

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-529221

(P2020-529221A)

(43) 公表日 令和2年10月8日(2020.10.8)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 15/62 (2006.01)	C 12 N 15/62	Z N A Z	4 B 0 6 4
C 12 N 15/70 (2006.01)	C 12 N 15/70	Z	4 B 0 6 5
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15		4 H 0 4 5
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19		
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2020-527858 (P2020-527858)	(71) 出願人	500184305 ザ・トラスティーズ・オブ・プリンストン ・ユニバーシティ THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY アメリカ合衆国 NJ 08544 ニュージャージー州、プリンストン、プロスペクト・アヴェニュー 87, サード・フロア
(86) (22) 出願日	平成30年7月27日 (2018.7.27)	(74) 代理人	100095832 弁理士 細田 芳徳
(85) 翻訳文提出日	令和2年3月5日 (2020.3.5)	(74) 代理人	100187850 弁理士 細田 芳弘
(86) 國際出願番号	PCT/US2018/044156		
(87) 國際公開番号	W02019/023616		
(87) 國際公開日	平成31年1月31日 (2019.1.31)		
(31) 優先権主張番号	62/538,505		
(32) 優先日	平成29年7月28日 (2017.7.28)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組み換えタンパク質発現のための融合タグ

(57) 【要約】

ある態様において、本発明は、DEEP融合タグおよび標的タンパク質(例えば目的のタンパク質)を含む融合タンパク質に関する。種々の他の態様において、本発明は、DEEP融合タグおよび標的タンパク質を含む融合タンパク質を产生する方法、DEEP融合タグをコードするヌクレオチド配列および標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列を導入するためのクローニング部位を含む構築物、ならびにかかるDNA構築物を含むキットを提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

DEEP融合タグおよび標的タンパク質を含む、融合タンパク質。

【請求項 2】

DEEP融合タグが、標的タンパク質に対してN末端にある、請求項1記載の融合タンパク質。

【請求項 3】

DEEP融合タグが、複数の表面露出ヒスチジン残基を含む、請求項1または2記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

DEEP融合タグが、アミノ酸配列:

【化 1】

MYGKLNDLLEDLQEVLKNLHKKNWHGGKDNLHDVDNHLQNVIEDIHDFMQG
GGSGGKLQEMMKEFQQVLDELNNHLQGGKHTVHIEQNIKEIFHHLEELVHR

(配列番号:1)を含む、請求項1、2または3記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

DEEP融合タグが、アミノ酸配列:

【化 2】

YGHNLNDLLEDLQEVLHNLHHNWHGGHDNLHDVDNHLQNVIEDIHDFMQGG
GSGGHLQEMMHEFQQVLDELNNHLQGGHHTVHIEQNIHEIFHHLEELVHR

(配列番号:10)を含む、請求項1、2または3記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

DEEP融合タグと標的タンパク質との間にリンカーアミノ酸配列をさらに含む、前記請求項のいずれか記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

該リンカーアミノ酸配列がポリグリシン配列を含む、請求項6記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

DEEP融合タグと標的タンパク質との間に切断部位をさらに含む、前記請求項のいずれか記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

該切断部位がプロテアーゼ切断部位である、請求項8記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

該切断部位が化学的切断部位である、請求項8記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

該標的タンパク質が、緑色蛍光タンパク質(GFP)、アミロイド(A_n)ポリペプチド、Trp Cageタンパク質、LS3ポリペプチド、インスリンA鎖ポリペプチドおよびインスリンB鎖ポリペプチドからなる群より選択される、前記請求項のいずれか記載の融合タンパク質。

【請求項 12】

第1の標的タンパク質および第2の標的タンパク質を含む融合タンパク質であって、第2の標的タンパク質が第1の標的タンパク質とは異なる、前記請求項のいずれか記載の融合タンパク質。

【請求項 13】

第1の標的タンパク質がDEEP融合タグに対してC末端にあり、第2の標的タンパク質がDEEP融合タグに対してN末端にある、請求項12記載の融合タンパク質。

【請求項 14】

第1の標的タンパク質がインスリンA鎖ポリペプチドであり、第2の標的タンパク質がインスリンB鎖ポリペプチドである、請求項12または13記載の融合タンパク質。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

約4～約10のpH範囲に対して安定である、前記請求項のいずれか記載の融合タンパク質。
。

【請求項 1 6】

前記請求項のいずれか記載の融合タンパク質をコードする、核酸分子。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 記載の核酸を含む、宿主細胞。

【請求項 1 8】

大腸菌である、請求項 1 7 記載の宿主細胞。

【請求項 1 9】

- a. 融合タンパク質をコードするDNA構築物を、宿主細胞に導入する工程、ここで該融合タンパク質は、DEEP融合タグおよび標的タンパク質を含む；
b. 該宿主細胞中で融合タンパク質を発現させる工程；
c. 融合タンパク質を単離する工程；ならびに
d. 標的タンパク質からDEEP融合タグを分離するために融合タンパク質を切断して、それにより標的タンパク質を得る工程
を含む、標的タンパク質を得る方法。

【請求項 2 0】

該融合タンパク質が、DEEP融合タグの親和性樹脂への結合により単離される、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 1】

該親和性樹脂が固定された金属である、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】

該固定された金属が固定されたニッケルである、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

該標的タンパク質からDEEP融合タグを分離するために融合タンパク質を切断する工程が、融合タンパク質とプロテアーゼを接触させることを含む、請求項 1 9～2 2 いずれか記載の方法。

【請求項 2 4】

該標的タンパク質からDEEP融合タグを分離するために融合タンパク質を切断する工程が、融合タンパク質と化学的切断剤を接触させることを含む、請求項 1 9～2 2 いずれか記載の方法。

【請求項 2 5】

DEEP融合タグをコードするヌクレオチド配列および標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列を導入するためのクローニング部位を含む、DNA構築物。

【請求項 2 6】

プラスミドである、請求項 2 5 記載のDNA構築物。

【請求項 2 7】

DEEP融合タグをコードするヌクレオチド配列がクローニング部位の上流にある、請求項 2 5 または 2 6 記載のDNA構築物。

【請求項 2 8】

DEEP融合タグをコードするヌクレオチド配列とクローニング部位との間にリンカーアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 2 5、2 6 または 2 7 記載のDNA構築物。

【請求項 2 9】

選択マーカーをさらに含む、請求項 2 5～2 8 いずれか記載のDNA構築物。

【請求項 3 0】

標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 2 5～2 9 いずれか記載のDNA構築物。

【請求項 3 1】

DEEP融合タグが、アミノ酸配列：

10

20

30

40

50

【化3】

MYGKLNDLLEDLQEVLKNLHKKNWHGGKDNLHDVDNHLQNVIEDIHDFMQG
GGSGGKLQEMMKEFQQVLDELNNHLQGGKHTVHHIEQNIKEIFHHLEELVHR

(配列番号：1)を含む、請求項25～30いずれか記載のDNA構築物。

【請求項32】

DEEP融合タグが、アミノ酸配列：

【化4】

YGHLNDLLEDLQEVLHNLHHNWHGGHDNLHDVDNHLQNVIEDIHDFMQGG
GSGGHLQEMMHEFQQVLDELNNHLQGGHHTVHHIEQNIHEIFHHLEELVHR

10

(配列番号：10)を含む、請求項25～30いずれか記載のDNA構築物。

【請求項33】

複数のDNA構築物を含むキットであって、それぞれのDNA構築物が、DEEPタンパク質をコードするヌクレオチド配列および標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列を導入するためのクローニング部位を含む、キット。

【請求項34】

それぞれのDNA構築物が異なるDEEP融合タグをコードする、請求項33記載のキット。

【請求項35】

少なくとも1つの構築物が、アミノ酸配列：

20

【化5】

MYGKLNDLLEDLQEVLKNLHKKNWHGGKDNLHDVDNHLQNVIEDIHDFMQG
GGSGGKLQEMMKEFQQVLDELNNHLQGGKHTVHHIEQNIKEIFHHLEELVHR

(配列番号：1)を含むDEEP融合タグをコードする、請求項33または34記載のキット。

【請求項36】

少なくとも1つの構築物が、アミノ酸配列：

【化6】

YGHLNDLLEDLQEVLHNLHHNWHGGHDNLHDVDNHLQNVIEDIHDFMQGG
GSGGHLQEMMHEFQQVLDELNNHLQGGHHTVHHIEQNIHEIFHHLEELVHR

30

(配列番号：10)を含むDEEP融合タグをコードする、請求項33または34記載のキット。

【請求項37】

それぞれのDNA構築物が同じクローニング部位を含む、請求項33～36いずれか記載のキット。

【請求項38】

DEEP融合タグをコードするヌクレオチド配列がクローニング部位の上流にある、請求項33～37いずれか記載のキット。

【請求項39】

DEEP融合タグ、インスリンA鎖ポリペプチドおよびインスリンB鎖ポリペプチドを含む、融合タンパク質。

40

【請求項40】

インスリンA鎖ポリペプチドが、DEEP融合タグに対してC末端にある、請求項39記載の融合タンパク質。

【請求項41】

インスリンB鎖ポリペプチドが、DEEP融合タグに対してN末端にある、請求項39または40記載の融合タンパク質。

【請求項42】

DEEP融合タグとインスリンA鎖ポリペプチドとの間に第1のリンカーをさらに含む、請求項39、40または41記載の融合タンパク質。

50

【請求項 4 3】

第1のリンカーが第1の切断部位を含む、請求項4 2記載の融合タンパク質。

【請求項 4 4】

DEEP融合タグとインスリンB鎖ポリペプチドとの間に第2のリンカーをさらに含む、請求項3 9～4 3いずれか記載の融合タンパク質。

【請求項 4 5】

第2のリンカーが第2の切断部位を含む、請求項4 4記載の融合タンパク質。

【請求項 4 6】

第1の切断部位および第2の切断部位が、同じ条件下で切断可能である、請求項4 5記載の融合タンパク質。

10

【請求項 4 7】

第1の切断部位および第2の切断部位が、独立して切断可能である、請求項4 5記載の融合タンパク質。

【請求項 4 8】

アミノ酸配列：

【化 7】

MRFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRYGHLNDLLEDLQEVLHN
LHHNWHGGHDNLHDVDNHLQNIEDIHDQMGGGSGGHLQEMMHEFQQV
LDELNNHLQGGHHTVHHIEQNIHEIFHHLEELVHRKRGIVEQCCTSICSLYQLE
NYCN

20

(配列番号：14)を含む、請求項3 9～4 7いずれか記載の融合タンパク質。

【請求項 4 9】

DEEP融合タグとインスリンA鎖ポリペプチドとの間に第1の切断部位をさらに含む、請求項3 9～4 2および4 4のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項 5 0】

DEEP融合タグとインスリンB鎖ポリペプチドとの間に第2の切断部位をさらに含む、請求項3 9～4 2、4 4および4 9のいずれか一項記載の融合タンパク質。

30

【請求項 5 1】

第1の切断部位および第2の切断部位が、同じ条件下で切断可能である、請求項5 0記載の融合タンパク質。

【請求項 5 2】

第1の切断部位および第2の切断部位が、独立して切断可能である、請求項5 0記載の融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】****関連出願**

