

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-502734

(P2010-502734A)

(43) 公表日 平成22年1月28日(2010.1.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24	4 C 0 7 6
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 37/48	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 37/465	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-527565 (P2009-527565)	(71) 出願人	509066019 フェーズバイオ ファーマシューティカルズ、インコーポレイテッド アメリカ合衆国、ノースカロライナ州 27713-1870, ダーハム, スイート 101, サウス アルストン アベニュー 4134
(86) (22) 出願日	平成19年9月6日(2007.9.6)	(74) 代理人	100079108 弁理士 稲葉 良幸
(85) 翻訳文提出日	平成21年5月1日(2009.5.1)	(74) 代理人	100109346 弁理士 大貫 敏史
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/077767	(72) 発明者	チルコティ, アシュトシュ アメリカ合衆国、ノースカロライナ州 27701, バーナム, エンジェルウッド アベニュー 915
(87) 国際公開番号	W02008/030968		最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成20年3月13日(2008.3.13)		
(31) 優先権主張番号	60/842, 464		
(32) 優先日	平成18年9月6日(2006.9.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 融合ペプチド治療用組成物

(57) 【要約】

エラスチン様ペプチド(ELP)とペプチド活性治療剤とを含む融合タンパク質(FP)を含有する治療用組成物、ならびにそのような組成物および融合タンパク質を作製し使用する方法。このようなタイプの治療用組成物は、ペプチド活性治療剤単独と比較して、達成されるペプチド活性治療剤の効力を改善することを可能にする。治療用組成物中のペプチド活性治療剤の効力の増強は、ELPが付随していない同じペプチド活性治療剤を含有する対応する組成物と比較して改善された溶解性、生物学的利用性、生物学的利用不能性、半減期などを含んでよい。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つのペプチド活性治療剤と結合した少なくとも 1 つのエラスチン様ペプチド (E L P) を含む、融合タンパク質 (F P) 治療用組成物。

【請求項 2】

前記 E L P が、N 末端または C 末端にて前記ペプチド活性治療剤と共有結合している、請求項 1 に記載の F P 治療用組成物。

【請求項 3】

少なくとも 2 つのペプチド活性治療剤を含み、一方のペプチド活性治療剤が N 末端にて前記 E L P と共有結合し、他方のペプチド活性治療剤が C 末端にて前記 E L P と共有結合している、請求項 1 に記載の F P 治療用組成物。

10

【請求項 4】

前記ペプチド活性治療剤が、前記 E L P と結合していない対応するペプチド活性治療剤と比較して、*in vivo* 効力が増強されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の F P 治療用組成物。

【請求項 5】

前記 *in vivo* 効力の増強が、溶解性、生物学的利用性、生物学的利用不能性、有効治療量、製剤適合性、タンパク質溶解抵抗性、投与されたペプチド活性治療剤の半減期、投与後の体内での残存率、および投与後の身体からのクリアランス速度からなる群より選択される特徴の増強を含む、請求項 4 に記載の F P 治療用組成物。

20

【請求項 6】

前記 E L P と前記ペプチド活性治療剤との間にスペーサー部分をさらに含む、請求項 1 に記載の F P 治療用組成物。

【請求項 7】

前記スペーサー部分が、前記組成物の薬物動態を制御する部分、プロテアーゼ非感受性部分、非ペプチド化学的部分、トロンビン、第 X a 因子、血液プロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、カテプシン、L y s のアミン基に付着できるホモ二官能性リンカー、一方の末端にて C y s に付着でき、他方の末端にて L y s に付着できるヘテロ二官能性リンカー、およびタンパク質を抗体の F c 領域に連結できる二官能性リンカーからなる群より選択される、請求項 6 に記載の F P 治療用組成物。

30

【請求項 8】

前記スペーサー部分が、式 $[(G l y)_n - S e r]_m$ (式中、 n は 1 ~ 4 (端値を含む) であり、 m は 1 ~ 4 (端値を含む) である) を有する非切断性スペーサー部分からなる群より選択される部分を含む、請求項 6 に記載の F P 治療用組成物。

【請求項 9】

前記 E L P が、反復ペプチド配列を含み、前記反復ペプチド配列が、ポリテトラペプチド、ポリペンタペプチド、ポリヘキサペプチド、ポリヘプタペプチド、ポリオクタペプチドおよびポリノナペプチドからなる群より選択される、請求項 1 に記載の F P 治療用組成物。

【請求項 10】

前記 E L P が、ポリマー反復またはオリゴマー反復を含み、前記反復が、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11 および配列番号 12 からなる群より選択される、請求項 9 に記載の F P 治療用組成物。

40

【請求項 11】

前記ペプチド活性治療剤が、インスリン A ペプチド、T 20 ペプチド、インターフェロアルファ 2 B ペプチド、タバコエッチウイルスプロテアーゼ、小ヘテロダイマーパートナーオーファン受容体、アンドロゲン受容体リガンド結合ドメイン、グルココルチコイド受容体リガンド結合ドメイン、エストロゲン受容体リガンド結合ドメイン、G タンパク質アルファ Q、1 - デオキシ - D - キシルロース 5 - リン酸レダクトイソメラーゼペプチド

50

、Gタンパク質アルファS、アンジオスタチン、青色蛍光タンパク質、カルモジュリン、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質、インターロイキン1受容体拮抗物質、ルシフェラーゼ、組織トランスグルタミナーゼ、モルヒネ調節神経ペプチド、神経ペプチドY、オレキシンB、レプチン、ACTH、カルシトニン、アドレノメデュリン、副甲状腺ホルモン、デフェンシンおよび成長ホルモンからなる群より選択されるタンパク質を含む、請求項1に記載のFT治療用組成物。

【請求項12】

前記ELPが、ペントペプチドIle-Pro-Gly-X-GlyまたはLeu-Pro-Gly-X-Gly（式中、Xは、任意の天然または非天然のアミノ酸残基であり、Xは、ポリマー反復またはオリゴマー反復の間で任意選択により変動してもよい）のオリゴマー反復を含む、請求項1に記載のFT治療用組成物。

10

【請求項13】

前記ポリマー反復またはオリゴマー反復のX成分が、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシンおよびパリン残基からなる群より選択される1つ以上のアミノ酸残基を含む、請求項12に記載の融合タンパク質。

【請求項14】

少なくとも1つのエラスチン様ペプチド(ELP)と連結された少なくとも1つのペプチド活性治療剤を含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む融合遺伝子治療用組成物。

20

【請求項15】

前記ヌクレオチド配列が、発現制御エレメントに操作可能に連結している、請求項14に記載の融合遺伝子治療用組成物。

【請求項16】

前記発現制御エレメントが、プロモーターを含む、請求項15に記載の融合遺伝子治療用組成物。

【請求項17】

ペプチド活性治療剤のin vivo効力を増強する方法であって、前記ペプチド活性治療剤を少なくとも1つのエラスチン様ペプチド(ELP)と結合させて、融合ペプチド治療用組成物を形成することを含み、前記ペプチド活性治療剤は、ELPと結合していない対応するペプチド活性治療剤と比較してin vivo効力が増強されていることを特徴とする方法。

30

【請求項18】

前記in vivo効力の増強が、タンパク質分解に対するペプチド活性治療剤の安定化である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記in vivo効力の増強が、ペプチド活性治療剤の生物学的利用性の増大である、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

ペプチド活性治療剤を必要とする対象を治療する方法であって、前記患者に、(i)少なくとも1つのELPと連結されたペプチド活性治療剤、または(ii)発現制御エレメントに操作可能に連結した、ペプチド活性治療剤と少なくとも1つのELPとを含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む治療用組成物を投与することを含む方法。

40

【請求項21】

治療剤がELPとコンジュゲートしている、治療剤剤形。

【請求項22】

経口または非経口投与用に適合されている、請求項20に記載の治療剤剤形。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

関連出願データ

本出願は、全体が本明細書に参照により組み込まれる、2006年9月6日に出願された米国特許出願第60/842,464号の35 U.S.C. § 119(e)に基づく優先権を主張するものである。

【0002】

本発明は、エラスチン様ペプチド(ELP)とペプチド活性治療剤とを含む融合タンパク質(FP)を組み込んだ、新しい世代の治療用組成物を提供する。本発明の治療用組成物は、ELPが付随していない同じペプチド活性治療剤を含有する対応する組成物と比較して、溶解性、生物学的利用性または生物学的利用不能性(biounavailability)、および投与されたペプチド活性治療剤の半減期の改善の達成を可能にする。

10

【背景技術】

【0003】

Ashutosh Chilkotiの名前で「FUSION PEPTIDES ISOLATABLE BY PHASE TRANSITION」として2005年2月8日に発行された米国特許第6,852,834号およびAshutosh Chilkotiの名前で「FUSION PEPTIDES ISOLATABLE BY PHASE TRANSITION」として2005年2月8日にファイルされた米国特許出願第11/053,100号の開示は、すべての目的でそれぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0004】

上記のChilkotiの特許および特許出願は、ELPペプチドを含む、遺伝的にコード可能な環境に応答する融合タンパク質を開示している。このような融合タンパク質は、溶液環境の関数として調節できる物理化学的および機能的に独特の特性を示す。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、概して、エラスチン様ペプチド(ELP)とペプチド活性治療剤とを含む融合タンパク質(FP)治療用組成物に関する。

30

【0006】

本発明のFP治療用組成物において、少なくとも1つのペプチド活性治療剤は、対応する治療剤単独と比較して、ペプチド活性治療剤の効力の増強を達成するために、例えばNまたはC末端にて共有結合している1つ以上のELPと結合している。ペプチド活性治療剤-ELP構築物は、溶解性、生物学的利用性、生物学的利用不能性、治療量、タンパク質溶解抵抗性、投与されたペプチド活性治療剤の半減期などの種々の特性のいずれに関する効力も増強されている。

【0007】

別の態様において、本発明は、発現制御エレメント、例えば適切なタイプのプロモーターに操作可能に連結している異種ヌクレオチド配列を含む融合遺伝子構築物であって、該異種ヌクレオチド配列が、少なくとも1つのELPと結合した少なくとも1つのペプチド活性治療剤を含む融合タンパク質をコードする構築物に関する。

40

【0008】

さらなる態様において、本発明は、ペプチド活性治療剤の効力を増強する方法に関する。該方法は、ペプチド活性治療剤を少なくとも1つのELPと結合させてFP治療用組成物を形成することを含み、ここで、このようなFP治療用組成物中のペプチド活性治療剤は、ペプチド活性治療剤単独と比較して、効力が増強している。一態様において、増強された効力は、in vivo効力である。

【0009】

本発明の別の態様は、ペプチド活性治療剤を必要とする対象を治療する方法であって、

50

患者に、(i)少なくとも1つのELPと連結されたペプチド活性治療剤、または(ii)発現制御エレメントに操作可能に連結した、ペプチド活性治療剤と少なくとも1つのELPとを含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む治療用組成物を投与することを含む方法に関する。

【0010】

さらに別の態様において、本発明は、治療剤がELPとコンジュゲートしている治療剤剤形に関する。

【0011】

本発明のその他の種々の態様、特徴および実施形態は、以下の開示および添付の特許請求の範囲からより完全に明らかになる。

10

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】実施例1の発現および精製法を用いる、37アミノ酸ペプチドの発現を示すSDS-PAGEゲルである。

【図2】実施例1の方法から得られたペプチドの精製を確認するグラフである。

【図3】実施例6に記載のBFP、CAT、およびK1-3のITCによる精製の結果を示すSDS-PAGEゲルである。

【図4】(図4A)PBS緩衝液中における実施例8の各融合構築物について、温度の関数としての濁度の上昇を示すグラフである。(図4B)PBS緩衝液中における実施例8の各融合構築物について、温度の関数としての濁度の上昇を示すグラフである。

20

【図5】実施例9に記載の¹⁴Cで標識したELPの血中濃度の経時推移を示すグラフである。

【図6】実施例10に記載のヌードマウスにおける¹⁴Cで標識したELP1-150および¹⁴Cで標識したELP2-160の生体内分布を示すグラフである。

【図7】実施例10に記載のヌードマウスにおける¹⁴Cで標識したELP2-[V₁A₈G₇-160]の生体内分布を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、エラスチン様ペプチド(ELP)とペプチド活性治療剤とを含む融合タンパク質(FP)を組み込んだ治療組成物を提供する。

30

【0014】

本発明の治療用組成物は、ELPが付随していない同じペプチド活性治療剤を含有する対応する組成物と比較して、ペプチド活性治療剤の効力の増強、例えば溶解性、生物学的利用性、生物学的利用不能性(蓄積および/または毒性、例えば心臓毒性を回避することが望まれる場合)、投与されたペプチド活性治療剤の半減期などの改善の達成を可能にする。

【0015】

以下の論述において容易に参照するために、このような論述に現われる特定の用語の定義を以下に記載する。

【0016】

用語「タンパク質」は、本明細書において、任意の長さのポリペプチドを含む一般的な意味で用いられる。

40

【0017】

用語「ペプチド」は、本明細書で用いる場合、約10000までの分子量を有するポリペプチド自体と、約10000を超える分子量を有するタンパク質(ここで、分子量は、数平均分子量である)を共に含むと広く解釈されることを意図する。ある特定の態様において、約2~約100個のアミノ酸残基を有するペプチドは、本発明のペプチド治療用活性剤として特に好ましい。

【0018】

本明細書で用いる場合、用語「結合した」は、特定の部分が互いに直接共有結合するか

50

、またはブリッジ、スペーサーのような1つ以上の介在部分、または1つ以上の連結部分を介して互いに間接的に共有的に接続されるか、あるいはそれらが例えば水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力などにより互いに非共有的に結合することを意味する。

【0019】

本明細書で用いる場合、用語「半減期」は、活性剤の生物活性の50%の減少が生じるために必要な期間を意味する。このような用語は、体内の活性剤の全体的な時間的持続期間である「残存率」、ならびに半減期および残存率の数値と相関関係があるまたはなくてもよい動的に変化する変数としての「クリアランス速度」と対比される。

【0020】

単語「形質転換する」は、本明細書において、外因性ポリヌクレオチド配列を原核または真核細胞に、当該技術において知られる任意の手段（例えば細胞またはウイルス粒子からのポリヌクレオチド配列の直接の伝達および感染性ウイルス粒子による伝達を含む）により導入し、不死化もしくは非不死化細胞系における遺伝子型の永続的または一時的な変更をもたらすことを指すのに広く用いられる。

10

【0021】

用語「機能的等価物」は、本明細書において、ネイティブなタンパク質の活性類似体、誘導体、断片、切断型アイソフォームなどであるタンパク質のことを指すのに用いられる。ポリペプチドは、対応するネイティブなポリペプチドの一部または全部の生物学的活性を保持する場合に活性である。

【0022】

本明細書で用いる場合、本発明による製剤の「医薬的に許容される」成分（塩、担体、賦形剤または希釈剤など）は、（1）本発明のFPと、FPの生物学的活性を失うことなく組み合わせることができる点で、製剤のその他の成分と適合し、（2）過度の有害副作用（毒性、刺激およびアレルギー応答など）なしで動物（ヒトを含む）への使用に適する成分である。副作用は、その危険性が医薬組成物により提供される利益を超える場合に「過度」である。医薬的に許容される成分の例は、限定されないが、リン酸緩衝塩溶液、水のような任意の標準的な医薬担体、油/水エマルジョン、マイクロエマルジョンのようなエマルジョン、および種々の湿潤剤を含む。

20

【0023】

本明細書で用いる場合、タンパク質に関して用いられる用語「ネイティブ」は、タンパク質が天然で見出される対応するタンパク質のアミノ酸配列を有することを示す。

30

【0024】

本明細書で用いる場合、用語「スペーサー」は、所定のELP/ペプチド活性治療剤構築物中のELPとペプチド活性治療剤との間に介在し得る任意の部分のことをいう。例えば、スペーサーは、ELPに一方の末端で共有結合し、ペプチド活性治療剤に他方の末端で共有結合する二価の基であってよい。よって、ELP/ペプチド活性治療剤構築物が、ELP/ペプチド活性治療剤構築物のその意図される目的のための効力を妨げない任意の追加の化学構造を含んでよい。スペーサーは、例えば、ELP/ペプチド活性治療剤構築物の薬物動態を制御するために提供されるプロテアーゼ感受性スペーサー部分であってよいか、またはプロテアーゼ非感受性ELP/ペプチド活性治療剤構築物であってよい。

40

【0025】

本発明の融合タンパク質（FP）治療用組成物は、少なくとも1つのペプチド活性治療剤と結合した少なくとも1つのエラスチン様ペプチド（ELP）を含む。組成物のELP成分およびペプチド活性治療剤成分は、共有結合、イオン結合、会合性結合、錯体形成、またはペプチド活性治療剤がその意図する目的に有効であるようにし、かつ、結合したELPの存在が何らかの機能的、治療的または生理的な観点で組成物中のペプチド活性治療剤を増強し、そのことによりペプチド活性治療剤単独よりも有効になるように、ELP成分とペプチド活性治療剤成分とを一体にするのに効果的な任意の他の結合様式を含む任意の好適な様式で互いに結合させることができる。

【0026】

50

つまり、F P 治療用組成物中の E L P 結合ペプチド活性治療剤は、任意の他の特性、例えばその生物学的利用性、生物学的利用不能性、治療量、製剤適合性 (formulation compatibility)、タンパク質溶解もしくは他の分解様式に対する抵抗性、溶解性、半減期もしくは投与後の体内残存率の他の指標、投与の後の身体からのクリアランス速度などを増強することができる。

【0027】

本発明の F P 治療用組成物において、少なくとも1つのペプチド活性治療剤は、例えば N 末端または C 末端に共有結合した1つ以上の E L P と結合して、対応する治療剤単独と比較してペプチド活性治療剤の効力の増強を達成する。

【0028】

本発明の F P 治療用組成物は、治療において直接投与することもでき、または発現制御エレメント、例えば適切なタイプのプロモーターに操作可能に連結している異種ヌクレオチド配列を含む、対応する融合遺伝子構築物から *in vivo* にて生成させることもでき、ここで、異種ヌクレオチド配列は、少なくとも1つの E L P と結合した少なくとも1つのペプチド活性治療剤を含む融合タンパク質をコードする。

【0029】

本発明は、ペプチド活性治療剤の効力を、例えばペプチド活性治療剤を少なくとも1つの E L P と結合させて F P 治療用組成物を形成することにより増強することを可能にし、ここで、このような F P 治療用組成物中のペプチド活性治療剤は、ペプチド活性治療剤単独と比較して効力が増強している。

【0030】

本発明は、少なくとも1つの E L P と結合した少なくとも1つのペプチド活性治療剤を含む任意の好適な治療用剤形を用いて実施することができる。

【0031】

本発明は、ペプチド活性治療剤を少なくとも1つの E L P と結合させて F P 治療用組成物を形成することにより、このような治療剤をタンパク質分解に対して安定化することを可能にする。

【0032】

本発明の F P 治療用組成物は、1つ以上の E L P 種と、1つ以上のペプチド活性治療剤とを含んでよい。上述したように、E L P 種とペプチド活性治療剤とは、互いに直接結合してよいし、またはこのような結合は、E L P とペプチド活性治療剤とを仲介するスペーサー部分を含む構築物において行うことができる。

【0033】

本発明の F P 治療用組成物中で用いられる E L P 種は、任意の好適なタイプのものでよい。E L P は、エラスチンタンパク質中に存在することが見出されている反復ペプチド配列である。これらの反復ペプチド配列としては、ポリテトラペプチド、ポリペンタペプチド、ポリヘキサペプチド、ポリヘプタペプチド、ポリオクタペプチド、およびポリノナペプチドが挙げられる。

【0034】

E L P は、可逆性の逆温度転移を受ける。これらは、転移温度 (T_t) 未満の水中では構造的に無秩序であり、高い可溶性であるが、温度が T_t より上に上昇すると、鋭い (2 ~ 3 の範囲) 無秩序から秩序への相転移を示して、ポリペプチドの脱溶媒和および凝集を導く。E L P 凝集体は、十分なサイズに達したときに、容易に回収でき、遠心分離により溶液から単離できる。このような相転移は可逆性であり、単離された E L P 凝集体は、温度を E L P の T_t 未満に戻すと、緩衝液中に完全に溶解できる。

【0035】

本発明の実施において、E L P 種は、治療用組成物中のペプチド活性治療剤を安定化するか、または改良するように機能する。結合したペプチド活性治療剤 - E L P 構築物をペプチド活性治療剤を必要とする患者に投与した後に、ペプチド活性治療剤および E L P は互いに結合したままである一方で、ペプチド活性治療剤は、例えば疾患状態もしくは生理

10

20

30

40

50

的状态の治療もしくは予防またはその他の治療上の介在に対して治療活性がある。

【0036】

例えば、本発明の治療用組成物中のELPは、限定されないが以下のものを含む、種々の特徴的なテトラペプチド、ペントペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチドおよびノナペプチドのポリマーまたはオリゴマー反復で形成されるELPを含んでよい：

(a) テトラペプチド Val - Pro - Gly - Gly、または V P G G (配列番号1)

；

(b) テトラペプチド Ile - Pro - Gly - Gly、または I P G G (配列番号2)

；

(c) ペントペプチド Val - Pro - Gly - X - Gly (配列番号3)、または V P G X G (式中、Xは、任意の天然または非天然のアミノ酸残基であり、Xは、ポリマーまたはオリゴマー反復の間で任意選択により変動してよい)；

(d) ペントペプチド Ala - Val - Gly - Val - Pro、または A V G V P (配列番号4)；

(e) ペントペプチド Ile - Pro - Gly - Val - Gly、または I P G V G (配列番号5)；

(f) ペントペプチド Leu - Pro - Gly - Val - Gly、または L P G V G (配列番号6)；

(g) ヘキサペプチド Val - Ala - Pro - Gly - Val - Gly、または V A P G V G (配列番号7)；

(h) オクタペプチド Gly - Val - Gly - Val - Pro - Gly - Val - Gly、または G V G V P G V G (配列番号8)；

(i) ノナペプチド Val - Pro - Gly - Phe - Gly - Val - Gly - Ala - Gly、または V P G F G V G A G (配列番号9)；および

(j) ノナペプチド Val - Pro - Gly - Val - Gly - Val - Pro - Gly - Gly、または V P G V G V P G G (配列番号10)。

【0037】

その他のサイズおよび構成の他の任意のポリマーまたはオリゴマー反復単位を、本発明の幅広い実施において有用に用い得る。

【0038】

一実施形態において、ペプチド活性治療剤 - ELP構築物中のELPは、ペントペプチド Val - Pro - Gly - X - Gly (式中、Xは、上記で定義される通りである)の反復単位を含み、ここで、ELP中の他のアミノ酸残基に対する Val - Pro - Gly - X - Gly ペントペプチド単位の割合は、約75%より大きく、より好ましくは約85%より大きく、さらにより好ましくは約95%より大きい。

【0039】

本発明のペプチド活性治療剤 - ELP構築物は、合成的に、例えば組換えにより製造してよい。

【0040】

ペプチド活性治療剤 - ELP構築物において、ELPは、ペプチド活性治療剤のC末端および/またはN末端にて接続されてよく、任意選択により、スペーサー配列が、ELPをペプチド活性治療剤から分離するように存在してよい。

【0041】

一態様において、本発明は、ELPをペプチド活性治療剤から分離する上記のスペーサー配列を任意選択により含む、ペプチド活性治療剤 - ELP融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを意図する。該ポリヌクレオチドは、発現ベクターの成分として提供されてよい。本発明は、このような発現ベクターにより形質転換されて、該融合タンパク質を発現する宿主細胞(原核または真核)も意図する。

【0042】

10

20

30

40

50

合成または発現された後のペプチド活性治療剤 - E L P 構築物は、相転移を行うことを含む方法、例えば温度を上昇させること、または別の様式では、単離されてない形で融合タンパク質を含有する媒体において融合タンパク質の相転移を生じさせることにより、単離できる。

【 0 0 4 3 】

例えば、ペプチド活性治療剤 - E L P 構築物は、相転移を示すペプチド活性治療剤 - E L P 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを形成し、培養で融合タンパク質を発現させ、培養物由来の融合タンパク質含有物を分離（例えば遠心分離、膜分離などによる）および逆転移サイクリングを含む処理に供して、ペプチド活性治療剤 - E L P 融合タンパク質を回収することを含む工程により、合成および回収してよい。

10

【 0 0 4 4 】

特定の一実施形態において、ペプチド活性治療剤 - E L P 融合タンパク質は、V P G G、I P G G、A V G V P、I P G V G、L P G V G、V A P G V G、G V G V P G V G、V P G F G V G A G、およびV P G V G V P G Gからなる群より選択されるポリペプチドのポリマーまたはオリゴマー反復を含むE L P部分を含む。

【 0 0 4 5 】

別の特定の実施形態において、ペプチド活性治療剤 - E L P 融合タンパク質は、L P G X G（配列番号11）、I P G X G（配列番号12）およびそれらの組合せ（式中、Xは、E L P 融合タンパク質の相転移を妨げないアミノ酸残基である）からなる群より選択されるポリマーまたはオリゴマー反復単位を含むE L P部分を含む。

20

【 0 0 4 6 】

本発明のペプチド活性治療剤 - E L P 構築物は、構築物に相転移の特徴を与えるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 7 】

ペプチド活性治療剤 - E L P 構築物中のE L Pは、ターン成分を含み得る。ターン成分として用いるために適するポリペプチドの例は、U r r yら、国際特許出願P C T / U S 9 6 / 0 5 1 8 6に記載される。あるいは、ペプチド活性治療剤 - E L P 構築物中のE L Pは、ターン成分を欠くか、または異なる立体配座および/もしくは折り畳みの特徴を有する成分を含み得る。

30

【 0 0 4 8 】

上記のように、E L Pは、限定されないが、V P G G、I P G G、V P G X G、A V G V P、I P G V G、L P G V G、V A P G V G、G V G V P G V G、V P G F G V G A G、およびV P G V G V P G G（配列番号1から配列番号10）を含む種々のテトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチドおよびノナペプチドのポリマーまたはオリゴマー反復を含み得る。相転移を示すか、または本発明のペプチド活性治療剤 - E L P 構築物において用いるための好適なE L P種を構成するために、E L Pが、上記に列挙されるようなポリマーまたはオリゴマー配列のみからなる必要はないことが、当業者に認識されるだろう。

【 0 0 4 9 】

一実施形態において、ペプチド活性治療剤 - E L P 構築物は、ペンタペプチドV P G X G（配列番号3）（式中、ゲスト残基Xは、E L Pの相転移の特徴を失わせない任意のアミノ酸である）のポリマーまたはオリゴマー反復であるE L Pを含む。Xは、天然または非天然アミノ酸であってよい。例えば、Xは、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリンからなる群より選択されてよい。特定の実施形態において、Xはプロリンでない。

40

【 0 0 5 0 】

Xは、非古典的なアミノ酸であってよい。非古典的アミノ酸の例は、通常のアミノ酸の

50

D異性体、2,4-ジアミノ酪酸、 β -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 β -Abu、 β -Ahx、6-アミノヘキササン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロ-アミノ酸、 β -メチルアミノ酸、C β -メチルアミノ酸、N β -メチルアミノ酸のようなデザイナーアミノ酸、および一般的なアミノ酸類似体を含む。

【0051】

Xの同一特性の選択は、それぞれのELP反復において独立している。選択は、X位の正または負に荷電している残基の考慮など、任意の所望の特徴に基づいてよい。X位において中性の値を有するELPが、より長い半減期を有し得ると考えてよい。

10

【0052】

別の実施形態において、ペプチド活性治療剤-ELP構築物は、ペンタペプチドIPGXG(配列番号11)またはLPGXG(配列番号12)(式中、Xは上記で定義される通りである)のポリマーまたはオリゴマー反復であるELPを含む。

【0053】

ELP配列のポリマーまたはオリゴマー反復は、ペプチド活性治療剤-ELP構築物の全体的な相転移の特徴を失わせない1つ以上のアミノ酸残基により分けられてよい。特定の実施形態において、ペプチド活性治療剤-ELP構築物のELP成分がペンタペプチドVPGXGのポリマーまたはオリゴマー反復を含む場合、ELPの他のアミノ酸残基に対するVPGXG反復の割合は、約75%より大きく、より好ましくは約85%より大きく、さらにより好ましくは約95%より大きく、最も好ましくは約99%より大きい。

20

【0054】

各反復において、Xは、独立して選択される。得られる異なるELP種を、ここでは、ELPk[X_iY_j-n](式中、kは、ELP反復単位の特定のタイプを示し、括弧内の大文字は、1文字アミノ酸コードであり、それらの対応する下付き文字は、反復単位中のそれぞれのゲスト残基Xの相対的割合を示し、nは、ペンタペプチド反復の数でのELPの合計の長さを示す)の表記法で区別する。例えば、ELP1[V₅A₂G₃-10]は、ペンタペプチドVPGXG(式中、Xは、相対的割合5:2:3のバリン、アラニンおよびグリシンである)の10反復単位を含むポリペプチドを表し、ELP1[K₁V₂F₁-4]は、ペンタペプチドVPGXG(式中、Xは、相対的割合1:2:1のリジン、バリンおよびフェニルアラニンである)の4反復単位を含有するポリペプチドを表し、ELP1[K₁V₇F₁-9]は、ペンタペプチドVPGXG(式中、Xは、相対的割合1:7:1のリジン、バリンおよびフェニルアラニンである)の4反復単位を含有するポリペプチドを表し、ELP1[V-5]は、ペンタペプチドVPGXG(式中、Xは、バリンのみである)の5反復単位を含有するポリペプチドを表し、ELP1[V-20]は、ペンタペプチドVPGXG(式中、Xは、バリンのみである)の20反復単位を含有するポリペプチドを表し、ELP2[5]は、ペンタペプチドAVGV₅Pの5反復単位を含有するポリペプチドを表し、ELP3[V-5]は、ペンタペプチドIPGXG(式中、Xは、バリンのみである)の5反復単位を含有するポリペプチドを表し、ELP4[V-5]は、ペンタペプチドLPGXG(式中、Xは、バリンのみである)の5反復単位を含有するポリペプチドを表す。

