



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | | |
|---|---|--|---|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/62, C07K 14/58, 14/36, 14/635 | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/18314 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Mai 1997 (22.05.97) | | |
| <table border="0" style="width: 100%;"><tr><td style="width: 50%; vertical-align: top;">(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/04850 (22) Internationales Anmeldedatum: 6. November 1996 (06.11.96) (30) Prioritätsdaten: 195 42 702.5 16. November 1995 (16.11.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOPETZKI, Erhard [DE/DE]; Kastnerhofstrasse 21, D-82377 Penzberg (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Werk Penzberg, Patentabteilung (RE-TB), Postfach 11 52, D-82372 Penzberg (DE).</td><td style="width: 50%; vertical-align: top;">(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></td></tr></table> | | | (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/04850 (22) Internationales Anmeldedatum: 6. November 1996 (06.11.96) (30) Prioritätsdaten: 195 42 702.5 16. November 1995 (16.11.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOPETZKI, Erhard [DE/DE]; Kastnerhofstrasse 21, D-82377 Penzberg (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Werk Penzberg, Patentabteilung (RE-TB), Postfach 11 52, D-82372 Penzberg (DE). | (81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/04850 (22) Internationales Anmeldedatum: 6. November 1996 (06.11.96) (30) Prioritätsdaten: 195 42 702.5 16. November 1995 (16.11.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOPETZKI, Erhard [DE/DE]; Kastnerhofstrasse 21, D-82377 Penzberg (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Werk Penzberg, Patentabteilung (RE-TB), Postfach 11 52, D-82372 Penzberg (DE). | (81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> | | | |
| (54) Title: PROCESS FOR THE PREPARATION OF PEPTIDES BY WAY OF STREPTAVIDIN FUSION PROTEINS | | | | |
| (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PEPTIDEN ÜBER STREPTAVIDIN-FUSIONSPROTEINE | | | | |
| (57) Abstract <p>The invention relates to a process for recombinant preparation of peptides by expression of a DNA in micro-organisms, which DNA codes for a fusion protein made of streptavidin and one of the said peptides. Streptavidin and the peptide are bound by a peptide sequence which can be cleaved by an endoproteinase. The process also includes isolation of the insoluble, inactive protein, solubilisation of the inactive protein using a denaturant, dilution of the denaturant at a pH value of between 8.5 and 11 until cleaving of the fusion protein by an endoproteinase can take place, cleaving of the fusion protein, lowering of the pH value until streptavidin and non-cleaved fusion protein precipitate, and cleaning of the desired peptide from the supernatant. Said process is particularly suitably for producing parathormone and urodilatin and fragments thereof.</p> | | | | |
| (57) Zusammenfassung <p>Ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Peptiden durch Expression einer DNA in Mikroorganismen, welche für ein Fusionsprotein aus Streptavidin und dem genannten Peptid codiert, wobei Streptavidin und Peptid über eine Peptidsequenz, welche durch eine Endoproteinase spaltbar ist, verbunden sind, Isolierung des unlöslichen, inaktiven Proteins, Solubilisierung des inaktiven Proteins mit einem Denaturierungsmittel, Verdünnung des Denaturierungsmittels bei einem pH-Wert zwischen 8,5 und 11, bis die Spaltung des Fusionsproteins durch eine Endoproteinase durchführbar ist, Spaltung des Fusionsproteins, Erniedrigung des pH-Werts, bis Streptavidin und nicht gespaltenes Fusionsprotein präzipitieren, und Reinigung des gewünschten Peptids aus dem Überstand, ist besonders zur Herstellung von Parathormon und Urodilatin sowie deren Fragmenten geeignet.</p> | | | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AM | Armenien | GB | Vereinigtes Königreich | MX | Mexiko |
| AT | Österreich | GE | Georgien | NE | Niger |
| AU | Australien | GN | Guinea | NL | Niederlande |
| BB | Barbados | GR | Griechenland | NO | Norwegen |
| BE | Belgien | HU | Ungarn | NZ | Neuseeland |
| BF | Burkina Faso | IE | Irland | PL | Polen |
| BG | Bulgarien | IT | Italien | PT | Portugal |
| BJ | Benin | JP | Japan | RO | Rumänien |
| BR | Brasilien | KE | Kenya | RU | Russische Föderation |
| BY | Belarus | KG | Kirgisistan | SD | Sudan |
| CA | Kanada | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KR | Republik Korea | SG | Singapur |
| CG | Kongo | KZ | Kasachstan | SI | Slowenien |
| CH | Schweiz | LI | Liechtenstein | SK | Slowakei |
| CI | Côte d'Ivoire | LK | Sri Lanka | SN | Senegal |
| CM | Kamerun | LR | Liberia | SZ | Swasiland |
| CN | China | LK | Litauen | TD | Tschad |
| CS | Tschechoslowakei | LU | Luxemburg | TG | Togo |
| CZ | Tschechische Republik | LV | Lettland | TJ | Tadschikistan |
| DE | Deutschland | MC | Monaco | TT | Trinidad und Tobago |
| DK | Dänemark | MD | Republik Moldau | UA | Ukraine |
| EE | Estland | MG | Madagaskar | UG | Uganda |
| ES | Spanien | ML | Mali | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| FI | Finnland | MN | Mongolei | UZ | Usbekistan |
| FR | Frankreich | MR | Mauretanien | VN | Vietnam |
| GA | Gabon | MW | Malawi | | |

Verfahren zur Herstellung von Peptiden über Streptavidin-Fusionsproteine

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Peptiden durch Expression von Fusionsproteinen mit Streptavidin und anschließender enzymatischer Spaltung des Fusionsproteins.

Unter Peptiden werden üblicherweise Substanzen verstanden, die aus bis zu ca. 100 Aminosäuren bestehen. Die Herstellung solcher Peptide ist entweder chemisch (Kent, S.B.H. et al. (1988) (1), Hodson, J.H., (1993) (2) oder rekombinant (Kopetzki, E. et al. (1994) (3) Winnacker, E.-L. (1987) (4), Harris, T.J.R. (1983) (5)) möglich.

Die Nachteile der chemischen Peptidsynthese liegen insbesondere darin, daß eine ökonomische Synthese lediglich bis ca. 30 bis 40 Aminosäuren möglich ist und sich häufig bei der Synthese unerwünschte Modifizierungen (Fehlsequenzen, nicht abgespaltene Schutzgruppen) bilden. Weitere Probleme sind die Racemisierung bei Fragmentkopplung, Schwierigkeiten bei der Abspaltung von Schutzgruppen und schließlich die aufwendige Reinigung.

Zur rekombinanten Herstellung von Peptiden können verschiedene Verfahren angewendet werden. Beispielsweise kann eine direkte Expression im Cytoplasma von Mikroorganismen oder Zelllinien erfolgen. Hierfür ist jedoch eine Mindestpolypeptidlänge von ca. 80 bis 100 Aminosäuren erforderlich. Kleinere Peptide sind nicht stabil und werden durch Proteolyse abgebaut. Zudem enthalten diese Proteine in der Regel ein zusätzliches N-terminales Methionin, und die Ausbeuten sind sehr gering.

Durch Expression löslicher Fusionsproteine mit selektiver Spaltsequenz und anschließender Freisetzung des gewünschten Peptids durch chemische oder enzymatische Spaltung, kann die Herstellung solcher Peptide verbessert werden (Itakura, K. et al. (1977) (20); EP-B 0 001 930 (21); Gram, H. et al. (1994) (19); Sharma, A. et al. (1992) (22)). Der Nachteil von löslichen Fusionsproteinen ist aber insbesondere, daß sie vorwiegend im nicht strukturierten Peptidbereich durch Proteolyse in der Zelle bzw. während der Sekretion und Aufarbeitung degradiert werden können.

