

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6714902号
(P6714902)

(45) 発行日 令和2年7月1日(2020.7.1)

(24) 登録日 令和2年6月10日(2020.6.10)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 P 21/02 (2006.01) C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 N 15/62 (2006.01) C 1 2 N 15/62 Z N A

請求項の数 10 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2016-508172 (P2016-508172)	(73) 特許権者	517409712
(86) (22) 出願日	平成26年4月17日 (2014.4.17)		ニューマファーム ゲーエムペーハー
(65) 公表番号	特表2016-515396 (P2016-515396A)		ドイツ連邦共和国、デュッセルドルフ 4
(43) 公表日	平成28年5月30日 (2016.5.30)		0225 メロヴィンガーブラッツ 1エ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/057887		ー
(87) 国際公開番号	W02014/170430	(74) 代理人	110000877
(87) 国際公開日	平成26年10月23日 (2014.10.23)		龍華国際特許業務法人
審査請求日	平成28年5月6日 (2016.5.6)	(72) 発明者	シュミット、ルッツ
審査番号	不服2018-14737 (P2018-14737/J1)		ドイツ連邦共和国、デュッセルドルフ 4
審査請求日	平成30年11月5日 (2018.11.5)		0225 ウニヴェルジテーツシュトラ
(31) 優先権主張番号	13164098.9		セ 1 ハイニンリッヒーハイネーウニヴェ
(32) 優先日	平成25年4月17日 (2013.4.17)		ルジテーツ デュッセルドルフ内
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチドおよびタンパク質の発現のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

関心対象の組換えペプチド (P e O I) またはタンパク質 (P r O I) を生成するための方法であり、

(a) 少なくとも1つの P e O I または P r O I と、タイプ1分泌系 (T 1 S S) の少なくとも1つのアロクライトまたはその断片と、を含む融合タンパク質を符号化する核酸分子を宿主細胞に導入する段階であって、当該段階において、前記宿主細胞は、外来性の A T P 結合カセット (A B C) トランスポーター、外来性の膜融合タンパク質 (M F P)、および/または外来性の外膜タンパク質 (O M P) を発現しない段階と、

(b) 前記融合タンパク質の発現を可能とする条件下で前記宿主細胞を培養する段階であって、当該段階において、前記融合タンパク質は、封入体 (I B) の形態で発現する段階と、

(c) 前記組換え融合タンパク質を前記宿主細胞から単離する段階と、

(d) 前記 P e O I または P r O I が機能的立体配座に折り畳まれることを可能とする条件に前記組換え融合タンパク質を晒す段階と

を備え、

前記 T 1 S S のアロクライトは、H l y A 及び L i p A から成る群から選択され、封入体の機能的立体配座への効率的な復元を可能にし、

前記核酸分子の前記 T 1 S S のアロクライトまたはその断片を符号化する部分は、少なくとも1つの共通配列 G G x G x D x U x からなる G G 反復配列を符号化する核酸配列を

10

20

有し、xは任意のアミノ酸であり得、Uは、疎水性の、大きなアミノ酸であり、

前記核酸分子の前記T1SSのアロクライトまたはその断片を符号化する部分は、配列番号4のアミノ酸配列で表される野生型のHlyA1または配列番号38の2-242残渣で表される野生型のLipA1に対応する部分に対し、少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを符号化する核酸配列を有する、方法。

【請求項2】

前記核酸分子の前記T1SSのアロクライトまたはその断片を符号化する部分は、SEQ ID NO: 2に明記されているアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列から成るHlyAを符号化する核酸配列を有する、請求項1に記載の方法。

10

【請求項3】

前記核酸分子の前記T1SSのアロクライトまたはその断片を符号化する部分は、SEQ ID NO: 4に明記されているアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 4のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列から成る、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

発現培地は、20.0mMまたはそれより少量のCa²⁺を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記宿主細胞の内在性ABCトランスポーター遺伝子、内在性MFP遺伝子、および/または内在性OMP遺伝子の発現、または前記宿主細胞における対応する遺伝子産物の活性は阻害され、または輸送が非効率的である、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項6】

前記宿主細胞は、内在性ABCトランスポーター、内在性MFP、および/または内在性OMPを発現しない、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

ステップ(d)において、前記組換えペプチドまたはタンパク質は再折り畳み緩衝液に曝され、前記再折り畳み緩衝液は、少なくとも0.01mMのCa²⁺を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項8】

(I)前記宿主細胞は原核細胞であり、および/または、
(II)前記発現は、最小培地で行われ、および/または、
(III)前記組換え融合ペプチドまたはタンパク質は、親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびこれらの複数の組み合わせから選択される方法を用いて精製され、および/または、

(IV)前記方法は、前記組換え融合タンパク質を、前記融合タンパク質の開裂に適したプロテアーゼと接触させて、別個の複数の分子として前記アロクライトおよび前記ペプチドまたはPROIを生成する追加のステップ(e)を備え、および/または、

40

(V)前記方法は、化学的処理により前記組換え融合タンパク質を開裂して、別個の複数の分子として前記アロクライトおよび前記PEOIまたはPROIを生成する追加のステップ(e)を備え、および/または、

(VI)前記方法は、(IV)または(V)に定義されている、前記PEOIまたはPROIの精製がその後続くことになるステップ(e)を備える、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記少なくとも1つのPEOIまたはPROIは、ナイシン、HCRF、IFABP、IFNA2、MBP、SEQ ID NO: 6に明記されているアミノ酸配列から成るペプチド101、SEQ ID NO: 8に明記されているアミノ酸配列から成るペプチド

50

102、SEQ ID NO: 10に明記されているアミノ酸配列から成るペプチド103、SEQ ID NO: 63に明記されているアミノ酸配列から成るMAB-40、SEQ ID NO: 64に明記されているアミノ酸配列から成るMab-42、SEQ ID NO: 61に明記されているアミノ酸配列から成るペプチド、サケカルシトニン、ヒトカルシトニン、SEQ ID NO: 62に明記されているアミノ酸配列から成る阻害物質ペプチド1、SEQ ID NO: 53に明記されているアミノ酸配列から成るペプチド238、SEQ ID NO: 54に明記されているアミノ酸配列から成るペプチド239、SEQ ID NO: 55に明記されているアミノ酸配列から成るペプチド240またはSEQ ID NO: 56に明記されているアミノ酸配列から成るペプチド241から成る群から選択される、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項10】

前記融合タンパク質を符号化する前記核酸分子は、前記融合タンパク質の発現を変調させる調節ヌクレオチド配列をさらに含む、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願発明は分子生物学、組換えペプチドおよびタンパク質の発現の分野に属し、関心対象の組換えペプチドおよびタンパク質の効率的な生成のための、タイプ1分泌系の基質/アロクライト(allocrine)またはその断片の核酸配列を含む方法に関する。アロクライトまたはその断片は、封入体(IB)としての関心対象のペプチドおよびタンパク質の発現を向上させ、IB-タグとして機能する。

20

【背景技術】

【0002】

近年、工業プロセスに用いられる組換えタンパク質/酵素生成は、ますます重要になってきており、近いうちに、多くの工業プロセスが組換え技術を伴うであろうと予想される。現在、生理活性のペプチドおよびタンパク質が、例をいくつか挙げるとすれば、糖尿病(インスリン)、ウイルス感染症および白血病(インターフェロン)、免疫系の病気(インターロイキン)、および赤血球の欠乏(エリスロポエチン)などの様々な病気における治療剤として用いられている。加えて、多量のタンパク質およびペプチドが、例えば、パルプおよび紙産業、繊維、食品産業、介護および化粧品産業、精糖、廃水処理、アルコール飲料の生産を含む様々な工業的用途のために、および新たな医薬品の生成のための触媒として必要とされている。

30

【0003】

しかし、天然の折り畳みを有する所望されるペプチドおよびタンパク質を大量に、かつ高い純度で得るためには多大な努力が必要とされるので、組換えペプチドおよびタンパク質の発現はまだ限定されている。

【0004】

概して、産物の精製はコストが高く、同様の特性をもつタンパク質は互いから分離するのが困難であるので、特に純度100%への最終的なステップは、コストを指数関数的に増加させる傾向にある(Hacking, A. J. (1986) Economic aspects of biotechnology, Cambridge University Press)。

40

【0005】

多くの場合、特に、関心対象のペプチド(ProI)または関心対象のタンパク質(ProI)がかなり短く、通常は可溶性であり、および/または宿主細胞内でタンパク質分解してしまうときに、不溶性の形態でタンパク質またはペプチドを発現させるのが有用である。不溶性の形態でのペプチドの生成は、単純な回収の容易化と、所望されないタンパク質分解からのペプチドの保護との両方を達成する。不溶性の形態でペプチドを生成するための1つの手段は、IBの形成を誘発する少なくとも1つの可溶性タグ(すなわち、封入体(IBタグ))を融合ペプチドに含めることにより、不溶性融合ペプチド/タンパク質

50

の一部としてペプチドを組み換えで生成することである。典型的には、融合タンパク質は、P e O IまたはP r O Iがその後に融合タンパク質から回収され得るよう、少なくとも1つの開裂可能なペプチドリンカーを含むよう設計される。融合タンパク質は、複数のI B - タグ、開裂可能なペプチドリンカー、およびP e O IまたはP r O Iを符号化する領域を含むよう設計され得る。

【0006】

不溶性タンパク質の発現を促進するペプチドタグを含む融合タンパク質は、当技術分野で周知である。典型的には、キメラタンパク質または融合タンパク質のタグ部分は大きく、融合タンパク質が不溶性となる可能性が高くなる。典型的に用いられる大きいペプチドの複数の例は、限定されないが以下を含む。クロラムフェニコールアセチル基転移酵素 (Dykes et al., (1988) Eur. J. Biochem., 174: 411)、ガラクトシダーゼ (Schellenberger et al., (1993) Int. J. Peptide Protein Res., 41: 326、Shen et al., (1984) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 281: 4627、およびKempe et al., (1985) Gene, 39: 239)、グルタチオン-S-転移酵素 (Ray et al., (1993) Bio/Technology, 11: 64、およびHancock et al. (WO94/04688))、リプロキナーゼのN末端 (米国特許第5, 206, 154号およびLai et al., (1993) Antimicrob. Agents & Chem., 37: 1614、バクテリオファージT4 gp55タンパク質 (Gramm et al., (1994) Bio/Technology, 12: 1017)、バクテリアステロイドイソメラーゼタンパク質 (Kuliopulos et al., (1994) J. Am. Chem. Soc. 116: 4599、および米国特許第5, 648, 244)、ユビキチン (Pilon et al., (1997) Biotechnol. Prog., 13: 374-79)、ウシプロキモシン (Haught et al., (1998) Biotechnol. Bioengineer. 57: 55-61)、殺菌/透過性増加タンパク質 ("BPI"; Better, M. D. およびGavit, P. D., 米国特許第6, 242, 219号)。当技術分野は、この技術の具体的な例で満ちている。例えば、特定のプロテアーゼから、発現したキメラタンパク質を保護するタグについて教示している米国特許第6, 037, 145号、所望されるタンパク質の容易な精製のためのタグおよび開裂可能なリンカーを有する融合タンパク質の合成について教示している米国特許第5, 648, 244号、並びに、特にキメラタンパク質またはペプチドの非溶解性を高めるよう設計されたアミノ酸組成を含む融合タグについて説明している米国特許第5, 215, 896号、第5, 302, 526号、第5, 330, 902号、および米国特許出願公開第2005/221444号を参照されたい。

【0007】

しかし、当技術分野で公知の方法は、P e O IまたはP r O Iを再び折り畳む解決法を何ら提供していない。したがって、当技術分野にはまだ、組換えP e O IおよびP r O Iの向上した生成を可能とする方法の必要性がある。

【0008】

本発明者らは、溶血毒A (HlyA) またはリパーゼA (LipA) 遺伝子断片を含む核酸配列を備える方法が、当技術分野における上記の必要性を克服することを見出した。両方の遺伝子は、ほとんどの場合にグラム陰性菌において生じ、周辺基質の中間物を形成することなくそれらの同族の基質を単一のステップで細胞基質から細胞外培地に排出するタイプ1分泌系 (T1SS) の一部である。T1SSファミリーのうち、輸送基質としてHlyAを伴う、Bakkes et al. によって説明されているHly T1SSは、共通配列GGxGxDxUx (x: 任意のアミノ酸残基、U: 大きい疎水性アミノ酸残基) のいわゆるGG反復配列を有しているので特に関心が高い (Ostolaza, H. et al., (1995) Eur. J. Biochem. 228, 39-44)。これらGG反復配列はCa²⁺イオンを高い親和性で結合する。この結合イベントは、Ca

Ca^{2+} 濃度が細胞内部(高いnM)の Ca^{2+} 濃度と比較し高い(最大mMの範囲)外部へのT1SSアロクライトの分泌の後に起こる。GG反復配列に結合している Ca^{2+} は、アロクライトの天然型の活性形態への折り畳みに触媒作用を及ぼし、 Ca^{2+} イオンは、折り畳みヘルパー/シャペロンとしての役割を担う(Jumpertz, T. et al., Microbiology 156, 2495-2505, doi:mic.0.038562-0 [pii])。大腸菌のHlyA T1SSの更なる成分は、ATP結合カセット(ABC)トランスポーターである内膜タンパク質HlyB、外膜タンパク質(OMP)TolC、および内膜における膜融合タンパク質(MFP)HlyDである。

【発明の概要】

【0009】

10

第1態様において、本願発明は、組換えPeOIまたはPrOIを生成するための方法に関し、方法は、(a)少なくとも1つのPeOIまたはPrOIを含む融合タンパク質を符号化する核酸分子と、T1SSの少なくとも1つのアロクライトまたはその断片とを、宿主細胞に導入する段階であり、宿主細胞は、T1SSの異種のABCトランスポーター、異種のMFP、および/または異種のOMPを発現しない段階と、(b)融合タンパク質の発現を可能とする条件下で宿主細胞を培養する段階であり、融合タンパク質は、IBの形態で発現する段階と、(c)組換え融合タンパク質を宿主細胞から単離する段階と、(d)PeOIまたはPrOIが機能的立体配座へと折り畳まれることを可能とする条件に組換え融合タンパク質を晒す段階とを備える。

【0010】

20

様々な実施形態において、T1SSのアロクライトは、HlyA、CyaA、EhxA、LktA、PlLktA、PasA、PvxA、MmxA、LtxA、ApxIA、ApxIIA、ApxIIIA、ApxIVA、ApxI、ApxII、AqxA、VcRtxA、VvRtxA、MbxA、RTX細胞毒素、RtxL1、RtxL2、FrhA、LipA、TliA、PrtA、PrtSM、PrtG、PrtB、PrtC、AprA、AprX、ZapA、ZapE、Sap、HasA、コリシンV、LapA、ORF、RzcA、RtxA、XF2407、XF2759、RzcA、RsaA、Crs、CsxA、CsxB、SlaA、SwmA、Sll1951、NodO、PlyA、PlyB、FrpA、FrpC、およびその断片から成る群から選択される。

【0011】

30

好ましい複数の実施形態において、T1SSのアロクライトは、SEQ ID NO: 2に明記されているアミノ酸配列、その断片、またはSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するポリペプチド、またはその断片を含む、またはこれらから成るHlyAであり得る。

【0012】

より好ましい複数の実施形態において、HlyAの断片は、SEQ ID NO: 4に明記されているアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 4のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するポリペプチドから成る。

【0013】

様々な実施形態において、発現培地は、20.0mMまたはそれより少量の Ca^{2+} を含む。

40

【0014】

更なる複数の実施形態において、本願発明は、T1SSの内在性ABCトランスポーター遺伝子、内在性MFP遺伝子、および/または内在性OMP遺伝子の発現、または宿主細胞における対応する遺伝子産物の活性は阻害され、または輸送が非効率的である方法に関する。

【0015】

他の様々な実施形態において、宿主細胞は、T1SSの内在性ABCトランスポーター、内在性MFP、および/または内在性OMPを発現しない。

【0016】

50

また更なる複数の実施形態において、組換えペプチドまたはタンパク質は再折り畳み緩衝液に曝され得、再折り畳み緩衝液は、少なくとも 0.01 mM の Ca^{2+} を含む。

【0017】

本願発明の方法の様々な実施形態において、(I) 宿主細胞は原核細胞であり、および/または、(II) 発現は、最小培地で行われ、および/または、(III) 組換え融合ペプチドまたはタンパク質は、親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびこれらの複数の組み合わせから選択される方法を用いて精製され、および/または、(IV) 方法は、組換え融合タンパク質を、融合タンパク質の開裂に適したプロテアーゼと接触させて、別個の複数の分子としてアロクライトおよび PeOI または PrOI を生成する追加のステップ (e) を備え、および/または、(V) 方法は、(IV) に定義されている、PeOI または PrOI の精製がその後続くことになるステップ (e) を備える。