30

40

【0055】

Urryらによる以前の研究は、エラスチンペンタペプチド配列VPGXG中の4番目の残基(X)が、ターンの形成を失うことなく変更され得ることを示した。これらの研究は、T_tがゲスト残基の疎水性の関数であることも示した。ゲスト残基およびそのモル比を変動させることにより、0~100の範囲にわたって逆転移を示すELPを合成できる。

【0056】

所定のELPの長さでのT_tは、ELP配列中に組み込む疎水性ゲスト残基の割合を大

50

きくすることにより減少できる。好適な疎水性ゲスト残基の例は、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンを含む。穏やかに疎水性であるチロシンも用いてよい。逆に、 T_t は、グルタミン酸、システイン、リジン、アスパラギン酸、アラニン、アスパラギン、セリン、スレオニン、グリシン、アルギニンおよびグルタミンからなる群より選択され、好ましくはアラニン、セリン、スレオニンおよびグルタミン酸から選択されるような残基を組み込むことにより、増大できる。

【0057】

一実施形態におけるELPは、約10～約80、より好ましくは約35～約60、最も好ましくは約38～約45の範囲の T_t を与えるように選択される。

【0058】

T_t は、ELP鎖長を変動することによっても変動できる。 T_t は、MWが減少すると増加する。分子量が100,000を超えるポリペプチドについて、Urryら(PCIT/US96/05186)により開発された疎水性尺度が、特定のELP配列のおおよその T_t を予測するために好ましい。

【0059】

分子量が100,000未満のポリペプチドについて、 T_t は、以下の2次関数により決定されるのが好ましい：

$$T_t = M_0 + M_1 X + M_2 X^2$$

(式中、 X はFPのMWであり、 $M_0 = 116.21$ ； $M_1 = -1.7499$ ； $M_2 = 0.010349$)。

【0060】

ELPの T_t 、およびペプチド活性治療剤に連結したELPの構築物の T_t は、ゲスト残基 X およびその疎水性により影響を受けるが、構築物の付随的な特性も影響を受ける。そのような特性は、限定されないが、溶解性、生物学的利用性または生物学的利用不能性、ならびにELP自体および構築物の半減期を含む。

【0061】

以下の実施例の部分では、ELPと結合した活性治療剤は、治療剤の遊離のタンパク質形態と比較して有意な量の治療剤の生物学的活性を保持することがわかる。さらに、ELPが長い半減期を示すことも示される。それに応じて、ELPは、本発明に従って、治療剤の遊離(コンジュゲートされていない)形態の半減期と比較して、ELPとコンジュゲートされているので、治療剤の半減期を実質的に(特定の実施形態では、例えば10%、20%、30%、50%、100%、200%またはそれより多くを超えて)増加させるために用い得る。さらに、ELPは、*in vivo*投与されたときに高血液含量器官を標的にすることが示され、ゆえに体内で分配されて、身体の種々の器官または領域のうちのあらかじめ決められた所望の身体的分布、または治療剤の所望の選択性もしくはターゲティングを提供できる。要するに、本発明により意図される活性ELP-治療剤コンジュゲートは、半減期が延長された活性な部位特異的組成物として投与されるかまたは*in vivo*にて生成される。

【0062】

本発明の一実施形態において、ELPの長さは、5～約500アミノ酸残基、より好ましくは約10～約450アミノ酸残基、さらにより好ましくは約15～約150アミノ酸残基である。ELPの長さは、目標 T_t を維持しながら、ELP配列内に疎水性ゲスト残基をより大きい割合で取り込むことにより、低下させ得る。

【0063】

ペプチド活性治療剤-ELP構築物中の活性治療剤は、任意の好適なタイプのものであり得る。好適なペプチドは、エリスロポエチン、マゲイニン、ベータ-デフェンシン、インターフェロン、インスリン、モノクローナル抗体、血液因子、コロニー刺激因子、成長ホルモン、インターロイキン、成長因子、治療用ワクチン、カルシトニン、腫瘍壊死因子(TNF)、受容体拮抗物質、コルチコステロイド、および酵素などの治療用タンパク質を特に含む、医薬、農業、ならびに他の科学的小および工業的分野において興味のあるもの

10

20

30

40

50

を含む。このようなペプチドの具体例は、限定されないが、補充療法で用いられる酵素；抗菌ペプチド；成長を促進するホルモン；および種々の用途に用いられる活性タンパク質様物質を含む。具体例は、限定されないが、スーパーオキシドジスムターゼ、インターフェロン、アスパラギナーゼ、グルタマーゼ、アルギナーゼ、アルギニンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼリボヌクレアーゼ、トリプシン、クロモトリプシン、パパイン、インスリン、カルシトニン、ACTH、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、ソマトシン (somatosin)、ソマトロピン、ソマトメジン、副甲状腺ホルモン、エリスロポエチン、視床下部放出因子、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモン、エンドルフィン、エンケファリン、およびバソプレシンを含む。

【0064】

本発明の一実施形態において、ペプチド活性治療剤は、チオレドキシンである。

【0065】

別の実施形態において、ペプチド活性治療剤は、テンダミスタット (tendamistat) である。テンダミスタット-E L P 融合タンパク質は、例えば膵炎の治療における - アミラーゼ阻害剤として用いるための容易に単離できる活性型のテンダミスタットを提供する。この融合タンパク質は、医薬的に許容される担体を伴う医薬製剤の成分として適切に提供される。テンダミスタット-E L P 融合タンパク質は、遊離のテンダミスタットの - アミラーゼ阻害活性のほとんどを保持しており、安定な構築物である。

【0066】

一実施形態において、ペプチド活性治療剤は、インスリン、カルシトニン、ACTH、グルカゴン、ソマトスタチン、ソマトロピン、ソマトメジン、副甲状腺ホルモン、エリスロポエチン、視床下部放出因子、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモン、エンドルフィン、エンケファリン、バソプレシン、非天然オピオイド、スーパーオキシドジスムターゼ、インターフェロン、アスパラギナーゼ、アルギナーゼ、アルギニンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼリボヌクレアーゼ、トリプシン、キモトリプシン、およびパパインからなる群より選択される生理的に活性なペプチドを含む。

【0067】

本発明は、よって、治療 (in vivo) 用の種々の組成物であって、ペプチド活性治療剤-E L P 構築物のペプチド成分が、生理的に活性、すなわち生物活性なペプチドである組成物を包含する。このようなペプチド含有組成物の好ましい形において、ペプチド成分の E L P 種への結合は、直接的な共有結合または間接的な (好適なスペーサー基を介して) 結合であり、ペプチド部分および E L P 部分は、互いのこのような直接的または間接的な共有結合を含む任意の好適な様式で、構造的に配置できる。つまり、広い多様性のペプチド種を、必要に応じて、または所定の治療用途において望まれるように、本発明の幅広い実施に適合できる。

【0068】

一実施形態における本発明のペプチド活性治療剤-E L P 構築物中のペプチド活性治療剤として用いられるペプチドは、補充療法において用いられる酵素、および成長を促進するホルモンを含む。このような酵素としては、スーパーオキシドジスムターゼ、インターフェロン、アスパラギナーゼ、グルタマーゼ、アルギナーゼ、アルギニンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼリボヌクレアーゼ、シトシンデアミナーゼ、トリプシン、クロモトリプシンおよびパパインがある。ペプチドホルモンのうち、本発明のペプチド活性治療剤-E L P 構築物において用いるのに適する特定の種は、限定されないが、インスリン、カルシトニン、ACTH、グルカゴン、ソマトシン、ソマトロピン、ソマトメジン、副甲状腺ホルモン、エリスロポエチン、視床下部放出因子、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモン、エンドルフィン、エンケファリン、およびバソプレシンを含む。

【0069】

別の特定の態様において、E L P / ペプチド活性治療剤構築物中のペプチド活性治療剤は、以下の種、ならびにそのような種のすべての変異型、断片および誘導体から選択される：アグーチ関連ペプチド、アミリン、アンジオテンシン、セクロピン、ボンベシン、ガ

10

20

30

40

50

ストリン放出ペプチドを含むガストリン、ラクtofフェリン、限定されないがマガイニンを含む抗菌ペプチド、ウロジラチン、核局在化シグナル(NLS)、コラーゲンペプチド、サバイピン、 β -アミロイドを含むアミロイドペプチド、ナトリウム利尿ペプチド、ペプチドYY、限定されないが神経ペプチドY、ダイノルフィン、エンドモルフィン、エンドセリン、エンケファリン、エキセンディン、フィブロネクチン、神経ペプチドWおよび神経ペプチドSを含む神経再生ペプチドおよび神経ペプチド、ペプチドT、メラノコルチン、アミロイド前駆体タンパク質、シートブレーカーペプチド、CARTペプチド、アミロイド阻害ペプチド、プリオン阻害ペプチド、クロロトキシシン、コルチコトロピン放出因子、オキシトシン、バソプレシン、コレシストキニン、セクレチン、チモシン、上皮成長因子(EGF)、血管内皮細胞成長因子(VEGF)、血小板由来成長因子(PDGF)、インスリン様成長因子(IGF)、繊維芽細胞成長因子(aFGF、bFGF)、パンクレアスタチン、メラニン細胞刺激ホルモン、オステオカルシン、ブラディキニン、アドレノメデュリン、ペリネリン、メタスタチン、アプロチニン、ガラニン様ペプチドを含むガラニン、レプチン、限定されないが β -デフェンシンおよび α -デフェンシンを含むデフェンシン、サリューシン、ならびに限定されないがコノトキシシン、デコルシン、クルトキシシン、イソギンチャク毒、タランチュラ毒を含む種々の毒；脳ナトリウム利尿ペプチド(B型ナトリウム利尿ペプチド、またはBNP)、心房性ナトリウム利尿ペプチドおよびバソナトリンを含むナトリウム利尿ペプチド；ニューロキニンA、ニューロキニンB；ニューロメジン；ニューロテンシン；オレキシン、膵臓ポリペプチド、脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)、プロラクチン放出ペプチド、プロテオリピドタンパク質(PLP)、ソマトスタチン、TNF- α ；グレーリン、プロテインC(Xigris)、SS1(dsFv)-PE38およびシュードモナス菌体外毒素タンパク質、アンチトロンピンIIIおよび凝固因子VIIAを含む凝固因子、第VII因子、第IX因子、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲンアクチベータ、ウロキナーゼ、ベータグルコセレブロシダーゼおよびアルファ-D-ガラクトシダーゼ、アルファL-イズロニダーゼ、アルファ-1,4-グルコシダーゼ、アリアルスルファターゼB、イズロネート-2-スルファターゼ、デオキシリボヌクレアーゼI、ヒト活性化タンパク質、卵胞刺激ホルモン、絨毛性ゴナドトロピン、黄体ホルモン、ソマトロピン、骨形成タンパク質、ネシリチド、副甲状腺ホルモン、エリスロポエチン、ケラチノサイト成長因子、ヒト顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、ヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、アルファインターフェロン、ベータインターフェロン、ガンマインターフェロン、IL-1、IL-1Ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-11、IL-12を含むインターロイキン、グリコプロテインIIIB/IIIA、B型肝炎、ガンマグロブリン、ヴェノグロブリンを含む免疫グロブリン、ヒルジン、アプロチニン、アンチトロンピンIII、アルファ-1-プロテイナーゼ阻害剤、フィルグラスチム、ならびにエタネルセプト。

10

20

30

40

50

【0070】

別の実施形態において、本発明のペプチド活性治療剤-ELP構築物のペプチド成分は、免疫療法またはその他の治療的介入に関連する任意の抗体または抗原であってよい。

【0071】

インスリンAペプチド、T20ペプチド、インターフェロンアルファ2Bペプチド、タバコエッチウイルスプロテアーゼ、小ヘテロダイマーパートナーオファン受容体、アンドロゲン受容体リガンド結合ドメイン、グルココルチコイド受容体リガンド結合ドメイン、エストロゲン受容体リガンド結合ドメイン、Gタンパク質アルファQ、1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸レダクトイソメラーゼペプチド、Gタンパク質アルファS、アンジオスタチン(K1-3)、青色蛍光タンパク質(BFP)、カルモジュリン(CalM)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、インターロイキン1受容体拮抗物質(IL-1Ra)、ルシフェラーゼ、組織トランスグルタミナーゼ(tTg)、モルヒネ調節神経ペプチド(MMN)、神経ペプチドY(NPY)、オレキシンB、レプチン、ACTH、カルシトニン、アドレノメ

デュリン (AM)、副甲状腺ホルモン (PTH)、デフェンシンおよび成長ホルモンのような種々のその他のタンパク質およびペプチドを、異なる ELP ポリペプチドと融合させて、逆相転移挙動を示す FP を形成する。

【0072】

活性治療剤として用いられるタンパク質およびペプチドは、それらの 1 次、2 次、および 3 次構造、サイズ、分子量、溶解性、電荷分布、粘度および生物学的機能が著しく異なり得る。

【0073】

本発明の範囲内には、合成の間またはその後、例えばベンジル化、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、PEG 化、既知の保護基 / 遮蔽基による誘導体化、タンパク質溶解切断、抗体分子もしくはその他の細胞性リガンドへの連結などにより、異なって修飾された FP を含む誘導体も含まれる。一実施形態において、FP は、N 末端においてアセチル化されているか、および / または C 末端においてアミド化される。別の実施形態において、FP は、ポリマー、例えば経口送達を促進すること、酵素分解を低減させること、ポリペプチドの溶解性を増大させること、またはヒトもしくはその他の動物への投与のための治療用ポリペプチドの化学的特性を向上させることが当該技術において知られているポリマーにコンジュゲートされる。

【0074】

本発明のペプチド活性治療剤 - ELP 構築物は、既知の組換え発現技術により得ることができる。ペプチド活性治療剤 - ELP 構築物を組換えにより製造するために、構築物をコードする核酸配列は、融合タンパク質をコードする核酸配列が、宿主細胞内で所望の融合ペプチドに転写および / または翻訳されるように好適なプロモーター配列に操作可能に連結している。好ましいプロモーターは、T7 プロモーターのような大腸菌 (E. coli) での発現に有用なものである。

【0075】

例えば真核または原核系の任意の通常用いられる発現系を用いてよい。具体例は、酵母、ピキア、バキュロウイルス、哺乳動物、ならびに大腸菌およびカウロバクター (Caulobacter) のような細菌系を含む。

【0076】

核酸配列を含むベクターは、ペプチド活性治療剤 - ELP 構築物の発現のために細胞に導入され得る。ベクターは、保持されている遺伝子が転写されて所望の RNA を生成する限りは、エピソームのままであるか、または染色体に組み込まれ得る。ベクターは、標準的な組換え DNA 技法により構築できる。ベクターは、プラスミド、ファージ、コスミド、ファージミド、ウイルス、または原核もしくは真核細胞での複製および発現に用いられる、当該技術において知られる任意のその他のタイプであり得る。プロモーターのような種々の転写シグナル、およびプロモーターへの RNA ポリメラーゼの結合を調節するその他の配列を含む、当該技術において知られる多様な成分をこのようなベクターに含み得ることが、当業者に認識されるだろう。ベクターが発現される細胞内で有効であることが知られる任意のプロモーターを、ペプチド活性治療剤 - ELP 構築物の最初の発現に用い得る。好適なプロモーターは、誘導性または構成性である。好適なプロモーターの例は、SV40 初期プロモーター領域、ラウス肉腫ウイルスの 3' 末端反復配列に含まれるプロモーター、HSV-1 (単純ヘルペスウイルス-1) チミジンキナーゼプロモーター、メタロチオネイン遺伝子の調節配列など、ならびに組織特異性を示し、トランスジェニック動物で用いられている以下の動物転写制御領域を含む：膵腺房細胞で活性があるエラストラーゼ I 遺伝子制御領域；膵ベータ細胞において活性があるインスリン遺伝子制御領域、リンパ系細胞で活性がある免疫グロブリン遺伝子制御領域、精巣、乳房、リンパ系細胞および肥満細胞で活性があるマウス乳房腫瘍ウイルス制御領域、肝臓で活性があるアルブミン遺伝子制御領域、肝臓で活性があるアルファ-フェトプロテイン遺伝子制御領域、肝臓で活性があるアルファ 1-アンチトリプシン遺伝子制御領域、赤血球細胞で活性があるベータ-グロブリン遺伝子制御領域、脳のオリゴデンドロサイト細胞内で活性があるミエリン塩

10

20

30

40

50

基性タンパク質遺伝子制御領域、骨格筋で活性があるミオシン軽鎖 - 2 遺伝子制御領域、および視床下部で活性があるゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域。

【0077】

一実施形態において、哺乳動物は、その乳中にペプチド活性治療剤 - ELP 構築物を生成するように遺伝子改変される。このような遺伝子改変を行う技術は、2000年1月1日に、「Transgenic Bovines and Milk from Transgenic Bovines」として発行された米国特許第6,013,857号に記載される。トランスジェニック動物のゲノムは、乳腺プロモーターに操作可能に連結したペプチド活性治療剤 - ELP 構築物をコードするDNA配列を含む導入遺伝子を含むように改変される。DNA配列の発現は、乳中のペプチド活性治療剤 - ELP 構築物の生成をもたらす。ペプチド活性治療剤 - ELP 構築物は、次いで、トランスジェニック哺乳類から得られる乳から、相転移により単離できる。トランスジェニック哺乳類は、好ましくはウシである。

10

【0078】

本発明のペプチド活性治療剤 - ELP 構築物は、逆転移サイクリング手順を用いて、例えばペプチド活性治療剤 - ELP 構築物の温度依存性の溶解性を利用するか、または構築物を含有する媒体への塩の添加を利用して、他の混入タンパク質から高純度に分離できる。逐次的な逆相転移サイクルを用いて、高純度を得ることができる。

【0079】

温度およびイオン強度の他に、ペプチド活性治療剤 - ELP 構築物の逆転移を改変するために有用なその他の環境変数は、pH、無機および有機の溶質および溶媒の添加、側鎖のイオン化または化学的改変、ならびに圧力を含む。

20

【0080】

本発明のある特定の例証となる実施形態において、10ポリペプチドELP (ELP 10マー) を構築する。ELP 10マーは18倍までオリゴマー化またはポリマー化されて、精密に特定された分子質量 (10マー、20マー、30マー、60マー、90マー、120マー、150マーおよび180マー) を有するELPのライブラリーを作り出す。ELPポリマーまたはオリゴマーは、次いで、ペプチド活性治療剤のC末端またはN末端に融合されて、ペプチド活性治療剤 - ELP 構築物を形成してよい。第2のペプチド活性治療剤を、融合タンパク質構築物のELP成分に融合させて、3元融合物を提供してよい。任意選択により、1つ以上のスペーサーを用いて、ELP成分をペプチド活性治療剤から分離してよい。

30

【0081】

よって、本発明は、ペプチド活性治療剤が、任意の多様な内因性分子の天然もしくは合成型、または天然に存在しないペプチド種、または上記のいずれかの機能的等価物であり得るペプチド活性治療剤 - ELP 構築物を与える。

【0082】

本発明のペプチド活性治療剤 - ELP 構築物は、非経口的に与えられた場合、すなわちペプチドが血漿プロテアーゼにより容易に代謝される場合のペプチド活性治療剤の主要な欠点を克服する。ペプチド活性治療剤の投与の経口経路は、さらにより問題が大きい。なぜなら、胃でのタンパク質溶解に加えて、胃の高い酸性が、このようなペプチド活性治療剤が意図する標的組織に到達する前にペプチド活性治療剤を破壊するからである。胃および膵臓の酵素の作用により生成されるペプチドおよびペプチド断片は、腸の刷子縁膜中のエキソペプチダーゼおよびエンドペプチダーゼにより切断されて、ジペプチドおよびトリペプチドを産出し、そして膵臓酵素によるタンパク質溶解が回避されたとしても、ポリペプチドは、刷子縁ペプチダーゼにより分解される。胃を通る経路を生き延びるペプチド活性治療剤はいずれも、腸粘膜での代謝にさらに付され、ここでは浸透バリアが細胞への侵入を妨げる。本発明のペプチド活性治療剤 - ELP 構築物は、このような欠点を克服し、生物学的利用性、生物学的利用不能性、治療剤の半減期、分解補助などの効力が増強したペプチド活性治療剤の組成物形態を提供する。

40

50

【0083】

よって、本発明のペプチド活性治療剤 - E L P 構築物は、経口および非経口の剤形、ならびにペプチド活性治療剤が非常に効率的な様式で用いられ得る種々のその他の剤形を可能にする。例えば、このような構築物は、高い粘膜吸収と、より低用量を用いるという付随する能力を達成して、最適治療効果を導き出す剤形を可能にする。

【0084】

E L P / ペプチド活性治療剤構築物は、構築物中の部分としてスペーサーも含んでよい。スペーサーは、任意の好適なタイプのものであってよく、ペプチドスペーサー、または非ペプチド化学的部分であってよい。

【0085】

ペプチドスペーサーは、プロテアーゼ切断性 (cleavable) または非切断性 (non-cleavable) であってよい。例として、切断性ペプチドスペーサー種は、限定されないが、トロンピン、第 X a 因子、プラスミン (血液プロテアーゼ)、メタロプロテアーゼ、カテプシン (例えば G F L G など)、およびその他の身体区画で見出されるプロテアーゼのような種々のタイプのプロテアーゼにより認識されるペプチド配列を含む。非切断性スペーサーは、同様に、例えば式 $[(Gly)_n - Ser]_m$ (式中、n は 1 ~ 4 (端値を含む)) であり、m は、1 ~ 4 (端値を含む)) を有する非切断性スペーサー部分を含む任意の好適なタイプのものであってよい。

【0086】

非ペプチド化学スペーサーは、さらに、例えば、それぞれの全体の開示が参照により本明細書に組み込まれる *Bioconjugate Techniques*, Greg T. Hermanson, Academic Press, Inc. により出版、1995 年に記載される機能的リンカー、および *Pierce Biotechnology, Inc.* (Rockford, Illinois) から入手可能な *Cross-Linking Reagents Technical Handbook* に記載されるものを含む任意の好適なタイプのものであり得る。例証の化学スペーサーは、Lys のアミン基に結合できるホモ二官能性リンカー、および一方の末端で Cys に、他方の末端で Lys に結合できるヘテロ二官能性リンカー、および抗体の Fc 領域にタンパク質を連結できるその他の二官能性リンカー (ここで、抗体の炭水化物はまず、ジオールまたはアルデヒドに酸化される) を含む。

【0087】

本発明のペプチド活性治療剤 - E L P 構築物は、状態もしくは疾患状態の予防または治療において用いられる。このような構築物は、本明細書において、動物対象についての利用性を有するペプチド活性治療剤に関連して記載されるが、本発明は、植物系における状態もしくは疾患状態の予防または治療についての利用性を有するペプチド活性治療剤 - E L P 構築物も意図する。例として、このような植物利用性を有するペプチド活性治療剤 - E L P 構築物のペプチド成分は、殺虫性、除草性、殺真菌性および / または農薬の効力を有してよい。

【0088】

本発明のさらなる態様は、任意の好適なタイプのベクター、例えば A A V、ワクシニア、ポックスウイルス、H S V、レトロウイルス、リポフェクション、R N A トランスファーなどに関連する本発明の融合遺伝子治療用組成物を用いる遺伝子治療に関する。

【0089】

治療上の使用において、本発明は、このような状態もしくは疾患状態を有するかまたは潜在的に感受性であってそのような治療を必要とする動物対象を治療する方法であって、そのような動物に上記の状態または疾患状態に治療上有効な本発明のペプチド活性治療剤 - E L P 構築物の有効量を投与することを含む方法を意図する。

【0090】

本発明のペプチド活性治療剤 - E L P 構築物により治療される動物対象は、ヒトおよび非ヒト動物 (例えば鳥類、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ) の対象を共に含み、好ましくは、哺乳

10

20

30

40

50

乳動物対象であり、最も好ましくはヒト対象である。

【0091】

対処しようとする特定の状態または疾患状態に応じて、動物対象に、本発明のペプチド活性治療剤 - E L P 構築物を、本明細書の開示に基づいて過度の実験を行うことなく当業者により容易に決定されるような、任意の好適な治療上有効で安全な投与量で投与してよい。

【0092】

一般的に、治療上の利点を達成するためのペプチド活性治療剤 - E L P 構築物中のペプチド活性治療剤の好適な用量は、例えば、1日当たりに受容者の体重1キログラム当たり1マイクログラム (μg) ~ 100ミリグラム (mg) の範囲、好ましくは1日当たりに体重1キログラム当たり10 μg ~ 50 mg の範囲、最も好ましくは1日当たりに体重1キログラム当たり10 μg ~ 50 mg の範囲であり得る。所望の用量は、1日のうちに適切な間隔で投与される2回、3回、4回、5回、6回またはそれより多い細分用量 (sub-dose) として与えられ得る。これらの細分用量は、単位剤形当たり例えば10 μg ~ 1000 mg 、好ましくは50 μg ~ 500 mg 、最も好ましくは50 μg ~ 250 mg の有効成分を含有する単位剤形で投与できる。あるいは、受容者の状態により要求されるのであれば、用量は、連続的注入として投与してよい。

10

【0093】

投与の形態および剤形は、もちろん、所定の治療用途のために望まれ、かつ有効であるペプチド活性治療剤の治療量に影響する。

20

【0094】

例えば、同じペプチド活性治療剤について、経口投与量は、非経口投与方法で用いられる投与量レベルの少なくとも2倍、例えば2 ~ 10倍であり得る。

【0095】

本発明のペプチド活性治療剤 - E L P 構築物は、そのまま、また、医薬的に許容されるそれらのエステル、塩、および他の生理的に機能的な誘導体を含む構築物の形で投与してよい。

【0096】

本発明は、本発明のペプチド活性治療剤 - E L P 構築物を含む、獣医学的使用およびヒトの医療用の医薬製剤も意図する。

30

【0097】

このような医薬および医療用製剤において、ペプチド活性治療剤 - E L P 構築物は、1つ以上の医薬的に許容される担体、および任意のその他の治療用成分と共に用いられ得る。担体は、製剤の他の成分と適合し、その受容者に過度に有害でないという意味で医薬的に許容されなければならない。ペプチド活性治療剤 - E L P 構築物は、上記のように所望の薬理学的効果を達成するのに効果的な量で、かつ所望の1日用量を達成するのに適する量で提供される。

【0098】

ペプチド活性治療剤 - E L P 構築物の製剤は、非経口および経口の投与に適するものを含み、特定の投与様式は、経口、直腸、頬側、局所、鼻、眼、皮下、筋内、静脈内、経皮、くも膜下腔内、関節内、動脈内、くも膜下、気管支、リンパ、腔、および子宮内の投与を含む。経口および非経口の投与に適する製剤が好ましい。

40

【0099】

ペプチド活性治療剤 - E L P 構築物が、溶液を含む製剤において用いられる場合、製剤は、経口または非経口により有利に投与され得る。ペプチド活性治療剤 - E L P 構築物が、懸濁液製剤中で、または生体適合性担体制剤中の粉末として用いられる場合、製剤は、経口、直腸、または気管支で有利に投与してよい。

【0100】

ペプチド活性治療剤 - E L P 構築物が、粉末の固体の形で直接用いられる場合、活性剤は、経口で有利に投与され得る。あるいは、好適な噴霧器を含む呼吸回路から患者によっ

50

て吸入される粉末の気体分散物を形成するためにキャリアガス中での粉末の噴霧化を介して、それを気管支に投与してよい。

【0101】

本発明のペプチド活性治療剤 - E L P 構築物を含む製剤は、単位剤形で好都合に提供されてもよく、製薬分野で公知の任意の方法により調製してよい。このような方法は、通常、ペプチド活性治療剤 - E L P 構築物を、1つ以上の付属の成分を構成する担体と混合する工程を含む。典型的には、製剤は、ペプチド活性治療剤 - E L P 構築物を、液体担体、微細固体担体、またはその両方と均質にかつ完全に混合し、次いで、必要であれば生成物を所望の製剤の剤形に成型することにより調製される。

【0102】

経口投与に適する本発明の製剤は、それぞれが所定量の有効成分を粉末または顆粒として含有するカプセル剤、カシェ剤、錠剤、またはロゼンジのような別々の単位として、あるいは水性の液体もしくはシロップのような非水性の液体中の懸濁剤、エリキシル、エマルジョンまたは頓服水剤 (draught) であってよい。

【0103】

錠剤は、任意選択により1つ以上の付属の成分と共に圧縮または成型により製造してよい。圧縮錠剤は、好適な機械で、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、不活性希釈剤、界面活性剤または排出剤と任意選択により混合された粉末または顆粒のような易流動性の形のペプチド活性治療剤 - E L P 構築物を用いて圧縮することにより製造してよい。粉末のペプチド活性治療剤 - E L P 構築物と好適な担体との混合物を含む成型錠剤は、好適な機械での成型により製造してよい。

