

(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2004-535195

(P2004-535195A)

(43) 公表日 平成16年11月25日(2004.11.25)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

Z N A A

4 B O 2 4

A 6 1 K 38/00

A 6 1 K 39/00

H

4 B O 6 4

A 6 1 K 39/00

A 6 1 P 31/12

4 B O 6 5

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 31/16

4 C O 8 4

A 6 1 P 31/16

A 6 1 P 31/18

4 C O 8 5

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-507263 (P2003-507263)

(86) (22) 出願日 平成14年6月24日 (2002.6.24)

(85) 翻訳文提出日 平成15年12月19日 (2003.12.19)

(86) 国際出願番号 PCT/EP2002/006957

(87) 国際公開番号 W02003/000878

(87) 国際公開日 平成15年1月3日 (2003.1.3)

(31) 優先権主張番号 01 115 225.3

(32) 優先日 平成13年6月22日 (2001.6.22)

(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(31) 優先権主張番号 01 120 939.2

(32) 優先日 平成13年8月31日 (2001.8.31)

(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591003013

エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー

F. HOFFMANN-LA ROCH

E AKTIENGESELLSCHAFT

T

スイス・シーエイチ-4070バーゼル・

グレンツアーヘルストラッセ124

(74) 代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

(72) 発明者 ショルツ, クリスチャン

ドイツ連邦共和国 ベンツベルク 823

77 ジンデルスドルファー シュトラー

セ 35アー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発現ツールとしてのFKBPシャペロンの使用

(57) 【要約】

本発明は、細菌（例えば、Escherichia coliなど）における外来タンパク質またはポリペプチドのクローニングおよび発現に関する。特に、本発明は、FkpA、SlyD、およびトリガー因子からなる群より選択されるFKBP型ペプチジルプロピルイソメラーゼを含む発現ツール、組換えタンパク質発現の方法、組換えポリペプチドならびにかかるポリペプチドの使用に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

標的ポリペプチドをコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列およびFKBPシャペロンをコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列をその上流に含んでなる、融合タンパク質をコードする組換えDNA分子であって、該FKBPシャペロンがFkpA、SlyDおよびトリガー因子からなる群より選択されることに特徴を有する組換えDNA分子。

【請求項 2】

10～100個のアミノ酸のペプチドリinkerをコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列を、前記標的ポリペプチドをコードする配列と前記FKBPシャペロンをコードする配列との間に含むことにさらに特徴を有する請求項 1 記載の組換えDNA分子。

10

【請求項 3】

前記FKBPシャペロンをコードするヌクレオチド配列を 1 つ含んでなる請求項 1 または 2 記載の組換えDNA分子。

【請求項 4】

FKBPシャペロンをコードする配列を 2 つ含んでなる請求項 1 または 2 記載の組換えDNA分子。

【請求項 5】

FKBPシャペロンをコードする 2 つの配列が標的ポリペプチドをコードする配列の上流に位置されることにさらに特徴を有する請求項 4 記載の組換えDNA分子。

【請求項 6】

PPIシャペロンをコードする 1 つの配列が標的ポリペプチドの上流に位置され、PPIシャペロンをコードする他の配列が標的ペプチドをコードする配列の下流に位置されることにさらに特徴を有する請求項 4 記載の組換えDNA分子。

20

【請求項 7】

10～100個のアミノ酸のリンカーポリペプチドをコードする 2 つの核酸配列を含むことにさらに特徴を有する請求項 4～6 記載の組換えDNA分子。

【請求項 8】

10～100個のアミノ酸のリンカーをコードする 2 つの核酸配列が異なる請求項 7 記載の組換えDNA分子。

【請求項 9】

前記リンカー配列のうち少なくとも 1 つがタンパク質分解性切断部位を含むポリペプチドリinkerをコードする、請求項 2～8 いずれか記載の組換えDNA分子。

30

【請求項 10】

操作可能に連結された請求項 1～9 いずれか記載の組換えDNA分子を含んでなる発現ベクター。

【請求項 11】

請求項 10 記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 12】

a．請求項 11 記載の宿主細胞を培養する工程
b．融合タンパク質の発現工程
c．該融合タンパク質の精製工程
を含む融合タンパク質を生成する方法。

40

【請求項 13】

FkpA、SlyDおよびトリガー因子からなる群より選択されるFKBPシャペロンに対応する少なくとも 1 つのポリペプチド配列ならびに標的ペプチドに対応する少なくとも 1 つのポリペプチド配列を含有してなる組換え的に生成された融合タンパク質。

