(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4519646号
(P4519646)

(45)発行日　平成22年8月4日(2010.8.4)　(24)登録日　平成22年5月28日(2010.5.28)

(51)Int.Cl.　F I
C07K 1/18 (2006.01)　C07K 1/18 ZNA
C12P 21/02 (2006.01)　C12P 21/02 E

請求項の数 8　(全 22 頁)

(21)出願番号　特願2004-525238 (P2004-525238)
(86)(22)出願日　平成15年7月18日 (2003.7.18)
(65)公表番号　特表2006-513978 (P2006-513978A)
(43)公表日　平成18年4月27日 (2006.4.27)
(86)国際出願番号　PCT/EP2003/007820
(87)国際公開番号　WO2004/013176
(87)国際公開日　平成16年2月12日 (2004.2.12)
審査請求日　平成18年7月12日 (2006.7.12)
(31)優先権主張番号　10235168.6
(32)優先日　平成14年8月1日 (2002.8.1)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)

前置審査

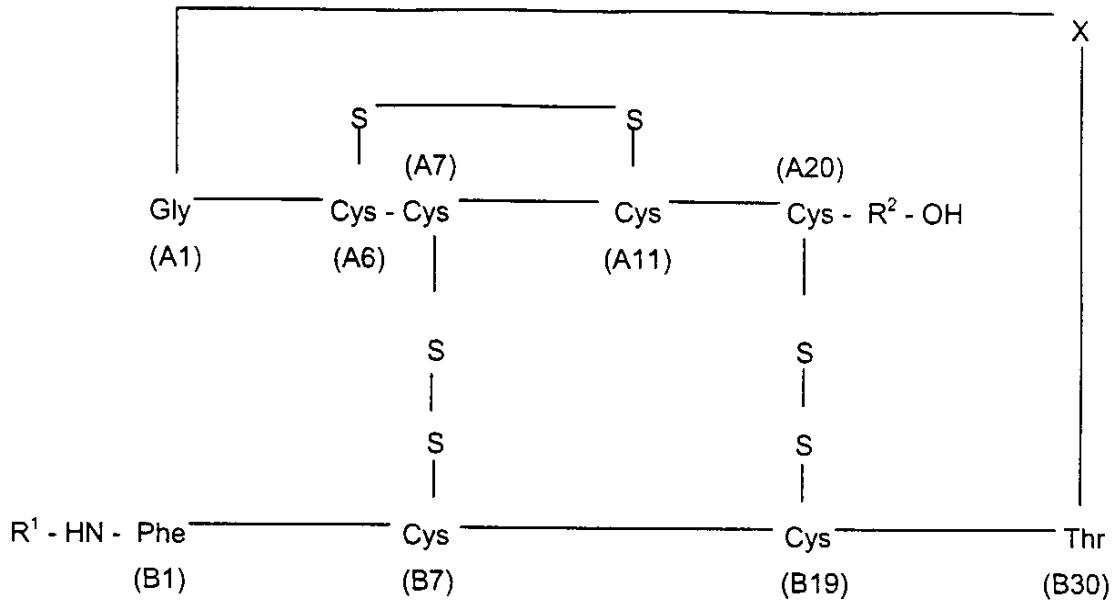
(73)特許権者　397056695
サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング
ドイツ連邦共和国デー－６５９２９フランクフルト・アム・マイン．ブリユニングシユトラーセ５０
(74)代理人　100127926
弁理士　結田　純次
(74)代理人　100140132
弁理士　竹林　則幸
(72)発明者　ホルスト・トューロウ
ドイツ連邦共和国６５５８２ハムバッハ．ブッヘンシュトラーセ３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】プレプロインスリンの精製方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
式１：

【化１】




$R^1$-B1-B30-X-A1-A20-$R^2$ (1)

（式中、Ｘは、
ａ）遺伝学的にコード可能なアミノ酸残基、または、
ｂ）２～３５個のアミノ酸残基を有するペプチドであり、ここで、最初と最後がいずれの場合もＡｒｇであり、
$R^1$は、
ａ）水素、
ｂ）遺伝学的にコード可能なアミノ酸残基、または、
ｃ）２～１５個のアミノ酸残基を有するペプチド
であり、
$R^2$は、遺伝学的にコード可能なアミノ酸残基であり、そして、
残基Ａ１～Ａ２０は、ヒトインスリンまたはインスリン類似体のＡ鎖のアミノ酸配列に対応し、残基Ｂ１～Ｂ３０は、ヒトインスリンまたはインスリン類似体のＢ鎖のアミノ酸配列に対応する）
で示されるプレプロインスリンのクロマトグラフィー精製方法であって、プレプロインスリンの水溶液から、フロースルー式の陰イオン交換体での第一のクロマトグラフィー、および、それに続く吸着式の陽イオン交換体での第二のクロマトグラフィーによってより高分子量の物質が除去され、ここで、第一のクロマトグラフィーは７．０～９．０のｐＨ、５～７ｍＳ／ｃｍの伝導率で行われ、第二のクロマトグラフィーは３．０～５．５のｐＨで行われる、上記の方法。

【請求項２】
プレプロインスリンは、以下のアミノ酸配列：
Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ａｌａ－Ａｒｇ－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ａｓｎ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－Ｔｈｒ－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ａｓｐ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ａｌａ

－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ
－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ
－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｇｌｎ
－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ａｓｎ（配列番号２）
を有する、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

プレプロインスリンは、以下のアミノ酸配列：
Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ａｌａ－Ａｒｇ
－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ａｓｎ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ
－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ
－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－Ｔｈｒ
－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ａｓｐ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｙ
－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ａｌａ
－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ
－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ
－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｇｌｎ
－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ（配列番号３）
を有する、請求項１に記載の方法。

【請求項４】

プレプロインスリンは、以下のアミノ酸配列：
Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ａｌａ－Ａｒｇ
－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｇｌｕ－Ｔｈｒ－Ａｒｇ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｇｌｎ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ａｓｎ（配列番号４）
を有する、請求項１に記載の方法。

【請求項５】

インスリンの変性を誘導するプレプロインスリン溶液から外来物質を分離するための、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６】

第二のクロマトグラフィーは、ｐＨ３．０～５．５で行われる、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７】

第二のクロマトグラフィーは、圧力１～３０ｂａｒで行われる、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８】