【0104】

シロップ剤は、ペプチド活性治療剤 - E L P 構築物を、任意の付属の成分を加えてもよい糖類、例えばスクロースの濃縮水溶液に加えることにより製造してよい。このような付属の成分は、香料、好適な防腐剤、糖類の結晶化を遅延させる剤、およびポリヒドロキシアルコール、例えばグリセロールまたはソルビトールのような任意のその他の成分の溶解性を増大させる剤を含んでよい。

【0105】

非経口投与に適する製剤は、受容者の血液と好ましくは等張である (例えば生理的塩溶液)、ペプチド活性治療剤 - E L P 構築物の滅菌水性調製物を含むことが簡便である。このような製剤は、懸濁化剤および増粘剤、またはペプチド活性治療剤を血液成分または1つ以上の器官に指向させるように設計されたその他の微粒子系を含んでよい。製剤は、単位投与形態または複数投与形態であってよい。

【0106】

鼻噴霧剤は、ペプチド活性治療剤 - E L P 構築物の精製水溶液を、防腐剤および等張剤と共に含む。このような製剤は、鼻粘膜に適合する pH と等張状態に調整されていることが好ましい。

【0107】

直腸投与用の製剤は、カカオ脂、硬化油、または水素添加脂肪性カルボン酸のような好適な担体を含む坐剤であってよい。

【0108】

眼用製剤は、pH および等張性因子が、好ましくは眼のものに合致するように調整されていること以外は、鼻噴霧と同様の方法により調製される。

【0109】

局所製剤は、鉱物油、石油、ポリヒドロキシアルコール、または局所医薬製剤に使用される他の基剤などの1つ以上の媒体中に溶解または懸濁されたペプチド活性治療剤 - E L P 構築物を含む。

【0110】

上記の成分に加えて、本発明の製剤は、希釈剤、緩衝剤、香料、崩壊剤、界面活性剤、増粘剤、滑沢剤、防腐剤 (抗酸化剤を含む) などから選択される1つ以上の付属の成分を

10

20

30

40

50

さらに含んでよい。

【0111】

本発明の特徴および利点は、以下の限定しない実施例に関してより十分に示される。

【実施例】

【0112】

本発明の特徴は、各種の異なるELP配列に融合させた、チオレドキシン、テンダミスタット、インスリン、T20タンパク質、インターフェロン、タバコエッチウイルスプロテアーゼ、小ヘテロダイマーパートナーオーファン受容体、アンドロゲン受容体リガンド結合タンパク質、グルココルチコイド受容体リガンド結合タンパク質、エストロゲン受容体リガンド結合タンパク質、Gタンパク質、1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸レダクトイソメラーゼ、アンジオスタチン(K1-3)、青色蛍光タンパク質(BFP)、カルモジュリン(CalM)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、インターロイキン1受容体拮抗物質(IL-1Ra)、ルシフェラーゼ、組織トランスグルタミナーゼ(tTg)、モルヒネ調節神経ペプチド(MMN)、神経ペプチドY(NPY)、オレキシンB、レプチン、ACTH、カルシトニン、アドレノメデュリン(AM)、副甲状腺ホルモン(PTH)、デフェンシン、および成長ホルモンなど各種の異なる組換えタンパク質を含有する融合タンパク質の発現を伴う実験への例示的な参照により、さらに完全に示される。

10

(実施例1)

【0113】

20

タンパク質および長鎖ペプチドの産生および精製

提示される事例研究では、ELP-(TEV)-ペプチド/タンパク質構築物を含有する大腸菌BL21 star菌株(Invitrogen社製)を、抗生剤を補足した培地で、誘導なしに37で24時間にわたり増殖させた。培養物を回収し、50mMトリス-HCl pH8.0および1mMEDTA中に再懸濁させた。細胞は、氷上における超音波破壊により溶解させた。細胞破砕物は、4、20,000gで30分間にわたる遠心分離により除去した。25の溶解物に1.5Mの最終濃度までNaClを添加することにより、逆温度転移を誘導した後、25、20,000gで15分間にわたり遠心分離した。結果として得られるペレットは、ELP-(TEV)-ペプチド/タンパク質融合およびNaClによる非特異的な沈殿タンパク質を含有した。ペレットは、40mlの氷冷緩衝液中に再懸濁させ、4、20,000gで15分間にわたり遠心分離し、非特異的な不溶性タンパク質を除去した。温度転移サイクルをさらに3回繰り返し、ELP-TEV融合タンパク質の純度を高め、最終容量を5ml未満に減少させた。

30

【0114】

ELPからのペプチド/タンパク質の分離は、ELP-TEVプロテアーゼを添加し、25で18時間にわたりインキュベートすることにより達成した。切断されたペプチド/タンパク質は、0.5M NaClの存在下における最終温度転移を用いて、ELPおよびELP-TEVプロテアーゼからさらに精製された後、室温、10,000gで遠心分離を行った。NaClにより転移したELP、ELP-TEVプロテアーゼ、および未切断のELP-ペプチド/タンパク質が不溶性画分中に見出されるのに対し、ペプチド/タンパク質は可溶性画分中にとどまった。HPLC法および液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MC)法を実施して、TEVがELP-(TEV)-ペプチド/タンパク質を切断する正確度、およびペプチド/タンパク質の最終純度を調べた。ELP-(TEV)-ペプチド/タンパク質、ELP、および精製されたペプチド/タンパク質の濃度は、EXPASYツールProtParamにより計算された減衰係数を用いる分光光度法により決定された(19th Annual American Peptide Symposium, June 2005;ポスター発表)。

40

【0115】

37アミノ酸ペプチドの産生

上述の系(deltaPhase(商標))を用いて、37アミノ酸ペプチドを発現させ精製した

50

。数ラウンドの転移により、発現した E L P - ペプチド融合体を精製した。精製された融合体は、T E V プロテアーゼと共にインキュベートし、ペプチドを切断した。T E V プロテアーゼは、インキュベーション後に切断された E L P と共に溶液から除去させる別の実験において、E L P 融合体として調製された。結果を図 1 に示すが、ここで、M は分子量マーカー、S は超音波分解後における溶解物、P は遠心分離（転移前）から得られるペレット、L は可溶性溶解物、T_n は n 回目の転移から得られるペレットである。

【0116】

LC-MS による分子量および純度を確認した結果のグラフである図 2 に見られる通り、結果として得られるペプチドは、脱アミド化された少量の不純物を含む、90% を超える純度を有した。

【0117】

ペプチド変異体系列の迅速な産生

次いで、ペプチド系列に可能なスループットおよび純度を決定した。表 1 に示す結果は、ペプチド系列を通じて一貫した成果物を産生する能力を示す。かつては、化学合成の限界により、ペプチド産生は 3 ~ 6 週間ごとに 1 ペプチドに制限され、これによりペプチド最適化の速度が制限された。前出の *delta Phase*（商標）系を用いたところ、以下の 6 つのペプチドを 2 週間未満で産生することができた。この系を並行処理できるようになって、スループットは、数週間で容易に数百倍に増大した。

【0118】

【表 1】

表1:ペプチド変異体系列の収量および純度

ペプチド	最終収量		ペプチド 純度レベル (LC-MS)
	ELP-ペプチド (mg/L)	ペプチド (mg/L)	
コア	280	18	94%
変異体1	389	32	93%
変異体2	194	20	90%
変異体3	195	21	98%
変異体4	267	32	92%
変異体5	195	20	92%

(実施例 2)

【0119】

チオレドキシシンおよび/またはテンダミスタットを含有する融合タンパク質

チオレドキシシンおよびテンダミスタットは、(1) ペプチド活性治療剤が、高レベルで過剰発現し、高い可溶性である(チオレドキシシン)、および(2) ペプチド活性治療剤が、大部分、不溶性の封入体として発現する(テンダミスタット)という、タンパク質発現の 2 つの限界的シナリオを例示する。

【0120】

チオレドキシシン - E L P 融合タンパク質が、遊離 E L P と比較して T_t のごくわずかな上昇(1 ~ 2)を示したのに対し、テンダミスタット融合体は、15 という T_t のより劇的な低下を示した。この変化が、三元構築物(チオレドキシシン - E L P - テンダミスタット)および二元構築物(E L P - テンダミスタット)のいずれについても同一であったことは、T_t の変化が、テンダミスタットと特異的に関連することを示した。これらの観察結果は、T_t の低下が、E L P 鎖と溶媒に曝露されたテンダミスタットの疎水性領域との間の相互作用によるという結論と符合するのに対し、高い可溶性のチオレドキシシンの場合、これらの疎水性相互作用は無視できるものであった。さらに、高い可溶性のタンパク質では、E L P タグとの融合の際に導入される T_t の摂動は、遊離 E L P と比較してご

10

20

30

40

50

くわずかである可能性が高い。

【0121】

原理的な概念を示すために、ELP配列をコードする遺伝子を合成し、2つの融合タンパク質構築物内に連結した。第1の構築物では、ELP配列を、標的組換えタンパク質の可溶性を上昇させる担体として通常用いられる109残基のタンパク質である、大腸菌チオレドキシンのC末端に融合させた。第2のより複雑な構築物では、77残基の - アミラーゼ阻害剤タンパク質であるテングミスタットを、チオレドキシンのELP融合体のC末端に融合させ、三元融合体を形成した。

【0122】

Urryらによる以前の研究は、2つのELP特異的変数である、ゲスト残基の組成（すなわち、VPGXGモノマーにおけるXの同一特性およびモル画分）およびELPの鎖長が、転移温度に大きく影響を及ぼし、それにより、 T_t によりペプチド活性治療剤 - ELP構築物を特徴づけることを可能とすることを示している。

【0123】

ゲスト残基としてバリン、アラニン、およびグリシンを5:2:3の比率で有し、水中において約40の予測 T_t を有するELP配列（配列番号13）をコードする遺伝子を合成した。10回のVPGXGペプチド反復（「10マー」）をコードする合成遺伝子を最大で18倍にオリゴマー化し、3.9~70.5kDaの範囲の正確に指定した分子量（MW）を有するELPをコードする遺伝子ライブラリーを作製した。チオレドキシンは、10マー、20マー、30マー、60マー、90マー、120マー、150マー、および180マーのELP配列とのN末端融合体として発現させ、テングミスタットは、チオレドキシンの90マーELPへのC末端融合体として発現させた。

【0124】

FPは、大腸菌内において発現させ、融合タンパク質中に存在する（ヒスチジン）。タグを用いる固定化金属アフィニティ - クロマトグラフィー（IMAC）法か、または、逆転移サイクリング（以下に述べる）により、細胞溶解物から精製した。精製されたFPは、トロンピンにより切断して、ELPから標的タンパク質を遊離させた。次いで、もう1ラウンドの逆転移サイクリングにより、ELPを標的タンパク質から分離する結果として、純標的タンパク質を得た。各構築物について、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS - PAGE）法により、精製されたFP、標的タンパク質、およびELPを特徴づけ、これにより、タンパク質純度を確認し、トロンピン切断の完全性を検証し、各タンパク質の移動が、その予測サイズと符合することを示した（結果は示さない）。

【0125】

このようにして形成された融合タンパク質の逆転移は、ELP含有融合タンパク質が転移を経る際の凝集による溶液の濁度を、温度の関数としてモニターすることにより、分光光度的に特徴づけることができる。温度が臨界温度まで上昇しても、溶液は透明なままである。さらに温度が上昇すると、約2の範囲にわたって濁度が急上昇し、最大値（約2.0の OD_{350} ）に達する。分光光度的に観察された転移の中間点における温度として定義される T_t は、この過程を記述するのに好適なパラメータである。

【0126】

PBS中における遊離ELP、チオレドキシンのELP融合体、ELP - テングミスタット融合体、およびチオレドキシンのELP - テングミスタット三元融合体の逆転移を調べた。 T_t が遊離ELPでは51、チオレドキシンの融合体では54であったことは、 T_t が、チオレドキシンの融合によりわずかに影響を受けるに過ぎないことを示す。テングミスタット三元融合体からの切断により産生されたチオレドキシンのELPが、直接に産生されたチオレドキシンのELPと比較してより高温の T_t を有した（54に対して60）ことは、おそらく、ELP配列にじかに隣接するリーダーアミノ酸配列およびトレーラーアミノ酸配列の違いによると思われる。ELP - テングミスタットおよびチオレドキシンのELP - テングミスタットの転移プロファイルはほぼ同一であり、34の

10

20

30

40

50

T_t を有した。FPの凝集は可逆的であり、凝集物は、温度を T_t 未滿に低下させると、完全に再溶解させた。しかし、再溶解の反応速度は、ELP-テングミスタット融合体およびチオレドキシン-ELP-テングミスタット融合体の場合の方が遅く、遊離ELPおよびチオレドキシン-ELPの場合のわずか数秒に対して、通常5~10分間を要した。チオレドキシン対照およびテングミスタット対照が、温度を上昇させても吸光度の変化を示さなかったことは、融合タンパク質について観察された熱誘導凝集が、ELP担体の逆転移に起因したことを示す。通常、融合タンパク質の逆転移は、また、遊離ELPの場合よりも若干広範囲にわたり、その濁度プロファイルにおいて、小さな高低の肩も観察された。

【0127】

Urryらによる研究において、鎖長の増大と共に T_t の低下が観察され、FPの逆転移に対するELP MWの効果もまた探索された。チオレドキシン-FPセットの T_t は、12.6~71.0 kDaの範囲にあるELP担体のMWの関数として決定された。高MW融合タンパク質の T_t が、デザイン目標温度の40 (71 kDa ELPの場合で42) であるのに対し、低MW融合体の T_t は、著明に高温であった(例えば、12.6 kDa ELPの場合で77)。

【0128】

T_t に影響を及ぼすELP特異的変数(すなわち、ゲスト残基の組成およびMW)に加え、溶媒、ELP濃度、およびイオン強度の選択など複数の外因的因子により、所与のELPに対する T_t をさらに調節することができる。特に、イオン強度の制御は、50の範囲にわたって T_t を調節し、これにより、所与のELPの T_t を特定の適用に最適化する好適な方法を提供する。溶液の温度およびイオン強度の操作は、また、(1)所与のイオン強度における T_t より高温に溶液温度を上昇させる、(2)イオン強度を等温的に上昇させて、 T_t を溶液温度未滿に低下させる、(3)溶液温度およびイオン強度を同時に変化させるといった複数の方法により、特定のELPに対して逆転移を誘導する際の実験的な柔軟性も提供する。

【0129】

インスリン還元アッセイにより決定されたチオレドキシン/60マーFPの比活性が、市販の大腸菌チオレドキシンの比活性と同一であった(結果は示さない)ことは、ELPが、 T_t 未滿ではチオレドキシン活性に対して効果を及ぼさなかったことを示す。チオレドキシン-ELP-テングミスタット三元融合体の場合、 α -アミラーゼ阻害アッセイは、チオレドキシン/90マーELP担体が、テングミスタットの α -アミラーゼ阻害活性を2分の1に低下させる(結果は示さない)ことを示した。しかし、トロンピンによりチオレドキシン-ELP担体からテングミスタットを切断し精製した後において、精製されたテングミスタットの活性は、IMAC法により独立に精製された組換えテングミスタットと区別できなかった。

【0130】

タンパク質精製への逆転移サイクリングの適用は、ELPの相転移が、標的タンパク質を変性させないことを必要とする。したがって、1.5 M NaCl中での熱サイクリングにおけるチオレドキシン/60マーELP融合体の凝集、再溶解、および機能活性をモニターした。1.5 M NaClは、実験に好適な温度である24と35との間の各熱サイクルにおいてFPが逆転移を経るよう、 T_t を単に低下させる(水中における62から27に)ために緩衝液に添加した。熱サイクリングの開始前において、24の溶液温度は、チオレドキシン-FPの T_t 未滿であり、タンパク質溶液は、検出可能な濁度を示さなかった。融合タンパク質のチオレドキシン活性をまずこの温度において調べるにより、ベースラインを確立した。温度を35に上昇させると、融合タンパク質が凝集し、結果として濁度が上昇した(約2.0のOD₃₅₀)。温度を24に低下させた後に溶液が完全に透明化したことは、融合タンパク質が再溶解されたことを示す。一定量を採取し、チオレドキシン活性について調べたところ、当初の値と同一であった。この熱サイクリング過程を2回繰り返した。各熱サイクル後の24において活性の変化が観

10

20

30

40

50

察されなかったことは、わずかな温度変化および結果として生じる凝集/再溶解が、タンパク質の安定性および機能に影響を及ぼさないことを確認した。加えて、凝集した融合タンパク質の再溶解および回収は、温度を24℃に低下させた後において定量的かつ完全であった。

【0131】

転移温度を上下に往復する条件（すなわち、NaCl濃度および温度）において遠心分離を反復することにより達成される逆転移サイクリングにより、各融合タンパク質がC末端における30マー、60マー、90マー、120マー、150マー、または180マーのELPタグを含有する6つのチオレドキシニン-FP、およびチオレドキシニン/90マーELP/テングダミスタット融合タンパク質を細胞溶解物から精製した。

10

【0132】

精製前に、誘導した大腸菌を遠心分離により培地から回収し、低濃度塩緩衝液（通常はPBS）中に再溶解させ、超音波破壊により溶解させた。高速遠心分離により不溶性物質を除去した後、溶解物にポリエチレンジオキシランを添加してDNAを沈殿させ、可溶性溶解物を得た。次いで、NaClの添加および/または溶液温度の上昇により逆転移サイクリングを開始してFPの逆転移を誘導し、FPの凝集の結果として溶液を混濁させた。凝集した融合タンパク質を、 T_t より高温における遠心分離により溶液から分離すると、遠心分離管の底部に半透明のペレットが形成された。混入大腸菌タンパク質を含有する上清は、除去および廃棄した。ペレットは、ELPの T_t 未満の温度における低イオン強度緩衝液中で再溶解させ、低温で遠心分離して、残存する不溶性物質を除去した。さらなるラウンドの逆転移サイクリングを企図したが、1ラウンドの逆転移サイクリング後に、混入タンパク質レベルがSDS-PAGE法の検出限界未満となった。

20

【0133】

チオレドキシニン/ELP融合タンパク質の各精製段階におけるチオレドキシニン比活性の研究のほか、BCAアッセイにより推定される総タンパク質量の決定も、可溶性溶解物（1）中における総タンパク質量の約20%が、逆転移による精製（3）の第1ラウンドにおいて沈殿することを示したので、残存する可溶性タンパク質は、除去および廃棄した（2）。上清中（その一部は、ネイティブな大腸菌チオレドキシニンが寄与する）において測定した低度のチオレドキシニン活性によって、この画分が混入宿主タンパク質を主に含有することが確認された。再溶解されたタンパク質のチオレドキシニン比活性は、市販のチオレドキシニン比活性に近く（データは示さない）、これは、1ラウンドの逆転移サイクリングが、完全な精製をもたらすことを確認した。精製の第2ラウンドは、チオレドキシニン比活性の検出可能な上昇をもたらさなかった（データは示さない）。複数ラウンドの逆転移による精製後における総チオレドキシニン活性が、細胞溶解物の比活性と実験的に区別できなかったことは、除去した上清中における標的タンパク質の消失が無視できることを示す。これらの結果は、チオレドキシニン-FPの高純度および高効率回収を確認し、チオレドキシニンの機能活性が、複数ラウンドの逆転移サイクリングを経た後においても完全に保持されることをさらに示した。

30

【0134】

チオレドキシニン融合構築物のタンパク質収量は通常、培養物リットル当たりの精製融合タンパク質50ミリグラムを超えた。融合タンパク質の重量による総収量は、ELP長の増大と共に減少し、30マー（MW = 12.6 kDa）では平均約70 mg/L、180マー（MW = 71.0 kDa）では平均約50 mg/Lであった。可溶性テングダミスタットの発現レベルは、そのチオレドキシニンのみとの融合体（10 mg/Lのチオレドキシニン-テングダミスタット融合体、4 mg/Lのテングダミスタット）と比較して、チオレドキシニン-ELP-テングダミスタット三元融合体（45 mg/Lの三元融合体、または、7 mg/Lのテングダミスタット）の場合の方がわずかに高かった。

40

【0135】

本明細書において前述の通り、環境応答的なELP配列に融合させた2つの組換えタンパク質である、チオレドキシニンおよびテングダミスタットを発現させ、ELP配列の逆転移

50

を用いることにより、穏やかに、かつ1段階で、他の可溶性大腸菌タンパク質からこれらの融合タンパク質を分離した。チオレドキシンおよびテングミスタットは、(1)標的タンパク質が、高レベルで過剰発現し、高い可溶性である(チオレドキシン)、および(2)該タンパク質が、大部分、不溶性封入体として発現される(テングミスタット)という、可溶性タンパク質発現の2つの限界的なシナリオを例示するため、これらを標的タンパク質として選択した。しかし、この後者のクラスを代表するタンパク質は、逆転移サイクリングにより精製すべき可溶性タンパク質として、一定レベルの発現を示さなければならない。

【0136】

チオレドキシンは、大腸菌における高レベルの可溶性タンパク質として発現し、したがって、ELPタグの可逆性可溶-不溶逆転移が融合タンパク質中でも保持されるかどうかを判定するのに好適な候補物質である。これに対し、テングミスタットは、大部分、封入体中における不溶性タンパク質として発現するので、他の試験タンパク質として選択された。チオレドキシンとの融合は、標的タンパク質の可溶性発現を促進するが、過剰発現したチオレドキシン-テングミスタット融合タンパク質の5~10%が、可溶性で機能的に活性なタンパク質として回収されたに過ぎない。

10

【0137】

標的組換えタンパク質の熱誘導による相分離に用いられるELPポリペプチドタグは、哺乳動物のエラスチン中に見出されるポリペプチド反復に由来した。ELPの相転移が、逆転移サイクリングによるタンパク質精製の原理的な基礎であるため、転移温度を特定することが、ELPタグのデザインにおける主要な目標となる。

20

【0138】

Urryらによるかつての研究は、ポリペプチドVPGXG配列中の第4残基(X)を、逆転移に有利な構造であるターンの形成を排除することなく変更し得ることを示した。これらの研究は、また、 T_t が、ゲスト残基の疎水性の関数であることをも示した。したがって、ゲスト残基の同一特性およびそのモル画分を変化させることによって、0~100の範囲にわたって逆転移を示すELPコポリマーを合成し得る。これらの結果に基づき、ELP担体が、培養時の大腸菌内では可溶性を保つが、細胞溶解後におけるわずかな温度上昇により凝集し得るよう、水中で約40の予測 T_t をもたらすアミノ酸配列を選択した。

30

【0139】

アミノ酸配列に加え、ELP鎖長によっても T_t は変化することが知られる。したがって、設計により、体系的に変化する分子量を有するELPライブラリーを合成し得るよう、遺伝子オリゴマー化の戦略による分子量の正確な制御を組み込んだ。高分子量ELPの T_t は、目標温度に近づき、チオレドキシン/180マー融合体(PBS中に25 μ M)の場合、42の実験観察 T_t を有した。しかし、 T_t は、MWの減少と共に劇的に上昇した。低イオン強度緩衝液中において、低分子量ELPの T_t は、タンパク質精製には高すぎ、その結果、 T_t を有用な温度に低下させるには高濃度のNaClを必要とする。ELP鎖長は、また、タンパク質収量の点でも重要である。ELP担体のMWが増大するにつれ、ELP MWの上昇と共に観察される発現融合タンパク質の総収量の減少に加え、ELPに対する標的タンパク質の重量百分率も低下する。したがって、精製用ELPタグのデザインは、ELP配列中に疎水性ゲスト残基のより大きな画分を組み込むことにより、目標 T_t を40付近に保持する一方で、ELP分子量を最小化することにより標的タンパク質発現を最大化することが好ましい。

40

【0140】

本明細書におけるチオレドキシン-ELP融合体が、遊離ELPと比較してごくわずかな T_t の上昇(1~2)を示したのに対し、テングミスタット-ELP融合体は、15というより劇的な T_t の低下を示した。この変化が、三元構築物(チオレドキシン-ELP-テングミスタット)および二元構築物(ELP-テングミスタット)のいずれについても同一であったことは、 T_t の変化が、テングミスタットと特異的に関連することを

50

示した。これらの観察結果は、 T_t の低下が、ELP鎖とテナダミスタット中の溶媒に曝露された疎水性領域との間の相互作用によるのに対し、高い可溶性のチオレドキシンの場合、これらの疎水性相互作用が無視できることを示唆した。 T_t のこの変化は、曝露される疎水性領域の無視できない画分を含有するタンパク質の逆転移による精製用のELP担体のデザインに複雑性を付加したが、高い可溶性のタンパク質の場合、ELPタグとの融合において導入される T_t の摂動は、遊離ELPと比較してごくわずかである可能性が高い。

【0141】

遺伝子合成およびELPタグのオリゴマー化には、標準的な分子生物学のプロトコールを用いた。10マーのポリペプチドであるVPGXG ELP用の合成遺伝子は、サイズが86~97塩基の範囲にある、5'側がリン酸化され、PAGE法により精製された4つの合成オリゴヌクレオチド(Integrated DNA Technologies社製)から構築した。オリゴヌクレオチドをアニールして、EcoRIおよびHindIII適合末端を有するELP遺伝子域にわたる2本鎖DNAを形成した。次いで、アニールしたオリゴヌクレオチドを、EcoRI/HindIIIにより直鎖化し脱リン酸化したpUC-19(NEB社製)内に、T4 DNAリガーゼを用いて連結した。化学的にコンピテントな大腸菌細胞(XL1-Blue)を、連結混合物により形質転換し、アンピシリン含有寒天プレート上でインキュベートした。コロニーは、まず、ブルーホワイトスクリーニング法により、次いで、コロニーPCR法によりスクリーニングし、挿入物の存在を検証した。推定挿入物のDNA配列は、ダイターミネーター法DNAシーケンシング(ABI370型DNAシーケンサー)により検証した。

10

20

【0142】

まず、10マーELP遺伝子を、同じ10マーELP遺伝子を含有するベクター内に連結することにより、20マーELP遺伝子を作製した。20マー遺伝子をもとの10マー遺伝子と同様に組み合わせることにより、30マー遺伝子を形成させた。この組合せ過程を繰り返して、10マーポリペプチド~180マーポリペプチドの範囲のELPをコードする遺伝子ライブラリーを作製した。典型的なポリマー化またはオリゴマー化の場合、ベクターは、PflMIにより直鎖化し、酵素的に脱リン酸化した。挿入物は、PflMIおよびBglIにより二重に消化し、アガロースゲル電気泳動法(Qiagen社製、Qiaex IIゲル抽出キット)により精製し、直鎖化したベクター内にT4 DNAリガーゼにより連結し、化学的にコンピテントな大腸菌細胞内に形質転換した。形質転換細胞は、コロニーPCR法によりスクリーニングし、DNAシーケンシングによりさらに確認した。

30

【0143】

チオレドキシ融合タンパク質用には、pET-32b発現ベクター(Novagen社製)を、SfiI制限部位と、チオレドキシ融合遺伝子の下流にある転写終止コドンとを含むように改変した。テナダミスタット三元融合体用には、チオレドキシ融合遺伝子-テナダミスタット融合体用の遺伝子を含有する、既に構築したpET-32aに基づくプラスミドを、トロピン認識部位の上流または下流の2つの代替位置にSfiI制限部位を含有するように改変した。次いで、PflMIおよびBglIでの消化により産生されたELP遺伝子セグメントを、各改変発現ベクターのSfiI部位内に連結した。クローニングは、コロニーPCR法およびDNAシーケンシングにより確認した。

40

【0144】

発現ベクターは、発現菌株BLR(DE3)(チオレドキシ融合体用)またはBL21-trxB(DE3)(テナダミスタット融合体用)(Novagen社製)内に形質転換した。100 μ g/mlアンピシリンを補った2倍希釈のYT培地を有するシェーカーフラスコに形質転換した細胞を接種し、振盪(250rpm)しながら37 $^{\circ}$ Cでインキュベートし、イソプロピル-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加して1mMの最終濃度とすることにより、0.8のOD₆₀₀で誘導した。培養物をさらに3時間インキュベートし、4 $^{\circ}$ Cでの遠心分離により回収し、低イオン強度緩衝液(培養物容量の約1/30

50

）中で再溶解させ、4℃での超音波破壊により溶解させた。溶解物は、4℃、約20,000×gで15分間遠心分離して、不溶性物質を除去した。ポリエチレンジオキシエタレンの添加（0.5%の最終濃度）により核酸を沈殿させた後、これを4℃、約20,000×gで15分間遠心分離した。次いで、細胞溶解物の可溶性画分および不溶性画分を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）法により特徴づけた。

【0145】

（His）₆ タグを含有したチオレドキシニン-E L P融合体は、ニッケルキレート化したニトリロ三酢酸誘導体化樹脂（Novagen社製）を用いる固定化金属アフィニティ-クロマトグラフィー（IMAC）法か、あるいは、逆転移サイクリングにより精製した。テンダミスタット-E L P融合体は、逆転移サイクリングのみによって精製した。逆転移サイクリングによる精製用に、細胞溶解物の温度を約45℃まで上昇させることにより、かつ/または、NaClを約2Mの濃度まで添加することによりFPを凝集させた。凝集した融合タンパク質は、35~45℃、10,000×g~15,000×gで15分間の遠心分離により溶液から分離した。上清を除去および廃棄し、融合タンパク質を含有するペレットは、低温で低イオン強度の緩衝液中に再溶解させた。次いで、再溶解されたペレットを4℃で遠心分離し、任意の残存する不溶性物質を除去した。

