

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4199543号  
(P4199543)

(45) 発行日 平成20年12月17日(2008.12.17)

(24) 登録日 平成20年10月10日(2008.10.10)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 14/435	(2006.01)	C O 7 K 14/435	
C O 7 K 14/52	(2006.01)	C O 7 K 14/52	
C O 7 K 14/62	(2006.01)	C O 7 K 14/62	
C O 7 K 19/00	(2006.01)	C O 7 K 19/00	

請求項の数 14 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-570745 (P2002-570745)  
 (86) (22) 出願日 平成14年2月8日(2002.2.8)  
 (65) 公表番号 特表2004-518446 (P2004-518446A)  
 (43) 公表日 平成16年6月24日(2004.6.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/001308  
 (87) 国際公開番号 W02002/070722  
 (87) 国際公開日 平成14年9月12日(2002.9.12)  
 審査請求日 平成17年2月4日(2005.2.4)  
 (31) 優先権主張番号 101 08 211.8  
 (32) 優先日 平成13年2月20日(2001.2.20)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 397056695  
 サノフィーアベンティス・ドイツュラント  
 ・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、ブリュニングシ  
 ユトラーセ50  
 (74) 代理人 100091731  
 弁理士 高木 千嘉  
 (74) 代理人 100080355  
 弁理士 西村 公佑  
 (74) 代理人 100105290  
 弁理士 三輪 昭次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵母による分泌を介して組換えタンパク質を生産するためのN-末端部分がヒルジン誘導体である融合タンパク質の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式：

$P_x - S_x - B_n - (Z R) - H i r (A s_m R) - \text{タンパク質}(Y) - T$

(式中、

$P_x$  は重要なタンパク質の至適収率が達成可能になるような方法において選択される任意のプロモーターDNA配列であり；

$S_x$  は至適収率を可能にするシグナル配列またはリーダー配列をコードする任意のDNAであり；

$B_n$  は1～15のアミノ酸コドンまたは化学結合であり；

ZはLysおよびArgからなる群より選択されるアミノ酸のコドンであり；

RはArgコドンまたは化学結合であり；

$A s_m$  は化学結合またはmアミノ酸コドンで、 $m = 1 \sim 10$ であり；

HirはヒルジンまたはLeu-ヒルジンをコードするDNA配列であり；

タンパク質Yは酵母中で産生され得る、そして酵母によって分泌され得る任意のタンパク質をコードするDNA配列であり；

Tは発現に有利な非翻訳DNA配列である)のDNA分子。

【請求項2】

タンパク質(Y)はミニ-プロインスリンまたはその誘導体である請求項1記載のDNA分子。

## 【請求項 3】

タンパク質 ( Y ) は医薬的に重要なタンパク質および/またはインターロイキン、リンホカインもしくはインターフェロンである請求項 1 記載の DNA 分子。

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の任意の DNA 分子によってコードされる融合タンパク質。

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の DNA 分子からなる多重コピーベクター。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の DNA 分子からなるプラスミド。

10

## 【請求項 7】

その染色体の部分として、ミニ - 染色体の部分として、または染色体外において、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の DNA 分子、請求項 5 記載の多重コピーベクターおよび/または請求項 6 記載のプラスミドを包含する宿主細胞。

## 【請求項 8】

宿主細胞は酵母である請求項 7 記載の宿主細胞。

## 【請求項 9】

S . セレビジエ、K . ラクチス、H . ポリモルファおよび P . パストリス からなる群より選択される請求項 8 記載の宿主細胞。

## 【請求項 10】

20

( a ) 請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の DNA 分子、請求項 5 記載の多重コピーベクター、または請求項 6 記載のプラスミドを請求項 7 ~ 9 のいずれかに記載の宿主細胞内で発現させ、( b ) 発現した融合タンパク質を細胞培養液の上清から単離する請求項 4 記載の融合タンパク質を培養により製造する方法。

## 【請求項 11】

培養の完了後、不要なタンパク質を沈殿させるために pH を 2.5 ~ 3.5 に調整し、発現した融合タンパク質を沈殿の上清から単離する請求項 10 記載の方法。

## 【請求項 12】

培養の上清を宿主細胞から分離したのち、宿主細胞を新鮮な培地中で反復培養し、培養時に得られた各上清から、放出された融合タンパク質を単離する請求項 11 記載の方法。