フォールディングされていないプレプロインスリンを発現することによってインスリンを製造する方法であって、

ａ）フォールディングされていないプレプロインスリンを発現する遺伝子操作された微生物を発酵させる工程、

ｂ）上記微生物を回収し、細胞を崩壊させる工程、

ｃ）未溶解のフォールディングされていないプレプロインスリンを含む封入体を単離する工程、

ｄ）ペプチド鎖が正しくフォールディングしたプレプロインスリンを溶解させ、同時に、ジスルフィド架橋を連結させ、プレプロインスリンを得て、続いて請求項１～７に記載

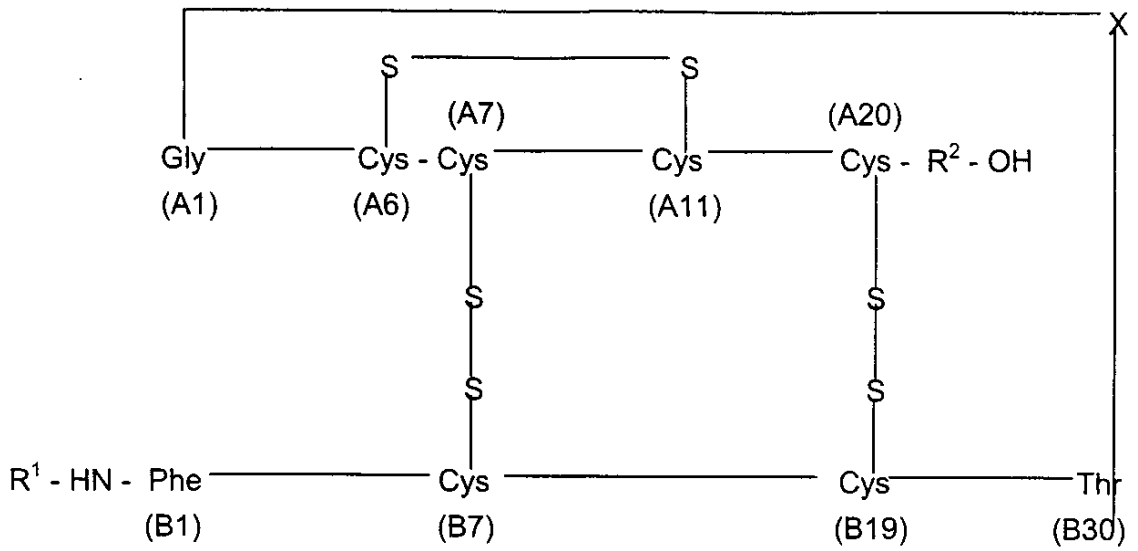
の方法を行う工程、
ｅ）プレプロインスリンを酵素で切断し、ヒトインスリンを得る工程、
ｆ）ヒトインスリンを精製する工程、
ｇ）ヒトインスリンを結晶化し、乾燥させる工程、
を含む、上記の方法。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
世界的に約１２００万人の人々が１型糖尿病に罹っており、１型糖尿病は、インスリンホルモンの内因性の産生が不十分なことを特徴とする。このタイプの糖尿病の唯一の可能な療法形態は、内分泌性インスリンの分泌の欠如をインスリン製剤を適用することによって代替することである。
【０００２】
インスリン製剤は、インスリンホルモンが活性物質である医薬製剤である。この場合、天然に存在するインスリンだけでなく、インスリン類似体およびインスリン誘導体が用いられる。
【０００３】
ヒトの膵臓で生産されるヒトインスリンは、５１個のアミノ酸残基を含むポリペプチドであり、これは、２つのペプチド鎖、すなわち２１個のアミノ酸残基を有するＡ鎖と、３０個のアミノ酸残基を有するＢ鎖とに分けられる。両ペプチド鎖のアミノ酸残基の配列は遺伝学的に決定されており、既知である。両鎖は互いに２個のジスルフィド架橋で連結している。加えて、Ａ鎖はまた、鎖内部のジスルフィド架橋も含む。
【０００４】
インスリン類似体は、少なくとも１つのアミノ酸残基の置換、および／または、少なくとも１つのアミノ酸残基の付加または除去により、ヒトインスリンと異なっている。インスリン類似体は、ヒト以外の種で天然に生じるものでもよいし、または、人工的に製造されたものでもよい。インスリン誘導体は、例えば追加のエステルまたはアミド基のような化学修飾されたアミノ酸残基を含むが、その他はヒトのアミノ酸配列または類似したアミノ酸配列を示す。
【０００５】
通常、インスリン類似体またはインスリン誘導体は、修飾されていないヒトインスリンと比べて、改変された作用キネティクス（ｋｉｎｅｔｉｃｓ）を示す。
【０００６】
ここ数年、ヒトインスリン、および、インスリン類似体もしくはインスリン誘導体が、組み換えＤＮＡ技術で製造されてきた。工業的な方法において、例えば、最初に式１で示される適切な前駆体のプレプロインスリン（ＰＰＩ）が製造され、それからヒトインスリンまたはインスリン類似体が酵素による切断により製造される。例えば、ヒトインスリンを製造するための遺伝学的方法は、以下の方法工程を含む：
ａ）遺伝子操作された微生物を発酵させる工程、
ｂ）前記微生物を回収し、細胞を崩壊させる工程、
ｃ）未溶解の融合タンパク質を含む封入体を単離する工程、
ｄ）ペプチド鎖が正しくフォールディングされた前記融合タンパク質を溶解させ、同時にジスルフィド架橋を連結させ、プレプロインスリンを得る工程、
ｅ）プレプロインスリンを酵素で切断し、ヒトインスリンを得る工程、
ｆ）ヒトインスリンを精製する工程、
ｇ）ヒトインスリンを結晶化し、得られた生成物を乾燥させる工程。
【０００７】
インスリン類似体を製造する際、プレプロインスリンの適切な領域のアミノ酸配列（Ａ鎖およびＢ鎖の）は、予め決定されている。様々なプレプロインスリンの酵素による切断は、例えば酵素トリプシン、さらに必要に応じて酵素カルボキシペプチダーゼＢのような

プロテアーゼを用いて行われる。

【０００８】

プレプロインスリンは、式１で示されるタンパク質である；

【化１】




$R^1$-B1-B30-X-A1-A20-$R^2$ (1)

上記式中、

Ｘは、

ａ）遺伝学的にコード可能なアミノ酸残基、または、

ｂ）２～３５個のアミノ酸残基を有するペプチドであり、ここで、最初と最後がいずれの場合も塩基性アミノ酸残基（特にＡｒｇ）であり、および、３個超のアミノ酸残基からなる場合、最初と最後がいずれの場合も２個の塩基性アミノ酸残基（特にＡｒｇおよび／またはＬｙｓ）

であり、

$R^1$は、

ａ）水素、

ｂ）遺伝学的にコード可能なアミノ酸残基、または、

ｃ）２～１５個のアミノ酸残基を有するペプチド

であり、

$R^2$は、遺伝学的にコード可能なアミノ酸残基であり、および、

残基Ａ１～Ａ２０は、ヒトインスリンまたはインスリン類似体のＡ鎖のアミノ酸配列に対応し、残基Ｂ１～Ｂ３０は、ヒトインスリンまたはインスリン類似体のＢ鎖のアミノ酸配列に対応する。

【０００９】

好ましくは、プレプロインスリンは、以下のような式１で示されるタンパク質である；

Ｘは、３５個のアミノ酸残基を有し、ヒトインスリンまたはサルのインスリンのＣ鎖配列を含むペプチド、または、２９個のアミノ酸を有するペプチドであり、その配列は以下の通り：

Ａｒｇ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ（配列番号１）、

$R^1$は、２～１５個のアミノ酸残基を有し、そのカルボキシル末端アミノ酸残基がＡｒ

ｇであるペプチドであり、
Ｒ[2]は、アミノ酸残基ＡｓｎまたはＧｌｙであり、および、
残基Ａ１～Ａ２０は、ヒトインスリンのＡ鎖のアミノ酸配列に対応し、
残基Ｂ１～Ｂ３０は、Ｂ３位のＡｓｎをＬｙｓで置換し、Ｂ２９位のＬｙｓをＧｌｕで置換しているヒトインスリンのＢ鎖またはインスリン類似体のアミノ酸配列に対応する。

【００１０】

本プロセスの、ペプチド鎖が正しくフォールディングされた融合タンパク質を溶解させて、同時にジスルフィド架橋を連結させ、プレプロインスリンを得る段階では、望ましい単量体プレプロインスリン以外にも、競合反応でポリマー状のプレプロインスリンも生産される。前記ポリマー状のプレプロインスリンは、それらのより高分子量によりＨＰＬＣ－ＧＰＣ分析または動的光散乱法で検出することができる。この望ましくない競合反応を抑制するために、融合タンパク質の初期濃度は、できるだけ低くする必要がある（ＤｅＢｅｒｎａｄｅｚ等，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍ．３０９：２１７，１９９９年）。実際には、このプロセスの段階では、約０．５～１ｇ／Ｌの濃度でプレプロインスリンが生産され、さらに、より高分子量の割合が約４０％であることがわかっている。より高分子量の区分には、ポリマー状のプレプロインスリンが含まれる。