10

【0146】

E L P融合体溶液の350nmにおける吸光度は、マルチセル熱電式温度制御装置を装備した、Cary 300型紫外可視分光光度計において、4~80℃の範囲でモニターした。T_{1/2}は、1.5分⁻¹の速度での加熱または冷却時における温度の関数としての、FPの凝集による350nmにおける吸光度変化の中間点から決定した。

20

【0147】

SDS-PAGE解析では、不連続緩衝系を有する、プレキャストで勾配10~20%のMini-Proteinゲル（BioRad社製）を用いた。融合タンパク質の濃度は、減衰係数の計算値を用いて、分光光度法により決定した。総タンパク質濃度は、BCAアッセイ（Pierce社製）により決定した。チオレドキシニン活性は、比色法インスリン還元アッセイにより決定した。テンダミスタット活性は、比色法-アマラーゼ阻害アッセイ（Sigma社製）により決定した。

【0148】

E L P-GFP融合タンパク質もまた合成し、E L Pの90マーおよび180マーを、緑色蛍光タンパク質（GFP）またはその変異体である青色蛍光タンパク質（BFP）に、N末端融合またはC末端融合した。すべての融合ポリペプチドは、温度の関数としての濁度の紫外可視分光光度法による測定によって特徴づけられた可逆性逆転移のほか、温度依存的な蛍光測定値も示した。GFP-E L P融合体およびBFP-E L P融合体の逆転移を用いて、ITCによりこれらの融合タンパク質を均質まで精製し、SDS-PAGE法およびクーマシー染色法により検証した。

30

【0149】

標準的な分子生物学のプロトコールをさらに用いて、E L P分子量の低いE L P遺伝子の合成およびポリマー化/オリゴマー化を行った（Ausubel, et al.）。本実施例では、2つのE L P配列のモノマー遺伝子を用いた。

40

【0150】

第1のE L P1[V₅A₂G₃-10]は、Xaaが、それぞれ5:2:3の比率でVal、Ala、およびGlyである、10回のVal-Pro-Xaa-Gly反復（配列番号13）をコードした。第2のモノマーであるE L P1[V-5]（配列番号14）は、5回のVal-Pro-Gly-Val-Glyペプチド（すなわち、Xaaは、Valのみ）をコードした。E L P1[V-5]モノマー遺伝子のコード配列は、5'-GTGGGTGTTC CGGC GTAGGTGTCC CAGGTGTGGGC GTACC GGCGT TGGTGTTC CTG GTGT CGGC GTGCC GGGC-3'（配列番号15）であった。該モノマー遺伝子は、化学的に合成された5'リン酸化オ

50

リゴヌクレオチド（アイオワ州、コーラルビル、Integrated DNA Technologies社製）から構築され、pUC19に基づくクローニングベクター内に連結した。モノマー遺伝子合成についての詳細な説明は、他の箇所に示す。

【0151】

ELP1 [V₅A₂G₃-10] および ELP1 [V-5] の両 ELP 配列のモノマー遺伝子共に、ELP 分子量が増大するライブラリーをコードするタンDEM 反復により、切れ目なくオリゴマー化された。「再帰的有向連結 (recursive directional ligation)」と称する方法を用いる遺伝子オリゴマー化に関する詳細な説明は、他の箇所に示す。略述すると、ELP 遺伝子セグメント（最初はモノマー遺伝子であり、後のラウンドではモノマーの大型複合体）を、そのベクターに由来する制限消化により切断し、精製し、同じまたは異なる ELP 遺伝子セグメントを含有する第2のクローニングベクター内に連結し、これによって、2つの遺伝子セグメントを連鎖させた。この過程は再帰的に反復することができ、ラウンドごとに遺伝子長を倍増させる。

10

【0152】

本明細書では、k が特定のタイプの ELP 反復単位を示し、角括弧内の大文字が一文字式のアミノ酸コードであり、その対応する添え字が反復単位中の各ゲスト残基 X の相対比率を示し、n がペプタペプチド反復回数により総 ELP 長を記載する、ELP k [X_iY_j-n] 表記法を用いて、異なる ELP 構築物を区別する。本実施例にとって中心的な2つの ELP 構築物は、ELP1 [V₅A₂G₃-90] (35.9 kDa) (配列番号16) および ELP1 [V-20] (9.0 kDa) (配列番号17) である。

20

【0153】

チオレドキシソ融合タンパク質を産生するため、ELP1 [V₅A₂G₃-90] および ELP1 [V-20] をコードする遺伝子を、その各クローニングベクターから切断し、チオレドキシソ遺伝子、(His)₆ タグ、およびトロンピンプロテアーゼ切断部位に対して3'側に位置する固有の SfiI 部位を導入するよう既に改変しておいた pET-32b 発現ベクター（ウィスコンシン州、マジソン、Novagen社製）内に個別に連結した。ELP タグを有さない遊離チオレドキシソ（「チオレドキシソ (His)₆」）をコードする改変 pET-32b ベクターと、各融合タンパク質（「チオレドキシソ - ELP1 [V₅A₂G₃-90]」および「チオレドキシソ - ELP1 [V-20]」）をコードする2つの発現ベクターとを、大腸菌 BLR (DE3) 菌株（Novagen社製）内に形質転換した。

30

【0154】

タンパク質発現レベルおよび精製収量の定量的な比較のため、3つの構築物各々を発現させ、並行して精製した。各試料（チオレドキシソ (His)₆）、チオレドキシソ - ELP1 [V-20]、チオレドキシソ - ELP1 [V₅A₂G₃-90] の各々につき4つずつの試料）につき、2ml ずつの出発培地（カリフォルニア州、カールスバード、Qbiogene社製、CircleGrow培地、100 μg/ml のアンピシリンを補足）に、新たに画線培養した寒天プレート上の1つのコロニーから採取したスタブを接種し、300 rpm で振盪しながら37 °C で一晩インキュベートした。次いで、培地からラクタマーゼを除去するため、500 μl の一晩おいたコンフルエント培地から、遠心分離（4 °C、2000 × g、15分間）により細胞をペレット化し、新鮮な培地洗浄液中に再懸濁させ、再ペレット化した。新鮮な培地中における2回目の再懸濁後、該細胞を用いて、250 ml フラスコ内における50 ml の発現培地（100 μg/ml のアンピシリンを有するCircleGrow培地）に接種した。

40

【0155】

培地フラスコは、300 rpm で振盪しながら37 °C でインキュベートした。増殖は、600 nm における光学濃度によりモニターし、イソプロピル β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加して1 mM の最終濃度とすることにより、OD₆₀₀ = 1.0 でタンパク質発現を誘導した。さらに3時間の培養後、遠心分離（4 °C、2000 × g、15分間）により40 ml から細胞を回収し、チオレドキシソ (His)₆ の場合は2 ml の

50

I M A C 結合緩衝液 (5 m M イミダゾール、 5 0 0 m M N a C l、 2 0 m M トリス - H C l、 p H 7 . 9) 中、チオレドキシン - E L P 1 [V - 2 0] およびチオレドキシン - E L P 1 [V₅A₂G₃ - 9 0] の場合は P B S (1 3 7 m M N a C l、 2 . 7 m M K C l、 4 . 2 m M N a₂H P O₄、 1 . 4 m M K H₂P O₄、 p H 7 . 3) 中に再懸濁させ、精製されるまで - 2 0 で凍結させ保存する。回収時の培地密度は、新鮮な緩衝液中における 1 : 1 0 の希釈後に、O D₆₀₀ において測定した。回収時のプラスミド D N A 量は、紫外可視分光光度法の後、プラスミド単離法 (カリフォルニア州、バレンシア、Qiagen 社製、プラスミド miniprep スピンキット) により定量した。

【 0 1 5 6 】

チオレドキシン - E L P 融合タンパク質の I T C による精製に対する対照として、標準的な I M A C プロトコルを用いて、遊離チオレドキシンを精製した。略述すると、解凍した細胞を氷冷した 1 5 m l の遠心分離管に移し、超音波破壊 (マイクロチップを用いる Fisher Scientific 社製 5 5 0 型 Sonic Dismembrator) により溶解させた。1 . 5 m l のマイクロ遠心分離管に移した後、大腸菌溶解物を遠心分離 (4、1 6、0 0 0 × g、3 0 分間) して、不溶性細胞破砕物を除去した。5 m l の 5 0 m M N i S O₄ で満たした 1 m l のニトリロ三酢酸樹脂ベッドを充填したカラムへの重力流により、1 m l の可溶性細胞溶解物を投入した。

10

【 0 1 5 7 】

1 5 m l の I M A C 結合緩衝液によるカラムの洗浄後、2 5 0 m M イミダゾールを補足した 6 m l の I M A C 結合緩衝液中にチオレドキシン (H i s₆) を溶出させた。イミダゾールは、3、5 0 0 M W C O 膜を用いる低濃度塩緩衝液 (2 5 m M N a C l、2 0 m M トリス - H C l、p H 7 . 4) に対する一晩の透析により、溶出液から除去した。I M A C 法による精製は、不連続緩衝系を有する、プレキャストで勾配 1 0 ~ 2 0 % のゲル (カリフォルニア州、ハーキュリーズ、BioRad 社製) を用いる S D S - P A G E 法によりモニターした。

20

【 0 1 5 8 】

精製されたチオレドキシン (H i s₆) の収量は、C 末端タグに存在する単独の T r p 残基による吸収を含むよう改変したチオレドキシンのモル減衰係数 (E L P 分子量に依存せず、チオレドキシン (H i s₆) およびすべてのチオレドキシン - E L P 融合タンパク質について、 $\epsilon_{280} = 19870 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を用いて、分光光度法により決定した。

30

【 0 1 5 9 】

I T C による典型的な精製では、解凍した細胞を氷冷した 1 5 m l の遠心分離管に移し、超音波破壊 (マイクロチップによる Fisher Scientific 社製 5 5 0 型 Sonic Dismembrator) により溶解させた。1 . 5 m l のマイクロ遠心分離管に移した後、大腸菌溶解物を 4 で 3 0 分間遠心分離して、不溶性細胞破砕物を除去した (I T C による精製時におけるすべての遠心分離工程は、Eppendorf 社製 5 4 1 5 C 型マイクロ遠心分離機により、1 6、0 0 0 × g で実施した) 。

【 0 1 6 0 】

細胞溶解物の除去後上清にポリエチレンイミンを添加 (0 . 5 % w / w) して核酸を沈殿させ、さらに 4 で 2 0 分間の遠心分離によりこれを除去した。上清を保持し、N a C l 濃度を 1 . 3 M まで上昇させることにより E L P 相転移を誘導した。凝集した融合タンパク質は、3 3 で 5 分間にわたる遠心分離により溶液から分離し、これが、遠心分離管底部における半透明ペレットの形成をもたらした。

40

【 0 1 6 1 】

上清を除去および廃棄し、融合タンパク質を含有するペレットは、4 で等量の P B S 中に再溶解させた。残存する任意の不溶性物質は、4 で 1 5 分間にわたる最終遠心分離工程により除去し、精製された融合タンパク質を含有する上清を保持した。I M A C 法による精製について上述した通り、融合タンパク質精製の進行は、S D S - P A G E 法によりモニターし、タンパク質濃度は、分光光度法により決定した。

50

【0162】

チオレドキシンとELPタグとの間に位置する認識部位において融合タンパク質を切断するトロンビンプロテアーゼ (Novagen社製) を用いて、チオレドキシンをそのELP融合パートナーから分離した。通常は約100 μM の濃度である融合タンパク質 μmol 当たり約10単位のトロンビンを用いるPBS中において、室温で一晩にわたりトロンビンによるタンパク質分解反応を進行させた。次いで、今度は、生成物であるチオレドキシンを含有する上清を保持する、さらに1ラウンドのITCにより、切断されたチオレドキシンから遊離ELPを分離した。

【0163】

臨界点を超える温度の上昇は、ELP凝集のために、約2 の範囲にわたる濁度の急激な上昇をもたらす最大値 (約2.0のOD₃₅₀) に至るという事実を利用して、温度の関数としての溶液濁度を光度法的に測定することによりモニターすることができる。最大濁度の50%時の温度であるT_bは、凝集過程を定量的にモニターするのに好適なパラメータである。

10

【0164】

チオレドキシン - ELP融合タンパク質の温度依存的な凝集挙動は、温度の関数としての350 nmにおける光学濃度を測定することにより特徴づけられた。タンパク質精製時における大腸菌溶解物中に見出される場合に典型的な濃度 (チオレドキシン - ELP1 [V-20] の場合が160 μM で、チオレドキシン - ELP1 [V₅A₂G₃-90] の場合が40 μM) での融合タンパク質を、熱電式温度制御マルチセルホルダーを装備したCary Bio-300紫外可視分光光度計 (カリフォルニア州、ウォルトナットクリーク、Varian Instruments社製) 内において、1分⁻¹の一定速度で加熱または冷却した。実験は、追加のNaClを各濃度で補足したPBS中で実施した。ELP T_tは、光学濃度が、350 nmにおける最大光学濃度の5%に達した時の温度として定義した。

20

【0165】

動的光散乱 (DLS) 法を用いて、温度およびNaCl濃度の関数としてのチオレドキシン - ELP融合タンパク質の粒子サイズ分布をモニターした。試料は、上記の濁度測定において用いたタンパク質および溶媒の組成を反映するよう調製し、4 および16, 000 $\times g$ で10分間にわたり遠心分離して、気泡および不溶性破砕物を除去した。粒子サイズ測定の前に、T_t未満の温度で、20 nmのWhatman社製Anodiscフィルターにより、試料を濾過した。

30

【0166】

Peltier温度制御ユニットを装備したDynaPro-LSR動的光散乱測定器 (バージニア州、シャーロットビル、Protein Solutions社製) を用いて、自己相関関数を採集した。Protein Solutions社製のDynamicsソフトウェアバージョン5.26.37の球形粒子用の正則化解析 (regularization analysis) を用いて、解析を行った。溶液を20 ~ 60 に熱しながら、規則的な温度間隔 (1 または2) で光散乱データを採集した。セルを対象温度まで上昇させ、少なくとも1分間にわたり試料温度を平衡させ、各測定値に5秒間の採集時間を伴う10個の測定値を採集することにより、各温度においてデータを採集した。

40

【0167】

溶液中における各チオレドキシン - ELP融合タンパク質の逆転移は、温度の関数としての350 nmにおける光学濃度をモニターすることにより特徴づけた。ITCによる精製時において異なるNaCl溶液を通常用いてT_tを低下させる、または、逆転移を等温的に開始させるので、PBS中、ならびに追加の1 M、2 M、および3 M NaClを有するPBS中における、40 μM チオレドキシン - ELP1 [V₅A₂G₃-90] および160 μM チオレドキシン - ELP1 [V-20] について濁度プロファイルを得た。

【0168】

チオレドキシン - ELP融合タンパク質溶液について、温度の関数としての350 nm

50

における光学濃度を評価した。1分⁻¹の速度で加熱しながら、PBS中、ならびに追加の1M、2M、および3M NaClを有するPBS中における、チオレドキシン-ELP1[V-20]（実線）およびチオレドキシン-ELP1[V₅A₂G₃-90]（破線）について濁度プロファイルを得た。4種類の各PBS溶液中におけるチオレドキシン-ELP1[V₅A₂G₃-90]の濃度は40μM、チオレドキシン-ELP1[V-20]の同濃度は160μMであり、ITCによる精製時における可溶性細胞溶解物中の各タンパク質の典型的な濃度と符合した。すべての溶液は、T_tを経て加熱するとき濁度の急速な上昇を示したが、T_tを超えて熱し続けたところ、チオレドキシン-ELP1[V-20]溶液が濁度を最終的に低下させるのに対し、チオレドキシン-ELP1[V₅A₂G₃-90]溶液は一貫して濁度を保持した。チオレドキシン-ELP1[V₅A₂G₃-90]のすべての溶液は、T_t未満に冷やすと、完全に透明化した。しかし、ELP1[V-20]溶液が、約55より高温に加熱しない場合に限り可逆的に透明化したことは、チオレドキシン融合タンパク質の熱変性が、この温度より高温で生じたことを示唆する。

10

20

30

40

50

【0169】

タンパク質濃度は、ITCによる精製時においてELP逆転移が初めて誘導される段階である、大腸菌溶解物の可溶性画分における各融合タンパク質について得られる濃度に典型的な濃度として選択した。1Mおよび2MのNaClを補足した大腸菌の可溶性細胞溶解物において直接に得られた濁度プロファイルは、前出の段落において述べたチオレドキシン融合タンパク質について決定された、対応するプロファイルと区別できなかった。（ELP融合タンパク質の凝集から生じる濁度とは区別し得ない、大腸菌タンパク質の熱変性から生じる濁度の可能性のため、大腸菌溶解物では、通常濁度プロファイルが得られなかった。）濁度プロファイルは、また、下記のITCによる精製について用いられる条件と符合する、1.3Mの塩を有するPBS中における各融合タンパク質についても得られた。

【0170】

ITCによる精製において用いられる溶液条件に対する加熱および冷却の濁度プロファイルは、発現および精製の定量的な比較に用いられるITC条件に対応する、1.3M NaClを有するPBS中の溶解物タンパク質濃度におけるチオレドキシン-ELP1[V-20]溶液（実線）およびチオレドキシン-ELP1[V₅A₂G₃-90]溶液（破線）について決定した。これらの条件は、チオレドキシン-ELP1[V-20]溶液の最大濁度が、33の遠心分離温度において生じるよう選択した。溶液は、1分⁻¹で加熱および冷却した。加熱曲線と冷却曲線との間に観察されたわずかな経路差は、T_tより高温における凝集物の経時的に緩慢な沈殿、および、溶液がT_t未満に冷却されるとき凝集に対する脱凝集のより緩慢な反応速度に主に起因した。

【0171】

チオレドキシン-ELP1[V₅A₂G₃-90]の熱誘導凝集挙動は、遊離ELPの場合と同様であった。チオレドキシン-ELP1[V₅A₂G₃-90]溶液の温度を上昇させたところ、4種類の塩濃縮物はすべて、濁度が急激に上昇する点であるELP T_tに達するまでは透明を保った。これは、それぞれ、0、1、2、および3MのNaClを添加したPBS中の51、31、15、および4において生じた。遊離チオレドキシン対照溶液が、この温度範囲にわたる温度上昇により濁度変化を示さなかったことは、観察された熱誘導凝集が、ELPタグの逆転移に起因したことを示す（結果は示さない）。T_tを超えてさらにこれらの溶液を加熱しても、濁度レベルは基本的に一定であり、経時的な凝集物の沈殿によりわずかに低下するのみであった。T_t未満まで冷却すると、凝集物が再溶解され、光学濃度がゼロに戻ったことは、ELP1[V₅A₂G₃-90]融合タンパク質の逆転移が、完全に可逆的であったことを示す。NaCl濃度を上昇させるとT_tが著明に低下する一方で、塩は、最大光学濃度、濁度プロファイルの全般的な形状、または、凝集の可逆性に対して測定可能な影響を及ぼさない。

【0172】

これに対して、チオレドキシソ - E L P 1 [V - 2 0] の相転移挙動は、チオレドキシソ - E L P 1 [V₅A₂G₃ - 9 0] 融合タンパク質および遊離 E L P の場合よりもはるかに複雑であった。T_t (それぞれ、1、2、および3 MのNaClを補足したPBS中において33、17、および4) における濁度の最初の急速な上昇は、他のE L P 構築物と同様であったが、チオレドキシソ - E L P 1 [V - 2 0] の各溶液について観察される最大濁度は、塩濃度の上昇と共に上昇した。さらに、T_t を超えての温度の上昇は、最終的に濁度の著明な低下をもたらした。この低下は可逆的であり、濁度が低下する点まで加熱した後に溶液を冷却した場合、濁度は再び上昇した。透明化現象は、温度の可逆的関数であるため、T_t における最初のE L P 凝集事象の後に、温度の上昇と共に、熱力学的に駆動される第2の分子再配置が生じると結論された。

10

【0173】

チオレドキシソ - E L P 1 [V - 2 0] 濁度プロファイルに固有の別な特徴は、チオレドキシソの不可逆性熱変性から生じる凝集に起因している可能性がある、約55 で開始する濃度の第2の上昇であった。55 未満に加熱される試料が、T_t 未満に冷却されると可逆的に透明化したのに対し、塩濃度が1 M以上の場合、55 より高温に加熱される試料は、T_t 未満に冷却されても混濁を保った(図示しない)。遊離チオレドキシソ溶液、およびより大型のE L P へのその融合タンパク質溶液は、はるかに高温まで安定であったので、この現象は、チオレドキシソ - E L P 1 [V - 2 0] 融合タンパク質に固有であると思われる(結果は示さない)。60 未満のPBS中におけるチオレドキシソ - E L P 1 [V - 2 0] には逆転移が観察されなかったが、塩を添加したところ、PBS + 1、2、および3 MのNaCl溶液における変性温度未満で逆転移が生じるようT_t が低下した。

20

【0174】

温度の関数としてのDLSを用いて融合タンパク質粒子のサイズを測定し、PBS、PBS + 1 M NaCl、およびPBS + 2 M NaCl中における40 μMチオレドキシソ - E L P 1 [V₅A₂G₃ - 9 0] の粒子サイズ分布(水和半径、R_h)に対する温度および塩の影響を判定した。PBS、1 M NaClを添加したPBS、および2 M NaClを添加したPBS中におけるチオレドキシソ - E L P 1 [V₅A₂G₃ - 9 0] 粒子のサイズは、T_t における濁度の急激な上昇が、5.9 ± 3.9 nmの流体力学半径(R_h)を有するモノマーの、180 ± 62 nmのR_hを有する凝集物への転換から生じることを示した。これらの凝集物は、転移開始を約6 上回る温度において、2.2 ± 3.8 μmの安定的なR_hに達するまで、温度と共に成長した。T_t はNaClの添加により低下したが、モノマーおよび完全に形成された凝集物いずれのサイズも、(T_t に近接する範囲の外において) 塩濃度または温度によってさほど影響を受けなかったことから、逆転T_t より高温における定常状態濁度の根拠が与えられる。大型の凝集物形成の開始時における温度は、対応する溶液条件に対する濁度測定により決定されるT_t と厳密に符合した。

30

【0175】

検討された各塩濃度に対して、各粒子型に帰属する散乱強度の、対応する定量分析も行った。所与の温度範囲にわたり2つ以上の相が共存する場合、これらのデータは、相対的な粒子集団の変化を示す。粒子集団に帰属する該強度は、集団の質量と直線的に相関せず、複合粒子の相対質量の計算が、逆相転移に伴う可能性が高い充填密度の変化により複雑化したことに注目すべきである。E L P およびE L P 融合タンパク質の充填密度に対して、温度がどのように影響を及ぼすかについてのより詳細な理解なしに、各粒子型に帰属する質量の妥当な推定を行うことは不可能であった。これらの定量的な限界を踏まえるにもかかわらず、このデータは、モノマーの消失により、凝集物に帰属する散乱光の量がT_t において劇的に増大することを示した。

40

【0176】

データは、また、同定されない小粒子(高度に可変的であるが、見かけのR_h = 17 ± 31 nm)、および、2 μmの凝集物と共存する極めて大型の凝集物(見かけのR_h = 7

50

4 ± 5.5 μm) 両者の偶発的な存在も反映した。小粒子が、凝集物懸濁液の真の成分である可能性は低く、むしろ、その存在は、自己相関関数におけるノイズから生じる、正規化アルゴリズムにおけるアーチファクトを反映する。分析アーチファクトとしての評価は、小粒子の高度に可変的なサイズ、および、転移よりも高温においてはふさわしくないその存在により裏付けられる。同様に、その見かけのサイズがDLS測定器により識別できるよりもはるかに大きいため、データ解析から予測される極めて大型の凝集物が、懸濁液中における真の粒子種を代表した可能性も低い。むしろ、この粒子種に帰属する散乱は、より小型の粒子からなるネットワークの統合的で緩慢な動きから生じ得る。

【0177】

チオレドキシソ - ELP1 [V₅A₂G₃ - 90] と異なり、より小型のチオレドキシソ - ELP1 [V - 20] 融合タンパク質は、そのより複雑な濁度プロファイルと符合する、より複雑な温度依存的粒子サイズ分布を示した。

10

【0178】

PBS + 1M NaCl、およびPBS + 2M NaCl 中におけるELP1 [V - 20] の粒子サイズ分布に対する温度の影響を調べた。温度がT_tを超えて上昇した場合の濁度の消失は、大型の凝集物から新規のより小型の粒子(R_h = 12 nm)への質量の移動と符合する。

【0179】

粒子R_hの分布に対する塩および温度の影響、ならびに、1Mおよび2MのNaClを添加したPBS中における160 μMチオレドキシソ - ELP1 [V - 20] の散乱強度に対する各粒子集団の対応する寄与についても調べた。1Mの塩を添加したチオレドキシソ - ELP1 [V - 20] の場合、T_tにおける濁度の急速な上昇に先立つ小さな肩に対応して、5.9 ± 5.1 nmのR_hを有するモノマーが、30 °Cにおいて140 ± 79 nmのR_hを有する凝集物に転換された。30 °Cより高温では、凝集物が温度の上昇と共に成長し(40 °CにおけるR_h = 1.5 ± 0.98 μmまで)、これは、33 °Cから観察された濁度の急速な上昇と符合した。大型融合タンパク質の凝集挙動と同様に、40 °Cより高温において、1M NaClを添加したPBS中におけるチオレドキシソ - ELP1 [V - 20] は、より小型の粒子からなるネットワークの統合的で緩慢な動きを反映し得る、極めて大型の凝集物(見かけのR_h = 64 ± 67 μm)の存在を示した。

20

【0180】

しかし、より大型の融合タンパク質と異なり、チオレドキシソ - ELP1 [V - 20] は、また、40 °Cより高温ではかつて観察されなかった小型粒子の一貫した存在も示した。この粒子は、モノマーR_hの約2倍である、12 ± 4.9 nmのR_hを有した。しかし、その平均R_hと比較して、そのばらつきは、モノマーの場合の半分に過ぎなかった。40 °Cより高温におけるこの粒子のサイズ、一貫性、および持続的な存在は、自己相関関数におけるノイズから生じる分析アーチファクトでもなく、再溶媒和したモノマーでもないことを示した。12 nmの粒子が存在するとき、より大型の凝集物(R_h = 200 ± 210 nm)のサイズが減少し散乱強度が低下することにより裏付けられる通り、12 nmの粒子は、T_tより高温において当初存在する凝集物における質量の消失により形成されると思われた。

30

40

【0181】

NaCl濃度が2Mまで上昇した場合にも、同様の12 nm粒子が観察された。このNaCl濃度では、濁度測定により決定される通り、T_tは17度まで低下した。この温度範囲は、試料キュベットにおける水蒸気凝結により下限が定められた。したがって、20 °Cと30 °Cとの間において、チオレドキシソ - ELP1 [V - 20] は、2.4 ± 1.7 μmの平均R_hを有する安定的な凝集物に既に転移していた。約36 °Cを超えて試料を加熱したところ、凝集物のR_hは230 ± 170 nmにまで徐々に減少し、12 nmの粒子(R_h = 12 ± 4.7 nm)が出現した。12 nm粒子に帰属する散乱光の百分率もまた、より大型の凝集物の縮小により徐々に増大した。

【0182】

50

チオレドキシン - E L P 1 [V - 2 0] およびチオレドキシン - E L P 1 [V₅ A₂ G₃ - 9 0] は、各々、溶解された大腸菌培養物の可溶性画分から I T C により精製し、チオレドキシン (H i s₆) は、E L P タグを有さない対照として、I M A C 法により精製した。逆転移は、1 . 3 M N a C l の添加により誘導し、3 3 で遠心分離を実施した。I T C により融合タンパク質を均質にまで精製するのに小型の E L P 1 [V - 2 0] タグを用いることが成功し、従来のアフィニティ - クロマトグラフィー法により精製された遊離チオレドキシンの場合と同様の収量および純度が得られた。

【 0 1 8 3 】

E L P タグは、クーマシー法により染色されず、したがって、融合タンパク質のチオレドキシン部分のみが、染色されたゲル中において可視的であったことに注目されたい。チオレドキシン - E L P 1 [V - 2 0] およびチオレドキシン - E L P 1 [V₅ A₂ G₃ - 9 0] についての、可溶性細胞溶解物中における発現レベルの定性的な比較は、E L P タグのサイズを 3 6 k D a から 9 k D a に縮小することにより、チオレドキシンの発現収量が大幅に向上することを明確に示した。さらに、チオレドキシン - E L P 1 [V - 2 0] は、遊離チオレドキシンの場合と定性的に同等なレベルまで発現した。S D S - P A G E 解析もまた、任意の標的タンパク質について、細胞溶解物の不溶性画分に検出可能な消失は見られないことを示した (結果は示さない) 。

10

【 0 1 8 4 】

I T C による精製では、1 . 3 M の追加 N a C l を添加し、約 3 3 より高温に溶液温度を上昇させることにより、E L P の相転移が開始された。細胞溶解物は、チオレドキシン - E L P 融合タンパク質の凝集の結果として混濁し、次いで、これが、約 3 3 における遠心分離により溶液から分離され、遠心分離管底部における半透明ペレットを形成した。S D S - P A G E 法は、最も混入的な大腸菌タンパク質が、除去された上清中に保持されることを示した。ペレットは、約 4 の P B S 中に溶解させ、低温 (約 1 2) で遠心分離して、任意の残存する不溶性物質を除去した。精製されたチオレドキシン - E L P 融合タンパク質を含む上清を保持した。最後に、チオレドキシンと E L P タグとの間に位置するコードされた認識部位における、各融合タンパク質のトロンピンによる切断に続き、I T C の第 2 ラウンドにより E L P タグを溶液から除去した後に、精製された遊離チオレドキシンを得た。ここで、トロンピンは、(クーマシー染色法の検出限界未満ながら) 上清中の標的チオレドキシンと共に保持されたが、遊離 E L P と共に切断後に除去されるトロンピン - E L P 融合体を作製することができた。

