(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3954091号
(P3954091)
(45)発行日　平成19年8月8日(2007.8.8)　(24)登録日　平成19年5月11日(2007.5.11)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 14/64	(2006.01)	C07K	14/64	
C07K 1/107	(2006.01)	C07K	1/107	
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	

請求項の数 23　(全 26 頁)

(21)出願番号　特願平7-503036
(86)(22)出願日　平成6年6月20日(1994.6.20)
(65)公表番号　特表平9-501911
(43)公表日　平成9年2月25日(1997.2.25)
(86)国際出願番号　PCT/US1994/006997
(87)国際公開番号　WO1995/000645
(87)国際公開日　平成7年1月5日(1995.1.5)
審査請求日　平成13年6月20日(2001.6.20)
(31)優先権主張番号　08/080,354
(32)優先日　平成5年6月21日(1993.6.21)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　596168317
ジェネンテック・インコーポレーテッド
ＧＥＮＥＮＴＥＣＨ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国カリフオルニア・９４０８０－４９９０・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌエー・ウェイ・１
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆
(74)代理人　100068526
弁理士　田村　恭生
(74)代理人　100098925
弁理士　上田　敏夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】リラキシンの製造方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトリラキシンを製造する方法であって、その方法は以下の工程：
（ａ）アミノ末端からカルボキシ末端へ、リーダーペプチド、Ｂ鎖、非天然のＣ鎖、およびＡ鎖の順で含む非天然のプロリラキシンをフォールディングし（該リーダーペプチドはＢ鎖に隣接する第１の解裂部位を含み、該非天然のＣ鎖はＢ鎖に隣接する第２の解裂部位およびＡ鎖に隣接する第３の解裂部位を含み、非天然のＣ鎖はＫＲＫＰＴＧＹＧＳＲＫＫＲ、ＤＫＫＲＴＧＹＧＳＲＲＲＫ、ＤＫＫＲＴＧＹＧＳＲＫＫＲ、およびＫＲＫＰＴＧＹＧＳＲＲＲＫよりなる群から選択されるアミノ酸配列よりなる）；
（ｂ）フォールディングされたプロリラキシンを、該第１、第２および第３解裂部位に特異的な１以上の解裂剤と接触させ、それによって該リーダーペプチドおよび該非天然のＣ鎖を特異的に除去し；および
（ｃ）製造された生物学的に活性なヒトリラキシンを回収する；
を含む方法。
【請求項２】
リラキシンがＨ２ヒトリラキシンである請求項１に記載の方法。
【請求項３】
解裂剤が１以上の酵素である請求項１に記載の方法。
【請求項４】
酵素をエンドプロテイナーゼＡｓｐＮ、トリプシン、エンドプロテイナーゼＬｙｓＣ、エンド

プロテイナーゼＡｒｇＣ、およびカルボキシペプチダーゼＢよりなる群から選択される請求項３に記載の方法。
【請求項５】
酵素がカルボキシペプチダーゼＢと組み合わせたトリプシンまたはエンドプロテイナーゼＡｒｇＣである請求項４に記載の方法。
【請求項６】
酵素がカルボキシペプチダーゼＢと組み合わせたＬｙｓＣである請求項４に記載の方法。
【請求項７】
酵素がＬｙｓＣと組み合わせたＡｓｐＮである請求項４に記載の方法。
【請求項８】
プロリラキシンをコードするＤＮＡを宿主細胞にトランスフェクトする作動可能な発現ベクター内に提供し、そのトランスフェクトされた細胞を培養し、プロリラキシンを単離することによりプロリラキシンを組換え的に製造する請求項１に記載の方法。
【請求項９】
単離がプロリラキシンの可溶化を含む請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
プロリラキシンをグアニジン塩酸塩を含む溶液で可溶化する請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
プロリラキシンのフォールディングがレドックス緩衝液の存在下に起こる請求項９に記載の方法。
【請求項１２】
宿主細胞がＥ．ｃｏｌｉである請求項８に記載の方法。
【請求項１３】
Ａ－鎖Ｎ－末端グルタミンを環化することをさらに含んでなる請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
リラキシンＡ－鎖Ｎ－末端グルタミンを熱工程により環化する請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
リラキシンを、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーおよび限外濾過より選択される方法の使用を含んでなる方法により回収する請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
リラキシンを製剤緩衝液中で製剤化することを場合により含んでなる請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
リーダーペプチド、Ｂ－鎖、非天然のＣ－鎖、およびＡ－鎖を含んでなる非天然のヒトプロリラキシンであって、該リーダー配列はＢ－鎖に隣接する解裂部位を含み、該非天然のＣ－鎖は、Ｂ－鎖およびＡ－鎖に隣接する解裂部位を含み、非天然型のＣ－鎖は、ＫＲＫＰＴＧＹＧＳＲＫＫＲ、ＤＫＫＲＴＧＹＧＳＲＲＲＫ、ＤＫＫＲＴＧＹＧＳＲＫＫＲ、およびＫＲＫＰＴＧＹＧＳＲＲＲＫよりなる群から選択されるアミノ酸配列よりなるプロリラキシン。
【請求項１８】
解裂部位が酵素的に解裂可能である請求項１７に記載のプロリラキシン。
【請求項１９】
請求項１７に記載のプロリラキシンをコードする単離されたＤＮＡ。
【請求項２０】
請求項１９に記載のＤＮＡを作動可能に含む発現ベクター。
【請求項２１】
請求項２０に記載のベクターでトランスフェクトされた宿主細胞。
【請求項２２】
該酵素がカルボキシペプチダーゼと組み合わせたトリプシンである請求項５に記載の方法

。
【請求項２３】
非天然のプロリラキシンからヒトリラキシンを製造する方法であって、該プロリラキシンはアミノ末端からカルボキシ末端に、順にリーダーペプチド、ヒトリラキシンＢ鎖、非天然のＣ鎖、ヒトリラキシンＡ鎖を含み、該リーダー配列はＢ鎖に隣接して第１解裂部位を含み、該非天然のＣ鎖はＢ鎖に隣接して第２解裂部位およびＡ鎖に隣接して第３解裂部位を含み、非天然のＣ鎖は、ＫＲＫＰＴＧＹＧＳＲＫＫＲ、ＤＫＫＲＴＧＹＧＳＲＲＲＫ、ＤＫＫＲＴＧＹＧＳＲＫＫＲ、およびＫＲＫＰＴＧＹＧＳＲＲＲＫよりなる群から選択されるアミノ酸配列よりなり、該方法は、
（ａ）該プロリラキシンをフォールディングし、
（ｂ）該フォールディングされたプロリラキシンを該第１、第２および第３解裂部位に特異的な１以上の解裂剤と接触させ、それによって該リーダー配列および該非天然のＣペプチドを特異的に除去し、そして
（ｃ）このようにして作った生物学的に活性なヒトリラキシンを回収する、
ことを含む方法。
【発明の詳細な説明】
産業分野
本発明は非天然形のプロリラキシン、およびそのような非天然形のプロリラキシンからのリラキシンの製造方法に関する。
発明の背景
成熟ヒトリラキシンは、出産前に産道の形を直し、出産過程を容易にするのに関与することが知られている、約６０００ダルトンの分子量を有する卵巣ホルモンペプチドである。該ペプチドは標的器官の結合組織の再構築を調節し、妊娠および出産の間、器官構造の必要な変化を与えるようである。妊娠ホルモンとしてのリラキシンの重要な役割の幾つかには、早産の防止、出産時の頸部成熟、および乳腺の発達がある［Reddy等、Arch. Biochem. Biophy., 294, 579（1992）］。リラキシンは主に妊娠ホルモンであるが、非妊娠の女性、および男性（精液）においても検出されている。
リラキシンのアミノ酸配列は、豚、ラット［Hudson等、Nature, 291, 127（1981）］、サメ、ツノザメ、ケイト、鯨、サルおよびヒト［Hudson等、EMBO J., 3, 2333（1984）］を含む多数の種について、直接的なタンパク質の配列決定により測定され、またはＤＮＡのヌクレオチド配列から推論された。
組換え技術が最初にラットおよび豚のリラキシンについてのｃＤＮＡクローンの単離に適用された［Hudson等、Nature, 291, 544（1981）；Haley等、DNA, 1, 155（1982）］。２つのヒト遺伝子形がブタのリラキシン遺伝子からのプローブを用いる遺伝子クローニングにより同定されている［Hudson等、Nature, 301, 628（1983）］；Hudson等、EMBO J., 3, 2333（1984）；米国特許第４,７５８,５１６号（１９８８年７月１９日発行）および同第４,８７１,６７０号（１９８９年１０月３日発行）］。しかしながらこれらの遺伝子形のうち一つのみ（Ｈ２と呼ばれる）が、黄体のう胞で転写されることが見出されている。他の遺伝子が他の組織部位で発現されるかどうか、またはそれが偽遺子であるかどうかは不明である。Ｈ２リラキシンが卵巣で合成され発現されるという事実は、これが妊娠の生理学に直接関与する配列であることを示唆する。
天然のリラキシンは、シグナルペプチド、Ｂ－鎖、結合用Ｃ－ペプチドおよびＡ－鎖の全体構造を有する一本鎖の２３kDaプレプロリラキシンとして合成される。リラキシンの生合成の間、発生期の鎖が小胞体を横切って移動する時に、シグナルペプチドは除去されて１９kDaのプロリラキシンを生ずる（Reddy等、上書）。プロリラキシンのリラキシンへの更なるプロセシングは、インシュリンと類似の方法でＢ－およびＡ－鎖の間のジサルファイド架橋の生成後に、Ｂ／Ｃ－鎖およびＡ－／Ｃ－鎖結合部に位置する特異的な対の塩基性アミノ酸残基におけるＣ－ペプチドのエンドプロテオリチック解裂によりインビボで起る［Marriott等、Mol. Endo, 6, No.9（1992）］。リラキシンのジサルファイド架橋は、Ａ８およびＡ１３間のＡ鎖内部の鎖内ジサルファイド架橋と共に、Ａ９－Ｂ１０および

Ａ２２－Ｂ２のシステイン間で起る（米国特許第４,６５６,２４９号、１９８７年４月７日発行）。
１９８８年現在のリラキシンについての知識の簡潔な総説は、Sherwood,D.、The physiology of Reproduction, １６章、「リラキシン」、Knobil,EおよびNeil,J編、Raren Press社、ニューヨーク、585～673ページ（1988）により、提供された。リラキシンは妊娠状態と首尾一貫して関連し、その知られた有用性の大部分はこの状態に関連する。
Ｈ２リラキシンは産道の形を直し、頸部の成熟、妊娠子宮内膜の肥厚、およびこの領域への血管新生の増加、およびコラーゲン合成を含む、出産過程を容易にすると記載されている。Ｈ２リラキシンは泌乳にも関連し、いくつかの報告はリラキシンが乳組織に生長促進効果を有することを示す［Wright,L.C.およびAnderson,R.R. Adv. Exp. Med. Biol., 341（1982）］。結合組織への影響が示されたので、リラキシンは皮膚の弾性を改良することが示唆された。１９９２年２月２１日に発行された米国特許第５,１６６,１９１号は、リラキシンの心臓血管治療における使用を記載する。
米国特許第５,０２３,３２１号（１９９１年６月１１日発行）は、ヒトのプレプロリラキシンおよびそのサブユニットの製造を開示する。米国特許第４,８７１,６７０号（１９８９年１０月３日発行）は、ヒトプレプロリラキシンおよびそのサブユニットの発現用の遺伝子およびＤＮＡトランスファーベクターを開示する。
欧州特許公開第１０１,３０９号（１９８４年２月２２日公開）および同第１１２,１４９号（１９８４年６月２７日公開）は、ヒトリラキシンおよびヒトＨ２－リラキシンおよびそのアナログについてコードする遺伝子配列の分子クローニングおよびキャラクタリゼーションを開示する。
米国特許第４,５６５,２４９号（１９８７年４月７日発行）は豚のリラキシンまたはその改変した形またはアナログの合成方法を開示する。
オーストラリア特許第５６１,６７０号（１９８７年８月２６日発行）およびHaley等、DNA, 1, 155－162（1982）は、豚リラキシンの製造方法を開示し、Stewart等、NAR, 11, No.19, 6597－6609（1983）はE.coli中での豚リラキシンの発現を開示する。Reddy等（上書）は、E.coli中で発現された組換え豚プロリラキシンの精製方法を開示する。
Gold等（Abstr. Pap. Chem. Soc. 203 Meet., Pt.3, BTEC55（1992））は、Ａ鎖Ｂ鎖結合反応に基づくリラキシンの製造方法を開示する。そのＡ鎖はリフラクタイルボディ中の改変されたプロリラキシンとしてE.coli中で発現された。そのＡ鎖はその改変されたプロリラキシンから化学的な解裂により精製された。Ｂ鎖は第２のE.coli発酵で製造され、該発酵においてＢ鎖は分泌され、次に精製された。次にその２つの精製された鎖を酸化的な結合およびフォールディング反応で結合された。反応の間、１つの鎖内ジサルファイド結合および２つの鎖間ジサルファイド結合が形成された。２つの鎖結合工程は多くの工程および２つの鎖の製造のための２つの発酵の使用を必要とする。
Marriott等［Molecular Endocrinology, 6, 1441（1992）］は、Ａ－／Ｃ－鎖およびＢ－／Ｃ－鎖結合部において非天然の解裂部位を有するプロリラキシン変異体の哺乳類発現を開示する。

組換え発現

２つの鎖の結合方法に用いられるような、２回の発酵および多くの工程の使用を必要としない、プロリラキシンからのリラキシンの製造方法についての必要が存在する。商業的に実行可能な生物学的に活性なリラキシンの十分高い収量を提供するであろうプロリラキシン生成物の回収方法についての必要性が存在する。原核生物系で発現され、宿主で生成する物質または生物学的活性を減少させる組換えの副生物が混入していない、生物学的に活性なリラキシンに次にプロセシングされる単離されたプロリラキシンの必要性が存在する。