【請求項 14】

FkpA、SlyDおよびトリガー因子からなる群より選択されるFKBPシャペロンに対応する少なくとも 1 つのポリペプチド配列、標的ペプチドに対応する少なくとも 1 つのポリペプチド配列、ならびに10～100個のアミノ酸の少なくとも 1 つのペプチドリinker配列を含有し

50

てなる組換え的に生成された融合タンパク質。

【請求項 15】

前記FKBPシャペロンに対応するポリペプチド配列を1つ含有することにさらに特徴を有する請求項13または14記載の融合タンパク質。

【請求項 16】

前記FKBPシャペロンに対応するポリペプチド配列を2つ含有することにさらに特徴を有する請求項13または14記載の融合タンパク質。

【請求項 17】

前記2つのFKBPシャペロンが標的ポリペプチドに関してN末端に位置されることにさらに特徴を有する請求項16記載の融合タンパク質。

【請求項 18】

前記2つのFKBPシャペロンのうち1つが標的ポリペプチドに対してN末端に、前記FKBPシャペロンのうち1つが標的ポリペプチドに対してC末端に位置されることにさらに特徴を有する請求項16記載の融合タンパク質。

【請求項 19】

少なくとも1つの標的ポリペプチド、FkpA、SlyDおよびトリガー因子からなる群より選択されるFKBPシャペロンに対応する2つの配列ならびに10~100個のアミノ酸の2つのペプチドリンカー配列を含有してなる組換え的に生成された融合タンパク質。

【請求項 20】

前記ペプチドリンカー配列のうち少なくとも1つがタンパク質分解性切断部位を含有する、請求項19記載の融合タンパク質。

【請求項 21】

前記標的タンパク質が感染性生物由来のポリペプチドを含有してなる請求項13~20いずれか記載の融合タンパク質。

【請求項 22】

前記ポリペプチドが感染性生物の少なくとも1つの診断的に直接関係のあるエピトープを含有することにさらに特徴を有する請求項21記載の融合タンパク質。

【請求項 23】

研究動物の免疫化への、請求項13~22いずれか記載の組換え的に生成された融合タンパク質の使用。

【請求項 24】

ワクチンの生成における請求項13~22いずれか記載の組換え的に生成された融合タンパク質の使用。

【請求項 25】

免疫学的検定法における請求項13~22いずれか記載の組換え的に生成された融合タンパク質の使用。

【請求項 26】

請求項13~22いずれか記載の組換え的に生成された融合タンパク質、および薬学的に許容され得る賦形剤を含有してなる組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、Escherichia coliなどの細菌における異種タンパク質またはポリペプチドのクローニングおよび発現に関する。特に、本発明は、FkpA、SlyD、およびトリガー因子からなる群より選択されるFKBP型ペプチジルプロピルイソメラーゼを含有する発現ツール、組換えタンパク質発現の方法、従って得られた組換えポリペプチドならびにかかるポリペプチドの使用に関する。

【0002】

多くの種類の発現系は、特許および科学的論文に記載されている。しかし、融合タンパク質が現代生物学の基礎となっているという事実にもかかわらず、可溶性、生物学的に活性な形態の標的タンパク質および高収率で標的タンパク質を得ることは、主要な難題であり

10

20

30

40

50

続けている (Kapust, R.B. および Waugh, D.S., Protein Sci 8 (1999) 1668 ~ 74)。

【0003】

可溶化剤として売り込まれている融合パートナーの例としては、チオレドキシン (TRX)、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、プロテイン A、ユビキチン、および DsbA が挙げられる。広範に理解され、潜在的に非常に重要であるが、この可溶化効果は、不十分に理解されたままである。例えば、固有の高い可溶性を除く特徴が有効な可溶化剤の典型であることは明らかではない。全ての可溶性融合パートナーはこの課題において等しく熟達しているのであろうか、またはいくつかは堅実に他よりも有効なのであろうか？同様に、多くの種々のポリペプチドの可溶性は、それらを高い可溶性のパートナーに融合することにより改良され得るかどうか、またはこのアプローチがほんの少しの場合にのみ有効であるかどうかは知られていない。

10

【0004】

もっとも強力な発現系に関する先行技術の状況は、近年、Kapustら、前出により要約されている。種々の標的タンパク質を含む可溶性融合タンパク質を生成するために彼達の試みにおいて、彼等は、3つの異なる顕著な候補融合パートナーを評価した。マルトース結合タンパク質 (MBP)、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、およびチオレドキシン (TRX) は、通常不溶性形態で蓄積する6つの多様なタンパク質の凝集を阻害する能力について試験されている。これら候補発現系の全てが当業者に公知であり、他の場所に詳細に記載される (例えば、発現ツールとしてGSTの使用を詳細に記載した欧州特許第293 249号)。

20

【0005】

注目すべきことに、Kapustら、前出は、MBPが先行技術で広範に使用されてもいる他の2つの融合パートナーよりはるかに有効な可溶化剤であることを見出した。さらに、彼等は、いくらかの場合にのみMBPへの融合が付着タンパク質のその生物学的に活性な形態への妥当な折り畳みを促進し得ることを示した。

【0006】

多くの凝集傾向のポリペプチドは適切なパートナーへの融合により可溶性にされ得るが、多少の予測できない方法におけるいくつかの候補融合パートナーは他よりもずっとよい可溶化剤であることは特に重大である。

【0007】

いくつかのレトロウイルス性の表面糖タンパク質 (rsgp) の組換え発現に取り組んでいる間、本発明者らは、当該分野で公知であり勧められている (例えば、Kapustら、前出により) 多くの発現ツールの利用性を研究した。しかし、本発明者らは、試験した全ての発現系が1個または数個の以下の欠点を持つことを見出した：低収率、取り扱いにくい融合ポリペプチド、または生理的緩衝条件での融合タンパク質の不溶性。

30

【0008】

従って、顕著な要求は、例えば、rsgpなどの凝集傾向のタンパク質の組換え発現に特に適切な代替の効率的な発現ツールを提供することにある。

【0009】

免疫抑制剤FK-506に結合するタンパク質いわゆるFK-506結合タンパク質すなわちFKBPに関する大量の特許文献がある。

40

【0010】

これらのタンパク質は、広範に研究されており、市販の適用はこれらのタンパク質のFK-506結合活性に集中するように設計されている。例えば、W093/25533は、CTP：CMP-3-デオキシ-D-マンノ-オクツロソン酸シチジルトランスフェラーゼ (= CKS) を発現ツールとして使用する。FKBPは、CKS系の発現ベクターにCKS遺伝子の下流に挿入される。得られた融合タンパク質を使用して、FK-506および他の免疫抑制剤の測定を改良する。

【0011】

W022/28011は、生物学的事象 (例えば、標的遺伝子転写ならびに操作細胞の成長、増殖および分化) の調節のための物質および方法を開示する。

50

【 0 0 1 2 】

W097/10253は、標的タンパク質およびFK-506結合タンパク質からなる融合タンパク質に結合し得る化合物をスクリーニングするためのハイスループットアッセイに関する。ハイスループットスクリーニングアッセイにおけるFKBP12-Src相同性 (SH2) 融合タンパク質の使用が開示される。融合タンパク質は、細菌ペリプラズムにおいて可溶性形態で生成され、標準的な凍結解凍処理により放出される。

【 0 0 1 3 】

本発明の課題は、標的タンパク質としてrsgpを含有する組換えタンパク質の改良された発現に使用され得、同時にあまり重要でない標的タンパク質にも適切である効率的な代替発現系を開発し提供することができるかどうかを研究することであった。

10

【 0 0 1 4 】

驚いたことに、本発明者らは、非常に見込みあるクローニングツールとしてペプチジルプロピルイソメラーゼ (PPIまたはPPIアーゼ) シャペロンのFKBP型ファミリーの特定のモジュールメンバーを同定することができた。本発明者らは、SlyD、FkpA、およびトリガー因子からなる群より選択されたシャペロンのFKBP型ファミリーに基づく発現系が、rsgpなどの重要なタンパク質を発現するのに理想であることを見出すと同時に、これらのシャペロンもあまり重要でない標的タンパク質に対する非常に見込みあるクローニングツールであることも示した。

【 0 0 1 5 】

発明の要旨

20

第一の態様において、本発明は、標的ポリペプチドをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列およびFKBPシャペロンをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列をその上流に含む、融合タンパク質をコードする組換えDNA分子であって、該FKBPシャペロンがFkpA、SlyDおよびトリガー因子からなる群より選択されることに特徴を有する組換えDNA分子に関する。

【 0 0 1 6 】

かかる組換えDNA分子の設計ならびに発現ベクター、かかる発現ベクターを含有する宿主細胞の一部として、および融合ポリペプチドの生成におけるその使用の好ましい方法も開示される。

【 0 0 1 7 】

30

さらに、組換え融合ポリペプチド自身が、例えば、可溶化、精製および取り扱いに関して驚くべき、有利な特性を示すことが見出されている。さらなる態様において、本発明は、FkpA、SlyDおよびトリガー因子からなる群より選択されるFKBPシャペロンに対応する少なくとも1つのポリペプチド配列ならびに標的ペプチドに対応する少なくとも1つのポリペプチド配列を含有する組換え的に生成された融合タンパク質に関する。

【 0 0 1 8 】

さらなる態様は、FkpA、SlyDおよびトリガー因子からなる群より選択されるFKBPシャペロンに対応する少なくとも1つのポリペプチド配列、標的ポリペプチドに対応する少なくとも1つのポリペプチド配列、ならびに10~100個のアミノ酸の少なくとも1つのペプチドリンカー配列を含有する組換え的に生成された融合タンパク質に関する。

40

【 0 0 1 9 】

好ましい組換え融合ポリペプチドおよび種々の適用におけるかかる融合ポリペプチドの使用も開示される。

【 0 0 2 0 】

発明の詳細な説明

本発明は、新規なポリペプチド発現系を記載する。好ましい態様において、標的ポリペプチドをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列およびFKBPシャペロンをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列をその上流に含む、融合タンパク質をコードする組換えDNA分子であって、該FKBPシャペロンがFkpA、SlyDおよびトリガー因子からなる群より選択されることに特徴を有する組換えDNA分子に関する。

50

【0021】

当業者にとって、用語「少なくとも1つ」は、それぞれ標的ポリペプチド、またはFKBPシャペロンをコードする1つ以上のヌクレオチド配列が、本発明の範囲を逸脱せずに組換えDNA分子の構築に使用され得ることを示すために使用されることは明白である。好ましくは、DNA構築物は、標的ポリペプチドをコードする1つまたは2つ、最も好ましくは1つの配列を含み、同時にシャペロンをコードする少なくとも1つ多くとも4つ、最も好ましくは1つまたは2つの配列を含む。

【0022】

用語「組換えDNA分子」は、遺伝子工学技術または化学合成によるポリヌクレオチドの単離セグメントの人工操作によって達成した配列の2つの他の点で別個のセグメントの組み合わせにより作製されるDNA分子をいう。そのようにすることで、所望の組み合わせの機能を生ずるために所望の機能のポリヌクレオチドセグメントを結合し得る。 10

【0023】

大量のポリヌクレオチドは、好適な宿主細胞において複製により産生され得る。タンパク質もしくはそのフラグメントをコードする天然または合成DNAフラグメントは、原核細胞または真核細胞への導入および複製可能な組換えポリヌクレオチド構築物、典型的にはDNA構築物に組み込まれ得る。

【0024】

ポリヌクレオチドはまた、化学合成(Beaucage, S.L.およびCaruthers, M.H., Tetrahedron Letters 22 (1981) 1859~1862に記載されるホスホルアミダイト法ならびにMatteucci, M.D.およびCaruthers, M.H., J. Am. Chem. Soc. 103 (1981) 3185~3191のトリエステル法が挙げられるが、これらに限定されない)により生成され得る。二本鎖フラグメントは、相補鎖を合成し、適切な条件下で鎖を共にアニーリングすることによるか、または適切なプライマー配列を用いてDNAポリメラーゼを使用して相補鎖を付加することによるかのいずれかによって、化学合成の一本鎖産物から得られ得る。 20

【0025】

ポリヌクレオチドは、ポリペプチドを「コードする」といわれ、その天然の状態である場合または当該分野で公知の方法により操作される場合、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドまたはそのフラグメントを生成するために転写および/または翻訳され得る。

【0026】

本発明の標的ポリペプチドは、より多くの量必要とされる任意のポリペプチドであり得、従って、他の非組換え供給源から単離または精製することは難しい。好ましくは本方法により生成される標的タンパク質の例としては、酵素、サイトカイン、成長因子、ホルモン、ワクチン、抗体などの哺乳動物遺伝子産物が挙げられる。より詳細には、好ましくは本発明の過剰発現された遺伝子産物としては、エリスロポエチン、インスリン、ソマトトロピン、成長ホルモン放出因子、血小板由来成長因子、上皮増殖因子、トランスホーミング増殖因子、トランスホーミング増殖因子、上皮増殖因子、線維芽細胞増殖因子、神経発育因子、インスリン様成長因子I、インスリン様成長因子II、凝固因子VIII、スーパーオキシドジスムターゼ、 α -インターフェロン、 γ -インターフェロン、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、顆粒球コロニー刺激因子、複数直系(multilineage)コロニー刺激活性、顆粒球マクロファージ刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子、T細胞増殖因子、リンホトキシンなどの遺伝子産物が挙げられる。好ましい過剰発現された遺伝子産物はヒト遺伝子産物である。さらに、本方法は、ワクチンとして使用され得る過剰発現された遺伝子産物の分泌を増大するために容易に適合し得る。ワクチンとして使用され得る過剰発現された遺伝子産物としては、哺乳動物病原体の任意の構造的遺伝子産物、膜会合性遺伝子産物、膜結合性遺伝子産物または分泌された遺伝子産物が挙げられる。哺乳動物病原体としては、哺乳動物に感染もしくは攻撃し得るウイルス、細菌、単細胞寄生生物または多細胞寄生生物が挙げられる。例えば、ウイルスワクチンとしては、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ワクシニア、ポリオウイルス、アデノウイルス、 30 40 50

インフルエンザ、A型肝炎、B型肝炎、デング熱ウイルス、日本脳炎、水痘帯状疱疹、サイトメガロウイルス、A型肝炎、ロタウイルスなどのウイルスに対するワクチン、および麻疹、黄熱、耳下腺炎、狂犬病、疱疹、インフルエンザ、パラインフルエンザなどのウイルス性疾患に対するワクチンが挙げられ得る。細菌ワクチンとしては、*Vibrio cholerae*、*Salmonella typhi*、*Bordetella pertussis*、*Streptococcus pneumoniae*、*Hemophilus influenzae*、*Clostridium tetani*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Mycobacterium leprae*、*R. rickettsii*、*Shigella*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Neisseria meningitidis*、*Coccidioides immitis*、*Borellia burgdorferi*などの細菌に対するワクチンが挙げられ得る。

【0027】

好ましくは、標的タンパク質は、HIV-1 gp41、HIV-2 gp36、HTLV gp21、HIV-1 p17、SlyD、FkpA、およびトリガー因子からなる群のメンバーである。 10

【0028】

本発明の標的ポリペプチドはまた、単一の組換えポリペプチドとして発現されるように構築されたいくつかの異なるタンパク質由来の配列（例えば、診断的に直接関係のあるエピトープ）を含み得る。

【0029】

ペプチジルプロピルイソメラーゼ（PPIまたはPPIアーゼ）という折り畳みヘルパーは、3つのファミリー、パルブリン（parvuline）（Schmid, F.X., Molecular chaperons in the life cycle of proteins (1998) 361~389, A.L. FinkおよびY. Goto編, Marcel Dekker Inc., New York, Rahfeld, J.U.ら, FEBS Lett 352 (1994) 180~4）、シクロフィリン（cyclophilin）（Fischer, G.ら, Nature 337 (1989) 476~8）およびFKBPファミリー（Lane, W.S.ら, J Protein Chem 10 (1991) 151~60）に細分される。FKBPファミリーは、そのメンバーが本来マクロライド（例えば、FK506およびラパマイシン（rapamycin））に結合する能力により同定されているので興味深い生化学特性を表す（Kay, J.E., Biochem J 314 (1996) 361~85）。 20

【0030】

本発明によると、好ましいモジュールPPIアーゼは、FkpA（Ramm, K.およびPluckthun, A., J Biol Chem 275 (2000) 17106~13）、SlyD（Hottenrott, S.ら, J Biol Chem 272 (1997) 15697~701）およびトリガー因子（Scholz, C.ら, Embo J 16 (1997) 54~8）、FKBPファミリーの全てのメンバーである。最も好ましくは、シャペロンFkpAおよびSlyDである。 30

【0031】

分子シャペロンの完全な配列を常に使用する必要がないことも周知であり、明白である。必要な能力および機能をなお有しているシャペロンの機能性フラグメント（いわゆるモジュール）もまた、使用され得る（W098/13496参照）。