20

30

【 0 1 8 5 】

クーマシー染色法により確認される通り、これらの S D S - P A G E 法の結果は、より短い 9 k D a の E L P 1 [V - 2 0] を用いて、I T C によりチオレドキシンを均質にまで精製し得ることを明確に示した。しかし、S D S - P A G E 法により定性的に確認される通り、これらの条件下における 2 つの E L P 融合タンパク質の精製効率には差が観察された。I T C による可溶性細胞溶解物からのチオレドキシン - E L P 1 [V₅ A₂ G₃ - 9 0] の回収が基本的に完全であったのに対し、チオレドキシン - E L P 1 [V - 2 0] の小型だが無視できない画分は、除去される上清中にとどまった。I M A C 法による精製では、カラムのフロースルー中に標的タンパク質の検出可能な消失が認められなかったが、E L P 1 [V - 2 0] タグでは、I T C により得られる純度レベルが、遊離チオレドキシンの I M A C 法での精製により得られる場合と同等かそれ以上に良好であった。

40

【 0 1 8 6 】

紫外可視分光光度法を用いて、I T C または I M A C 法での精製により回収される各タンパク質の収量を定量した。これらのデータは、精製後に回収されたタンパク質量を記したが、S D S - P A G E 法による結果は、この量が、可溶性溶解物における発現収量にほぼ等しいことを示唆した。この解析のため、3 つのタンパク質構築物の各々について、同一の条件下で、4 つずつの培養物を並行して培養した。実験上の便宜のため、5 0 m l の培養物についてこれらのデータを得、培養物リットル当たりの収量に外挿した。個別の 1 リットル培養物の精製は、実際の収量が、外挿された値とほぼ符合することを確認した

50

(データは示さない)。

【0187】

50 ml 試験培養物からのチオレドキシシ (His₆)、チオレドキシシ - ELP1 [V-20]、およびチオレドキシシ - ELP1 [V₅A₂G₃-90] の総収量を決定し、培養物リットル当たりのミリグラム数に外挿した (平均 ± SD、n = 4)。融合タンパク質の各質量画分を用いて計算される、収量に対する ELP タグおよびチオレドキシシの個別の寄与も、比較のために決定された。他のすべての実験条件が同一である場合、ELP タグを 36 kDa (チオレドキシシ - ELP1 [V₅A₂G₃-90]) から 9 kDa (チオレドキシシ - ELP1 [V-20]) に短縮すると、標的チオレドキシシの収量がほぼ 4 倍増加した。

10

【0188】

データは、ELP タグの分子量を縮小すると、チオレドキシシの収量を劇的に増加させることを示した。大腸菌培養物に対する同一の実験条件下において、ELP タグサイズを、チオレドキシシ - ELP1 [V₅A₂G₃-90] における 36 kDa からチオレドキシシ - ELP1 [V-20] における 9 kDa に縮小すると、融合タンパク質の収量が 70% 増大した (それぞれ、82 ± 12 mg/L 対 137 ± 21 mg/L; P < 0.005、対応のない t 検定)。さらに、ELP タグのサイズを縮小すると、融合タンパク質中におけるその質量画分が低下したので、標的タンパク質であるチオレドキシシ (すなわち、トロンピン切断部位において融合タンパク質から分離される場合) は、融合タンパク質収量においてより大きな質量画分を占めた。こうして、チオレドキシシ収量は、より小型のタグを用いたところ、365% 増大した (大型および小型のタグに対して、それぞれ、23 ± 3.3 mg/L 対 83 ± 12 mg/L; P < 0.0001)。9 kDa タグを用いて ITC により得られたこのチオレドキシシ収量は、ELP タグを用いずに発現し、IMAC 法により精製されたチオレドキシシについて得られた収量 (93 ± 13 mg/L; P > 0.25) と統計学的に区別できなかった。

20

【0189】

チオレドキシシの相対収量が、細胞溶解物中で観察される発現レベルと相関したので、これらの結果は、SDS-PAGE 法による結果を裏付けた。ELP タグの収量は、いずれの融合タンパク質についても同等であった (チオレドキシシ - ELP1 [V₅A₂G₃-90] について 59 ± 8.6 mg/L、および、チオレドキシシ - ELP1 [V-20] について 54 ± 8.1 mg/L; P > 0.4)。これは、チオレドキシシ融合タンパク質中における ELP タグの重量による収量が、24 ~ 72 kDa の範囲の ELP1 [V₅A₂G₃-90] ポリペプチドファミリー内における ELP 分子量に対して基本的に一定であるというかつての観察と符合した。

30

【0190】

精製効率と ITC における溶液条件との間の関係を裏付けるため、塩濃度と遠心分離温度との異なる組合せを用いて、チオレドキシシ - ELP1 [V-20] 融合タンパク質の ITC による精製を繰り返した。

【0191】

NaCl 濃度および遠心分離温度が ITC によるチオレドキシシ - ELP [V-20] の精製に及ぼす影響について、SDS-PAGE 解析を実施した (SL = 可溶性細胞溶解物; S = 融合タンパク質の逆転移、および、遠心分離による凝集した標的タンパク質の除去後における上清; ならびに P = PBS 中での溶解後において、精製された融合タンパク質を含有する再溶解ペレット)。各精製に対する NaCl モル濃度および遠心分離温度に注目した。各場合において高レベルの純度が達成されたが、適切な NaCl 濃度および遠心分離温度が、完全な精製効率を達成するのに極めて重要である。

40

【0192】

1 M NaCl を有する PBS を 49 における遠心分離と組み合わせて、ITC による精製に用いたところ、標的融合タンパク質の大部分は、除去される上清中に消失した。PBS に 2 M NaCl を加えて 33 の遠心分離温度を用いたところ、標的タンパク質

50

の半分超が、遠心分離により捕獲された。最後に3 M NaClを有するPBSおよび12における遠心分離を用いたところ、標的タンパク質の極めて大部分が精製に成功した。これらの例の各々において、標的タンパク質は均質まで精製されたが、これらの結果は、塩濃度および温度の選択が、ITCによる精製の効率に影響を及ぼす重要な因子であることを示した。

【0193】

本実施例の目的は、かつて報告した場合と比較してサイズが縮小される、ITCによる精製のELPタグを産生し、発現レベルおよび精製効率に対するこの縮小の影響を特徴づけることであった。かつての試みにおいて、第1世代のELP精製タグは、ELP1 [V₅A₂G₃-10]モノマー配列に基づいて開発された。この配列を再帰的にオリゴマー化して、4 kDa (ELP1 [V₅A₂G₃-10]) ~ 71 kDa (ELP1 [V₅A₂G₃-180])の範囲の分子量を有するELPをコードする合成遺伝子ライブラリーを作製した。この特定のゲスト残基組成は、Urry et al.のかつての研究に基づいて選択し、この組成を有するELPは、水中において約100 kDaの分子量に対して約40のT_tを示すことが予測された。融合タンパク質が、37での培養時に可溶性であり続けるが、塩濃度または溶液温度のわずかな上昇によるELP相転移を介して可逆性凝集を誘導し得るよう、40のT_tを目標とした。

10

【0194】

より分子量の高い構築物のT_tは、40に近かった(25 μMのPBS中において、MW_{ELP} = 71 kDaを有するチオレドキシソニン-ELP1 [V₅A₂G₃-180]の場合、T_t = 42)が、チオレドキシソニン-ELP1 [V₅A₂G₃]融合タンパク質のT_tは、分子量を低下させると劇的に上昇した(同じ条件下において、MW_{ELP} = 13 kDaを有するチオレドキシソニン-ELP1 [V₅A₂G₃-30]の場合、T_t = 77)。低分子量ELPの高T_tは、そのT_tを有用な温度(例えば、20~40)に低下させるのに、極めて高濃度のNaCl (> 3 M)の添加を必要とし、このことが、標的タンパク質の塩誘導変性の可能性のために、これらをITCによる精製用に一般的に用いることを不可能とした。より大型のELP1 [V₅A₂G₃]ポリペプチドが、チオレドキシソニンおよび第2のモデル標的タンパク質であるテングミスタットの精製に用いることに成功したが、ELP1 [V₅A₂G₃]鎖長が長くなると共に、融合タンパク質の収量が著明に減少することが観察された。

20

30

【0195】

これらの観察結果は、より低分子量のELPタグが、より適度なNaCl濃度で40に近いT_tを示すよう、上記の実験におけるELP発現タグの再デザインにより、そのT_tも低下させながら、ELP発現タグのサイズを縮小することを動機づけた。本研究のために新たに合成された第2のモノマー遺伝子は、4番目のゲスト残基がValに限る、5回のペントマーELP配列(ELP1 [V-5])をコードした。ELP1 [V]に存在するValは、ELP1 [V₅A₂G₃]に存在するAlaおよびGlyよりも疎水性であるので、チオレドキシソニン-ELP1 [V]融合タンパク質は、チオレドキシソニン-ELP1 [V₅A₂G₃]融合体よりも低いELP分子量で40のT_tを有すると予測された。

40

【0196】

ELP1 [V-20]配列(ELP1 [V-5]遺伝子の4回のタンデム反復)は、適度(1 M)のNaClを有する溶解物タンパク質濃度において、40に近いそのT_tが実験的に観察されているため、ITCによる精製におけるさらなる特徴づけのために、ELP1 [V-5]オリゴマーライブラリーから選択された。本実施例では、チオレドキシソニン-ELP1 [V-20]構築物(MW_{ELP} = 9 kDa)、および、かつて記載されたチオレドキシソニン-ELP1 [V₅A₂G₃-90]構築物(MW_{ELP} = 36 kDa)の2つの融合タンパク質が、各NaCl濃度に対する溶解物条件において極めて類似するT_tを有したので、これらを比較した。すなわち、これらは、ITCによる精製タグ用に所望の上述されたT_t特性を満たす2つのライブラリーの各々に由来する熱的類似体である

50

。

【0197】

かつての観察結果は、ELPサイズを縮小すると、融合タンパク質全体の発現レベルを高める可能性が高いことを示唆したが、タグサイズの縮小が、ITCによるELP融合タンパク質の精製に有害な影響を及ぼすか否か、先験的には明らかでなかった。したがって、標的タンパク質の発現レベルに対するその影響に加えて、ITCによる精製後における標的タンパク質の精製効率（すなわち、回収度）および純度に対するELPタグ長の影響を探索した。

【0198】

SDS-PAGE法および分光光度法による結果は、ELP分子量を36kDaから9kDaに低下させると、融合タンパク質の発現が4倍近く増強され、逆転移を誘導するのに用いられる任意の溶液条件（すなわち、NaCl濃度および温度）下における最終タンパク質の純度に有害な影響を及ぼさないことを示した。ELP[V-20]タグによる発現レベルが、遊離チオレドキシンの場合と同等であることは、ELPタグのさらなる短縮が、チオレドキシンの収量を増大させることはないことを示す。

10

【0199】

ELPタグ長が短縮されるのに応じて観察されるチオレドキシンの収量の増大に対する可能な1つの説明は、所与の培養条件に対し、細胞によって発現され得るELP質量が、ELP鎖長には依存せずに制限されることである。これは、各分子量の他のELPによる結果ならびに観察によっても裏付けられた。こうした制限は、おそらく、不十分なtRNAプールおよび/または高度に反復的なELP配列に起因するアミノ酸枯渇による代謝的因子により生じる可能性が高い。ELPの質量による収量が制限因子であるならば、これは、ELP[V-20]タグによるチオレドキシンの収量増加の根拠を提供する。ELPの所与の重量による収量に対し、ELP鎖長を短縮させると、融合タンパク質のモル収量が増大し、したがって、標的タンパク質の収量が増大する。さらに、このことは、また、例えば、培養時における特定のELP関連アミノ酸の補足により、ELPの重量による収量を増加させれば、融合タンパク質収量改善の別の可能な経路がもたらされることを示唆する。

20

【0200】

より短いELP1[V-20]タグにより標的タンパク質の収量が増加したが、この利益は、より複雑な転移挙動を伴った。このタグによる回収効率が、ITCに用いる溶液条件に依存するのに対し、より大型のELP1[V₅A₂G₃-90]タグでは、融合タンパク質の回収が、すべての溶液条件下において完全であった（結果は示さない）。こうして、短縮されたELP1[V-20]タグは、ITCによりチオレドキシンを均質にまで精製することを可能としたが、精製の効率は、逆転移を誘導するのに選択される特異的な条件に対して高感度であった。

30

【0201】

濁度およびDLS法によるデータは、より小型のELP1[V-20]タグの精製効率が溶液条件に対して示す感度への洞察をもたらした。チオレドキシンのELP1[V₅A₂G₃-90]溶液が、T_tより高いすべての温度において混濁を保つ一方で、チオレドキシンのELP1[V-20]の濁度プロファイルは、T_tにおける最初の急速な上昇の後、T_tより高温におけるさらなる加熱と共に透明化し始めた。温度上昇に伴うこの透明化現象は、本発明者の知る限り、他のELPまたはELP融合タンパク質ではかつて観察されなかった。この複雑な凝集挙動を研究するため、温度の関数としての動的光散乱を用いて、融合タンパク質粒子のサイズを測定し、2つの融合タンパク質の著明に異なる濁度プロファイルの構造的基礎を決定した。

40

【0202】

温度上昇と共に、チオレドキシンのELP1[V₅A₂G₃-90]モノマーは、急激で不連続的な相転移を経て、約2μmの定常状態R_hを有し、T_tより高いすべての温度において残存する凝集物を形成した。凝集物がT_tより高温で安定なため、凝集タンパク

50

質は、その T_t より高い任意の温度（または、 T_t が溶液温度未満にまで低下する任意の NaCl 濃度）において、遠心分離により完全に回収することができた。

【0203】

チオレドキシソ - ELP1 [V-20] もまた、凝集物を形成する急激な相転移を示したが、これらの凝集物は、その相転移温度より高いすべての温度では安定でなかった。温度が T_t を超えて上昇するのに応じて、やはり温度上昇と共にサイズの縮小を示したより大型の凝集物における質量の消失により、約 12 nm の R_h を有する小型の凝集物が形成された。これは、 T_t より高温で観察された、チオレドキシソ - ELP1 [V-20] の濁度の低下に対する構造的な根拠を提供する。 T_t より高温（1 M NaCl を有する PBS では T_t より約 10 高い温度に始まる、また、2 M NaCl を有する PBS では T_t より約 15 高い温度に始まる）まで加熱すると、より大型の散乱中心が、光の散乱効率がより低い小型の粒子に転換された。大型凝集物の消失によるこれらの 12 nm 粒子の形成は、遠心分離による可溶性溶解物からの融合タンパク質の不完全な回収をもたらした。こうして、ELP1 [V-20]（および、潜在的に、他の小型 ELP タグ）を融合タンパク質の精製に用いた場合、遠心分離により容易に分離できるより大型の凝集物のみが懸濁液中に存在するよう、 NaCl 濃度および補完的な溶液温度を選択することが、完全なタンパク質の回収には肝要であった。

10

【0204】

サイズのみに基づくなら、12 nm 粒子の正確な構造は予測できなかった。しかし、該粒子は、溶媒和したチオレドキシソドメインが、崩壊した疎水性の ELP ドメインを粒子の核に包み込むよう凝集する、少数の融合タンパク質分子（おそらく、40 ~ 60 個のオーダー）を含有するミセル様の構造であり得る。チオレドキシソの親水性「ヘッド」の直径が約 3 nm、20 ペンタマー ELP の疎水性「テール」の長さが約 7 nm であったので、観察された粒子のサイズ（約 12 nm の R_h ）は、こうした構造と符合する。

20

【0205】

こうしたミセル構造において必要とされるチオレドキシソ分子の近接性は、また、約 5 5 より高温で観察される不可逆性凝集を説明し得る。この低温における変性は、ELP1 [V-20] に融合したチオレドキシソおよび 1 M 以上の NaCl 濃度についてのみ観察された。また、12 nm 粒子が観察されたのはこれらの条件の場合のみであった。チオレドキシソ分子間で少量の ELP が緩衝する、該ミセルの溶媒和した親水性外殻におけるチオレドキシソの極めて高い有効濃度は、熱的安定性の低下が観察されたことと符合する。

30

【0206】

NaCl 濃度および溶液温度の適切な選択が、ITC を効率的に実施するのに適する。マイクロ遠心分離機を 4 の冷却実験用キャビネット内に置いた場合の 12、22 の実験用ベンチ上に置いた場合の 33、および 37 の静置用インキュベータ内に置いた場合の 49（すべての試料温度は、10 分間の遠心分離後において、熱電対により直接測定した）の 3 つの遠心分離温度を、実験に好適な温度として選択した。 NaCl 濃度は、 T_t を各遠心分離温度未満のある点まで低下させるよう、1 M ずつ上昇させて選択した。

40

【0207】

最初の 2 つの温度例の場合、遠心分離温度および NaCl 濃度のこれらの組合せにおいて、チオレドキシソ - ELP1 [V-20] は、より大型の凝集物が 12 nm 粒子と共存する 2 相挙動を示したため、回収は不完全であった。質量が小さいため、12 nm 粒子は、遠心分離時に懸濁を保ち、より大型の凝集物相中に含有される融合タンパク質画分のみが遠心分離により除去され、再溶解ペレット中に回収された。49 では、1 M NaCl を有する PBS 中におけるチオレドキシソ - ELP1 [V-20] の濁度プロファイルが、その最大値から著明に低下し、データは、散乱強度の大部分が、12 nm 粒子に由来することを示した。これに対応して、SDS - PAGE 法によるデータは、存在する融合タンパク質のごくわずかな画分が、ITC による精製時に遠心分離により捕獲されることを

50

示した。2 M NaClを有するPBS中における33 では、やはりその最大値を下回るものの、チオレドキシン - ELP1 [V - 20]の濁度は、そのピーク値に近づき、データは、12 nm粒子に帰属する散乱強度がはるかに小さいことを示した。12 nm粒子に起因する上清中の消失はやはり小さくはなかったが、SDS - PAGE法により確認された通り、ITCによる精製が融合タンパク質の大半を捕獲したことは、これらの観察と符合した。

【0208】

3 M NaClを有するPBS中における12 の遠心分離温度を用いたところ、再溶解ペレット中における融合タンパク質の回収は、ほぼ完全であった。これらの条件下において、溶液濁度は、その最大値に極めて近かった。濁度を、低い塩濃度について確立された粒子サイズ分布の傾向と組み合わせると、これらの条件を有するITCにより得られる完全な回収が、これらの溶液条件では、大型の凝集物のみの存在により説明されることが示唆される。

10

【0209】

これらの例は、チオレドキシン - ELP1 [V - 20]のITCによる効率的な精製、および、潜在的には、小型のELPタグを有する他の可溶性融合タンパク質には、濁度プロファイルにおける最高点を達成するよう、NaCl濃度および遠心分離温度を選択すべきであることを示す。温度制御のないマイクロ遠心分離機の場合、遠心分離試料温度を決定し、次いで、塩の正確な添加により融合タンパク質の T_t を調整することにより、温度制御が最も实际的に達成される。冷却システムを装備するより大型の遠心分離機の場合、NaCl濃度および遠心分離温度の統合的な変更により、回収効率を最大化することができる。逆転移を誘導する温度および塩濃度の任意の組合せを用いて完全に回収できるチオレドキシン - ELP1 [V₅A₂G₃ - 90]の場合に対して、チオレドキシン - ELP1 [V - 20]の場合は、ITC時における溶液条件の制御に必要な精度が、標的タンパク質収量の4倍増に必要な代価である。

20

【0210】

ELP精製タグ長を36 kDaから9 kDaに短縮すると、モデル標的タンパク質である大腸菌チオレドキシンの発現レベルが4倍に増加した。9 kDaタグによる発現レベルは、ELPタグなしに発現させた遊離チオレドキシンの場合と同様であり、したがって、ELPタグサイズのさらなる縮小は、さらなる利益をもたらさない可能性が高い。ELPの短縮は、最終タンパク質生成物の純度に有害な影響を及ぼさなかったが、ITCによる精製時におけるより大型の凝集物の形成を助長する、塩濃度および溶液温度の適切な組合せを選択することが重要である。

30

(実施例3)

【0211】

ELPタグを用いる組換えタンパク質のハイスループット精製

5ポリペプチドであるELPのVPGVG配列遺伝子は、PflMI適合末端およびHinDIIIの適合末端を有する2本鎖標準DNAを産出する、2つの5'側リン酸化合成オリゴヌクレオチド(アイオワ州、コーラルビル、Integrated DNA Technologies社製)をアニールすることにより構築した。この遺伝子を、PflMI/HinDIIIにより直鎖化し脱リン酸化した改変pUC-19ベクター(マサチューセッツ州、ピバリー、New England Biolabs社製)中に挿入し、PflMIおよびBglIを有する再帰的有向連結を用いてポリマー化し(Meyer, 1999; Meyer, 2000)、20ポリペプチドのELP配列遺伝子を産生した。次いで、このELP遺伝子を、PflMIおよびBglIにより切断し、ゲル精製し(カリフォルニア州、パレンシア、Qiagen社製、QIAquickゲル抽出キット)、SfiIにより直鎖化し脱リン酸化した改変pET32bベクター(ウィスコンシン州、マジソン、Novagen社製; Meyer, 1999)内に挿入した。次いで、この発現ベクターを、BLR(DE3)(Novagen社製)大腸菌発現菌株内に形質転換した。

40

【0212】

上記の細胞は、凍結された(DMSO)ストックから採取し、100 μg/mlアンピ

50

シリンを補足した寒天プレート上で画線培養し、一晚増殖させた。マルチチャンネルピペッターを用いて、200マイクロリットルの増殖培地（カリフォルニア州、カールスバード、Qbiogene社製；Circlegrow培地中に100 μ g/mlのアンピシリン）を、標準的な96ウェルマイクロプレート（ニューヨーク州、コーニング、Corning社製、Costar）の各ウェルに注入した。200 μ lのピペットチップを用いて、マイクロプレートの各ウェルに、上記の寒天プレート上のコロニーに由来する細胞のピンヘッドサイズの凝集を接種した。覆いをかぶせたマイクロプレートを、37、275rpmで振盪しながらインキュベートした。マイクロプレートホルダーを適宜用いて、シェーカー内の適所にマイクロプレートを保持した。マイクロプレートリーダー（カリフォルニア州、サニーベール、Molecular Devices社製；Thermomax）を用いて測定した培養物の大半について、OD₆₅₀が0.65 - この光学濃度は、紫外可視分光光度計（島津製作所、UV-1601）を用いて測定された2.0のOD₆₅₀に対応する - に達した時に、1mMの最終濃度までイソプロピル - チオガラクトピラノシドを添加することにより、培養物を誘導した。誘導後4時間にわたり、培養物を振盪しながらインキュベートし、次いで、重量整合マイクロプレート担体アダプター（カリフォルニア州、パロアルト、Beckman Instruments社製）を用いて、4、1100gで40分間にわたる遠心分離により回収した。培地を除去し、細胞ペレットは、精製の準備ができるまで、マイクロプレート内において - 80 で凍結させた。

10

【0213】

ELP1[V-20]/チオレドキシタンパク質は、マイクロプレート内の細胞培養物から、以下の通りに精製した。1 μ lのリソザイム溶液（ミズーリ州、セントルイス、Sigma社製；グレードVI；25mg/ml）および25 μ lの溶解緩衝液（50mM NaCl、5%グリセロール、50mMトリス-HCl、pH7.5）を各ウェルに添加することにより、細胞を溶解させた。次いで、オービタルシェーカーを用いて、4で20分間にわたりマイクロプレートを振盪した。2 μ lの1.35%（質量による）デオキシコール酸ナトリウム溶液を各ウェルに添加し、マイクロプレートを4で5分間にわたり振盪した。2 μ lのデオキシリボヌクレアーゼI溶液（100単位/ μ l、Type II、ミズーリ州、セントルイス、Sigma社製）を各ウェルに添加し、マイクロプレートを4で10分間にわたり振盪した。次いで、重量整合マイクロプレート担体アダプター（カリフォルニア州、パロアルト、Beckman Instruments社製）を用いて、マイクロプレートを4、1100gで20分間にわたり遠心分離し、細胞微粒子および不溶性タンパク質をペレット化した。2 μ lの10%（質量による）ポリエチレンイミン溶液を各ウェルに添加し、マイクロプレートを4で15分間にわたり振盪した。次いで、マイクロプレートを4、1100gで20分間にわたり遠心分離し、DNAをペレット化した。上清は、新たなマイクロプレートのウェルに移し、古いマイクロプレートは廃棄した。ELP1[V-20]/チオレドキシンの凝集を誘導するため、20 μ lの飽和NaCl溶液を各ウェルに添加したところ、濁度の著明な上昇が、標的タンパク質の凝集を示した。凝集タンパク質をペレット化するため、マイクロプレートを30、1100gで40分間にわたり遠心分離した。タンパク質ペレットを30 μ lのリン酸緩衝液中に再溶解させた後、マイクロプレートを4、1100gで20分間にわたり遠心分離して、不溶性脂質を除去した。最後に、精製したタンパク質上清を新たなマイクロプレートのウェルに移し、4で保管した。ITCにより精製されたELP1[V-20]/チオレドキシ融合タンパク質に対して、SDS-PAGEゲル解析を行った。

20

30

40

【0214】

あるいは、以下のプロトコールに従う市販の抽出試薬を用いて、複数のELP/ELP融合タンパク質を精製することができる。25マイクロリットルのNovagen社製BugBusterタンパク質抽出試薬を各マイクロプレートウェルに添加することにより、細胞を溶解させる。マイクロプレートを、室温で15分間にわたり、シェーカー速度2のFisher社製Vortex Genie（あるいは、最大速度のオービタルシェーカー）上に置く。マイクロプレートアダプターを用い、摂氏4度で20分間にわたり遠心

50

分離 (J S 4 . 2 ローター用のBeckman社製アダプターの場合、2300rpm、1700 × g) を行い、ペレットを形成する。2マイクロリットルのポリエチレンイミンをウェルに (0 . 66 % まで) 添加し、Vortex Genieまたはシェーカーを用いて5分間にわたり振盪する。氷上で10分間にわたりインキュベートし、場合によって振盪する。マイクロプレートアダプターを用い、摂氏4度、最大速度で25分間にわたり遠心分離する。上清を未使用のマイクロプレートに移し、使用済みのマイクロプレートをペレットと共に廃棄する。NaCl (結晶) を添加し、かつ/または、溶液温度を上昇させて、ELP凝集を誘導する。振盪のみにより混合する - ピペティングは、ピペットチップにELPを凝集させる。溶液は、ある程度まで混濁する。転移温度より高温で遠心分離する (摂氏35 ~ 40度、2300rpm、1700gで45分間) 。上清を廃棄し、ウェルの底部および壁面全体で繰り返しピペティングすることにより、30マイクロリットルの低温の選択緩衝液 (PBS) 中に、ペレット (通常は不可視または極小のペレット) を再懸濁させる。遠心分離 (摂氏4度、2300rpm、1700 × gで20分間) して、脂質などの不溶性不純物をスピアウトする。上清を別のマイクロプレートに移す。精製されたELPは、使用準備ができるまで、摂氏 - 80度で凍結保存してよい。 (融合体の場合、凍結が融合タンパク質に適することを確認しなければならない。) 本技法において用いられる適切なNaCl濃度および温度は、ELP、融合パートナー、およびELP濃度に依存する。目的は、有効ELP転移温度を、溶液温度よりも少なくとも3 ~ 5度低下させることである。融合タンパク質により忍容されるならば、より高温を用いてもよいが、摂氏25 ~ 30度の有効転移温度および摂氏35 ~ 40度の温熱遠心分離を用いるのが有用であった。

【0215】

タンパク質濃度は、 A_{280} を測定 (島津製作所、UV - 1601) し、ELP1 [V - 20] / チオレドキシンのモル減衰係数 ($= 19,870$) を用いることにより決定したが、これは、ELP1 [V - 20] / チオレドキシントタンパク質試料がタンパク質およびDNA不純物を含有しないことを仮定する。チオレドキシソ活性は、インスリン還元アッセイ (Holmgren, 1984) により決定した。

【0216】

融合タンパク質の構築には、既に公表された T_t の理論データ (Urry, 1991) を用いて、約70の T_t を有する小型のELPタグをデザインした。ELPタグの特徴づけは、 T_t が76.2であることを示し、 T_t が指定されたELPタグを合理的にデザインすることが可能であることを確認した。ELP / チオレドキシソ融合タンパク質の場合、低濃度の塩緩衝液、1Mの塩溶液、および2Mの塩溶液中における T_t は、それぞれ、68、37、および18であり、ELPタグへの可溶性タンパク質の融合が T_t に及ぼす影響は最小限であることを確認し、塩濃度を調整することにより、広範にわたって T_t を操作し得ることを示した。

【0217】

前述に基づき、ELP配列および切断部位により連結されたポリリンカー領域 (この内部に標的タンパク質を挿入する) を含有するプラスミド発現ベクターファミリーを作製することにより、各種タンパク質の発現を促進することができる。こうしたプラスミドファミリー中に埋め込まれたELP配列は、異なる転移温度を有し得る (ゲスト残基の同一特性を変更することによる) 。特定の標的タンパク質用の発現ベクターは、該タンパク質の表面疎水性特性に基づき選択するのが望ましい。次いで、精製時における溶液の塩濃度を調整して、所望の T_t を得る。

【0218】

マイクロプレートウェル内における細胞培養物の増殖を含むタンパク質発現の場合、約2のOD₆₀₀で細胞培養物を誘導し、誘導後4時間にわたり増殖させることが望ましい。マイクロプレートにおける増殖のための誘導時における細胞密度は、従来のタンパク質発現プロトコールにより達成される密度の2 ~ 3倍である。これらの高細胞密度においても、ウェル内で増殖する場合、容量に対する高い表面積率を特徴とする培養物の通気によ

り、マイクロプレートウェルにおいて急速かつ健全な細胞増殖を維持することができる。誘導後の増殖時間が長い細胞培養物は、標的タンパク質の収量増加が最小限であり、過剰発現プロトコール (Guda, 1995) を用いる増殖は、融合タンパク質の増加は最小限で混入タンパク質がはるかに増加した (約 10 倍)。マイクロプレートウェル中の細胞増殖物の容量に対する高い表面積率における細胞培地の蒸発を回避するため、増殖時において適切な覆いによりマイクロプレートを覆い、誘導時において細胞増殖培地に追加の培地を注入する必要があった。リットル当たりベースにおいて、マイクロプレートウェル内で増殖させた培地は、従来のプロトコールにより増殖させた培地よりも高レベルの融合タンパク質発現を有した。

【0219】

細胞を市販の非イオン性タンパク質抽出製剤により溶解させたところ、ITCを用いるハイスループットタンパク質精製が成功した。細胞溶解後、ポリエチレンイミンの添加により、遠心分離直後の未加工溶解物の可溶性画分から、核酸および高分子量タンパク質を除去した。融合タンパク質および可溶性溶解物の塩濃度において、融合タンパク質の T_t は、約 65 であった。融合タンパク質の凝集を誘導するこの温度より高温で可溶性溶解物を加熱すると、可溶性混入タンパク質のほか、標的タンパク質自体も変性し沈殿する。さらに、この温度は、遠心分離時における遠心分離機チャンパー内で維持することができなかった。したがって、可溶性溶解物に約 2 M まで塩を添加したところ、これが融合タンパク質の T_t を約 18 まで低下させ、室温での融合タンパク質の凝集を可能とした。この塩濃度は、混入タンパク質を沈殿させず、最終精製タンパク質生成物の機能性も変化させなかった。

【0220】

ITCを用いるハイスループットタンパク質精製は、有効かつ効率的であった。発現した融合タンパク質のうち、細胞溶解物の不溶性タンパク質画分中に消失したのは約 15% であった。融合タンパク質凝集後における試料の遠心分離は、タンパク質を有効に分離し、融合タンパク質の 90% がペレット化したのに対し、融合タンパク質の 10% は、すべての可溶性混入タンパク質と共に上清中にとどまった。全体で発現タンパク質の約 75% が、ITCによる精製を用いて抽出され、精製された生成物中の大腸菌による混入タンパク質レベルは、SDS-PAGE法により検出可能なレベルを下回った。遠心分離速度を上昇させることにより、精製過程を速め、精製効率を上昇させることができ、高速の遠心分離速度は、遠心分離時間を短縮させ、高速の遠心分離速度 (5000 g) においては、融合タンパク質のすべてが、凝集後の遠心分離時においてペレット化する。トロンビンの添加は、融合タンパク質を完全に切断し、ITCの第2ラウンドは、チオレドキシンの消失なしに、チオレドキシンの標的タンパク質からELPタグを分離した。

【0221】

吸光度測定 (A_{280} 、 $\epsilon = 19,870$) を用いて決定されたウェル当たりの平均精製融合タンパク質量は、8.5 μg の標準偏差を伴う 33 μg であった。値は、ウェル当たり 19.7 μg と 48.3 μg との間に均等に分散した。精製タンパク質収量の大きなばらつきは、ITC過程の精製効率のばらつきよりも、タンパク質の発現量がウェルごとに異なることに起因した。細胞培養物ごとに様々な量のタンパク質が発現したのは、1) 接種の圧痕は、細胞培養物が、初発において様々な量の細胞を有することを意味し、2) あらゆる可能性において、より豊富な通気により、周縁部のウェル内における細胞培養物の方が、より迅速に増殖し、より高度な定常状態細胞密度に達する傾向があったためである。作業を簡便化するため、細胞培養物ごとに誘導および回収するのではなく、すべての細胞培養物を同時に誘導し、次いで、回収した。

【0222】

チオレドキシンの標的タンパク質の酵素活性は、インスリン還元アッセイを用いて測定した。こうした酵素活性に基づいて決定された、ウェル当たりの平均融合タンパク質量は、8.0 μg の標準偏差を伴う 35.7 μg であった。ここでも、値は、ウェル当たり 24.6 μg の最小値と 50.8 μg の最大値との間に均等に分散した。チオレドキシンは、

10

20

30

40

50

E L P タグに付着したままであるにもかかわらず、酵素的に活性であったことが重要である。このハイスルーブット I T C 法を用いて発現し精製されたチオレドキシンは、単位質量当たりの酵素活性が、市販のチオレドキシシ (Sigma社製) の場合よりも平均で 10.3% 大きく、I T C 過程の穏やかさおよびこれにより達成された純度の裏付けとなった。

【0223】

平均して、ハイスルーブット E L P / チオレドキシシタンパク質による発現および精製は、増殖物リットル当たり約 160 mg のタンパク質を産生した。これは、従来のタンパク質発現および I T C 精製法を用いて得られる E L P / チオレドキシシ収量 (タンパク質 140 ~ 200 mg / 増殖物 L) と同等である。

【0224】

マイクロプレートおよび逆転移サイクリングを用いるハイスルーブットタンパク質精製段階に対する S D S - P A G E ゲル法を上述の手順により実施し、ここで、文書化されたプロトコルを用い、E L P / チオレドキシシ融合タンパク質を精製した。ゲル試料は、S D S により変性させ、ベータ-メルカプトエタノールにより還元し、勾配 10 ~ 20% のトリス-H C l ゲル上において 200 V で 45 分間にわたり電気泳動させた。

【0225】

吸光度測定 (A_{280} 、 $\epsilon = 19,870$) を用いて決定されたウェル当たりの総融合タンパク質量に関するヒストグラム ($n = 20$ 、 $\mu = 32.97$ 、 $\sigma = 8.48$)、および市販のチオレドキシシ (Sigma社製) と比較した、試料ごとの融合タンパク質の機能性 / 純度に関するヒストグラム ($n = 20$ 、 $\mu = 110.37\%$ 、 $\sigma = 16.54\%$) を含め、精製されたタンパク質試料の定量化にはヒストグラムを用いた。

【0226】

こうしたハイスルーブットタンパク質発現法および精製法については、ニッケルキレート化マルチウェルプレートが、ウェル当たりわずかに 1 ng の His タグ付きタンパク質を精製し得るのに対し、I T C を用いるハイスルーブット精製の能力は、ウェル中で増殖させる培養物により発現し得るタンパク質量のみによって制限され、E L P タグ付きタンパク質の場合、タンパク質発現レベルは、数十マイクログラムの範囲である。

【0227】

こうして、I T C を用いるハイスルーブット精製は、高収量を提供し、治療用組成物の有効成分を産生するペプチド活性治療剤 - E L P 構築物の精製に十分な融合タンパク質を産生する。精製されたミリグラムレベルの融合タンパク質は、他の容器において細胞培養物を増殖させ、再懸濁させた細胞ペレットを精製過程用のマルチウェルプレートに移すことにより得ることができる。最後に、こうしたハイスルーブット精製法が必要とする精製中間生成物の未使用のマルチウェルプレートへの移動は 1 回だけなので、現在行われる従来の市販ハイスルーブット精製法よりも技術的に簡便で廉価である。

(実施例 4)

【0228】

各種 E L P 遺伝子発現系列の構築
細菌の菌株とプラスミド

クローニング工程は、大腸菌 X L 1 - B l u e 菌株 ($r e c A 1$ 、 $e n d A 1$ 、 $g y r A 9 6$ 、 $t h i - 1$ 、 $h s d R 1 7$ (r_k^- 、 m_k^+)、 $s u p E 4 4$ 、 $r e l A 1$ 、 $l a c [F']$ 、 $p r o A B$ 、 $l a c I^q Z$ M 1 5、T n 1 0 (T e t^I)) (カリフォルニア州、ラジヨラ、Stratagene社製) 内で行った。E L P 構築物のクローニングベクターとしては、p U C 1 9 (マサチューセッツ州、ピバリー、N E B 社製) を用いた (Meyer and Chilkoti, 1999)。p E T 1 5 b ベクターおよび p E T 2 4 d ベクターの改変形態 (Novagen社製) を用いて、B L 2 1 S t a r (D E 3) 菌株 (F' 、 $o m p T$ 、 $h s d S_B$ ($r_B^- m_B^-$)、 $g a l$ 、 $d c m$ 、 $r n e l 3 1$ 、(D E 3)) (カリフォルニア州、カールスバード、Invitrogen社製)、または、B L R (D E 3) (F' 、 $o m p T$ 、 $h s d S_B$ ($r_B^- m_B^-$)、 $g a l$ 、 $d c m$ 、($s r l - r e c A$) 3 0 6 : : T n 1 0 (T c^R) (D E 3)) (ウィスコンシン州、マジソン、Novagen社製) 内

10

20

30

40

50

においてELPおよびELP融合タンパク質を発現した。合成DNAオリゴは、アイオワ州、コーラルビル、Integrated DNA Technologies社から購入した。すべてのベクター構築物は、標準的な分子生物学プロトコルを用いて作製した (Ausubel, et al., 1995)。

【0229】

ELP1 [V₅A₂G₃] 遺伝子系列の構築

ELP1 [V₅A₂G₃] 系列とは、Xが、5 : 2 : 3の相対比率でバリン、アラニン、およびグリシンである、ペントペプチドVPGXGの多数回反復単位を含有するポリペプチドを指す。

【0230】

ELP1 [V₅A₂G₃] 系列モノマーであるELP1 [V₅A₂G₃-10] は、5'側がリン酸化され、PAGE法により精製された4つの合成オリゴをアニールして、EcoRI適合末端およびHindIII適合末端 (Meyer and Chilkoti, 1999) を有する2本鎖DNAを形成することにより作製した。該オリゴは、加熱ブロック内で95とした50 μlの1倍濃度リガーゼ緩衝液 (Invitrogen社製) 中における4つのオリゴの1 μM混合物中でアニールし、次いで、該ブロックを室温までゆっくりと冷ました。ELP1 [V₅A₂G₃-10] / EcoRI - HindIII DNAセグメントを、EcoRIおよびHindIIIで消化し、CIAP (Invitrogen社製) で脱リン酸化したpUC19ベクター内に連結し、pUC19 - ELP1 [V₅A₂G₃-10] を形成した。ELP1 [V₅A₂G₃] 系列ライブラリーの構築は、pUC19 - ELP1 [V₅A₂G₃-10] に由来するELP1 [V₅A₂G₃-10] PflMI / BglI断片を、PflMIにより直鎖化し、CIAPにより脱リン酸化したpUC19 - ELP1 [V₅A₂G₃-10] 内に挿入して、pUC19 - ELP1 [V₅A₂G₃-20] を作製することにより開始した。次いで、pUC19 - ELP1 [V₅A₂G₃-20] は、PflMIで消化したpUC19 - ELP1 [V₅A₂G₃-20] 内に、それぞれ、ELP1 [V₅A₂G₃-10] PflMI / BglI断片またはELP1 [V₅A₂G₃-20] PflMI / BglI断片を連結することにより、pUC19 - ELP1 [V₅A₂G₃-30] およびpUC19 - ELP1 [V₅A₂G₃-40] に構築された。この手順を用いてELP1 [V₅A₂G₃] 系列を拡張し、pUC19 - ELP1 [V₅A₂G₃-60] 遺伝子、pUC19 - ELP1 [V₅A₂G₃-90] 遺伝子、およびpUC19 - ELP1 [V₅A₂G₃-180] 遺伝子を作製した。

【0231】

ELP1 [K₁V₂F₁] 遺伝子系列の構築

ELP1 [K₁V₂F₁] 系列とは、Xが、1 : 2 : 1の相対比率でリジン、バリン、およびフェニルアラニンである、ペントペプチドVPGXGの多数回反復単位を含有するポリペプチドを指す。

【0232】

ELP1 [K₁V₂F₁] 系列モノマーであるELP1 [K₁V₂F₁-4] (配列番号18) は、5'側がリン酸化され、PAGE法により精製された2つの合成オリゴをアニールして、EcoRI適合末端およびHindIII適合末端 (Meyer and Chilkoti, 1999) を有する2本鎖DNAを形成することにより作製した。該オリゴは、加熱ブロック内で95とした50 μlの1倍濃度リガーゼ緩衝液 (Invitrogen社製) 中における4つのオリゴの1 μM混合物中でアニールし、次いで、該ブロックを室温までゆっくりと冷ました。ELP1 [K₁V₂F₁-4] / EcoRI - HindIII DNAセグメントを、EcoRIおよびHindIIIで消化し、CIAP (Invitrogen社製) で脱リン酸化したpUC19ベクター内に連結し、pUC19 - ELP1 [K₁V₂F₁-4] を形成した。ELP1 [K₁V₂F₁] 系列ライブラリーの構築は、pUC19 - ELP1 [K₁V₂F₁-4] に由来するELP1 [K₁V₂F₁-4] PflMI / BglI断片を、PflMIにより直鎖化し、CIAPにより脱リン酸化したpUC19 - ELP1 [K₁V₂F₁-4] 内に挿入して、pUC19 - ELP1 [K₁V₂F₁-8] を作製す

10

20

30

40

50

ることにより開始した。同じ手順を用いて、ELP1 [K₁V₂F₁-4]系列は、連結するごとに2倍化し、pUC19-ELP1 [K₁V₂F₁-16]、pUC19-ELP1 [K₁V₂F₁-32]、pUC19-ELP1 [K₁V₂F₁-64]、およびpUC19-ELP1 [K₁V₂F₁-128]を形成した。

【0233】

ELP1 [K₁V₇F₁]遺伝子系列の構築

ELP1 [K₁V₇F₁]系列とは、Xが、1:7:1の相対比率でリジン、バリン、およびフェニルアラニンである、ペントペプチドVPGXGの多数回反復単位を含有するポリペプチドを指す。

【0234】

ELP1 [K₁V₇F₁]系列モノマーであるELP1 [K₁V₇F₁-9] (配列番号19)は、5'側がリン酸化され、PAGE法により精製された4つの合成オリゴをアニールして、PflMI適合末端およびHindIII適合末端を有する2本鎖DNAを形成することにより作製した。次いで、ELP1 [K₁V₇F₁-9] DNAセグメントを、PflMI/HindIIIで消化した脱リン酸化pUC19-ELP1 [V₅A₂G₃-180]ベクター内に連結し、これにより、ELP1 [K₁V₇F₁-9]をELP1 [V₅A₂G₃-180]に置換して、pUC19-ELP1 [K₁V₇F₁-9]モノマーを形成した。ELP1 [K₁V₇F₁-9]系列は、ELP1 [K₁V₂F₁]系列と同じ形で拡張し、pUC19-ELP1 [K₁V₇F₁-18]、pUC19-ELP1 [K₁V₇F₁-36]、pUC19-ELP1 [K₁V₇F₁-72]、およびpUC19-ELP1 [K₁V₇F₁-144]を作製した。

【0235】

ELP1 [V]遺伝子系列の構築

ELP1 [V]系列とは、Xがバリンに限る、ペントペプチドVPGXGの多数回反復単位を含有するポリペプチドを指す。

【0236】

ELP1 [V]系列モノマーであるELP1 [V-5] (配列番号14)は、5'側がリン酸化され、PAGE法により精製された2つの合成オリゴをアニールして、EcoR1適合末端およびHindIII適合末端を有する2本鎖DNAを形成することにより作製した。次いで、ELP1 [V-5] DNAセグメントを、EcoR1/HindIIIで消化した脱リン酸化pUC19ベクター内に連結し、pUC19-ELP1 [V-5]モノマーを形成した。ELP1 [V]系列は、ELP1 [V₅A₂G₃]系列と同じ形で作製し、最終的には、pUC19-ELP1 [V-5]をpUC19-ELP1 [V-60]およびpUC19-ELP1 [V-120]に拡張した。

【0237】

ELP2遺伝子系列の構築

ELP2系列とは、ペントペプチドAVGV Pの多数回反復単位を含有するポリペプチドを指す。

【0238】

ELP2系列モノマーであるELP2 [5] (配列番号20)は、5'側がリン酸化され、PAGE法により精製された2つの合成オリゴをアニールして、EcoR1適合末端およびHindIII適合末端を有する2本鎖DNAを形成することにより作製した。次いで、ELP2 [5] DNAセグメントを、EcoR1/HindIIIで消化した脱リン酸化pUC19ベクター内に連結し、pUC19-ELP2 [5]モノマーを形成した。ELP2系列は、ELP1 [K₁V₂F₁]系列と同じ形で拡張し、pUC19-ELP2 [10]、pUC19-ELP2 [30]、pUC19-ELP2 [60]、およびpUC19-ELP2 [120]を作製した。

【0239】

ELP3 [V]遺伝子系列の構築

ELP3 [V]系列とは、Xがバリンに限る、ペントペプチドIPGXGの多数回反復

10

20

30

40

50

単位を含有するポリペプチドを指す。

【0240】

ELP3[V]系列モノマーであるELP3[V-5]（配列番号21）は、5'側がリン酸化され、PAGE法により精製された2つの合成オリゴをアニールして、PflMIアミノ末端の適合末端、および、好適なカルボキシル末端制限部位を欠くためにGGCカルボキシル末端の適合末端を有するが、やはりモノマーの切れ目のない付加を可能とする、2本鎖DNAを形成することにより作製した。次いで、ELP3[V-5]DNAセグメントを、PflMI/BglIで消化した脱リン酸化pUC19-ELP4[V-5]ベクター内に連結し、これにより、ELP4[V-5]をELP3[V-5]に置換して、pUC19-ELP3[V-5]モノマーを形成した。ELP3[V]系列は、PflMIで消化したpUC19-ELP3[V-5]内に、アニールしたELP3オリゴを連結することにより拡張した。連結のたびに、ELP3[V]系列は5倍ずつ拡張され、ELP3[V-10]、ELP3[V-15]などを作製した。

10

【0241】

ELP4[V]遺伝子系列の構築

ELP4[V]系列とは、Xがパリンに限る、ペントペプチドLPGXGの多数回反復単位を含有するポリペプチドを指す。

【0242】

ELP4[V]系列モノマーであるELP4[V-5]（配列番号22）は、5'側がリン酸化され、PAGE法により精製された2つの合成オリゴをアニールして、EcoR1適合末端およびHindIII適合末端を有する2本鎖DNAを形成することにより作製した。次いで、ELP4[V-5]DNAセグメントを、EcoR1/HindIIIで消化した脱リン酸化pUC19ベクター内に連結し、pUC19-ELP4[V-5]モノマーを形成した。ELP4[V]系列は、ELP1[K₁V₂F₁]系列と同じ形で拡張し、pUC19-ELP4[V-10]、pUC19-ELP4[V-30]、pUC19-ELP4[V-60]、およびpUC19-ELP4[V-120]を作製した。

20

【0243】

ELP遺伝子は、また、pET15b-SD0、pET15b-SD3、pET15b-SD5、pET15b-SD6、およびpET24d-SD21などの他のベクター内にも挿入された。pETベクター系列は、カリフォルニア州、サンディエゴ、Novagen社から入手できる。

30

【0244】

pET15b-SD0ベクターは、マルチクローニング制限部位(SacI-NdeI-NcoI-XhoI-SnaBI-BamHI)を含有する、SD0 2本鎖DNAセグメントを用いて、pET15bベクターを改変することにより形成した。SD0 2本鎖DNAセグメントは、XbaI適合末端およびBamHI適合末端を有し、XbaI/BamHIにより直鎖化され5'側が脱リン酸化されたpET15b内に連結され、pET15b-SD0ベクターを形成した。

【0245】

pET15b-SD3ベクターは、マルチクローニング部位(NdeI-NcoI-XhoI-SnaBI-BamHI)が後続するヒンジ領域-トロンピン切断部位の上流にあるSfiI制限部位を含有する、SD3 2本鎖DNAセグメントを用いて、pET15b-SD0ベクターを改変することにより形成した。SD3 2本鎖DNAセグメントは、SacI適合末端およびNdeI適合末端を有し、SacI/NdeIにより直鎖化され5'側が脱リン酸化されたpET15b-SD0内に連結され、pET15b-SD3ベクターを形成した。

40

【0246】

pET15b-SD5ベクターは、ヒンジおよびマルチクローニング部位(NdeI-NcoI-XhoI-SnaBI-BamHI)が後続するトロンピン切断部位の上流に

50

ある S f i 1 制限部位を含有する、S D 5 2 本鎖 D N A セグメントを用いて、p E T 1 5 b - S D 3 ベクターを改変することにより形成した。S D 5 2 本鎖 D N A セグメントは、S f i 1 適合末端および N d e 1 適合末端を有し、S f i 1 / N d e 1 により直鎖化され 5 ' 側が脱リン酸化された p E T 1 5 b - S D 3 内に連結され、p E T 1 5 b - S D 5 ベクターを形成した。

【0247】

p E T 1 5 b - S D 6 ベクターは、マルチクローニング部位 (N d e 1 - N c o 1 - X h o 1 - S n a B 1 - B a m H 1) が後続するリンカー領域 - T E V 切断部位の上流にある S f i 1 制限部位を含有する、S D 6 2 本鎖 D N A セグメントを用いて、p E T 1 5 b - S D 3 ベクターを改変することにより形成した。S D 6 2 本鎖 D N A セグメントは、S f i 1 適合末端および N d e 1 適合末端を有し、S f i 1 / N d e 1 により直鎖化され 5 ' 側が脱リン酸化された p E T 1 5 b - S D 3 内に連結され、p E T 1 5 b - S D 6 ベクターを形成した。

10

【0248】

p E T 2 4 d - S D 2 1 ベクターは、N c o 1 適合末端および N h e 1 適合末端を有する S D 2 1 2 本鎖 D N A セグメントを用いて、p E T 2 4 d ベクターを改変することにより形成した。S D 2 1 2 本鎖 D N A セグメントは、N c o 1 / N h e 1 により直鎖化され 5 ' 側が脱リン酸化された p E T 2 4 d 内に連結され、p E T 2 4 d - S D 2 1 ベクターを形成し、これが、S f i 1 部位の直後に、最小限数の追加アミノ酸を有する E L P の挿入および発現のための 2 つの終止コドンを含む、新たなマルチクローニング部位である N c o I - S f i I - N h e I - B a m H I - E c o R 1 - S a c I - S a l I - H i n d I I I - N o t I - X h o I を含有した。

20

【0249】

X L 1 - B l u e 内で産生された p U C 1 9 - E L P 1 [V 5 A 2 G 3 - 6 0] プラスミド、p U C 1 9 - E L P 1 [V 5 A 2 G 3 - 9 0] プラスミド、および p U C 1 9 - E L P 1 [V 5 A 2 G 3 - 1 8 0] プラスミドを、P f l M 1 および B g l 1 で消化し、E L P 含有断片を、本明細書で上述した p E T 1 5 b - S D 3 発現ベクターの S f i 1 部位内に連結し、それぞれ、p E T 1 5 b - S D 3 - E L P 1 [V 5 A 2 G 3 - 6 0]、p E T 1 5 b - S D 5 - E L P 1 [V 5 A 2 G 3 - 9 0]、および p E T 1 5 b - S D 5 - E L P 1 [V 5 A 2 G 3 - 1 8 0] を作製した。

30

【0250】

X L 1 - B l u e 内で産生された p U C 1 9 - E L P 1 [V 5 A 2 G 3 - 9 0] プラスミド、p U C 1 9 - E L P 1 [V 5 A 2 G 3 - 1 8 0] プラスミド、p U C 1 9 - E L P 1 [V - 6 0] プラスミド、および p U C 1 9 - E L P 1 [V - 1 2 0] プラスミドを、P f l M 1 および B g l 1 で消化し、E L P 含有断片を、本明細書で上述した p E T 1 5 b - S D 5 発現ベクターの S f i 1 部位内に連結し、それぞれ、p E T 1 5 b - S D 5 - E L P 1 [V 5 A 2 G 3 - 9 0]、および p E T 1 5 b - S D 5 - E L P 1 [V 5 A 2 G 3 - 1 8 0]、p E T 1 5 b - S D 5 - E L P 1 [V - 6 0]、および p E T 1 5 b - S D 5 - E L P 1 [V - 1 2 0] を作製した。

40

【0251】

X L 1 - B l u e 内で産生された p U C 1 9 - E L P 1 [V 5 A 2 G 3 - 9 0] プラスミドを、P f l M 1 および B g l 1 で消化し、E L P 含有断片を、本明細書で上述した p E T 1 5 b - S D 6 発現ベクターの S f i 1 部位内に連結し、p E T 1 5 b - S D 6 - E L P 1 [V 5 A 2 G 3 - 9 0] を作製した。

【0252】

X L 1 - B l u e 内で産生された p U C 1 9 - E L P 1 [K 1 V 2 F 1 - 6 4] プラスミドおよび p U C 1 9 - E L P 1 [K 1 V 2 F 1 - 1 2 8] プラスミドを、P f l M 1 および B g l 1 で消化し、E L P 含有断片を、本明細書で上述した p E T 2 4 d - S D 2 1 発現ベクターの S f i 1 部位内に連結し、それぞれ、p E T 2 4 d - S D 2 1 - E L P 1 [K 1 V 2 F 1 - 6 4] および p E T 2 4 d - S D 2 1 - E L P 1 [K 1 V 2 F 1 - 1 2

50

8] を作製した。

【 0 2 5 3 】

X L 1 - B l u e 内で産生された p U C 1 9 - E L P 1 [K ₁ V ₇ F ₁ - 7 2] プラスミドおよび p U C 1 9 - E L P 1 [K ₁ V ₇ F ₁ - 1 4 4] プラスミドを、 P f l M 1 および B g l 1 で消化し、 E L P 含有断片を、本明細書で上述した p E T 2 4 d - S D 2 1 発現ベクターの S f i 1 部位内に連結し、それぞれ、 p E T 2 4 d - S D 2 1 - E L P 1 [K ₁ V ₇ F ₁ - 7 2] および p E T 2 4 d - S D 2 1 - E L P 1 [K ₁ V ₇ F ₁ - 1 4 4] を作製した。

【 0 2 5 4 】

X L 1 - B l u e 内で産生された p U C 1 9 - E L P 2 [6 0] プラスミドおよび p U C 1 9 - E L P 2 [1 2 0] プラスミドを、 N c o I および H i n d I I I で消化し、 E L P 含有断片を、本明細書で上述した p E T 2 4 d - S D 2 1 発現ベクターの N c o I 部位および H i n d I I I 部位内に連結し、それぞれ、 p E T 2 4 d - S D 2 1 - E L P 2 [6 0] および p E T 2 4 d - S D 2 1 - E L P 2 [1 2 0] を作製した。

10

【 0 2 5 5 】

X L 1 - B l u e 内で産生された p U C 1 9 - E L P 4 [V - 6 0] プラスミドおよび p U C 1 9 - E L P 4 [V - 1 2 0] プラスミドを、 N c o I および H i n d I I I で消化し、 E L P 含有断片を、本明細書で上述した p E T 2 4 d - S D 2 1 発現ベクターの N c o I 部位および H i n d I I I 部位内に連結し、それぞれ、 p E T 2 4 d - S D 2 1 - E L P 4 [V - 6 0] および p E T 2 4 d - S D 2 1 - E L P 4 [V - 1 2 0] を作製した。

20

(実施例 5)

【 0 2 5 6 】

各種融合タンパク質の構築、単離、および精製

以下の融合タンパク質が、特定の組合せにおける各種のペプチド活性治療剤および E L P 種を例示することに注意されたい。

【 0 2 5 7 】

これらの融合タンパク質は、各ペプチド活性治療剤と E L P 部分との間の切断部位を伴ってデザインされたが、さらなる研究用にペプチド活性治療剤および E L P 部分を産生する切断反応において用いる場合、ペプチド活性治療剤を E L P に直接結合する簡便法により、プロテアーゼもしくは他の分解作用物質、または、その投与後の *i n v i v o* において該構築物が遭遇し得る状態による切断を受けやすい切断群または部分の介在なしに、こうした切断部位を欠く、対応するペプチド活性治療剤 - E L P 構築物が容易に産生される。

30

【 0 2 5 8 】

E L P 含有融合タンパク質の形成、および、こうした融合タンパク質により示される相転移挙動において、各種の標的タンパク質 (ペプチド活性治療剤) の使用を示す実験を行った。具体的に、本明細書に上記の教示および開示と符合する、既知の組換え発現技法を用いることにより、以下の 3 6 の E L P 含有融合タンパク質：

間にエンテロキナーゼプロテアーゼ切断部位を有する、インスリン A ペプチドおよび E L P 1 [V - 6 0] ポリペプチド (配列番号 2 3) ；

40

間にエンテロキナーゼプロテアーゼ切断部位を有する、インスリン A ペプチドおよび E L P 1 [V ₅ A ₂ G ₃ - 9 0] ポリペプチド (配列番号 2 4) ；

間にエンテロキナーゼプロテアーゼ切断部位を有する、インスリン A ペプチドおよび E L P 1 [V - 1 2 0] ポリペプチド (配列番号 2 5) ；

間にエンテロキナーゼプロテアーゼ切断部位を有する、インスリン A ペプチドおよび E L P 1 [V ₅ A ₂ G ₃ - 1 8 0] ポリペプチド (配列番号 2 6) ；

間にエンテロキナーゼプロテアーゼ切断部位を有する、 T 2 0 ペプチドおよび E L P 1 [V - 6 0] ポリペプチド (配列番号 2 7) ；

間にエンテロキナーゼプロテアーゼ切断部位を有する、 T 2 0 ペプチドおよび E L P

50

- 1 [V₅ A₂ G₃ - 90] ポリペプチド (配列番号 28) ;
 間にエンテロキナーゼプロテアーゼ切断部位を有する、T20ペプチドおよびELP
- 1 [V - 120] ポリペプチド (配列番号 29) ;
 間にトロンビンプロテアーゼ切断部位を有する、T20ペプチドおよびELP 1 [V
- 60] ポリペプチド (配列番号 30) ;
 間にトロンビンプロテアーゼ切断部位を有する、T20ペプチドおよびELP 1 [V
- ₅ A₂ G₃ - 90] ポリペプチド (配列番号 31) ;
 間にトロンビンプロテアーゼ切断部位を有する、T20ペプチドおよびELP 1 [V
- 120] ポリペプチド (配列番号 32) ;
 間にタバコエッチウイルス (TEV) プロテアーゼ切断部位 (QS 残基間の切断) を
 有する、T20ペプチドおよびELP 1 [V - 60] ポリペプチド (配列番号 33) ; 10
- 間にTEVプロテアーゼ切断部位 (QS 残基間の切断) を有する、T20ペプチドお
 よびELP 1 [V₅ A₂ G₃ - 90] ポリペプチド (配列番号 34) ;
- 間にTEVプロテアーゼ切断部位 (QS 残基間の切断) を有する、T20ペプチドお
 よびELP 1 [V - 120] ポリペプチド (配列番号 35) ;
- 間にTEVプロテアーゼ切断部位 (QY 残基間の切断) を有する、T20ペプチドお
 よびELP 1 [V - 60] ポリペプチド (配列番号 36) ;
- 間にTEVプロテアーゼ切断部位 (QY 残基間の切断) を有する、T20ペプチドお
 よびELP 1 [V₅ A₂ G₃ - 90] ポリペプチド (配列番号 37) ;
- 間にTEVプロテアーゼ切断部位 (QY 残基間の切断) を有する、T20ペプチドお
 よびELP 1 [V - 120] ポリペプチド (配列番号 38) ; 20
- 間にトロンビンプロテアーゼ切断部位を有する、インターフェロンアルファ2Bタン
 パク質およびELP 1 [V₅ A₂ G₃ - 90] ポリペプチド (配列番号 39) ;
- 間にトロンビンプロテアーゼ切断部位を有する、タバコエッチウイルスプロテアーゼ
 およびELP 1 [V - 60] ポリペプチド (配列番号 40) ;
- 間にトロンビンプロテアーゼ切断部位を有する、タバコエッチウイルスプロテアーゼ
 およびELP 1 [V₅ A₂ G₃ - 90] ポリペプチド (配列番号 41) ;
- 間にトロンビンプロテアーゼ切断部位を有する、タバコエッチウイルスプロテアーゼ
 およびELP 1 [V - 120] ポリペプチド (配列番号 42) ;
- 間にトロンビンプロテアーゼ切断部位を有する、タバコエッチウイルスプロテアーゼ
 およびELP 1 [V₅ A₂ G₃ - 180] ポリペプチド (配列番号 43) ; 30
- 間にトロンビンプロテアーゼ切断部位を有する、小ヘテロダイマーパートナーオーフ
 ァン受容体およびELP 1 [V₅ A₂ G₃ - 90] ポリペプチド (配列番号 44) ;
- 間にトロンビンプロテアーゼ切断部位を有する、アンドロゲン受容体リガンド結合ド
 メインおよびELP 1 [V₅ A₂ G₃ - 90] ポリペプチド (配列番号 45) ;
- 間にトロンビンプロテアーゼ切断部位を有する、アンドロゲン受容体リガンド結合ド
 メインおよびELP 1 [V₅ A₂ G₃ - 180] ポリペプチド (配列番号 46) ;
- 間にトロンビンプロテアーゼ切断部位を有する、グルコルチコイド受容体リガンド
 結合ドメインおよびELP 1 [V₅ A₂ G₃ - 90] ポリペプチド (配列番号 47) ;
- 間にトロンビンプロテアーゼ切断部位を有する、エストロゲン受容体リガンド結合ド
 メインおよびELP 1 [V₅ A₂ G₃ - 60] ポリペプチド (配列番号 48) ; 40
- 間にトロンビンプロテアーゼ切断部位を有する、エストロゲン受容体リガンド結合ド
 メインおよびELP 1 [V₅ A₂ G₃ - 90] ポリペプチド (配列番号 49) ;
- 間にトロンビンプロテアーゼ切断部位を有する、エストロゲン受容体リガンド結合ド
 メインおよびELP 1 [V₅ A₂ G₃ - 180] ポリペプチド (配列番号 50) ;
- 間にTEVプロテアーゼ切断部位 (QG 残基間の切断) を有する、エストロゲン受容
 体リガンド結合ドメインおよびELP 1 [V₅ A₂ G₃ - 90] ポリペプチド (配列番号
 51) ;
- 間にトロンビンプロテアーゼ切断部位を有する、Gタンパク質アルファQおよびEL
 P 1 [V₅ A₂ G₃ - 90] ポリペプチド (配列番号 52) ; 50

間にトロンピンプロテアーゼ切断部位を有する、Gタンパク質アルファQおよびELP1 [V₅A₂G₃-180]ポリペプチド(配列番号53);

間にトロンピンプロテアーゼ切断部位を有する、1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸レダクトイソメラーゼペプチドおよびELP1 [V₅A₂G₃-60]ポリペプチド(配列番号54);

間にトロンピンプロテアーゼ切断部位を有する、1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸レダクトイソメラーゼペプチドおよびELP1 [V₅A₂G₃-90]ポリペプチド(配列番号55);

間にトロンピンプロテアーゼ切断部位を有する、1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸レダクトイソメラーゼペプチドおよびELP1 [V₅A₂G₃-180]ポリペ

10

プチド(配列番号57);および

間にトロンピンプロテアーゼ切断部位を有する、Gタンパク質アルファSおよびELP1 [V₅A₂G₃-90]ポリペプチド(配列番号58)

を大腸菌内において形成した。

【0259】

上に列挙した36のELP含有融合タンパク質のすべてが、対応するELPタグの逆相転移挙動を保持し、以下の実験手順により、逆転移サイクリング(ITC)法を用いることにより、単離および精製に成功した。

20

【0260】

インスリンAペプチド(InsA)を含有する融合タンパク質の単離および精製

各ELP-InsA融合タンパク質を含有する大腸菌BLR(DE3)菌株(Novagen社製)の単一コロニーを、100μg/mlアンピシリン(Sigma社製)を補足した5mlのCircleGrow培地(カリフォルニア州、サンディエゴ、Q-BIOgene社製)に接種し、37、250rpmで振盪しながら5時間にわたり増殖させた。次いで、5mlの培養物を500mlの培養液に接種し、25で16時間にわたり増殖させた後、1mM IPTGにより25で4時間にわたり誘導した。培養物を回収し、40mlの20mMトリス-HCl pH7.4、50mM NaCl、1mM DTT、および完全EDTA非含有プロテアーゼ阻害剤ペレット1個(イリノイ州、インディアナポリス、Roche社製)中に懸濁させた。細胞は、30秒間の冷却間隔を挟み、35%出力で10秒間の破壊からなる、氷上で3分間にわたる超音波破壊により溶解させた。細胞破砕物は、4、20、000gで30分間にわたる遠心分離により除去した。

30

【0261】

室温での細胞溶解物にNaClを添加することにより逆相転移を誘導し、そこで1.0Mの最終濃度を達成した後、室温、20、000gで15分間にわたり遠心分離を行った。得られたペレットは、各ELP-InsA融合タンパク質およびNaClによる非特異的な沈殿タンパク質を含有した。

【0262】

ペレットは、40mlの氷冷した20mMトリス-HCl pH7.4、50mM NaCl、1mM DTT中に再懸濁させ、4、20、000gで15分間にわたり再遠心分離して、NaClによる非特異的な沈殿タンパク質を除去した。逆転移サイクルをさらに2回繰り返し、各ELP-InsA融合タンパク質の純度を高め、最終容量を0.5mlに減少させた。

40

【0263】

T20ペプチド(T20)を含有する融合タンパク質の単離および精製

各ELP-T20融合タンパク質を含有する大腸菌BLR(DE3)菌株(Novagen社製)の単一コロニーを、100μg/mlアンピシリン(Sigma社製)を補足した500mlのCircleGrow培地(カリフォルニア州、サンディエゴ、Q-BIOgene社製)

50

に接種し、37、250rpmで振盪しながら24時間にわたり増殖させた。培養物を回収し、40mlの50mMトリスpH8.0、0.5mMEDTA、および完全プロテアーゼ阻害剤ペレット1個(イリノイ州、インディアナポリス、Roche社製)中に懸濁させた。細胞は、30秒間の冷却間隔を挟み、35%出力で10秒間の破壊からなる、氷上で3分間にわたる超音波破壊により溶解させた。細胞破砕物は、4、20,000gで30分間にわたる遠心分離により除去した。

【0264】

室温での細胞溶解物にNaClを添加することにより逆相転移を誘導し、そこで1.0Mの最終濃度を達成した後、室温、20,000gで15分間にわたり遠心分離を行った。得られたペレットは、各ELP-T20融合タンパク質およびNaClによる非特異的な沈殿タンパク質を含有した。

10

【0265】

ペレットは、40mlの氷冷した50mMトリスpH8.0、0.5mMEDTA中に再懸濁させ、4、20,000gで15分間にわたり再遠心分離して、NaClによる非特異的な沈殿タンパク質を除去した。逆転移サイクルをさらに2回繰り返し、各ELP-T20融合タンパク質の純度を高め、最終容量を5mlに減少させた。

【0266】

インターフェロンアルファ2Bペプチド(IFNA2)を含有する融合タンパク質の単離および精製

ELP-IFNA2融合タンパク質およびCodon Plus-RILプラスミド(Stratagene社製)を含有する大腸菌BL21(DE3)TrxB菌株(Novagen社製)の単一コロニーを、100μg/mlアンピシリン(Sigma社製)、25ug/mlクロラムフェニコール(Sigma社製)を補足した500mlのCircleGrow培地(カリフォルニア州、サンディエゴ、Q-BIOgene社製)に接種し、27、250rpmで振盪しながら48時間にわたりインキュベートした。培養物を回収し、50mMトリス-HCL pH7.4、50mM NaCl、および完全EDTA非含有プロテアーゼ阻害剤ペレット1個(イリノイ州、インディアナポリス、Roche社製)中に懸濁させた。細胞は、30秒間の冷却間隔を挟み、35%出力で10秒間の破壊からなる、氷上で3分間にわたる超音波破壊により溶解させた。細胞破砕物は、4、20,000gで30分間にわたる遠心分離により除去した。

20

30

【0267】

室温での細胞溶解物にNaClを添加することにより逆相転移を誘導し、1.5Mの最終濃度を達成した後、室温、20,000gで15分間にわたり遠心分離を行った。得られたペレットは、ELP-IFNA2融合タンパク質およびNaClによる非特異的な沈殿タンパク質を含有した。

【0268】

ペレットは、40mlの氷冷した50mMトリス-HCL pH7.4および50mM NaCl中に再懸濁させ、4、20,000gで15分間にわたり再遠心分離して、NaClによる非特異的な沈殿タンパク質を除去した。逆転移サイクルをさらに2回繰り返し、ELP-IFNA2融合タンパク質の純度を高め、最終容量を5mlに減少させた。

40

【0269】

タバコエッチウイルスプロテアーゼ(TEV)を含有する融合タンパク質の単離および精製

pET15b-SD5-ELP-TEV構築物およびCodon Plus-RILプラスミド(Stratagene社製)を含有する大腸菌BL21star菌株またはBRL(DE3)菌株の単一コロニーを、100μg/mlアンピシリン(Sigma社製)、25ug/mlクロラムフェニコール(Sigma社製)を補足した500mlのCircleGrow培地(カリフォルニア州、サンディエゴ、Q-BIOgene社製)に接種し、27、250rpmで振盪しながら48時間にわたりインキュベートした。培養物を回収し、50mM

50

トリス - H C L p H 8 . 0、1 m M E D T A、5 m M D T T、1 0 % グリセロール、および 1 m M P M S F 中に懸濁させた。細胞は、3 0 秒間の冷却間隔を挟み、3 5 % 出力で 1 0 秒間の破壊からなる、氷上で 3 分間にわたる超音波破壊により溶解させた。細胞破砕物は、4、2 0、0 0 0 g で 3 0 分間にわたる遠心分離により除去した。

【 0 2 7 0 】

室温での細胞溶解物に N a C l を添加することにより逆相転移を誘導し、1 . 5 M の最終濃度を達成した後、室温、2 0、0 0 0 g で 1 5 分間にわたり遠心分離を行った。得られたペレットは、各 E L P - T E V 融合タンパク質および N a C l による非特異的な沈殿タンパク質を含有した。

【 0 2 7 1 】

ペレットは、4 0 m l の氷冷した 5 0 m M トリス - H C L p H 8 . 0、1 m M E D T A、5 m M D T T、1 0 % グリセロール中に再懸濁させ、4、2 0、0 0 0 g で 1 5 分間にわたり再遠心分離して、N a C l による非特異的な沈殿タンパク質を除去した。逆転移サイクルをさらに 2 回繰り返し、各 E L P - T E V 融合タンパク質の純度を高め、最終容量を 1 m l に減少させた。

【 0 2 7 2 】

小ヘテロダイマーパートナーオーファン受容体 (S H P) を含有する融合タンパク質の単離および精製

E L P - S H P 融合タンパク質を含有する大腸菌 B L 2 1 S t a r (D E 3) 菌株の単一コロニーを、1 0 0 μ g / m l アンピシリン (Sigma社製) および 1 0 % スクロースを補足した 5 0 0 m l の C i r c l e G r o w 培地 (カリフォルニア州、サンディエゴ、Q-BIOgene社製) に接種し、2 7、2 5 0 r p m で振盪しながら 4 8 時間にわたり増殖させた。培養物を回収し、5 0 m M トリス - H C L p H 8 . 0、1 5 0 m M K C L、1 m M D T T、1 m M E D T A、および完全 E D T A 非含有プロテアーゼ阻害剤ペレット 1 個 (イリノイ州、インディアナポリス、Roche社製) 中に懸濁させた。細胞は、3 0 秒間の冷却間隔を挟み、3 5 % 出力で 1 0 秒間の破壊からなる、氷上で 3 分間にわたる超音波破壊により溶解させた。可溶性溶解物中の D N A および R N A は、2 μ l ベンゾナーゼ (Novagen社製) を添加し、4 で 3 0 分間にわたりインキュベートすることによりさらに分解した。細胞破砕物は、4、2 0、0 0 0 g で 3 0 分間にわたる遠心分離により除去した。

【 0 2 7 3 】

室温での細胞溶解物に N a C l を添加することにより逆相転移を誘導し、1 . 5 M の最終濃度を達成した後、室温、2 0、0 0 0 g で 1 5 分間にわたり遠心分離を行った。得られたペレットは、E L P - S H P 融合タンパク質および N a C l による非特異的な沈殿タンパク質を含有した。

【 0 2 7 4 】

ペレットは、4 0 m l の氷冷した 5 0 m M トリス - H C L p H 8 . 0、1 5 0 m M K C L、1 m M D T T、1 m M E D T A、および 1 % N - オクチルグルコシド中に再懸濁させ、4、2 0、0 0 0 g で 1 5 分間にわたり再遠心分離して、非特異的な不溶性タンパク質を除去した。温度転移サイクルをさらに 2 回繰り返し、E L P - S H P 融合タンパク質の純度を高め、最終容量を 2 m l に減少させた。

【 0 2 7 5 】

アンドロゲン受容体リガンド結合ドメイン (A R - L B D) を含有する融合タンパク質の単離および精製

E L P - A R - L B D 融合タンパク質を含有する大腸菌 B L 2 1 S t a r (D E 3) 菌株の単一コロニーを、1 0 0 μ g / m l アンピシリン (Sigma社製) および 1 0 μ M D H T を補足した 5 0 0 m l の C i r c l e G r o w 培地 (カリフォルニア州、サンディエゴ、Q-BIOgene社製) に接種し、2 7、2 5 0 r p m で振盪しながら 4 8 時間にわたり増殖させた。培養物を回収し、4 0 m l の 5 0 m M ヘプス p H 7 . 5、1 5 0 m M N a C l、0 . 1 % N - オクチルグルコシド、1 0 % グリセロール、1 m M D T T、1

10

20

30

40

50

μM DHT、および完全EDTA非含有プロテアーゼ阻害剤ペレット1個（イリノイ州、インディアナポリス、Roche社製）中に懸濁させた。細胞は、30秒間の冷却間隔を挟み、35%出力で10秒間の破壊からなる、氷上で3分間にわたる超音波破壊により溶解させた。可溶性超音波分解物中のDNAおよびRNAは、 $2\mu\text{l}$ ベンゾナーゼ（Novagen社製）を添加し、4で30分間にわたりインキュベートすることによりさらに分解した。細胞破砕物は、4、20,000gで30分間にわたる遠心分離により除去した。

【0276】

室温での細胞溶解物にNaClを添加することにより逆相転移を誘導し、2.0Mの最終濃度を達成した後、室温、20,000gで15分間にわたり遠心分離を行った。得られたペレットは、各ELP-AR-LBD融合タンパク質およびNaClによる非特異的な沈殿タンパク質を含有した。

10

【0277】

ペレットは、40mlの氷冷した50mMヘペスpH7.5、150mM NaCl、0.1% N-オクチルグルコシド、10%グリセロール、1mM DTT、および $1\mu\text{M}$ DHT中に再懸濁させ、4、20,000gで15分間にわたり再遠心分離して、NaClによる非特異的な沈殿タンパク質を除去した。逆転移サイクルをさらに2回繰り返し、各ELP-AR-LBD融合タンパク質の純度を高め、最終容量を25mlに減少させた。

【0278】

グルコシルチコイド受容体リガンド結合ドメイン（GR-LBD）を含有する融合タンパク質の単離および精製

20

ELP-GR-LBD融合タンパク質を含有する大腸菌BL21 Star (DE3) 菌株の単一コロニーを、 $100\mu\text{g/ml}$ アンピシリン（Sigma社製）を補足した500mlのCircle Grow培地（カリフォルニア州、サンディエゴ、Q-BIOgene社製）に接種し、37、250rpmで振盪しながら24時間にわたり増殖させた。培養物を回収し、50mMヘペスpH7.5、150mM NaCl、1mM DTT、10%グリセロール、0.1% CHAPS、および完全EDTA非含有プロテアーゼ阻害剤ペレット1個（イリノイ州、インディアナポリス、Roche社製）中に懸濁させた。細胞は、30秒間の冷却間隔を挟み、35%出力で10秒間の破壊からなる、氷上で3分間にわたる超音波破壊により溶解させた。可溶性溶解物中のDNAおよびRNAは、 $2\mu\text{l}$ ベンゾナーゼ（Novagen社製）を添加し、4で30分間にわたりインキュベートすることによりさらに分解した。細胞破砕物は、4、20,000gで30分間にわたる遠心分離により除去した。

30

【0279】

室温での細胞溶解物にNaClを添加することにより逆相転移を誘導し、2.0Mの最終濃度を達成した後、室温、20,000gで15分間にわたり遠心分離を行った。得られたペレットは、ELP-GR-LBD融合タンパク質およびNaClによる非特異的な沈殿タンパク質を含有した。

【0280】

ペレットは、40mlの氷冷した50mMヘペスpH7.5、150mM NaCl、1mM DTT、10%グリセロール、0.1% CHAPS中に再懸濁させ、4、20,000gで15分間にわたり再遠心分離して、NaClによる非特異的な沈殿タンパク質を除去した。逆転移サイクルをさらに2回繰り返し、ELP-GR-LBD融合タンパク質の純度を高め、最終容量を10mlに減少させた。

40

【0281】

エストロゲン受容体リガンド結合ドメイン（ER-LBD）を含有する融合タンパク質の単離および精製

各ELP-ER-LBD融合タンパク質を含有する大腸菌BL21 Star (DE3) 菌株の単一コロニーを、 $100\mu\text{g/ml}$ アンピシリン（Sigma社製）、10%スクロース（Sigma社製）を補足した500mlのCircle Grow培地（カリフォルニ

50

ア州、サンディエゴ、Q-BIOgene社製)に接種し、 2.7×10^8 、 250 rpm で振盪しながら48時間にわたり増殖させた。培養物を回収し、 40 ml の 50 mM トリス-HCL pH 8.0、 150 mM KCL、 1 mM EDTA、 1 mM DTT、および完全EDTA非含有プロテアーゼ阻害剤ペレット1個(イリノイ州、インディアナポリス、Roche社製)中に懸濁させた。細胞は、30秒間の冷却間隔を挟み、35%出力で10秒間の破壊からなる、氷上で3分間にわたる超音波破壊により溶解させた。可溶性溶解物中のDNAおよびRNAは、 $2 \mu\text{l}$ ベンゾナーゼ(Novagen社製)を添加し、 4°C で30分間にわたりインキュベートすることによりさらに分解した。細胞破砕物は、 4°C 、 $20,000 \text{ g}$ で30分間にわたる遠心分離により除去した。

【0282】

室温での細胞溶解物にNaClを添加することにより逆相転移を誘導し、 1.5 M の最終濃度を達成した後、室温、 $20,000 \text{ g}$ で15分間にわたり遠心分離を行った。得られたペレットは、各ELP-ER-LBD融合タンパク質およびNaClによる非特異的な沈殿タンパク質を含有した。

【0283】

ペレットは、 40 ml の氷冷した 50 mM トリス-HCL pH 8.0、 150 mM KCL、 1 mM EDTA、 1 mM DTT中に再懸濁させ、 4°C 、 $20,000 \text{ g}$ で15分間にわたり再遠心分離して、NaClによる非特異的な沈殿タンパク質を除去した。逆転移サイクルをさらに2回繰り返し、各ELP-ER-LBD融合タンパク質の純度を高め、最終容量を 10 ml に減少させた。

【0284】

Gタンパク質アルファQ($G_{\alpha q}$)を含有する融合タンパク質の単離および精製

各ELP- $G_{\alpha q}$ 融合タンパク質を含有する大腸菌BL21 Star(DE3)菌株の単一コロニーを、 $100 \mu\text{g/ml}$ アンピシリン(Sigma社製)および $1 \mu\text{M}$ GDPを補足した 500 ml のCircle Grow培地(カリフォルニア州、サンディエゴ、Q-BIOgene社製)に接種し、 3.7×10^8 、 250 rpm で振盪しながら24時間にわたり増殖させた。培養物を回収し、 40 ml の 50 mM ヘペスpH 7.5、 150 mM NaCl、 1.0% CHAPS、 10% グリセロール、 1 mM DTT、 $10 \mu\text{M}$ GDP、および完全EDTA非含有プロテアーゼ阻害剤ペレット1個(イリノイ州、インディアナポリス、Roche社製)中に懸濁させた。細胞は、30秒間の冷却間隔を挟み、35%出力で10秒間の破壊からなる、氷上で3分間にわたる超音波破壊により溶解させた。可溶性溶解物中のDNAおよびRNAは、 $2 \mu\text{l}$ ベンゾナーゼ(Novagen社製)を添加し、 4°C で30分間にわたりインキュベートすることによりさらに分解した。細胞破砕物は、 4°C 、 $20,000 \text{ g}$ で30分間にわたる遠心分離により除去した。

【0285】

室温での細胞溶解物にNaClを添加することにより逆相転移を誘導し、 2.0 M の最終濃度を達成した後、室温、 $20,000 \text{ g}$ で15分間にわたり遠心分離を行った。得られたペレットは、各ELP- $G_{\alpha q}$ 融合タンパク質およびNaClによる非特異的な沈殿タンパク質を含有した。

【0286】

ペレットは、 30 ml の氷冷した 50 mM ヘペスpH 7.5、 150 mM NaCl、 1.0% CHAPS、 10% グリセロール、 1 mM DTT、 $10 \mu\text{M}$ GDP中に再懸濁させ、 4°C 、 $20,000 \text{ g}$ で15分間にわたり再遠心分離して、NaClによる非特異的な沈殿タンパク質を除去した。逆転移サイクルをさらに2回繰り返し、各ELP- $G_{\alpha q}$ 融合タンパク質の純度を高め、最終容量を 5 ml に減少させた。

【0287】

1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸レダクトイソメラーゼ(DXR)を含有する融合タンパク質の単離および精製

各ELP-DXR融合タンパク質を含有する大腸菌BL21 Star(DE3)菌株の単一コロニーを、 $100 \mu\text{g/ml}$ アンピシリン(Sigma社製)、 1 mM MnCl_2

10

20

30

40

50

(VWR社製)を補足した500mlのCircle Grow培地(カリフォルニア州、サンディエゴ、Q-BIOgene社製)に接種し、37℃、250rpmで振盪しながら24時間にわたり増殖させた。培養物を回収し、40mlの0.1MトリスpH7.6、1mM DTT、および完全EDTA非含有プロテアーゼ阻害剤ペレット1個(イリノイ州、インディアナポリス、Roche社製)中に懸濁させた。細胞は、30秒間の冷却間隔を挟み、35%出力で10秒間の破壊からなる、氷上で3分間にわたる超音波破壊により溶解させた。可溶性溶解物中のDNAおよびRNAは、2μlベンゾナーゼ(Novagen社製)を添加し、4℃で30分間にわたりインキュベートすることによりさらに分解した。細胞破砕物は、4℃、20,000gで30分間にわたる遠心分離により除去した。

【0288】

室温での細胞溶解物にNaClを添加することにより逆相転移を誘導し、2.0Mの最終濃度を達成した後、室温、20,000gで15分間にわたり遠心分離を行った。得られたペレットは、各ELP-DXR融合タンパク質およびNaClによる非特異的な沈殿タンパク質を含有した。

【0289】

ペレットは、20mlの氷冷した0.1MトリスpH7.6、1mM DTT中に再懸濁させ、4℃、20,000gで15分間にわたり遠心分離して、NaClによる非特異的な沈殿タンパク質を除去した。逆転移サイクルをさらに2回繰り返し、各ELP-DXR融合タンパク質の純度を高め、最終容量を5mlに減少させた。

【0290】

Gタンパク質アルファS(G_αS)を含有する融合タンパク質の単離および精製

ELP-G_αS融合タンパク質を含有する大腸菌BL21 Star(DE3)菌株の単一コロニーを、100μg/mlアンピシリン(Sigma社製)を補足した500mlのCircle Grow培地(カリフォルニア州、サンディエゴ、Q-BIOgene社製)に接種し、37℃、250rpmで振盪しながら24時間にわたり増殖させた。培養物を回収し、40mlのPBS、10%グリセロール、1mM DTT、および完全EDTA非含有プロテアーゼ阻害剤ペレット1個(イリノイ州、インディアナポリス、Roche社製)中に懸濁させた。細胞は、30秒間の冷却間隔を挟み、35%出力で10秒間の破壊からなる、氷上で3分間にわたる超音波破壊により溶解させた。可溶性溶解物中のDNAおよびRNAは、2μlベンゾナーゼ(Novagen社製)を添加し、4℃で30分間にわたりインキュベートすることによりさらに分解した。細胞破砕物は、4℃、20,000gで30分間にわたる遠心分離により除去した。

【0291】

室温での細胞溶解物にNaClを添加することにより逆相転移を誘導し、1.5Mの最終濃度を達成した後、室温、20,000gで15分間にわたり遠心分離を行った。得られたペレットは、ELP-G_αS融合タンパク質およびNaClによる非特異的な沈殿タンパク質を含有した。

【0292】

ペレットは、10mlの氷冷したPBS、10%グリセロール、1mM DTT中に再懸濁させ、4℃、20,000gで15分間にわたり遠心分離して、NaClによる非特異的な沈殿タンパク質を除去した。逆転移サイクルをさらに2回繰り返し、ELP-G_αS融合タンパク質の純度を高め、最終容量を1mlに減少させた。

(実施例6)

【0293】

クロマトグラフィー法によらない10個のタンパク質の産生

前出の実施例1に記載のdelta Phase(商標)系法により、10個のタンパク質の発現および精製を試験することに成功した。表2、および、3つのタンパク質について図3のSDS-PAGE図に示した結果は、多様なタンパク質が、>95%の純度まで精製できることを明確に示す。ELP1[V₅A₂G₃-90]との融合タンパク質および固定化金属アフィニティ-クロマトグラフィー(IMAC)法による精製用タグとの融

10

20

30

40

50

合タンパク質として発現した、青色蛍光タンパク質 (B F P)、チオレドキシン (T r x)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T)、カルモジュリン (C a l M)、およびアンジオスタチン (K 1 - 3) を完全に特徴づけることにより、E L P 融合タンパク質の発現および精製に対する体系的な評価を行った。発現は、大腸菌内で行った。E L P 融合タンパク質の精製に対して得られた収量を、表 2 で一覧にする。

