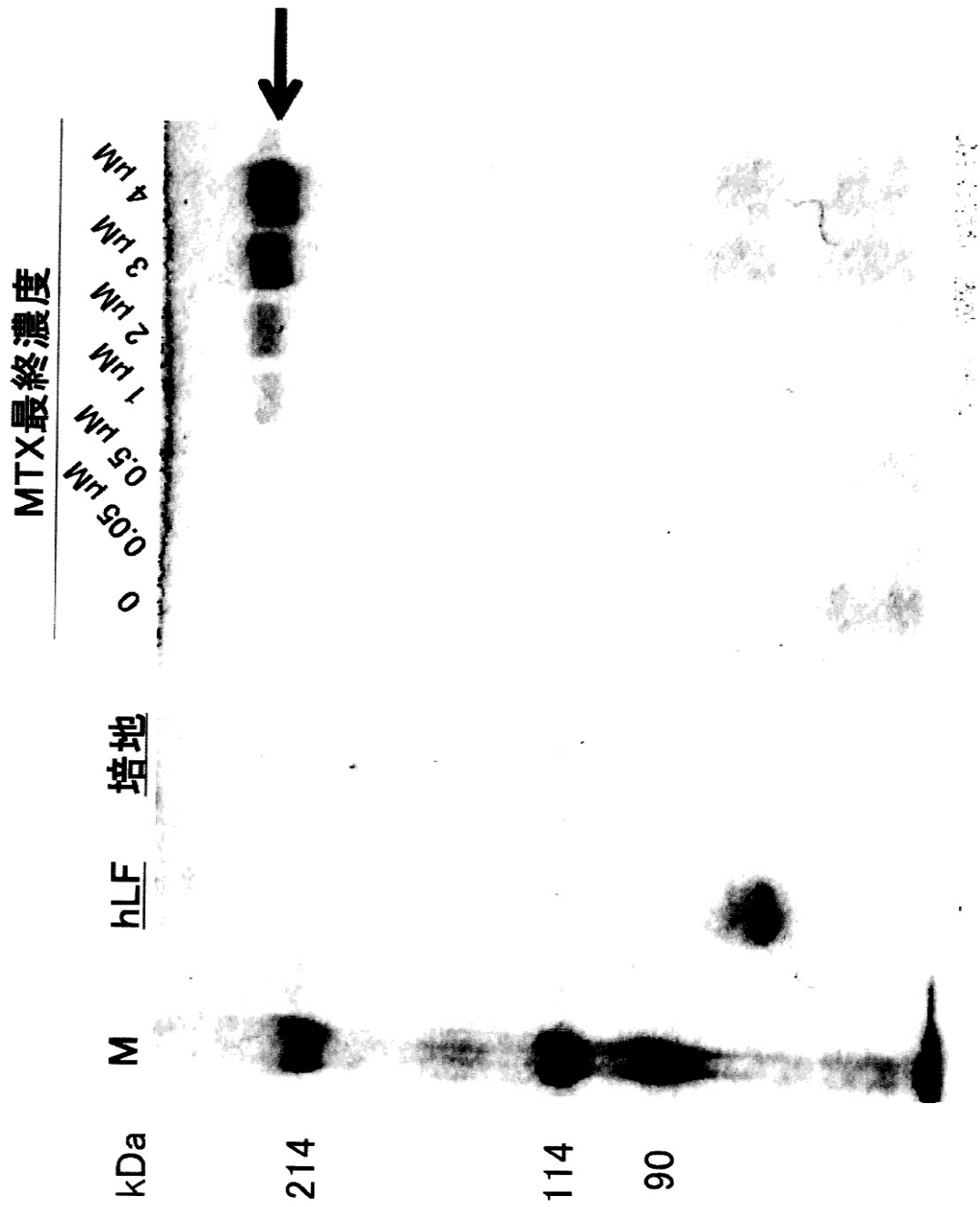
【 図 17 B 】

図 17B

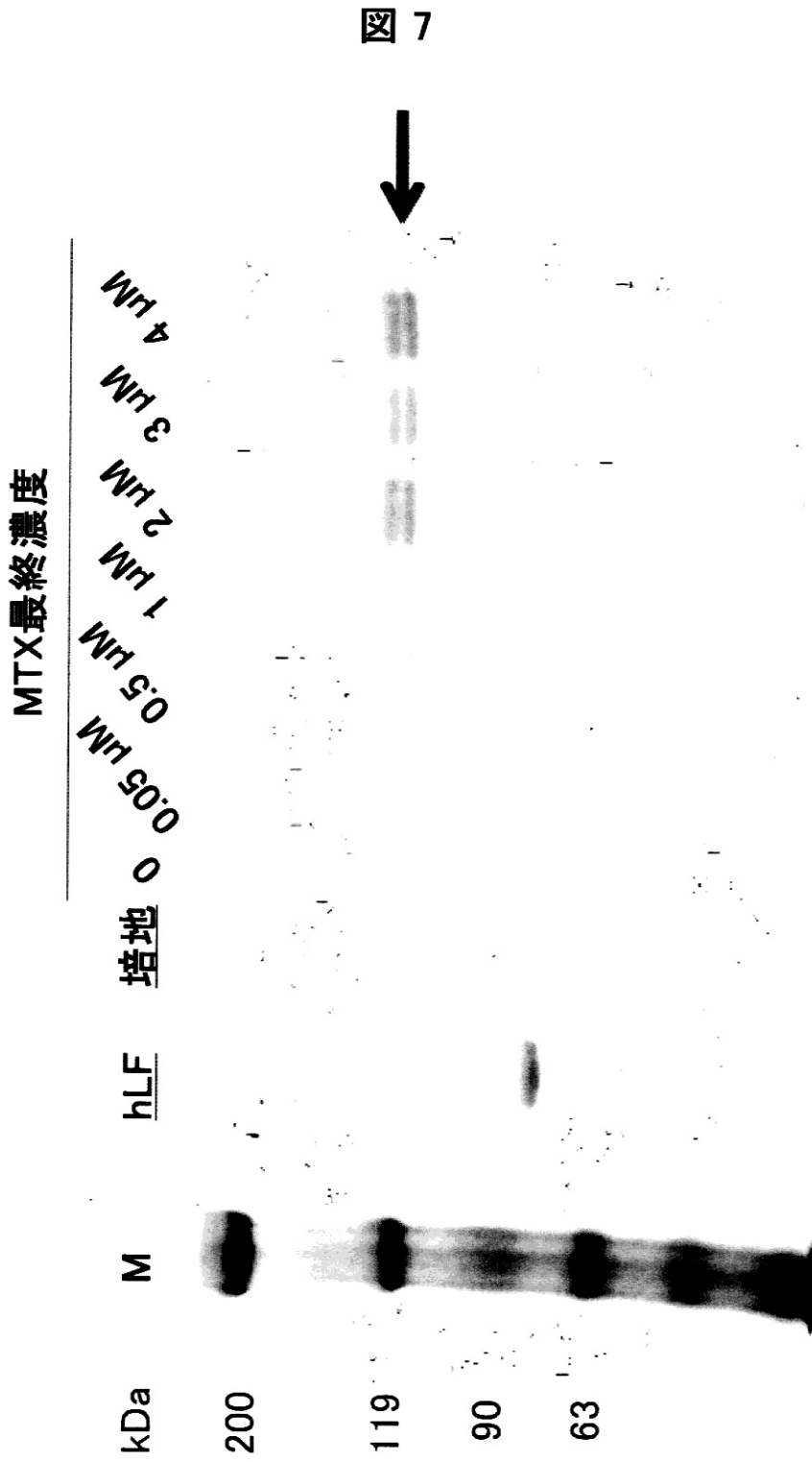
MKLVFLVLLFLGALGLCLAGRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRK
 VRGPPVSCIKRDSPIQCIQAIENRADAVTLDGGFIYEAGLAPYKLRPVAA
 EYVGTERQPRTHYYAVAVVKKGGSFQLNELQGLKSCHTGLRRTAGWNVP
 IGTLRPFLNWTGPPEIEAAVARFFSASCVPADKGGQFPNLCRLCAGTGE
 NKCAFSSQEPYFSYSGAFKCLRDGAGDVAFIRESTVFEDLSDEAERDEYE
 LLCPDNTRKPVDFKDKCHLARVP SHAVVARSVNGKEDAIWNLLRQAQE
 KFGKDKSPKFQFLGSPSGQKDLLFKDSAIGFSRVPPRIDSGLYLGSGYFT
 AIQNLRKSEEEVAARRARVVWCAVGEQELRKCQWWSGLSEGSVTCSSAS
 TTEDCIALVLKGEADAMSLDGGYVYTAGKCGLVPVLAENYKSSQSSDPD
 PNCVDRPVEGYLAVAVRRSDTSLTWN SVKGGKKSCHTAVDRTAGWNIPM
 GLLFNQGTGSKFDEYFSQSCAPGSDPRSNLCALCIGDEQGENKCPNSN
 ERYYGTYGAFRCLAENAGDVAFVKDVTVLQNTDGNNNEAWAKDLKLD
 FALLCLDGKRKPVTEARSCHLAMAPNHAVVSRMDKVERLKQVLLHQQA
 KFRNGSDCPDKFCLFQSETKNLLFNDNTECLARLHGKTTYEKYLG PQ
 YVAGITNLKCCSTSPLEACEFLRKDPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTKLSLSLSPGK

【 図 6 】

図 6

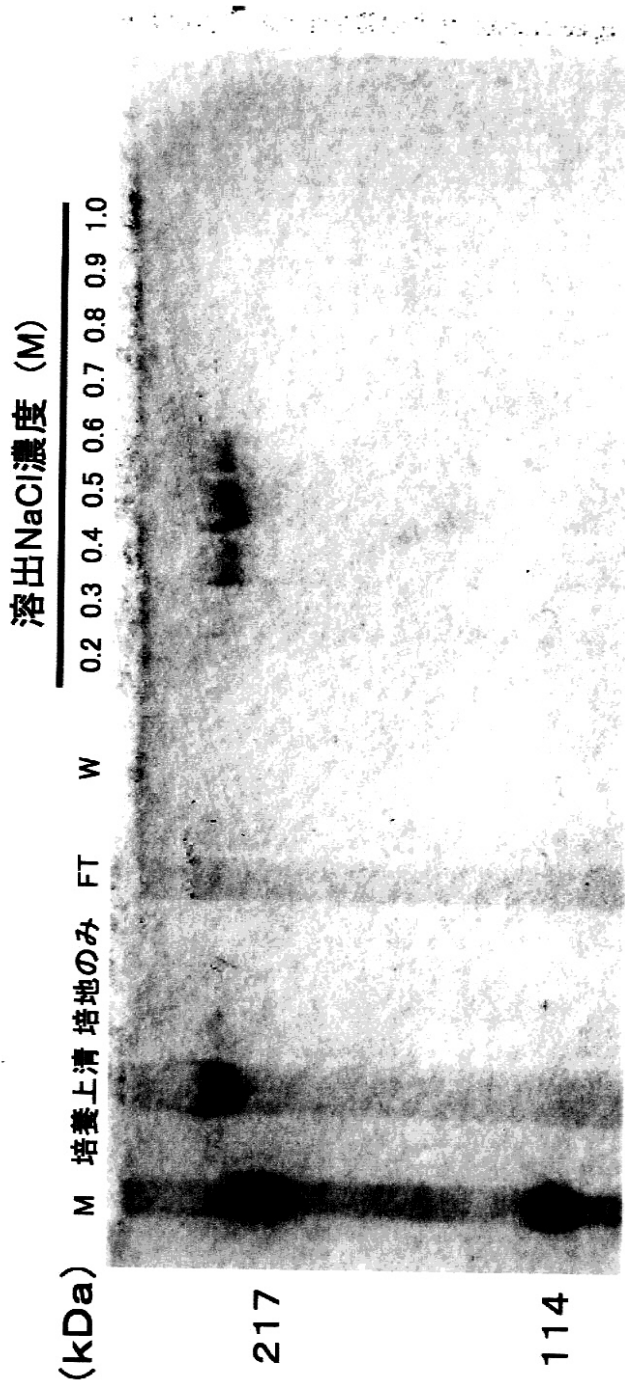


【 図 7 】

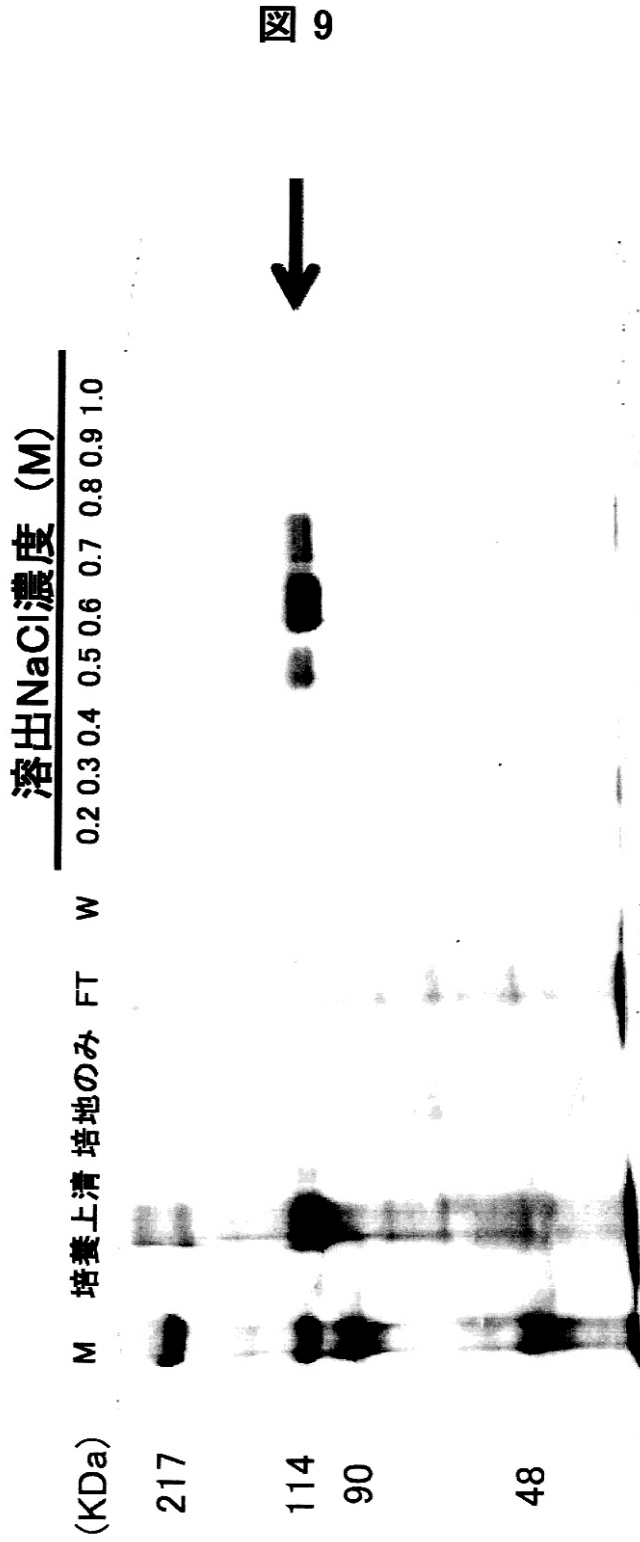


【 図 8 】

図 8

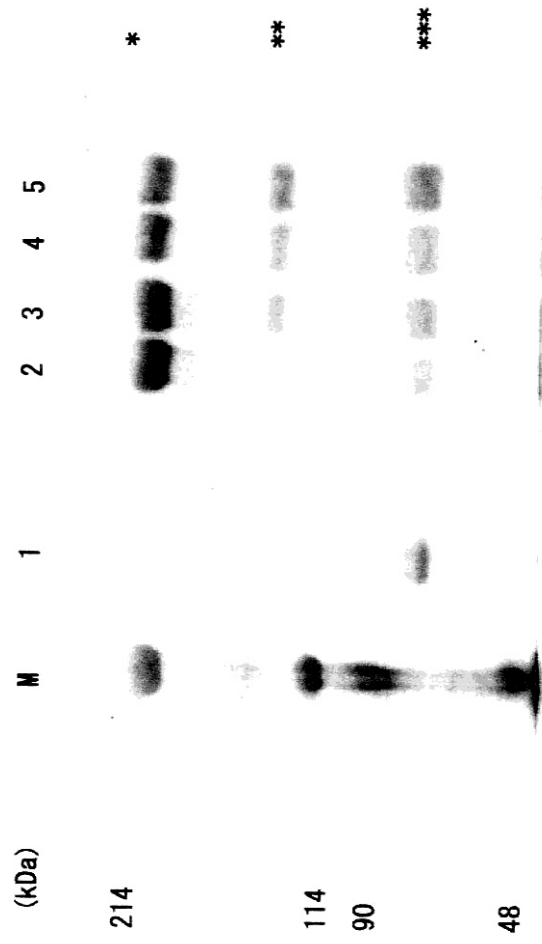


【 図 9 】



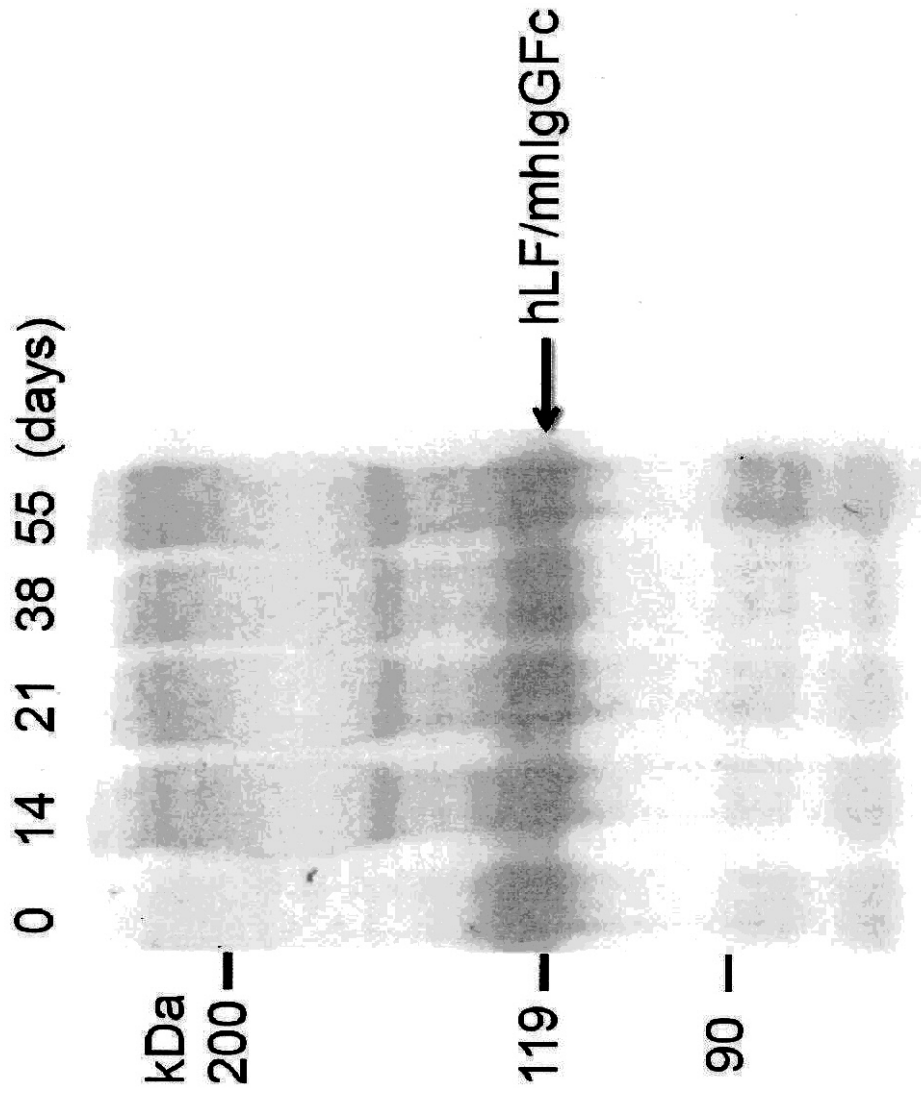
【 14 】

14



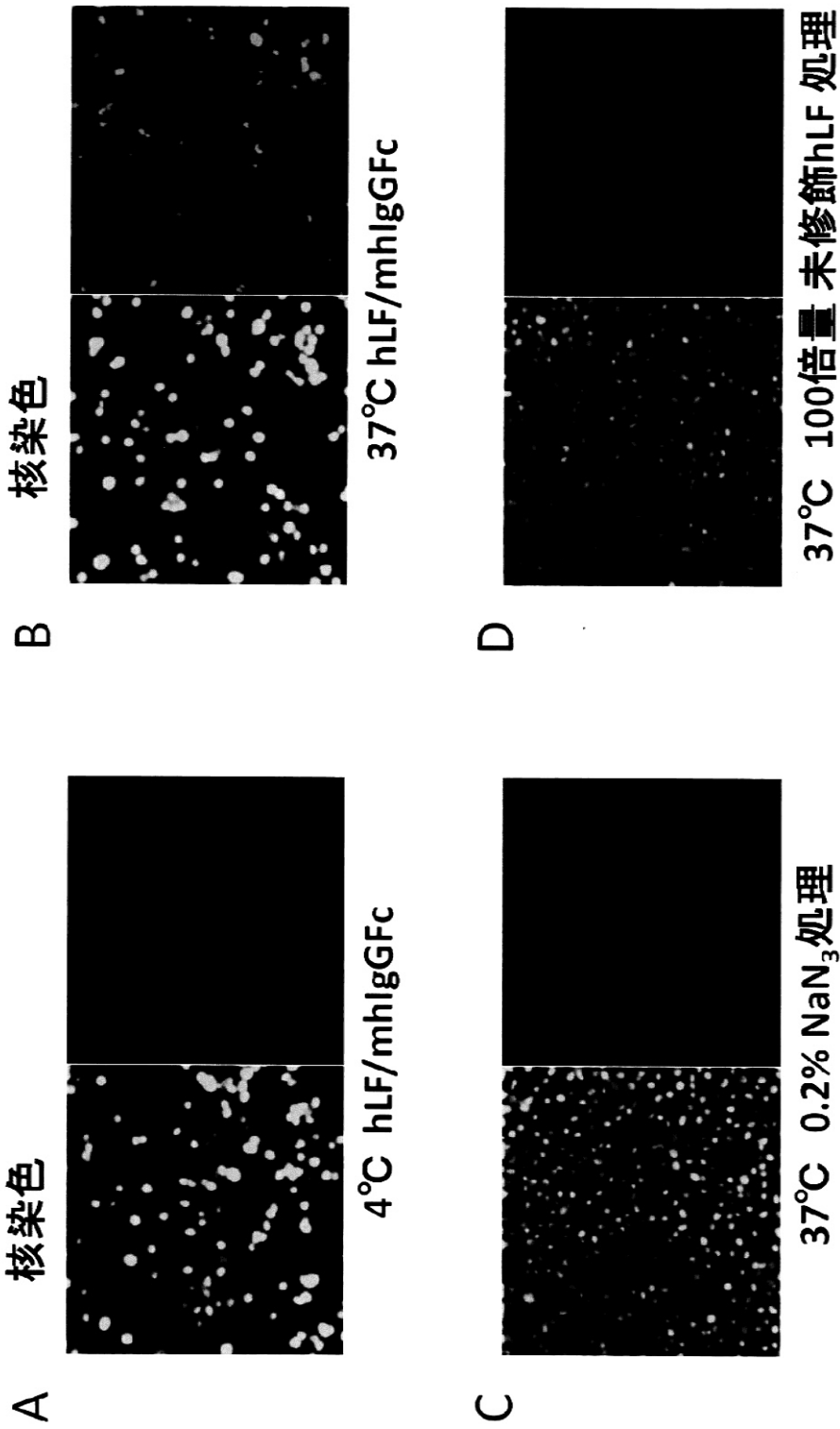
