

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4958975号
(P4958975)

(45) 発行日 平成24年6月20日 (2012.6.20)

(24) 登録日 平成24年3月30日 (2012.3.30)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02 C
C 1 2 P	21/06 (2006.01)	C 1 2 P	21/06
C O 7 K	19/00 (2006.01)	C O 7 K	19/00
C O 7 K	14/62 (2006.01)	C O 7 K	14/62

請求項の数 7 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2009-525970 (P2009-525970)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成19年8月29日 (2007.8.29)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2010-501606 (P2010-501606A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成22年1月21日 (2010.1.21)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/007539		T
(87) 国際公開番号	W02008/025527		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成20年3月6日 (2008.3.6)		グレンツァーヘルストラツセ124
審査請求日	平成21年3月25日 (2009.3.25)	(74) 代理人	100078662
(31) 優先権主張番号	06018171.6		弁理士 津国 肇
(32) 優先日	平成18年8月31日 (2006.8.31)	(74) 代理人	100113653
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 東田 幸四郎
		(74) 代理人	100116919
			弁理士 齋藤 房幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリン様増殖因子 I の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) プロペプチドの C 末端にその N 末端で結合した IGF-I を含む融合タンパク質をコードする核酸を含有する発現ベクターを含む原核宿主細胞を培養すること、

b) それによって、該プロペプチドが、アミノ酸 - Y - Pro でその C 末端が終止し、ここで、Y が、Pro、Pro-Ala、Pro-Gly、Pro-Thr、Ala-Pro、Gly-Pro、Thr-Pro、Arg-Pro、または Pro-Arg-Pro からなる群より選択され、該 IGF-I の最初の 2 個のアミノ酸が Gly-Pro であり、これにより該融合タンパク質の IgA プロテアーゼ切断部位はアミノ酸共通配列 Y-Pro.!.Gly-Pro(.!.:切断位置) を有する、

c) 該融合タンパク質を回収し、そして該融合タンパク質を IgA プロテアーゼで切断すること、および

d) 該 IGF-I を回収すること
を特徴とする、IGF-I の製造方法。

【請求項 2】

前記 IGF-I が、IGF-I (配列番号 1)、C 末端切断型 IGF-I (3~6 個のアミノ酸)、R36A、R37A からなる群より選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

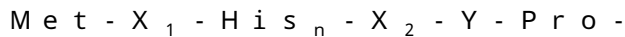
【請求項 3】

前記 IGF-I が、IgG 由来のヒト Fc にその C 末端で結合することを特徴とする、

請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記プロペプチドが、式：



によって示され、式中、

Met が、メチオニンを示し、

X₁ が、結合、セリンまたはアスパラギンであり、

His が、ヒスチジンであり、

n が、0 ~ 6 の数であり、

X₂ が、ペプチド配列番号 6 ~ 10 からなる群より選択されるリンカーペプチドであり、

Pro が、プロリンであり、および

Y が、Pro、Pro-Ala、Pro-Gly、Pro-Thr、Ala-Pro、Gly-Pro、Thr-Pro、Arg-Pro、または Pro-Arg-Pro からなる群より選択され、該 IGF-I の最初の 2 個のアミノ酸が Gly-Pro であり、これにより該融合タンパク質の I g A プロテアーゼ切断部位はアミノ酸共通配列 Y-Pro-! . Gly-Pro (. ! . : 切断位置) を有する

ことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

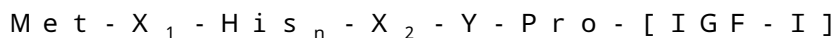
プロペプチドの C 末端に結合した IGF-I を含む融合タンパク質であって、プロペプチドが、アミノ酸 - Y-Pro でその C 末端が終止し、ここで、Y が、Pro、Pro-Ala、Pro-Gly、Pro-Thr、Ala-Pro、Gly-Pro、Thr-Pro、Arg-Pro、または Pro-Arg-Pro からなる群より選択され、該 IGF-I の最初の 2 個のアミノ酸が Gly-Pro であり、これにより該融合タンパク質の I g A プロテアーゼ切断部位はアミノ酸共通配列 Y-Pro-! . Gly-Pro (. ! . : 切断位置) を有することを特徴とする、融合タンパク質。

【請求項 6】

前記プロペプチドが、30 個までのアミノ酸長を有することを特徴とする、請求項 5 に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

