

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. Februar 2004 (19.02.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/015112 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/62**,
C07K 19/00

Butzbach (DE). **SOMMERMEYER, Klaus** [DE/DE];
In der Laubach 26, 61191 Rosbach v.d.H. (DE). **LANG,**
Volker [DE/DE]; Harheimer Weg 3, 61118 Bad Vilbel
(DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2002/008249

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Juli 2002 (24.07.2002)

(74) **Anwälte: VON MENGES, A.** usw.; Uexküll & Stolberg,
Beselerstr. 4, 22607 Hamburg (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): FRESNIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH**
[DE/DE]; Daimlerstr. 16, 61352 Bad Homburg (DE).

(72) **Erfinder; und**

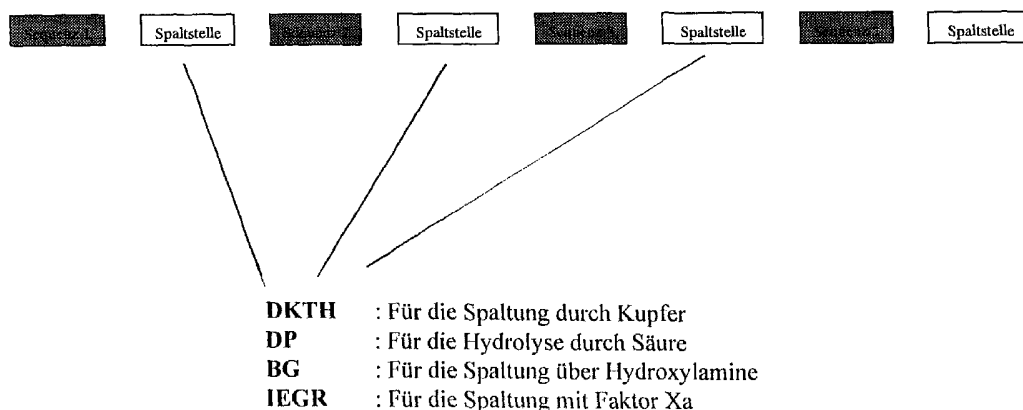
(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): DORMANN, Dirk**
[DE/DE]; Frauenlobstr. 68, 55118 Mainz (DE). **EICH-**
NER, Wolfram [DE/DE]; Richard Wagner Str. 12, 35510

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** DNS-CONSTRUCTS FOR THE PRODUCTION OF PEPTIDES

(54) **Bezeichnung:** DNS-KONSTRUKTE FÜR DIE HERSTELLUNG VON PEPTIDEN



(57) **Abstract:** The invention relates to DNS-constructs which code for a polypeptide having the following general structural formula $A-x_1-B(-x_2-C_{1-n})_n$, wherein A and B are the same or different oligopeptides with 3 - 100 amino acids; C or C_{1-n} are one or several oligopeptides of any particular sequence with 3 - 100 amino acids; x_1 and x_2 are the same or different recognition sequences for a peptide separation; and n is a whole number greater than 0. The invention also relates to the use of DNS-constructs for the production of peptides and peptide mixtures, in addition to the peptide mixtures obtained therefrom.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft DNS-Konstrukte, die für ein Polypeptid kodieren, das die folgende allgemeine Strukturformel $A-x_1-B(-x_2-C_{1-n})_n$ umfaßt, worin A und B dieselben oder verschiedene Oligopeptide mit 3 bis 100 Aminosäuren sind; C oder C_{1-n} ein oder mehrere Oligopeptide beliebiger Sequenz mit 3 bis 100 Aminosäuren sind; x_1 und x_2 dieselben oder verschiedene Erkennungssequenzen für eine Peptidspaltung sind; und n eine ganze Zahl größer als 0 ist. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der DNS-Konstrukte für die Herstellung von Peptiden und Peptidgemischen sowie die dadurch erhältlichen Peptidgemische.

WO 2004/015112 A1



DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.*

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht*

DNS-Konstrukte für die Herstellung von Peptiden

Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige DNS-Konstrukte, die für Peptide mit einer bestimmten Struktur kodieren, und deren Verwendung für die Herstellung von Peptiden und Peptidgemischen sowie die dadurch erhältlichen Peptidgemische.

Der Bedarf an Poly- und Oligopeptiden mit einer bestimmten Sequenz und Struktur hat in den vergangenen Jahren stark zugenommen. Eine Vielzahl von Polypeptiden ist bereits als Wirkstoff für Arzneimittel zugelassen worden, weitere befinden sich in der vorklinischen oder klinischen Erprobungsphase für eine entsprechende Zulassung (Pharma Buisness, July/August 2000, Seiten 45 bis 60).

Derzeit werden zudem viele Peptid-Bibliotheken erstellt, die es ermöglichen eine sehr große Anzahl verschiedener Peptide schnell und einfach auf eine bestimmte Aktivität der Peptide hin zu analysieren. So existieren beispielsweise Phagen-Display-Bibliotheken, bei denen kurze Oligopeptide (beispielsweise 3- bis 50-mere) auf der Oberfläche von Phagen exprimiert werden. Ferner

- 2 -

werden Antikörper-Bibliotheken, bei denen die Antikörper beispielsweise aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen (sogenannte "single chain antibodies", Einzelketten-Antikörper), in Bakterien oder auf der Oberfläche von Phagen exprimiert. Alle
5 diese Bibliotheken haben das Ziel, Peptide mit bestimmter Wirkstoff- oder Bindungs-Aktivität zu identifizieren. Unter Verwendung einer Phagen-Display-Bibliothek wurde beispielsweise das bereits bekannte Bindungsmotiv RGD des Fibronektin-Moleküls gefunden, welches die Bindung dieses Moleküls an eine Vielzahl von
10 Integrine bewirkt (Pasqualini et al., J. Cell. Biol. Vol. 130 (1995), S. 1189).

Konnte ein Peptid mit gewünschten Eigenschaften identifiziert werden, so eignen sich die Peptid-Bibliotheken nicht für die
15 Herstellung dieses Peptides in großer Menge. Derzeit werden Peptide über drei verschiedene Synthesewege erstellt. Alle Peptide können entweder durch chemische oder rekombinante Synthese erzeugt werden. Ferner können eine Reihe von Peptiden durch Extraktion aus natürlichen Quellen gewonnen werden. Alle
20 im Stand der Technik bekannten Verfahren weisen jedoch erhebliche Nachteile auf.

Die chemische Peptidsynthese bietet sich primär bei kurzen Peptiden an, da die chemische Synthese längerer Peptide sehr
25 aufwendig ist. Ferner weist die chemische Synthese den inhärenten Nachteil auf, dass dafür organische Lösungsmittel verwendet werden müssen, die im Falle einer geplanten medizinischen Verwendung der Peptide durch aufwendige Reinigungsverfahren zu entfernen sind.

30 Auch die Extraktion von Peptiden aus natürlichen Quellen ist in der Regel sehr aufwendig. Die Peptide liegen in diesen Quellen üblicherweise in geringer Konzentration vor. Eine Vielzahl von Reinigungsschritten ist daher notwendig, um einigermaßen reine
35 Peptide zu erhalten.

- 3 -

Die rekombinante Synthese eines Peptids durch Expression einer für das Peptid kodierenden DNS weist als Vorteil die hohe Genauigkeit des Syntheseprozesses auf. Dieser Syntheseweg ermöglicht es, Peptide herzustellen, die chemisch nur sehr schwierig hergestellt werden könnten. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass der Einsatz chemischer Verbindungen mit toxischer Wirkung vermieden werden kann (keine Verwendung von Lösungsmitteln, etc.). Auf diesem Syntheseweg können auch längerkettige Peptide relativ kostengünstig hergestellt werden (WO 98/50563).