【 18 】

18



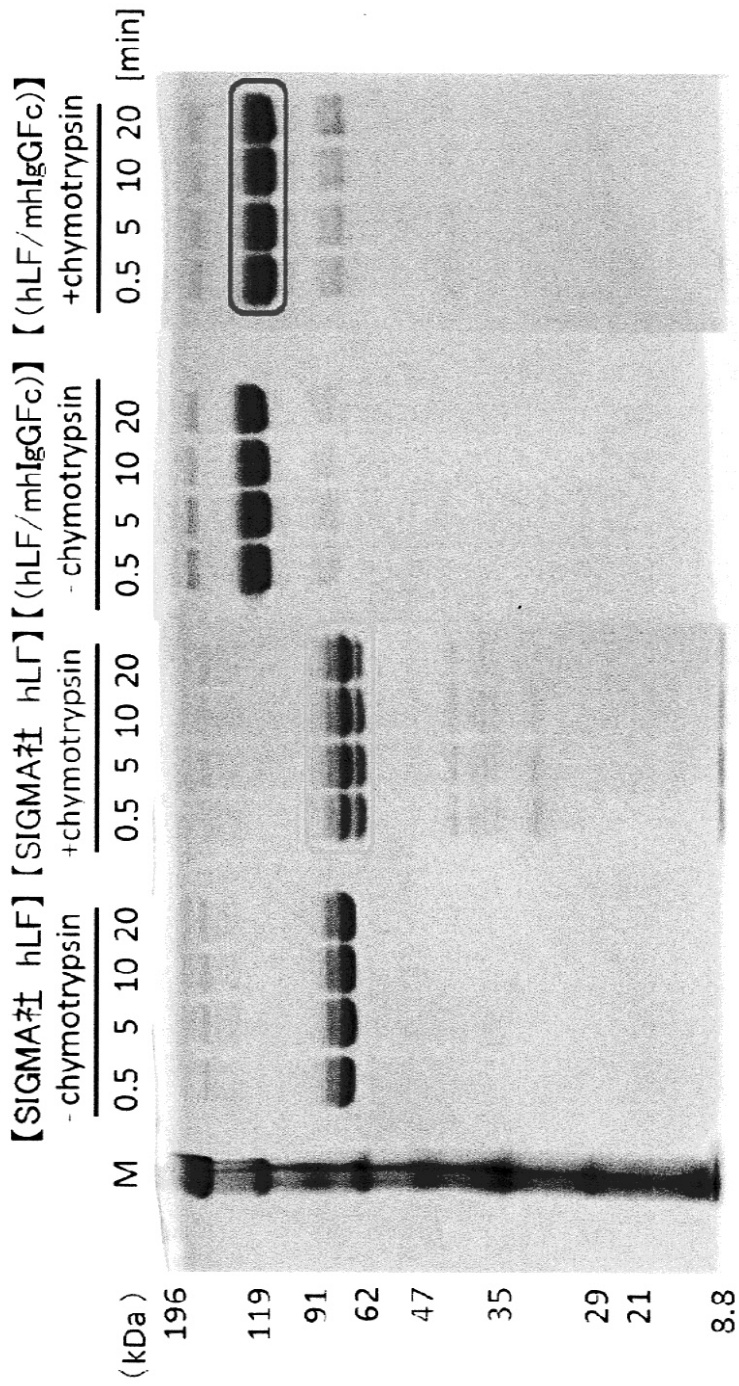
【 图 19 】

图 19



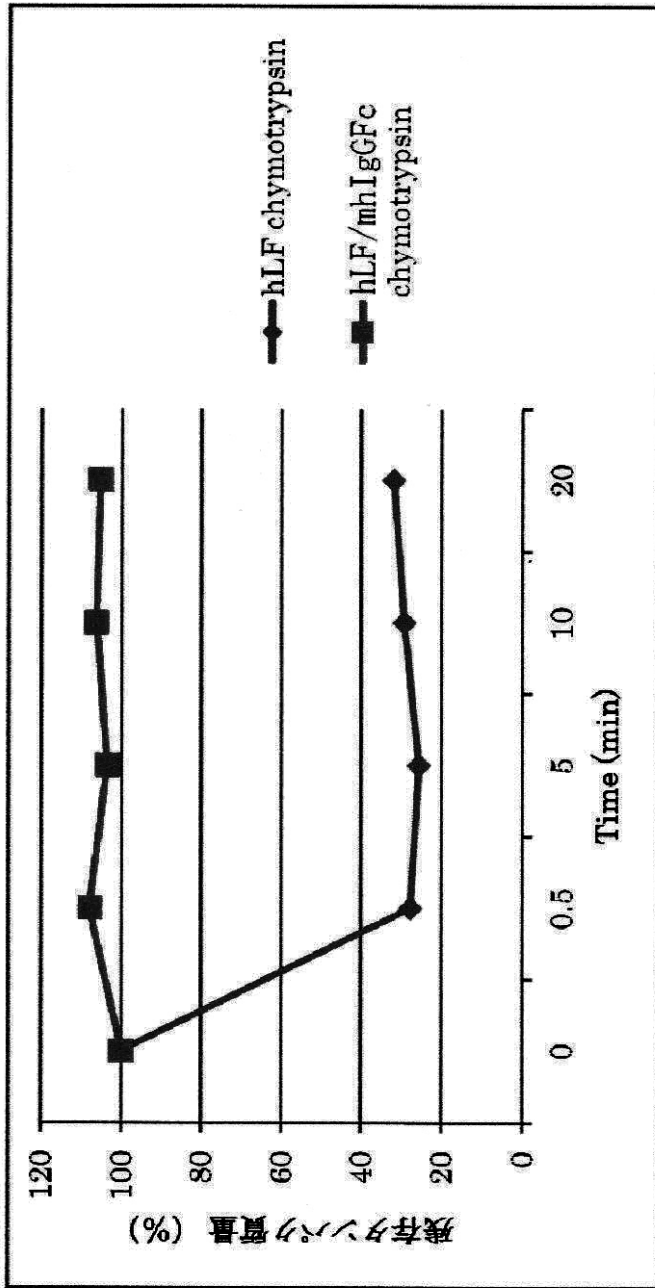
【 20 】

20



【 図 2 1 】

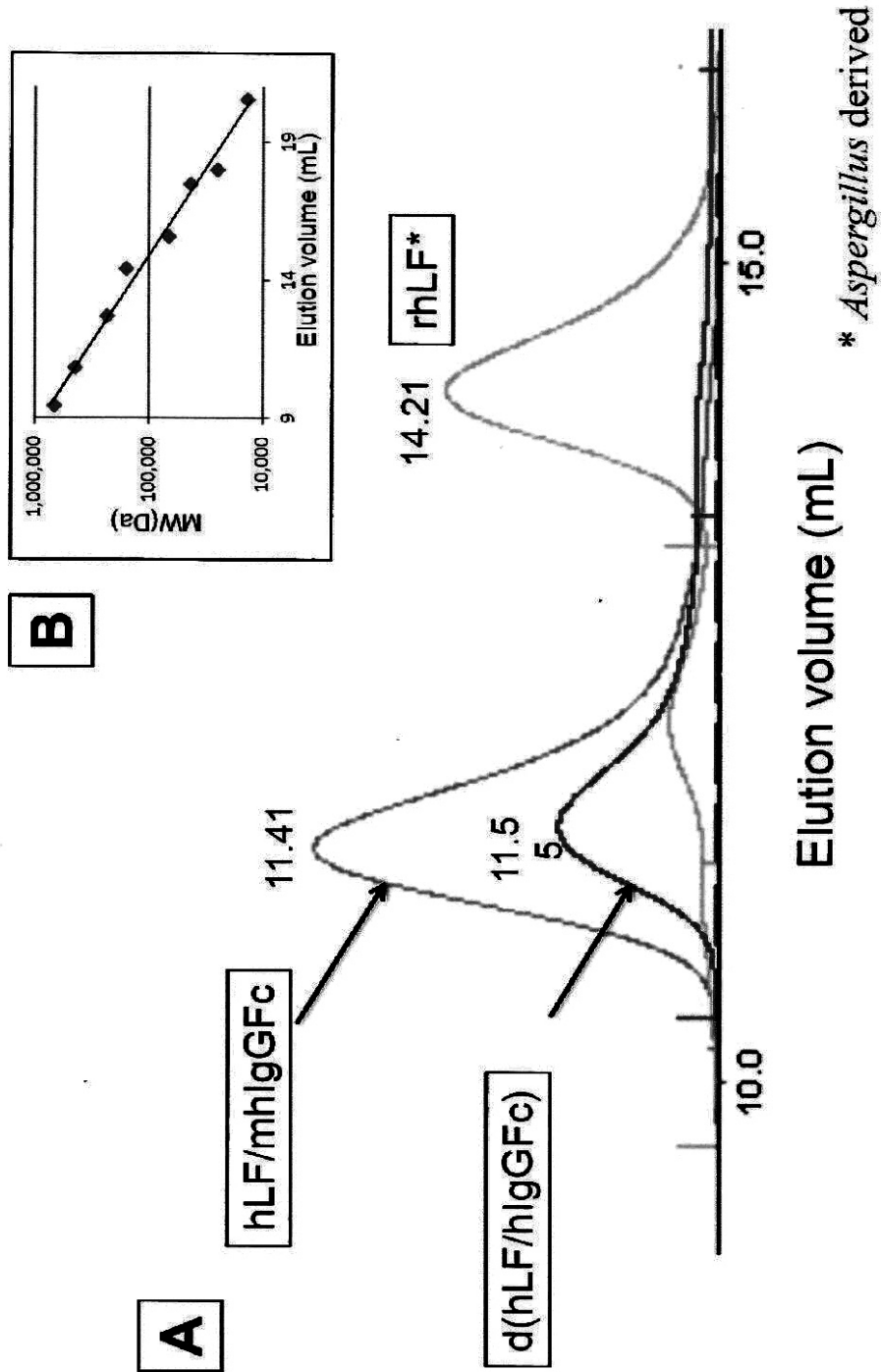
図 21



キモトリプシン耐性の解析結果

【 2 2 】

22



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
A 0 1 K	67/027	(2006.01)	A 0 1 K	67/027	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
A 0 1 H	5/00	(2006.01)	A 0 1 H	5/00	A
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	37/14	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	15/12	(2006.01)	A 6 1 P	15/12	
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P	25/08	
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P	25/24	
A 6 1 P	25/20	(2006.01)	A 6 1 P	25/20	
A 6 1 P	1/02	(2006.01)	A 6 1 P	1/02	
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00	
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P	13/08	
A 6 1 P	13/02	(2006.01)	A 6 1 P	13/02	
A 6 1 P	1/10	(2006.01)	A 6 1 P	1/10	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	

審査官 長部 喜幸

- (56)参考文献 特表2003-512011(JP,A)
 特表2002-520045(JP,A)
 特表2000-511424(JP,A)
 特表2010-514699(JP,A)
 特表2010-531134(JP,A)
 特表2008-509153(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 19/00
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 WPI