式：



を特徴とし、式中、

Met が、メチオニンを示し、

X₁ が、結合、セリンまたはアスパラギンであり、

His が、ヒスチジンであり、

n が、0 ~ 6 の数であり、

X₂ が、ペプチド配列番号 6 ~ 10 からなる群より選択されるリンカーペプチドであり、

Pro が、プロリンであり、および

Y が、Pro、Pro-Ala、Pro-Gly、Pro-Thr、Ala-Pro、Gly-Pro、Thr-Pro、Arg-Pro、または Pro-Arg-Pro からなる群より選択され、該 IGF-I の最初の 2 個のアミノ酸が Gly-Pro であり、これにより該融合タンパク質の I g A プロテアーゼ切断部位はアミノ酸共通配列 Y-Pro-! . Gly-Pro (. ! . : 切断位置) を有する、

請求項 5 または 6 に記載の融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インスリン様増殖因子 I (IGF-I) の製造方法、医薬組成物、および使用方法に関するものである。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

ヒトインスリン様増殖因子 (I G F - I) は、インスリンと構造的に関連した循環ホルモンである。I G F - I は、末梢組織に及ぼす増殖ホルモンの作用の主要介在物質であると伝統的に考えられている。I G F - I は、70個のアミノ酸からなり、ソマトメジンCとも呼ばれ、SwissProt No. P01343によって定義される。用途、活性および産生は、例えば、le Bouc, Y., et al., FEBS Lett. 196 (1986) 108-112; de Pagter-Holthuisen, P., et al., FEBS Lett. 195 (1986) 179-184; Sandberg Nordqvist, A.C., et al., Brain Res. Mol. Brain Res. 12 (1992) 275-277; Steenbergh, P.H., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 175 (1991) 507-514; Tanner, J.M., et al., Acta Endocrinol. (Copenh.) 84 (1977) 681-696; Uthne, K., et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 39 (1974) 548-554; 欧州特許第0 123 228号; 欧州特許第0 128 733号; 米国特許第5,861,373号; 米国特許第5,714,460号; 欧州特許第0 597 033号; W002/32449; W093/02695に記載される。

10

【 0 0 0 3 】

I G F - I の機能の制御は、非常に複雑である。循環において、I G F - I のたった0.2%が、遊離形態で存在するのに対し、大部分は、I G F に対して非常に高い親和性を有しかつI G F - I の機能を調節するI G F 結合タンパク質 (I G F B P) へ結合する。因子は、プロテアーゼによるI G F B P のタンパク質分解等のI G F - I を放出するメカニズムによって局所的に遊離され得る。

【 0 0 0 4 】

I G F - I は、発達中のおよび成熟した脳においてパラクリンの役割を担う (Werther, G.A., et al., Mol. Endocrinol. 4 (1990) 773-778) 。インビトロでの研究では、I G F - I が、ドーパミン作動性ニューロン (Knusel, B., et al., J. Neurosci. 10(1990) 558-570) およびオリゴデンドロサイト (McMorris, F.A., および Dubois-Dalcq, M., J. Neurosci. Res. 21 (1988) 199-209, McMorris, F.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 822-826, Mozell, R.L., および McMorris, F.A., J. Neurosci. Res. 30 (1991) 382-390) を含む中枢神経系 (C N S) におけるニューロンのいくつかの種類に関する強力な非選択的栄養剤であることが示されている (Knusel, B., et al., J. Neurosci. 10(1990) 558-570, Svrzic, D., および Schubert, D., Biochem. Biophys. Res. Commun. 172 (1990) 54-60) 。米国特許第5,093,317号には、コリン作動性ニューロン細胞の生存が、I G F - I の投与によって増強することが記載されている。I G F - I が、末梢神経の再生を刺激し (Kanje, M., et al., Brain Res. 486 (1989) 396-398) 、およびオルニチンデカルボキシラーゼ活性を亢進する (米国特許第5,093,317号) ことがさらに公知である。米国特許第5,861,373号およびW093/02695には、患者の中枢神経系においてI G F - I および/またはそのアナログの活性濃度を高めることによって、グリア細胞および/または非コリン作動性ニューロン細胞に主に影響する、中枢神経系に対する損傷または中枢神経系の疾病を治療する方法が記載されている。W002/32449は、哺乳動物の鼻腔へ、I G F - I またはその生物活性のあるものを治療有効量含む医薬組成物を投与することによって、哺乳動物の中枢神経系において虚血性損傷を軽減または予防するための方法に関する。I G F - I は、鼻腔を通じて吸収され、虚血事象と関連した虚血性損傷を軽減または予防するのに効果的な量で、哺乳動物の中枢神経系中へと輸送される。欧州特許第0 8 7 4 6 4 1号は、エイズ関連認知症、アルツハイマー病 (A D) 、パーキンソン病、ピック病、ハンチントン病、肝性脳症、皮質基底神経節症候群 (cortical-basal ganglionic syndrome) 、進行性認知症、痙性不全対麻痺を有する家族性認知症、進行性核上麻痺、多発性硬化症、シルダーの脳性硬化症 (cerebral sclerosis of Schilder) または急性壊死性出血性脳脊髄炎による中枢神経系におけるニューロン損傷を治療または予防するための医薬の製造のためのI G F - I またはI G F - I I の使用であって、ここで、該医薬は、血液脳関門または血液脊髄関門の外側での該I G F の有効量の非経口的投与のための形態にある、使用を特許請求している。