10

Für die rekombinante Synthese sind im Stand der Technik eine Vielzahl von Wirtssystemen benutzt worden. Kürzlich veröffentlichte Beispiele für Expressionssysteme, die zur Herstellung von rekombinanten Peptiden/Proteinen verwendet werden können, sind zum Beispiel *Escherichia coli* (Gavit P, Better M, J. Biotechnol 79: 2, 127-36, Apr.28, 2000), Hefen (Cereghino JL, Cregg JM, FEMS Microbiol Rev 24: 1, 45 - 66, Jan, 2000), eukaryotische Zellkulturen (Geisse S, et al., Protein Expr. Purif.8: 3, 271-82, Nov, 1996), Insektenzellen (Sorscher EJ, Sommerfelt MA, Methods Mol. Biol 39: 337 - 48, 1995), transgene Pflanzen (Cramer CL, Boothe JG, Oishi KK, Curr Top Microbiol Immunol 240: 95 - 118, 1999) und transgene Tiere (Pollock DP, et al., J Immunol Methods 231:1-2, 147 -57, Dec 10, 1999).

Der Nachteil der rekombinanten Synthese liegt darin, dass die Wirtszellen dazu tendieren die Peptide nur in geringen Mengen zu erzeugen. Insbesondere bei Peptiden mit kürzerer Kettenlänge erfolgt zudem eine Sekretion der Peptide (WO 98/50563). Um die Ausbeuten zu erhöhen, wurden verschiedene Strategien entwickelt.

30

Ein Ansatz besteht darin, eine für das Peptid kodierende DNS-Sequenz zu erstellen, die es ermöglicht, das Peptid als Teil eines Fusionsproteins zu exprimieren (WO 95/27782, US 6,183,992). Der "Fusionspartner" kann dabei ein Protein sein, welches sich vorteilhaft auf die Expression auswirkt und/oder die Reinigung vereinfacht. In einer Weiterentwicklung dieses Ansatzes wurden Wiederholungen von Peptideinheiten in Form von Fusionsproteinen

35

- 4 -

exprimiert (WO 91/07496, Kempe et al., Gene 39 239-245, 1985) und anschließend gereinigt.

Ferner wurden im Stand der Technik DNS-Konstrukte erstellt, die für Fusionsproteine kodieren, welche zwischen zwei Peptidsequenzen eine Erkennungsstelle für eine Peptidspaltung aufweisen (WO 00/32795). Auch diese DNS-Konstrukte exprimieren jedoch die gewünschten Peptide nur in relativ geringer Konzentration.

Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Problem liegt dementsprechend in der Bereitstellung verbesserter DNS-Konstrukte, die eine rekombinante Expression von Peptiden und Peptidgemischen ermöglichen.

Dieses Problem wurde nunmehr durch DNS-Konstrukte gelöst, die für ein Polypeptid kodieren, wobei das Polypeptid die folgende allgemeine Strukturformel

$$A-x-B(-x_{1-n}-C_{1-n})_n$$

20

umfaßt, worin

A und B dieselben oder verschiedene Oligopeptide mit 3 bis 100 Aminosäuren sind;

25

C oder C_{1-n} ein oder mehrere Oligopeptide beliebiger Sequenz mit 3 bis 100 Aminosäuren sind;

x und x_{1-n} dieselben oder verschiedene Erkennungssequenzen für eine Peptidspaltung sind; und

30

n eine ganze Zahl größer als 0 ist.

Die vorliegende Erfindung stellt somit erstmals DNS-Konstrukte zur Verfügung, die für eine neuartige Kombination von Peptidsequenzen kodieren, welche die Herstellung von Peptiden in hoher Konzentration ermöglicht. Dabei kommt eine überraschende Kom-

35

- 5 -

bination verschiedener rekombinanter und chemischer Techniken zum Einsatz.

In der obigen Formel kann A ein Oligopeptid darstellen, das dieselbe oder eine andere Sequenz als Oligopeptid B aufweisen. C stellt ein Oligopeptid dar, das dieselbe oder eine von A und B verschiedene Sequenz aufweist. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform weisen A, B und C unterschiedliche Sequenzen auf.

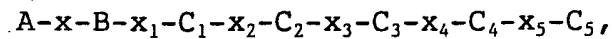
Das DNS-Konstrukt ist ferner dadurch gekennzeichnet, dass n größer als 0, vorzugsweise größer als 1, insbesondere größer als 3, 5 oder 10 ist. Soweit n größer als 1 ist, ergeben sich Oligopeptide C_1 , C_2 , C_n , die dieselbe oder verschiedene Sequenzen aufweisen können. Es ist besonders bevorzugt, dass n im Bereich von 3 bis 5 liegt.

Die Variable n kann auch von der Art der für die Expression des DNS-Konstruktes verwendeten Wirtszelle abhängen. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine Wirtszelle für die Expression des DNS-Konstruktes verwendet, die eine verringerte Rekombinationsfrequenz aufweist. Die Rekombination der DNS wird von den sogenannten REC-Enzymen der Wirtszelle gesteuert. Im Stand der Technik sind Wirtszellen erzeugt worden, die Mutationen (beispielsweise Deletionen oder Substitutionen) in den REC-Genen aufweisen. Als Folge dieser Mutationen werden die REC-Gene in verringertem Umfang oder gar nicht mehr exprimiert. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden Wirtszellen mit einer im Vergleich zur Wildtyp der Zelle verringerten Expression der REC-Gene als Zellen mit verringerter Rekombinationsfrequenz bezeichnet.

Erfindungsgemäß ist es besonders in den Fällen, in denen n größer als 3, insbesondere größer als 5 oder 15 ist, bevorzugt, Wirtszellen zu verwenden, die eine verringerte Rekombinationsfrequenz aufweisen.

- 6 -

Für den Fall, dass $n = 5$ ist, kodiert das erfindungsgemäße DNS-Konstrukt somit für ein Peptid der Formel



5

worin A, B und C_{1-5} Oligonukleotide darstellen, welche dieselben oder verschiedene Sequenzen aufweisen können, und x und x_{1-5} dieselben oder verschiedene Erkennungssequenzen für eine Peptidspaltung darstellen. Erfindungsgemäß werden besondere Vorteile erhalten, wenn $n = 3, 5$ oder größer ist, da die gewünschten Peptide in diesem Fall durch das DNS-Konstrukt in besonders hoher Konzentration zur Expression gelangen. Die Erfindung umfaßt daher insbesondere DNS-Konstrukte in denen n größer als 15 und größer als 50 beträgt.

15

Erfindungsgemäß ist es bevorzugt, dass das DNS-Konstrukt für ein Peptidgemisch kodiert. Eine solche Anwendung wäre zum Beispiel ein DNS-Konstrukt, das für ein Gemisch von Peptiden kodiert, deren Verwendung in einer Spüllösung zur Reduzierung der hohen Rezidivrate des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms nach transurethraler Resektion von Blasenkarzinom (DE 19529909C2) bekannt ist. Bei dieser Verwendung soll die lokale Tumorumplantation durch Bindung der Tumorzellen an Adhäsionsmoleküle verhindert werden. Hierbei erscheint es vorteilhaft unterschiedliche Moleküle, die am Mechanismus der Zelladhäsion beteiligt sind, durch Oligopeptide zu blockieren. Um eine möglichst vollständige Blockierung zu erreichen, müssen die Peptide im Überschuß vorliegen. Daher werden größere Quantitäten unterschiedlicher Oligopeptide bei dieser Verwendung eingesetzt.

30

Ein entsprechendes Peptidgemisch bestehend aus mehreren unterschiedlichen Peptidsequenzen kann durch die erfindungsgemäßen DNS-Konstrukte als Fusionsprotein innerhalb einer Zelle exprimiert werden. Die unterschiedlichen Peptide sind innerhalb des Fusionsproteins über Sequenzen verbunden, die eine Spaltung zur Generierung der einzelnen Peptide ermöglichen. Die einzelnen Peptidsequenzen können dabei als Einzelkopie oder auch als

35

- 7 -

Wiederholung vorliegen. Gemäß dieser Ausführungsform der Erfindung kann es sich beispielsweise bei den Oligopeptiden A, B und C_{1-n} um eines der Peptide RGD, LDV, IDA, DGEA, GPRP, VTL, YIGSR, KQAGDV oder REDV handeln. Dabei ist es besonders bevorzugt, dass die Peptide bereits in der Mischung exprimiert werden, in der diese später als Wirkstoffe in der Spüllösung eingesetzt werden.

Gemäß einer alternativen Ausführungsform kodieren die erfindungsgemäßen DNS-Konstrukte für antimikrobielle Peptide. In den letzten Jahren verursachen Bakterien, die gegen Antibiotika resistent sind, große Probleme in der Human- und Veterinär-Medizin. Neuerdings sind antimikrobielle Peptide entwickelt worden, die eine sehr interessante neue Klasse von antimikrobiellen Agenzien darstellen (Hancock, R. E. W., J. Med. Microbiol., Vol. 46 , 1 - 3, 1997). Ein kritischer Aspekt für den Einsatz von antimikrobiellen Peptiden sind jedoch deren hohe Herstellungskosten (US 6183992). Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen DNS-Konstrukte für die Expression der antimikrobiellen Peptide ist es nunmehr möglich, die Herstellkosten zu reduzieren und in einem Verfahrensschritt eine Kombination unterschiedlicher Peptide zu erzeugen.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften aufgrund der toxischen Aktivität der Peptide üblicherweise nicht in mikrobiellen Expressionssystemen hergestellt werden können. Die Verwendung der erfindungsgemäßen DNS-Konstrukte bei der Herstellung dieser Peptide ermöglicht jedoch die Expression in mikrobiellen Wirtssystemen. Erst die Aufspaltung des Polypeptids in antimikrobielle Peptide würde die toxischen Peptide erzeugen.

Der Einsatz der erfindungsgemäßen DNS-Konstrukte ist beispielsweise auch für die Herstellung von Impfstoffen vorteilhaft. Für diesen Zweck können verschiedene Peptid-Epitope aus einem "Zielprotein" eines infektiösen Agens (Bakterium, Virus) ausgewählt, durch die erfindungsgemäßen DNS-Konstrukte exprimiert,

- 8 -

aufgespalten und als Peptidgemisch oder als einzelne Peptide zur Immunisierung von Menschen oder Tieren verwendet werden.

Das erfindungsgemäße DNS-Konstrukt eignet sich für die Expression
5 von Poly- und Oligopeptiden mit einer beliebigen Kettenlänge. Die Kettenlänge der einzelnen Oligopeptide kann beispielsweise von 3 bis 100 Aminosäuren betragen. Die Expression von Oligopeptiden A, B und C_{1-n} mit einer Länge von 5 bis 50 Aminosäuren, insbesondere 7 bis 20 Aminosäuren, ist jedoch besonders bevorzugt.

10

Das erfindungsgemäße Konstrukt kodiert für ein Peptid, das eine oder mehrere verschiedene Erkennungssequenzen für die Peptidspaltung x aufweist. Die Erkennungssequenzen können dabei so ausgestaltet sein, dass die Spaltung durch Proteasen, innerhalb
15 der Wirtszelle oder durch eine chemische Spaltung ermöglicht wird.

Im Stand der Technik sind eine Vielzahl von Proteasen bekannt, die eine spezifische Spaltung von Peptiden ermöglichen, darunter
20 Faktor Xa, TEV, Genenase I, Thrombin, Enterokinase und 3C ((Nagai K and Thogersen HC, Nature 309, 810 - 812, 1984; Dougherty WG et al., EMBO Journal 7, 1281 - 1287, 1988; Carter P and Wells JA et al., Science 237, 394 - 399, 1987; McKenzie KR et al, Journal of Immunol. 147, 312 - 319, 1991; laVallie ER et al, Journal of
25 Biol. Chem. 268, 23311- 23317; Walker PA et al, Biotechnology 12., 601 - 605, 1994). Bei dieser Spaltung wird das Fusionprotein nach der Expression *in vitro* mit Proteasen inkubiert und die Peptide nach der Spaltung gereinigt.

30 Darüber hinaus können die Erkennungssequenzen so ausgestaltet sein, dass eine Spaltung noch innerhalb der Wirtszelle ermöglicht wird. Dafür werden als Erkennungssequenzen sogenannte Inteine verwendet, die ein Spleißen der Peptide in der Zelle ermöglichen (vgl. David W. Wood et al., Nature Biotech. Vol 17, 889 -892,
35 1999).

- 9 -

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung sind die Erkennungssequenzen so ausgestaltet, dass eine chemische Spaltung nach Expression und Isolierung der Polypeptide ermöglicht wird. Beliebige im Stand der Technik bekannte Spaltungsverfahren können dabei zum Einsatz kommen. So kann beispielsweise die spezifische Spaltung durch CNBr nach Methionin nach dem in Dobeli H, et al. (Protein Expr Purif 12 (3), 404 - 14, 1998) offenbarten Verfahren eingesetzt werden. Weitere Spaltungen können durch Hydroxylamin vorgenommen werden, welches spezifisch Asp-Gly Bindungen spaltet (Butler, W. T., J. Biol. Chem. 244, 3415 - 3417, 1969). Schließlich sind Spaltungen von Asp-Pro Bindungen durch Säurehydrolyse (Han KK, Richard C, Biserte G., Int J Biochem, 15(7), 875 - 884, 1982) und der Sequenz DKTH durch Cu^{2+} (Humphreys D.P. et al., Protein Eng 12(2): 179-184, 1999) bekannt.

In Abhängigkeit der geplanten Verwendung kann eine der genannten Spaltungsstrategien besondere Vorteile aufweisen. Bei der Produktion von Peptiden für den pharmazeutischen Einsatz muß das Produkt homogen vorliegen. Aus diesem Grund muß die gewählte Spaltung quantitativ und ohne spezifische Nebenreaktionen (z. B. durch unspezifische Spaltung) ablaufen. Die optimale Spaltungsstrategie und die entsprechenden Erkennungssequenzen können jedoch von dem Fachmann im Hinblick auf die geplante Verwendung der Peptide aufgrund seines Fachwissens oder durch einfache Versuche im Einzelfall ohne weiteres ermittelt werden.

Die Erkennungssequenzen, x , x_1 , x_2 , etc. können identischer oder verschiedener Sequenz sein. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Erkennungssequenzen identischer Sequenz, was eine gleichzeitige Aufspaltung in die Oligopeptide ermöglicht. Besondere Vorteile ergeben sich, wenn die DNA-Konstrukte mit Spaltstellen identischer Sequenz in Wirtszellen exprimiert werden, die eine verringerte Rekombinationsfrequenz aufweisen.

Zur Herstellung entsprechender DNS-Konstrukte können beliebige im Stand der Technik bekannte Verfahren verwendet werden. Sowohl

- 10 -

die Oligonukleotide, welche für die einzelnen Peptide A, B, C₁, etc. kodieren, als auch das Polynukleotid, welches für das vollständige Fusionspeptid kodiert, können durch synthetische Synthese oder durch Isolierung aus natürlicher oder rekombinanter
5 DNS erhalten werden. Vorzugsweise werden die für die einzelnen Peptide kodierenden Oligonukleotide durch chemische Synthese erzeugt. Bei der Auswahl der DNS-Sequenz kann es vorteilhaft sein, die Benutzung der Codons durch die Wirtszelle, in der das DNS-Konstrukt exprimiert werden soll, zu berücksichtigen. Gemäß
10 dieser Ausführungsform besteht das DNS-Konstrukt daher primär aus Codons, die von der Wirtszelle häufig für die Expression der entsprechenden Aminosäure verwendet werden.

Ferner kann es vorteilhaft sein, mögliche mRNS-Sekundärstrukturen
15 bei der Auswahl der Codons des erfindungsgemäßen DNS-Konstruktes zu berücksichtigen. Durch die Wahl von Codons, welche die Ausbildung einer stabilen mRNS-Sekundärstruktur verhindern, kann die Translationseffizienz verbessert werden.

20 Nach den obigen Kriterien erzeugte Oligonukleotide können durch im Stand der Technik bekannte Verfahren zu dem erfindungsgemäßen DNS-Konstrukt verknüpft werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Expressionsvektoren,
25 in denen eines der erfindungsgemäßen DNS-Konstrukte operativ mit einer Expressions-regulierenden Sequenz verknüpft wurde. Zahlreiche regulatorische DNS-Sequenzen (Promotoren, Enhancer, etc.) sind im Stand der Technik bekannt. Entsprechende Expressionsvektoren, die für bestimmte Wirtssysteme angepaßt sind,
30 können beispielsweise kommerziell erhalten werden. Die Expression kann auch über die Anzahl der Expressionsvektoren in einer Zelle (die sogenannte "copy number") reguliert werden. Bestimmte Expressionsvektoren liegen in der Wirtszelle in hoher Kopienzahl vor, und erzielen bereits durch diese Eigenschaft eine hohe
35 Expression des gewünschten Polypeptids.

- 11 -

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Wirtszellen, die ein erfindungsgemäßes DNS-Konstrukt enthalten. Dabei kann es sich um eine beliebige prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle handeln. Die Verwendung von Pilzen, Hefen, Bakterien, Insektenzellen, Pflanzenzellen oder tierischen Zellen ist bevorzugt. Wirtssysteme, die bereits im Stand der Technik für eine kostengünstige Expression von Polypeptiden verwendet wurden, beispielsweise Zellen von *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus niger*, CHO- oder COS-Zellen sind besonders bevorzugt. Alternativ dazu können die erfindungsgemäßen DNS-Konstrukte in Zellen transgener Tiere, insbesondere in Kühen, Ziegen, Schafen, oder in transgenen Pflanzen, wie Tabak, Mais, Kartoffeln, exprimiert werden.

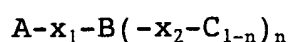
Die vorliegende Erfindung betrifft selbstverständlich ebenfalls Verfahren zur Herstellung eines Peptids, bei denen man die erfindungsgemäßen DNS-Konstrukte in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert und das Polypeptid gewinnt. In Abhängigkeit des gewählten Expressionssystems kann man das Polypeptid nach der Expression aus dem Kulturüberstand oder aus den Zellen der Zellkultur isolieren. Verfahren zur Isolierung von Polypeptiden sind im Stand der Technik umfassend beschrieben und können einen oder mehrere aus Ionenaustauscher-Chromatographie, hydrophobe Interaktions-Chromatographie, Gel-Permeations-Chromatographie oder Affinitäts-Chromatographie umfassen. Die Verwendung der Affinitäts-Chromatographie ist bevorzugt, da durch dieses Verfahren die besten Trennleistungen erreicht werden.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfaßt das DNS-Konstrukt Sequenzen, die für einen sogenannten Tag kodieren, welches die Reinigung mittels Affinitäts-Chromatographie ermöglicht. Entsprechende Tags, beispielsweise His-Tags bestehend aus mehreren Histidin-Aminosäureresten, und deren Verwendung für die Affinitäts-Chromatographie sind im Stand der Technik bekannt (vgl. beispielsweise Sulkowski, E., Trends in Biotechnology, Vol.3 (1985), S.1). Vorzugsweise weisen die

- 12 -

erfindungsgemäßen DNS-Konstrukte Sequenzen auf, die für einen Tag kodieren.

Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich die Polypeptide,
5 die durch dieses Verfahren erhältlich sind. Dabei handelt es sich um Polypeptide, welche die folgende Strukturformel umfassen:



10 worin A, B, C, x und n die oben genannte Bedeutung aufweisen. Der prinzipielle Aufbau eines Beispiels eines entsprechenden Polypeptids ist auch in Fig. 1 dargestellt.

Diese Polypeptide können unmittelbar eingesetzt werden oder
15 spezifisch an den Stellen x in eine Vielzahl von Peptiden aufspalten werden. In Abhängigkeit der Struktur des DNS-Konstruktes wird dadurch ein Peptidgemisch oder eine Vielzahl von Peptiden gleicher Sequenz erhalten.

20 Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können die so erhaltenen Peptide oder Peptidgemische aufgereinigt werden, wobei ein Peptidgemisch oder einzelne Peptide in hoher Konzentration und reiner Form erhalten werden. Zur Reinigung können die bereits genannten Chromatographie-Verfahren eingesetzt werden, die dem
25 Fachmann wohl bekannt sind.

Ein geringer Anteil an unspezifischen Nebenprodukten kann gegebenenfalls durch im Stand der Technik übliche Reinigungsverfahren entfernt werden.

30

Kurze Darstellung der Figuren:

Fig. 1 Prinzipieller Aufbau der erfindungsgemäßen Fusionsproteine;

35

Fig. 2 RT-18 HPLC-Elutionsprofil des Fusionspeptides vor Zugabe von CuCl_2 ;

- 13 -

Fig. 3 RT-18 HPLC-Elutionsprofil der Peptide im Ansatz 8 nach 45 Stunden Inkubation unter den in Tabelle 1 genannten Bedingungen;

5 Fig. 4 Massenspektroskopische Analyse der Peptide im Ansatz 8 nach 45 Stunden Inkubation unter den in Tabelle 1 genannten Bedingungen.

10 Beispiel

Das Peptid mit der Sequenz:

S-H-G-R-G-D-S-D-D-K-S-H-D-K-Q-A-G-D-V-D-K-S-H-E-I-L-D-V-K-D-K

15

(SEQ ID NO: 1), worin die Cu-Spaltstellen fett und die verschiedenen Peptidsequenzen kursiv dargestellt wurden, wurde unter den in Tabelle 1 genannten Reaktionsbedingungen gespalten. Die einzelnen Reaktionen werden in Tabelle 1 zusammengefasst. Die

20 Konzentration des Fusionspeptides betrug in allen Ansätzen 1 mg/ml.

	Ansatz	Puffer	Temperatur	Inkubations-zeit	Prozent Spaltung
5	1	Tris, pH 8,2, 2 mM Cu	55 °C	3 h	0 %
		Tris, pH 8,2, 6 mM Cu	55 °C	24 h	30 %
		Tris, pH 8,2, 6 mM Cu	62 °C	3 h	40 %
		Tris, pH 8,2, 6 mM Cu	62 °C	24 h	85 %
		Tris, pH 8,2, 6 mM Cu	62 °C	48 h	100 %
10	2	Tris, pH 8,2, 1 mM Cu	55 °C	24 h	5 %
	3	Tris, pH 8,2, 1 mM Cu	62 °C	4,5 h	5 %
	4	Tris, pH 8,2, 0,2 mM Cu	55 °C	24 h	10 %
		Tris, pH 8,2, 0,2 mM Cu	62 °C	24 h	10 %
	15	5	Tris, pH 8,52, 2 mM Cu	55 °C	4 h
Tris, pH 8,52, 8 mM Cu			55 °C	18 h	5 %
Tris, pH 8,52, 2 mM Cu			62 °C	18 h	40 %
Tris, pH 8,52, 2 mM Cu			62 °C	40 h	65 %
20	6	Borat, pH 9, 2 mM Cu	62 °C	1,5 h	20 %
		Borat, pH 9, 2 mM Cu	62 °C	2 h	ca. 55 %
		Borat, pH 9, 2 mM Cu	62 °C	21,5 h	100 %
25	7	Borat, pH 9, 1 mM Cu	62 °C	18 h	ca. 60 %
		Borat, pH 9, 1 mM Cu	62 °C	20 h	ca. 75 %
	8	Borat, pH 8, 2 mM Cu	62 °C	4 h	60 %
Borat, pH 8, 2 mM Cu		62 °C	3 h	ca. 85 %	
Borat, pH 8, 2 mM Cu		62 °C	15 h	100 %	

Tabelle 1

Reaktionsbedingungen, unter denen die Spaltung des Peptids analysiert wurde; ein Teil der Ansätze wurde nacheinander bei verschiedenen Bedingungen inkubiert, d.h. Ansatz 1 wurde mit dem genannten Puffer nacheinander für 3 Stunden bei 55 °C, für 24 Stunden bei 55 °C, für 3 Stunden bei 62 °C, etc. inkubiert.

- 15 -

Die durch die Spaltung erhaltenen Peptide wurden über eine RT-18 HPLC-Säule aufgetrennt und aus dem dabei erhaltenen Laufprofil wurde die Spaltungseffizienz der verschiedenen Bedingungen ermittelt. Zudem wurde eine massenspektroskopische Auswertung
5 vorgenommen. Beispiele der durch diese Analysen erhaltenen Ergebnisse werden in den Figuren 2 bis 4 dargestellt.

Die Elutionsprofile zeigen lediglich die optische Dichte des Eluates über die Zeit. Die massenspektroskopische Darstellung
10 zeigt die Verteilung der Masse/Ladung der erhaltenen Peptide. Fig. 2 beschreibt das Elutionsprofil des ungespaltenen Fusionspeptides von der RT-18 HPLC-Säule vor Zugabe von CuCl_2 . Demgegenüber ist in Fig. 3 RT-18 das HPLC-Elutionsprofil der Peptide des Ansatzes 8 nach 45 Stunden Inkubation unter den in Tabelle 1
15 genannten Bedingungen zu sehen. Fig. 4 stellt die massenspektroskopische Analyse der Peptide des Ansatzes 8 nach 45 Stunden Inkubation unter den in Tabelle 1 genannten Bedingungen dar.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Spaltung bei basischem pH-Wert
20 möglich ist, wobei sich zwischen pH 8,2 und pH 9,0 keine signifikanten Unterschiede ergeben.

Die Reaktion verläuft besser in Boratpuffer als in TRIS-Puffer, vermutlich weil es zu einer Wechselwirkung zwischen dem Stickstoff
25 stoff und dem Kupfer kommen kann.

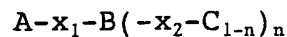
Bei einer Temperatur von 62 °C wird eine 100%ige Spaltung innerhalb von 24 bis 48 Stunden erzielt. Bei einer Temperatur von 55 °C verläuft die Reaktion langsamer.

30

Spezifische Nebenprodukte konnten nicht identifiziert werden.

Patentansprüche

1. DNS-Konstrukt, das für ein Polypeptid kodiert, wobei das Polypeptid die folgende allgemeine Strukturformel



umfaßt, worin

A und B dieselben oder verschiedene Oligopeptide mit 3 bis 100 Aminosäuren sind;

C oder C_{1-n} ein oder mehrere Oligopeptide beliebiger Sequenz mit 3 bis 100 Aminosäuren sind;

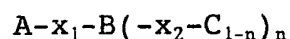
x_1 und x_2 dieselben oder verschiedene Erkennungssequenzen für eine Peptidspaltung sind; und

n eine ganze Zahl größer als 0 ist.

2. DNS-Konstrukt gemäß Anspruch 1, in der A ein Oligopeptid darstellt, das eine andere Sequenz als Oligopeptid B aufweist.
3. DNS-Konstrukt gemäß Anspruch 1 oder 2, in der C ein Oligopeptid darstellt, das dieselbe Sequenz wie Oligopeptid A oder B aufweist.
4. DNS-Konstrukt gemäß Anspruch 1 oder 2, in der C ein Oligopeptid darstellt, das eine von A und B verschiedene Sequenz aufweist.
5. DNS-Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, in der n größer als 1 ist.

6. DNS-Konstrukt gemäß Anspruch 5, in der n größer als 3 ist.
7. DNS-Konstrukt gemäß Anspruch 6, in der n größer als 5 ist.
8. DNS-Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7, in der C_1 , C_2 , C_n derselben oder verschiedene Oligopeptide sind.
9. DNS-Konstrukt gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, in der die Oligopeptide A, B und C_{1-n} eine Länge von 10 bis 50 Aminosäuren aufweisen.
10. DNS-Konstrukt gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, in der n von 2 bis 50 beträgt.
11. DNS-Konstrukt gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, in der x eine Erkennungssequenz darstellt, die eine Spaltung durch Proteasen, Spaltung innerhalb der Wirtszelle oder eine chemische Spaltung ermöglicht.
12. DNS-Konstrukt gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, in der x eine Erkennungssequenz darstellt, die eine Spaltung durch Faktor Xa, TEV, Genenase I, Thrombin, Enterokinase, 3C, CNBr, Hydroxylamin, Cu^{2+} oder Säurehydrolyse ermöglicht.
13. Expressionsvektor, in dem ein DNS-Konstrukt gemäß einem der vorstehenden Ansprüche operativ mit einer expressionsregulierenden Sequenz verknüpft wurde.
14. Wirtszelle, die ein DNS-Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 enthält.
15. Wirtszelle nach Anspruch 14, die eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle ist.
16. Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 14 oder 15, die eine Hefezelle, eine Insektenzelle, eine Pflanzenzelle oder eine tierische Zelle ist.

17. Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16, die eine E.coli, CHO-, COS- oder S.cerevisiae-Zelle ist.
18. Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 14 bis 17, die eine verringerte Rekombinationsfrequenz aufweist.
19. Verfahren zur Herstellung eines Peptids, bei dem man eine DNS-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert und das Polypeptid gewinnt.
20. Verfahren gemäß Anspruch 19, bei dem die Expression des DNS-Konstruktes in einer Zelle gemäß einem der Ansprüche 14 bis 18 erfolgt.
21. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 19 oder 20, bei dem man das Polypeptid nach der Expression isoliert.
22. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 19 bis 21, bei dem man das Polypeptid aus dem Kulturüberstand isoliert.
23. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 19 bis 22, bei dem man das Polypeptid aus den Zellen der Zellkultur isoliert.
24. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 19 bis 23, bei dem man das Polypeptid spezifisch an den Stellen x in Peptide aufspaltet.
25. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 19 bis 24, bei dem man ferner einzelne Peptide oder ein Peptidgemisch isoliert.
26. Polypeptid erhältlich durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 19 bis 25.
27. Polypeptid, umfassend die folgende allgemeine Strukturformel



worin

A und B dieselben oder verschiedene Oligopeptide mit 3 bis 100 Aminosäuren sind;

C ein beliebiges Oligopeptid mit 3 bis 100 Aminosäuren ist;

x_1 und x_2 dieselben oder verschiedene Erkennungssequenzen für eine Peptidspaltung sind; und

n eine ganze Zahl größer als 0 ist.

28. Polypeptid gemäß Anspruch 27, in dem A ein Oligopeptid darstellt, das eine andere Sequenz als Oligopeptid B aufweist.
29. Polypeptid gemäß Anspruch 27 oder 28, in dem C ein Oligopeptid darstellt, das dieselbe Sequenz wie Oligopeptid A oder B aufweist.
30. Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 27 bis 29, in der C ein Oligopeptid darstellt, das eine von A und B verschiedene Sequenz aufweist.
31. Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 27 bis 30, in der n größer als 1 ist.
32. Polypeptid gemäß Anspruch 31, in der n größer als 3 ist.
33. Polypeptid gemäß Anspruch 32, in der n größer als 5 ist.
34. Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 27 bis 33, in der C_1 , C_2 , C_n derselben oder verschiedene Oligopeptide sind.
35. Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 27 bis 34, in der die Oligopeptide A, B und C_{1-n} eine Länge von 10 bis 50 Aminosäuren aufweisen.

36. Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 27 bis 35, in der n von 2 bis 50 beträgt.
37. Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 27 bis 36, in der x eine Erkennungssequenz darstellt, die eine Spaltung durch Proteasen, Spaltung innerhalb der Wirtszelle oder eine chemische Spaltung ermöglicht.
38. Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 27 bis 37, in der x eine Erkennungssequenz darstellt, die eine Spaltung durch Factor Xa, TEV, Genenase I, Thrombin, Enterokinase, 3C, CNBr, Hydroxylamin, Cu^{2+} oder Säurehydrolyse ermöglicht.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Fresenius Kabi

5 <120> DNS-Konstrukte für die Herstellung von Peptiden

<130> 56904

<140>

10 <141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

20

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Fusionsprotein

25 <400> 1

Ser His Gly Arg Gly Asp Ser Asp Asp Lys Ser His Asp Lys Gln Ala

1

5

10

15

30

Gly Asp Val Asp Lys Ser His Glu Ile Leu Asp Val Lys Asp Lys

20

25

30

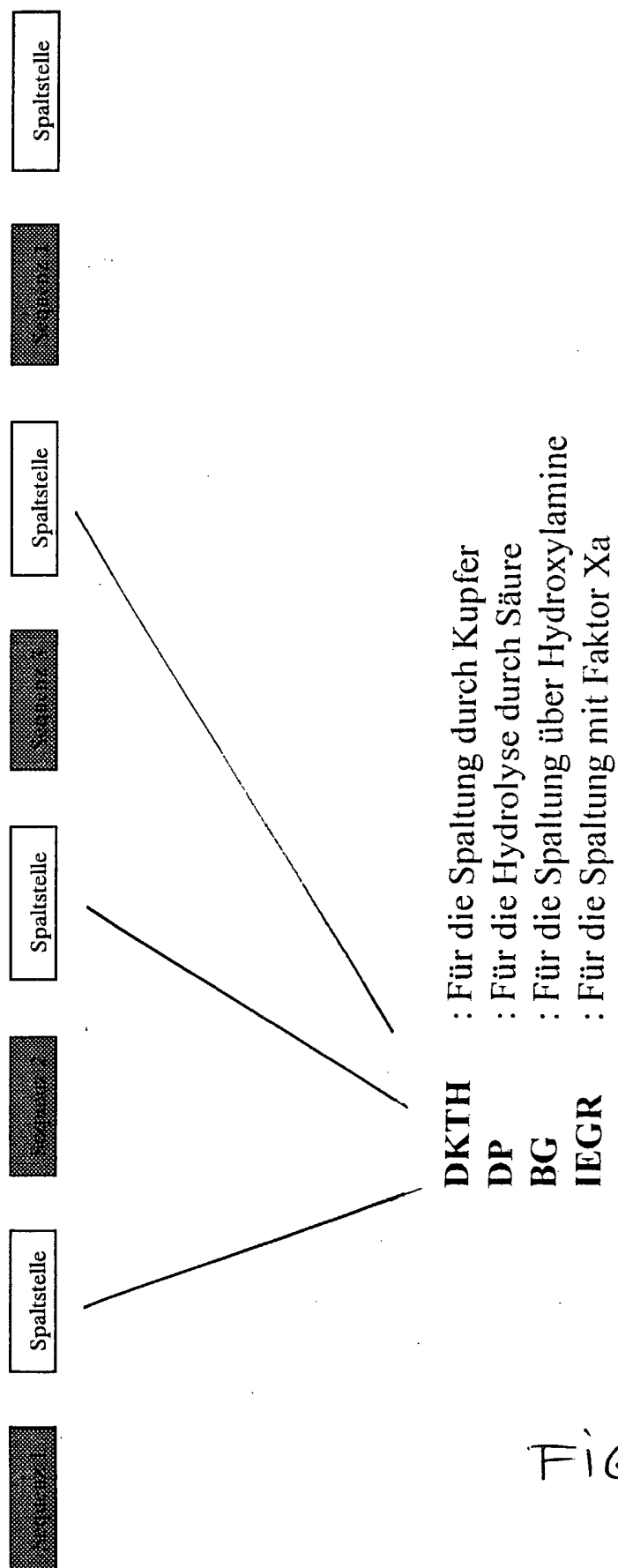
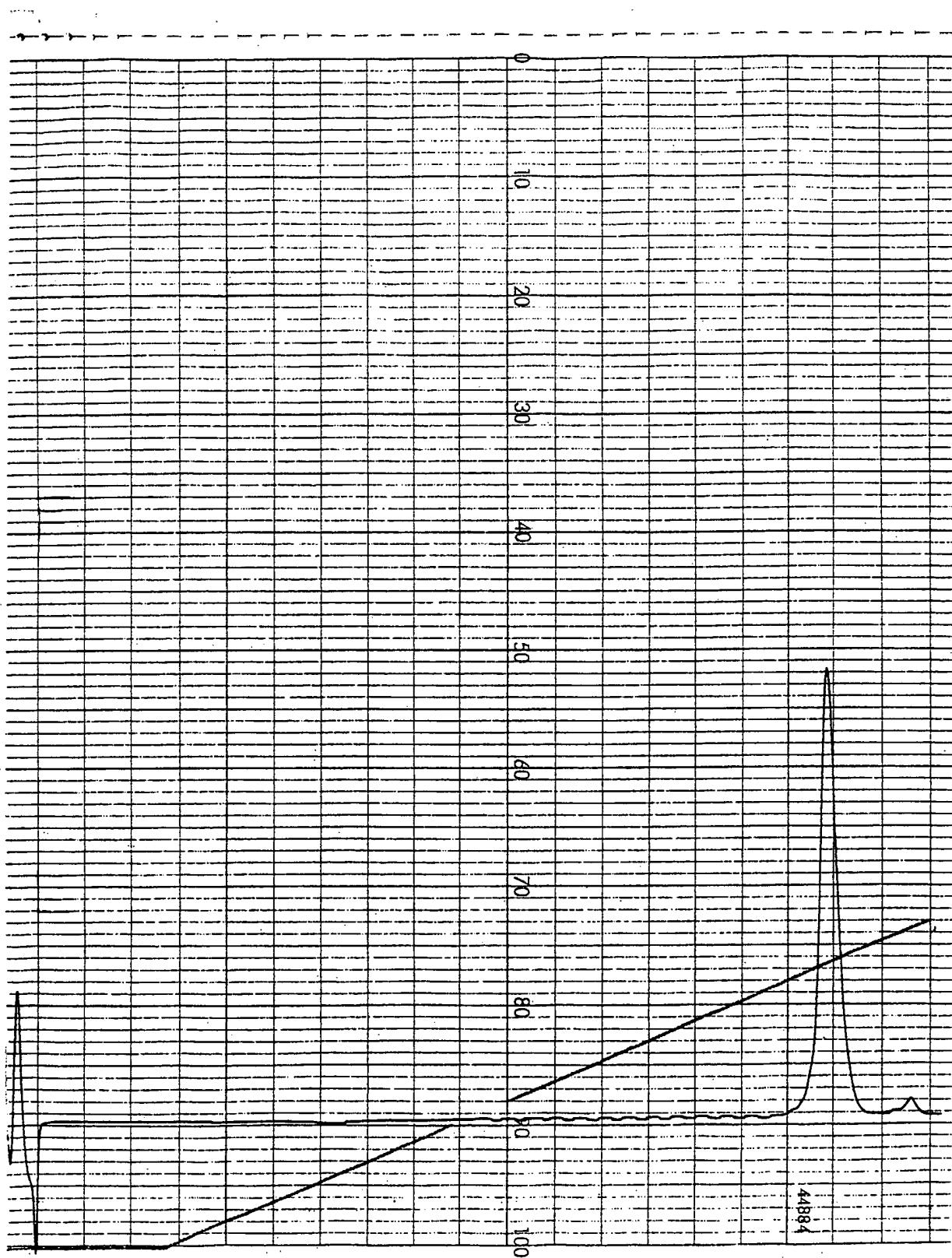
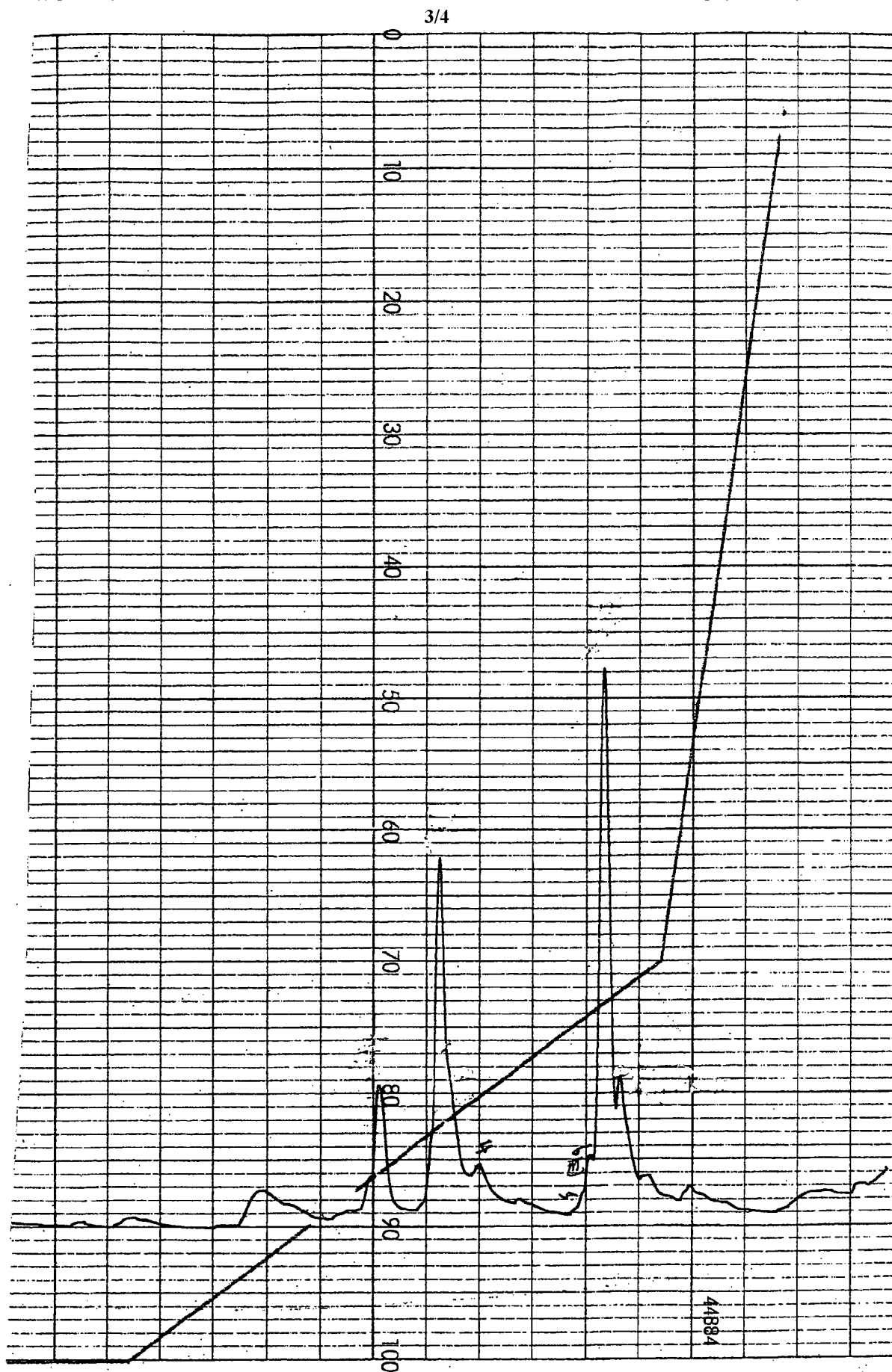