10

【0018】

更なる他の複数の実施形態において、本願発明は、少なくとも1つの PeOI または PrOI が、ナイシン、HCRF、IFABP、IFNA2、MBP、ペプチド101、ペプチド102、ペプチド103、MAB-40、Mab-42、Fuzeon (登録商標)、サケカルシトニン、ヒトカルシトニン、ペプチド1、238、239、240または241から成る群から選択される方法に関する。

【0019】

さらに、更なる複数の実施形態において、融合タンパク質を符号化する核酸分子は、融合タンパク質の発現を変調させる調節ヌクレオチド配列をさらに含む。

20

【0020】

上記にて開示された複数の実施形態の全ての組み合わせも本願発明の範囲内に含まれることが意図されていることが理解される。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】用いられるプラスミドコンストラクトのいくつかの模式図を示す。

【図2】HlyA1/HlyAcのN末端に融合させられたIFABPおよびMBP (およびそれらの示されている突然変異) の細胞可溶化物の不溶性および可溶性分画のSDS-PAGEゲル(15%)を示す(図2のA)。試料はSDS-PAGE上に載せられ、クマシーブリリアントブルー(CBB)で染色された。図2のBは、HlyA1および示されているPrOIまたはPeOIの融合タンパク質を発現する大腸菌の細胞可溶化物試料を示しており、PrOIまたはPeOIは、HlyA1にC末端で融合させられ、SDS-PAGEにより解析され、CBB染色により可視化されている。図2のCは、(プラスミドpQE-IFABP wtにより符号化された)IFABP wt、または(pIAR_207により符号化された)HlyA1-IFABP wtを生成している細胞の細胞破壊の後の可溶性および不溶性分画のSDS-PAGE(15%)を描写している。HlyA1-IFABP wtの可溶性分解産物が示されている。図2のDは、HlyA1に融合させられたペプチド238、239、240および241の発現を示し、ペプチド240および241の発現は、融合タンパク質HlyA1なしで失敗することを示している。

30

40

【図3】HlyA1がEDTAまたは Ca^{2+} 存在下で再び折り畳まれ、IMACおよびSECに適用された実験を示す。A: Ca^{2+} 存在下で、N末端His6タグをもつHlyA1がIMACに充填され(左列)、結合したタンパク質がイミダゾールの勾配により溶出させられた。B: IMACから溶出させられたHlyA1のSEC解析(Superdex 75 10/300カラム。GE Healthcare)。CおよびD: EDTA存在下でIMACおよびSECによりHlyA1が解析された。

【図4】HlyA1-ナイシンが Ca^{2+} またはEDTA存在下で再び折り畳まれ、濃縮されSECに適用された実験を示す。A: Ca^{2+} 存在下での再折り畳みの後のHlyA1-ナイシンの不溶性(「ペレット」)および可溶性(「上清」)分画、およびSEC解

50

析の溶出分画。B：EDTA存在下での再折り畳みの後のHlyA1 - ナイシンの不溶性（「ペレット」）および可溶性（「上清」）分画、およびSEC解析の溶出分画。C：AおよびBのSECクロマトグラム。D：HlyA1 - ナイシンが第Xa因子（NEB）により培養され、混合物の試料が様々な時点（左から右に0、20、40、60、90、120分）において取り出され、SDS - PAGEゲル上に載せられ、CBBにより染色された。E：基準であるナイシン（上の線）および本願発明に係る技術により生成されたナイシン（下の線）のHPLCクロマトグラム。F：HPLC溶出分画のSDS - PAGE解析。左列：90分後の第Xa因子反応。他の列：HPLCの溶出分画。矢印は、ナイシンおよびHlyA1の位置を示す。

【図5】Ca²⁺およびEDTA存在下でのLipA1 - ナイシンの再折り畳み実験を示す。LipA1 - ナイシンが大腸菌におけるIBとして生成され、単離されたIBが、Ca²⁺またはEDTA存在下で再び折り畳まれた。Ca²⁺存在下で、純粋かつ可溶性のLipA1 - ナイシンが均質な状態で生成された。対照的に、LipA1 - ナイシンはEDTA存在下で凝集した。AおよびB：SEC溶出分画のSDS - PAGE解析、および、Ca²⁺により再び折り畳まれたLipA1 - ナイシンの対応するSECクロマトグラム。CおよびD：EDTA存在下でLipA1 - ナイシンが再び折り畳まれ、AおよびBに説明されているように解析された。

【図6】pIAR__215、pIAR__220、pIAR__221、pIAR__222およびpIAR__223により符号化されたペプチドの発現解析、および、Ca²⁺およびEDTA存在下で発現した（pIAR__220、pIAR__222およびpIAR__223により符号化された）ペプチドの再折り畳み実験を示す。示されているタンパク質は、大腸菌においてIBとして生成され、単離されたIBはCa²⁺またはEDTA存在下で再び折り畳まれた。A：示されている試料のSDS - PAGE解析。B～G：再び折り畳まれた示されているタンパク質のSEC解析。

【図7】HCRFの生成を示す。A：プラスミドpIAR__202により符号化されたHlyA1 - HCRFのIBが、Ca²⁺またはEDTA存在下で再び折り畳まれた。B：Ca²⁺存在下で再び折り畳まれたHlyA1 - HCRFが、10分、40分、および120分の間、第Xa因子により培養された。矢印は、それぞれHlyA1 - HCRF、HlyA1およびHCRFの位置を示す。Ca²⁺またはEDTAを含む緩衝液内で再び折り畳まれたHlyA1 - HCRFがSEC解析に適用され、溶出分画がSDS - PAGEにより解析された。C：上記で言及されたSEC解析の溶出クロマトグラム。D：Ca²⁺存在下で再び折り畳まれたHlyA1 - HCRFのSEC解析の後のCBB染色SDS - PAGEゲル。E：EDTA存在下で再び折り畳まれたHlyA1 - HCRFのSEC解析の後のCBB染色SDS - PAGEゲル。矢印は、HlyA1 - HCRFの位置を示す。HlyA1 - HCRFは、Ca²⁺存在下で再び折り畳まれ、2時間の間、第Xa因子により培養され、温浸混合物がHPLCにより精製された。F：HPLCクロマトグラム。G：HPLC溶出分画のCBB染色されたSDS - PAGEゲル。矢印は、HCRFの位置を示す。

【図8】HlyA1 - IFABPの生成および機能性の研究を示す。再び折り畳まれたHlyA1 - IFABPのSEC解析AおよびC：Ca²⁺により再び折り畳まれたHlyA1 - IFABPのSEC解析からの溶出分画のSDS - PAGEゲル、およびSECの溶出クロマトグラムBおよびD：EDTAにより再び折り畳まれたHlyA1 - IFABPのSEC解析からの溶出分画のSDS - PAGEゲル、およびSECの溶出クロマトグラムE：Ca²⁺またはEDTA存在下で精製されたHlyA1 - IFABPが、第Xa因子により培養され、示されている時点で、タンパク質試料がSDS - PAGEにより解析された。矢印は、IFABPの位置を示す。FおよびG：DAUDAによる滴定実験を用いたHlyA1 - IFABPの機能性の研究F：HlyA1 - IFABPが、Ca²⁺存在下で再び折り畳まれ、SECにより精製された。DAUDAがHlyA1 - IFABPに滴定され、500nmでの蛍光信号が記録され、DAUDA濃度に対してプロットされている。黒色の列は、理論的合致度の曲線を表す。G：Fと同じ実験が、EDTA存在

10

20

30

40

50

下で精製されたH1yA1-IFABPに関して繰り返された。

【図9】H1yA1-IFNA2の生成を示す。A：0.5Mアルギニン存在下で再び折り畳まれたH1yA1-IFNA2のSDS-PAGE解析分泌させられたIFNA2-H1yA1が、ジスルフィド結合を含む酸化タンパク質に関する基準としての役割を担った(左列)。DTTの不在状態で、H1yA1-IFNA2は、基準と同じランニング高さ(running height)で移動する。対照的に、DTT存在下でH1yA1-IFNA2はより遅く移動する。これらの結果は、再び折り畳まれたH1yA1-IFNA2内でのジスルフィド結合の形成を示す。BおよびC：それぞれCa²⁺およびEDTA存在下で再び折り畳まれた後のH1yA1-IFNA2のSEC解析B：Ca²⁺存在下での再折り畳みC：EDTA存在下での再折り畳み

10

【図10】再び折り畳まれたH1yA1-MBPおよびアミロース樹脂の結合実験を示す。H1yA1-MBPは大腸菌において発現させられ(列「細胞可溶化物」)およびH1yA1-MBPのIBを調製し(列「変性H1yA1-MBP」)、Ca²⁺存在下で変性させられ再び折り畳まれた。再折り畳み(列「沈殿」)の間いくつかのH1yA1-MBPが沈殿し、および可溶性H1yA1-MBP(列「再折り畳み」)がアミロース樹脂に充填された。H1yA1-MBPはアミロースに結合し、「通過分画」内にはタンパク質が残らなかった。洗浄の後、H1yA1-MBPはマルトースにより溶出させられた(列「溶出」)。

【図11】ペプチド101、102および103の生成を示す。A：ペプチド101、102および103に融合させられたH1yA1の発現。B~D：ペプチド101、102および103に融合させられたH1yA1の精製方式。対応する融合タンパク質を発現する細胞は破壊され、細胞可溶化物(列「細胞可溶化物」)が遠心分離させられた。可溶性分画には見える融合タンパク質はなく(列「可溶性分画」)、融合タンパク質がIBとして凝集した。IBは変性させられ(列「変性IB」)、Ca²⁺存在下で再び折り畳まれた。融合タンパク質はCa²⁺により効率的に再び折り畳まれ(「再び折り畳まれたペプチド10X」)、およびタンパク質は沈殿しなかった(「ペレット」)。復元された融合タンパク質は第Xa因子により培養され、ペプチド101、102、および103がH1yA1から分離された(列「第Xa因子」)。非特異的な開裂産物が全ての場合において生じた(列「+第Xa因子」を参照)。

20

【図12】(プラスミドpIAR__112により符号化された)H1yA1-R210Dに融合させられたペプチド103による第Xa因子消化実験を示す。再び折り畳まれたIB(列「-」)が第Xa因子により培養され(「+」)、試料がSDS-PAGEにより解析された。非特異的な開裂産物は生じなかった(図11に示される結果と比較)。

30

【図13】Fuzeon(登録商標)の生成を示すH1yA1-Fuzeon(登録商標)がCa²⁺(a)またはEDTA(b)存在下で再び折り畳まれ、Superdex 75 16/60カラムに載せられた。矢印は、H1yA1-Fuzeon(登録商標)の位置を示す。C：H1yA1-Fuzeon(登録商標)がCa²⁺存在下で再び折り畳まれ、10分、40分、および120分の間、第Xa因子により培養された。矢印は、開裂産物H1yA1およびFuzeon(登録商標)の位置を示す。

【図14】示されている期間の間、CNBrにより変性させられ培養されたH1yA1 M88A-Met-ペプチド103のIBの実験を示す。試料はSDS-PAGEにより解析された。開裂産物H1yA1 M88A-Metがゲル上に見える。非特異的な開裂産物は得られなかった。ペプチド103は(おそらくその比較的小さい分子量に起因して)CBBにより染色されなかったため、それは、HPLCにより精製され、質量分析により改めて配列決定された。そのような方法を用いて、ペプチド103が識別された。

40

【図15】バッチ培養および発酵におけるH1yA1 M88A-Met-ペプチド3の発現解析を示す。プラスミドpIAR__115を含む大腸菌細胞がバッチ培養(左列)において、またはグルコース(中央の列)またはグリセロール(右列)を餌として用いた発酵によって培養された。グルコースおよびグリセリンを餌として用いた発酵により高い細胞密度(>50)が得られた。しかし、グルコースは用いられた条件下で融合タンパク質

50

の発現を抑制するようである。グリセロール存在下で、対照的に、高い細胞密度および高い発現レベルが達成された。

【図16】H1yA1に融合させられた異なるペプチドの分泌解析を示す。A：H1yA1に融合させられたペプチド101、102および103の分泌解析。PeOIは、H1yA1にC末端で融合させられ（プラスミドpIAR_101、pIAR_102、およびpIAR_103）、H1yBおよびH1yD（pK184-H1yBD）と同時発現した。細胞可溶化物および上清試料が、SDS-PAGEにより解析された。B：H1yA1-Mab40の分泌解析。細胞はH1yA1-Mab40を、およびa+で示されている場合には、H1yBおよびH1yDを（プラスミドpK184-H1yBDから）発現した。さらに、IPTGおよび整流装置（異なる通気）の発現および分泌に対する影響を調査した。細胞増殖の後に、細胞可溶化物および上清試料がSDS-PAGEにより解析された。H1yA1にC末端で融合させられた解析されたペプチドは、専用のT1SSにより効率的に分泌された。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本明細書に用いられている用語は、その逆のことがはっきりと述べられていない限り、以下の意味をもつ。

【0023】

本明細書で用いられる「少なくとも1つ」とは、1つまたは複数、特に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれより多くに関する。

【0024】

分子に関して本明細書で入れ替え可能に用いられている「単離された」または「単離する」とは、その分子が、その分子と自然な状態で関連している他の分子から少なくとも部分的に分離されていることを意味する。「単離された」とは、分子が精製されて、それが、他のタンパク質および核酸、並びに宿主細胞から生じる細胞残屑など他の分子および成分から分離させられていることを意味し得る。

【0025】

本明細書で用いられる「核酸」は、DNAおよびRNAなど全ての天然型の核酸を含む。好ましくは、核酸分子はDNAである。本明細書で用いられる「核酸配列同一性」とは、任意の位置における残基が、基準である核酸の対応する位置におけるものと同一であることを意味する。本願発明の好ましい核酸配列同一性は80%であり、より好ましくは90%であり、または、さらにより好ましくは95%である。

【0026】

核酸分子に関連して本明細書で用いられる「断片」という用語は、1つまたは複数の3'または5'末端ヌクレオチドだけ短縮されたその基準である核酸配列と比較される核酸配列に関する。短縮は、基準である配列の連続するヌクレオチド鎖が残るよう3'末端、5'末端、またはそれら両方で起こる。断片は好ましくは、少なくとも20、より好ましくは少なくとも50個のヌクレオチドの長さを有する。

【0027】

「ペプチド」という用語は、本明細書を通して、ペプチド結合により互いに結合されたアミノ酸残基のポリマーを指すのに用いられる。本願発明に係るペプチドは、2~100のアミノ酸残基を有する。

【0028】

「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書を通じて入れ替え可能に、ペプチド結合により互いに結合されたアミノ酸残基のポリマーを指すのに用いられる。本願発明に係るタンパク質またはポリペプチドは、好ましくは、100またはそれより多くのアミノ酸残基を有する。

【0029】

本明細書で用いられる「関心対象のタンパク質」、「PROI」、または「関心対象のペプチド」、「PeOI」という用語は、組換え発現を介して発現する任意の遺伝子産物

10

20

30

40

50

に関する。本明細書に開示されている「関心対象のペプチドまたはタンパク質」という用語は、任意の天然型または非天然型のペプチドまたはタンパク質を網羅する。いくつかの実施形態において、P e O IまたはP r O Iは、非天然型/合成ペプチドまたはタンパク質である。これに関連する合成とは、ペプチドまたはタンパク質の配列が人工的に設計されていることを意味する。したがって、P e O IまたはP r O Iに関する配列符号化は、1、2またはそれより多く天然型ペプチドまたはタンパク質に関する核酸配列符号化を含み得る。これらの天然型ペプチドまたはタンパク質はさらに、例えば、符号化配列の突然変異誘発により修飾されていてもよい。

【0030】

「N末端断片」という用語は、ペプチドまたはタンパク質のN末端から始まる連続するアミノ酸ポリマーが残るよう、基準であるペプチドまたはタンパク質配列と比較してC末端で切断されたペプチドまたはタンパク質配列に関する。いくつかの実施形態において、そのような断片は、少なくとも10個のアミノ酸の長さを有し得る。

10

【0031】

「C末端断片」という用語は、ペプチドまたはタンパク質のC末端から始まる連続するアミノ酸ポリマーが残るよう、基準であるペプチドまたはタンパク質配列と比較してN末端で切断されたペプチドまたはタンパク質配列に関する。いくつかの実施形態において、そのような断片は、少なくとも10個のアミノ酸の長さを有し得る。

【0032】

本明細書で用いられる「融合タンパク質」という用語は、NまたはC末端で互いに結合されたペプチドおよびタンパク質に関する。そのような融合タンパク質は、操作可能に互いに融合させられた核酸配列により符号化され得る。特定の複数の実施形態において、融合タンパク質とは、本願発明に従って、ポリペプチド鎖、例えば、H l y Aまたはその断片またはその相同体を含むポリペプチド鎖にC末端で融合させられた少なくとも1つのP e O IまたはP r O Iを指す。

20

【0033】

概して、当業者は、本願発明を実施するために、本明細書に説明されている任意のヌクレオチド配列が、追加の開始および/または終止コドンを用意する、または用意しなければならないことを、または、本明細書に説明されている配列のいずれかの開始および/または終止コドンが、用いられる核酸コンストラクトに応じて削除され得る、または削除されなければならないことを理解する。当業者は、この決定を、例えば、本願発明の核酸分子に含まれる核酸配列が翻訳されることになるのか、および/または融合タンパク質として翻訳されることになるのかに基づいて行うであろう。

30

【0034】

核酸分子に関して本明細書で用いられる「導入」という用語は、宿主細胞への外来DNAの取り込みおよび組み込みを指す。核酸分子のそのような取り込みは、宿主細胞の自然な形質転換受容性に、または当技術分野で周知の電気穿孔または塩化カルシウム変換などの遺伝子導入法に依存し得る。

【0035】

本明細書で用いられる「宿主細胞」という用語は、核酸分子を内部に持つ生物、または組換えP e O IまたはP r O Iを符号化するベクターに関する。好ましい複数の実施形態において、宿主細胞は原核細胞である。より好ましい複数の実施形態において、宿主細胞は、B L 2 1、D H 1、D H 5、D M 1、H B 1 0 1、J M 1 0 1 - 1 1 0、K 1 2、R o s e t t a (D E 3) p L y s S、S U R E、T O P 1 0、X L 1 - B l u e、X L 2 - B l u e、およびX L 1 0 - B l u e系を含み得るがこれらに限定されない大腸菌である。

40

【0036】

本明細書で入れ替え可能に用いられている「発現」または「発現した」という用語は、遺伝子からの情報が遺伝子産物の合成のために用いられるプロセスに関する。細胞ベースの発現系において、発現は、転写および翻訳ステップを含む。

50

【 0 0 3 7 】

本明細書で用いられる「組換え発現」という用語は、宿主生物における外来遺伝子の転写および翻訳に関する。外来DNAとは、当該生物の外部から生じる任意のデオキシリボ核酸を指す。タンパク質に関して本明細書で用いられる「異種」という用語は、外来DNAから発現するタンパク質を指す。これは、内在性核酸配列と同一である核酸配列から発現する、および人工的に複製されたタンパク質も含む。

【 0 0 3 8 】

組換えペプチドまたはタンパク質に関して本明細書で用いられる「生成」という用語は、組換えペプチドまたはタンパク質が宿主細胞において発現し、続いて、宿主細胞の他の分子から単離されることを指す。

10

【 0 0 3 9 】

本明細書で用いられる「培養する (culturing)」、「培養する」または「培養」は、管理された条件下で特別に用意された培地における宿主細胞の増殖に関する。「組換え発現に適した条件」または「発現を可能とする条件」という用語は、当技術分野で公知の方法を用いて宿主細胞におけるPrOIの生成を可能とする条件に関連し、ここで細胞は、規定の培地および温度条件下で培養される。培地は、栄養、最小、選択、分別、または強化培地であり得る。好ましくは、培地は最小培地である。宿主細胞の増殖および発現温度は、4 から45 の範囲であり得る。好ましくは、増殖および発現温度は、30 から39 の範囲である。本明細書で用いられる「発現培地」という用語は、それらがタンパク質の発現の間に宿主細胞の培養のために用いられるときの上記培地のいずれか

20

【 0 0 4 0 】

本明細書で用いられる「晒す」という用語は、様々な成分、例えば、タンパク質および緩衝液が接触させられることを意味する。

【 0 0 4 1 】

本明細書で入れ替え可能に用いられている「封入体」または「IB」という用語は、物質、例えば、タンパク質の核または細胞質内集簇体に関する。IBは、未溶解であり、非単位 (non-unit) 脂質膜を有する。本願発明の方法において、IBは主に、少なくとも1つのPeOIまたはPrOIと、T1SSの少なくとも1つのアロクライトまたはその断片とを含む融合タンパク質から成る。

30

【 0 0 4 2 】

本明細書で入れ替え可能に用いられている「基質」または「アロクライト」という用語は、T1SSのカーゴであり得る溶質に関する。基質またはアロクライトは、GG反復配列および分泌信号などT1SSを介した輸送を可能とする特定のペプチド配列輸送性を有するタンパク質である。

【 0 0 4 3 】

本明細書で入れ替え可能に用いられている「タイプ1分泌系」または「T1SS」という用語は、3つのタンパク質サブユニット、ABCトランスポータータンパク質、MFP、およびOMPから成るタンパク質複合体に関する。ABCトランスポーターは、複数の膜に亘る様々な基質の転座を含む特定の生物学的プロセスを実行するのにアデノシン三リン酸 (ATP) 加水分解のエネルギーを利用する膜貫通タンパク質である。MFPファミリーのタンパク質は、グラム陰性菌の細胞膜における主要なポーターを、外膜においてポリンまたはチャネル機能を果たす外膜因子タンパク質と繋ぐ補助タンパク質または「アダプター」として機能する。したがって、三連のタンパク質複合体は、イオン、薬剤およびタンパク質などの様々な分子がグラム陰性菌の内膜および外膜を通過する輸送を可能とする。T1SS基質のサブグループは、RTX (毒素における反復配列) 毒素である。

40

【 0 0 4 4 】

タンパク質に関して本明細書で用いられる「機能的立体配座」という用語は、当該タンパク質が、その天然立体配座において同じタンパク質の活性の少なくとも5%、10%、20%、40%または50%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは

50

100%である他のタンパク質との基質触媒作用、タンパク質特定の局在化または相互作用など特定の活性を有することを可能とする当該タンパク質の構造を指す。機能的立体配座は通常、タンパク質が可溶性であることを要する。タンパク質の天然立体配座は、有効であり機能性であるその適切に折り畳まれた、および/または組み立てられた形態である。生体分子の天然状態は、二次から四次構造が共有結合したバックボーンに沿った弱い相互作用から形成された、4つの全てのレベルの生体分子構造を有し得る。これは、これらの弱い相互作用が妨害され、これらの形態の構造の喪失に繋がり、生体分子の一次構造のみを保持している変性状態と対照的である。

【0045】

本明細書で用いられる「阻害」という用語は、エフェクター分子により引き起こされるタンパク質活性または遺伝子発現活性の検出可能である著しい低下に関する。タンパク質活性または遺伝子発現を検出する方法は当技術分野で公知である。

【0046】

本願発明は、関心対象の組換えペプチドおよびタンパク質の効率的な生成のための、タイプ1分泌系の基質/アロクライトまたはその断片の核酸配列を備える方法に関する。アロクライトまたはその断片は、封入体(IB)として関心対象のペプチドおよびタンパク質の発現を向上させ、IB-タグとして機能する。重要なことに、アロクライトおよびその断片は、封入体の、機能的立体配座への効率的な復元を可能とする。したがって、アロクライトおよびその断片は、対応する不利益なしで、複数のIB-タグおよび可溶性タグの利点を兼ね備える。

【0047】

Hly分泌系は、大抵はグラム陰性菌において起こるタンパク質分泌系である。この分泌系は、周辺質において中間的に留まることなく細胞基質から細胞外空間へ単一のステップでATP駆動されたやり方でそれらの基質を輸送するT1SSファミリーに属する。Hly分泌系は、ABCトランスポーターを表すHlyBと、MFPHlyDと、一般的なOMP TolCとを含む。~110kDa溶血性毒素HlyAは、Hly分泌系の輸送基質である。遺伝子レベルでは、HlyA特定の分泌に必要な成分は、オペロン構造で組織化されている。HlyCのための核酸配列符号化は、このオペロンの一部を形成するが、Hly分泌系を通じたHlyA分泌には必要ではない。HlyCは、HlyAを溶血性にするHlyAのアシル化に触媒作用を及ぼす。HlyAは、1024個のアミノ酸残基から成るタンパク質であり、Hly分泌系を介したその排出のために、分泌信号と呼ばれる約40~60個のアミノ酸を含むそのC末端を必要とする。さらに、HlyAは、いくつかのグリシンが豊富な(GG)反復配列(GGXGXDXUX。ここで、Xは任意のアミノ酸であり得、Uは、分泌信号のN末端に位置する疎水性の大きなアミノ酸である。)を含む領域により特徴づけられる。GG反復配列は、毒素(RTX)ファミリーにおける反復配列の特性である。GG反復配列は、それらの折り畳みを誘発するCa²⁺を結合する。したがって、Ca²⁺の不在状態で、GG反復配列を含む領域は構造化されない。1つのHlyAタンパク質のアミノ酸配列は、SEQ ID NO:2において、SEQ ID NO:1に明記されているヌクレオチド配列により符号化されるものとして明記されている。野生型HlyAと比較し高められたレベルで発現させられ、HlyA(図1)のN末端部分を欠くHlyAの断片は、HlyA1と名前が付けられた。HlyA1のアミノ酸配列は、SEQ ID NO:4に明記されており、他方、符号化するヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:3に明記されている。

【0048】

本願発明は、T1SSの少なくとも1つのアロクライトまたはその断片に融合させられたPeOIまたはPrOIが、非抱合型PeOIまたはPrOI単体が可溶性の形態で発現した場合であってもIBの形態の融合タンパク質の発現に繋がるという本発明者らの驚くべき発見に基づいている。さらに、Ca²⁺が、アロクライトおよびPeOIまたはPrOIから成る融合タンパク質の変性IBの、可溶性および機能的立体配座への折り畳みを誘発することが本発明者らによって発見された。したがって、アロクライトまたはその

10

20

30

40

50

断片は、対応する不利益（封入体タグ：凝集した非活性の産物。可溶性タグ：かなり低い収率、低い純度、タンパク質分解し易い）なしで、IB-タグ（高い収率、高い初期純度、タンパク質分解に対する免疫性）および可溶性タグ（可溶性かつ生理活性の産物）の利点を兼ね備える二機能性のタグである。

【0049】

したがって、第1態様において、本願発明は組換えPeOIまたはPrOIを生成するための方法に関し、方法は、(a)少なくとも1つのPeOIまたはPrOIを含む融合タンパク質を符号化する核酸分子と、T1SSの少なくとも1つのアロクライトまたはその断片とを宿主細胞に導入する段階と、(b)融合タンパク質の発現を可能とする条件下で宿主細胞を培養する段階であり、融合タンパク質は、IBの形態で発現する段階と、(c)組換え融合タンパク質を宿主細胞から単離する段階とを備える。更なる複数の実施形態は、(d)PeOIまたはPrOIが機能的立体配座へと折り畳まれることを可能とする条件に組換え融合タンパク質を晒すステップを備え得る。第1態様の様々な他の実施形態において、宿主細胞は、T1SSの異種ABCトランスポーター、異種MFP、および/または異種OMPを発現しない。

【0050】

様々な実施形態において、本願発明の本態様は、Linhartova et al. (Linhartova, I. et al., FEMS Microbiol Rev 34, 1076-1112, FMR231 [pii] 10.1111/j.1574-6976.2010.00231.x) に説明されているようなHlyA、CyaA、Ehx A、LktA、PLktA、PasA、Pvx A、Mmx A、Ltx A、Apx IA、Apx IIA、Apx IIIA、Apx IVA、Apx I、Apx II、Aqx A、VcRtx A、VvRtx A、Mbx A、RTX細胞毒素、RtxL1、RtxL2、Frh A、LipA、TliA、PrtA、PrtSM、PrtG、PrtB、PrtC、AprA、AprX、ZapA、ZapE、Sap、HasA、コリシンV、LapA、ORF、RzcA、RtxA、XF2407、XF2759、RzcA、RsaA、Crs、CsxA、CsxB、SlaA、SwmA、Sll1951、NodO、PlyA、PlyB、FrpA、FrpC、FrpC様または他のT1SSアロクライトから成る群から選択されるT1SSのアロクライト、およびその断片も含む。様々な好ましい実施形態において、アロクライトは、共通配列GGxGxDxUx（ここで、Xは任意のアミノ酸であり得、Uは、疎水性の、大きなアミノ酸である。）の少なくとも1つのGG反復配列の存在により特徴づけられる。より好ましい複数の実施形態において、T1SSのアロクライトは、SEQ ID NO: 2に明記されているアミノ酸配列、その断片、またはSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するポリペプチド、またはその断片を含む、またはこれらから成るHlyAである。他の様々な実施形態において、HlyAの断片は、SEQ ID NO: 4に明記されているアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 4のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するポリペプチドから成る。

【0051】

様々な実施形態において、本願発明の本態様は、SEQ ID No. 1~4の上記された配列の相同体も含む。本明細書で用いられる「相同性」または「相同体」という用語は、他のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列またはその一部とかなり同様の配列、または高い配列同一性（例えば、70%、80%、90%、95%、97.5%、99%、またはそれより高い）を有するポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を指す。したがって、上記の核酸分子に関して、相同体という用語は、上記で定義されている第1の核酸配列のヌクレオチド配列と少なくとも70、好ましくは80、より好ましくは90、さらにより好ましくは95、97.5、または99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。配列同一性は、ヌクレオチドの連続した区間に亘り起こり得、または非連続的であり得る。

【0052】

本願発明の第1態様の様々な実施形態において、T1SSのアロクライトは、PeOIまたはPrOIのC末端に融合させられ得る。第1態様の他の様々な実施形態において、アロクライトは、PeOIまたはPrOIのN末端に融合させられ得る。

【0053】

一実施形態において、発現培地は20.0 mMまたはそれより少量のCa²⁺を含む。より好ましい実施形態において、発現培地におけるCa²⁺濃度は、0.1 mMまたはそれより低い。

【0054】

様々な実施形態において、T1SSの内在性ABCトランスポーター遺伝子、内在性MFP遺伝子、および/または内在性OMP遺伝子の発現、または宿主細胞における対応する遺伝子産物の活性は阻害される。様々な実施形態において、宿主細胞は、T1SSの内在性ABCトランスポーター、内在性MFP、および/または内在性OMPを発現しない。遺伝子の発現を阻害する、それらの削除、またはプロモータ配列または遺伝子自体の完全性を破壊するヌクレオチド配列の挿入などの方法が当技術分野で公知である。削除または破壊の後の好ましい遺伝子発現活性は、未処理の細胞において測定される活性の35%、30%、25%、20%、15%、10%、または5%より低くてもよい。本願発明の他の様々な実施形態において、タイプ1分泌系の内在性ABCトランスポーター、内在性MFP、および/または内在性OMPは、抗体または小分子阻害物質により阻害される。本願発明の好ましい複数の実施形態において、ABCトランスポーター活性は、オルトパナジウム酸または8-アジド-ATPなどのATP相同性阻害物質により阻害される。そのようなATPミメティックは当技術分野で公知である。阻害物質処理の後の好ましいタンパク質活性は、未処理の細胞で測定される活性の35%、30%、25%、20%、15%、10%、または5%より低くてもよい。本願発明の他の複数の実施形態において、輸送は、アロクライト自体、例えば、アロクライトを過剰発現させることにより、または融合ペプチドおよびタンパク質の付着により阻害またはブロックされる。

【0055】

他の複数の実施形態において、組換えペプチドまたはタンパク質は、再折り畳み緩衝液に曝され、ここで再折り畳み緩衝液は、少なくとも0.01、より好ましくは0.01~40 mMのCa²⁺を含む。

【0056】

本願発明の方法の様々な実施形態において、(I)宿主細胞は原核細胞であり、および/または、(II)発現は、最小培地で行われ、および/または、(III)組換え融合ペプチドまたはタンパク質は、親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびこれらの複数の組み合わせから選択される方法を用いて精製され、および/または、(IV)方法は、組換え融合タンパク質を、融合タンパク質の開裂に適したプロテアーゼと接触させて、別個の複数の分子としてアロクライトおよびPeOIまたはPrOIを生成する追加のステップ(e)を備え、および/または、(V)方法は、(IV)に定義されている、PeOIまたはPrOIの精製がその後続くことになるステップ(e)を備える。

【0057】

さらに他の実施形態において、本願発明は、少なくとも1つのPeOIまたはPrOIが、ナイシン、HCRF、IFABP、IFNA2、MBP、ペプチド101、ペプチド102、ペプチド103、MAB-40、Mab-42、Fuzeon(登録商標)、サケカルシトニン、ヒトカルシトニン、阻害物質ペプチド1、238、239、240または241から成る群から選択される方法にも関し得る。

【0058】

様々な実施形態において、融合タンパク質を符号化する核酸分子は、融合タンパク質の発現を変調させる調節ヌクレオチド配列をさらに含む。好ましい調節核酸配列は、SEQ ID NO: 39に明記されている。本明細書で用いられる「調節ヌクレオチド配列」という用語は、遺伝子の5'に位置し、当該遺伝子の発現活性を高める核酸配列に関する

10

20

30

40

50

【0059】

本明細書で用いられる「親和性タグ」という用語は、PeOIまたはPrOIに結合され、親和性タグリセプタを用いてタグ付けされたPeOIまたはPrOIの濃縮を可能とする実体に関する。本明細書で用いられる「親和性クロマトグラフィー」という用語は、タグ付けされたペプチドまたはタンパク質およびリセプタの複合体形成に関する。特定の複数の実施形態において、親和性タグは、Strep-tag（登録商標）またはStrept-tag（登録商標）II、myc-タグ、FLAG-タグ、His-タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（SUMO）タグ、共有結合性であるが分離可能なNorpdペプチド（CYD）タグ、タンパク質C重鎖（HPC）タグ、カルモジュリン結合ペプチド（CBP）タグ、またはHAタグ、若しくは、ストレプトアビジン結合タンパク質（SBP）、マルトース結合タンパク質（MBP）、およびグルタチオン-S-転移酵素などのタンパク質から成る群から選択され得る。

10

【0060】

「プロテアーゼ開裂部位」という用語は、選択されたプロテアーゼに開裂され得、したがって、プロテアーゼ開裂部位により相互結合されたペプチドまたはタンパク質配列の分離を可能とするペプチド配列を指す。特定の複数の実施形態において、プロテアーゼ開裂部位は、第Xa因子、タバコエッジウイルス（tobacco edge virus, TEV）プロテアーゼ、エンテロキナーゼ、SUMO Expressプロテアーゼ、IgA-プロテアーゼ、Arg-Cプロテイナーゼ、Asp-Nエンドペプチダーゼ、Asp-Nエンドペプチダーゼ+N末端グル、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、キモトリプシン高特異性、キモトリプシン低特異性、クロストリパイン（クロストリジオペプチダーゼB）、グルタミルエンドペプチダーゼ、グランザイムB、ペプシン、プロリンエンドペプチダーゼ、プロテイナーゼK、ブドウ球菌ペプチダーゼI、トロンピン、トリプシン、およびサーモリシン開裂部位から成る群から選択される。

20

【0061】

化学的開裂という用語は、化合物により引き起こされる、ペプチド結合の開裂を指す。そのような化合物は、メチオニン残基へのC末端を開裂する臭化シアン（CNBr）、トリプトファン残基へのC末端を開裂するBNPSSカトール、NCSまたはTFA、および、テトラペプチドS/TXHZ（XおよびZは、任意のアミノ酸残基であり得るが、X=プロリンであることを除く）へのC末端を開裂するNi²⁺イオンを含み得るが、これらに限定されない（Kopera et al., (2012), Plos One 7(5)）。

30

【0062】

本願発明の文脈で用いられる「融合させられ」とは、結果として得られるペプチドまたはタンパク質が直接的に、1つまたは複数のアミノ酸、ペプチド、またはタンパク質、例えば、1つまたは複数のプロテアーゼ開裂部位および/または親和性タグにより互いに結合され、または互いに連結されていることを意味する。

40

【0063】

PeOIまたはPrOIが2つまたはそれより多くの天然型ペプチドまたはタンパク質を含む場合、それら2つまたはそれより多くのペプチドまたはタンパク質は、プロテアーゼ開裂部位により分離され得る。

【0064】

概して、任意のペプチドまたはタンパク質が、PeOIまたはPrOIとして選択され得る。特定の複数の実施形態において、PrOIは、ホモ二量体またはホモ多量体を形成しないタンパク質である。より大きなタンパク質複合体の形成は効率的なタンパク質の排出を阻み得るので、自己相互作用するペプチドまたはタンパク質を避けることは、組換えペプチドまたはタンパク質が細胞培養上清内へと分泌される場合に有利であり得る。しか

50

し、PrOIは、より大きなペプチドまたはタンパク質複合体のサブユニットであるペプチドまたはタンパク質であってもよい。そのようなペプチドまたはタンパク質は、発現、およびオプションで分泌の後に単離され得、マルチペプチドまたはタンパク質複合体の*in vitro*での再構築に適し得る。特定の複数の実施形態において、PeOIまたはPrOIは、100個より少ないアミノ酸残基を有するペプチドである。これらのペプチドがそれらの天然状態において、翻訳の後にプレおよび/またはプロ配列を含む場合、PeOIのための核酸配列符号化は、成熟ペプチドを符号化する配列に限定されるように操作され得る。1つの例示的なペプチドはインスリン、例えば、ヒトインスリンである。過剰発現したペプチドおよびタンパク質の分泌は、ペプチドまたはタンパク質が宿主細胞にとって有害であるときに特に有利である。このことが理由となり、本願発明は、宿主細胞にとって毒性があると知られているリパーゼおよびプロテアーゼの発現に関して特に有利であり、したがって、本願発明に係るシステムおよび方法によるこれらのタンパク質の発現は、本願発明の特定の実施形態を表す。

10

【0065】

様々な実施形態において、PeOIまたはPrOIは酵素である。

【0066】

The International Union of Biochemistry and Molecular Biologyは、酵素に関する学名、EC番号を開発した。各酵素は、「EC」が頭に付けられた4つの番号の配列により説明される。最初の番号は、そのメカニズムに基づいて酵素を広く分類する。

20

【0067】

学名の全体は、<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>で閲覧することが出来る。

【0068】

したがって、本願発明に係るPeOIまたはPrOIは、クラスEC1(酸化還元酵素)、EC2(転移酵素)、EC3(加水分解酵素)、EC4(リアーゼ)、EC5(イソメラーゼ)、およびEC6(連結酵素)、並びにこれらのサブクラスのいずれかから選択され得る。

【0069】

特定の複数の実施形態において、PeOIまたはPrOIは、補助因子依存であり得、補欠分子族を内部に持つ。そのようなペプチドまたはタンパク質の発現のために、いくつかの実施形態において、対応する補助因子、または補欠分子族が、発現の間に培地に加えられ得る。

30

【0070】

特定の場合において、PeOIまたはPrOIは脱水素酵素または酸化酵素である。

【0071】

PeOIまたはPrOIが脱水素酵素である場合、いくつかの実施形態において、PeOIまたはPrOIは、アルコール脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、セロピオース脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素、およびアルデヒド脱水素酵素から成る群から選択される。

40

【0072】

PeOIまたはPrOIが酸化酵素である場合、いくつかの実施形態において、PeOIまたはPrOIは、シトクロムP450酸化還元酵素、特にP450_{BM3}およびその変種、過酸化酵素、モノキシゲナーゼ、ヒドロゲナーゼ、モノアミン酸化酵素、アルデヒド酸化酵素、キサンチン酸化酵素、アミノ酸酸化酵素およびNADH酸化酵素から成る群から選択される。

【0073】

更なる複数の実施形態において、PeOIまたはPrOIは、アミノ基転移酵素またはキナーゼである。

【0074】

50

PeOIまたはPrOIがアミノ基転移酵素である場合、いくつかの実施形態において、PeOIまたはPrOIは、アラニンアミノ基転移酵素、アスパラギン酸アミノ基転移酵素、グルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基転移酵素、ヒスチジノール-リン酸アミノ基転移酵素、およびヒスチジノールピルビン酸アミノ基転移酵素から成る群から選択である。

【0075】

様々な実施形態において、PeOIまたはPrOIがキナーゼである場合、PeOIまたはPrOIは、ヌクレオシドニリン酸キナーゼ、ヌクレオシドリン酸キナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、およびグルコキナーゼから成る群から選択である。

【0076】

いくつかの実施形態において、PeOIまたはPrOIが加水分解酵素である場合、PeOIまたはPrOIは、リパーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、ニトリル加水分解酵素、ハロゲナーゼ、ホスホリパーゼ、およびエステラーゼから成る群から選択される。

10

【0077】

特定の複数の実施形態において、PeOIまたはPrOIがリアーゼである場合、PeOIまたはPrOIは、アルドラーゼ、例えば、ヒドロキシニトリルリアーゼ、チアミン依存酵素、例えば、ベンズアルデヒドリアーゼ、およびピルビン酸デカルボキシラーゼから成る群から選択される。

【0078】

様々な実施形態において、PeOIまたはPrOIがイソメラーゼである場合、PeOIまたはPrOIは、イソメラーゼおよびムターゼから成る群から選択される。

20

【0079】

いくつかの実施形態において、PeOIまたはPrOIが連結酵素である場合、PeOIまたはPrOIはDNA連結酵素であり得る。

【0080】

特定の複数の実施形態において、PeOIまたはPrOIは抗体であり得る。これは、完全な免疫グロブリンまたはその断片を含み得、それら免疫グロブリンは、IgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b、およびIgG3、IgMなどの様々なクラスおよびアイソタイプを含む。その断片は、Fab、Fv、およびF(ab')₂、Fab'などを含み得る。

30

【0081】

また、本明細書においては治療的に活性なPeOIおよびPrOI、例えば、サイトカインも考慮されている。

【0082】

したがって、特定の複数の実施形態において、PeOIまたはPrOIは、サイトカイン、特に、ヒトまたはマウスインターフェロン、インターロイキン、コロニー刺激因子、壊死因子、例えば、腫瘍壊死因子、および増殖因子から成る群から選択される。

【0083】

いくつかの実施形態において、PeOIまたはPrOIがインターフェロンである場合、PeOIまたはPrOIは、インターフェロンアルファ、例えば、アルファ-1、アルファ-2、アルファ-2a、およびアルファ-2b、アルファ-2、アルファ-8、アルファ-16、アルファ-21、ベータ、例えば、ベータ-1、ベータ-1a、およびベータ-1b、又はガンマから成る群から選択され得る。

40

【0084】

更なる複数の実施形態において、PeOIまたはPrOIは、抗菌性ペプチド、特に、バクテリオシンおよびランチピオテイクス、例えば、ナイシン、カテリシジン、デフェンシン、およびサポシンから成る群から選択されるペプチドである。

【0085】

更なる複数の実施形態において、PeOIまたはPrOIは、例えば、鋼、アルミニウムおよびその他の金属に対して明確な表面特異性、炭素、セラミック、鉱物、プラスチック

50

ク、木材や他の材料または細胞のような他の生物材料などの他の表面に対して特異性を有する接着性ペプチド、または、水環境において、および嫌気性菌条件下で機能する接着性ペプチドである。

【0086】

更なる複数の実施形態において、PeOIまたはPrOIは、2～100個の範囲のアミノ酸の長さを有し、当該アミノ酸は、20のタンパク質構成アミノ酸から成る群から選択される。より好ましくは、当該PeOIまたはPrOIは、DYKDDDDKMASMTGGQQMGHHHHHHH(SEQ ID NO:45)、MGSSAAAAAASGPGGYGPENQGPSGGYGPGGP(SEQ ID NO:46)、ENREVPFGFTALIKTLRKCKII(SEQ ID NO:47)、NLVSGLIEARKYLEWLHRKLNCKV(SEQ ID NO:48)、HHHHHHIEGRAMSILKSPIDERSILK(SEQ ID NO:49)、HHHHHHIEGRPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPG(SEQ ID NO:50)、HHHHHHIEGRGAPGAPGSQGAPGLQ(SEQ ID NO:51)、GGGRGDMGSSAAAAAASGPGGYGPENQGPSGPGGYGPPRGDGGG(SEQ ID NO:52)から成るペプチドまたはタンパク質の群から選択される。

10

【0087】

また、本明細書に開示されているのは、治療的に活性なペプチドまたはタンパク質であるPeOIまたはPrOIである。特定の複数の実施形態において、PeOIまたはPrOIは治療的に活性なペプチドである。いくつかの実施形態において、治療的に活性なペプチドは、Fuzeon/T20、ヒトカルシトニン、サケカルシトニン、ヒトの副腎皮質刺激ホルモン放出因子、Mab40、Mab42、アルツハイマー病に関連するペプチド、エクセナチド、グラチラマー/コパクソン、テリパラチド/forsteo、ロミブロスチム/nplate、pramlintide/シムリン、チマルファシン/ザダキシ、エンフビルチド、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、脳性ナトリウム利尿ペプチド、ネシリチド/ナトレコル、コルチコリベリン、セルモレリン、ソマトレリン、セクレチン(ヒトおよびブタ)、テルリプレシン、シナプルチド、テデュグルチド、vx-001、血管作用性腸ペプチド、アピブダジル、リナクロチドおよびテデュグルチドから成る群から選択され得る。

20

30

【0088】

特定の複数の実施形態において、PeOIまたはPrOIはタイプI分泌基質である。1000より多くのタンパク質が、文献においてタイプI分泌基質として注釈をつけられ、または説明されている。それらの多く、特にプロテアーゼおよびリパーゼのような加水分解酵素は、生物工学的な使用に関して興味深い特性を有している。適したプロテアーゼおよびリパーゼは、Baumann et al.(1993)EMBO J 12, 3357-3364およびMeier et al.(2007)J. BIOL. CHEM.: 282(43), pp. 31477-31483により説明されている。これらの文書のそれぞれの内容は、その全体が本明細書に参照により組み込まれる。

【0089】

当然、少なくとも1つのPeOIまたはPrOIに関する核酸配列符号化は突然変異誘発を受け得、したがって、タンパク質レベルで変異したPeOIまたはPrOIへと繋がり得る。

40

【0090】

本明細書で用いられる「突然変異」という用語は、任意のヌクレオチド配列またはタンパク質のヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列における変化に関連し、置換、削除、短縮化、および挿入を含む。1つの具体的な例において、突然変異は、点変異、すなわち、任意の配列における、1つまたは複数のヌクレオチドおよび/またはアミノ酸の置換である。タンパク質配列に関して「突然変異」という用語が用いられた場合、タンパク質を符号化するヌクレオチド配列が、例えば、アミノ酸配列を変化させることなく発現の効率

50

性を高める（コドン最適化）目的に資する沈黙突然変異を含む複数の突然変異または修飾を含み得ることが理解される。本願発明において、突然変異は好ましくは、他のアミノ酸による1または2つのアミノ酸の置換である。代替的に、または加えて、核酸分子は、符号化されたタンパク質配列を変化させないヌクレオチド交換、いわゆる沈黙突然変異を含み得る。いくつかの実施形態において、突然変異、例えば、沈黙突然変異は、核酸分子により符号化されたペプチドまたはタンパク質の発現および/または分泌の効率性を高める。重要なことに、突然変異は、本願発明の核酸分子全体で誘発され得る。したがって、突然変異は、ペプチドまたはタンパク質に関する配列符号化に限定されないかもしれない。したがって、また、非符号化配列の区間は突然変異誘発を受け得る。このタイプの突然変異も、沈黙突然変異という用語の範囲に含まれる。非符号化配列の突然変異誘発は、例えば、核酸分子内の異なる配列区間により符号化されたペプチドまたはタンパク質の向上した発現および/または分泌の達成のために有利であり得る。

10

【0091】

本明細書で用いられる「突然変異誘発」という用語は、タンパク質配列の任意の配列位置における天然型のアミノ酸が、それぞれの天然のポリペプチド配列においてこの特定の位置に存在しない少なくとも1つのアミノ酸により置換されるよう実験条件が選択されることを意味する。「突然変異誘発」という用語は、1つまたは複数のアミノ酸の削除または挿入による、配列セグメントの長さの（追加の）修正も含む。したがって、例えば、選択された配列位置における1つのアミノ酸が3つのランダムな突然変異の区間により置き換えられ、野生型のタンパク質のそれぞれのセグメントの長さと比較して2つのアミノ酸残基の挿入に繋がることも本願発明の範囲に含まれる。本願発明において、そのような挿入または削除は、突然変異誘発を受け得るペプチドセグメントのいずれかにおいて互いに独立してもたらされ得る。

20

【0092】

「ランダム突然変異誘発」という用語は、予め定められた単一のアミノ酸（突然変異）が特定の配列位置に存在していないが、少なくとも2つの異なるアミノ酸の1つが、突然変異誘発の間に規定の配列位置において特定の確率で組み込まれ得ることを意味する。

【0093】

「コドン最適化された」とは、1つのアミノ酸残基を符号化するコドンが、同じアミノ酸を符号化するが、この特定のアミノ酸に関して任意の宿主生物によってより頻繁に用いられている異なるコドンにより置き換えられることを意味する。相同性のポリペプチドを符号化するそのようなヌクレオチド配列は、高い配列可変性を有し得、したがって、同じ、または相同性のポリペプチドを符号化する核酸分子間の配列同一性が低いかもしれないことが理解される。

30

【0094】

タンパク質配列の自然の符号化配列、すなわち、酵素のそれぞれの遺伝子セグメントは、本願発明において選択されるアミノ酸位置の突然変異誘発のための開始点として用いられ得る。列挙されているアミノ酸位置の突然変異誘発に関して、当業者は、部位特異的な突然変異誘発のための様々な確立された標準的な方法を自由に選ぶことができる（Sambrook, J. et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY）。一般的に用いられている技術は、所望される配列位置において縮重塩基組成を有する合成オリゴヌクレオチドの混合物を用いてPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）により突然変異をもたらすことである。例えば、コドンNNKまたはNNS（ここで、N = アデニン、グアニン、シトシン、またはチミン、K = グアニンまたはチミン、S = アデニンまたはシトシン）を用いることにより、突然変異誘発の間に20の全てのアミノ酸、およびそれに加えてアンバー終止コドンを組み込むことが可能となり、他方、コドンVVSは、アミノ酸Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr、Val（V = アデニン、グアニン、またはシトシン）がポリペプチド配列の選択された位置に組み込まれる

40

50

ことを阻害するので、組み込まれる可能性のあるアミノ酸の数を12に制限する。コドンNMS (M = アデニンまたはシトシン) を用いることにより、アミノ酸Arg、Cys、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Valが選択された配列位置において組み込まれることを阻害するので、例えば、選択された配列位置における可能性のあるアミノ酸の数を11に制限する。他の可能性としては、コドンNDTまたはNDC (D = アデニン、グアニン、またはチミン) を用いることがある。これはコドンおよび符号化されたアミノ酸の数の間の割合を1:1とし、したがって、スクリーニングの手間を減らし、12の極性、非極性、芳香族、非芳香族、親水性および疎水性アミノ酸残基 (Arg、Asn、Asp、Cys、Gly、His、Ile、Leu、Phe、Ser、Tyr、Val (Reetz et al., 2008, ChemBioChem, 21; 9(11): 1797-804)) のバランスのとれたセットへと繋がる。

10

【0095】

特定の複数の実施形態において、PeOIまたはPrOIは、野生型ペプチドまたはタンパク質配列に対する、少なくとも10、20、30、40、50、またはそれより多くのNおよび/またはC末端アミノ酸の削除を含む。

【0096】

様々な実施形態において、PeOIまたはPrOIは、MBP、リパーゼCalB、プロテアーゼSprP、加水分解酵素PlaB、加水分解酵素PlaK、加水分解酵素PlbF、リパーゼTesA、Vif、ヒトインターフェロンアルファ-1、アルファ-2、アルファ-8、アルファ-16、アルファ-21、ヒトインターフェロンベータ、ヒトインターフェロンガンマ、マウスインターフェロンアルファ、マウスインターフェロンガンマ、IFABP、Cas2、アフィボディタンパク質ZA3、ナイシン、副腎皮質刺激ホルモン放出因子、アミロイドベータペプチド、エクセナチド、Fuzeon) / T20、サケカルシトニン、Mab40、Mab42、リパーゼLipA、SprP、HIV-1タンパク質Vif、およびヒトカルシトニンから成る群から選択される。

20

【0097】

PeOIまたはPrOIはベクターへとクローン化され得る。特定の複数の実施形態において、ベクターは、pSUベクター、pETベクター、pBADベクター、pK184ベクター、pMONOベクター、pSELECTベクター、pSELECT-Tagベクター、pVITROベクター、pVIVOベクター、pORFベクター、pBLASTベクター、pUNOベクター、pDUOベクター、pZEROベクター、pDeNyベクター、pDRIVEベクター、pDRIVE-SEAPベクター、HaloTag (登録商標) Fusionベクター、pTARGET (商標) ベクター、Flexi (登録商標) ベクター、pDESTベクター、pHILベクター、pPICベクター、pMETベクター、pPinkベクター、pLPベクター、pTOPOベクター、pBudベクター、pCEPベクター、pCMVベクター、pDisplayベクター、pEFベクター、pFLベクター、pFRTベクター、pFastBacベクター、pGAPZベクター、pIZ/V5ベクター、pLenti6ベクター、pMIBベクター、pOGベクター、pOptiベクター、pREP4ベクター、pRSETベクター、pSCREENベクター、pSecTagベクター、pTEF1ベクター、pTracerベクター、pTrcベクター、pUB6ベクター、pVAX1ベクター、pYC2ベクター、pYES2-vector、pZeoベクター、pcDNAベクター、pFLAGベクター、pTACベクター、pT7ベクター、gateway (登録商標) ベクター、pQEベクター、pLEXYベクター、pRNAベクター、pPKベクター、pUMVCベクター、pLIVEベクター、pCRUZベクター、Duetベクター、および他のベクター、またはそれらの誘導体から成る群から選択される。好ましい複数の実施形態において、ベクターはpSUベクターである。

30

40

【0098】

本願発明のベクターは、高、中、低コピーベクターから成る群から選択され得る。

【0099】

50

上記で説明されているベクターは、上記で説明されている核酸分子により符号化され、ベクターDNAに含まれるペプチドまたはタンパク質の発現を達成するために、宿主細胞の変換または遺伝子導入のために用いられ得る。

【0100】

宿主細胞は具体的に、遺伝子を発現可能な宿主細胞として選択され得る。加えて、またはそうでなければ、ペプチドまたはタンパク質、ペプチドまたはタンパク質の断片、または他のポリペプチドとのペプチドまたはタンパク質の融合タンパク質を生成するために、ペプチドまたはタンパク質に関する核酸符号化は、適した系における発現のために遺伝子改変され得る。変換は、標準的な技術を用いて行われ得る (Sambrook, J. et al. (2001) 既出)。

10

【0101】

本明細書に説明されているPeOIまたはPrOIの組換え発現に関するそのようなベクターを含む原核または真核の宿主生物も、本願発明の一部を形成する。適した宿主細胞は原核細胞であり得る。特定の複数の実施形態において、宿主細胞は、グラム陽性およびグラム陰性細菌から成る群から選択される。いくつかの実施形態において、宿主細胞は大腸菌などのグラム陰性細菌である。特定の複数の実施形態において、宿主細胞は大腸菌、特に大腸菌BL21(DE3)または他の大腸菌K12または大腸菌B834または大腸菌DH5 またはXL-1誘導体である。更なる複数の実施形態において、宿主細胞は、大腸菌(大腸菌)、シュードモナス、セラチアマルセセンス、サルモネラ菌、赤痢菌(および他の腸内細菌)、ナイセリア、ヘモフィルス、クレブシエラ、プロテウス、エンテロバクター、ヘリコバクター、アシネトバクター、モラクセラ、ヘリコバクター、ステノトロホモナス、デロビブリオ、レジオネラ菌、酢酸菌、バチルス、桿菌、Carynebacterium、クロストリジウム、リステリア菌、連鎖球菌、ブドウ球菌、および古細菌細胞から成る群から選択される。適した真核生物の宿主細胞には、CHO細胞、昆虫細胞、真菌、酵母細胞、例えば、サッカロミセス・セレビシエ、分裂酵母、ピキア・パストリスが含まれる。

20

【0102】

変換された宿主細胞は本願発明のペプチドまたはタンパク質を符号化するヌクレオチド配列の発現に適した条件下で培養される。特定の複数の実施形態において、細胞は、PeOIまたはPrOIを符号化するヌクレオチド配列の発現に適した条件下で培養される。

30

【0103】

組換えPeOIまたはPrOIを生成するために、組換えDNA技術によりベクターが、適した原核または真核の宿主生物に導入される。この目的のために、宿主細胞は最初に、確立された標準的な方法を用いて本願発明に係る核酸分子を含むベクターにより変換される(Sambrook, J. et al. (2001) 既出)。その後、宿主細胞は、異種DNAの発現、したがって、対応するポリペプチドの合成を可能とする条件下で培養される。続いて、ポリペプチドが細胞から回収される。

【0104】

本願発明のペプチドおよびタンパク質の発現のために、いくつかの適した実施要綱が当業者に公知である。

40

【0105】

概して、選択された宿主の増殖に適した任意の公知である培地が本方法に採用され得る。様々な実施形態において、培地は富栄養培地または最小培地である。また、本明細書において考慮されているのは、細胞を増殖させるステップとペプチドまたはタンパク質を発現させるステップとが異なる培地の使用を含む方法である。例えば、増殖ステップは、富栄養培地を用いて行われ、発現ステップにおいて最小培地により置き換えられる。特定の場合において、培地は、LB培地、TB培地、2YT培地、合成培地、および最小培地から成る群から選択される。

【0106】

いくつかの実施形態において、培地は、IPTG、アラビノース、トリプトファンおよび

50

びノまたはマルトースが加えられてもよく、並びにノ若しくは、培養温度が変更されてもよく、並びにノ若しくは培養はUV光に曝されてもよい。様々な実施形態において、組換えペプチドまたはタンパク質の分泌を可能とする条件は、ペプチドまたはタンパク質の発現のために用いられるものと同じである。

【0107】

特定の複数の実施形態において、宿主細胞は、大腸菌、特に大腸菌BL21(DE3)および大腸菌DH5などの原核細胞である。

【0108】

いくつかの実施形態において、例えば、増殖および発現の間に宿主細胞の培養全体が最小培地で実行される。最小培地は、この培地においてタンパク質、脂質、炭化水素、色素、および不純物含有量が低下し、したがって、広範な精製ステップの必要性を回避または低減するので、組換えペプチドまたはタンパク質の発現に有利である。

【0109】

さらに、本発明者らは、再折り畳み緩衝液にアルカリ土類金属塩を加えることが、組換えPeOIまたはPrOIを機能的立体配座へと折り畳むのに有利であることを見出した。いくつかの実施形態において、再折り畳み緩衝液の最終的な濃度は少なくとも0.01mMである。特定の複数の実施形態において、再折り畳み緩衝液は、マグネシウム塩、カルシウム塩、ストロンチウム塩、バリウム塩から成る群から選択される少なくとも1つのアルカリ土類金属塩が補充され得る。いくつかの実施形態において、再折り畳み緩衝液は、少なくとも0.01mMのカルシウム塩を含む。アルカリ土類金属塩の少なくとも0.01mMの全体濃度は、異なるアルカリ土類金属およびノまたは同じアルカリ土類金属からのいくつかの塩を組み合わせることにより達成され得る。アルカリ土類金属が、マグネシウム塩、カルシウム塩、ストロンチウム塩、またはバリウム塩から選択された場合、合成物は、少なくとも0.01mMの単一のカルシウム、ストロンチウムまたはバリウム塩、若しくはいくつかのマグネシウム、カルシウム、ストロンチウムまたはバリウム塩の組み合わせを含み得、少なくとも0.01mMの全体濃度に繋がり得る。特に、少なくとも0.01mMであるカルシウム塩濃度は、いくつかのカルシウム塩を組み合わせることにより達成され得、少なくとも0.01mMの全体濃度に繋がり得る。特定の複数の実施形態において、カルシウム塩は、CaCl₂、CaCO₃、Ca(OH)₂、CaSO₄・2H₂O、Ca₃(PO₄)₂、Ca(CH₃COO)₂・H₂O、およびCa(C₂H₃O₂)₂から成る群から選択される。特定の複数の実施形態において、緩衝液は、少なくとも0.01mMのCa²⁺イオンを含む。様々な実施形態において、再折り畳み緩衝液におけるCa²⁺の濃度は、20~100mMの範囲内である。好ましい実施形態において、Ca²⁺濃度は20mMである。

【0110】

様々な実施形態において、方法は、組換えペプチドまたはタンパク質の精製も網羅し、組換えペプチドまたはタンパク質は、親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびこれらの複数の組み合わせから選択される方法を用いて精製される。

【0111】

いくつかの実施形態において、方法は、組換えペプチドまたはタンパク質内のプロテアーゼ開裂部位の開裂に適したプロテアーゼにより組換えペプチドまたはタンパク質を処理することを備え得る。いくつかの実施形態において、組換えペプチドまたはタンパク質は、上記に開示されている1つまたは複数の方法を用いてタンパク質分解開裂の前に精製される。また、組換えペプチドまたはタンパク質の開裂の後に、方法は、上記に定義されているようにさらに精製ステップを備え得る。したがって、いくつかの実施形態において、組換えペプチドまたはタンパク質は精製され、タンパク質分解開裂を受け、PeOIまたはPrOIはさらに精製される。

【0112】

HlyAまたはHlyAの断片とPeOI(例えばプロテアーゼ第Xa因子)との間の

10

20

30

40

50

部位特異的なプロテアーゼ開裂部位の導入により、または化学的開裂により、アロクライトおよびP e O IまたはP r O Iは、分離され得、および結果として得られるP r O IまたはP e O Iが、追加のノ人工的なアミノ酸なしで生成される。化学的開裂は、臭化シアン、B - プロモスクシンイミド、N - クロロスクシンイミド、BNPSスカトール(3 - プロモ - 3 - メチル - 2 - (o - ニトロフェニルスルフェニル)インドレニン)、またはNi²⁺イオンにより処理され得る。そのような方法は当技術分野で周知である。

【0113】

本願発明のペプチドまたはタンパク質の、特にP e O IまたはP r O Iの精製およびノまたは分泌の後に、ペプチドまたはタンパク質は、ペプチドまたはタンパク質の血清半減期を延長させる成分に融合させられ得る。そのような成分は当技術分野で周知であり、当業者は、通常やり方に頼って、適した成分を特定し得る。例示的な成分は、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミンまたはアルブミン断片、アルブミン結合ペプチド、アルブミン結合タンパク質、トランスフェリン、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロキシエチルデンプン、パルミチン酸、および他の脂肪酸分子を含むがこれらに限定されない。融合はNまたはC末端への融合であり得、しかしまた、システイン、リシン、セリン、スレオニン、グルタミン酸およびアスパラギン酸の側鎖を含む、そのように修飾されることが出来るアミノ酸側鎖への融合であり得る。

【0114】

様々な他の実施形態において、本願発明のペプチドまたはタンパク質、例えば、P e O IまたはP r O Iのポリペプチド配列におけるシステイン残基は、他のアミノ酸へ変異させられ、または例えば、ジスルフィド架橋形成を防ぐよう削除させられ得る。他の複数の実施形態において、本願発明のペプチドまたはタンパク質は、修飾、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、ビオチン、ペプチドまたはタンパク質などの他の化合物との共役のために、または非天然型ジスルフィド結合の形成のための共役部位を生成するために、システイン残基に変異させられる1つまたは複数のアミノ酸を含み得る。したがって、上記で説明されている方法は、ポリエチレングリコール(PEG)、ビオチン、ペプチドまたはタンパク質などの化合物の結合、または非天然型ジスルフィド結合の形成も含み得る。

【0115】

実施例

【0116】

材料および方法

【0117】

タンパク質を、大腸菌BL21(DE3)Novagen)で発現させた。全てのオリゴヌクレオチドはEurofins MWGから購入した。全ての酵素は、NEB、Clontech、Invitrogen、またはFermentasから購入した。

【0118】

1. In-Fusion HDクローン化

【0119】

1.1 ベクターの直線化

【0120】

ベクターは、所望される位置でアニーリングするオリゴヌクレオチドを用いたPCRにより直線化した。例えば、プラスミドpSU-HlyA1を、(5'-TAAATATATTAATTTAAATGATAGCAATCTTACT-3')(SEQ ID NO: 40)およびpSUrev__X__rev(5'-TGCTGATGTGGTTCAGG-3')(SEQ ID NO: 41)のためにオリゴヌクレオチドpSUrev__lin__forにより増幅させた。所望される場合、オリゴヌクレオチドは、プロテアーゼ開裂部位を符号化し、すなわち、オリゴヌクレオチドpSUrev__lin__Xa__rev(5'-ACGGCCATCAATTGCTGATGTGGTTCAGG-3')(SEQ ID

10

20

30

40

50

NO: 42) が第 X a 因子開裂部位 (一次配列: IDGR) を符号化した。PCR 産物を DpnI で処置して、PCR テンプレートを破壊した。所望される場合、PCR 産物を PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) により、または Gel Extraction (Qiagen, Hilden) により精製した。

【0121】

1. 2. 挿入断片の増幅 関心対象の遺伝子を、関心対象の遺伝子にアニーリングする、直線化されたベクターと相補的な 5' オーバーハングを有するオリゴヌクレオチドによる PCR により増幅させた。例えば、順方向オリゴヌクレオチドのオーバーハング (5' - GCAATTGATGGCCGT - 3') (SEQ ID NO: 43) は、オリゴヌクレオチド pS Urev__lin__Xa__rev と相補的であり、逆方向オリゴヌクレオチドのオーバーハング (5' - TAAATTAATATATTA - 3') (SEQ ID NO: 44) は、オリゴヌクレオチド pS Urev__lin__for と相補的であった。所望される場合、PCR 産物を、PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) により、または Gel Extraction (Qiagen, Hilden) により精製した。

10

【0122】

1. 3. In-Fusion HD 反応

【0123】

この反応は、マニュアル (ClonTech) に従って行った。

【0124】

1. 4. 変換

20

【0125】

適した大腸菌細胞を In-Fusion 産物により変換させ、所望される選択マーカを含む寒天平板上で一晩増殖させ、単一のコロニーをプラスミドの調製のために選び取った。全てのプラスミドの配列を、配列決定により検証した。

【0126】

2. PCR およびそれに続く連結によるヌクレオチドの挿入または削除

【0127】

2. 1. リン酸化

【0128】

オリゴヌクレオチドは、マニュアルに従って 5' リン酸塩と共にオーダーし、または 5' において T4 Polynucleotide Kinase (NEB) によりリン酸化させた。

30

【0129】

2. 2. プラスミドの増幅

【0130】

ヌクレオチドの削除のために、プラスミドを、リン酸化されたオリゴヌクレオチドを用いて PCR により、所望されるヌクレオチドにおいて増幅させた。挿入のために、プラスミドを、それらの 5' に挿入されることになるヌクレオチドを有する 5' リン酸化オリゴヌクレオチドを用い、PCR により、所望されるヌクレオチドにおいて増幅させた。PCR 反応を 37 °C で DpnI によって恒温放置してテンプレート DNA を破壊し、ゲル抽出された 50 ng 直線化プラスミドを、Ligase (NEB) および推奨される反応緩衝液を用いて一晩かけて 4 °C で連結させた。連結試料を大腸菌の変換のために用い、プラスミドを単離し、配列を配列決定により検証した。