30

## 【請求項 13】

沈殿後、上清中に発現したタンパク質を濃縮する工程は、マイクロろ過、疎水性相互作用クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーからなる群より選択される請求項 10 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 14】

( a ) 請求項 10 ~ 13 の記載に従って融合タンパク質を発現させ、単離し；  
( b ) 融合タンパク質をトリプシンおよびカルボキシペプチダーゼ B によって処理し；  
そして

( c ) 工程 ( b ) の反応混合物からインスリンを単離する、  
インスリンの製造方法。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の背景】

組換えタンパク質に基づく医薬を製造する至適方法の開発は以下の観点から正当に評価されなければならない課題である。すなわち、第一に、方法は可能な限り費用効果的なものであるべきであり、第二に生成物は最高の純度のものであるべきである。この関連では発現システムの選択が特定の製造方法のコースを決定し、タンパク質化学における新技術および広範囲の生物化学的可能性の開発、並びに既知の技術の新しい組み合わせが常に、既存の方法に改良の可能性を提供することは当業者には自明である。この種の関連タンパク質の酵母における発現は、本技術分野で広く用いられている。

50

## 【 0 0 0 2 】

インスリン、GM-CSF (Leukine<sup>(R)</sup>) およびヒルジン (Refludan<sup>(R)</sup>) のようなタンパク質の製造は、特定のタンパク質またはその前駆体の酵母における合成に基づく遺伝子工学方法の開発が成功した例である。一般的に、酵母は、*Hansenula polymorpha* (Weydemannら, Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 377-385, 1995) または *Pichia pastoris* (Rosenfeldら, Protein Expr. Purif. 4: 476-82, 1996) を用いた場合、グラム規模の好収率で、とくにヒルジンを直接的に合成できる。

## 【 0 0 0 3 】

本発明者らは今回、驚くべきことに、ヒルジンまたはそのN-末端におけるヒルジン誘導体を含む融合タンパク質が、ヒルジンそれ自体の場合と同様の好収率で酵母から輸送できることを見出したのである。収率はモルベースである。これは、1 Lあたりネイティブなヒルジン100mgの収率を産生する宿主/ベクター系が、1 Lあたりで約180mgの融合タンパク質(ヒルジンおよび、たとえばEP-A 0 347 781に記載されているようなミニ・プロインスリンから成る)を産生できることを意味する。驚くべきことにヒルジンは生物学的に活性で、ミニ・プロインスリンは正しくフォールディングされた三次元構造の形態で存在する。この2つのタンパク質が、他の位置では融合タンパク質を効果的には切断しないエンドプロテアーゼによって特異的に認識されるアミノ酸のリンカーを介して融合されていると、当該タンパク質は直接切断され、活性型になることができる。インスリンの製造の場合には、ヒルジンとミニ・プロインスリンの間のリンカーは好ましくは、カルボキシ末端にアルギニンを含有する。同時プロセッシングではトリプシン変換により融合部分を切断し、プロインスリンをモノ-Arg-インスリンに変換することが可能である。したがって、本発明は、式

$$P_x - S_x - B_n - (ZR) - Hir (As_mR) - \text{タンパク質}(Y) - T$$

のDNA分子(別名:発現カセット)に関し、該発現カセットはヒルジンまたは、配列As<sub>m</sub>Rを介してタンパク質Yとの融合タンパク質を形成するヒルジン誘導体をコードしており、

## 【 0 0 0 4 】

式中、

P<sub>x</sub>は所定のタンパク質の至適収率が達成可能になるような方法において選択される任意のプロモーターDNA配列であり;

S<sub>x</sub>は至適収率を可能にするシグナル配列またはリーダー配列をコードする任意のDNAであり;

B<sub>n</sub>は1~15のアミノ酸コドンまたは化学結合であり;

ZはLysおよびArgからなる群より選択されるアミノ酸のコドンであり;

RはArgコドンであり;

As<sub>m</sub>は化学結合またはmアミノ酸コドンで、m = 1~10であり;

Hirはヒルジンまたは天然のヒルジンと少なくとも40%のホモロジーを有するヒルジン誘導体をコードするDNA配列であり;

タンパク質Yは酵母中で産生され得る、そして酵母により分泌され得る任意のタンパク質をコードするDNA配列であり;