20

30

40

【 0 0 0 5 】

50

遊離 IGF-I の脳レベルおよび血清レベルの低下は、AD の散発性形態および家族性形態の病変形成と関連付けられてきた。さらに、IGF-I は、A β 誘発性神経毒性に対してニューロンを保護する (Niikura, T., et al., J. Neurosci. 21 (2001) 1902-1910、Dore, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997) 4772-4777、Dore, S., et al., Ann. NY Acad. Sci. 890 (1999) 356-364)。近年、末梢投与された IGF-I が、ラットおよびマウスにおいて脳 A β レベルを低下できることが示された (Carro, E., et al., Nat. Med. 8 (2002) 1390-1397)。さらに、その研究は、トランスジェニック AD マウスモデルにおいて、長期化した IGF-I 治療が、脳アミロイドプラーク負荷を有意に低下させることを示した。これらのデータより、IGF-I が、脳から A β を除去することによって、脳 A β レベルを低下させることができ、およびプラークが関連する脳の認知症を軽減できるという見解が強力に支持される。

10

【0006】

IgA プロテアーゼの認識部位は、Yaa-Pro-!-Xaa-Pro と記載される。Yaa は、Pro (またはまれに Ala、Gly もしくは Thr との組み合わせの Pro、すなわち、Pro-Ala、Pro-Gly、もしくは Pro-Thr) を表す。Xaa は、Thr、Ser または Ala を表す (Pohlner, J. et al., Bio/Technology 10 (1992) 799-804、Pohlner, J. et al., Nature 325 (1987) 458-462 および米国特許第 5,427,927 号)。天然の切断部位は、Wood, S.G. and Burton, J., Infect Immun. 59 (1991) 1818-1822 によって同定された。ナイセリア・ゴノレー (*Neisseria gonorrhoeae*) (2 型) 由来の免疫グロブリン A1 プロテアーゼのための合成ペプチド基質は、自己タンパク質分解部位 Lys-Pro-Ala-Pro-!-Ser-Pro、Val-Ala-Pro-Pro-!-Ser-Pro、Pro-Arg-Pro-Pro-!-Ala-Pro、Pro-Arg-Pro-Pro-!-Ser-Pro、Pro-Arg-Pro-Pro-!-Thr-Pro ならびに IgA1 切断部位 Pro-Pro-Thr-Pro-!-Ser-Pro および Ser-Thr-Pro-Pro-!-Thr-Pro である。

20

【0007】

WO2006/066891 には、インスリン様増殖因子 I (IGF-I) と 1 個または 2 個のポリ (エチレングリコール) 基とからなる結合体が開示されている。この結合体は、該 IGF-I が、野生型 IGF-I アミノ酸配列のアミノ酸位置 27、37、65、68 の 3 個まで位置でアミノ酸変化を有し、それにより該アミノ酸の 1 個または 2 個がリジンであり、アミノ酸 27 が極性アミノ酸であるがリジンではなく、該リジンの第一級アミノ基を介してポリ (エチレングリコール) 基と結合し、そして全体的な分子量が 20 ~ 100 kDa であることを特徴とする。このような結合体は、アルツハイマー病のような神経変性疾患の治療に有用である。

30

【0008】

WO2006/074390 は、IGF-I 変異体、および IGF-I 変異体と特定の融合構成要素を含む融合タンパク質を参照する。WO2006/074390 は、特定の IGF-I 変異体を参照する。