【 0 2 9 4 】

【表 2】

表2:deltaPhase(商標)のタンパク質精製への適用

標的タンパク質	MW (kDa) ^a	収量(mg/L) ^b	ELP-タンパク質融合体活性の確認
アンジオスタチン(K1-3)	30.7	27	あり
青色蛍光タンパク質(BFP)	26.9	100	あり
カルモジュリン(CalM)	16.7	75*	あり
クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)	25.7	80	あり
緑色蛍光タンパク質(GFP)	26.9	78	あり
インターロイキン 1 受容体拮抗物質 (IL 1rRa)	17.0	8	あり
ルシフェラーゼ	60.8	10	ND**
組織トランスグルタミナーゼ(tTg)	77.0	36	あり
テンダミスタット	7.9	22	あり
チオレドキシン(Trx)	11.7	50	あり

表 2:deltaPhase(商標)システムにより合成された ELP1 融合タンパク質配列。
^a タンパク質の平均分子量を示す。^b 精製収量は、ELP 融合体に由来する標的タンパク質の最高収量を示す。 **ND=未判定。

10

20

【 0 2 9 5 】

図 3 は、B F P、C A T、および K 1 - 3 の I T C による精製に対する S D S - P A G E ゲルを示す。図は、可溶性の大腸菌溶解物 (L)、融合タンパク質の T_t より高温での遠心分離後における上清 (S)、および精製タンパク質 (S) を含む。第 2 のゲルは、T r x (A)、B F P (B)、C A T (C)、K 1 - 3 (D)、G F P (E) の精製 E L P [V₅A₂G₃-90] 融合体を示す。

30

(実施例 7)

【 0 2 9 6 】

医薬的に有意義な 10 ペプチドの産生

前出の実施例 1 に記載の d e l t a P h a s e (商 標) 系を用いて、サイズが 2 . 0 ~ 6 . 2 k D a の範囲にあり、等電点が 4 . 1 1 ~ 1 2 . 3 の範囲にある、医薬的に有意義な 10 ペプチドを発現させ精製した。以下の表 3 に示す通り、多数の発現条件および精製条件を変化させる広範な作業の後、90%を超える純度およびリットル当たり 17 ~ 23 mg の収量を有する 6 つのペプチドを、発現させ精製することに成功した。

40

【 0 2 9 7 】

【表 3】

表3

ペプチド	産生された融合体の量 Mg/L	産生されたペプチドの量 Mg/L	純度
モルヒネ調節神経ペプチド (MMN)	224	17	99%
神経ペプチド Y(NPY)	222	20	98%
オレキシン B	320	19	91%
レプチン	415	19	97%
ACTH	133	19	99%
カルシトニン	260	23	98%

10

【0298】

産生された融合タンパク質は、ELP4-60-MMN、ELP4-60-NPY、ELP4-60-オレキシンB、ELP4-60-レプチン、ELP4-60-ACTH、ELP4-60-GH、およびELP1-90-カルシトニンを含んだ。

【0299】

4つのペプチドは、大量に産生するのがより困難であると分かった。これは、サイズ、溶解性、タンパク質溶解の傾向を含むペプチドの多様な性質を踏まえれば、驚くべきことではない。困難なペプチドによる融合タンパク質である、ELP-アドレノメデュリン(AM)、ELP-副甲状腺ホルモン(PTH)、ELP-デフェンシン、およびELP-成長ホルモンを産生することに成功した。しかし、対象ペプチドからのELPの切断後において、タバコエッチウイルス(TEV)による切断系が不十分であるか、またはペプチドが不溶性であった。ELP-成長ホルモンの切断は、部分的に達成されただけであり、ELP-AM、ELP-PTH、およびELP-デフェンシンの切断後にはペプチドが残らなかった。これらの結果は、医薬的に有意義なペプチドのクロマトグラフィー法によらない精製に対して、ELP系が有する柔軟性および広範な適用を実証する。

20

(実施例8)

30

【0300】

融合タンパク質の活性

融合ペプチドによる治療用タンパク質は、以下の4つのタンパク質：青色蛍光タンパク質(BFP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、チオレドキシリン(Trx)、およびインターロイキン1受容体拮抗物質(IL-1Ra)を用いて産生した。各組成物は、ELP1[V₅A₂G₃-90]を用いて、ELP/タンパク質およびタンパク質/ELPの両方の配向で産生された。

【0301】

8つの融合構築物のリンカー：

CAT/ELP CAT-VENLYFQGGMG(配列番号59)-ELP
 ELP/CAT ELP-VPGWPSSGDYDIPTTENLYFQGAH
 (配列番号60)-CAT
 Trx/ELP Trx-GSGSGHMHSHHSHSSGLVPRGSGK
 (配列番号61)-ELP
 ELP/Trx ELP-VPGWPSSGDYDIPTTENLYFQGAH
 (配列番号62)-Trx
 BFP/ELP BFP-VDKLAALDMHSHHSHSSGLVPRG
 SGK(配列番号63)-ELP
 ELP/BFP ELP-VPGWPSSGDYDIPTTENLYFQGAH
 (配列番号64)-BFP

40

50

IL - 1 R a / E L P I L - 1 R a - L E N L Y F Q G G M G (配列番号 6 5) - E L P

E L P / I L - 1 R a E L P - V P G W P S S G D Y D I P T T E N L Y F Q G A H (配列番号 6 6) - I L - 1 R a

【 0 3 0 2 】

8つのタンパク質融合構築物すべてをBLR (DE3)細胞内に形質転換し、50 mL TB培地においてトリプテートで増殖させ、ITCにより精製した。ITCの1ラウンド中において、NaClを添加することにより相転移を誘導して T_t を低下させ、遠心分離により大型のミクロンサイズの凝集物を回収する。低イオン強度の緩衝液中にペレットを再懸濁させた後、低温でのスピンによりELP融合タンパク質ペレット中に捕獲された不溶性混入物質を除去する。各融合構築物は、3~5回ずつ相転移を繰り返し通過し、純タンパク質を得た。

10

【 0 3 0 3 】

すべての構築物について、タンパク質/ELP融合体の収量は、ELP/タンパク質構築物の収量よりも高量であったが、2つの配向による収量間の比率は、標的タンパク質のサイズに依存する(表4)。ELP/タンパク質配向において、小型タンパク質であるTrxおよびIL-1Raについて得られる収量は、大型タンパク質であるCATおよびBFPの収量よりも著明に高量である。

【 0 3 0 4 】

【表4】

20

表4:8つの融合タンパク質の収量、比活性、および転移温度

融合タンパク質	収量* (mg/培養液L)	比活性**	T_1 (°C)***
BFP/ELP	79 ± 15	1704 ± 293	62.9 ± 0.3 67.9 ± 0.5
ELP/BFP	0.5 ± 0.06	1620 ± 111	62.4 ± 0.5
CAT/ELP	39 ± 7	8058 ± 1437	46.1 ± 0.3
ELP/CAT	2.2 ± 2.1	2984 ± 1783	47.1 ± 0.2
Trx/ELP	87 ± 4	116.6 ± 9.9	67.3 ± 0.4
ELP/Trx	27 ± 9	68.6 ± 18.0	72.9 ± 0.4
IL-1Ra/ELP	15.8 ± 4.8	2.0 ± 0.4	53.1 ± 0.4
ELP/IL-1Ra	8.2 ± 1.3	0.5 ± 0.2	55.9 ± 0.6

30

*収量は、50mLの培養液から1Lに外挿した。

**Trx および CAT の場合、比活性は U/mg 単位で測定し、1 単位は 1 分間あたりに 1n モルの基質の変換に対応する。BFP の比活性は、タンパク質 mg 当たりの蛍光発光により得られる積分面積(A.U./μg)として記録し、IL-1Ra の活性は、μg/mL 単位の EC50 値として測定する。

***すべての融合タンパク質濃度は2μMであり、発現はPBS緩衝液中で行った。

40

【 0 3 0 5 】

Trx/ELPおよびBFP/ELPについては、非融合の遊離標的タンパク質と比較した活性の著明な変化が観察されていない(Trabicc-Carlson K, et al. Protein Eng. Des. Sel. 2004, 17:57-66; Meyer DE, Chilkoti A, Nat. Biotechnol. 1999, 17:1112-1115)のに対し、CAT/ELPは、遊離CATと比較して約15%のわずかな活性の低下を示す。既に、IL-1Ra/ELP活性が、遊離IL-1Raと比較して100倍を超えて低下することが判明しており、これが、これらのELP融合タンパク質について観察された最大の差である(Shamji, Setton et al., 報道記事に収載)。

【 0 3 0 6 】

2つの融合構築物におけるTrx活性は、Holmgrenにより記載されたインスリ

50

ン還元アッセイ (11. Holmgren A., J. Biol. Chem. 1979, 254:9627-9632; Holmgren A., Bjornstedt M., Methods Enzymol. 1984, 107:295-300) により測定した。実質的な酵素反応において、インスリン中のジスルフィド結合が還元される一方、NADPHはNADP⁺に酸化され、これは、340nmにおける分光光度法により追跡される。各実験において、初期速度は25で測定し、比活性に換算した。3つの精製バッチの各々に対し、3回ずつアッセイを実施した。2つの融合構築物のU/融合タンパク質mg単位による比活性を、表4に示す (Trxアッセイにおける1Uは、1分間当たり1nモルの基質の変換である)。2つのTrx構築物の間で比活性の差が観察されており、ELP/Trxの比活性は、Trx/ELP活性の約60%にまで低下している。

【0307】

2つの異なる配向においてELPに融合したCATの活性を、基質である1-デオキシクロラムフェニコールの酵素的なアセチル化により決定した。活性は、3回の精製の各々について、トリプリケートで測定した。残存する基質および形成された産物は、薄層クロマトグラフィーにより分離した後で、両者の蛍光強度を測定した。2つのCAT構築物の比活性は、U/mg単位で表4に記録する (1Uは、1分間当たり1nモルの基質の変換である)。ここで、ELP/CAT構築物の比活性が、CAT/ELPと比較して低下していることがわかる。著明な低下が観察され、ELP/CAT融合タンパク質においては、約37%の活性が残存するに過ぎない (表4)。

【0308】

IL-1Raは、インターロイキン1受容体をめぐりインターロイキン1 (IL-1) と競合し、該拮抗物質の効力は、活性IL-1Raが細胞の増殖を阻害する細胞増殖アッセイにより測定される。ELP融合体の形態または非融合の市販拮抗物質の形態におけるIL-1Raの存在および不在下で、72時間にわたり、ヒト末梢血白血球RPMI1788を増殖させた。増殖は、Cell Titer Gloアッセイにより測定した。2つの融合構築物の活性を、表4で一覧にする。CATおよびTrxと同様に、IL-1Raもまた、ELP/タンパク質配向において活性の低下を示し、IL-1Ra/ELPは、ELP/IL-1Raよりも4倍強力である。非融合IL-1Raと比較して、遊離IL-1Raは、IL-1Ra/ELPよりも約300倍高活性である (IL-1RaのEC50は、1.6ng/ml)。

【0309】

BFPは、生物活性タンパク質ではなく、近紫外領域において発光する。蛍光発光は、タンパク質の3次構造変化について高感度の測定法であり、ここでは、2つのBFP融合構築物間における構造的差異を評価するのに用いる。各BFP構築物の蛍光スペクトルは、385nmでの励起後における430~600nmから採集されている。曲線を統合し、曲線下面積をタンパク質量で規格化した。結果を表4で一覧にする。蛍光測定についてBFP/ELPと同じ範囲において濃度を得るために、これらの実験で用いられたELP/BFPは、2種類の1L培養液から増殖させた。タンパク質量による規格化の後、2つのBFP構築物間には蛍光の著明な差が観察されない。

【0310】

融合タンパク質の転移温度 (T_t) は、アクセス可能な表面積の疎水性/親水性比率に対して高感度である。ELP/タンパク質構築物は、BFP構築物を除いて逆配向の融合体ほど活性でなく、この活性の低下が主要な構造的な変化のためであるとすれば、転移温度が変化するであろう。各構築物の光学濃度の変化が、350nmでの15~90において追跡され、 T_t は、転移の中間点として導かれた (図4および表4)。各融合タンパク質の濃度は2 μ Mであり、これは、一部のELP/タンパク質構築物の極めて低い収量のために選択された。図4は、PBS緩衝液における、A.Trx/ELP (黒丸)、ELP/Trx (白丸)、IL-1Ra/ELP (黒逆三角)、およびELP/IL-1Ra (白逆三角)、ならびに、B.BFP/ELP (黒四角)、ELP/BFP (白四角)、CAT/ELP (黒三角)、ELP/CAT (白三角) の各2 μ M融合構築物について、温度の関数としての濁度の上昇を示す。 T_t は、各転移曲線の中間点として計算し、表

10

20

30

40

50

4 に示す。

【0311】

ELP / Trx および ELP / IL - 1 Ra の転移温度は、そのタンパク質 / ELP 対応物よりも転移温度が高い。Trx 構築物および IL - 1 Ra 構築物が、それぞれ 5 . 6 および 2 . 8 ずつ異なるのに対し、2 つの CAT 構築物の間の差は、ほとんど無視できる (図 4 A および B、表 4)。ELP / BFP が、1 種類の転移を示し、62 . 4 において大型の凝集物を形成するのに対し、BFP / ELP 構築物は、全く異なるパターンを示す。この融合タンパク質は、ELP / BFP とほぼ同じ温度で凝集物を形成し始めるが、温度が上昇するにつれ凝集物は分解され、代わって、BFP / ELP 構築物はミセル様の構造を形成する。ミセル様構造形成の転移温度もまた、曲線の間中点として記録され、BFP / ELP の第 2 の転移温度として表 4 に示される。

10

【0312】

NaCl を添加することにより誘導した凝集相を繰り返し通過した後で遠心分離工程を行い、最後に得られたペレットを緩衝液中に再懸濁させる、逆転移サイクリングにより 8 つの構築物すべてを精製した。精製過程後の ELP / タンパク質融合体の最終収量は、それら各々のタンパク質 / ELP 構築物と比較して低い、より小型の標的タンパク質は、比較的高収量を有する。低収量は、精製時における多量の消失によるのではなく、翻訳時における標的タンパク質のミスフォールディングによる可能性が極めて高い、ELP / タンパク質の発現レベルの低下の結果である。精製 ELP / タンパク質は、標的タンパク質のネイティブな折り畳みとやや異なる形で折り畳まれると推定され、BFP を除いて、い

20

(実施例 9)

【0313】

ELP 1 の半減期

ELP 1 の薬物動態は、脚部 / 脇腹に FaDu 異種移植を有するヌードマウス (Balb / c nu / nu) に [¹⁴C] ELP 1 を静脈内投与し、投与後の各時間経過後に血液試料を採取することにより決定した。血液濃度の経時推移および血漿半減期 (初期 $t_{1/2}$ および終末 $t_{1/2}$) を図 5 に示す。血中薬物動態は、高分子に対する特徴的な分布および排出応答を示し、これは、二重指数関数過程により十分に記載された。

30

【0314】

図 5 における血漿濃度の経時推移曲線は、排出応答および分布応答 (図 5 に実線で示す) を共に近似する 2 区画モデル (2 compartment model) の解析解に適合し、関連する薬物動態パラメータを表 5 に示す。ELP の分布容積 (1 . 338 μ l) が、仮説的な血漿容積である 1 . 363 μ l とほぼ同一であった (Barbee, R.W., et al., Am. J. Physiol. 263(3)(1992) R728-R733) ことは、ELP が、投与直後に特定の器官および組織へと急速に分布または結合しなかったことを示す。AUC は、中枢区画または血漿中における ELP への累積的な曝露の測定量である。体内クリアランスは、体内における ELP 排出の、その血漿濃度と比較した比率として定義され、腎臓、肝臓などを含むすべての器官を通してのクリアランスの総和である。長い終末半減期 ($t_{1/2} = 8 . 37$ 時間) および低い分布容積 (すなわち、血漿容積とほぼ等しい) など、これらの薬物動態パラメータは、充実性腫瘍および潜在的には他の疾患部位への治療剤の送達に好適であると考えられる。これは、こうした値が、他の奏効する薬剤担体に見られる場合 (R. Duncan, Nat. Rev. Drug. Discov. 2(5)(2003) 347-360) と同様の形で EPR 効果を利用するのに適する特性を ELP が有することを示すからである。

40

【0315】

【表5】

表5:[¹⁴C]ELP1について計算した薬物動態パラメータ

	k_1 (時間 ⁻¹)	k_2 (時間 ⁻¹)	k_e (時間 ⁻¹)	V_d (μ L)	AUC (ELP mg 時間/mL)	Cl_B (μ L/時間)
ELP1-150	3.54	1.99	0.24	1,338	7.1	317

【0316】

10

物質移動速度定数は、標準的な2区画モデルに由来する(k_1 、中枢区画から抹消区画へ； k_2 、抹消区画から中枢区画へ；および k_e 、中枢区画からの排出)。分布容積(V_d)、中枢区画濃度の経時推移曲線下面積(AUC)、および体内クリアランス(Cl_B)を示す。データは、平均値($n=5$ 、 V_d を除き、初期血漿濃度(C_0)は、 $n=3$ を有する類似のコホートから計算した)として示す。

(実施例10)

【0317】

ヌードマウスにおけるELPの血中分布

¹⁴Cで標識したELP1-150および/または¹⁴Cで標識したELP2-160

Fadu腫瘍を有するヌードマウスに、¹⁴Cで標識したELP1-150および/または¹⁴Cで標識したELP2-160を投与した(平均 \pm SD、 $n=6$)。腫瘍は、ELPの投与後に41.5の水浴中で加熱した。図6に見られる通り、分布は、最高血液含量器官である、肝臓、腎臓、脾臓、および肺において最高である。

20

【0318】

¹⁴Cで標識したELP2-[V₁A₈G₇-160]

15 μ Mの血漿濃度で、ヌードマウスに¹⁴Cで標識したELP2-[V₁A₈G₇-160]($T_t > 60$)を投与した。ELP濃度は、ヌードマウスの右後脚に位置する、植え込んだFadu腫瘍の1時間の加熱(41)後に決定した。データは、平均に95%信頼区間を加えて示す($N=6$)。

【0319】

30

結果は、組織型に対する組織グラム(g)当たりの注入用量(ID)百分率グラフの形で、図7に示す。ELP濃度は、¹⁴Cで標識したELP2-[V₁A₈G₇-160]の全身投与後1.5時間において測定した。最高の分布は、最高血液含量器官である、肝臓、腎臓、脾臓、および肺において見られる。

【0320】

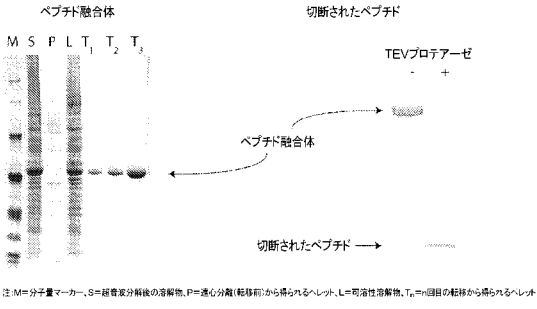
本明細書では、本発明の特定の態様、特徴、および例示的实施形態について本発明を記載してきたが、本発明の利用性は、このように限定されるのではなく、むしろ、本発明分野における当業者に示唆される通り、本明細書の開示に基づく他の多数の変更、改変、および代替的实施形態に拡張され、これらを包括することを理解されたい。

【0321】

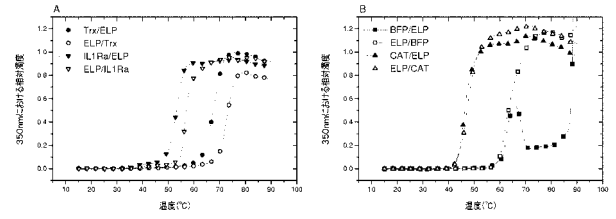
40

これに対応して、以下に特許請求の範囲が主張される本発明は、その意図および範囲内にあるすべてのこうした変更、改変、および代替的实施形態を含むものとして、広く理解および解釈されることを意図する。

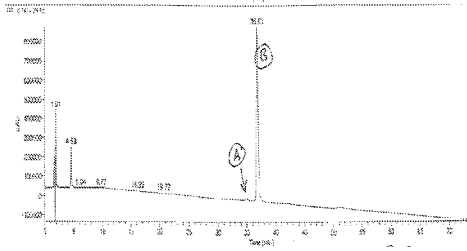
【 図 1 】



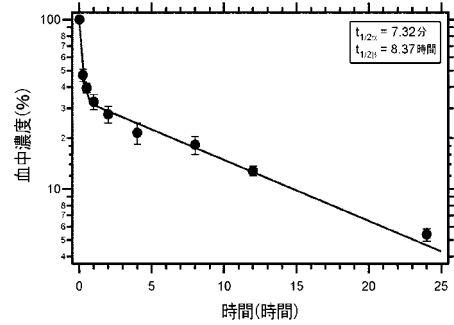
【 図 4 】



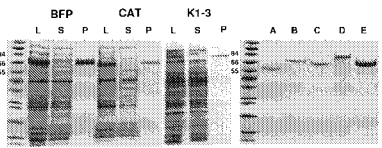
【 図 2 】



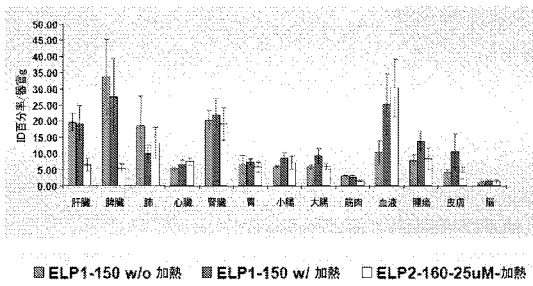
【 図 5 】



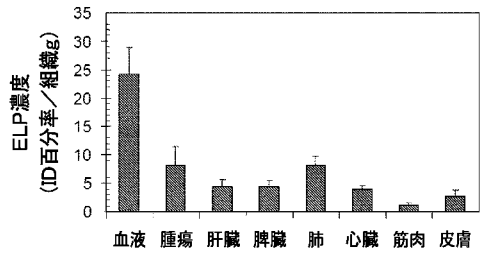
【 図 3 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【配列表】

2010502734000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成21年7月1日(2009.7.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

融合タンパク質および医薬的に許容される担体を含む治療用組成物であって、前記融合タンパク質は、治療用タンパク質および少なくとも1つのエラスチン様タンパク質(ELP)成分を含み、前記融合タンパク質は、血中で可溶性であり、前記治療用タンパク質は、その非融合対応物と比較して血液循環において延長された半減期を有する、治療用組成物。

【請求項2】

前記治療用タンパク質が、ペプチドホルモン、酵素補充療法に好適な酵素、凝固因子、またはモノクローナル抗体である、請求項1に記載の治療用組成物。

【請求項3】

前記治療用タンパク質が、GLP-1またはVIIa因子である、請求項2に記載の治療用組成物。

【請求項4】

前記ELP成分が、配列番号1~12で定義される1つ以上のペプチド繰り返し単位から構成される、請求項1~3のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項5】

前記ELP成分が、VPGXG、IPGXG、および/またはLPGXGの繰り返し(ここで、Xは、遺伝子によりコードされるアミノ酸である)を含む、請求項4のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項6】

前記ELP成分が、VPGXGの繰り返し(ここで、各Xは、V、A、およびGから独立して選択されるか、あるいはK、V、およびFから独立して選択される)を含む、請求項5に記載の治療用組成物。

【請求項7】

Xが、約V₅、A₂、およびG₃の割合のV、A、およびGである、請求項6に記載の治療用組成物。

【請求項8】

Xが、約K₁、V₂、およびF₁の割合のK、V、およびFである、請求項6に記載の治療用組成物。

【請求項9】

各Xが、Vである、請求項6に記載の治療用組成物。

【請求項10】

前記ELP成分が、少なくとも90の繰り返し単位を含む、請求項1~9のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項11】

ELP成分をC末端に含む、請求項1~10のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項12】

ELP成分をN末端に含む、請求項1~10のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項13】

ELP成分をN末端およびC末端に含む、請求項1~10のいずれか一項に記載の治療

用組成物。

【請求項 1 4】

前記治療用タンパク質と前記 E L P 成分との間にスペーサーをさらに含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 1 5】

前記組成物が非経口投与用に製剤化される、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 1 6】

前記組成物が皮下投与、筋内投与、静脈内投与用に製剤化される、請求項 1 5 に記載の治療用組成物。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の治療用組成物をヒトを除く対象に投与することを含む、前記対象を治療する方法。

【請求項 1 8】

対象を治療するための薬剤の製造における請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の治療用組成物の使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/77767
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C12P 21/06(2006.01);A61K 38/00(2006.01);C07K 14/00(2006.01) USPC: 435/69.1;530/300,350;514/12,17 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/69.1; 530/300,350; 514/12,17 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPTO Internal (EAST); DialogOne (Biosci, Medicine, Medline, Caplus)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,852,834 B2 (CHILKOTT) 08 February 2005 (08.02.2005), see Figure 4a and column 18, lines 46-50 and Example 6, especially 6.8.5 and Col. 9, lines 35-36.	1,2,4, 5,12,13,21
X	MEYER et al. Purification of Recombinant Proteins by Fusion with Thermally-Responsive Polypeptides. Nature Biotechnology, 1999, Vol. 17, pp. 1112-1115.	1-8,21 ----- 9-13,22

Y	MEYER et al. Protein Purification by Fusion with an Environmentally Responsive Elastin-Like Polypeptide: Effect of Polypeptide Length on the Purification of Thioredoxin. Biotechnology Progress, 2001, Vol. 17, pp. 720-728.	1,2,4-6,12,13,21 ----- 3,7-11,22
X	CHOW et al. Ultra-High Expression of a Thermally Responsive Recombinant Fusion Protein in E. coli. Biotechnology Progress, 2006, Vol. 22, pp.638-646.	1, 2, 4, 5-8, 11 and 21

Y	WO 2006/110292 A2 (Univ. of Calif.) 19 October 2006 (19.10.2006), see entire document.	1-13, 21 and 22
A		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 25 July 2008 (25.07.2008)		Date of mailing of the international search report 11 AUG 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer SUZANNE M. NOAKES Telephone No. 571-272-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/77767

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-13,21 and 22
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
	<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/7767

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2003/041393 A1 (IPK) 22 May 2003 (22.05.2003), Abstract	1-13, 21 and 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/7767

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-13, 21 and 22, drawn to a therapeutic composition comprising a fusion protein which includes at least one elastin-like peptide (ELP) coupled with at least one peptide active therapeutic agent.

Group II, claim(s) 14-16, drawn to a fusion gene therapeutic composition including a nucleotide sequence encoding a fusion protein which includes at least one elastin-like peptide (ELP) coupled with at least one peptide active therapeutic agent.

Group III, claim(s) 17-19, drawn to a method of enhancing *in vivo* the efficacy of a peptide active therapeutic agent by coupling the said agent with at least one elastin-like peptide.

Group IV, claim(s) 20, drawn to a method of treating a subject in need of a peptide active therapeutic agent by administering a therapeutic composition comprising a peptide active therapeutic agent coupled to at least one ELP *or* a composition comprising a nucleotide sequence encoding a peptide active therapeutic agent coupled to at least one ELP.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Chilkoti (US 6,852,834 B2) teaches the gene construction, expression and purification of therapeutically competent compositions of fusion proteins which possess elastin-like peptides coupled to either thioredoxin or tendamistat (see column 15, Example 6, lines 52-62). It is noted that the instant specification states that "In one embodiment of the invention, the peptide active therapeutic agent is thioredoxin." (see instant specification, p. 12, paragraph 0070); And, "In another embodiment, the peptide active agent is tendamistat." (see instant specification, p.12, paragraph 0071). The fusion proteins were purified using metal-affinity chromatography or inverse transition cycling wherein the purified proteins were highly purified (e.g. absent any detectable contaminants when assessed on SDS-Page gels - see Figure 4a and column 18, lines 46-50). Thus, since the protein was purified in PBS buffers (which are therapeutically competent buffers)— (see Example 6.8.5, column 24), the highly purified ELP-thioredoxin and ELP-tendamistat proteins are considered to be in a therapeutic composition and meet the limitations minimally of claim 1.

Therefore, the technical feature linking the inventions of Groups I-IV does not constitute a special technical feature as defined by PCT Rule 13.2, as it does not differentiate the claimed subject matter as a whole over the prior art. Since according to PCT Rule 13.2 the presence of such a common or corresponding special technical feature is an absolute prerequisite for unity to be established, and given that there does not appear to be any other technical feature common to the claimed subject matter as a whole which might be able to fulfill this role, the currently claimed subject matter lacks unity of invention according to PCT Rule 13.1.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/48	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 1
A 6 1 K 47/42	(2006.01)	A 6 1 K	47/48	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	A 6 1 K	47/42	
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
		C 0 7 K	19/00	

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

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA01 BA07 BA21 BA41 BA63 CA02 DA06 EA04 GA11
 HA01
 4C076 AA95 BB13 BB15 BB16 CC29 CC41 EE41 EE59 FF31
 4C084 AA01 AA02 AA03 BA41 BA44 DB01 DB33 DC01 DC10 DC14
 MA05 MA66 NA12 ZB211
 4C085 AA14 AA21 EE01 GG02 GG03 GG04
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 DA01 DA30 DA50 DA65 DA89
 EA20 FA74