発明の概要

本発明は、商業的に有効な量および純度の生物学的に活性なリラキシンが、非天然プロリラキシン形を介して製造できるという、予期されない実験上の発見に基づく。本発明は、非天然のプロリラキシン形が首尾よくフォールドされ（folded）、天然のプロリラキシン

を用いて実現されるよりも高い収量で組換え系において生物学的に活性なリラキシンにプロセシングされるという、予期されない実験上の発見に基づく。
本発明は、リーダー配列、Ｂ－鎖、非天然Ｃ－ペプチド、およびＡ－鎖を有する、非天然プロリラキシン形の設計および構築に基づく。リーダー配列はプロリラキシンＢ－鎖に隣接する解裂部位を含み、非天然のＣ－ペプチドは、Ｂ－鎖／Ｃ－鎖結合およびＡ－鎖／Ｃ－鎖結合における解裂部位を含む。本発明は非天然のプロリラキシンからの、生物学的に活性なリラキシン製造の生成物回収方法の設計にも基づく。
本発明は、
（ａ）非天然プロリラキシンをコードする核酸を提供し（該プロリラキシンはリーダー配列、Ｂ－鎖、非天然のＣ－鎖、およびＡ－鎖を含んでなり、該リーダー配列はＢ－鎖配列に隣接する第１の解裂部位を含み、該非天然のＣ－鎖はＢ－鎖およびＡ－鎖にそれぞれ隣接する第２および第３の解裂部位を含んでなる）；
（ｂ）該非天然のプロリラキシンをコードする該核酸を含む原核細胞を培養し、該培養は該原核生物細胞中で該核酸を発現して非天然のプロリラキシンを製造し；
（ｃ）該培養方法により製造された該プロリラキシンを単離し、可溶化させ；
（ｄ）該可溶化させたプロリラキシンを再生させ；
（ｅ）該プロリラキシンから該リーダー配列および該非天然のＣ－ペプチドを切除し、切除は該解裂部位に特異的な解裂剤の使用により行い；そして
（ｆ）リラキシンを回収する、
ことを含んでなる、非天然プロリラキシンの発酵からのリラキシンの製造方法を提供することにより成し遂げられる。その方法はＡ－鎖Ｎ末端のグルタミンを環化することを更に含み得る。
本発明の好ましい態様においては、リラキシンはＨ２形のヒトリラキシンである。
本発明の１態様では、リーダー配列および非天然のＣ－ペプチドの切除は酵素的解裂による。
本発明の１態様では、リーダー配列および非天然のＣ－ペプチドの切削はトリプシンおよびカルボキシペプチダーゼＢ（ＣＰＢ）の使用により行われ、他の態様ではＡｒｇ ＣおよびＣＰＢの使用により行われる。リーダー配列の切除はエンドプロテイナーゼＡｓｐ Ｎおよびトリプシンを使用することにより好ましくは行われる。非天然のＣ－ペプチドの切除は、カルボキシペプチダーゼＢと共にＡｒｇ Ｃ、トリプシンまたはＬｙｓ Ｃの使用により、またはトリプシンおよびＡｒｇ Ｃにより好ましくは行われる。図２Ａ～２Ｄを参照。
本発明の１発明の１態様においては、可溶化したプロリラキシンは希薄なタンパク質濃度の条件下に再生（ｒｅｆｏｌｄ）される。本発明の他の態様では可溶化したプロリラキシンはコントロールされた酸化条件下に再生され得る。
他の態様において本発明は、リーダー配列、Ｂ－鎖、非天然のＣ－ペプチドおよびＡ－鎖を含んでなる単離されたプロリラキシンを提供する。

【図面の簡単な説明】

図１は、非天然のリーダー（「ＳＴII」）およびＣ－ペプチド（「ｍｉｎｉ Ｃ」）を含み、リーダーの後、並びにＣ－ペプチドおよびＢ鎖およびＡ鎖の間に解裂部位を有するプロリラキシンをコードするＤＮＡの構成を示す。
図２および２Ａ～２Ｄは、本発明の４つの構成物についての、リーダー配列、非天然のＣ－ペプチド、および酵素的な解裂部位を示す。（配列番号５～８）。
図３は、プラスミドｐＲＢ250ＣＴｓｃについての核酸およびアミノ酸配列を示す。図１も参照。（配列番号９）。
図４は、図３に示した非天然のプロリラキシンをコードする遺伝子を含んでなるプラスミドｐＲＢ250ＣＴｓｃの系統を示す。
図５は、ｐＲＢ250ＣＴｓｃ構築の中間プラスミドであるプラスミドｐＲＢ250Ｃの構築を説明する。
図６は、ｐＲＢ250ＣＴｓｃ構築の中間プラスミドであるプラスミドｐＲＢ250の構築を説明する。

図７は、pＲＢ250構築の中間体であるプラスミドpＲＢ192の構築を説明する。
図８は、pＲＢ192構築の中間体であるプラスミドpＲＢ151の構築を説明する。
図９は、pＲＢ192構築の中間体であるプラスミドpＲＢ51の構築を説明する。
図９Ａは、pＴＲ21からのＮot Ｉ-Ｂam ＨＩ断片を説明する。
図１０は、プラスミドpＲＢ11の部分配列を提供する。（配列番号10）
図１０Ａは、pＲＢ11の構築を説明する。
図１１は、pＲＢ151構築の中間体であるプラスミドpＲＢ61の構築を説明する。
図１２は、pＲＢ61構築の中間体であるプラスミドpＲＡ1の構築を説明する。
図１２Ａは、pＴＦ161の構築を説明する。
図１３は、プラスミドpＲＡ1構築の中間体であるプラスミドpＴＲ591の構築を説明する。
図１４は、pＴＲ591構築の中間体であるpＴＲ561の構築を説明する。
図１５は、pＲＢ61構築の中間体であるpＬＳ331amＢの構築を説明する。
図１６は、pＲＢ61構築の中間体であるpＴＦ271の部分配列を提供する。（配列番号11）
図１６Ａは、pＴＦ271の構築を説明する。
図１７は、pＲＢ250Ｃ構築の中間体であるpＲＢ192Ｃの構築を説明する。
図１８は、pＬＳ331amＢ構築の中間体であるpＬＳ32の構築を説明する。
図１８Ａは、pＬＳ8からの291bpのＨind III－ＢamＨＩ断片の配列を説明する。
図１９は、pＬＳ331amＢ構築の中間体であるpＡＰ1amＢの構築を説明する。

発明の詳細な記述

本明細書で用いる「リラキシン」は、Hudson等（EMBO J., 3, 2333（1984））に記載されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、およびリラキシンの定性的な生物学的活性を保持する、その天然のアレル等の天然のアミノ酸配列変異体として定義する。
組換えＤＮＡ技術を用いて導入されたもののような非天然のリラキシンアミノ酸置換、挿入または削除物、並びに例えばグリコシル化改変物のような、共有結合または非共有結合改変物も本発明の範囲内にある。但し最終のリラキシンが天然のリラキシンの定性的な生物学的活性を有するものとする。
「リラキシン」の語は、恥骨結合インビトロバイオアッセイ［Steinetz等、Endocrinology, 67, 102（1960）］。ラットの子宮平滑筋インビトロアッセイ［St. Louis, J. Can. J. Physiol. Pharmacol., 59, 507（1981）］、およびホルモン刺激後のｃＡＭＰレベルの測定［Braddon, S. A., Endocrinology, 102, 1292（1978）およびJudson等、J. Endocrinology, 87, 153（1980）］等の承認されたリラキシン分析において生物学的に活性であることが知られた、様々な形のヒトおよび非ヒトの動物リラキシンをも同様に指す。
本明細書で用いる「プロリラキシン」はＢ－、Ａ－、およびＣ－鎖を含んでなるリラキシンの前駆体を指し、「リラキシン」は上に定義した通りである。プロリラキシンの特徴は、それらが下に定義する非天然のＣ－鎖を含むことである。
本発明のプロリラキシン前駆体は天然源から得られ、化学的に合成され、または組換えＤＮＡ技術により製造されたプロリラキシンを含むことを意図する。本発明の非天然プロリラキシンのいくつかは、天然のＡ－およびＢ－鎖を結合した非天然のＣ－鎖を有する。本発明の非天然のプロリラキシンのいくつかは、天然の酵素解裂部位を含む非天然のＣ－鎖を有し、一方他の非天然のプロリラキシンは非天然の酵素解裂部分を含む。
本明細書中で用いる「Ｃ－鎖」の語は、プロリラキシンのＡおよびＢ鎖を結合するペプチドを指す。本発明の焦点は、天然には存在しない、プロリラキシンのＡおよびＢ鎖を結合するペプチドとここに定義した「非天然のＣ鎖」の使用である。本発明の好ましい非天然のＣ－鎖は、プロリラキシンのＡおよびＢ鎖を結合し、Ｂ－／Ｃ－鎖結合、およびＡ－／Ｃ－鎖結合部で解裂部位をコードするアミノ酸を含むペプチドである。約８～１５のアミノ酸を有するＣ－鎖が好ましい。
本明細書で用いるプロリラキシン「リーダー」、「リーダーペプチド」、「リーダー配列」、または「シグナル配列」の語は、プロリラキシンのＮ－末端に見出される短いアミノ酸配列を指す。好ましいリーダー配列は宿主の原核生物細胞のペリプラズムにプロリラキシンを向けるのに非または半機能的である。本発明の宿主細胞により製造されたプロリラ

キシンは、いわゆるリフラクタイルボディ中に典型的に見出され、それから精製される。
本発明の特に好ましいリーダー配列は、宿主細胞のペリプラズムへのプロリラキシンの分泌を達成するよりも、プロリラキシンの高発現を駆動させるのに用いるトランケートされたＳＴIIリーダー配列である。典型的にはＬysおよびＡrgを本発明の「リーダー配列」中に含ませ、リラキシンからのリーダー配列の解裂を可能にする。
モデルとして説明する典型的なリーダーは、ＭＫＫＮＩＡＦＬＬＫＲとし定義される。その均等物はＭＫＫＮＩＡＦＬＬＲＫ、ＭＫＫＮＩＡＦＬＬＲＲおよびＭＫＫＮＩＡＦＬＬＫＫを含む。有用なリーダーの付随的な特徴は、それがＢ－鎖からの解裂についてのタンパク質分解酵素解裂部位を有するということである。
本明細書で用いる「プロリラキシンからリラキシンを製造する方法」または「リラキシン製造のための生成物回収方法」という語句は、非天然プロリラキシンの設計と構築、プロリラキシンを作るための発酵法、およびリラキシンを精製するためのいずれかのその後の工程を言う。宿主細胞中に発現したプロリラキシンからリラキシンを精製する工程は、遠心による等のプロリラキシンリフラクタイルボディを単離し、プロリラキシンを可溶化し、可溶化したプロリラキシンを再生し、プロリラキシンリーダー配列およびＣ－ペプチドを解裂させ、リラキシンから不純物を除去し、リラキシンを最終製剤のための形で提供することを含むが、これに限定されない。これらの精製工程は限定というより説明的なものである。
「商業的に実行可能な、または有効な収量または量」の語は、プロリラキシンの原核細胞発酵からの最終リラキシン収量を言い、少なくとも約１０～１００mg／Ｌ、好ましくは約１００mg／Ｌ以上であると定義される。
「生物学的活性」の語、および文法上の均等物は野生型ヒトリラキシンにより示されるいずれの生物学的活性をも指す。リラキシンの生物学的活性は、例えば恥骨結合インビトロアッセイ［Ｓteinetz等，Ｅndocrinology，６７，１０２（１９６０）］、ラット子宮平滑筋インビトロアッセイ［Ｓt．Ｌouis，Ｊ．Ｃan．Ｊ．Ｐhysiol．Ｐharmacol．，５９，５０７（１９８１）］、およびホルモン刺激後のcＡＭＰレベルの測定［Ｂraddon，Ｓ．Ａ．，Ｅndocrinology，１０２，１２９２（１９７８）およびＪudson等，Ｊ．Ｅndocrinology，８７，１５３（１９８０）］等の認められたリラキシンアッセイで測定される。
本明細書で用いる「解裂剤」の語は、プロリラキシンを特異的に解裂し、所望に応じリーダー配列またはＣ－ペプチド等の或る成分を脱離させ、または切除するのに用いる試薬を言う。適当な解裂剤には、エンドプロテイナーゼ、例えばエンドプロテイナーゼＬysＣ、エンドプロテイナーゼＡrgＣ、エンドプロテイナーゼＡspＮ；トリプシン；カルボキシペプチダーゼＢ；プロホルモンコンベルターゼ（ＰＣ）、例えばフリン、ＰＣ1、ＰＣ２、ＫＥＸ２；サブチリシンまたはその変異体；および有機または無機酸、ヒドロキシルアミン、Ｎ－ブロモスクシンイミドおよび臭化シアン等の化学試薬を含む。
様々なタンパク質分解酵素により触媒されるペプチド結合の加水分解は、Ｔhe Ｅnzymes，３版、Ｂoyer編，Ａcademic Ｐress，III巻（１９７１）；Ｍeth．Ｅnzymol．，XIX巻，ＰerlmanおよびＬorand編，ニューヨーク，Ａcademic Ｐress，（１９７０）；Ｅnzymol．，XLV巻，Ｌorand編，ニューヨーク，Ａcademic Ｐress，（１９７６）；Ｄrapeau，Ｊ．Ｂiol．Ｃhem．，２５３，５８９９（１９７８），およびＤrapeau，Ｍeth．Ｅnzymol．，４７，８９（１９７７）に教示される。化学試薬の広範なリストについては、２２６ページの表IIIを含め、Ｗitcop，Ａdvances in Ｐrotein Ｃhemistry，Ａnfinsen等編，１６巻，２２１～３２１ページ，Ａcademic Ｐress，ニューヨーク（１９６１）を参照。
本発明に適した他の解裂剤は、解裂のための所望の結合、およびその試薬がプロリラキシンの還元型に作用するか酸化型に作用するのか心に止めて、当業者により理解されると考えられる。非天然のプロリラキシンの解裂に用いる条件は用いる解裂剤に依存し、その条件は用いる解裂剤を与えられた当業者には明らかであろう。
本発明において、所望の解裂剤により、所望の位置、すなわちリーダー配列の後で解裂を達成し、またはＣ－ペプチドを切除するのに必要なコドンを含むよう、非天然のプロリラキシンはデザインされ、構築される。所望のポリペプチド成分、この場合にはリラキシン