【0009】

融合タンパク質を介した IGF-I の組換え製造の方法は、例えば、欧州特許第 015565 5 号および米国特許第 5,158,875 号から公知である。しかしながら、組換えで製造された IGF-I のマイクロヘテロジェニティー (microheterogeneity) が、しばしば見出される (Forsberg, G. et al., Biochem. J. 271 (1990) 357-363)。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、高い純度および収量をともなう、原核生物における、その N 末端にメチオニンが付着していない IGF-I の組換え製造の方法を提供する。本発明は、

a) プロペプチドの C 末端にその N 末端で結合した IGF-I を含む融合タンパク質を

50

コードする核酸を含有する発現ベクターを含む原核宿主細胞を培養すること、

b) それによって、該プロペプチドが、アミノ酸 - Y - Pro でその C 末端が終止し、ここで、Y が、Pro、Pro - Ala、Pro - Gly、Pro - Thr、Ala - Pro、Gly - Pro、Thr - Pro、Arg - Pro、または Pro - Arg - Pro からなる群より選択されること、

c) 該融合タンパク質を回収し、そして該融合タンパク質を IgA プロテアーゼで切断すること、および

d) 該 IGF - I を回収すること

を特徴とする、IGF - I の製造方法を含む。回収された IGF - I は、N 末端に結合するメチオニン残基を含まない。

10

【0011】

本発明の好ましい実施態様は、配列番号 2 ~ 5 に示されるペプチドからなる群より選択されるプロペプチドである。

【0012】

本発明のさらなる実施態様は、プロペプチドの C 末端にその N 末端で結合した IGF - I を含む融合タンパク質であり、ここで、該プロペプチドは、アミノ酸 - Y - Pro でその C 末端が終止し、ここで、Y が、Pro、Pro - Ala、Pro - Gly、Pro - Thr、Ala - Pro、Gly - Pro、Thr - Pro、Arg - Pro、または Pro - Arg - Pro からなる群より選択されることを特徴とする。- Y - Pro 配列によって、プロペプチドは、該 IGF - I から IgA プロテアーゼ処理によって分離されることが可能である。

20

【0013】

好ましくは、本発明による融合タンパク質は、式 Met - X₁ - His_n - X₂ - Y - Pro - [IGF - I] を特徴とし、式中、

Met が、メチオニンを示し、

X₁ が、結合、セリンまたはアスパラギンであり、

His が、ヒスチジンであり、

n が、0 ~ 6 の数であり、

X₂ が、ペプチド配列番号 6 ~ 10 からなる群より選択されるリンカーペプチドであり、

Pro が、プロリンであり、および

30

Y が、Pro、Pro - Ala、Pro - Gly、Pro - Thr、Ala - Pro、Gly - Pro、Thr - Pro、Arg - Pro、または Pro - Arg - Pro からなる群より選択される。

【0014】

好ましくは、プロペプチドは、式 Met - X₁ - His_n - X₂ - Y - Pro - によって示され、式中、

Met が、メチオニンを示し、

X₁ が、結合、セリンまたはアスパラギンであり、

His が、ヒスチジンであり、

n が、0 ~ 6 の数であり、

40

X₂ が、ペプチド配列番号 6 ~ 10 からなる群より選択されるリンカーペプチドであり、

Pro が、プロリンであり、および

Y が、Pro、Pro - Ala、Pro - Gly、Pro - Thr、Ala - Pro、Gly - Pro、Thr - Pro、Arg - Pro、または Pro - Arg - Pro からなる群より選択される。

【0015】

プロペプチドは、IGF - I の N 末端 (グリシン) にその C 末端で結合する。プロペプチドは好ましくは、30 個までのアミノ酸長を有する。好ましくは、X₁ は結合である。好ましくは n は、0 または 6 である。好ましくは X₂ は、ペプチド配列番号 7 である。好ましくは Y は、Pro - Arg - Pro である。

50

【 0 0 1 6 】

本発明はさらに、本発明による I G F - I を、好ましくは医薬的に許容しうる担体とともに含有する医薬組成物を含む。

【 0 0 1 7 】

本発明はさらに、本発明による I G F - I を含有する医薬組成物の製造方法を含む。

【 0 0 1 8 】

本発明はさらに、A D の治療のための医薬の製造のための本発明による I G F - I の使用を含む。

【 0 0 1 9 】

本発明はさらに、アミノ反応性 I G F - I の医薬有効量を、A D の治療を必要とする患者へ、好ましくは 1 週間に 1 ~ 2 回の適用において投与することを特徴とする、A D の治療のための方法を含む。