Tは発現に有利な非翻訳DNA配列である。

## 【 0 0 0 5 】

好ましいタンパク質Yはミニ・プロインスリン誘導体、インターロイキン、リンホカイン、またはインターフェロンのようなポリペプチドである。発現カセットは好ましくは酵母に導入される。上記発現カセットは、特定の酵母ゲノムに安定に統合された1または2以上のコピーを有するか、または多重コピーベクター上もしくはミニ染色体エレメント類上、染色体外に存在してもよい。

## 【 0 0 0 6 】

本発明の他の実施態様は、上述の任意のDNA分子によってコードされる融合タンパク質である。

## 【 0 0 0 7 】

本発明のさらに他の実施態様は上述のDNA分子からなる多重コピーベクターおよびプラスミドである。

## 【 0 0 0 8 】

本発明の付加的な実施態様は、その染色体の一部として、ミニ染色体の一部として、または染色体外に、上述のDNA分子、または上述の多重コピーベクターもしくは上述のプラスミドを有する宿主細胞であり、この場合、上記宿主細胞は好ましくは酵母であり、とくに *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *H. polymorpha* および *P. pastoris* からなる群より選択される。

## 【 0 0 0 9 】

本発明の他の実施態様は上記融合タンパク質を培養で製造する方法であり、

( a ) 上述のDNA分子、上述の多重コピーベクターまたは上述のプラスミドを、上述の宿主細胞内で発現させ、

( b ) 発現した融合タンパク質を細胞培養液の上清から単離し、この場合とくに培養の完了後、不要なタンパク質を沈殿させるためにpHを2.5~3.5に調整し、発現した融合タンパク質を沈殿の上清から単離する方法である。

## 【 0 0 1 0 】

本発明の他の実施態様は上述の方法において、培養上清を宿主細胞から分離したのち、宿主細胞を新鮮な培地中で反復培養し、培養時に得られた各上清から放出された融合タンパク質を単離する方法である。

## 【 0 0 1 1 】

本発明の他の実施態様は、上述の方法において、上清中に発現したタンパク質を沈殿させたのち濃縮する工程が、マイクロろ過、疎水性相互作用クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーからなる群より選択される。

## 【 0 0 1 2 】

本発明の付加的実施態様は、インスリンの製造方法において、

( a ) 上述の融合タンパク質を上述の方法に従って発現させ、単離し；

( b ) 融合タンパク質をトリプシンおよびカルボキシペプチダーゼ B によって処理し；そして、

( c ) 工程 ( b ) の反応混合物からインスリンを単離する方法である。

## 【 0 0 1 3 】

以下に記述する発現系は例とし掲げるものである。発現カセットを上述の選択された系に導入するためには、適当な組換えDNA構築が、選ばれた宿主系のタイプに応じて作成されなければならないことは当業者に自明の通りである。したがって、選択された宿主/ベクター系に関連して工業的培養を至適化することができる。

## 【 0 0 1 4 】

ヒルド類の1種であるヒルからは、たとえば、トロンピン阻害ヒルジンの様々なアイソフォームが開発されてきた。ヒルジンはその分子の人工的な改変、たとえばN-末端アミノ酸の交換により、医薬的要求のために至適化されている(たとえば、EP-A 0 324 712)。本発明には、ヒルジンおよびヒルジン変異体の使用が包含される。本発明の特定の実施態様では天然のヒルジンアイソフォームの一つが使用される(天然のアイソフォームは、ともに「ヒルジン」と呼ばれる)。天然のアイソフォームは、たとえばVal-Val-ヒルジンまたはIle-Thr-ヒルジンである。本発明の他の実施態様では、天然のヒルジンアイソフォーム変異体を使用する。変異体は天然のヒルジンアイソフォームから得られるが、たとえば、天然のアイソフォームと比較してアミノ酸の付加および/またはアミノ酸の欠失および/またはアミノ酸の交換が含まれる。ヒルジン変異体は、天然のヒルジンアイソフォームとは別のペプチドセグメントおよび新たなアミノ酸を含有していてもよい。ヒルジン変異体は既知であり、たとえばDE 3 430 566に記載されている。ヒルジン変異体はタンパク質の形で市販されている(Calbiochem Biochemicals, カタログ番号377-853, -950-960)。