Ｂ－鎖またはＡ－鎖をコードする配列の５'末端コドンの上流に、好ましくは隣接して、若しくはポリペプチドの所望の成分のカルボキシ末端コドンの下流に、好ましくは隣接して、または単離されるべき所望の成分が、予期される翻訳生成物の内部アミノ酸配列であるなら両方に、適当なコドンを挿入することが必要であろう。

本発明においては、プロリラキシンリーダー配列およびＣ－ペプチドを同じ解裂方法により切除するするのが有効である。所望のホルモンであるリラキシンが生成する限り、リーダー配列／Ｂ－鎖結合、Ｂ－／Ｃ－鎖結合、およびＡ－／Ｃ－鎖結合で利用できる解裂部位を解裂できるいかなる酵素または化学試薬も使用できる。

オリゴヌクレオチドは、Crea等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5765（1978）、またはKunkel等、Methods in Enzymol., 154, 367（1987）に記載の技術等の当該技術分野で周知の技術を用いて容易に合成される。

１以上のアミノ酸で置換された変異体はいくつかの方法の１つで作ることができる。アミノ酸がポリペプチド鎖中において接近して位置するなら、それらは所望のアミノ酸置換物のすべてについてコードする１つのオリゴヌクレオチドを用いて同時にミューテートさせ得る。しかしながらアミノ酸が互いからいくらかの距離に離れて位置するなら（例えば１０以上アミノ酸により分離されている）、所望の変化のすべてをコードする単一のオリゴヌクレオチドを作るのはより困難である。その代わりとして、２つの別の方法の１つを用い得る。第１の方法では別のオリゴヌクレオチドを置換すべき各アミノ酸について作る。そのオリゴヌクレオチドを１本鎖の鋳型ＤＮＡに同時にアニールする。鋳型から合成されるＤＮＡの第２の鎖は所望のアミノ酸置換物のすべてをコードするであろう。その別法は、所望の変異体を製造するために２ラウンド以上の突然変異誘発を必要とする。

野生型のプロリラキシンまたは当該技術分野で知られた突然変異体分子をコードする核酸配列の突然変異体を作る他の方法は、出発プロリラキシン分子をコードする核酸配列を制限酵素を用いる消化により適当な位置で解裂し、適当に解裂した核酸を回収し、所望のアミノ酸配列およびブラント末端を有するポリリンカー等のフランキング領域をコードする。オリゴヌクレオチドを合成し（または、ポリリンカーの代わりに、プロリラキシンをコードする核酸を解裂するのにも用いる制限酵素でその合成オリゴヌクレオチドを消化し、それによって付着末端を作り）、その合成核酸をプロリラキシンをコードする構造遺伝子の残りにライゲートすることを含む。

例えば米国特許第４,６８３,１９５号（１９８７年７月２８日発行）、およびCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubel等編、Green Publishing Associates and Wiley-Interscience,２巻、１５章、１９９１年に記載されたように、ＰＣＲ突然変異誘発も本発明のプロリラキシン変異体を作るのに適している。以下の議論はＤＮＡについてであるが、その技術はＲＮＡについても利用できることが理解される。変異体第２プライマーを用いるか、または異なった変異体プライマーで第２のＰＣＲを行い、２つの生成したＰＣＲフラグメントをベクターフラグメントへ３（または以上）部分ライゲーションにより同時にライゲートすることにより、別の位置での変異を同時に導入できる。

ＲＮＡ、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、合成ＤＮＡ、またはＤＮＡの結合に由来するリラキシンの核酸を、更なるクローニング（核酸の増幅）用、または発現用の複製可能なベクターに挿入する。所望のコーディングおよびコントロール配列を含む適当なベクターの構築には標準的な組換え技術を用いる。単離されたプラスミドまたは核酸フラグメントを解裂し、仕立て、再ライゲートして所望のプラスミドを形成する。

多くのベクターが利用可能であり、適当なベクターの選択は、１）それが核酸の増幅に用いるのか核酸発現に用いるのか、２）ベクターに挿入されるべき核酸の大きさ、および３）ベクターで形質転換される宿主細胞による。それぞれのベクターは、その機能（核酸の増幅または核酸の発現）およびそれが両立できる宿主細胞に依存して、様々な成分を含む。ベクター成分は次の１以上を含むがそれらに限定されない：シグナル配列、複製起点、１以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終結配列。

本発明の好ましい複製可能なベクターは、非天然のプロリラキシンの発現とプロリラキシ

ンＢ－鎖の正しいＮ－末端プロセシングを可能にするリーダー配列、トリプトファン（trp）プロモーター、ラムダ$_{t_0}$終結配列、ｐＢＲ322複製起点、抗生物質抵抗性遺伝子、および非天然のＣ－ペプチドにより連結されたリラキシンＡおよびＢ鎖（ＣペプチドはＢ－／Ｃ－鎖およびＡ－／Ｃ－鎖結合で酵素解裂部位を含む）を含むものである。

原核生物はプロリラキシンの最初のクローニング工程のための好ましい宿主細胞である。それらは、大量の核酸の急速な製造に、部位特異的突然変異誘発に用いる１本鎖核酸鋳型の製造に、多数の変異体の同時スクリーニングに、および生じた変異体の核酸配列決定に特に有用である。プロリラキシンの製造における使用に適した原核生物、例えばE.coli、および発現ベクターの例は、例えば国際出願ＷＯ９０／０２７９８号（１９９０年３月２２日公開）に開示されたものである。プロリラキシンＤＮＡ配列のクローニングに用いる原核生物は、例えば、E.coli Ｋ12株294（ATCC No.31446）、E.coli Ｂ、およびE.coli Ｘ1776（ATCC No.31537）を含む。

原核生物は発現にも用いられる。クローニングまたはベクター発現に適した宿主細胞はE.coli細胞である。E.coli株Ｗ3110（Ｆ$^-$、Ｉ$^-$、原栄養菌、ATCC No.27325）は特に好ましい宿主である。何故ならそれは組換えＤＮＡ製品発酵用の一般的な宿主株であるからである。好ましくは宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌すべきである。菌株Ｗ3110を改変してタンパク質をコードする遺伝子中の遺伝的変異を行ってもよい。そのような宿主の例には、完全な遺伝子型tonＡΔを有するE.coli Ｗ3110株1Ａ2；完全な遺伝子型tonＡΔptr3を有するＷ3110株9Ｅ4；完全な遺伝子型tonＡΔptr3 phoＡΔＥ15Δ（argF-lac）169ompＴΔdegＰ41kan^{r}を有するE.coli Ｗ3110株27ＣＡ（ATCC No.55244）；完全な遺伝子型tonＡΔptr3 phoＡΔＥ15 4（argF-lac）169ompＴΔdegＰ41kan^{r}rbs7ΔilvＧを有するE.coliＷ3110株37Ｄ6；非カナマイシン抵抗性のdegＰ削除突然変異を有する株37Ｄ6であるE.coli株Ｗ3110株40Ｂ4m、および米国特許第４,９４６,７８３号（１－９９０年８月７日発行）に開示された変異体ペリプラズムプロテイナーゼを有するE.coli株を含む。クローニングおよび発現の方法論は当該技術分野でよく知られており、例えば前述の公開されたＰＣＴ特許出願（ＷＯ９０／０２７９８号）に開示されている。

プロリラキシンの発酵は、当該技術分野でよく知られた方法論により行われ、例えばElander, Genetic Engineering Technology in Industrial Pharmacy, John M. Tabor編、Marcel Dekker, 115-129（1989）に開示されている。しかし各発酵方法を至適化するのに多くの発酵の変法が存在する。発酵の進歩の主な目標は細胞マスを至適化し、生成物の蓄積を最大にすることである。大規模発酵とは、体積的な能力、すなわちヘッドスペースのための適当な空間をのこした残した作業用空間が少なくとも約１０００Ｌであるファーメンター中での発酵を言う。小規模発酵とは容積的な能力で約１００Ｌ以下、好ましくは１０Ｌ以下のファーメンター中での発酵を言う。

発酵ブロスからの粗生成物の単離は、濾過、遠心分離および／または沈降、沈殿および傾斜または技術の組合せの使用により行い得る。リフラクタイルボディの形の粗生成物の単離には、細胞からリフラクタイルボディを遊離させるために、細胞を崩壊させるという第１の工程を必要とする。細胞崩壊の方法にはソニケーション、ホモジナイザーを通すこと、およびリゾチーム、洗剤、または他の薬剤の使用による細胞溶解がある。

リフラクタイルボディが細胞から遊離すると、そのリフラクタイルボディは、大きさおよび溶解性等の物理的および化学的性質の差異に基づいて残りの発酵溶液から分離し得る。沈殿とは単純な重力場における沈降をいい、一方遠心分離は遠心力による高められた沈降速度の創出を必要とする。本発明においては発酵ブロスから粗プロリラキシンを単離する好ましい方法は、細胞からプロリラキシンのリフラクタイルボディを遊離するためのある種の細胞崩壊、およびその後のリフラクタイルボディを軽い固体廃棄物および液体から分離するのを可能にするいずれかの遠心技術を含む。本発明において、好ましい形の機械的な細胞崩壊はホモジナイゼーションであり、好ましい遠心分離技術は大容量の連続流動の、ソリッドボウル遠心分離である。

タンパク質が、細胞内リフラクタイルボディの形で発現される場合には、生成物回収方法には、リフラクタイルボディを可溶化し、可溶化したタンパク質を再生し（renature）、

適当な場合には調節された酸化を行う工程を含み、有用な生成物を得る。発酵ブロスから粗プロリラキシンリフラクタイルボディを単離した後に、そのプロリラキシンリフラクタイルボディを可溶化し、再生させる（refold）。
リフラクタイルボディ中のタンパク質を可溶化するのに用いる溶媒には、グアニジン－ＨＣｌ（ＧｕＨＣｌ）（８Ｍまで）、尿素（８Ｍまで）、ＳＤＳ、アルカリ性のpH（＞８．０）、酸のpH（＜３．０）、およびアセトニトリル／プロパノールを含むが、これ等に限定されない。本発明のプロリラキシンリフラクタイルボディのための好ましい可溶化緩衝液は、ＧｕＨＣｌ、３．５～４．０Ｍ、または尿素、２～８Ｍである。本発明において、ＰＥＩ（ポリエチンイミン）を汚染物を沈殿させながらプロリラキシンを可溶形に保持するのに用いる。
可溶化されたタンパク質の再生は、ジサルファイド架橋を含むタンパク質の再生前または同時の還元されたタンパク質の酸化と共に、可溶化剤を少なくし、または除去する（例えば透析または希釈により）ことにより行うことができる。本発明においては再生工程をレドックス緩衝液を用いる酸化的な環境で行うのが好ましい。本発明においては、実行可能な希薄濃度で再生を行うのが好ましく、溶液の作業可能な体積および次の精製工程のための高希釈による起こりうるロスを考慮に入れる。グラムで表してリフラクタイルボディ重量の６０～１００倍の範囲の希釈物を用いるのが最も好ましい。可溶化および再生工程の間、プロリラキシンアミノ酸側鎖の誘導体化をもたらす条件にさらす（例えば９．０以上のpH値に長時間さらす）ことを最小限にすることも好ましい。システイン残基を含み、天然型でジサルファイド結合を含むプロリラキシン等のタンパク質を再生するためには、可溶化および再生工程に存在する還元／酸化条件は重要であり、タンパク質特異的である。本発明においては可溶化および再生工程は２～８℃で行うのが好ましい。
再生の後、他のタンパク質、混在している封入小体中に存在する混入核酸および再生中間体を除去し、プロリラキシンを単離し、濃縮するため精製工程が必要である。次例は適当な精製工程の例示である：イムノアフィニティカラムまたはイオン交換カラムによる分別、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカカラムによるクロマトグラフィー、電気泳動、硫酸アンモニウム沈殿、ゲル濾過、限外濾過／ダイアフィルトレーション、金属キレート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。
混入物から所望の生成物を精製するのに用いるクロマトグラフマトリックスは商業的に入手できる。クロマトグラフマトリックスの総説は、Marston等の上書、およびGuide to Protein Purification, Deutscher編、Academic Press, Inc., 309頁（1990）に与えられている。
本発明においては、プロリラキシンのリラキシンへの解裂は、プロリラキシンの再生およびその後の可溶化剤の除去の後に行うのが好ましい。解裂方法は議論した化学的解裂または酵素的解裂を含む。
本発明においては、好ましい方法はリラキシンＡ鎖Ｎ－末端グルタミンの環化工程を含む。Ａ鎖Ｎ－末端グルタミンの環化のためのどのような方法も用いることができる。そのような方法の例は、好ましくは僅かに酸性条件下の熱処理、イミダゾール等の親核試薬による中性pHでの処理である。Ｎ－末端Ａ鎖を環化するのに用いるどのような方法も、環化工程自体により生じる混入物を除去するための更なる精製工程を必要とするかも知れず、遠心分離、カラムクロマトグラフィーまたは沈殿技術を含む。
リラキシンを最終の製剤の形で提供する最終生成品の精製は、クロマトグラフィー、有機溶媒除去。限外濾過／ダイアフィルトレーションの工程を含む。
典型的には、本発明の方法で用いるリラキシンは、それを、周囲温度で、適当なpHで、所望の純度で、薬学的に許容し得る担体、すなわち用いる用量および濃度でレシピエントに非毒性の担体と混合することにより製剤化する。適当な担体およびその製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences,16版、1980、Mack Publishing Co., Oslo等編に記載されている。これらの組成物は有効量のリラキシンを、例えば約０．０００３mg／mＬ以上、約８mg/mＬ以上のオーダーで適当な量の担体と共に含み、患者への有効な投与に適した薬学的に許容し得る組成物を作る。

製剤のpHは好ましくは約３～約８の任意の範囲である。pH５の酢酸塩緩衝液中の製剤は適当な実施態様である。リラキシン用の好ましい製剤は、緩衝化され、または緩衝化されない溶液であり、好ましくは２０mM酢酸ナトリウム、pH５.０である。
リラキシンの臨床的投与に特に適した組成物は無菌の水溶液、または凍結乾燥したタンパク質等の無菌の水和可能な（Hydratable）粉末を含む。典型的には、適当な量の薬学的に許容し得る塩も製剤に用い、製剤を等張性にする。
無菌は（０.２ミクロン）膜を通す無菌濾過により容易に達成できる。再構成のための凍結乾燥した製剤も許容し得るが、リラキシンは通常水溶液として貯蔵するであろう。
リラキシン組成物は良好な医学的プラクティスと一致した方法で製剤化し、投薬し、投与する。これに関して考慮する要素は、治療する個々の疾患、治療する個々の哺乳動物、各患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の運搬部位、投与方法、投与のスケジュール、および医療関係者に知られた他の要素を含む。投与すべきリラキシンの「治療的に有効な量」はそのような考慮により支配され、疾患を予防し、改善し、治療するのに必要な最小量である。
一般的な案として、用量あたり投与するリラキシンの薬学的に有効な量は、１日当り、患者の体重１kgにつき約０.００１～１００mgの範囲であり、リラキシンの典型的な範囲は０.００５～５０mg／kg／日である。
本発明は次の実施例を参照してさらに完全に理解されるであろう。しかし実施例は本発明の範囲を制限するものと解釈すべきでない。すべて引用した文献は本明細書の一部を構成する。

実施例１

天然には存在しないプロリラキシンモデルに対する発現ビヒクルの構築

プラスミドpRB２５０CTscは、プロリラキシン（第１図および第３図で示す通り、トリプシン並びにトリプシン／カルボキシペプチダーゼ酵素的開裂部位をA／C鎖ジャンクションおよびB／C鎖ジャンクションに有する、天然には存在しないリーダー配列および天然には存在しないC－ペプチドを含有するハドソン（Hudson）ら，［ヨーロピアン・モレキュラー・バイオロジー・オーガニゼーション・ジャーナル（EMBO J.）３，２３３３（１９８４）］で開示された配列から誘導されるリラキシンAおよびB鎖）を含む。大腸菌（E.Coli）においてプロリラキシン遺伝子を発現するのに必要とされる転写および翻訳配列は、pHCH２０７－１から誘導されるトリプトファン（Trp）プロモーターにより与えられる［デボーア（deBoer）ら、［プロモーターズ：ストラクチャー・アンド・ファンクション（Promoters：Structure and Function），ロドリゲツ（Rodriguez）およびチェンバーリン（Chamberlain）版，M.J.ペガー（Paeger）出版社，ニューヨーク ４６２（１９８２）］から］。ラムダt_0転写ターミネーター［スカルティシーズ（Scholtisses）ら，NAR １５，３１８５（１９８７）］は、プロリラキシン終止コドンに隣接した位置にある。プラスミドpRB２５０CTscは、形質転換宿主にテトラサイクリン耐性を与える。プラスミドpRB２５０CTscは、pBR３２２ベクターを起源とする複製起点を有する［ストクリフ（Sutcliff），コールド・スプリング・ハーバー・シンポジウム・オン・クオンティタティブ・バイオロジー（Cold Spring Harbor symposium on Quantitative Biology）４３，７７（１９７８）］。
プラスミドpRB２５０CTscはまた、アミノ酸リジン（Lys）およびアルギニン（Arg）が3'に続く、大腸菌（E.Coli）の熱安定エンテロトキシンII（ST II）遺伝子を起源とする９つのアミノ酸も有する［ピッケン（Picken）ら，インフェクション・アンド・イムニティ（Infect. Immun.）４２，２６９（１９８３）］。
LysおよびArgを加えたST IIの９つのアミノ酸は、Trpプロモーターの3'に位置して、与えられた簡便な開裂部位を有する、天然には存在しないプロリラキシンを高いレベルで発現させることから、酵素的開裂によるプロリラキシンB鎖の正しいN－末端プロセシングを発生させる。ST IIの９つのアミノ酸は、機能リーダー配列をコードしない。
プラスミドpRB２５０CTsc：プラスミドpRB２５０CTscは、第４図で示す通り、Trpプロモーターを含むプラスミドpRB２５０、天然には存在しないプロリラキシンコー

ド配列を２５０塩基対のＸba ＩからＨind IIIのフラグメント上に含むｐＲＢ２５０Ｃ、およびラムダt_0転写ターミネーターを４１２塩基対のＳtu ＩからＢam ＨＩのフラグメント上に含むpdh１０８を中間体として用いる、幾つかの工程を経て構築された。

プラスミドｐＲＢ２５０：プラスミドｐＲＢ２５０は、ＬysおよびＡrgに関するコドンを加えた、ピッケンら，［インフェクション・アンド・イムニティ ４２，２６９（１９８３）］で記載されている熱安定エンテロトキシンII（ＳＴ II）リーダー配列（ＭＫＫＮＩＡＦＬＬ）の９つのアミノ酸にＴrpプロモーター／オペレーターを連結させる結果得られる。ｐＲＢ２５０は、第６図で示す通り、３つのＤＮＡフラグメントを一緒に連結することにより製造された。これらのうち第１フラグメントは、Ｂss ＨIIからＸba Ｉまでの小さなフラグメントが除去された、第７図で示すベクターｐＲＢ１９２であった。第２フラグメントは、ＬysおよびＡrgを加えたＳＴ IIの９つのアミノ酸をコードする、合成二本鎖のＲel ６０である。

MetLysLysAsnIleAlaPheLeuLeuLysArg

5'-CTAGAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTCTTCTTAAACGGG-3'

3'-TTAATACTTTTTCTTATAGCGTAAAGAAGAATTTGCCCTGA-5'

第３フラグメントは、プラスミドｐＲＢ５１を起源とするＨinf ＩからＢss ＨIIのフラグメントであり、この構築を第９図に記載する。

プラスミドｐＲＢ２５０Ｃ：プラスミドｐＲＢ２５０Ｃは、アミノ酸のＬysおよびＡrgを加えたＳＴ IIリーダーの９つのアミノ酸にＴrpプロモーターを連結させる結果得られて、天然には存在しないプロリラキシン、さらにはまた天然に存在するテトラサイクリン耐性遺伝子プロモーターに欠けたテトラサイクリン耐性遺伝子も含む。

ｐＲＢ２５０Ｃは、第５図で示す通り、３つのフラグメントを一緒に連結することにより製造された。これらのうち第１フラグメントは、Ｘba ＩからＢam ＨＩまでの小さなフラグメントが除去されたベクターｐＲＢ１９２であった。第２フラグメントは、ｐＲＢ１９２Ｃを起源とするＮot ＩからＢam ＨＩのフラグメントであり、これは天然には存在しないプロリラキシンを起源とするＣ－ペプチドを含んでなる。第３フラグメントは、ｐＲＢ２５０を起源とする約７５塩基対のＮot ＩからＸba Ｉのフラグメントである。

プラスミドpdh１０８：プラスミドpdh１０８は、スカルティシーズら，上記で記載されているようなラムダ転写ターミネーターを含む。

プラスミドｐＲＢ１９２：プラスミドｐＲＢ１９２は、ＬysおよびＡrgを加えたブタ成長ホルモンの９つのアミノ酸が後に続く、アミノ酸のメチオニンに連結したＴrpプロモーターを含み、また天然に存在するプロリラキシンも含む。ｐＲＢ１９２は、第７図で示す通り、３つのフラグメントを一緒に連結することにより製造された。これらのフラグメントのうち第１フラグメントは、Ｘba ＩからＢss ＨIIの小さなフラグメントが除去されたベクターｐＲＢ１５１であった。第２フラグメントは、ＬysおよびＡrgを加えたブタ成長ホルモンの９つのアミノ酸にメチオニンが加えられた配列を有する、合成二本鎖のＲel ５２であった。

MetPheProAlaMetProLeuSerSerLysArg

5'-CTAGAATTATGTTCCCAGCTATGCCTCTATCTAGTAAACGGG-3'

3'-TTAATACAAGGGTCGATACGGAGATAGATCATTTGCCCTGA-5'

第３フラグメントは、ｐＲＢ５１を起源とする４６塩基対のＨinf ＩからＢssＨIIのフラグメントであった。

プラスミドｐＲＢ１９２Ｃ：プラスミドｐＲＢ１９２Ｃは、ＬysおよびＡrgを加えたブタ成長ホルモンの９つのアミノ酸が後に続くメチオニンにＴrpプロモーターを連結させる結果得られて、天然には存在しないプロリラキシンをさらに含む。プラスミドｐＲＢ１９２Ｃは、プロモーターに欠けたテトラサイクリン耐性遺伝子を含む。ｐＲＢ１９２Ｃは、第１８図で示す通り、３つのフラグメントを一緒に連結することにより製造された。第１フラグメントは、プラスミドｐＲＢ１９２を起源とするＢss ＨIIからＥco ＲＶまでの大きな

ベクターフラグメントであった。第２フラグメントは、天然には存在しないプロリラキシンの配列：

GlnIleAlaIleCysGlyMetSerThrTrpSerLysArgLysProThrGlyTyr
5'-CGCGCAGATTGCCATTTGCGGCATGAGCACCTGGAGCAAAAGGAAACCCACTGGTTAT
3'-GTCTAACGGTAAACGCCGTACTCGTGGACCTCGTTTTCCTTTGGGTGACCAATA
GlySer
GGTTCT-3'
CCAAGAGC-5'

を含む、合成二本鎖のＲｅｌ ５８であった。

第３フラグメントは、リラキシンＡ鎖およびテトラサイクリン耐性遺伝子の５'末端を含むｐＲＢ１９２の、２００塩基対のＴａｑ ＩからＥｃｏ ＲＶのフラグメントであった。

プラスミドｐＲＢ１５１：プラスミドｐＲＢ１５１は、プロリラキシンコード配列にＴｒｐプロモーターを連結させる結果得られて、第８図で示す通り、２つのフラグメントを一緒に連結することにより製造された。これらのうち第１フラグメントは、プラスミドｐＲＢ６１を起源とするＰｓｔ ＩからＸｂａ Ｉのベクターフラグメントである。第２フラグメントは、［デボーアら、［プロモーターズ：ストラクチャー・アンド・ファンクション，ロドリゲツおよびチェンバーリン版，Ｍ.Ｊ.ペガー出版社，ニューヨーク４６２（１９８２）］から］で記載されている通り、プラスミドｐＨＧＨ２０７－１を起源とするＰｓｔ ＩからＸｂａ Ｉのフラグメント上にＴｒｐプロモーターを含む。

プラスミドｐＲＢ５１：プラスミドｐＲＢ５１は、完全なＳＴ IIリーダー配列にアルカリホスファターゼプロモーターを連結させる結果得られて、また天然に存在するプロリラキシン配列も含む。ｐＲＢ５１は、第９図で示す通り、２つのフラグメントを一緒に連結することにより製造された。第１フラグメントは、プラスミドｐＲＢ１１を起源とするＮｏｔ ＩからＢａｍ ＨＩまでの大きなベクターフラグメントであった。第２フラグメントは、プロリラキシンのアミノ酸配列１２～１６１をコードするｐＴＲ２１を起源とする、Ｎｏｔ ＩからＢａｍ ＨＩの小さなフラグメントであって、その配列を第９Ａ図に示す。ｐＲＢ１１は、ＳＴ IIシグナル配列の助けを借り、大腸菌（Ｅ.Ｃｏｌｉ）においてリラキシンＢ鎖が発現するよう設計した発現プラスミドである。発現するのに必要とされる転写および翻訳配列は、ＡＰプロモーター、並びにトリプトファン（Ｔｒｐ）およびＳＴ IIシャイン・ダルガーノ配列により与えられる。ｐＲＢ１１のプラスミド起点およびテトラサイクリン耐性遺伝子は、ＡｖａＩおよびＰｖｕIIのエンドヌクレアーゼ制限部位の間のヌクレオチド配列を欠失させることから、１細胞につきより多数のプラスミドコピーが結果的に得られるよう変化したｐＢＲ３２２プラスミドから誘導される。リラキシンＢ鎖に関するコード配列は、プロリラキシンＨ２のｃＤＮＡクローンから得られた［ハドソンら，ヨーロピアン・モレキュラー・バイオロジー・オーガニゼーション・ジャーナル ３，２３３３（１９８４）］。アルカリホスファターゼ（ＡＰ）プロモーターおよび熱安定エンテロトキシンII（ＳＴ II）シグナル配列は、チャング（Ｃｈａｎｇ）ら，ジーン（Ｇｅｎｅ）５５，１８９（１９８７）で記載されている。ｐＲＢ１１の配列を第１０図に示す。

プラスミドｐＲＢ６１：プラスミドｐＲＢ６１は、天然に存在するプロリラキシンコード配列にアルカリホスファターゼプロモーターを連結させる結果得られる。ｐＲＢ６１は、第１１図で示す通り、４つのフラグメントを一緒に連結することにより製造された。第１フラグメントは、第１５図で示すようなベクターｐＬＳ３３ｌａｍＢを起源とするＥｃｏ ＲＩからＨｉｎｄ IIIのベクターフラグメントであった。第２フラグメントは、第１６図で示すようなプラスミドｐＴＦ２７１を起源とする４１２塩基対のＥｃｏ ＲＩからＸｂａ Ｉのフラグメントであった。プラスミドｐＴＦ２７１は、ＳＴ IIシグナル配列の助けを借り、大腸菌（Ｅ.Ｃｏｌｉ）のペリプラズム中へ成熟したヒト組織因子の最初の２４３のアミノ酸が発現するよう設計されている。発現するのに必要とされる転写および翻訳配列は、アルカリホスファターゼプロモーター、並びにＴｒｐおよびＳＴ IIシャイン・ダルガーノ配列により