Die Herstellung von Streptavidin-Fusionsproteinen ist in der EP-B 0 198 015, bei Sano, T. (1991) (9) und Sano, T. (1992) (10) beschrieben. Solche chimäre Proteine umfassen bei Sano als Streptavidinanteil die Aminosäuren 16 - 133 von Streptavidin, einen Polylinker und die Sequenz des "target-Proteins". Als target-Proteine sind von Sano das Maus Metallothionein I Protein und das T7-Gen-10-Protein beschrieben. Diese chimären Proteine enthielten jedoch keine Spaltstelle, über die das "target-Protein" vom Streptavidin-Anteil wieder abgespalten werden kann. In der EP-B 0 198 015 wird die Herstellung von Streptavidinfusionsproteinen in Streptomyces beschrieben. Die Isolierung des Peptidanteils aus dem Fusionsprotein ist jedoch sehr aufwendig. So muß beispielsweise vor und nach der Spaltung jeweils eine Affinitätschromatographie mit Iminobiotin als Ligand durchgeführt werden.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem Peptide über Streptavidin-Fusionsproteine in hoher Ausbeute und Reinheit bei möglichst vollständiger Abtrennung vom Streptavidinanteil zur Verfügung gestellt werden können.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung eines Peptids durch Expression einer DNA in Mikroorganismen, vorzugsweise Prokaryonten, welche für ein Fusionsprotein aus Streptavidin und dem genannten Peptid codiert, wobei Streptavidin und Peptid über eine Peptidsequenz, welche durch eine Endoproteinase spaltbar ist, verbunden sind, Isolierung des unlöslichen, inaktiven Fusionsproteins, Solubilisierung des inaktiven Fusionsproteins mit einem Denaturierungsmittel, Verdünnung des Denaturierungsmittels bei einem pH-Wert zwischen 8,5 und 11, bis die Spaltung des Fusionsproteins durch eine Endoproteinase durchführbar ist, Spaltung des Fusionsproteins, Erniedrigung des pH-Werts, bis das abgespaltene Streptavidin und nicht gespaltenes Fusionsprotein präzipitieren, und Reinigung des gewünschten Peptids aus dem Überstand.

Das erfindungsgemäße Verfahren nutzt den Vorteil, daß Streptavidin-Fusionsproteine in Prokaryonten sehr gut exprimierbar sind und sich in Form von unlöslichen inaktiven Proteinen (inclusion bodies) isolieren lassen. In Denaturierungsmitteln solubilisierte Streptavidin-Fusionsproteine lassen sich bei pH-Werten über 8,5 so weit verdünnen, daß sie, ohne zu präzipitieren, mit einer Endoproteinase verdaut werden können.

Ein weiterer wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt darin, daß eine Naturierung des Fusionsproteins zum aktiven Protein nicht erforderlich ist. Schließlich können das freigesetzte Streptavidin und gegebenenfalls nicht gespaltenes Streptavidin-Fusionsprotein durch Präzipitation bei pH-Werten unter 6 vom gewünschten Peptid abgetrennt werden. Das

erfindungsgemäße Verfahren ist zur Herstellung einer Vielzahl von kurzkettigen Peptiden geeignet. Insbesondere ist das Verfahren zur Herstellung von natriuretischen Peptiden und Parathormonpeptiden geeignet.

Natriuretische Peptide (NP-Peptide) sind Peptide mit natriuretischer Aktivität, die im Herz-Ventrikel, der Nebenniere und dem Gehirn aus einem Precursorpolypeptid (Prohormon) gebildet werden und als Strukturelement einen Ring aus 17 Aminosäuren aufweisen, der durch eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten ausgebildet wird. Precursorpolypeptide sind z. B. das "atrial"-natriuretische Peptid (ANP 1 - 126) oder Cardiodilatin (CCD 1 - 126) und die "brain"-natriuretischen Peptide vom B- und C-Typ. Bevorzugte NP-Peptide leiten sich von dem "human α atrial-natriuretic peptide" ($h\alpha$ ANP) ab. Besonders bevorzugt sind dabei die C-terminalen $h\alpha$ ANP-Fragmente der Aminosäuren 95 - 126, 99 - 126 und 102 - 126.

Urodilatin (CDD 95 - 126) ist ein natriuretisches Peptid, welches aus humanem Urin gewonnen werden kann (Forssmann, K. et al. (1988) (23)). Das Peptid hat eine Länge von 32 Aminosäuren, bildet einen Ring aus 17 Aminosäuren durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten und gehört zu der Cardiodilatin/"atrial"-natriuretischen Peptid (CDD/ANP)-Familie. Es entsteht, ebenso wie α -ANP (99 - 126), aus dem ANP-Propeptid (ANP 1 - 126). Urodilatin (CCD 95 - 126) entsteht in vivo vermutlich durch Spaltung dieses Propeptids zwischen den Aminosäuren 94 und 95. Das ca. 3,5 kDa schwere Urodilatin-Peptid unterscheidet sich vom α -ANP (99 - 126)-Peptid durch eine 4-Aminosäuren-Verlängerung am N-Terminus. Die Aminosäuresequenz und die Struktur von Urodilatin sind beispielsweise in Drummer, C. et al. (1993) (24) beschrieben. Urodilatin bindet an die membranständigen ANP-Rezeptoren A und B und aktiviert eine an den Rezeptor gekoppelte intrazelluläre Guanylatcyklase. Dies bewirkt die Bildung des "second messengers" cGMP, der die diuretischen und natriuretischen Wirkungen in der Niere und die relaxierende Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur vermittelt. (Heim, J.M. (1989) (25)). Damit ist Urodilatin ein bevorzugtes Therapeutikum zur Prophylaxe und Therapie des akuten Nierenversagens, z. B. bei Patienten nach Herz- oder Lebertransplantation. (Bub, A. et al. (1992) (26); Drummer, C. et al. (1991) (27) und (1992) (28); Emmeluth, C. et al. (1992) (29); Goetz, K.L. et al. (1990) (30)).

Ebenfalls vorteilhaft kann das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Parathormon (PTH) sowie dessen Fragmente verwendet werden. Die DNA- und Aminosäuresequenz von PTH ist beispielsweise in Rokkones, E. et al. (1994) (16) beschrieben. Das humane Parathormon codiert für ein Pre-Pro-PTH Protein von 115 Aminosäuren. Nach Abspaltung der Signalsequenz und des Prosegments besitzt das gereifte PTH Hormon 84 Aminosäuren (PTH

1 - 84). Es hat sich gezeigt, daß PTH, welches rekombinant in *E.coli* und *S. cerevisiae* hergestellt wird, instabil ist und rasch abgebaut wird. Die Herstellung von PTH-Fusionsproteinen ist von Forsberg, G. et al. (1991) (17) beschrieben. Dazu wird eine Nukleinsäure hergestellt, welche für ein Fusionsprotein aus reifem PTH (1 - 84) und ein 15 kD schweres IgG-Bindeprotein codiert. Zwischen beide Proteinanteile ist eine Spaltstelle für Thrombin oder Subtilisin eingefügt. Auch dieses Fusionsprotein ist instabil und wird bei der Expression in *E.coli* bereits zu einem beträchtlichen Teil abgebaut. Auch durch Sekretion des reifen PTH (1 - 84) Hormones ins Periplasma von *E.coli* unter Verwendung der Protein A-Signalsequenz konnte die Degradation von PTH (1 - 84) nicht verhindert werden. Die Halbwertszeit von PTH (1 - 84) in *E.coli* beträgt nur wenige Minuten.

Von Gardella, T.J. et al (1990) (18) wird die Herstellung von PTH (1 - 84) in *E.coli* über ein mit Faktor Xa spaltbares Fusionsprotein beschrieben. Die Spaltung mit Faktor Xa ist jedoch sehr unvollständig (nach zwei Stunden ca. 50 % Spaltung) oder führt bei längerer Inkubation mit Faktor Xa ebenfalls zum Abbau von PTH (1 - 84).

Von Gram, H. et al. (1994) (19) wird ebenfalls die Herstellung eines PTH-Fragments (PTH 1 - 38) mittels eines Fusionsproteins in *E.coli* beschrieben. Zur Abspaltung des C-terminal fusionierten PTH (1 - 38) Peptids wurde ein Asp-Pro-Pro-Linker benutzt. Dieser läßt sich mittels eines 2-Stufenprozesses spalten/entfernen. In einer ersten Reaktion wird die säurelabile Asp-Pro-Peptidbindung chemisch hydrolysiert (Inkubation des Fusionsproteins in 60 mM HCl für 24 Std. bei 50°C). Danach wird in einer zweiten Reaktion das N-terminal verbleibende Pro-Pro-Dipeptid enzymatisch mit Dipeptidylpeptidase IV aus *L. lactis* entfernt. Dieses Verfahren ist jedoch zeitaufwendig und bedingt durch die saure Hydrolyse werden in beträchtlichem Umfang Nebenprodukte gebildet.

Die Spaltung der Fusionsproteine kann enzymatisch mit einer spezifisch spaltenden Proteinase (Restriktionsproteinase) erfolgen. Die Auswahl der Proteinase erfolgt unter Berücksichtigung der Aminosäuresequenz des herzustellenden Peptids. Es ist darauf zu achten, daß die Erkennungs-/Spaltsequenz der Restriktionsproteinase möglichst nicht in dem gewünschten Peptid und vorzugsweise auch nicht im Carrieranteil (Streptavidinanteil) des Fusionsproteins vorkommt, d.h. sie sollte nur einmal in der Spaltungsregion (Linkerregion) vorkommen. Als spezifisch spaltende Endoproteinasen sind z. B. Enterokinase, Faktor Xa, Thrombin, Subtilisin BPN Varianten / Ubiquitin Protein Peptidase, Renin, Collagenase, Trypsin, Chymotrypsin, Endoproteinase Lys-C, Kallekrein (Carter, P., (12)), TEV Proteinase (Parks, T.D. et al., Anal. Biochem. 216 (1994) 413 - 417) (36), IgA Proteinase (Pohlner, J. et al., Nature 325 (1987)

458 - 462) (37), Kex2p Proteinase (EP-A 0 467 839) (38) oder *S. aureus* V8 Proteinase geeignet.

Vorzugsweise wird Endoproteinase LysC, welche spezifisch am C-terminalen Ende von Lysin Proteine und Peptide spaltet, verwendet. Ein solches Enzym ist beispielsweise aus Pilzen oder Bakterien (DE 30 34 045 C2) bekannt. Endoproteinase LysC eignet sich besonders gut zur Herstellung von Peptiden, die keinen Lysinrest enthalten, wie z. B. Urodilatin.

Unter einer Peptidsequenz, welche durch eine Endoproteinase spaltbar ist, ist im Sinne der vorliegenden Erfindung eine kurzkettenige Peptidsequenz zu verstehen, welche vorzugsweise aus 5 - 15 Aminosäuren besteht und die eine Spaltstelle für die gewünschte Endoproteinase C-terminal enthält. Vorzugsweise enthält dieser Linker N-terminal von der gewünschten Endoproteinaseerkenntnissequenz zusätzlich eine Kombination aus mehreren Aminosäuren, ausgewählt aus den Aminosäuren Gly, Thr, Ser, Ala, Pro, Asp, Glu, Arg und Lys. Besonders bevorzugt wird ein Linker verwendet, in dem 2 - 8 dieser zusätzlichen Aminosäuren die negativ geladenen Aminosäuren Asp und/oder Glu sind.

Die Herstellung einer DNA, welche für das Fusionsprotein codiert, kann nach den bekannten Verfahren, wie sie bei Sambrook, J. et al. (1989) (6) beschrieben sind, erfolgen.

Als Streptavidin kann beispielsweise Streptavidin, wie in der EP-B 0 198 015 (7) und EP-A 0 612 325 (8) beschrieben, verwendet werden. Weitere Streptavidin-Derivate oder -Fragmente, wie beispielsweise von Sano, T. et al., (9) beschrieben, sind ebenfalls geeignet. Bevorzugt wird ein Streptavidin verwendet, welches am N-Terminus und/oder C-Terminus trunziert (verkürzt) ist. Dadurch wird die Aggregation und Proteolyse verhindert (Sano, T. et al., (9)). Vorzugsweise wird ein Streptavidin verwendet, welches mit den Aminosäuren 10 - 20 beginnt und mit den Aminosäuren 130 - 140 endet (Numerierung analog: Argarana, C. E. et al. (1986) (33)). Besonders bevorzugt wird ein Streptavidin der Aminosäuren 16 - 133 oder 13 - 139 verwendet.

Die Herstellung der Fusionsproteine erfolgt durch Expression einer DNA (Nukleinsäuresequenz), welche für das Fusionsprotein codiert, in Mikroorganismen, vorzugsweise in Prokaryonten. Damit das Protein in denaturierter, unlöslicher Form ("inclusion bodies") entsteht, sollte der verwendete Expressionsvektor keine Elemente enthalten, die eine Sekretion des Proteins ins Medium vermitteln. Die Herstellung einer für die Expression geeigneten DNA kann vorzugsweise synthetisch erfolgen. Derartige Verfahren sind dem Fachmann

geläufig und beispielsweise in Beattie, K.L. und Fowler, R.F. (1991) (34); EP-B 0 424 990 (35); Itakura, K. et al. (1977) (20) beschrieben. Die Nukleinsäuresequenz der erfindungsgemäßen Proteine kann zweckmäßig modifiziert sein. Derartige Modifikationen sind beispielsweise:

- Veränderung der Nukleinsäuresequenz, um verschiedene Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen zur Erleichterung der Schritte der Ligation, Klonierung und Mutagenese einzuführen.
- Veränderung der Nukleinsäuresequenz zum Einbau von bevorzugten Codons für die Wirtszelle.
- Ergänzung der Nukleinsäuresequenz um zusätzliche Regulations- und Transkriptionselemente, um die Expression in der Wirtszelle zu optimieren.

Alle weiteren Verfahrensschritte zur Herstellung von geeigneten Expressionsvektoren und zur Expression sind Stand der Technik und dem Fachmann geläufig. Beschrieben sind derartige Methoden beispielsweise bei Sambrook, J. et al. (1989) (6).

Fusionsproteine können sowohl in Prokaryonten als auch in anderen Zellen, beispielsweise in eukaryontischen Wirtszellen, wie Hefen (z. B. *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula* und *Kluyveromyces*) und Pilzen, wie *Aspergillus* und *Trichoderma* in Form unlöslicher Proteinaggregate, sogenannten "inclusion bodies" (IBs), anfallen. Inclusion bodies entstehen dann, wenn die Synthesegeschwindigkeit des Proteins in der Zelle größer ist als die Faltungsgeschwindigkeit zum aktiven nativen Protein. In diesem Fall aggregiert das Protein in der Zelle, vorzugsweise im Cytoplasma. Dort wird das Protein in denaturierter, verdichteter und unlöslicher Form in der Zelle abgelagert. Dadurch erfährt die Zelle eine möglichst geringe Störung ihrer anderen Zellfunktionen.

Als prokaryontische Wirtsorganismen sind beispielsweise *Escherichia*, *Streptomyces* oder *Bacillus* geeignet. Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Fusionsproteine werden die Mikroorganismen, vorzugsweise Prokaryonten, in üblicher Weise mit dem Vektor, welcher die für das Fusionsprotein codierende DNA enthält, transformiert und anschließend in üblicher Weise fermentiert. Nach Aufschluß der Zellen wird das unlösliche, inaktive Protein (IBs) in üblicher Weise, beispielsweise durch Zentrifugation (Pelletfraktion) isoliert. Die gewünschten unlös-

lichen Proteinaggregate können ggf. durch Waschen des Pellets, mit z. B. detergentienhaltigen Puffern, weiter angereichert werden.

Die IBs werden nach dem dem Fachmann geläufigen Verfahren mit einem Denaturierungsmittel, wie z.B. Guanidinhydrochlorid, Harnstoff oder einem Harnstoffderivat (vgl. z. B. US Patent Nr. 5,453,363) solubilisiert und durch Verdünnung oder Dialyse in einen geeigneten nicht denaturierenden Puffer (pH >8.5) überführt. Die Verdünnung erfolgt dabei in einer solchen Weise, daß das verbleibende Denaturierungsmittel die enzymatische Hydrolyse des Fusionsproteins nicht wesentlich beeinflußt.

Vorzugsweise erfolgt die Verdünnung pulsartig, beispielsweise durch Eintropfen des IB-Solubilisats in Puffer (pH >8.5), der kein Denaturierungsmittel enthält.

Eine solche pulsartige Verdünnung ermöglicht eine praktisch gleichzeitige Entfernung der Wirkung des Denaturierungsmittels und Vereinzelung der zu solubilisierenden Moleküle. Dadurch wird eine nicht erwünschte intermolekulare Wechselwirkung (Aggregation) der zu solubilisierenden Moleküle weitgehend vermieden.

Überraschenderweise hat es sich gezeigt, daß die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Fusionsproteine in den Wirtszellen nicht abgebaut werden und sich enzymatisch vollständig spalten lassen, ohne daß im Peptidanteil selbst (z. B. PTH oder Urodilatin) in nennenswertem Umfang eine Spaltung stattfindet.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere geeignet zur Herstellung von Urodilatin, Parathormon und deren Fragmente. Besonders bevorzugt werden die Urodilatinfragmente der Aminosäuren 95 - 126, 99 - 126 oder 102 - 126 sowie das Parathormonfragment der Aminosäuren 1 - 37 hergestellt.

Die folgenden Beispiele, Publikationen, die Sequenzprotokolle und die Abbildungen erläutern die Erfindung, deren Schutzzumfang sich aus den Patentansprüchen ergibt, weiter. Die beschriebenen Verfahren sind als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

Fig. 1 zeigt die gemäß Beispiel 1 erhaltenen DNA-Segmente A und B.

Fig. 2 zeigt die gemäß Beispiel 2 erhaltenen DNA-Segmente C und D.

Fig. 3 zeigt das gemäß Beispiel 3 erhaltene DNA-Segment E und das gemäß Beispiel 4 erhaltene DNA-Segment F.

Beispiel 1

Konstruktion des core-SA-URO(95-126) Fusionsgens mit Endoproteinaselinker (Plasmid: pSA-EK-URO)

core-SA: verkürztes Streptavidin der Aminosäuren Met-(13 - 139)

URO (95 - 126): Urodilatin oder Cardiodilatinfragment der Aminosäuren 95 - 126 (Sequenz beschrieben in Drummer, C. et al. (1993) (24)).

Der Expressionsvektor für das core-SA-URO(95-126) Fusionsgen mit Endoproteinaselinker LysC-Spaltstelle basiert auf dem Expressionsvektor pSAM-CORE für core-Streptavidin. Die Herstellung und Beschreibung des Plasmids pSAM-CORE ist in der WO 93/09144 (11) beschrieben. Zur Konstruktion von core-SA Fusionsproteinen wurde die singuläre am 3'-Ende lokalisierte NheI Restriktionsschnittstelle vor dem Stopcodon des core-SA Gens benutzt.

Ein ca. 140 Bp langes für den Linker [VDDDDK] (SEQ ID NO:1) und das Urodilatin(95-126) Polypeptid [TAPRSLRRSSCFGGRMDRIGASGLGCNSFRY] (SEQ ID NO:2) kodierendes DNA-Fragment wurde aus 2 ca. 70 Bp langen chemisch hergestellten DNA Segmenten zusammengesetzt. Beim "Gendesign" wurden die in E. coli bevorzugt benutzten Codone (E. coli "Codonusage") berücksichtigt und die einzelnen DNA Segmente mit geeigneten singulären Restriktionsendonukleaseschnittstellen an den Enden versehen.

In zwei Ansätzen wurden die komplementären Oligonukleotide 1 (SEQ ID NO:3) und 2 (SEQ ID NO:4)

1

AATTCGCTAGCGTTGACGACGATGACAAAACGGCGCCGCGTTCCCTGCGTAGATC
TTCCTGCTTCGGC (SEQ ID NO:3)

2

GGCCGCCGAAGCAGGAAGATCTACGCAGGGAACGCGGCGCCGTTTTGTCATCGTC
GTCAACGCTAGCG (SEQ ID NO:4)

zu dem DNA Segment A (Fig. 1) und die Oligonukleotide 3 (SEQ ID NO:5) und 4 (SEQ ID NO:6)

3

GGCCGCATGGACCGTATCGGTGCTCAGTCCGGACTGGGTTGCAACTCCTTCCGTT
ACTAATGA (SEQ ID NO:5)

4

AGCTTCATTAGTAACGGAAGGAGTTGCAACCCAGTCCGGACTGAGCACCGATACG
GTCCATGC (SEQ ID NO:6)

zu dem DNA Segment B, (Fig. 1) "annealt" (Reaktionspuffer: 12,5 mmol/l Tris-HCl, pH 7,0 und 12,5 mmol/l MgCl₂ ; Oligonukleotid-Konzentration: jeweils 1 pmol / 60 µl) und die Hybridisierungsprodukte A und B jeweils in die Polylinkerregion des E. coli pUCBM21 Vektors (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) subkloniert (DNA Segment A, Schnittstellen: EcoRI und NotI; DNA Segment B, Schnittstellen: NotI und HindIII). Mittels DNA Sequenzierung wurde die DNA Sequenz der beiden subklonierten DNA Segmente bestätigt. Danach wurde das Expressionsplasmid pSA-EK-URO für das core-SA-URO(95-126) Fusionsgen in einer Dreifragmentligation aus dem Nhe/NotI-DNA Segment A , dem NotI/HindIII-DNA Segment B und dem ca. 2,9 kbp langen NheI/HindIII-pSAM-CORE Vektorfragment zusammengesetzt. Dabei wurden die DNA Segmente A und B nach Doppelverdau mit den entsprechenden Endonukleasen aus den entsprechenden pUCBM21 Plasmidderivaten isoliert. Das gewünschte Plasmid pSA-EK-URO wurde durch Restriktionskartierung identifiziert und die DNA Sequenz des Linker-Urodilatin-Bereichs erneut durch DNA Sequenzierung überprüft.

Beispiel 2**Konstruktion des core-SA-PTH(1-37) Fusionsgens mit Enterokinaselinker
(Plasmid: pSA-EK-PTH)**

PTH (1 - 37): Parathormonfragment der Aminosäuren 1 - 37, Aminosäuresequenz beschrieben in Handy, G.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 7365 - 7369 (39).

Der Vektor pSA-EK-PTH zur Expression des core-SA-PTH(1-37) Fusionsgens mit Enterokinasespaltstelle wurde gemäß der im Beispiel 1 beschriebenen Strategie für das core-SA-URO(95-126) Fusionsgen mit Enterokinasespaltstelle hergestellt.

In zwei Ansätzen wurden die komplementären Oligonukleotide 5 (SEQ ID NO:7) und 6 (SEQ ID NO:8)

5
AATTCGCTAGCGGTACCGTCGACGACGATGACAAATCCGTTTCCGAAATCCAGCT
GATGCACAACCTGGGTAAACACCTGAACTC (SEQ ID NO:7)

6
CATGGAGTTCAGGTGTTTACCCAGGTTGTGCATCAGCTGGATTTCCGAAACGGAT
TTGTCATCGTCGTCGACGGTACCGCTAGCG (SEQ ID NO:8)

zu dem DNA Segment C (Fig. 2) und die Oligonukleotide 7 (SEQ ID NO:9) und 8 (SEQ ID NO:10)

7
CATGGAACGTGTTGAATGGCTGCGTAAAAAACTGCAGGACGTTCACTTCGTT
GCTCTGTAATGA (SEQ ID NO:9)

8
AGCTTCATTACAGAGCAACGAAGTTGTGAACGTCCTGCAGTTTTTTACGCAGCCA
TTCAACACGTTT (SEQ ID NO:10)

zu dem DNA Segment D (Fig. 2) "annealt" (Reaktionspuffer: 12,5 mmol/l Tris-HCl, pH 7,0 und 12,5 mmol/l MgCl₂ ; Oligonukleotid-Konzentration: jeweils 1 nmol / 60 µl) und die Hybridisierungsprodukte C und D jeweils in die Polylinkerregion des E. coli pUCBM21 Vektors subkloniert (DNA Segment C, Schnittstellen: EcoRI und NcoI; DNA Segment D, Schnittstellen: NcoI und HindIII). Mittels DNA Sequenzierung wurde die DNA Sequenz der beiden subklonierten DNA Segmente bestätigt. Danach wurde das Expressionsplasmid pSA-EK-PTH für das core-SA-EK-PTH(1-37) Fusionsgen in einer Dreifragmentligation aus dem NheI/NcoI-DNA Segment C , dem NcoI/HindIII-DNA Segment D und dem ca. 2,9 kBp langen NheI/HindIII-pSAM-CORE Vektorfragment zusammengesetzt. Dabei wurden die DNA Segmente C und D nach Doppelverdau mit den entsprechenden Endonukleasen aus den entsprechenden pUCBM21 Plasmidderivaten isoliert. Das gewünschte Plasmid pSA-EK-PTH wurde durch Restriktionskartierung identifiziert und die DNA Sequenz des Enterokinaselinker-PTH-Bereichs erneut durch DNA Sequenzierung überprüft.

Beispiel 3

Konstruktion des core-SA-PTH(1-37) Fusionsgens mit Thrombinlinker (Plasmid: pSA-THRO-PTH)

Das Plasmid pSA-THRO-PTH leitet sich von dem core-SA-EK-PTH Expressionsplasmid pSA-EK-PTH (siehe Beispiel 2) ab, indem die kodierende Region für den Enterokinaselinker durch einen Thrombinlinker ersetzt wurde.

Die Aminosäuresequenz des verwendeten Thrombinlinkers [GDFLAEGLVPR] (SEQ ID NO:15) basiert auf der natürlichen Thrombinspaltstelle in Fibrinogen (Aminosäureposition: 6-16) und der minimalen Erkennungssequenz für Thrombin (Carter, P. In: Ladisch, M.R.; Willson, R.C.; Painton, C.C.; Builder, S.E. eds. (1990) (12)).

Dazu wurde das Plasmid pSA-EK-PTH mit NheI und PvuII verdaut, das ca. 2,9 kBp lange NheI/PvuII-pSA-EK-PTH Vektorfragment isoliert und mit dem aus den 2 komplementären Oligonukleotiden 9 (SEQ ID NO:11) und 10 (SEQ ID NO:12) durch Hybridisierung hergestellten DNA Segment E (Fig. 3) ligiert.

9

CTAGCCCGGGTGACTTCCTGGCTGAAGGTCTGGTTCGCGTTCCGTTTCCGAAATC
CAG (SEQ ID NO:11)

10

CTGGATTTCGGAAACGGAACGCGGAACCAGACCTTCAGCCAGGAAGTCACCCGG
G (SEQ ID NO:12)

Die gewünschte Plasmidkonstruktion pSA-THRO-PTH wurde durch Restriktionskartierung identifiziert und die ausgetauschte Linkerregion durch DNA Sequenzierung überprüft.

Beispiel 4**Konstruktion des core-SA-PTH(1-37) Fusionsgens mit TEV Linker (Plasmid: pSA-TEV-PTH)**

Das Plasmid pSA-TEV-PTH leitet sich von dem core-SA-EK-PTH Expressionsplasmid pSA-EK-PTH (siehe Beispiel 2) ab, indem die kodierende Region für den Enterokinaselinker durch einen TEV Linker ersetzt wurde.

Die Pflanzenvirus TEV NIa Proteinase ("tobacco etch virus") erkennt die Aminosäuresequenz ENLYFQ↓G/S und spaltet zwischen Gln und Gly oder Ser (Dougherty, W.G. et al., (1988)) (13). Das rekombinat hergestellte Enzym wurde von GIBCO BRL (Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD, USA) bezogen.

Dazu wurde das Plasmid pSA-EK-PTH mit NheI und PvuII verdaut, das ca. 2,9 kBp lange NheI/PvuII-pSA-EK-PTH Vektorfragment isoliert und mit dem aus den 2 komplementären Oligonukleotiden 11 (SEQ ID NO:13) und 12 (SEQ ID NO:14) durch Hybridisierung hergestellten DNA Segment F (Fig. 3) ligiert.

11

CTAGCGGATCCGAAAACCTGTACTTCCAGTCCGTTTCCGAAATCCAG
(SEQ ID NO:13)

12

CTGGATTTCGGAAACGGACTGGAAGTACAGGTTTTTCGGATCCG
(SEQ ID NO:14)

Die gewünschte Plasmidkonstruktion pSA-TEV-PTH wurde durch Restriktionskartierung identifiziert und die ausgetauschte Linkerregion durch DNA Sequenzierung überprüft.

Beispiel 5

Expression der core-SA Fusionsproteine in *E. coli*

Zur Expression der core-SA Fusionsproteine wurde der *E. coli* K12 Stamm RM82 (eine Methionin Revertante von ED 8654, Murray, N.E. et al.(1977)) (14) jeweils mit einem der in den Beispielen 1 - 4 beschriebenen Expressionsplasmiden pSA-EK-URO, pSA-EK-PTH, pSA-THRO-PTH und pSA-TEV-PTH (Ampicillin-Resistenz) und dem lacI^q-Repressorplasmid pUBS500 (Kanamycin-Resistenz, Herstellung und Beschreibung siehe: EP-A 0368342) transformiert.

Die RM82/pUBS500/pSA-EK-URO, RM82/pUBS500/pSA-EK-PTH, RM82/pUBS500/pSA-THRO-PTH und RM82/pUBS500/pSA-TEV-PTH Zellen wurden in DYT-Medium (1% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) Bacto Tryptone (Difco, Detroit, USA) und 0,5% NaCl), mit 50 mg/l Ampicillin und 50 mg/l Kanamycin bis zu einer optischen Dichte bei 550 nm von 0,6 - 0,9 angezogen und anschließend mit IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) (1 - 5 mmol/l Endkonzentration) induziert. Nach einer Induktionsphase von 4 - 8 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und die Zellpellets mit 25 mmol/l Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 gewaschen.

Expressionsanalyse

Die Zellpellets aus jeweils 1 ml abzentrifugiertem Anzuchtmedium (RM82/pUBS500/pSA-EK-URO, RM82/pUBS500/pSA-EK-PTH, RM82/pUBS500/pSA-THRO-PTH und RM82/pUBS500/pSA-TEV-PTH Zellen) wurden in 0,25 ml 10 mmol/l Phosphatpuffer, pH 6,8 und 1 mmol/l EDTA resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit 1/5 Volumen 5xSDS-Probenpuffer (1xSDS-Probenpuffer: 50 mmol/l Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 1% Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 0.001% Bromphenolblau) versetzt. Die unlösliche Zelltrümmerfraktion wurde in 0,3 ml 1xSDS-Probenpuffer mit 6 - 8 M Harnstoff resuspendiert, die Proben 5 Minuten bei 95°C inkubiert und zentrifugiert. Danach wurden die Proteine durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt (Laemmli, U.K. (1970)) (15) und mit Coomassie Brilliant Blue R Farbstoff angefärbt.

Die in *E. coli* synthetisierten core-SA Fusionsproteine waren homogen und wurden ausschließlich in der unlöslichen Zelltrümmerfraktion gefunden (IBs). Die Expressionshöhe für die core-SA Fusionsproteine betrug 30 - 50% bezogen auf das *E. coli* Gesamtprotein.

Beispiel 6

Zellyse und Präparation der "inclusion bodies" (IBs)

Jeweils 200 g (Naßgewicht) *E. coli* RM82/pUBS500/pSA-EK-URO, RM82/pUBS500/pSA-EK-PTH, RM82/pUBS500/pSA-THRO-PTH und RM82/pUBS500/pSA-TEV-PTH Zellen wurden in 1 l 0,1 mol/l Tris-HCl, pH 7,0 bei 0°C suspendiert, 300 mg Lysozym zugegeben und 20 Minuten bei 0°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mechanisch mittels Hochdruckdispersion vollständig aufgeschlossen und die DNA durch Zugabe von 2 ml 1 mol/l MgCl₂ und 10 mg DNase (Boehringer Mannheim # 154709) bei 25°C in 30 Minuten verdaut. Anschließend wurden zur Aufschlußlösung 500 ml 60 mmol/l EDTA, 6% Triton[®] X100 und 1,5 mol/l NaCl, pH 7,0 zugemischt und weitere 30 Minuten bei 0°C inkubiert. Danach wurden die unlöslichen Bestandteile (Zelltrümmer und IBs) durch Zentrifugation sedimentiert.

Das Pellet wurde in 1 l 0,1 mol/l Tris-HCl, 20 mmol/l EDTA, pH 6,5 suspendiert, 30 Minuten bei 25°C inkubiert und das IB-Präparat durch Zentrifugation isoliert.

Solubilisierung der IBs

25 g IB-Pellet (Naßgewicht) wurden in 200 ml 10 mmol/l Tris-HCl Puffer, 8 mol/l Harnstoff, 10 mmol/l EDTA, pH 7,0 durch 2-stündiges Rühren bei 25°C suspendiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt und der klare Überstand weiterverarbeitet.

Beispiel 7

Verdünnung des Solubilisats

Die Verdünnung wurde in einem BioFloII-Fermenter (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, N.J., USA) bei 25°C unter Rühren (300 UPM) durch kontinuierliche Zugabe von 200 ml Core-SA-Fusionsprotein-Solubilisat in 3,8 l 50 mmol/l Tris HCl pH 9,0 mittels einer Pumpe (Fördermenge 15-40 ml/Std.) bewirkt.

Beispiel 8**Enzymatische Spaltung der Core-SA Fusionsproteine****Enterokinase Spaltung (ValAsp4Lys-Spaltsequenz)**

Die core-SA Fusionsproteine mit Enterokinaseschnittstelle wurden in einer Konzentration von 0,3 bis 3 mg/ml und einem Substrat / Proteinase Verhältnis von 1:20 bis 1:250 (Enterokinase, Restriktionsproteinase aus Kälberdarm, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) in 50 mmol/l Tris-HCl, pH 8,0 bei 30°C verdaut und der zeitliche Verlauf der enzymatischen Spaltung (Kinetik) durch analytische Reversed Phase HPLC (siehe Beispiel 9.1) analysiert. Dazu wurden aus dem Reaktionsansatz über einen Zeitraum von 6 bis 24 Stunden Proben (10 bis 100 µl) im Abstand von 1 bis 3 Stunden entnommen.

LysC Endoproteinase Spaltung (Lys-Spaltstelle)

Das Core-SA-EK-URO Fusionsprotein wurde in einer Konzentration von 0,3 bis 3 mg/ml und einem Substrat / Proteinase Verhältnis von 1:1000 bis 1:25000 (LysC Endoproteinase aus Lysobacter enzymogenes, sequencing grade; Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) in 50 mmol/l Tris-HCl, pH 8,0 bei 30 bis 35°C verdaut und der zeitliche Verlauf der enzymatischen Spaltung durch analytische Reversed Phase HPLC (siehe Beispiel 9.1) analysiert. Dazu wurden aus dem Reaktionsansatz über einen Zeitraum von 6 bis 24 Stunden Proben (10 bis 100 µl) im Abstand von 1 bis 3 Stunden entnommen.

Thrombin Spaltung (GDFLAEGLVPR-Spaltsequenz)

Das Core-SA-THRO-PTH Fusionsprotein wurde in einer Konzentration von 0,3 bis 3 mg/ml und einem Substrat / Proteinase Verhältnis von 1:50 bis 1:500 (Thrombin aus Humanplasma, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) in 50 mmol/l Tris-HCl, pH 8,8 bei 25 bis 30°C verdaut und der zeitliche Verlauf der enzymatischen Spaltung durch analytische Reversed Phase HPLC (siehe Beispiel 9.1) analysiert. Dazu wurden aus dem Reaktionsansatz über einen Zeitraum von 6 bis 24 Stunden Proben (10 bis 100 µl) im Abstand von 1 bis 3 Stunden entnommen.

TEV Nla Proteinase Spaltung (GluAsnLeuTyrPheGln↓Gly/Ser-Spaltsequenz)

Das Core-SA-TEV-PTH Fusionsprotein wurde in einer Konzentration von 0,3 bis 3 mg/ml und einem Substrat / Proteinase Verhältnis von 1:50 bis 1:500 (rekombinante TEV Nla Restriktionsproteinase, GIBCO BRL Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD, USA) in 50 mmol/l Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 mmol/l EDTA und 1 mmol/l DTT bei 30°C verdaut und der zeitliche Verlauf der enzymatischen Spaltung durch analytische Reversed Phase HPLC (siehe Beispiel 9.1) analysiert. Dazu wurden aus dem Reaktionsansatz über einen Zeitraum von 6 bis 24 Stunden Proben (10 bis 100 µl) im Abstand von 1 bis 3 Stunden entnommen.

Beispiel 9**Abtrennung von Core-SA und nicht gespaltenem Core-SA Fusionsprotein durch Präzipitation**

Das freigesetzte Core-SA Trägerprotein und nicht gespaltenes Core-SA Fusionsprotein wurden aus dem Spaltungsansatz durch pH-Erniedrigung (pH < 6) präzipitiert. Der Spaltungsansatz wurde mit 1 mol/l Zitronensäure bis zu einer Endkonzentration von 25 mmol/l versetzt, auf pH 3,0 eingestellt und das Präzipitat durch Zentrifugation oder Filtration abgetrennt.

Beispiel 10**Reinigung der Peptide URO(95-126) und PTH(1-37)**

Die enzymatisch freigesetzten Peptide können mit chromatographischen Methoden, die dem Fachmann bekannt sind, weiter gereinigt werden.

10.1 Reinigung der Peptide durch Kationenaustauschchromatographie an Fractogel EMD-SO₃ 650(M)

Der Spaltungsansatz wurde auf eine mit 25 mmol/l Citronensäure, pH 3,0 äquilibrierte Fractogel EMD-SO₃⁻-650(M) Säule (3 x 40 cm, V = 283 ml) der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) beladen (1 SV/Std.) und so lange mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen, bis die Absorption des Eluats bei 280 nm den Leerwert des Puffers erreichte. Die Elution des gebundenen Materials erfolgte durch einen Gradienten von 0 bis 1 mmol/l NaCl in Äquilibrierungspuffer (10 bis 20 SV, 1 SV/Std.).

10.2 Reinigung der Peptide durch Reversed Phase HPLC

Nach Vorreinigung der Peptide mittels Kationenaustauschchromatographie (siehe: Beispiel 10.1) wurde ein Aliquot von 1 bis 2 ml (ca. 100 bis 300 µg) durch semipräparative RP-HPLC unter Fraktionierung weiter aufgereinigt.

Chromatographiebedingungen:

| | |
|----------------|---|
| Säule: | Eurospher 100-C ₈ , 5 µm (4 x 250 mm, V = 3,17 ml) Knauer, Berlin, Deutschland) |
| Probenvolumen: | 1 - 2 ml (100 - 300 µg Protein) |
| Detektor: | UV, 220 nm |
| Flußrate: | 0,5 ml/min |
| Fließmittel: | |
| - A: | 0.13% TFA in H ₂ O |
| - B: | 0.1% TFA, 80% Acetonitril, 20% H ₂ O (v/v) |

Beispiel 11

Analytische Reversed Phase (HPLC)

Die analytische reversed phase (HPLC) wurde mit einer Europhersäule durchgeführt (Europher 100-C₈, 5 µm (4 x 250 mm, V = 3,17 ml, Knauer, Berlin, Deutschland). Das Probenvolumen betrug 10 - 100 µl, entsprechend 1 - 100 µg Protein. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei 220 nm. Chromatographiert wurde mit einer Flußrate von 0,5 ml/min.

Fließmittel:

A: 0,13 % Trifluoressigsäure in H₂O (Gradient 100 - 0 % in 50 min)

B: 0,1 % Trifluoressigsäure, 80 % Acetonitril, 20 % H₂O (v/v) (Gradient 0 - 100 % in 50 min).

Beispiel 12**Charakterisierung der gereinigten Peptide**

Die Identität und Reinheit der gereinigten Peptide wurde durch Massenspektroskopie (PD-MS und Laser-Desorptionsspektroskopie), analytische reversed phase HPLC, isoelektrische Fokussierung (Bark, J.E. et al., J. Forensic Sci. Soc. 16 (1976) 115 - 120 (42), SDS PAGE (Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680 - 685 (43)) und Kapillar-Elektrophorese, im Vergleich mit einem chemisch hergestellten Standard, überprüft.

Referenzliste

- 1) Kent, S.B.H. et al., Banburi Rep. 29 (1988) 3 - 20
- 2) Hodson, J.H., Bio/Technology 11 (1993) 1309 - 1310
- 3) Kopetzki, E. et al., Clin. Chem. 40 (1994) 688 - 704
- 4) Winnacker, E.-L.: VCH Publishers, Weinheim and New York (1987)
- 5) Harris, T.J.R. In: Genetic Engineering (Williamson, R. ed.), Academic Press, London, vol. 4 (1983) 127 - 185
- 6.) Sambrook, J. et al. (1989) In: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- 7) EP-B 0 198 015
- 8) EP-A 0 612 325
- 9) Sano, T., Biochem. Biophys. Res. Commun. 176 (1991) 571 - 577
- 10.) Sano, T. et al., Proc Natl. Acad. Sci., USA 89 (1992) 1534 - 1538
- 11.) WO 93/09144
- 12.) Carter, P. In: Ladisch, M.R.; Willson, R.C.; Painton, C.C.; Builder, S.E. eds. Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large-Scale Processes. ACS Symposium Series No. 427, American Chemical Society, (1990) 181-193
- 13.) Dougherty, W.G. et al., EMBO J. 7 (1988) 1281-1287
- 14.) Murray, N.E. et al., Mol. Gen. Genet. 150 (1977) 53-61
- 15.) Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685
- 16.) Rokkones, E. et al., J. Biotechnol. 33 (1994) 293 - 306
- 17.) Forsberg, G. et al., in: J. Prot. Chem. 10 (1991) 517 - 526
- 18.) Gardella, T.J. et al., J. Biol. Chem. 265 (1990)
- 19.) Gram, H. et al., Bio/Technology 12 (1994) 1017 - 1023
- 20.) Itakura, K. et al., Science 198 (1977) 1056-1063
- 21.) EP-B 0 001 930
- 22.) Sharma, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 1534-1538
- 23.) Forssmann, K. et al., Clin. Wochensh. 66 (1988) 752 - 759
- 24.) Drummer, C. et al., Pflügers Archiv, European J. of Physiol. 423 (1993) 372 - 377
- 25.) Heim, J.M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 163 (1989) 37 - 41
- 26.) Bub, A. et al., Histochem. J. (Suppl.) 24 (1992) 517
- 27.) Drummer, C. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 1 (1991) 1109 - 1113
- 28.) Drummer, C. et al., Am. J. Physiol. 262 (1992) F 744 - 754
- 29.) Emmeluth, C. et al., Am. J. Physiol. 262 (1992) F 513 - F 516

- 30.) Goetz, K.L. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 1 (1990) 867 - 874
- 31.) DE 30 34 045 C2
- 32.) Allen, G. et al., J. Cell. Sci. Suppl. 3 (1985) 29
- 33.) Argarana C.E. et al., Nucl. Acids Res. 14 (1986) 1871 - 1882
- 34.) Beattie, K.L. und Fowler, R.F., Nature 352 (1991) 548 - 549
- 35.) EP-B 0 424 990
- 36.) Parks, T.D. et al., Anal. Biochem. 216 (1994) 413 - 417
- 37.) Pohlner, J. et al., Nature 325 (1987) 458 - 462
- 38.) EP-A 0 467 839
- 39.) Handy, G.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 78 (1981) 7365 - 7369

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
- (B) STRASSE: Sandhofer Str. 116
- (C) ORT: Mannheim
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: D-68305
- (G) TELEFON: 08856/60-3446
- (H) TELEFAX: 08856/60-3451

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur Herstellung von
Peptiden ueber
Streptavidin-Fusionsproteine

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 15

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30B (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Val Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 32 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- 22 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Ala | Pro | Arg | Ser | Leu | Arg | Arg | Ser | Ser | Cys | Phe | Gly | Gly | Arg | Met |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | | 15 | |
| Asp | Arg | Ile | Gly | Ala | Gln | Ser | Gly | Leu | Gly | Cys | Asn | Ser | Phe | Arg | Tyr |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 68 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AATTCGCTAG CGTTGACGAC GATGACAAAA CGGCGCCGCG TTCCCTGCGT AGATCTTCCT 60
GCTTCGGC 68

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 68 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GGCCGCCGAA GCAGGAAGAT CTACGCAGGG AACGCGGCGC CGTTTTGTCA TCGTCGTCAA 60
CGCTAGCG 68

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 63 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetische Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GGCCGCATGG ACCGTATCGG TGCTCAGTCC GGACTGGGTT GCAACTCCTT CCGTTACTAA 60
TGA 63

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 63 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AGCTTCATTA GTAACGGAAG GAGTTGCAAC CCAGTCCGGA CTGAGCACCG ATACGGTCCA 60
TGC 63

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 85 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

AATTCGCTAG CGGTACCGTC GACGACGATG ACAAATCCGT TTCCGAAATC CAGCTGATGC 60
ACAACCTGGG TAAACACCTG AACTC 85

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 85 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CATGGAGTTC AGGTGTTTAC CCAGGTTGTG CATCAGCTGG ATTCGGAAA CGGATTTGTC 60
ATCGTCGTCG ACGGTACCGC TAGCG 85

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 67 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CATGGAACGT GTTGAATGGC TCGGTAAAAA ACTGCAGGAC GTTCACAACT TCGTTGCTCT 60
GTAATGA 67

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 59 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CTAGCCCGGG TGACTTCCTG GCTGAAGGTC TGGTTCCGCG TTCCGTTTCC GAAATCCAG 59

- 26 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

CTAGCCCGGG TGACTTCCTG GCTGAAGGTC TGGTCCGCG TTCCGTTTCC GAAATCCAG 59

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 55 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

CTGGATTTTCG GAAACGGAAC GCGGAACCAG ACCTTCAGCC AGGAAGTCAC CCGGG 55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 47 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

CTAGCGGATC CGAAAACCTG TACTTCCAGT CCGTTTCCGA AATCCAG 47

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- 27 -

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches Oligonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

CTGGATTTCG GAAACGGACT GGAAGTACAG GTTTTCGGAT CCG

43

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

| | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Asp | Phe | Leu | Ala | Glu | Gly | Leu | Val | Pro | Arg |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | |

Patentansprüche

1. Verfahren zur rekombinanten Herstellung eines Peptids durch Expression einer DNA in Mikroorganismen, welche für ein Fusionsprotein aus Streptavidin und dem genannten Peptid codiert, wobei Streptavidin und Peptid über eine Peptidsequenz, welche durch eine Endoproteinase spaltbar ist, verbunden sind, Isolierung des unlöslichen, inaktiven Fusionsproteins, Solubilisierung des inaktiven Fusionsproteins mit einem Denaturierungsmittel, Verdünnung des Denaturierungsmittels bei einem pH-Wert zwischen 8,5 und 11, bis die Spaltung des Fusionsproteins durch eine Endoproteinase durchführbar ist, Spaltung des Fusionsproteins, Erniedrigung des pH-Werts, bis das abgespaltene Streptavidin und nicht gespaltenes Fusionsprotein präzipitieren, und Reinigung des gewünschten Peptids aus dem Überstand.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verdünnung des solubilierten, inaktiven Proteins in wäßrige Pufferlösung erfolgt.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Peptid Urodilatin, Parathormon oder ein davon abgeleitetes Fragment verwendet wird.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Peptid ein Fragment von Urodilatin (95 - 126) der Aminosäuren 99 - 126 oder 102 - 126 oder ein Fragment von Parathormon der Aminosäuren 1 - 37 verwendet wird.

Fig. 1

A

```

EcoRI  NheI
5'-AATTTCGCTAGCGTTGACGACGATGACAAAACGGCGCGCGTTCCTGCGTAGATCTTCCTGCTTCGGC -3'
3'-      GCGATCGCAACTGCTGCTACTGTTTTGCCGCGCGCAAGGACGCACTCTAGAAGGACGAAGCCGCCGG-5'
      AlaSerValAspAspAspLysThrAlaProArgSerLeuArgArgSerCysPheGlyGly
--- Core-SA||Enteroki.-Linker||----- Urodilatin(95-126) ----->

```

B

```

NotI
5'-GGCCCGCATGGACCGTATCGGTGCTCAGTCCGGACTGGGTGCAACTCCTTCCGTTACTAATGA -3'
3'-      CGTACCTGGCATAGCCACGAGTCAGGCCCTGACCCAACGTTGAGGAAGGCAATGATTACTTCGA-5'
      ArgMetAspArgIleGlyAlaGlnSerGlyLeuGlyCysAsnSerPheArgTyrStop
----- Urodilatin(95-126) -----|

```


Fig. 2

C

```

EcoRI  NheI
5'-aattcGCTAGCGGTACCGTCGACGACGATGACAAATCCGTTTCCGAAATCCAGCTGATGCACAACCTGGGTAACACACCTGAACTC-3'
3'-gCGATCGCCATGGCAGCTGCTGCTACTGTTTAGGCAAAAGGCTTTAGGTCGACTACGTGTTGGACCCATTGTGGACTTGAGGTAC-5'
AlaSerGlyThrValAspAspAspLysSerValSerGluIleGlnLeuMetHisAsnLeuGlyLysHisLeuAsnSerMet
--- Core-SA|| Enterokinaselinker ||---- PTH(1-37) ----->
```

D

```

NcoI
5'-CATGGAACGTGTTGAATGGCTGCGTAAATAAAGTGCAGGACGTTTCCAACTTCGTTGCTCTGTAATGA-3'
3'-CTTGCAACAATTACCGACGCAATTTTGGACGTCCTGCAAGTGTGAAGCAACGAGACATTACTTCGA-5'
GluArgValGluTrpLeuArgLysLysLeuGlnAspValHisAsnPheValAlaLeuStop
----- PTH(1-37) -----|
```