## 【 0 0 1 5 】

多くの場合、ヒルジンを含む融合タンパク質は酸性媒体に驚くほど良好な溶解性を示し、これはタンパク質の化学的な処理に関してきわめて有利である。第一に、上清の成分の多くは上述の条件下に沈殿する。第二に、大部分のペプチダーゼまたはプロテアーゼは不活性である。したがって、操作の最後に培養液を酸性にすることで、融合タンパク質から不要な上清タンパク質を宿主細胞とともに直接分離し、更なる工程で上記融合タンパク質を濃縮することができる。これは同様に本発明の主題である。

## 【0016】

培養の終わりには、フォールディングの過程はまだ100%完全ではない。メルカプタンまたは、たとえばシステイン塩酸塩の添加がこの過程を完了させる。これは同様に本発明の主題である。

10

## 【0017】

## 【実施例】

以下の実施例は本発明を、限定ではなく、さらに詳細に記述するものである。

実施例1：Leu - ヒルジン (Ref ludan<sup>(R)</sup>) - Arg - ミニ - プロインスリンから成る融合タンパク質をコードする発現カセットの構築

出発原料はプラスミドpK152 (PCT/EP00/08537)、pSW3 (EP-A 0 347 781) およびウシインターロイキン2 (Priceら, Gene 55, 1987) をコードする組換え酵母プラスミド誘導体である。酵母プラスミドは酵母ADH2プロモーターの制御下に 因子リーダー配列をもつことを特徴とする。この配列の後に、KpnI制限酵素認識部位を介して連結するウシインターロイキン2 cDNA配列が続き、操作後、このベクター中に1つだけ存在する、非翻訳3 20  
末端におけるNcoI制限酵素認識部位を含有する。したがって、このcDNA配列はKpnI/NcoI切断により、そのプラスミドから容易に切り離すことができる。良好な発現効率が報告されていることから、残余の3 インターロイキン2配列 (Tとして) はmRNAに対して安定化作用を有し、したがって、酵母特異的なターミネーター配列により置換する必要はないことが推定できる。プラスミドpK152はLeu - ヒルジン (Ref ludan) をコードするDNA配列を有し、プラスミドpSW3はミニ - プロインスリンのDNA配列を有する。ヒルジン - LysArg - ミニ - プロインスリンをコードする遺伝子配列は最初、PCR技術によって調製される。この目的ではExpedite<sup>(R)</sup> DNA合成システムを用いて4つのプライマーを調製する：

## 【0018】

i . hir\_insf1 (配列番号：1)、コードされるタンパク質セグメント (配列番号：2) 30

I P E E Y L Q Arg F V N Q H L C  
5'- ATCCCTGAGGAATACCTTCAG CGA TTTGTTAACCAACACTTGTGTGG-3'  
59 60 61 62 63 64 65 B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7

ii . hir\_insrev1 (配列番号：3)

5'- CCTCACAAGTG TTGGTTAACA AA TCG CT GAAGGTATTC CTCAGGGAT-3'

iii . hirf1 (配列番号：4、コードされるタンパク質セグメント (配列番号：5) 40

L T Y T D C  
5'- TTTTTTTGGATCCTTTGGATAAAAAGACTTACGTATACTGACTGCAC

iv . insnc01rev (配列番号：6)

5'- TTTTTTCCAT GGGTCGACTATCAG

## 【0019】

50

プライマー-hir\_insf1は、ヒルジンの末端アミノ酸(59-65)のコードとArgリンカー(コード太字部)を介するインスリン配列B1~B7の間の接続部を表している。プライマー-hir\_insf1はそれに対し100%相補的である。プライマー-hirf1は、EP-A 0 324 712に記載されているように、ヒルジン遺伝子の開始部位からKpnI切断部位までをコードする。プライマー-insncoirevはEP-A 0347 781による合成ミニ-プロインスリンの3'末端をマークする。

【0020】

2つの標準ポリメラーゼ連鎖反応は、プライマーペアhirf1/hir\_insf1と鋳型としてプラスミドpK152のDNA、およびhir\_insf1/insncoirevと鋳型としてプラスミドpSW3のDNAを用いて実施する。この反応は、100 µLのPCR緩衝液中で、各場合200nmolのプライマー、1 µLのポリメラーゼおよび100ngのベクターを用いて実施される。工程1は95 °Cで2分間のインキュベーションである。