FIG. 1



Figur 2

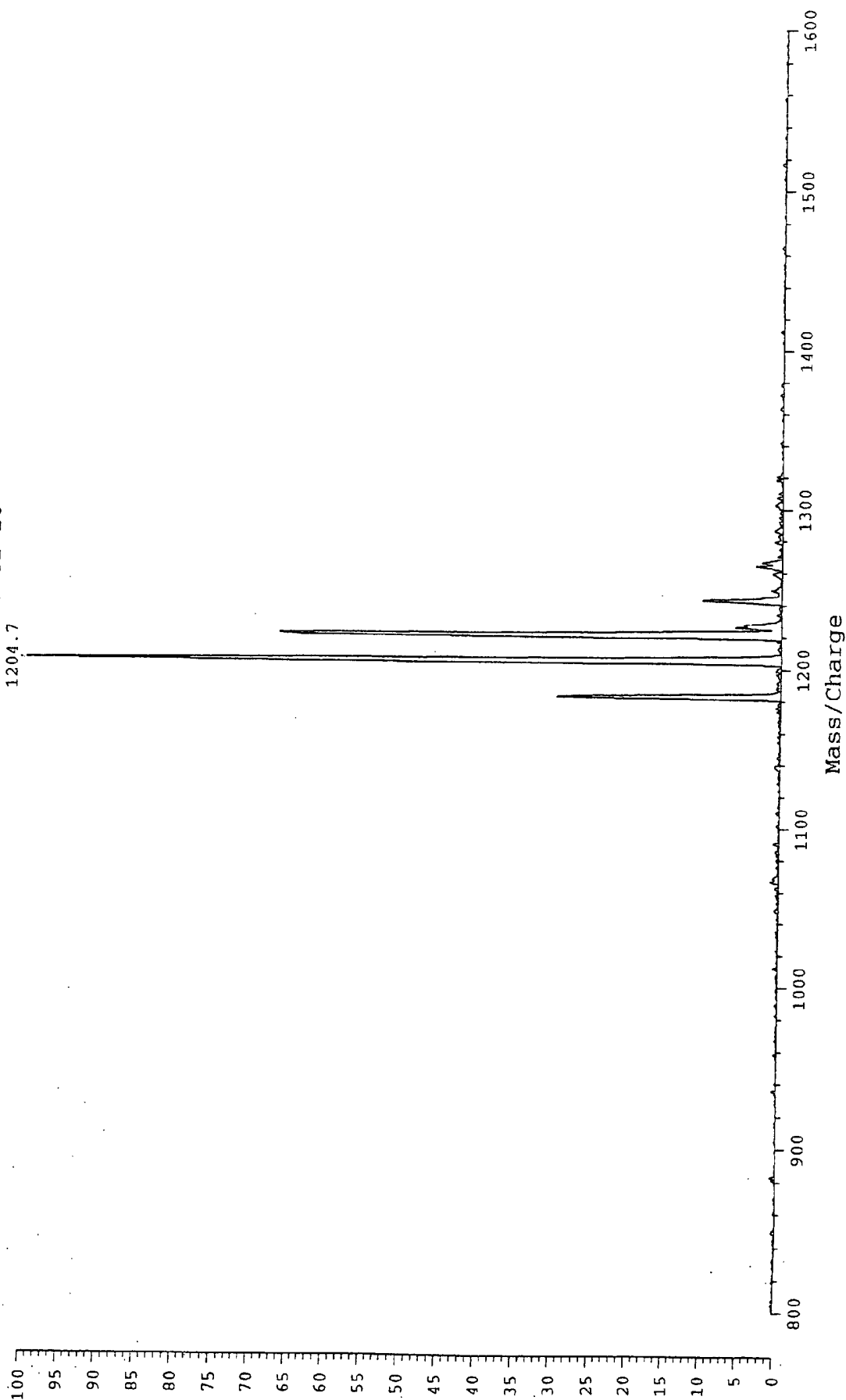


Figur 3

Figur 4

Data: <Untitled>.15 7 Mar 101 10:49 Cal: YM2610 26 Oct 100 13:35
Kratos Kompact MALDI 3 V5.2.0: + Reflectron High Power: 129

%Int. 100% =62 mV[sum= 3135 mV] Profiles 1-50 Smooth Sv-G1 10
1204.7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/08249

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/62 C07K19/00

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 7 C12N 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)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 595 887 A (COOLIDGE THOMAS R ET AL) 21 January 1997 (1997-01-21) das ganze Dokument, insbesondere fig.1-2c ---	1-38
X	US 6 183 992 B1 (KIM SUN-CHANG ET AL) 6 February 2001 (2001-02-06) das ganze Dokument, insbesondere Beispiele 2-5 ---	1-38
X	WO 00 17336 A (LEE SANG JUN) 30 March 2000 (2000-03-30) das ganze Dokument, insbesondere S. 3, Zeilen 14-18 und Tabellen I und II --- -/--	1-38



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

23 January 2003

Date of mailing of the international search report

06/02/2003

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

Lüdemann, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/08249

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JONASSON PER ET AL: "Integrated bioprocess for production of human proinsulin C-peptide via heat release of an intracellular heptameric fusion protein." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 76, no. 2-3, 21 January 2000 (2000-01-21), pages 215-226, XP002228389 ISSN: 0168-1656 the whole document ----	1-38
X	OTTAVI A ET AL: "An improved method to obtain a single recombinant vasoactive intestinal peptide (VIP) analog." BIOCHIMIE (PARIS), vol. 80, no. 4, April 1998 (1998-04), pages 289-293, XP002228390 ISSN: 0300-9084 the whole document -----	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/08249

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5595887	A	21-01-1997	AT 189478 T	15-02-2000
			AU 662302 B2	31-08-1995
			AU 8915591 A	18-02-1992
			CA 2087261 A1	17-01-1992
			DE 69131961 D1	09-03-2000
			DK 539530 T3	26-06-2000
			EP 0539530 A1	05-05-1993
			IE 912464 A1	29-01-1992
			JP 6505624 T	30-06-1994
			JP 3129437 B2	29-01-2001
			NZ 238812 A	27-01-1993
			WO 9201707 A1	06-02-1992
			US 6127150 A	03-10-2000
			ZA 9105307 A	24-02-1993
US 6183992	B1	06-02-2001	KR 263583 B1	01-08-2000
			AU 719037 B2	04-05-2000
			AU 7788798 A	30-12-1998
			CN 1228121 T	08-09-1999
			EP 0923647 A1	23-06-1999
			JP 2002502246 T	22-01-2002
			WO 9854336 A1	03-12-1998
WO 0017336	A	30-03-2000	AU 5762699 A	10-04-2000
			WO 0017336 A1	30-03-2000
			KR 2000023309 A	25-04-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/08249

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/62 C07K19/00

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

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N 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)

EPO-Internal, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 595 887 A (COOLIDGE THOMAS R ET AL) 21. Januar 1997 (1997-01-21) das ganze Dokument, insbesondere fig.1-2c ---	1-38
X	US 6 183 992 B1 (KIM SUN-CHANG ET AL) 6. Februar 2001 (2001-02-06) das ganze Dokument, insbesondere Beispiele 2-5 ---	1-38
X	WO 00 17336 A (LEE SANG JUN) 30. März 2000 (2000-03-30) das ganze Dokument, insbesondere S. 3, Zeilen 14-18 und Tabellen I and II --- -/--	1-38



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

23. Januar 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/02/2003

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

Lüdemann, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/08249

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JONASSON PER ET AL: "Integrated bioprocess for production of human proinsulin C-peptide via heat release of an intracellular heptameric fusion protein." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 76, Nr. 2-3, 21. Januar 2000 (2000-01-21), Seiten 215-226, XP002228389 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument ----	1-38
X	OTTAVI A ET AL: "An improved method to obtain a single recombinant vasoactive intestinal peptide (VIP) analog." BIOCHIMIE (PARIS), Bd. 80, Nr. 4, April 1998 (1998-04), Seiten 289-293, XP002228390 ISSN: 0300-9084 das ganze Dokument -----	1-38

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/08249

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5595887 A	21-01-1997	AT 189478 T	15-02-2000
		AU 662302 B2	31-08-1995
		AU 8915591 A	18-02-1992
		CA 2087261 A1	17-01-1992
		DE 69131961 D1	09-03-2000
		DK 539530 T3	26-06-2000
		EP 0539530 A1	05-05-1993
		IE 912464 A1	29-01-1992
		JP 6505624 T	30-06-1994
		JP 3129437 B2	29-01-2001
		NZ 238812 A	27-01-1993
		WO 9201707 A1	06-02-1992
		US 6127150 A	03-10-2000
		ZA 9105307 A	24-02-1993
US 6183992 B1	06-02-2001	KR 263583 B1	01-08-2000
		AU 719037 B2	04-05-2000
		AU 7788798 A	30-12-1998
		CN 1228121 T	08-09-1999
		EP 0923647 A1	23-06-1999
		JP 2002502246 T	22-01-2002
		WO 9854336 A1	03-12-1998
WO 0017336 A	30-03-2000	AU 5762699 A	10-04-2000
		WO 0017336 A1	30-03-2000
		KR 2000023309 A	25-04-2000