【００１１】

驚くべきことに、本発明の範囲内において、ポリマー状のプレプロインスリンは、それに続くプロセスの段階で未変性インスリンの変性を誘導することによってインスリンの安定性に不利に作用することがわかった。変性反応の連鎖中、第一の可逆性の工程で、溶解した単量体インスリン分子から、物理的な接着力で繰り返し単位が連結された直線状の凝集体が生産されることがわかっている。それに続く不可逆性の反応により、溶解した凝集体から、安定な不溶性の凝集体の束（フィブリル）が生産され、これらは順に、自己触媒プロセスで未変性インスリンの変性を誘導する。これら不溶性のインスリンの繊維は、生物学的に不活性なだけではなく、医薬インスリン製剤を適用する際に注射針を詰まらせる原因となり得る。加えて、これらはまた、インスリン製剤を用いた療法中に場合により起こりうる免疫学的な不適合反応に関与する（Ｊ．Ｂｒａｎｇｅ等，Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃ．１９９７年，８６，５１７～５２５；Ｒ．Ｅ．Ｒａｔｎｅｒ等，Ｄｉａｂｅｔｅｓ，３９，７２８～７３３，１９９０年）。

【００１２】

インスリン製造プロセスのそれに続く部分において、プレプロインスリンは、酵素トリプシンとカルボキシペプチダーゼＢによってヒトインスリンに変換される（Ｋｅｍｍｌｅｒ，Ｗ．，Ｐｅｔｅｒｓｏｎ，Ｊ．Ｄ．およびＳｔｅｉｎｅｒ，Ｄ．Ｆ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２４６（１９７１年）６７８６～６７９１を参照）。この場合、Ａ鎖とＢ鎖との間のリンカーペプチド（式１におけるＸ）と、Ｂ鎖のアミノ末端の先の部分（式１におけるＲ[1]）が除去される。トリプシンでの酵素反応は、その切断によりヒトインスリンが生産されるペプチド結合を切断するだけでなく、競合反応において、その切断により多数の望ましくない副産物が生産される他のペプチド結合も切断する。式１で示されるアミノ酸残基Ｂ２９とＢ３０との間をさらに切断することによる脱Ｔｈｒインスリンの形成（ＥＰ０　２６４　２５０（Ｂ１）を参照）が、特に望ましくない。それに続く精製段階でこの副産物を除去すると、生成物が大量に失われる。この望ましくない副作用を抑制するためには、プレプロインスリンの初期濃度をできるだけ高く、すなわち８～２５ｇ／ｌ（これは１～３ｍＭに相当する）の範囲にする必要がある（ＥＰ０　２６４　２５０（Ｂ１）を参照）。この必要性は、２つ前の段落で述べられた必要性と対照的である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１３】

上記から明白であるが、プレプロインスリン生産と、プレプロインスリンのインスリンへの切断の間に、ポリマー状のプレプロインスリンをできるだけ徹底的に除去し、同時に、単量体プレプロインスリン濃度をできるだけ多く増加させる追加のプロセス工程を導入

することが有利である。このプロセス工程において極めて高い収率を確実にするには、追加の条件が必要である。

【００１４】

従って、疎水性の吸着性樹脂でプレプロインスリンを濃縮することが提唱されてきた（ＥＰ０　６００　３７２（Ｂ１））。本出願人は、高い濃度係数（Ｆ＝１０～１５）は達成可能であるが、実質的にはポリマー状のプレプロインスリンは除去されていないことを自身の実験で示すことができた。その他の提案（Ｄ．Ｆ．Ｓｔｅｉｎｅｒ等，Ｄｉａｂｅｔｅｓ，１７（１９６８年），７２５～７３６）では、イオン交換樹脂を用いたプレプロインスリンのクロマトグラフィーの精製が述べられている。我々の実験において、我々は、陰イオン交換樹脂を用いて、濃度係数Ｆ＝５、および、より高分子量の区分を約５％になるまで除去することしかできなかった。陽イオン交換樹脂を用いてより高分子量の区分を約１％になるまで除去したが、樹脂のプレプロインスリンに対する結合能力が不十分であることがわかった。

【課題を解決するための手段】

【００１５】

続いて、驚くべきことに、フロースルー式の陰イオン交換樹脂でのクロマトグラフィーと、その直後の吸着式の陽イオン交換樹脂でのクロマトグラフィーの組み合わせが、明らかに優れた結果を提供することがわかった。それゆえに、本発明は、同時に高濃度の単量体プレプロインスリンを含むプレプロインスリン水溶液から、より高分子量の物質を効果的に除去する方法に関する。

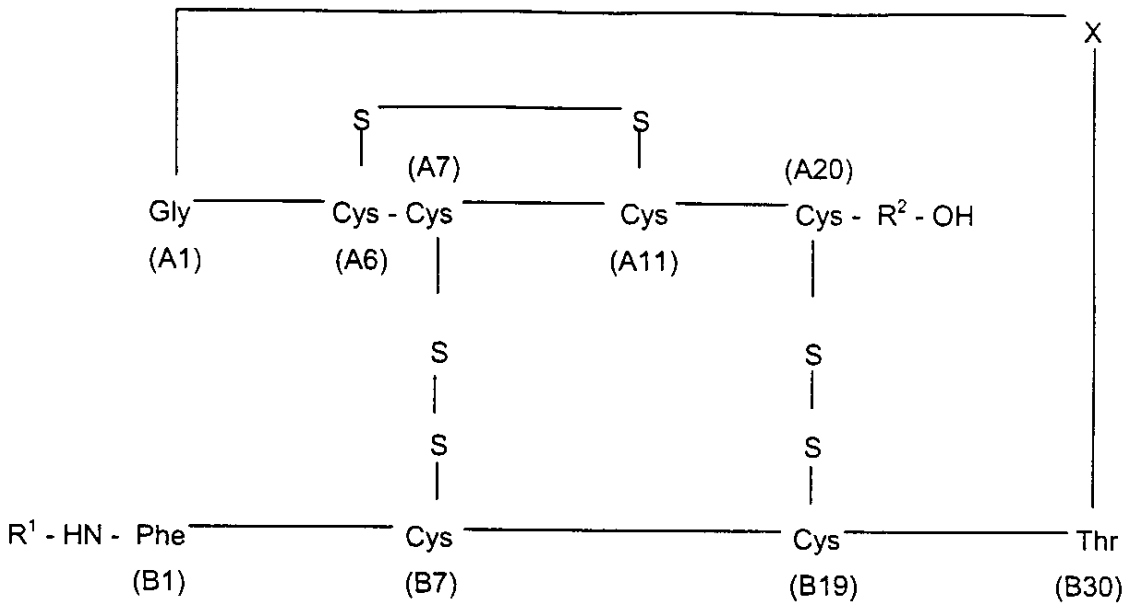
【００１６】

本発明によれば、インスリン製造プロセス中に生産されるようなプレプロインスリンの希釈水溶液は、陰イオン交換樹脂が充填されたプレカラム（例えばＳｏｕｒｃｅ３０Ｑ）を、ｐＨ７．０～９．０、好ましくはｐＨ７．５～８．５で、伝導率５～７ｍＳ／ｃｍで通過して送り出される。この場合、単量体プレプロインスリンは、樹脂に結合しないが、透過液と共にカラムを通過する。それに対して、ポリマー状のプレプロインスリンを含むより高い分子量の物質の大部分は樹脂に吸着し、プレプロインスリンから除去される。この対象の物質を含むプレカラムからの透過液は、ライン上で塩酸を用いてｐＨ３．０～５．５、好ましくはｐＨ４．０～５．０に調節され、続いて、直接的に、陽イオン交換樹脂が充填された第二のカラム（例えばＳｏｕｒｃｅ３０Ｓ）に送り出される。プレプロインスリンはこの樹脂に吸着され、不純物は、透過液と共にカラムから洗浄される。プレプロインスリンは、濃度を１～２０ｇ／ｌ、好ましくは２．５～１５．０ｇ／ｌに直線的に増加させた塩化ナトリウム含有溶出緩衝液で脱離させる。精製したプレプロインスリンは、主画分に回収され、その一方でさらなる不純物は、前の画分と後の画分で除去される。プレプロインスリンの初期量の＞９０％を含む主画分において、測定された濃度は１５～２０ｇ／Ｌであった（濃度係数Ｆ＝２０～２５）。より高分子量の物質は、＜０．１％になるまで除去された。この方法で精製したプレプロインスリンは、途中で結晶化させることにより溶液から単離してもよいし、または、溶液を酵素による切断プロセス段階に直接供給してもよい。