ついで、95 °Cで30"、55 °Cで30"および72 °Cで30"を25サイクル行う。最後のサイクルに続いて、72 °Cで3分間インキュベートし、ついで反応を停止させる。プライマー-hir\_insf1およびhir\_insf1は100%相補的なので、2つの生成物のDNA産物は上記配列に応じて重複し、したがって最初の2反応の生成物を鋳型として、ならびにプライマー-hirf1およびinsncoirevを用いた第三の反応において、Argによって隔てられるヒルジンおよびミニ-プロインスリンをコードするDNAフラグメントを形成させる。PCRフラグメントを酵素KpnIおよびNcoIで消化し、ついでT4リガーゼ反応において、KpnI/NcoIによって開裂したpADH2ベクター中に挿入する。次に、EP-A 0347 781の実施例7と同様にコンピテント E. coli MM294細胞を、ライゲーション混合物で形質転換する。プラスミドDNAをついで2つのクローンから、DNA配列解析による特性分析のために単離する。挿入されたDNA配列の確認後、プラスミド調製物のDNAを使用して上記実施例に従いパンの酵母、Y79株の細胞を形質転換する。しかしながら、pADH2ベクターを使用した場合、上記実施例とは対照的に、ベクターの導入の後に、trp1-1変異の相補性の選択を行う。他のコントロールでは、プラスミドDNAは、酵母形質転換体から再単離され、制限分析によって分析される。構築された発現ベクターはpADH2Hir\_Insと表される。発現は実施例4に従って実施する。融合タンパク質は上清中に見出される。

【0021】

実施例2: Leu-ヒルジン(Refludan)-Gly Asn Ser Ala Arg-ミニ-プロインスリンから成る融合タンパク質をコードする発現カセットの構築  
この実施例はヒルジン誘導体とミニ-プロインスリンの間のトリプシン認識部位を修飾する方法を示す。構築は実施例1に従って実施する。

【0022】

2つの新しいオリゴヌクレオチドを合成する。

Hir\_insf (配列番号: 7)、コードされたタンパク質セグメント (配列番号: 8)

G N S A R F V N Q H L C

5' ATCCCTGAGGAATACCTTCAGGGAAATTCGGCACGATTTGTAAACCAACTTGTGTGG

3'

Hir<sub>65</sub>

B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7

Hir\_insf (配列番号: 9)

5' CCACACAAGTGTGGTTAACAAATCGTGCCGAATTTCCCTGAAGGTATTCCTCAGGGAT

B2 B1

Hir<sub>65</sub>

【0023】

プライマーペアhirf1/hir\_insf1と、鋳型としてプラスミドpK152のDNAを用いて、およびhir\_insf1/insncoirevと、鋳型としてプラスミドpSW3のDNAを用いて2種のポリメラー

ゼ連鎖反応を実施する。最初の2反応の生成物を鋳型として、およびプライマー-hirf1およびinsncoirevを用いた第三の反応において、リンカー-Gly Asn Ser Ala Argによって隔てられるヒルジンおよびミニ-プロインスリンをコードするDNAフラグメントを形成させる。PCR3の生成物をついでKpnIおよびNcoIで切断し、適当に開裂したpADH2ベクター中に導入し、実施例1に従って特性を調べる。このプラスミドはpADHH\_GNSA\_Insと表される。細胞をプラスミドDNAで形質転換する。発現は実施例3に従って実施する。融合タンパク質は上清中に見出される。

【0024】

実施例3：パンの酵母系における組換え生成物の発現

発現は2相に分割する。最初に、前培養を酵母最小培地中で行う。培地は1Lあたり以下の組成を有する。

6.7g 酵母窒素ベース(アミノ酸なし)

5.0g カサミノ酸(ビタミンなし)

0.008% アデニン

0.008% ウラシル

2% グルコース

【0025】

本培養または発現培養は、前培養のアリコート接種して行う。本培養培地は1Lあたり以下の成分を含有する。

10g 酵母エキス

20g ペプトン

0.008% アデニン

0.008% ウラシル

4% グルコース

【0026】

記載の培地を使用し、発現は次のようにして振盪フラスコ中で実施する。

方法：一夜培養した前培養液0.3mLを80mLの予め加温した培地で希釈し、激しく振盪しながら30分で約24時間インキュベートする。各場合とも、この方法で産生させた培養液1mLをついで遠心分離し、光学密度を測定したのち、そして細胞を除去したのち、上清を凍結乾燥し、SDS-PAGEにより分析する。生物学的に活性なヒルジンの含量はトロンピン阻害アッセイを行って決定する。別の培養プロトコールにより、細胞は、ろ過または注意深い遠心分離により除去される。所定のタンパク質を培地から単離する一方、細胞に炭素源としてアルコールと0.5%以下のグルコースを含有する、新鮮な予め加温した本培養培地を加える。このようにして培養は中断しないで継続される。この工程は5回まで反復できる。