10

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 0 】

驚くべきことに、I g A プロテアーゼ、好ましくはナイセリア・ゴノレー由来の I g A プロテアーゼが、アミノ酸配列 Y - Pro . ! . Gly - Pro を切断できることが見出された。Y は、Pro、Pro - Ala、Pro - Gly、Pro - Thr、Ala - Pro、Gly - Pro、Thr - Pro、Arg - Pro、または Pro - Arg - Pro からなる群より選択される。好ましくは Pro - Pro . ! . Gly - Pro または Pro - Arg - Pro - Pro . ! . Gly - Pro (配列番号 11) が切断部位として有用である (. ! . : 切断位置)。本発明による処理のための I g A プロテアーゼ切断部位は、アミノ酸コンセンサス配列 Y - Pro . ! . Gly - Pro を有し、それにより、Gly - Pro は、I G F - I の最初の 2 個のアミノ酸である。Y は好ましくは、アミノ酸 Pro、Pro - Ala、Arg - Pro または Pro - Arg - Pro で終止するアミノ酸配列を表す。このような Y アミノ酸配列、特に Pro - Arg - Pro は、例えば、Ala - Pro - Arg - Pro (配列番号 12) または Pro - Ala - Pro - Arg - Pro (配列番号 13) にあるようなさらなる Ala 基または Pro - Ala 基によって伸長されることが可能である。特に好ましいのは、切断アミノ酸配列 Pro - Arg - Pro - Pro . ! . Gly - Pro (配列番号 11)、Pro - Ala - Pro . ! . Gly - Pro (配列番号 14)、Pro - Pro - . ! . Gly - Pro (配列番号 15)、Ala - Pro - Arg - Pro - Pro . ! . Gly - Pro (配列番号 16) または Pro - Ala - Pro - Arg - Pro - Pro . ! . Gly - Pro (配列番号 17) である。

20

30

【 0 0 2 1 】

本発明によると、「I g A プロテアーゼ」という用語には、I g A を特異的に切断し、例えばナイセリア・ゴノレー (2 型) 由来の I g A 1 プロテアーゼなど、Kornfeld, S.J. and Plaut, A.G., Rev. Infekt. Dis. 3 (1981) 521-534 に記載されるプロテアーゼが含まれる。独国特許第 36 22 221(A) 号、Koomey, J.M., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. US A 79 (1982) 7881- 7885、Bricker, J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 2681- 2685、Pohlner, J., Nature 325 (1987) 458- 462、および Halter, R., et al., EMBO J. 3 (1984) 1595-1601 において記載されているような組換え I g A プロテアーゼも、まさに適している。好ましくは、該 I g A プロテアーゼは、ナイセリア・ゴノレー由来の I g A プロテアーゼである。好ましくは、該ナイセリア・ゴノレー (2 型) 由来の I g A 1 プロテアーゼは、配列番号 21 を有する。

40

【 0 0 2 2 】

本発明による I G F - I とは、ソマトメジン C と呼ばれ、SwissProt No. P01343 によって定義される、70 個のアミノ酸からなるヒトタンパク質を指す。用途、活性および産生は、例えば、le Bouc, Y., et al., FEBS Lett. 196 (1986) 108-112、de Pagter-Holt huizen, P., et al., FEBS Lett. 195 (1986) 179-184、Sandberg Nordqvist, A.C., et al., Brain Res. Mol. Brain Res. 12 (1992) 275-277、Steenbergh, P.H., et al., Bio

50

chem. Biophys. Res. Commun. 175 (1991) 507-514、Tanner, J.M., et al., Acta Endocrinol. (Copenh.) 84 (1977) 681-696、Uthne, K., et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 39 (1974) 548-554、欧州特許第0 123 228号、欧州特許第0 128 733号、米国特許第5, 861,373号、米国特許第5,714,460号、欧州特許第0 597 033号、W002/32449、W093/02695に記載される。

【0023】

本発明によるIGF-Iは、IGF-I、C末端切断型IGF-I(3~6個のアミノ酸の欠失)、R36A(位置36でのアラニンによるアルギニンの置換)、R37Aからなる群より選択されるIGF-Iを含む。好ましくは、該IGF-Iは、IgG由来の、好ましくはIgG1またはIgG4由来のヒトFcにそのC末端で結合する。