【００１７】

従って、本発明は、式１：

【化２】




$R^1$-B1-B30-X-A1-A20-$R^2$ (1)

で示されるプレプロインスリンのクロマトグラフィー精製方法に関し、

【００１８】

式中、Ｘは、

ａ）遺伝学的にコード可能なアミノ酸残基、または、

ｂ）２～３５個のアミノ酸残基を有するペプチドであり、ここで、最初と最後がいずれの場合も塩基性アミノ酸残基（特にＡｒｇ）であり、および、３個超のアミノ酸残基からなる場合、最初と最後がいずれの場合も２個の塩基性アミノ酸残基（特にＡｒｇおよび／またはＬｙｓ）

であり、

$R^1$は、

ａ）水素、

ｂ）遺伝学的にコード可能なアミノ酸残基、または、

ｃ）２～１５個のアミノ酸残基を有するペプチド

であり、

$R^2$は、遺伝学的にコード可能なアミノ酸残基であり、および、

残基Ａ１～Ａ２０は、ヒトインスリンまたはインスリン類似体のＡ鎖のアミノ酸配列に対応し、残基Ｂ１～Ｂ３０は、ヒトインスリンまたはインスリン類似体のＢ鎖のアミノ酸配列に対応し；

【００１９】

本方法において、より高分子量の物質が、フロースルー式の陰イオン交換体での第一のクロマトグラフィー、および、それに続く吸着式の陽イオン交換体での第二のクロマトグラフィーによって、前記プレプロインスリンの水溶液から除去される；

ここで、前記プレプロインスリンは、以下のアミノ酸配列を有し得る：

Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ａｌａ－Ａｒｇ－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ａｓｎ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－Ｔｈｒ

－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ａｓｐ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｙ
－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ａｌａ
－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ
－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ
－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｇｌｎ
－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ａｓｎ；（配列番号２）
Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ａｌａ－Ａｒｇ
－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ａｓｎ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ
－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ
－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－Ｔｈｒ
－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ａｓｐ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｙ
－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ａｌａ
－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ
－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ
－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｇｌｎ
－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ；（配列番号３）
Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ａｌａ－Ａｒｇ
－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ
－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ
－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｇｌｕ－Ｔｈｒ
－Ａｒｇ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ
－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｌｅｕ
－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ
－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ
－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｇｌｎ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ａｓｎ
（配列番号４）。

【００２０】

本発明はさらに、インスリンの変性を誘導するプレプロインスリンの溶液から外来物質を分離するための上記方法に関する。

【００２１】

本発明はさらに、前記第二のクロマトグラフィーは、ｐＨ３．０～５．５で行われる、上記方法に関する。

【００２２】

本発明はさらに、前記第二のクロマトグラフィーは、圧力１～３０ｂａｒで行われる、上記方法に関する。

【００２３】

本発明はさらに、フォールディングされていないプレプロインスリンを発現することによってインスリンを製造する方法に関し、本方法は、以下の工程を含む：

ａ）フォールディングされていないプレプロインスリンを発現する遺伝子操作された微生物を発酵させる工程、

ｂ）前記微生物を回収し、細胞を崩壊させる工程、

ｃ）未溶解のフォールディングされていないプレプロインスリンを含む封入体を単離する工程、

ｄ）ペプチド鎖が正しくフォールディングしたプレプロインスリンを溶解させ、同時にジスルフィド架橋を連結させ、プレプロインスリンを得て、それに続いて、上述の式１で示されるプレプロインスリンのクロマトグラフィー精製方法を行う工程、

ｅ）プレプロインスリンを酵素で切断し、ヒトインスリンを得る工程、

ｆ）ヒトインスリンを精製する工程、

ｇ）ヒトインスリンを結晶化し、乾燥させる工程。

以下で本発明をより詳細に説明するが、これに限定されない。

【実施例】
【００２４】
以下の実施例１～３に記載の、式１で示される様々なプレプロインスリンを精製するための出発溶液を、以下のような既知の方法（ＥＰ０ ４８９ ７８０、および、ＥＰ０ ６００ ３７２）で、上述のプロセスの段階ａ、ｂ、ｃおよびｄに従って製造した：
微生物の発酵（プロセス段階ａ）の間、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞は、プレプロインスリンのアミノ酸配列を有する融合タンパク質を含む封入体を形成した。発酵終了後、この細胞を遠心分離で単離し、通常の高圧ホモジナイズによって崩壊させた（プロセス段階ｂ）。このプロセスで放出された不溶性の封入体を遠心分離で単離し、遠心分離機中で水で洗浄した（プロセス段階ｃ）。それに続くプロセス段階ｄで、融合タンパク質の封入体を８Ｍ塩酸グアニジン溶液（ｐＨ１０．８）に溶解させた。水で希釈し、塩酸システインを加えた後、３個のジスルフィド架橋をｐＨ１０．８、４℃で連結させて融合タンパク質をフォールディングさせ、式１で示されるプレプロインスリンを得た。次に、この溶液を１０％濃度の塩酸を用いてｐＨ５に調整し、その結果として外来タンパク質を沈殿させ、この沈殿を遠心分離で除去した。遠心分離後の上清は、０．６～０．８ｇ／ｌの単量体プレプロインスリンを含んでいた。プレプロインスリンの純度は、ＨＰＬＣ－ＲＰ分析で測定したところ、面積で約６５％であった。ＨＰＬＣ－ＧＰＣ分析により、より高分子量の不純物は、面積で約４５％の割合と測定された。
【００２５】
ＨＰＬＣ－ＲＰ分析
【表１】

| | |
|---|---|
| カラム： | メルク(Merck)製の LiChroCART 250-4(スーパースフェア(Superspher) 100-RP18e) |
| 器具： | ウォーターズ (Waters) 2690 |
| ソフトウェア： | ウォーターズ・ミレニアム (Waters Millenium) |
| 勾配： | Ａ：２５容量%アセトニトリル、0.05Mリン酸緩衝液(pH 2.5)中の0.3M NaCl<br>Ｂ：65容量%アセトニトリル、0.05Mリン酸緩衝液(pH2.5)中の0.05M NaCl<br>勾配は、対応するランタイムに従って、以下の緩衝液Ｂ量であることを特徴とする：０分で4.0%；20分で17.0%；30分で37.0%；40分で4.0% |
| 温度： | ３５℃ |
| ローディング量： | １０μｌ |
| 総ランタイム： | ５５分間 |
| 流速： | １．０ml／分 |
| 検出： | ２１４nm (ウォーターズ 2487) |