【0027】

実施例4：P. pastoris系におけるヒルジン - Arg - ミニ - プロインスリン融合タンパク質のクローニングおよび発現

P. pastoris系を使用する組換えタンパク質の製造のためのクローニングおよび発現キットはInvitrogen<sup>(R)</sup>から市販されている。したがって、所望の組換えタンパク質を製造するためのP. pastoris系の調製および以後の発現に関する詳細な技術的プロトコールは提供されているため、上述のプロトコールに従う場合、所望のタンパク質をコードする発現ベクターの構築のみを記述する。EasySelect<sup>(R)</sup>Pichia発現キット(カタログ番号K1740-01)を使用する。

【0028】

pPICZ Aベクターはそのキットの一部である。制限酵素XhoIおよびSacIIによるベクターの開裂は実施例1と同様、所定のタンパク質を因子リーダーに付加し、上清への分泌について試験することを可能にする。融合タンパク質のクローニングには2つのプライマーが要求される。プライマー pichia\_H\_If1(配列番号:10)は次の配列を有する:

10

20

30

40

5' - TTTTTTCTCGAGAAAAGA CTTACGTATACTGAC - 3'

XhoI

Hir<sub>1</sub> Hir<sub>2</sub> ほか

プライマー pichia\_H\_Irev2f1 (配列番号: 11) は次の配列を有する:

5' - TTTTTTGGCGCCGAATTCACCTATTAGTTACAGTAGTTTTCC - 3'

SacII EcoRI

A21

【0029】

使用する鋳型はプラスミドpADH2Hir\_InsのDNAである。両プライマーによる標準PCRは、XhoIおよびSacIIの挿入部位により延長されたヒルジン - Arg - ミニ - ロインスリンの配列を含有するDNA生成物を産生する。このDNA生成物が適当に切断されて、そのフラグメントが単離されると、上記フラグメントをT4 DNAリガーゼ反応において、開裂されたベクターDNA中に挿入することができる。製造業者のプロトコルを変えて、実施例1に記載のE. coli MM294株をライゲーション混合物で形質転換し、ゼオシン選択プレート上で組換えコロニーをスクリーニングして、成功した形質転換体を得る。プラスミドDNAをクローンから再単離し、ついで制限分析およびDNA配列分析により特性を調べる。次に、この方法で構築されたプラスミドを用いて、製造業者の指示書に従って、融合タンパク質製造のためのP. pastoris発現クローンを調製する。

10

20

【0030】

実施例5: トロンピン阻害アッセイ

ヒルジン濃度はGriessbachらの方法(Thrombosis Research 37, pp. 347-350, 1985)に従って決定する。この目的には、検量曲線を確立させるため、特定量のRefludan標準を測定に包含させる。これからmg/Lでの収率が直接測定できる。生物活性も、融合タンパク質のプロインスリン成分の正しいフォールディングの直接的な指標となる。また正しいS-S架橋形成を測定するために、蛋白分解性S. aureus消化、ついでRP-HPLCシステムにおける分析を使用することも可能である。

【0031】

実施例6: 融合タンパク質の精製

培養の完了後、pHを2.5~3に調整する。宿主細胞の自然分解または分泌により上清に見出される大部分の他のポリペプチドとは対照的に、融合タンパク質は驚くべきことにpH 2.5~3では沈殿しない。したがって、培養培地を適宜、酸性にし、ついで沈殿の完了後に、沈殿と細胞を遠心分離またはマイクロろ過によって除く。次に、培地をpH 6.8に調整し、融合タンパク質の含有量を分析的HPLC測定により平行して測定する。測定に続いて、融合タンパク質1~1.5 mgあたり約1 µgになるように、上清にトリプシンを添加する。室温で約4時間インキュベートしたのち、精製は2 - プロパノールの存在下に、pH3.5で陽イオン交換クロマトグラフィーにより実施する。溶出は0.15~0.45Mの勾配を適用して緩衝液中で実施する。モノ - Arg - インスリンは約0.3Mで溶出する。1:1に希釈したのち、10%濃度のZnCl<sub>2</sub>溶液を添加し、モノ - Arg - インスリンを、約pH6.8においてインスリン含有分画から沈殿させる。インスリンをろ別し、ついで0.05M Tris-HCl (pH 8.5)に溶解し、2 mg/mLの溶液を得る。ついで、溶液100mLあたり約1ユニットのカルボキシペプチダーゼBを添加し、穏やかに攪拌しながら反応を実施する。ついでクエン酸でpHを5.5に調整し、インスリンをZnCl<sub>2</sub>の存在下に結晶化させる。結晶を取り、溶解し、RP-HPLCで精製したのち、インスリンを再度結晶化により精製する。