10

【0024】

C末端切断型IGF-I(3~6個のアミノ酸の欠失)とは、C末端で3~6個のアミノ酸の欠失した配列番号1のIGF-Iを示す。

【0025】

R36Aとは、アミノ酸位置36でアルギニンがアラニンによって置換された配列番号1のIGF-Iを示す。

【0026】

R37Aとは、アミノ酸位置37でアルギニンがアラニンによって置換された配列番号1のIGF-Iを示す。

【0027】

融合タンパク質をコードする遺伝子は、好ましくは、融合タンパク質が、必要条件に従って産生されることが可能であるよう、適切な(好ましくは誘導可能な)発現シグナルの調節下に置かれる。適切な原核細胞または真核(植物および動物)細胞は、タンパク質融合の産生のための宿主細胞として使用可能であるが、無細胞系も可能である。

20

【0028】

本発明による方法の好ましい実施態様は、宿主細胞が、組換えDNAまたは組換えベクターで形質転換され、ここで、該DNAまたはベクターは、本発明による融合タンパク質をコードする遺伝子の少なくとも1つのコピーを含有し、そして形質転換された細胞は、適切な培地中で培養され、融合タンパク質をコードする遺伝子は、該形質転換された細胞中で発現し、融合タンパク質はIgAプロテアーゼで切断され、そしてIGF-Iが単離されることを特徴とする。

30

【0029】

本発明による融合タンパク質の発現は、例えば、リジンを含まない -ガラクトシダーゼ遺伝子の断片との融合によってDNAレベルで改良されることが可能であり、すなわち、Yは、リジンを含まない -ガラクトシダーゼタンパク質の一部を含有する。融合タンパク質の発現を亢進させるための他の代替例は、当業者に公知である。発現産物の精製および分離は、他のポリペプチド、特に高電荷のポリペプチドもしくはタンパク質(例えば、ポリ(Lys, Arg))または高い親和性で特定の物質へ結合することが可能なポリペプチドもしくはタンパク質(例えば、ストレプトアビジン)との融合によって容易になり得る(例えば、欧州特許第0 089 626(A)号、欧州特許第0 306 610(A)号)。特に好ましいリンカーペプチドは、好ましくはN末端側でSHHHHHH(配列番号18)、NHHHHHH(配列番号19)またはHHHHHH(配列番号20)が先行するペプチド配列番号6~10である。

40

【0030】

本発明は、本発明による融合タンパク質をコードし、およびIgAプロテアーゼ切断部位が、プロペプチドとIGF-Iとの間の接合領域中に組み込まれる(組換え)核酸も提供する。

【0031】

本発明による組換えDNAは、分子生物学の分野の当業者に公知の方法で得ることができ、このために、IGF-Iのアミノ酸配列をコードするDNA配列を含有するベクタ

50

ーは通常、この遺伝子の5'末端の領域中の制限エンドヌクレアーゼで切断され、所望の配列を含有するオリゴヌクレオチドと再度結合される。

【0032】

さらに、本発明は、本発明による組換えDNAの少なくとも1つのコピーを含有する組換えベクターも提供する。原核生物におけるタンパク質発現のためのベースとして適切なベクターは、当業者に公知である。このベクターは好ましくは、本発明による組換えDNAの高い発現が可能となるベクターである。ベクター上の組換えDNAは好ましくは、誘導可能な発現シグナルの調節下にある(例えば、tac、lacまたはtrpプロモーター)。

【0033】

本発明によるベクターは、染色体外に存在し得(例えば、プラスミド)、および宿主生物体(例えば、バクテリオファージ)のゲノム中に組み込まれ得る。本発明によるベクターは、好ましくはプラスミドである。各場合において、特定の宿主生物体における遺伝子発現に適しているベクターは、分子生物学の分野の当業者に公知である。前記ベクターは、真核ベクターであり得るが、好ましくは原核ベクターである。原核生物における本発明によるDNAの発現に適したベクターの例は、例えば、市販のpUCベクターおよびpURベクターである。

【0034】

本発明は、本発明による組換えDNAでおよび/または本発明による組換えベクターで形質転換された細胞、好ましくは原核細胞、特に好ましくは大腸菌(E.coli)細胞も提供する。

【0035】

融合タンパク質が、原核生物中で発現する場合、不活性のやや溶け難い凝集体(屈折体、封入体)が形成される。したがって、融合タンパク質は、その活性型形態へと形質転換されなければならない。当業者になじみのある手法を使用して(例えば、欧州特許第0 219 874(A)号、欧州特許第0 114 506(A)号、WO84/03711参照)、まず、変性剤の添加によって可溶化が実施された後、再生および所望の場合さらなる精製工程が実施される。

