

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-519950
(P2016-519950A)

(43) 公表日 平成28年7月11日(2016.7.11)

(51) Int.Cl.

C 12 P 21/02 (2006.01)
C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 N 15/00 (2006.01)
C 07 K 19/00 (2006.01)
C 07 K 14/35 (2006.01)

F 1

C 12 P 21/02
C 12 N 15/00
C 12 N 15/00
C 07 K 19/00
C 07 K 14/35

C
A

テーマコード(参考)

4 B 0 6 4
4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-516145 (P2016-516145)
(86) (22) 出願日 平成26年5月28日 (2014.5.28)
(85) 翻訳文提出日 平成28年1月26日 (2016.1.26)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2014/061048
(87) 國際公開番号 WO2014/191455
(87) 國際公開日 平成26年12月4日 (2014.12.4)
(31) 優先権主張番号 13170009.8
(32) 優先日 平成25年5月31日 (2013.5.31)
(33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号 61/833,046
(32) 優先日 平成25年6月10日 (2013.6.10)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509091848
ノヴォ ノルディスク アー／エス
デンマーク、パウスヴェア ディーケー
2880, ノヴォ アレー
(74) 代理人 100108453
弁理士 村山 靖彦
(74) 代理人 100110364
弁理士 実広 信哉
(74) 代理人 100133400
弁理士 阿部 達彦
(72) 発明者 アラン・クリスチャン・ショー
デンマーク・DK-2880・パウスヴェ
ア・ノヴォ・アレー・(番地なし)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】操作されたインテインを使用してペプチドを生産する方法

(57) 【要約】

本発明は、組み換え手段によりペプチドを生産する方法を提供する。このペプチドを、標的ペプチドと操作されたインテインとを含む融合ペプチドの一部として発現させる。本発明はまた、操作されたインテイン、このインテインを含む融合タンパク質及びこの融合タンパク質をコードするDNA構築物も提供する。融合タンパク質のチオール誘導性開裂により、標的ペプチドのカルボキシ末端 -チオエステルが得られる。カルボキシ末端 -チオエステルは、任意の求核剤と原理的には反応することができ、従って、この戦略により、広範囲のカルボキシ末端修飾、例えば化学的ライゲーション、バイオコンジュゲーション又はアミド化が可能となる。本発明の操作されたインテインは、サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインテイン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン変異を有しており、これにより、融合タンパク質の発現レベルが増加し、単離された標的ペプチドが高収量となり、そのため、本発明の方法は生産規模に適している。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ペプチドを生産する方法であって、前記ペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、標的ペプチドと操作されたインティエンとを含み、前記インティエンは、サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインティエン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン変異を有する、方法。

【請求項 2】

前記インティエンはGyrAインティエンである、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記インティエンはMxe GyrAインティエンである、請求項2に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記インティエンは、Mxe GyrAインティエン(配列番号1)の残基107～164に対応する残基又はMxe GyrAインティエン(配列番号1)の残基107～164に対応する残基の一部の切除によりサイズが最小化されるMxe GyrAインティエンであり、前記切除された残基は、1～10個のアミノ酸を含むリンカーに置き換えられる、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記リンカーは、6～10個のアミノ酸を含み、前記リンカーのアミノ酸のうちの少なくとも6個は、グリシン及び/又はセリンである、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記インティエンの配列は配列番号20である、請求項5に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記標的ペプチドは、-アミド化ペプチド、例えばPYY、PP、-CGRP、CT及びアミリン又はこれらの類似体である、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記融合タンパク質は、精製タグと任意選択でプロテアーゼ部位とを更に含み、これにより、アフィニティクロマトグラフィー又は他のクロマトグラフィー法による同定及び/又は精製が可能となり、前記プロテアーゼ部位により、そのような精製タグの脱離が可能となる、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記標的ペプチドの-チオエステルを生じる前記融合タンパク質のチオール誘導性開裂を更に含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 10】

-アミド化ペプチドを生産する方法であって、前記ペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、標的ペプチドと配列番号20のインティエンとを含む、方法。

【請求項 11】

前記融合タンパク質を、細菌、酵母、哺乳動物細胞において、又はトランスジェニック哺乳動物の体液中で発現させる、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

標的ペプチドとインティエンとを含む融合タンパク質であって、前記インティエンは、サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインティエン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン変異を有する、融合タンパク質。

40

【請求項 13】

サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインティエン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン変異を有するインティエン。

【請求項 14】

前記インティエンの配列は配列番号20である、請求項13に記載のインティエン。

【請求項 15】

請求項12に記載の融合タンパク質をコードするDNA構築物。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】**【0001】**

本発明は、ペプチドを生産する方法であって、融合タンパク質の一部としてのペプチドの発現を含み、前記融合タンパク質が、標的ペプチドと操作された(engineered)インティエンとを含む方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

ペプチドは、50種を超えるペプチドベースの製品が現在市販されている、急成長している種類の治療法であり、免疫学、腫瘍学、神経学及び内分泌学等の疾患分野をカバーするまでに発展している。ペプチドは、主に特定の細胞受容体との相互作用により過度な生理機能を制御し、それにより、ペプチドは、神経伝達及びホルモンの放出等の細胞シグナル伝達事象を誘導する。内因性ペプチドは、*in vivo*で制限されている安定性及び生理学的利用能に起因する治療法としての課題に関連している。しかしながら、ペプチドの治療特性を選択的に変更する及び改善する能力の改善と組み合わされた高特異性及び低毒性により、薬物開発でのペプチドの関連性が増加している。

10

【0003】

内分泌学では、糖尿病及び肥満等の疾患で見られるように、ペプチドホルモンのレベルの不均衡により又はこの不均衡と関連して疾患が引き起こされることが多い。特に、内分泌系及び神経系におけるペプチドホルモンの約半分は、それらのC末端で -アミド化されており、 -アミド部分は、生物学的な活性及び安定性にとって極めて重要であることが多い。肥満及び糖尿病に関するペプチドホルモン{例えば、ペプチドYY(PYY)、臍臓ペプチド (PP)、 -カルシトニン遺伝子関連ペプチド(-CGRP)、カルシトニン(CT)及びアミリン}を含む、ある特定の治療用ペプチドは、完全な生理学的活性を得るために、C末端に -アミド部分を必要とする。

20

【0004】

ペプチド治療薬を生産するために最も広く使用される技法は、微生物の発現系及び化学合成である。ペプチドのC末端アミドは化学合成により容易に得られるが、 -アミド化酵素機構を欠いている、微生物宿主由来の組み換えペプチドへの導入は容易ではない。従って、 -アミドを翻訳後修飾として導入する必要がある。

30

【0005】

インティエンは、アミノ末端及びカルボキシ末端の両方でタンパク質配列に隣接している、単細胞生物中で発現される自己触媒タンパク質ドメインである。アミノ末端配列及びカルボキシ末端配列は、エキソン及びイントロンというDNA命名法に従ってエクステインと命名されている。インティエンの新たに現われるファミリーの一見した代表的なメンバーは、マイコバクテリウム・ゼノピ(*Mycobacterium xenopi*)からのGyrA遺伝子産物(*Mxe GyrA*)である。このGyrA遺伝子産物は分子量が約22kDaであり、いくつかの極めて重要なアミノ酸をアミノ末端(システイン)で並びにカルボキシ末端(ヒスチジン及びアスパラギン)で含む。加えて、カルボキシ末端エクステインは、システイン、セリン又はトレオニンから始まる必要がある。翻訳の完了後のある時点で、アミノ末端エクステインとインティエンとの間のペプチド結合は、インティエンのアミノ末端でシステインに作用するNからSへのアシルシフトによりチオエステル結合に変換される。次いで、この結合は、カルボキシ末端エクステインの開始と同時に求核残基(セリン、トレオニン又はシステイン)に交換され、その後、インティエンのC末端でのアスパラギンの関与により、インティエンがそれ自体を切除し、同時に、第2のアシルシフトによりアミノ末端エクステインとカルボキシ末端エクステインとの間に天然のペプチド結合が生じる。これらの関連した反応の全体的な効果は、2個のエクステインが見かけ上結合しており、インティエンが放出されていることである。

40

【0006】

変異インティエン(Mutant inteins)は、アミノ末端のスプライス部位又はカルボキシ末端のスプライス部位のいずれかでの開裂を可能とするために、変異(mutation)により自己スプライシング機能がないように設計されている。*Mxe GyrA*インティエンの場合、N198

50

A変異によりアミノ末端の開裂が可能となっている。別のポリペプチド配列である標的ペプチドによるアミノ末端のエクステインの置き換えにより、2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム(MESNa)等の求核性の化学剤による、生じた融合タンパク質の開裂後に、反応性カルボキシ末端 -チオエステルハンドルを有する標的ペプチドの調製が可能となる。そのようなインテイン誘導性 -チオエステルは、任意の求核剤と反応することができ、化学的ライゲーション、バイオコンジュゲーション又はアミド化のための化学ハンドルとして有用である。インテインをベースとするアプローチを使用して、実験室規模で -アミド化ペプチドが組み換えにより生成されている(国際公開第98/50563A1号パンフレット;国際公開第00/00625A1号パンフレット;Cottingham I. R. 等、Nat. Biotechnol. 2001、19、974～977頁)。

10

【0007】

C末端が アミド化されたペプチドの大規模生産のためのこの技法の使用の主な制限は、一般に観察される低収量であり、これは、インテインの大きなサイズとインテイン融合タンパク質の加水分解不安定性との組み合わせに起因する可能性がある。Mxe GyrAインテインにおけるT3C変異の導入は、早期開裂の低減に関連することが分かっている(Cui C. 等、Protein Expr. Purif. 2006、50、74～81頁)。更に、インテインのサイズはペプチドホルモンのサイズと比べて大きく、インテインのサイズの減少により、宿主のタンパク質合成機構のより経済的な使用によるペプチドホルモンの最終収量が潜在的に改善される可能性がある。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】国際公開第98/50563A1号パンフレット

【特許文献2】国際公開第00/00625A1号パンフレット

【特許文献3】国際公開第2006/108826号パンフレット

【特許文献4】国際公開第2008/043847号パンフレット

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Cottingham I. R. 等、Nat. Biotechnol. 2001、19、974～977頁

30

【非特許文献2】Cui C. 等、Protein Expr. Purif. 2006、50、74～81頁

【非特許文献3】Klabunde T. (1998) Nature Structural Biology、5、31～36頁

【非特許文献4】George RA. 及びHeringa J. (2002) Protein Engineering、15、871～879頁

【非特許文献5】Hiraga, K. 等(2005) J. Mol. Biol. 354、916～926頁

【発明の概要】

【0010】

本発明は、組み換え手段によりペプチドを生産する方法を提供する。このペプチドを、標的ペプチドと操作されたインテインとを含む融合タンパク質の一部として発現させ、融合タンパク質のチオール誘導性開裂により、標的ペプチドのカルボキシ末端 -チオエステルが得られる。カルボキシ末端 -チオエステルは、任意の求核剤と原理的には反応することができ、従って、この戦略により、広範囲のカルボキシ末端修飾、例えば化学的ライゲーション、バイオコンジュゲーション又はアミド化が可能となる。インテインをベースとする戦略の別の利点は、ペプチド -チオエステルがペプチド-インテイン融合タンパク質のチオール開裂(thiolysis)により生成され、酵素を処理する必要性が潜在的に避けられることである。

40

【0011】

一態様では、本発明はペプチドを生産する方法であって、ペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、標的ペプチドとインテインとを含み、前記インテインは、サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインテイン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン変異を有する、方法を提供する。

50

【 0 0 1 2 】

別の態様では、本発明は、標的ペプチドとインティンとを含む融合タンパク質であって、前記インティンは、サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインティン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン変異を有する、融合タンパク質を提供する。

【 0 0 1 3 】

別の態様では、本発明は、サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインティン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン変異を有するインティンを提供する。

【 0 0 1 4 】

別の態様では、本発明は、少なくとも標的ペプチドとインティンとを含む融合タンパク質をコードするDNA構築物であって、前記インティンは、サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインティン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン変異を有する、DNA構築物を提供する。

10

【 0 0 1 5 】

インティンへのアミノ末端融合としての標的ペプチドの発現を伴う、インティンをベースとするアプローチを使用するペプチド-チオエステルの組み換え生産は、標的ペプチドの低収量に起因して実験室規模に制限されてきた。

【 0 0 1 6 】

本発明の操作されたインティンは、サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインティン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン変異を有しており、これにより、融合タンパク質の発現レベルが増加し、単離された標的ペプチドが高収量となり、そのため、本発明の方法は生産規模に適している。

20

【 図面の簡単な説明 】**【 0 0 1 7 】**

【図1】プロテアーゼ部位(配列番号8)を含むアミノ末端タグ(配列番号4)とカルボキシ末端GyrAインティンバリエント(variant)(配列番号17)との間で融合した[Gly4]-hPYY4-36(配列番号10)をコードするプラスミド1Aの代表的なpET11aベクターマップを示す図である。融合タンパク質全体を特徴タンパク質1Aで示す。NdeI制限酵素部位、NheI制限酵素部位、NsiI制限酵素部位、Xhol制限酵素部位及びBamHI制限酵素部位を示す。T7プロモーター領域、アンピシリン(Ampicillin)耐性遺伝子、lacI抑制領域及び複製部位の起点もベクターマップに示す。

30

【図2】カルボキシ末端を修飾した標的ペプチドを作製するための基本原理を概略的に表す図である。標的ペプチドは、この標的ペプチドを-チオエステル、-アミドとして生成する求核開裂により遊離させることができるカルボキシ末端インティンに融合している、又は合成カルボキシ末端断片と融合している。図2に示すように、標的ペプチドはアミノ末端アフィニティタグに更に融合しており、このアフィニティタグを酵素的開裂により除去することができる。この精製タグをインティンに対してカルボキシ末端に配置することができ、これにより、酵素を処理する必要性が避けられる。

40

【 図 3 】 -**【 図 4 】 -**

40

【 図 5 】 -**【 図 6 】 -****【 図 7 】 -****【 発明を実施するための形態 】****【 0 0 1 8 】**

ペプチドは、糖尿病及び肥満等の代謝性疾患を含む幅広い疾患での治療薬として関心が高い。肥満及び糖尿病に関するペプチドホルモン(例えば、PYY、PP、-CGRP、CT及びアミリン)を含む、ある特定の治療用ペプチドは、完全な生理学的活性を得るために、カルボキシ末端に-アミド部分を必要とする。課題は、組み換え手段により及び特に生産規模でそのようなペプチドを生成することである。