【００２６】
ローディング溶液中のプレプロインスリン含量を決定するため、分析されたサンプル中のプレプロインスリンのピーク面積を、対応する標準物質のピーク面積で割った。純度を決定するために、プレプロインスリンのピーク面積を、分析されたサンプル中の全ての溶出可能な物質のピーク面積の合計で割った。
【００２７】
ＨＰＬＣ－ＧＰＣ分析

【表２】

| | |
|---|---|
| カラム： | 連続した２個のカラム、ステンレス鋼Ｌ＝300mm；ID＝7.8mm |
| 器具： | ポンプ：ウォーターズ510／オートサンプラー：Wisp717 |
| ソフトウェア： | ウォーターズ・ミレニアム |
| 固定相： | ショウデックス・プロテイン（Shodex Protein）KW802.5 120-7ジオール |
| 分離境界： | 2000～80000ダルトン |
| 移動相： | 30容量%アセトニトリル、3.5M酢酸，pH3.0，アンモニア水溶液で調節 |
| 勾配： | 定組成（isocratic） |
| 温度： | 室温 |
| ローディング量： | １００μｌ |
| 総ランタイム： | ６５分間 |
| 流速： | ０．５ml／分 |
| 検出： | ２７６nm（ウォーターズ2487） |

【００２８】
より高分子量の物質の区分を測定するために、単量体プレプロインスリンの前に溶出させた全てのより高分子量の物質のピーク面積を、全ての溶出可能な物質のピーク面積の合計で割った。標準物質を用いて単量体プレプロインスリンの保持時間を決定した。
【００２９】
実施例１
上述のプロセスの段階ａ、ｂ、ｃおよびｄが完了した後、以下のアミノ酸配列を有するプレプロインスリンの溶液を、適切に遺伝子操作されたＥ．ｃｏｌｉ細胞から得た：
Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ａｌａ－Ａｒｇ－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ａｓｎ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－Ｔｈｒ－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ａｓｐ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｇｌｎ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ａｓｎ（配列番号２）。
【００３０】
前記プレプロインスリンは、式１に相当し、式中、
Ｘは、サルのＣペプチドの配列を含む３５個のアミノ酸残基を有するペプチド鎖であり、
$R^1$は、配列：Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ａｌａ－Ａｒｇ（配列番号５）の１０個のアミノ酸残基を有するペプチド鎖であり、
$R^2$は、アミノ酸残基Ａｓｎであり（ヒトインスリンのＡ鎖のＡ２１と同一）、
Ａ１～Ａ２０は、ヒトインスリンのＡ鎖の配列を有する（Ａ１～Ａ２０のみ）ペプチド鎖であり、
Ｂ１～Ｂ３０は、ヒトインスリンのＢ鎖の配列を有するペプチド鎖である。
【００３１】
主として、連続して配置された２つのクロマトグラフィーカラム、および、その間に配置された撹拌容器を含む装置を用いて、プレプロインスリン溶液を精製した。２つのカラ

ムの間のライン上で溶液のｐＨを変化させるために、撹拌容器を用いた。

【００３２】

第一のクロマトグラフィーカラムにおいて（製造元：ファルマシア（Ｐｈａｒｍａｃｉａ），直径：５ｃｍ）、ゲルベッド（ベッド高さ：１４ｃｍ，ベッド体積：２７５ｍｌ）を、陰イオン交換樹脂ＤＥＡＥ－セファロース・ファスト・フロー（Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　ｆａｓｔ　ｆｌｏｗ）（製造元：ファルマシア・バイオテク（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）；製品番号１７－０７０９－０５）を用いて製造した。カラムを上から下へ大気圧１ｂａｒで稼動させた。流速は２０００ｍｌ／ｈとした。多重バルブ、ローディングポンプ（Ｉｓｍａｔｅｃ　ＭＶ）、および、バブルトラップをカラムの上流に取り付けた。以下の溶液を連続的にカラムに多重バルブを介して送り出した：

８．１Ｌのローディング溶液、

２．３Ｌの置換用緩衝液、

１．４Ｌの洗浄緩衝液、

１．４Ｌの再生溶液、

２Ｌの平衡緩衝液。

【００３３】

ＵＶプローブ（２７５ｎｍ，データの記録を伴う）およびその他の多重バルブをカラムの下流に取り付けた。第二の多重バルブを介して、約１０．２Ｌの透過液画分を上述の撹拌容器に導き、続いて、約１Ｌの洗浄画分を回収容器に導いた。残存した透過液を、多重バルブを介して生物学的廃棄物チャンネルに排出した。

【００３４】

陰イオン交換クロマトグラフィーをフロースルー式で稼動させ、すなわち、価値のある物質のプレプロインスリンがゲルには結合せずに、生成物を適用する間に透過液と共にカラムを通過して洗浄されるような条件を選択した（ｐＨ８．３；伝導率＝６．１ｍＳ／ｃｍ）。それに対して、汚染物質はゲルに吸着し、洗浄緩衝液と再生溶液で除去された。

【００３５】

用いられた溶液は、以下の組成を有する：

【００３６】

カラム１用の出発溶液：

【表３】

| | | |
|---|---|---|
| 出発溶液（遠心分離からの上清） | ８．０Ｌ | |
| 塩化ナトリウム溶液、25%濃度（w/w） | １００ml | １２．５ml／Ｌ |
| 水酸化ナトリウム溶液、10%（w/w） | 約４．５ml | ０．６ml／Ｌ |
| | pH８．３ | |
| 伝導率 | ６．１mS/cm | |
| 温度 | 約５℃ | |
| | | |
| 純水 | １Ｌ | |
| トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン | ４．０ｇ／Ｌ | |
| 塩化ナトリウム | ２．５ｇ／Ｌ | |
| 塩酸，25%濃度（w/w） | 約２．５ml／Ｌ | |
| | pH８．０ | |
| 伝導率 | 約５．７mS／cm | |
| 温度 | 室温 | |
| | | |
| 純水 | １Ｌ | |
| トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン | ５．０ｇ／Ｌ | |
| 塩化ナトリウム | １５ｇ／Ｌ | |
| 塩酸，２５%濃度（w/w） | 約３ml／Ｌ | |
| | pH８．０ | |
| 伝導率 | 約２４mS／cm | |
| 温度 | 室温 | |

【００３７】
カラム１および２のための再生溶液：
【表４】

| | | |
|---|---|---|
| 純水 | ０．９１Ｌ | |
| 塩化ナトリウム | ４０ｇ | ４０ｇ／Ｌ |
| 水酸化ナトリウム溶液、３３%濃度（w/w） | ０．０９Ｌ | １モル／Ｌ |

【００３８】
カラム１のための平衡緩衝液：
【表５】

| | |
|---|---|
| 純水 | １Ｌ |
| トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン | ５．０ｇ／Ｌ |
| 塩化ナトリウム | ２．０ｇ／Ｌ |
| 塩酸，25%濃度（w/w） | 約３ml／Ｌ |
| | pH８．０ |
| 伝導率 | 約５．１mS／cm |
| 温度 | 室温 |

【００３９】
価値のある物質のプレプロインスリンを含む透過液分画、および、より高い分子量の不純物の大部分を含む洗浄分画をカラムアウトレットで回収した：
１．約１０．２Ｌ　透過液画分

（生成物を置換する間、溶液ローディングの開始時はＵＶ値２０％から始め（上昇）、ＵＶ値３５％にする（下降））
２．約１Ｌ　洗浄画分
（洗浄緩衝液のローディングの際はＵＶ値３０％から始め（上昇勾配）、ＵＶ値４０％にする（下降））。
【００４０】
その他全ての透過液を、生物学的廃棄物チャンネルに排出した。
【００４１】
図１は、カラム１のアウトレットで測定されたＵＶ図を示す。
【００４２】
第一のカラムの透過液画分を、ライン上で中間に存在する容器（基準体積：４Ｌ，撹拌しながら，ｐＨプローブおよびインレットチューブ）中で９０％濃度の乳酸でｐＨ３．５に調節し、次に、第二のクロマトグラフィーカラムに直接送り出した。
【００４３】
第二のクロマトグラフィーカラム（製造元：ファルマシア，直径：５ｃｍ）において、ゲルベッド（ベッド高さ：１０．５ｃｍ，ベッド体積：２０６ｍｌ）を、陽イオン交換樹脂Ｓｏｕｒｃｅ３０Ｓ（製造元：ファルマシア・バイオテク；製品番号１７－１２７３－０４）を用いて製造した。カラムを上から下へ大気圧１ｂａｒで稼動させた。同様に流速は２０００ｍｌ／ｈであった。多重バルブ、ローディングポンプ、および、バブルトラップをカラムの上流に取り付けた。以下の溶液を連続的にカラムに多重バルブを介して送り出した：
１０．２Ｌ　ローディング溶液（＝カラム１の透過液分画，ｐＨ３．５に調節）
０．５Ｌ　置換用緩衝液当量
３．０Ｌ　溶出緩衝液Ａ／Ｂ（等量のＡおよびＢ）
２．３Ｌ　再生溶液
２Ｌ　平衡緩衝液。
【００４４】
ＵＶプローブ（２７５ｎｍ，データの記録を伴う）およびその他の多重バルブをカラムの下流に取り付けた。約１Ｌの主画分を、第二の多重バルブを介して回収容器に導いた。残存した透過液を多重バルブを介して生物学的廃棄物チャンネルに排出した。
【００４５】
陽イオン交換体クロマトグラフィーを、吸着式で稼動させ、すなわち生成物を適用する間、価値のある物質のプレプロインスリンをゲルに吸着させ、（ローディング溶液を排出させた後）、溶出緩衝液Ａ／Ｂを用いて再び脱離させた。最適な精製効果を達成するために、直線的に増加する塩化ナトリウム濃度勾配を、溶出緩衝液に適用した。
【００４６】
用いられた溶液は、以下の組成を有する：
【００４７】
カラム２用のローディング溶液：
【表６】

| | | |
|---|---|---|
| カラム１の透過液分画 | 約１０．２Ｌ | |
| 乳酸，９０％濃度 | １４．３ｍｌ | １．４ｍｌ／Ｌ |
| | ｐＨ３．５ | |
| 伝導率 | 約６．３ｍＳ／ｃｍ | |
| 温度 | 約５℃ | |

【００４８】
カラム２用の置換用緩衝液：

【表７】

| | | |
|---|---|---|
| 純水 | １Ｌ | |
| 乳酸，９０％濃度 | ８．３ｍｌ | ０．１モル／Ｌ |
| 塩化ナトリウム | ２．５ｇ | ２．５ｇ／Ｌ |
| 水酸化ナトリウム溶液、１０％濃度（w/w） | 約８ｍｌ | |
| | ｐＨ３．５ | |
| 伝導率 | 約８ｍＳ／ｃｍ | |
| 温度 | 室温 | |

【００４９】
カラム２用の溶出緩衝液Ａ：
溶出緩衝液Ａはカラム２用の置換用緩衝液と同一である。
【００５０】
カラム２用の溶出緩衝液Ｂ：
【表８】

| | | |
|---|---|---|
| 純水 | １Ｌ | |
| 乳酸，９０％濃度 | ８．３ｍｌ | ０．１モル／Ｌ |
| 塩化ナトリウム | １５．０ｇ | １５．０ｇ／Ｌ |
| 水酸化ナトリウム溶液、１０％濃度（w/w） | 約７ｍｌ | |
| | ｐＨ３．５ | |
| 伝導率 | 約２５ｍＳ／ｃｍ | |
| 温度 | 室温 | |

【００５１】
カラム１および２用の再生溶液：
【表９】

| | | |
|---|---|---|
| 純水 | ０．９１Ｌ | |
| 塩化ナトリウム | ４０ｇ | ４０ｇ／Ｌ |
| 水酸化ナトリウム溶液、３３％濃度（w/w） | ０．０９Ｌ | １モル／Ｌ |

【００５２】
カラム２用の平衡緩衝液：
【表１０】

| | | |
|---|---|---|
| 純水 | １Ｌ | |
| 乳酸，９０％濃度 | ８．３ｍｌ | ０．１モル／Ｌ |
| 塩化ナトリウム | ２．９ｇ／ｌ | |
| 水酸化ナトリウム溶液、約１０％濃度(w/w) | 約９ｍｌ | |
| | ｐＨ３．５ | |
| 伝導率 | 約８．５ｍＳ／ｃｍ | |
| 温度 | 室温 | |

【００５３】
価値のある物質のプレプロインスリンを含む主要な画分をカラムアウトレットで回収した：
約１．０Ｌ　主画分
（溶出中、ＵＶ値６５％から始め（上昇）、ＵＶ値７６％（下降）にする）。

【００５４】
その他全ての透過液を、生物学的廃棄物チャンネルに排出した。
【００５５】
図２は、カラム２のアウトレットで測定されたＵＶ図を示す。
【００５６】
精製した溶液（カラム２の主要な画分）において、面積で純度が８９％の１５ｇ／Ｌのプレプロインスリンを測定した（ＨＰＬＣ－ＲＰ分析）。収率は、出発溶液中のプレプロインスリンの量に基づき９１％であった。面積でより高分子量の区分は、ＨＰＬＣ－ＧＰＣ分析で０．２％と測定された。
【００５７】
実施例２
上述のプロセスの段階ａ、ｂ、ｃおよびｄが完了した後、以下のアミノ酸配列を有するプレプロインスリンの溶液を、適切に遺伝子操作されたＥ．ｃｏｌｉ細胞から得た：
Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ａｌａ－Ａｒｇ－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ａｓｎ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－Ｔｈｒ－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ｇｌｕ－Ａｉａ－Ｇｌｕ－Ａｓｐ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｇｌｎ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ（配列番号３）。
【００５８】
前記プレプロインスリンは、式１に相当し、
式中、
Ｘは、サルのＣペプチドの配列を含む３５個のアミノ酸残基を有するペプチド鎖であり、
$R^1$は、配列：Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ａｌａ－Ａｒｇ（配列番号５）の１０個のアミノ酸残基を有するペプチド鎖であり、
$R^2$は、アミノ酸残基Ｇｌｙであり、
Ａ１～Ａ２０は、ヒトインスリンのＡ鎖の配列を有する（Ａ１～Ａ２０のみ）ペプチド鎖であり、
Ｂ１～Ｂ３０は、ヒトインスリンのＢ鎖の配列を有するペプチド鎖である。
【００５９】
プレプロインスリン溶液を、主として、連続して配置された２つのクロマトグラフィーカラム、および、その間に配置された撹拌容器を含む装置を用いて再び精製した。撹拌容器を用いて、２つのカラムの間で溶液のｐＨを変化させた。第二のクロマトグラフィー段階の装置は、圧力の安定性のために設計された。
【００６０】
実施例１で説明した通りに、カラム１のクロマトグラフィーと、中間に存在する容器でのｐＨ切り替えを行った（従って、ここでの説明および値は省略する）。
【００６１】
第二のクロマトグラフィーカラム（製造元：プロクロム（Ｐｒｏｃｈｒｏｍ），直径：５ｃｍ，材質：ステンレス鋼）において、ゲルベッド（ベッド高さ：１０ｃｍ，ベッド体積：１９６ｍｌ）を、陽イオン交換体Ｓｏｕｒｃｅ３０Ｓ（製造元：ファルマシア・バイオテク；製品番号：１７－１２７３－０４）を用いて製造した。このカラムを、上から下へ、稼動圧力１０ｂａｒで稼動させた。流速は、３５００ｍｌ／ｈであった。多重バルブ、ローディングポンプ（製造元：ベスタ（Ｂｅｓｔａ）；タイプ：ＨＤ２－３００）をカラムの上流に取り付けた。以下の溶液を連続的にカラムに多重バルブを介して送り出した