【0036】

IgAプロテアーゼで切断されるべきIGF-I融合タンパク質の処理に必要な条件は、重要ではない。しかしながら、この過程において、IGF-I融合タンパク質とIgAプロテアーゼとの重量比が1:1~100:1であることが好ましい。反応は好ましくは、pH6.5~8.5のバッファー水溶液で行う。バッファー濃度は好ましくは、50~500mmolの範囲にあり、所望の場合、0~100mmol/Lの塩化ナトリウムを添加する。切断は好ましくは、室温で少なくとも60分から5日まで、好ましくは24~72時間実施される。

【0037】

可溶化、再生およびIgAプロテアーゼによる切断の後、このように得られた切断産物は好ましくは、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーおよび/またはサイズによる分画によって精製される。このように生じたIGF-Iは、位置-1においてメチオニンを含まない。

【0038】

医薬製剤

IGF-Iは、混合物として、または例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーもしくはサイズ排除クロマトグラフィーによって分離される異なる種として投与されることが可能である。本発明の化合物は、当業者に公知である、医薬組成物の製造方法に従って処方されることが可能である。このような組成物の製造のために、本発明によるIGF-Iは、医薬的に許容しうる担体との混合物中で、好ましくは医薬組成物の所望の成分を含有する水溶液に対する透析または透析濾過によって組み合わされる。このような許容しうる担体は、例えば、Remington's Pharmaceutical Science, 18th edition, 1990, Mack Publishing Company, Oslo et al.編集(例えばp.14

10

20

30

40

50

35 ~ 1712)に記載される。典型的な組成物は、本発明に従った物質の有効量、例えば約0.1 ~ 100 mg/mLを、適切な量の担体とともに含有する。組成物は、非経口的に投与され得る。本発明によるIGF-Iは、好ましくは腹腔内、皮下、静脈内または鼻内適用を介して投与される。

【0039】

本発明による医薬製剤は、当該分野で公知の方法に従って調製されることが可能である。通常、IGF-Iの溶液は、医薬組成物中で使用されるよう企図されたバッファーに対して透析または透析濾過され、所望のタンパク質終濃度は、濃縮または希釈によって調整される。

【0040】

以下の例および配列は、本発明の理解を助けるために提供され、本発明の真の範囲は、添付の特許請求の範囲に示される。変更が、本発明の精神から逸脱することなく、記載の手法においてなされ得ることが理解される。アミノ酸の名称は、1文字コード(例えば、R)または3文字コード(例えば、Arg)のいずれかを使用して略記される。R36Aとは、アミノ酸アルギニン36がアラニンによって置換されているIGF-I変異体を意味する。

【0041】

配列表

配列番号1 ヒトIGF-Iのアミノ酸配列(SwissProt P01343由来のアミノ酸49 ~ 118)

配列番号2 好ましいプロペプチドのアミノ酸配列

配列番号3 好ましいプロペプチドのアミノ酸配列

配列番号4 好ましいプロペプチドのアミノ酸配列

配列番号5 好ましいプロペプチドのアミノ酸配列

配列番号6 ~ 10 リンカー

配列番号11 ~ 17 切断配列

配列番号18 ~ 20 その他

配列番号21 ナイセリア・ゴノレー(2型)由来のIgA1プロテアーゼのアミノ酸配列

【実施例】

【0042】

実施例1

有用な発現ベクターおよびE. coli株は、欧州特許第0972838号に記載されている。E. coliクローンから、発現している融合タンパク質が選択的寒天プレート上で増殖し、1個の接種ループを(100 mLの)選択培地へ移し、37°Cで13時間、光学密度(578 nm)が2 ~ 4になるまで培養する。この培養物を氷上でさらに6時間保存した後、主要培養物の自動接種を37°Cで実施する。IGF-I変異体の発現は、1.0 mM IPTGの添加とともに50の光学密度(578 nm)で開始する。全体的な発酵は、16時間まで持続する。SDS-PAGEゲル上の産物のタンパク質バンドの容積測定強度をIGF標準物質のバンドと比較することによって、タンパク質の量を濃度測定で測定する。培養プロセスを遠心分離によって回収する。

【0043】

精製された封入体(IB)材料を得るために、標準物質の発酵から回収されたバイオマスを次の手法で処理する。0.3 g / 100 g生物乾燥重量のリゾチームおよび5 U / 1 g生物乾燥重量のベンゾナーゼを20分間インキュベートし、ホモジナイズする。30 U / 1 g生物乾燥重量のベンゾナーゼを添加し、37°Cで60分間インキュベートする。0.5 L / LのBrjバッファーを添加し、室温で30分間インキュベートする。遠心分離後、300 mLのTris-EDTA-バッファー / 100 g生物湿重量(精製されたIB湿重量)中にペレットを再懸濁し、室温で30分間インキュベートし、遠心分離する。6.8 Mグアニジン-HCl、0.1 M TrisHCl、0.1 M DTT、pH 8.5中で1