与えられる。ヒト組織因子に関するコード配列は、フィッシャー（Ｆisher）ら，トロンボシス・リサーチ（Ｔhrom.Res.）４８，８９（１９８７）により記載されている。アルカリホスファターゼプロモーター、トリプトファン（Ｔrp）および熱安定エンテロトキシンII（ＳＴ II）シャイン・ダルガーノ配列、並びにＳＴ IIシグナル配列は、phＧＨ－１から誘導された［チャングら，ジーン ５５，１８９（１９８７）］。プラスミド起点およびテトラサイクリン耐性遺伝子は、pＢＲ３２２から誘導された［ストクリフ，コールド・スプリング・ハーバー・シンポウジア・オン・クオンティタティブ・バイオロジー，第４３巻，７７（１９７８）］。

第３フラグメントは、プラスミドpＰrePｒoRelＨ２Ｔrp２０７を起源とするＸba ＩからＢgl IIの小さなフラグメントである。pＰrePｒoRelＨ２Ｔrp２０７は、ＨＧＨコード配列がプロリラキシンの配列で置換されたpＨＧＨ２０７の誘導体である［１９８７年５月５日に発行された米国特許第４,６６３,２８３号で記載されている通り］。第４フラグメントは、ベクターpＲＡ１を起源とする２４塩基対のＢgl IIからＨind IIIのフラグメントである。

プラスミドpＬＳ３３lamＢ：pＬＳ３３lamＢは、第１５図で示す通り、３つのＤＮＡフラグメントを一緒に連結することにより構築された。これらのうち第１フラグメントは、Ｘba Ｉ－ＢstＥIIIの小さなフラグメントが除去された、以下に記載するベクターpＬＳ３２であった。第２フラグメントは、ｌamＢシグナル配列をコードする、以下に記載するpＡＰlamＢを起源とする７５塩基対のＸba Ｉ－ＥaeＩのフラグメントであった。第３フラグメントは、以下の配列を有する４６塩基対の合成ＤＮＡ二本鎖であった。

5'-GGCCACTCTGTGCGGTGCTGAACTGGTTGACGCTCTGCAGTTTGTTTGCG-3'

3'-TGAGACACGCCACGACTTGACCAACTGCGAGACGTCAAACAAACGCCACTG-5'

上記配列は、成熟したＩＧＦ－Ｉのアミノ酸４～１８をコードする。

ＰＬ３２は、ＩＧＦ－Ｉコード配列が熱安定エンテロトキシン II（ＳＴ II）シグナル配列のコード配列に融合する結果得られて、第１８図で示す通り、４つのＤＮＡフラグメントを一緒に連結することにより製造された。これらのうち第１フラグメントは、組織因子遺伝子を含むＮsiＩ－Ｂam ＨＩの小さなフラグメントが除去された、ベクターpＴＦ２Ａ１２であった［パボルスキー（Ｐaborsky）ら，バイオケミストリー（Ｂiochemistry）２８，８０７２（１９８９）］。ＳＴ IIシグナル配列は、ピッケンら，インフェクション・アンド・イムニティ ４２，２６９（１９８３）］により記載されている。第２フラグメントは、成熟したＩＧＦ－Ｉの最初の１８のアミノ酸をコードする５５塩基対の合成二本鎖であった。

この二本鎖は、以下の配列を有する。

5'-GGTCCCGAAACTCTGTGCGGTGCTGAACTGGTTGACGCTCTGCA

3'-ACGTCCAGGGCTTTGAGACACGCCACGACTTGACCAACTGCGAGACGT

GTTTGTTTGCG-3'

CAAACAAACGCCACTG-5'

連結反応における第３部分は、ＩＧＦ－Ｉの残留アミノ酸１９～７０をコードする、pＫ１ＺＺ ＩＧＦ－Ｉを起源とする１５４塩基対のＢstＥIIからＨind IIIのフラグメントであった。pＫ１ＺＺ ＩＧＦ－Ｉは、プロテインＡシグナルに結合するプロテインＡプロモーターに取り付けた、ＩgＧsおよび分泌タンパクを結合するプロテインＡを起源とする２つの共通ｚ領域に結合した、Ａsn－Ｇly界面をコードする２つのコドンを用いて合成ＩＧＦ－Ｉ遺伝子に融合したlacプロモーターを含み、また５つ多いコピー数までＦ領域も含むカナマイシン耐性プラスミドである。このプラスミドは、１９８７年８月５日に公開された欧州特許公開第２３０,８６９号で記載されているpＺＺ－ＩＧＦ－Ｉに類似しており、そこでは、アンピシリン遺伝子がカナマイシン遺伝子で置換されている。pＬＳ３２の構築において第１８Ｂ図に示された最後のフラグメントは、プラスミドpＬＳ８を起源とする２９１塩基対のＨind III－Ｂam ＨＩのフラグメントであった。この最後のフラグメ

ントは単に、Hind III制限部位がメチオニン開始コドンのすぐ上流になるよう工夫された、pＢＲ３２２のテトラサイクリン遺伝子の開始点に関するコード配列というだけである［ストクリフ，コールド・スプリング・ハーバー・シンポウジア・オン・クオンティタティブ・バイオロジー ４３，７７（１９７８）］。

プラスミドpＡＰlamＢ：プラスミドpＡＰlamＢは、第１９図で示す通り、２つのＤＮＡフラグメントを一緒に連結することにより構築され、ＡＰプロモーターおよびＴrpシャイン・ダルガーノ配列の下流にlamＢシグナルコード配列を置く結果得られる。連結反応には、Ｘba Ｉ－Bgl IIの小さなフラグメントが除去されたベクターpＲＡ１が伴われた。このプラスミドは、pＨＧＨ１の誘導体であり［チャングら，ジーン ５５，１８９（１９８７）］、この後者のプラスミドは、ＡＰプロモーター、ＳＴ IIシグナルおよびＨＧＨをコードするＤＮＡを含む。pＲＡ１は、hＧＨではなくリラキシンＡ鎖をコードするＤＮＡ［この配列は、米国特許第４,７５８,５１６号で記載されている］を含み、またプロモーターおよびリボソーム結合部位の下流に簡便なBgl II制限部位を含むという点でpＨＧＨ１とは異なる。連結反応における第２部分は、lamＢシグナル配列をコードする、以下の配列を有する８０塩基対の合成ＤＮＡ二本鎖であり、これは、クレメント（Ｃlement）およびホフヌング（Hofnung），セル（Cell）２７，５０７（１９８１）により記載されている。

```
5'-CTAGAATTATGATGATTACTCTGCGCAAACTTCCTCTGGCGGTTG
    3'-TTAATACTACTAATGAGACGCGTTTGAAGGAGACCGCCAAC
CCGTCGCAGCGGGCGTAATGTCTGCTCAGGCCATGGCCA-3'
GGCAGCGTCGCCCGCATTACAGACGAGTCCGGTACCGGTCTAG-5'
```

プラスミドpＲＡ１：プラスミドpＲＡ１は、アルカリホスファターゼプロモーターをＳＴ IIリーダー配列に融合させる結果得られ、リラキシンＡ鎖のコード配列をさらに含む。pＲＡ１は、第１２図で示す通り、３つのＤＮＡフラグメントを一緒に連結することにより製造された。第１フラグメントは、第１２Ａ図で記載されている通り、pＧＨ１［チャングら，ジーン ５５，１８９（１９８７）］およびpＴＦ１１１［パボルスキーら，バイオケミストリー ２８，８０７（１９８９）］の誘導体であるプラスミドpＴＦ１６１を起源とする、Nsi ＩからNhe Ｉの大きなベクターフラグメントであった。第２フラグメントは、以下の配列を有する合成二本鎖のＲel ３６である。

```
    5'-CAACTCTACAGTGCATTGGCTAATAAATGTTGCCATGTTGGTTGTACC
 3'-ACGTGTTGAGATGTCACGTAACCGATTATTTACAACGGTACAACCAACATGG
AAAA-3'
TTTTCTAG-5'
```

第３フラグメントは、プラスミドpＴＲ５９１を起源とする２２４塩基対のBgl IIからNhe Ｉのフラグメントであった。

プラスミドpＴＲ５９１：プラスミドpＴＲ５９１は、ヒトプロリラキシンにＴrpプロモーターを連結させる結果得られる。pＴＲ５９１は、第１３図で示す通り、３つのフラグメントを一緒に連結することにより製造された。第１フラグメントは、第１４図で示し、また国際特許公開ＷＯ ９０／１３６５９で記載されているようなプラスミドpＴＲ５６１を起源とするBgl IIからBam ＨＩのフラグメントであった。第２フラグメントが、pＴＲ５６１を起源とする２６塩基対のＡlu ＩからBgl IIのフラグメントである一方、第３フラグメントは、ＲＢＲ３２２を起源とする３４４塩基対のＡlu ＩからBam ＨＩのフラグメントである。

プラスミドpＲＢ２５０ＣＴscの他に、天然には存在しないリーダーおよびＣ－ペプチドを有するプロリラキシンを含んでなる他のプラスミドは、第２図で示す通り、構築された。

実施例２～４

酵素的開裂部位を有する、天然には存在しないリーダー－Ｃ－ペプチドを含んでなる、プ

ロリラキシン発現ベクターのpＲＥＬＣIII、pＲＥＬＣＡspN、およびpＲＥＬＣLysC［第２図を参照］は、pＲＢ２５０ＣＴscに関する上記の通り、合成Ｃ－ペプチドコード配列の適当な置換を伴って構築される。

実施例５

トリプシンおよびＣＰＢを用いて、天然には存在しないプロリラキシンからリラキシンを製造する方法

発酵およびリフラクタイルボディの最初の単離：

pＲＢ２５０ＣＴscでトランスフェクトしたＷ３１１０tonAを発酵に使用する。３７℃で約８時間増殖したＬＢ振盪フラスコを６０Ｌのシード発酵で接種するのに使用する。ＯＤ５５０が４５＋／－５となるまで６０Ｌの培養を３７℃で増殖した（約８～９時間）後、１０００Ｌの製造発酵を接種するのに使用する。１０００Ｌの培養を３７℃で増殖し、インドール酢酸（ＩＡＡ）を加えて８時間後、通常は接種してから１２～１６時間後に収穫する。使用する培地は、ＬＢフラスコールリアブイヨン＋テトラサイクリン５μg／mlである。

次いで、収穫した細胞を以下に概要を述べるプロセス工程で処理する。

ブイヨンを熱－殺傷装置に通すことにより、細胞を収穫時間のうちに殺す。その混合物を２～８℃まで冷却し、最終濃度が５mMとなるまでＥＤＴＡを加えて、pHを５.５に調節する。細胞を破壊（例えば、ガウリン（Gaulin）のホモジナイザー中で）して、リフラクタイルボディを遠心分離（例えば、アルファ・ラバル（Alfa Laval）ＡＸ２１３）により集める。ペレット化したリフラクタイルボディを凍結して、約－７０℃で保存する。

ミニ－Ｃ プロリラキシンの抽出、ホールディング（folding）および精製：

リフラクタイルボディ１kgにつき１４Ｌから２０Ｌの抽出緩衝液（３.５M 塩酸グアニジン／５０mM トリス／０.２％ ＥＤＴＡ，pH ８.５）中に、凍結したリフラクタイルボディを溶解する。

最終体積がリフラクタイルボディ１kgにつき６０Ｌとなるまで、上記抽出物を５０mM トリス／０.２％ ＥＤＴＡ，pH ８.５で希釈することにより、プロリラキシンを再生（refold）する。シスタミン（０.１１３ｇ／Ｌ）およびシステイン（０.６０６ｇ／Ｌ）を加え、プロリラキシンがホールディングされるまで、その混合物を約１時間撹拌する。再生が完了した後、最終濃度が約０.０５～０.１％となるまで、ポリエチレンイミンを加える。その結果得られる懸濁液を穏やかに約１時間撹拌する。５０mM トリス／０.２％ ＥＤＴＡ，pH ８.５で１２０Ｌまでさらに希釈した後、その懸濁液をさらに１時間穏やかに撹拌する。

固体を遠心分離（例えば、ＣＥＰＡ Ｚ１０１またはアルファ・ラバル ＡＸ２１３）により除去して、その結果得られる上澄みをデプス（depth）フィルター（例えば、ＣＵＮＯ）に通して濾過する。３.５M 尿素／５０mM トリス／０.２％ ＥＤＴＡ，pH ８.５中で平衡としたシリカカラム上に、その透明な溶液を負荷する。そのカラムを５M 尿素／５０mM トリス／０.２％ ＥＤＴＡ，pH ８.５で洗浄した後、ホールドしたプロリラキシンを５M 尿素／５０mM トリス／０.２％ ＥＤＴＡ／０.５M ＴＭＡＭＣ，pH ８.５で溶離する。

その結果得られるプールを陽イオン交換クロマトグラフィー（例えば、Ｓ－セファロース・ファースト・フロー（Ｓ－Ｓepharose Ｆast Ｆlow））によりさらに精製する。３.５M 尿素／５０mM トリス／０.２％ ＥＤＴＡ，pH ８.５中で平衡としたシリカカラムに、その溶液を直接加える。そのカラムを同じ緩衝液で洗浄する。０.５M ＮａＣｌを含む同じ緩衝液でプロリラキシンを溶離する。

