

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7386552号
(P7386552)

(45)発行日 令和5年11月27日(2023.11.27)

(24)登録日 令和5年11月16日(2023.11.16)

(51)国際特許分類

C 1 2 Q	1/37 (2006.01)	F I	C 1 2 Q	1/37	Z N A
C 4 0 B	40/08 (2006.01)		C 4 0 B	40/08	
C 1 2 N	9/50 (2006.01)		C 1 2 N	9/50	
C 1 2 N	15/10 (2006.01)		C 1 2 N	15/10	2 0 0 Z
C 0 7 K	19/00 (2006.01)		C 0 7 K	19/00	

請求項の数 37 (全37頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-520425(P2021-520425)
(86)(22)出願日	平成31年1月11日(2019.1.11)
(65)公表番号	特表2022-502070(P2022-502070)
	A)
(43)公表日	令和4年1月11日(2022.1.11)
(86)国際出願番号	PCT/CN2019/071417
(87)国際公開番号	WO2020/073553
(87)国際公開日	令和2年4月16日(2020.4.16)
審査請求日	令和3年4月13日(2021.4.13)
(31)優先権主張番号	201811177105.9
(32)優先日	平成30年10月10日(2018.10.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)
(31)優先権主張番号	201811540344.6
(32)優先日	平成30年12月17日(2018.12.17)
	最終頁に続く

(73)特許権者	521148658
	上饒市康可得生物科技有限公司
	S H A N G R A O C O N C O R D P H
	A R M A C E U T I C A L C O . , L
	T D .
	中華人民共和国 334000 江西省上饒
	市上饒經濟技術開發區管委會登峰大廈 1
	802 室
	R o o m 1 8 0 2 , D e n g f e n g
	B u i l d i n g , M a n a g e m e
	n t C o m m i t t e e o f S h a
	n g r a o E c o n o m i c D e v e
	l o p m e n t Z o n e , S h a
	r a o , J i a n g x i 3 3 4 0 0 0
	, C h i n a

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 プロテアーゼバリアントのスクリーニング方法および得られたプロテアーゼバリアント

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

(1) プロテアーゼランダム変異ライブラリーを構築する工程；および

(2) 該プロテアーゼランダム変異ライブラリーについて、宿主内でプロテアーゼの酵素切断活性が最初の (initial) プロテアーゼよりも低く、且つ生体外変性条件下でプロテアーゼの酵素切断活性を有するプロテアーゼバリアントをスクリーニングする工程；を含み、

該最初のプロテアーゼは、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を有する S 2 1 9 V T E V プロテアーゼ、または配列番号 17 に示される G e n B a n k a c c e s s i o n N o . A A B 4 0 0 2 6 . 1 のアミノ酸配列を有するエンテロキナーゼであり、

10

該生体外変性条件は 3 M ~ 5 M の尿素または 1 M ~ 2 M のグアニジン塩酸塩であり、

該プロテアーゼバリアントは、T E V プロテアーゼバリアントまたはエンテロキナーゼバリアントである、

プロテアーゼバリアントのスクリーニング方法。

【請求項2】

該プロテアーゼランダム変異ライブラリーがプロテアーゼランダム変異ウイルスライブラリーである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

該プロテアーゼランダム変異ライブラリーがプロテアーゼランダム変異ファージライブラリーである、請求項2に記載の方法。

20

【請求項 4】

該プロテアーゼバリアントを同定する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

ランダム突然変異誘発キットで該変異ライブラリーを生成することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

工程(1)において、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を有する S 2 1 9 V T E V プロテアーゼをテンプレートとして、ランダム変異を行い、該ライブラリーを構築する、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

該プロテアーゼバリアントが、宿主内で該最初のプロテアーゼよりも低い酵素切断活性を有し、且つ該生体外変性条件下で該最初のプロテアーゼの酵素切断活性を保持する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

該 T E V プロテアーゼバリアントが、宿主内で配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を有する S 2 1 9 V T E V プロテアーゼよりも低い酵素切断活性を有し、且つ該生体外変性条件下で配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を有する S 2 1 9 V T E V プロテアーゼの酵素切断活性を保持する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

該プロテアーゼバリアントが、プロテアーゼ - プロテアーゼ切断配列 - Y 1 を含む融合タンパク質として提示され、

Y 1 は標的タンパク質である、

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

該プロテアーゼ - プロテアーゼ切断配列 - Y 1 が T E V p - s T E V - Y 1 であり、

プロテアーゼバリアントが T E V プロテアーゼバリアントであり、

ここで、

T E V p は T E V プロテアーゼであり、

s T E V は T E V プロテアーゼの切断配列であり、

Y 1 は標的タンパク質であり、

該 T E V プロテアーゼの切断配列は E X X Y X Q G 、 E X X Y X Q S 、または E X X Y X Q H であり、

X は任意のアミノ酸残基である、

請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

該 T E V プロテアーゼの切断配列が配列番号 7 および 8 から選択される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

該プロテアーゼバリアントが、ファージの表面に提示される、請求項 9 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

宿主内で、該プロテアーゼバリアントの N 末端に、直接的、またはリンカーを介して間接的に部分 A を付加することを含み、

該部分 A は、親和性タグ、ビオチン、抗体、抗原、ハプテン、ストレプトアビシン、リガンド、受容体、核酸、酵素、基質およびアブタマーのうちの 1 つである、

請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

該プロテアーゼバリアントが T E V プロテアーゼバリアントである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

3 M ~ 5 M の尿素または 1 M ~ 2 M のグアニジン塩酸塩の条件下で、該部分 A に特異的な部分 B を固定化した固体支持体とともに、該部分 A を付加したファージライブリーを一定期間インキュベートし、および、標的ファージを含む溶液と固体支持体とを分離することを含み、

該部分 B は該部分 A に特異的に結合するという条件で、該部分 A は親和性タグ、ビオチン、抗体、抗原、ハプテン、ストレプトアビシン、リガンド、受容体、核酸、酵素、基質およびアブタマーのうちの 1 つであり、かつ、該部分 B が、ビオチン、抗体、抗原、ハプテン、ストレプトアビシン、リガンド、受容体、核酸、酵素、基質およびアブタマーのうちの 1 つである。

請求項 13 または 14 に記載の方法。 10

【請求項 16】

該標的ファージのスクリーニングが 1 回以上繰り返される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

該プロテアーゼが、A v i - プロテアーゼ - プロテアーゼ切断部位 - Y 1 - P I I I 構築物を介して、ファージ P I I I タンパク質の末端に提示され、

A v i タグは 15 個のアミノ酸残基 G L N D I F E A Q K I E W H E からなる短いペプチドタグである、

請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

該構築物が p H E N 1 - A v i - T E V p - s T E V - Y 1 であり、該 T E V プロテアーゼが A v i - T E V p - s T E V - Y 1 - P I I I として提示される、請求項 17 に記載の方法。 20

【請求項 19】

該 T E V プロテアーゼの切断配列が E X X Y X Q G 、 E X X Y X Q S 、または E X X Y X Q H であり、X は任意のアミノ酸残基である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

該 T E V プロテアーゼの切断配列が配列番号 7 および 8 から選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

該酵素切断活性が、該プロテアーゼおよびその切断配列を含む融合タンパク質に対して測定されるものである、請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載の方法。 30

【請求項 22】

該酵素切断活性がプロテアーゼ - プロテアーゼ切断配列 - Y 1 を含む融合タンパク質に対して測定されるものである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

該酵素切断活性が該 T E V プロテアーゼバリアントおよびその切断配列を含む融合タンパク質に対して測定されるものである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

該酵素切断活性が T E V p - s T E V - Y 1 を含む融合タンパク質に対して測定されるものである、請求項 23 に記載の方法。 40

【請求項 25】

該スクリーニングが、宿主内で該プロテアーゼランダム変異ファージライブリーをビオチン化することを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 26】

該プロテアーゼランダム変異ファージライブリーが T E V プロテアーゼランダム変異ファージライブリーである請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

該スクリーニングが、該ビオチン化されたファージライブリーをストレプトアビシン磁気ビーズで処理し、該磁気ビーズによって捕捉されたファージを 3 M ~ 5 M の尿素中で一定期間インキュベートし、標的ファージを含む溶液から該磁気ビーズを分離することを

10

20

30

40

50

含む、請求項 2 5 または 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

該標的ファージのスクリーニングを 1 回以上繰り返す、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

該ライブラリーが、コロニー P C R によって検証される、請求項 1 ~ 2 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 0】

該コロニー P C R に使用されるプライマーが、

フォワードプライマー：5' - C C A C C A T G G C C G G T C T G A A T G A T A T T
T T T G A A G C - 3' ;

リバースプライマー：5' - T T G T T C T G C G G C C G C A A A T T C C A G C - 3'
である請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

ライブラリーの容量が 1×10^9 以上である、該請求項 1 ~ 3 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 2】

ライブラリーの容量が最大 2×10^9 である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

全体の変異頻度は 1 . 5 ~ 7 個 / k b の中 / 低程度である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

Y 1 がヒトまたはブタの A C T H または G L P - 1 である、請求項 9 ~ 1 2 、 1 7 ~ 2 0 および 2 2 ~ 2 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 5】

該宿主が大腸菌である、請求項 1 ~ 3 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 6】

該生体外変性条件が 3 . 5 M ~ 4 . 5 M の尿素または 1 . 5 M のグアニジン塩酸塩の条件である、請求項 1 ~ 3 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 7】

該生体外変性条件が 4 M の尿素である、請求項 1 ~ 3 6 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

< 関連出願への相互参照 >

本出願は、2018年10月10日に出願された、発明の名称が「T E V プロテアーゼバリアント、その融合タンパク質、調製方法および使用」である、出願番号が C N 2 0 1 8 1 1 1 7 7 1 0 5 . 9 である中国特許出願と、2018年12月17日に出願された、発明の名称が「プロテアーゼバリアントのスクリーニング方法および得られたプロテアーゼバリアント」である、出願番号が C N 2 0 1 8 1 1 5 4 0 3 4 4 . 6 である中国特許出願との優先権を主張するものであり、それらの全体を参照により本出願の一部をなすものとして引用する。

【0 0 0 2】

< 技術分野 >

本発明は、タンパク質分野に関し、具体的に、プロテアーゼバリアントのスクリーニング方法および T E V プロテアーゼバリアントに関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

T E V プロテアーゼ (T E V P r o t e a s e) は、タバコエッチウイルス (T E V) N 1 a プロテアーゼに由来する 2 7 k D a の活性ドメインであり、そのアミノ酸配列は配列番号 1 に示される。T E V プロテアーゼは、強い部位特異性を持ち、E X X Y X Q (G / S) 7 アミノ酸配列を認識できる。最も一般的な配列は、グルタミン G l n (P 1)

10

20

30

40

50

とグリシン G l y (P 1 ')との間(即ち、P 1 と P 1 'との間)に制限部位を有する G 1 u - A s n - L e u - T y r - P h e - G l n - G l y (または E N L Y F Q G)である。T E V プロテアーゼの配列特異性は、トロンビン、第 X a 因子、およびエンテロキナーゼなどのプロテアーゼの配列特異性よりもはるかに高い。

【 0 0 0 4 】

T E V プロテアーゼは、広い範囲の pH (pH 4 ~ 8 . 5) および温度 (4 ~ 3 4) に耐えられ、タンパク質の溶解性または安定性を増加させる一般的な添加剤 (エチレングリコール、E G T A 、洗剤および還元剤) に対してある程度の耐性がある。T E V プロテアーゼがエチレングリコール、E G T A および一部の洗剤 (T r i t o n X - 1 0 0 、 T w e e n - 2 0 、およびN P - 4 0) に対して感受性がないことを示す研究がある。1 % の C H A P S の存在下では、活性が低下し、低濃度の変性剤 (2 M の尿素、1 % の S D S) および還元剤 (0 . 7 M の - メルカプトエタノール) の存在下でも、ほとんどの活性を維持することができる (C . S u n l a , 2 0 1 2) 。

【 0 0 0 5 】

野生型 T E V 酵素は、発現や溶解性などに一定の欠陥があるため、遺伝子工学技術によって改良された変異体に関する報告が多数ある。例えば、天然の T E V プロテアーゼでは、自己切断が起こる。発現および精製のプロセスにおいて、T E V プロテアーゼは、他の T E V プロテアーゼとの衝突によって、コンフォメーション変化を起こし続け、特定の部位で自己切断することで、完全なプロテアーゼは切断され、その活性が大幅に低下する。L u c a s t らによって発見された S 2 1 9 N 変異体は、安定性が大幅に改善されたが、溶解度は高くなく、タンパク質の約 9 5 % が封入体として沈殿物に存在する。K a p u s t らは、遺伝子工学を用いて天然の T E V プロテアーゼの遺伝子配列に点突然変異を行ったことで、安定性が高く、酵素活性がわずかに向上した変異体 S 2 1 9 V を得た。その安定性は S 2 1 9 N の約 1 0 0 倍高かった。さらに、T E V プロテアーゼの発現収率は高くなく、溶解度も非常に低い。T E V プロテアーゼの約 5 % のみは、細胞破碎液の上清中に存在し、収量は 1 2 . 5 m g / L であった。V a n d e n B e r g らは、D N A シャッフリング (D N A s h u f f l i n g) 、エラープローン P C R (e r r o r - p r o n e P C R) により、収量を 5 4 m g / L まで増加させることができる変異体 T E V S H を発見した。その溶解度は S 2 1 9 N よりもはるかに高いが、酵素活性の変化はほとんど見られなかった。C a b r i t a , L . D . らは、P o P M u S i C ソフトウェアによる設計を利用して T E V プロテアーゼのシングルポイント変異体 (s i n g l e - p o i n t m u t a n t) の安定性を解析し、野生型 T E V プロテアーゼと比べ、溶解度と酵素活性がともに改善された 5 つの変異体をスクリーニングし、同時に、シングルポイント変異体と比べ、溶解度と酵素活性が大幅に改善された二重変異体 (d o u b l e m u t a n t) を得た。T E V プロテアーゼ自体の欠点を考慮して、研究者は改良された変異体を検討している。例えば、T E V S e r 1 3 5 G l y 変異体は、W T よりも安定であり、より高い温度 (> 4 0) に耐えることができる。また、T E V プロテアーゼの溶解度を大幅に増加させることができる変異 (T 1 7 S 、 N 6 8 D 、 N 1 7 7 V) も存在する。

【 0 0 0 6 】

現在、T E V プロテアーゼのスクリーニング方法は、主に、酵素活性、溶解性、および収量などの T E V プロテアーゼの特性を改善することに注目している。本発明の T E V プロテアーゼのスクリーニング方法はまだ報告されていない。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 7 】

本発明は、少なくとも部分的に、ポリペプチド薬物の調製における本発明者らの発見に基づいており、即ち、従来の T E V プロテアーゼは、発現過程で大量の融合タンパク質を切断(自己切断)してしまい、その結果、ポリペプチドが早期放出され、細胞内でプロテアーゼによって加水分解されやすくなるため、精製に不利であり、工業的な生産に適しないという問題があった。従来の T E V プロテアーゼは、低濃度の変性剤 (2 M 尿素、1 % S D S) でその活性をほとんど維持することができる (C . S u n e t a l . , 2 0 1 1) 。

10

20

30

40

50

2)が、多くのタンパク質は2M尿素などの低濃度変性条件下では完全に溶解できないため、TEVプロテアーゼの使用が制限されている。これに関して、本発明者らは、この問題の解決に適するTEVプロテアーゼバリエントを探すために、以下の新しいスクリーニング方法を提供した。

【0008】

本発明は、以下の工程(1)～(3)を含むプロテアーゼバリエントのスクリーニング方法を提供する。

(1) プロテアーゼランダム変異ライブラリー、好ましくはプロテアーゼランダム変異ウイルスライブラリー、好ましくはプロテアーゼランダム変異ファージライブラリーを構築する工程；

(2) 前記のプロテアーゼランダム変異ライブラリー、好ましくはプロテアーゼランダム変異ウイルスライブラリー、好ましくはプロテアーゼランダム変異ファージライブラリーについて、宿主内または同様の条件下でプロテアーゼの酵素切断活性が弱く、且つ生体外変性条件下でプロテアーゼの酵素切断活性を有するプロテアーゼバリエントをスクリーニングする工程；および

(3) 必要に応じて、プロテアーゼバリエントを同定する工程；

ここで、前記のプロテアーゼは、好ましくは、TEVプロテアーゼまたはエンテロキナーゼである。

【0009】

一実施形態において、方法は、ランダム突然変異誘発キットで前記の変異ライブラリーを生成することをさらに含む。

【0010】

一実施形態において、工程(1)では、例えばTEVプロテアーゼテンプレート(例えば配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するS219V TEVプロテアーゼ)のような適切なプロテアーゼテンプレートをテンプレートとして、ランダム変異を行い、前記のライブラリーを構築する。

【0011】

一実施形態において、プロテアーゼバリエントは、宿主内または同様の条件下で、最初のプロテアーゼよりも低い酵素切断活性を有し、且つ生体外変性条件下で最初のプロテアーゼの酵素切断活性を保持する。

【0012】

一実施形態において、TEVプロテアーゼバリエントは、宿主内または同様の条件下で、配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するS219Vプロテアーゼよりも低い酵素切断活性を有し、且つ生体外変性条件下で配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するS219Vプロテアーゼの酵素切断活性を保持する。

【0013】

一実施形態において、プロテアーゼバリエント、好ましくはTEVプロテアーゼバリエントは、プロテアーゼ-プロテアーゼ切断配列-Y1(例えばTEVp-sTEV-Y1)を含む融合タンパク質として提示され；プロテアーゼバリエント、好ましくはTEVプロテアーゼバリエントは、ファージの表面に提示されることが好ましく；ここで、TEVpはTEVプロテアーゼであり、sTEVはTEVプロテアーゼの切断配列であり、Y1は標的タンパク質であり；好ましくは、前記のTEVプロテアーゼの切断配列はEXXYXQG/S/Hであり、ここで、Xが任意のアミノ酸残基であり、好ましくは、前記のTEVプロテアーゼの切断配列が配列番号7および8から選択される。

【0014】

一実施形態において、方法は、宿主内で前記のプロテアーゼバリエント、好ましくはTEVプロテアーゼバリエントのN末端に、直接的、またはリンカーを介して間接的に部分Aを付加することを含む。

【0015】

一実施形態において、部分Aは、親和性タグ、ビオチン、抗体、抗原、ハプテン、ポリ

10

20

30

40

50

ストレプトアビジン、リガンド、受容体、核酸、酵素、基質およびアプタマーのうちの1つである。

【0016】

一実施形態において、方法は、前記のプロテアーゼに適した生体外条件下で、部位Aに特異的な部位Bを固定化した固体支持体とともに、部分Aを付加したファージライプラリーを一定期間インキュベートし、標的ファージを含む溶液と支持体とを分離することを含み、必要に応じて、前記の標的ファージのスクリーニングを1回以上繰り返す。

【0017】

一実施形態において、部分Bが部分Aに特異的に結合するという条件で、部分Bは、ビオチン、抗体、抗原、ハプテン、ポリストレプトアビジン、リガンド、受容体、核酸、酵素、基質およびアプタマーのうちの1つである。

10

【0018】

一実施形態において、プロテアーゼ、好ましくはTEVプロテアーゼは、Avi-プロテアーゼ-プロテアーゼ切断部位-Y1-P1II、好ましくはpHEN1-Avi-TEVp-sTEV-Y1構築物を介してAvi-TEVp-sTEV-Y1-P1IIとして、ファージP1IIタンパク質の末端に提示され、ここで、Aviタグが15個のアミノ酸残基GLNDIFEAQKIEWHからなる短いペプチドタグであり；好ましくは、前記のTEVプロテアーゼの切断配列がEXXYXQG/S/Hであり、ここで、Xが任意のアミノ酸残基であり、好ましくは、前記のTEVプロテアーゼの切断配列が配列番号7および8から選択される。

20

【0019】

一実施形態において、酵素切断活性は、前記のプロテアーゼおよびその切断配列（例えばプロテアーゼ-プロテアーゼ切断配列-Y1）を含む融合タンパク質、好ましくは前記のTEVプロテアーゼバリエントおよびその切断配列を含む融合タンパク質、好ましくはTEVp-sTEV-Y1に対して測定されるものである。

【0020】

一実施形態において、スクリーニングは、宿主内で前記のプロテアーゼ、好ましくはTEVプロテアーゼランダム変異ファージライプラリーをビオチン化することを含む。

【0021】

一実施形態において、スクリーニングは、ビオチン化されたファージライプラリーをストレプトアビジン磁気ビーズで処理し、磁気ビーズによって捕捉されたファージを中／高濃度の尿素中で一定期間インキュベートし、標的ファージを含む溶液から磁気ビーズを分離することを含み、必要に応じて、前記の標的ファージのスクリーニングを1回以上繰り返す。

30

【0022】

一実施形態において、前記のライプラリーは、コロニーPCRによって検証される。一実施形態において、前記のコロニーPCRに使用されるプライマーは次の通りである。

フォワードプライマー：5' - C C A C C A T G G C C G G T C T G A A T G A T A T T
T T T G A A G C - 3'

リバースプライマー：5' - T T G T T C T G C G G C C G C A A A T T C C A G C - 3' 40

【0023】

一実施形態において、ライプラリーの容量は 1×10^9 以上、好ましくは 2×10^9 であり；好ましくは、全体の変異頻度は1.5～7個/kbの中／低程度である。

【0024】

一実施形態において、Y1はヒトまたはブタのACTHまたはGLP-1である。一実施形態において、前記の宿主は大腸菌である。

【0025】

一実施形態において、生体外変性条件は中／高程度の変性条件であり、好ましくは3M～5Mの尿素、好ましくは3.5M～4.5Mの尿素、より好ましくは4Mの尿素または1M～2Mのグアニジン塩酸塩、好ましくは1.5Mのグアニジン塩酸塩の条件である。

50

【0026】

本発明は、本発明の方法によって得られるプロテアーゼバリアントを提供する。一実施形態において、前記のプロテアーゼバリアントは、宿主での発現において低い酵素切断活性を有し、好ましくは、前記のTEVプロテアーゼバリアントは、配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するS219Vバリアントよりも低い酵素切断活性を有し、前記のTEVプロテアーゼバリアントの切断配列はEXXYXQG/S/Hから選択され、ここで、Xが任意のアミノ酸残基であり、好ましくは、前記のTEVプロテアーゼの切断配列は、配列番号7および8から選択され；好ましくは、前記のプロテアーゼバリアントまたはTEVプロテアーゼバリアントは、中／高程度の変性条件下、好ましくは3M～5Mの尿素、好ましくは3.5M～4.5Mの尿素、より好ましくは4Mの尿素または1M～2Mのグアニジン塩酸塩、好ましくは1.5Mのグアニジン塩酸塩の生体外環境下で、最初のプロテアーゼ（例えばS219Vプロテアーゼ）の生体外酵素切断活性を保持し；好ましくは、前記の酵素切断活性は、前記のプロテアーゼバリアントおよびその切断配列（例えばプロテアーゼ-プロテアーゼ切断配列-Y1）を含む融合タンパク質、好ましくは前記のTEVプロテアーゼバリアントおよびその切断配列を含む融合タンパク質に対して測定されるものであり、好ましくは、前記のTEVプロテアーゼの切断配列がEXXYXQG/S/Hであり、ここで、Xが任意のアミノ酸残基であり、好ましくは、前記のTEVプロテアーゼの切断配列が配列番号7および8から選択される。

10

【0027】

一実施形態では、TEVプロテアーゼバリアントは、以下の変異からなる群から選択される1つまたは複数の変異を含んでも良い。

20

配列番号1に示される配列の第111位に対応する位置でのロイシン(L)からフェニルアラニン(F)またはヒスチジン(H)への変異；

配列番号1に示される配列の第138位に対応する位置でのイソロイシン(I)からリジン(K)への変異；

配列番号1に示される配列の第28位に対応する位置でのヒスチジン(H)からロイシン(L)への変異；

配列番号1に示される配列の第196位に対応する位置でのグルタミン酸(Q)からヒスチジン(H)への変異；

配列番号1に示される配列の第135位に対応する位置でのセリン(S)からグリシン(G)への変異；および

30

配列番号1に示される配列の第187位に対応する位置でのメチオニン(M)からイソロイシン(I)への変異。

【0028】

好ましくは、前記のTEVプロテアーゼバリアントは、以下の変異からなる群から選択される変異の組合せを含む。

配列番号1に示される配列の第111位に対応する位置でのロイシン(L)からフェニルアラニン(F)への変異、および配列番号1に示される配列の第138位に対応する位置でのイソロイシン(I)からリジン(K)への変異；

配列番号1に示される配列の第28位に対応する位置でのヒスチジン(H)からロイシン(L)への変異、配列番号1に示される配列の第111位に対応する位置でのロイシン(L)からフェニルアラニン(F)への変異、および配列番号1に示される配列の第196位に対応する位置でのグルタミン酸(Q)からヒスチジン(H)への変異；ならびに

40

配列番号1に示される配列の第111位に対応する位置でのロイシン(L)からヒスチジン(H)への変異、配列番号1に示される配列の第135位に対応する位置でのセリン(S)からグリシン(G)への変異、および配列番号1に示される配列の第187位に対応する位置でのメチオニン(M)からイソロイシン(I)への変異；

好ましくは、前記のTEVプロテアーゼバリアントは、配列番号1に示される配列の第219位に対応する位置でのセリン(S)からバリン(V)への変異を含み；

好ましくは、前記のTEVプロテアーゼバリアントは、宿主での発現において低い酵素

50

切断活性を有し、好ましくは配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を有する S 2 1 9 V バリアントよりも低い酵素切断活性を有すること、および / または前記の T E V プロテアーゼバリアントは、中 / 高程度の変性条件下で、好ましくは 3 M ~ 5 M の尿素、好ましくは 3 . 5 M ~ 4 . 5 M の尿素、より好ましくは 4 M の尿素または 1 M ~ 2 M のグアニジン塩酸塩、好ましくは 1 . 5 M のグアニジン塩酸塩の生体外環境下で、高い酵素切断活性を有し、好ましくは S 2 1 9 V バリアントの生体外酵素切断活性を保持することという条件下で、前記の T E V プロテアーゼバリアントは、上記の変異以外の 1 つまたは複数の変異をさらにを含む。

【 0 0 2 9 】

一実施形態では、相同体 (homologue) は、配列番号 4 、 5 または 6 と少なくとも 90 % 、好ましくは少なくとも 95 % 、より好ましくは少なくとも 98 % 、最も好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；好ましくは、配列番号 4 、 5 または 6 と比較して、少なくとも 1 個、好ましくは少なくとも 2 個、より好ましくは少なくとも 3 個、最も好ましくは少なくとも 4 個のアミノ酸部位の置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含み；好ましくは、前記の相同体は、宿主での発現において低い酵素切断活性を有し、好ましくは配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を有する S 2 1 9 V バリアントよりも低い切断活性を有し、および / または前記の T E V プロテアーゼバリアントは、中 / 高程度の変性条件下で、好ましくは 3 M ~ 5 M の尿素、好ましくは 3 . 5 M ~ 4 . 5 M の尿素、より好ましくは 4 M の尿素または 1 M ~ 2 M のグアニジン塩酸塩、好ましくは 1 . 5 M のグアニジン塩酸塩の生体外環境下で、 S 2 1 9 V バリアントの生体外酵素切断活性を保持する。

【 0 0 3 0 】

本発明は、融合タンパク質を提供する。融合タンパク質は、本発明によるプロテアーゼバリアントを含み；好ましくは、前記の融合タンパク質は、プロテアーゼ - プロテアーゼ切斷配列 - Y 1 、好ましくは T E V p - s T E V - Y 1 の構造を含み、ここで、 Y 1 は、標的ポリペプチドであり； T E V p は、本発明による T E V プロテアーゼバリアントであり； s T E V は、 T E V プロテアーゼの切斷配列である E X X Y X Q G / S / H であり、 X が任意のアミノ酸残基であり、好ましくは、前記の切斷配列が配列番号 7 および 8 から選択され；好ましくは、標的ポリペプチドは、 A C T H 、 G L P - 1 / G L P - 2 、 I F N - 、 I F N - 、 H i s t a t i n 、 C C L 5 、 S D F - 1 、 I G F - 1 、 L e p t i n 、 B N P 、 E x - 4 からなる群から選択され、好ましくは A C T H であり、好ましくはヒト A C T H であり、より好ましくは配列番号 2 に示されるアミノ酸配列のヒト A C T H であり；好ましくは、プロテアーゼバリアント（例えば T E V p ）がプロテアーゼバリアント切斷配列（例えば s T E V ）を認識して切斷することができるという条件下で、プロテアーゼバリアントおよびプロテアーゼバリアント切斷配列（例えば T E V p および s T E V ）は、直接接続され、または 1 つまたは複数のアミノ酸残基を介して接続され；好ましくは、プロテアーゼバリアント（例えば T E V p ）がプロテアーゼバリアント切斷配列（例えば s T E V ）を認識して切斷することができるという条件下で、プロテアーゼバリアント切斷配列（例えば s T E V ）および Y 1 は、直接接続され、または 1 つまたは複数のアミノ酸残基を介して接続され、好ましくは、プロテアーゼバリアント切斷配列（例えば s T E V ）および Y 1 は、直接接続され；好ましくは、前記の融合タンパク質は、タグをさらに含み、好ましくは、前記のタグは、精製タグであり；好ましくは、前記のタグは、 H i s タグ、マルトース結合タンパク質 (M B P) タグ、グルタチオン S - トランスフェラーゼ (G S T) タグ、 N u s A タグ、 S U M O タグ、 A v i タグ、 T 7 タグ、 S タグ、 F l a g タグ、 H A タグ、 c - m y c タグ、または S t r e p I I タグからなる群から選択され；好ましくは、前記のタグは、融合タンパク質の N 末端および / または C 末端にあり、或いは T E V p の N 末端にタグはない。

【 0 0 3 1 】

本発明は、プロテアーゼバリアントまたは融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を提供する。好ましくは、前記のポリヌクレオチド配列は配列番号 14 ~ 16 から

10

20

30

40

50

選択される。

【 0 0 3 2 】

本発明は、本発明によるポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド構築物を提供する。

【 0 0 3 3 】

本発明は、本発明によるポリヌクレオチド配列、または本発明のポリヌクレオチド構築物を含む発現ベクターを提供し；好ましくは、前記の発現ベクターは、真核生物発現ベクター、または原核生物発現ベクターであり；好ましくは、p R S 3 1 4、p Y E S 2、バキュロウイルス - S 2 発現系および p c D N A 3 . 1 からなる群から選択され、或いは好ましくは、p E T 系発現ベクター、p Q E 系発現ベクターおよび p B A D 系発現ベクターからなる群から選択される。

10

【 0 0 3 4 】

本発明は、本発明によるポリヌクレオチド配列、本発明によるポリヌクレオチド構築物、または本発明による発現ベクターを含む細胞を提供し；好ましくは、真核細胞または原核細胞であり；好ましくは、前記の真核細胞は、サッカロマイセス・セレビシエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e)、昆虫細胞発現系からなる群から選択され；好ましくは、前記の原核細胞は、B L 2 1、B L 2 1 (D E 3)、B L 2 1 (D E 3) p L y s S、R o s e t t a 2、R o s e t t a 2 p L y s S、T u n e r (D E 3)、またはO r i g a m i 2 からなる群から選択される。

20

【 0 0 3 5 】

本発明は、以下の(1)～(3)を含む、本発明によるプロテアーゼバリアント、好ましくはT E V プロテアーゼバリアントの調製方法を提供する。

- (1) 本発明の細胞の培養に適した条件下で、培地中で前記の細胞を培養する。
- (2) 培地を回収するか、または細胞を溶解して、ライセートを回収する。
- (3) 精製して前記のプロテアーゼバリアント、好ましくはT E V プロテアーゼバリアントを得る。

30

【 0 0 3 6 】

本発明は、標的ポリペプチドの調製における、本発明によるプロテアーゼバリアント、好ましくはT E V プロテアーゼバリアントの使用を提供し、ここで、前記のプロテアーゼバリアント、好ましくはT E V プロテアーゼバリアントおよび前記の標的ポリペプチドが、融合タンパク質として発現され；好ましくは、前記の融合タンパク質は、本発明の融合タンパク質である。

30

【 0 0 3 7 】

本発明は、以下の(1)～(7)を含む標的ポリペプチドの調製方法を提供する。

- (1) 本発明の融合タンパク質を適當な条件下で培地中で培養する。
- (2) 融合タンパク質の封入体を得る。
- (3) 約8Mの尿素または約6Mのグアニジン塩酸塩のような高変性条件下で、封入体を溶解する。

(4) 中／高程度変性条件下、好ましくは3M～5M尿素、好ましくは3.5M～4.5M尿素、より好ましくは4M尿素または1M～2Mグアニジン塩酸塩、好ましくは1.5Mグアニジン塩酸塩の条件下で、一定の温度、例えば20～40、好ましくは25で、例えば10～24時間、例えば12時間インキュベートする。

40

(5) 緩衝液、例えばT r i s - H C l、好ましくは50mMのT r i s - H C lで希釈した後、プロテアーゼバリアント、好ましくはT E V プロテアーゼを沈殿させる。

(6) プロテアーゼバリアント、好ましくはT E V プロテアーゼの沈殿物を遠心分離で除去し、前記の標的ポリペプチドを得る。

(7) 前記の標的ポリペプチドを精製し；好ましいは、前記の精製は、塩析、限外濾過、有機溶媒沈殿、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーカラム、逆相高速液体クロマトグラフィーからなる群から選択される技術によって実施される。

【 0 0 3 8 】

50

本発明のスクリーニング方法を通じて、発明者らは、新規の T E V プロテアーゼバリアント 4 D、12 D および 32 C を得た。これは、本発明の方法を使用することによって、宿主内で T E V プロテアーゼの酵素切断活性が弱く、且つ生体外変性条件下で T E V プロテアーゼ酵素切断活性を有する T E V プロテアーゼバリアントを得ることができる。さらに、T E V プロテアーゼ認識配列 E X X Y X Q H を使用してスクリーニングを行うと、E N L Y F Q H を効率的に切断する T E V プロテアーゼ変異体も得られる。このような変異体は、N 末端がヒスチジンで始まる多くのポリペプチドの場合、望ましいものである。

1. 本発明の T E V プロテアーゼバリアントは、天然の N 末端を有する様々なポリペプチドまたはタンパク質を产生するために広く使用される。

2. 本発明の T E V プロテアーゼバリアントは、スクリーニングにより得られるが、直接得られた変異体は、要件を満たすことができないか、または部分的に要件を満たす。一連の変異点の組み合わせにより、さらに改善された独特の特性を備える改良型突然変異体を得ることが可能である。例えば、L 1 1 1 F と他の変異点との組み合わせは、生体内活性がないかまたは極めて低いが、中程度の生体外変性条件下ではより高い活性を有することを特徴とする。

3. 本発明の方法は、標的タンパク質を発現させるために、D N A 組換え技術および原核生物発現系を採用しており、幅広い適用性を有する。

4. ブタ下垂体から A C T H を抽出する方法と比較して、本発明の方法を使用してヒトまたはブタ由来の A C T H を調製する場合の製造コストは、従来のブタの脳からの抽出による製造技術の製造コストよりも数百倍も低くすることができる。この方法は、生産サイクルを大幅に短縮し、生産時間およびコストを節約し、ブタの下垂体を得るために大量のブタの殺害に依存する必要がなくなり、ブタ由来の A C T H の使用による免疫原性アレルギー反応のリスクを回避し、薬の安全性を大幅に向上させることができる。また、本発明の方法で調製された A C T H は、人体から分泌される A C T H と全く同じものであるため、アミノ酸配列の精度および製品の純度が極めて高く、優れた生物活性を持ち、薬効を向上させ、副作用の発生を抑えることができる。本方法は、有機合成法に比べて、ヒト由來の全長 A C T H の調製の難易度およびコストを大幅に低減し、操作が簡単で、高価な触媒や高圧装置を必要とせず、収率が高く、大量生産に適している。つまり、本方法は、製造プロセスが明確で簡単であり、再現性が良く、大規模生産の実現が容易であり、環境汚染を低減することができる。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図 1】図 1 は、異なる濃度の尿素での T E V P 变異体 12 D の消化効率の S D S - P A G E ゲルクマシープリリアントブルー染色画像である。矢印は標的タンパク質を示す。

【図 2】図 2 は、異なる濃度の尿素での T E V P 变異体 4 D の消化効率の S D S - P A G E ゲルクマシープリリアントブルー染色画像である。矢印は標的タンパク質を示す。

【図 3】図 3 は、異なる濃度の尿素での T E V P 变異体 32 C の消化効率の S D S - P A G E ゲルクマシープリリアントブルー染色画像である。矢印は標的タンパク質を示す。

【図 4】図 4 A は、異なる濃度の尿素での T E V P 变異体 4 D の消化効率の S D S - P A G E ゲルクマシープリリアントブルー染色画像である。図 4 B は、電気泳動バンドのグレーベルの比較である。

【図 5】図 5 は、T E V P 变異体 4 D、12 D および 32 C の生体内および生体外の酵素切断活性と S 2 1 9 V との比較である。矢印は標的タンパク質を示す。

【図 6】図 6 は、T E V P 变異体 4 D、12 D、32 C および S 2 1 9 V の融合タンパク質の 0.5 M 尿素での溶解度試験である。

【図 7】図 7 は、プラスミド p E T - 28 b - P D 1 - A v i の模式図である。

【図 8】図 8 は、プラスミド p E T - 28 b - A C T H の模式図である。

【図 9】図 9 は、プラスミド A v i - T E V - s T E V - A C T H の遺伝子構造図である。

【図 10】図 10 は、質量分析計で測定した、精製された A C T H の分子量を示すスペクトルである。

10

20

30

40

50

【図11】図11は、生体外で測定したA C T H活性を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0040】

以下、本発明の目的、技術構成および利点をより明確にするために、本発明の実施形態をさらに詳細に説明するが、本発明の実施形態はそれに限定されない。

【0041】

本明細書では、「宿主」という用語は、タンパク質を発現するのに適した任意の真核細胞または原核細胞を指す。一実施形態では、宿主細胞は大腸菌細胞である。

【0042】

本明細書では、「生体外変性条件」という用語は、T E Vプロテアーゼを含む融合タンパク質を溶解させ、酵素切断活性を有する条件を指し、例えば、3 M ~ 5 Mの尿素、好ましくは3 . 5 M ~ 4 . 5 Mの尿素、より好ましくは4 Mの尿素または1 M ~ 2 Mのグアニジン塩酸塩、好ましくは1 . 5 Mのグアニジン塩酸塩の条件である。

10

【0043】

本明細書では、T E Vプロテアーゼは、タバコエッチウイルス(T E V)に由来するN1aプロテアーゼにおける27 kDaの活性ドメインである。本明細書では、配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するS219V T E Vプロテアーゼを、出発T E Vプロテアーゼとして使用する。しかしながら、当業者は、様々な他のT E Vプロテアーゼが、本発明の方法における出発T E Vプロテアーゼとして使用されることを理解すべきである。T E Vプロテアーゼは優れた部位特異性を持ち、E X X Y X Q(G / S)の7アミノ酸配列を認識することができ、最も一般的な配列がG1u - A s n - L e u - T y r - P h e - G1n - G1y(またはE N L Y F Q G)であり、その制限部位がグルタミンG1n(P1)とグリシンG1y(P1')との間(即ち、P1とP1'との間)にあり、その配列特異性が、トロンビン、第Xa因子、およびエンテロキナーゼなどのプロテアーゼの配列特異性よりもはるかに高い。

20

【0044】

本明細書では、「T E Vプロテアーゼバリエント」とは、スクリーニングで使用される出発T E Vプロテアーゼと比較してアミノ酸残基の差異を有するT E Vプロテアーゼを指し、ここで、バリエントは、T E Vプロテアーゼが特定の配列および/または構造を有することを意味しない。

30

【0045】

本明細書では、「T E Vプロテアーゼ酵素切断活性」とは、T E Vプロテアーゼが、T E Vプロテアーゼおよびその切断部位を含む融合タンパク質を自己切断する酵素切断活性を指す。一実施形態において、本発明のT E Vプロテアーゼ酵素切断活性は、E X X Y X Q(G / S / H)を含む融合タンパク質に対する切断活性である。

40

【0046】

本明細書において、ファージ提示技術を使用して融合タンパク質を提示する。ファージ提示技術は、外来タンパク質またはポリペプチドのD N A配列をファージコートタンパク質の構造遺伝子の適切な位置に挿入して、コートタンパク質の発現とともに外来遺伝子がコートタンパク質を発現しながら、ファージの再構築によって外来タンパク質をファージの表面に提示するバイオテクノロジーである。当業者は、本発明の方法を実施するために、他のT E Vプロテアーゼランダム変異ライブラリーを選択できることを理解すべきである。

【0047】

ファージ提示系は、一本鎖糸状ファージ提示系、ファージ提示系、およびT 4ファージ提示系であって良い。一本鎖糸状ファージ提示系の場合、P I I I 提示系およびP V I I 提示系であって良い。ファージ提示系の場合、P V 提示系およびDタンパク質提示系であって良い。好ましくは、一実施形態では、ファージ提示系は、P I I I 提示系である。

【0048】

50

本明細書では、「部分A」および「部分B」とは、例えば、ビオチン、抗体、抗原、ハプテン、ポリストレプトアビジン、リガンド、受容体、核酸、酵素、基質およびアプタマーから選択される一対の結合パートナーを指し、ただし、「部分A」と「部分B」は特異的に結合する。

【0049】

一実施形態において、部分Bを含む固体支持体は、部分Aを含む融合タンパク質の捕捉に用いられる。一実施形態において、タグがビオチン部分である場合、固体支持体は、ストレプトアビジンでコーティングされたビーズまたは樹脂であってもよく、例えば、Dynabeads M-280 ストレプトアビジン、Dynabeads MyOneストレプトアビジン、Dynabeads M-270ストレプトアビジン(Invitrogen)、ストレプトアビジンセファロース樹脂(Pierce)、ストレプトアビジンハイパーリンク樹脂、MagnaBindストレプトアビジンビーズ(Thermo Fisher Scientific)、BioMagストレプトアビジン、ProMagストレプトアビジン、シリカストレプトアビジン(Bangs Laboratories)、高性能ストレプトアビジンセファロース(Streptavidin Sepharose High Performance)(GE Healthcare)、ストレプトアビジンポリスチレンミクロスフェア(Microspheres - Nanospheres)、ストレプトアビジンコーティングポリスチレン粒子(SpheroTech)、またはビオチン標識分子を捕捉するために当業者が一般的に使用される他のストレプトアビジンコーティングビーズまたは樹脂である。

【0050】

一実施形態において、TEVプロテアーゼは、Avi-TEVp-sTEV-Y1-PIIIとして、をファージPIIIタンパク質の末端(N末端)に提示され、ここで、Aviタグは、15個のアミノ酸残基GLNDIFEAQKIEWH Eからなる短いペプチドタグである。宿主での発現において、Aviタグを介してAvi-TEVp-sTEV-Y1-PIIIをビオチン化する。

【0051】

本明細書では、「エンテロキナーゼ」は、哺乳動物の十二指腸に存在するヘテロ二量体セリンプロテアーゼである。エンテロキナーゼの制限部位は、DDDDDKなど知られており、エンテロキナーゼのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列も、当業者であれば、例えばGenBank: AAC50138.1、AAB40026.1などが利用可能である。

【0052】

TEVプロテアーゼ

TEVプロテアーゼは、融合タンパク質を効率的に切断するためによく用いられるが、切断は両方が可溶性である場合に限られている。現在、ほとんどのポリペプチド薬は、溶解性が悪く、通常、封入体として発現しており、TEVプロテアーゼの切断条件と一致しない。封入体は、高濃度の尿素またはグアニジン塩酸塩で溶解させる必要があるが、このような条件での切断が極めて困難である。従来のTEVプロテアーゼは、基質と同条件下で、効率的な切断活性と、同時溶解とを両立させることができた。

【0053】

封入体は、精製に有利で、簡単な処理で比較的純粋な目的タンパク質を得ることができる。しかし、封入体タンパク質は、高濃度の尿素またはグアニジン塩酸塩で溶解する必要がある。このような条件下では、野生型TEVプロテアーゼは、不活性または極めて低活性であり、融合タンパク質を効率的に切断することができない。現在、改良されたTEVプロテアーゼに関する報告は多数あるが、切断に最適な条件は、いずれも生理的条件または非変性条件であり、通常、低濃度の変性剤(尿素またはグアニジン塩酸塩)に対してある程度の耐性を有しているが、ほとんどの封入体タンパク質は低濃度変性条件下で不溶性である。したがって、従来のTEVプロテアーゼは、上記の場合には適していない。

【0054】

本発明者らは、TEVプロテアーゼとポリペプチドを融合させてポリペプチド医薬品を

10

20

30

40

50

調製するための理想的な製造条件が以下の通りであることを見出した。(1)該融合タンパク質は、封入体として発現し、精製に有利である。(2)該融合タンパク質は、細胞内で自己切断しない。そうでなければ、精製に不利である。(3)該融合タンパク質は、高濃度の変性剤に溶解された後、中／高程度の濃度の変性剤を含む酵素切断反応系に希釈されると、TEVプロテアーゼが活性を回復し、効率的に自己切断してポリペプチドを放出する。(4)大容量のTEVプロテアーゼライブラーからスクリーニングして進化させたTEVプロテアーゼバリアントは、その制限部位のP1'位置に幅広いアミノ酸スペクトルを有するため、天然のN末端を有する様々なポリペプチドまたはタンパク質の生産に広く利用することができる。

【0055】

通常調製される自己切断性を有する融合タンパク質の構造は、US2010035300A1に提供されている。融合タンパク質の調製において、Hisタグは、発現させる標的タンパク質（例えば、EGFP）と密接に連結する必要がある。これは、融合タンパク質を細胞内で発現させると、従来の野生型TEVpまたは変異型TEVpが細胞内で一定の酵素切断活性を有し、自己切断が発生するためである。切断後のEGFPは、それに密接に接続されたHisタグを介して回収することができる。このHisタグがなければ、細胞内での自己切断が早すぎるため、タンパク質を回収することが難しくなり、EGFPを効率的に生産することができない。しかし、これはまた、特定のニーズに応じて、EGFPのHisタグをさらに除去する必要がある場合は、明らかに時間と手間がかかるという問題をもたらす。

【0056】

本発明において、融合タンパク質における標的タンパク質は、例えばHisのようなタグを含まなくてもよい。一実施形態では、融合タンパク質は、Avi-TEVp-sTEV-ACTHの構造を含み、ここで、AviはAviタグタンパク質であり、sTEVはTEVプロテアーゼ制限部位である。TEVpバリアント（例えば12Dバリアント）は、細胞内酵素活性が極めて低いため、発現した融合タンパク質はほとんど細胞内で溶解することはない。封入体を回収し、8M尿素で溶解し、環境を4M尿素に調整すると、12Dは、酵素の活性を発揮し、sTEVとして認識部位を切断する。切断した後、単純な希釈で尿素またはグアニジン塩酸塩の最終濃度を0.5Mに低下させる。TEVプロテアーゼは、溶解性が低いため、沈殿しやすいが、生物学的活性を有する放出されたポリペプチドは緩衝液に溶解しやすいため、遠心分離によって、高度に精製されたペプチドを得ることができる。これにより、追加のプロテアーゼ除去工程の必要性が巧みに排除され、後の精製プロセスが大幅に簡素化される。

【0057】

封入体の形成は精製に有利である。1)遠心分離によって高濃度で比較的純粋なタンパク質を容易に得ることができる。2)封入体は、プロテアーゼの加水分解からタンパク質を保護する。また、毒性タンパク質は不活性な封入体として発現し、宿主細菌の増殖に影響を与えない。例えば、本発明の方法に係るTEV-ACTH融合タンパク質は、封入体として発現しているため、精製工程が大幅に簡素化され、より高い濃度と純度に達することができ、さらに、プロテアーゼの加水分解を受けないため、安定した高収量が得られやすい。

【0058】

本発明のスクリーニング方法

本発明において、大容量のTEVランダム変異ファージライブラーが構築され、その重要な遺伝子構造はAvi-TEV-sTEV-Y1-PIIIであり、即ち、プロテアーゼがこのような形でファージPIIIタンパク質の末端に提示される。ここで、Avitagは、15個のアミノ酸残基からなる短いペプチドタグ(GLNDIFEAQKIEWHE)であり、生体内または生体外においてビオチンリガーゼによってリジン残基(K)で1つのビオチンに結合されることで、タンパク質のビオチン化を達成し、さらに、ビオチン化されたタンパク質は、ストレプトアビシンに特異的に結合することができる。これらの

10

20

30

40

50

2つの反応に基づいて、本発明の T E V ファージは、生体内でビオチン化され、ビオチン化されたファージライブラリーは、ストレプトアビジン磁気ビーズで固定化することができる。理想的な条件下では、細胞内で発現したときに酵素切断活性を有する T E V バリアントは、発現過程で自己切断され、その結果、最終的に組み立てられたファージ P I I I タンパク質の末端に A v i - t a g なしで、ポリペプチド Y 1 のみを有し、磁気ビーズによって捕捉されない。また、細胞内で発現したときに酵素切断活性を有しない T E V バリアントは、発現過程で自己切断が起こらず、最終的に組み立てられたファージ P I I I タンパク質の末端は A v i - T E V - s T E V - Y 1 であり、N 末端の A v i - t a g はビオチン化されており、ストレプトアビジンを含む磁気ビーズで捕捉することができる。磁気ビーズに捕捉されたファージは、中 / 高濃度の尿素中でインキュベートされる。このような条件下で酵素切断を受けたファージは、自己切断により磁気ビーズから脱落し、溶液に入る。この溶液を回収することで、最初の標的ファージが得られる。これを増殖した後に、次回のスクリーニングに供する。数回のスクリーニングの後、生体内で酵素切断活性が弱く、且つ生体外変性条件下で酵素切断活性を有する T E V プロテアーゼバリアントがエンリッチ化される。遺伝子配列解析により、発現ベクターにクローニングした後に 1 つずつ確認できるエンリッチ化された配列を得る。それにより、本発明の T E V バリアントをスクリーニングする。

【 0 0 5 9 】

酵素切断活性または効率の測定

酵素切断活性は、 S D S - P A G E ゲルの結果に基いて算出することができる。具体的には、 T E V プロテアーゼバリアントの封入体を 10 倍希釈した後、 10 % の - メルカプトエタノールを含む 5 × S D S ローディング緩衝液を添加し、 100 °C で 5 分間煮沸し、ローディングしてゲルで電気泳動を行う。終了後、ゲルをクマシープリリアントブルー染色液に入れて 30 分間染色した後、クマシープリリアントブルー脱色液に入れ、背景が無色になるまで約 20 分間加熱して脱色する。次に、ゲルをゲルイメージングシステムに設置して撮影する。取得した画像を I m a g e J ソフトウェアで処理し、バンドのグレー値を定量する。生体内酵素切断活性 = 1 - 融合タンパク質バンドのグレー値 / (融合タンパク質バンドのグレー値 + A v i - T E V バンドのグレー値 * 融合タンパク質の分子量 / A v i - T E V の分子量) 。

【 0 0 6 0 】

本明細書において、電気泳動バンドのグレー値を I m a g e J ソフトウェアで解析する方法は、現在の一般的な方法である。

【 0 0 6 1 】

本明細書において、生体外酵素切断効率の算出方法は以下の通りである。

生体外酵素切断効率 = 1 - 酵素切断後の融合タンパク質バンドのグレー値 / 酵素切断前の融合タンパク質バンドのグレー値

【 0 0 6 2 】

本明細書において、 8 M 以上の尿素または 6 M 以上のグアニジン塩酸塩を高濃度の変性剤とし、 4 M 尿素を中程度の濃度の変性剤とする。中 / 高程度の濃度の変性条件とは、 4 M 尿素または 1.5 M グアニジン塩酸塩、 50 mM Tris - HCl (pH 8.0) 、 1 mM EDTA 、 2 mM DTT を指し、反応温度は 4 ~ 37 °C 、好ましくは 25 °C である。

【 0 0 6 3 】

以下に実施例を挙げて本発明を説明する。

【 0 0 6 4 】

実施例

実施例 1 : T E V プロテアーゼバリアントの取得

1. 大容量 T E V プロテアーゼランダム変異ライブラリーの構築

1.1 実験材料

大腸菌 T G 1 : s u p E h s d 5 t h i (l a c - p r o A B) F' [t r a D]

10

20

30

40

50

36 proAB+lacIq lacZ M15] (Bio-viewshine Biotechnology社から購入)。ファージミドベクターpHEN1 (BioVector NTCC plasmid vector strain cell gene collection centerから購入、カタログ番号Biovector786623)。DNAポリメラーゼ、T4 DNAリガーゼ、制限エンドヌクレアーゼはInvitrogen Trading社から購入した。プラスミド抽出キットおよびアガロースゲルDNA回収キットは、Tiangen Biotechnologies (Beijing)社から購入した。ランダム変異誘発キット (GeneMorph II Random Mutagenesis Kit) はAgilent Technologies社から購入した。プライマーの合成および遺伝子配列の決定は、Nanjing Genscript Biotech Corporationで行った。

【0065】

1.2 TEVPランダム変異ライブラーの構築

1.2.1 ランダムミューテーションPCRによるTEVP DNA断片の調製

TEVP S219V 遺伝子の大範囲のランダム変異は、pQE30-TEV (S219V) (この27kDaのTEV NIaプロテアーゼバリアント遺伝子は、Nanjing Genscript社により合成され、pQE30ベクターのBamH1とHindIIIの間にクローニングされた) をテンプレートとして使用したランダム変異誘発キット (GeneMorph II Random Mutagenesis Kit) で行った。PCRプライマーは、以下の通りである。

TEV-F : 5'-AATCTCGAGGGATCTAAAGGTCCCTGGAGAAA
GCTTGTTTAAGGGACCAAC-3

TEV-R : 5'-AATGGATCCTTGCAGTACACCAATTCA-3

【0066】

具体的に、各工程はキットのプロトコールに従って操作し、PCRサイクル数およびテンプレート量を正確に制御し、PCR条件は中程度の変異条件に設定された。50 μl反応系は、次のように調製した。PCRチューブに、41.5 μlのddH2O、5 μlの10×Mutazyme II 反応緩衝液、1 μlの40mM dNTP混合物（各最終濃度は200 μM）、0.5 μlのプライマー混合物（各プライマーは250ng/μl）、1 μlのTEVPテンプレート（テンプレート量10ng）を順次に添加した。PCR增幅条件は、95℃で3分間の前変性；95℃で30秒；60℃で30秒；72℃で50秒；合計32サイクル；72℃で10分間の最終伸長とした。PCR終了後、5 μlの産物を採取して、キットにおける1.1-kbのゲル標準を分子量標準として、1%アガロースゲル電気泳動を行った。染色後、標的バンドの明るさを標準と比較し、PCRの収量を算出し、これをテンプレート量で割って増幅率を求めた。これを基づいて、PCR工程でのd値を算出した（計算式： $2^d = PCR\text{ 収量} / 初期\text{ テンプレート量}$ ）。本発明のTEVPランダムミューテーションPCRの最終的なd値は7.5であり、対応する変異頻度は約9変異/kb（説明書参照）であり、これは期待通りである。PCR産物をフェノールクロロホルムで抽出・精製した後、XbaIとBamH1でダブルダイジェストし、アガロースゲルDNA回収キットで消化産物を回収し、-20℃で保存した。

【0067】

1.2.2 線形化されたベクターの調製

ファージミドベクターpHEN1 (BioVector NTCC plasmid vector strain cell gene collection centerから購入、カタログ番号Biovector786623) を線形化する前に、修飾を行った。まず、Aviタグ配列であるGLNDIFEAQKIEWHEをシグナルペプチドの下流に挿入し、得られた融合タンパク質をビオチン化してから、ストレプトアビジン磁気ビーズで固定化した。pET28b-PD1-Avi (Nanjing Genscript社で合成した。遺伝子構造はNco1-PD1遺伝子-Not1-BamHI-GG

10

20

30

40

50

G S リンカー - a v i タグ - X h o 1 である。P D 1 遺伝子の G e n e b a n k アクセッショング番号は、N M _ 0 0 5 0 1 8 である。プラスミドマップを図 7 に示す。) を、A v i タグの P C R 増幅用テンプレートとして使用し、P C R プライマーは次のとおりである。

A v i - F : 5 - A C T C C A T G G C C G G T C T G A A T G A T A T T T T T G A
A G C - 3

A v i - R : 5 - A A T C T C G A G C T C G T G C C A C T C G A T T T T C T G - 3
【 0 0 6 8 】

生成物をフェノールクロロホルムで精製し、N c o 1 と X h o 1 でダブルダイジェストし、ゲルを回収した後、同様に酵素で消化した p H E N 1 ベクターにライゲーションして p H E N 1 - A v i を得た。次に、s T E V (ヌクレオチド配列 : G A A A A T C T G T 10
A T T T T C A G A G C 、アミノ酸配列 : E N L Y F Q S) とヒト A C T H 遺伝子を含むタンデム配列を A v i タグの後ろ (クローニングサイト X h o 1 + N o t 1) に挿入した。s T E V - A C T H タンデム配列の P C R 増幅用テンプレートは、p E T 2 8 b - A C T H (Nanjing Genscript 社で合成した。プラスミドマップを図 8 に示す。アミノ酸配列は、配列番号 2 に示す。ヌクレオチド配列は、配列番号 1 3 に示す。) であり、P C R プライマーは次のとおりである。

A C T H - F : A A T C T C G A G G G A T C T G G A T C C G G A G G T G G C G G
T A G C G A A A A T C T G T A T T T T C A G A G C T A T A G C A T G G A A C - 3

A C T H - R : 5 - A A T G C G G C C G C A A A T T C C A G C G G A A A T G C - 3
【 0 0 6 9 】

プライマーの上流に B a m H 1 部位を追加導入し、フェノールクロロホルムで P C R 産物を精製し、N o t 1 と X h o 1 でダブルダイジェストした後、同様に酵素で消化した p H E N 1 - A v i ベクターにライゲーションして、p H E N 1 - A v i - s T E V - A C T H 得た。ベクターの線形化 : p H E N 1 - A v i - s T E V - A C T H を X h o 1 と B a m H 1 でダブルダイジェストし、消化産物における大きな断片をゲルで回収し、 - 2 0 20 で保存した。

【 0 0 7 0 】

1 . 2 . 3 ライゲーションおよびライゲーション生成物の回収

消化して回収したベクター (p H E N 1 - A v i - s T E V - A C T H) を、インサートフラグメント (ランダムに変異した T E V P 遺伝子) と 1 : 3 、 1 : 5 、 1 : 1 0 でライゲーションした。具体的に、まず、ベクター p H E N 1 - A v i - s T E V - A C T H を調製 (1 . 2 . 2 線形化されたベクターの調製を参照) し、次に、インサートフラグメントを調製 (1 . 2 . 1 ランダムミューターション P C R による T E V P D N A 断片の調製を参照) し、両方を T 4 D N A リガーゼ (Thermo Fisher Scientific) でライゲーションして、p H E N 1 - A v i - T E V p - s T E V - A C T H 得た。ライゲーションシステムはキットのプロトコールに従った。2 0 μ l 反応系を例にとると、P C R チューブに、1 5 0 n g の線形化されたベクター、対応する量のインサートフラグメント (ベクターに対するモル比は 1 : 3 または 1 : 5 または 1 : 1 0) 、2 μ l の 1 0 × T 4 D N A リガーゼバッファー、1 μ l の T 4 D N A リガーゼを順次に添加し、最後に d d H 2 O で容量を 2 0 μ l になるように容量を調整した。形質転換によって生成されたクローナーの数を計算することにより、最適なライゲーション比は 1 : 5 であると判定された。プラスミドマップを図 9 に示す。最適なライゲーション比は 1 : 5 であると判定された。異なる濃度のライゲーション生成物を用いて形質転換を行い、最適な形質転換生成物量を 0 . 2 μ g (1 0 μ l) と判定した。ライゲーション生成物をフェノール - クロロホルム抽出で精製し、タンパク質および塩イオンを除去して、d d H 2 O に溶解した。

【 0 0 7 1 】

1 . 2 . 4 電気形質転換 (e l e c t r o t r a n s f o r m a t i o n)

電気穿孔法によりライゲーション生成物を宿主細菌 T G 1 にトランスフェクトした。電気形質転換用コンピテント細胞の調製方法は、分子クローニング実験ガイド (第 3 版) に

10

20

30

40

50

従った。10 μl のライゲーション生成物を 200 μl の電気形質転換用コンピテント細胞と穏やかに混合して、氷浴に 2 分間入れ、0.2 cm の孔隙を備えた予冷した電気形質転換キュベットに移して電気形質転換を行った。電気形質転換装置 (Bio-Rad Gene-Pulser) のパラメーターは、2.5 KV、25 μF、200 であった。電撃した後、直ちに 1 ml の SOC 培地を加え、吸い出した後、1 ml の SOC 培地で電撃キュベットを 2 回濯いだ。3 ml の細菌液を合わせ、37、200 rpm で 45 ~ 60 分間振とうした。10⁻²、10⁻³、および 10⁻⁴ の勾配で細菌液を希釈し、各勾配で 100 μl の菌体を採取して、SOC (25 μg / ml のカルベニシリンを含む) の小プレートに広げ、残量を 5000 × g で 5 分間遠心分離し、菌体を回収した。再懸濁した後に、SOC (25 μg / ml カルベニシリンを含む) の正方形の大きなプレート (25 × 25 cm) に広げた。倒立したプレートを 37 で 12 ~ 16 時間インキュベートした後、小プレートでカウントを行った。そして、2 YT 培地で大プレート上のコロニーをすぎ、塗布ロッドで軽く搔き取り、最終濃度が 50 % になるようにグリセロールを加えた後、チューブに分注し、-80 で凍結保存した。ライプラリー容量の計算方法：容量プレート上のクローン数 * 希釈倍率 * 希釈前の細菌液の総体積。ライプラリー容量が 1 × 10⁹ 以上になるまで、電気形質転換を数回繰り返した。

【0072】

1.2.5 配列の決定および解析

一部の元の細菌クローンをランダムに選択し、コロニー PCR によって組換えプラスミドを検証した。PCR 検証プライマーは次の通りである。

フォワードプライマー：5'-CCACCATGGCCGGTCTGAATGATATT
TTTGAAAGC-3'

リバースプライマー：5'-TTGTTCTGC GG CCGCAATTCCAGC-3'

PCR 陽性の組換えプラスミドを配列決定を委託 (Genescript Biotech h n o l o g y 社) し、構築されたライプラリーのランダム性、ライプラリー容量、および存在度を評価した。

【0073】

1.2.6 ライプラリーの容量および多様性の評価

ベクターとインサートフラグメントとのモル比は 1 : 5 であり、10 μl のライゲーション生成物を利用して電気形質転換を行った。形質転換効率は 9 × 10⁸ cfu / μg DNA である。複数回の形質転換を組み合わせた容量は 2.02 × 10⁹ で、スクリーニングのニーズを満たした。ペプチドライプラリーから 20 個のクローンをランダムに選び、配列を決定した。結果 (表 1) は、全体的な変異頻度が中 / 低程度 (1.5 ~ 7 個 / kb) であることを示す。実際の値と理論値の間には一定の偏差がある。考えられる理由の 1 つは、同義突然変異がカウントされていないことであり、もう 1 つは、サンプル数が少ないことである。配列決定用サンプルの数が増えるにつれて、このような偏差は減少していく。上記の結果は、構築された TEP ランダムファージライプラリーが、基本的なフレームワーク、ライプラリー容量、および多様性の観点から、設計要件を満たしたこと示す。

【0074】

表 1 ランダムに選択されたクローンにおけるアミノ酸変異の分布

10

20

30

40

50

【表1】

クローン#	部位1	部位2	部位3	部位4	部位5
1	H 4 6 Q	I 1 8 9 M	S 1 2 2 T	N 1 7 4 Y	E 1 8 8 K
2	Y 1 1 H	T 2 9 A			
3	D 1 0 Y				
4	フレームシフト変異				
5	C 1 3 0 Y	Q 1 9 7 R	G 2 1 3 S		
6	T 2 9 A	T 4 3 S	R 5 0 S	K 2 2 9 E	
7	I 1 8 F	F 4 8 S	Q 5 8 s t o p		
8	G 7 E	S 1 5 3 G			
9	フレームシフト変異				
10	変異なし				
11	G 5 3 V	D 1 4 8 G	T 1 7 5 R		
12	M 8 7 V	F 1 8 6 Y	V 2 1 9 A		
13	H 2 8 Y	Q 7 3 s t o p	I 1 3 8 T	W 1 9 8 C	
14	E 1 8 8 A				
15	S 1 6 8 T				
16	F 1 7 2 S	M 2 1 8 L			
17	N 1 7 6 I				
18	変異なし				
19	変異なし				
20	G 6 2 S				

【0075】

2. T E V P ランダム変異ファージライブラリーからの標的クローンのスクリーニング

2.1 実験材料

H R P - M 1 3 抗体はBeijing Sino Biological社から購入し、96ウェルELISAプレートおよびELISA試薬はSangon Biotech (Shanghai)社から購入し、ストレプトアビシン磁気ビーズはNEBから購入し、D-ビオチン、IPTGなどの試薬はSangon Biotech (Shanghai)社から購入した。

【0076】

2.2 ファージライブラリーの培養

少なくとも1つのライブラリー容量の細菌を採取し、2×YT-CG (2×YT + 100 μg / ml カルベニシリンおよび2%グルコース) を含む2L三角フラスコに、初期OD600値 = 約0.1になるように加え、OD600が約0.5になるまで37、200 rpmで振とうした。ヘルパー・ファージM130K07 (Beijing Bio-viewshine Bio Technology社から購入) を加えて感染 (MOI = 20) させ、100 rpmでゆっくり回転させながら37で1時間インキュベーションを続けた。その後、遠心分離 (2000 × g で20分間) により細菌を回収し、上清を可能な限り除去して廃棄した。1Lの2×YT-CK (2×YT + 100 μg / ml カルベニシリンおよび50 μg / ml カナマイシン + 200 μm D-ビオチン) で菌体を再懸濁し、250 rpm、25で一晩インキュベートした。翌日、パッケージされたファージを回収して精製した。細胞培養物を750 mlの遠心分離ボトルに移し、氷中でわずかに冷却した。次に、大型ベンチトップ遠心分離機によって4500 rpm、4で30分間遠心分離した。上清が濁った場合は、別の清潔なボトルに移し、このステップを繰り返した。上層の80%の上清 (細胞ペレットを攪拌しないように) を別の新しい750 ml遠心

10

20

30

40

50

分離ボトルに移し、1/6容量のPEG/NaCl溶液(20%[w/v]のPEG-8000、2.5MのNaCl)を加え、混合した後、氷中に少なくとも2時間放置し、4500rpm、4で30分間遠心分離した。すべての上清を注意深く取り除き、10mlのPBSを加えた。ピペットで沈殿物を再溶解させ、2mlのEPチューブに移した。15000×g、4で20分間遠心分離して、残った菌体や破片を取り除いた。ピペットで上清を新しいEPチューブに注意深く移し、そこに1/6容量のPEG/NaCl溶液を加え、氷上に1時間置いてファージを再び沈殿させた後、15000×g、4で20分間遠心分離し、ファージ沈殿物を回収した。すべての上清を注意深く取り除き、廃棄した。さらに、ファージ沈殿物を適量のPBSで再溶解し、完全に溶解した後、15000×g、4で10分間遠心分離して、残った不溶性不純物を除去した。上清を新しいEPチューブに分注し、50%のグリセリンを加え、-80で長期間保存した。

【0077】

2.3ライブラリー力価の決定

Carol M Y Leeらの方法(M Y Lee, Carol & Iorno, Niccol & Sierrro, Frederic & Christ, Daniel.(2007). Selection of human antibody fragments by phage display. Nature protocols. 2.3 001-8. 10. 1038/nprot.2007.448.)に参照して、ファージライブラリーを2×YTで勾配希釈した。 10^{-9} 、 10^{-10} 、および 10^{-11} の希釈液について、それぞれ $10\mu l$ を採取し、対数増殖期まで培養した新鮮なTG1細菌液 $200\mu l$ に加え、均一に混合し、37で30分間インキュベートし、2×YT-CGを含むプレートにすべて広げた。プレートを30のインキュベーター内で一晩インキュベートし、翌日、單一コロニーの数をカウントし、力価を算出した。

【0078】

2.4 ライブラリのパンニング(panning)

本発明のTEVPバリアントをパンニングする原理は以下の通りである。Aviタグは、15アミノ酸残基(GLNDIFEAQKIEWH)で構成される短いペプチドタグであり、生体内および生体外の両方でもビオチンリガーゼによってリジン残基にビオチンをライゲーションすることにより、タンパク質のビオチン化を実現する。ビオチン化タンパク質は、特にストレプトアビジンによって結合される。これらの2つの反応に基づいて、本発明のTEVpファージは、生体内でビオチン化することができ、ビオチン化ファージライブラリーは、ストレプトアビジン磁気ビーズで固定化することができる。理想的な条件下では、細胞内で酵素切断活性を持つTEVPバリアントは、発現プロセスにおいて自己切断され、その結果、最終的に組み立てられたファージPIIIタンパク質は、末端にACTHのみを有し、Aviタグを有しないため、磁気ビーズで捕捉することができない。一方、細胞内で発現させた場合、酵素切断活性を有しないTEVPバリアントは、発現プロセスにおいて自己切断をすることなく、その結果、最終的に組み立てられたファージPIIIタンパク質は、末端がAvi-TEVP-sTEV-ACTHであり、N末端のAviタグがビオチン化されているため、ストレプトアビジンを含む磁気ビーズで捕捉することができる。磁気ビーズによって捕捉されたファージは、中/高濃度の尿素中でインキュベートされる。生理学的条件下で不溶性であるTEVPバリアントは、この条件下で溶解してその活性を回復し、酵素切断ができる。この条件下で消化されたファージは、自己切断により磁気ビーズから脱落し、溶液に入る。溶液を回収して、最初の標的ファージを取得し、增幅した後、次のスクリーニングを行うことができる。数回のスクリーニングの後、弱い生体内酵素切断活性を有し、且つ生体外変性条件下で酵素切断活性を有するTEVプロテアーゼバリアントがエンリッチ化される。遺伝子配列解析により、発現ベクターにクローニングした後に1つずつ確認できるエンリッチ化された配列を得る。各回のパンニング結果を以下の表2に示します。

【0079】

表2. 各回のパンニングのデータ

10

20

30

40

50

【表2】

回数	投入したファージ (c f u)	回収ファージ (c f u)	回収率
1	2.8×10^{11}	6.2×10^6	2.2×10^{-5}
2	2.0×10^{11}	2.8×10^7	1.1×10^{-4}
3	1.4×10^{11}	5.9×10^7	4.2×10^{-4}

10

【0080】

ファージパンニングの具体的なプロセスは次の通りである。

(1) ファージの固定化：清潔な2mlのEPチューブで、100倍のライブラリー容量のファージをTBS緩衝液(50mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl、0.1%[v/v] Tween-20)に希釈し、適量のストレプトアビシン磁気ビーズを添加して混合し、4℃で回転させ、20分間インキュベートした。磁石で磁気ビーズを沈殿させた後、TBSで5回洗浄して未結合のファージを除去した。

【0081】

(2) 酵素切断のスクリーニング：3M尿素を含むTBS緩衝液を磁気ビーズに添加し、室温で1~2時間インキュベートした。磁石で磁気ビーズを沈殿させ、上清を可能な限り回収した。

20

【0082】

(3) ファージの増幅：OD600=0.5のTG1宿主細菌50mlに、溶出したファージを加え、37℃で1時間ゆっくり振とうした。100μg/mlのカルベニシリンおよび2%のグルコースを添加し、さらに2時間インキュベートした。ヘルパーファージ(M13OK07(Beijing Bio-viewshine Bio Technology Co., Ltd.社から購入))を添加して感染(MOI=20)させ、ゆっくりと回転させながら37℃で1時間インキュベーションした。次に、遠心分離により細菌を回収し、上清を可能な限り取り除いた。100mlの2×YT-CK(2×YT+100μg/mlのカルベニシリンおよび50μg/mlカナマイシン+200μMのD-ビオチン)で菌体を再懸濁し、25℃、250rpmで一晩インキュベートした。翌日、パッケージされたファージを回収して精製した。培養物を清潔な50ml遠心管に移し、13,000g、4℃で20分間遠心分離した。上層の80%の上清を新しい遠心管に移し、1/6容量のPEG/NaCl溶液を加え、4℃で1時間以上沈殿させた。その後、再び遠心分離して沈殿物を回収し、適量のPBSを加えてファージ沈殿物を再懸濁し、さらに遠心分離して細菌の破片などの不純物を除去した。上清を回収し、1/6容量のPEG/NaCl溶液を添加し、氷上で1時間静置した後、再び遠心分離して沈殿物を回収し、適量のPBSに溶解した。次に、13,000gで10分間遠心分離して不溶性不純物を除去し、上清を別の新しいEPチューブに移し、増幅後の溶出液とした。

30

で20分間遠心分離した。上層の80%の上清を新しい遠心管に移し、1/6容量のPEG/NaCl溶液を加え、4℃で1時間以上沈殿させた。その後、再び遠心分離して沈殿物を回収し、適量のPBSを加えてファージ沈殿物を再懸濁し、さらに遠心分離して細菌の破片などの不純物を除去した。上清を回収し、1/6容量のPEG/NaCl溶液を添加し、氷上で1時間静置した後、再び遠心分離して沈殿物を回収し、適量のPBSに溶解した。次に、13,000gで10分間遠心分離して不溶性不純物を除去し、上清を別の新しいEPチューブに移し、増幅後の溶出液とした。

40

【0083】

(4) 力価測定のために1μlの精製ファージを採取し、残りは次のパンニングまたは保存のために使用した。

【0084】

(5) シーケンシングによるスクリーニング配列のエンリッチ化の分析：3回のパンニング後、最終回で溶出したファージを使用して宿主細菌を感染させ、2×YT-CGプレートにブレーティングし、30℃で一晩インキュベートした。翌日、シングルクローンコロニーを選択し、コロニーPCRを行ってライブラリー配列に属するかどうかを確認し、陽性クローンを配列決定解析に供した。配列決定の結果を解析し、変異部位の頻度を統計することにより、最終的に最良の7つの変異体が候補クローンとして選定した。

【0085】

50

3. 候補クローンの特性評価

上記の7つの候補配列を消化（Nco1 / Not1）し、発現ベクターpET28b（Novagen社から購入）にクローニングし、Rosetta2（DE3）（Hunan Youbio社から購入）にトランスフェクトして発現させた。発現条件：LB培地、37℃でOD600=約0.6になるまで培養した。誘導条件：37℃で250rpmで振とうし、2mM IPTG、4時間誘導した。細菌処理：遠心分離で細菌を回収し、細菌を再懸濁し、超音波によって破壊し、遠心分離で封入体の沈殿物を回収し、封入体を洗浄し、最後に、8M尿素（50mM Tris-HCl、1mM EDTA、2mM DTT、8M尿素、pH8.0）で封入体を溶解した。

【0086】

封入体タンパク質の希釈および消化試験：尿素の最終濃度を3Mまたは4Mになるよう、TEVP消化緩衝液（50mM Tris-HCl、1mM EDTA、2mM DTT、pH8.0）で各候補クローンの封入体タンパク質を希釈した後、25℃で一晩消化した。翌日、SDS-PAGEゲルで電気泳動を行い、消化を確認した。タンパク質電気泳動バンドをImage Jソフトウェアで処理し、バンドのグレー値を算出した。

【0087】

消化条件の最適化：上記の消化試験で得られた陽性クローンは、異なる条件下で消化効率をさらに試験する必要がある。このような条件としては、異なる尿素濃度、異なる温度、異なるグアニジン塩酸塩濃度、反応溶液中のDTTおよびEDTA濃度が挙げられる。

【0088】

本発明は、上記のスクリーニングを通して、最終的に、生体内酵素切断活性が弱いが生体外活性が正常である3つの変異体を得た。試験結果を図1、2、3、4A-Bに示す。

【0089】

具体的なプロセスは、以下の通りである。8M尿素緩衝液に溶解した各TEVプロテアーゼバリアント-ACTH融合タンパク質を、1:10の比率で希釈液に添加した。希釈液は、異なる濃度の尿素を含む50mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA、2mM DTTであった。尿素の最終濃度が4Mの場合、希釈液は、3.56M尿素、50mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA、2mM DTTであった。各サンプルを均一に混合した後、直ちに2本のEPチューブに均等に分注し、そのうちの1本に5×SDSローディング緩衝液を添加し、100℃で5分間煮沸し、0時間の酵素切断サンプルとした。もう1本は、25℃で16時間自己切断した後、5×SDSローディング緩衝液を添加し、100℃で5分間煮沸し、16時間の酵素切断サンプルとした。その後、SDS-PAGE変性ゲルで電気泳動を実行し、各バリアントの0時間、16時間の酵素切断サンプルを検出した。電気泳動後、クマシープリリアントブルーでゲルを染色し、脱色し、写真を撮った。Image Jソフトウェアで画像を処理して、電気泳動バンドのグレー値を算出した。計算方法は以下の通りである。

【0090】

生体内酵素切断活性 = 1 - 酵素切断前の融合タンパク質バンドのグレー値 / (酵素切断前の融合タンパク質バンドのグレー値 + Avi-TEVPバンドのグレー値 × 融合タンパク質分子量 / Avi-TEVP分子量)。

【0091】

生体外酵素切断効率 = 1 - 酵素切断後の融合タンパク質バンドのグレー値 / 酵素切断前の融合タンパク質バンドのグレー値。

【0092】

表3に示すように、4D、12D、および32Cプロテアーゼバリアントの生体内酵素切断活性は、有意に低下し、4M尿素での生体外切断効率は、いずれも30%以上であった。本発明におけるACTHポリペプチドの調製に用いたTEVプロテアーゼバリアントは、表3に示すいずれかである。本発明でスクリーニングされたTEVプロテアーゼバリアントは、他の組換えポリペプチドおよびタンパク質の調製に使用することができる。

【0093】

10

20

30

40

50

表3は、複数のプロテアーゼバリアントとACTHとの融合タンパク質の収量（計算方法：融合タンパク質サンプルとBSA標準品と共に、SDS-PAGE変性ゲルで電気泳動を実行した後、クマシーブリリアントブルー染色溶液で染色し、脱色溶液で背景を取り除き、写真を撮影する。写真におけるBSA標準品バンドのグレー値をサンプルのグレー値と比較してサンプルの濃度を推定し、融合タンパク質の濃度と収量を算出する。）、生体内活性、および4M尿素に対する生体外耐性（対照としてS219Vを使用）を示し、タンパク質バンドのグレー値に基づいて比較する。データは、3つの異なるバッチで発現されたTEVPバリアントの融合タンパク質の収量、および生体内酵素切断と生体外酵素切断の比率の統計結果である。

【表3】

クローン名	融合タンパク質の収量 (mg/L)	生体内酵素切断の比 例(%)	生体外酵素切断の比 率(%)
4D	220.92±6.93	10.75±4.40	52.93±11.27
12D	185.73±9.26	1.49±1.10	61.07±14.65
32C	237.78±11.02	2.48±0.51	26.89±2.95
S219V	88.39±6.89	71.97±8.08	70.96±6.23

10

20

30

40

50

【0094】

注：ここで、融合タンパク質の収量は、酵素切断されていない融合タンパク質を指す。生体内で酵素切断された融合タンパク質は、役に立たないためカウントされない。S219Vは、野生型TEVPの第219位のアミノ酸がセリン(S)からバリン(V)に変異している。

4D: S219Vの第111位のアミノ酸はロイシン(L)からフェニルアラニン(F)に変異し、第138位のアミノ酸はイソロイシン(I)からリジン(K)に変異している。

12D: S219Vの第28位のアミノ酸はヒスチジン(H)からロイシン(L)に変異し、第111位のアミノ酸はロイシン(L)からフェニルアラニン(F)に変異し、第196位のアミノ酸はグルタミン酸(Q)からヒスチジン(H)に変異している。

32C: S219Vの第111位のアミノ酸はロイシン(L)からヒスチジン(H)に変異し、第135位のアミノ酸はセリン(S)からグリシン(G)に変異し、第187位のアミノ酸はメチオニン(M)からイソロイシン(I)に変異している。

【0095】

図1は、TEVP変異体12Dが4M尿素溶液で最も高い酵素切断効率を有することを示す。図2は、TEVP変異体4Dが4M尿素で最も高い酵素切断効率を有することを示す。図3は、TEVP変異体32Cが4M尿素で最も高い酵素切断効率を有することを示す。図4Aおよび4Bは、TEVPバリアント4Dが4M尿素、25%の条件下で最も高い酵素切断効率を有することを示す。尿素濃度が4Mを超えると、各変異体の酵素切断効率が徐々に低下する。

【0096】

図5は、本発明でスクリーニングされたTEVP変異体4D、12Dおよび32Cの生体内酵素切断活性がS219V対照のそれよりも大幅に低く(0時間バンドの比較に基づく)、生体外酵素切断活性がS219Vと同等またはそれ以下であることを示す。

【0097】

図6は、0.5M尿素における各TEVP変異体の融合タンパク質の溶解度がいずれも

低いことを示す（希釈された上清には少量のタンパク質のみがあり、ほとんどのタンパク質は希釈された沈殿物にあった）。これは、TEVP変異体融合タンパク質が0.5M尿素に希釈された後に、沈殿物として存在した。

【0098】

本発明におけるACTHポリペプチドの調製に使用されたTEVプロテアーゼバリアントは、表1に示すいずれかである。本発明でスクリーニングされたTEVプロテアーゼバリアントは、他の組換えポリペプチドおよびタンパク質の調製に使用することができる。

【0099】

実施例2：TEVP-ACTH融合タンパク質によるACTHポリペプチドの調製

1. TEVP-ACTH融合タンパク質発現ベクターの構築

実施例1において、融合タンパク質の酵素切断によって放出されたACTHのカルボキシル末端は、実際の生産において除去される必要があるHisタグを有する。したがって、PCRによってACTH遺伝子の下流に終止コドンを導入する必要がある。具体的には、実施例1の工程3で最も効果があったTEVプロテアーゼバリアント12Dを含むプラスミドをテンプレートとして、PCRによりベクターのオープンリーディングフレームにおけるAvi-TEVP-sT EV-ACTH領域を増幅した（TEVPバリアント12Dの配列は配列番号5であり、ACTH遺伝子の配列は配列番号13である。）。増幅は、KOD-plus DNAハイファイデリティポリメラーゼ（東洋紡）を使用して行った。増幅プログラムは、95度2分間の前変性、98度10秒間の変性、60度30秒間のアニーリング、68度1分間12秒間の伸長、30サイクル増幅である。遺伝子の下流に終止コドンを導入した。プライマーは次のとおりである。

TEV-ACTH-F: 5'-CCACCATGGCGGTC TGAATGATATT
TTTGAAGC-3

TEV-ACTH-R: 5'-AGAGCGGCCGC TTATTAAAATTCCAG
CGGAAATGCTTCTGC-3

【0100】

ここで、下線部分は、それぞれ制限部位Nco1およびNot1である。PCR生成物およびベクターpET-28b (Novagen)を、37、Nco1およびNot1で3時間消化した後、断片をゲルで回収し、次に、20、T4DNAリガーゼで2時間ライゲーションした。DH5⁺コンピテント細胞にライゲーション生成物を形質転換した後、形質転換した生成物をカナマイシン耐性 (50 μg/ml) LBプレートに塗布し、単一のコロニーが出現するまで培養した。単一のコロニーを選び、プラスミドを抽出し、酵素切断の検証を行った。組換えプラスミドは、Genscriptに委託して配列決定を行い、プラスミドpET-28b-Avi-TEVP-sT EV-ACTH（ここで、sT EV配列はTEVP-ACTHプラスミドにある）を得た。

【0101】

2. TEVP-ACTH融合タンパク質の誘導性発現、精製、酵素切断および検証

構築された発現ベクターを形質転換した。具体的には、50ngのプラスミドpET-28b-TEVP-sT EV-ACTHを、対応する化学コンピテント細胞Rosetta2(DE3)に加え、氷浴に30分間入れ、42度45秒間加熱ショックを与え、氷浴に2分間入れた。抗生素質を含まない1mlのLB培地を添加し、37度1時間培養した。100μlの細菌溶液を採取して、カナマイシン (50 μg/ml) + クロラムフェニコール (34 μg/ml) を含むLBプレートに塗布し、単一のコロニーが出現するまで37度インキュベートした。

【0102】

TEVP-ACTH融合タンパク質の誘導性発現：單一コロニーを採取し、カナマイシン (50 μg/ml) とクロラムフェニコール (34 μg/ml) を含むLB液体培地でOD600=0.5~0.8になるまで培養した。体積比1:50で培養物をLB液体培地に接種し、37度激しく振とうしながらOD600=0.5~0.8まで培養し、最終濃度2mMのIPTGを加え、37度4時間誘導した。発現過程において、TEVP

10

20

30

40

50

- A C T H 融合タンパク質は、不溶性の封入体として存在した。発酵が完了した後、菌体を回収し、超音波で破碎し、洗浄緩衝液（組成：50 mM Tris-HCl、200 mM NaCl、10 mM EDTA、10 mM - メルカプトエタノール、0.5% Triton X-100）で数回洗浄し、T E V P - A C T H 融合タンパク質の粗抽出物を得た。変性剤であるグアニジン塩酸塩または尿素を含む緩衝液（組成：50 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA、2 mM DTT、8 M 尿素または6 M GuHCl）を添加し、T E V P - A C T H 融合タンパク質を溶解し、変性溶液を調製した。

【0103】

T E V P 消化緩衝液（3.556 M 尿素、50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、2 mM DTT、pH 8.0）で融合タンパク質変性溶液を10倍希釈し、尿素の最終濃度を4 M にし、25℃で一晩自己切断した。酵素切斷生成物を8倍希釈（希釈液は50 mM Tris-HCl pH 8.0）した後、T E V プロテアーゼおよび未切斷の融合タンパク質は、溶解性が低いため、沈殿（図6を参照）したが、A C T H ポリペプチドは、溶液に溶解された。したがって、13000 g、低温、高速、4℃で30分間遠心分離した後、上清を回収し、A C T H 原液を得た。

10

【0104】

3. A C T H の精製および保存

0.22 μm メンブレンフィルターでA C T H 原液をろ過して不純物を除去し、1 k の限外ろ過遠心管理（M i l l i p o r e 社）で濃縮しながら脱塩し、50% の硫酸アンモニウムで沈殿させた。A C T H は、溶液の上層に懸濁物を形成し、これを注意深く回収してP B S で溶解し、限外濾過によって濃縮および脱塩を行い、高純度のヒトまたはブタ由来の組換えA C T H の溶液を得て、次に凍結乾燥して保存した。

20

【0105】

4. A C T H の構造同定

精製されたA C T H の分子量を質量分析計で測定した結果、測定された分子量は理論値と一致した。その結果を図10に示す。

【0106】

5. A C T H の活性測定

2週齢の健康なS D ラットを1%ペントバルビタールナトリウム（40 mg / kg）で麻酔し、無菌状態で副腎を摘出し、皮膜と髄質を取り除き、ハンクス平衡塩溶液に入れた。1 mm³の大きさにカットした後、I型コラゲナーゼおよびD N a s e を含む消化液に移し、5分間隔で振とうしながら1時間消化した。ピペットを使用して数回ピッティングすることにより細胞を機械的に分離して懸濁液を形成した。次に、これをセルシーブ（c e l l s i e v e ）で濾過して50 mlの遠心管に入れ、1000 × g で10分間遠心分離した。上清を注意深く除去し、沈殿した細胞をハンクス溶液で2回洗浄し、最後に、20% のウシ胎児血清を含むD M E M / F 1 2 培地（G i b c o ）で再懸濁して、濃度を2 × 10⁵ 個 / ml に調整し、90 mm シャーレに接種し、37℃、5% CO₂ の条件下でインキュベートした。倒立型位相差顕微鏡で副腎細胞の成長過程および形態変化を観察した。48時間の培養後、顕微鏡下で、副腎細胞は、付着して成長すること、細胞体積が増加していること、細胞体が円形または多角形になること、細胞体が大きいこと、細胞質が透明であること、細胞質中に規則的な大きさの粒子が多数存在していることが観察された。このようにして、ラット副腎皮質細胞を得た。

30

【0107】

精製されたA C T H を、e x vivo でラット副腎皮質細胞とインキュベートした。具体的には、副腎細胞の各グループに、異なる濃度（0.1 μU、0.2 μU、2 μU、20 μU、200 μU、1 U = 10 μg タンパク質）のA C T H（細胞とA C T Hとの体積比は400 : 1）をそれぞれ添加した。37℃で24時間培養した後、培地を採取して遠心分離し、細胞破片を除去した後、酵素結合免疫吸着測定法（酵素結合免疫吸着測定法について、He Shangjin et al. "The expression and significance of PCNA in rat adrenal cell c

40

50

ulture." Clinical Urology Journal of Surgery 21.8 (2006) : 625 - 626を参照)によりコルチコステロン濃度を測定した。その結果、ACTHの濃度が増加するにつれて、コルチコステロンの濃度も徐々に増加することが分かった。ACTHは、細胞を刺激してステロイドホルモンを分泌させるため、生成されたコルチコステロンの濃度を測定することでACTHの活性を定量することができる(ELISA法)。結果は、精製後の複数バッチのACTHが高い生物活性と活性安定性を有することを示した。その結果を図11に示す。

【0108】

上記は、本発明の好ましい実施形態のみを示したものであり、いかなる形態でも本発明を限定するものではない。したがって、本発明の技術的本質に基づいて、本発明の技術構成の内容から逸脱することなく上記の実施形態になされた任意の単純な改変、同等な変更および修正は、依然として本発明の技術構成の範囲内にある。

10

【0109】

配列番号1(野生型TEVP)

GESLFKGPRDYNPISSSTICHLTNESDGHTTSLYGIGFGPFIITNKHLFRRNNGTLLVQSLHG
VFKVKNTTTLQQHLIDGRDMIIIRMPKDFPPFPQKLKFREPQREERICLVTTNFQTKSMSS
MVSDTSCTFPSSDGIFWKHWIQTKDQCGSPLVSTRDGFIIVGIHSASNFTNTNNYFTSVP
KNFMELLTNQEQQWVSGWGLNADSVLWGGHKVFMVKPEEPFQPVKEATQLMNELVY
SQ

配列番号2(ヒトACTHアミノ酸配列)

SYSMEHFRWGKPVGKKRKPVKVYPNGAEDESAEAFPLEF

20

配列番号3: TEVP(219V)ヌクレオチド配列

GGAGAAAGCTTGTAAAGGGACCACGTGATTACAACCCGATATCGAGCACCATTGTCA
TTTGACGAATGAATCTGATGGCACACAACATCGTTGATGGTATTGGATTGGTCCCT
TCATCATTACAAACAAGCACTTGTAAAGGAAATAATGGAACACTGTTGGTCCAATCA
CTACATGGTGTATTCAAGGTCAAGAACACCACGACTTGCACAAACACCTCATTGATGG
GAGGGACATGATAATTATCGCATGCCTAAGGATTCCCACCATTCTCAAAGCTGA
AATTTAGAGAGGCCACAAAGGGAAAGAGCGCATATGCTTGTGACAACCAACTCCAAACT
AAGAGCATGTCTAGCATGGTGTCAAGACACTAGTTGCACATTCCCTCATCTGATGGCAT
ATTCTGGAAGCATTGGATTCAAACCAAGGATGGCAGTGTGGCAGTCCATTAGTATCAA
CTAGAGATGGTTCATTGTTGGTATAACACTCAGCATCGAATTTCACCAACACAAACAT
TATTCACAAGCGTGCCAAAAACTTCATGGAATTGTTGACAATCAGGAGGCGCAGCA
GTGGGTTAGTGGTGGGATTAAATGCTGACTCAGTATTGTGGGGGCCATAAAGTT
TCATGGTAAACCTGAAGAGCCTTTCAGCCAGTTAAGGAAGCGACTCAACTCATGAAT
GAATTGGTGTACTCGCAA

30

配列番号4(4D TEVP)

GESLFKGPRDYNPISSSTICHLTNESDGHTTSLYGIGFGPFIITNKHLFRRNNGTLLVQSLHG
VFKVKNTTTLQQHLIDGRDMIIIRMPKDFPPFPQKLKFREPQREERICLVTTNFQTKSMSS
MVSDTSCTFPSSDGIFWKHWIQTKDQCGSPLVSTRDGFIIVGIHSASNFTNTNNYFTSVP
KNFMELLTNQEQQWVSGWGLNADSVLWGGHKVFMVKPEEPFQPVKEATQLMNELVY
SQ

40

配列番号5(12D TEVP)

GESLFKGPRDYNPISSSTICHLTNESDGHTTSLYGIGFGPFIITNKHLFRRNNGTLLVQSLHG
VFKVKNTTTLQQHLIDGRDMIIIRMPKDFPPFPQKLKFREPQREERICLVTTNFQTKSMSS
MVSDTSCTFPSSDGIFWKHWIQTKDQCGSPLVSTRDGFIIVGIHSASNFTNTNNYFTSVP
KNFMELLTNQEAHQWVSGWGLNADSVLWGGHKVFMVKPEEPFQPVKEATQLMNELVY
SQ

50

配列番号6(32C TEVP)

GESLFKGPRDYNPISSSTICHLTNESDGHTTSLYGIGFGPFIITNKHLFRRNNGTLLVQSLHG
VFKVKNTTTLQQHLIDGRDMIIIRMPKDFPPFPQKLKFREPQREERICHVTTNFQTKSMS

50

SMVSDTSCTFPSGDGIFWKHWIQTKDGQCGSPLVSTRDGFIIVGIHSASNFTNTNNYFTSV
PKNFIELLTNQEAAQQWVSGWGLNADSVLWGGHKVFMVKPEEPFQPVKEATQLMNELV
YSQ

配列番号 7

ENLYFQS

配列番号 8

ENLYFQH

配列番号 9

EXXYXQ(G/S)

配列番号 10 (S 2 1 9 V)

GESLFKGPRDYNPISSITCHLTNESDGHTTSLYGIGFGPFIITNKHLFRNNNGTLLVQSLHG
VFKVKNTTTLQQHLIDGRDMIIRMPKDFPPFPQKLKFREPQREERICLVTTNFQTKSMS
MVSDTSCTFPSSDGIFWKHWIQTKDGQCGSPLVSTRDGFIIVGIHSASNFTNTNNYFTSVP
KNFMELLTNQEAAQQWVSGWGLNADSVLWGGHKVFMVKPEEPFQPVKEATQLMNELVY
SQ

10

配列番号 11

EXXYXQS

配列番号 12 : s T E V (実施例で使用された T E V p 制限部位のヌクレオチド配列)

GAAAATCTGTATTTTCAGAGC

配列番号 13 : A C T H DNA ヌクレオチド配列

20

AGCTATAGCATGGAACATTTCTGTTGGGTAAACCGGTTGGTAAAAAACGTCGTCCGGT
TAAAGTTTATCCGAATGGTGCAGAAGATGAATCGGCAGAACGATTCCGCTGGAATT

配列番号 14 : T E V (4 D)

GGAGAAAGCTTGTAAAGGGACCACGTGATTACAACCCGATATCGAGCACCAATTGTCA
TTTGACGAATGAATCTGATGGGCACACAACATCGTTGTATGGTATTGGATTGGCCCT
TCATCATTACAAACAAGCACTTGTAGAAGAAATAATGGAACACTGTTGGTCCAATCA
CTACATGGTGTATTCAAGGTCAAGAACACCAACGACTTGCAACAACACCTCATTGATGG
GAGGGACATGATAATTATTCGCATGCCTAAGGATTCCCACCATTCCCTCAAAGCTGA
AATTTAGAGAGGCCACAAAGGGAGAGCGCATATGTTGTGACAACCAACTCCAAACT
AAGAGCATGTCTAGCATGGTGTAGACACTAGTTGCACATTCCCTCATCTGATGGCAA
ATTCTGGAAGCATTGGATTCAAACCAAGGATGGCAGTGTGGCAGTCCATTAGTATCAA
CTAGAGATGGTTCATTGTTGGTATACTCAGCATCGAATTTCACCAACACAAACAT
TATTCACAAGCGTGCCGAAAAACTTCATGGAATTGTTGACAATCAGGAGGCGCAGCA
GTGGGTTAGTGGTGGGATTAAATGCTGACTCAGTATTGTGGGGGCCATAAGTT
TCATGGTTAACCTGAAGAGCCTTTCAGCCAGTTAAGGAAGCGACTCAACTCATGAAT
GAATTGGTGTACTCGCAA

30

配列番号 15 : T E V (12 D)

GGAGAAAGCTTGTAAAGGGACCACGTGATTACAACCCGATATCGAGCACCAATTGTCA
TTTGACGAATGAATCTGATGGCTCACAAACATCGTTGTATGGTATTGGATTGGCCCT
TCATCATTACAAACAAGCACTTGTAGAAGAAATAATGGAACACTGTTGGTCCAATCA
CTACATGGTGTATTCAAGGTCAAGAACACCAACGACTTGCAACAACACCTCATTGATGG
GAGGGACATGATAATTATTCGCATGCCTAAGGATTCCCACCATTCCCTCAAAGCTGA
AATTTAGAGAGGCCACAAAGGGAGAGCGCATATGTTGTGACAACCAACTCCAAACT
AAGAGCATGTCTAGCATGGTGTAGACACTAGTTGCACATTCCCTCATCTGATGGCAT
ATTCTGGAAGCATTGGATTCAAACCAAGGATGGCAGTGTGGCAGTCCATTAGTATCAA
CTAGAGATGGTTCATTGTTGGTATACTCAGCATCGAATTTCACCAACACAAACAT
TATTCACAAGCGTGCCGAAAAACTTCATGGAATTGTTGACAATCAGGAGGCGCAGCA
GTGGGTTAGTGGTGGGATTAAATGCTGACTCAGTATTGTGGGGGCCATAAGTT
TCATGGTTAACCTGAAGAGCCTTTCAGCCAGTTAAGGAAGCGACTCAACTCATGAAT
GAATTGGTGTACTCGCAA

40

50

配列番号 16 : T E V (3 2 C)

GGAGAAAGCTTGTAAAGGGACCACGTGATTACAACCCGATATCGAGCACCATTGTCA
 TTTGACGAATGAATCTGATGGCACACAACATCGTTATGGTATTGGATTGGTCCCT
 TCATCATACAAACAAGCACTTGTAGAAGAAATAATGGAACACTGTTGGTCCAATCA
 CTACATGGTGATTCAAGGTCAAGAACACCACGACTTGCAACAACACCTCATTGATGG
 GAGGGACATGATAATTATCGCATGCCTAAGGATTCCCACCATTCTCAAAGCTGA
 AATTTAGAGAGCCACAAAGGGAAAGAGCGCATATGTCATGTGACAACCAACTCCAAACT
 AAGAGCATGTCTAGCATGGTGTAGACACTAGTTGCACATTCCCTCAGGTGATGGCAT
 ATTCTGGAAGCATTGGATTCAAACCAAGGATGGCAGTGTGGCAGTCCATTAGTATCAA
 CTAGAGATGGGTTATTGTTGGTATACTCAGCATCGAATTCACCAACACAAACAT
 TATTCACTAGCGTGCAGAAAAACTTCATTGAATTGTTGACAATCAGGAGGCCAGCA
 GTGGGTTAGTGGTGGGATTAAATGCTGACTCAGTATTGTTGGGGGCCATAAAGTT
 TCATGGTTAACCTGAAGAGCCTTCAAGGAAGCCACTCAACTCATGAAT
 GAATTGGTGTACTCGCAA

配列番号 17 : GenBank accession No. AAB40026.1

MGSKRSPSRHRSLLTYEVMFALFVILVALCAGLIAVSWLSIQGSVKDAFGKSHEARGLKIIISGATY
 NPHLQDKLSVDFKVLAFDIQQMIDDIFQSSNLNEYKNSRVLQFENGSIIVIFDLDQWVSDKNVKEEL
 IQGIEANKSSQLVTFHIDLNSIDITASLENFSTISPATTSEKLTTISPLATPGNVSIECPPDSRLCADAL
 KCIAIDLFCDELNCPDGSDEDNKTACACDRFLTGSSGSFEALHYPKPSNNTSAVCRWIIRVNQGLS
 IQLNFDYFNTYYADVLNIYEGMSSKILRASLWSNNPGIIRIFSNQVTATFLIQSDESVDYIGFKVYTAF
 NSKELNYYEKINCNFEDGFCFW1QDLNDDNEWERTQGSTFPSTGPTFDHTFGNESFYISTPTGPGR
 ERVGLLTLPLDPTPEQAclfWYMYGENVYKLSINISSDQNMEKTIFQKEGNYQNWNYGQVTLNETVE
 FKVSFYGFKNQILSDIALDDISLTYGICNVSVYPEPTLVPTPPPELPTDCGGPHDLWEPNTTFTSINF
 SYPNQAFCIWNLNAQKGKNIQLHFQEFDLENIADVVEIRDGEGDDSLFLAVYTGPVNDVFSTINRMTV
 LFITDNMLAKQGFKANFTTGYGLGIPEPCKEDNFQCKDGECIPLVNLCDFPHCKDGSDEAHCVRLFNGT
 TDSSGLVQFRIQSIWHVACAENWTQISDDVCQLLGLGTGNSSVPTFSTGGGPYVNLNTAPNGSLILTPS
 QQCLEDSLILLQCNYKSCGKKLVTQEVPKIVGGSDSREGAWPWWVALYFDDQQVCGASLVSRDWLVSAA
 HCVYGRNMEPSKWAVLGLHMASNLTSPQIETRLIDQIVINPHYNKRRKNNNDIAMMHLEMKVNYTDYIQP
 ICLPEENQVFPGRICSIAWGALIYQGSTADVLQEADVPLSNEKQQQMPEYNITEVMCAGYEAGGV
 DSCQGDGGPLMCQENNWRLLAGVTSFGYQCALPNRPGVYARVPRTEWIQSFLH

10

20

30

[請求項 1]

(1) プロテアーゼランダム変異ライブラリー、好ましくはプロテアーゼランダム変異ウイルスライブラリー、好ましくはプロテアーゼランダム変異ファージライブラリーを構築する工程；

(2) 前記のプロテアーゼランダム変異ライブラリー、好ましくはプロテアーゼランダム変異ウイルスライブラリー、好ましくはプロテアーゼランダム変異ファージライブラリーについて、宿主内または同様の条件下でプロテアーゼの酵素切断活性が弱く、且つ生体外変性条件下でプロテアーゼの酵素切断活性を有するプロテアーゼバリアントをスクリーニングする工程；および

(3) 必要に応じて、プロテアーゼバリアントを同定する工程を含み、ここで、前記のプロテアーゼは、好ましくは、T E V プロテアーゼまたはエンテロキナーゼである。

プロテアーゼバリアントのスクリーニング方法。

[請求項 2]

ランダム突然変異誘発キットで前記の変異ライブラリーを生成することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

[請求項 3]

40

50

工程(1)において、例えばTEVプロテアーゼテンプレート(例えば配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するS219V TEVプロテアーゼ)のような適切なプロテアーゼテンプレートをテンプレートとして、ランダム変異を行い、前記のライブラリーを構築し、

好ましくは、プロテアーゼバリアントが、宿主内または同様の条件下で、最初のプロテアーゼよりも低い酵素切断活性を有し、且つ生体外変性条件下で最初のプロテアーゼの酵素切断活性を保持し；

好ましくは、前記のTEVプロテアーゼバリアントが、宿主内または同様の条件下で、配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するS219Vプロテアーゼよりも低い酵素切断活性を有し、且つ生体外変性条件下で配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するS219Vプロテアーゼの酵素切断活性を保持する、

請求項1または2に記載の方法。

[請求項4]

プロテアーゼバリアント、好ましくはTEVプロテアーゼバリアントが、プロテアーゼ-プロテアーゼ切断配列-Y1(例えばTEVp-sTEV-Y1)を含む融合タンパク質として提示され；プロテアーゼバリアント、好ましくはTEVプロテアーゼバリアントが、ファージの表面に提示されることが好ましく；ここで、TEVpがTEVプロテアーゼであり、sTEVがTEVプロテアーゼの切断配列であり、Y1が標的タンパク質であり；好ましくは、前記のTEVプロテアーゼの切断配列がEXXYXQG/S/Hであり、ここで、Xが任意のアミノ酸残基であり、好ましくは、前記のTEVプロテアーゼの切断配列が配列番号7および8から選択される、

前記の請求項のいずれかに記載の方法。

[請求項5]

宿主内で、前記のプロテアーゼバリアント、好ましくはTEVプロテアーゼバリアントのN末端に、直接的、またはリンカーを介して間接的に部分Aを付加することを含み、ここで、好ましくは、前記の部分Aが、親和性タグ、ビオチン、抗体、抗原、ハプテン、ポリストレプトアビジン、リガンド、受容体、核酸、酵素、基質およびアブタマーのうちの1つである、

前記の請求項のいずれかに記載の方法。

[請求項6]

前記のプロテアーゼに適した生体外条件下で、部位Aに特異的な部位Bを固定化した固体支持体とともに、部分Aを付加したファージライブラリーを一定期間インキュベートし、標的ファージを含む溶液と支持体とを分離することを含み、必要に応じて、前記の標的ファージのスクリーニングを1回以上繰り返し、

ここで、好ましくは、前記の部分Bが部分Aに特異的に結合するという条件で、部分Bが、ビオチン、抗体、抗原、ハプテン、ポリストレプトアビジン、リガンド、受容体、核酸、酵素、基質およびアブタマーのうちの1つである、

前記の請求項のいずれかに記載の方法。

[請求項7]

プロテアーゼ、好ましくはTEVプロテアーゼが、Avi-プロテアーゼ-プロテアーゼ切断部位-Y1-PIII、好ましくはpHEN1-Avi-TEVp-sTEV-Y1構築物を介してAvi-TEVp-sTEV-Y1-PIIIとして、ファージP IIIタンパク質の末端に提示され、ここで、Aviタグが15個のアミノ酸残基GLNDIFEAQKIEWHからなる短いペプチドタグであり；好ましくは、前記のTEVプロテアーゼの切断配列がEXXYXQG/S/Hであり、ここで、Xが任意のアミノ酸残基であり、好ましくは、前記のTEVプロテアーゼの切断配列が配列番号7および8から選択され；

好ましくは、前記の酵素切断活性が、前記のプロテアーゼおよびその切断配列(例えばプロテアーゼ-プロテアーゼ切断配列-Y1)を含む融合タンパク質、好ましくは前記のTEVプロテアーゼバリアントおよびその切断配列を含む融合タンパク質、好ましくはT

10

20

30

40

50

E V p - s T E V - Y 1 に対して測定されるものであり；

好ましくは、前記のスクリーニングが、宿主内で前記のプロテアーゼ、好ましくは T E V プロテアーゼランダム変異ファージライブラリーをビオチン化することを含み；

好ましくは、前記のスクリーニングが、ビオチン化されたファージライブラリーをストレプトアビジン磁気ビーズで処理し、磁気ビーズによって捕捉されたファージを中／高濃度の尿素中で一定期間インキュベートし、標的ファージを含む溶液から磁気ビーズを分離することを含み、必要に応じて、前記の標的ファージのスクリーニングを 1 回以上繰り返し；

好ましくは、前記のライブラリーが、コロニー P C R によって検証され、好ましくは、前記のコロニー P C R に使用されるプライマーが、

10 フォワードプライマー： 5' - C C A C C A T G G C C G G T C T G A A T G A T A T T
T T T G A A G C - 3'

リバースプライマー： 5' - T T G T T C T G C G G C C G C A A A T T C C A G C - 3'
であり；

好ましくは、ライブラリーの容量は 1×10^9 以上、好ましくは 2×10^9 であり；好ましくは、全体の変異頻度は 1 . 5 ~ 7 個 / k b の中／低程度である、

前記の請求項のいずれかに記載の方法。

[請求項 8]

Y 1 がヒトまたはブタの A C T H または G L P - 1 であり、好ましくは、前記の宿主が大腸菌である、

前記の請求項のいずれかに記載の方法。

[請求項 9]

前記の生体外変性条件が中／高程度の変性条件であり、好ましくは 3 M ~ 5 M の尿素、好ましくは 3 . 5 M ~ 4 . 5 M の尿素、より好ましくは 4 M の尿素または 1 M ~ 2 M のグアニジン塩酸塩、好ましくは 1 . 5 M のグアニジン塩酸塩の条件である、

前記の請求項のいずれかに記載の方法。

[請求項 10]

前記のプロテアーゼバリアントは、宿主での発現において低い酵素切断活性を有し、好ましくは、前記の T E V プロテアーゼバリアントは、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を有する S 2 1 9 V バリアントよりも低い酵素切断活性を有し、前記の T E V プロテアーゼバリアントの切断配列は E X X Y X Q G / S / H から選択され、ここで、X が任意のアミノ酸残基であり、好ましくは、前記の T E V プロテアーゼの切断配列は、配列番号 7 および 8 から選択され；好ましくは、前記のプロテアーゼバリアントまたは T E V プロテアーゼバリアントは、中／高程度の変性条件下、好ましくは 3 M ~ 5 M の尿素、好ましくは 3 . 5 M ~ 4 . 5 M の尿素、より好ましくは 4 M の尿素または 1 M ~ 2 M のグアニジン塩酸塩、好ましくは 1 . 5 M のグアニジン塩酸塩の生体外環境下で、最初のプロテアーゼ（例えば S 2 1 9 V プロテアーゼ）の生体外酵素切断活性を保持し；好ましくは、前記の酵素切断活性は、前記のプロテアーゼバリアントおよびその切断配列（例えばプロテアーゼ - プロテアーゼ切断配列 - Y 1 ）を含む融合タンパク質、好ましくは前記の T E V プロテアーゼバリアントおよびその切断配列を含む融合タンパク質に対して測定されるものであり、好ましくは、前記の T E V プロテアーゼの切断配列が E X X Y X Q G / S / H であり、ここで、X が任意のアミノ酸残基であり、好ましくは、前記の T E V プロテアーゼの切断配列は配列番号 7 および 8 から選択される、

前記の請求項のいずれかに記載の方法によって得られるプロテアーゼバリアント。

[請求項 11]

前記の T E V プロテアーゼバリアントが、

配列番号 1 に示される配列の第 1 1 1 位に対応する位置でのロイシン (L) からフェニルアラニン (F) またはヒスチジン (H) への変異、

配列番号 1 に示される配列の第 1 3 8 位に対応する位置でのイソロイシン (I) からリジン (K) への変異、

10

20

30

40

50

配列番号 1 に示される配列の第 28 位に対応する位置でのヒスチジン (H) からロイシン (L) への変異、

配列番号 1 に示される配列の第 196 位に対応する位置でのグルタミン酸 (Q) からヒスチジン (H) への変異、

配列番号 1 に示される配列の第 135 位に対応する位置でのセリン (S) からグリシン (G) への変異、および

配列番号 1 に示される配列の第 187 位に対応する位置でのメチオニン (M) からイソロイシン (I) への変異からなる群から選択される 1 つまたは複数の変異を含み；

好ましくは、前記の TEV プロテアーゼバリアントが、

配列番号 1 に示される配列の第 111 位に対応する位置でのロイシン (L) からフェニルアラニン (F) への変異、および配列番号 1 に示される配列の第 138 位に対応する位置でのイソロイシン (I) からリジン (K) への変異；

配列番号 1 に示される配列の第 28 位に対応する位置でのヒスチジン (H) からロイシン (L) への変異、配列番号 1 に示される配列の第 111 位に対応する位置でのロイシン (L) からフェニルアラニン (F) への変異、および配列番号 1 に示される配列の第 196 位に対応する位置でのグルタミン酸 (Q) からヒスチジン (H) への変異；ならびに

配列番号 1 に示される配列の第 111 位に対応する位置でのロイシン (L) からヒスチジン (H) への変異、配列番号 1 に示される配列の第 135 位に対応する位置でのセリン (S) からグリシン (G) への変異、および配列番号 1 に示される配列の第 187 位に対応する位置でのメチオニン (M) からイソロイシン (I) への変異からなる群から選択される変異の組合せを含み；

好ましくは、前記の TEV プロテアーゼバリアントが、配列番号 1 に示される配列の第 219 位に対応する位置でのセリン (S) からバリン (V) への変異を含み；

好ましくは、前記の TEV プロテアーゼバリアントが、宿主での発現において低い酵素切断活性を有し、好ましくは配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を有する S219V バリアントよりも低い酵素切断活性を有すること、および / または前記の TEV プロテアーゼバリアントが、中 / 高程度の変性条件下で、好ましくは 3M ~ 5M の尿素、好ましくは 3.5M ~ 4.5M の尿素、より好ましくは 4M の尿素または 1M ~ 2M のグアニジン塩酸塩、好ましくは 1.5M のグアニジン塩酸塩の生体外環境下で、高い酵素切断活性を有し、好ましくは S219V バリアントの生体外酵素切断活性を保持することという条件下で、前記の TEV プロテアーゼバリアントが、上記の変異以外の 1 つまたは複数の変異をさらにを含む、

請求項 10 に記載のプロテアーゼバリアント。

[請求項 12]

前記の相同体が、配列番号 4、5 または 6 と少なくとも 90%、好ましくは少なくとも 95%、より好ましくは少なくとも 98%、最も好ましくは少なくとも 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；

好ましくは、前記の相同体が、配列番号 4、5 または 6 と比較して、少なくとも 1 個、好ましくは少なくとも 2 個、より好ましくは少なくとも 3 個、最も好ましくは少なくとも 4 個のアミノ酸部位の置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含み、

好ましくは、前記の相同体が、宿主での発現において低い酵素切断活性を有し、好ましくは、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を有する S219V バリアントよりも低い酵素切断活性を有し、および / または前記の TEV プロテアーゼバリアントが、中 / 高程度の変性条件下で、好ましくは 3M ~ 5M の尿素、より好ましくは 3.5M ~ 4.5M の尿素、より好ましくは 4M の尿素または 1M ~ 2M のグアニジン塩酸塩、好ましくは 1.5M のグアニジン塩酸塩の生体外環境下で、S219V バリアントの生体外酵素切断活性を保持する、

請求項 10 または 11 に記載のプロテアーゼバリアント。

[請求項 13]

請求項 10 ~ 12 のいずれかに記載のプロテアーゼバリアントを含む融合タンパク質で

10

20

30

40

50

あって、

好ましくは、前記の融合タンパク質は、プロテアーゼ - プロテアーゼ切断配列 - Y 1、好ましくは T E V p - s T E V - Y 1 の構造を含み、ここで、Y 1 は、標的ポリペプチドであり；T E V p は、請求項 10 ~ 12 のいずれかに記載の T E V プロテアーゼバリアントであり；s T E V は、T E V プロテアーゼの切断配列である E X X Y X Q G / S であり、ここで、X は任意のアミノ酸残基であり、好ましくは、前記の切断配列は配列番号 7 および 8 から選択され；好ましくは、前記の標的ポリペプチドは、A C T H、G L P - 1 / G L P - 2、I F N - 、I F N - 、H i s t a t i n、C C L 5、S D F - 1 、I G F - 1、L e p t i n、B N P、E x - 4 からなる群から選択され、好ましくは A C T H であり、好ましくはヒト A C T H であり、より好ましくは配列番号 2 に示されるアミノ酸配列のヒト A C T H であり；好ましくは、プロテアーゼバリアント（例えば T E V p ）はプロテアーゼバリアント切断配列（例えば s T E V ）を認識して切断することができるという条件下で、プロテアーゼバリアントおよびプロテアーゼバリアント切断配列（例えば T E V p および s T E V ）は直接接続され、または 1 つまたは複数のアミノ酸残基を介して接続され；好ましくは、プロテアーゼバリアント（例えば T E V p ）はプロテアーゼバリアント切断配列（例えば s T E V ）を認識して切断することができるという条件下で、プロテアーゼバリアント切断配列（例えば s T E V ）および Y 1 は直接接続され、または 1 つまたは複数のアミノ酸残基を介して接続され、好ましくは、プロテアーゼバリアント切断配列（例えば s T E V ）および Y 1 は直接接続され；好ましくは、前記の融合タンパク質は、タグをさらに含み、好ましくは、前記のタグは、精製タグであり；好ましくは、前記のタグは、H i s タグ、マルトース結合タンパク質（M B P）タグ、グルタチオン S - トランスフェラーゼ（G S T）タグ、N u s A タグ、S U M O タグ、A v i タグ、T 7 タグ、S タグ、F l a g タグ、H A タグ、c - m y c タグ、または S t r e p I I タグからなる群から選択され；好ましくは、前記のタグは、融合タンパク質の N 末端および / または C 末端にあり、或いは T E V p の N 末端にタグはない、

融合タンパク質。

[請求項 14]

請求項 10 ~ 12 のいずれかに記載のプロテアーゼバリアント、または請求項 13 に記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列であって、

好ましくは配列番号 14 ~ 16 から選択される、

ポリヌクレオチド配列。

[請求項 15]

請求項 14 に記載のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド構築物。

[請求項 16]

請求項 14 に記載のポリヌクレオチド配列、または請求項 15 に記載のポリヌクレオチド構築物を含む発現ベクターであって、

好ましくは、前記の発現ベクターが真核生物発現ベクターまたは原核生物発現ベクターであり；好ましくは、p R S 3 1 4、p Y E S 2、バキュロウイルス - S 2 発現系および p c D N A 3 . 1 からなる群から選択され、或いは、好ましくは、p E T 系発現ベクター、p Q E 系発現ベクターおよび p B A D 系発現ベクターからなる群から選択される、
発現ベクター。

[請求項 17]

請求項 14 に記載のポリヌクレオチド配列、または請求項 15 に記載のポリヌクレオチド構築物、または請求項 16 に記載の発現ベクターを含む細胞であって；

好ましくは、前記の真核細胞が、サッカロマイセス・セレビシエ、昆虫細胞発現系からなる群から選択され；好ましくは、前記の原核細胞が、B L 2 1、B L 2 1 (D E 3)、B L 2 1 (D E 3) p L y s S、R o s e t t a 2、R o s e t t a 2 p L y s S、T uner (D E 3)、または O r i g a m i 2 からなる群から選択される、
細胞。

[請求項 18]

10

20

30

40

50

請求項 10～12 のいずれかに記載のプロテアーゼバリアント、好ましくは T E V プロテアーゼバリアントを調製する方法であって、

(1) 請求項 17 に記載の細胞の培養に適した条件下で、培地中で前記の細胞を培養すること；

(2) 培地を回収するか、または細胞を溶解して、ライセートを回収すること；

(3) 精製して前記のプロテアーゼバリアント、好ましくは T E V プロテアーゼバリアントを得ることを含む、

プロテアーゼバリアント、好ましくは T E V プロテアーゼバリアントの調製方法。

[請求項 19]

標的ポリペプチドの調製における、請求項 10～12 のいずれかに記載のプロテアーゼバリアント、好ましくは T E V プロテアーゼバリアントの使用であって、

ここで、前記のプロテアーゼバリアント、好ましくは T E V プロテアーゼバリアントおよび前記の標的ポリペプチドが、融合タンパク質として発現され、好ましくは、前記の融合タンパク質が請求項 13 に記載の融合タンパク質である、

プロテアーゼバリアント、好ましくは T E V プロテアーゼバリアントの使用。

[請求項 20]

標的ポリペプチドを調製する方法であって、

(1) 請求項 13 に記載の融合タンパク質を適当な条件下で培地中で培養すること；

(2) 融合タンパク質の封入体を得ること；

(3) 約 8 M の尿素または約 6 M のグアニジン塩酸塩のような高変性条件下で、封入体を溶解すること；

(4) 中／高程度変性条件下で、好ましくは 3 M～5 M 尿素、好ましくは 3.5 M～4.5 M 尿素、より好ましくは 4 M 尿素または 1 M～2 M グアニジン塩酸塩、好ましくは 1.5 M グアニジン塩酸塩の条件下で、一定の温度、例えば 20～40℃、好ましくは 25℃、例えば 10～24 時間、例えば 12 時間インキュベートすること；

(5) 緩衝液、例えば Tris-HCl、好ましくは 50 mM の Tris-HCl で希釈した後、プロテアーゼバリアント、好ましくは T E V プロテアーゼを沈殿させること；

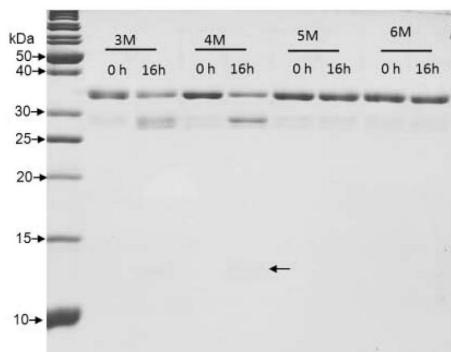
(6) プロテアーゼバリアント、好ましくは T E V プロテアーゼの沈殿物を遠心分離で除去し、前記の標的ポリペプチドを得ること；

(7) 前記の標的ポリペプチドを精製し、ここで、前記の精製が、塩析、限外濾過、有機溶媒沈殿、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーカラム、逆相高速液体クロマトグラフィーからなる群から選択される技術によって実施されることを含む、

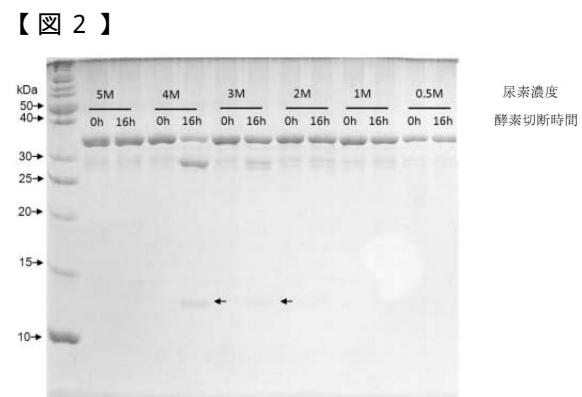
標的ポリペプチドの調製方法。

【図面】

【図 1】



尿素濃度
酵素切断時間



尿素濃度
酵素切断時間

10

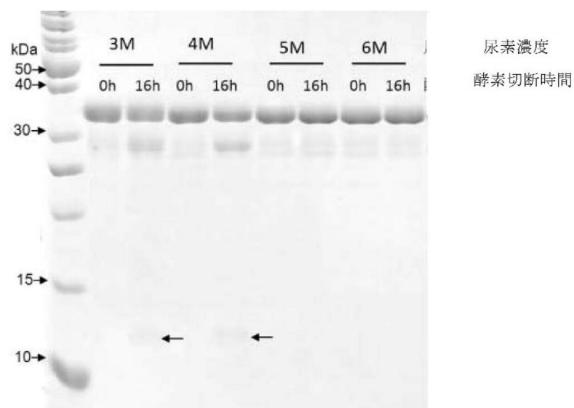
20

30

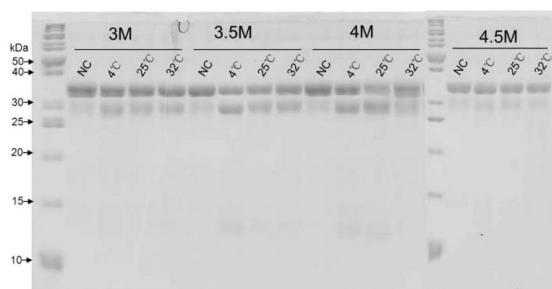
40

50

【図3】

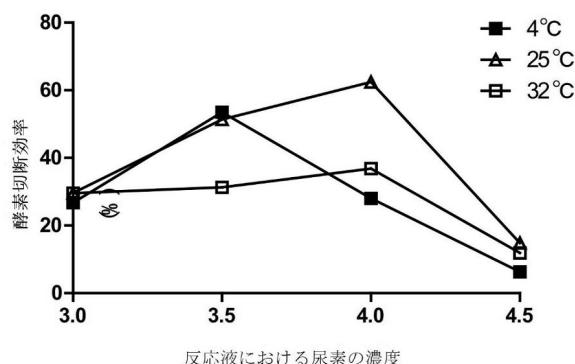


【図4 A】

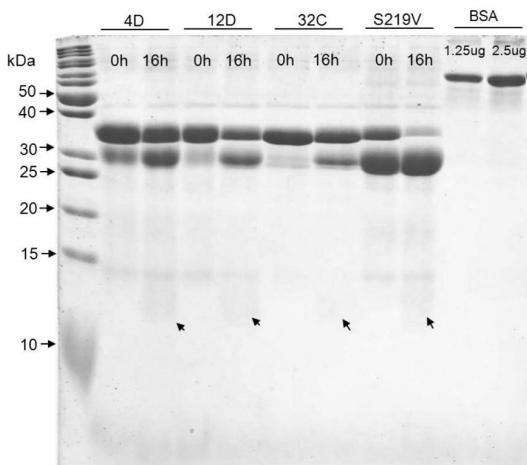


10

【図4 B】



【図5】



20

30

40

50

【図6】

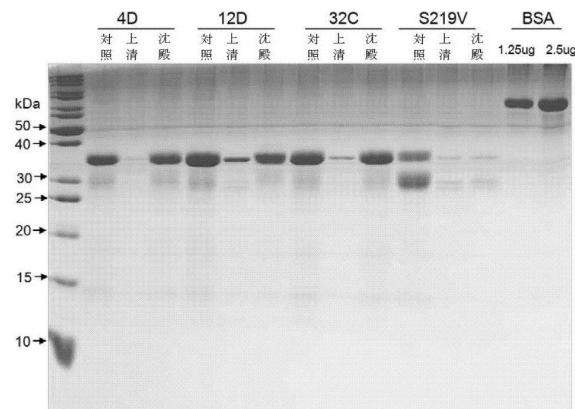
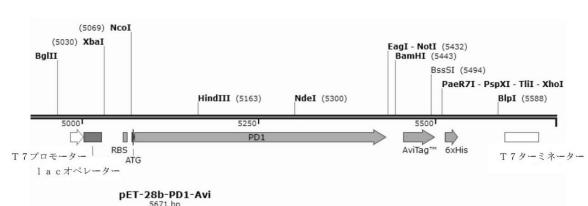


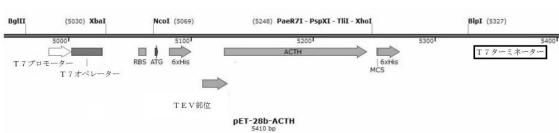
図6

【図7】



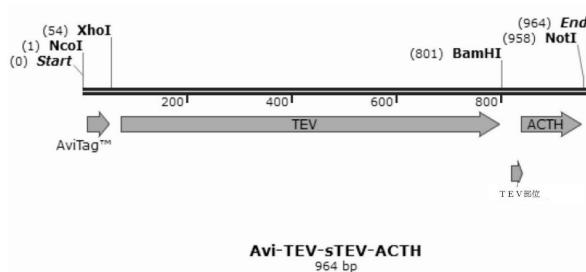
10

【図8】



20

【図9】

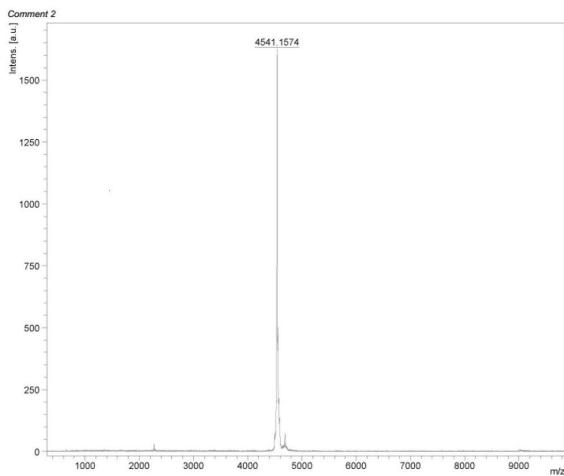


30

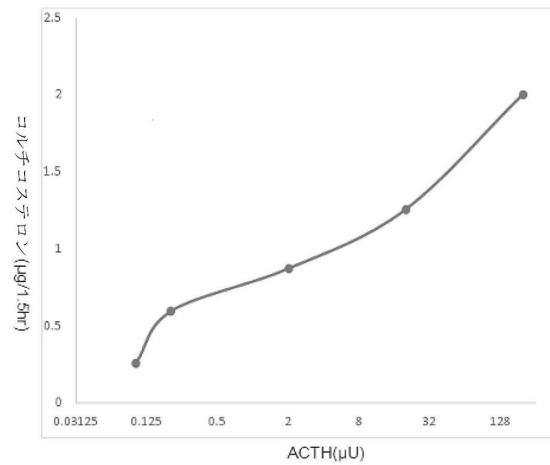
40

50

【図 1 0】



【図 1 1】



10

【配列表】

0007386552000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I		
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705
C 1 2 N	15/115 (2010.01)	C 1 2 N	15/115
C 1 2 N	15/57 (2006.01)	C 1 2 N	15/57
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686
C 0 7 K	14/605 (2006.01)	C 0 7 K	14/605
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21

(33)優先権主張国・地域又は機関

中国(CN)

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100126778

弁理士 品川 永敏

(74)代理人 100162695

弁理士 釜平 双美

(74)代理人 100156155

弁理士 水原 正弘

(74)代理人 100162684

弁理士 吳 英燦

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(72)発明者 劉 日魁

中華人民共和国 3 3 4 0 0 0 江西省上饒市上饒經濟技術開發区管委会登峰大厦 1802 室

(72)発明者 鄭 曉龍

中華人民共和国 3 3 4 0 0 0 江西省上饒市上饒經濟技術開發区管委会登峰大厦 1802 室

(72)発明者 万 江華

中華人民共和国 3 3 4 0 0 0 江西省上饒市上饒經濟技術開發区管委会登峰大厦 1802 室

審査官 山内 達人

特表 2013 - 517797 (JP, A)

米国特許出願公開第 2010 / 0035300 (US, A1)

特表 2013 - 513385 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q

C 1 2 N

C 0 7 K

C 4 0 B 4 0 / 0 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)