40

【0131】

3. 部位特異的な突然変異誘発

【0132】

突然変異誘発を、Site-Directed Mutagenesis Protocol of (Agilent) に従って行った。

【0133】

50

4. 関心対象の遺伝子の過剰発現

【0134】

大腸菌を、所望されるプラスミドを用いて変換させ、37℃で振盪しながら2YT培地で増殖させた。発現を、1mMのIPTGにより誘発させ、細胞を4時間の間、増殖させた。典型的には、培養のOD600は5から8の範囲であった。細胞を遠心分離により回収し、-20℃で保存した。

【0135】

5. IBの調製

【0136】

細胞を、再懸濁緩衝液(10mMのTris-HCl、120mMのNaCl、1mMのEDTA、pH7.3)に再懸濁させ、細胞粉碎器(2.5kbar。Constant Systems)の3回の通過により破壊した。細胞可溶化物を20分の間、13,500xg、4℃で遠心分離し、ペレットを、0.5% Triton-X-100および1mMのDTTが加えられた再懸濁緩衝液を用いて洗浄した。20分間の13,500xg、4℃での遠心分離の後、ペレットを、再懸濁緩衝液を用いて洗浄した。遠心分離の後、IBを含むペレットを、4℃/室温で変性緩衝液(10mMのTris-HCl、120mMのNaCl、0.1mMのEDTA、10%グリセロール、6Mのグアニジウム-塩酸塩/8Mの尿素pH7.3)において可溶化させ/変性させた。変性IBは-20℃で保存した。

10

【0137】

6. 臭化シアン(CNBr)による化学的開裂

【0138】

変性IBに、0.1N HClおよび100倍のモル過剰量のCNBr(Sigma-Aldrich)を加えた。反応は、室温で恒温放置した。

20

【0139】

7.3-プロモ-3-メチル-2-(2-ニトロフェニルチオ)-3H-インドール(BNPSスカトール)による化学的開裂

【0140】

IBを50% H₂Oおよび50%酢酸で可溶化させ、(酢酸に溶解された)BNPSスカトールを用いて室温または他の温度で培養した。更なる詳細は、Vestling et al.(1994)RCM 8,786-790、およびRahali et al.(1999)Journal of protein chemistry 18,1-12に説明されている。

30

【0141】

8. N-クロロスクシンイミド(NCS)による化学的開裂

【0142】

IBを、8Mの尿素、pH7.3で溶解し、(酢酸に溶解された)NCSと混ぜ合わせた。更なる詳細は、Shechter et al.(1976)Biochemistry 15,5071-5075、およびLischwe et al.(1977)The Journal of biological chemistry 252,4976-4980に説明されている。

40

【0143】

9. トリフルオロ酢酸(TFA)による化学的開裂

【0144】

IBを、TFAに溶解した。DMSOおよびHCl(37%)を加えて、開裂反応を開始させた。反応混合物は、異なる複数の温度で恒温放置した。更なる詳細はDimarcho et al.(1987)Process for selective peptide bond cleavage,EP0288272A3に説明されている。

【0145】

10. IBの再折り畳み

50

【0146】

変性IBを、変性緩衝液において0.2mg/mLまで希釈し、20mMのCaCl₂または0.2mMのEDTAが加えられた再び折り畳み緩衝液(10mMのTris-HCl、120mMのNaCl、pH7.3)に対して透析しつつ、または変性IBを(20mMのCaCl₂または0.2mMのEDTAが加えられた)再懸濁緩衝液において0.2mg/mLまで迅速に希釈することにより再び折り畳んだ。再び折り畳み緩衝液の成分は変更され得、他の緩衝液(Hepes、CAPS、Bicine、Citrateなど)、0~14の範囲のpH値、塩濃度、および追加の補足物が用いられ得る。再び折り畳みのためのタンパク質濃度も、例えば、0.01~20mg/mLの範囲で変更され得る。再び折り畳まれたIBは20分の間、50,000xg、4 で遠心分離し、上清を更なる実験のために用いた。

10

【0147】

11. タンパク質試料の濃度

【0148】

タンパク質を、所望される分画分子量(MWCO)による限外濾過(Amicon Filterデバイス、Millipore)により濃縮させた。

【0149】

12. 固定化金属イオン親和性クロマトグラフィー(IMAC)

【0150】

IMACを、FPLCシステム(Akta Systems、GE Healthcare)を用いて行った。Hisタグを含む再び折り畳まれたタンパク質をIMACカラムに充填し、0.1mMのEDTAまたは20mMのCaCl₂が加えられたIMAC緩衝液A(10mMのTris-HCl、100mMのKCl、10%グリセロール、10mMのイミダゾール、pH7.3)において平衡化させた。タンパク質を、10~500mMの直線勾配のイミダゾールから溶出させた。

20

【0151】

13. 第Xa因子消化

【0152】

50μgのタンパク質を、4、20、または25 で1μg第Xa因子(NEB)を用いて培養し、試料を様々な時点において取り出した。

30

【0153】

14. サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)

【0154】

対応する緩衝液において平衡化させられたSECカラム(Superdex 75 16/60、Superdex 75 10/300、Superdex 200 16/60、Superdex 200 10/300、GE Healthcare)へ、タンパク質を載せた。

【0155】

15. HPLC

【0156】

分析RP-HPLCを、室温で、LiChrospher WP 300 RP-18の末端にキャップがつけられたカラム(Merck)を用いて行った。再び折り畳まれた/変性IBを注入し、水性緩衝液A(0%アセトニトリル、0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸)を有機溶剤緩衝液B)100%アセトニトリル、0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸)と混合することにより溶出させた。タンパク質またはペプチドを、0~100%の勾配の緩衝液を用いて溶出させた。クロマトグラムは、220nmでの吸光度を示す。溶出剤を分画し、回収し、溶剤を蒸発させた。

40

【0157】

16. DAUDAによる蛍光分光法

【0158】

50

11 - (ダンシルアミノ)ウンデカノン酸(DAUDA, Cayman Chemical)を、50%イソプロパノールおよび50%緩衝液(20mMの KH_2PO_4 、0.25mMのEDTA、pH7.3)の1mMの保存液として調製し、さらに、緩衝液を用いて適切な濃度まで希釈した。100nMのタンパク質を、緩衝液および1mLの石英ガラスキュベットにおいて用いた。Fluorolog(登録商標)-3(Horiba)(Kim and Frieden(1998)Protein Sci, 7, 1821-1828)を用いた350nmでの励起の後、蛍光信号を500nmの波長で記録した。励起および発光の両方に関してスリット幅は4.3nmに調整し、0.5秒の間、信号を積算した。タンパク質の不在状態での緩衝液におけるDAUDAの蛍光信号は、バックグラウンドとして減算した。補正し、正規化した蛍光信号を、DAUDA濃度に対してプロットした。データは、プログラムPrism 5を用いて調整した。

10

【0159】

17. アミロース樹脂への結合検定

【0160】

再び折り畳まれたHlyA1-MBPを、自然流下によりアミロース樹脂上に載せ、広範な洗浄の後に、タンパク質を、10mMのマルトースを含む再折り畳み緩衝液により溶出させた。

【0161】

18. 分泌検定

【0162】

大腸菌細胞を、(ABCトランスポーターHlyBおよび膜融合タンパク質HlyDを符号化する)プラスミドpK184-HlyBDにより変換させ、Haemolysin A T1SSとプラスミド符号化融合タンパク質との会合を可能とした。pK184 HlyB, Dは、Bakkes et al. (2010) JBC; 285(52): 40573-80により以前に説明されている。(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)およびアンピシリン(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)および5mMの CaCl_2 が加えられた2xYT培地で、細胞を一晩かけて増殖させた。50mLの増殖培地に、開始0.1のOD600の細胞を播種した。細胞を37で攪拌して増殖させ、発現を0.4~0.6のOD600で1mMのIPTGにより誘発させた。2~6時間後、培養物を遠心分離し(20分、50.000xg、4)、上清試料(16 μL)および細胞(OD_{eq}=0.08)がSDS-PAGEおよびクマシーブリリアントブルー(CBB)染色により解析した。

20

【0163】

19. 用いられたベクター、および用いられたベクターにより符号化されたタンパク質配列

30

【0164】

以下のDNAを、pSUプラスミドのバックボーンへとクローン化させた。

【表 1】

ベクター名	PeOI/ PrOI	野生型タンパク質受入番号、 バージョン番号、日付	コンストラクト	ベクター配 列符号化 SEQ I D NO:	タンパク 質配列/ SEQ ID N O:
p I A R _ 1 0 1	ペプチド101	—	H l y A 1ペプチド1	5	6
p I A R _ 1 0 2	ペプチド102	—	H l y A 1ペプチド2	7	8
p I A R _ 1 0 3	ペプチド103	—	H l y A 1ペプチド3	9	10
p I A R _ 1 1 2	ペプチド103	—	H l y A 1 R 2 1 0 Dペ プチド3	11	12
p I A R _ 1 1 5	ペプチド103	—	H l y A 1 M 8 8 Aペ プチド3	13	14
p I A R _ 2 0 1	Fuzeugon®	受入番号 3H00_A バージョン 3H00_A GI: 281307071, VRL 2009年12月19日	H l y A 1 - F u z e o n®	15	16
p I A R _ 2 0 2	ヒト副腎皮質刺激 ホルモン放出因子	受入番号 AAX18228 バージョン AAX18228. 1 GI: 6978827, ROD 2011年8月14日	H l y A 1 - H C R F	17	18
p I A R _ 2 0 7	I F A B P	受入番号 NP_037200 バージョン NP_37200. 1 GI: 125973, BCT 2011年5月3日	H l y A 1 - I F A B P	19	20
p I A R _ 2 1 2	ベータアミロイド ペプチド前駆体 [ホモサビエン ス]、40個のアミ ノ酸	受入番号 ABB26265 バージョン ABB26265. 2 GI: 8176534, 2000年7月14日	H l y A 1 - M a b 4 0	21	22
p I A R _ 2 1 3	MBP	—	H l y A 1 - M B P	23	24
p I A R _ 2 1 4	ナイシン	受入番号 P13068 バージョン P13068. 1 GI: 125973, BCT 2011年5月3日	H l y A 1 ナイシン	25	26
p I A R _ 2 1 5	ナイシン	“	H l y A 1 ナイシン (3 つのGG反復配列)	27	28
p I A R _ 2 2 0	ナイシン	“	H l y A 1 ナイシン (2 つのGG反復配列)	29	30
p I A R _ 2 2 1	ナイシン	“	H l y A 1 ナイシン (1 つのGG反復配列)	31	32
p I A R _ 2 2 2	ナイシン	“	H l y A 1 ナイシン (G G反復配列なし)	33	34

10

20

30

40

【表 2】

ベクター名	PeOI/ PrOI	野生型タンパク質受入番号、 バージョン番号、日付	コンストラクト	ベクター配 列符号化 SEQ I D NO:	タンパク 質配列/ SEQ ID N O:
p I A R _ 2 2 3	ナイシン	“	H l y A 1 ナイシン (4 つのGG反復配列、H l y A 1 のC末端部分な し)	3 5	3 6
p I A R _ 2 2 7	サケカルシトニン	受入番号 B A A 0 0 2 8 1 バージョン B A A 0 0 2 8 1 . 1 G I : 2 2 0 9 4 6, S Y N 2 0 0 3 年 5 月 2 1 日	H l y A 1 - M e t サケ カルシトニン		6 5
p I A R _ 2 2 8	ヒトカルシトニン	受入番号 A C B 1 4 8 8 1 バージョン A C B 1 4 8 8 1 . 1 G I : 1 7 0 3 2 0 1 1 0, S Y N 2 0 0 8 年 3 月 2 4 日	H l y A 1 - T y r ヒト カルシトニン		6 0
p I A R _ 2 2 9	ベータアミロイド ペプチド前駆体 [ホモサピエン ス]、42個のアミ ノ酸	受入番号 A A B 2 6 2 6 5 バージョン A A B 2 6 2 6 5 . 2 G I : 8 1 7 6 5 3 4, 2 0 0 0 年 7 月 1 4 日	H l y A 1 - T y r - M a b 4 2		6 4
p I A R _ 2 3 7	阻害物質ペプチド 1	Q 0 6 4 5 5 (M T G 8 _ H U M A N)	H l y A 1 - M e t 阻害 物質ペプチド1		6 2
p I A R _ 2 3 8		人口配列	H l y A 1 - T r y ペプ チド238		5 3
p I A R _ 2 3 9		人口配列	H l y A 1 - T r y ペプ チド239		5 4
p I A R _ 2 4 0		人口配列	H l y A 1 - T r y ペプ チド240		5 5
p I A R _ 2 4 1		人口配列	H l y A 1 - T r y ペプ チド241		5 6
p I A R _ 2 4 2		人口配列	ペプチド240		5 5
p I A R _ 2 4 3		人口配列	ペプチド241		5 6
p I A R _ 3 0 2	ナイシン	受入番号 P 1 3 0 6 8 バージョン P 1 3 0 6 8 . 1 G I : 1 2 5 9 7 3, B C T 2 0 1 1 年 5 月 3 日	L i p A ナイシン	3 7	3 8

【0165】

実施例 1 : H l y A またはその断片に N 末端または C 末端で融合させられた P e O I ま
たは P r O I の I B の形成

【0166】

全ての示されている、H l y A または H l y A の断片 (例えば、H l y A 1。いくつか
のコンストラクトの模式図に関しては図 1 を参照) に N 末端で融合させられた P r O I お
よび P e O I が I B として細胞において凝集する (図 2)。注目すべきことに、非抱合型
の I F A B P は通常、細胞内で可溶性であった (図 2 の C を参照)。これら結果は、H l
y A および H l y A の断片が I B の形成を誘発し、この特性を、融合させられたペプチド
およびタンパク質へと伝えていることを示している。

【0167】

10

20

30

40

50

Hly AまたはHly Aの断片(例えば、Hly A 1。コンストラクトの模式図に関しては図1を参照)にC末端で融合させられたProIまたはPeoIを、大腸菌において発現させ(図2のB)、それらは細胞内で不溶性である(例示的なHly A 1 - IFABP、図2のCを参照)。したがって、Hly AおよびHly Aの断片は、そのNおよびC末端に融合させられたProIおよびPeoIのIBとしての凝集を強いる。

【0168】

Hly Aまたはその断片の融合タンパク質、および1つのペプチドまたは異なる複数のペプチドの2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはそれより多くの単量体から成るペプチド多量体も、細胞内の不溶性凝集体として発現する。図2のDは、Hly A 1に融合させられた、単量体としてのペプチド238(SEQ ID NO: 53)、三量体(ペプチド240 SEQ ID NO: 55)、および五量体(ペプチド241 [SEQ ID NO: 56])の発現を示す。Hly A 1への融合なしで、三量体および五量体のペプチドは細胞により生成されなかった(pET16b__240およびpET16b__241を参照)。多量体のペプチドは細胞内で発現せず、またタンパク質分解的に分解されなかった(prot e o l y t i c a l l y d e g r a d e d)。

10

【0169】

同様の発現データを、Hly A 1に融合させられた以下のペプチドに関して得た。Mab40(SEQ ID NO: 63)、Mab42(SEQ ID NO: 64)、サケカルシトニン(SEQ ID NO: 65)、ヒトカルシトニン(SEQ ID NO: 60)、阻害物質ペプチド1(SEQ ID NO: 62)、およびその他。

20

【0170】

実施例2: Hly AおよびHly A 1の精製および再折り畳み

【0171】

Hly AおよびHly A 1を、IBとして大腸菌において生成した。IBを、それぞれEDTAまたはCaCl₂存在下で再び折り畳んだ。再折り畳み効率性は、EDTAにより約35%であり、不均質かつ不安定なHly AまたはHly A 1を得た。図3のAおよびBは、Hly A断片Hly A 1に関する結果を示す。対照的に、Ca²⁺存在下で90%を超えるHly AまたはHly A 1が再び折り畳まれ、タンパク質は安定しており均質であった(図3のCおよびD)。

【0172】

30

実施例3: Hly A 1 - ナイシンの精製および再折り畳み

【0173】

(プラスミドpIAR__214により符号化された)Hly A 1 - ナイシンを発現している5gの細胞から、Hly A 1 - ナイシンの約140mgの未精製IBを調製し、変性させ、再び折り畳んだ。EDTA存在下で、殆どのタンパク質は不溶性であり、凝集し、少量の不均質なHly A 1 - ナイシンのみが生成された(図4のAおよびC)。対照的に、Ca²⁺による再折り畳みは、高い純度の均質なタンパク質種を高い収率で生成した(図4のBおよびC)。再折り畳みの効率性は、Ca²⁺存在下で95%より高く、EDTA存在下で25%より低かった。