50

【0019】

本発明は、操作されたインテインを提供し、このインテインは、サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインテイン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン点変異を有する。このインテインをペプチドの組み換え産生に使用することができ、このペプチドは、標的ペプチドと本発明の操作されたインテインとを含む融合タンパク質の一部として発現される(図2を参照されたい)。アラインメントによりMxe GyrAインテイン(配列番号1)の3位に対応する位置でのシステイン変異とインテインの最小化との組み合わせにより、インテイン融合タンパク質の発現量が増加し、そのため標的ペプチドの収量が増加する。後者は、標的ペプチドの-チオエステルをもたらす融合タンパク質のチオール誘導性開裂により得られ、重炭酸アンモニウム(ammonia bicarbonate)等のアンモニア求核剤の添加により、標的ペプチドの-チオエステルを、標的ペプチドの対応する-アミドに変換することができる。そのため、本発明の操作されたインテインは、PYY、PP、アミリン及び-CGRP等の-アミド化ペプチドホルモンの生産に最適化された戦略を提供する。単離された標的ペプチドのより高い発現量及びより高い収量に起因して、本発明は、そのため生産規模で-アミド化ペプチドを組み換えにより生産する方法を提供する。

10

【0020】

この方法により生成された-チオエステルも化学的ライゲーション又はバイオコンジュゲーションに使用することができ、一態様では、本発明は、カルボキシ末端がバイオコンジュゲートされたタンパク質及びペプチドを組み換えにより生産する方法を提供する。

20

【0021】

一態様では、本発明は、ペプチドを生産する方法であって、ペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、標的ペプチドとインテインとを含み、前記インテインは、サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインテイン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン変異を有する、方法に関する。

20

【0022】

一態様では、本発明は、標的ペプチドとインテインとを含む融合タンパク質であって、前記インテインは、サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインテイン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン変異を有する、融合タンパク質を提供する。一態様では、本発明は、サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインテイン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン変異を有するインテインを提供する。一態様では、本発明は、標的ペプチドとインテインとを含む融合タンパク質をコードするDNA構築物であって、前記インテインは、サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインテイン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン変異を有する、DNA構築物を提供する。

30

【0023】

インテインは、アミノ末端及びカルボキシ末端の両方でタンパク質配列に隣接している、単細胞生物中で発現される自己触媒タンパク質ドメインである。一態様では、このインテインはGyrAインテインである。GyrAインテインは、いくつかの細菌の、典型的にはマイコバクテリウム(Mycobacterium)種のDNAジャイレースサブユニットAをコードする遺伝子配列内に挿入されているインテインのクラスである。このクラスのインテインは、高配列相同意性を共有する及びアミノ末端にCysを有しカルボキシ末端にHis-Asnを有することを特徴とする16種の異なるインテインからなる。更に、これらインテインは全て、アミノ末端エクステインのカルボキシ末端にTyrを有し、カルボキシ末端エクステインのアミノ末端にThrを有することにより見分けられる。一般に、これらインテインは約420個のアミノ酸のサイズを有しており、アミノ末端スプライシング領域及びカルボキシ末端スプライシング領域は、DODホーミングエンドヌクレアーゼドメインにより遮断されている。しかしながら、Mxe GyrAインテインはDODホーミングエンドヌクレアーゼドメインを欠き、他のGyrAインテインと比べてアミノスプライシングドメインとカルボキシスプライシングドメインとの間に少量の残基を有しており、全体のサイズが198個のアミノ酸となる。このインテインのX線結晶構造から、この領域(アミノ酸残基107~164に対応する)は、2個の-へ

40

50

リクスと、更にインテインの特徴的なHINTスプライシングドメインの一部から突出している及びこの一部ではない非構造化領域とからなることが分かっている。

【0024】

一態様では、インテインはMxe GyrAインテインであり、このMxe GyrAインテインは、化学的ライゲーションの目的のためにタンパク質 -チオエステルを生成すべく実験室規模で広く使用されている。このインテインは、細菌封入体からリフォールディングされる能力等のいくつかの有利な特性を持ち、変性剤及びアミノ末端エクステインのカルボキシ末端残基への低い配列要求の存在下で活性を保持する。Mxe GyrAインテインのアミノ酸配列を配列番号1に示す。

【0025】

一態様では、インテインは、残基107～164の一部の切除又は切除された残基の配列GSGS GSGSのリンカーへの置換によりサイズが最小化されるMxe GyrAインテインである。

【0026】

一態様では、インテインは、残基107～160の切除及び切除された残基の配列GSGSGSGSのリンカーへの置き換えによりサイズが最小化されるMxe GyrAインテインである。

【0027】

一態様では、インテインは、配列番号20の配列を有するT3C変異を有する、最小化されるMxe GyrAインテインである。

【0028】

一態様では、標的ペプチドは、カルボキシ末端で -アミド化されているペプチドホルモンである。全ての哺乳動物のペプチドホルモンの約50%は、これらのカルボキシ末端で -アミド化されており、この -アミド官能基は生物学的活性に極めて重要であることが多い。いくつかのペプチドホルモンは今日、糖尿病及び/又は肥満等の代謝性疾患の治療での薬物として使用される。一例はアミリン{例えば、ヒトアミリンの類似体であるSymlin(登録商標)(酢酸プラムリンチド)}である。ヒトアミリンは、糖尿病及び/又は肥満を治療する又は予防するために使用され得る37個の残基の -アミド化ペプチドホルモンである。従って、アミリンのカルボキシ末端は、完全な生物学的活性を得るために -アミド化される必要がある。同様に、PYY、PP、CT及び -CGRPも、完全な生物学的活性を得るために -アミド化しなければならない。カルボキシ末端の -アミド部分は、タンパク質分解に対する防護としても作用することができる。カルボキシ末端の アミド化されたグルカゲン様ペプチド-1(GLP-1)と、アミド化されていないとの比較により、アミド化は、インスリン分泌及びグルカゴン分泌で見られる生物学的效果に全体的に影響を及ぼさないことが示される。しかしながら、広範なカルボキシ末端分解が、アミド化されていないバリアント用の血漿中で生じる。そのため、いくつかのペプチド及びタンパク質の場合、カルボキシ末端のアミド化は、完全長の及び血漿中で生物学的に活性なタンパク質の存在を延ばす手段として導入するのに有益であり得る。従って、本発明は、ペプチド又はタンパク質を得るための代替方法を提供し、このペプチド又はタンパク質は、生物学的活性のために又は血漿中でのカルボキシペプチダーゼ分解に対して保護するためにカルボキシ末端が -アミド化されている。

【0029】

標的ペプチドは、カルボキシ末端 -チオエステルとしての融合タンパク質から放出され、カルボキシ末端 -チオエステルは、求核アシリル置換反応により多くの求核剤と反応することができ、従って、本発明は、化学的ライゲーションによる、生物学的実体又は非生物学的実体とのバイオコンジュゲーションによる及びアミド化によるペプチド伸長等のカルボキシ末端修飾を含む、より広範囲のペプチドを生産する方法を更に提供する。

【0030】

ペプチドYY(PYY)及び臍臓ペプチド(PP)は両方とも、神経ペプチドY(NPY)も属するPP-フォールドファミリー(PP-fold family)のペプチドの群に属する。これらのペプチド全て、カルボキシ末端アミドを有する36種のアミノ酸ペプチドとして天然に分泌される。これらペプチドは共通の3次元フォールド、即ちPP-フォールドを特徴としており、このPP-フォ

10

20

30

40

50

ールドは、これらペプチドの生物学的機能にとって重要な安定化要素であると考えられる。ヒトPYY(1-36)及びヒトPP(1-36)のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号2及び配列番号14に示す。PP-フォールドペプチド又はこの類似体は、動物モデルにおける及びヒトにおけるこれらペプチドのうちのいくつかの実証された食欲減退効果に基づいて、肥満及び関連疾患の治療での使用が提案されている。

【0031】

PYYは、ヒトペプチドホルモン及びこの種バリアントを意味する。一態様では、標的ペプチドはPYY又はこの類似体である。PYYは、食事中に末端小腸及び結腸におけるL細胞から放出される。PYYはPYY(1-36)として放出されるが、ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP IV)により、循環PYYの約50%を構成するPYY(3-36)に開裂される。PYY(3-36)はGI管において末梢効果を有することが知られており、満腹シグナルとして中心的に作用することも知られている。用語「ヒトPYY」及び「hPYY」は、配列番号2に係るhPYY(1-36)又は代わりに配列番号11に係るhPYY(3-36)を意味することを意図しており、これらは、1位及び2位においてアミノ末端アミノ酸を欠失している。一態様では、用語PYYはヒトPYYを意味することを意図している。一態様では、標的ペプチドはPYY(3-36)である。一態様では、標的ペプチドはhPYY(3-36)である。一態様では、標的ペプチドはPYYの類似体である。一態様では、標的ペプチドはhPYYの類似体である。一態様では、標的ペプチドは配列番号10の[Gly4]-hPYY(4-36)である。一態様では、標的ペプチドは[Arg4, Gln18, Lys30]-PYY(3-36)である。一態様では、標的ペプチドは、配列番号15の[Arg4, Gln18, Lys30]-hPYY(3-36)である。

10

20

30

【0032】

一態様では、標的ペプチドはPP又はこの類似体である。膵臓ポリペプチド(PP)PPは、膵島において内分泌細胞から分泌されるホルモンであり、食事の摂取により放出が刺激される。PPは、食事摂取量を低減すること及びエネルギー消費を潜在的に高めることが知られている。PPは、ヒトペプチドホルモン及びこの種バリアントを意味する。一態様では、標的ペプチドはPPである。一態様では、標的ペプチドはhPPである。一態様では、標的ペプチドは、配列番号14に係るhPP(1-36)である。

【0033】

カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)は、いくつかの種において、 α -CGRP及び β -CGRP(又はそれぞれCGRP-I及びCGRP-II)と命名されている2種の形態で存在するペプチドである。CGRPペプチドは種内で高度に保存されている。CGRPは、例えば感覚神経、運動神経及び腸神経から放出される。CGRPは様々な薬理学的效果、例えば1)血管拡張、2)筋肉及び肝臓のAMPキナーゼ(AMPK)の活性化並びに脂肪分解及び/又は脂肪酸化、3)食事摂取量の低減、4)胃内容排出の抑制及び消化管機能の改変並びに5)解糖の増加及びグリコーゲン合成の抑制を誘発する。AMPK活性化に対して、脂肪酸化及び食事摂取量の低減は、代謝性疾患、解糖及びインスリン耐性を媒介することが示唆されているグリコーゲン合成の抑制において有益であり得る。

【0034】

α -CGRPは、ヒトペプチドホルモン及びこの種バリアントを意味する。一態様では、標的ペプチドは α -CGRP又はこの類似体である。一態様では、標的ペプチドは β -CGRPである。一態様では、標的ペプチドは配列番号12のh β -CGRPである。

40

【0035】

カルシトニン(CT)は、カルシウム代謝の障害及び疼痛の治療に臨床的に使用されており、哺乳動物におけるグルコースレベルの増加とのカルシトニン(CT)の関連性が様々な報告の主題となっている。糖尿病の治療におけるカルシトニンの使用も説明されている。

【0036】

カルシトニンは、哺乳動物において甲状腺の傍濾胞細胞により並びに鳥及び魚の鰓後腺により産生される小ペプチドである。ヒトカルシトニン、サケカルシトニン、ウナギカルシトニン、エルカトニン(elkatonin)、ブタカルシトニン及びニワトリカルシトニン等の様々なカルシトニンが単離されている。様々なカルシトニンの種類には、著しい構造的な

50

非相同性が存在する。例えば、ヒトカルシトニンを構成するアミノ酸とサケカルシトニンを構成するアミノ酸との間の同一性はわずか50%である。ヒトカルシトニン(hCT)は、甲状腺の傍濾胞(Cとしても知られる)細胞により主に產生される、32個のアミノ酸残基を含むペプチドホルモンである。サケカルシトニンも32merのポリペプチドである。

【0037】

「カルシトニン」又は「CT」は、ヒトカルシトニン(hCT)又はサケカルシトニン(sCT)を含む、ヒトペプチドホルモン及びこの種バリエントを意味する。一態様では、標的ペプチドはCT又はこの類似体である。一態様では、標的ペプチドはCTである。一態様では、標的ペプチドはヒトCTである。一態様では、標的ペプチドは配列番号13のhCTである。

【0038】

一態様では、標的ペプチドはアミリン又はこの類似体である。ヒトアミリン(hアミリン)は、2種の別々の受容体複合体に結合する37個のアミノ酸長の配列番号3のポリペプチドである。これら2種の複合体は、カルシトニン受容体に加えて受容体活性改変タンパク質であるRAMP1又はRAMP3を含む。カルシトニン受容体とアミリン受容体との間の密接な関係から、カルシトニン受容体に対するある程度の交差反応をアミリン受容体アゴニストに予測することができる。カルシトニン受容体は全身の多くの組織で見出されており、骨代謝の制御に関与すると考えられている。カルシトニン受容体で活性であるポリペプチドは、高カルシウム血症、骨粗鬆症、パジェット病、肥満又は肥満関連疾患の治療において有用であり得、更には肥満関連疾患の予防においても有用であり得る。

【0039】

アミリンは、ヒトペプチドホルモン及びこの種バリエントを意味する。一態様では、標的ペプチドはアミリンである。一態様では、標的ペプチドは[Asp14, Arg17, Pro21, Pro27, Arg35]-アミリンである。一態様では、標的ペプチドは配列番号16の[Asp14, Arg17, Pro21, Pro27, Arg35]-hアミリンである。

【0040】

一態様では、インテイン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置している。

【0041】

用語「ポリペプチド」及び「ペプチド」は本明細書で使用する場合、ペプチド結合により連結されている少なくとも5個の構成アミノ酸で構成されている化合物を意味する。光学異性体が述べられていないアミノ酸は全て、L-異性体を意味すると理解すべきである。しかしながら、本発明の範囲内では、1種又は複数種のアミノ酸のうちのD-アミノ酸残基も考えられる。