40

本願は、2017年7月28日に出願された米国仮特許出願第62/538,505号の利益を主張する。この出願の全教示は、参照により本明細書に援用される。

【0 0 0 2】

ASCIIテキストファイルにおける資料の参照による援用

本願は、本願と同時に提出された以下のASCIIテキストファイル

ファイル名：53911006001SEQUENCELISTING.TXT；2018年7月26日に作成され、11KBのサイズ

に含まれる配列表を参照により援用する。

【背景技術】**【0 0 0 3】**

50

背景

バイオテクノロジーの現在の時代は、組み換えDNAの作製および全ての種にわたる遺伝子の操作により始まった。今日、この技術は、基礎科学からタンパク質医薬の大規模製造まで広範囲の種々の設定において広範囲に実施される。組換えDNAを操作して該DNAを種々の異なる宿主生物に挿入することは比較的簡単になっているが、このDNAにコードされるタンパク質の発現および精製は困難なままである。組み換えタンパク質を発現させるために最も一般的に使用される宿主は大腸菌である。大腸菌におけるタンパク質の産生は比較的早く、安価で、ユーザーにとって使い易く、細胞質もしくはペリプラズムなどの異なる細胞区画に方向づけられ得るか、または細胞外に分泌されもし得る。しかしながら、多くの所望のタンパク質およびペプチドの発現収率および可溶性は、予想できず、大腸菌および/または他の発現宿主においてしばしば低い発現が生じ、または発現がないことさえ生じる。

10

【0004】

これらの問題に取り組むための試みは、典型的に、目的のタンパク質(POI)の、融合タグとして公知である別のタンパク質への融合体を構築することを含み、これは、多くの場合において発現レベルを向上させ得、可溶性を高め得、分解を低減させ得、かつPOIの折り畳みを容易にし得る。今まで、タンパク質発現に使用される融合タグは一般的に、宿主細胞において高レベルで発現する特定のタンパク質由来の天然に存在する配列であった。しかしながら、全てのPOIの産生を信頼性高く容易にする公知の単一の融合タグはない。結果的に、それぞれの新規のPOIについていくつかの異なる融合タグが典型的に試験され、もしあれば、どれがPOIの発現を容易にするかが決定される。現在、良く特徴付けられ、市販されている約1ダースのみの天然に存在する融合タグがある。しかしながら、これらの市販の融合タグは、いくつかのPOIは既存のタグとの融合体として発現された場合であっても産生することが困難なままであるので、全てのPOIの発現を容易にするわけではない。したがって、既存のタグを使用して産生することが困難であるPOIを含む、一般的POIの発現および精製を向上し得る新規の融合タグについての必要性がある。

20

【発明の概要】

【0005】

概要

本発明は、一般的に、本明細書においてデノボ発現エンハンサータンパク質(De novo Expression Enhancer Protein) (DEEP)融合タグと称される、広範囲のタンパク質の発現を高め得る人工融合タグを含む融合タンパク質、ならびにかかる融合タンパク質をコードするDNA構築物およびかかる融合タンパク質を得る(例えば産生する)方法に関する。

30

【0006】

したがって、一態様において、本発明は、DEEP融合タグおよび標的タンパク質(例えば目的のタンパク質(POI))を含む融合タンパク質に関する。

【0007】

別の態様において、本発明は、DEEP融合タグ、インスリンA鎖ポリペプチド(例えばDEEP融合タグに対してC末端)およびインスリンB鎖ポリペプチド(例えばDEEP融合タグに対してN末端)を含む融合タンパク質に関する。

40

【0008】

別の態様において、本発明は、DEEP融合タグ(例えば配列番号：1のアミノ酸配列を含む)および標的タンパク質(例えばPOI)を含む融合タンパク質をコードする核酸分子に関する。さらに別の態様において、本発明は、DEEP融合タグ(例えば配列番号：1のアミノ酸配列を含む)および標的タンパク質を含む融合タンパク質をコードする核酸分子を含む宿主細胞(例えば大腸菌)に関する。

【0009】

別の態様において、本発明は、a)融合タンパク質をコードするDNA構築物を宿主細胞に導入する工程、ここで該融合タンパク質は、DEEP融合タグおよび標的タンパク質を含む、b)該宿主細胞中で融合タンパク質を発現させる工程、c)該融合タンパク質を単離する工程

50

、ならびにd)標的タンパク質からDEEP融合タグを分離するために該融合タンパク質を切断する工程を含む、標的タンパク質を得る方法に関する。

【0010】

さらに別の態様において、本発明は、i)DEEP融合タグをコードするヌクレオチド配列、およびii)標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列を導入するためのクローニング部位を含む構築物に関する。

【0011】

さらなる態様において、本発明は、1つまたは複数のDNA構築物を含むキットに関し、ここでそれぞれのDNA構築物は、DEEPタンパク質をコードするヌクレオチド配列および標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列を導入するためのクローニング部位を含む。

10

【0012】

本明細書に記載されるように、DEEP融合タグは、宿主細胞、特に大腸菌において、天然に存在する配列に基づく既存の融合タグを使用して発現することが困難であるタンパク質を含む、種々の異なるタンパク質の発現および産生を容易にし得る。さらに、DEEP融合タグを含む融合タンパク質は一般的に、可溶性でありかつ広範囲のpH値(例えば4~10のpH)に対して安定であるが、天然の配列に基づく市販の融合タグは典型的に、生理学的pHの周囲のみで安定である。さらに、本明細書に記載されるDEEP融合タグはまた、さらなる親和性タグを必要とせずに、融合タンパク質の迅速な精製のための親和性タグとして使用され得る。

20

【図面の簡単な説明】

【0013】

図面の簡単な説明

【図1-1】図1A~1Eは、DEEPの過剰発現および精製に関する。図1A)DEEPタンパク質のIMAC精製(挿入図：表面に露出した12His残基が強調され、親水性残基が暗く、疎水性残基が明るくされているDEEPタンパク質の構造)。図1B)IMACピーク#5のSEC精製および対応する図1C)SDS-PAGE分析(1-細胞全体、2-溶解された細胞、3-溶解された細胞の可溶性画分、4/5/6/7/8-IMACおよびSECピーク)。

【図1-2】図1D)20から60%のBの線形勾配を用いて分析的C8カラムを使用してSEC精製されたDEEPのRP HPLC分析(A-水、B-MeCN、両方に0.1% v/vのTFAを添加)、および図1E)ピークの対応するESI-TOF MS分析。

30

【図2-1】図2A~2CはfrGFP(折り畳まれたレポーターGFP)の過剰発現および精製に関する。図2A)プラスミド設計ならびにリンカー残基およびfrGFPの対応する配列。

【図2-2】図2B)過剰発現され、精製された1-6xHis、2-DEEPおよび3-6xHis-SUMOへのfrGFP N末端融合体のSDS-PAGE。Sol-溶解された細胞の可溶性画分、HisTrap-IMAC(固定された金属アフィニティークロマトグラフィー)およびSEC-サイズ排除クロマトグラフィー。

30

【図2-3】図2C)DEEP-GFPおよびSUMO-GFPの蛍光発光(Ex. : 490nm)。

【図3-1】図3A~3Dは、Trp cageの過剰発現および精製に関する。図3A)プラスミド設計ならびにリンカー残基およびTrp cageの対応する配列。図3B)Trp cageは、以下の切断部位：1-DEEP-Met-Trp、2-DEEP-TEV-Trp、3-SUMO-Met-Trpおよび4-SUMO-TEV-Trpを含むDEEPおよびSUMO融合タグなし(左のゲル)およびあり(中央のゲル)で過剰発現された。DEEP-Met-Trpはさらに、IMACを使用して精製された(右のゲル)。予想MWは：1-14796、2-15460、3-16314および4-16948Daである。

40

【図3-2】図3C)IMAC精製した可溶性および不溶性の画分の発現比較ならびに対応する図3D)HPLC分析。

【図4-1】図4A~4Cは、A₁₋₄₂の過剰発現および精製に関する。図4A)プラスミド設計ならびにリンカー残基およびA₁₋₄₂の対応する配列。図4B)1-A₁₋₄₂、2-DEEP-A₁₋₄₂および3-SUMO-A₁₋₄₂過剰発現(左のゲル)の細胞全体SDS-PAGE分析。37および18で誘導された細胞からのDEEP-A₁₋₄₂の精製(右のゲル)。WC-細胞全体、Sol-溶解された細胞の可溶性画分、Pel-0.5% w/vサルコシルに溶解された不溶性タンパク質画分。予想MWは：1-4645、2-17465および3-18927Daである。

50

【図4-2】図4C)精製プロセスのSDS-PAGE。

【図5-1】図5A～5Cは、DEEP-Met-LS3の過剰発現および精製に関する。図5A)プラスミド設計ならびにリンカー残基およびLS3の対応する配列。図5B)タンパク質収率を高めるために、グルコースの添加を試験した(±は、1% w/vグルコースを補充したLB培地中の過剰発現を示す)。実験セクションに記載されるようなバッファを用いてNi-NTAビーズを使用してDEEP-Met-LS3精製を行った。DEEP-Met-LS3の予想MWは14865Daである。

【図5-2】図5C)精製プロセスのSDS-PAGE。右のゲルは、SUMO-LS3およびDEEP-LS3を用いた3回の発現および精製実験の要約である。

【図6-1】図6A～6Dは、DEEP-Met-Insの過剰発現に関する。図6A)プラスミド設計および対応する配列。図6B)発現および精製プロセスのSDS-PAGE。WC-細胞全体、Sup1/2/3-洗浄工程の上清およびIBs-再懸濁された封入体。DEEP-Insの予想MWは18302Daである。

【図6-2】図6C)再折り畳み中間体のRP-HPLCクロマトグラムおよびMEの関数としての再折り畳み収率。

【図6-3】図6D)V8プロテアーゼのLC-MS分析。三角形はV8の切断部位である(グルタミン酸のC末端で切断)。

【発明を実施するための形態】

【0014】

詳細な説明

例示態様の説明を以下にする。

【0015】

本発明は、部分的に、融合タグとして融合タンパク質に組み込んだ際に宿主細胞、特に大腸菌内および/または大腸菌からの種々の異なる目的のタンパク質の発現、產生および/または精製を容易にし得るタンパク質の発見に基づく。

【0016】

したがって、一態様において、本発明は、DEEP融合タグおよび標的タンパク質(例えば目的のタンパク質)を含む融合タンパク質に関する。

【0017】

「タンパク質」、「ペプチド」および「ポリペプチド」は、長さまたは翻訳後修飾(例えばグリコシル化またはリン酸化)に関係なく、アミド結合により共有結合した少なくとも2つのアミノ酸のポリマーを示すために本明細書において交換可能に使用される。タンパク質、ペプチドまたはポリペプチドは、任意の適切なL-およびD-アミノ酸、例えば一般的な-L-アミノ酸(例えばアラニン、グリシン、バリン)、非-L-アミノ酸(例えば-D-アラニン、4-L-アミノ酪酸、6-L-アミノカプロン酸、サルコシン、スタチン)および通常でないアミノ酸(例えばシトルリン、ホモシトルリン(homocitrulline)、ホモセリン、ノルロイシン、ノルバリン、オルニチン)を含み得る。ペプチド上のアミノ、カルボキシルおよび/または他の官能基は遊離してい得る(例えば修飾されない)かまたは適切な保護基により保護され得る。アミノ基およびカルボキシル基のための適切な保護基ならびに保護基を付加または除去するための方法は、当該技術分野で公知であり、例えばGreen and Wuts, 「Protecting Groups in Organic Synthesis」, John Wiley and Sons, 1991に開示される。

タンパク質、ペプチドまたはポリペプチドの官能基はまた、当該技術分野で公知の方法を使用して誘導体化(例えばアルキル化)され得るかまたは(例えばフルオロゲンまたはハプテンなどの検出可能な標識を用いて)標識され得る。タンパク質、ペプチドまたはポリペプチドは、所望の場合は、1つ以上の修飾(例えばアミノ酸リンカー、アシリル化、アセチル化、アミド化、メチル化、末端修飾基(例えば環状化修飾)、N-メチル-L-アミノ基置換)を含み得る。さらに、タンパク質、ペプチドまたはポリペプチドは、公知のおよび/または天然に存在するペプチドのアナログ、例えば保存アミノ酸残基置換(1つまたは複数)を有するペプチドアナログであり得る。