10

20

30

40

50

g / L の I B を室温で一晩可溶化する。濁った溶液を 6 . 8 M グアニジン - H C l 、 0 . 1 M TrisH C l 、 p H 8 . 0 に対して透析する。透析後、遠心分離によって不溶性成分を除去する。プロ I G F - I 溶液を 0 . 8 M アルギニン、 0 . 1 M TrisH C l 、 0 . 1 M グアニジン - H C l 、 1 m M G S H 、 1 m M G S S H 、 p H 8 . 5 中へ室温で 5 0 倍希釈することによって、フォールディングを実施する。2 時間後、溶液に 2 M 塩化ナトリウムを補充し、濾過し、 2 M N a C l 、 0 . 8 M アルギニン、 0 . 1 M TrisH C l 、 0 . 1 M グアニジン - H C l 、 p H 8 . 5 を含有するバッファーで室温で平衡化した H I C カラム (Butyl Sepharose 4 Fast Flow ; GE , Amersham Biosciences) へ、 1 0 m L / 分の流速で適用する。ベースラインに到達するまでカラムを平衡化バッファーで洗浄した後、平衡化バッファーで開始し、 0 . 1 M TrisH C l 、 5 % エチレングリコール、 p H 8 . 5 を含有するバッファーで終了する直線勾配の 1 0 カラム容積で溶出する。逆相高速クロマトグラフィー (r p H P L C) によって、溶出した画分を分析する。正確に形成された S S 架橋を有するタンパク質を含有する画分をプールした。反応混合物にナイセリア・ゴノレー (2 型) 由来の I g A 1 プロテアーゼを補充し (重量比 1 : 5 0) 、室温で一晩インキュベートする (図 2 参照) 。反応混合物を 5 0 m M 酢酸 (p H 4 . 5) で 1 : 2 に希釈した後、 5 0 m M 酢酸で平衡化された陽イオン I E C カラム (MacroCap SP support ; GE , Amersham Biosciences , Uppsala , Sweden) へ適用するか、または S E C S u p e r d e x (商標) 2 0 0 (General Electric) へ適用する。ベースラインに到達するまでカラムを洗浄した後、 5 0 m M 酢酸で開始し、 1 M 塩化ナトリウムを補充された 5 0 m M 酢酸で終了する直線勾配の 2 0 カラム容積で溶出する。溶出した画分を S D S - P A G E によって分析した。 I G F - I の分子サイズを有する単一バンドを含有する画分を I G F - 1 としてプールする。静的光散乱検出を有する分析用サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) 、トリプシン消化の M S 分析、 A s p - N 消化の M S 分析および分析用陽イオン I E C または S E C によって、 I G F - I の同一性を確認する。

10

20

【配列表】0004958975000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 フィッシャー, シュテファン
ドイツ国、8 2 3 9 8 ポリング、ヤコビフェルトヴェーク 1 1
- (72)発明者 ヘッセ, フリーデリーケ
ドイツ国、8 0 3 3 9 ミュンヘン、ガングホーフェルシュトラッセ 2 3
- (72)発明者 クネッテゲン, ヘンドリク
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、アガーテ - フライスナー - ヴェーク 1 6
- (72)発明者 ラング, クルト
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、ランゴナー・シュトラッセ 1 0
- (72)発明者 レグラ, イェルク・トーマス
ドイツ国、8 0 6 3 9 ミュンヘン、リールシュトラッセ 1 5
- (72)発明者 シャンツ, クリステリアン
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、イム・ヴィースフェルト 1 1
- (72)発明者 シャウブマー, アンドレアス
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、ザンクト・クララ・シュトラッセ 4 1

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 特表平04 - 501514 (JP, A)
特表平05 - 501360 (JP, A)
特表2004 - 528014 (JP, A)
Protein Eng. , 1987年, vol.1, no.6, pp.487-492
J. Protein Chem. , 1992年, vol.11, no.2, pp.201-211
Bio/Technology , 1992年, vol.10, no.7, pp.799-804
Gene , 1993年, vol.130, no.1, pp.121-126

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00-15/90
C12P 21/02
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed