

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4597454号
(P4597454)

(45) 発行日 平成22年12月15日 (2010.12.15)

(24) 登録日 平成22年10月1日 (2010.10.1)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A O 1 H 5/00 (2006.01)

A O 1 H 5/00 A

A O 1 K 67/027 (2006.01)

A O 1 K 67/027

A 2 3 J 3/06 (2006.01)

A 2 3 J 3/06

A 2 3 L 1/00 (2006.01)

A 2 3 L 1/00 F

請求項の数 52 (全 87 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-537357 (P2001-537357)
 (86) (22) 出願日 平成12年11月10日 (2000.11.10)
 (65) 公表番号 特表2003-516730 (P2003-516730A)
 (43) 公表日 平成15年5月20日 (2003.5.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/030791
 (87) 国際公開番号 W02001/034646
 (87) 国際公開日 平成13年5月17日 (2001.5.17)
 審査請求日 平成18年7月19日 (2006.7.19)
 (31) 優先権主張番号 60/165,114
 (32) 優先日 平成11年11月12日 (1999.11.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/204,437
 (32) 優先日 平成12年5月15日 (2000.5.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501093088
 ファイブローゲン、インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 94080 カリフォル
 ニア州、サウス サン フランシスコ、ゲ
 ートウェイ ブールバード 225
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (72) 発明者 チャン, ロバート, シイ.
 アメリカ合州国 94010 カリフォル
 ニア州 バーリングゲーム, エッジコート
 ドライブ 2155

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えゼラチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

均一な分子量の組換えヒトゼラチンポリペプチドからなる組換えゼラチンを含む組成物。

【請求項 2】

組換えゼラチンが約 5 kDa、約 8 kDa、約 9 kDa、約 14kDa、約 16kDa、約 22kDa、約 23kDa、約 36kDa、約 44kDa、および約 65kDa からなる群より選択される分子量を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

組換えゼラチンが 50、100、150、200、250、および 300 からなる群より選択されるブルーム強度を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

組換えゼラチンが 0 ~ 100 のブルーム強度を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

組換えゼラチンが他のどのようなコラーゲンも含まない 1 つの型のコラーゲンから誘導されたものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

1 つの型のコラーゲンが I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型、VI 型、VII 型、VIII 型、IX 型、X 型、XI 型、XII 型、XIII 型、XIV 型、XV 型、XVI 型、XVII 型、XVIII 型、XIX 型、および XX 型コラーゲンからなる群より選択される、請求項 5 に記載の組成物。

10

20

【請求項 7】

組換えゼラチンの内毒素レベルが1.000EU/mgより低い、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

組換えゼラチンの内毒素レベルが0.500EU/mgより低い、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

組換えゼラチンの内毒素レベルが0.050EU/mgより低い、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

組換えゼラチンの内毒素レベルが0.005EU/mgより低い、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

組換えゼラチンが配列番号15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、31、および33からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 に記載の組成物。 10

【請求項 12】

配列番号15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、31、および33からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする、単離および精製されたポリヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項 12 に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

【請求項 14】

請求項 12 に記載のポリヌクレオチドを含有する宿主細胞。

【請求項 15】

原核細胞である、請求項 14 に記載の宿主細胞。 20

【請求項 16】

真核細胞である、請求項 14 に記載の宿主細胞。

【請求項 17】

真核宿主細胞が酵母細胞、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、および真菌細胞からなる群より選択される、請求項 16 に記載の真核宿主細胞。

【請求項 18】

請求項 12 に記載のポリヌクレオチドを含有するトランスジェニック動物。

【請求項 19】

請求項 12 に記載のポリヌクレオチドを含有するトランスジェニック植物。 30

【請求項 20】

組換えゼラチンが配列番号26、27、28、および29からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 21】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む結合剤。

【請求項 22】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含むカプセル材料。

【請求項 23】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む安定剤。

【請求項 24】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む皮膜形成剤。 40

【請求項 25】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む保湿剤。

【請求項 26】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む乳化剤。

【請求項 27】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む増粘剤。

【請求項 28】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含むゲル化剤。

【請求項 29】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含むコロイド剤。 50

【請求項 3 0】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む接着剤。

【請求項 3 1】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む医薬組成物。

【請求項 3 2】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含むハードゲルカプセル。

【請求項 3 3】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含むソフトゲルカプセル。

【請求項 3 4】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む血漿増量剤。

10

【請求項 3 5】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含むコロイド容積置換材料。

【請求項 3 6】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含むグラフトコーティング剤。

【請求項 3 7】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む医療用スポンジ。

【請求項 3 8】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む医療用プラグ。

【請求項 3 9】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む医薬用安定剤。

20

【請求項 4 0】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含むマイクロキャリアー。

【請求項 4 1】

(a) 請求項 1 に記載の組成物、および、

(b) 該組成物を被験者に送達するための器具、

を含んでなるキット。

【請求項 4 2】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む食用組成物。

【請求項 4 3】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含むタンパク質補助剤。

30

【請求項 4 4】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む脂肪代替品。

【請求項 4 5】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む栄養補助剤。

【請求項 4 6】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む食用コーティング剤。

【請求項 4 7】

部分的にヒドロキシル化された請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む写真用組成物。

【請求項 4 8】

完全にヒドロキシル化された請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む写真用組成物。

40

【請求項 4 9】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む化粧用組成物。

【請求項 5 0】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む工業用組成物。

【請求項 5 1】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む細胞培養組成物。

【請求項 5 2】

請求項 1 に記載の組換えヒトゼラチンを含む実験用組成物。

50

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、組換えゼラチン、組換えゼラチンを含む組成物および作用剤、組換えゼラチンの調製方法、ならびに、これらのゼラチンを様々な用途で使用するものに関するものである。

【0002】

発明の背景

ゼラチンは、動物の主要な構造・結合タンパク質であるコラーゲンの誘導体である。ゼラチンはコラーゲンの変性から誘導されるもので、Gly-X-Y反復配列（ここで、XおよびYはほとんどプロリンおよびヒドロキシプロリン残基であることが多い）をもつポリペプチド配列を含む。これらの配列は三重らせん構造に寄与し、ゼラチンポリペプチドのゲル化能に影響を及ぼす。現在入手できるゼラチンは動物の皮革と骨（典型的には、ウシおよびブタの供給源）の加工処理を経て抽出されている。ゼラチンは、その生物物理的性質により、多種多様な用途および産業において汎用される万能材料となっている。例えば、ゼラチンは数多くの医薬品、写真製品、工業製品、化粧品、食品および飲料、ならびに製造方法において広く用いられている。したがって、ゼラチンは商業的に価値のある多用途製品である。

【0003】

ゼラチンの製造

ゼラチンは一般的にウシおよびブタ源（特に、皮革と骨）からの天然のコラーゲンより製造される。場合によっては、ゼラチンを、例えば、魚、ニワトリ、ウマなどの供給源から抽出することもできる。典型的なゼラチン製造用の、ウシの皮革や骨のような原料は、政府により承認された検査を受けてヒト消費用に合格した動物に由来するものである。この原料の感染性に対しては、例えば、伝染性海綿状脳症(TSE)、特にウシ海綿状脳症(BSE)、スクレイビーなどの混入病原体の存在のために、関心がもたれている（例えば、Rohwer, R.G. (1996), Dev Biol Stand 88:247-256を参照のこと）。こうした問題は製薬および医療用途で使用するゼラチンにとって特に重大である。

【0004】

近年、これらの材料（その大部分はウシ源に由来するものであるが）の安全性についての関心が高まってきており、様々なゼラチン含有製品は、ヒトの致死的な神経疾患である新型クロイツフェルト・ヤコブ病(nvCJD)に関連したウシ海綿状脳症(BSE)の伝染のリスクを減らすための、いくつかの規制措置の中心になっている。動物の組織や骨からゼラチンを抽出する過程で現在用いられている精製工程は、SE混入組織（すなわち、脳組織など）による感染の可能性を除くのに十分ではないという懸念がある。米国や欧州の製造業者は、動物またはヒトの食品、あるいは製薬、医療または化粧品の分野で用いられるゼラチン用の原料は、次第にその数が増しているBSE諸国から得られたものであってはならない、と取り決めている。さらに、ゼラチンの製造にはある種の材料（例えば、ウシの脳組織）を使わないという制約がある。

【0005】

現在の精製プロセスはいくつかの精製・洗浄工程を含み、苛酷で非常に長ったらしい抽出法を必要とする。動物の皮革と骨を溶出(rendering)工程で処理し、溶出した材料を各種の化学的処理にかける（高酸性または高アルカリ性条件に長時間さらす）。多くの精製工程では、洗浄、濾過、様々な熱処理が必要となる。酸による無機物の除去および石灰による処理を行なって、非コラーゲン性タンパク質のような不純物を除去する。骨は脱脂しなければならない。この材料をさらに精製するために、上記工程に更なる洗浄・濾過工程、イオン交換、その他の化学的および滅菌的処理を加える。その上、かかる処理の後にも汚染物や不純物がまだ残っていることがあり、それゆえ、得られたゼラチン製品は一般的に清澄化、精製、時には更なる濃縮を行ってから使用に供しなければならない。

【0006】

商用ゼラチンは通常 A 型または B 型として分類される。これらの分類は抽出工程の一部として行なう予備処理抽出源を反映したものである。一般に、A 型は酸で処理した材料（通常、ブタの皮革）から誘導され、B 型はアルカリまたは石灰で処理した材料（通常、ウシの骨（骨素：ossein）と皮革）から誘導される。

【 0 0 0 7 】

A 型ゼラチンを抽出する場合には、一般に、新鮮なまたは凍結したブタ皮革を水で連続的に洗浄し、希酸で処理する必要がある。酸処理した皮革を再度洗浄してから、反復抽出工程にかけるが、この工程では温水で処理して存在するコラーゲンを部分的に加水分解する。得られた抽出物（希薄なゼラチン溶液）を濾過し、蒸発させ、得られた濃縮液を冷却してゲルにする。続いてそのゲルをトンネル乾燥機、連続乾燥機または他の乾燥装置で処理する。

10

【 0 0 0 8 】

石灰処理法では、提供動物の刈り込んだ皮革を洗浄し、次いで石灰で処理すると B 型ゼラチンが得られる。石灰処理には 1 ～ 3 ヶ月もの長い期間を要し、通常約 60 日かかる。石灰処理した皮革を洗浄し、希酸で処理する。次に、この皮革を温水で加水分解し、得られた抽出物を、酸処理法に関して上述したように処理する。

【 0 0 0 9 】

B 型ゼラチンは骨素源からも処理することができる。硬骨を洗浄し、脱脂し、塩酸などの希酸で連続処理して浸出する。骨の無機質分は酸処理により反応するので、これを酸溶液と共に除去し、骨素つまり無機質を取り除いた骨をあとに残す。この有機骨物質を、残留する酸を洗浄して除いてから、保存のために乾燥するか、直ちに石灰で処理する。石灰処理後、ウシ皮革からのゼラチン製造に関して上述したように骨素を処理する。あらゆる場合に、最終的な濾過、無機質除去、濃縮および乾燥工程の後、得られたゼラチン製品をバッチごとに分けて、様々な物理的、化学的および細菌学的検査にかけて等級および純度を決定し、商業上の必要性に応じて粉碎し、ブレンドする。A 型および B 型の両方の抽出法とも、得られるゼラチン製品は典型的には 2,3 千ダルトンから数十万ダルトンまでの大きさのゼラチン分子の混合物から成っている。

20

【 0 0 1 0 】

魚のゼラチンはゲル化型または非ゲル化型に分類され、典型的には A 型ゼラチンとして処理されるものであるが、これもまた幾つかの商業用途に使われている。ゲル化型は通常温水に生息している魚の皮膚から誘導され、一方非ゲル化型は冷水魚から誘導される。魚のゼラチンはアミノ酸組成が広範囲に変化しており、典型的にはプロリンおよびヒドロキシプロリン残基の割合がより低いという点で動物のゼラチンと相違する。動物のゼラチンとは対照的に、魚のゼラチンは典型的には、匹敵する平均分子量でさえも、かなりの低温で液体のままである。他の動物のゼラチンと同様、魚のゼラチンも魚の皮膚を処理し、続いて加水分解することにより抽出される。この場合も、動物の抽出法と同様、均質性を欠く製品が得られる。

30

【 0 0 1 1 】

要約

ゼラチンは広範な用途において使用される不可欠な製品である。ゼラチンの多様な用途はこの偏在するタンパク質の混合物の様々な特徴および性質によるものである。現在の抽出法からは、いろいろな範囲の分子量分布を有するポリペプチドを含む不均質なタンパク質の混合物からなるゼラチン製品が得られる。そして所望の用途で使用するのに適した物理的性質をもつゼラチン混合物を得るためには、種々のロットの製品をブレンドすることが時に必要となる。

40

【 0 0 1 2 】

より均質な製品、そしてより再現性のある手段で製造された製品が望ましいだろう。再現性のある物理的性質をもつ均質な材料の入手可能性は、例えば、特定の性質（一定の分子量範囲など）を備えたゼラチンの入手可能性が再現性のある制御された性能を可能にする場合に、様々な製品および方法において望ましいだろう。したがって、制御された性質を

50

有する均質な製品を提供できる、信頼性および再現性のあるゼラチン製造法の必要性が存在する。

【 0 0 1 3 】

加えて、医薬品、化粧品、食品および飲料産業においては、特に、動物源（例えば、ウシやブタの骨および組織）から抽出により得られるもの以外のゼラチンの供給源が必要とされている。さらに、現在入手できるゼラチンは骨や組織などの動物源から製造されているので、ゼラチン含有製品の望ましくない免疫原性および感染性に関する問題がある（例えば、Sakaguchi, M.ら (1999) J. Aller. Clin. Immunol. 104:695-699; Miyazawaら (1999) Vaccine 17:2176-2180; Sakaguchiら (1999) Immunology 96:286-290; Kelso (1999) J. Aller. Clin. Immunol. 103:200-202; Asher (1999) Dev Biol Stand 99:41-44; およ

10

Verdrager (1999) Lancet 354:1304-1305を参照のこと）。加えて、動物源（組織や骨など）からの抽出を経ない代替材料の入手可能性は倫理上、宗教上および社会上の問題を解決するだろう。例えば、動物源（組織や骨など）からの抽出を必要としない組換え材料は、Kosher and Halal法に従う人々のような、食物を制限している人々が使用するのに適した食品および他の経口摂取される製品（例えば、カプセル入りの薬）の製造に使用することができよう。

【 0 0 1 4 】

ゼラチン製造業者や最終ユーザーは現在利用されている動物源からのゼラチンに代わるいくつかの天然および合成代替品を探し求めて検討してきたが、普遍的な代替品はまだ見つかっていない。少数の用途に適した代替品は確認されていて、例えば、VCAPSカプセル(CAPSUGEL; Morris Plains, NJ)においてセルロース系原料が使用されており、また、写真乳剤においてはマウスおよびラットのカラーゲン配列からの非天然ゼラチン様タンパク質の使用が提案されている（例えば、Werten, M.W.ら (1999) Yeast 15:1087-1096; および De Wolf, Antonら, 欧州特許出願第EP1014176A2号を参照のこと）。しかし、ゼラチンをベースとした方法および製品の大多数では、この重要な材料の性能特性が再現されておらず、代替品は採用されていない。かくして、得られる製品が所望の性能特性を備えた合理的代替品として機能しうる、再現性のある合成的手法でゼラチンを製造するための手段が必要とされている。

20

【 0 0 1 5 】

要するに、ゼラチンの性能特性を提供すると同時に、より再現性のある制御された製品の供給源を可能にする普遍的な置換材料の必要性が存在する。また、苛酷で長ったらしい処理加工を必要としないゼラチンの調製方法、およびより均質な製品をもたらしかつ多様な用途に適する様々な型のゼラチンを多量にかつ安定に調製できるゼラチンの製造方法が必要とされている。いろいろな用途にすぐに対応できかつ既存の健康上およびその他の問題に答える多用途ゼラチン製品の必要性が叫ばれている。

30

【 0 0 1 6 】

本発明は、これらおよび他の必要性を、現在ゼラチンが使用されている極めて多岐にわたる範囲の用途に適した、組換え法で得られた、普遍的な置換材料を提供することによって解決するものである。かかる材料は、特定の用途にふさわしい性質および特性を備えるように設計され、かくして、これまでは入手可能でない新しい性質および用途を提供することができ

40

【 0 0 1 7 】

発明の概要

本発明は、組換えゼラチン、組換えゼラチンを含む組成物および作用剤、組換えゼラチンの調製方法ならびに使用方法に関する。

【 0 0 1 8 】

一つの態様において、本発明は組換えゼラチンを含む組成物を提供する。一実施形態では、組換えゼラチンは、約 5 kDa、8 kDa、9 kDa、14kDa、16kDa、22kDa、23kDa、36kDa、44 kDa、および65kDaからなる群より選択される分子量を有する。別の実施形態では、組換えゼラチンは、約 0 ~ 50kDa、約10 ~ 30kDa、約30 ~ 50kDa、約10 ~ 70kDa、約50 ~ 70kDa、約5

50

0～100kDa、約100～150kDa、約150～200kDa、約200～250kDa、約250～300kDa、および約300～350kDaからなる群より選択される分子量範囲を有する。一態様において、組換えゼラチンは300kDaより大きい分子量を有する。

【0019】

別の態様において、本発明は、50、100、150、200、250、および300からなる群より選択されるブルーム強度(Bloom strength)を有する組換えゼラチンを包含する。さらなる実施形態では、ブルーム強度は0～100である。

【0020】

特定の実施形態において、本発明は、組換えゼラチンがヒドロキシル化されていないか、完全にヒドロキシル化されているか、または部分的にヒドロキシル化されている、組換えゼラチンを含む組成物を提供する。様々な態様においては、組換えゼラチンは20～80%、30～80%、40～80%、60～80%、20～60%、30～60%、40～60%、20～30%、20～40%、および30～40%からなる群より選択されるヒドロキシル化率を有する。他の実施形態では、組換えゼラチンは完全にヒドロキシル化されているか、部分的にヒドロキシル化されているか、ヒドロキシル化されていない。

10

【0021】

一つの態様において、本発明は、組換えゼラチンが組換えゼラチンポリペプチドの均質混合物からなる、組換えゼラチンを含む組成物を提供する。別の態様においては、組換えゼラチンは組換えゼラチンポリペプチドの不均質混合物からなる。

【0022】

一実施形態において、本発明は、組換えゼラチンが他のどのようなコラーゲンも含まない1つの型のコラーゲンから誘導されたものである、組換えゼラチンを含む組成物を提供する。特定の実施形態では、1つの型のコラーゲンがI型、II型、III型、IV型、V型、VI型、VII型、VIII型、IX型、X型、XI型、XII型、XIII型、XIV型、XV型、XVI型、XVII型、XVIII型、XIX型、およびXX型コラーゲンからなる群より選択される。組換えゼラチンの内毒素レベルが1.000EU/mgより低い、0.500EU/mgより低い、0.050EU/mgより低い、および0.005EU/mgより低い、組換えゼラチンの組成物も包含される。

20

【0023】

特定の実施形態において、本発明の組換えゼラチンは配列番号15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、31、および33からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる。これらのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドも提供され、また、該ポリヌクレオチドを含有する発現ベクターおよび宿主細胞も提供される。いくつかの態様では、本発明の宿主細胞は原核細胞または真核細胞である。一実施形態において、真核宿主細胞は酵母細胞、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、および真菌細胞からなる群より選択される。本発明はさらに、該ポリヌクレオチドを含有するトランスジェニック動物およびトランスジェニック植物を提供する。

30

【0024】

配列番号26、27、28、および29からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる組換えゼラチンも提供される。

【0025】

一態様において、本発明は組換えゼラチンの調製方法を提供する。この方法は、組換えコラーゲンまたはプロコラーゲンまたはその断片もしくは変異体を提供し、該組換えコラーゲンまたはプロコラーゲンまたはその断片もしくは変異体を処理加工して組換えゼラチンを得る、ことを含んでなる。一態様において、組換えゼラチンに処理加工される組換えコラーゲンは組換えヒトコラーゲンである。別の態様においては、組換えコラーゲンが、コラーゲンまたはプロコラーゲンをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドと、コラーゲンの翻訳後酵素またはそのサブユニットをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドとを共発現させることにより得られる。ある実施形態では、翻訳後酵素がプロリルヒドロキシラーゼである。

40

【0026】

50

本発明による別の方法では、組換えゼラチンが、改変コラーゲン構築物から直接産生される。さらなる実施形態では、組換えゼラチンが、改変コラーゲン構築物と、翻訳後酵素またはそのサブユニットをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドとを共発現させることにより産生される。一実施形態では、翻訳後酵素がプロリルヒドロキシラーゼである。

【0027】

所定の融点を有する組換えゼラチンの調製方法も提供される。一実施形態において、この方法は、組換えゼラチンに、所定の融点に対応するヒドロキシル化率を付与することを含んでなる。さらなる実施形態では、付与するステップが、プロリルヒドロキシラーゼの存在下で改変コラーゲン構築物から組換えゼラチンを産生させることを含む。他の態様では、付与するステップが、ヒドロキシル化された組換えコラーゲンから組換えゼラチンを誘導すること、または非ヒドロキシル化組換えゼラチンをヒドロキシル化することを含む。

10

【0028】

本発明の組換えゼラチンの様々な用途も包含される。特に、本発明は、組換えゼラチンを含む結合剤、カプセル材料、安定剤、皮膜形成剤、保湿剤、乳化剤、増粘剤、ゲル化剤、コロイド剤、接着剤、凝集剤、および精製剤を含む。

【0029】

本発明は、一実施形態において、組換えゼラチンを含む医薬組成物を提供する。さらなる実施形態において、組換えゼラチンはヒト組換えゼラチンである。別の実施形態では、組換えゼラチンが非免疫原性である。特定の実施形態において、本発明は、組換えゼラチンを含むハードゲルカプセル、ソフトゲルカプセル、錠剤コーティング剤、血漿増量剤、コロイド容積置換材料、グラフトコーティング剤、医療用スポンジ、医療用プラグ、医薬用安定剤、およびマイクロキャリアを提供する。一態様において、本発明は、組換えゼラチンを含む組成物と、該組成物を被験者に送達するための器具とを含んでなるキットを提供する。

20

【0030】

組換えゼラチンを含む食用組成物も包含され、同様に、組換えゼラチンを含むタンパク質補助剤、脂肪代替品、栄養補助剤、食用コーティング剤、および各種のマイクロカプセル材料も含まれる。組換えゼラチンを含む写真用組成物も包含され、また、組換えゼラチンが部分的または完全にヒドロキシル化されている実施形態も含まれる。本発明はさらに、組換えゼラチンを含む化粧用組成物を提供する。

30

【0031】

他の実施形態では、本発明は、組換えゼラチンを含む工業用組成物、組換えゼラチンを含む細胞培養組成物、および組換えゼラチンを含む実験室用組成物を包含する。本発明の組換えゼラチンまたはこれらの組換えゼラチンをコードするポリヌクレオチドを含むマイクロアレイのような、さらなる実施形態も含まれる。

【0032】

発明の説明

本発明のタンパク質、ヌクレオチド配列、および方法を説明する前に、本発明はここに記載する特定の方法論、プロトコール、細胞系、ベクター、および試薬に限定されるものでなく、これらは変更しうることが理解されよう。また、本明細書中で用いる技術用語は特定の実施形態のみを説明するためのもので、本発明の範囲を制限するものでないことを理解すべきである。

40

【0033】

本明細書中で用いるとき、単数形「a」、「an」および「the」は、特に指示しないかぎり、複数形への言及を含むことに留意すべきである。したがって、例えば、「宿主細胞(a host cell)」という記載は1以上のそのような宿主細胞および当業者に公知のその等価物を意味し、「抗体(an antibody)」という記載は1以上の抗体および当業者に公知のその等価物を指す、といった具合である。

【0034】

50

特に定義しないかぎり、本明細書中で用いる全ての技術および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解されている意味を表す。本明細書中に記載するものと類似のまたは同等の方法および材料はどれも本発明の実施または試験に使用することができるが、ここでは好適な方法、装置および材料について記載する。本明細書に挙げた全ての刊行物は、本発明との関連において使用しうる、刊行物に報告された細胞系、ベクター、および方法論を記載および開示することを目的に、参考として本明細書に含めるものとする。本発明が先行発明によるそのような開示に先行する資格がないことを認めたものとして何事も解釈されるべきでない。本明細書に引用した文献はそれぞれをそのまま参照によりここに組み入れるものとする。

【 0 0 3 5 】

本発明の実施には、特に示さないかぎり、当分野の技術の範囲内で、通常の化学的、生化学的、分子生物学的、免疫学的、および薬学的方法が用いられる。そのような技術は文献に十分に説明されている。例えば、Gennaro, A.R.編 (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Publishing Co.; Colowick, S.ら編, Methods In Enzymology, Academic Press, Inc.; Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. WeirおよびC.C. Blackwell編, 1986, Blackwell Scientific Publications); Maniatis, T.ら編 (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Vols. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M.ら編 (1999) Short Protocols in Molecular Biology, 第4版, John Wiley & Sons; Reamら編 (1998) Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechnology Series), 第2版, (Newton & Graham編, 1997, Springer Verlag)を参照のこと。

【 0 0 3 6 】

定義

用語「コラーゲン」は、I型からXX型までのコラーゲンを含めて、既知のコラーゲン型のいずれか1つ、ならびに、天然、合成、半合成、または組換えであろうとなかろうと、任意の他のコラーゲンを意味する。この用語はプロコラーゲンも包含する。用語「コラーゲン」は、単一のポリヌクレオチドによりコードされる一本鎖ポリヌクレオチド、ならびにコラーゲン鎖のホモ三量体およびヘテロ三量体のアセンブリを包含する。用語「コラーゲン」は特にその変異体および断片、ならびにその機能的等価物および誘導体を包含し、それらはコラーゲンの少なくとも1つの構造的または機能的特性、例えば(Gly-X-Y)_nドメインを保持することが好ましい。

【 0 0 3 7 】

用語「プロコラーゲン」は、I型からXX型コラーゲンのいずれか1つに対応するプロコラーゲン、ならびに、天然、合成、半合成、または組換えであろうとなかろうと、三量体アセンブリ、溶解性、精製、または他の何らかの機能を補助し、その後続いてN-プロテイナーゼ、C-プロテイナーゼ、または他の酵素(例えば、コラーゲン産生に関連したタンパク質加水分解酵素)により切断されるC-末端および/またはN-末端のプロペプチドまたはテロペプチドを保有する、他のいずれかのコラーゲンに対応するプロコラーゲンを意味する。用語「プロコラーゲン」は特にその変異体および断片、ならびにその機能的等価物および誘導体を包含し、それらはコラーゲンの少なくとも1つの構造的または機能的特性、例えば(Gly-X-Y)_nドメインを保持することが好ましい。

【 0 0 3 8 】

本明細書中で用いる「ゼラチン」とは、伝統的方法による抽出、組換えまたは生合成の如何に係わりなく、あらゆるゼラチンまたはゼラチンの少なくとも1つの構造的および/または機能的特性を有する分子を意味する。ゼラチンは現在骨および組織のような動物源(ウシ、ブタ、ニワトリ、ウマ、魚など)に由来するコラーゲンからの抽出により得られている。用語「ゼラチン」は、ゼラチン製品中に含まれる2以上のポリペプチドの組成物と、ゼラチン材料に寄与する個々のポリペプチドとの両方を包含する。したがって、本発明に関して用いられる用語「組換えゼラチン」は、本発明のゼラチンポリペプチドを含む組換えゼラチン材料と、本発明の個々のゼラチンポリペプチドとの両方を包含する。

【 0 0 3 9 】

ゼラチンが誘導され得るポリペプチドは、コラーゲン、プロコラーゲン、およびコラーゲンの少なくとも1つの構造的および/または機能的特性を有する他のポリペプチドのようなポリペプチドである。そのようなポリペプチドとして、例えば、単一のコラーゲン鎖、またはコラーゲンのホモ三量体もしくはヘテロ三量体、または少なくとも1つのコラーゲン性ドメイン (Gly-X-Y領域) を含むその断片、誘導体、オリゴマー、ポリマーもしくはサブユニットが挙げられる。この用語は特に、自然界には存在しない遺伝子工学的に作製された配列、例えば改変コラーゲン構築物などを含む。改変コラーゲン構築物は、天然のコラーゲン遺伝子から欠失、付加、置換、または他の変化により改変されている配列を含むポリヌクレオチドである。

10

【 0 0 4 0 】

「アジュバント」は、薬物またはワクチンの効果を高める、改善する、または他の方法で補助するために薬物またはワクチンに添加される物質である。ワクチン製剤に用いられるアジュバントは、免疫応答の非特異的刺激因子をもたらしことによって免疫応答を改善する免疫学的薬剤でありうる。アジュバントはしばしば生ワクチン以外のワクチンで用いられる。

【 0 0 4 1 】

用語「対立遺伝子」または「対立遺伝子配列」は、遺伝子配列の別の形態を指す。対立遺伝子は核酸配列の少なくとも1つの突然変異から生じ、改変されたmRNAまたはポリペプチド (その構造または機能は改変されていても、されていなくてもよい) をもたらし。いかなる所与の天然または組換え遺伝子も、対立遺伝子形態を全くもたないか、1個または多数の対立遺伝子形態をもつことができる。対立遺伝子を生じさせる通常の突然変異変化は一般に、ヌクレオチドの天然の欠失、付加または置換のせいであるとされている。こうした種類の変化は、それぞれ単独でまたは他との組合せで、所与の配列中に1回以上起こることがある。

20

【 0 0 4 2 】

「改変」ポリヌクレオチド配列には、個々のヌクレオチドの欠失、挿入または置換を有するが、同一のまたは機能的に同等のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをもたらしものが含まれる。この定義には、特定のオリゴヌクレオチドプローブを用いて、または対立遺伝子との不適切なまたは予期せざるハイブリダイゼーションの欠如により、容易に検出できるまたはできない、対象ポリヌクレオチド配列の正常な染色体の遺伝子座以外の遺伝子座を有する多形を示す配列が含まれる。

30

【 0 0 4 3 】

「改変」ポリペプチドは、サイレント変化を引き起こしかつ機能的に同等のポリペプチドをもたらしアミノ酸残基の欠失、挿入または置換を含みうる。意図的なアミノ酸置換は、アミノ酸残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性、および/または両親媒性の類似性に基いて、コードされるポリペプチドの生物学的または免疫学的活性が保持されるかぎり、行なうことができる。例えば、負に荷電したアミノ酸にはアスパラギン酸とグルタミン酸が含まれ、正に荷電したアミノ酸にはリシンとアルギニンが含まれ、同様の親水値を有する非荷電極性ヘッド基をもつアミノ酸としては、ロイシンとイソロイシンとバリン、グリシンとアラニン、アスパラギンとグルタミン、セリンとトレオニン、およびフェニルアラニンとチロシンが挙げられる。

40

【 0 0 4 4 】

本明細書中で用いる「アミノ酸」もしくは「ポリペプチド」配列、または「ポリペプチド」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質配列、またはその断片を指し、そして天然に存在する分子であっても合成分子であってもよい。ポリペプチドまたはアミノ酸断片は、ポリペプチドの少なくとも1つの構造的および/または機能的特性を保持するポリペプチドの任意の部分である。本発明の少なくとも一つの実施形態では、ポリペプチド断片は少なくとも1つの (Gly-X-Y)_n 領域を保持するものである。

【 0 0 4 5 】

50

用語「動物」は、例えば「動物コラーゲン」に関して用いるとき、天然、合成、半合成、または組換えの如何に係わりなく、動物源に由来するあらゆるコラーゲンを包含する。動物源としては、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジを含むがこれらに限らない哺乳動物源、およびニワトリ、魚、げっ歯類、非脊椎動物を含むがこれらに限らない他の動物源がある。

【0046】

「抗原性」は、体内に導入したとき、免疫応答および抗体産生を刺激する物質の能力に係する。抗原性を示す物質は抗原性があると称される。抗原性物質としては、種々の巨大分子、例えば、タンパク質、リポタンパク質、多糖類、核酸、細菌とその構成成分、およびウイルスとその構成成分が含まれるが、これらに限らない。

10

【0047】

本明細書で用いる用語「相補的」または「相補性」とは、塩基対合によるポリヌクレオチドの天然の結合をいう。例えば、配列「A-G-T」は相補的配列「T-C-A」に結合する。2つの一本鎖分子間の相補性は、「部分的」（核酸の一部のみが結合する場合）であっても、完全（一本鎖分子間に完全な相補性が存在する場合）であってもよい。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強度に大きな影響を及ぼす。これは、核酸鎖間の結合に依存する増幅反応、およびペプチド核酸(PNA)分子などの設計および使用において特に重要である。

【0048】

「欠失」は、1個以上のアミノ酸残基またはヌクレオチドの非存在をもたらすアミノ酸またはヌクレオチド配列の変化である。

20

【0049】

ポリヌクレオチドに適用する用語「誘導体」は、特定のポリペプチドをコードする、または特定のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに相補的な、ポリヌクレオチドの化学的修飾体のことである。そのような修飾には、例えば、水素のアルキル、アシルまたはアミノ基による置換が含まれる。ポリペプチドに関して本明細書で用いる用語「誘導体」とは、例えば、ヒドロキシル化、グリコシル化、PEG化(pegylation)、または同様のプロセスにより修飾されたポリペプチドのことである。用語「誘導体」は、それが誘導される分子の構造的および/または機能的特性を少なくとも1つ含む分子を包含する。

【0050】

ある分子が通常はその分子の一部とはなり得ない追加の化学成分を含む場合、その分子は別の分子の「キメラ誘導体」とであるといえる。そのような化学成分は分子の溶解性、吸収、生物学的半減期などを改善することができる。あるいはまた、かかる成分はその分子の毒性を低下させたり、その分子の望ましくない副作用を排除または低下させたり、などすることができる。そのような作用を媒介しうる成分は一般に当分野で入手可能であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Science（前掲）に見出すことができる。そのような成分を分子に連結するための方法も当分野で公知である。

30

【0051】

「賦形剤」とは、本明細書中で用いる場合、薬物、ワクチンまたは医薬組成物に適当なコンシステンシーまたは形状を付与する目的で、薬物、ワクチンまたは医薬組成物の製剤化の際に希釈剤またはビヒクルとして使用される不活性物質のことである。

40

【0052】

本明細書中で用いる「機能的均等物」または「機能的同等物」とは、特定のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの少なくとも1つの機能的および/または構造的特性を有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。機能的均等物は特定の機能の実施を可能にする修飾を含んでいてもよい。「機能的均等物」という用語は、ある分子の断片、突然変異体、ハイブリッド、変異体、類似体、または化学的誘導体を含むものである。

【0053】

「融合タンパク質」は、異なるタンパク質に由来するペプチド配列が機能的に連結されているタンパク質である。

50

【 0 0 5 4 】

用語「ハイブリダイゼーション」は、核酸配列が塩基対合によって相補的配列に結合するプロセスを指す。ハイブリダイゼーション条件は、例えば、プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーション溶液中の塩もしくはホルムアミドの濃度によって、またはハイブリダイゼーション温度によって規定されており、当分野では周知である。ハイブリダイゼーションは様々なストリンジェンシーの条件下で行なうことができる。

【 0 0 5 5 】

特に、ストリンジェンシーは、塩の濃度を下げるか、ホルムアミドの濃度を上げるか、またはハイブリダイゼーション温度を上げることによって高めることができる。例えば、本発明の場合、高度のストリンジェンシー条件下でのハイブリダイゼーションは約50%ホルムアミド中、約37~42℃で行ない、低下したストリンジェンシー条件下でのハイブリダイゼーションは約35~25%ホルムアミド中、約30~35℃で行なう。特に、ハイブリダイゼーションは最高のストリンジェンシー条件、すなわち、50%ホルムアミド、5X SSPE、0.3% SDS、および200 µg/ml 剪断・変性サケ精子DNA中42℃で行なう。

10

【 0 0 5 6 】

特定レベルのストリンジェンシーに対応する温度範囲は、当分野で公知の方法、例えば、対象となる核酸のプリン対ピリミジン比を算出し、それに応じて温度を調整することにより、さらに狭くすることができる。非特異的シグナルを除くために、例えば、0.1X SSCおよび0.5% SDSにまで次第にストリンジェンシーを高めた条件下で室温にて、プロットを連続的に洗浄することができる。上記範囲および条件の変更は当分野で周知である。

20

【 0 0 5 7 】

「免疫原性」は、生物の体内で免疫応答を引き出す能力に関係する。免疫原性を示す物質は免疫原性があると称される。かかる物質には、限定するものではないが、種々の巨大分子、例えば、タンパク質、リボタンパク質、多糖類、核酸、細菌とその構成成分、およびウイルスとその構成成分が含まれる。免疫原性物質はかなりの高分子量（通常10kDaより大）であることが多い。

【 0 0 5 8 】

「感染力」は感染する能力または感染を生じさせる能力を指し、体内への細菌やウイルスなどの微生物の侵入および増殖をいう。

【 0 0 5 9 】

「挿入」または「付加」という用語は、天然の分子に比較して、1個以上のアミノ酸残基またはヌクレオチドが追加される、それぞれポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列の変化を指す。

30

【 0 0 6 0 】

本明細書中で用いる「単離された」とは、天然のタンパク質源中に存在するタンパク質などからだけでなく、一般には他の成分からも分離されている分子を指し、好ましくは、もしあるとすれば、溶媒、バッファー、イオン、または該分子の溶液中に通常存在する他の成分だけが存在する状態の分子を指す。本明細書中で用いる「単離された」および「精製された」はその天然源中に存在する分子を含まない。

【 0 0 6 1 】

用語「マイクロアレイ」は、基体上に核酸、アミノ酸、抗体などを配置したものを指す。基体はどのような適当な支持体であってもよく、例えば、ビーズ、ガラス、紙、ニトロセルロース、ナイロン、または任意の適切なメンブランなどである。基体は硬質または半硬質の支持体であり、限定するものではないが、メンブラン、フィルター、ウェファー、チップ、スライド、繊維、ビーズ（磁性または非磁性ビーズ）、ゲル、チューブ、プレート、ポリマー、微粒子、毛細管などが含まれる。基体はコーティングのための表面を提供し、かつ/または、核酸やアミノ酸などを結合させうる、例えば、ウェル、ピン、溝、チャンネル、細孔といった様々な表面形状をとることができる。

40

【 0 0 6 2 】

「微生物」という用語は、限定するものではないが、ウイルス、細菌、クラミジア、リケ

50

ッチア、マイコプラズマ、ウレアプラズマ、真菌、および寄生体（原生動物などの伝染性寄生虫を含む）を含むことができる。

【0063】

用語「核酸」もしくは「ポリヌクレオチド」配列、または「ポリヌクレオチド」は、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド、またはその断片、さらに、一本鎖でも二本鎖でもよく、センス鎖でもアンチセンス鎖でもよい天然または合成起源のDNAまたはRNA、ペプチド核酸(PNA)、または天然または合成起源のDNA様もしくはRNA様物質を指す。ポリヌクレオチド断片はそのポリヌクレオチドの少なくとも1つの構造的または機能的特性を保持するポリヌクレオチド配列の任意の部分である。本発明の一実施形態において、ポリヌクレオチド断片は少なくとも1つの(Gly-X-Y)_n領域をコードするものである。ポリヌクレオチド断片は様々な長さのものであってよく、例えば、少なくとも60ヌクレオチド長、少なくとも100ヌクレオチド長、少なくとも1000ヌクレオチド長、または少なくとも10,000ヌクレオチド長でありうる。

【0064】

「類似性パーセント」（類似性％）という語句は、2つ以上のポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列を比較したときに見出される配列類似性の百分率を指す。類似性パーセントは当分野で周知の方法により決定することができる。例えば、アミノ酸配列同士の類似性パーセントはクラスター法を使って求められる（例えば、Higgins, D.G.およびP.M. Sharp (1988) Gene 73:237-244 を参照のこと）。アルゴリズムにより全ての対間の距離を調べることで、配列をクラスターにグループ分けする。クラスターは対ごとに、続いてグループごとにアライメントする。2つのアミノ酸配列、例えば、配列Aと配列B間の類似性パーセントは、配列Aと配列B間で一致する残基の合計数を、配列Aの長さマイナス(-)配列A中のギャップ残基の数マイナス(-)配列B中のギャップ残基の数で割った値を100倍することにより算出される。2つのアミノ酸配列間の相同性が低いかまたは無いギャップは類似性パーセントの決定に含めない。類似性パーセントは当分野で知られた他の方法、例えば、ハイブリダイゼーション条件を変えることによっても計算でき、また、MEGA LIGNプログラム(DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin)のようなプログラムを使ってコンピュータで計算することもできる。

【0065】

本明細書で用いる「植物」という用語は、1つ以上の植物、すなわち、真核独立栄養生物、例えば、被子植物および裸子植物、単子葉植物および双子葉植物（ダイズ、ワタ、アルファルファ、アマ、トマト、ビート、ヒマワリ、ジャガイモ、タバコ、トウモロコシ、コムギ、イネ、レタス、バナナ、キャッサバ、サフラワー、ナタネ、オイルシード、マスタード、キャノーラ、タイマ、藻類、ケルプなどを含むが、これらに限らない）を指すことを含む。用語「植物」はまた、1つ以上の植物細胞を包含する。「植物細胞」としては、限定するものではないが、栄養組織および器官、例えば、種子、懸濁培養物、胚、分裂領域、カルス組織、葉、根、シュート、配偶体、芽胞体、花粉、塊茎、球茎、球根、花、果実、球果、孢子などが挙げられる。

【0066】

用語「翻訳後酵素」は、コラーゲンまたはプロコラーゲンなどの翻訳後修飾を触媒する酵素を意味する。この用語は、限定するものではないが、例えば、プロリルヒドロキシラーゼ、ペプチジルプロリルイソメラーゼ、コラーゲンガラクトシルヒドロキシリシルグルコシルトランスフェラーゼ、ヒドロキシリシルガラクトシルトランスフェラーゼ、C-プロテイナーゼ、N-プロテイナーゼ、リシルヒドロキシラーゼ、およびリシルオキシダーゼを包含する。

【0067】

本明細書で用いる「プロモーター」は、一般に、ポリヌクレオチド配列の転写を開始させ、指令し、媒介することができる核酸配列の調節領域を指す。プロモーターはさらに、転写速度に影響しうる上流または下流のプロモーターエレメントなどの認識配列を含むことができる。

【 0 0 6 8 】

「非構成プロモーター」という用語は、特定の組織を経て転写を誘導するか、あるいは別のやり方で環境または発生制御下にあるプロモーターを指し、組織優先的、組織特異的、細胞型特異的プロモーターなどの抑制および誘導プロモーターを含む。そのようなプロモーターとしては、限定するものではないが、低酸素症または寒冷ストレスにより誘導可能なAdH1プロモーター、熱ストレスにより誘導可能なHsp70プロモーター、および光により誘導可能なPPDKプロモーターが挙げられる。

【 0 0 6 9 】

「組織優先的」であるプロモーターは、特定の組織において優先的に転写を開始するプロモーターである。「組織特異的」であるプロモーターは特定の組織においてのみ転写を開始するプロモーターである。「細胞型特異的」プロモーターは少なくとも1つの器官の特定の細胞型（例えば、血管細胞）における発現を主に駆動するプロモーターである。

10

【 0 0 7 0 】

「誘導」または「抑制」プロモーターは、例えば嫌氣的条件、光の存在、生物ストレスなどの環境条件により、または内部の化学的または生物学的シグナル（例えば、グリセルアルデヒドホスフェートデヒドロゲナーゼ、AOX1およびAOX2メタノール誘導プロモーター）もしくは物理的損傷にตอบสนองして、転写が行なわれるように、環境の制御下にあるプロモーターである。

【 0 0 7 1 】

本明細書で用いる「構成プロモーター」という用語は、転写を開始させ、指令し、媒介するプロモーターを指し、ほとんどの環境条件および発生・細胞分化の状態において活動性である。構成プロモーターの例は、限定するものではないが、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35S、アグロバクテリウム・ツメファシエンズのT-DNAから誘導された1'-または2'-プロモーター、ユビキチン1プロモーター、Smasプロモーター、シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼプロモーター、グリセルアルデヒドデヒドロゲナーゼプロモーター、およびNosプロモーターなどがある。

20

【 0 0 7 2 】

本明細書中で用いる「精製された」という用語は、他の生物学的巨大分子（ポリヌクレオチド、タンパク質など）が実質的に存在しない状態で、示された分子が存在することを意味する。この用語は好ましくは、対象の分子が溶液または組成物中に少なくとも80重量%、好ましくは85重量%、より好ましくは少なくとも95重量%、最も好ましくは少なくとも99.8重量%存在することを意図している。水、バッファー、および他の小分子（特に、分子量が約1 kDaより小さい分子）が存在してもよい。

30

【 0 0 7 3 】

「実質的に精製された」という用語は、本明細書中で用いるとき、その天然環境から取り出され（単離または分離され）、かつそれがもともと結合していた他の成分を60%以上、好ましくは75%以上、最も好ましくは90%以上除かれている核酸またはアミノ酸配列を指す。

【 0 0 7 4 】

「置換」は、1個以上のアミノ酸またはヌクレオチドを、それぞれ異なるアミノ酸またはヌクレオチドで置き換えることである。

40

【 0 0 7 5 】

本明細書中で用いる「トランスフェクション」という用語は、細胞に発現ベクターを導入するプロセスを指す。当分野では各種のトランスフェクション技法が知られており、例えば、マイクロインジェクション、リポフェクション、または遺伝子銃の使用がある。

【 0 0 7 6 】

本明細書で定義する「形質転換」は、外因性の核酸配列（例えば、DNA）がレシピエント細胞に入って、それを変化させるプロセスをいう。形質転換は当分野で公知の種々の方法を使って天然のまたは人工的な条件下で行なうことができる。外来核酸配列を原核または真核宿主細胞に挿入するための、どのような公知方法で形質転換を行なってもよい。その

50

方法は形質転換すべき宿主細胞の型に基づいて選択され、例えば、ウイルス感染、エレクトロポレーション、熱ショック、リポフェクション、粒子ボンバードメントを含むが、これらに限らない。そのような「形質転換」細胞は、安定に形質転換された細胞（挿入されたDNAが自律複製プラスミドまたは宿主染色体の一部として複製可能）を含み、さらに、挿入された核酸を限られた期間だけ一過性に発現する細胞も含む。

【0077】

本明細書で用いる「ワクチン」という用語は、同様の実存物による将来の感染を防止することを目的にして、特定の病気に対する免疫を生じさせるか、人工的に増強するために投与される、死滅または改変した微生物、生存しているか弱毒化された生物、生存していて十分に毒性のある生物、または他の物質（天然、合成、または半合成のペプチド、タンパク質、生物学的巨大分子、または核酸を含むが、これらに限らない）の製剤を指す。ワクチンは、生きているまたは不活化した微生物、または他の病原体（ウイルスや細菌を含む）だけでなく、合成、半合成もしくは組換えDNAに基づくサブユニットを含むことができる。

10

【0078】

ワクチンは、1種の微生物もしくは病原体（例えば、ポリオウイルスワクチン）または1種の微生物もしくは病原体の抗原から成る1価（単一の株／微生物／疾患のワクチン）でありうる。また、ワクチンは2種以上の微生物もしくは病原体（例えば、麻疹・流行性耳下腺炎・風疹(MMR)ワクチン）または2種以上の微生物もしくは病原体の抗原から成る多価、例えば2価、3価など（混合ワクチン）であってもよい。

20

【0079】

生ワクチンは生きている微生物から調製される。弱毒化ワクチンは、実験動物宿主または感染組織／細胞培養物内で物理的改変（放射線、温度条件付けなど）もしくは連続継代を受けた微生物から調製される生ワクチンであり、そのような処理は無毒性の株または毒性の低下した株をもたらすが、防御免疫を引き出す能力は維持する。弱毒化生ワクチンの例として、麻疹、流行性耳下腺炎、風疹、イヌ・ジステンパーがある。不活化ワクチンは、伝染性の微生物成分が、ウイルス外被または細菌外膜タンパク質の抗原性または免疫原性に影響を及ぼすことなく、例えば化学的または物理的処理（例えば、ホルマリン、 β -プロピオラクトン、または γ 線）により破壊されているワクチンである。不活化またはサブユニットワクチンの例としては、インフルエンザ、A型肝炎、ポリオ(IPV)ワクチンがある。

30

【0080】

サブユニットワクチンは、免疫応答の誘導に関与する、例えばウイルス、細菌または他の病原体由来の重要な巨大分子から構成される。こうした成分はいくつかの方法により得ることができ、例えば、微生物からの精製、組換えDNA法による生産などから得られる。サブユニットワクチンはあらゆる病原体の合成擬似物を含むことができる。サブユニットワクチンは、巨大分子、例えば、細菌のタンパク質毒素（例えば、破傷風、ジフテリア）、ウイルスのタンパク質（例えば、インフルエンザウイルス由来）、莢膜をもつ細菌由来の多糖類（例えば、インフルエンザ菌、肺炎球菌）、および組換えDNA法により産生されるウイルス様粒子（例えば、B型肝炎表面抗原）などを含んでいてもよい。

40

【0081】

合成ワクチンは、病原体の表面抗原を模倣した、免疫原性のある、小さな合成ペプチドから作られたワクチンであり、また、組換えDNA法の助けをかりて製造したワクチンであってもよく、全ウイルス（その核酸が改変されたもの）が含まれる。

【0082】

半合成ワクチンまたはコンジュゲートワクチンは、タンパク質キャリアー分子に結合させた微生物由来の多糖抗原から成る。

【0083】

DNAワクチンは抗原をコードする組換えDNAベクターを含有し、コードされた抗原が該DNAを取り込んだ宿主細胞において発現されると、コードされた抗原に対する体液性または細

50

胞性の免疫応答が引き出される。

【0084】

様々な感染性病原体に対してワクチンが開発されている。本発明は、関与する病原体の如何にかかわらず、ワクチン製剤において使用することができる組換えゼラチンに関する。したがって、本発明は実施例によって詳しく説明したワクチンで使用するに限らない。ワクチンには、ワクシニアウイルス（スモールポックス）、ポリオウイルス（ソーク(Salk)およびセービン(Sabin))、麻疹、流行性耳下腺炎、風疹、ジフテリア、破傷風、水痘 - 帯状疱疹（ニワトリポックス / 帯状ヘルペス）、百日咳、カルメット・ゲラン桿菌（BCG、結核）、インフルエンザ菌髄膜炎、狂犬病、コレラ、日本脳炎ウイルス、チフス菌、赤痢菌、A型肝炎、B型肝炎、アデノウイルス、黄熱病、口蹄疫、単純ヘルペスウイルス、呼吸シンシチアルウイルス、ロタウイルス、デング熱、西ナイルウイルス、シチメンチョウ・ヘルペスウイルス（マレク病）、インフルエンザ、および炭疽菌のワクチンが含まれるが、これらに限らない。本明細書中で用いるワクチンという用語は、すでに開発されているか、今後開発されるであろう各種感染症、自己免疫疾患、癌に対するワクチン、例えば、HIV、HCV、マラリアに対するワクチン、および乳癌、肺癌、大腸癌、腎癌、膀胱癌、卵巣癌に対するワクチンのことも含めるものとする。

10

【0085】

ポリペプチドまたはアミノ酸「変異体」は、特定のアミノ酸配列から1個以上のアミノ酸が変化したアミノ酸配列である。ポリペプチド変異体は保存的变化を含んでもよく、その場合、置換用アミノ酸は置換されるアミノ酸と類似した構造または化学的性質を有するもので、例えば、ロイシンのイソロイシンによる置換である。変異体は非保存的变化を有していてもよく、この場合は、置換用アミノ酸が置換されるアミノ酸と異なる物理的性質を有するもので、例えば、グリシンのトリプトファンによる置換である。同様の小さな変化として、アミノ酸の欠失もしくは挿入、または両方を含んでもよい。好ましくは、アミノ酸変異体は特定のポリペプチドのある種の構造的または機能的特性を保持する。どのアミノ酸が置換、挿入または欠失され得るかを決定する際のガイダンスがあり、例えば、LASERGENEソフトウェア(DNASTAR Inc., Madison, WI)のような当分野で公知のコンピュータプログラムを使用することができる。

20

【0086】

ポリヌクレオチド変異体は、特定のポリヌクレオチド配列に対して、好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%のポリヌクレオチド配列類似性を有する、特定のポリヌクレオチド配列の変異体である。当業者であれば、遺伝子コードの縮重の結果として、特定のタンパク質をコードする変異体ポリヌクレオチド配列を多数（その一部は既知の天然遺伝子のポリヌクレオチド配列に対して最小の相同性を有する）作製しうることを理解するであろう。したがって、本発明は、可能なコドン選択に基づいて組合せを選ぶことにより作製できるポリヌクレオチド配列の個々のあらゆる変異を含むものである。これらの組合せは標準的なコドントリプレット遺伝子コードに従って行なわれ、そのような変異すべてが具体的に開示されているとみなすべきである。

30

【0087】

本発明

本発明は、組換えゼラチン、ならびに、これらのゼラチンの生産方法を提供する。本発明の組換えゼラチンは、バラツキがなく、かつ性能が改善され、様々な健康上のおよびその他の懸念事項に対処することができる。本発明の方法を用いれば、時間がかかり、しかも苛酷な工程を通じて動物源からゼラチンを抽出するのではなく、これを直接製造することができる。本発明の組換えゼラチンには、病原体、例えば、病原菌、伝染性海綿状脳症（TSE）などが存在しない。本発明の方法は、バラツキを最小限にし、既存の抽出方法で達成できない程度の再現性を可能にする。

40

【0088】

生じうる免疫原応答（例えば、抗原およびアレルギー反応）に関する懸念などの安全性の

50

問題が、動物由来の製品の使用に関して発生している。現在用いられている動物源のゼラチン混合物を完全に特性決定し、精製し、または再現することは不可能であり、これが、製薬および医療の現場で進行中の課題である。これ以外にも、抽出および精製工程から起こる細菌汚染や内毒素負荷に関して、安全性に対する懸念がある。

【0089】

本発明の組換えゼラチンは、細菌汚染や内毒素が実質的にないことから、上記の懸念事項に対処するものである。さらに、天然ヒト配列から誘導したゼラチンを使用すれば、非ヒト、すなわち、動物由来のタンパク質の使用による免疫応答の危険性を排除できるため、本発明の組換えヒトゼラチンは、現在使用中の動物由来のものに比して、明らかに利点を提供する。

10

【0090】

さらに、本発明のゼラチンは、特定の用途のために最適化した特徴を備える多様な個別の材料として生産することができる。こうして得られる製品は、動物を供給源とする現在市販されているゼラチンに比べて、内部的にバラツキが少なく、かつ均一である。

【0091】

一実施形態では、本発明は、組換えゼラチンを提供する。このゼラチンは、限定するものではないが、ヒト、ウシ、ブタ、ウマ、げっ歯類、ニワトリ、ヒツジおよび魚類などの様々な種に由来する配列、あるいは、非脊椎動物種由来の配列を用いて生産することができる。本発明のゼラチンは、既存の製造方法によるゼラチン製品と比較して、純度が高く、しかも、タンパク質負荷、ならびに、内毒素や、核酸、多糖類、プリオンといった他の汚染物質のレベルが低い。従って、本発明のゼラチンは、既存の方法により製造されたゼラチンと比較して、使用するのに安全であり、負の副作用のリスクを最小限に抑えながら、これまでより高い用量で、ヒトや動物に投与したり、あるいは、摂取させたりすることができる。

20

【0092】

本発明のゼラチンは、特定の用途にあわせて最適化した特性を備えて、直接生産することができ、これによって、ゼラチンを使用しかつ製剤化する能力が改善されるため、市販のゼラチンと比べて、活性および加工性が高い。現在、動物源から抽出されているゼラチンは、所与のバッチまたはサンプル全体を通じて、分子量が広範囲で、不均質な製品であるのに対し、本発明のゼラチンは、バラツキが少なく、均質かつ再現可能な製品である。

30

【0093】

本発明の組換えゼラチンは、様々な方法で生産することができる。一方法では、組換えゼラチンは、組換えコラーゲンのプロセッシングにより生産する（例えば、実施例7、10および11を参照）。別の方法では、組換えゼラチンは、改変したコラーゲン構築物、すなわち、少なくとも1つのコラーゲン性ドメインをコードするが、天然のコラーゲンはコードしないポリヌクレオチドを含む構築物の発現から、直接生産する（例えば、実施例1、4および6を参照）。別の実施形態では、組換えゼラチンは、完全長の天然コラーゲンまたはプロコラーゲンではなく、少なくとも1つのコラーゲン性ドメインを含むポリペプチドから誘導する（例えば、配列番号15~25、30、31および33を参照）。また、組換えゼラチンは、さらにN末端またはC末端プロペプチドを含んだ配列からなるものでもよい（例えば、配列番号26~29を参照）。

40

【0094】

別の実施形態では、本発明の組換えゼラチンは、組換えコラーゲンまたはプロコラーゲンから誘導する。コラーゲン分子は、一般に、 $(\text{Gly-X-Y})_n$ 反復配列を含むポリペプチド鎖の三量体アセンブリから得られ、該反復配列が通常の生物学的条件下で、三重らせんドメインの形成を可能にする（例えば、van der Restら（1991）、FASEB J. 5:2814-2823を参照）。現在、約20種のコラーゲン型が、ウシ、ヒツジ、ブタ、ニワトリおよびヒトなどの脊椎動物コラーゲンで確認されている。多種多様な天然コラーゲンの構造および生物学的機能の詳細な説明は、中でもAyadら、The Extracellular Matrix Facts Book, Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴ；Burgeson, R. E. およびNimmi（1992）「コラ

50

ーゲン型：分子構造と組織分布(Collagen types: Molecular Structure and Tissue Distribution)」, Clin. Orthop. 282:250-272 ; Kielty, C. M.ら (1993) 「コラーゲンファミリー：構造、アセンブリおよび細胞外マトリックスにおける構成(The Collagen Family : Structure, Assembly And Organization In The Extracellular Matrix)」, Connective tissue And Its Heritable Disorder, Molecular Genetics, And Medical Aspects, Royce, P. M.およびSteinmann, B.編、Wiley-Liss, ニューヨーク州、pp. 103-147 ; ならびに、ProckopおよびKivirikko (1995) 「コラーゲン：分子生物学、疾病、および治療への可能性(Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy)」, Annu Rev Biochem 64:403-434) にみいだすことができる。

【 0 0 9 5 】

10

I型コラーゲンは、生物の全コラーゲンの約80~90%を占める骨および皮膚の主要な繊維性コラーゲンである。I型コラーゲンは、多細胞生物の細胞外マトリックスに存在する主要な構造巨大分子であり、全タンパク質量の約20%を占めている。I型コラーゲンは、2本の $\alpha 1(I)$ 鎖と1本の $\alpha 2(I)$ 鎖とからなるヘテロ三量体分子であり、これらの鎖は、それぞれ、COL1A1およびCOL1A2遺伝子によりコードされる。その他の型のコラーゲンは、I型コラーゲンほど豊富ではなく、様々な分布パターンを示す。例えば、II型コラーゲンは、軟骨およびガラス体液中の主要コラーゲンであるのに対し、III型コラーゲンは、血管に高レベルで存在するが、皮膚にはそれより低いレベルで存在する。

【 0 0 9 6 】

20

III型コラーゲンは、皮膚および血管組織に存在する主要な繊維性コラーゲンである。III型コラーゲンは、COL3A1遺伝子によりコードされる3本の同じ $\alpha 1(III)$ 鎖からなるホモ三量体である。組織から各種コラーゲンを精製する方法は、例えば、Byersら (1974) Biochemistry 13:5243-5248 ; およびMillerおよびPhodes (1982) Methods in Enzymology 82:33-64にみいだすことができる。

【 0 0 9 7 】

翻訳後酵素は、プロコラーゲンおよびコラーゲンの生合成に重要である。例えば、プロリル4-ヒドロキシラーゼは、細胞によるプロコラーゲンまたはコラーゲンの合成に必要な翻訳後酵素である。この酵素は、反復Gly-X-Y配列のY-位置におけるプロリル残基を4-ヒドロキシプロリンにヒドロキシル化する (例えば、Prockopら (1984) N.Engl. J. Med. 311:376-386)。適切な数のY-位置プロリル残基が、プロリル4-ヒドロキシラーゼにより4-ヒドロキシプロリンにヒドロキシル化されない限り、新しく合成された鎖は、安定した三重らせんコンホメーションを維持することができない。さらに、ヒドロキシル化がまったく起こらないか、不十分なヒドロキシル化が起こった場合には、そのポリペプチドが適正に分泌されず、変性する恐れがある。

30

【 0 0 9 8 】

脊椎動物のプロリル4-ヒドロキシラーゼは $\alpha_2\beta_2$ 四量体である (例えば、BergおよびProckop (1973) J. Biol. Chem. 248:1175-1192 ; およびTudermanら (1975) Eur. J. Biochem. 52:9-16を参照)。 α サブユニットは、プロリル残基のヒドロキシル化に関与する触媒部位を含むが、 β サブユニットの不在下では不溶性である。タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである β サブユニットは、チオール/ジスルフィドの相互交換を触媒し、これによって、安定したタンパク質を確立するのに必須のジスルフィド結合が形成される。 β サブユニットは、プロリル4-ヒドロキシラーゼ四量体の一部を成す場合には、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ活性の50%を保持する (例えば、Pihlajaniemiら (1987) Embo J. 6:643-649 ; Parkkonenら (1988) Biochem. J. 256:1005-1011; およびKoivuら (1987) J. Biol. Chem. 262:6447-6449を参照)。

40

【 0 0 9 9 】

活性組換えヒトプロリル4-ヒドロキシラーゼは、 α および β サブユニットを同時に発現させることにより、例えば、Sf9昆虫細胞および酵母細胞で生産されてきた (例えば、Vuoriら (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7467-7470 ; 米国特許第5,593,859号を参照)。プロリル4-ヒドロキシラーゼ以外にも、他のコラーゲン翻訳後酵素が同定されて、文献

50

に報告されており、このような酵素として、Cプロテイナーゼ、Nプロテイナーゼ、リシルオキシダーゼ、リシルヒドロキシラーゼなどが挙げられる（例えば、Olsenら（1991）Cell Biology of Extracellular Matrix、第2版、Hay編、Plenum Press、ニューヨーク州を参照）。

【0100】

本発明は、特に、本発明の組換えゼラチンに、必要に応じて、ヒドロキシル化（例えば、プロリンヒドロキシル化および/またはリシルヒドロキシル化）を付与する、あらゆる生物学的または化学的化合物の使用を包含する。これらには、例えば、プロリル4-ヒドロキシラーゼの各種イソ型、ならびに、天然、合成、もしくは半合成に拘わらず、所望の活性を有するプロリル4-ヒドロキシラーゼの変異体または断片もしくはサブユニットを含む、内因的または外因的に供給される、あらゆる種由来のプロリル4-ヒドロキシラーゼ、ならびに、プロリル3-ヒドロキシラーゼなどの他のヒドロキシラーゼが挙げられる（例えば、本明細書に参照によりその全文が組み込まれる米国特許第5,928,922号を参照）。一実施形態では、プロリルヒドロキシラーゼ活性は、組換えゼラチンをコードするか、あるいは、組換えゼラチンを誘導することができるポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドと同じ種に由来するプロリルヒドロキシラーゼにより付与される。さらに別の実施形態では、プロリル4-ヒドロキシラーゼはヒト由来のものであり、コードポリヌクレオチドがヒト配列から誘導される。

10

【0101】

本発明は、ゼラチンの熱可塑性を操作することにより、所望の物理的特性を備えた材料を生産する方法を提供する。一方法では、特定の哺乳動物または昆虫細胞、もしくはトランスジェニック動物、あるいは植物または植物細胞などの、内在性プロリルヒドロキシラーゼまたはそれ以外のヒドロキシラーゼを有する宿主系において、コードポリヌクレオチドを発現させる。このような系で、本発明は、広範な比率のヒドロキシル化を有する組換えゼラチンの混合物（すなわち、非ヒドロキシル化、部分的ヒドロキシル化、および完全ヒドロキシル化部分）を生産する方法を提供する。

20

【0102】

例えば、ヒドロキシル化率が広範な組換えゼラチンを生産する一方法では、例えば、トランスジェニック動物における内在性プロリルヒドロキシラーゼによりヒドロキシル化が付与され、ヒドロキシル化率の分布は、非ヒドロキシル化から、完全ヒドロキシル化までの範囲にあり、生産された材料の融解温度は、28 ~ 36 であり、中央値 T_m は約30 ~ 32 である。所望であれば、上記材料の様々な画分を温度勾配に従って単離することができ、これは、下流での使用で、例えば体温（37 ）で三重らせん構造を保持するため十分にヒドロキシル化されたものなど、より十分にヒドロキシル化された材料を選択しなければならない場合に必要となるであろう。

30

【0103】

別の実施形態では、例えば、トランスジェニック動物などの系で組換えゼラチンを生産するが、その際、ヒドロキシル化を外因性プロリルヒドロキシラーゼで補う。一実施形態では、組換えゼラチンを生産する方法により、非ヒドロキシル化から完全ヒドロキシル化までの範囲の組換えゼラチンが得られる。内在性プロリルヒドロキシラーゼの存在下だけで生産された組換え材料よりも、外因性プロリルヒドロキシラーゼの存在下で生産された組換え材料の方が、十分にヒドロキシル化された組換えゼラチンの画分の比率が大きくなる。従って、生産された材料の融点は、例えば、28 ~ 40 の範囲であり、中央値 T_m は約34 ~ 36 である。このようなゼラチン混合物は、様々なヒドロキシル化度を有する部分の分画化や単離の必要がなく、ゲルカプセル製造などの各種用途で使用するのに適している。

40

【0104】

前記方法により、ある範囲の融解温度をもつ組換え材料の生産が可能になり、これらの材料は、例えば温度勾配を用いて、特定の温度（例えば、36 ）で固体の材料を、特定の温度で液体の材料から分離することにより、容易に分割することができる。さらに、本発明は、分離することなく、大量用途での使用に適した材料を生産する経済的な方法を提供す

50

る。例えば、ゲルカプセルの製造に、前記方法により生産された組換えゼラチンを使用するが、ある範囲の融解温度を有する組換え材料は33 付近の所望の融解温度を有し、このようなゼラチンは体温で融解するため嚥下および消化に好適である。本発明の方法では、組換えゼラチンは、所望の系、例えば、トランスジェニック動物で直接生産する、あるいは、所望の系で生産された組換えコラーゲンから、例えば、酸、熱もしくは酵素を用いた加水分解により、誘導することができる。

【0105】

一実施形態では、本発明は、組換えコラーゲンを生産し、該組換えコラーゲンから組換えゼラチンを誘導することを含んでなる、組換えゼラチンの生産方法を提供する。一態様では、この方法は、コラーゲンまたはプロコラーゲンまたはその断片もしくは変異体をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列と、コラーゲン翻訳後酵素またはそのサブユニットをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの発現を含む（例えば、本明細書に参照によりその全文が組み込まれる米国特許第5,593,859号を参照）。本発明の組換えゼラチンは、当業者には公知の方法を用いて、組換えコラーゲンから誘導することができる（例えば、Veis (1965) Int Rev Connect Tissue Res, 3:113-200を参照）。例えば、コラーゲンからゼラチンへの抽出方法すべてに共通する特徴は、コラーゲタンパク質の二次構造の消失であり、ほとんどの場合、コラーゲン構造の改変である。本発明のゼラチンを生産するのに用いられるコラーゲンは、所望するゼラチンの型に応じて、様々な方法を用いて処理加工することができる。

【0106】

本発明のゼラチンは、組換えにより生産されたコラーゲンまたはプロコラーゲンまたはその他のコラーゲン性ポリペプチドから、あるいは、細胞培養物、例えば脊椎動物細胞培養物から、当業者には公知の多様な方法により誘導することができる。例えば、高温での溶解性、ならびに、低または高pH、低または高塩濃度、および高温の条件下での安定性といったゼラチンの利点を利用して、細胞塊または培養基から直接誘導することもできる。コラーゲンからゼラチン組成物を生産する方法、工程および技法としては、高温にてタンパク質加水分解酵素で消化する、界面活性剤、熱またはその他の当業者には公知の変性剤を用いてコラーゲンの三重らせん構造を変性する、などがある。さらに、石灰または酸による処理、水溶液中での熱抽出、イオン交換クロマトグラフィー、クロスフローろ過、ならびに、各種乾燥法を含む、動物または屠畜場供給源からゼラチンを抽出するための様々な工程を用いて、組換えコラーゲンから本発明のゼラチンを誘導することができる。

【0107】

一態様では、本発明のゼラチンは変性された三重らせんからなり、少なくとも1つのコラーゲンサブユニット、コラーゲン鎖、またはその断片を含む。特定のコラーゲン鎖、サブユニット、またはその断片内のGly-X-Y単位は、同じでも違っていてもよい。好ましくは、XおよびYは、プロリンまたはヒドロキシプロリンのいずれかであり、構成鎖のほぼ第3残基位置ごとにグリシンが現れる。XおよびYのアミノ酸はプロリンまたはヒドロキシプロリンであり、各Gly-X-Y単位は同じでも異なってもよい。別の実施形態では、本発明の組換えゼラチンは、 $(\text{Gly-X-Y})_n$ のアミノ酸配列を含み、ここでXおよびYは任意のアミノ酸である。

【0108】

一実施形態では、本発明のゼラチンは、他の型のコラーゲンを実質的に一切含まない1つの型の組換えコラーゲンから誘導される。一態様では、組換えコラーゲンはI型コラーゲンである。別の態様では、組換えコラーゲンはIII型コラーゲンである。本発明の別の実施形態では、組換えコラーゲンはヒト組換えコラーゲンである。組換えコラーゲンがいずれか1つの型のコラーゲン、例えば、I型~XX型コラーゲンのいずれか1つ、またはその他の天然、合成もしくは半合成コラーゲンのいずれかである本発明のさらに別の実施形態が特に考えられる。組換えゼラチンがI型~XX型コラーゲン、またはその他の天然、合成もしくは半合成コラーゲンのいずれか1種以上からなる特定の混合物から誘導される実施形態が特に考えられる。

【0109】

組換えゼラチンを生産する本発明の方法には、ゼラチン抽出の伝統的方法と比べて、いくつかの利点がある。最も重要なことは、本発明が、天然のコラーゲン配列を含む、信頼性の高い、非組織のゼラチン供給源を提供することである。さらに、既存の抽出方法では、様々な医療用途での使用に有利なヒトゼラチンの天然供給源を獲得することができない。本発明は、特に、ヒト配列から誘導された組換えゼラチン、組換えヒトゼラチンを含む組成物、ならびに、これらのゼラチンの生産方法を提供する。組換えヒトゼラチンは、製薬および医療のプロセスで用いられるように非免疫原性であるため、その多様な用途が考えられる。

【0110】

別の態様では、本発明は、様々な形態のゼラチンを発現することができる、遺伝子工学的に作製された構築物からの上記ゼラチンの生産を提供する。この発明は、特に、組換えプロリルヒドロキシラーゼと、非天然コラーゲン構築物などの各種合成構築物を用いて、ゼラチンを生産する方法に関する。さらに、本発明は、特定の用途に必要とされる特定の性質を備えるように設計することができる組換えゼラチンを提供する。また、これらのゼラチンの生産方法も提供する。既存の方法を用いて、所望のゲル強度、粘度、融解特性、等電点プロファイル、pH、ヒドロキシル化度、アミノ酸組成、臭い、色などを備えたゼラチンを生産することができる。本発明に従う一方法では、非ヒドロキシル化ゼラチンを生産し、必要に応じて、その後完全または部分的にヒドロキシル化することが可能である。

【0111】

ゼラチンの特性

ゼラチンの様々な物理的特性が、特定の用途におけるその有用性を決定する。ゼラチンは、例えば、その両性の性質、熱可逆ゲルを形成する能力、保護コロイドおよび界面活性特性、粘性および安定性への寄与に基づく固有の性能を提供する。様々な用途において、ゼラチンは、例えば、乳化剤、増粘剤、もしくは安定剤；フィルムまたはコーティング形成剤；結合剤；接着剤またはグルー；あるいは、凝集剤として使用されている。

【0112】

原料、予備処理の種類、および抽出工程のすべてが、従来の製造で得られるゼラチンポリペプチドの組成に影響を与える。従って、現在入手可能な動物由来の製品は、ポリペプチド鎖の不均質タンパク質混合物である。ゼラチン分子はかなり大きく、特定のサンプル内の分子量は2,3kDaから数百kDaまでの範囲である。特定ロットのゼラチンの分子量分布は、例えば、ゼラチンサンプルの粘度および/またはゲル強度に影響を与える可能性があるため、非常に重要になることがある。

【0113】

一般に、ゼラチン溶液の粘度は、濃度が増加し、温度が低下するにつれ、高くなる。例えば、ゼラチンを安定剤または増粘剤として用いる場合には、粘土が高い溶液の方が好ましい。用途によっては、例えば、各種乳化液などに含まれるような、液体ゼラチンが好ましい。ゼラチン溶液の粘度は、ゼラチン成分の分子量が増加するほど高くなる。従って、高粘度ゼラチン溶液は、高濃度の低分子量ゼラチンか、あるいは、低濃度の高分子量ゼラチンから構成されることになる。粘度はまた、硬化および融点などのゲル特性に影響を与える。高粘度ゼラチン溶液は、低粘度ゼラチン溶液に比べて、融解および硬化速度が高いゲルをもたらす。

【0114】

ゼラチンの熱可逆性および熱可塑性は、多くの用途（例えば、ゲルカプセルおよび錠剤の製造）において利用される特性である。ゼラチンを加熱し、必要に応じて成形または造形した後、冷却することにより、ホメオスタティック温度で固有の特性を有するカプセルまたは錠剤コーティングを形成することができる。このようなゼラチンは、口内温度で溶解し始め、嚥下がしやすく、体温で液体となる。

【0115】

様々なゲル強度のゼラチンが、各種用途での使用に適している。硬化したゲルの堅さまた

10

20

30

40

50

は強度は、典型的には、国際的基準および方法を用いて決定しうるブルーム（Bloom）値を計算することにより測定する。手短に言えば、ブルーム強度は、一定温度浴中に18時間浸漬した6.67%ゼラチン溶液により形成されたゲルの強度の測定値である。標準的テクスチャー分析装置を用いて、標準AOAC（Association of Official Agricultural Chemists）プランジャー 4 mmをゲル中に降下させるのに要する重量（グラム）を測定する。プランジャーの降下に要した重量（グラム）が200グラムであったとすると、その特定ゼラチンのブルーム値は200であることになる（例えば、米国薬局方およびOfficial Methods of Analysis of AOAC International、第17版、第II巻を参照）。

【 0 1 1 6 】

このように、市販のゼラチンはブルーム強度に基づいて格付けされ、販売される。ゼラチンの各種用途に応じて、様々な範囲のブルーム値が適している。例えば、各種工業用途、例えば、コンクリート安定化、砂型鋳物、鋳型、グルー、コーティングなどに使用するゼラチンは、所望の性能特性に応じて、広範なブルーム強度のゼラチンから選択する。広範なブルーム強度を有するゼラチンは、各種医薬品の製造においても望ましい。例えば、ソフトゲルカプセルは、ブルーム値が約150～175の骨質(ossein)または皮膚ゼラチンおよび/またはブルーム値が約190～210のブタ由来のゼラチン、もしくはそれらのブレンドを用いて製造されるのに対し、ハードゲルカプセルには、ブルーム値が約220～260のゼラチンが用いられるであろう。食品用途では、マシュマロまたはその他の菓子製品に用いられる増粘剤としてのゼラチンは約250のブルーム強度をもつ。写真用途における特定の乳化液や、各種工業用コーティングなどの様々な用途では、非ゲル化ゼラチンの使用が必要とされる。

【 0 1 1 7 】

本発明は、様々なブルーム強度を有する組換えゼラチンの生産を可能にする。一態様では、本発明は、例えば、ブルーム強度が約50、100、150、200、250および300のゼラチンの製造を可能にする。一実施形態では、本発明は、ブルーム強度が約400の組換えゼラチンの生産を可能にする。このようなゼラチンは、例えば、ゲルカプセルの製造に用いることができ、十分な強度のゲルを提供するのに必要な材料が少なくすむことから、これまでより軽くかつ薄いカプセルの製造が可能になる。また、ブルーム強度が100より低い、および0～100の組換えゼラチンも考えられる。

【 0 1 1 8 】

本発明は、特定の用途に所望される物理的特性を備えた組換えゼラチンを設計する方法を提供する。一実施形態では、本発明は、特定の分子量または分子量範囲を有する均質な分子からなる組換えゼラチン、ならびに、これらの組換えゼラチンの生産方法を提供する。このような均質かつ均一材料は、予想可能な性能を備えた製品の信頼性の高い供給源を提供し、製品性能および製造パラメーターのバラツキを最小限にする点で、有利である。現在、特定の分子量または分子量範囲によってもたらされる粘度またはゲル強度など、所望の物理的特性を備えた混合物を生産するためには、様々なロットからのゼラチンをブレンドしなければならない場合がある。

【 0 1 1 9 】

特定の分子量の組換えゼラチンよりも、特定の分子量範囲の組換えゼラチンの方が好ましい用途において、本発明は、このような材料を提供する。本発明の組換えゼラチンを用いて、製造者は、例えば、指定された分子量のロットからの組換えゼラチンを特定の比率で混合して、所望の分子量範囲を有する混合物を得ることができる。さらに、本発明の組換えゼラチンは、現在市販されている製品と比較して、本質的に均質性が高く、バラツキが少ない。本発明の一方法では、酸または熱加水分解などで組換えコラーゲンを処理加工することにより、現在入手可能なゼラチン製品より分子量範囲が狭い組換えゼラチンが得られる。適切かつ制御可能な加水分解条件を用いたところ、本発明の方法により、市販のゼラチンと分子量分布が類似した組換えヒトゼラチン、ならびに、市販の製品より分子量範囲が狭い組換えゼラチンが得られた（実施例9および10参照）。

【 0 1 2 0 】

本発明は、均一の分子量、もしくは指定された範囲の分子量の組換えゼラチンを提供し、バラツキや予測不能性を排除することにより、工程の微細な調節を可能にすると同時に、予測可能な挙動を得ることができる。本発明の方法により、あらゆる所望の分子量または所望範囲の分子量の組換えゼラチンを生産することができる。例えば、一実施形態では、組換えゼラチンは分子量が300 kDaを超える。別の実施形態では、組換えゼラチンの分子量範囲は約150～250 kDaまたは約250～350 kDaである。上記以外の分子量範囲が特に考えられており、限定するものではないが、下記の分子量範囲がある：約0～50 kDa、約50～100 kDa、約100～150 kDa、約150～200 kDa、約200～250 kDa、約250～300 kDa、約300～350 kDa。

【0121】

10

別の態様では、いくつかの市販のゼラチンと類似した分子量（約10～70 kDa）の組換えゼラチンを生産することができる。好ましい実施形態では、本発明は、市販の製品では現在入手できない、分子量範囲が狭い、例えば、約10～30 kDa、約30～50 kDa、約50～70 kDaの組換えゼラチンを提供する。具体的実施形態では、意図する用途に適した特定の性質を付与する鎖長の組換えゼラチンが提供される。本発明の様々な実施形態では、約1 kDa、5 kDa、8 kDa、9 kDa、14 kDa、16 kDa、22 kDa、23 kDa、44 kDa、および65 kDaの均一の分子量を有する組換えゼラチンが考慮される（例えば、表2参照）。

【0122】

特に、本発明の一方法では、短縮されたコラーゲン配列、例えば、表2に示した配列からゼラチンを生産する。これらの配列は特定のコラーゲン性ドメインを表示し、短い形態のゼラチンをコードする。

20

【0123】

本発明のゼラチンは、通常誘導される動物ゼラチンと比べて、低いまたは高い平均分子量をもちながら、ゼラチンの有用な物理的特性、例えば、皮膜形成能を保持することができる。例えば、コラーゲン、コラーゲン鎖、サブユニットもしくはその断片の変性、あるいは、ヒドロキシル化度の変更など、コラーゲン配列の様々な修飾を実施することにより、特定の物理的特性、すなわち、従来のゼラチンより高いまたは低い融点、多様なアミノ酸組成、特定の分子量または分子量範囲などを有するゼラチンを生産することができ、本明細書では、特に、このような変異体が意図される。

【0124】

30

I型コラーゲンのような典型的繊維形成コラーゲン分子の分子量は300 kDaである。高分子量ゼラチンを用いる用途では、現在入手可能な抽出ゼラチンより高い分子量のゼラチンを生産するのが望ましい場合がある。従って、本発明の一実施形態では、コラーゲン（現在、市販のゼラチンはコラーゲンから抽出する）よりも大きな分子を含むゼラチンを生産することができる。こうして得られる分子量の高いゼラチン製品は、その物理的特性が望ましい様々な用途で直接使用することができ、あるいは、分割した後処理することにより、さらに小さなサイズの分子の生産も可能である。

【0125】

一実施形態では、通常の動物源で得られるものより大きなコラーゲンを用いて、ゼラチンを生産することができる。例えば、本発明の生産方法を改変して、ベスチメンチフェラン（vestimentiferan）棲管虫*Riftia pachyptila*（分子量約2600 kDa）および環形動物*Alvinella pompejana*（分子量約1700 kDa）の体壁から得た酸可溶性小皮コラーゲンを生産することができる。これらのコラーゲンを本発明の生産方法に合わせて改変することにより、現在入手可能なゼラチンが抽出されるものより大きな分子を生産することができ、得られた生産物を処理して、所望のゼラチンを生産することも可能である。

40

【0126】

本発明に従う多様な方法により、様々な分子量のゼラチンを生産することが特に意図される。例えば、本発明の組換えゼラチンの特徴、例えば、ヒドロキシル化率、架橋度などを変えることにより、所望の分子量の組換えゼラチンを生産することができる。一態様では、例えば、本発明は、当業者には公知の架橋剤を用いて、ゼラチンポリペプチドを架橋さ

50

せることにより、大きな分子量の組換えゼラチンを生産する方法を提供する（例えば、「考察」（後掲）参照）。

【0127】

本発明の別の態様では、ゼラチンを誘導することのできるポリペプチドを、天然コラーゲン配列の全部または断片の多数のコピーを含む遺伝子工学的に作製した構築物から発現させる。例えば、一実施形態では、本発明は、I型コラーゲンのコラーゲン性ドメインの多数のコピーを含む改変コラーゲン構築物を提供する。別の実施形態では、上記構築物は、III型コラーゲンのコラーゲン性ドメインの多数のコピーを含む。さらに別の実施形態では、上記構築物は、I型およびIII型コラーゲン性ドメインのコピーを含む。本発明は、I型～XX型までのコラーゲンを、あらゆるコラーゲンをコードする配列の全部または一部

10

【0128】

別の実施形態では、本発明は、コラーゲンまたはプロコラーゲン三重らせん段階からの誘導なしに、ゼラチンを生産する方法を提供する。一態様では、この方法は、三重らせん構造は形成させないが、プロリルヒドロキシラーゼの活性は許容する高温発現系（例えば、好熱性生物に依存するものなど）における様々な構築物の発現により、組換えゼラチンを生産することを含んでなる。本発明のゼラチンは、三重らせんの形成を妨げる突然変異、付加、もしくは欠失を含むコラーゲン構築物から誘導することも可能である。別の態様では、該方法は、標準温度（すなわち、37℃）では三重らせんの形成を可能にしない短縮された構築物からゼラチンを生産することを含んでなる。あるいは、三重らせん形成の阻害剤、例えば、ポリアニオンの存在下でゼラチンを生産することができ、その際、該阻害剤を生合成コラーゲン構築物と共発現させる。さらに、本発明の生合成ゼラチンは、三重らせんを形成しない、組換えにより生産されたコラーゲン鎖から誘導することもできる。

20

【0129】

別の実施形態では、本発明は、非ヒドロキシル化コラーゲン、またはプロリン残基の完全なヒドロキシル化ではなく、部分的ヒドロキシル化を行ったコラーゲンからゼラチンを誘導する方法を提供する。一態様では、この方法は、例えば、プロリルヒドロキシラーゼをもたない昆虫発現系において、プロリルヒドロキシラーゼの非存在下で発現させたコラーゲンからゼラチンを誘導することを含む（例えば、Mylliharjuら（1997）J. Biol. Chem. 272, 21824-21830を参照）。本発明に従う一方法では、部分的にヒドロキシル化した、または非ヒドロキシル化コラーゲンからゼラチンを誘導する。ヒドロキシル化は、例えば、ヒドロキシラーゼのin vitro投与により付与することができる。一方法では、例えば、細菌または酵母宿主細胞にヒドロキシプロリンを与えることにより、プロリンに代わるヒドロキシプロリンの低度の置換を強制的に行なうことも可能である。

30

【0130】

本発明は、完全ヒドロキシル化、部分的ヒドロキシル化、および非ヒドロキシル化組換えゼラチンからなる。別の実施形態では、本発明の方法は、特定のヒドロキシル化度を有するゼラチンまたはゼラチン前駆体の生産を含んでなる。さらに別の態様では、本発明は、20～80%ヒドロキシル化、好ましくは、約30～60%ヒドロキシル化、最も好ましくは、約40%のヒドロキシル化率を有するゼラチンの生産方法に関する（実施例4および5を参照）。本発明の部分的ヒドロキシル化組換えゼラチンは、様々なヒドロキシル化度の組換えゼラチンを指定比率で混合することにより、あるいは、直接得ることができる（実施例4および5を参照）。さらに、本発明は、プロリルヒドロキシラーゼを非ヒドロキシル化組換えゼラチンにin vitroで投与し、反応の長さを制御することにより、組換えゼラチンの部分的ヒドロキシル化を達成する方法を提供する。

40

【0131】

50

現在入手可能な動物源ゼラチンの熱特性を改変できる範囲には制限がある。本発明は、特に、組換えゼラチンが、特定用途に所望される特定の熱特性を有する、組換えゼラチンの生産方法を提供する。本発明の方法を用いて、例えば、組換えゼラチンの融点および/またはゲル強度を多様な方法で操作することができる。組換えゼラチンの熱安定性および/またはゲル強度は、当業者には公知の様々な技法により測定が可能である。

【0132】

一般に、ゼラチンの融点は、ヒドロキシル化度が増加するにつれ、高くなる。本発明の方法を用いて、ヒドロキシル化および/または架橋などの操作により、現在入手可能な動物源ゼラチンよりゲル強度および/または融点が高い高分子量ゼラチンを生産することが可能である。従って、本発明は、高いフィルム強度などを得るため高分子量ゼラチンが所望されるが、非ゲル化または低強度ゲル製品が求められる用途での使用に適した、市販の製品では達成できない特性を有する組換えゼラチンを提供する。一実施形態では、本発明は、プロリン残基の不完全なヒドロキシル化により、温度安定性が低い組換えゼラチンを提供する。

10

【0133】

このような組換えゼラチンは各種用途で有用である。既存の抽出方法により生産されたゼラチンでは、魚ゼラチンだけが、ゲル化しない、高い平均分子量の皮膜形成タンパク質を提供する。非ゲル化魚ゼラチンによって提供される非ゲル化および冷水溶解の特性には、現在入手可能なヒドロキシル化ウシおよびブタゼラチンが匹敵し得るが、ヒドロキシル化したゼラチンは、平均分子量が低いため、相応して皮膜強度およびフレキシビリティが低下する。従って、一実施形態では、本発明は、現在入手可能な動物源材料により提供されるものよりゲル強度が低くかつ分子量が高い部分的ヒドロキシル化組換えゼラチンを提供する。

20

【0134】

分子量が高くゲル強度が低い組換えゼラチンは、安定性が所望されるが、医薬品の展性および一体性を維持するために非または低ゲル化性が求められる、各種医薬用途でも有用である。このような組換えゼラチンは、その分子量が安定性をもたらし、循環系中での滞留時間を増加すること、また、改変された硬化点によって、室温で材料がゲル化するのを防止し、増量剤を温めずに投与できることから、例えば、血漿増量剤として用いることができる。一実施形態では、本発明は、医薬用途、例えば、血漿増量剤における使用に適した部分的ヒドロキシル化組換えゼラチンを提供する。

30

【0135】

別の態様では、部分的ヒドロキシル化組換えゼラチンは、プロリルヒドロキシラーゼの非存在下で、例えば、プロリルヒドロキシラーゼをもたない昆虫発現系において、組換えゼラチンの発現、あるいは、本発明の組換えゼラチンを誘導することができるポリペプチドの発現を実施することにより、得られる(例えば、Myllyharjuら(1997) J. Biol. Chem. 272, 21824-21830参照)。ヒドロキシル化は、生産時に行うか、もしくはin vitroでの生物学的または化学的修飾により、後に実施することができる。本発明の一方法では、組換えゼラチンは、部分的にヒドロキシル化した、または完全にヒドロキシル化したコラーゲンから誘導する。

40

【0136】

現在利用可能な方法により天然の供給源から得たゼラチンは、構成コラーゲン分子のリシン残基間に共有架橋結合が存在することにより、大幅に強化される。特定のリシン残基は、分泌前に、酵素リシルヒドロキシラーゼによりヒドロキシル化されるため、架橋は、コラーゲン分泌および繊維形成の後に、細胞外空間中に自然に起こる。次に、細胞外酵素リシルオキシダーゼが、コラーゲン分子中の特定のリシンおよびヒドロキシリシン残基を脱アミノ化し、高度に反応性のアルデヒド基を生成し、該アルデヒド基が、自発的に反応して共有結合を形成する。こうして得られた架橋コラーゲンは、ゲル強度および粘度が増加したゼラチンをもたらす。特に、架橋度が高いほど、ゼラチンの融解温度およびゲル強度も高くなる。

50

【0137】

一態様では、本発明は、架橋された組換えゼラチンを提供し、これによって分子量がより高いゼラチンが得られる（実施例7参照）。架橋は、生物学的または化学的修飾によるものなど、各種方法によって実施することができる。例えば、一実施形態では、組換えゼラチン、またはゼラチンを誘導することができるポリペプチドをリシルヒドロキシラーゼおよびリシルオキシダーゼの存在下で発現させる。別の態様では、発現後のポリペプチドを架橋により修飾する。さらに別の態様では、本発明は、反応性化学架橋剤、例えば、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（EDC）のような化学的手段により、架橋を実施する（実施例7参照）。上記以外に、ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート（BS³）、3,3'-ジチオビス(スルホスクシンイミジル)プロピオネート（DTSSP）、およびトリス-スルホスクシンイミジルアミノトリアセテート（Sulfo-TSAT）などの化学的架橋剤、また、当業者には公知の各種薬剤を用いてもよい。さらに、本発明は、様々な架橋度を有する組換えゼラチンの生産方法を提供し、これは、所望の融点、ゲル強度および粘度を有する組換えゼラチンを得る上で有用である。

10

【0138】

本発明は、組換えゼラチンの分子量、ヒドロキシル化度、および架橋度を操作することにより、様々なブルーム強度を有する組換えゼラチン、ならびに、様々な粘度を有する組換えゼラチンの生産を可能にする方法を提供する。

【0139】

プロリンヒドロキシル化は、天然コラーゲンの形成に中心的な役割を果たしている。また、配列X-Lys-Glyにおける特定のリシル残基のヒドロキシル化も、コラーゲン合成および繊維形成に重要な機能を果たす。修飾されたリシン残基上のヒドロキシル基は、炭水化物の結合部位としての機能と、安定した分子間架橋形成の必須部位としての機能を果たす。これらの修飾には、特定の酵素、すなわち、リシルヒドロキシラーゼおよびリシルオキシダーゼの発現が必要である。

20

【0140】

従って、本発明の一態様では、本発明のポリペプチドとこれら酵素との共発現が考えられる。本明細書に記載したように、リシルヒドロキシラーゼをコードする遺伝子（Hautalaら（1992）Genomics 13:62-69）を宿主細胞中で発現させ、その後、ゼラチンまたはゼラチンを誘導することのできるポリペプチドをコードする配列の導入によりさらに修飾する。本発明の組換えゼラチンは、従って、内在的に発現させたリシルヒドロキシラーゼおよびリシルオキシダーゼの活性により、翻訳後修飾することができる。本発明の組換えゼラチンはまた、外因性リシルヒドロキシラーゼおよびリシルオキシダーゼの発現により修飾することもできる。一実施形態では、生産された組換えゼラチンは非ヒドロキシル化されており、続いて、これをリシルヒドロキシラーゼの酵素活性によるリシン残基の所望される程度のヒドロキシル化の実施によって改変する。リシルヒドロキシル化度を改変できることは、所望のゲル強度および粘度をもたらす様々な架橋度を有するゼラチン、ならびに、ゼラチンを誘導することのできるポリペプチドを生産する上で望ましいことである。

30

【0141】

別の実施形態では、ヒドロキシリシン残基を含むポリペプチドを、例えば、酵母細胞中に発現させ、そこでは、ヒドロキシプロリンがプロリルヒドロキシラーゼの活性により生産される（実施例1および4を参照）。いくつかの実施形態では、修飾した組換えゼラチンまたはゼラチンを誘導することのできるポリペプチドを製剤化し、これを動物またはヒトに投与して、リシルオキシダーゼのような内在性酵素の基質として作用させ、これによって、コラーゲン性ポリペプチドが安定化した架橋形態で組織に組み込まれるようにする。従って、本発明の一態様は、リシルヒドロキシラーゼまたはリシルオキシダーゼの活性を必要とせずに、商業用途のための所望のゲル強度および粘度を有する組換えゼラチンの生産を可能にする。

40

【0142】

本発明はまた、特定のゲル化点を有するゼラチンの生産も可能にする。一実施形態では、

50

本発明は、15～35 の硬化またはゲル化点を有するゼラチンの生産を可能にする。別の実施形態では、組換えゼラチンは、15～25 、25～35 および20～30 の硬化点を有する。

【0143】

様々な態様において、本発明は、非ヒドロキシル化組換えゼラチン、完全ヒドロキシル化組換えゼラチン、または、様々な程度にまでヒドロキシル化された組換えゼラチン、例えば、ヒドロキシル化および非ヒドロキシル化製品の混合物であるゼラチンを提供する。さらに、本発明は、様々な加水分解度を有する組換えゼラチンの生産方法を提供する（実施例9および10参照）。ゼラチンヒドロキシル化物は典型的に、冷水溶解性であり、多様な用途で用いられ、特に、製薬および食品産業で用いられるが、これらの分野では、非ゲル化特性を有するゼラチンが求められる。ゼラチンヒドロキシル化物は、製薬産業において、皮膜形成剤、マイクロカプセル化工程、関節炎および関節鎮痛剤、錠剤、および各種栄養剤に用いられる。化粧品産業では、ゼラチンヒドロキシル化物はシャンプーおよびコンディショナー、ローション、および口紅やマニキュアなどその他の製品に用いられる。ゼラチンヒドロキシル化物は、タンパク質および活力飲料および食品の栄養補助剤として；ワイン、ビールおよびジュース透明化のための清澄剤として；また、食品香料および着色料などの添加剤のマイクロカプセル化に使用されている。ゼラチンヒドロキシル化物は、その皮膜形成性のために、工業用途、例えば、半導体製造における素子のコーティングなどにも使用されている。

10

【0144】

本発明の一実施形態では、コラーゲン配列からゼラチンを生産するが、該配列では、発現産物の挙動を改変するために、特定の天然ドメインが欠失または付加されている。本発明はさらに、インタクトな三重らせんコラーゲンを生産することなく、改変されたコラーゲン構築物から直接ゼラチンを生産する、組換えゼラチンの生産方法を包含する。特に、本発明は、標準的な三重らせんコラーゲンをコードしない様々な構築物の発現を含む組換えゼラチンの生産方法を包含する。例えば、特異的欠失により、コラーゲンゼン应答性領域、ならびに、免疫原性、例えば、抗原性およびアレルギー性の应答を誘発する各種領域を排除することができる。

20

【0145】

種々のコラーゲンの特定ドメインは、特定の活性と関連している（例えば、Shahanら（1999）*Con. Tiss. Res.* 40:221-232；Raffら（2000）*Human Genet* 106:19-28を参照；尚、両文献とも、本明細書に参照によりその全体を組み入れる）。特に、本発明は、特定の活性に関連するコラーゲン遺伝子の特定の領域を排除もしくは低減または増加するように改変されたコラーゲン構築物から誘導された組換えゼラチンを産生する方法を提供する。特に、このような領域を全部または一部欠失させることにより、特定の活性が欠如または低下したゼラチンを産生することができた。あるいは、特定領域の付加的コピーを付加することにより、活性が増強したゼラチンを産生することもできた。例えば、血小板細胞表面上の $\alpha 2 \beta 1$ インテグリン受容体により認識されるIおよびIII型コラーゲンにおける配列が同定されている（Knightら（1998）*J. Biol. Chem.* 273:33287-33294；およびMortonら（1997）*J. Biol. Chem.* 272:11044-11048；これらの文献はすべて、本明細書に参照によりその全体を組み入れる）。

30

40

【0146】

本発明の一態様では、血小板活性化領域を欠いたコラーゲン構築物から合成される断片からなる均質のゼラチンを産生することが望ましい。このようなゼラチンは、例えば、吻合術および血管移植などに関連する製品（例えば、ステントおよび移植装置用のコーティングを含む）に含まれる。このような製品は、有害な副作用、例えば、血栓症に関連する可能性があり、これは、このような製品の使用に伴ない、コラーゲン性製品に存在する血小板凝集領域の結果として発病し得る。一態様では、本発明は、ステントまたは類似装置に用いる場合、細胞結合の支持体を提供することができるが、血小板反応領域を含まないため、血小板凝集の危険性を最小限に抑える組換えゼラチンの産生方法を提供する（実施例2参照）。従って、本発明は、一実施形態で、組換えゼラチンを含むステントコーティ

50

ングを提供する。好ましい実施形態では、組換えゼラチンは、組換えヒトゼラチンである。様々な創傷の手当ての用途などの場合には、特定の凝集活性を誘導することができるドメインを含む組換えゼラチンを提供するのが望ましいだろう。

【0147】

本発明のゼラチンは、 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリン受容体により認識される領域をコードしないコラーゲン構築物から、もしくは、このような領域の1または複数のコピーを有する構築物から発現させることができ、これにより、血小板凝集および活性化を低減しないまたは低減する、均質でバラツキのないゼラチン製品が得られる。一態様では、本発明は、ゼラチンの直接発現、またはコラーゲン性ポリペプチドからのゼラチンのプロセッシングのいずれかにより、高度に効率的な組換え発現を用いて、組換えゼラチンの産生を提供する。本発明の産生方法は、多数の発現系のいずれか1つを用いることができることから、既存の抽出方法とは反対に、極めて高いフレキシビリティを提供する。産生材料は、例えば、酵母または植物バイオマスから入手することができる。例えば、本発明の方法に従い、均一サイズの特定のゼラチン分子が産生されるように命令することにより、特定の産生系での分泌を最適化することができる。様々な実施形態において、本発明のゼラチン、またはこれらのゼラチンが誘導されるポリペプチドは、発現系で産生される。このような発現系としては、限定するものではないが、細菌発現系のような原核生物発現系、ならびに酵母、動物、植物および昆虫発現系を含む真核生物発現系が挙げられる。トランスジェニック動物およびトランスジェニック植物などの発現系も考えられる。

【0148】

本発明は、ゼラチンまたは細胞中でゼラチンを誘導することができるポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの発現を提供する。一実施形態では、本発明はゼラチンまたは細胞中でゼラチンを誘導することができるポリペプチドをコードする少なくとも2以上のポリヌクレオチドの発現を提供することで、均質または不均質ポリペプチドである組換えゼラチンを産生する。本発明はさらに、コラーゲンプロセッシングまたは翻訳後酵素もしくは細胞中のそれらのサブユニットをコードするポリヌクレオチドの発現を提供する。様々な翻訳後修飾および様々な翻訳後酵素(例えば、プロリルヒドロキシラーゼ、リシルヒドロキシラーゼなど)は、本発明のゼラチンの例えば、ブルーム強度およびその他の物理的特性に影響を与えることができる。

【0149】

本発明の組換えゼラチンは、コラーゲン性配列から誘導する。本発明のコードポリヌクレオチドが誘導される配列は、最終的ゼラチン産物の意図する用途に所望する特性に応じて、ヒトまたは非ヒト配列から選択することができる。製薬および医療用途では、組換えヒトゼラチンが好ましい。非ヒト供給源としては、ウシ、ブタおよびウマなどの非ヒト哺乳動物源、ならびに、その他、ニワトリおよび魚類などの動物源が挙げられる。特に、非天然配列が考えられる。

【0150】

コラーゲンをコードする核酸配列については、当業界では広く記載されている(例えば、FullerおよびBoedtke (1981) Biochemistry 20:996-1006; Sandellら (1984) J. Biol Chem 259:7826-34; Kohnoら (1984) J. Biol Chem 259:13668-13673; Frenchら (1985) Gene 39:311-312; Metsarantaら (1991) J. Biol Chem 266:16862-16869; Metsarantaら (1991) Biochim Biophys Acta 1089:241-243; Woodら (1987) Gene 61:225-230; Glumoffら (1994) Biochim Biophys Acta 1217:41-48; Shiraiら (1998) Matrix Biology 17:85-88; Trompら (1988) Biochem J 253:919-912; Kuivaniemiら (1988) Biochem J 252:633-640; およびAla-Kokkoら (1989) Biochem J 260:509-516を参照。また、2000年11月10日付けで出願された「動物コラーゲンおよびゼラチン」と題する同時係属の同一所有である米国特許出願第_____号も参照されたい)。

【0151】

本発明の核酸配列を操作することにより、該コード配列を改変し、これを用いて、組換えゼラチン、または、組換えゼラチンを誘導することができるポリペプチドを産生すること

ができる。これは、限定するものではないが、遺伝子産物のプロセッシングおよび発現を修飾する改変などの多様な目的のために行う。例えば、選択的分泌シグナルは、あらゆる天然分泌シグナルで置換してもよい。下記のような当業界において公知の技法を用いて、突然変異を導入することもできる：例えば、指定部位突然変異誘発、PCR指定突然変異誘発、カセット突然変異誘発、ならびに、新しい制限部位を挿入する、あるいは、グリコシル化パターン、リン酸化、タンパク質分解ターンオーバー/分解などを改変する当業界において公知のその他の技法。さらに、特定の宿主細胞を用いて、発現系においてゼラチンを産生する場合、任意のトリプレットアミノ酸コドンのサイレント位置で、本発明のポリヌクレオチドを改変することにより、特定の宿主生物のコドン優先事項にさらに適合させることができる。

10

【0152】

本発明に従い用いることのできる改変ポリヌクレオチド配列としては、天然コラーゲン配列内にヌクレオチド残基の欠失、付加または置換を含む配列が挙げられる。このようなポリヌクレオチドは、同じまたは機能的に同等の遺伝子産物をコードすることができる。遺伝子産物自体も、コラーゲン配列内にアミノ酸残基の欠失、付加または置換を含んでいてよい。

【0153】

本発明のポリヌクレオチド配列をさらにコードされたポリペプチドの変異体をコードする配列に指令する。コードされたアミノ酸変異体は、変異体ポリペプチドをコードするための適したヌクレオチド変化を導入するための当業界において公知の種々の方法によって調製することができる。アミノ酸配列変異体の構築で重要な2つの変数は、突然変異の位置と、突然変異の種類である。本発明のゼラチンまたは本発明のゼラチンを誘導するポリペプチドのアミノ酸配列変異体は、ポリヌクレオチドを突然変異させて、天然には存在しないアミノ酸配列を得ることにより、構築するのが好ましい。これらのアミノ酸改変は、例えば、様々な種由来のコラーゲン（可変位置）、または高度に保存された領域（定常領域）で異なる部位で実施することができる。このような位置での部位は、例えば、第1を保存的選択（例えば、疎水性アミノ酸を異なる疎水性アミノ酸に）で、次により遠位の選択で（例えば、疎水性アミノ酸を荷電アミノ酸に）で置換することで典型的には連続的に改変し、次いで標的部位において欠失または挿入を行うことができる。

20

【0154】

固有の遺伝子コードの縮重により、起原が、天然、合成、半合成、あるいは、組換えのいずれにかかわらず、実質的に同じまたは機能的に同等のアミノ酸配列もしくはポリペプチドをコードする他の核酸配列を、請求した本発明の実施に用いることができる。特に、コドン最適化配列などの縮重変異体が、本発明では考えられる。さらに、本発明は、特にストリンジェントな条件下で特定の配列にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドを提供する。

30

【0155】

発現

本発明は、当業者が利用可能な発現系の範囲において好適に適用される。多数のこれらの発現系について以下に説明するが、本発明の用途は下記の具体的な実施形態に制限されないことを理解すべきである。

40

【0156】

様々な発現系を用いて、本発明の組換えゼラチン、または、これらのゼラチンを誘導することができるポリペプチドをコードする配列を含有および発現させることができる。このような系としては、限定するものではないが、組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミド核酸発現ベクターで形質転換した細菌などの微生物；酵母発現ベクターで形質転換した酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、パキユロウイルス）に感染させた昆虫細胞系；真菌ベクターで形質転換した糸状菌；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）もしくは細菌発現ベクター（例えば、pETまたはpBR322プラスミド）で形質転換した植物細胞系；あるいは、動

50

物細胞系が挙げられる。

【0157】

本発明のポリヌクレオチドの発現に使用するのに適した対照エレメントまたは調節配列は、宿主細胞タンパク質と相互作用して、転写および翻訳を実施する、エンハンサー、プロモーター、ならびに5'および3'非翻訳領域などのベクターの非翻訳領域である。このようなエレメントは、強度および特異性において様々であってよい。使用するベクター系および宿主に応じて、任意の数の好適な転写および翻訳エレメントを用いることができる。

【0158】

プロモーターは、その制御下で核酸の転写を制御する構造遺伝子の開始コドンから上流に位置する非翻訳配列である。誘導性プロモーターは、培地条件の変化、例えば、栄養素の存在または不在に応答して、その転写開始レベルを改変するプロモーターである。当業者であれば、本発明の方法での使用に適した宿主細胞で認識される多数のプロモーターを知っているであろう。

【0159】

プロモーター、エンハンサー、およびその他の制御エレメントは、当業者が適宜選択することができる。例えば、細菌系でクローニングする場合には、BLUESCRIPTファージミド (Stratagene, La Jolla, カリフォルニア州) またはpSPORT1プラスミド (GIBCO BRL) などのハイブリッドlacZプロモーターのような誘導性プロモーターを用いることができる。昆虫細胞では、バキュロウイルスポリヘドリンプロモーターを用いることができる。植物系では、植物細胞のゲノムに由来するプロモーターまたはエンハンサー (例えば、熱ショックプロモーター、RUBISCOの小サブユニット用のプロモーター; クロロフィルa/b結合タンパク質用のプロモーター; 種々の貯蔵タンパク質遺伝子用のプロモーターなど)、もしくは植物ウイルスに由来するプロモーターまたはエンハンサー (例えば、ウイルスプロモーターまたはリーダー配列、CaMVの35S RNAプロモーター、TMVのコートタンパク質プロモーターなど) をベクターにクローニングすることができる。哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子に由来するプロモーター (例えば、メタロチオネインプロモーター、 α -アクチンプロモーターなど) または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター (例えば、アデノウイルス後期プロモーター、CMV、SV40、LTR、TKおよびワクシニアウイルス7.5Kプロモーターなど) が好ましい。所望のポリペプチドをコードする配列の複数のコピーを含む細胞系を生成する必要がある場合には、適当な選択マーカーと一緒に、SV40またはEBVに基づくベクターを用いることができる。

【0160】

このようなプロモーターは、例えば、天然遺伝子からプロモーターを除去し、プロモーター配列の3'末端にコードポリヌクレオチドを配置するなどにより、本発明のゼラチンまたはゼラチン前駆体をコードするポリヌクレオチドに機能的に連結することができる。本発明で有用なプロモーターとしては、限定するものではないが、例えば、ラクトースプロモーター、アラビノースプロモーター、アルカリホスファターゼプロモーター、トリプトファンプロモーター、およびtacプロモーターのようなハイブリッドプロモーターなどを含めた原核生物プロモーター; 例えば、3-ホスホグリセリン酸キナーゼのプロモーター、その他の解糖酵素プロモーター (ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホホフルクトースキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼなど)、アルコールデヒドロゲナーゼのプロモーター、アルコールオキシダーゼ (AOX) 1もしくは2プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マルトースプロモーター、およびガラクトースプロモーターを含めた酵母プロモーター; 例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、鳥肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、SV40由来のプロモーターを含めた真核生物プロモーター、ならびに、標的真核生物由来のプロモーター、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 由来のグルコアミラーゼプロモーター、アクチンもしくはユビキチンプロモーター、哺乳動物由来の免疫グロブリンプロモーター、および天然コラーゲンプロモーターが挙げられる (例えば、de Boerら (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25; Hitzemanら (1980) *J. Biol. Chem.* 255:2073)

10

20

30

40

50

; Fiersら (1978) Nature 273:113; MulliganおよびBerg (1980) Science 209:1422-1427; Pavlakisら (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:7398-7402; Greenwayら (1982) Gene 18:355-360; Grayら (1982) Nature 295:503-508; Reyesら (1982) Nature 297:598-601; CanaaniおよびBerg (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5166-5170; Gormanら (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777-6781; およびNunbergら (1984) Mol. and Cell. Biol. 11(4):2306-2315)。

【0161】

本発明の方法のゼラチンおよびゼラチン前駆体をコードするポリヌクレオチド配列は、一般的な発現を指令する構成的プロモーターの転写制御下で実施することができる。あるいは、本発明の方法で用いられるポリヌクレオチドを特定の組織または細胞型に発現させるか、またはさらに精密な環境条件もしくは成長制御下で発現させる。これらの例において発現を指令するプロモーターは、誘導性プロモーターとして知られている。組織特異的プロモーターを用いる場合には、タンパク質発現は、タンパク質の抽出をしようとする組織で特に高い。例えば、植物では、所望の組織に応じて、内乳、アリューロン層、胚（または胚盤および子葉としての胚部分）、果皮、茎、葉、塊茎、根などに発現をターゲティングすることができる。植物における公知の組織特異的プロモーターの例としては、塊茎指向性I型パタチンプロモーター、ジャガイモ塊茎ADPGPP遺伝子に関連するプロモーター、種子指向性転写を駆動する β コングリシニン（7Sタンパク質）のダイズプロモーター、ならびに、トウモロコシ内乳のゼイン遺伝子由来の種子指向性プロモーターが挙げられる（例えば、Bevanら (1986) Nucleic Acids Res. 14:4625-4638; Mullerら (1990) Mol. Gen. Genet. 224:136-146; Bray (1987) Planta 172:364-370; およびPedersenら (1982) Cell 29:1015-1026を参照）。

【0162】

多くの場合、プロモーターからの本発明のゼラチンまたはゼラチン前駆体をコードする配列の転写は、ベクターにエンハンサー配列を挿入することにより増大される。エンハンサーは、通常、約10~300 bpのシス作用エレメントであり、これが作用して、プロモーターでの転写開始の速度を増大する。真核および原核生物の両者において、多くのエンハンサーが知られており、当業者であれば、目的とする宿主細胞に適したエンハンサーを選択することができるだろう（例えば、Yaniv (1982) Nature 297:17-18を参照）。

【0163】

本発明のゼラチンおよびゼラチン前駆体は、分泌タンパク質として発現させてもよい。タンパク質の発現に用いられる操作された細胞が、非ヒト宿主細胞である場合、コラーゲンタンパク質の分泌シグナルペプチドに代わって、宿主細胞の分泌標的機構によりさらに効率的に認識される別の分泌シグナルペプチドを用いるのが有利であることが多い。適した分泌シグナル配列は、哺乳動物遺伝子の最適真菌発現を得る上で特に重要である（例えば、Brakeら (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4642を参照）。その他の原核生物、酵母、真菌、昆虫または哺乳動物細胞のシグナル配列も当業界において公知であり、当業者であれば、選択した宿主細胞に適したシグナル配列を容易に選択することができるだろう。

【0164】

発現効率は、文献に記載されているように、使用する特定の細胞系に適したエンハンサーの導入により増強することができる（例えば、Scharf, D.ら (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-162を参照）。さらに、宿主細胞株は、挿入された配列の発現をモジュレートする、あるいは、所望の様式で発現タンパク質をプロセッシングする能力について選択することができる。ポリペプチドのこのような修飾としては、限定するものではないが、アセチル化、カルボシキル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、プレニル化およびアシル化が挙げられる。また、タンパク質の「プレプロ」形態を切断する翻訳後プロセッシングを用いて、正しい挿入、フォールディング、および/または機能を促進することも可能である。特定の細胞機構を備えると共に、このような翻訳後活性に特有の作用機構を有するCHO、HeLa、MDCK、HEK293およびWI38などの様々な宿主細胞を選択することにより

、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にすることができる。

【0165】

本発明に従い、組換えゼラチンまたはゼラチンを誘導できるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、適した宿主細胞中に発現させることができる。本発明の好ましい実施形態では、組換えゼラチンはヒトゼラチンである。本発明の別の好ましい実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、他の型のコラーゲンのコード配列を含まないI型コラーゲン配列、または他の型のコラーゲンのコード配列を含まないII型コラーゲン配列、または他の型のコラーゲンのコード配列を含まないIII型コラーゲン配列から誘導する。別の実施形態では、コードポリヌクレオチドは、指定量のI型およびIII型コラーゲンから誘導することにより、コードされたポリペプチドにより産生された、または該ポリペプチドから誘導されたゼラチンが、規定量のI型およびIII型コラーゲンの混合物を含むようにする。

10

【0166】

本発明のゼラチンが誘導されるコラーゲンを発現させるために、または本発明のゼラチンの産生をもたらす、天然コラーゲン配列以外の配列を発現させるために、コラーゲンをコードするヌクレオチド配列、もしくは機能的同等物、あるいは、その他の配列、例えば、表2に示すような短縮コラーゲン配列を、適した発現ベクター、すなわち、挿入されたコード配列の転写および翻訳に必須のエLEMENTを含むベクター、あるいは、RNAウイルスベクターの場合には、複製および翻訳に必須のエLEMENTを含むベクターに挿入する。

【0167】

当業者には周知の方法を用いて、所望のコード配列および適した転写／翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、標準的DNAクローニング法、例えば、*in vitro*組換え法、合成法、および*in vivo*組換えが挙げられる。例えば、Maniatisら（前掲）；およびAusubel, F. M. (1997) *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons（ニューヨーク州ニューヨーク）に記載されている技法を参照されたい。

20

【0168】

種々の発現系を用いて、本発明のポリペプチドを発現させることができる。例えば、典型的発現ベクターは、複製起点をコードするELEMENT；外因性ヌクレオチド配列挿入のためのクローニング部位；外因性遺伝子の転写開始を制御するELEMENT（プロモーターなど）；ならびに、転写産物のプロセッシングを制御するELEMENT（転写／終結／ポリアダニル化配列など）を含む。また、本発明で使用する発現ベクターは、染色体へのベクターの起こりうる組込みに必要な配列を含んでいてもよい。さらに、転写開始を制御するプロモーターに機能的に連結された選択マーカーをコードする遺伝子が発現ベクターに含まれていてもよく、例えば宿主内での発現ベクターの成長および選択を提供する抗生物質耐性遺伝子がある。

30

【0169】

本発明のベクターは、宿主細胞内で自律的に複製しても、または宿主染色体に組み込まれてもよい。自律的に複製する配列を有する好適なベクターは、種々の細菌、酵母ならびに原核および真核生物の両方における様々なウイルス複製配列について周知である。ベクターが、宿主細胞ゲノムDNAに存在する配列に相同的なDNA配列を有する場合、該ベクターは宿主細胞ゲノムに組み込まれ得る。

40

【0170】

組換えタンパク質の長期かつ高収率産生のためには、安定した発現が好ましい。例えば、安定して本発明のポリペプチドを発現させる細胞系は、ウイルス複製起点または適当な発現ELEMENT（例えば、プロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、ポリアダニル化部位など）と、同じまたは個別のベクター上に選択マーカー遺伝子を含む発現ベクターを用いて、形質転換することができる。ベクターの導入後、補強した培地で1～2日間細胞を成長させ、次に、選択培地に移す。組換えプラスミド中の選択マーカーが、選択に対する耐性を賦与するため、導入された配列をうまく発現する細胞を成長および回収することができる。安定して形質転換させた細胞の耐性クローンは、細胞型に適した組織培養

50

法を用いて増殖させることができる。所望のポリペプチドを発現する細胞系を産生するのにこの方法を用いることは有利でありうる。

【0171】

例えば、ガラクトースプロモーターにより駆動される、本発明の方法に用いられる様々な配列の発現は、下記のようにして誘導することができる：非抑制、非誘導糖で培養物を成長させて、ガラクトースの添加後、急速な誘導が起こるようにする；グルコース培地で培養物を成長させ、次に、遠心分離によりグルコースを除去し、細胞を洗浄した後、ガラクトース培地中に再懸濁させる；ならびに、グルコースとガラクトースの両方を含む培地で細胞を成長させることで、ガラクトース誘導が起こる前に、グルコースが優先的に代謝されるようにする。

10

【0172】

多数の選択系を用いて形質転換した細胞系を回収することができる。これらの系としては、限定するものではないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼおよびアデニンホスホリボシル-トランスフェラーゼ遺伝子が挙げられ、それぞれ、tkまたはaprf細胞で用いることができる（例えば、Wigler, M.ら（1977）Cell 11:223-32；Lowy, I.ら（1980）Cell 22:817-23を参照）。また、代謝拮抗物質、抗生物質または除草剤耐性を選択の基準として用いてもよい。従って、本発明では、このような選択マーカー、例えば：メトトレキサートに耐性を賦与するdhfr；アミノグリコシドネオマイシンおよびG-418に耐性を賦与するnpt；ならびに、クロルスルフロンおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼにそれぞれ耐性を賦与するalsまたはpatの使用が考えられる（例えば、Wigler, M.ら（1980）Proc. Natl. Acad. Sci. 77:3567-3570；およびColbere-Garapin, F.ら（1981）J. Mol. Biol. 150:1-14を参照）。

20

【0173】

上記以外の選択遺伝子も記載されており、例えば、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを使用できるようにするtrpB、あるいは、細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを使用できるようにするhisDがある（例えば、Hartman, S.C.およびR.C. Mulligan（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8047-51を参照）。近年、可視マーカーの使用が人気を集めており、現在、アントシアニン、βグルクロニダーゼおよびその基質GUS、ならびに、ルシフェラーゼおよびその基質ルシフェリンなどのマーカーが、形質転換体を同定するだけでなく、特定のベクター系によって起こり得る一過性のまたは安定したタンパク質発現の定量化に、広く用いられている（例えば、Rhodes, C.A.ら（1995）Methods Mol. Biol. 55:121-131参照）。

30

【0174】

以上述べてきたように、本発明の産生方法で用いる発現ベクターは、典型的に、細胞に選択可能な表現型を賦与するマーカー遺伝子を含むことができる。通常、この選択マーカー遺伝子は抗生物質耐性をコードし、好適な遺伝子は、少なくとも1セットの抗生物質スペクチノマイシンに対する耐性をコードする遺伝子、ストレプトマイシン耐性をコードするストレプトマイシンホホトランスフェラーゼ（SPT）遺伝子、カナマイシンまたはジェネティシン耐性をコードするネオマイシンホホトランスフェラーゼ（NPTH）遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、アセトラクテートシンターゼ（ALS）の作用を阻害するように作用する除草剤、特に、スルホニル尿素型の除草剤（例えば、S4およびノまたはHra突然変異）に対する耐性をコードする遺伝子、グルタミシンターゼの作用を阻害するように作用する除草剤（例えばホフィノトリシンまたはバスタ（basta））に対する耐性をコードする遺伝子（例えば、バー（bar）遺伝子）、あるいは、当業界において公知のその他類似遺伝子を含む。バー遺伝子は、除草剤バスタに対する耐性をコードし、またnptII遺伝子は、抗生物質カナマイシンおよびジェネティシンに対する耐性をコードし、ALS遺伝子は、除草剤クロルスルフロンに対する耐性をコードする。

40

【0175】

どの宿主細胞が、形質転換の後、目的とするポリヌクレオチドを含むかを決定するその他の方法には、当業者に公知の様々な方法が含まれる。これらの方法としては、限定するも

50

のではないが、DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションを含む核酸ハイブリダイゼーション、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの検出および/または定量化のための膜、溶液もしくはチップに基づく技法などの種々のタンパク質バイオアッセイまたはイムノアッセイが挙げられる。

【0176】

さらに、挿入配列の発現をモジュレートし、遺伝子産物を所望の特定形式で修飾およびプロセッシングする宿主細胞株を選択することができる。タンパク質産物のこのような修飾（例えば、グリコシル化）およびプロセッシング（例えば、切断）は、タンパク質の機能に重要であると考えられる。様々な宿主細胞が、タンパク質の翻訳後プロセッシングおよび修飾に特有な特定の作用機構を備えている。適した細胞系または宿主系を選択することにより、発現させた外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にすることができる。このため、一次転写産物の正しいプロセッシングのための細胞機構を有する真核宿主細胞を用いることができる。ここで、上記のプロセッシングには、遺伝子産物のタンパク質フォールディング、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、ならびに、リン酸化などの様々な修飾が含まれる。このような哺乳動物宿主細胞としては、限定するものではないが、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、WI38などが挙げられる。

【0177】

また特定の開始シグナルを用いて、本発明のポリヌクレオチドのより効率的な翻訳を達成することもできる。このようなシグナルとしては、ATG開始コドンおよび隣接配列が挙げられる。本発明のポリペプチドをコードする配列を、翻訳などに必要な任意の開始または上流配列と一緒に、適当な発現ベクターに挿入する場合、追加の転写または翻訳制御シグナルは何も必要としない場合がある。しかし、コード配列、もしくはその一部だけを挿入する場合には、ATG開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルを与えなければならない。さらに、開始コドンは、正しいリーディングフレーム内に配置することにより、全挿入体の翻訳を確実にしなければならない。外因性翻訳エレメントおよび開始コドンについては、天然および合成の様々な起源のものでよい（例えば、Bittnerら（1987）Meth. In Enzymol. 153:516-544）。

【0178】

本発明の宿主細胞は、本発明のゼラチン、または該ゼラチンを誘導できるポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド以外に、翻訳後酵素をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドで感染、トランスフェクト、あるいは、形質転換することができる。このようなポリヌクレオチドとしては、プロリル4-ヒドロキシラーゼ、コラーゲングリコシルトランスフェラーゼ、C-プロテイナーゼ、N-プロテイナーゼ、リシルオキシダーゼ、もしくはリシルヒドロキシラーゼなどのコラーゲン翻訳後酵素をコードするものが挙げられ、該ポリヌクレオチドを、天然に翻訳後酵素を産生しない細胞、例えば、酵母細胞、または十分な量の翻訳後酵素を天然に産生することのできない細胞、例えば、種々の昆虫および哺乳動物細胞に挿入し、外因性酵素に特定の翻訳後作用を生じさせることができる。本発明の一実施形態では、翻訳後酵素は、プロリル4-ヒドロキシラーゼであり、ポリヌクレオチドは、プロリルヒドロキシラーゼの α または β サブユニットをコードする。好ましい実施形態では、プロリル4-ヒドロキシラーゼの α および β サブユニットをコードするポリヌクレオチドを細胞に挿入することにより、生物学的に活性のプロリル4-ヒドロキシラーゼ酵素を産生させ、これをゼラチンまたはゼラチンを誘導できるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと共発現させる。

【0179】

翻訳後酵素をコードするポリヌクレオチドは、天然、合成、または組換えのいずれに拘わらず、任意の供給源に由来するものでよい。好ましい実施形態では、翻訳後酵素は、産生しようとする組換えゼラチンと同じ種から誘導する。一実施形態では、産生しようとする組換えゼラチンは、ヒト組換えゼラチンであり、翻訳後酵素は、ヒトプロリル4-ヒドロキシラーゼである。

【0180】

本発明の発現ゼラチンまたはゼラチン前駆体は、好ましくは、培地に分泌させ、当業界において公知の方法、例えば、クロマトグラフィーにより、均一になるまで精製することができる。一実施形態では、組換えゼラチンまたはゼラチン前駆体は、サイズ排除クロマトグラフィーで精製する。しかし、当業界において公知の他の方法を用いてもよく、これらの方法としては、限定するものではないが、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC)、ならびに逆相クロマトグラフィーが挙げられる (例えば、Maniatisら (前掲) ; Ausubelら (前掲) ; および Scopes (1994) Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag New York, Inc. N.Y. を参照)。

【0181】

原核生物

細菌系のような原核生物系では、発現させようとするポリペプチドの意図する用途に応じて、多数の発現ベクターのいずれか1つを選択することができる。例えば、本発明の組換えゼラチンまたはこれら組換えゼラチンを誘導できるポリペプチドが多量に必要な場合、容易に精製できる融合タンパク質の高レベル発現を指令するベクターを用いることができる。このようなベクターとしては、限定するものではないが、BLUESCRIPT (Stratagene) のような多機能大腸菌クローニングおよび発現ベクター (ここでは、コード配列を、アミノ末端Metの配列と、これに続くβガラクトシダーゼの7つの残基を含むフレーム内でベクターに連結することにより、ハイブリッドタンパク質を産生することができる) ; pINベクター (Van Heeke, G. および S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509) などが挙げられる。またpGEX (Promega, Madison, Wis.) およびpET (Invitrogen) ベクターを用いて、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) を有する融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させることができる。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、当業界において公知の様々な方法、例えば、グルタチオン-アガロースビーズへの吸着後、遊離グルタチオンの存在下での溶出により、溶解細胞から容易に精製することができる。このような系で作製されたタンパク質は、ヘパリン、トロンビン、または第Xa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計し、目的とするクローニングされたポリペプチドをGST成分から放出させることが可能である。

【0182】

酵母

好ましい実施形態では、本発明は酵素発現系を用いて組換えゼラチンを産生する方法を提供する。好ましい実施形態では、ゼラチンは、改変されたコラーゲン構築物から直接産生されるか、あるいはコラーゲン性ポリペプチドのプロセッシングから誘導される。構成的、非構成的、または誘導性プロモーターを含む多数のベクターを酵母系に用いることができる (例えば、Ausubelら (前掲)、第13章を参照)。いくつかの態様では、サッカロミセス・セレビシアエ (*S. cerevisiae*) での発現において、染色体へのDNA組込みを指令する配列を含むベクターを用いる。

【0183】

一実施形態では、本発明の組換えゼラチンまたはこれらのゼラチンを誘導できるポリペプチドは、酵母サッカロミセス・セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) からの宿主細胞を用いて発現させる。当業界で入手可能な多数の発現ベクター (α因子、AOX、GAL1-10 およびPGHのような構成的または誘導性プロモーターを含む多数のベクターを含む) と一緒にサッカロミセス・セレビシアエを用いることができる (例えば、Ausubelら (前掲) および Grantら (1987) Methods Enzymol. 153:516-544を参照)。一般に用いられる発現ベクターは、酵母および大腸菌のColE1起点両方での増殖のための2μ複製起点を含むシャトルベクターであり、外来遺伝子の効率的転写のための酵母プロモーターおよびターミネーターを含む。2μプラスミドを組み込むベクターとしては、限定するものではないが、2μORI-STBエレメント、GAL1-10を有するpWYG4およびpYES2などが挙げられる。ヒドロキシ化産物が求められる本発明の一方法においては、コラーゲン翻訳後酵素、例えば、プロリル4-ヒドロキシラーゼの共発現を含む。このような方法の1つでは、pWYG4ベクターを用いて、Nco1クローニング部位を用いて、プロリル4-ヒドロキシラーゼのαまたはβサブユ

ニットいずれかの遺伝子を挿入し、 α または β サブユニットいずれかのためのATG開始コドンを提供する。一方法では、宿主の染色体への直接組込みを指令する発現プラスミドを用いる。

【0184】

また、完全な2 α ORI、STB、REP1およびREP2、GAL7プロモーターおよびFLPターミネーターを有する発現ベクターpWYG7Lも用いることができる。翻訳後酵素、例えば、プロリル4-ヒドロキシラーゼの共発現が望ましい場合には、プロリル4-ヒドロキシラーゼの α または β サブユニットいずれかの遺伝子を、BamHIまたはNcoI部位にその5'末端を有するポリリンカーに挿入する。細胞壁の除去の前または後に、プロリル4-ヒドロキシラーゼ遺伝子を含むベクターをサッカロミセス・セレピシアエに形質転換することで、スフェロプラストを10
產生するが、該スフェロプラストは、カルシウムおよびポリエチレングリコールによる処理の際、またはリチウムイオンによる完全な細胞の処理によりDNAを取り込む。あるいは、エレクトロポレーションによりDNAを導入してもよい。LEU2、TRP1、URA3、HIS3またはLEU2-Dのような選択マーカーと一緒に、ロイシン、トリプトファン、ウラシルまたはヒスチジンに対する栄養要求性の宿主酵母細胞を用いて、形質転換体を選択することができる。

【0185】

別の好ましい実施形態では、本発明の組換えゼラチンを產生する方法は、酵母ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、またはその他の種の非サッカロミセス酵母由来の宿主細胞を用いるが、これらは増産工程で、高収率の組換えタンパク質を產生する上で利点を有20
する。ピキア属発現系は、原核生物 (例えば、大腸菌) 発現系 (高レベル発現、容易な増産、かつ安価な成長) および真核生物発現系 (タンパク質プロセッシング、フォールディング、および翻訳後修飾) の両方の利点を含む。このような発現系を、当業者には入手可能な様々な方法およびキット、例えばInvitrogen Corporation (San Diego, CA) から入手可能なピキア発現 (PICHIA EXPRESSION) キットを用いて構築することができる。

【0186】

ピキア・パストリス、またはピキア・メタノリカ (*Phichia methanolica*) などのメタノール酵母 (methylophilic yeast) には、多数のメタノール応答性遺伝子があり、各々の発現は、メタノール応答性調節領域 (プロモーターとも呼ばれる) により制御される。この20
ようなメタノール応答性プロモーターのいずれも、本発明の実施での使用に適している。具体的な調節領域の例としては、ピキア・パストリスAOX1由来の一次アルコールオキシダーゼ遺伝子用のプロモーター、ピキア・パストリスAOX2由来の二次アルコールオキシダーゼ遺伝子用のプロモーター、FLD1プロモーター、ピキア・パストリス由来のジヒドロキシアセトンシンターゼ (DAS) 遺伝子用のプロモーター、P40遺伝子用のプロモーターなどが挙げられる。典型的には、ピキア・パストリスでの発現は、厳密に調節されたAOX1遺伝子由来のプロモーターによって得られる (例えば、Ellisら (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:1111; および米国特許第4,855,231号)。また構成的発現は、例えば、GPHプロモーターを用いて達成することができる。

【0187】

本発明の方法で使用するのに好ましい別の酵母発現系は、メタノール酵母、ハンセヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) を利用する。この系は、例えば、高収率が求められる本発明の產生方法で用いることができる。メタノール上での成長により、MOX (メタノールオキシダーゼ)、DAS (ジヒドロキシアセトンシンターゼ)、ならびに、FMHD (ギ酸脱水素酵素) のようなキー酵素 (enzymes key) の誘導が起こる。これらの酵素は、全細胞タンパク質の30~40%までを占めることができる。MOX、DASおよびFMDH産生をコードする遺伝子は、メタノール上での成長により誘導され、かつグルコース上の成長により抑制される強力なプロモーターによって制御される。これら3つのプロモーターのいずれかまたはすべてを用いて、当業界において公知の方法に従い、ハンセヌラ・ポリモルファにおける異種配列の高レベル発現を達成することができる。

【0188】

10

20

30

40

50

本発明の一方法では、誘導性ハンセンラ・ポリモルファプロモーターの制御下で、コードポリヌクレオチドを発現ベクターにクローニングする。産物の分泌が求められる場合には、MF α 1のような酵母中での分泌用シグナル配列をコードするポリヌクレオチドを、本発明のポリペプチドのコード配列とともにフレーム内に融合させる。発現ベクターは、好ましくはURA3またはLEU2のような栄養要求性マーカー遺伝子、もしくは、栄養要求性宿主の欠失を補うのに用いることができる当業界において公知のその他のマーカーを含有する。あるいは、ゼオシンまたはブスタチンのような優性選択マーカーを用いてもよい。

【0189】

次に発現ベクターを用いて、当業者に公知の技法により、ハンセンラ・ポリモルファ宿主細胞を形質転換する。ハンセンラ・ポリモルファ形質転換の有用で、かつ興味をひく特徴は、発現ベクターの100コピーまでのゲノムへの自発的組込みである。ほとんどの場合、組み込まれた配列は、頭 - 尾構成を呈する多量体を形成する。組み込まれた外来DNAは、非選択的条件下でも、数種の組換え株において、有糸分裂が安定していることが明らかにされている。この高コピー組込みの現象は、当該系の産生性をさらに高めることになる。

【0190】

植物

本発明はまた、植物宿主細胞およびトランスジェニック植物を含めた植物発現系において、本発明の組換えゼラチンまたは該組換えゼラチンを誘導することができるポリペプチドの産生を意図する（例えば、Transgenic Plants: A Production System for Industrial and Pharmaceutical Proteins, OwenおよびPen編、John Wiley & Sons, 1996 ; Transgenic Plants, GalunおよびBreiman編、Imperial College Press, 1997 ; およびApplied Plant Biotechnology, Chopraら編、Science Publishers, Inc., 1997を参照）。植物発現ベクターを用いる場合、配列の発現を多数のプロモーターのいずれかにより駆動することができる。例えば、CaMVの35Sおよび19Sプロモーターのようなウイルスプロモーターを単独、またはTMV由来のオメガリーダー配列と組み合わせる用いることができる（例えば、Brissonら（1984）Nature 310:511-514 ; およびTakamatsu, N.（1987）EMBO J. 6:307-311を参照）。植物発現ベクターおよびリポーター遺伝子は、一般に当業界において公知である（例えば、Gruberら（1993）Methods of Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Pressを参照）。

【0191】

あるいは、RUBISCOの小サブユニットまたは熱ショックプロモーター（例えば、ダイズhsp17.5-Eまたはhsp17.3-B）などの植物プロモーターを用いてもよい（例えば、Coruzzi, G.ら（1984）EMBO J. 3:1617-1680 ; Broglie, R.ら（1984）Science 224:838-843 ; Winter, J.ら（1991）Results Probl. Cell Differ. 17:85-105 ; およびGurleyら（1986）Mol. Cell Biol. 6:559-565を参照）。これらの構築物を植物細胞に、Tiプラスミド、Riプラスミド、植物ウイルスベクター、直接DNA形質転換、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、病原体媒介感染、粒子ボンバードメント、あるいは一般に入手可能な多数の文献に記載されているような当業界において公知のその他の手段を用いて導入することができる（例えば、Hobbs, S.またはMurry, L. E., McGraw Hill Yearbook of Science and Technology（1992）McGraw Hill, New York, N.Y., pp. 191-196 ; WeissbachおよびWeissbach（1988）Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, 第VIII節、pp. 421-463 ; およびGriersonおよびCorey, Plant Molecular Biology, 第2版, Blackie, London, 第7～9章を参照）。

【0192】

様々な実施形態において、本発明の組換えゼラチンまたは該組換えゼラチンを誘導することができるポリペプチドは、例えば、キャノーラ、トウモロコシ、ダイズ、イネおよびオオムギの種子を用いた、利用可能な種子に基づく産生法により、種子から産生される。このような実施形態では、タンパク質を種子発芽 / 脱皮中に回収する。別の実施形態では、タンパク質を内乳または植物の他の部分に直接発現させ、これによって、ゼラチンが抽出されず、植物自体が例えばタンパク質源のような栄養補給源として働くことができる。

【 0 1 9 3 】

ポリヌクレオチドの発現を指令するのに用いることができるプロモーターは、異種または非異種のいずれでもよい。またこれらプロモーターを用いて、アンチセンス核酸の発現を駆動することにより、所望する通りに、発現を低減、増大または改変することができる。植物または植物細胞における配列の転写を増大および/または最大化するのに実施できるその他の改変は標準的であり、当業界において公知である。例えば、プロモーターに機能的に連結したポリヌクレオチド配列は、例えば、ペプチド輸送シグナル配列、コドン使用、イントロン、ポリアデニル化シグナルおよび転写終結部位など、コードされたポリペプチドの転写率を改変する少なくとも1つの因子をさらに含んでよい。植物での発現レベルを増大するための核酸構築物の改変方法は、一般に当業界において公知である（例えば、Rogersら（1985）*J. Biol. Chem.* 260:3731；Comejoら（1993）*Plant Mol Biol* 23:567-568を参照）。ポリヌクレオチドの転写率に影響を与える植物系の操作においては、正または負の作用配列、エンハンサーおよびサイレンサー、クロマチン構造などのような調節配列を含む、当業界において公知の種々の因子を用いることができる。

10

【 0 1 9 4 】

植物における外来遺伝子の発現に有用な典型的なベクターは、当業界において周知であり、限定するものではないが、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）の腫瘍誘導（Ti）プラスミドから誘導されたベクターが挙げられる。これらのベクターは植物組込みベクターであり、形質転換されると、宿主植物のゲノム中にDNAの一部を組み込む（例えば、Rogersら（1987）*Meth. In Enzymol.* 153:253-277；Schardlら（1987）*Gene* 61:1-11；およびBergerら（1989）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8402-8406を参照）。

20

【 0 1 9 5 】

植物細胞を形質転換する方法は、当業界において利用可能であり、例えば、直接遺伝子導入、*in vitro*原形質体形質転換、植物ウイルス媒介形質転換、リボソーム媒介形質転換、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、アグロバクテリウム媒介形質転換、および弾道粒子加速(ballistic particle acceleration)が挙げられる（例えば、Paszowskiら（1984）*EMBO J.* 3:2717-2722；米国特許第4,684,611号；欧州特許出願第0 67 53 3号；米国特許第4,407,956号；米国特許第4,536,475号；Crosswayら（1986）*Biotechniques* 4:320-334；Riggsら（1986）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606；Hincheeら（1988）*Biotechnology* 6:915-921；および米国特許第4,945,050号を参照）。イネ、コムギ、トウモロコシ、モロコシ、およびオオムギの形質転換のための標準的方法は、当業界ですでに記載されている（例えば、Christouら（1992）*Trends in Biotechnology* 10:239；Casasら（1993）*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:11212；Wanら（1994）*Plant Physiol.* 104:37；およびLeeら（1991）*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88:6389を参照）。コムギは、トウモロコシまたはイネを形質転換するのに用いられる方法と同様の技法で形質転換することができる（例えば、Frommら（1990）*Bio/Technology* 8:833；およびGordon-Kammら、前掲を参照）。

30

【 0 1 9 6 】

本発明の組換えゼラチンまたはこれらの組換えゼラチンを誘導できるポリペプチドを発現することができる植物または植物細胞を生成するのに用いることのできる付加的な方法は、当業界で十分に確立されている（例えば、米国特許第5,959,091号；米国特許第5,859,347号；米国特許第5,763,241号；米国特許第5,659,122号；米国特許第5,593,874号；米国特許第5,495,071号；米国特許第5,424,412号；米国特許第5,362,865号；および米国特許第5,229,112号を参照）。

40

【 0 1 9 7 】

本発明は、さらに組換えゼラチンまたは該組換えゼラチンを誘導することができるポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列からなる植物または植物細胞由来のバイオマスを提供することによってポリペプチドを産生する方法であって、その際、このようなポリヌクレオチド配列をプロモーターに機能的に連結してポリペプチドの発

50

現に影響を与える方法を提供する。さらなる実施形態では、本発明の方法はさらに、翻訳後修飾を触媒する酵素をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列またはそのサブユニットの共発現を含み、その際、このようなポリヌクレオチド配列をプロモーターに機能的に連結する。これらの方法では、組換えゼラチンまたはコラーゲン性ポリペプチドは、バイオマスから抽出される。

【0198】

真菌

また糸状菌を用いて、本発明のポリペプチドを産生することもできる。糸状菌において組換えタンパク質を発現および/または分泌するためのベクターは、当業界で周知であり、当業者であれば、当業界において入手可能な方法および製品を用いて、本明細書に引用した方法でこれらのベクターを使用することができよう（例えば、米国特許第5,834,191号参照）。

【0199】

昆虫

昆虫細胞系により、本発明のポリペプチドを大量に産生することが可能である。このような系の1つでは、*Autographa californica*核多角体病ウイルス（AcNPV）をベクターとして用いて、例えば、*Spodoptera frugiperda*細胞または*Trichoplusia*幼虫において外来遺伝子を発現させる。本発明のゼラチンまたはゼラチン前駆体をコードする配列をウイルス、例えば、多角体遺伝子の非必須領域にクローニングし、AcNPVプロモーター、例えば、多角体プロモーターの制御下に配置する。コード配列の挿入がうまくいけば、多角体遺伝子の不活性化が起こり、非閉鎖組換えウイルス（すなわち、多角体遺伝子によりコードされるタンパク質性コートを欠いたウイルス）が産生されるだろう。次に、これらの組換えウイルスを用いて、*Spodoptera frugiperda*細胞または*Trichoplusia*幼虫を感染させ、そこで、ゼラチンまたはゼラチン前駆体をコードするポリヌクレオチドを発現させる（例えば、Engelhard, E. K.ら（1994）*Proc. Nat. Acad. Sci.* 91:3224-3227；Smithら（1983）*J. Virol.* 46:584；および米国特許第4,215,051号を参照）。この発現系のさらなる例を、例えば、Ausubelら（1995）（前掲）にみいだすことができる。

【0200】

本発明のポリペプチドの組換え産生は、昆虫細胞において、例えば、必要であると思われる任意の翻訳後酵素をコードするものを含めて、適したポリヌクレオチド配列を含むバキュロウイルスベクターの感染により達成することができる。バキュロウイルスは、昆虫細胞において様々な組換えタンパク質を大量産生する上で、極めて効率的な発現ベクターである。当業界において公知の種々の方法を用いて、本発明のゼラチンまたはゼラチン前駆体をコードする配列と、適した転写/翻訳制御シグナルとを含む発現ベクターを構築することができる（例えば、Luckowら（1989）*Virology* 170:31-39；およびGruenwald, S.およびJ. Heitz（1993）*Baculovirus Expression Vector System: Procedure & Methods Manual*, Phamingen, San Diego, CAを参照）。

【0201】

動物

本発明は、本発明の組換えゼラチンまたは本発明の組換えゼラチンを誘導することができるポリペプチドを動物系において発現させる方法を提供する。このような系としては、哺乳動物および非脊椎動物宿主細胞、ならびにトランスジェニック動物が挙げられる。哺乳動物宿主細胞では、多数の発現系を使用することができる。アデノウイルスを発現ベクターとして用いる場合には、本発明のポリペプチドをコードする配列を、後期プロモーターおよび三部分(tripartite)リーダー配列から成るアデノウイルス転写/翻訳複合体に連結することができる。次に、このキメラ遺伝子をin vitroまたはin vivo組換えにより、アデノウイルスゲノムに挿入することができる。ウイルスゲノムの非必須E1またはE3領域への挿入を用いて、本発明のポリペプチドを感染した宿主細胞中に発現することができる生存可能なウイルスを取得することができる（例えば、Logan, J.およびShenk, T.（1984）*Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3655-3659を参照）。あるいは、ワクシニア7.5Kプロモータ

ーを用いてもよい（例えば、Mackettら（1982）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415-7419（1982）；Mackettら（1984），J. Virol. 49:857-864；およびPanicaliら（1982）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4927-4931を参照）。さらに、ラウス肉腫ウイルス（RVS）エンハンサーのような当業界において公知の種々の転写エンハンサーを用いて、例えば、哺乳動物宿主細胞における発現を増大することも可能である。

【0202】

セムリキ森林ウイルスは、哺乳動物細胞系の感染を可能にするような広い宿主範囲を有することから、好ましい発現系である。このようなウイルスベクターを用いた、哺乳動物宿主細胞、例えば、乳児ハムスター腎（BHK）細胞およびチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞の感染によって、極めて高い組換え発現レベルを達成することができる。さらに詳細には、セムリキ森林ウイルスは、発現系が染色体組込みに基づくものではないため、該ウイルスを広範囲の宿主に用いることが考えられ、従って、構造 - 機能関係を同定し、種々のハイブリッド分子の作用を試験することを目的とする研究において、組換えゼラチンの修飾を迅速に獲得する手段となるであろう。哺乳動物宿主細胞における外因性タンパク質の発現に用いられるセムリキ森林ウイルスベクターの構築方法は、当業界において公知であり、例えば、Oikkonenら（1994）Methods Cell Biol 43:43-53に記載されている。

【0203】

さらに、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（dhfr）が欠失したCHO細胞は、dhfr遺伝子および所望のポリヌクレオチドを含む発現プラスミドでトランスフェクトすることができる。当業界で知られているように、メトトレキサートの濃度の増大に耐性を有するCHO細胞の選択は、遺伝子増幅を経るため、所望の組換えタンパク質のより高い発現レベルを提供する。

【0204】

またトランスジェニック動物系を用いて、本発明の組換えゼラチンまたはこれらのゼラチンを誘導することができるポリペプチドを発現することもできる。このような系を、例えば哺乳動物においてプロモーターおよび哺乳動物腺で発現をもたらすことができるその他の必要なまたは任意の調節配列にコードポリペプチドを機能的に連結することにより構築することができる。同様に、翻訳後修飾をもたらす必要または任意の翻訳後酵素を、好適な発現系を用いる標的細胞中に同時に産生することができる。トランスジェニック動物を用いてタンパク質を組換えにより産生する方法は、当業界において公知である（例えば、米国特許第4,736,866号；米国特許第5,824,838号；米国特許第5,487,992号；および米国特許第5,614,396号；ならびに同時係属米国特許出願第08/987,292号を参照）。

【0205】

ゼラチンの使用

ゼラチンは、種々の製薬用および医療用の製品および装置の製造において、またはそれらの一成分として使用される。医薬品の約85%がウシ由来の材料（例えば、種々の製品において現在使用されているウシ・ゼラチン）を何らかの形態で含有していると推定され、例えば、医薬用安定剤、血漿増量薬、スポンジ、ハードおよびソフトゼラチンカプセル、坐薬などが含まれる。ゼラチンの皮膜形成能は、特に経口用で固形の製薬剤形（例えば制御放出性カプセル剤および錠剤、およびゼラチンが投与や送達などの容易性を向上させようとするコーティングとして役立つ他の多くの医薬品）用に設計される種々のフィルムコーティング系において利用される。ゼラチンは種々の形態で安定剤として用いられる。例えば製薬産業（例えば薬剤およびワクチン）、食品および飲料の製品および製法、工業的用途（例えばコンクリートの安定化）に用いられる。また種々の実験用溶液（例えば種々の細胞調製物）における安定剤としても用いられる。

【0206】

種々の食用形態のゼラチンは、長期にわたって食品産業および飲料産業で用いられてきた。ゼラチンは、種々の菓子製品およびデザート製品、特にプリン、フロスティング、クリームフィリングならびに乳製品および冷凍製品において広く用いられる。ゼラチンは、種々のホイップしたトッピング、スープやソースにおいて乳化剤および増粘剤として役立つ。ゼラチンは、ワインやフルーツジュースなどの種々の飲料の清澄化および澱下げにおい

て凝集剤として使用される。ゼラチンは、マヨネーズやサラダ用ドレッシングなどの種々の低脂肪および減脂肪製品において増粘剤および安定剤として用いられ、他の場合には代用脂肪として存在する。また、ゼラチンは、風味付与剤、色素およびビタミンのマイクロカプセル化でも広く使用される。ゼラチンはまた、種々の高エネルギー栄養ドリンクおよび食品（例えば体重減量産業およびスポーツ産業において一般化しているもの）におけるタンパク質補助剤としても使用できる。皮膜形成剤として、ゼラチンは、果実、肉、調製食品のコーティング、ならびに種々の菓子製品（キャンディーやガムなど）において使用される。

【0207】

化粧品産業では、ゼラチンは、種々のヘアケア製品およびスキンケア製品において用いられる。ゼラチンは、多くのシャンプー、ムース、クリーム、ローション、フェイスパック、口紅、マニキュアの溶液および製品、ならびに他の化粧品用の装置および用途において増粘剤および増ちょう剤(bodying agent)として使用される。また、ゼラチンは、化粧品産業において、種々の製品のマイクロカプセル化およびパッケージングにおいても使用される。

10

【0208】

ゼラチンは、広範囲の産業用途において使用される。例えば、ゼラチンは、種々の製造プロセスにおいてグルーおよび接着剤として広く使用される。ゼラチンは、例えばパッケージング用再湿型紙ガムテープの製造、木材の接着、種々のグレードの厚紙や紙の紙接着における種々の接着剤およびグルー剤において、ならびに再湿化により再活性化できる

20

【0209】

ゼラチンは、種々の電子装置において感光性コーティングとして役立ち、例えばカラーテレビやビデオカメラの製造などの種々のフォトリソグラフィープロセスにおけるフォトレジスト基剤として使用される。半導体の製造では、ゼラチンは、リードフレームの製作や種々の半導体素子のコーティングで使用される。ゼラチンは、種々の印刷プロセス、および特殊な品質の紙（例えば債務証書や株券などにおいて用いられるもの）の製造において使用される。

【0210】

写真用途におけるゼラチンの使用は、長い間定着している。ゼラチンは、X線および写真フィルムの現像において用いられる溶液などの写真溶液において、種々の活性成分の担体として使用される。ゼラチンは種々の写真製版技術においてずっと使用されており、種々のタイプのフィルムの一成分としても含まれ、フィルム製品および紙製品の種々の層におけるハロゲン化銀化学において多量に使用される。銀系ゼラチンフィルムは、マイクロフィッシュフィルムの形態および他の情報保管形態で見られる。ゼラチンは、種々のフィルムなどのセルフシール要素として使用される。

30

【0211】

また、ゼラチンは、種々の実験用途のための有用な材料でもある。例えば、ゼラチンは、種々の細胞培養の用途において使用して、例えばプレート、フラスコ、マイクロビーズまたは他の支持体のコーティングとして細胞の接着および増殖のための適切な表面を提供したり、あるいは増殖培地における適切なタンパク質供給源を提供することができる。加水分解された、もしくはゲル強度の低いゼラチンは、種々のプロセスにおいて、例えば、アッセイ[例えば固相酵素免疫アッセイ(ELISA)や他のイムノアッセイ]で用いられるコーティング溶液およびブロッキング溶液において、生物学的緩衝剤として使用される。ゼラチンはまた、生化学的分析および電気泳動分析に使用される種々のゲル(エンザイモグラフィ用ゲルなど)における一成分でもある。

40

【0212】

製薬

また、本発明は、種々の製薬および医療の用途における組換えゼラチンの使用を意図している。特に、1つの実施形態において、本発明は、組換えゼラチンを含む医薬組成物を提

50

供する。好ましい実施形態において、この組換えゼラチンはヒト供給源に由来するものである。本発明の組換えゼラチンは、天然のヒト・コラーゲン配列に由来するゼラチンを使用するので、該ゼラチン材料に対する免疫原性の危険を低減するという、当技術分野において従来では成し得なかった利点をもたらす。さらに、本発明のゼラチンは制御された環境において組換えによって生産されるので、TSEなどの因子または処理加工の際に導入される病原体および内毒素からの感染性の危険が最小限に抑えられる。

【0213】

市販材料の内毒素レベルは、典型的にはゼラチン1mg当たり約1.0～1.5EUの範囲である[例えば、Schaegger, H.およびG. von Jagow (1987) Anal. Biochem. 166:368-379; Friberger, P.ら, (1987) 「リムルス試験による細菌内毒素の検出(Detection of Bacterial Endotoxins with the Limulus Ameobocyte Lysate Test)」, Prog. Clin. Biol. Res. 231:149-169を参照]。本発明の方法では、内毒素レベルを2～3桁低下させることができる(実施例8を参照のこと)。したがって、本発明は、1つの実施形態において、実質的に内毒素を含まない、ヒト供給源に由来する組換えゼラチンを提供する。

10

【0214】

動物由来の材料に付随する免疫原性および感染性の問題がないゼラチン材料を提供することに加えて、本発明は、バラツキのない製品の再現可能な供給源を可能にする。具体的に述べると、本発明のゼラチンは、同一分子の均質な混合物として提供できる。特定の医療用途で望まれる物理的特性が、はっきり限定して導入されて、安定して達成され得る。したがって、本発明は、既存のゼラチン製品の入手可能性および使用に付随するバラツキを最低限に抑え、信頼性が高く一定した製品を提供する。

20

【0215】

特定の実施形態において、本発明の組換えゼラチンは、ハードシェルもしくはハードカプセル(典型的にはゼラチン溶液から製造されるもの)ならびにソフトシェルもしくはソフトカプセル(典型的にはゼラチンフィルムから製造されるもの)を含むカプセルの製造に使用できる。本発明の特定の実施形態では、組換えゼラチンを含むハードゲルカプセル、および組換えゼラチンを含むソフトゲルカプセル、ならびにこれらのカプセルの製造方法が提供される。ゼラチンの熱可逆性は、多くの用途(例えばそのようなゲルカプセルおよび錠剤の製造)において適切に利用されている特性である。ゼラチンは、適宜に加熱、成形または賦形でき、ホメオスタティック温度にて固有の特性を持つカプセルまたは錠剤コーティングを形成するのに使用できる。特定のゼラチンは、口内温度で溶け始めて飲み込みを容易にし、体内温度にて(例えば胃内で)液状になる。1つの実施形態において、本発明は、市販のカプセルおよびコーティングの溶解速度を持つ組換えゼラチンを提供する。別の実施形態において、本発明は、カプセルおよび錠剤化に適する向上した靱性を持つ組換えゼラチンを提供する。

30

【0216】

ゲルカプセルの製造のような特定の用途において、ゼラチンにより経時的に現れる脆性および硬さは、現在利用可能な動物由来ゼラチンの保存寿命および有用性を制限する重要なパラメーターである。経時的に粘度を維持できることは、特に製造した製品のバラツキの少なさを維持するために現在はゼラチンをかなり大きなロットで購入しているゼラチン含有製品の製造業者にとっては、価値ある利点であろう。さらに、ハードゲルカプセルの製造などの幾つかの製造プロセスでは、現在のところ、所望の特性を持つ材料を製造するためには、複数のゼラチン型(例えばA型およびB型のゼラチン)のブレンドが必要である。何故ならば、例えばB型のゼラチンだけを用いると、製造および使用の上であまりにも脆弱なハードゲルカプセルになってしまうからである。

40

【0217】

本発明の組換えゼラチンは、現在利用可能な材料よりも、純度が高く、よりよい特性を有している。したがって、本発明のゼラチンは、安定な材料を提供でき、その挙動においてより再現可能で予測可能なものである。さらに、本発明の方法を用いれば、1つの分子内または十分に特性付けられた分子の混合物内に、2つの型のゼラチンの構造特徴を併せ持

50

つ組換えゼラチンを作製することも可能である。

【0218】

本発明の組換えゼラチンはまた、種々の医薬品（例えば薬剤またはワクチン）における安定剤としても使用できる〔例えば、同じ出願人による同時係属中の米国特許出願第_____号（発明の名称：「ワクチン中の組換えゼラチン(Recombinant Gelatines in Vaccines)」、2000年11月10日出願、参照によりその全体を本明細書に組み入れる）を参照のこと〕。したがって、1つの実施形態において、本発明は、組換えゼラチンを含む安定剤を提供するものであり、この安定剤は製薬用途における使用に適する。好ましい実施形態において、この組換えゼラチンは組換えヒト・ゼラチンである。

【0219】

各種コラーゲンの様々な領域が種々の活性と関連する。例えば、III型コラーゲンの様々な領域が、凝固カスケードに関与する活性部位と関連している。したがって、1つの実施形態において、本発明は、特定のコラーゲン（1種または複数種）の特定の活性領域を含む組換えゼラチンをコードするポリヌクレオチドの使用を意図する。そのようなポリヌクレオチドは、種々の様式で（例えばマイクロアレイで）使用できる。したがって、そのようなポリヌクレオチドは、サンプル中の目的とするコラーゲン性ドメインに対応するmRNAポリヌクレオチドの変化した結合を同定するための診断用ツールとして使用可能である。コードされたポリペプチドは、特定のコラーゲン性ドメインに関連する活性および/または発現を抑制または増大させることが可能な薬物または化合物の種々のスクリーニング方法において使用可能である。

【0220】

また、本発明のゼラチンは、カプセル化（マイクロカプセル化を含む）、錠剤化、坐薬ならびに種々の医療用エマルジョンにおいても使用できる。また、本発明は、本明細書において提供される組換えゼラチンの、医療用スポンジ（例えば止血用スポンジ等）、創傷治療、および種々の外科用途における使用（例えば胎児内視鏡検査および他の処置において出入孔を取り除いた後で漏出を防止するのに用いられるスポンジとしての使用）を意図している。したがって、1つの態様において、本発明は、組換えゼラチンを含むスポンジを提供し、このスポンジは、医療処置における使用に適する。好ましい実施形態において、この組換えゼラチンは組換えヒト・ゼラチンである。

【0221】

本発明の組換えゼラチンは、特定の用途における使用に適する特定の物理的特性を持つように設計できる。本発明は、所望どおりの特定の特性を持つゼラチンを得るために、そして現在入手可能な材料では成し得なかった程度まで顧客の要求仕様に応えるために、最終ゼラチン製剤の特性（例えば分子量、ゲル強度およびpH）を変える方法を提供する。さらに、そのような製剤は、顧客が、本発明の組換えゼラチンにあわせて、既存のプロセスおよび製剤の改善を探索したり、新しい用途を開発することを可能にする。

【0222】

ワクチン製剤において用いられるような市販の動物由来の可溶型ゼラチンの分子量分布は、約0～30kDおよび約0～60kDの範囲である（実施例7および9を参照）。本発明は、適切な加水分解条件下での組換えヒト・ゼラチンの製造方法を提供するものであり、これにより、市販ゼラチンと一致する分子量分布を持つ組換えヒト・ゼラチンが得られ、同じ目的に使用できる。さらに、本発明は、市販の材料では得られない狭い分子量分布（例えば約10～30kDa、または約30～50kDa）を持つゼラチンの製造方法を提供する。

【0223】

本発明の組換えゼラチンおよびその組成物は、種々の外科的処置（例えば神経の再生を誘導および支援するための生分解性導管）、大型の外科手術におけるコロイド状容積置換材料、種々の出入孔部位（例えばカテーテル挿入部位および他の切開部もしくは創傷部）を封止するのに用いられるゼラチンスポンジ栓子、ならびに感染防止密封材としてのポリエステル移植片にも使用できる〔例えば、Mligilche, N.L.ら, (1999) East Afr. Med. J. 76(7):400-406; Beyerら, (1997) Br. J. Anaesth. 78(1):4-50; Luksら, (1999) Am. J.

10

20

30

40

50

Obstet. Gynecol. 181(4):995-996 ; およびFarooqら, (1999) J. Surg. Res. 87(1):57-61を参照のこと]。

【 0 2 2 4 】

本発明の医薬組成物は、関節炎、関節症、ならびに軟骨や関節の柔軟性の低下に関連する他の症状を含む種々の関節の症状の治療のために、被験者に投与できる。好ましい実施形態において、組換えゼラチンは、より高濃度のアルギニン、ヒドロキシプロリンおよびヒドロキシリシン、ならびに軟骨におけるコラーゲンおよびプロテオグリカンの産生に関連する他のアミノ酸を含む修飾されたアミノ酸配列を含む [例えば、Oesserら, (1999) J. Nutr. 129(10):1891-1895を参照のこと]。本発明のゼラチンを用いて合成されるミクロスフェアも意図される。そのようなマイクロカプセル化粒子は、例えば治療用のタンパク質もしくは小分子の指向性送達において使用されて、非炎症性で生物適合性である送達系を提供することができる [例えば、Brownら, (1998) Arthritis Rheum. 41:2185-2195を参照のこと]。別の態様において、本発明は、慢性関節リウマチにおける疾患活性を緩和するための、本発明の組換えゼラチンの経口投与を意図する [Arboreliusら, (1999) Rheumatol Int 18:129-135]。経口摂取型の医薬品においては、胃、消化管などの酸性環境における分解に対して安定性がある組換えゼラチンを提供することが望ましいと思われる。

10

【 0 2 2 5 】

カプセル化の技法、ならびに種々の製剤および薬剤送達系は、当業界では利用可能であり、多くの出典資料に記載されている [例えば、Gennaro, A.R.編, (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Publishing Co., Easton PAを参照のこと]。ある特定の状況について最も有効で都合の良い投与経路および最も適切な配合処方、当業界で公知の方法により容易に決定できる。

20

【 0 2 2 6 】

適切な投与経路としては、例えば、経口、直腸、経粘膜または経腸投与、ならびに、筋肉内、皮下、骨髄内注射、および骨腔内、直接的脳室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内または眼内注射などの非経口送達を挙げることができる。例えばワクチンは、静脈内、経鼻または経口で送達でき、生の弱毒化型、サブユニット型、1価型、2価型、3価型のワクチンなどの形態をとることができる。また、腸内放出などのための製剤も意図される。組成物は、全身的ではなく局所的に投与してもよい。本発明はまた、組換えゼラチンを含んでなる医薬組成物を提供するものであり、この組成物は、舌側または経鼻送達用のスプレー剤としての送達に適する。

30

【 0 2 2 7 】

食品

食品産業において、ゼラチンは、その物理的特性および純粋なタンパク質組成により、種々の様式での使用に適するようになり、例えば食料品および栄養補助食品の一成分としての使用が挙げられる。ゼラチンは、それ自体が食品となっており、炭水化物を含まない純粋なタンパク質供給源を提供することができる。さらに、ゼラチンの物理的および構造的特徴は、種々の食品の製造およびパッケージングの用途に有用である。例えば、ゼラチンは、ゲル化剤および増粘剤として；乳化剤および起泡剤として；凝固もしくはタンパク質-液体の分離を防止するために；「質感 (feel)」のために、もしくはコンシステンシーおよびテクスチャーを向上させるために；水分を保持するために；そして接着およびパッケージングにおいて (例えば食用フィルムとして) 用いられる。

40

【 0 2 2 8 】

食用ゼラチンは、純粋なタンパク質の特により有用な供給源として役立つことができる。したがって、1つの態様において、本発明は、組換えゼラチンを含むタンパク質補助剤を提供する。本発明のゼラチンは、例えば所望の特定量の必須アミノ酸を用いて製造できる。本発明は、特定の用途または最終製品にとって最適な特性を有する種々の食用ゼラチンの製造を提供するものであり、該ゼラチンはゲル、リーフ、または粉末の形態のいずれでもよい。

【 0 2 2 9 】

50

本発明は、様々な比率のアミノ酸残基をからなる組換えゼラチン製品を提供する。典型的には、ゼラチンは、ヒトにとって必須のアミノ酸の大部分を含み、例えば、リシン、アルギニン、ロイシンおよびイソロイシンが含まれる。1つの実施形態において、本発明は、特定の比率の所望のアミノ酸からなる組換えゼラチンを提供する。例えば、スポーツマンの食事を補助しようとする食品に用いられるゼラチンは、より高レベルの、リシン（筋肉成長のためになる）およびアルギニン（クレアチンの前駆体として、筋肉細胞のエネルギー代謝に関与する）などの残基を含むことになる。ゼラチンは、一般に、他のタンパク質供給源（例えば肉や乳製品）のアミノ酸組成を完全なものにして高めることにより、食品の栄養価を強化するのに役立つことができる。

【0230】

ゼラチンには、ほとんど味がなく邪魔にならない程度の味しかないので、味のよい栄養補助剤となり得る。例えば、加水分解されたゼラチンは、デザートやキャンディーおよび他のカロリー食品において、より濃厚な炭水化物溶液の代替品として使用されて、カロリー含量を低減する。また、ゼラチンは、例えばダイエット産業において製造される低カロリー食品または高エネルギー食品などの、栄養価の高い食品のタンパク質供給源としても役立つことができる。ゼラチンは、タンパク質供給源として役立つだけでなく、炭水化物を含まない担体もしくは充填剤（例えば噴霧もしくは乾燥インスタント食品および調味料におけるもの）として、または清澄剤および澱下剤（例えばワインおよびジュースにおけるもの）として役立つことができる。

【0231】

ゼラチンが所望の特性（例えばテクスチャー、色および透明性）を付与できることは、非常に有用である。そのような製品のテクスチャーは、用いる成分のタイプ、配合上の変動要素、およびその製品がどのように加工され取り扱われるのか、によって大きく左右される。例えば製菓の用途では、ゼラチンは、打錠菓子および一般的なガム状製品などの、種々のゲル化製品の中に見られる。ゼラチンは、ゲル化剤として用いて、柔らかくて弾力があるものから脆くて固いものまでのテクスチャーを付与する。完成した製品のテクスチャーおよび口当たりは、用いるゼラチンのブルーム強度、濃度および配合処方に応じて決まる。さらに、ゼラチンのコロイド特性は、色素や染料の下地を提供して、最終製品の所望の不透明度または透明度ならびに色を可能にする。したがって、1つの態様において、本発明は、ゲル化菓子製品の製造において、所望のテクスチャー特性、光沢および透明度を付与するゼラチンの使用を可能にする。別の態様においては、粘度が比較的低い適切なゼラチンが選択される。何故ならば、高い粘度では、製造の際に沈積しているシロップの望ましくない「テイリング」が起こって、欠陥商品となる可能性があるからである。一般的に言って、ゼラチンのブルーム値が高くなるほど製品は固くなるので、ゼラチン含有量を増大させることにより、製品はより固くなり、シコシコしたテクスチャーとなる。

【0232】

例えば空気を含む菓子製品の製造などで広く利用されているゼラチンの1つの特性は、泡を発生してそれを支え、取込まれた気泡の周囲に膜を形成することにより気/液境界面での迅速なゲル化を促進する、その能力である。空気含有製品は、マシュマロ、フロスティング、ヌガー、およびクッキーやウエハースのフィリングを含む、菓子製品の大きなファミリーをなしている。特定の製品に必要とされる空気含有の程度およびゲル化時間は、使用するゼラチンの型およびグレード、ならびに最終製品中のゼラチンの濃度に応じて決まる。使用するゼラチンの型および割合を変えることにより、空気含有製品のテクスチャーを変化させることができる。例えば、ブルーム値（すなわちゲル強度）が高いゼラチンほど脆い歯ごたえをもたらす、ブルーム値が低いゼラチンほど、弾力のあるテクスチャーをもたらす。

【0233】

ゼラチンは、脂肪を含有し僅かに空気を含ませてある果実グミおよび他のシュガープル（sugar-pulled）菓子製品種（例えばトフィーやキャラメル）の製造において、多くの機能を果たす。例えば、ゼラチンは、脂肪の乳化を補助して、分散および安定性を向上させ、

10

20

30

40

50

所望のテクスチャーおよび歯ごたえ、ならびに起泡能力を付与し、例えばショ糖の結晶化を調節することにより最終製品の保存寿命を付与する。典型的には、これらの製品では、ブルーム値約150～200のゼラチンが0.5～1.5%w/wの使用レベルで用いられる。したがって、1つの態様において、本発明は、食料品において使用するための、ブルーム値約150～200の組換えゼラチンを意図する。

【0234】

ゼラチンは、粉砂糖および砂糖シロップに分散させた脂肪からなる固相および液相の両者を含むクリームペーストにおいて、粘着性のあるテクスチャーをもたらす。ゼラチンは、脆いテクスチャーを防止しひび割れを抑制するための結合剤として作用する。ゼラチンの結合特性は、トローチおよび圧縮錠剤においても利用されている。リコリス (licorice;カンゾウキャンディー) のような製品において、ゼラチンは、多くの場合は小麦粉などの物質と組み合わせて、結合剤として作用し、保湿性を大きく向上させ、製造の際のひび割れや崩壊を防止する。ゼラチンはまた、例えばリコリスなどの菓子製品が保存の間に乾燥しないようにするのに役立ち、製品の保存寿命を向上させる。したがって、本発明は、1つの実施形態において、組換えゼラチンを含む結合剤を提供するものであり、この結合剤は、食料品の一成分となり得る。本発明はさらに、組換えゼラチンを含む保湿剤を提供するものであり、この保湿剤は食料品における使用に適する。

10

【0235】

ゲル化製品は種々の形態で利用可能であり、例えば、砂糖、ゼラチン、酸、風味付与剤および色素が溶解されてゲル化されている即席製品、乾燥ブレンド粉末混合物または錠剤が挙げられる。融点が約25～35の弾性組織化した熱可逆性ゲルを形成するゼラチンの能力はそのような使用に利用されている。これらのゲル性製品の最終的なテクスチャー、硬さおよびゲル化速度は、該ゼラチンの濃度および物理的特性、特にブルーム強度および粘度レベルにより調節される。ゼラチンデザート製造において、より高いグレードのゼラチンをより低い濃度で使用して特定の硬さのゲル化製品を製造することは、より低い強度のゼラチンをより高い濃度で用いる場合と比較して、経済面での利点ならびに透明度および着色の向上などの利点がある。したがって、1つの実施形態において、本発明は、組換えゼラチンを含むゲル化剤を提供するものであり、このゲル化剤は食料品における使用に適する。

20

【0236】

ゼラチンは、アイスクリーム、ヨーグルトおよびプリンなどの、特定のテクスチャーおよび口当たりが望まれる種々の乳製品の製造において使用されることが多い。特にゼラチンは、滑らかで、均一に組織化されたコンシステンシーおよびクリーミーな口当たりを付与する。ゼラチンは、他の親水コロイドと組み合わせて、低脂肪マヨネーズおよびサラダ用ドレッシングにおける増粘剤および安定剤として使用される。

30

【0237】

低脂肪および無脂肪乳製品の数や要望が益々増えるに従って、ゼラチンは、完成製品の製品テクスチャー、コクおよび口あたりに多大に貢献することができる。その脂肪様の溶融特性のために、融点が約25～35であるゼラチンは、所望の官能的特性または「口の中で溶ける」特性を付与して、十分に脂肪を含む製品のテクスチャーに近いものにする。

40

【0238】

健康に対する意識が高い社会では、ゼラチンは、低脂肪もしくは減脂肪および無脂肪ヨーグルト製品における安定剤として十分に適しており、脂肪を含まない状態で、コクや口当たりを付与し、滑らかで、きめ細かく、クリーミーなテクスチャーを生み出す。さらに、ゼラチンは、液離、すなわちホエータンパク質の分離を防止することによって、これらの製品を安定化する。これに関して、ゼラチン製品は、水を結合するゲル網目構造を形成するように機能して、ホエータンパク質の滲出および分離を防止し、こうして製品の保存寿命に役立つ。ゼラチンはまた、濃縮クリームの製造にも使用され、この場合、ゼラチンのゲル化特性および乳化特性がクリームの粘度を増大させるのに利用される。また、ゼラチンは、サワークリーム、ソフトチーズ製品および酸味のある乳製デザート (例えばチーズ