：
１０．２Ｌ　ローディング溶液（＝カラム１の透過液分画，ｐＨ４．６に調節）
０．５Ｌ　置換用緩衝液
３．０Ｌ　溶出緩衝液Ａ／Ｂ（等量のＡおよびＢ）
２．３Ｌ　再生溶液
２Ｌ　平衡緩衝液。

【００６２】
ＵＶプローブ（２７５ｎｍ，データの記録を伴う）およびその他の多重バルブをカラムの下流に取り付けた。精製したプレプロインスリンを含む主画分を、第二の多重バルブを介して回収容器に導いた。残存した透過液を多重バルブを介して生物学的廃棄物チャンネルに排出した。

【００６３】
陽イオン交換体クロマトグラフィーを、吸着式で稼動させ、すなわち生成物を適用する間、価値のある物質のプレプロインスリンをゲルに吸着させ、（ローディング溶液を排出させた後）、溶出緩衝液Ａ／Ｂを用いて再び脱離させた。最適な精製効果を達成するために、直線的に増加する塩化ナトリウム濃度勾配を、溶出緩衝液に適用した。

【００６４】
用いられた溶液は、以下の組成を有する：

【００６５】
カラム２用のローディング溶液：
【表１１】

| | | |
|---|---|---|
| カラム１の透過液画分 | 約１０．２Ｌ | |
| 乳酸，９０％濃度 | １２．２ml | １．２ml／Ｌ |
| | ｐＨ４．６ | |
| 伝導率 | 約６．７mS／cm | |
| 温度 | 約５℃ | |

【００６６】
カラム２用の置換用緩衝液：
【表１２】

| | | |
|---|---|---|
| 純水 | １Ｌ | |
| 乳酸，９０％濃度 | ８．３ml | ０．１モル／Ｌ |
| 塩化ナトリウム | ２．５ｇ | ２．５ｇ／Ｌ |
| 水酸化ナトリウム溶液、約１０％濃度(w/w) | ２７ml | |
| | ｐＨ４．６ | |
| 伝導率 | 約８mS／cm | |
| 温度 | 室温 | |

【００６７】
カラム２用の溶出緩衝液Ａ：
溶出緩衝液Ａは、カラム２用の置換用緩衝液と同一である。

【００６８】
カラム２用の溶出緩衝液Ｂ：

【表１３】

| | | |
|---|---|---|
| 純水 | １Ｌ | |
| 乳酸，９０％濃度 | ８．３ml | ０．１モル／Ｌ |
| 塩化ナトリウム | １５．０ｇ | １５．０ｇ／Ｌ |
| 水酸化ナトリウム溶液、１０％濃度（w/w） | 約２７ml | |
| | ｐＨ４．６ | |
| 伝導率 | 約２５mS／cm | |
| 温度 | 室温 | |

【００６９】
カラム１および２用の再生溶液：
【表１４】

| | | |
|---|---|---|
| 純水 | ０．９１Ｌ | |
| 塩化ナトリウム | ４０ｇ | ４０ｇ／Ｌ |
| 水酸化ナトリウム溶液，３３％濃度（w/w） | ０．０９Ｌ | １モル／Ｌ |

【００７０】
カラム２用の平衡緩衝液：
【表１５】

| | | |
|---|---|---|
| 純水 | １Ｌ | |
| 乳酸，９０％濃度 | ８．３ｇ | ０．１モル／Ｌ |
| 塩化ナトリウム | ２．９ｇ／Ｌ | |
| 水酸化ナトリウム溶液、１０％濃度（w/w） | 約２６ml | |
| | ｐＨ４．６ | |
| 伝導率 | 約８．７mS／cm | |
| 温度 | 室温 | |

【００７１】
価値のある物質のプレプロインスリンを含む主画分をカラムアウトレットで回収した：
約０．９Ｌ　主画分（溶出中、ＵＶ値６５％から始め（上昇）、ＵＶ値７６％（下降）にする）
その他全ての透過液を、生物学的廃棄物チャンネルに排出した。
【００７２】
精製した溶液（カラム２の主画分）において、１７ｇ／Ｌのプレプロインスリンは、面積で純度が９３％であると測定した（ＨＰＬＣ－ＲＰ分析）。収率は、出発溶液中のプレプロインスリンの量に基づき９２％であった。より高分子量の区分は、ＨＰＬＣ－ＧＰＣ分析で面積で＜０．１％と測定された。
【００７３】
実施例３
上述のプロセスの段階ａ、ｂ、ｃおよびｄが完了した後、以下のアミノ酸配列を有するプレプロインスリンの溶液を、適切に遺伝子操作されたＥ．ｃｏｌｉ細胞から得た：
Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ａｌａ－Ａｒｇ－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｇｌｕ－Ｔｈｒ－Ａｒｇ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｌｅｕ

－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｇｌｎ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ａｓｎ（配列番号４）。

【００７４】

前記プレプロインスリンは、式１に相当し、

式中、

Ｘは、配列：Ａｒｇ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ（配列番号１）の２９個のアミノ酸残基を有するペプチド鎖であり、

$R^1$は、配列：Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ａｌａ－Ａｒｇ（配列番号５）の１０個のアミノ酸残基を有するペプチド鎖であり、

$R^2$は、アミノ酸残基Ａｓｎ（ヒトインスリンのＡ鎖のＡ２１）であり、

Ａ１～Ａ２０は、ヒトインスリンのＡ鎖の配列を有する（Ａ１～Ａ２０のみ）ペプチド鎖であり、

Ｂ１～Ｂ３０は、ヒトインスリンのＢ鎖と類似した配列を有する、すなわちＢ３位のＶａｌをＬｙｓで置換し、Ｂ２９位のＬｙｓをＧｌｕで置換したペプチド鎖である。

【００７５】

実施例１で用いたのと同じ装置を用いてプレプロインスリン溶液を精製した。

【００７６】

この時、カラム１のクロマトグラフィーには、陰イオン交換樹脂Ｓｏｕｒｃｅ３０Ｑ（製造元：ファルマシア・バイオテク；製品番号：１７－１２７５－０４）が用いられた。このゲルの再生には、実施例１および２と比べて２倍量の再生溶液が必要であった。第一のクロマトグラフィーの残りのパラメーター、例えば溶液の組成と量は、実施例１および２で説明されたのと同じである。

【００７７】

同様に、中間に存在する容器でｐＨ切り替えを実施例１で説明された通りに行った。

【００７８】

ここで、第二のクロマトグラフィーを稼動圧力１５ｂａｒで行った。第二のクロマトグラフィーのその他全てのパラメーターは、実施例２で説明されたのと同一である。

【００７９】

精製した溶液（カラム２の主画分）において、１７ｇ／Ｌのプレプロインスリンの純度は、面積で９２.５％であると測定された（ＨＰＬＣ－ＲＰ分析）。収率は、出発溶液中のプレプロインスリンの量に基づき９１％であった。より高分子量の区分は、ＨＰＬＣ－ＧＰＣ分析で面積で＜０.１％と測定された。

【００８０】

変性分析

変性分析（表１）により、フォールディング反応中に生産されたより高分子量のポリマー状のプレプロインスリンが、天然インスリンの変性を誘導できることを示す。

【００８１】

変性分析において、実施例２で説明されたプレプロインスリンを酵素で切断することによって得られる未変性のインスリングラルギン（アベンティス・ドイツ社（Ａｖｅｎｔｉｓ　Ｄｅｕｔｓｃｈｌａｎｄ　ＧｍｂＨ）製品）を結晶化した。驚くべきことに、我々は、インスリングラルギンの結晶化条件下（ｐＨ６.１、および、２６℃）で、インスリンの変性を誘導し得る物質を結晶化混合物に加えると未変性インスリンの変性が起こることを、全実験において示すことができた。

【００８２】

以下の組成の、結晶化混合物用の標準溶液を製造した：

インスリングラルギン　５ｇ／Ｌ

クエン酸　５．２ミリモル／Ｌ
塩化亜鉛　３ミリモル／Ｌ
塩化ナトリウム　０．５ｇ／Ｌ
ｎ－プロパノール　７　％（ｖ／ｖ）
純水で５００ｍｌにし、
１Ｎ塩酸を用いて、ｐＨ３にした。

【００８３】

この溶液を孔の幅が０．１μｍのメンブレンフィルターでろ過した。

【００８４】

変性分析において、この酸性の標準溶液を様々な分析物質の溶液と混合した：除去されたポリマー状のプレプロインスリンを濃度５ｇ／Ｌで含むカラム１の洗浄画分、または、精製したプレプロインスリンをそれぞれ１５および１７ｇ／Ｌ濃度で含むカラム２の主画分。インスリンの変性により観察された現象が引き起こされるというさらなる証拠のために、０．１％濃度のポロキサマー（Ｐｏｌｏｘａｍｅｒ）１７１のストック水溶液（１０ｍｌ）を加えた。ポロキサマー１７１は、疎水性界面でインスリンの変性を抑制することがわかっている（Ｈ．Ｔｈｕｒｏｗ　ａｎｄ　Ｋ．Ｇｅｉｓｅｎ，Ｄｉａｂｅｔｏｌｏｇｉａ（１９８４年）２７，２１２～２１８、および、ＥＰ０　０１８　６０９）。

【００８５】

次に、この溶液を２６℃に加熱し、１０％濃度の水酸化ナトリウム溶液で撹拌しながらｐＨ６．１に調節し、無晶性インスリンの沈殿を得た。この無晶性の懸濁液を２６℃で５０時間撹拌した。この後、全ての混合物は、インスリン結晶を含んでいた。

【００８６】

この混合物を、バックグラウンドにおける、または、インスリン結晶間の無晶性粒子（膜）の外観を顕微鏡下で観察してサンプルを評価することによって分析した。加えて、それぞれの混合物を、ほぼ同じ量で２つに分けた。沈降の挙動を調べるために、第一の部分を２５０ｍｌの測定シリンダーに導入し、この混合物を室温で６０分間放置した後、沈殿物量と上清の透明度を評価した。第二の部分を１Ｎ塩酸でｐＨ３に調節し、インスリン結晶が溶解した後、生じた溶液の透明度を評価した。

【００８７】

表１は、変性分析の結果を示す。ポリマー分画を添加しなかったコントロールサンプル１７４Ａ、および、１８８Ａでは、変性は観察されなかった。顕微鏡下で、透明なバックグラウンドに対して結晶を目視できた。６０分後、この結晶を沈殿させ、凝縮された沈殿物と透明な上清が生じた。この結晶をｐＨ３で溶解させた後、透明な溶液が生成した。それに対して、サンプル１７４Ｂ、１８８Ｂ、および、１７４Ｃは、いずれの場合もそれぞれ１ｍｌおよび５ｍｌのポリマー画分が結晶化混合物に添加されており、これらは、インスリングラルギンの明らかな変性を示した。顕微鏡下で、結晶間に無晶性の膜を目視できた。沈降分析において、多量の沈殿物が生成し、それにおいて沈殿物量は、５０～９０ｍｌ（結晶懸濁液２５０ｍｌより）であった。結晶をｐＨ３で再溶解させた後、程度の差はあるが不透明な無晶性の懸濁液が生成した。２０ｐｐｍのポロキサマー１７１の存在下では、１ｍｌのポリマー溶液（１８８Ｃ）の添加による変性は観察されなかった。同様に、精製したプレプロインスリン（実施例１、２および３のカラム２の主画分）と混合した分析混合物１７４Ｄ、１７４Ｅ、および、１７４Ｆにおいては、インスリンのグラルギンの変性は観察されなかった。

【００８８】

ヒトインスリンを結晶化した類似の変性分析でも、同様の結果が得られた（ここには示さず）。

【００８９】

【表１６】

表１．より高分子量の不純物のインスリンのグラルギン変性に対する影響

| 結晶化混合物番号 | 結晶化混合物への添加 | 顕微鏡像のバックグラウンドの外観（菱面体の結晶間の） | 結晶をｐＨ３で溶解させた後の外観 | 結晶懸濁液の沈降挙動 |
|---|---|---|---|---|
| 174 A | なし | 透明 | 透明 | ＋＋＋ |
| 174 B | １mlの洗浄画分，カラム１* | 無晶性粒子 | わずかに不透明 | ＋－－ |
| 174 C | ５mlの洗浄画分，カラム１* | より無晶性粒子 | 不透明 | －－－ |
| | | | | |
| 174 D | １mlの主画分，実施例１** | 透明 | 透明 | ＋＋＋ |
| 174 E | １mlの主画分，実施例２*** | 透明 | 透明 | ＋＋＋ |
| 174 F | １mlの主画分，実施例３**** | 透明 | 透明 | ＋＋＋ |
| | | | | |
| 188 A | なし | 透明 | 透明 | ＋＋＋ |
| 188 B | １mlの洗浄画分，カラム１* | 無晶性粒子 | 不透明 | －－－ |
| 188 C | １mlの洗浄画分，カラム１* および、２０ppm ポロキサマー１７１ | 場合によっては無晶性粒子 | 透明 | ＋＋＋ |

いずれの場合においても、結晶化混合物は、５００ｍｌであり、２５００ｍｇのインスリングラルギン（＝５ｍｇ）を含む。

＋＋＋＝約６０分後、懸濁液２５０ｍｌからの沈殿物３～５ｍｌ。
－－－＝約６０分後、懸濁液２５０ｍｌからの、９０ｍｌまでの沈殿物。

＊　　実施例２のカラム１の洗浄画分は、５ｇ／Ｌのタンパク質を含む。
＊＊　　実施例１のカラム２の主画分は、１５ｇ／Ｌのプレプロインスリンを含む。
＊＊＊　　実施例２のカラム２の主画分は、１７ｇ／Ｌのプレプロインスリンを含む。
＊＊＊＊　実施例３のカラム２の主画分は１７ｇ／Ｌのプレプロインスリンを含む。

【配列表】
0004519646000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　ハンス・ブルーメンシュトック
ドイツ連邦共和国６５７９５ハッテルスハイム．フレールスハイマーシュトラーセ３３
(72)発明者　シャンターレ・ハーヴェニト
ドイツ連邦共和国６５７１９ホーフハイム．アードルフ－コルピング－シュトラーセ５

審査官　野村　英雄

(56)参考文献　特開平０１－０８６８９６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第０１／０２５２７８（WO，Ａ１）
特開平１１－１３０７９８（ＪＰ，Ａ）
特表２００２－５００００３（ＪＰ，Ａ）
特表２００３－５１１０１８（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C07K　1/00-19/00
C12N　15/00
C12P　21/02
UniProt/GeneSeq
PubMed
Science Direct
WPI