Fig. 3

NheI
5'-CTAGCCCGGTGACTTCTGGCTGAAGGTCTGGTTCGCGTTCGGTTCCGAAATCCAGCTG-3'
3'-GGCCCACTGAAGGACCGACTTCCAGACCAAGCGCAGGCTTAGGTCGAC-5'
SerProGlyAspPheLeuAlaGluGlyLeuValProArgSerValSerGluIleGlnLeu
core-SA||----- Thrombin-Linker -----||--- PTH(1-37) --->
(PvuII)

F

NheI
5' - CTAGCGGATCCGAAACCTGTACTTCCAGTCCGTTCCGAAATCCAGCTG - 3' (PvuII)
3' - GCCTAGGCTTTTGGACATGAAGTCAGGCAAGGCTTAGGTCGAC - 3'
AlaSerGlySerGluAsnLeuTyrPheGlnSerValSerGluIleGlnLeu
core-SA || --- TEV Nla-Linker --- || --- PTH(1-37) --->

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No
PCT/EP 96/04850

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/62 C07K14/58 C07K14/36 C07K14/635

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)

IPC 6 C07K

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 practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| Y | EP 0 528 686 A (SUNTORY LTD) 24 February 1993 see the whole document in particular examples 4, 8 and claim 2 --- | 1-4 |
| Y | GB 2 180 539 A (GLAXO GROUP LTD) 1 April 1987 see the whole document --- | 1-4 |
| Y | JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 102, no. 1, July 1987, pages 111-122, XP002022296 Y. SAITO ET AL: "Bacterial synthesis of recombinant alpha human atrial natriuretic polypeptide" see the whole document --- -/-- | 1-4 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "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)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "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
- "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
- "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
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 February 1997

Date of mailing of the international search report

20.02.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Van der Schaal, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No
PCT/EP 96/04850

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 265, no. 26, 15 September 1990, MD US, pages 15854-15859, XP002024631 T. GARDELLA ET AL: "Expression of human parathyroid hormone-(1-84) in Escherichia coli as a Factor X-cleavable fusion protein" see the whole document --- | 1-4 |
| Y | JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 8, 15 March 1989, MD US, pages 4367-4373, XP002024630 E. WINGENDER ET AL: "Expression of human parathyroid hormone in Escherichia coli" see the whole document --- | 1-4 |
| Y | WO 86 02077 A (MEADE HARRY M;GARWIN JEFFREY L; BIOGEN NV) 10 April 1986 see the whole document in particular page 5, line 36 - page 6, line 27 --- | 1-4 |
| Y | WO 89 03422 A (BRITISH BIO TECHNOLOGY) 20 April 1989 see page 4, paragraph 4; claim 10 --- | 1-4 |
| Y | WO 88 06596 A (BISSENDORF PEPTIDE GMBH) 7 September 1988 see the whole document --- | 3,4 |
| Y | WO 91 06564 A (FORSSMANN WOLF GEORG) 16 May 1991 see the whole document ----- | 3,4 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/04850

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|---|--|
| EP-A-0528686 | 24-02-93 | JP-A- 5328992 AU-B- 656791 AU-A- 2107892 CA-A- 2076320 | 14-12-93 16-02-95 11-03-93 20-02-93 |
| GB-A-2180539 | 01-04-87 | NONE | |
| WO-A-8602077 | 10-04-86 | DE-A- 3583940 EP-A- 0198015 JP-A- 8228791 JP-T- 62500700 US-A- 5168049 US-A- 5272254 | 02-10-91 22-10-86 10-09-96 26-03-87 01-12-92 21-12-93 |
| WO-A-8903422 | 20-04-89 | EP-A- 0390785 JP-T- 3501923 | 10-10-90 09-05-91 |
| WO-A-8806596 | 07-09-88 | DE-A- 3706731 DE-A- 3717329 AU-B- 614738 AU-A- 1348188 DE-A- 3878231 EP-A- 0349545 JP-T- 2502636 US-A- 5449751 | 15-09-88 15-12-88 12-09-91 26-09-88 18-03-93 10-01-90 23-08-90 12-09-95 |
| WO-A-9106564 | 16-05-91 | DE-A- 3935738 AT-T- 121424 AU-B- 643725 AU-A- 6871291 CA-A- 2071538 DE-D- 59008949 EP-A- 0497915 ES-T- 2071837 | 08-05-91 15-05-95 25-11-93 31-05-91 28-04-91 24-05-95 12-08-92 01-07-95 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Inter nales Aktenzeichen
 PCT/EP 96/04850

 A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 C12N15/62 C07K14/58 C07K14/36 C07K14/635

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| Y | EP 0 528 686 A (SUNTORY LTD) 24. Februar 1993 siehe das ganze Dokument insbesondere Beispiele 4, 8 und Anspruch 2 --- | 1-4 |
| Y | GB 2 180 539 A (GLAXO GROUP LTD) 1. April 1987 siehe das ganze Dokument --- | 1-4 |
| Y | JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 102, Nr. 1, Juli 1987, Seiten 111-122, XP002022296 Y. SAITO ET AL: "Bacterial synthesis of recombinant alpha human atrial natriuretic polypeptide" siehe das ganze Dokument --- | 1-4 |
| | --- -/- | |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. Februar 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

20.02.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Van der Schaal, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/04850

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|--|--------------------|
| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| Y | JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 265, Nr. 26, 15.September 1990, MD US, Seiten 15854-15859, XP002024631 T. GARDELLA ET AL: "Expression of human parathyroid hormone-(1-84) in Escherichia coli as a Factor X-cleavable fusion protein" siehe das ganze Dokument --- | 1-4 |
| Y | JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 264, Nr. 8, 15.März 1989, MD US, Seiten 4367-4373, XP002024630 E. WINGENDER ET AL: "Expression of human parathyroid hormone in Escherichia coli" siehe das ganze Dokument --- | 1-4 |
| Y | WO 86 02077 A (MEADE HARRY M;GARWIN JEFFREY L; BIOGEN NV) 10.April 1986 siehe das ganze Dokument insbesondere Seite 5, Zeile 36 - Seite 6, Zeile 27 --- | 1-4 |
| Y | WO 89 03422 A (BRITISH BIO TECHNOLOGY) 20.April 1989 siehe Seite 4, Absatz 4; Anspruch 10 --- | 1-4 |
| Y | WO 88 06596 A (BISSENDORF PEPTIDE GMBH) 7.September 1988 siehe das ganze Dokument --- | 3,4 |
| Y | WO 91 06564 A (FORSSMANN WOLF GEORG) 16.Mai 1991 siehe das ganze Dokument ----- | 3,4 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/04850

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| EP-A-0528686 | 24-02-93 | JP-A- 5328992 | 14-12-93 |
| | | AU-B- 656791 | 16-02-95 |
| | | AU-A- 2107892 | 11-03-93 |
| | | CA-A- 2076320 | 20-02-93 |
| ----- | | | |
| GB-A-2180539 | 01-04-87 | KEINE | |
| ----- | | | |
| WO-A-8602077 | 10-04-86 | DE-A- 3583940 | 02-10-91 |
| | | EP-A- 0198015 | 22-10-86 |
| | | JP-A- 8228791 | 10-09-96 |
| | | JP-T- 62500700 | 26-03-87 |
| | | US-A- 5168049 | 01-12-92 |
| | | US-A- 5272254 | 21-12-93 |
| ----- | | | |
| WO-A-8903422 | 20-04-89 | EP-A- 0390785 | 10-10-90 |
| | | JP-T- 3501923 | 09-05-91 |
| ----- | | | |
| WO-A-8806596 | 07-09-88 | DE-A- 3706731 | 15-09-88 |
| | | DE-A- 3717329 | 15-12-88 |
| | | AU-B- 614738 | 12-09-91 |
| | | AU-A- 1348188 | 26-09-88 |
| | | DE-A- 3878231 | 18-03-93 |
| | | EP-A- 0340510 | 10-01-90 |
| | | JP-T- 2502636 | 23-08-90 |
| | | US-A- 5449751 | 12-09-95 |
| ----- | | | |
| WO-A-9106564 | 16-05-91 | DE-A- 3935738 | 08-05-91 |
| | | AT-T- 121424 | 15-05-95 |
| | | AU-B- 643725 | 25-11-93 |
| | | AU-A- 6871291 | 31-05-91 |
| | | CA-A- 2071538 | 28-04-91 |
| | | DE-D- 59008949 | 24-05-95 |
| | | EP-A- 0497915 | 12-08-92 |
| | | ES-T- 2071837 | 01-07-95 |
| ----- | | | |