【0174】

40

再折り畳みに続き、第Xa因子による部位特異的なタンパク質分解によりナイシンをHly A 1から分離させた(図4のD)。90分後、100μLの反応混合物を、HPLCにより精製した(図4のE)。溶出分画を、SDS - PAGE解析(図4のF)、Western Blotting、および質量分析(データは示されていない)により解析し、完全なナイシン分子を識別した。

【0175】

実施例4: Lip A 1 - ナイシンの精製および再折り畳み

【0176】

リパーゼA(Lip A)は、専用のT1SSにより分泌させられた他のRTXタンパク質である。Hly A 1 - ナイシンと同等の、ナイシンがLip AのC末端断片に融合させ

50

られたコンストラクトをクローン化させた。この断片は、R T X領域、および(プラスミド p I A R__3 0 2 上で符号化された) L i p A の分泌信号をカバーしていた。続いて L i p A 1 - ナイシンを大腸菌において生成し、I B の形成を検査した。図 5 の A に示されているように、L i p A 1 - ナイシンは I B を形成する。さらに、変性させられた L i p A 1 - ナイシンの再折り畳みを、 $C a^{2+}$ および E D T A それぞれの存在下で解析した。再び折り畳まれた L i p A 1 - ナイシンの S E C 解析は、融合タンパク質が H l y A 1 - ナイシンと同様の挙動を示し、 $C a^{2+}$ が、L i p A 1 - ナイシンの、安定した均質なタンパク質への再折り畳みを誘発することを示した(図 5 の B)。対照的に、E D T A 存在下で、L i p A 1 - ナイシンはより低い効率性で再び折り畳まれ、L i p A 1 - ナイシンの大部分は凝集を形成する(図 5 の C および D)。したがって、H l y A、L i p A、およびおそらく R T X タンパク質スーパーファミリーの他の要素が、I B として P r O I および P e O I を生成し、 $C a^{2+}$ 、他の金属イオン、または特定の再折り畳み条件を加えることにより融合タンパク質を再び折り畳むのに用いられ得るかもしれない。

10

【 0 1 7 7 】

実施例 5 : 異なる H l y A 断片およびそれらの再折り畳みを誘発する統合性の解析

【 0 1 7 8 】

各 G G 反復配列の、I B の形成および再折り畳みに関する影響を調べるために H l y A 1 - ナイシンを、G G 反復配列毎に N 末端から段階的に切断した(図 1)。プラスミド p I A R__2 1 5、p I A R__2 2 0、p I A R__2 2 1、p I A R__2 2 2 から発現させられたタンパク質を調べた。H l y A 1 の C 末端部分の影響を検討するために p I A R__2 2 3 を設計した。p I A R__2 2 3 は、H l y A 1 の C 末端を欠いている(分泌信号を含む) H l y A 1 の 4 つの G G 反復配列全てに C 末端で融合させられたナイシンに対応する。

20

【 0 1 7 9 】

プラスミド p I A R__2 2 2 からの発現させられたタンパク質のみを、細胞可溶化物試料において見える量で大腸菌において発現させた(図 6 の A)。それにも関わらず、p I A R__2 1 5、p I A R__2 2 0 ~ 2 2 3 により符号化されたタンパク質を発現する細胞の I B を調製し、変性させ、 $C a^{2+}$ または E D T A を用いて再び折り畳むことが出来た。再び折り畳まれたタンパク質を濃縮させ、S E C により解析した。濃縮されたタンパク質の、第 X a 因子による開裂を解析した。プラスミド p I A R__2 2 0、p I A R__2 2 2、および p I A R__2 2 3 のみが、相当量の組換えタンパク質を生成した。したがって、これらのタンパク質は、以下の解釈により検討された。

30

【 0 1 8 0 】

プラスミド p I A R__2 2 0 (2 つの G G 反復配列)、p I A R__2 2 2 (G G 反復配列なし)、および p I A R__2 2 3 (4 つの G G 反復配列のみ、H l y A 1 の C 末端部分なし) から符号化されたタンパク質の I B を生成した。したがって、G G 反復配列および分泌信号から成る H l y A 1 の C 末端部分が I B の形成を誘発する可能性がある。

【 0 1 8 1 】

p I A R__2 2 0 (2 つの G G 反復配列) により符号化されたタンパク質は、E D T A と比較して $C a^{2+}$ 存在下でより効率的に再び折り畳まれ濃縮された(図 6 の B および C)。他方、 $C a^{2+}$ および E D T A の両方の場合において、p I A R__2 2 2 (G G 反復配列なし) により符号化されたタンパク質の再折り畳みおよび濃縮の効率性は同程度であった。したがって、2 つの G G 反復配列は、 $C a^{2+}$ 依存的に再折り畳みの効率性の向上を可能とする。p I A R__2 2 0 および p I A R__2 2 2 により符号化されたタンパク質の S E C 解析はこれらの結果を支持している。p I A R__2 2 0 により符号化されたタンパク質は、 $C a^{2+}$ 存在下でのみ、S E C 解析により明確かつ対称的な信号を示し(図 6 の C)、他方、p I A R__2 2 2 により符号化されたタンパク質による S E C 解析のクロマトグラムは、E D T A および $C a^{2+}$ 存在下で同等であり(図 6 の D および E)、したがって、p I A R__2 2 2 により符号化されたタンパク質は、可溶性の均質な状態へと折り畳まれなかった。このことは、G G 反復配列が効率的な復元のために必須であることを

40

50

示している。

【0182】

Ca^{2+} 存在下でのみSECから対称的な信号として、pIAR__223(4つのGG反復配列あり、HlyA1のC末端部分なし)により符号化されたタンパク質は溶出する。対照的に、EDTA存在下で、pIAR__223から発現させられた組換えタンパク質は不均質である(図6のFおよびG)。

【0183】

実施例6: HlyA1-HCRFの精製および再折り畳み

【0184】

約5gの細胞から、(プラスミドpIAR__202により符号化された)HlyA1-HCRFに関して約200mgの未精製IBを精製し、グアニジウム-塩酸塩において変性させ、続いて再び折り畳んだ(図7のA)。EDTA存在下での40mgのHlyA1-HCRFの再折り畳みは、約8.4mgの可溶性タンパク質を生成したが、タンパク質試料は不安定かつ不均質であった(図7のCおよびE)。対照的に、 Ca^{2+} 存在下での再折り畳みは、(約85%の再折り畳み率に対応する)34mgの可溶性かつ均質なタンパク質を生成した(図7のCおよびD)。

10

【0185】

再び折り畳まれたHlyA1-HCRFは第Xa因子を用いて温浸し(図7のG)、反応混合物をHPLCにより精製した(図7のF)。この方策により、HCRFをHlyA1から開裂し、分離させた。

20

【0186】

実施例7: IFABPの生成

【0187】

(プラスミドpIAR__207上で符号化された)HlyA1-IFABPを発現させ、約6gの細胞から205mgの変性IBを調製した。HlyA1-IFABPを、 Ca^{2+} およびEDTA存在下で、安定した均質な状態へと再び折り畳んだ(>65%)(図8のA~D)。IFABPのIBへの凝集を強いたにも関わらず、HlyA1は、変性させられたIFABPの*in vitro*での再折り畳みを阻害しない。この方策により、HlyA1-IFABPは高い収率、高い純度、および可溶性の形態で生成された。SEC解析に基づくと、 Ca^{2+} のプラスの影響はHlyA1-IFABPの復元に関して無視できる程度であったが、しかし、HlyA1-IFABPの生物活性は Ca^{2+} 存在下でより高い(図8のFおよびG)。したがって、いくつかの実施形態において、T1SSのアロクライトまたはその断片は、IB-タグとして機能し、融合させられたPeOIまたはPrOIの効率的な復元を妨げない。 Ca^{2+} イオンの存在は融合パートナーの生物活性を、例えば、アロクライトまたはその断片の安定性および/または可溶性を高めることによりその安定性および可溶性を高めることにより高める。

30

【0188】

IFABPを、第Xa因子によりHlyA1から開裂した。1 μ gの第Xa因子が3時間および20で50 μ gのHlyA1-IFABPの>95%を消化した(図8のE)。HlyA1-IFABPの生物活性を、11-(5-(ジメチルアミノ)-1-ナフタレニル)スルホニル)アミノ)-ウンデカノン酸(DAUDA)、蛍光性脂肪酸類似体により検査した(図8のFおよびG)。 Ca^{2+} およびEDTAにおいて再び折り畳まれたHlyA1-IFABPの K_D は、それぞれ140.8nM \pm 13.1nMおよび264.3nM \pm 13.2nMであると判断した。HlyA1-IFABPは、生物活性であり、開発された技術が、活性であり可溶性であるタンパク質の生成を可能とすることを示した。活性は、IFABPに関する文献における値と同等であった(K_D = 20.9nM \pm 0.6nM)。

40

【0189】

実施例8: IFNA2の生成

【0190】

50

(プラスミド pIAR__210 により符号化された) HlyA1-IFNA2 を、大腸菌において高いレベルで発現させた。約 5 g の細胞から 310 mg の変性 IB を精製した。HlyA1-IFNA2 の再折り畳みを、 Ca^{2+} または EDTA 存在下で行った。±3~4% の HlyA1-IFNA2 を、両方の試薬存在下で再び折り畳んだ。還元剤 (DTT) ありでの、またはなしでの SDS-PAGE 解析は、再折り畳み後の HlyA1-IFNA2 の酸化状態、およびしたがって、ジスルフィド結合の形成を示唆している (データは示されていない)。再折り畳みの効率性は、0.5 M アルギニンを加えることによりほぼ 100% まで高められた。ここでも、HlyA1 は IFNA2 の再折り畳みを妨げず、IFNA2 が、本願発明を用いることにより高い収率で生成された。再び折り畳まれた HlyA1-IFNA2 は DTT 存在下で、またはそれが存在していない状態で SDS-PAGE 解析により示されるように酸化され (図 9 の A)、生物活性であった (データは示されていない)。

10

【0191】

アルギニンおよび Ca^{2+} 存在下で再び折り畳まれた HlyA1-IFNA2 は可溶性であり均質であった (図 9 の B)。対照的に、アルギニンおよび EDTA により再び折り畳まれた HlyA1-IFNA2 に関して 2 つの溶出信号が観察された (図 9 の C)。したがって、 Ca^{2+} 存在下での再折り畳みは、EDTA 存在下での再折り畳みと比較して HlyA1-IFNA2 の均質性を高めた。

【0192】

実施例 9 : MBP の生成

20

【0193】

MBP は、大腸菌内での融合させられた PrOI の可溶性の発現のための可溶性タグとして周知である (Nallamsetty, S. & Waugh, D. S. A. (2007) Nat Protoc, 2, 383-391)。それにも関わらず、IB および (プラスミド pIAR__213 により符号化された) HlyA1-MBP IB が調製され、HlyA1 は MBP の凝集を強いる (図 10)。HlyA1-MBP を Ca^{2+} 存在下で再び折り畳み、濃縮させた。SEC 解析は、可溶性 HlyA1-MBP の生成を示した (データは示されていない)。再び折り畳まれた HlyA1-MBP は固定化アミロースに結合し、再び折り畳まれた MBP の生物学的機能性を示した (図 10)。

【0194】

30

実施例 10 : pIAR__101 ~ 103 再折り畳みおよび第 Xa 因子消化

【0195】

HlyA1 および (プラスミド pIAR__101、pIAR__102、pIAR__103 により符号化された) ペプチド 101、102 および 103 の融合タンパク質を、IB として大腸菌において発現させた (図 11 の A)。約 4.5 g の細胞から 72 mg、92 mg、および 108 mg の未精製 IB を調製した。

【0196】

IB を、 Ca^{2+} によりほぼ 100% まで再び折り畳み、タンパク質を濃縮させた (列「ペレット」および「再び折り畳まれたペプチド 10X」を比較。図 11 の B~D)。融合タンパク質を第 Xa 因子により培養し、PeOI を HlyA1 から分離させることが出来た。ペプチドを HPLC により精製した。ペプチド 103 を質量分析により識別した (データは示されていない)。

40

【0197】

実施例 11 : HlyA1-Fuzeon (登録商標) の精製および再折り畳み

【0198】

約 4 g の細胞から、(プラスミド pIAR__201 により符号化された) HlyA1-Fuzeon (登録商標) の 130 mg の未精製 IB を精製し、これらをグアニジウム-塩酸塩で変性させ、続いて再び折り畳んだ。再折り畳みの効率性は Ca^{2+} を用いた場合に ±30% であり、EDTA を用いた場合に ±11% であった。SEC 解析は、HlyA1-Fuzeon (登録商標) は、 Ca^{2+} 存在下でのみ可溶性状態で生成され得ること

50

を示した(図12のAおよびB)。図12のCは、第Xa因子による、HlyA1-Fuzeon(登録商標)からのFuzeon(登録商標)のタンパク分解性分離の結果を示す。

【0199】

実施例12：HlyA1における第Xa因子に関する非特異的な開裂部位の変性

【0200】

質量分析は、HlyA1における第Xa因子に関する非特異的な開裂部位を識別した(一次配列SYGR、aa 207-210)。野生型HlyA1の、プラスミドpIAR__112におけるHlyA1-R210Dへの突然変異は、この開裂部位を破壊すること、およびHlyA1とPeOIまたはPrOIとの間の意図されている開裂部位上での第Xa因子の開裂の効率性を高めることを目的として構築された。ペプチド103に融合させられたHlyA1-R210Dの第Xa因子消化は、HlyA1-R210Dの部位産物が形成されなかったことを示した(図13)。

10

【0201】

実施例13：融合タンパク質の化学的開裂

【0202】

ペプチド結合の化学的開裂は文献において周知である。そのようなアプローチの、PrOIまたはPeOIの二機能性タグからの分離への適用可能性を調べた。臭化シアン(CNBr)、メチオニン残基にC末端で結合するペプチドを開裂する化学試薬、およびBNPSSカトール、NCS、およびTFA、トリプトファン残基のC末端でのペプチド結合を開裂する化学試薬を選択した。HlyA1内の単一のメチオニンおよびトリプトファン残基はアラニン(M88A、W109A)に変異し、メチオニンまたはトリプトファンはN末端でPeOIまたはPrOIに置かれた。例えば、メチオニンを、N末端でペプチド103(タンパク質HlyA1 M88A-Met-ペプチド3。プラスミドpIAR__115上で符号化された)に追加した。図14におけるSDS-PAGE解析により示されるように、ペプチドは成功裏にHlyA1から開裂された。A：ペプチド103を、CNBrによりHlyA1 M88A-Metから分離させた。ペプチド103のアイデンティティは、質量分析により確認された(データは示されていない)。B：pIAR__202w、pIAR__238、pIAR__239、pIAR__240およびpIAR__241により符号化されたペプチドの約50%を、3hでNCSによりHlyA1から開裂した。pIAR__240およびpIAR__241はクーマシー染色されたゲル上で明確に見え(矢印により示されている)、他方、他のペプチドは染色するには小さ過ぎた。0hの試料において50kDa超で見える種は、ペプチドのシステイン架橋二量体に対応する。

20

30

【0203】

実施例14：発酵を介して発現させられたHlyA1融合タンパク質

【0204】

プラスミドpIAR__115を含む大腸菌を発酵のために用いた。発酵の間に餌としてグルコースが用いられたとき、発現が抑制された。この抑制は、グルコースによるプラスミドpIAR__115の発現を規制するラクトースプロモータの抑制から生じるのかもしれない。したがって、グリセロールを、発酵の間に餌としてテストした。この方策により、2.5kgより多くの湿細胞が10Lの発酵ブロスから生成された。HlyA1 M88A-Met-ペプチド3の発現レベルは、バッチ培養と同等であり、またはさらには、それよりも高められた(図15)。440gの細胞(湿細胞質量)から65gのIBを調製した。したがって、本願発明に係る技術は規模の拡張が可能であり、IBの滴定量は、細胞質量を増やす、および/または発現レベルを高めることにより増やされる。

40

【0205】

本明細書に引用されている全ての文書は、それらの全体が参照によりここに組み込まれる。

【0206】

本明細書において例示的に説明されてきた複数の本願発明は、本明細書に具体的に開示

50

されていない要素または複数の要素、限定または複数の限定がなくても適切に実施され得る。したがって、例えば、「備える」、「含む (including)」、「含む (containing)」等の用語は、拡大的に、限定することなく読まれるべきである。加えて、本明細書に採用されている用語および表現は、限定ではなく説明の用語として用いられており、そのような用語および表現の使用において、示されている、および説明されている特徴、またその一部の任意の同等物を排除する意図はなく、様々な修正が特許請求されている発明の範囲内で可能であることが認識される。したがって、本願発明が、好ましい複数の実施形態、およびオプション的な複数の特徴によって具体的に開示されてきたが、それらにおいて実施される、本明細書において開示されている本願発明の修正および変形が、当業者により用いられるかもしれない、そのような修正および変形は本願発明の範囲内にあるものとして見なされることが理解されるべきである。本願発明は、本明細書において幅広く、および一般的に説明されてきた。包括的な開示内に含まれるより狭い範囲の種および部分的なグルーピングのそれぞれも本願発明の一部を形成する。これには、削除された部材が本明細書に具体的に列挙されているかにかかわらず、任意の主題をその種類から取り除く但し書きまたは否定的な限定を用いた本願発明の包括的な説明が含まれる。加えて、本願発明の複数の特徴または態様が、マーカッシュグループに関して説明されているとき、これによって本願発明は、マーカッシュグループの任意の個々の要素、または複数の要素のサブグループに関して説明されていることを当業者は認識されよう。本願発明の更なる複数の実施形態は、以下の請求項より明らかになるであろう。

10

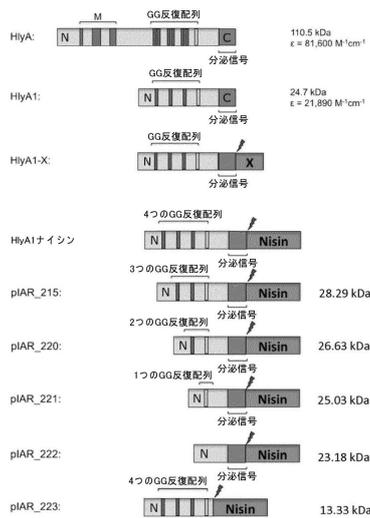
20

【配列表フリーテキスト】

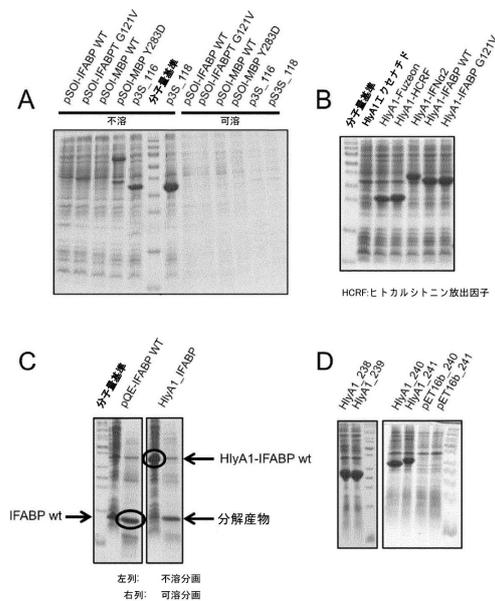
【0207】

<223> Inventor: SCHMITT, Lutz; SCHWARZ, Christian; SMITS, Sander Hendrikus Joannes

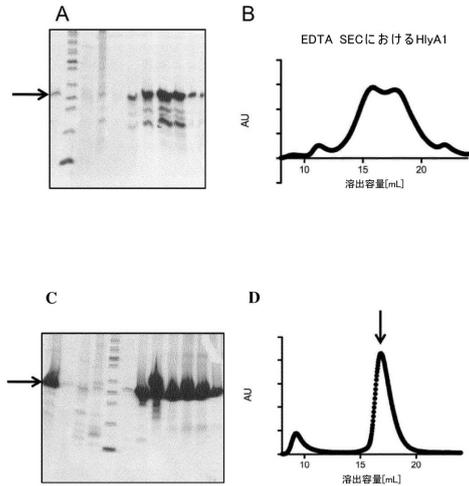
【図1】



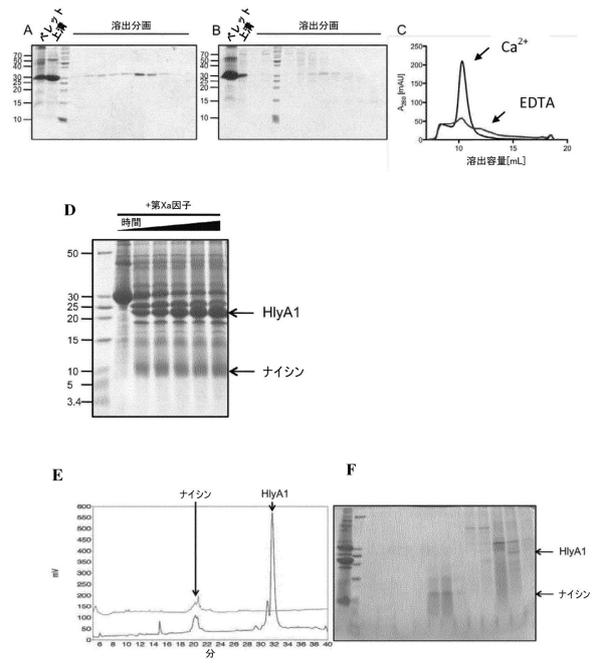
【図2】



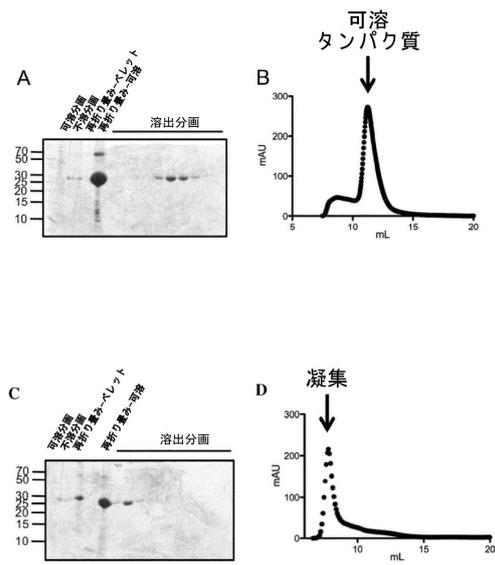
【 図 3 】



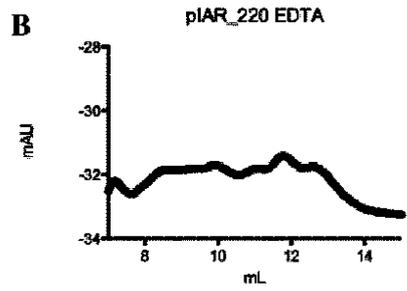
【 図 4 】



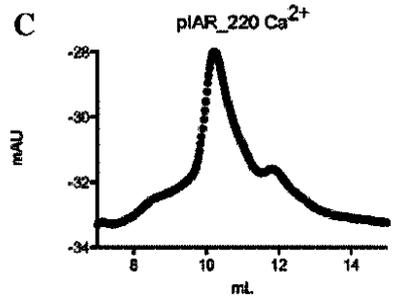
【 図 5 】



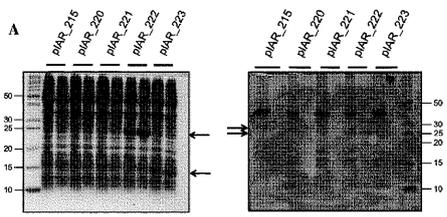
【 図 6 B 】



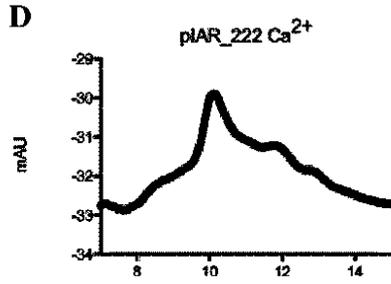
【 図 6 C 】



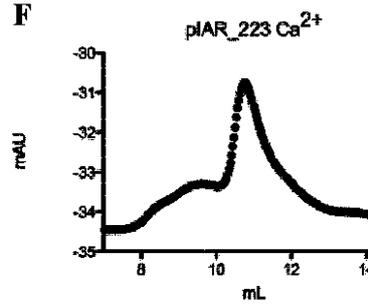
【 図 6 A 】



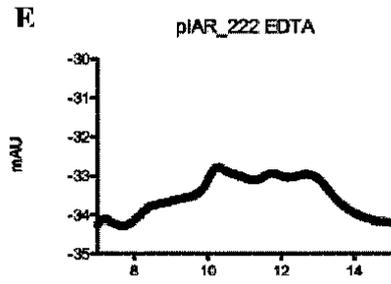
【 図 6 D 】



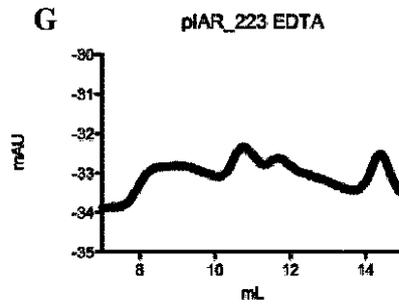
【 図 6 F 】



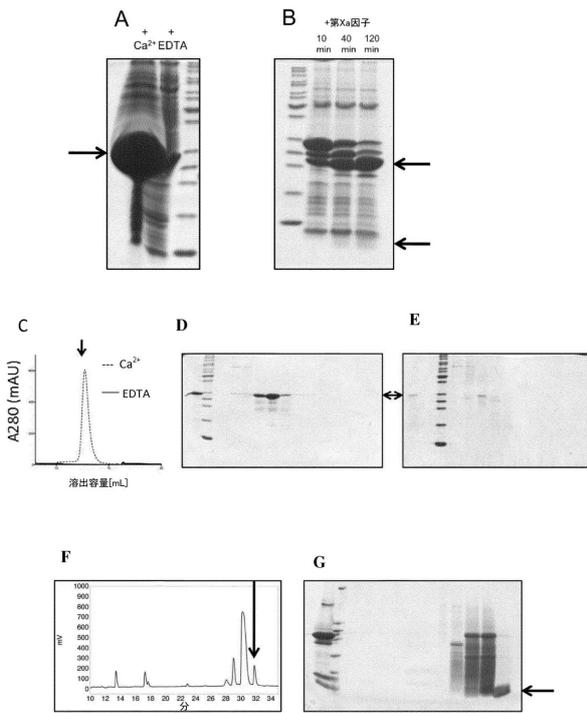
【 図 6 E 】



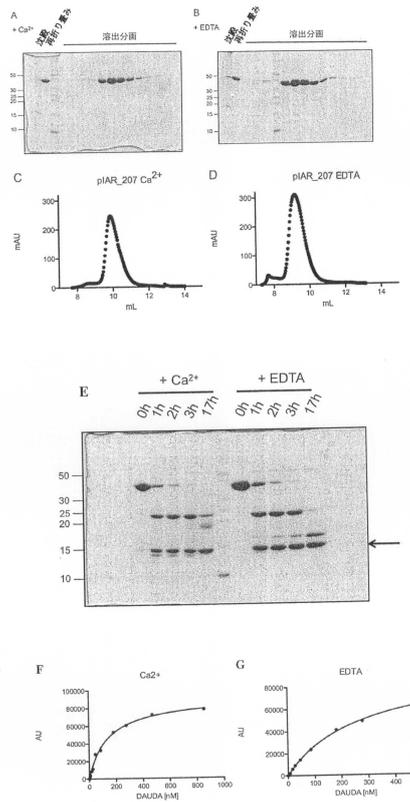
【 図 6 G 】



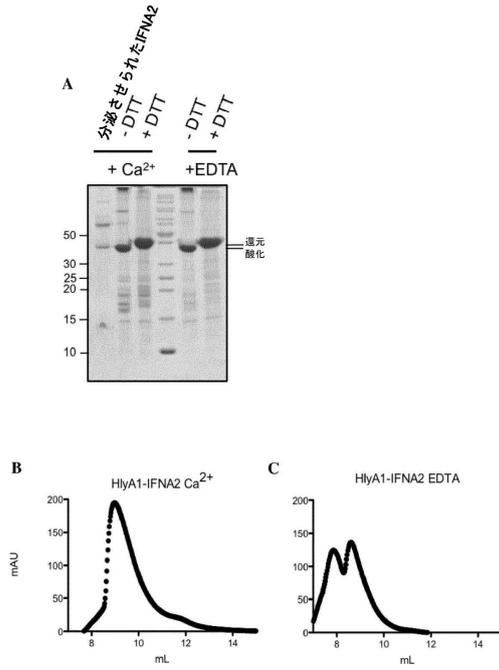
【 図 7 】



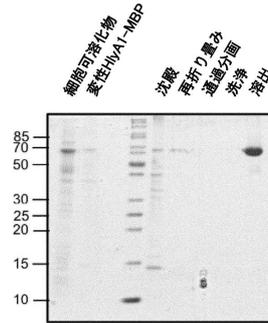
【 図 8 】



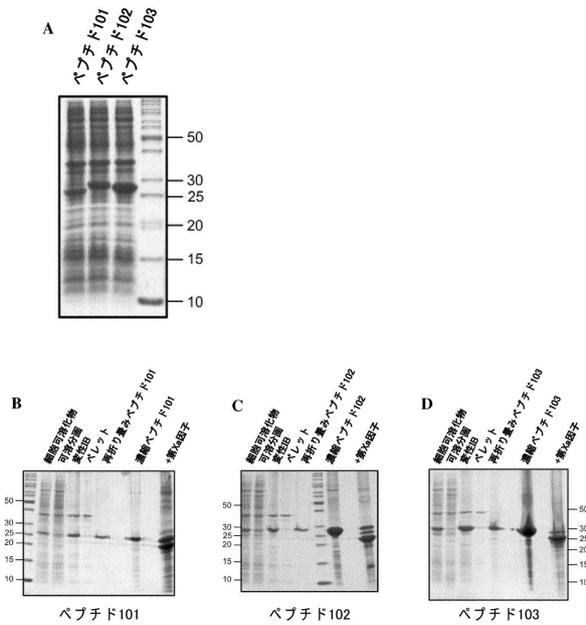
【 図 9 】



【 図 10 】

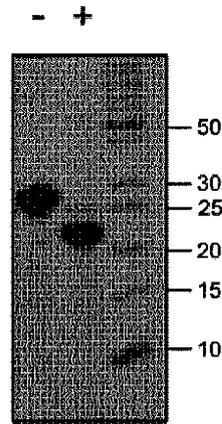


【 図 11 】

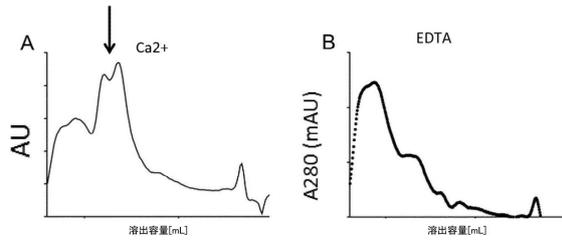


【 図 12 】

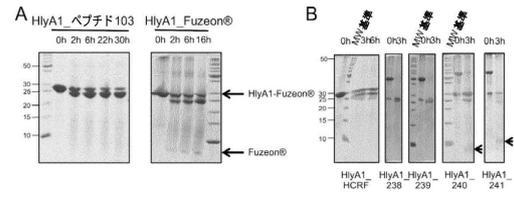
Figure 12



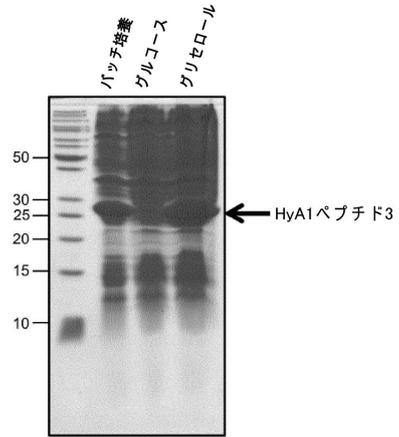
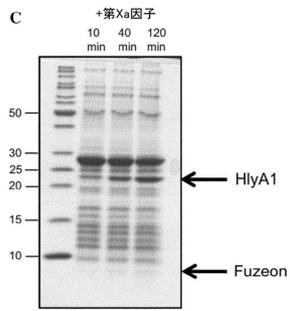
【図13】



【図14】



【図15】



【配列表】

0006714902000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 シュワルツ、クリスチャン
ドイツ連邦共和国、デュッセルドルフ 40225 ユニヴェルジテーツシュトラッセ 1 ハイ
ンリッヒ - ハイネ - ユニヴェルジテーツ デュッセルドルフ内
- (72)発明者 スミツ、サンダー ヘンドリカス ヨハネス
ドイツ連邦共和国、デュッセルドルフ 40225 ユニヴェルジテーツシュトラッセ 1 ハイ
ンリッヒ - ハイネ - ユニヴェルジテーツ デュッセルドルフ内

合議体

審判長 中島 庸子
審判官 田村 聖子
審判官 小暮 道明

- (56)参考文献 Journal of Bioscience and Bioengineering, 20
05年, Vol. 99, No. 4, pp. 303 - 310
Journal of Biotechnology, 2012年 6月15日, Vol. 15
9, No. 3, pp. 155 - 161
Bioengineered, 2012年, 3: 5, pp. 289 - 292
Vaccine, 2001年, Vol. 19, pp. 1406 - 1415

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90
PubMed, BIOSIS/EMBASE/CAPLUS/MEDLINE/WPIDS(S
TN)
JST7580/JSTPlus/JMEDPlus(JDream3)