【0018】

用語「融合タンパク質」は、2つ以上の異なるタンパク質および/またはペプチドの全てまたは一部を含む合成、半合成または組み換えの單一タンパク質分子をいう。融合は、N

10

20

30

40

50

末端融合(DEEP融合タグに関して)、C末端融合(DEEP融合タグに関して)または内部融合(DEEP融合タグおよび/または標的タンパク質に関して)であり得る。

【0019】

本明細書で使用する場合、用語「デノボ発現エンハンサータンパク質融合タグ」または「DEEP融合タグ」は、少なくとも2つ(例えば2、3、4、5または6)のヘリックスを有するポリペプチドをいい、ここでそれぞれのヘリックスは、 $[PNPPNNP]_n$ (式中、それぞれの「P」は独立して、極性アミノ酸残基Lys (K)、His (H)、Glu (E)、Gln (Q)、Asp (D)、Asn (N)、Thr (T)およびSer (S)から選択され、それぞれの「N」は独立して、非極性アミノ酸残基Phe (F)、Leu (L)、Ile (I)、Met (M)、Val (V)およびTrp (W)から選択され、nは2~10の整数(例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10)である)により定義される7個のアミノ酸残基の2成分のパターン化された配列、または7つぞろいの配列を含む。DEEP融合タグの特定の態様において、n=3である。10

【0020】

1つより多くの7つぞろいの配列を含むヘリックス中の7つぞろいの配列は、同一であり得る(すなわち同じ7つぞろいの配列の反復)かまたは異なり得る(すなわち、同じヘリックス中のそれぞれのPNPPNNPの7つぞろいの配列は異なるアミノ酸配列を有し得る)。さらに、DEEP融合タグ中のヘリックスのアミノ酸組成は、例えばタグ中のヘリックスのそれが異なるアミノ酸配列を有するように、ヘリックスからヘリックスへと異なり得る。20

【0021】

DEEP融合タグはまた、例えばタグ中の第1のヘリックスに対してN末端および/または最後のヘリックスに対してC末端にさらなるアミノ酸残基を含み得る。典型的に、DEEP融合タグはまた、ヘリックスの間にヘリックス間ターンを含み、ここでそれぞれのヘリックス間ターンは、例えば縮重DNAコドンVAN (V: A、GまたはC; N: A、G、CまたはT)によりコードされる4、5または6個のアミノ酸残基(例えばGly (G)、His (H)、Gln (Q)、Asn (N)、Asp (D)、Glu (E)およびLys (K))を含む。30

【0022】

DEEP融合タグは一般的に、少なくとも約70アミノ酸残基長(例えば74アミノ酸残基)である。特定の態様において、DEEP融合タグは、少なくとも約100アミノ酸残基長(例えば102アミノ酸残基)である。典型的に、DEEP融合タグは、約500アミノ酸残基長未満、例えば約450アミノ酸残基長未満または約420アミノ酸残基長未満である。30

【0023】

特定の態様において、DEEP融合タグは、適切に折り畳まれた融合タンパク質内の表面に露出する複数のヒスチジン残基を含む。さらなる態様において、DEEP融合タグ内のそれぞれのヘリックスは、少なくとも1つ(例えば1、2、3、4、5、6またはそれ以上、例えば12)のヒスチジン残基(1つまたは複数)を含む。

【0024】

本発明におけるDEEP融合タグとしての使用に適切なポリペプチド、ならびにかかるポリペプチドを設計および作製する方法の特定の例は、それがその全体において参照により本明細書に援用される以下の刊行物：40

【表1】

- Wei Y, Liu T, Sazinsky SL, Moffet DA, Pelczer I, and Hecht MH (2003), Stably folded de novo proteins from a designed combinatorial library. *Protein Science* 12, 92–102 (see, e.g., Figure 2, proteins designated 86, n86, S-23, S-213, S-285, S-824 and S-836);
- Kamtekar S, Schiffer JM, Xiong H, Babik JM & Hecht MH (1993), Protein Design by Binary Patterning of Polar and Non-Polar Amino Acids. *Science* 262, 1680-1685;
- Wei Y, Kim S, Fela D, Baum J, & Hecht MH (2003), Solution Structure of a De Novo Protein From a Designed Combinatorial Library. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 100, 13270-13273;
- Hecht MH, Das A, Go A, Bradley LH & Wei Y (2004), *De Novo* Proteins from Designed Combinatorial Libraries. *Protein Science* 13, 1711-1723;
- Go A, Kim S, Baum J, & Hecht MH (2008), Structure and Dynamics of De novo Proteins from a Designed Superfamily of 4-Helix Bundles. *Protein Science* 17, 821-832; および
- Bradley LH, Kleiner RE, Wang AF, Hecht MH & Wood DW (2005), An Intein-Based Genetic Selection Enables Construction of a High-Quality Library of Binary Patterned De Novo Sequences. *Protein Engineering, Design & Selection (PEDS)* 18, 201-207.

10

20

30

50

に記載される。

【0025】

特定の態様において、DEEP融合タグは、S-824タンパク質またはその機能性断片、例えばN末端メチオニン残基を欠く断片のアミノ酸配列

【化1】

MYGKLNDLLEDLQEVLKNLHKKNWHGGKDNLHDVDNLQNVIEDIHDFMQGGGSG
GKLQEMMKEFQQVLDELNNHLQGGKHTVHHIEQNIKEIFHHLEELVHR

(配列番号：1)を含むか、それから本質的になるかまたはそれからなる(例えば含む)。

【0026】

別の特定の態様において、DEEP融合タグは、アミノ酸配列

【化2】

YGHLDLLEDLQEVLHNLHHNWHGGHDNLHDVDNLQNVIEDIHDFMQGGGSGG
HLQEMMHEFQQVLDELNNHLQGGHHTVHHIEQNIHEIFHHLEELVHR

(配列番号：10)またはその機能性断片を含むか、それから本質的になるかまたはそれからなる(例えば含む)。

【0027】

他の態様において、DEEP融合タグは、配列番号：1または配列番号：10のアミノ酸配列のそれぞれに対して、例えば少なくとも約70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有する配列番号：1または配列番号：10のS-824配列のバリエントアミノ酸配列を含む。本明細書で使用する場合、用語「配列同一性」は、デフォルトギャップウェイトを使用したプログラムGAPまたはBESTFITなどにより最適に整列される場合に、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列が、少なくとも、例えば70%配列同一性、または少なくとも80%配列同一性、または少なくとも85%配列同一性、または少なくとも90%配列同一性、または少なくとも95%配列同一性またはそれ以上を共有することを意味する。配列比較について、典型的に、1つの配列は、試験配列が比較される参照配列(例えば親配列)として働く。配列同一性比較は、所定のタンパク質の全長を通して、または所定のタンパク質の所望の断片内で試験され得る。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列および参照配列がコンピューター

に入力され、サブ配列座標が指定され、必要な場合は、配列アルゴリズムプログラムパラメーターが指定される。次いで配列比較アルゴリズムにより、指定されたプログラムパラメーターに基づいて、参照配列に対する試験配列(1つまたは複数)についてのパーセント配列同一性が計算される。

【0028】

比較のための配列の最適整列は、例えばSmith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)の局所相同性アルゴリズムにより、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性整列アルゴリズムにより、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. US A 85:2444 (1988)の類似性検索方法により、これらのアルゴリズムのコンピューター計算実行(the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. のGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)により、または視覚的調査(一般的にAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology参照)により実行され得る。パーセント配列同一性および配列類似性を決定するために適切なアルゴリズムの1つの例は、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990)に記載されるBLASTアルゴリズムである。BLAST分析を実行するためのソフトウェアは、国立生物工学情報センターを通じて公に利用可能である(国立衛生研究所NCBIインターネットサーバーを通じて公にアクセス可能である)。典型的に、デフォルトプログラムパラメーターは、配列比較を実行するために使用され得るが、カスタマイズされたパラメーターも使用され得る。アミノ酸配列について、BLASTPプログラムでは、デフォルトとして、3のワード長さ(wordlength) (W)、10の予測(expectation) (E)およびBLOSUM62スコアリングマトリックスが使用される(Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)参照)。

【0029】

本明細書で使用する場合、用語「標的タンパク質」は、宿主系におけるその発現が望ましいペプチドまたはポリペプチドをいう。かかるタンパク質はまた、本明細書において目的のタンパク質またはPOIと称される。本発明の融合タンパク質に含まれ得る標的タンパク質の例は、緑色蛍光タンパク質(GFP)、アミロイド(A)ポリペプチド、Trp Cageタンパク質、LS3ポリペプチド、インスリンA鎖ポリペプチドおよびインスリンB鎖ポリペプチドである。本発明の融合タンパク質に含まれ得る標的タンパク質のさらなる例は、インスリンまたはその断片、例えばインスリンA鎖ポリペプチド、インスリンB鎖ポリペプチドもしくはインスリンC鎖ポリペプチドまたはそれらの組合せである。

【0030】

一態様において、標的タンパク質は少なくとも10個のアミノ酸を含む。一態様において、標的タンパク質は少なくとも20個のアミノ酸を含む。別の態様において、標的タンパク質は少なくとも30個のアミノ酸を含む。特定の態様において、標的タンパク質は少なくとも50個のアミノ酸を含む。ある態様において、標的タンパク質は少なくとも100個のアミノ酸を含む。

【0031】

一般的に、標的タンパク質は、別の異種タンパク質の発現および/または精製を促進するために使用されるペプチドタグまたはポリペプチドドメインではない。一態様において、標的タンパク質は、アミノ酸配列DYKDDDDK(配列番号:2)を有するFLAGオクタペプチドではない。一態様において、標的タンパク質は、エラスチン様タンパク質(ELP)ではない。一態様において、標的タンパク質は、インテインポリペプチドではない。一態様において、標的タンパク質は、アミノ酸配列GGCを有するトリペプチドではない。

【0032】

一態様において、DEEP融合タグは、標的タンパク質に対してN末端に配置される。別の態様において、DEEP融合タグは、標的タンパク質に対してC末端に配置される。

【0033】

いくつかの態様において、本明細書に開示される融合タンパク質は、内部融合体(DEEP融合タグおよび/または標的タンパク質に関して)である。例えば、DEEP融合タグは、標的タンパク質に挿入され得る。代替的に、標的タンパク質は、DEEP融合タグに挿入され得る

10

20

30

40

50

。特定の態様において、標的タンパク質は、DEEP融合タグ中のヘリックス間ターンに挿入される。

【0034】

本発明の融合タンパク質は、DEEP融合タグおよび標的タンパク質に加えて他のアミノ酸配列を含み得る。いくつかの態様において、本発明の融合タンパク質は、リンカーアミノ酸配列を含む(例えば、DEEP融合タグと標的タンパク質の間に配置される)。種々のリンカーアミノ酸配列は、当該技術分野で公知であり、本発明において使用され得る。いくつかの態様において、リンカー配列は、Gly、Ser、Thr、His、Asp、Glu、Asn、Gln、LysおよびArgから選択される1つ以上のアミノ酸残基を含む。いくつかの態様において、リンカー配列としては、ポリグリシン配列(例えば6Xグリシン配列)が挙げられる。リンカーの他の例としては、GSAGSAAGSG(配列番号：12)、GGGGGGSR(配列番号：13)、KRおよびRRが挙げられる。ある態様において、リンカー配列は、切断部位を含む。

10

【0035】

いくつかの態様において、本発明の融合タンパク質は切断部位を含む。切断部位は、試薬(例えばプロテアーゼなどの生物学的試薬または化学的試薬)により切断される特異的なアミノ酸またはアミノ酸配列である。