50

ケーキ)、ならびに風味付けしたミルクベースのデザート(例えばムース、シフォンおよびスフレ)においても広範にわたって使用される。クリーム粘度は、使用するゼラチンの濃度およびゲル化特性を変えることにより、希望どおりに変化させることができる。そのような使用のための典型的なゼラチンレベルは、0.2~0.8%w/wの範囲であるが、種々の製品においては、それより高い、またはそれより低いゲル強度が望まれる場合がある。本発明は、組換えゼラチンを含む安定剤を提供する。

【0239】

食品産業および健康産業では、減脂肪または無脂肪の製品の需要が拡大している。ゼラチンは、その食事性の特性(例えば脂肪を含まない状態でタンパク質を提供できること)のために、体重減量産業において、ならびに患者、回復期患者および特別な食事性の感受性もしくは要求がある個体のために設計された製品において有用になっている。ゼラチンのタンパク質含量は、炭水化物を含まない栄養価を付与する。ゼラチンは、その栄養価に加えて、非常に消化が良いので、容易に吸収される液状食品に添加できる。純粋なゼラチンは、脂肪、糖、プリンまたはコレステロールを含まない。ゼラチンは、その物理的特性、タンパク質含量、および強い味がないことにより、多くの製品において好ましい代替脂肪となっている。ゼラチンは、例えば低脂肪のバターやマーガリンなどの製品において、乳化安定剤として広く使用されている。増粘剤および結合剤としては、ゼラチンは、種々の食品において脂肪分の全体または一部を代替できる。例えば、ゼラチンは、クリーム、バターおよび他の乳性脂肪;卵黄;ならびに他のデンプン質の製品などの、高カロリー結合剤を代替できる。さらに、ゼラチンの保湿特性は、多量の水を結合させる上で役立ち、食後の満足感や満腹感をより高くする。

【0240】

ゼラチンの官能的感触または口当りは重要である。何故ならば、多くの無脂肪または減脂肪製品は、脂肪の口当たりや食味にできるだけ近いものに似せようとしているからである。低脂肪配合物においてゼラチンを使用することにより、脂肪を十分に含む製品と同等のテクスチャーを達成することが可能であり、それにより、好ましいテクスチャーおよび口当りを維持しながらも、低カロリー含量が達成される。使用するゼラチンの量は、完成製品に(多少なりとも)含まれる脂肪の割合に応じて決まる。例えば、製品の完全性および官能的訴求を維持するためには、60%の脂肪含有量では0.5%w/wのゼラチンが用いられ、25%の脂肪レベルでは約3.5%w/wのゼラチンが用いられる。本発明により製造されるゼラチンは、それが含まれる食品の融点、または好ましくはヒトの体温もしくは口内温度とほぼ同様の融点を持つことができるので、食する温度でゼラチンが溶け、その分だけリッチな口当たりとなる。さらに、ゼラチンの穏やかな食味は、特定の食品の風味付与剤に影響を及ぼさない。最後に、ゼラチンは非常に消化され易い。したがって、ゼラチンを脂肪代替品として用いれば、カロリーを低下させることができ、その分だけテクスチャーやリッチ感が低下すること、その分だけ食味や消化性に負の影響を及ぼすこともない。本発明は、1つの態様として、組換えゼラチンを含む脂肪代替品を提供するものであり、この脂肪代替品は食品における使用を意図している。好ましい実施形態において、その組換えゼラチンは約25~約35の融点を持つ。

【0241】

ゼラチンは、組織の空洞部に浸透したり、それを充填することにより、調理済ハムなどの肉を含む種々の缶詰食品および保存食品の外観およびスライス特性を向上させる。缶詰肉食品において、ゼラチンは、レトルト処理の際に出てくる肉汁を吸収する役目をし、スライス特性を向上させ、製品に満足な外観を付与する。これらの例においては、カルシウム含量が低いゼラチンを選ぶべきである。何故ならば、肉汁中のリン酸からのリン酸カルシウムの析出が起こる場合があるからである。魚介などの缶詰の用途では、殺菌工程の際に適用される熱処理に耐えるために、高いゲル強度を持つゼラチンが用いられる。選択した殺菌の程度およびゲル強度に応じて、ゼラチンレベルは通常は0.5~5.0%w/wの範囲である。ゼラチンはまた、缶詰魚介や缶詰肉および種々のゼリー状(アスピック)製品における結合剤およびゲル化剤としても役立つ。

【0242】

ゼラチンは、ソーセージのコーティングに適用される。この場合、ゼラチンは、香辛料を製品（例えばサラミ）の表面に結合させる上での接着剤として使用される。ソーセージは、典型的には高いブルームおよび高い粘度を持つゼラチンの濃縮溶液中でディップコーティングして、該ゼラチンにゲル化する時間を与え、製品表面からの流出を抑える。そのようなコーティングはまた、例えば、ダイズや他の肉代替製品の製造、および種々の果実、肉および調製食品のコーティングにおいても用いられる。1つの態様において、本発明は、組換えゼラチンを含む食用コーティング剤を提供する。

【0243】

また、ゼラチンは、種々の風味付与剤、色素および他の添加剤、ならびにビタミンのマイクロカプセル化においても使用される。

10

【0244】

特に意図されるものは、安定剤、増粘剤、皮膜形成剤、結合剤、食用コーティング剤、ゲル化剤、タンパク質補助剤、乳化剤、色素や風味付与剤やビタミンのためのマイクロカプセル化剤などとして使用可能であり、また種々の食品補助剤（例えば栄養補助剤やダイエット補助剤など）および脂肪代替品において使用可能である種々の組換えゼラチンである。1つの実施形態において、本発明のゼラチンは、ユダヤ教徒、イスラム教徒、菜食主義者の消費者に向けて調製した食品、または特定の動物由来の製品を含む食物の摂取を制限する他の食事の加工およびパッケージング、またはそれらの一成分として用いられる。

【0245】

20

ヒトでの消費が意図される食品において使用されることに加えて、ゼラチンは、ペットフードのバーやペレット、スナック類およびチュアブル（噛み砕き剤）の製造における結合剤として使用される。これらの製品においてゼラチンがもたらす構造的利点に加えて、ゼラチンの高いタンパク質含量は、動物の骨格系変性疾患の症状緩和、ならびに毛皮の生えやテクスチャーの改善などの正の効果を付与できる。

【0246】

写真

別の態様において、本発明は、組換えゼラチンを含む写真用組成物を含む。好ましくは、その組換えゼラチンは部分的にヒドロキシル化されている。ゼラチンは、種々の写真プロセスおよび写真製品（例えばフィルムおよび紙を含む）において重要な成分である。ゼラチンは、感光性製品における結合剤として使用され、この場合、ゼラチンのゲル固化特性および皮膜形成特性によって、1回の適用で複数のコーティングを手がけることが可能な、鮮明で、均一で、耐久性のあるコーティングが得られる。結合剤としてのゼラチンは、所望の均一なコンシステンシー、固化または接着を生じさせ、提供する。ゼラチンはまた、カラー写真製品において、カップリング剤および色素のエマルジョンを安定化させる。

30

【0247】

ゼラチンは、ハロゲン化銀エマルジョン層、トップコートもしくは表面層、中間層およびバックコートを含む写真コーティングにおいて不可欠である。ゼラチンの化学的特性およびコロイド特性は、写真用ハロゲン化銀エマルジョンの正確な沈着および化学的成熟を可能にする。乳化液の中には、非ゲル化型の魚ゼラチンを用いるものがあり、これは、40%という高濃度および20℃という低温であっても溶液中で液状のままであることができる。

40

【0248】

1つの実施形態において、上記組換えゼラチンは、低い分子量および低いゲル化温度を有する。別の実施形態では、該組換えゼラチンは、低いゲル化点を有するが、既存の非ゲル化型の魚由来ゼラチンまたは動物由来ゼラチンの加水分解物で達成されるよりも高い分子量を持つ。

【0249】

本発明の組換えゼラチンは、種々の写真用途において使用でき、例えば、フィルム上および紙上の双方におけるハロゲン化銀の支持が挙げられる。1つの実施形態において、該組換えゼラチンは、ゲル化温度が15～25℃である。該組換えゼラチンは、噴霧乾燥して、低

50

密度で冷水に可溶性である粉体またはフィルムとして提供でき、したがって、例えばフォトレジスト系などの種々の技術的用途での使用に有利である。また、本発明のゼラチンは、ゼラチンフィルターにおいても使用できる。本発明は、それぞれの特定のニーズの厳密な特性を満足するように特別設計された写真用ゼラチン製品、ならびにそのようなゼラチンの製造方法を意図する。

【0250】

その他

本発明の組換えゼラチンは、その独特で統合された化学的構成およびそれに対応するその物理的特性のバラツキの少なさのために、市販ゼラチンと比較して種々の技術的利点をもたらす。したがって、本発明の組換えゼラチンは、現在は抽出型ゼラチンが関わっている技術的用途に使用できる。例えば、本発明のゼラチンは、種々の工業プロセスにおいて使用でき、例えば（限定するものではないが）紙のサイジングおよびグラビア、コロタイプ、スクリーン印刷プロセス、マイクロカプセル化色素、コピー転写紙、およびアラビアゴムとのコアセルベート複合体の形成によってゼラチンでコーティングされる他の紙および板が挙げられる。また、本発明のゼラチンは、滑らかな沈積を確実にするための電気メッキにおいて、ある重合反応における保護コロイドとして、そして半導体製造におけるコーティングもしくは皮膜形成剤としても使用できる。

10

【0251】

別の実施形態において、本発明のゼラチンは、株券、銀行券などの特殊な品質の紙の結合剤として使用される。本発明のゼラチンは、さらに、マッチペースト用の結合剤として役立ち、より低い密度およびより均一なマッチの燃焼をもたらす、ならびに研磨紙を製造するためのキャンパス上または紙バックング上での研磨粒子の固定をもたらす。

20

【0252】

ゼラチンの特徴、例えばその保護コロイドとして役立つ能力やpHの変化に伴ってその電荷を変える能力は、相俟って、ゼラチンが、マイクロカプセル化用に適する材料となる。したがって、ゼラチンおよびその誘導体は、種々のマイクロカプセル化の装置および技術において、例えばノンカーボン紙用のインク、宣伝用および試供品製造用の香水、多成分接着剤において用いられる化学物質、ならびにビタミンおよび栄養補助剤のマイクロカプセル化において使用できる。ゼラチンおよびその誘導体のマイクロカプセル化能はまた、酸素、香気および水蒸気の透過性を最低限に抑えられるようにするパッケージングを含む包装材料の製造においても有用である。したがって、ゼラチンは、食品、医薬品および他のデリケートな製品のパッケージングなどの、可撓性のパッケージングにおいて広く使用される。

30

【0253】

ゼラチンにより付与される接着作用および表面張力の低下のために、ゼラチンは葉用の肥料に有用なものとなる。ゼラチンのアミノ酸は安定でゆっくり分解されるために、該肥料によりもたらされる正確に調整された栄養素濃度は維持され、長期にわたって利用可能になる。ゼラチンはまた、肥料ペレットの製造における生分解性の結合剤としても有用である。

【0254】

ゼラチンは、そのアミノ酸組成のために、窒素の複合供給源として、例えばペニシリウム・クリゾゲナム (*Penicillium chrysogenum*) によるペニシリンの合成、ならびに種々の出発培養物および抗生物質の製造に有用なものとして役立つことができる [例えば、Leon hartsbergerら, (1993) J Biotechnol 30:299-313を参照のこと]。

40

【0255】

本発明の組換えゼラチンは種々の実験用途に使用できる。その場合、本発明の組換えゼラチンの再現性および均一性は非常に有用であり、実験プロセスおよび組成物における望ましくないバラツキが最低限に抑えられる。例えば、本発明の組換えゼラチンは、種々の組織培養用途において使用して、増殖培地において適切なタンパク供給源を提供し、ある用途では、細胞増殖マトリックスもしくはスカフォールディング（足場）、または細胞の接

50

着および増殖のための他の表面を提供することができる。本発明はまた、組換えゼラチンを含む細胞保存用製剤を提供する。そのような製剤は、例えば血小板細胞の調製物を保存するために使用して、該溶液を投与および使用まで保護することができる。本発明は、加水分解された、もしくはゲル強度が低い組換えゼラチンを含む生物学的緩衝液（例えば種々のブロックング溶液およびコーティング溶液）を意図する。さらなる実施形態において、本発明は、生化学的分析および電気泳動分析（例えばエンザイモグラフィ用ゲル）に用いられる種々のゲル用の再現可能な組換えゼラチンを提供する。

【0256】

本発明はまた、組換えゼラチンで被覆されたマイクロキャリアビーズを包含する。そのようなマイクロキャリア（例えば哺乳動物細胞の培養において用いられるもの）は、接着依
10
存性細胞の増殖表面を提供する。例えば、多糖およびポリスチレンのビーズを本発明の組換えゼラチンで被覆して、細胞の接着および増殖のための適切な表面を提供する。1つの実施形態において、本発明のマイクロキャリアビーズは、特定の細胞の分化および増殖を誘導できる活性なコラーゲン性ドメインを含む特定の組換えゼラチンで被覆される。

【0257】

各種コラーゲンの様々な領域が種々の活性に関与している。例えば、III型コラーゲンの種々の領域は、凝固カスケードに関与する活性部位に関連している。したがって、1つの実施形態において、本発明は、特定のコラーゲン（1種または複数種）の特定の活性領域を含む組換えゼラチンをコードするポリヌクレオチドの使用を意図する。そのようなポリ
20
ヌクレオチドは、種々の様式で、例えばマイクロアレイで使用できる。

【0258】

組換えゼラチン、ポリペプチド、および本発明の組換えゼラチンをコードするポリヌクレオチドは、新規なマイクロアレイ技法およびスクリーニング法において使用できる。コラーゲンの繊維および固定化コラーゲンは血小板に強く結合する。何故ならば、血小板は、コラーゲンに対する複数の結合部位を持ち、該結合部位は互いに多量体化している数個の
コラーゲン分子を取り囲む。血小板のコラーゲン受容体を介する血小板とコラーゲンとの相互作用によって、血小板は活性化され、続いて血小板の凝集体が形成される。

【0259】

例えばIII型コラーゲンの生物学的に活性な領域からなる組換えゼラチンは、既存のコラーゲンおよびゼラチン供給源では到底達成できない均一性、純度および再現可能性を有する
30
マイクロファイバーとして調製できる。本発明の組換えゼラチンから誘導されるマイクロファイバーは、相互作用（例えばIII型コラーゲンまたは任意の他の繊維形成性コラーゲンとの相互作用）による血小板凝集を防止する化合物をスクリーニングするのに用いられる基体（例えばアレイまたはチップ）上に存在できる。化合物、小分子、ペプチド、または他の生物学的分子（例えば抗体）は、血小板とコラーゲン繊維内の特定の領域（例えばRGD配列）との相互作用により仲介される血餅形成または血小板凝集の過程を予防、低減または鈍化させるそれらの能力に関してスクリーニングできる。さらに、マイクロアレイはまた、様々なタイプのインテグリンとコラーゲンおよびゼラチンマイクロファイバーの種々の領域との相互作用を調べる上でも有用である。繊維形成性コラーゲン（例えば、
40
I型、II型、III型、V型またはXI型コラーゲン）のいずれかに由来する組換えゼラチンから製造されるマイクロファイバーは、コラーゲン誘発性血小板凝集アンタゴニストのスクリーニングに使用可能である。

【0260】

また、組換えゼラチンまたはその断片をコードするポリヌクレオチドのマイクロアレイも意図される。そのようなマイクロアレイは、コラーゲンまたはゼラチンをコードするポリヌクレオチド（例えばDNAまたはRNA）の変異体のスクリーニングおよび単離に、そして例
例えば正常組織と罹患組織における発現レベルの差を求めるのに有用である。

【0261】

別の実施形態において、本発明は、前駆細胞の分化、組織再生療法および組織エンジニアリングにおいて使用するための精製された組換えヒト・ゼラチンを提供する。細胞外マト
50

リックスの成分は、細胞の増殖および分化の調節に関与する。塩基性繊維芽細胞増殖因子を埋め込んだゼラチンミクロスフェアを使用した場合、人工真皮モデルにおいて繊維芽細胞の増殖および毛細管の形成が促進された [Kawaiら, (2000) Biomaterials, 21:489-499]。IV型コラーゲンは、細胞増殖および神経膠細胞の分化は抑制したが、ニューロン前駆体の分化は促進した [Aliら, (1998) Brain Res Dev Brain Res 110:31-38]。さらに、I型コラーゲンは骨髄間質細胞の骨形成性分化を誘導したが、II型、III型およびV型のコラーゲンは誘導しなかった [MizunoおよびKuboki (1995) Biochem Biophys Res Commun 211:1091-1098; ならびにMizunoら, (1997) Bone 20:101-107]。

【0262】

一般に、細胞培養においてゼラチンを使用すれば、造血幹細胞および他の前駆細胞において、細胞密度は高くなり、細胞生存能は増大し延長される [Tunら, (2000) ASAIO J 46:522-526]。キャリアマトリックスまたは送達媒体として用いられるゼラチンは、骨髄由来の間葉前駆細胞の送達および間葉細胞に基づく軟骨再生療法のための骨軟骨の分化を支援する [Angelesら, (1999) Tissue Eng 5:545-554; Ponticelliら, (2000) J Biomed Mater Res 52:246-255; およびYoungら, (1998) J Orthop Res 16:406-413]。本発明は、細胞培養において、例えば細胞接着、細胞増殖および細胞分化の促進において使用するための組換えゼラチンを提供する。特定の実施形態において、本発明は、所望の細胞接着、細胞増殖または細胞分化の活性をもたらすように設計された特定の組換えゼラチンの製造方法を提供する。例えば、ニューロン前駆細胞の分化の促進が望まれる場合は、この活性に関与するIV型コラーゲンの特定の領域を含む組換えゼラチンを製造すればよい。

【0263】

本発明は、組換えゼラチンを含む化粧品組成物を提供する。この組成物は、被験者に投与して、荒れていたり折れている爪を改善・修復し、毛髪のテクスチャーを向上させることができる。ゼラチンは、その低アレルゲン特性および水和特性、ならびにテクスチャー、色および透明性を付与したり皮膜を形成するその能力のために、種々の化粧品および洗面用化粧品において重要な成分となっている。例えば、ゼラチンは、シャンプーやコンディショナーなどのヘアケア製品の有用な成分である。1つの実施形態において、本発明は、組換えゼラチンを含む保湿剤を提供するものであり、この保湿剤は、化粧品用途における使用に適する。ゼラチンの皮膜形成特性は、特に前に化学的製剤で処理した損傷毛髪において、毛髪のツヤやまとまりを向上させる。また、ゼラチンは、毛髪の処置（パーマントウェーブおよび脱色など）を含む種々の美容プロセスにおいても使用され、その場合、ゼラチンなどのタンパク質が毛髪構造の保護に用いられる。ゼラチンの皮膜形成特性が皮膚の滑らかさや柔軟さを付与するので、組換えゼラチンのローション、パック、クリーム、口紅および他の化粧品における使用も意図される。1つの態様において、本発明は、組換えゼラチンを含む化粧品組成物を意図するものであり、これは荒れた、または弱い爪などを処置するために投与される。

【0264】

ゼラチンの特徴、例えば保護コロイドとして役立つ能力、pHの変化に応じてその電荷を変化させる能力などは、相俟って、ゼラチンをマイクロカプセル化での使用に適する物質にしている。したがって、ゼラチンおよびその誘導体は、種々のマイクロカプセル化の装置および技法、例えば宣伝用および試供品製造用の香水のマイクロカプセル化に使用できる。

【0265】

以下の実施例により、本発明をさらに詳細に説明する。以下の調製物および実施例は、当業者が本発明をより明確に理解し実施できるようにするためのものである。しかし、本発明は、例示する実施形態によりその範囲を限定されるものではなく、それら実施形態は、単に本発明の個々の態様を説明しようとするものであり、機能的に等価である方法は本発明の範囲内である。事実、本明細書中に記載されているもの以外の本発明の種々の変更は、上記の記載および添付の図面から当業者には明らかであろう。そのような変更は特許請求の範囲内にあるものとする。

【 0 2 6 6 】

実施例

特に断らない限り、以下の材料および方法を本発明の実施例において用いた。

【 0 2 6 7 】

実施例 1：組換えゼラチンの直接的発現

ヒト I 型コラーゲンからの $\alpha 1(I)$ cDNA の特定の断片を、PCR により増幅し、プラスミド pPICZ αA または pPIC9K (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) にクローニングした。クローニングに用いた特異的 PCR 用プライマーは下記の表 1 に示す。特定の組換えゼラチンは、表 2 において、配列番号 15 ~ 25、30、31 および 33 として特定される。これらの組換えゼラチンは、ヒトプレプロ $\alpha 1(I)$ コラーゲン (Genbank 登録番号: CAA98968) を参照することにより更に特定される。用いた発現用プラスミドは、酵母接合因子 α プレプロ分泌配列に融合した各種の大きさの $\alpha 1(I)$ cDNA 配列を含むものであった。当業界で公知の他のシグナル配列も使用可能であり、例えば、酵母のインベルターゼ (SUC2)、酵母の酸フォスファターゼ (PHO) 配列、天然のプロコラーゲンシグナル配列、およびヒト血清アルブミンのシグナル配列が挙げられる。特定の発現系において特定のゼラチン断片の発現レベルを最適化するシグナル配列を選ぶべきである。

【 0 2 6 8 】

【表 1】

表1

配列番号	配列
1	GTATCTCTCGAGAAGAGAGAGGGCTGAAGCTGGTCTGCCTGGTGCCAAGGGT
2	TAGACTATTATCTCTCGCCAGCGGGACCAGCAGG
3	GTATCTCTCGAGAAGAGAGAGGGCTGAGGCTGGAGCTCAGGGACCCCTGGC
4	ATGCTCTAGATTATTAAGGCGCGCCAGGTTACCCGCTGTTACCCCTGGG
5	GTATCTCTCGAGAAGAGAGAGGGCTGAAGCTGGCCCCATGGGTCCCTCTGGT CCT
6	TGCTCTAGATCATTAAAGCATCTCCCTTGGCACCATCCAA
7	TGCTCTAGACTATTAAGGCGCGCCAGCATCACCCCTTAGCACCATC
8	TGCTCTAGATCATTAAAGGCGCGCCAGGTTACCCGCTGTTACCCCTGGG
9	TGCTCTAGATCATTATCTCTCGCCCTCTTGCTCCAGAGGG
10	GTGCCCCTGGTCAGGCTGGTGTGATGGGATTCCCTGGACCTAAAGGTGCTG CTTAAT
11	CTAGATTAAGCAGCACCTTTAGGTCCAGGGAATCCCATCACACCAGCCTGA CCACGGGCACCAG
12	ATGCTCTAGATTATTAAGGAGAACCGTCTCGTCCAGGGGA
13	CTAGTCTAGATTATCTTGCTCCAGAGGGGCCAGGGGC
14	CTAGTCTAGATTAGCGAGCACCTTTGGCTCCAGGAGC
32	AGCTTCTAGATTATTAGGGAGGACCAGGGGGACCAGGAGGTCC

【 0 2 6 9 】

【表 2】

表 2

配列番号	用いた PCR 用プライマー	アミノ酸配列	分子量
15	配列番号 5 と配列番号 6	残基 179～残基 280	9, 447Da
16	配列番号 5 と配列番号 8	残基 179～残基 439	23, 276Da
17	配列番号 5 と配列番号 9	残基 179～残基 679	44, 737Da
18	配列番号 10 と配列番号 11	残基 531～残基 589	5, 250Da
19	配列番号 1 と配列番号 2	残基 531～残基 631	8, 947Da
20	配列番号 1 と配列番号 7	残基 531～残基 715	16, 483Da
21	配列番号 1 と配列番号 4	残基 531～残基 781	22, 373Da
22	配列番号 1 と配列番号 12	残基 531～残基 1030	44, 216Da
23	配列番号 3 と配列番号 7	残基 615～残基 715	8, 213Da
24	配列番号 3 と配列番号 4	残基 615～残基 781	14, 943Da
25	配列番号 3 と配列番号 12	残基 615～残基 1030	36, 785Da
30	配列番号 3 と配列番号 13	残基 615～残基 676	5, 517Da
31	配列番号 3 と配列番号 14	残基 615～残基 865	22, 126Da
33	配列番号 1 と配列番号 32	残基 531～残基 1192	約 65kDa

【 0 2 7 0 】

発現用プラスミドを、エレクトロポレーションによりピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 細胞に導入し、his4要求性の補完性 (pPIC9Kベクターの場合) またはゼオシンに対する耐性 (pPICZαAベクターの場合) により形質転換体を選択した。組換えタンパク質の発現は、メタノール誘導性アルコールオキシダーゼプロモーター (P_{AOX1}) により調節した。ピキア・パストリス宿主細胞は、ヒトプロピル4-ヒドロキシラーゼ (P4H) (コラーゲンにおけるヒドロキシプロリンの翻訳後合成に関与する酵素) のαおよびβサブユニットの組込み型コピーを含んでいた。上記酵素に関しては既に記載されている [例えば、Vuorela, M.ら, (1997) EMBO J 16:6702-6712を参照されたい]。

【 0 2 7 1 】

この酵母の株を緩衝化最少グリセロール培地で増殖させ、Invitrogen社のピキア発現マニュアルに記載されているように炭素源としてグリセロールに代えてメタノール (0.5%) を含有する同じ培地を用いて組換えタンパク質の発現を誘導した。ゼラチン産生株は、調整培地の10～20%トリシンSDS-PAGE分析および振盪フラスコ培養物からの抽出物のプロピル4-ヒドロキシラーゼの活性により同定した。プロピル4-ヒドロキシラーゼとコラーゲン断片との共発現により、天然のヒト配列を持つ組換えゼラチンの発現がもたらされた。

【 0 2 7 2 】

その断片を発現させ、培地に分泌させた。組換えゼラチンを回収し、培地からアセトン沈殿、アニオンもしくはカチオン交換クロマトグラフィーまたはそれらの任意の組合せにより精製した。アセトン沈殿は、アセトンが無細胞培養上清に最終濃度40%まで添加することにより、4で行った。こうして得られた沈殿は、主に内因性の酵母タンパク質からなるものであり、それを遠心分離により回収した。次に、この上清にアセトン

%まで添加して、ゼラチンを沈殿させ、次にこれを遠心分離により回収し、水で一夜透析し、凍結乾燥した。アニオンおよびカチオン交換クロマトグラフィーを組み合わせることにより、高純度のゼラチンが得られた。クロマトグラフィーによる精製は、室温で行った。

【0273】

コラーゲンタンパク質の大きさを、電気泳動により、アミノ酸組成に基づく分子量の理論値と比較して推定することは、当業界では公知である [Butkowskiら, (1982) Methods Enzymol 82:410-423]。この組換えゼラチンのN末端配列を分析したところ、酵母分泌経路に該タンパク質を誘導するためにゼラチン断片に融合させたプレプロ配列が正確にプロセッシングされたことが実証された。この系において産生されたゼラチンは、ヒトコラーゲンに由来する配列だけを含むものであった。さらに、ピキア・パストリス細胞は非常にわずかなタンパク質しか分泌しないので、この組換えゼラチンは調整培地の主成分となった。

10

【0274】

発現された組換えゼラチンは、異なる大きさのものであり、SDS-PAGEで測定した場合に約5 kDa～約65kDaの範囲であり、これは、例えば、図1に示すように、約5 kDa (レーン2、配列番号18)、約10kDa (レーン3、配列番号19)、約16kDa (レーン4、配列番号24)、約18kDa (レーン5、配列番号20)、約20kDa (レーン6、配列番号28) (これは理論上の分子量が17,914Daでもある、表1には示さず)、約33kDa (レーン7、配列番号27) (これは理論上の分子量が29,625Daでもある、表1には示さず)、約41kDa (レーン8、配列番号25)、および約50kDa (レーン9、配列番号22)のゼラチンに該当している (レーン10は加水分解した組換えヒトI型コラーゲンに該当する。実施例10に記載のようにして調製したもの)。

20

【0275】

実施例2：ヒト組換えゼラチンは細胞接着活性を促進する

本発明の組換えヒトゼラチン断片は、in vitroで細胞接着活性を示した。以下のアッセイでは、96ウェルMaxisorpプレート (Nunc) を、実施例1に記載され、かつ表2に示されているように、ヒトI型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖からの以下の組換えヒトゼラチンドメインで被覆した：配列番号19、配列番号20、配列番号21、および配列番号22。VITROGENウシコラーゲン (Cohesion Technologies; Palo Alto CA) およびウシ血清アルブミンを、それぞれ陽性対照および陰性対照として使用した。それらタンパク質の各々を、0.1M NaHCO₃ (pH 10.0) で0.1mg/mlに希釈し、プレートを4で一夜被覆した。ヒト包皮線維芽細胞 (HFF) またはヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC、Clonetics製、第5継代) を被覆プレートに接種し、37で60分間インキュベートした。実験はそれぞれ3回ずつ行った。

30

【0276】

次に、細胞接着の程度を試薬WST-1を用いて測定し、その吸光度をELISA読取り装置で450mMにて読み取った。図2Aでは、組換えヒトゼラチンがMaxisorpプレートへのHFFの接着を促進し、これらの細胞の場合、接着は、各ウェルに被覆した組換えヒトゼラチンの分子量に正比例することを示している。具体的に述べると、配列番号19、配列番号20および配列番号21の組換えゼラチンは、BSAを用いて見られる場合よりも非常に高度にHFFの接着を促進した。図2Bでは、各種の組換えヒトゼラチンが、内皮細胞の接着を促進することを示している。細胞接着活性はまた、組換えヒトコラーゲンの熱加水分解により調製した組換えヒトゼラチン (実施例9で後記する) を用いて、分子量が0～30kDaおよび0～50kDaの範囲である組換えゼラチンを用いた場合にも実証された。

40

【0277】

実施例3：タンパク質加水分解に対して安定なゼラチン断片の同定

組換えゼラチン断片は、組換えピキア・パストリス細胞の培地中でのそれらの発現および蓄積の間にタンパク質加水分解により改変されていることが判明した。I型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖のらせん状ドメインの数種の異なる部分を発現させることにより、タンパク質加水分解に関して安定性に優れる組換えゼラチンを特定できる。3種の異なるゼラチン断片をプラスミドpPICZ α Aにクローニングし、ピキア・パストリス細胞における組換えタンパク

50

質発現時にそれらの相対的な安定性を評価した。

【0278】

用いた第1の株は、上記の実施例2に記載されており、これは配列番号19に対応する。それ以外の株は、ヒト $\alpha 1(I)$ らせん状ドメインのアミノ酸残基179~280(配列番号15)および615~715(配列番号23)をコードするプラスミドを用いて作製した。これらの組換えゼラチンは、実施例1に記載されているようにして、配列番号5と配列番号6および配列番号3と配列番号7のプライマーを用いて構築した。PCR産物をXhoIおよびXbaIで消化し、クローニングし、上記のようにしてエレクトロポレーション用に調製した。これらの株を増殖させ、タンパク質発現を誘導し、発現されたゼラチン断片をDSD-PAGEにより比較した。図3では、配列番号15の組換えゼラチン(レーン2)および配列番号19の組換えゼラチン(レーン3)はタンパク質加水分解を受けたが、配列番号23の組換えゼラチン(レーン4)は全く完全なままであることが示されている。この結果から、安定性に優れる本発明の組換えゼラチン断片が作製できることが実証された。

10

【0279】

実施例4：ヒドロキシ化組換えヒトゼラチンの発現

プロリル4-ヒドロキシラーゼ活性は、酵母においては検出されていない。ピキア・パストリス株は、活性なプロリル4-ヒドロキシラーゼを発現するように操作されており、従来ヒドロキシ化コラーゲンを産生させるために用いられている(米国特許第5,593,859号を参照)。ヒドロキシ化組換えヒトゼラチンを発現させるために、この株を、配列番号1と配列番号2のプライマーを用いたPCRにより作製したヒト $\alpha 1(I)$ コラーゲンの組換え体の100アミノ酸(表2の配列番号19)をコードするゼラチン発現カセットで形質転換した。このPCR DNA産物(約330bp)をXhoI-XbaIで消化し、pPICZ αA (Invitrogen)のXhoI-XbaI部位に連結して、プラスミドpD07を作製した。

20

【0280】

pD07から1048bpのCei II-AgeI断片を単離した。これは、AOX1プロモーター領域の3'部分、接合因子 α 分泌シグナル、配列番号19の組換えゼラチン、pPICZ αA 由来のポリリンカー配列、および56塩基対のAOX1転写ターミネーターを含んでいた。この断片を、pPIC9K(Invitrogen)のCei II-AgeI部位に連結して、pD041を作製した。ピキア・パストリスの $\alpha \beta 8$ 株(his4)を、エレクトロポレーションにより、StuIで線状化したプラスミドpD041で形質転換し、最少デキストロースプレートに播種し、his4要求性を補完する形質転換体を選択した。約20のhis⁺形質転換体が増殖し、実施例1に記載されているようにしてメタノールで誘導した。配列番号19を発現する株を、調整培地のSDS-PAGE分析により同定した(図4)。

30

【0281】

陽性の株からの組換えゼラチン断片を、アセトン沈殿により培地から精製し、例えばHare, PE (1977) Methods in Enzymology 47:3-18に記載されているようにして、さらにアミノ酸分析により分析した。それらの株のうち1つからのゼラチン産物をアミノ酸分析したところ、分泌された組換えゼラチン中にヒドロキシプロリンが存在することが示された。図4に示す株から単離されたゼラチン(単離物#2)において、プロリンに対するヒドロキシプロリンの比率は0.29であることが示され、これはゼラチンとプロリル4-ヒドロキシラーゼとが共発現されたことを示している。

40

【0282】

プロリル4-ヒドロキシラーゼを発現しないピキア・パストリス株からヒドロキシ化されていない組換えゼラチンが発現され、それを精製した。続いて、この組換えゼラチン中のプロリン残基を、プロリル4-ヒドロキシラーゼ酵素活性を用いてin vitroにてヒドロキシプロリン残基に変換した。ゼラチン発現用プラスミドを、PCRにより配列番号3と配列番号4のプライマーを用いて作製したところ、配列番号24の組換えゼラチンが発現された。この525bpのPCR産物を精製し、XhoI-XbaIで消化し、XhoI-XbaIで消化しておいたpPICZ αA に連結した。このプラスミドをPmeIで線状化し、ピキア・パストリス X-33株(Invitrogen)にエレクトロポレーションした。500 μ g/mlのゼオシンを含有するYPDプレートで増殖

50

させることにより、形質転換体を選択した。株は上記のようにしてゼラチン発現について試験し、ヒドロキシ化されていない組換えゼラチンを陽性の単離体の培地から精製した。調整培地は、10kDa分子量カットオフ膜を用いた圧透析により10倍に濃縮し、サンプルを緩衝液 A (50mM Tris-HCl、pH 9.0、50mM NaCl) で透析した。透析された物質は、緩衝液 A で平衡化した Q セファロース (Q-sepharose) カラムでクロマトグラフィーにかけた。ゼラチンは、これらの条件下ではこのカラムに結合しないので、通り抜け画分中に存在していた。混入している酵母タンパク質の大部分が該カラムに結合し、これを緩衝液 B (緩衝液 A + 0.5 M NaCl) で溶出させた。

【 0 2 8 3 】

通り抜け画分を50mM酢酸ナトリウム (pH 4.5) で透析し、組換えゼラチンを、同じ緩衝液で平衡化した SP-セファロースカラムでさらに精製した。組換えゼラチンはこのカラムに結合し、0.2M NaCl で段階的に溶出させた。精製したゼラチン (1 mg/ml) を熱変性させ (100 °C で10分間)、以下の成分の存在下で、精製した P4H と 1 : 30 の酵素 : 基質比で混合した : 50mM Tris-HCl、pH 7.8、2 mM アスコルビン酸、2 mM α -ケトグルタル酸、0.1mM Fe SO₄、10 μ M DTT、10mg/ml ウシ血清アルブミン、および100単位カタラーゼ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) [例えば、Kivirikko, K.I. および Myllyla, R. (1982) *Methods in Enzymology* 82:245-304 ; ならびに Vouri, K. ら (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 7467-7470 を参照]。反応は 37 °C で16時間行った。

【 0 2 8 4 】

次に、その組換えゼラチンを、上記のようにして Q-セファロースでのクロマトグラフィーにより精製した。結合しているタンパク質を該カラムから 0.5 M NaCl で溶出させ、回収した (図 5、レーン 7、8 および 9)。通り抜け画分および溶出画分を SDS-PAGE により分析したところ、回収したゼラチンの純度が判った (図 5)。このゼラチンのアミノ酸分析は、通り抜け画分の透析の後で行った (図 5、レーン 3 ~ 6)。アミノ酸分析から、このゼラチンの 87% がヒドロキシ化されていることが示された。100% のヒドロキシ化が達成されるのは、ゼラチン中のヒドロキシプロリンのモル数 / (プロリンのモル数 + ヒドロキシプロリンのモル数) = 0.5 である場合である。

【 0 2 8 5 】

実施例 5 : プロリル 4-ヒドロキシラーゼの存在下または不在下でのゼラチンの安定性

18kDa の組換えゼラチン (配列番号 20) を、上記の方法に従って発現させた。発現された断片を、ゲル電気泳動により分析した。プロリル 4-ヒドロキシラーゼの存在下で発現された組換えゼラチンは、プロリル 4-ヒドロキシラーゼの不在下で発現されたゼラチンよりも著しく高い安定性を示した (図 6 を参照)。

【 0 2 8 6 】

組換えヒトゼラチンの安定性および安定性の増大に及ぼすプロリンのヒドロキシ化の役割は、プロリル 4-ヒドロキシラーゼを発現するピキア・パストリス株において検討した。配列番号 1 と配列番号 7 のプライマーを用いた PCR により、配列番号 20 をコードするプラスミド (pD032) を構築した。この PCR 産物を、上記のようにして精製し、消化し、クローニングした。プロリルヒドロキシラーゼを欠く宿主細胞と α および β プロリル 4-ヒドロキシラーゼサブユニットを含む宿主細胞において、同じ α 1(I)c DNA 断片が発現された。3 種のピキア・パストリス株 : X-33 株 (野生型のピキア・パストリス) ; 2 種のプロリル 4-ヒドロキシラーゼ発現株である P4H-2 株および α β 8 株を、米国特許第 5,593,859 号および Vourrela ら (1997) *EMBO J* 16:6702-6712 に記載されているようにして、PmeI で線状化しておいた pD032 でエレクトロポレーションした。

【 0 2 8 7 】

形質転換体は、500 μ g/ml のゼオシンに対する耐性により選択した。各形質転換体からの 8 つの単離体を増殖させ、上記のようにして誘導し、発現された組換えヒトゼラチンの安定性を SDS-PAGE により分析した (図 6 を参照)。野生型ピキア・パストリス X-33 株では、ほぼ同量の完全な状態のままの組換えゼラチンとタンパク質加水分解による断片 (これはゲル上で該組換えゼラチンの直ぐ下に移動した。図の右の矢印で示す) とが見られた (図

10

20

30

40

50

6、X-33株)。プロリル4-ヒドロキシラーゼを共発現する二者の株では、タンパク質加水分解による断片の量は有意に少なく、このことは、プロリル4-ヒドロキシラーゼが組換えヒトゼラチンと共発現されると、該ゼラチンのタンパク質加水分解を実質的に低下させることによって、ゼラチンの安定性が増大することが実証された(図6、P4H-2株および α β 8株)。

【0288】

実施例6：発現用培地の補給による組換えヒトゼラチン発現の増大化

先の報告から、カザミノ酸を補給した培地が、ピキア・パストリスにおける特定のタンパク質の発現の際に見られるタンパク質加水分解の量を低下させることが示されている[Clare, J.J.ら, (1991) Gene 105:202-215]。ピキア・パストリスにおいて発現される本発明の組換えヒトゼラチンの分解を、発現用培地を各種の補給成分で富化した後で測定した。この特定の研究において、実施例5に記載されているピキア・パストリス α β 8株(配列番号20の組換えヒトゼラチン断片を発現するもの)を用いた(実施例5および表2)。組換えゼラチンは、カザミノ酸、カジトン、酵母抽出物、ペプトン、ペプタミン、トリプトン、ゲラトン(Gelatone)、ラクトアルブミンおよびソイトンを含む各種補給成分をある範囲の濃度(0~2%)で加えた培地中で誘導された。ラクトアルブミン加水分解物、ソイトン、カジトンおよびペプタミン(Difco Laboratories, Detroit, MI)を含む数種の配合物は、組換えゼラチンの発現レベルを増大させた(図7、ラクトアルブミンおよびソイトン)。

【0289】

これらの結果から、組換えゼラチンの発現の際に用いた特定の培地補給成分によってタンパク質産生が増大することが示される。1つの態様において、培地補給成分としてソイトンを使用する場合には、組換えゼラチンの発現を増大させる(動物由来ではなく)植物由来の培地成分が供給された。これにより、種々の用途で使用可能な組換えゼラチンの産生のための、動物性物質を含まない環境がもたらされる。

【0290】

実施例7：組換えヒトゼラチンの架橋

組換えヒトコラーゲン(米国特許第5,593,859号に記載されているようにして得たもの)のスラリーは、10.8mgの組換えヒトI型コラーゲンを5mlの水に溶解させ、続いて20mMリン酸ナトリウム(pH 7.2)で透析することにより調製した。このスラリーの最終組換えヒトコラーゲン濃度は約2mg/mlであった。架橋型の組換えヒトゼラチンの調製は、10 μ lまたは5 μ lの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC, Pierce Chemical Co.)の20%溶液を1mlの上記組換えヒトコラーゲンスラリーに添加することにより行った。架橋反応は、室温で一夜行った。未反応のEDCは、水で透析することにより除去した。

【0291】

こうして得られた架橋型の組換えヒトゼラチンを、6%グリシンSDS-PAGE分析により分析した。図8には、組換えヒトゼラチン(レーン6、標識化UNL-5-4)、架橋型組換えヒトゼラチン(レーン5、標識化UNL-5-4、0.1%EDC;レーン4、標識化UNL5-4、0.2%EDC)、市販のハードカプセル用ゼラチン(レーン3)およびSigma Chemical Co.から入手した市販ゼラチン(タイプA、ブタ皮からのもの、約300ブルーム、レーン2)のSDS-PAGEによる比較を示してある。図8のSDS-PAGE分析で示されているように、市販のカプセル用ゼラチンおよびSigma製のゼラチンは、主成分として α 鎖(分子量が約110kDa)ならびにそれより高い分子量のゼラチン成分(約200~250kDaの範囲の分子量を持つ)のスミアを含んでいた。組換えヒトコラーゲンは、 α 鎖だけから構成されるものであった。しかし、架橋の後では、架橋型組換えゼラチンは、市販ゼラチンおよび市販のカプセル用ゼラチンにおいて見られる場合と同様に、 α 鎖だけでなく、それより高い分子量のゼラチンのスミアからも構成されていた。このことは、組換えヒトゼラチンを架橋することにより、市販のカプセル用ゼラチンとほぼ同様の分子量分布を示す組換えヒトゼラチンを得ることができることを示している。架橋型の組換えゼラチンは、高いゲル強度および高い粘度が望まし

い用途に使用される。

【 0 2 9 2 】

実施例 8：市販ゼラチンおよび可溶性組換えヒトゼラチンの内毒素レベル

Kind & Knox (K&K) から購入した可溶性ゼラチンおよび本発明の組換えヒトゼラチン（実施例 9 に記載されているようにして作製したもの）の内毒素レベルは、当業界で公知であるように Limulus Ameobocyte Lysate 試験 [例えば Friberger, P. ら, (1987) Prog. Clin. Biol. Res. 231:149-169 を参照] を用いて測定した。3 種の異なるゼラチン濃度について調べた。表 3 に示すように、本発明の組換えヒト I 型コラーゲン (rhcl) の熱加水分解により作製した組換えヒトゼラチンは、実質的に内毒素を含んでいなかった。市販物質の内毒素レベルは、タンパク質 mg 当たり約 1 ~ 1.5 EU であった。本発明において記載されて

10

【 0 2 9 3 】

【表 3】

表 3

ゼラチン濃度 (mg/ml)	K&K のゼラチン (EU/mg)	組換えヒト・ゼラチン (EU/mg)
3	1.03	< 0.005
1.5	1.41	< 0.005
0.75	1.29	< 0.006

20

【 0 2 9 4 】

実施例 9：熱および酸加水分解によるゼラチンの誘導体化

加水分解手順（酸、熱および酵素によるもの）を工夫して、現在利用可能な可溶性動物由来ゼラチンとほぼ同様の分子量分布を持つ可溶性の組換えヒトゼラチンを作製し、これを例えばワクチン製剤における安定剤として使用した。これらの実験のために、完全な状態

30

【 0 2 9 5 】

市販ゼラチンの分子量分布：

これらの組換えヒトゼラチンを、市販ゼラチンと比較した。特性決定するために、Leiner Davis, Great Lake, Kind & Knox および Dynagel により製造された 4 種の低分子量ゼラチンのサンプルを入手した。調べた全てのゼラチンは、室温で可溶性であった。トリシン SDS-PAGE ゲル上でのこれらゼラチンの分子量分布は図 9 に示し、表 4 に列記してある。ゲルのプロファイルから、市販ゼラチンの分子量分布が約 0 ~ 55 kDa であり、但し Dynagel-1 サンプルだけは分子量分布が 0 ~ 30 kDa であることが示された。また、ゲルのプロファイルからは、2 種の分子量分布のパターンが判明した。1 つの例において、Leiner Davis および Great Lakes からのサンプルから誘導したものでは、SDS-PAGE により数本の不連続な分子のバンドが見られた。第 2 の例におけるパターンは、Dynagel および Kind & Knox のサンプルから誘導したものであるが、それらは、ゲル上に連続した物質の分布を示し、不連続なバンドはなかった。Dynagel-1 および Dynagel-2 の分子量分布は、それらが同じ製造元によって同じ用途に向けて製造されているにもかかわらず、全く異なっていた。この結果から、現在入手可能なゼラチンでは、バッチ別のバラツキが極めて有意なものであることが示された。

40

【 0 2 9 6 】

50

【表 4】

表 4

会社名	相対移動度	最大見掛け分子量 (Da)	分子量分布* (Da)
K & K	0.3410	70,000	0-55,500
Leiner Davis	0.3410	70,000	0-55,500
Great Lake	0.3693	60,000	0-47,600
Sol-U-Por, # 1	0.3483	65,000	0-51,600
Sol-U-Por, # 2	0.4972	37,000	0-29,400

10

★分子量は係数 1.26 により調整した [この係数は、コラーゲンタンパク質の平均残基重量

(91.6) に対する基準タンパク質の平均残基重量 (115) の比率である]。

【 0 2 9 7 】

ゼラチンの熱加水分解は、次のようにして行った。市販の乾燥ゼラチンを40～50 の水に溶解して、5 % のゼラチン溶液にした。熱加水分解に備えて、この溶液のpHを0.1N NaOHまたは0.1N HClのいずれかで調整した。I型およびIII型の組換えヒトコラーゲンを、米国特許第5,593,859号に記載されているようにしてピキア・パストリスで発現させ、精製した。最終的に得られる組換えヒトコラーゲンを10mM HClに溶解し、水で透析し、凍結乾燥した。凍結乾燥した組換えヒトコラーゲンを40～50 の水に溶解して、3 % 溶液にした。熱加水分解の前に、この溶液のpHを下記に示すように調整した。

20

【 0 2 9 8 】

熱加水分解は、1 ml Reacti-Vials (Pierce) 内で行った。加水分解温度は、実験に応じて100 から150 まで変えた。加水分解溶液のpHは、指示されるように、pH 2 からpH 7 まで変えた。加水分解時間もまた、溶液の温度およびpHに応じて、1 時間から32時間まで変えた。ゼラチンの加水分解物は、さまざまな時間間隔でサンプリングし、SDS-PAGEにより分析した。

【 0 2 9 9 】

市販ゼラチンの120 における加水分解：

Sigma製の高分子量ゼラチンのサンプル（ブタ皮由来のタイプ A、250kDa）を6種のpHが異なる溶液（5 % ゼラチン）に溶解し、120 で加水分解した。pH 2 およびpH 3 の溶液は、2時間半にわたり加水分解し、30分毎にサンプリングした。pH 4 の溶液は、5 時間にわたり加水分解し、1 時間毎にサンプリングした。pH 5、pH 6 およびpH 7 の溶液は、24時間にわたり加水分解し、14時間加水分解した後、2 時間毎にサンプリングした。

30

【 0 3 0 0 】

加水分解パターンをトリシン10～20% SDSゲルで分析したところ、図10A、10B、10C、10D、10Eおよび10Fに示すようになった。ゲルのプロファイルから、溶液のpHが低くなるほど、ゼラチンの加水分解は迅速に起こることが示される。また、ゲルのプロファイルからは、加水分解物の間に2種の加水分解パターンがあることも判明した。一方のパターンは、ゲル上に数本の不連続な分子バンドを示したが（pH 2 およびpH 3 の溶液の酸加水分解の結果である図10Aおよび10Bを参照されたい）、他方のパターンは、ゲル上で連続した物質分布を示した（pH 4、pH 5、pH 6 およびpH 7 の溶液の加水分解の結果である図10C、10D、10Eおよび10Fを参照されたい）。

40

【 0 3 0 1 】

これらの結果から、市販ゼラチンの分析において見られるように（SDS-PAGEにおける不連続なバンドvs連続した物質分布）、上記で概説した方法またはその変法によって2種の異なるタイプの物質を生じることが示された。また、これらの実験結果は、高分子量のゼラチンを熱分解することにより、種々の大きさの可溶性ゼラチンが生じること示していた

50

。表 5 には、Sigma製のゼラチンを用いて、pH6.0の溶液中で120 で加水分解した後で得られる分子量分布を示してある。

【 0 3 0 2 】

【表 5】

表 5

加水分解時間 (時間)	相対移動度	最大見掛け分子量 (Da)	分子量分布 (Da)
4	0.2356	140,000	0-111,000
8	0.2890	90,000	0-71,400
11.5	0.3372	75,000	0-59,500
16	0.3837	47,000	0-37,300
20	0.4186	40,000	0-31,700
24	0.4525	33,000	0-26,200

【 0 3 0 3 】

市販ゼラチンの150 における加水分解：

Sigma製の高分子量のゼラチンのサンプル（ブタ皮由来のA型、250kDa）を4種のpHが異なる溶液（5%ゼラチン）に溶解し、150 で最長10時間にわたり加水分解した。加水分解物は、分析用として、2時間毎にサンプリングした。加水分解パターンをトリシン10～20% SDS-PAGEゲルで分析したところ、図11A、11B、11Cおよび11Dに示すようになった。ゲルのプロファイルから、ゼラチンの分解は120 におけるよりも150 における方がはるかに迅速に起こることが示される。さらに、ゼラチンの加水分解を150 で行った場合、より低い分子量のゼラチン断片が生じた。表 6 には、pH6.0の溶液中で150 で加水分解した後のSigma製のゼラチンの分子量分布を示してある。

【 0 3 0 4 】

【表 6】

表6

加水分解時間 (時間)	相対移動度	最大見掛け分子量 (Da)	分子量分布 (Da)
2.5	0.2833	95,000	0-75,400
4.5	0.4555	41,000	0-32,500
6	0.5277	32,000	0-25,400
8	0.5833	24,000	0-19,000
10	0.6611	15,000	0-11,900

【 0 3 0 5 】

実施例10：組換えI型およびIII型ヒトコラーゲンの酸および熱加水分解

組換えヒトI型コラーゲンを、中性pH条件下（pH7）で最長8時間まで、または酸性pH条件下（pH2）で最長3時間まで、120 で加水分解した。組換えヒトIII型コラーゲンは、中性および酸性の条件下で最長6時間まで120 で加水分解した。加水分解は実施例9で記載したようにして行った。ヒト組換えI型およびIII型の加水分解物を、トリシン10～20% SDS-PAGEゲルにより分析し、それを図12Aおよび12Bに示す。SDS-PAGEゲルパターンから、組換えヒトコラーゲンの熱加水分解が、天然供給源由来の高分子量ゼラチンの加水分解パターンと同一であることが示される（図9、図10A～10F、および図11A～11D 対 図12Aおよび12B）。天然ゼラチンの加水分解（pH7）の場合と同様に、組換えヒトコラーゲンを酸加水分解すると、数本の不連続な分子量バンドが示されたが、中性での加水分解物はより連続な分子量分布を示した。組換えヒトゼラチンの中性での加水分解物の分子量分

布は、6～8時間熱分解した後では、ほぼ0～70kDaであった。酸性条件下での加水分解は、ずっと迅速に起こった。組換えヒトゼラチンの酸性での加水分解物の分子量分布はずっと狭く、2～3時間熱処理した後ではほぼ0～10kDaであった。

【0306】

検討した熱加水分解組換えヒトゼラチンの更なる改良として、本発明者らは、ヒトI型コラーゲンの $\alpha 1(I)$ 鎖の不連続断片を持つヒトゼラチンを生産するための酵母多重遺伝子の組換え発現方法論の有用性を実証している。この技法によれば、大きさが6～65kDaの範囲で、精製され、高度に均一であるゼラチン断片を生産することが可能になる。このことは、特定の用途に使用可能なゼラチンの大きさおよび生物物理学的特性に関して抜群の融通性をもたらす。

【0307】

実施例11：組換えヒトI型コラーゲンの酵素的加水分解

組換えヒトI型コラーゲンは、表7に示すプロテアーゼ類を用いて酵素により加水分解した。組換えヒトI型コラーゲンは、各酵素と共に、表7に示す基質：酵素の比率(w/w)を用いて、37℃でインキュベートした。処理により得られたヒト組換えI型加水分解物を、トリシン10～20% SDS-PAGEゲルにより分析した。パパインおよびプロテアーゼXでの処理により得られた結果を図13に示す。SDS-PAGEゲルパターンから、組換えヒトコラーゲンの酵素的加水分解により、該ゼラチンの異なる分子量分布が得られることが示された。パパインを用いた酵素的加水分解を行うと、図13および表7に示すような連続した加水分解パターンが得られるが、プロテアーゼXを用いた加水分解では、数本の不連続な分子量バンドが生じた。表7に示すように、本方法により作製された組換えゼラチンは、特定の酵素的加水分解処理により、異なる加水分解パターンを示した。このことは、特定の用途に使用可能なゼラチンの大きさおよび生物物理学的特性をもたらす上で、抜群の融通性をもたらす。

【0308】

【表7】

表7

酵素	酵素活性／タンパク質mg	基質：酵素比	加水分解パターン
キモパパイン	1 U @ 37°C, pH 6.5	500:1	連続
ブロメライン	8 U @ 37°C, pH 4.6	5,000:1	バンディング&連続
プロテアーゼVIII	12 U @ 37°C, pH 8.5	7,000:1	バンディング
パパイン	17 U @ 37°C, pH 6.5	10,000:1	連続
プロテアーゼX	42 U @ 37°C, pH 8.5	20,000:1	バンディング

【0309】

実施例12：異なる組換えゼラチンに対して誘導された組換えヒトI型コラーゲンに対する抗体

酵母ピキア・パストリスで産生させたヒト組換えI型コラーゲンを、その可能性のあるアレルギー反応について、モルモットに対する接触感作物質として試験した（Maximization法として知られている）。この試験期間の後、血清を採取して、モルモットにおける組換えヒトI型コラーゲンの免疫原性を調べた。1gのrhCIを10mlの0.9%塩化ナトリウム注射液（SCI）またはゴマ油に浸漬し、37℃で72時間インキュベートした。次に、抽出物を3000rpmで15分間遠心分離し、上清を投与用として回収した。

【0310】

ハートレー種（Hartley）モルモットを誘導期の間、試験物質および対照溶液に曝露した。この時期の間に、被毛を刈り込んだ領域における3組ずつの皮内（ID）注射を行った。第1の組のID注射剤（頭部用）は、同量のSCIに溶解したフロイント完全アジュバント（FC

A) のエマルジョンからなるものであった。第2の組のID注射剤(胴部用)は、試験抽出物(組換えヒトI型コラーゲン)からなるものであった。第3の組(尾部用)は、試験抽出物と同量のFCAとのエマルジョンからなるものであった。陽性対照および陰性対照の動物は、第2および第3の組の注射剤に試験抽出物を含めなかった以外は、試験動物と同様にして処置した。

【0311】

ID注射後6日目に、試験部位を、刺激の形跡について評価した。次に、試験部位を、SLSの10%石油溶液で前処理し、ガラスロッドを用いて皮膚にすり込み、次に24時間にわたり露出したままにした。7日目に、0.4mlの試験物質抽出物に浸漬したWhatman #3濾紙の直径4.25cmのディスクを用いて、各試験動物の被毛除去領域に局所投与を行った。局所的誘導投与後13日目に、該動物をチャンレジした。各動物の右半身の一領域の被毛を刈った。翌日、0.3mlの試験抽出物、ヒビクル対照抽出物、または陽性対照溶液を含むHill Topチャンバーを被毛除去した領域にのせ、該動物の上で24時間放置した。該チャンバーを取り除いた24時間後、48時間後および72時間後に、投与部位を紅斑および水腫について評点した。

【0312】

72時間後、血液を採取し、凝固させ、次に2800rpmで15分間遠心分離した。各試験管から血清を取り出し、血清サンプルを使用するまで-70℃で保存した。

【0313】

次に、免疫したモルモットからの血清を、組換えヒトI型コラーゲン(rhcl)、組換えヒトIII型コラーゲン(rhcll)、VITROGENウシコラーゲン(Cohesion Technologies; Palo Alto, CA)、ならびに6kDa(配列番号18)、10kDa(配列番号19)、18kDa(配列番号20)、33kDa(配列番号27)、50kDa(配列番号22)および65kDa(配列番号33)の断片を含む本発明の組換えヒトゼラチンの種々の断片(表2および実施例1を参照)に対して誘導した抗体の存在について分析した。組換えコラーゲンおよび組換えゼラチンを、8%Tris-グリシンまたは10~20%トリシンSDS-PAGEゲルで電気泳動した。ウエスタンブロット分析は、この研究で用いたモルモットの各々からの抗血清を用いて行った。図14では、組換えヒトI型コラーゲンで免疫したモルモットからの血清中に組換えヒトI型コラーゲン特異的抗体が存在することが示されている。ウエスタンブロット分析により分析した組換えゼラチンに対する抗体反応性は、調べた血清のいずれにおいても見られなかった。図14は、この研究における1匹のモルモットからの抗血清を用いたウエスタンブロット分析の結果を示している。少なくとも4匹の異なるモルモットからの血清を分析したところ、それらの各々は、図14で示した結果と同一の結果を示した。

【0314】

モルモットへのrhclの注射後に見られる抗原応答に関連すると考えられるI型コラーゲンのエピトープを解明することが望ましかった。組換えヒトI型コラーゲンを、変性およびカラムクロマトグラフィーの後で、その $\alpha 1(I)$ 成分と $\alpha 2(I)$ 成分とに分けた。組換えI型コラーゲンの $\alpha 1(I)$ 鎖および組換えI型コラーゲンの $\alpha 2(I)$ 鎖の臭化シアン(CNBr)分解は、BornsteinおよびPiez(1966) Biochemistry 5:3460に記載されているようにして行った。完全な状態のままの α 鎖および結果として生じるペプチド断片はSDS-PAGEにより分離し、上記のモルモット血清に対する反応性についてウエスタンブロット分析により分析した。図15Aには、組換えヒトI型コラーゲンの完全な状態のままの $\alpha 1(I)$ 鎖および $\alpha 2(I)$ 鎖ならびにCNBr分解した $\alpha 1(I)$ 鎖および $\alpha 2(I)$ 鎖のクーマシー染色したSDS-PAGEが示してある。ウエスタンブロット分析から、rhclに対して反応性であるモルモットの抗血清が、I型コラーゲンの $\alpha 2$ 鎖およびその特定のCNBr断片に対して誘導されたことが示された。I型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖に対する反応性は全く検出されなかった(図15B)。

【0315】

上記のウエスタンブロット分析は、SDS-PAGEでの電気泳動分離によって、組換えヒトI型コラーゲン、CNBr断片、および組換えヒトゼラチンに対するモルモット血清の反応性を調べるものであった。非変性条件下でのこれらのポリペプチドに対するモルモットの抗血清

の反応性を調べるために、直接的ELISA分析を行った(図16)。データから、モルモットの抗血清が、rhclの生来のコンフォメーションを認識することが示された。本発明の組換えゼラチンのいずれもが、該ゼラチンの断片が熱変性の前に存在するのか後で存在するのに関係なく、ELISAによりモルモット抗血清と反応しなかった。rhclは、分析前に熱変性された場合、ELISAにおいてさらに一層反応性が高かった(データは示さず)。このことから、血清中のポリクローナル抗体が、らせん構造ではなく、主に並列したエピトープを認識することが示される。総合すると、これらの結果から、本実施例で示すように、ヒトI型コラーゲン上(特に $\alpha 2$ 鎖上)に抗原性部位が存在することに付随する問題は本発明の方法により回避できることが示された。したがって、本発明は、抗原性部位を欠く組換えゼラチンの製造方法を提供するものであり、かかる組換えゼラチンは、抗原性が低いゼラチンが望まれる特定の用途に有用である。

10

【0316】

本発明の記載されている方法および系の種々の変更および改変は、本発明の精神および範囲から逸脱することなしに、当業者には明らかであろう。本発明は特定の好ましい実施形態に関連させて説明してきたが、特許請求の範囲に記載されているような本発明は、不当にもそのような特定の実施形態に限定されるべきではないことを理解すべきである。本発明を実施するための記載されている態様の種々の変更は、当技術分野および関連する分野に習熟する者にとっては明らかであり、それらは本明細書の特許請求の範囲内にあるとする。本明細書中で引用されている全ての参考文献は、参照によりその全体を本明細書に組み入れられるものとする。

20

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、組換えゼラチンの発現の結果を示した図である。

【図2】 図2Aおよび2Bは、組換えゼラチンが細胞付着を支持することを実証する図である。

【図3】 図3は、タンパク質加水分解的に安定な組換えゼラチンの製造を実証する図である。

【図4】 図4は、ヒドロキシル化された組換えゼラチンの製造を実証する図である。

【図5】 図5は、in vitroヒドロキシル化後の組換えゼラチンの精製の結果を示した図である。

【図6】 図6は、プロリル 4-ヒドロキシラーゼの存在下または非存在下で発現させた組換えゼラチンの安定性を示した図である。

30

【図7】 図7は、発現媒体の補給により増加した組換えゼラチン発現の結果を示した図である。

【図8】 図8は、市販のゼラチンと架橋組換えゼラチンとの比較を示した図である。

【図9】 図9は、市販のゼラチンの分子量分布の比較を示した図である。

【図10】 図10A、10B、10C、10D、10E、および10Fは、120で行なった市販のゼラチンの加水分解の結果を示した図である。

【図11】 図11A、11B、11C、および11Dは、150で行なった市販のゼラチンの加水分解の結果を示した図である。

【図12】 図12Aおよび12Bは、組換えヒトコラーゲンI型およびIII型の酸および熱による加水分解の結果を示した図である。

40

【図13】 図13は、組換えヒトコラーゲンI型の酵素による加水分解の結果を示した図である。

【図14】 図14は、組換えヒトコラーゲンI型で免疫したモルモットから得られた抗血清を用いた、組換えヒトコラーゲンおよび組換えヒトゼラチンのウェスタンブロット分析を示した図である。

【図15】 図15Aおよび15Bは、組換えヒトコラーゲンI型で免疫したモルモットから得られた抗血清が、コラーゲンI型の特定の臭化シアン断片に対して反応性であることを示した図である。

【図16】 図16は、組換えヒトコラーゲンI型で免疫したモルモットから得られた抗血

50

清が組換えヒトゼラチンに対して反応性でないことを示した図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> FibroGen, Inc.