【0042】

本発明に係るペプチドの構成アミノ酸は、遺伝暗号によりコードされるアミノ酸の群に由来してもよく、遺伝暗号によりコードされない天然アミノ酸であってもよく、更には合成アミノ酸でもよい。遺伝暗号によりコードされない天然アミノ酸は、例えば-D-カルボキシグルタミン酸塩、オルニチン、ホスホセリン、D-アラニン及びD-グルタミンである。合成アミノ酸には、化学合成により製造されるアミノ酸、即ち遺伝暗号によりコードされるアミノ酸のD-異性体、例えばD-アラニン及びD-ロイシン、Aib(-アミノイソ酪酸)、Abu(-アミノ酪酸)、Tle(tert-ブチルグリシン)、-アラニン、3-アミノメチル安息香酸、アントラニル酸が含まれる。

【0043】

22種のタンパク質原性アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、シスチン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、ヒドロキシプロリン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリンである。

【0044】

そのため、非タンパク質原性アミノ酸は、ペプチド結合によりペプチドに組み込まれ得るがタンパク質原性アミノ酸ではない部分である。例は、-カルボキシグルタミン酸塩、オルニチン、ホスホセリン、D-アミノ酸、例えばD-アラニン及びD-グルタミンであり、

10

20

30

40

50

合成の非タンパク質原性アミノ酸には、化学合成により製造されるアミノ酸、即ち遺伝暗号によりコードされるアミノ酸のD-異性体、例えばD-アラニン及びD-ロイシン、Aib(-アミノイソ酪酸)、Abu(-アミノ酪酸)、Tle(tert-ブチルグリシン)、3-アミノメチル安息香酸、アントラニル酸、des-アミノ-ヒスチジン、アミノ酸のベータ類似体、例えば -アラニン等、D-ヒスチジン、デスマミノ-ヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、-ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、N -アセチル-ヒスチジン、-フルオロメチル-ヒスチジン、-メチル-ヒスチジン、3-ピリジルアラニン、2-ピリジルアラニン若しくは4-ピリジルアラニン、(1-アミノシクロプロピル)カルボン酸、(1-アミノシクロブチル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘキシル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘキシル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘプチル)カルボン酸又は(1-アミノシクロオクチル)カルボン酸が含まれる。

10

【0045】

本発明で使用する非天然アミノ酸として、チオチロシン、オルニチン、3-メルカプトフェニルアラニン、3-若しくは4-アミノフェニルアラニン、3-若しくは4-アセチルフェニルアラニン、2-若しくは3-ヒドロキシフェニル(o-若しくはm-チロシン)、ヒドロキシメチルグリシン、アミノエチルグリシン、1-メチル-1-メルカプトエチルグリシン、アミノエチルチオエチルグリシン及びメルカプトエチルグリシンが挙げられるがこれらに限定されない。本発明で有用な非天然アミノ酸の多くは市販されている。他のものは、当分野で既知の方法により調製され得る。

20

【0046】

用語「類似体」はペプチドに関して本明細書で使用する場合、ペプチドの少なくとも1個のアミノ酸残基が別のアミノ酸残基に置換されている及び/又は少なくとも1個のアミノ酸残基がペプチドから欠失している及び/又は少なくとも1個のアミノ酸残基がペプチドに追加されている及び/又はペプチドの少なくとも1個のアミノ酸残基が修飾されているペプチドを意味する。アミノ酸残基のそのような追加、置換又は欠失は、ペプチドのアミノ末端及び/若しくはカルボキシ末端で並びに/又はポリペプチド配列内で生じることができる。

20

【0047】

用語「置換」は、天然配列における1個のアミノ酸の別のアミノ酸への変更を意味することを意図する。

30

【0048】

用語「欠失」は、天然配列からの1個又は複数個のアミノ酸の除去を意味することを意図する。

【0049】

用語「挿入」は、1個又は複数個のアミノ酸の天然配列への追加を意味することを意図する。

【0050】

用語「修飾」は、天然ペプチド配列における1個若しくは複数個のアミノ酸の側鎖又は1個若しくは複数個のアミノ酸のアルファ窒素原子に共有結合した変更を意味することを意図する。

40

【0051】

本発明の係るペプチドを説明するために单一の命名法を使用しており、例えば、[Gly4]-hPYy(4-36)は、ヒトPYy(hPYy)ID:配列番号2の類似体を指定し、この類似体では、4位で天然に存在するリシンがグリシンに置換されており、それぞれ1位、2位及び3位で天然に存在するチロシン、プロリン及びイソロイシンが欠失している。一態様では、標的ペプチドは、例えばヒト、マウス、ヒツジ、ヤギ、ウシ又はウマを含むの哺乳動物等の脊椎動物に由来し得る。用語「脊椎動物」は、魚類、両生類、爬虫類、鳥類及び哺乳動物を含む脊椎動物門の主要部門である脊椎動物亜門のメンバーを意味しており、このメンバーは全て、分割された脊柱と明確な高分化頭部とを特徴とする。用語「哺乳動物」はヒトを意味しており、更には哺乳綱において恒常性維持機構を持つ動物界の他の温血メンバー、例えば

50

コンパニオン哺乳動物、動物園の哺乳動物及び食料源としての哺乳動物も意味している。コンパニオン哺乳動物のいくつかの例は、イヌ科の動物(例えばイヌ)、ネコ科の動物(例えばネコ)及びウマであり、食料源としての哺乳動物のいくつかの例は、ブタ、ウシ、ヒツジ等である。一態様では、哺乳動物はヒト又はコンパニオン哺乳動物である。一態様では、哺乳動物は男性又は女性のヒトである。

【0052】

この系の更なる改良では、融合タンパク質はタグも含み、これにより、アフィニティ又は他のクロマトグラフィー法による、融合タンパク質、ひいてはペプチドの同定及び/又は精製が可能となる。好適なタグの例として、特定のキチン結合ドメイン又はこの一部、酸性アミノ酸又は塩基性アミノ酸の繰り返し、グルタチオントランスフェラーゼタグ、抗体により回収されるタグ、例えばFLAGタグ、HAタグ、MYSタグ、ビオチン又はストレプトアビシン及び固定化金属アフィニティクロマトグラフィー用の、少なくとも5個のヒスチジンを含む小ポリペプチド配列であるHisタグが挙げられる。精製タグには、国際公開第2006/108826号パンフレット及び国際公開第2008/043847号パンフレットで公開された国際特許出願に記載されている好熱性細菌に由来する高塩基性のリボソームタンパク質も含まれ得る。例えば、融合タンパク質は、インタクトな融合タンパク質のアフィニティ精製に使用することができる固定化金属イオンアフィニティクロマトグラフィーカラムに強固に結合するHisタグを含むことができる。

10

【0053】

一態様では、融合タンパク質は、精製タグ及び任意選択でプロテアーゼ部位を更に含み、これにより、アフィニティクロマトグラフィー又は他のクロマトグラフィー法による同定及び/又は精製が可能となる。一態様では、精製タグはアルカリ性である。一態様では、精製タグはヒスチジンタグを含む。一態様では、精製タグ及び任意選択でプロテアーゼ部位は、標的ペプチドのアミノ末端に位置している。

20

【0054】

商業規模で作用することができる任意の発現系が好適であるが、上記に記載のインテンンをベースとするベクターが大腸菌(*E. coli*)中で使用するために設計される。特定の発現系で最適に使用するために他のベクターを設計することができる。例えば、哺乳動物の発現系を選択した場合、タンパク質コード領域は、この特定の系のためにコドン使用頻度を最適化しなければならない。ペプチド融合タンパク質を発現させるために使用され得る発現系の例として、細菌{大腸菌、枯草菌(*B. subtilis*)等}、酵母{*S. cerevisiae*}、*P. pastoris*(*P. pastoris*)等}、昆虫細胞{*S. frugiperda*(*S. frugiperda*)}、哺乳動物発現系(チャイニーズハムスター卵巣、ベビーハムスター腎臓等)、乳又は他の体液(好ましくはブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ等)中におけるトランスジェニック哺乳動物発現系が挙げられる。大腸菌発現系の場合には、発現産物中に開始メチオニンが保持され得る。一例は、アミノ末端イソロイシンを有するPYY(3-36)であり、このPYY(3-36)は、大腸菌中の発現後にメチオニアミノペプチダーゼにより開始メチオニンが効果的に除去されることを予期されない。しかしながら、アミノ末端を標識、例えばプロテアーゼ部位を含む介在リンカーを有する精製タグに融合させることにより、標的ペプチドの天然アミノ末端を得ることができる。適切なプロテアーゼ{例えば、*alp*、エンテロキナーゼ若しくはヒトライノウイルス-14 3C(HRV14-3C)}又はペプチダーゼ{例えばジペプチジルアミノペプチダーゼ1(DAP1)}の使用による精製タグのその後の除去により、標的ペプチドの天然アミノ末端を生成する。或いは、臭化シアンと接触させることにより、開始メチオニンを化学的に除去することができる。

30

【0055】

一態様では、融合タンパク質を、細菌、酵母、哺乳動物細胞又はトランスジェニック哺乳動物の体液中で発現させる。一態様では、融合タンパク質を、細菌中で又は酵母中で発現させる。一態様では、融合タンパク質を細菌中で発現させる。一態様では、融合タンパク質を大腸菌中で発現させる。

40

【0056】

50

チオエステルは、ペプチド結合又は酸素-エステルと比較して相対的に反応性の化学基であり、従って緩やかな反応条件下でアミドに速やかに変換される。好ましい試薬はMESNAであるが、多くの他のメルカプト基(スルフヒドリル基、チオール基)含有試薬も効果的に機能することができる。放出されたMESNA-チオエステルは、(不要な遊離酸を不可逆的に生成する)水による加水分解に対して相対的に安定しており、アミド形成を促進する任意の化学条件での反応に適している。

【0057】

一態様では、本方法は、標的ペプチドの -チオエステルを生じる融合タンパク質のチオール誘導性開裂を含む。一態様では、本方法は、 -チオエステルの標的ペプチドの対応する -アミドへの変換を更に含む。一態様では、アミド化工程はアンモニウム求核剤の存在下で起こる。一態様では、アンモニウム求核剤を重炭酸アンモニウムの水溶液として供給する。

10

【0058】

一態様では、本発明は、配列番号10の[Gly4]-hPYY(4-36)を生産する方法であって、このペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、配列番号10の標的ペプチドと、配列番号20のインティンと、配列番号4の精製タグと、配列番号8のプロテアーゼ部位とを含み、前記インティン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグ及びプロテアーゼ部位は標的ペプチドのアミノ末端に位置している、方法を提供する。

20

【0059】

一態様では、本発明は、配列番号11のhPYY(3-36)を生産する方法であって、このペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、配列番号11の標的ペプチドと、配列番号20のインティンと、配列番号5の精製タグと、配列番号9のプロテアーゼ部位とを含み、前記インティン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグ及びプロテアーゼ部位は標的ペプチドのアミノ末端に位置している、方法を提供する。

20

【0060】

一態様では、本発明は、配列番号12のh-CGRPを生産する方法であって、このペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、配列番号12の標的ペプチドと、配列番号20のインティンと、配列番号5の精製タグと、配列番号9のプロテアーゼ部位とを含み、前記インティン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグ及びプロテアーゼ部位は標的ペプチドのアミノ末端に位置している、方法を提供する。

30

【0061】

一態様では、本発明は、配列番号14のhPPを生産する方法であって、このペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、配列番号14の標的ペプチドと、配列番号20のインティンと、配列番号5の精製タグと、配列番号9のプロテアーゼ部位とを含み、前記インティン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグ及びプロテアーゼ部位は標的ペプチドのアミノ末端に位置している、方法を提供する。

40

【0062】

一態様では、本発明は、配列番号15の[Arg4, Gln18, Lys30]-hPYY(3-36)を生産する方法であって、このペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、配列番号15の標的ペプチドと、配列番号20のインティンと、配列番号6の精製タグとを含み、前記インティン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグは標的ペプチドのアミノ末端に位置している、方法を提供する。

【0063】

一態様では、本発明は、配列番号16の[Asp14, Arg17, Pro21, Pro27, Arg35]-hアミリンを生産する方法であって、このペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、配列番号16の標的ペプチドと、配列番号20のインティン

50

と、配列番号7の精製タグとを含み、前記インテイン配列は標的ペプチドのアミノ末端に位置しており、前記精製タグは標的ペプチドのカルボキシ末端に位置している、方法を提供する。

【0064】

リーダー配列、コドン利用、インテイン又はこの変異体及び精製戦略の適切な選択により、これらの系のうちのいずれか及び細胞内又は細胞外生産に発現を最適化することができる。当業者は、本発明は任意の特定の標的ペプチド又は供給源としての任意の種に拘束されないことを理解するであろう。

【0065】

本発明の実施形態

10

下記は本発明の非限定的な実施形態である。

1. ペプチドを生産する方法であって、ペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、標的ペプチドとインテインとを含み、前記インテインは、サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインテイン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン変異を有する、方法。

2. 前記インテインはGyrAインテインである、実施形態1に記載の方法。

3. 前記インテインはMxe GyrAインテインである、実施形態1又は2に記載の方法。

4. 前記インテインは、Mxe GyrAインテイン(配列番号1)の残基107～164又は該残基107～164の一部の切除によりサイズが最小化されるMxe GyrAインテインである、実施形態1から3のいずれか一つに記載の方法。

20

5. 前記インテインは、Mxe GyrAインテイン(配列番号1)の残基107～164又は該残基107～164の一部の切除によりサイズが最小化されるMxe GyrAインテインであり、切除された残基は、1～10個のアミノ酸を含むリンカーに置き換えられる、実施形態1から4のいずれか一つに記載の方法。

6. 前記インテインは、Mxe GyrAインテイン(配列番号1)の残基107～164又は該残基107～164の一部の切除によりサイズが最小化されるMxe GyrAインテインであり、切除された残基は、6～10個のアミノ酸を含むリンカーに置き換えられ、リンカーのアミノ酸のうちの少なくとも6個はグリシン及び/又はセリンである、実施形態1から5のいずれか一つに記載の方法。

30

7. 前記インテインは、Mxe GyrAインテイン(配列番号1)の残基107～164の切除によりサイズが最小化されるMxe GyrAインテインであり、切除された残基は、配列GSGSGSGSのリンカーに置き換えられる、実施形態1から6のいずれか一つに記載の方法。

8. 前記インテインの配列は配列番号20である、実施形態1から7のいずれか一つに記載の方法。

9. 前記インテイン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置する、実施形態1から8のいずれか一つに記載の方法。

10. 標的ペプチドは、糖尿病又は肥満の調節に関与するペプチドホルモンである、実施形態1から9のいずれか一つに記載の方法。

11. 標的ペプチドは、糖尿病の調節に関与するペプチドホルモンである、実施形態1から10のいずれか一つに記載の方法。

40

12. 標的ペプチドは、肥満の調節に関与するペプチドホルモンである、実施形態1から11のいずれか一つに記載の方法。

13. 標的ペプチドは -アミド化ペプチドである、実施形態1から12のいずれか一つに記載の方法。

14. 標的ペプチドの内因型は -アミド化ペプチドである、実施形態1から13のいずれか一つに記載の方法。

15. 標的ペプチドは、カルボキシ末端がバイオコンジュゲートされたペプチドである、実施形態1から14のいずれか一つに記載の方法。

16. 標的ペプチドは、PYY、PP、 -CGRP、CT及びアミリン又はこれらの類似体から選択される、実施形態1から15のいずれか一つに記載の方法。

50

17. 標的ペプチドは、PYY、PP、 α -CGRP及びアミリン又はこれらの類似体から選択される、実施形態1から16のいずれか一つに記載の方法。

18. 標的ペプチドはPYY又はこの類似体である、実施形態1から17のいずれか一つに記載の方法。

19. 標的ペプチドはhPYY又はこの類似体である、実施形態1から18のいずれか一つに記載の方法。

20. 標的ペプチドは[Gly4]-PYY(4-36)である、実施形態1から19のいずれか一つに記載の方法。 10

21. 標的ペプチドは[Gly4]-hPYY(4-36)である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の方法。

22. 標的ペプチドはPYY(3-36)である、実施形態1から21のいずれか一つに記載の方法。

23. 標的ペプチドはhPYY(3-36)である、実施形態1から22のいずれか一つに記載の方法。

24. 標的ペプチドは[Arg4, Gln18, Lys30]-PYY(3-36)である、実施形態1から23のいずれか一つに記載の方法。

25. 標的ペプチドは[Arg4, Gln18, Lys30]-hPYY(3-36)である、実施形態1から24のいずれか一つに記載の方法。

26. 標的ペプチドは α -CGRP又はこの類似体である、実施形態1から25のいずれか一つに記載の方法。 20

27. 標的ペプチドは α -CGRPである、実施形態1から26のいずれか一つに記載の方法。

28. 標的ペプチドはh α -CGRPである、実施形態1から27のいずれか一つに記載の方法。

29. 標的ペプチドはCT又はこの類似体である、実施形態1から28のいずれか一つに記載の方法。

30. 標的ペプチドはCTである、実施形態1から29のいずれか一つに記載の方法。

31. 標的ペプチドはhCTである、実施形態1から30のいずれか一つに記載の方法。

32. 標的ペプチドはPP又はこの類似体である、実施形態1から31のいずれか一つに記載の方法。

33. 標的ペプチドはPPである、実施形態1から32のいずれか一つに記載の方法。

34. 標的ペプチドはhPPである、実施形態1から33のいずれか一つに記載の方法。

35. 標的ペプチドはアミリン又はこの類似体である、実施形態1から34のいずれか一つに記載の方法。 30

36. 標的ペプチドはhアミリン又はこの類似体である、実施形態1から35のいずれか一つに記載の方法。

37. 標的ペプチドは[Asp14, Arg17, Pro21, Pro27, Arg35]-アミリンである、実施形態1から36のいずれか一つに記載の方法。

38. 標的ペプチドは[Asp14, Arg17, Pro21, Pro27, Arg35]-hアミリンである、実施形態1から37のいずれか一つに記載の方法。

39. 融合タンパク質は精製タグ及び任意選択でプロテアーゼ部位を更に含み、これにより、アフィニティ又は他のクロマトグラフィー法による同定及び/又は精製が可能となる、実施形態1から38のいずれか一つに記載の方法。

40. 精製タグはアルカリ性である、実施形態39に記載の方法。 40

41. 精製タグはヒスチジンタグを含む、実施形態39に記載の方法。

42. 精製タグ及び任意選択でプロテアーゼ部位は標的ペプチドのアミノ末端に位置する、実施形態39から41のいずれか一つに記載の方法。

43. 精製タグを適切なプロテアーゼで切断して標的ペプチドを生成することができる、実施形態39から42のいずれか一つに記載の方法。

44. 融合タンパク質を細菌、酵母、哺乳動物細胞又はトランスジェニック哺乳動物の体液中で発現させる、実施形態1から43のいずれか一つに記載の方法。

45. 融合タンパク質を細菌中で又は酵母中で発現させる、実施形態1から44のいずれか一つに記載の方法。

46. 融合タンパク質を細菌中で発現させる、実施形態1から45のいずれか一つに記載の方 50

法。

47. 融合タンパク質を大腸菌中で発現させる、実施形態1から46のいずれか一つに記載の方法。

48. 標的ペプチドの -チオエステルを生じる融合タンパク質のチオール誘導性開裂を更に含む実施形態1から47のいずれか一つに記載の方法。

49. 標的ペプチドの -チオエステルの、対応する -アミドへの変換を更に含む実施形態48に記載の方法。

50. アミド化工程がアンモニウム求核剤の存在下で生じる、実施形態49に記載の方法。

51. アンモニウム求核剤は重炭酸アンモニウムである、実施形態50に記載の方法。

52. -アミド化ペプチドを生産する方法であって、ペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、標的ペプチドと配列番号20のインティエンとを含む、方法。10

53. 前記インティエン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置する、実施形態52に記載の方法。

54. 融合タンパク質は、精製タグと任意選択でプロテアーゼ部位とを更に含み、これにより、アフィニティ又は他のクロマトグラフィー法による同定及び/又は精製が可能となる、実施形態52又は53に記載の方法。

55. 精製タグはヒスチジンタグを含む、実施形態54に記載の方法。

56. 精製タグはアルカリ性タグを含む、実施形態55に記載の方法。

57. 精製タグ及び任意選択でプロテアーゼ部位は標的ペプチドのアミノ末端に位置する、実施形態54から56のいずれか一つに記載の方法。20

58. 精製タグを適切なプロテアーゼで切断して標的ペプチドを生成することができる、実施形態54から57のいずれか一つに記載の方法。

59. 融合タンパク質を細菌、酵母、哺乳動物細胞又はトランスジェニック哺乳動物の体液中で発現させる、実施形態52から58のいずれか一つに記載の方法。

60. 融合タンパク質を細菌中で又は酵母中で発現させる、実施形態59に記載の方法。

61. 融合タンパク質を細菌中で発現させる、実施形態59に記載の方法。

62. 融合タンパク質を大腸菌中で発現させる、実施形態59に記載の方法。

63. [Gly4]-hPYY(4-36)を生産する方法であって、このペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、配列番号10の標的ペプチドと、配列番号20のインティエンと、配列番号4の精製タグと、配列番号8のプロテアーゼ部位とを含み、前記インティエン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグ及びプロテアーゼ部位は標的ペプチドのアミノ末端に位置している、方法。30

64. hPYY(3-36)を生産する方法であって、このペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、配列番号11の標的ペプチドと、配列番号20のインティエンと、配列番号5の精製タグと、配列番号9のプロテアーゼ部位とを含み、前記インティエン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグ及びプロテアーゼ部位は標的ペプチドのアミノ末端に位置している、方法。

65. h-CGRPを生産する方法であって、このペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、配列番号12の標的ペプチドと、配列番号20のインティエンと、配列番号5の精製タグと、配列番号9のプロテアーゼ部位とを含み、前記インティエン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグ及びプロテアーゼ部位は標的ペプチドのアミノ末端に位置している、方法。40

66. hPPを生産する方法であって、このペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、配列番号14の標的ペプチドと、配列番号20のインティエンと、配列番号5の精製タグと、配列番号9のプロテアーゼ部位とを含み、前記インティエン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグ及びプロテアーゼ部位は標的ペプチドのアミノ末端に位置している、方法。

67. [Arg4, Gln18, Lys30]-hPYY(3-36)を生産する方法であって、このペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、配列番号15の標的50

ペプチドと、配列番号20のインティインと、配列番号6の精製タグとを含み、前記インティイン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグは標的ペプチドのアミノ末端に位置している、方法。

68.[Asp14, Arg17, Pro21, Pro27, Arg35]-hアミリンを生産する方法であって、このペプチドを融合タンパク質の一部として発現させる工程を含み、前記融合タンパク質は、配列番号16の標的ペプチドと、配列番号20のインティインと、配列番号7の精製タグとを含み、前記インティイン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグは標的ペプチドのアミノ末端に位置している、方法。

69.標的ペプチドとインティインとを含む融合タンパク質であって、前記インティインは、サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインティイン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン変異を有する、融合タンパク質。 10

70.前記インティインはGyrAインティインである、実施形態69に記載の融合タンパク質。

71.前記インティインはMxe GyrAインティインである、実施形態70に記載の融合タンパク質。
。

72.前記インティインは、Mxe GyrAインティイン(配列番号1)の残基107～164又は該残基107～164の切除によりサイズが最小化されるMxe GyrAインティインであり、切除された残基は配列GSGSGSGSのリンカーに置き換えられる、実施形態71に記載の融合タンパク質。

73.前記インティインは、Mxe GyrAインティイン(配列番号1)の残基107～160の切除によりサイズが最小化されるMxe GyrAインティインであり、切除された残基は配列GSGSGSGSのリンカーに置き換えられる、実施形態72に記載の融合タンパク質。 20

74.前記インティインの配列は配列番号20である、実施形態73に記載の融合タンパク質。

75.前記インティイン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置している、実施形態69から74のいずれか一つに記載の融合タンパク質。

76.標的ペプチドは、糖尿病又は肥満の調節に関与するペプチドホルモンである、実施形態69から75のいずれか一つに記載の融合タンパク質。

77.標的ペプチドは、糖尿病の調節に関与するペプチドホルモンである、実施形態69から76のいずれか一つに記載の融合タンパク質。

78.標的ペプチドは、肥満の調節に関与するペプチドホルモンである、実施形態69から76のいずれか一つに記載の融合タンパク質。

79.標的ペプチドは -アミド化ペプチドである、実施形態69から78のいずれか一つに記載の融合タンパク質。 30

80.標的ペプチドの内因型は -アミド化ペプチドである、実施形態69から78のいずれか一つに記載の融合タンパク質。

81.標的ペプチドは、カルボキシ末端がバイオコンジュゲートされたペプチドである、実施形態69から78のいずれか一つに記載の融合タンパク質。

82.標的ペプチドは、PYY、PP、 -CGRP及びアミリン又はこれらの類似体から選択される、実施形態69から78のいずれか一つに記載の融合タンパク質。

83.標的ペプチドはPYY又はこの類似体である、実施形態82に記載の融合タンパク質。

84.標的ペプチドはhPYY又はこの類似体である、実施形態83に記載の融合タンパク質。

85.標的ペプチドは[Gly4]-PYY(4-36)である、実施形態83に記載の融合タンパク質。 40

86.標的ペプチドは[Gly4]-hPYY(4-36)である、実施形態83に記載の融合タンパク質。

87.標的ペプチドはPYY(3-36)である、実施形態83に記載の融合タンパク質。

88.標的ペプチドはhPYY(3-36)である、実施形態83に記載の融合タンパク質。

89.標的ペプチドは[Arg4, Gln18, Lys30]-PYY(3-36)である、実施形態83に記載の融合タンパク質。

90.標的ペプチドは[Arg4, Gln18, Lys30]-hPYY(3-36)である、実施形態83に記載の融合タンパク質。

91.標的ペプチドは -CGRP又はこの類似体である、実施形態82に記載の融合タンパク質。
。

92.標的ペプチドは -CGRPである、実施形態91に記載の融合タンパク質。 50

93. 標的ペプチドはh-CGRPである、実施形態91に記載の融合タンパク質。
94. 標的ペプチドはCT又はこの類似体である、実施形態82に記載の融合タンパク質。
95. 標的ペプチドはCTである、実施形態94に記載の融合タンパク質。
96. 標的ペプチドはhCTである、実施形態94に記載の融合タンパク質。
97. 標的ペプチドはPP又はこの類似体である、実施形態82に記載の融合タンパク質。
98. 標的ペプチドはPPである、実施形態97に記載の融合タンパク質。
99. 標的ペプチドはhPPである、実施形態97に記載の融合タンパク質。
100. 標的ペプチドはアミリン又はこの類似体である、実施形態82に記載の融合タンパク質。
101. 標的ペプチドは[Asp14, Arg17, Pro21, Pro27, Arg35]-アミリンである、実施形態100に記載の融合タンパク質。 10
102. 標的ペプチドは[Asp14, Arg17, Pro21, Pro27, Arg35]-hアミリンである、実施形態100に記載の融合タンパク質。
103. 精製タグ及び任意選択でプロテアーゼ部位を更に含み、これにより、アフィニティ又は他のクロマトグラフィー法による同定及び/又は精製が可能となる、実施形態69～102のいずれか一つに記載の融合タンパク質。
104. 精製タグはアルカリ性である、実施形態103に記載の融合タンパク質。
105. 精製タグはヒスチジンタグを含む、実施形態104に記載の融合タンパク質。
106. 精製タグ及び任意選択でプロテアーゼ部位は標的ペプチドのアミノ末端に位置する、実施形態103から105のいずれか一つに記載の融合タンパク質。 20
107. 精製タグを適切なプロテアーゼで切断して標的ペプチドを生成することができる、実施形態103から106のいずれか一つに記載の融合タンパク質。
108. 配列番号10の標的ペプチドと、配列番号20のインティインと、配列番号4の精製タグと、配列番号8のプロテアーゼ部位とを含む融合タンパク質であって、前記インティイン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグ及びプロテアーゼ部位は標的ペプチドのアミノ末端に位置している、融合タンパク質。
109. 配列番号11の標的ペプチドと、配列番号20のインティインと、配列番号5の精製タグと、配列番号9のプロテアーゼ部位とを含む融合タンパク質であって、前記インティイン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグ及びプロテアーゼ部位は標的ペプチドのアミノ末端に位置している、融合タンパク質。 30
110. 配列番号12の標的ペプチドと、配列番号20のインティインと、配列番号5の精製タグと、配列番号9のプロテアーゼ部位とを含む融合タンパク質であって、前記インティイン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグ及びプロテアーゼ部位は標的ペプチドのアミノ末端に位置している、融合タンパク質。
111. 配列番号14の標的ペプチドと、配列番号20のインティインと、配列番号5の精製タグと、配列番号9のプロテアーゼ部位とを含む融合タンパク質であって、前記インティイン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグ及びプロテアーゼ部位は標的ペプチドのアミノ末端に位置している、融合タンパク質。
112. 配列番号15の標的ペプチドと、配列番号20のインティインと、配列番号6の精製タグとを含む融合タンパク質であって、前記インティイン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグは標的ペプチドのアミノ末端に位置している、融合タンパク質。 40
113. 配列番号16の標的ペプチドと、配列番号20のインティインと、配列番号7の精製タグとを含む融合タンパク質であって、前記インティイン配列は標的ペプチドのカルボキシ末端に位置しており、前記精製タグは標的ペプチドのアミノ末端に位置している、融合タンパク質。
114. サイズが最小化され、アラインメントによりMxe GyrAインティイン(配列番号1)の3位に対応する位置にシステイン変異を有するインティイン。
115. 前記インティインはGyrAインティインである、実施形態114に記載のインティイン。
116. 前記インティインはMxe GyrAインティインである、実施形態115に記載のインティイン。 50

117. 前記インテインは、Mxe GyrAインテイン(配列番号1)の残基107～164又は該残基107～164の一部の切除によりサイズが最小化されるMxe GyrAインテインであり、削除された残基は、配列GSGSGSGSのリンカーに置き換えられる、実施形態116に記載のインテイン。

118. 前記インテインは、Mxe GyrAインテイン(配列番号1)の残基107～160の切除によりサイズが最小化されるMxe GyrAインテインであり、切除された残基は配列GSGSGSGSのリンカーに置き換えられる、実施形態117に記載のインテイン。

119. 前記インテインの配列は配列番号20である、実施形態118に記載のインテイン。

120. 配列番号20のインテイン。

121. 実施形態69から113のいずれか一つに記載の融合タンパク質をコードするDNA構築物。
。

10

122. ベクターの形態である実施形態121に記載のDNA構築物。

【実施例】

【0066】

本発明の実施例は、PYY、PP、アミリン、CT及び^α-CGRPのヒトバリアントhPYY、hPP、hアミリン、hCT及び^α-CGRPをベースとする。天然インテインと称されるMxe GyrAインテインバリアント(配列番号17)はN198A変異を有しており、該Mxe GyrAインテインバリアントの生来の自己スプライシング機能が無力化されており、Mxe GyrAインテインバリアントは分子間のチオール誘導性開裂の影響を受けやすい。合計で35種のベクターを含む7組のプラスミドを設計した{Table 1(表1)}。

【0067】

20

【表1】

Table 1. 実施例で言及される各番号が付された融合タンパク質のリスト

タンパク質番号	プラスミド番号	N末端タグ	プロテアーゼ部位	標的ペプチド	インテイン
1A	p1A	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号17
1B	p1B	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号19
1C	p1C	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号20
1D	p1D	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号18
1E	p1E	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号21
1F	p1F	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号22
1G	p1G	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号23
1H	p1H	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号24
1I	p1I	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号25
1J	p1J	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号26
1K	p1K	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号27
1L	p1L	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号28
1M	p1M	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号29
1N	p1N	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号30
1O	p1O	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号31
1P	p1P	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号32
1Q	p1Q	配列番号4	配列番号8	配列番号10	配列番号33
2A	p2A	配列番号5	配列番号9	配列番号11	配列番号17
2B	p2B	配列番号5	配列番号9	配列番号11	配列番号19
2C	p2C	配列番号5	配列番号9	配列番号11	配列番号20
3A	p3A	配列番号5	配列番号9	配列番号12	配列番号17
3B	p3B	配列番号5	配列番号9	配列番号12	配列番号19
3C	p3C	配列番号5	配列番号9	配列番号12	配列番号20
4A	p4A	配列番号5	配列番号9	配列番号13	配列番号17
4B	p4B	配列番号5	配列番号9	配列番号13	配列番号19
4C	p4C	配列番号5	配列番号9	配列番号13	配列番号20
5A	p5A	配列番号5	配列番号9	配列番号14	配列番号17
5B	p5B	配列番号5	配列番号9	配列番号14	配列番号19
5C	p5C	配列番号5	配列番号9	配列番号14	配列番号20
6A	p6A	配列番号6		配列番号15	配列番号17
6B	p6B	配列番号6		配列番号15	配列番号19
6C	p6C	配列番号6		配列番号15	配列番号20
7A	p7A	配列番号7		配列番号16	配列番号17
7B	p7B	配列番号7		配列番号16	配列番号19
7C	p7C	配列番号7		配列番号16	配列番号20

【0068】

材料及び方法

略語のリスト

Amp アンピシリン

E. coli 大腸菌

GyrA マイコバクテリウム・ゼノビ由来のDNA GyraseAインテイン

h -CGRP ヒト -カルシトニン遺伝子関連ペプチド

10

20

30

40

50

hアミリン ヒトアミリン
 hCT ヒトカルシトニン
 HPLC 高速液体クロマトグラフィー
 hPP ヒト胰臓ペプチド
 hPYY ヒトペプチドYY
 IB 封入体
 IPTG イソプロピル -D-1-チオガラクトピラノシド
 LB ルリア-ベルターニ
 LC-MS 液体クロマトグラフィー質量分析
 MESNa 2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム
¹⁰
 OD₆₀₀ 600nmでの光学密度
 RP-UPLC 逆相超高速液体クロマトグラフィー
 SDS-PAGE ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動
 TAP 熱安定性のアルカリ性タンパク質
 TFA トリフルオロ酢酸
 T. Maritima サーモトガ.マリティマ

【0069】

融合タンパク質の一般的な調製方法

構築物のクローニング:

プラスミドは、Xhol/BamHI制限酵素部位、NheI/BamHI制限酵素部位若しくはNheI/NsiI制限酵素部位とT4 DNAリガーゼ(New England BioLabs社、マサチューセッツ州、イプスウィッヂ)とを製造業者により説明される方法により使用する、Geneart社(ドイツ、レーベンスブルク)から得た合成遺伝子断片のpET11aベクター(Novagen社)中へのクローニングにより生成し、又はサブクローニングしたベクターとしてGeneart社から提供された。いずれの場合も、融合タンパク質をコードする遺伝子は、E. coli中での発現にコドン最適化されていた。このプラスミドのベクターマップを図1に例示する。

【0070】

このプラスミドを使用してコンピテントTOP10(Invitrogen社)E. coli細胞を形質転換させ、100 μg/mlのアンピシリンを含むLB培地寒天プレート上で一晩インキュベートした。目的の各タンパク質をコードするプラスミドを、液体のLB/Amp(100 μg/mlのアンピシリン)培地及び標準的なミニプレッピングでのプラスミド増殖後の陽性クローンから得た。スクレオチド配列の正確性を、T7プロモーター/ターミネーター配列特異的プライマーを使用するDNAシークエンシング(Eurofins MWG Operon社、ドイツ、エーバースベルクにより行われる)により検証した。

【0071】

振とうフラスコ中での融合タンパク質の発現:

プラスミドをE. coli発現株BL21(DE3)中に形質転換させ、この発現株をLB/Ampプレート上に蒔いて37℃で一晩インキュベートした。振とうフラスコを使用して、LB/Amp培地中において37℃で、適切なプラスミドを含むBL21(DE3)細胞を0.4~0.6のOD₆₀₀まで増殖させた。この細胞を、37℃で3時間にわたり0.5mMのIPTGで誘導した。誘導後に、遠心分離(4000×g、4℃、15分、Heraeus Multifuge 3 S-R、DJB Labcare社、イギリス、ニューポートパグネル)により細胞を回収した。25mMのリン酸ナトリウムpH5バッファー中における超音波処理(氷上で実施した20分にわたる15秒オン及びオフのパルスでの40%パワー、Bandelin Sonopuls、Buch og Holm社)により、回収した細胞を溶解させた。不溶性タンパク質を沈降させ(4000×g、4℃、15分)、細胞溶解物をデカンテーションした。

【0072】

SDS-PAGE分析:

誘導した細胞及び誘導していない細胞を含み、(25mMのリン酸ナトリウムpH5バッファーを含むバッファー中の超音波処理及び遠心分離により得た)誘導した細胞の可溶性画分及び不溶性画分も更に含む試料バッファー(BioRad XT試料バッファー+4mMのTCEP)中にあ

10

20

30

40

50

ける溶解物試料のクマシ染色SDS-PAGE分析を実行した。ImageJを使用するSDS-PAGEゲルの濃度測定分析により、融合タンパク質及びインテインのバンド強度を推測した。

【0073】

検出及び特性評価の一般的な方法

UPLC法A: 融合タンパク質の定量化

Acuity UPLCシステム(Waters社)及び参照Std1(精製した融合タンパク質1B、0.169mg/ml)を使用するRP-UPLCにより、融合タンパク質のタンパク質濃度を定量化した。Acuity UPLC BEH300 C4(1.7um、2.1×100mm、1.7 μm)(Waters社)カラムと、下記のようにして214nm検出を行う、0.4ml/分及び40 °Cのカラム温度での0.1%のTFA水(溶出液A)及びアセトニトリル中の0.08%のTFA(溶出液B)を使用するグラジエント溶出とを使用して試料を分析した：

【0074】

【表2】

時間(分)	溶出液B %
0	20
5	20
20	60
20.5	99
23	99
23.1	20
26	20

【0075】

試料のセットを、システムを調節するためのStd 1の単回注入で開始し、試料の較正のためのStd 1の2回注入で終了した。

【0076】

UPLC法B: チオール誘導性開裂の分析

融合タンパク質の開裂反応から回収したアリコートを、Acuity UPLC System(Waters社)と、BEH C18(2.1×5mm 1.7 μm、Waters社)van guard(商標)プレカラムに接続したAcuity UPLC BEHC18(2.1×150mmカラム、1.7 μm、Waters社)カラムとを使用するRP-UPLCにより分析した。214nm検出を行う、0.4ml/分及び50 °Cのカラム温度での0.1%のTFA水(溶出液A)及びアセトニトリル中の0.08%のTFA(溶出液B)を使用する二段階グラジエント溶出を下記のように適用した：

【0077】

【表3】

時間(分)	溶出液B %
0	28
2	28
12	33
23	53
23.1	99
24.9	99
25	28
27	28

【0078】

UPLC法C: ペプチド -チオエステルの定量化

Acuity UPLC System(Waters社)及び参照Std2{融合タンパク質1Aの精製ペプチド -チオエ斯特ル、(0.144mg/ml)}を使用するRP-UPLCにより、 -チオエ斯特ルの濃度を定量化

10

20

30

40

50

した。BEHC18(2.1×5mm 1.7 μm、Waters社)van guard(商標)プレカラムに接続したAcuity UPLC BEHC18(2.1×150mmカラム、1.7 μm、Waters社)カラムを適用した。214nm検出を行う、0.4ml/分及び50 °Cのカラム温度での0.1%のTFA水(溶出液A)及びアセトニトリル中の0.08%のTFA(溶出液B)の直線グラジエント溶出を下記のように使用した：

【0079】

【表4】

時間(分)	溶出液 B %
0	28
2	28
12	33
12.1	90
13.5	28
15.0	28

10

【0080】

試料のセットを、試料の較正のためのStd 2の2回注入で終了した。

【0081】

LC-MS分析A: 融合タンパク質及びインテインの特性評価

20

Zorbax 300SB-C18高感度分割(2.1×50mm、3.5 μm、Agilent Technologies社)カラムを使用するLC-MSD-TOF(Agilent Technologies社)機器と40 °Cのカラム温度とを使用するLC-MS分析により、融合タンパク質及び開裂混合物の特性評価を実施した。MSイオン化モードを陽イオンにセットした。100 ~ 3000amuをスキャンした。0.3ml/分のフロー及び214nmで検出する、水中の0.1%のギ酸(溶出液A)及びアセトニトリル中の0.1%のギ酸(溶出液B)における8.8mMのギ酸アンモニウムの直線グラジエントを下記のように使用した：

【0082】

【表5】

時間(分)	溶出液 B %
0	18
2	18
3	25
13	65
13.1	90
17	90
17.1	18
20	18

30

【0083】

LC-MS分析B: 酵素的開裂の分析

40

LC-MSD-TOF(Agilent Technologies社)機器とカラム温度が40 °CであるZorbax 300SB-C18高感度分割(2.1×50mm、3.5 μm、Agilent Technologies社)カラムとを使用するLC-MS分析により、精製タグを除去するためのタンパク質分解酵素による酵素的消化を分析した。MSイオン化モードを陽イオンにセットした。100 ~ 3000amuをスキャンした。0.3ml/分のフロー及び214nmで検出する、水中の0.1%のギ酸(溶出液A)及びアセトニトリル中の0.1%のギ酸(溶出液B)における8.8mMのギ酸アンモニウムの直線グラジエントを下記のように使用した：

【0084】

【表6】

時間(分)	溶出液B%
0	5
3	5
18	70
18.1	90
22	90
22.1	5
25	5

10

【0085】

(実施例1)

操作されたインテインの活性の測定

目的は、サイズが最小化される及びT3Cを有する機能性Mxe GyrAインテインを生成することであった。この目的を達成するために、それぞれが異なるMxe GyrAインテインバリアントを有する17種の融合タンパク質のセットを生成し、これらのチオール誘導性開裂反応の速度定数を、インテイン活性の尺度として使用した。

【0086】

17種全ての融合タンパク質{タンパク質1A～1Q、Table 1(表1)}は、プロテアーゼ部位を介するアミノ末端伸長とカルボキシ末端Mxe GyrAインテインバリアントとの間で融合した標的ペプチド[Gly4]-hPYY(4-36)(配列番号10)を含んだ。アミノ末端伸長は、カチオン交換クロマトグラフィーによる精製を可能とする、サーモトガ・マリティマ(*Thermotoga maritima*)由来のリボソームタンパク質L27のバリアント(RL27tm、配列番号4)であった。プロテアーゼ部位(配列番号8)は、HRV14-3Cプロテアーゼに認識される及びアミノ末端伸長の除去を可能とするEVLFQ配列を含んだ。タンパク質1Aは天然Mxe GyrAインテインバリアントを含み、タンパク質1Dは[Cys3]-Mxe GyrAインテインバリアントを含み、タンパク質1B及びタンパク質1E～1Sは、最小化されたMxe GyrAインテインバリアントを含み、タンパク質1Cは、T3C変異を有する、最小化されたMxe GyrAインテインバリアントを含んだ。最小化されたインテインは、アミノ末端スプライシング領域とカルボキシ末端スプライシング領域との間に、除去される又は小型リンカーに置換される46～57個のアミノ酸を有した{Table 2(表7)}。より具体的には、除去される領域はMxe GyrAインテインの残基103～164の一部で構成されており、結晶構造(Klabunde T. (1998) *Nature Structural Biology*、5、31～36頁)によれば、カルボキシ末端スプライシング領域の -ストランド9及び -ストランド10の間に位置している。検討したリンカーとして、Mxe GyrAインテインのN末端スプライシングドメインの -ストランド4及び -ストランド5を連結するLDRHGN配列、リンカーデータベースからの -ヘリカルADNLALAリンカー配列(George RA. 及びHeringa J. (2002) *Protein Engineering*、15、871～879頁)、ドロソフィラ・メラノガスター(*Drosophila melanogaster*)のヘッジホッギタンパク質の -ストランド9及び -ストランド10を連結するRDVETGEリンカー(Hiraga, K. 等(2005) *J. Mol. Biol.* 354、916～926頁で説明されている)並びにフレキシブルGSGSGSGSリンカーが挙げられる。

20

30

40

【0087】

【表7】

Table 2. インティンバリアントとそれぞれの欠失サイズ、リンカー及び変異のリスト

タンパク質番号	配列番号	欠失部位 ^a		リンカー	変異	サイズ(残基数)
		N末端	C末端			
1A	17					198
1B	19	Gln106	Phe161	GSGSGSGS		152
1C	20	Gln106	Phe161	GSGSGSGS	T3C	152
1D	18				T3C	198
1E	21	Ser111	Asp158			152
1F	22	Gln106	Phe161			144
1G	23	Ser111	Asp158	LDRHGN		158
1H	24	Gln106	Phe161	LDRHGN		150
1I	25	Gln106	Phe161	RDVETGE		151
1J	26	Gln106	Phe161	ADNLALA		151
1K	27	Gln106	Phe161	GRGSGRGS		152
1L	28	Ile105	Phe161	GSGSGSGS		151
1M	29	Val104	Phe161	GSGSGSGS		150
1N	30	Ala103	Phe161	GSGSGSGS		149
1O	31	Gln106	Tyr162	GSGSGSGS		151
1P	32	Gln106	Tyr163	GSGSGSGS		150
1Q	33	Gln106	Ala164	GSGSGSGS		149

^a両方の残基がトランケート型インティンバリアントの一部として残存する。

10

20

30

40

50

【0088】

融合タンパク質のチオール誘導性開裂:

融合タンパク質1A~1Qを、一般的な方法で説明したように、200mLのLB培地が入った振とうフラスコ中で発現させた。不溶性タンパク質をMQで2回洗浄し、より小さい画分に分けて-20℃で保存した。不溶性タンパク質ペレットを可溶化バッファー[100mMのリン酸ナトリウム、pH7.5、5Mの尿素]中で再懸濁させ、1時間にわたり氷上でインキュベートし、その後濾過した(0.45μm)。RP-UPLC法Aによりタンパク質濃度を決定し、その後、可溶化バッファーで0.6mg/mlの最終濃度に希釈した。タンパク質溶液のアリコート(325μL)を485μLの水性希釈バッファーA[100mMのリン酸ナトリウム、pH7.5、250mMのNaCl]と190μLのバッファーB[100mMのリン酸ナトリウム、pH7.5、2Mの尿素、150mMのNaCl]との混合物中の希釈によりリフォールドさせ、100mMのリン酸ナトリウム、pH7.5、2Mの尿素、150mMのNaCl中に0.2mg/mlのタンパク質という最終濃度を得た。バッファーB中の2Mのストックからの100mMへのMESNaの添加により開裂を誘導した。攪拌(300rpm)しつつ一晩にわたりエッペンドルフチューブ中において5℃で反応させた。アリコートを経時に回収し、6Mの塩酸グアニジン中の1.7%のHClの1容積で約pH3までクエンチさせ、RP-UPLC法Bにより分析すると共にLC-MS法Aにより特性評価した。決定を3回実施し、生成物生成を面積 - チオエステル生成物/(面積 - チオエステル生成物 + 面積タンパク質){式中、 - チオエステル生成物は、アミノ末端にタグが付けられた[Gly4]-PYY(4-36) - チオエステルであり、タンパク質は融合タンパク質である}として算出した。生成物生成を時間の関数としてプロットした。著しく過剰なモル濃度でMESNaを使用することにより擬一次反応を達成させ、データを方程式P=P₀(1-e^{-kt}){式中、Pは、生成されたペプチド - チオエステル生成物の時間tでのパーセンテージであり、P₀は、得たペプチド - チオエステル生成物の最大パーセンテージであり、kは、GraphPad Prism 5.01(GraphPad Software社、カリフォルニア州、ラホヤ)を使用して観測した速度である}に当てはめることにより、速度定数(k_{obs})を決定した。

【0089】

1.1. 機能性の最小化されたインテインの活性の測定:

最初に、Mxe GyrAインテインを、そのサイズに関して最適化した。トランケート型インテインバリアントでは、Mxe GyrAインテイン配列のAla103とAla164との間の46個の残基(全インテインサイズの23%に対応する)が最低限除去されている。タンパク質1Eにおけるインテインの残基112～157(46個のアミノ酸)の除去(配列番号21)により、スプライシング活性がタンパク質1Aと比較してわずかに低下したが、タンパク質1Fにおけるインテインの残基107～160(54個のアミノ酸)の除去(配列番号22)ではインテインは不活性であった{Table 3(表8)}。タンパク質1E及びタンパク質1Fに関する差異は、タンパク質1Eのインテインが、-ストランド9と-ストランド10との間に残存するいくつかの非構造化アミノ酸を有するが、タンパク質1Fでは-ストランド9と-ストランド10との間の非構造化領域全体が除去されていることである。配列番号19の操作されたインテイン配列を含むタンパク質1Bを生じる、タンパク質1Fにおけるインテインの残基Gln106と残基Phe161との間へのフレキシブルGSGSGSGSリンカーの導入により、活性の領域はタンパク質1Aの天然インテインに相当するレベルになった{Table 3(表8)}。タンパク質1Bにおけるインテインを更に最小化することができるかどうかを検討するために、GSGSGSGSリンカーの両側の残基を意図的に除去し、6種の融合タンパク質1N～1Sを生成した。タンパク質1L、タンパク質1M及びタンパク質1Nでは、1個、2個及び3個のアミノ酸をそれぞれ、インテインのGSGSGSGSリンカーに対してアミノ末端で除去し(配列番号28～30)、これにより、タンパク質1Nでは開裂を観測せず、インテイン活性が著しく低下した{Table 3(表8)}。対照的に、インテインのGSGSGSGSリンカーに対して1～3個のアミノ酸がカルボキシ末端で除去されているタンパク質10、タンパク質1P及びタンパク質1Qでのインテイン(配列番号31～33)ではそれぞれ、タンパク質1Bと比較してわずか1.1倍、1.2倍及び1.7倍の活性の減少を観測した。

10

20

30

【0090】

リンカー領域の構造的完全性及び電荷の差異の効果を評価するために、欠失部位間に様々な他のリンカーを挿入した。タンパク質1G及びタンパク質1Hではそれぞれ、インテインのAsp158とSer111との間にLDRHGNリンカーを挿入した(配列番号23)、又はインテインのGln106とPhe161との間にLDRHGNリンカーを挿入した(配列番号24)。リンカーが存在していないタンパク質1E及びタンパク質1Fの対応するインテインと比較して、タンパク質1G及びタンパク質1HのLDRHGNリンカーではインテイン活性は変化しなかった{Table 3(表8)}。タンパク質1BのGSGSGSGSリンカーの代わりにヘッジホッグRDVETGEリンカー(配列番号25)、-ヘリカルADNLALAリンカー(配列番号26)又はアルカリ性GRGSGRGSリンカー(配列番号27)を導入した場合、タンパク質1I、タンパク質1J及びタンパク質1Kがそれぞれ生成され、インテイン活性がわずか1.8倍、4.8倍及び1.5倍低下した{Table 3(表8)}。

【0091】

最も活性な最小化されたインテインは、残基107～160がGSGSGSGSリンカーに置換されているタンパク質1Bのインテイン(配列番号19)であった。

40

【0092】

1.2. 最小化されたインテインへのT3C変異の導入:

次に、T3C変異を、タンパク質1Bの最小化されたインテインに導入してタンパク質1Cを生成し、該タンパク質1Cは[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrA(配列番号20)を含んだ。タンパク質1Dにおける完全長のT3Cインテインバリアント[Cys3]-Mxe GyrA(配列番号18)を対照として使用した。タンパク質1D及びタンパク質1CのT3C変異によりそれぞれ、タンパク質1Aの天然インテインと比較してインテイン活性が低下した{Table 3(表8)}。活性の低下は、タンパク質1Dでの完全長インテインの場合よりもタンパク質1Cでの最小化されたインテイン場合により顕著であった。

【0093】

サイズが約25%低減されている、いくつかの活性なMxe GyrAインテインバリアントを同定した。これら最小化されたインテインは、Gln106とPhe161との間の46～57個のアミノ酸が除去されている、又はリンカーに置換されている。最も活性な最小化されたインテイン

50

は、残基107～160の代わりにフレキシブルGSGSGSGSリンカーが導入されている[106(GS)₄161]-Mxe GyrA(配列番号19)であった。T3C変異を有する、対応するインテインである[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrA(配列番号20)も活性であったが、チオール誘導性開裂はより遅かった。

【0094】

【表8】

Table 3.融合タンパク質及びこれに対応するインテインバリアントの分子量のリスト。チオール誘導性開裂の反応速度を更に列挙する。

タンパク質番号	分子量				開裂活性 $K_{obs}(\text{秒}^{-1})$	
	タンパク質		インテイン			
	算出(Da)	観測(Da)	観測(Da)	算出(Da)		
1A	33442.5	33442.5	21269.9	21269.8	(1.0±0.1)×10 ⁻³	
1B	28220.2	28219.6	16047.1	16047.3	(8.6±0.5)×10 ⁻⁴	
1C	28222.2	28223.0	16049.5	16049.3	(7.6±0.4)×10 ⁻⁵	
1D	33444.5	33444.8	21271.8	21271.6	(2.5±0.2)×10 ⁻⁴	
1E	28520.6	28520.0	16347.3	16347.7	(7.0±0.5)×10 ⁻⁴	
1F	27643.7	27643.2	15470.8	n.d.	n.d. ^a	
1G	29213.3	29912.7	17040.1	17040.4	(7.7±0.5)×10 ⁻⁴	
1H	28336.4	28335.8	16163.5	n.d.	n.d. ^a	
1I	28430.5	28430.0	16257.2	16257.6	(4.7±0.2)×10 ⁻⁴	
1J	28312.4	28311.8	16139.2	16139.5	(1.8±0.1)×10 ⁻⁴	
1K	28358.4	28357.8	16185.5	n.d.	(5.6±0.4)×10 ⁻⁴	
1L	28092.0	28091.6	15919.0	15919.2	(4.2±0.1)×10 ⁻⁴	
1M	27978.9	27978.4	15806.0	15805.8	(5.4±0.3)×10 ⁻⁵	
1N	27879.8	27879.3	15706.9	n.d.	n.d. ^a	
1O	28073.0	28072.5	15900.0	15900.1	(7.9±0.4)×10 ⁻⁴	
1P	27909.8	27909.4	15736.8	15736.9	(6.9±0.2)×10 ⁻⁴	
1Q	27746.6	27746.2	15573.4	15573.8	(5.1±0.3)×10 ⁻⁴	

^a開裂を観測しなかった、又は観測した開裂はごくわずかであった。

10

20

30

【0095】

(実施例2)

操作されたインテインを使用するタンパク質発現レベル

目的は、操作されたインテインである[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrA(配列番号20)が、所望の標的ペプチドを含む融合タンパク質の発現レベルにどの程度影響を及ぼすかを決定することであった。

【0096】

各標的ペプチド、[Gly4]-hPYY(4-36)(配列番号10)、hPYY(3-36)(配列番号11)、h-CGRP(配列番号12)、hCT(配列番号13)、hPP(配列番号14)、[Arg4, Gln18, Lys30]-hPYY(3-36)(配列番号15)及び[Asp14, Arg17, Pro21, Pro27, Arg35]-hアミリン(配列番号16)のために、3種の異なる融合タンパク質を構築した。全ての融合タンパク質は、アミノ末端伸長、標的タンパク質及びMxe GyrAインテインバリアントで構成されていた。各標的ペプチドそれぞれのA融合タンパク質、B融合タンパク質及びC誘導タンパク質はそれぞれ、天然Mxe GyrA(配列番号17)インテイン、[106(GS)₄161]-Mxe GyrA(配列番号19)インテイン及び[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrA(配列番号20)インテインを含んだ。

40

【0097】

融合タンパク質の発現：

37でTPP細胞懸濁管を使用して、適切なプラスミドを含むBL21(DE3)細胞をLB培地(100 μg/mLのアンピシリン)中において約0.4のOD₆₀₀まで増殖させた。細胞培養物を約20～30

50

分にわたり18℃に冷却し、0.4~0.6のOD₆₀₀で0.5mMのIPTGを添加することにより融合タンパク質の発現を誘導した。タンパク質を18℃で一晩発現させた。遠心分離により、細胞を1mLアリコート中に回収した。一般的な方法で説明したようにSDS-PAGE分析を実行した。誘導した溶解物の試料のバンド強度から、加水分解の割合及び発現レベルを推定した{Table 4(表9)}。具体的には、加水分解を面積インティン/(面積タンパク質+面積インティン)として算出し、相対的な発現レベルは、各群内の融合タンパク質Cの面積と比べた融合タンパク質A及び融合タンパク質Bの面積を表す。溶解性の割合を可溶性画分及び不溶性画分から推定し、面積可溶性タンパク質/(面積可溶性タンパク質+面積不溶性タンパク質)(式中、面積可溶性タンパク質及び面積不溶性タンパク質はそれぞれ、可溶性試料中の及び不溶性試料中のインティン及び融合タンパク質の全面積を表す)として算出した。

10

とし算出した。

【0098】

2.1.PYY-インティン融合タンパク質の発現

タンパク質1A、タンパク質1B及びタンパク質1Cを含むタンパク質1ファミリーは、アミノ末端伸長{HRV14-3Cプロテアーゼ部位(配列番号8)を介してアルカリ性タグ(配列番号4)を含む}と、それぞれ天然Mxe GyrA(配列番号17)、[106(GS)₄161]-Mxe(配列番号19)及び[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrA(配列番号20)であるカルボキシ末端Mxe GyrAインティンバリアントとの間で融合した[Gly4]-hPYY(4-36)を含む。タンパク質1A~1Cを可溶性画分中で主に得た{Table 4(表9)}。タンパク質1A及びタンパク質1Bの約50%が加水分解されていたが、タンパク質1Cにおける操作されたインティンでは加水分解を観測しなかった。加水分解の欠如は、タンパク質1A及びタンパク質1Bと比較してタンパク質1Cの場合の発現レベルの約30%の増加と関連した。

20

【0099】

2A、2B及び2Cを含むタンパク質2ファミリーは、アミノ末端伸長{エンテロキナーゼプロテアーゼ部位(配列番号9)を介してHisタグ(配列番号5)を含む}と、それぞれ天然Mxe GyrA、[106(GS)₄161]-Mxe GyrA及び[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrAであるカルボキシ末端Mxe GyrAインティンバリアントとの間で融合したhPYY(3-36)を含む。タンパク質2A~2Cを可溶性画分中で主に得た{Table 4(表9)}。タンパク質2A及びタンパク質2Bの約60%及び約50%がそれぞれ加水分解されていたが、タンパク質2Cでは加水分解を観測しなかった。このことは、タンパク質2A及びタンパク質2Bと比較してタンパク質2Cの場合の発現レベルの30~40%の増加と関連した。

30

【0100】

6A、6B及び6Cを含むタンパク質6ファミリーは、DAP1(配列番号6)により除去され得るアミノ末端ヒスチジン富化ドデカペチド伸長と、それぞれカルボキシ末端Mxe GyrA、[106(GS)₄161]-Mxe GyrA及び[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrAとの間で融合した[Arg4, Glu18, Lys30]-hPYY(3-36)を含む。3種全ての融合タンパク質を可溶性画分で主として得た{Table 4(表9)}。タンパク質6A及びタンパク質6Bの約50%が加水分解されていたが、タンパク質6Cでは加水分解を観測しなかった。このことは、タンパク質6Cと比べてタンパク質6A及びタンパク質6Bの発現レベルの15~30%の低下と更に関連した。

30

【0101】

2.2. -CGRP-インティン融合タンパク質の発現

3A、3B及び3Cを含むタンパク質3ファミリーは、アミノ末端伸長{Hisタグ(配列番号5)及びエンテロキナーゼプロテアーゼ部位(配列番号9)を含む}と、それぞれ天然Mxe GyrA、[106(GS)₄161]-Mxe GyrA及び[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrAであるカルボキシ末端Mxe GyrAインティンバリアントとの間で融合したh-CGRPを含む。3種全ての融合タンパク質を可溶性画分中で主として得た{Table 4(表9)}。タンパク質3A及びタンパク質3Bの約50%が加水分解されていたが、タンパク質3Cでは加水分解を観測しなかった。このことは、タンパク質3Cと比べてタンパク質3A及びタンパク質3Bの発現レベルの約30%の低下と更に関連した。

40

【0102】

50

2.3.CT-インテイン融合タンパク質の発現

4A、4B及び4Cを含むタンパク質4ファミリーは、アミノ末端伸長{Hisタグ(配列番号5)及びエンテロキナーゼプロテアーゼ部位(配列番号9)を含む}と、それぞれ天然Mxe GyrA、[106(GS)₄161]-Mxe GyrA及び[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrAであるカルボキシ末端Mxe GyrAインテインバリアントと間で融合したhCTを含む。3種全てのタンパク質を、加水分解されることなく主として可溶性画分中で得た{Table 4(表9)}。この場合、タンパク質4A及びタンパク質4Bの発現レベルはタンパク質4Cと比較して高かった。

【0103】

2.4.PP-インテイン融合タンパク質の発現

5A、5B及び5Cを含むタンパク質5ファミリーは、アミノ末端伸長{Hisタグ(配列番号5)及びエンテロキナーゼプロテアーゼ部位(配列番号9)を含む}と、それぞれ天然Mxe GyrA、[106(GS)₄161]-Mxe GyrA及び[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrAであるカルボキシ末端Mxe GyrAインテインバリアントとの間で融合したhPPを含む。タンパク質5A～5Cを可溶性画分中で得た{Table 4(表9)}。タンパク質5A及びタンパク質5Bでは約50%の加水分解を観測したが、タンパク質5Cでは加水分解を観測しなかった。このことは、タンパク質5A及びタンパク質5Bと比較してタンパク質5Cの発現レベルの約10～20%の増加と関連した。

【0104】

2.5.アミリン-インテイン融合タンパク質の発現

7A、7B及び7Cを含むタンパク質7ファミリーは、αlpプロテアーゼ(配列番号7)により除去され得るアミノ末端ヒスチジン富化トリデカペチド伸長と、それぞれ天然Mxe GyrA、[106(GS)₄161]-Mxe GyrA及び[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrAであるカルボキシ末端Mxe GyrAインテインバリアントとの間で融合した[Asp14, Arg17, Pro21, Pro27, Arg35]-hアミリンを含む。タンパク質7A及びタンパク質7Bを両方とも可溶性画分中で主として得ており、タンパク質7Cを可溶性タンパク質と不溶性タンパク質との混合物として得た{Table 4(表9)}。タンパク質7A及びタンパク質7Bの両方の場合には広範な加水分解を観測したが、タンパク質7Cの操作されたインテインは加水分解と関連しなかった。このことは、タンパク質7A及びタンパク質7Bと比較してタンパク質7Cの7～13%までの発現レベルの増加という結果になった。

【0105】

結論として、[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrAインテイン(配列番号20)は一般的に加水分解が減少しており、同時に野生型Mxe GyrA(配列番号17)インテイン及び最小化された[106(GS)₄161]-Mxe GyrA(配列番号19)インテインと比較して融合タンパク質の発現レベルが増加した。

【0106】

10

20

30

【表9】

Table 4.天然Mxe GyrAインテイン、[106(GS)₄161]-Mxe GyrAインテイン及び[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrAインテインの融合タンパク質の加水分解レベル、発現レベル及び溶解性

番号	誘導された試料 タンパク質 (面積)	インテイン (面積)	加水分解 [%] ^a	発現レベル [%] ^b	可溶性タンパク質 (面積) ^c	不溶性タンパク質 (面積) ^c	可溶性タンパク質 [%] ^d
1A	13381	12560	48	71	13290	537	96
1B	12120	9299	43	64	10070	459	96
1C	18726	0	0	100	10277	4344	70
2A	9067	13958	61	58	11110	441	96
2B	10199	9631	49	73	10721	1361	89
2C	13892	0	0	100	9211	1381	87
3A	15504	18586	55	73	29018	777	97
3B	15516	14075	48	73	18273	1477	93
3C	21352	0	0	100	15325	2242	87
4A	15028	0	0	120	5492	809	87
4B	13137	0	0	105	6787	1736	80
4C	12523	0	0	100	6540	924	88
5A	13353	8285	38	80	8322	972	90
5B	15544	10519	40	93	17907	1719	91
5C	16778	0	0	100	11792	1241	90
6A	14438	16435	53	85	23601	761	97
6B	11385	9574	46	67	15269	895	94
6C	16938	0	0	100	8951	3202	74
7A	18941	25732	58	87	38419	2092	95
7B	19832	13501	41	91	12629	5249	71
7C	21811	0	0	100	6073	8547	42

^a面積インテイン/(面積タンパク質+面積インテイン)として推定した。

^b融合タンパク質 C の発現レベルを 100%に設定し、融合タンパク質 A 及び融合タンパク質 B の発現レベルを C と比較して算出した。

^cインテインの面積と融合タンパク質の面積との合計。

^d面積可溶性タンパク質/(面積可溶性タンパク質+面積不溶性タンパク質)として推定した。

【0107】

(実施例3)

操作されたインテインを使用するペプチド -チオエステル生成

標的ペプチドの収量への操作された[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrAインテインの効果を調べるために、アミノ末端にタグが付けられた[Gly4]-hPYY(4-36) -チオエステルを、それぞれ天然Mxe GyrA(配列番号17)、[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrA(配列番号20)及び[Cys3]-Mxe GyrA(配列番号18)を含む融合タンパク質1A、融合タンパク質1C及び融合タンパク質1Dから単離した。

【0108】

融合タンパク質1A、融合タンパク質1C及び融合タンパク質1Dを、一般的な方法で説明したように、200mLのLB培地が入った振とうフラスコ中で発現させた。一般的な方法で説明したようにSDS-PAGE分析を実施し、融合タンパク質の>90%は不溶性画分中であることが示された。回収した細胞を超音波処理により25mMのリン酸ナトリウムpH5バッファー中に溶

10

20

30

40

50

解させ、不溶性画分を洗浄バッファー[25mMのリン酸ナトリウム、1mMのEDTA、1%のTriton X-100、pH7]で2回洗浄し、その後100mMのリン酸ナトリウムpH7.5バッファーで1回洗浄した。単離した封入体を可溶化バッファー[100mMのリン酸ナトリウム、8Mの尿素、1mMのTCE P、1mMのEDTA、pH7.5](20mL)中に再懸濁し、緩やかに攪拌しつつ5℃で2時間にわたりインキュベートした。発現量をRP-UPLC法Aにより推定した。試料を濾過し(0.45 μm)、コールドリリフォールディングバッファー[100mMのリン酸ナトリウム、1.3Mの尿素、150mMのNaCl、1mMのEDTA、1mMのTCEP、pH7.5]の9容積中に急速に希釈することによりリフォールドさせ、135mMのNaCl及び2Mの尿素の濃度となった。希釈直後に、MESNaを100mMの最終濃度まで添加することにより開裂を開始させた。pH7.3で20時間にわたり5℃で反応させた。チオール誘導性開裂を、RP-UPLC法B及びLC-MS法Aによりモニタリングした。融合タンパク質及びその対応するインテインの観測した質量は、予期したものと相関性があった{Table 3(表8)}。

10

【0109】

チオール誘導性反応混合物をバッファーA[50mMのリン酸ナトリウム、1mMのEDTA、pH7]の3容積で希釈して導電率を約12mS/cmまで低下させた後、AKTA explorer 100システム(GE Healthcare社)を使用して5mL/分でHiTrap SP Sepharose HP(16 × 25mm、5mL、GE Healthcare社)カラム上に充填した。カラムをバッファーAの9カラム容積で洗浄し、3mL/分で20カラム容積を超えて1MのNaClを含む0~100%のバッファーAの直線グラジエントを使用して、アミノ末端にタグが付けられた[Gly4]-hPYY(4-36)-チオエステルを溶出させた。-チオエステルを含む画分をプールし、RP-UPLC法Cにより量を推定した。生成物の素性をESI-MSにより確認し、12315.35Da(予期:12315.09)のデコンポリュートした質量であった。収量をTable 5(表10)に列挙する。

20

【0110】

【表10】

Table 5.様々なインテインバリエントを使用する、Nにタグが付けられた[Gly4]-hPYY(4-36)
6) α-チオエステルの精製^a

タンパク質	融合タンパク質の収量 (mg/L)	α-チオエステルの収量 ^b (mg/L)	α-酸不純物 ^c (%)
1A	119	23	6.0
1C	147	43	1.5
1D	130	24	1.5

30

^a200mL の振とうフラスコ培養物から得た収量を培養物リットル当たりの収量に正規化した。データは、2つの独立した実験からの平均を表す。

^b α-酸副生成物の量を含んでいない。

^c RP-UPLCによる面積_{α-酸}/(面積_{α-酸}+面積_{α-チオエステル})として推定した。

【0111】

結論として、野生型Mxe GyrAインテイン(配列番号14)を含むタンパク質1Aから得た、アミノ末端にタグが付けられた[Gly4]-hPYY(4-36)-チオエステルの収量は、[Cys3]-Mxe GyrA(配列番号18)を含むタンパク質1Dの収量と類似しており、このことは、T3C変異自体が標的ペプチドの量を増加させないことを示した{Table 5(表10)}。しかしながら、[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrAインテイン(配列番号20)を含むタンパク質1Cから単離した場合には、収量は、タンパク質1Aと比較して約80%増加しており、このことは、サイズが最小化される操作されたインテイン及びT3C変異が標的ペプチドの収量に良い影響を及ぼしたこと示す。重要なことに、アミノ末端にタグが付けられた[Gly4]-hPYY(4-36)-酸副生成物の量がタンパク質1Aと比較してタンパク質1C及びタンパク質1Dの場合に低減しており、このことは、T3C変異は精製中にも有益な効果を有することを示す。

40

【0112】

50

[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrAインテイン(配列番号20)は融合タンパク質の発現レベルを高め、標的ペプチドの収量を増強させる。このことが[Cys3]-Mxe GyrAインテイン(配列番号18)の場合には観測されなかったことから、最小化されたサイズは、これらの特性の増強に寄与する。

【0113】

(実施例4)

[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe GyrAインテインを使用する -アミド化ペプチドの生成

-アミド化ペプチドの大規模生産のための、操作されたインテインを含む融合タンパク質の潜在的な使用は、この融合タンパク質の高細胞密度条件下で発現する能力に依存する。このことは[Gly4]-hPYY(4-36)-NH₂で実証されており、この[Gly4]-hPYY(4-36)-NH₂を、生物反応器中の流加回分(fed-batch)発酵後にタンパク質1Cから単離した。10

【0114】

4.1. 融合タンパク質1Cの流加回分発酵

プラスミドp1Cを含むBL21(DE3)細胞の前培養物を、6~8時間にわたり振とうフラスコ中において、100 μg/mLのアンピシリンが加えられたLB培地で増殖させた。500mLの生物反応器(DasGib Technology社)中において好気性条件下で発酵を実行し、炭素源及び窒素源としてグルコース及びアンモニアをそれぞれ含む既知発酵培地の最初の体積が200mLであり、滅菌(30分にわたる121 °Cでのオートクレーブ処理)後に100 μg/mLのアンピシリンを添加した。約0.2の最初のOD₆₀₀に達するまで前培養物を生物反応器中に接種した。5NのNH₄O Hの添加によりpHを7.0に維持し、温度を37 °Cに維持し、培養期間にわたって0.4L/分の空気流量を培養プロセスに通した。攪拌速度(400~1200rpm)を調節して、少なくとも30%O₂飽和の溶解酸素レベルに達した。発酵培地中における最初のグルコース濃度は10g/Lであり、発酵から5時間後から、マグネシウム及び微量金属を加えたグルコースフィードを、10gのグルコース/L/時間の最終供給量まで段階的に加え、発酵が停止するまで最終供給量を維持した。50~60のOD₆₀₀での0.5mMのIPTGの添加により、融合タンパク質の產生を誘導した。誘導から4時間後に発酵を停止させた。F10-6x500y Rotor(13000×g)を備えるSorvall RC 6 Plus遠心分離機での遠心分離により細胞を回収し、-20 °Cで保管した。細胞を40~50のOD₆₀₀まで溶解バッファー[25mMのリン酸ナトリウム、pH5]中で再懸濁させ、4 °Cで1時間攪拌した。1.36Kbarの圧力において均一細胞破碎システム(constant cell disruption system)E615で細胞を溶解させた。溶解した細胞を沈降させ、上清をデカンテーションした。不溶性の封入体を洗浄バッファー[25mMのリン酸ナトリウム、pH7、5mMのEDTA、1%のTriton X-100]で洗浄し、2時間にわたり5 °Cで攪拌した後、MilliQ水で1回洗浄した。封入体を20個のより小さい画分に等しく分けた。20

【0115】

4.2. [Gly4]-hPYY(4-36)-アミド([Gly4]-hPYY(4-36)-NH₂)の単離

本戦略を図2中で概説する。1/20流加回分培養物からの封入体を変性バッファー[25mMのリン酸ナトリウム、8Mの尿素、1mMのTCEP、1mMのEDTA、pH7.5](30mL)中に再懸濁させ、緩やかに攪拌しつつ3.5時間にわたり5 °Cでインキュベートした。融合タンパク質の収量をRP-UPLC法Aにより推定し、変性バッファーにより試料を約1.2mg/mLの濃度まで希釈した。攪拌しつつ5分を超えてタンパク質を8.5容積の希釈バッファー[25mMのリン酸ナトリウム、1mMのTCEP、1mMのEDTA、0.5MのNaCl、pH7.5]に添加することにより、タンパク質をリリフォールドさせた。希釈バッファー中の2Mのストックからの100mMへのMESNaの添加により、チオール誘導性開裂を速やかに開始させた。攪拌しつつ一晩5 °C及びpH7.3において0.8Mの尿素と0.5MのNaClとの溶液中で反応させた。30

【0116】

固体のNH₄HCO₃の1Mの最終濃度までの添加により、アミド化を実施した。1NのNaOHにより溶液のpHを8.5に調整し、一晩5 °Cで反応させた。チオール誘導性開裂反応及びアミド化反応をLC-MS法Aによりモニタリングした{Table 6(表11)}。

【0117】

【表11】

Table 6. タンパク質1Cのチオール開裂及びアミド化の後の質量

	平均質量(Da)	
	予測	観測
アミノ末端にタグが付けられた[Gly4]-hPYY(4-36)		
α -チオエステル	12315.09	12315.33
α -アミド	12189.92	12189.93

【0118】

10

アミド化混合物を濾過し($0.22\text{ }\mu\text{m}$)、フィルタを8Mの尿素で洗浄した。尿素洗浄液をPhenomenex Lunaカラム($15\text{ }\mu\text{m}$ 及び $300\text{ }\times\ 250\text{ mm}$)上に充填し、続いて、AKTA Explorer 100(GE Healthcare社)を使用してアミド化混合物を充填した。水中の0.1%のTFA(溶媒A)及びアセトニトリル中の0.1%のTFA(溶媒B)を25~45%Bの直線グラジエントで使用して、アミノ末端にタグが付けられた[Gly4]-hPYY(4-36)-NH₂を溶出した。凍結乾燥後、タンパク質を2.5mMのリン酸ナトリウムpH7.5バッファー中に溶解させ、配列EVLFQ/GPを特異的に認識するHRV14-3Cプロテアーゼを使用する酵素的開裂によりアミノ末端のタグを除去した。酵素対基質の1:12(重量/重量)の比を使用し、少なくとも48時間にわたり室温でインキュベートした。消化物のpHを4.3に調整後、溶出液A[10mMのNH₄HCO₃、pH5.5]で平衡化したプレパックHiTrap SPセファロースHPカラム(5mL)上への3mL/分での充填、続いて5カラム容積を超える0~100%溶出液B[10mMのNH₄HCO₃、pH8.5]のグラジエントにより、[Gly4]-hPYY(4-36)-NH₂を回収し、10CVにわたりイソクラティック溶出液Bを使用して[Gly4]-hPYY(4-36)-NH₂を溶出させた。[Gly4]-hPYY(4-36)-NH₂の純度及び同一性をRP-UPLC法Cにより決定し、LC-MS法Bにより特性評価し、収量を化学発光窒素検出により推定した{(Table 7(表12))}。[Gly4]-hPYY(4-36)-NH₂を99%の純度及び184mg/Lの収量で単離した{(Table 7(表12))}。

20

【0119】

結論として、[Cys3, 106(GS)₄161]-Mxe Gyra(配列番号20)を含む融合タンパク質1Cの高細胞密度条件下での発現及び[Gly4]-hPYY(4-36)-NH₂への変換に成功し、操作されたインテインの大規模な α -アミド化ペプチドの生産への適用性を実証した。

30

【0120】

【表12】

Table 7. 操作されたインテインを含む融合タンパク質1Cの流加培養物からの α -アミド化[Gly4]-hPYY(4-36)-NH₂の生産^a

タンパク質 の収量 [g/L]	[Gly4]-hPYY(4-36)- NH ₂ の収量 [mg/L]	回収率 [モル%]	純度 [%]	[M+5H] ⁵⁺ イオンのモノア イソトピック質量
				予測 観測
4.4	184	31	99	773.59 773.60

^a200mLの流加培養物の1/20から得た収量を培養物リットル当たりの収量に正規化した。

40

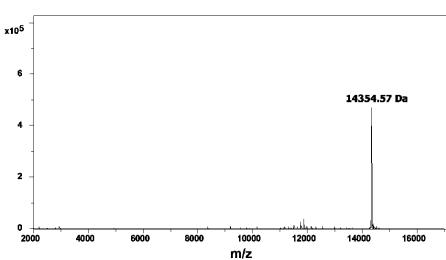
データは、2つの独立した培養及びその後の精製からの平均を表す。

【0121】

本明細書では本発明のある特定の特徴が例示されている及び説明されているが、当業者は多くの改変、置換、変更及び均等をすぐに想起するであろう。従って、添付した特許請求の範囲は、そのような改変及び変更の全てを本発明の正確な趣旨内であるようにカバーするように意図されていることが理解されるべきである。

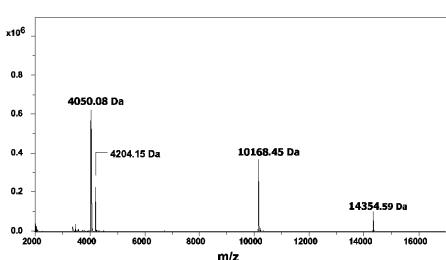
【図1】

Figure 1 / 7



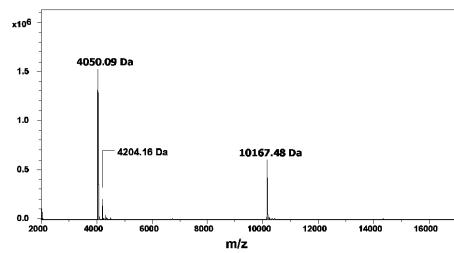
【図2】

Figure 2 / 7



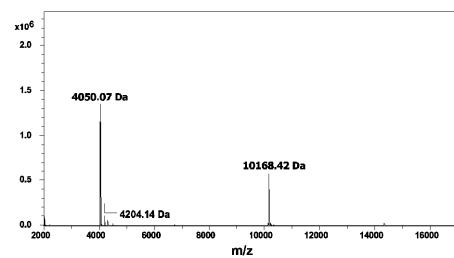
【図3】

Figure 3 / 7



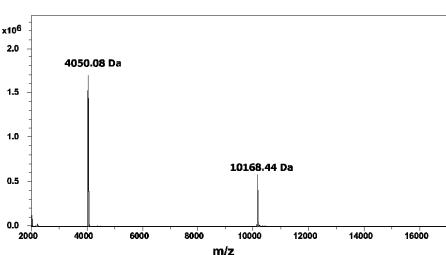
【図4】

Figure 4 / 7



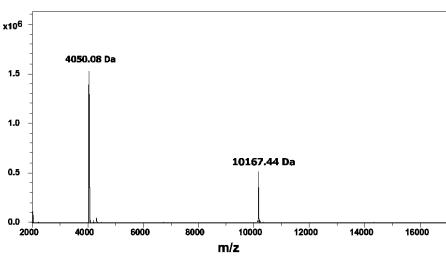
【図5】

Figure 5 / 7



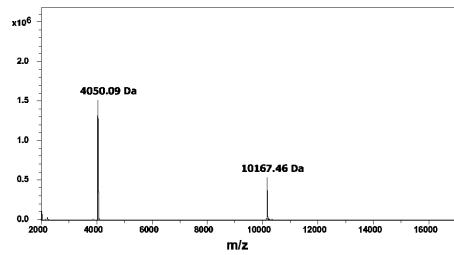
【図6】

Figure 6 / 7



【図7】

Figure 7 / 7



【配列表】

2016519950000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2014/061048
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/22 C07K14/575 C07K7/00 C12N15/09 C12N15/62 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CUI C ET AL: "Elimination of in vivo cleavage between target protein and intein in the intein-mediated protein purification systems", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 50, no. 1, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 74-81, XP024908862, ISSN: 1046-5928, DOI: 10.1016/J.PEP.2006.05.019 [retrieved on 2006-11-01] in particular see page 75-76 and 78-80, Figure 2; the whole document</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-3,12, 13,15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 23 July 2014		Date of mailing of the international search report 30/07/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vix, Olivier

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/061048

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/029245 A1 (CTT CANCER TARGETING TECH OY [FI]; VALTANEN HELI [FI]; BJOERKLUND MIKA) 8 April 2004 (2004-04-08) the whole document ----- P. L. STAROKADOMSKYY ET AL: "Utilization of protein splicing for purification of the human growth hormone", MOLECULAR BIOLOGY, vol. 42, no. 6, 1 December 2008 (2008-12-01), pages 966-972, XP055087672, ISSN: 0026-8933, DOI: 10.1134/S0026893308060198 the whole document ----- IAN R. COTTINGHAM ET AL: "A method for the amidation of recombinant peptides expressed as intein fusion proteins in Escherichia coli.", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 19, no. 10, 1 October 2001 (2001-10-01), pages 974-977, XP055087005, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt1001-974 cited in the application the whole document ----- BJORKLUND M ET AL: "Use of intein-directed biosynthesis to improve serum stability and bioactivity of a gelatinase inhibitory peptide", COMBINATORIAL CHEMISTRY AND HIGH THROUGHPUT SCREENING, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 6, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 29-35, XP002984195, ISSN: 1386-2073 the whole document ----- GERRIT VOLKMANN ET AL: "Protein C-Terminal Labeling and Biotinylation Using Synthetic Peptide and Split-Intein", PLOS ONE, vol. 4, no. 12, 21 December 2009 (2009-12-21), page e8381, XP055087008, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0008381 the whole document ----- -/-	1-3,12, 13,15 1-3,12, 13,15 1-3,12, 13,15 1-3,12, 13,15 1-3,12, 13,15 1-3,12, 13,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/061048

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/100176 A2 (UNIV ROCHESTER [US]; FASAN RUDI [US]; FROST JOHN R [US]; SMITH JESSICA) 26 July 2012 (2012-07-26) in particular see [0150]-[0153] and claims 28-30; the whole document -----	1-3,12, 13,15
Y	WO 2013/045632 A1 (ERA BIOTECH S A [ES]) 4 April 2013 (2013-04-04) the whole document -----	1-3,12, 13,15
Y	CHEN Y Q ET AL: "Expression of a cytotoxic cationic antibacterial peptide in Escherichia coli using two fusion partners", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 57, no. 2, 1 February 2008 (2008-02-01), pages 303-311, XP026864280, ISSN: 1046-5928, DOI: 10.1016/J.PEP.2007.09.012 [retrieved on 2008-02-01] the whole document -----	1-3,12, 13,15
Y	SHARMA S S ET AL: "Intein-mediated protein purification of fusion proteins expressed under high-cell density conditions in E. coli", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 125, no. 1, 20 August 2006 (2006-08-20), pages 48-56, XP024956691, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2006.01.018 [retrieved on 2006-08-20] the whole document -----	1-3,12, 13,15
Y	TELENTI ET AL: "The Mycobacterium xenopi Gyra protein splicing element: characterization of a minimal intein.", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 179, no. 20, 1 October 1997 (1997-10-01), pages 6378-6382, XP055087035, ISSN: 0021-9193 the whole document -----	1-3,12, 13,15
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/061048

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>HIRAGA ET AL: "Minimization and stabilization of the Mycobacterium tuberculosis recA intein", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 354, no. 4, 9 December 2005 (2005-12-09), pages 916-926, XP005216839, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2005.09.088 the whole document</p> <p>-----</p>	1-3,12, 13,15
T	<p>LOUISE ALBERTSEN ET AL: "Recombinant Production of Peptide C -Terminal [alpha]-Amides Using an Engineered Intein", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, 6 November 2013 (2013-11-06), XP055087207, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc4002689 the whole document</p> <p>-----</p>	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/061048

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 2004029245	A1 08-04-2004	AU 2003264657	A1	19-04-2004	
		CA 2500254	A1	08-04-2004	
		CN 1703510	A	30-11-2005	
		EP 1543121	A1	22-06-2005	
		JP 2006514543	A	11-05-2006	
		US 2006240510	A1	26-10-2006	
		WO 2004029245	A1	08-04-2004	
<hr/>					
WO 2012100176	A2 26-07-2012	EP 2665744	A2	27-11-2013	
		US 2013330773	A1	12-12-2013	
		WO 2012100176	A2	26-07-2012	
<hr/>					
WO 2013045632	A1 04-04-2013	AU 2012314355	A1	24-04-2014	
		CA 2850411	A1	04-04-2013	
		EP 2761006	A1	06-08-2014	
		KR 20140069313	A	09-06-2014	
		WO 2013045632	A1	04-04-2013	
<hr/>					

フロントページの続き

(51) Int.CI. F I テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/575 (2006.01) C 0 7 K 14/575

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

(72) 発明者 イエンス・クリスチャン・ノリルド
デンマーク・DK-2880・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・(番地なし)

(72) 発明者 ルイーセ・アルベルトセン
デンマーク・DK-2880・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・(番地なし)

F ターム(参考) 4B064 AG01 AG15 CA02 CA10 CA19 CC24 CE10 CE11 DA01
4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA11 CA40 DA30 EA20 FA74 GA21
GA26