【0036】

一態様において、切断部位は、プロテアーゼ切断部位(例えばTEVプロテアーゼにより認識および切断される部位)である。いくつかの異なるプロテアーゼについてのプロテアーゼ切断部位を提供するヌクレオチド配列は、当該技術分野で公知であり、例えばエンテロペプチダーゼ切断部位：DDDDK/；タバコエッチウイルス(tobacco etch virus)プロテアーゼ切断部位：ENLYFQ/G；第Xa因子切断部位：IEGR/；およびトロンビン切断部位：LVPR/GSが挙げられる。プロテアーゼ切断部位を提供する他のヌクレオチド配列としては、例えばLysおよびArgのC末端でのトリプシン切断；ならびにポリペプチドのC末端の位置からのLysおよびArgの加水分解によるカルボキシペプチダーゼ切断が挙げられる。したがって、本発明の融合タンパク質中の切断部位は、例えばエンテロペプチダーゼ、タバコエッチウイルスプロテアーゼ、第Xa因子、トロンビン、トリプシンまたはカルボキシペプチダーゼにより切断され得る。

20

【0037】

別の態様において、切断部位は、化学的切断部位(例えば臭化シアン(CNBr)により認識および切断される部位)である。種々の化学剤についての化学的切断部位を提供するヌクレオチド配列は、当該技術分野で公知であり、例えばメチオニンのC末端でのCNBr切断：M/；アスパラギン-グリシンでのヒドロキシルアミン切断：N/G；およびアスパラギン酸-プロリンでの蟻酸切断：D/Pが挙げられる。

30

【0038】

いくつかの態様において、本発明の融合タンパク質は、広いpH範囲に対して安定性および/または溶解性を示す。特定の態様において、本発明の融合タンパク質は、約4～約10のpH範囲に対して安定性および/または溶解性を示す。

【0039】

一般的に、DEEP融合タグのN末端およびC末端は、本発明の適切に折り畳まれた融合タンパク質において、互いに対しても近接して、例えば2つのペプチド鎖の間の分子間相互作用(例えばジスルフィド結合形成)が可能になる距離で、配置される。代表的なDEEP融合タグの核磁気共鳴構造、S-824 (PDBエントリー1P68)によると、適切に折り畳まれたS-824のN末端とC末端の間の距離は、約10～約12.4 の範囲である。したがって、いくつかの態様において、適切に折り畳まれたDEEP融合タグのN末端とC末端の間の距離は、約25未満、例えば約20 未満、約15 未満または約10 未満である。いくつかの態様において、適切に折り畳まれたDEEP融合タグのN末端とC末端の間の距離は、約1～約25、約5～約20 または約5～約15 である。

40

【0040】

理論に拘束されることを望まないが、かかるトポロジーを有するDEEP融合タグは、多量

50

体化(例えば二量体化)、2つ以上の異なるペプチド/ポリペプチド鎖または標的タンパク質の間の分子間折り畳みおよび/またはジスルフィド形成を誘導するために使用され得ると考えられる。したがって、いくつかの態様において、本発明の融合タンパク質は、2つ以上の標的タンパク質(例えば2つの標的タンパク質)を含む。一態様において、DEEP融合タグは、2つの標的タンパク質(例えば第1の標的タンパク質のN末端および第2の標的タンパク質のC末端)の間に配置される。例えば、本発明の融合タンパク質は、インスリンA鎖ポリペプチドである第1の標的タンパク質とインスリンB鎖ポリペプチドである第2の標的タンパク質の間にDEEP融合タグを含み得る。この例において、DEEP融合タグは、インスリンC鎖ポリペプチドと同様に機能し得、A鎖とB鎖の間のジスルフィド形成を誘導し得る。

【0041】

いくつかの態様において、融合タンパク質は、DEEP融合タグ、インスリンA鎖ポリペプチドおよびインスリンB鎖ポリペプチドを含む。いくつかの態様において、インスリンA鎖ポリペプチドは、DEEP融合タグのC末端にある。いくつかの態様において、インスリンB鎖ポリペプチドは、DEEP融合タグのN末端にある。いくつかの態様において、インスリンA鎖ポリペプチドはDEEP融合タグのC末端にあり、インスリンB鎖ポリペプチドはDEEP融合タグのN末端にある。

【0042】

インスリンは、時々プレプロインスリンと称される110アミノ酸鎖として転写される。ヒトプレプロインスリンのアミノ酸配列は、UniProtアクセション番号P01308(配列番号：11)に指定されている。アミノ酸残基1～24からなるプレプロインスリンのシグナルペプチドの除去により、プロインスリンが生じる。生物学的に活性なインスリンは、インスリンC鎖のアミノ酸配列に対応する配列番号：11のアミノ酸残基57～87の除去およびA鎖とB鎖の間のジスルフィド結合の形成により生じる。したがって、生物学的に活性なインスリンは、元の翻訳産物のほんの51アミノ酸だけを含む。そうではないと示されない限り、「インスリン」は、本明細書で使用する場合、プレプロインスリン、プロインスリンおよび生物学的に活性なインスリンを包含する。いくつかの態様において、インスリンは生物学的に活性なインスリンである。いくつかの態様において、インスリンはプロインスリンである。いくつかの態様において、インスリンはプレプロインスリンである。

【0043】

本明細書で使用する場合、「インスリンA鎖ポリペプチド」は、天然に存在し得るかまたは天然には存在し得ない(例えば作り変えられ得る)。インスリンA鎖ポリペプチドは、組み換え体または合成物であり得、未修飾または修飾され得る(例えば翻訳後修飾され、例えばグリコシル化またはリン酸化によるものとして)。本明細書に記載される融合タンパク質および方法における使用に適切なインスリンA鎖ポリペプチドの例は、当該技術分野で公知であり、ヒト由来のインスリンA鎖ポリペプチドなどの天然に存在するインスリンA鎖ポリペプチドのバリエント(例えば天然に存在するインスリンA鎖ポリペプチドに対して少なくとも約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%の同一性を有するバリエント)が挙げられる。いくつかの態様において、インスリンA鎖ポリペプチドは、UniProtアクセション番号P01308(配列番号：11)に指定されるヒトイインスリンのアミノ酸残基90～110のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号：11のアミノ酸配列のアミノ酸残基90～110に対して少なくとも約70%(例えば約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%)の同一性を有するそのバリエントである。配列番号：9のアミノ酸配列は、配列番号：11のアミノ酸配列のアミノ酸残基90～110に対応する。したがって、いくつかの態様において、インスリンA鎖ポリペプチドは、配列番号：9のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号：9のアミノ酸配列に対して少なくとも約70%(例えば約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%)の同一性を有するそのバリエントである。

【0044】

本明細書で使用する場合、「インスリンB鎖ポリペプチド」は、天然に存在し得るかまたは天然には存在し得ない(例えば作り変えられ得る)。インスリンB鎖ポリペプチドは、

10

20

30

40

50

組み換え体または合成物であり得、未修飾または修飾され得る(例えば翻訳後修飾され、例えばグリコシル化またはリン酸化によるものとして)。本明細書に記載される融合タンパク質および方法における使用に適切なインスリンB鎖ポリペプチドの例は、当該技術分野で公知であり、ヒト由来のインスリンB鎖ポリペプチドなどの天然に存在するインスリンB鎖ポリペプチドのバリエント(例えば天然に存在するインスリンB鎖ポリペプチドに対して少なくとも約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%の同一性を有するバリエント)が挙げられる。いくつかの態様において、インスリンB鎖ポリペプチドは、UniProtアクセッション番号P01308(配列番号：11)に指定されるヒトインスリンのアミノ酸残基25～54のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号：11のアミノ酸配列のアミノ酸残基25～54に対して少なくとも約70%(例えば約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%)の同一性を有するそのバリエントである。配列番号：8のアミノ酸配列は、配列番号：11のアミノ酸配列のアミノ酸残基25～54に対応する。したがって、いくつかの態様において、インスリンB鎖ポリペプチドは、配列番号：8のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号：8のアミノ酸配列に対して少なくとも約70%(例えば約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%)の同一性を有するそのバリエントである。

【0045】

本明細書で使用する場合、「インスリンC鎖ポリペプチド」は、天然に存在し得るかまたは天然には存在し得ない(例えば作り変えられ得る)。インスリンC鎖ポリペプチドは、組み換え体または合成物であり得、未修飾または修飾され得る(例えば翻訳後修飾され、例えばグリコシル化またはリン酸化によるものとして)。本明細書に記載される融合タンパク質および方法における使用に適切なインスリンC鎖ポリペプチドの例は、当該技術分野で公知であり、ヒト由来のインスリンC鎖ポリペプチドなどの天然に存在するインスリンC鎖ポリペプチドのバリエント(例えば天然に存在するインスリンC鎖ポリペプチドに対して少なくとも約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%の同一性を有するバリエント)が挙げられる。いくつかの態様において、インスリンC鎖ポリペプチドは、UniProtアクセッション番号P01308(配列番号：11)に指定されるヒトイインスリンのアミノ酸残基57～87のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号：11のアミノ酸配列のアミノ酸残基57～87に対して少なくとも約70%(例えば約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%)の同一性を有するそのバリエントである。

【0046】

米国特許出願公開公報US 2018/0194827号には、インスリンペプチドならびに天然のもしくは天然に存在するインスリンA鎖およびB鎖と比較して種々の置換、付加および/または改変を含むインスリンA鎖およびインスリンB鎖を含む単鎖インスリンペプチドアゴニストが記載される。インスリン誘導体およびアナログ、例えばインスリンA鎖ポリペプチドおよびインスリンB鎖ポリペプチドに関するUS 2018/0194827の教示は、それらの全体において参照により本明細書に援用される。したがって、インスリンA鎖ポリペプチドおよびインスリンB鎖ポリペプチドの例としては、US 2018/0194827に開示されるインスリンA鎖およびインスリンB鎖が挙げられる。

【0047】

Mathieu, C., Gillard, P. and Benhalima, K., *Nature Reviews Endocrinology* 13, 385-399 (2017) (Mathieu et al.)およびZaykov, A.N., Mayer, J.P. and DiMarchi, R.D., *Nature Reviews Drug Discovery* 15, 425-439 (2016) (Zaykov et al.)には、インスリンアナログが記載される。インスリン誘導体およびアナログ、例えばインスリンA鎖ポリペプチドおよびインスリンB鎖ポリペプチドに関するMathieu et al.およびZaykov et al.の教示は、それらの全体において参照により本明細書に援用される。したがって、インスリンA鎖ポリペプチドおよびインスリンB鎖ポリペプチドの例としては、Mathieu et al.およびZaykov et al.に開示されるインスリンA鎖およびインスリンB鎖が挙げられる。

【0048】

10

20

30

40

50

DEEP-インスリンA鎖ポリペプチド-インスリンB鎖ポリペプチド融合体のいくつかの態様は、DEEP融合タグとインスリンA鎖ポリペプチドの間に第1のリンカーをさらに含む。DEEP-インスリンA鎖ポリペプチド-インスリンB鎖ポリペプチド融合体のいくつかの態様は、DEEP融合タグとインスリンB鎖ポリペプチドの間に第2のリンカーをさらに含む。DEEP-インスリンA鎖ポリペプチド-インスリンB鎖ポリペプチド融合体のいくつかの態様は、DEEP融合タグとインスリンA鎖ポリペプチドの間に第1のリンカーおよびDEEP融合タグとインスリンB鎖ポリペプチドの間に第2のリンカーをさらに含む。いくつかの態様において、第1のリンカーは、第1の切断部位(例えばプロテアーゼ切断部位、化学的切断部位)を含む。いくつかの態様において、第2のリンカーは、第2の切断部位(例えばプロテアーゼ切断部位、化学的切断部位)を含む。

10

【0049】

DEEP-インスリンA鎖ポリペプチド-インスリンB鎖ポリペプチド融合体のいくつかの態様は、DEEP融合タグとインスリンA鎖ポリペプチドの間に第1の切断部位をさらに含む。DEEP-インスリンA鎖ポリペプチド-インスリンB鎖ポリペプチド融合体のいくつかの態様は、DEEP融合タグとインスリンB鎖ポリペプチドの間に第2の切断部位をさらに含む。DEEP-インスリンA鎖ポリペプチド-インスリンB鎖ポリペプチド融合体のいくつかの態様は、DEEP融合タグとインスリンA鎖ポリペプチドの間に第1の切断部位およびDEEP融合タグとインスリンB鎖ポリペプチドの間に第2の切断部位をさらに含む。

20

【0050】

第1の切断部位および第2の切断部位を有するDEEP-インスリンA鎖ポリペプチド-インスリンB鎖ポリペプチド融合体のいくつかの態様において、第1の切断部位および第2の切断部位は同じ条件下で(例えば同じ化学的条件下で同じプロテアーゼにより)切断可能である。いくつかの態様において、第1の切断部位および第2の切断部位は独立して(たとえば直交する(orthogonal)化学的条件下で独立する異なるプロテアーゼにより)切断可能である。

30

【0051】

本発明の融合タンパク質の一態様において、融合タンパク質は、配列番号：7のアミノ酸配列、または配列番号：7のアミノ酸配列に対して少なくとも約70%(例えば約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%)の同一性を有するそのバリアントを含む。

30

【0052】

本発明の融合タンパク質の一態様において、融合タンパク質は、アミノ酸配列：

【化3】

MRFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFYTPKTRRYGHLNDLLEDLQEVLHNLHH
NWHGGHDNLHDVDNHLQNVIEDIHDQMGGGSGGHLQEMMHEFQQVLDELN
NHLQGGHHTVHHIEQNIHEIFHHLEELVHRKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN

(配列番号：14)、または配列番号：14のアミノ酸配列に対して少なくとも約70%(例えば約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%)の同一性を有するそのバリアントを含む。太字の配列番号：14の部分は配列番号：10のアミノ酸配列を有するDEEP融合タグに対応する。

40

【0053】

別の態様において、本発明は、本発明の融合タンパク質をコードする核酸分子に関する。用語「核酸」は、本明細書において、複数のヌクレオチドモノマー(例えばリボヌクレオチドモノマーまたはデオキシリボヌクレオチドモノマー)を含むポリマーをいうために使用される。「核酸」としては、例えばDNA(例えばcDNA)、RNAおよびDNA-RNAハイブリッド分子が挙げられる。核酸分子は、天然に存在し得るか、組み換え体であり得るかまたは合成物であり得る。また、核酸分子は、一本鎖、二本鎖または三本鎖であり得る。いくつかの局面において、核酸分子は改変され得る。核酸改変としては、例えばメチル化、ヌク

50

レオチドアナログによる1つ以上の天然に存在するヌクレオチドの置換、非電荷結合(例えばメチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメート等)、電荷結合(例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等)などのヌクレオチド間の改変、垂れ下がり(pendent)部分(例えばポリペプチド)、インターラーティー(例えばアクリジン、ソラレン(psoralen)等)、キレート剤、アルキル化剤および改変された結合(例えばアノマー核酸等)が挙げられる。二本鎖ポリマーの場合、「核酸」は、分子のいずれかまたは両方の鎖をいい得る。

【0054】

遺伝子コードは、ほとんどのアミノ酸がいくつかのコドン(「同義語(synonym)」または「同義の(synonymous)」コドンと称される)により表されるように縮重するが、特定の生物によるコドンの使用頻度はランダムではなく、特定のコドントリプレットに対して偏っていることが当該技術分野において理解される。したがって、特定の態様において、本発明の融合タンパク質をコードする核酸は、特定の種類の宿主細胞における発現について(例えばコドン最適化により)最適化されているヌクレオチド配列を含む。コドン最適化は、目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、かかるポリヌクレオチドにおける特定のコドンを、同じアミノ酸(1つまたは複数)をコードするが、核酸が発現されている宿主細胞においてより一般的に使用され/認識されるコドンにより置き換えるように改変されるプロセスをいう。いくつかの局面において、本発明の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、大腸菌における発現について最適化されたコドンである。

10

【0055】

別の態様において、本発明は、本発明の融合タンパク質をコードする核酸分子を含む宿主細胞に関する。本明細書で使用する場合、用語「宿主細胞」は、DEEP融合タグを含む融合タンパク質をコードする核酸を発現するための適切な宿主をいう。いくつかの態様において、宿主細胞は、当該技術分野で公知の組み換えDNA技術を使用して構築されたベクターにより形質転換またはトランスフェクトされている細胞をいう。適切な宿主細胞の例としては、酵母細胞(例えばピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)およびサッカロミセス・セレビシエ)、昆虫細胞(例えばスドプテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*) Sf9細胞)、哺乳動物細胞(例えばCHO細胞)および細菌細胞(例えば大腸菌および枯草菌；アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*))が挙げられる。適切な宿主細胞のさらなる例としては、植物細胞(例えばベンサミアナタバコ(*Nicotiana benthamiana*))が挙げられる。特定の局面において、宿主細胞は大腸菌である。

20

【0056】

本発明の融合タンパク質は、常套的な方法および当該技術分野で周知の試薬を使用して、組み換えるまたは合成的に產生され得る。例えば、本発明の融合タンパク質は、当該技術分野で公知の方法により、適切な宿主細胞(例えば細菌、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞)中で組換える的に產生され得る。例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992；およびMolecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press参照。例えば、本明細書に記載される融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子は、適切な宿主細胞(例えば大腸菌)に導入され得、かつ発現され得、発現された融合タンパク質は、常套的な方法および容易に入手可能な試薬を使用して宿主細胞(例えば封入体中)から単離/精製され得る。

30

【0057】

ある態様において、本発明はまた、標的タンパク質を得る(例えば発現する、產生する、精製する)方法に関する。一態様において、該方法は、a)融合タンパク質をコードするDNA構築物を宿主細胞に導入する工程、ここで該融合タンパク質はDEEP融合タグおよび標的タンパク質を含む、b)宿主細胞中で融合タンパク質を発現させる工程、c)融合タンパク質を単離する工程、ならびにd)融合タンパク質を切断して標的タンパク質からDEEP融合タグを分離する工程を含む。

40

【0058】

50

融合タンパク質をコードするDNA構築物を宿主細胞に導入するための方法は、当該技術分野で周知であり、例えば標準的な形質転換およびトランسفエクションの技術(例えばエレクトロポレーション、化学的形質転換)が挙げられる。本発明の分野における当業者は、DNA構築物を宿主細胞に導入するための適切な方法を容易に選択し得る。

【0059】

宿主細胞中でタンパク質を発現させるための種々の方法が当該技術分野で周知である(例えば大腸菌におけるIPTG誘導発現)。本発明の分野における当業者は、本発明の融合タンパク質を宿主細胞中で発現させるための適切な方法を容易に選択し得る。

【0060】

発現された融合タンパク質は、例えばリゾチーム処理、超音波処理、濾過、塩析、超遠心分離およびクロマトグラフィーを含む公知の方法および試薬を使用して、宿主細胞から単離され得る。組み換え的に発現された融合タンパク質は、宿主細胞および/または宿主細胞培養培地から回収され得る。一旦細胞から放出されると、融合タンパク質は、標準的な技術および試薬を使用した親和性樹脂への結合により細胞溶解物から精製され得る。特定の態様において、融合タンパク質は、融合タンパク質中のDEEP融合タグの親和性樹脂(例えば固相支持体)への結合により単離される。いくつかの態様において、DEEP融合タグは、His-タグ付加タンパク質について典型的に使用される方法による精製を可能にする、複数の表面露出ヒスチジン残基を含む。例えば、本発明の融合タンパク質は、固定された金属イオン親和性クロマトグラフィー(IMAC)を使用して単離され得る。IMAC適用のための固定された遷移金属を含む適切なIMAC樹脂は当該技術分野で公知であり、市販され(例えばTALON(登録商標)SuperflowTM樹脂、HisTrapTM高性能樹脂、GE Healthcare Life Sciences)、例えば固定されたニッケル樹脂、固定されたコバルト樹脂、固定された銅樹脂および固定された亜鉛樹脂が挙げられる。特定の態様において、本発明の融合タンパク質は、固定されたニッケルイオンを含む親和性樹脂を使用して精製される。

【0061】

本明細書で使用する場合、「単離された(isolated)」は、実質的に純粋を意味する。例えば、単離された融合タンパク質は、融合タンパク質以外の物質(例えば化学物質、タンパク質、ペプチド、他の生物学的物質)を含む混合物の少なくとも約50重量%、約60重量%、約70重量%、約80重量%、約90重量%、約95重量%、約97重量%、約98重量%、約99重量%または約99.5重量%を構成する。

【0062】

融合タンパク質から融合タグを切断する方法は当該技術分野で公知である。例えば、標的タンパク質からDEEP融合タグを分離するための融合タンパク質の切断は、化学的切断(例えばCNBr切断)または酵素切断(例えばプロテアーゼ切断)により実施され得る。

【0063】

さらに別の態様において、本発明は、DEEP融合タグ、および標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列を導入するためのクローニング部位をコードするヌクレオチド配列を含む構築物に関する。特定の態様において、該構築物はDNA構築物である。DEEP融合タグは、本明細書に記載されるDEEP融合タグのいずれか(例えば配列番号:1)であり得る。標的タンパク質の例としては、本明細書に記載される標的タンパク質(例えば配列番号:1)が挙げられる。

【0064】

いくつかの態様において、該構築物はプラスミドである。一般的に、用語「プラスミド」は、用語「ベクター」と交換可能に使用され、核酸配列を細胞に導入するための核酸構築物をいう。いくつかの局面において、プラスミドは、本明細書に記載されるように、適切な宿主における発現に影響を及ぼし得る1つ以上の適切な異種配列(1つまたは複数)に操作可能に連結される発現プラスミドである。「操作可能に連結される」は、本明細書において、異種配列が、例えば目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を引き起こすまたは制御するか、または目的のポリヌクレオチドの発現産物に関してインフレームで発現されるように、異種配列が、目的のポリヌクレオチドに関係のある位置に適切

10

20

30

40

50

に(例えば機能的関係で)配置される構成として定義される。本明細書で使用する場合、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列は、2つの配列が自然には関係のない場合に該アミノ酸配列またはヌクレオチド配列が操作可能に連結される別の配列に対して「異種」である。

【0065】

一局面において、異種配列はプロモーター配列である。本明細書で使用する場合、「プロモーター配列」は、宿主細胞に対して内在性であり、宿主細胞中で該プロモーターに操作可能に連結された核酸の転写を引き起こし得る1つ以上のタンパク質により認識される核酸配列をいう。典型的に、プロモーター配列は、目的のポリヌクレオチドの発現を媒介する転写調節配列を含む。プロモーターは、変異体、切断体およびハイブリッドのプロモーターを含む選り抜きの宿主細胞において転写活性を示す任意の核酸配列であり得、宿主細胞に対して同種または異種のいずれかの細胞外または細胞内のポリペプチドをコードする遺伝子から得られ得る。細菌性宿主について、本開示の核酸構築物の転写を引き起こすための適切なプロモーターとしては、限定されないが、大腸菌lacオペロン、ストレプトミセス・セリカラー(*Streptomyces coelicolor*)アガラーゼ遺伝子(dagA)、枯草菌レバンスクラーゼ(*levansucrase*)遺伝子(sacB)、バチルス・リケニフォルミス(*Bacillus licheniformis*) アミラーゼ遺伝子(amyL)、バチルス・ステアロサーモフィルス(*Bacillus stearothermophilus*)マルトース生成アミラーゼ(maltoseic amylase)遺伝子(amyM)、バチルス・アミロリケファシエンス(*Bacillus amyloliquefaciens*) アミラーゼ遺伝子(amyQ)、バチルス・リケニフォルミスペニシリナーゼ遺伝子(penP)、枯草菌xy1Aおよびxy1B遺伝子、ならびに原核生物 ラクタマーゼ遺伝子から得られるプロモーター(例えばVilla-Kamaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731, 1978参照)、ならびにtacプロモーター(例えばDeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25, 1983参照)が挙げられる。纖維状真菌宿主細胞についてのプロモーターの例としては、限定されないが、コウジカビTAKAアミラーゼ、リゾムコール・ミエヘイ(*Rhizomucor miehei*)アスペラギン酸プロテイナーゼ、黒色アスペルギルス中性 -アミラーゼ、黒色アスペルギルス酸性安定性 -アミラーゼ(acid stable alpha-amylase)、黒色アスペルギルスまたはアワモリコウジカビ(*Aspergillus awamori*)グルコアミラーゼ(glaA)、リゾムコール・ミエヘイリパーゼ、コウジカビアルカリ性プロテアーゼ、コウジカビトリオースホスフェートイソメラーゼ、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)アセトアミダーゼ、およびフザリウム・オキシスポラム(*Fusarium oxysporum*)トリプシン様プロテアーゼ(例えばWO 96/00787参照)についての遺伝子から得られるプロモーター、ならびにNA2-tpiプロモーター(黒色アスペルギルス中性 -アミラーゼおよびコウジカビトリオースホスフェートイソメラーゼについての遺伝子由来のプロモーターのハイブリッド)、ならびにそれらの変異体、切断体およびハイブリッドのプロモーターが挙げられる。酵母細胞プロモーターの例は、サッカロミセス・セレビシエエノラーゼ(ENO-1)、サッカロミセス・セレビシエガラクトキナーゼ(GAL1)、サッカロミセス・セレビシエアルコールデヒドロゲナーゼ/グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(ADH2/GAP)、およびサッカロミセス・セレビシエ3-ホスホグリセレートキナーゼについての遺伝子に由来するものであり得る。酵母宿主細胞についての他の有用なプロモーターは当該技術分野で公知である(例えばRomanos et al., Yeast 8:423-488, 1992参照)。

【0066】

プロモーター配列に加えて、本発明のDNA構築物中のDEEP融合タグおよび/またはPOIをコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結され得る他の異種配列の例としては、限定されないが、他の融合部分(例えばマルトース結合タンパク質(MBP)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST))をコードする配列、シグナルペプチドをコードする配列、プロペプチドをコードする配列、開始配列、ターミネーター配列、転写および翻訳の停止シグナル、ならびに選択マークー配列が挙げられる。

【0067】

DEEP融合タグをコードするヌクレオチド配列に加えて、本明細書に記載される構築物は

10

20

30

40

50

、ヌクレオチド配列(1つまたは複数)(例えば標的タンパク質をコードする配列)を導入するための1つ以上(例えば1、2または3)のクローニング部位(1つまたは複数)を含む。クローニング部位は、標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列の上流または下流に配置され得る。本発明の核酸構築物における含入のための種々の有用なクローニング部位は当業者に公知である。いくつかの態様において、クローニング部位は、制限酵素により認識および/または切断されるヌクレオチド配列である。

【0068】

いくつかの態様において、構築物は、リンカーアミノ酸配列をコードする1つ以上のヌクレオチド配列(例えばDEEP融合タグをコードするヌクレオチド配列とクローニング部位の間に配置されるリンカーヌクレオチド配列)をさらに含む。リンカーアミノ酸配列の例としては、本明細書に記載されるリンカーのいずれか(例えばポリグリシンリンカー)が挙げられる。10

【0069】

いくつかの態様において、構築物は、抗生物質耐性遺伝子(例えばカナマイシン耐性遺伝子)などの選択マーカーをさらに含む。種々の選択マーカーは当該技術分野で公知であり、本発明において使用され得る。

【0070】

さらなる態様において、本発明は、本発明の1つ以上のDNA構築物を含むキットに関し、ここで該1つ以上の構築物はそれぞれ、DEEPタンパク質をコードするヌクレオチド配列、およびヌクレオチド配列(例えば標的タンパク質/目的のタンパク質をコードする異種配列)を導入するためのクローニング部位を含む。適切なDNA構築物としては、例えば本明細書に記載されるDNA構築物のいずれかが挙げられる。適切なクローニング部位(例えば制限部位)としては本明細書に記載されるものが挙げられる。好ましくは、クローニング部位は、標的タンパク質をコードする異種ヌクレオチド配列のインフレーム挿入を可能にする、DEEP融合タグをコードする配列に関する位置に配置される。20

【0071】

一態様において、キットは、DEEPタンパク質をコードする配列およびクローニング部位を含む単一のDNA構築物を含む。別の態様において、該キットは、DEEPタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびクローニング部位を含む複数の構築物を含む。特定の態様において、該キットは複数のDNA構築物を含み、ここでそれぞれのDNA構築物は、異なるDEEP融合タグをコードする。別の態様において、該キットは複数のDNA構築物を含み、ここでそれぞれのDNA構築物は、同じDEEP融合タグをコードする。30

【0072】

キット内の複数の構築物は、同じクローニング部位または異なるクローニング部位を含み得る。一態様において、それぞれのDNA構築物は同じクローニング部位を含む。クローニング部位は、構築物内でDEEP融合タグをコードするヌクレオチド配列の上流または下流に配置され得る。

【0073】

複数のDNA構築物を含む本発明のキットは、例えば特定の宿主において最適な発現を有するDEEP融合タンパク質を同定するように設計されたハイスループットスクリーニング法において使用され得る。40

【0074】

いくつかの態様において、該キットはさらに、分子クローニング技術に有用な試薬(例えば制限酵素)などの1つ以上のさらなる試薬を含む。

【0075】

典型的に、該キットは、使用の容易さのために区分けされ、試薬を有する1つ以上の容器を含み得る。一態様において、キット構成要素の全ては一緒にパッケージングされる。代替的に、該キットの1つ以上の個々の構成要素は、他のキット構成要素とは別のパッケージにおいて提供され得る。

【実施例】

10

20

30

40

50

【 0 0 7 6 】**実施例**

以下の材料および方法は、本明細書における図1A～6Dに記載される実験において使用された。

【 0 0 7 7 】**プラスミドの構築および株：**

アミロイド 1-42(A₁₋₄₂)、TRP cage (TRP)、インスリン(INS)および(LSLLSL)₃ (LS3)をコードする合成遺伝子を、大腸菌コドン最適化gBlocks (Integrated DNA Technologies)として注文して、XbaIおよびHindIIIの制限部位を含むフォワードプライマーおよびリバースプライマーを用いて増幅した。S-824およびSUMOタンパク質をコードする遺伝子を、先に報告されたプラスミドから、NdeIおよびXbaI制限部位を含むフォワードプライマーおよびリバースプライマーを用いて増幅した(SUMO: J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 2162-2165、S824: Journal of Molecular Biology 428, 399-411)。標準的な遺伝子工学技術を使用して、消化したS-824、POI(目的のタンパク質/ペプチド)および直線化されたプラスミドをライゲーションして、pET30DEEP-POIプラスミドを生じた。GFP融合について、S-824およびSUMOを、以前に記載されるようにNdeIおよびBamHI制限部位を使用してpET28GFPにクローニングした(J. Molec. Biology 319, 1279-1290)。ライゲーションされたプラスミドをDH5[®]細胞に形質転換して、カナマイシン選択プレート上で増殖させた。プラスミドDNA抽出および配列決定のために、コロニーを、30mg/Lカナマイシンを補充した5mLの新鮮なLB(LB-kan)を含む試験管に接種して、震盪インキュベーター中37[°]、200RPMで一晩増殖させた。
10

【 0 0 7 8 】**タンパク質発現および溶解：**

配列決定したプラスミドをBL21DE3細胞に形質転換して、カナマイシン選択LB寒天プレート上で増殖させた。新しいコロニーを、37[°]、200RPMでの一晩のインキュベーションのために50mLフラスコ中15mLのLB-kanに接種した。翌日、10mLの一晩増殖培養物を4Lフラスコ中1LのLB-kanに接種した。細胞を37[°]、200RPMで約0.6のOD₆₀₀まで増殖させて発現実験を行った。IPTG(1または0.1mM)を添加してタンパク質発現を開始させ、37[°]で約4時間または18[°]で一晩、200RPMでさらにインキュベートした。4[°]で5000xgの遠心分離により細胞を回収し、-80[°]で保存した。細胞ペレットを、50mM Tris、300mM NaClおよび10% v/vグリセロール中pH=8で再懸濁して、1000barで操作するEmulsiflex C3ホモジナイザーを通した少なくとも3回の通過を使用して溶解させた。4[°]、30000xg、30分間の遠心分離により溶解物を清澄化した。
20

【 0 0 7 9 】**可溶性タンパク質の精製：**

DEEP-GFPおよびDEEP-TRPの両方は、可溶性画分中に見られた。0.45 μm PVDF膜シリジフィルターにより上清をろ過して、バッファA(TBS: 50mM Tris、300mM NaCl、pH=8)中で予め平衡化したHisTrap (GE Healthcare)カラムに充填した。カラムを、10カラム容量のバッファAで洗浄した。次いでタンパク質を75%バッファB(TBS、500mMイミダゾール、pH=8)で溶出した。溶出された画分を合わせて約10mLを得て、HiLoad Superdex 75 26/600カラム(GE Healthcare)を使用したサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)または3,500MWCOチューブを使用した透析のいずれかにより、さらに精製した。
40

【 0 0 8 0 】

図1A～1Eは、DEEPの過剰発現および精製に関し、DEEPが精製ハンドル(handle)として働き得ることを示す。12個の表面露出ヒスチジン残基により、DEEPは、His-タグと同等の親和性でNi-IMACカラムに結合する。HPLCクロマトグラム(図1D)により示されるように、タンパク質は95%より高い純度までさらに精製され得た。

【 0 0 8 1 】

図2A～2Cは、frGFP(折り畳みレポーターGFP)の過剰発現および精製に関し、DEEPの、GFPなどの良好に発現されるタンパク質への融合は、タンパク質の発現を損なわないことを
50

示す。さらに、DEEPのGFPへの融合により、SUMO-GFP融合体と比較してより高い蛍光を有するタンパク質が生じ、DEEPは、GFPの正確な折り畳みにおいてSUMOよりも小さく干渉することが示唆された。

【0082】

図3A～3Dは、Trp cageの過剰発現および精製に関し、Trp cageの全体的な発現収率は、DEEP融合についてSUMO融合よりも高いことが示される。

【0083】

表1は、図2Bに示されるHis-GFP、DEEP-GFPおよびSUMO-GFPの精製の要約を提供する。

【0084】

【表2】

表1. GFP 精製の要約

	MW (g/mol)	SEC ピーク (mg/mL)	蛍光 (RFU)
His-GFP	28809	1.24	5450
DEEP-GFP	39534	1.05	4029
SUMO-GFP	41021	1.04	3874

【0085】

不溶性タンパク質の精製：

DEEP-A₁₋₄₂、DEEP-INSおよびDEEP-LS3は不溶性画分中に見られた。DEEP-A₁₋₄₂またはDEEP-INSの不溶性ペレットを、1% Triton X-100を添加した溶解バッファで洗浄し、20、30000xgで20分間遠心分離し、滅菌Milli-Q水でもう2回洗浄した。驚くべきことに、DEEP-A₁₋₄₂およびDEEP-INSは1% Triton X-100中で不溶性の封入体を形成したが、DEEP-LS3はこの画分で可溶性であり、DEEP-LS3と膜の好ましい結合が示唆された。そのため、Triton X-100洗浄を省略して、ペレットを、TBSで2回洗浄した。DEEP-A₁₋₄₂、DEEP-INSおよびDEEP-LS3の洗浄したペレットは、最終的に6MグアニジンHClを含むTBSに溶解し、6MグアニジンHClを添加したバッファAおよびBを用いて変性条件下で、HisTrapカラムを使用して精製した。

【0086】

図4A～4Cは、A₁₋₄₂の過剰発現および精製に関し、DEEPに融合した場合、A₁₋₄₂は、主に不溶性画分に蓄積して、SUMO融合と比較した場合より高い発現収率を生じることを示す。

【0087】

図5A～5Cは、DEEP-Met-LS3の過剰発現および精製に関し、DEEP融合により、正確な質量に対応するタンパク質バンドがSDS-PAGEゲル上に見られ得ることを示す。一方で、SUMO融合ではタンパク質はほとんど観察されなかった。

【0088】

図6A～6Dは、DEEP-Met-Insの過剰発現に関し、インスリンのA鎖およびB鎖のDEEPのC末端およびN末端の両方への融合により高発現収率が生じることを示す。さらに、DEEPは、正確なジスルフィドパターンの形成に向かうインスリンの再折り畳みプロセスを容易にする。

【0089】

HPLC分析：

両方に0.1% TFAを添加した溶媒A：水および溶媒B：アセトニトリルを用いてC4またはC18カラムのいずれかを使用して逆相HPLCを行った。タンパク質試料は、カラムへの充填前に、0.1%または1% TFAのいずれかで酸性化した。

【0090】

DEEP-インスリン再折り畳みおよびジスルフィドパターン特徴付け

8M尿素中の50mgのIMAC精製したDEEP-インスリンを、50mM Glyバッファ、pH=10.5で10倍

10

20

30

40

50

希釈した。ジスルフィド結合再編成(reshuffling)を開始するために、Meを添加して、再折り畳み溶液を緩やかに攪拌しながら4でインキュベートした。DEEP融合体からインスリンを解放するために、再折り畳みDEEP-インスリンを、トリプシンおよびカルボキシペプチダーゼBで処理した。切断されたインスリンを、C18カラムを使用してRP-HPLCによりさらに精製し、凍結乾燥して、V8プロテアーゼにより消化した。

【0091】

表2は、V8プロテアーゼにより消化されたDEEP-インスリンのペプチド断片の、計算された質量および同定された質量を示す。表2に示される結果により、DEEP-インスリン融合体のA鎖およびB鎖は、天然のインスリンにおいて観察されるジスルフィドパターンを形成することが確認される。DEEP-インスリン融合タンパク質中のV8の切断部位およびインスリンのA鎖およびB鎖の間で形成されるあり得るジスルフィド結合を図6Dに示す。
10

【0092】

【表3】

表 2.

保持時間(分)	ペプチド	計算された質量(Da)	同定された質量(Da)
14.3	A1	416.5	416.2
28	B3	1116.3	1115.6
28.5	B2+A3	1377.6	1376.6
35.5	B1+A2	2969.4	2968.3
36.2	B1+A1A2	3367.9	3367.5

【0093】

そうではないと定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術的用語および科学的用語は、本発明の属する分野の当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0094】

本明細書で使用する場合、不定冠詞「a」および「an」は、明確にそれと反対であると示されない限り、「少なくとも1つ」を意味すると理解されるべきである。
30

【0095】

語句「および/または」は、本明細書で使用する場合、そのように連結される要素、すなわちいくつかの場合において接続的に存在し、他の場合において離接的に存在する要素の「いずれかまたは両方」を意味すると理解されるべきである。

【0096】

明確にそれと反対であると示されない限り、1つより多くの工程または行為を含む本明細書に記載される任意の方法において、該方法の工程または行為の順序は、該方法の工程または行為が記載される順序に必ずしも限定されないことも理解されるべきである。

【0097】

そうではないと示されない限り、またはそうではないことが文脈から明らかでかつ当業者に理解されない限り、範囲として表される値は、文脈がそうではないことを明らかに規定しない限りは、種々の態様において記載される範囲内の任意の特定の値または下位範囲(subrange)が想定され得る。数値に関して「約」は一般的に、そうではないと示さない限りまたはそうではないことが文脈から明らかでない限り、該値の±8%、いくつかの態様において±6%、いくつかの態様において±4%、いくつかの態様において±2%、いくつかの態様において±1%、いくつかの態様において±0.5%以内にある値の範囲をいう。
40

【0098】

本明細書に引用される全ての特許、公開公報および参照文献の教示は、それらの全体において参照により援用される。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 9 】

例示態様が特に示され、記載されるが、形態および詳細における種々の変更は、添付の特許請求の範囲に包含される態様の範囲から逸脱することなく、本発明においてなされ得ることが当業者には理解される。

【 図 1 - 1 】

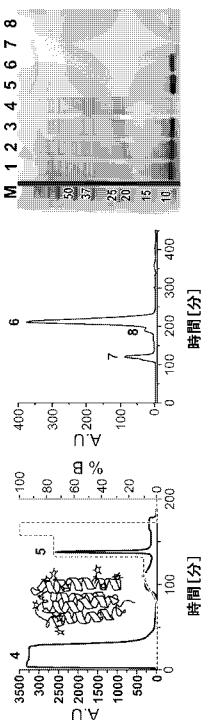


FIG. 1A

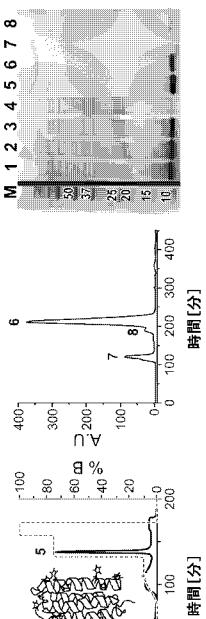


FIG. 1B

FIG. 1C

【 図 1 - 2 】

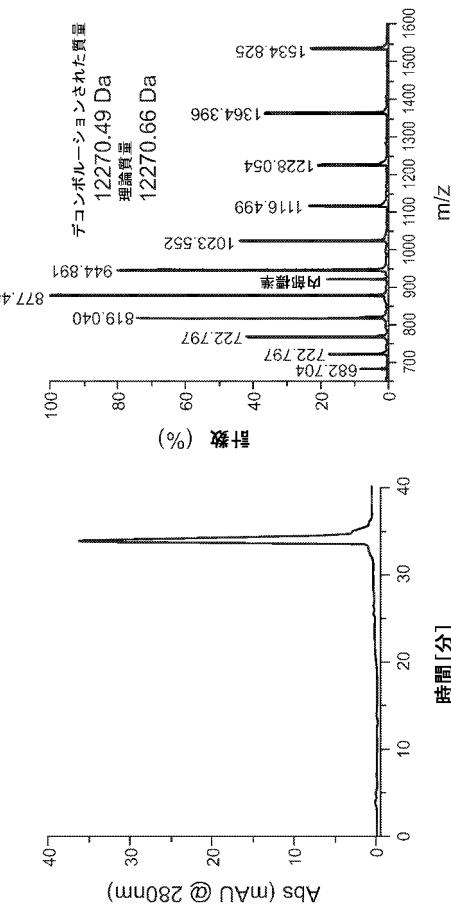


FIG. 1D

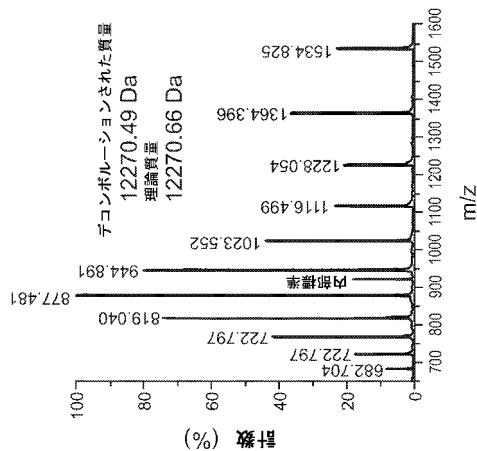
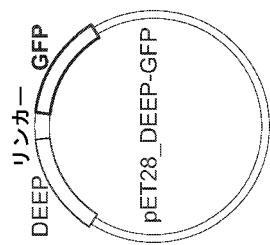


FIG. 1E

【図 2 - 1】

GSAGSAAGSG
EFSKGEELFTGVVPILEVLDGVNGHKFVSVSGEGEGLATYG
KLTIKFICITGKLIPVWPPTLVTTITYGVQOCFSKYPDHMKRH
DEEFKSAMPSEYQERTISFXDGNYKTRAEVKPEGDTLVNR
IELKGIDFKEGDNTLGHKLEYNXYSHNVYTADKOKONGIKA
NFKIRHNIEEGSVQLADHYQONTPIGDGPVLLPPDNHYLSTQ
SALSKDNPNEERDHMVLLEFTVZAGITHGMDELXK (配列番号:3)