<120> RECOMBINANT GELATINS

<130> FG0219PCT

<140>

<141>

<160> 33

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 51

<212> DNA

<213> human

<400> 1

gtatctctcg agaagagaga ggctgaagct ggtctgcttg gtgccaaggg t 51

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> human

<400> 2

tagactatta tctctcgcca gcgggaccag cagg 34

<210> 3

<211> 51

<212> DNA

<213> human

<400> 3

gtatctctcg agaagagaga ggctgaggct ggagctcagg gacccctgg c 51

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> human

<400> 4

atgctctaga ttattacttg tcaccagggg caccagcagg 40

<210> 5

<211> 54

<212> DNA

<213> human

<400> 5

gtatctctcg agaagagaga ggctgaagct ggcccatgg gtccctctgg tcct 54

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

10

20

30

40

<213> human

<400> 6

tgctctagat cattaagcat ctcccttggc accatccaa 39

<210> 7

<211> 45

<212> DNA

<213> human

<400> 7

tgctctagac tattaaggcg cgccagcatc acccttagca ccac 45

<210> 8

<211> 48

<212> DNA

<213> human

<400> 8

tgctctagat cattaaggcg cgccaggctc accgctgtta cccttggg 48

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> human

<400> 9

tgctctagat cattatctct cgctcttgc tccagaggg 39

<210> 10

<211> 57

<212> DNA

<213> human

<400> 10

gtgcccgtgg tcaggctggt gtgatgggat tccctggacc taaagggtgt gettaat 57

<210> 11

<211> 64

<212> DNA

<213> human

<400> 11

ctagattaag cagcaccttt aggtccaggg aatcccatca caccagcctg accacgggca 60
ccag 64

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> human

<400> 12

atgctctaga ttattaagga gaaccgtctc gtccagggga 40

<210> 13

<211> 37

<212> DNA

<213> human

10

20

30

<400> 13
ctagtctaga ttatcttgct ccagaggggc caggggc

37

<210> 14
<211> 37
<212> DNA
<213> human

<400> 14
ctagtctaga ttagcgagca ccttgggtc caggagc

37

<210> 15
<211> 102
<212> PRT
<213> human

10

<400> 15
Gly Pro Met Gly Pro Ser Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly
1 5 10 15
Ala Pro Gly Pro Gln Gly Phe Gln Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly Glu
20 25 30
Pro Gly Ala Ser Gly Pro Met Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro Pro
35 40 45
Gly Lys Asn Gly Asp Asp Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly Arg Pro Gly
50 55 60
Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Ala Arg Gly Leu Pro Gly Thr
65 70 75 80
Ala Gly Leu Pro Gly Met Lys Gly His Arg Gly Phe Ser Gly Leu Asp
85 90 95
Gly Ala Lys Gly Asp Ala
100

20

<210> 16
<211> 261
<212> PRT
<213> human

<400> 16
Gly Pro Met Gly Pro Ser Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly
1 5 10 15
Ala Pro Gly Pro Gln Gly Phe Gln Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly Glu
20 25 30
Pro Gly Ala Ser Gly Pro Met Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro Pro
35 40 45
Gly Lys Asn Gly Asp Asp Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly Arg Pro Gly
50 55 60
Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Ala Arg Gly Leu Pro Gly Thr
65 70 75 80

30

Ala Gly Leu Pro Gly Met Lys Gly His Arg Gly Phe Ser Gly Leu Asp
85 90 95

Gly Ala Lys Gly Asp Ala Gly Pro Ala Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly
100 105 110

Ser Pro Gly Glu Asn Gly Ala Pro Gly Gln Met Gly Pro Arg Gly Leu
115 120 125

Pro Gly Glu Arg Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Pro Ala Gly Ala Arg
130 135 140

Gly Asn Asp Gly Ala Thr Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly
145 150 155 160

Pro Ala Gly Pro Pro Gly Phe Pro Gly Ala Val Gly Ala Lys Gly Glu
165 170 175

Ala Gly Pro Gln Gly Pro Arg Gly Ser Glu Gly Pro Gln Gly Val Arg
180 185 190

Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Ala Gly Pro Ala Gly
195 200 205

Asn Pro Gly Ala Asp Gly Gln Pro Gly Ala Lys Gly Ala Asn Gly Ala
210 215 220

Pro Gly Ile Ala Gly Ala Pro Gly Phe Pro Gly Ala Arg Gly Pro Ser
225 230 235 240

Gly Pro Gln Gly Pro Gly Gly Pro Pro Gly Pro Lys Gly Asn Ser Gly
245 250 255

Glu Pro Gly Ala Pro
260

<210> 17
<211> 501
<212> PRT
<213> human

<400> 17

Gly Pro Met Gly Pro Ser Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly
1 5 10 15

Ala Pro Gly Pro Gln Gly Phe Gln Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly Glu
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Gly Pro Met Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro Pro
35 40 45

Gly Lys Asn Gly Asp Asp Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly Arg Pro Gly
50 55 60

Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Ala Arg Gly Leu Pro Gly Thr
65 70 75 80

10

20

30

Ala Gly Leu Pro Gly Met Lys Gly His Arg Gly Phe Ser Gly Leu Asp
 85 90 95
 Gly Ala Lys Gly Asp Ala Gly Pro Ala Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly
 100 105 110
 Ser Pro Gly Glu Asn Gly Ala Pro Gly Gln Met Gly Pro Arg Gly Leu
 115 120 125
 Pro Gly Glu Arg Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Pro Ala Gly Ala Arg
 130 135 140
 Gly Asn Asp Gly Ala Thr Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly
 145 150 155 160
 Pro Ala Gly Pro Pro Gly Phe Pro Gly Ala Val Gly Ala Lys Gly Glu
 165 170 175
 Ala Gly Pro Gln Gly Pro Arg Gly Ser Glu Gly Pro Gln Gly Val Arg
 180 185 190
 Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Ala Gly Pro Ala Gly
 195 200 205
 Asn Pro Gly Ala Asp Gly Gln Pro Gly Ala Lys Gly Ala Asn Gly Ala
 210 215 220
 Pro Gly Ile Ala Gly Ala Pro Gly Phe Pro Gly Ala Arg Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Gly Pro Gln Gly Pro Gly Gly Pro Pro Gly Pro Lys Gly Asn Ser Gly
 245 250 255
 Glu Pro Gly Ala Pro Gly Ser Lys Gly Asp Thr Gly Ala Lys Gly Glu
 260 265 270
 Pro Gly Pro Val Gly Val Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Glu Glu
 275 280 285
 Gly Lys Arg Gly Ala Arg Gly Glu Pro Gly Pro Thr Gly Leu Pro Gly
 290 295 300
 Pro Pro Gly Glu Arg Gly Gly Pro Gly Ser Arg Gly Phe Pro Gly Ala
 305 310 315 320
 Asp Gly Val Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ser Pro
 325 330 335
 Gly Pro Ala Gly Pro Lys Gly Ser Pro Gly Glu Ala Gly Arg Pro Gly
 340 345 350
 Glu Ala Gly Leu Pro Gly Ala Lys Gly Leu Thr Gly Ser Pro Gly Ser
 355 360 365
 Pro Gly Pro Asp Gly Lys Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Gln Asp
 370 375 380
 Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Arg Gly Gln Ala Gly
 385 390 395 400

10

20

30

Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Ala Ala Gly Glu Pro Gly Lys
 405 410 415

Ala Gly Glu Arg Gly Val Pro Gly Pro Pro Gly Ala Val Gly Pro Ala
 420 425 430

Gly Lys Asp Gly Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly
 435 440 445

Pro Ala Gly Glu Arg Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly Ser Pro Gly Phe
 450 455 460

Gln Gly Leu Pro Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Lys Pro
 465 470 475 480

Gly Glu Gln Gly Val Pro Gly Asp Leu Gly Ala Pro Gly Pro Ser Gly
 485 490 495

Ala Arg Gly Glu Arg
 500

10

<210> 18
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> human

<400> 18
 Glu Ala Gly Leu Pro Gly Ala Lys Gly Leu Thr Gly Ser Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Pro Gly Pro Asp Gly Lys Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Gln Asp
 20 25 30

Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Arg Gly Gln Ala Gly
 35 40 45

Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Ala Ala
 50 55

20

<210> 19
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> human

<400> 19
 Glu Ala Gly Leu Pro Gly Ala Lys Gly Leu Thr Gly Ser Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Pro Gly Pro Asp Gly Lys Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Gln Asp
 20 25 30

Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Arg Gly Gln Ala Gly
 35 40 45

Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Ala Ala Gly Glu Pro Gly Lys
 50 55 60

30

Ala Gly Glu Arg Gly Val Pro Gly Pro Pro Gly Ala Val Gly Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Lys Asp Gly Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly
 85 90 95
 Pro Ala Gly Glu Arg
 100

<210> 20
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> human

10

<400> 20
 Glu Ala Gly Leu Pro Gly Ala Lys Gly Leu Thr Gly Ser Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Pro Gly Pro Asp Gly Lys Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Gln Asp
 20 25 30
 Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Arg Gly Gln Ala Gly
 35 40 45
 Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Ala Ala Gly Glu Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Gly Glu Arg Gly Val Pro Gly Pro Pro Gly Ala Val Gly Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Lys Asp Gly Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly
 85 90 95
 Pro Ala Gly Glu Arg Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly Ser Pro Gly Phe
 100 105 110
 Gln Gly Leu Pro Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Lys Pro
 115 120 125
 Gly Glu Gln Gly Val Pro Gly Asp Leu Gly Ala Pro Gly Pro Ser Gly
 130 135 140
 Ala Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Glu Arg Gly Val Gln Gly Pro
 145 150 155 160
 Pro Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Ala Asn Gly Ala Pro Gly Asn Asp
 165 170 175
 Gly Ala Lys Gly Asp Ala Gly Ala Pro
 180 185

20

30

<210> 21
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> human

<400> 21

Glu Ala Gly Leu Pro Gly Ala Lys Gly Leu Thr Gly Ser Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Pro Gly Pro Asp Gly Lys Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Gln Asp
 20 25 30
 Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Arg Gly Gln Ala Gly
 35 40 45
 Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Ala Ala Gly Glu Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Gly Glu Arg Gly Val Pro Gly Pro Pro Gly Ala Val Gly Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Lys Asp Gly Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly
 85 90 95
 Pro Ala Gly Glu Arg Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly Ser Pro Gly Phe
 100 105 110
 Gln Gly Leu Pro Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Lys Pro
 115 120 125
 Gly Glu Gln Gly Val Pro Gly Asp Leu Gly Ala Pro Gly Pro Ser Gly
 130 135 140
 Ala Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Glu Arg Gly Val Gln Gly Pro
 145 150 155 160
 Pro Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Ala Asn Gly Ala Pro Gly Asn Asp
 165 170 175
 Gly Ala Lys Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gln Gly
 180 185 190
 Ala Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu
 195 200 205
 Pro Gly Pro Lys Gly Asp Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp
 210 215 220
 Gly Ser Pro Gly Lys Asp Gly Val Arg Gly Leu Thr Gly Pro Ile Gly
 225 230 235 240
 Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Asp Lys
 245 250

10

20

30

<210> 22
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> human

<400> 22
 Glu Ala Gly Leu Pro Gly Ala Lys Gly Leu Thr Gly Ser Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Pro Gly Pro Asp Gly Lys Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Gln Asp
 20 25 30
 Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Arg Gly Gln Ala Gly
 35 40 45
 Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Ala Ala Gly Glu Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Gly Glu Arg Gly Val Pro Gly Pro Pro Gly Ala Val Gly Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Lys Asp Gly Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly
 85 90 95
 Pro Ala Gly Glu Arg Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly Ser Pro Gly Phe
 100 105 110
 Gln Gly Leu Pro Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Lys Pro
 115 120 125
 Gly Glu Gln Gly Val Pro Gly Asp Leu Gly Ala Pro Gly Pro Ser Gly
 130 135 140
 Ala Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Glu Arg Gly Val Gln Gly Pro
 145 150 155 160
 Pro Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Ala Asn Gly Ala Pro Gly Asn Asp
 165 170 175
 Gly Ala Lys Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gln Gly
 180 185 190
 Ala Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu
 195 200 205
 Pro Gly Pro Lys Gly Asp Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp
 210 215 220
 Gly Ser Pro Gly Lys Asp Gly Val Arg Gly Leu Thr Gly Pro Ile Gly
 225 230 235 240
 Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Asp Lys Gly Glu Ser Gly Pro
 245 250 255
 Ser Gly Pro Ala Gly Pro Thr Gly Ala Arg Gly Ala Pro Gly Asp Arg
 260 265 270
 Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Phe Ala Gly Pro Pro Gly
 275 280 285
 Ala Asp Gly Gln Pro Gly Ala Lys Gly Glu Pro Gly Asp Ala Gly Ala
 290 295 300
 Lys Gly Asp Ala Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Pro Pro
 305 310 315 320
 Gly Pro Ile Gly Asn Val Gly Ala Pro Gly Ala Lys Gly Ala Arg Gly
 325 330 335

10

20

30

Ser Ala Gly Pro Pro Gly Ala Thr Gly Phe Pro Gly Ala Ala Gly Arg
 340 345 350
 Val Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Asn Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro
 355 360 365
 Gly Pro Ala Gly Lys Glu Gly Gly Lys Gly Pro Arg Gly Glu Thr Gly
 370 375 380
 Pro Ala Gly Arg Pro Gly Glu Val Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro
 385 390 395 400
 Ala Gly Glu Lys Gly Ser Pro Gly Ala Asp Gly Pro Ala Gly Ala Pro
 405 410 415
 Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg Gly Val Val Gly
 420 425 430
 Leu Pro Gly Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Leu Pro Gly Pro
 435 440 445
 Ser Gly Glu Pro Gly Lys Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly Glu Arg
 450 455 460
 Gly Pro Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Leu Ala Gly Pro Pro Gly
 465 470 475 480
 Glu Ser Gly Arg Glu Gly Ala Pro Ala Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg
 485 490 495
 Asp Gly Ser Pro
 500

10

20

<210> 23
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> human

<400> 23
 Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly Ser Pro Gly Phe Gln Gly Leu Pro
 20 25 30
 Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly Glu Gln Gly
 35 40 45
 Val Pro Gly Asp Leu Gly Ala Pro Gly Pro Ser Gly Ala Arg Gly Glu
 50 55 60
 Arg Gly Phe Pro Gly Glu Arg Gly Val Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Pro Arg Gly Ala Asn Gly Ala Pro Gly Asn
 85 90

30

<210> 24
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> human

<400> 24

Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly Ser Pro Gly Phe Gln Gly Leu Pro
 20 25 30
 Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly Glu Gln Gly
 35 40 45
 Val Pro Gly Asp Leu Gly Ala Pro Gly Pro Ser Gly Ala Arg Gly Glu
 50 55 60
 Arg Gly Phe Pro Gly Glu Arg Gly Val Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Pro Arg Gly Ala Asn Gly Ala Pro Gly Asn Asp Gly Ala Lys Gly
 85 90 95
 Asp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gln Gly Ala Pro Gly Leu
 100 105 110
 Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys
 115 120 125
 Gly Asp Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ser Pro Gly
 130 135 140
 Lys Asp Gly Val Arg Gly Leu Thr Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro
 145 150 155 160
 Ala Gly Ala Pro Gly Asp Lys
 165

10

20

<210> 25
 <211> 416
 <212> PRT
 <213> human

<400> 25

Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly Ser Pro Gly Phe Gln Gly Leu Pro
 20 25 30
 Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly Glu Gln Gly
 35 40 45
 Val Pro Gly Asp Leu Gly Ala Pro Gly Pro Ser Gly Ala Arg Gly Glu
 50 55 60

30

Arg Gly Phe Pro Gly Glu Arg Gly Val Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Pro Arg Gly Ala Asn Gly Ala Pro Gly Asn Asp Gly Ala Lys Gly
 85 90 95
 Asp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gln Gly Ala Pro Gly Leu
 100 105 110
 Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys
 115 120 125
 Gly Asp Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ser Pro Gly
 130 135 140
 Lys Asp Gly Val Arg Gly Leu Thr Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro
 145 150 155 160
 Ala Gly Ala Pro Gly Asp Lys Gly Glu Ser Gly Pro Ser Gly Pro Ala
 165 170 175
 Gly Pro Thr Gly Ala Arg Gly Ala Pro Gly Asp Arg Gly Glu Pro Gly
 180 185 190
 Pro Pro Gly Pro Ala Gly Phe Ala Gly Pro Pro Gly Ala Asp Gly Gln
 195 200 205
 Pro Gly Ala Lys Gly Glu Pro Gly Asp Ala Gly Ala Lys Gly Asp Ala
 210 215 220
 Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Pro Ile Gly
 225 230 235 240
 Asn Val Gly Ala Pro Gly Ala Lys Gly Ala Arg Gly Ser Ala Gly Pro
 245 250 255
 Pro Gly Ala Thr Gly Phe Pro Gly Ala Ala Gly Arg Val Gly Pro Pro
 260 265 270
 Gly Pro Ser Gly Asn Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly
 275 280 285
 Lys Glu Gly Gly Lys Gly Pro Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Arg
 290 295 300
 Pro Gly Glu Val Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Glu Lys
 305 310 315 320
 Gly Ser Pro Gly Ala Asp Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly
 325 330 335
 Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg Gly Val Val Gly Leu Pro Gly Gln
 340 345 350
 Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Leu Pro Gly Pro Ser Gly Glu Pro
 355 360 365
 Gly Lys Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly
 370 375 380

10

20

30

Pro Met Gly Pro Pro Gly Leu Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ser Gly Arg
385 390 395 400

Glu Gly Ala Pro Ala Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg Asp Gly Ser Pro
405 410 415

<210> 26
<211> 510
<212> PRT
<213> human

<400> 26

Gly Glu Arg Gly Val Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly
1 5 10 15

Ala Asn Gly Ala Pro Gly Asn Asp Gly Ala Lys Gly Asp Ala Gly Ala
20 25 30

Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro
35 40 45

Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Asp Arg Gly
50 55 60

Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ser Pro Gly Lys Asp Gly Val
65 70 75 80

Arg Gly Leu Thr Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Pro
85 90 95

Gly Asp Lys Gly Glu Ser Gly Pro Ser Gly Pro Ala Gly Pro Thr Gly
100 105 110

Ala Arg Gly Ala Pro Gly Asp Arg Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro
115 120 125

Ala Gly Phe Ala Gly Pro Pro Gly Ala Asp Gly Gln Pro Gly Ala Lys
130 135 140

Gly Glu Pro Gly Asp Ala Gly Ala Lys Gly Asp Ala Gly Pro Pro Gly
145 150 155 160

Pro Ala Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Pro Ile Gly Asn Val Gly Ala
165 170 175

Pro Gly Ala Lys Gly Ala Arg Gly Ser Ala Gly Pro Pro Gly Ala Thr
180 185 190

Gly Phe Pro Gly Ala Ala Gly Arg Val Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly
195 200 205

Asn Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Lys Glu Gly Gly
210 215 220

Lys Gly Pro Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Arg Pro Gly Glu Val
225 230 235 240

10

20

30

Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Glu Lys Gly Ser Pro Gly
 245 250 255
 Ala Asp Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Ile
 260 265 270
 Ala Gly Gln Arg Gly Val Val Gly Leu Pro Gly Gln Arg Gly Glu Arg
 275 280 285
 Gly Phe Pro Gly Leu Pro Gly Pro Ser Gly Glu Pro Gly Lys Gln Gly
 290 295 300
 Pro Ser Gly Ala Ser Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Met Gly Pro
 305 310 315 320
 Pro Gly Leu Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ser Gly Arg Glu Gly Ala Pro
 325 330 335
 Ala Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg Asp Gly Ser Pro Gly Ala Lys Gly
 340 345 350
 Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly Ala
 355 360 365
 Pro Gly Ala Pro Gly Pro Val Gly Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg
 370 375 380
 Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Pro Val Gly Pro Val Gly
 385 390 395 400
 Ala Arg Gly Pro Ala Gly Pro Gln Gly Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu
 405 410 415
 Thr Gly Glu Gln Gly Asp Arg Gly Ile Lys Gly His Arg Gly Phe Ser
 420 425 430
 Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ser Pro Gly Glu Gln Gly
 435 440 445
 Pro Ser Gly Ala Ser Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Ser
 450 455 460
 Ala Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Leu Asn Gly Leu Pro Gly Pro Ile
 465 470 475 480
 Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Arg Thr Gly Asp Ala Gly Pro Val Gly
 485 490 495
 Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro
 500 505 510

10

20

30

<210> 27
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> human
 <400> 27

Gly Ala Lys Gly Ala Arg Gly Ser Ala Gly Pro Pro Gly Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Phe Pro Gly Ala Ala Gly Arg Val Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Asn
 20 25 30
 Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Lys Glu Gly Gly Lys
 35 40 45
 Gly Pro Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Arg Pro Gly Glu Val Gly
 50 55 60
 Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Glu Lys Gly Ser Pro Gly Ala
 65 70 75 80
 Asp Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Ile Ala
 85 90 95
 Gly Gln Arg Gly Val Val Gly Leu Pro Gly Gln Arg Gly Glu Arg Gly
 100 105 110
 Phe Pro Gly Leu Pro Gly Pro Ser Gly Glu Pro Gly Lys Gln Gly Pro
 115 120 125
 Ser Gly Ala Ser Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro
 130 135 140
 Gly Leu Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ser Gly Arg Glu Gly Ala Pro Ala
 145 150 155 160
 Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg Asp Gly Ser Pro Gly Ala Lys Gly Asp
 165 170 175
 Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro
 180 185 190
 Gly Ala Pro Gly Pro Val Gly Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly
 195 200 205
 Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Pro Val Gly Pro Val Gly Ala
 210 215 220
 Arg Gly Pro Ala Gly Pro Gln Gly Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Thr
 225 230 235 240
 Gly Glu Gln Gly Asp Arg Gly Ile Lys Gly His Arg Gly Phe Ser Gly
 245 250 255
 Leu Gln Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ser Pro Gly Glu Gln Gly Pro
 260 265 270
 Ser Gly Ala Ser Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Ser Ala
 275 280 285
 Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Leu Asn Gly Leu Pro Gly Pro Ile Gly
 290 295 300
 Pro Pro Gly Pro Arg Gly Arg Thr Gly Asp Ala Gly Pro Val Gly Pro
 305 310 315 320

10

20

30

Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro
 325 330

<210> 28
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> human

<400> 28

Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Leu Ala Gly Pro
 1 5 10 15

Pro Gly Glu Ser Gly Arg Glu Gly Ala Pro Ala Ala Glu Gly Ser Pro
 20 25 30

Gly Arg Asp Gly Ser Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly
 35 40 45

Pro Ala Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro
 50 55 60

Val Gly Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala
 65 70 75 80

Gly Pro Ala Gly Pro Val Gly Pro Val Gly Ala Arg Gly Pro Ala Gly
 85 90 95

Pro Gln Gly Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Thr Gly Glu Gln Gly Asp
 100 105 110

Arg Gly Ile Lys Gly His Arg Gly Phe Ser Gly Leu Gln Gly Pro Pro
 115 120 125

Gly Pro Pro Gly Ser Pro Gly Glu Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly
 130 135 140

Pro Ala Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Ser Ala Gly Ala Pro Gly Lys
 145 150 155 160

Asp Gly Leu Asn Gly Leu Pro Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg
 165 170 175

Gly Arg Thr Gly Asp Ala Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
 180 185 190

Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro
 195 200

<210> 29
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> human

<400> 29

Arg Gly Asp Lys Gly Glu Thr Gly Glu Gln Gly Asp Arg Gly Ile Lys
 1 5 10 15

10

20

30

Gly His Arg Gly Phe Ser Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
 20 25 30
 Ser Pro Gly Glu Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly Pro Ala Gly Pro
 35 40 45
 Arg Gly Pro Pro Gly Ser Ala Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Leu Asn
 50 55 60
 Gly Leu Pro Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Arg Thr Gly
 65 70 75 80
 Asp Ala Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro
 85 90 95
 Pro Gly Pro Pro
 100

10

<210> 30
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> human

<400> 30
 Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly Ser Pro Gly Phe Gln Gly Leu Pro
 20 25 30
 Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly Glu Gln Gly
 35 40 45
 Val Pro Gly Asp Leu Gly Ala Pro Gly Pro Ser Gly Ala Arg
 50 55 60

20

<210> 31
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> human

<400> 31
 Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly Ser Pro Gly Phe Gln Gly Leu Pro
 20 25 30
 Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly Glu Gln Gly
 35 40 45
 Val Pro Gly Asp Leu Gly Ala Pro Gly Pro Ser Gly Ala Arg Gly Glu
 50 55 60
 Arg Gly Phe Pro Gly Glu Arg Gly Val Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala
 65 70 75 80

30

20

30

```

<400> 33
Glu Ala Gly Leu Pro Gly Ala Lys Gly Leu Thr Gly Ser Pro Gly Ser
  1             5             10             15
Pro Gly Pro Asp Gly Lys Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Gln Asp
      20             25             30
Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Arg Gly Gln Ala Gly
  35             40             45

```

Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Ala Ala Gly Glu Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Gly Glu Arg Gly Val Pro Gly Pro Pro Gly Ala Val Gly Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Lys Asp Gly Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly
 85 90 95
 Pro Ala Gly Glu Arg Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly Ser Pro Gly Phe
 100 105 110
 Gln Gly Leu Pro Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Lys Pro
 115 120 125
 Gly Glu Gln Gly Val Pro Gly Asp Leu Gly Ala Pro Gly Pro Ser Gly
 130 135 140
 Ala Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Glu Arg Gly Val Gln Gly Pro
 145 150 155 160
 Pro Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Ala Asn Gly Ala Pro Gly Asn Asp
 165 170 175
 Gly Ala Lys Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gln Gly
 180 185 190
 Ala Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu
 195 200 205
 Pro Gly Pro Lys Gly Asp Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp
 210 215 220
 Gly Ser Pro Gly Lys Asp Gly Val Arg Gly Leu Thr Gly Pro Ile Gly
 225 230 235 240
 Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Asp Lys Gly Glu Ser Gly Pro
 245 250 255
 Ser Gly Pro Ala Gly Pro Thr Gly Ala Arg Gly Ala Pro Gly Asp Arg
 260 265 270
 Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Phe Ala Gly Pro Pro Gly
 275 280 285
 Ala Asp Gly Gln Pro Gly Ala Lys Gly Glu Pro Gly Asp Ala Gly Ala
 290 295 300
 Lys Gly Asp Ala Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Pro Pro
 305 310 315 320
 Gly Pro Ile Gly Asn Val Gly Ala Pro Gly Ala Lys Gly Ala Arg Gly
 325 330 335
 Ser Ala Gly Pro Pro Gly Ala Thr Gly Phe Pro Gly Ala Ala Gly Arg
 340 345 350
 Val Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Asn Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro
 355 360 365

10

20

30

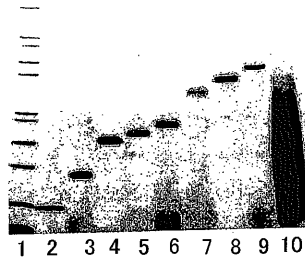
Gly Pro Ala Gly Lys Glu Gly Gly Lys Gly Pro Arg Gly Glu Thr Gly
 370 375 380
 Pro Ala Gly Arg Pro Gly Glu Val Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro
 385 390 395 400
 Ala Gly Glu Lys Gly Ser Pro Gly Ala Asp Gly Pro Ala Gly Ala Pro
 405 410 415
 Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg Gly Val Val Gly
 420 425 430
 Leu Pro Gly Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Leu Pro Gly Pro
 435 440 445
 Ser Gly Glu Pro Gly Lys Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly Glu Arg
 450 455 460
 Gly Pro Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Leu Ala Gly Pro Pro Gly
 465 470 475 480
 Glu Ser Gly Arg Glu Gly Ala Pro Ala Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg
 485 490 495
 Asp Gly Ser Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala
 500 505 510
 Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Val Gly
 515 520 525
 Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro
 530 535 540
 Ala Gly Pro Val Gly Pro Val Gly Ala Arg Gly Pro Ala Gly Pro Gln
 545 550 555 560
 Gly Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Thr Gly Glu Gln Gly Asp Arg Gly
 565 570 575
 Ile Lys Gly His Arg Gly Phe Ser Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Pro
 580 585 590
 Pro Gly Ser Pro Gly Glu Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly Pro Ala
 595 600 605
 Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Ser Ala Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly
 610 615 620
 Leu Asn Gly Leu Pro Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Arg
 625 630 635 640
 Thr Gly Asp Ala Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro
 645 650 655
 Gly Pro Pro Gly Pro Pro
 660

10

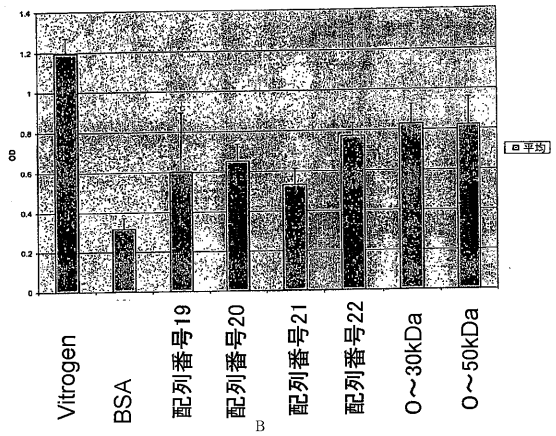
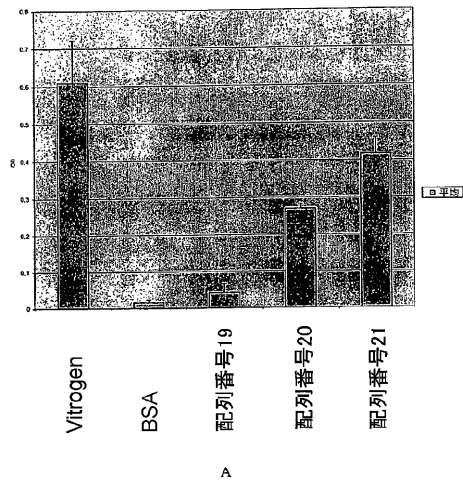
20

30

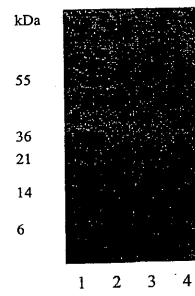
【図 1】



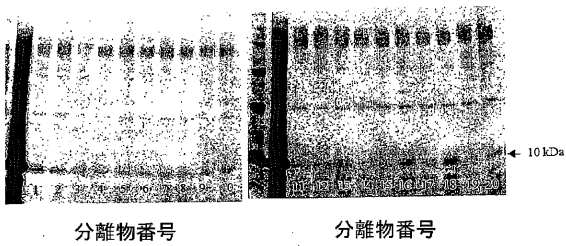
【図 2】



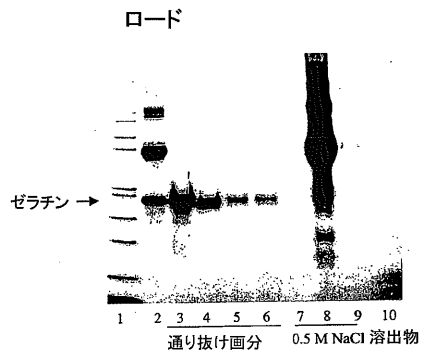
【図 3】



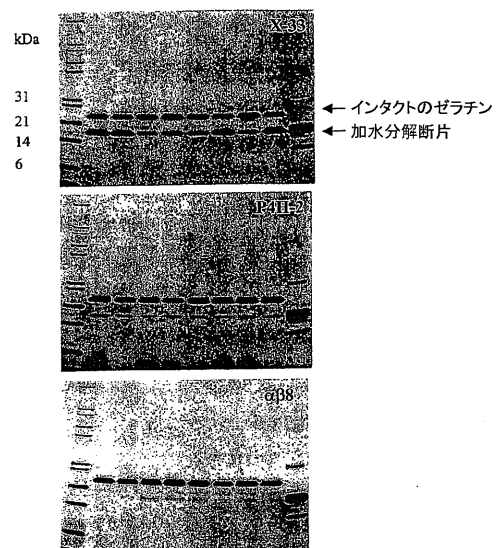
【図 4】



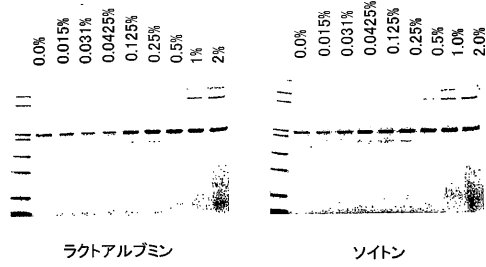
【図 5】



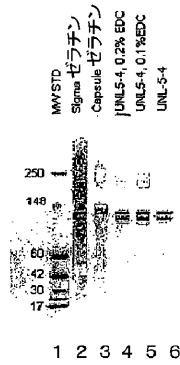
【図 6】



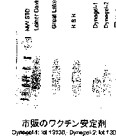
【図 7】



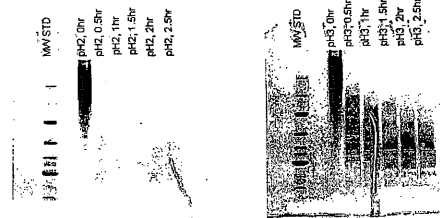
【図 8】



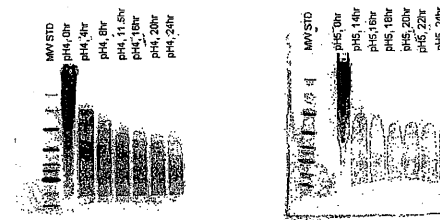
【図 9】



【図 10】

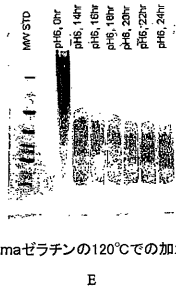


Sigmaゼラチンの120°Cでの加水分解



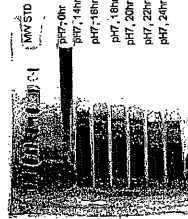
Sigmaゼラチンの120°Cでの加水分解

Sigmaゼラチンの120°Cでの加水分解



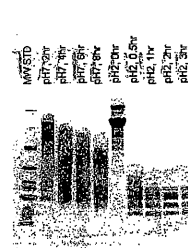
E

Sigmaゼラチンの120°Cでの加水分解

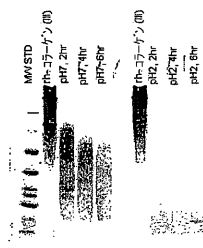


F

【図 12】

組換えヒトコラーゲン(I)の
120°Cでの加水分解

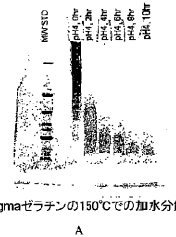
A

組換えヒトコラーゲン(III)の
120°Cでの加水分解

B

【図 11】

Sigmaゼラチンの150°Cでの加水分解



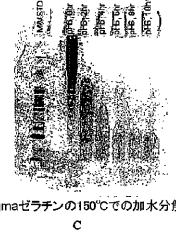
A

Sigmaゼラチンの150°Cでの加水分解



B

Sigmaゼラチンの150°Cでの加水分解



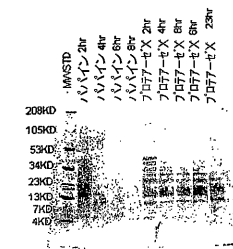
C

Sigmaゼラチンの150°Cでの加水分解

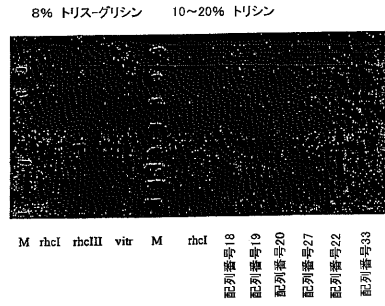


D

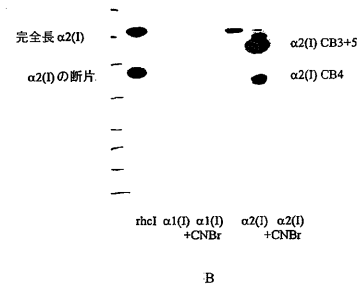
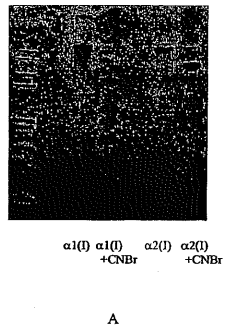
【図 13】

パバインおよびプロテアーゼXによる
組換えヒトコラーゲン(I)の37°Cでの加水分解

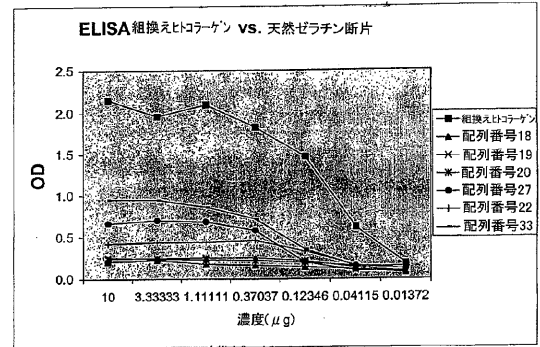
【図 14】



【図 15】



【図 16】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 2 3 L 1/30 (2006.01)		A 2 3 L 1/30	A
A 6 1 K 9/48 (2006.01)		A 6 1 K 9/48	
A 6 1 K 47/42 (2006.01)		A 6 1 K 47/42	
A 6 1 L 31/00 (2006.01)		A 6 1 L 31/00	B
A 6 1 P 19/02 (2006.01)		A 6 1 P 19/02	
B 0 1 F 17/30 (2006.01)		B 0 1 F 17/30	
C 0 7 K 14/78 (2006.01)		C 0 7 K 14/78	
C 0 8 H 1/00 (2006.01)		C 0 8 H 1/00	
C 0 9 J 189/00 (2006.01)		C 0 9 J 189/00	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/00	1 0 2
A 6 1 K 38/17 (2006.01)		A 6 1 K 37/12	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)		C 1 2 P 21/02	C

(72)発明者 キビリッコ, カリ, アイ.

フィンランド国 エフアイエヌ - 9 0 6 5 0 オウル パークキセンランタ 5

(72)発明者 ネット, トーマス, ビイ.

アメリカ合州国 9 4 0 2 7 カリフォルニア州 アサートン, グレンウッド アヴェニュー 1
9 0

(72)発明者 オルセン, デビット, アール.

アメリカ合州国 9 4 0 2 5 カリフォルニア州 メンロ パーク, ヘッジ ロード 2 7 6

(72)発明者 ボラレック, ジェームス, ダブリュ.

アメリカ合州国 9 4 9 6 5 カリフォルニア州 サンサリト, ワルド ポイント ハーバー, エ
イ ドック, 3 番地

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 国際公開第 9 8 / 0 2 7 2 0 2 (WO, A 1)

特開昭 5 4 - 0 0 5 0 4 8 (JP, A)

欧州特許出願公開第 0 0 9 2 6 5 4 3 (EP, A 1)

EMBO J, vol.16, p.6702-6712 (1997)

DNA Cell Biol, vol.17, p.511-518 (1998)

Advanced Drug delivery Reviews, vol.55, p.1547-1567 (2003)

Yeast, vol.15, p.1087-1096 (1999)

J Biol Chem, vol.275, p.23303-23309 (2000)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 ~ 15/90

PubMed

SwissProt/PIR/GeneSeq