ミニ－Ｃ プロリラキシンの酵素的開裂：

イオン交換カラムから得られるプールを約５～１０mg／mlまで濃縮し、５Ｋのカットオフ（cutoff）膜（例えば、フィルトロン（Ｆiltron）ＰＥＳ オメガ（Ｏmega））上で、５０mM トリス／５mM $CaCl_2$，pH ８.５中へ濾過（diafiltered）する。

トリプシンを１：１００ｗ／ｗの比率（例えば、プロリラキシン１００mgにつきトリプシン１ＭＧ）で溶液に加える。３０分後、カルボキシペプチダーゼ Ｂをその混合物に加え

る（プロリラキシン１mgにつきＣＰＢ ０.２rＥＵ）。開裂反応の進行をＣ４またはＣ１８カラム上での分析用逆相クロマトグラフィーにより追跡する。完了した後、氷酢酸を加える（反応混合物１Ｌにつき３０ml）ことにより、反応を停止する。

Ａ鎖のＮ－末端グルタミンの環化：

酸性とした溶液を約８５℃に加熱し、その状態で約１時間保った後、約１０℃まで冷却する。その結果得られる懸濁液を、０.５Ｍ 酢酸を等容量加えることにより希釈して、遠心分離する。そのペレットを０.５Ｍ 酢酸で洗浄して、再び遠心分離してもよい。その結果得られる上澄みを合わせて、濾過する。

リラキシンの精製：

０.５Ｍ 酢酸／５０mM トリス／５mM $CaCl_2$，pH ３.５中で平衡とした陽イオン交換カラム（例えば、Ｓ－セファロース高性能）上に、その透明な上澄みを負荷する。ローディングが完了した後、そのカラムを最初に平衡緩衝液で洗浄した後、５０mM ＭＥＳ，ｐＨ ７．０および５０mM ＭＥＳ／１２５mM NaCl，pH ７.０で洗浄する。５０mM ＭＥＳ，pH７.０中、１２５mMから１４０mMまでのＮａＣｌのグラジエントを用いて、リラキシンを溶離する。

０.１％ リン酸中で平衡としたＣ４またはＣ１８シリカカラム上での逆相クロマトグラフィーを行う。平衡緩衝液のグラジエントおよび０.１％ リン酸／８０％ アセトニトリルを用いて、リラキシンを溶離する。

２０mM ＭＥＳ／５％ エタノール，pH ６．０中で平衡とした高性能陽イオン交換カラム（例えば、ＭＯＮＯ Ｓ）上に、その結果得られるプールを直接負荷する。２０mM ＭＥＳ／５％ エタノール，pH６.０中、１０mMから３２mMまでのＮａＣｌのグラジエントを用いて、リラキシンを溶離する。

次いで、サイズ排除クロマトグラフィー（例えば、セファデックス（Ｓephadex）Ｇ－１５）にかけることより、または１０mM クエン酸塩／等張生理食塩水，pH５.０、もしくは２０mM 酢酸ナトリウム，pH ５.０を用い、５Ｋのカットオフ膜（例えば、アミコン（Ａmicon）ＹＭ－５，フィルトロン・オメガ）上で、限外濾過およびダイフィルトレーション（difiltration）することにより、リラキシンを製剤化する。

最終的注意：

前述の記載では、本発明を行うのに利用することのできる具体的方法を詳述している。本願の特定化合物を特性決定し、製造して、使用するのに、初めに利用する具体的方法、またさらには利用する具体的モデルシステムに関する開示を詳述したことで、同じ知識に達するための、またこの知識を他の化合物およびシステムにまで拡張するための、他に代わる確実な方法をどのようにして考え出したらよいかということが、当業者には十分理解されるであろう。従って、本明細書中で前述のものをどんなに詳述して公にしても、本願の全体範囲を制限するものとして解釈すべきではない。むしろ、本発明の範囲は、付記する請求の範囲の法的構成によってのみ支配されるべきである。

【図１】

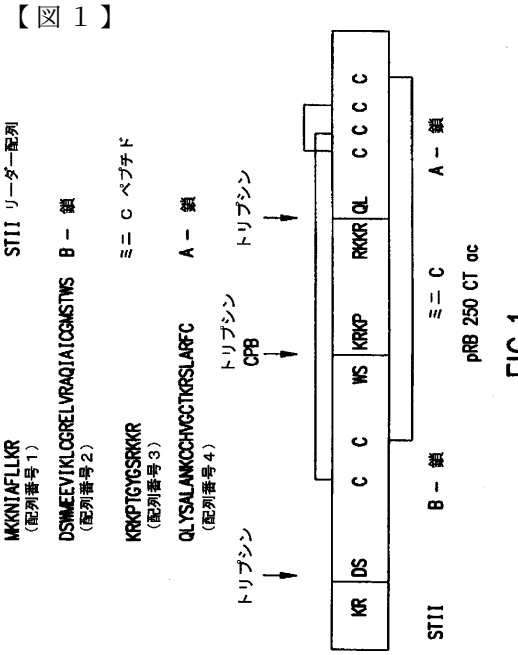


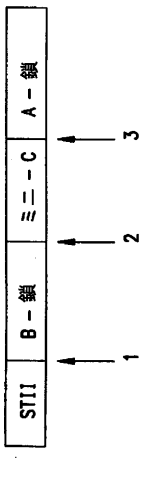
FIG.1

【図２】

プラスミド名	リーダー配列	C鎖配列	解裂用酵素
pRB250CTsc	MKKNIAFLLKR	KRKPTGYGSRKKR 5	トリプシンおよびカルボキシペプチダーゼC (CPB)
pRELCIII	MKKNIAFLLKR	DKKRTGYGSRRRK 6	AspN および LysC
pRELCAspN	MKKNIAFLLKR	DKKRTGYGSRKKR 7	AspN およびトリプシンまたは ArgC
PRELCLysC	MKKNIAFLLKR	KRKPTGYGSRRRK 8	LysC および CPB

FIG.2

【図２Ａ】

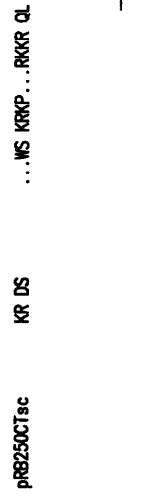


構築物	STII/B－鎖	BC/AC	MC/AC	部位	酵素
	↓1	↓2	↓3		
pRB250CTsc	KR DS	…WS KRKP	…RKKR QL	1	TRYP.;ASP-N
				2	TRYP.;ARG-C;LYS-C;ALL WITH CPB
				3	TRYP.;ARG-C

最も好ましい組合せ
ARG-C/CPB
トリプシン/CPB

FIG.2A

【図２Ｂ】



構築物	STII/B－鎖	BC/AC	MC/AC	部位	酵素
	↓1	↓2	↓3		
pRELCIII	KR DS	…WS DKKR	…RRRK Q	1	TRYP.;ASP-N
				2	ASP-N
				3	TRYP.;LYS-C

最も好ましい組合せ
ASP-N/LYS-C
ASP-N/トリプシン

FIG.2B

【図２Ｃ】

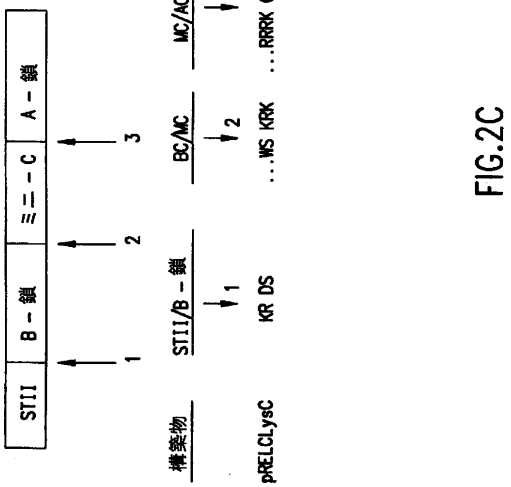


FIG.2C

【図２Ｄ】

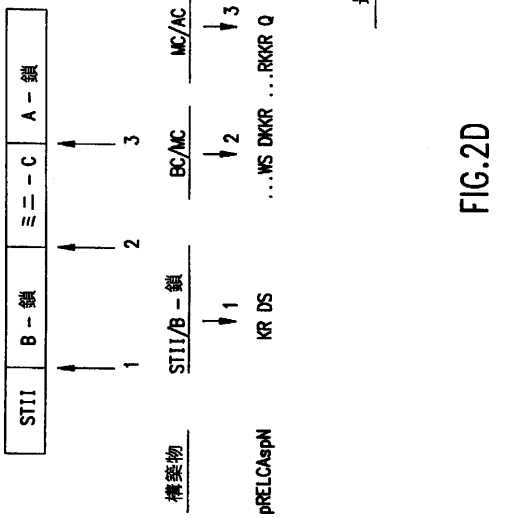


FIG.2D

【図３】

```
ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT AAA CGG GAC TCA   36
Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Lys Arg Asp Ser
 1               5                  10
 STIIリーダー＋KR

TGG ATG GAG GAA GTT ATT AAA TTA TGC GGC CGC GAA TTA   75
Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu
        15                  20                  25
  B－鎖　リラキシン

GTT CGC GCG CAG ATT GCC ATT TGC GGC ATG AGC ACC TGG  114
Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp
                30                  35

AGC   AAA AGG AAA CCC ACT GGT TAT GGT TCT CGA AAA AAG  153
Ser   Lys Arg Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Arg Lys Lys
      40                  45                  50
      Cーペプチドをコードする合成ＤＮＡ

AGA   CAA CTC TAC AGT GCA TTG GCT AAT AAA TGT TGC CAT  192
Arg   Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His
            55                  60
      A－鎖　リラキシン

GTT GGT TGT ACC AAA AGA TCT CTT GCT AGA TTT TGC  228
Val Gly Cys Thr Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
65                  70                  75  76
```

FIG.3

【図４】

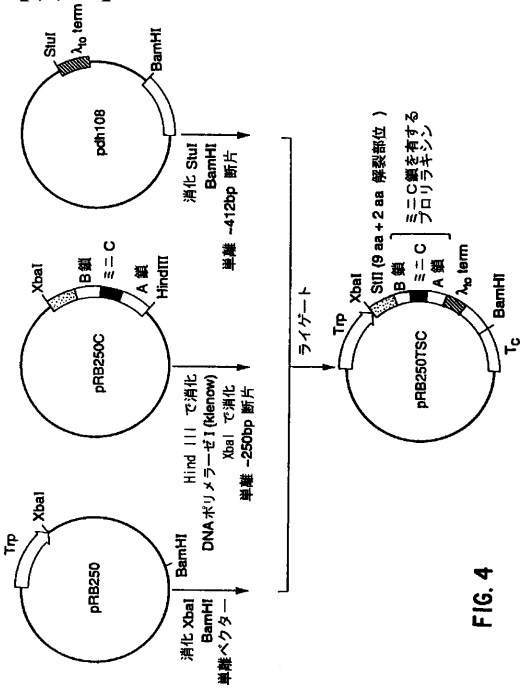


FIG. 4

【図５】

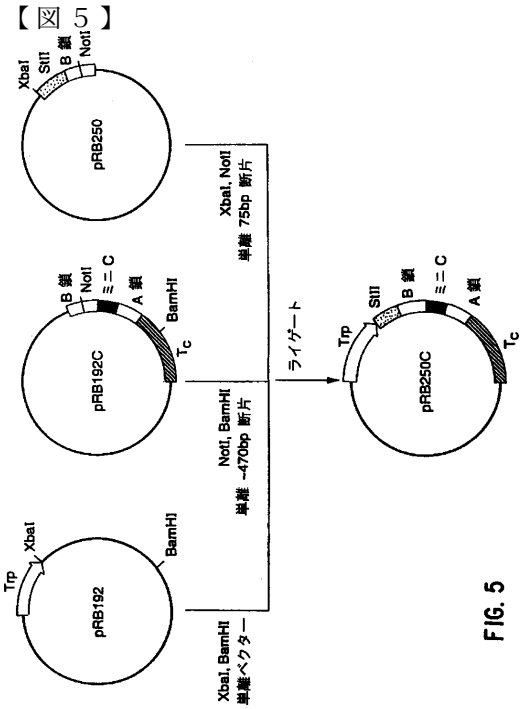


FIG. 5

【図６】

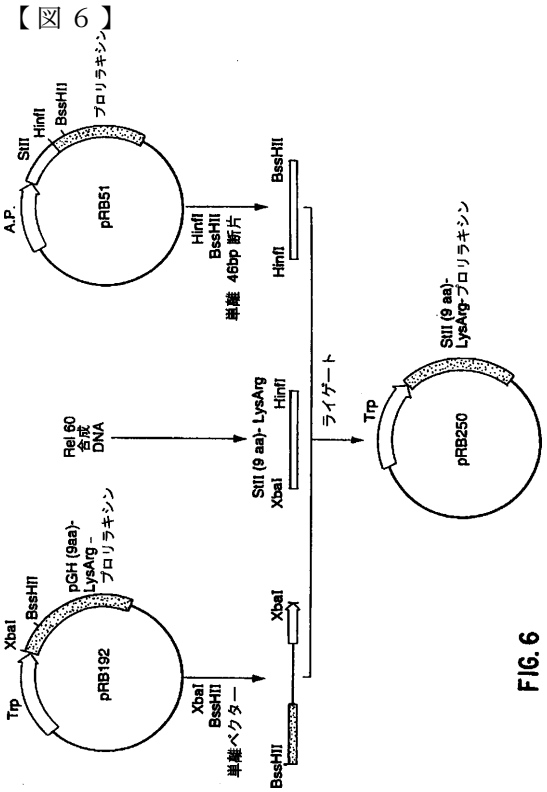


FIG. 6

【図７】

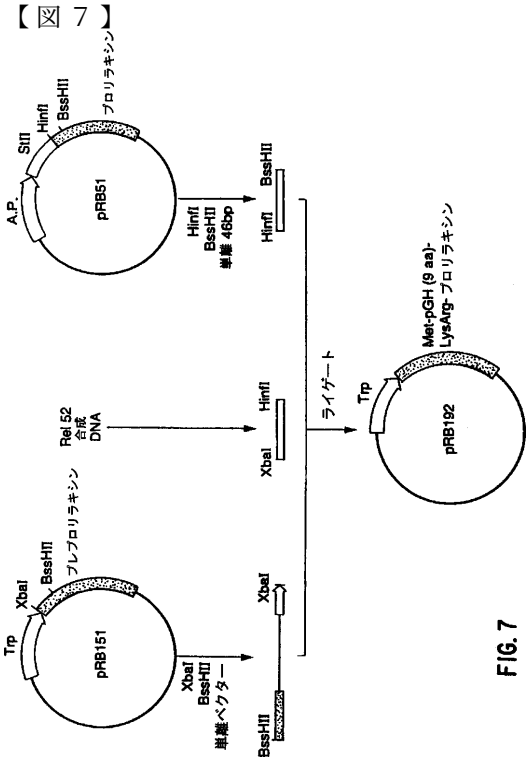


FIG. 7

【図８】

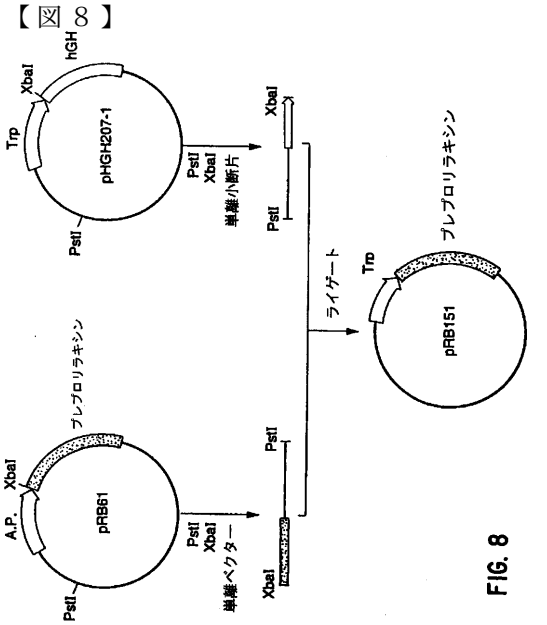


FIG. 8

【図９】

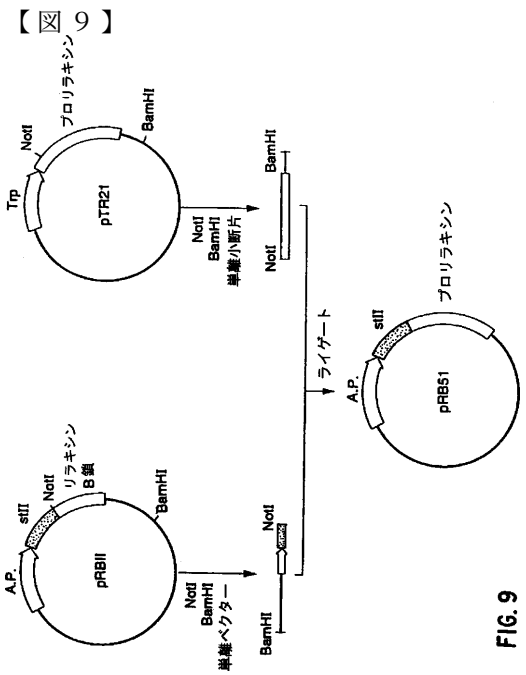


FIG. 9

【図９Ａ】

GlyArgGluLeuValArgAlaGlnIleAlaIleCysGlyMetSerThrTrpSerLysArgSerLeuSerGlnGluAsp
GCGGCCCCGAATTAGTTCCGCCGCAGATTGCCATTTGCGGCATGAGCACCTGCAGCAAAAGCTCTCTGAGCCAGGAAGAT

AlaProGlnThrProArgProValAlaGluIleValProSerPheIleAsnLysAspThrGluThrIleAsnMetMetSer
GCTCCTCAGACACCTAGACCAGTGGCAGAAATTGTGCCATCCTTCATCAACAAAGATACAGAAACCATAAATATGATGTC

GluPheValAlaAsnLeuProGlnGluLeuLysLeuThrLeuSerGluMetGlnProAlaLeuProGlnLeuGlnGlnHis
AGAATTTGTTGCTAATTTGCCACAGGAGCTGAAGTTAACCCTGTCTGAGATGCAGCCAGCATTACCACAGCTACAACAAC

ValProValLeuLysAspSerSerLeuLeuPheGluGluPheLysLysLeuIleArgAsnArgGlnSerGluAlaAla
ATGTACCTGTATTAAAACATTCCAGTCTTCTCTTTGAAGAATTTAAGAAACTTATTCGCAATAGACAAAGTGAAGCCGCA

AspSerSerProSerGluLeuLysTyrLeuGlyLeuAspThrHisSerArgLysLysArgGlnLeuTyrSerAlaLeuAla
GACAGCAGTCCTTCAGAATTAAAATACTTAGGCTTGGATACTCATTCTCGAAAAAAGAGACAACTCTACAGTGCATTCGC

AsnLysCysHisValGlyCysThrLysArgSerLeuAlaArgPheCys
TAATAAATGTTGCCATGTTGCTTGTACCAAAAGATCTCTTGCTAGATTTTGCTGAGATGAAGCTAATTGTGCACATCTCG

TATAATATTCACACATATTCTTAATGACATTTCACTGATGCTTCTATCAGGTCAATTCTCATGTTTGACACCTTATCATC

GATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCGCT

CATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGGTACTGCCGGGCCTCTTGCGGG

ATATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTGCTAGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCA

CCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCCGCCCAGTCCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGCCACTATCGACTA

CGCGATCATGCGGACCACACCCGTCCTGTGGATCC

FIG.9A

【図１０】

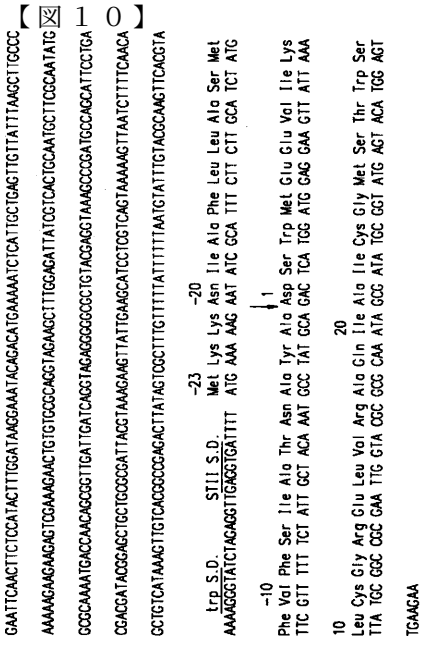


FIG.10

【図１０Ａ】

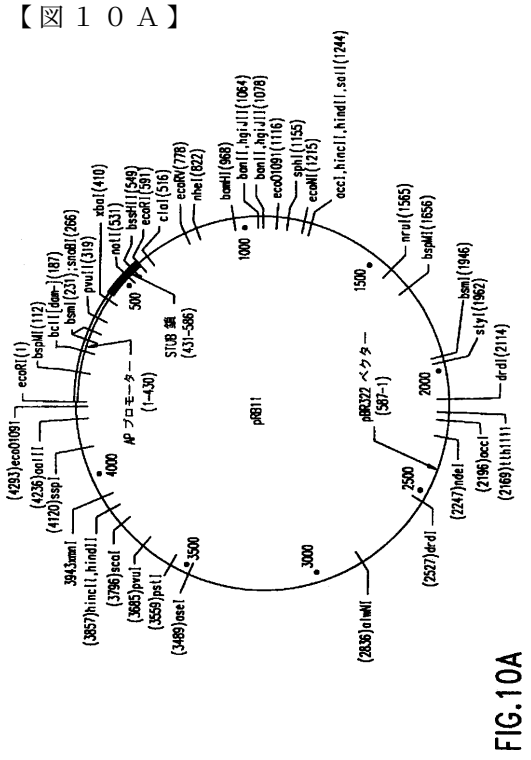


FIG.10A

【図１１】

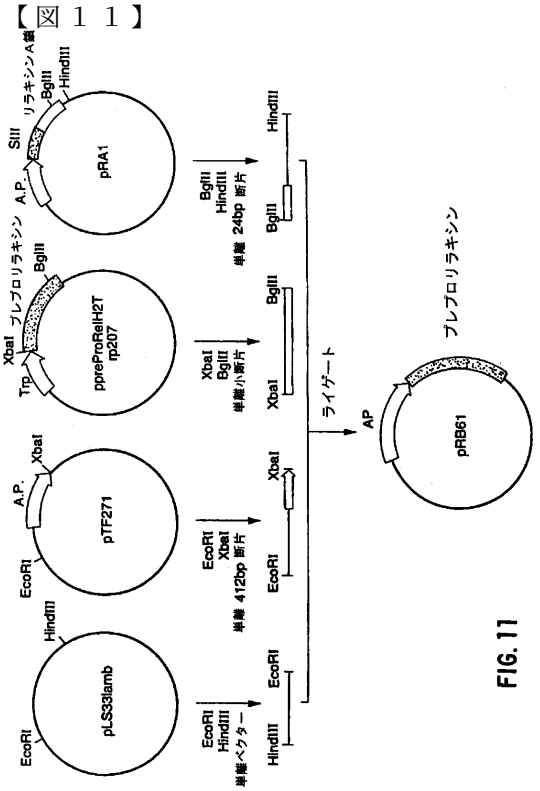


FIG. 11

【図１２】

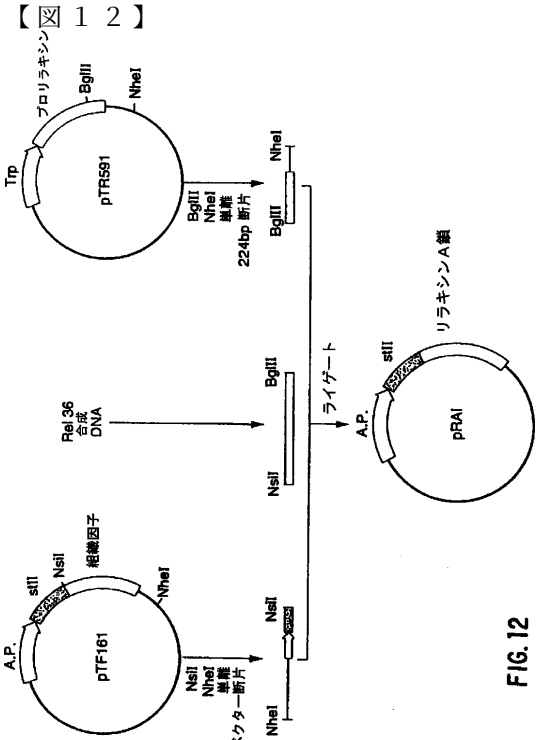


FIG. 12

【図１２Ａ】

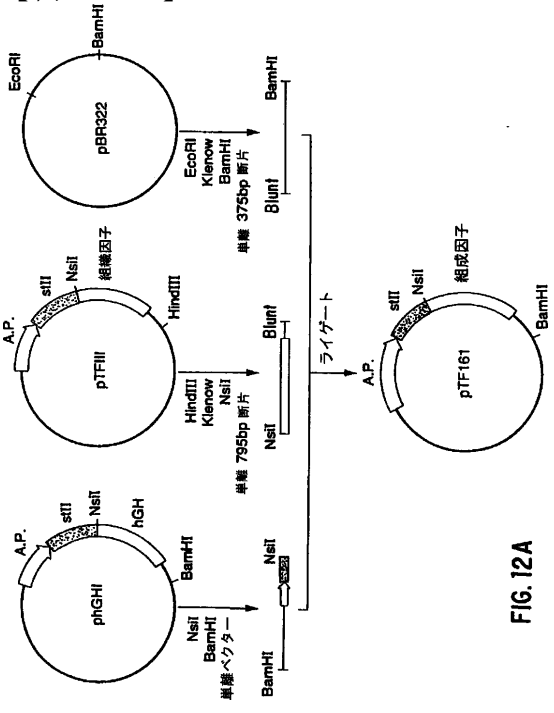


FIG. 12A

【図１３】

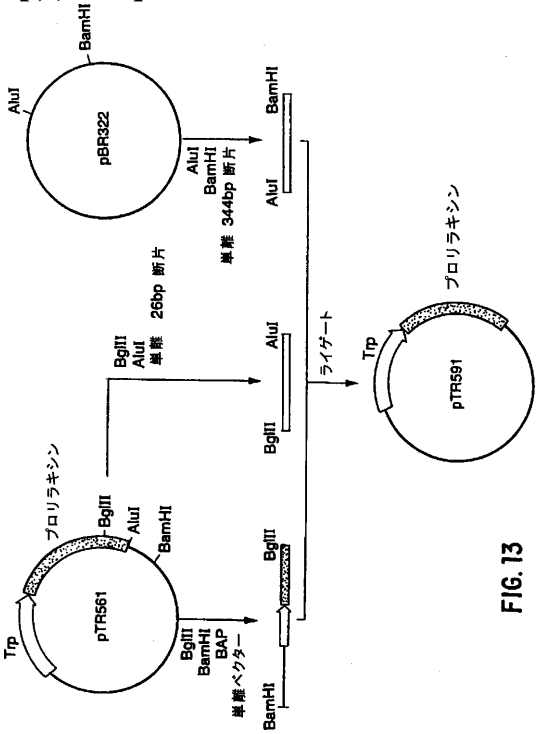


FIG. 13

【図１４】

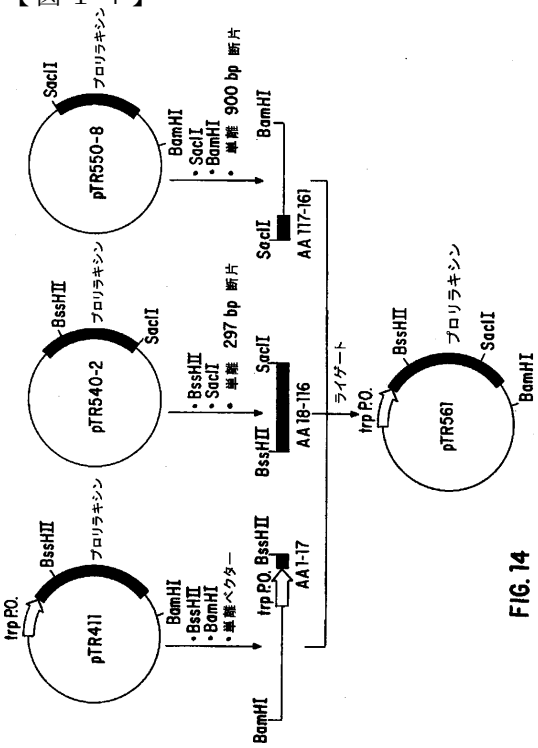


FIG. 14

【図１５】

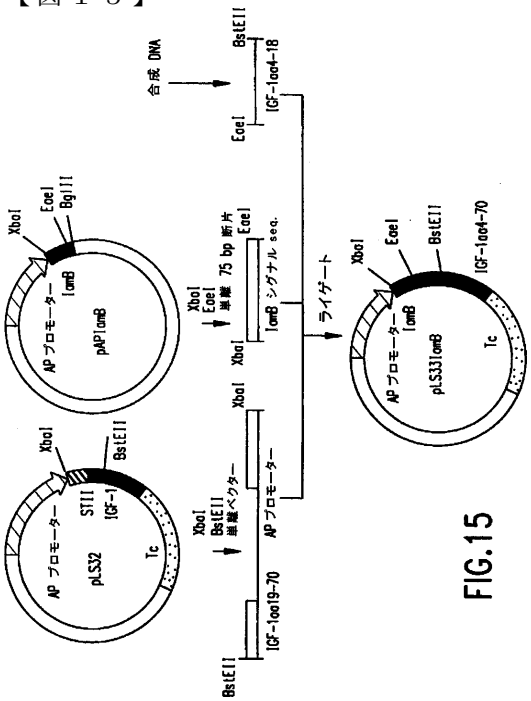


FIG.15

【図１６Ａ】

```
GAATTCAACTTCTCCATACTTTGGATAAGGAAATACAGACATGAAAAATCTCATTGCTGAGTTGTTATTTAAGCTTGCCC
AAAAAGAAGAAGAGTCGAAAGAACTGTGTGCCCAGGTAGAAGCTTTGGAGATTATCGTCACTGCAATGCTTCGCAATATG
GCGCAAAATGACCAACAGCGGTTGATTGATCAGGTAGAGGCGGCGCTGTACGAGGTAAAGCCCGATGCCAGCATTCCTGA
CGACGATACGGAGCTGCTGGCGCATTACGTAAAGAAGTTATTGAAGCATCCTCGTCAGTAAAAAGTTAATCTTTTCAACA
GCTGTCATAAAGTTGTCACGCCCAGACTTATAGTCGCTTTGTTTTTATTTTTAATGTATTTGTAACTAGTACGCAAGT

                                                -23        -20
        trp S.D.          STII S.D.             Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala
TCACGTAAAAAGGGTATCTAGAGGTTGAGGTGATTTT   ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA

          -10                                        1
Ser Met Phe Val Phe Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val
TCT ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA AAT GCC TAT GCA TCA GGC ACT ACA AAT ACT GTG

          10                                  20
Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro
GCA GCA TAT AAT TTA ACT TGG AAA TCA ACT AAT TTC AAG ACA ATT TTG GAG TGG GAA CCC

          30                                  40
Lys Pro Val Asn Gln Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser
AAA CCC GTC AAT CAA GTC TAC ACT GTT CAA ATA AGC ACT AAG TCA GGA GAT TGG AAA AGC

          50                                  60
Lys Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val Lys Asp Val
AAA TGC TTT TAC ACA ACA GAC ACA GAG TGT GAC CTC ACC GAC GAG ATT GTG AAG GAT GTG

          70                                  80
Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly
AAG CAG ACG TAC TTG GCA CGG GTC TTC TCC TAC CCC GCA GGG AAT GTG GAG AGC ACC GGT

          90                                  100
Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn
TCT GCT GGG GAG CCT CTG TAT GAG AAC TCC CCA GAG TTC ACA CCT TAC CTG GAG ACA AAC

          110                                 120
Leu Gly Gln Pro Thr Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val
CTC GGA CAG CCA ACA ATT CAG AGT TTT GAA CAG GTG GGA ACA AAA GTG AAT GTG ACC GTA
```

FIG.16A

【図１６Ｂ】

```
          130                                 140
Glu Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg Asp Val Phe
GAA GAT GAA CGG ACT TTA GTC AGA AGG AAC AAC ACT TTC CTA AGC CTC CGG GAT GTT TTT

          150                                 160
Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr
GGC AAG GAC TTA ATT TAT ACA CTT TAT TAT TGG AAA TCT TCA AGT TCA GGA AAG AAA ACA

          170                                 180
Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe
GCC AAA ACA AAC ACT AAT GAG TTT TTG ATT GAT GTG GAT AAA GGA GAA AAC TAC TGT TTC

          190                                 200
Ser Val Gln Ala Val Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val
AGT GTT CAA GCA GTG ATT CCC TCC CGA ACA GTT AAC CGG AAG AGT ACA GAC AGC CCG GTA

          210                                 220
Glu Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile Gly Ala Val
GAG TGT ATG GGC CAG GAG AAA GGG GAA TTC AGA GAA ATA TTC TAC ATC ATT GGA GCT GTG

          230                                 240
Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile Ser Leu His OC*
GTA TTT GTG GTC ATC ATC CTT GTC ATC ATC CTG GCT ATA TCT GTA CAC TAA  AATTCTCATGT

TTGACAGCTTATCATCGATCAGCTTTAATCCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGA
AATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGGTACTG
CCCGGCCCTCTTGCCGGATATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTGCTAGCGCTATATGCGTTGAT
GCAATTTCTAT
```

FIG.16B

【図１６Ｃ】

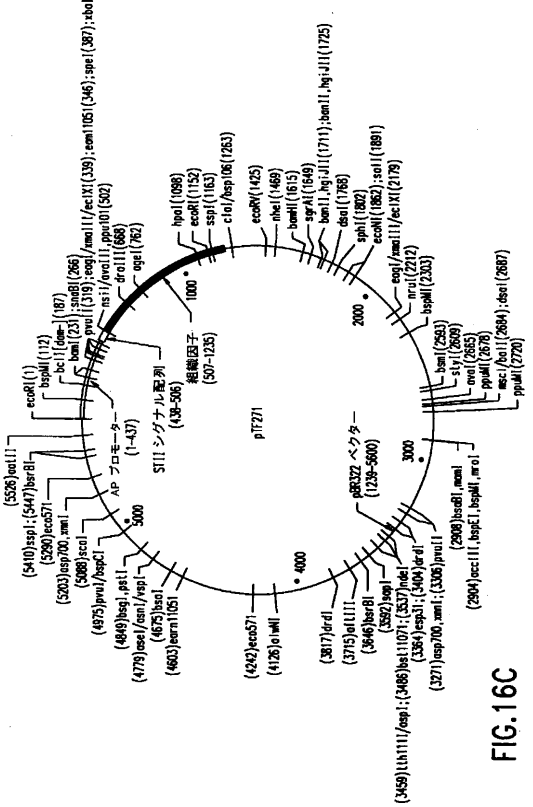


FIG.16C

【図１７】

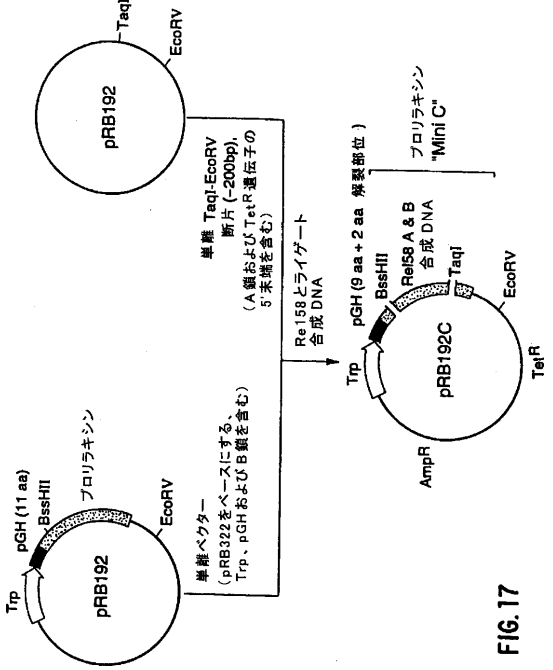


FIG.17

【図１８】

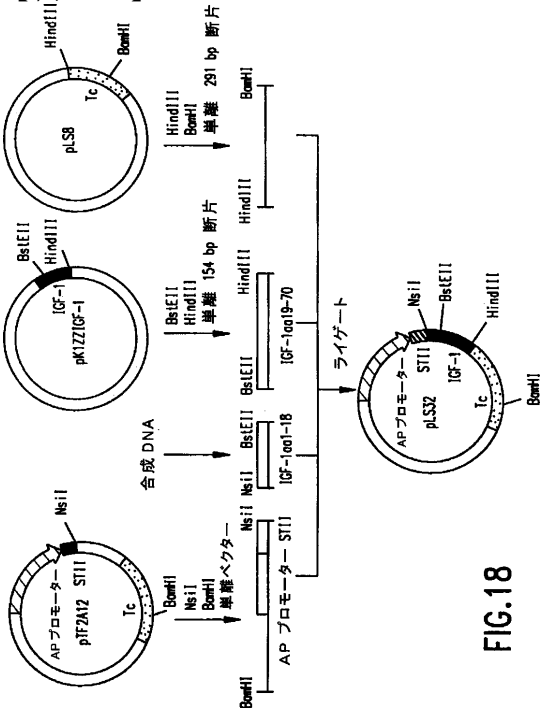


FIG.18

【図１８Ａ】

MetLysSerAsnAsnAlaLeuIleValIleLeuGlyThrValThrLeuAspAlaValGlyIleGlyLeuValMet
AAGCTTATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTAT

ProValLeuProGlyLeuLeuArgAspIleValHisSerAspSerIleAlaSerHisTyrGlyValLeuLeuAlaLeuTyr
GCCCGTACTGCCCCGCCCTCTTGCGGGATATGGTCCATTCGACACGACATCCCCAGTCACTATGGCGTGCTGCTAGCGCTAT

AlaLeuMetGlnPheLeuCysAlaProValLeuGlyAlaLeuSerAspArgPheGlyArgArgProValLeuLeuAlaA
ATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCCGCCCCAGTCCTGCTCGCTT

SerLeuLeuGlyAlaThrIleAspTyrAlaIleMetAlaThrProValLeuTrp
TCGCTACTTGGAGCCACTATCGACTACGCGATCATGGCGACCACACCCGTCCTGTGGATCC

FIG.18A

【図１９】

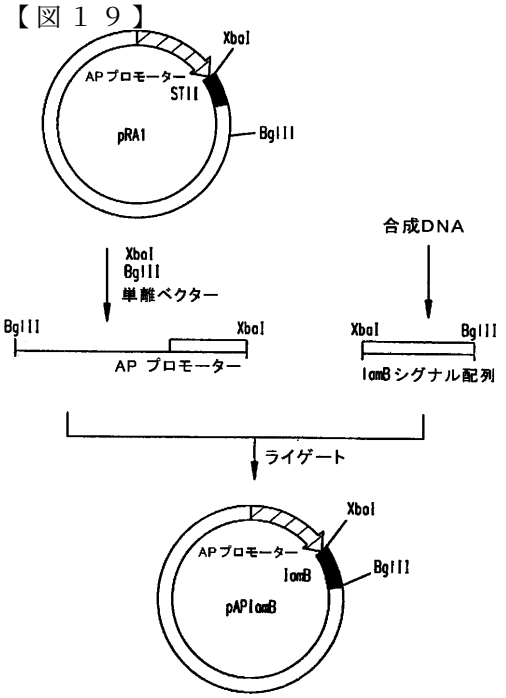

XbaI
APプロモーター
STII
pRA1
BglII
合成DNA
XbaI
BglII
単離ベクター
BglII
XbaI
AP プロモーター
XbaI
BglII
lamBシグナル配列
ライゲート
XbaI
APプロモーター
lamB
BglII
pAPlamB

FIG.19

フロントページの続き

(72)発明者 ブリース，ティム
アメリカ合衆国カリフォルニア９４１２３、サン・フランシスコ、スコット・ストリート３３３０番
(72)発明者 ヘイエンガ，カーク
アメリカ合衆国カリフォルニア９４４０２、サン・マテオ、ベイリッジ・ウェイ１６４０番
(72)発明者 リンデルクネット，アーンスト
アメリカ合衆国カリフォルニア９４０７０、サン・カルロス、バウアー・ドライブ８１２番
(72)発明者 ヴァンドレン，リチャード
アメリカ合衆国カリフォルニア９４０１０、ヒルスバーロウ、ハイネ・ロード１０１５番
(72)発明者 ヤンスラ，ダニエル
アメリカ合衆国カリフォルニア９４０４４、パシフィカ、カーメル・アベニュー３３０番

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 特開昭５８－０１０６００（ＪＰ，Ａ）
欧州特許出願公開第００５１８５８７（ＥＰ，Ａ１）
特開昭６３－２３００８９（ＪＰ，Ａ）
特開昭５９－０８５２９２（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/00
C07K 1/00
C07K 14/00
C12N 1/00
C12P 21/00
BIOSIS/MEDLINE/WPI(STN)
EPAT(QUESTEL)
PubMed