30

40

【0032】

実施例7: 培養培地中において直接行われる融合タンパク質のプロセッシング

発現期の終わりに、培養培地のpHを6.8に調整し、トリプシンを攪拌しながら加えて、最終濃度4~8 mg/Lを確立させる。約4時間インキュベートしたのち、この方法で処理した培養液のpHを2.5~3に調整する。1~6時間かけて沈殿させたのち、pHを3.5に上げ、

50

形成されたモノ - Arg - インスリンを30% 2 - プロパノールの存在下に陽イオン交換クロマトグラフィーによって精製する。溶出は0.05~0.5MのNaCl塩の勾配を用いて実施する。生成物含有分画をH<sub>2</sub>Oで1:1に希釈し、ついで0.1%濃度のZnCl<sub>2</sub>溶液になるようにZnCl<sub>2</sub>を加える。モノ - Arg - インスリンをpH約6.8で沈殿させ、たとえば実施例6に従ってインスリンに変換する。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH

<120> Use of fusion proteins whose N-terminal part is a hirudin derivative for the production of recombinant proteins via secretion by yeasts 10

<130> DEAV2001/0008

<140> 10108211.8

<141> 2001-02-20

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1 20

<210> 1

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:hir\_insf1

<400> 1

atccctgagg aataccttca gcgatttggt aaccaacact tgtgtgg 47

<210> 2 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:protein  
hir\_insf1

<400> 2

Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Gln Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys

1 5 10 15 40

<210> 3

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hir\_insrev1

<400> 3

cctcacaagt gttggttaac aaatcgctga aggtattcct cagggat 47

<210> 4

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hirf1

<400> 4

tttttttggga tcctttggat aaaagactta cgtatactga ctgcac 46

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: protein hirf1

<400> 5

Leu Thr Tyr Thr Asp Cys

1 5

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: insncolrev

<400> 6

ttttttccat gggtcgacta tcag 24

<210> 7

<211> 59

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Hir\_insf

<400> 7  
atccctgagg aataccttca gggaaattcg gcacgatttg ttaaccaaca cttgtgtgg 59

<210> 8  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

10

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: protein  
Hir\_insf

<400> 8  
Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys  
1 5 10

20

<210> 9  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Hir\_insrev

<400> 9  
ccacacaagt gttgggtaac aaatcgtgcc gaatttcocct gaaggatttc ctcagggat 59

30

<210> 10  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: pichia\_H\_1f1

<400> 10  
tttttttctc gagaaaagac ttacgtatac tgac 34

<210> 11  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

40

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: pichia\_H\_Irev2

<400> 11  
ttttttggcg ccgaattcac tattagttac agtagttttc c 41

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/19</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19
<b>C 1 2 P</b>	<b>21/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P 21/02 E
			C 1 2 P 21/02 F
			C 1 2 P 21/02 K

(72)発明者 パウル・ハーバーマン  
 ドイツ連邦共和国 6 5 8 1 7 エブシュタイン・ロセルトシュトラッセ 3 5

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 米国特許第 0 5 8 6 6 3 7 1 ( U S , A )  
 米国特許第 0 5 1 8 0 6 6 8 ( U S , A )  
 米国特許第 0 5 6 7 7 1 7 2 ( U S , A )  
 国際公開第 9 1 / 0 0 9 1 2 5 ( W O , A 1 )  
 欧州特許出願公開第 0 0 4 6 7 8 3 9 ( E P , A 1 )  
 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America , 1 9  
 8 6 年 , Vol.83 , p.6766-6770

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N15/00-15/90  
 C07K1/00-19/00  
 C12P1/00-41/00  
 CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)  
 JSTPlus(JDreamII)  
 Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
 UniProt/GeneSeq  
 Pubmed