FIG. 2A



【図 2 - 3】

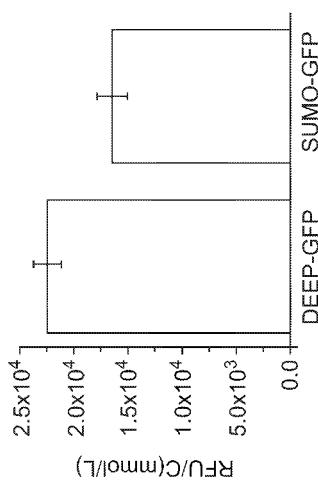


FIG. 2C

【図 2 - 2】

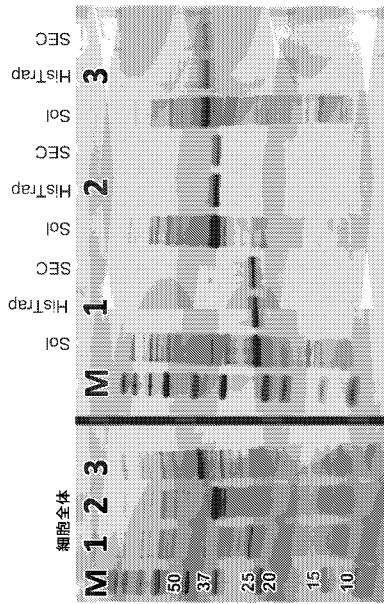


FIG. 2B

【図 3 - 1】

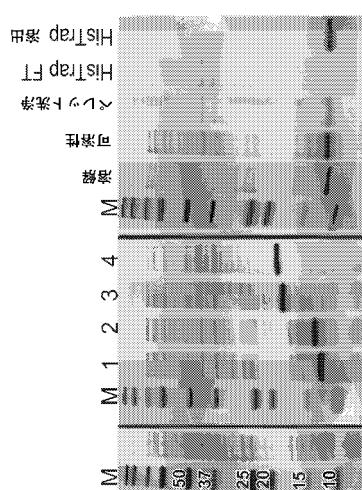


FIG. 3B

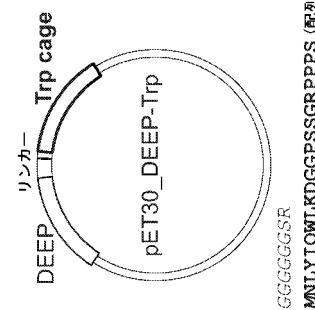


FIG. 3A

【図 3 - 2】

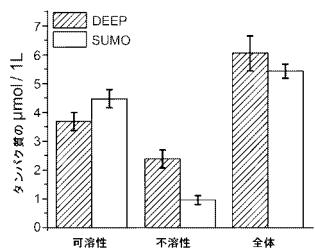


FIG. 3C

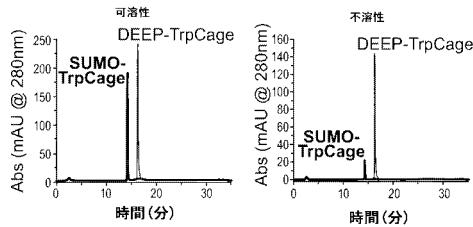


FIG. 3D

【図 4 - 2】

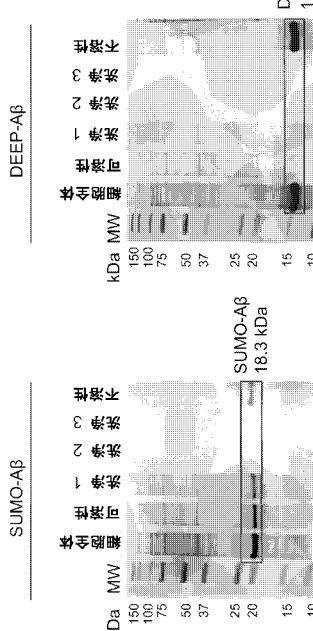


FIG. 4C

【図 4 - 1】

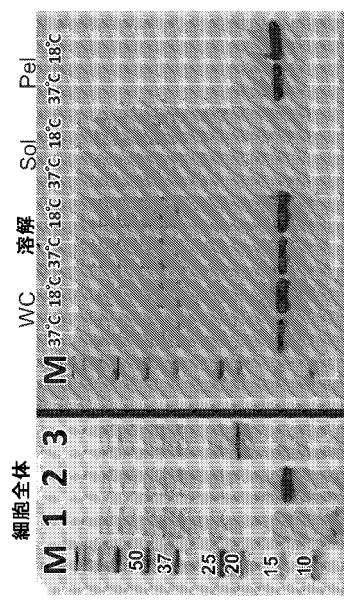


FIG. 4B

【図 5 - 1】

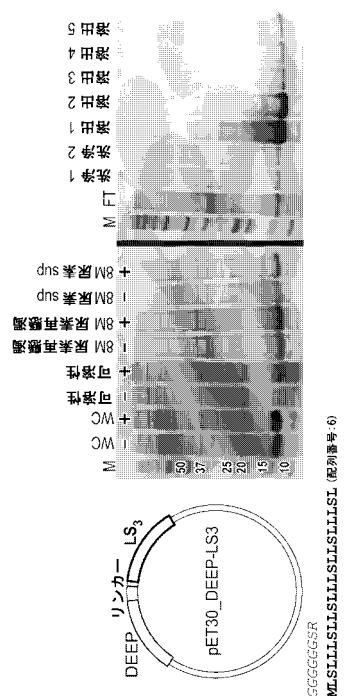


FIG. 5B

FIG. 5A

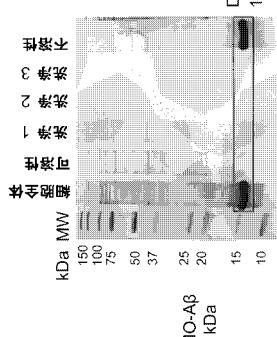
SUMO-A β DEEP-A β 

FIG. 4C

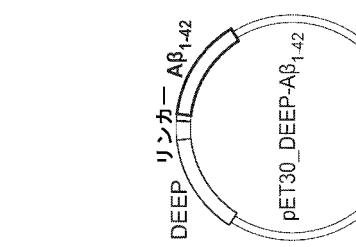


FIG. 4A

【図 5 - 2】

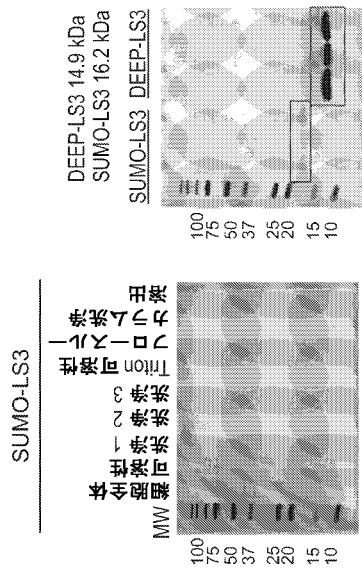
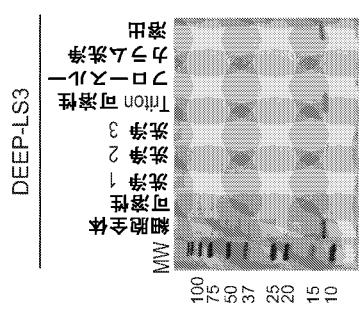


FIG. 5C



【図 6 - 2】

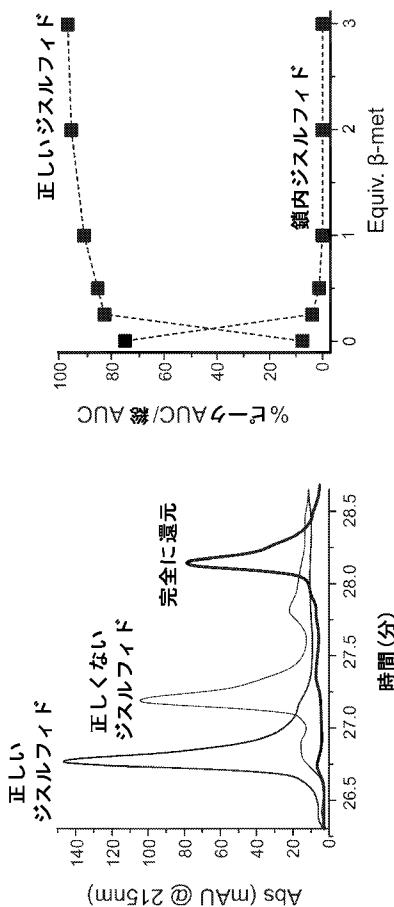


FIG. 6C

【図 6 - 1】

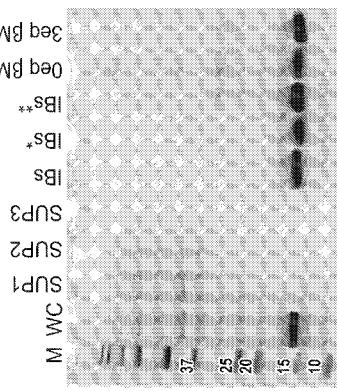


FIG. 6B

【図 6 - 3】

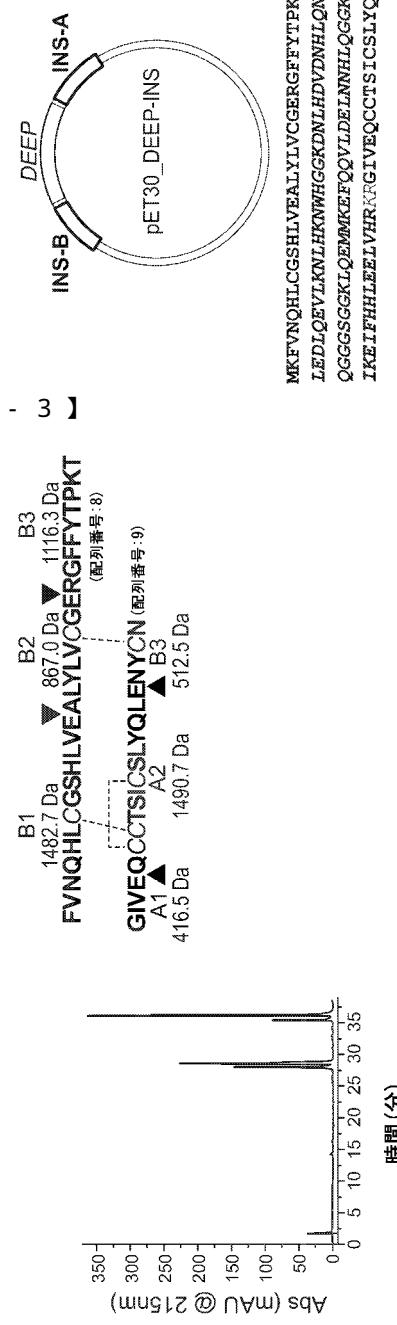


FIG. 6A

FIG. 6D

【配列表】

2020529221000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2018/044156						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/435 ADD.								
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) 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 practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"> Y. WEI ET AL: "Enzyme-like proteins from an unselected library of designed amino acid sequences", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, vol. 17, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 67-75, XP055509280, GB ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/protein/gzh007 Figure 1, Table 3, discussion. ----- -/-/ </td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"> 4-10, 12, 13, 15, 21-24, 29-38 </td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	Y. WEI ET AL: "Enzyme-like proteins from an unselected library of designed amino acid sequences", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, vol. 17, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 67-75, XP055509280, GB ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/protein/gzh007 Figure 1, Table 3, discussion. ----- -/-/	4-10, 12, 13, 15, 21-24, 29-38
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
Y	Y. WEI ET AL: "Enzyme-like proteins from an unselected library of designed amino acid sequences", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, vol. 17, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 67-75, XP055509280, GB ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/protein/gzh007 Figure 1, Table 3, discussion. ----- -/-/	4-10, 12, 13, 15, 21-24, 29-38						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family 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 application or patent 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 27 September 2018	Date of mailing of the international search report 08/10/2018							
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Gómez Ortiz, Mariola							

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2018/044156

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WEI YINAN ET AL: "Stably folded de novo proteins from a designed combinatorial library", PROTEIN SCIENCE, WILEY, US, vol. 12, no. 1, 31 December 2002 (2002-12-31), pages 92-102, XP009508244, ISSN: 0961-8368, DOI: 10.1110/PS.0228003 [retrieved on 2009-01-01] Figure 2, Table 1, Figure 7, page 96. ----- KAMTEKAR S ET AL: "PROTEIN DESIGN BY BINARY PATTERNING OF POLAR AND NONPOLAR AMINO ACIDS", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 262, no. 5140, 10 December 1993 (1993-12-10), pages 1680-1685, XP001182910, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/SCIENCE.8259512 the whole document ----- WO 2015/015518 A2 (BIOGENOMICS LTD [IN]) 5 February 2015 (2015-02-05) Examples and claims ----- AJAMALUDDIN MALIK: "Protein fusion tags for efficient expression and purification of recombinant proteins in the periplasmic space of E. coli", 3 BIOTECH, vol. 6, no. 1, 4 February 2016 (2016-02-04), XP055487226, DE ISSN: 2190-572X, DOI: 10.1007/s13205-016-0397-7 the whole document ----- KOBAYASHI NAOYA ET AL: "Design and construction of self-assembling supramolecular protein complexes using artificial and fusion proteins as nanoscale building blocks", CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, vol. 46, 1 February 2017 (2017-02-01), pages 57-65, XP085146958, ISSN: 0958-1669, DOI: 10.1016/J.COPBIO.2017.01.001 -----	4-10, 12, 13, 15, 21-24, 29-38 4-10, 12, 13, 15, 21-24, 29-38 1-52 1-3, 16-20, 25-28 4-10, 12, 13, 15, 21-24, 29-38 1-52

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2018/044156

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015015518 A2	05-02-2015	EP 3027645 A2 SG 11201600684X A US 2016168226 A1 WO 2015015518 A2	08-06-2016 26-02-2016 16-06-2016 05-02-2015

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 14/62 (2006.01)	C 0 7 K 14/62	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,C1,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON

(72)発明者 ヘクト,マイケル

アメリカ合衆国 ニュージャージー 08540 プリンストン,ロス スティーブンソン サークル 212

(72)発明者 ザージトスキー,シュロモ

アメリカ合衆国 ニュージャージー 08852 サウス ブレンズウィック,エルム シーティー.7333

F ターム(参考) 4B064 AG01 AG16 CA19 CC24 DA01

4B065 AA01X AA26X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 BD04 BD15 BD18

BD46 CA24 CA44

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 DA37 EA20 EA27 FA72 FA74

GA01 GA06 GA15 GA26