【0032】

例えば、FkpAは、細菌サイトゾルにおいて不活性前駆体分子として合成され、細胞質膜を横切って転移する原形質周辺の（periplasmic）PPIである。活性形態のFkpA（成熟FkpAまたは原形質周辺FkpA）は、シグナル配列（アミノ酸1~25）を欠損し、従って、前駆体分子のアミノ酸26~270を含む。FkpAに関する関連性のある配列情報は、公開データベースから容易に得られ得る（例えば、寄託番号P45523の元で「SWISS-PROT」から）。本発明の発現ツールとして使用されるFkpAは、N末端シグナル配列を欠損している。 40

【0033】

FkpA、すなわちSlyDに関連するクローンは、触媒性かつシャペロン機能を司る構築されたN末端ドメインならびにヒスチジンおよびシステイン残基が非常に豊富な主として構築されていないC末端からなる（Hottenrott、前出）。本発明者らは、アミノ酸1~165を含むSlyDのC末端切断バリエーションが標的タンパク質の効率的な発現に非常に肯定的な効果を発揮することを見出した。野生型SlyDとは異なり、ジスルフィドシャッフリングに欠陥を生じさせる危険は、使用される切断SlyDバリエーション（1~165）において首尾よく回避される。切断SlyD（1~165）を含む組換えDNA分子は、本発明の好ましい態様である。 50

【 0 0 3 4 】

本発明のDNA構築物を設計する好ましい様式において、シグナルペプチドは含まれない。本発明の発現系は、サイトゾル発現系として作用する場合、最も有利であることが見出されている。このサイトゾル発現は、封入体の形成を生ずる。封入体に通常関連する表明されかつ周知な問題とは異なり、本発明者らは現在、非常に大量のタンパク質が生成されるだけでなく、本発明の組換えタンパク質はまた取り扱いやすい（例えば、可溶化、再折り畳みしやすい）ことを見出している。従って、好ましい態様において、本発明は、標的ポリペプチドをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列およびFKBPシャペロンをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列をその上流に含む、融合タンパク質をコードする組換えDNA分子であって、該FKBPシャペロンがFkpA、SlyDおよびトリガー因子からなる群より選択され、DNA構築物がシグナルペプチドを欠損していることにさらに特徴を有する組換えDNA分子に関する。

10

【 0 0 3 5 】

用語「シグナルペプチドを欠損している」は、甚だしい限定として理解されてはならない。当業者にとっては、いずれの構築物も実際にシグナルペプチド配列を欠損してもよいことは容易に明白である。しかし、代替として、配列は、シグナルペプチド機能を欠損するように単に修飾されていてもよい。

【 0 0 3 6 】

1個または数個のアミノ酸置換または欠失を保有する上記で考察されたシャペロンのバリエーションもまた、本発明の組換えDNAまたは融合ポリペプチドを得るために使用され得る。当業者は、かかるバリエーションが実施例節に記載するような手順を使用することにより本発明の方法に適切であるかどうかを容易に断言し得る。

20

【 0 0 3 7 】

本発明で使用される場合、用語「組換え体」または「融合ポリペプチド」は、発現ツールとして使用されるFKBPシャペロンに対応する少なくとも1つのポリペプチドドメインおよび標的タンパク質に対応する少なくとも1つのポリペプチドドメインを含むポリペプチドをいう。任意に、かかる融合タンパク質は、10～100アミノ酸残基のリンカーポリペプチドをさらに含み得る。当業者にとって、かかるリンカーポリペプチドが意図される適用、特に長さ、可撓性、電荷、および親水性に関して最も適切に設計されることは明白である。

30

【 0 0 3 8 】

好ましくは、本発明のDNA構築物は、FKBPシャペロンに対応するポリペプチド配列と標的タンパク質に対応するポリペプチド配列との間にポリペプチドリンカーを含む融合タンパク質をコードする。さらに、例えば、タンパク質分解性切断部位を提供するためにリンカーをコードするかかるDNA配列はポリリンカーとしても作用し得る、すなわち複数のDNA制限部位を提供して、標的タンパク質およびシャペロンドメインをコードするDNAフラグメントの融合を容易にし得る。

【 0 0 3 9 】

本発明は、適切なDNA分子を構築するために組換えDNA技術を利用する。

【 0 0 4 0 】

さらなる好ましい態様において、本発明は、操作可能に連結された標的ポリペプチドをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列およびFKBPシャペロンをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列をその上流に含む、融合タンパク質をコードする組換えDNA分子であって、該FKBPシャペロンがFkpA、SlyDおよびトリガー因子からなる群より選択されることに特徴を有する組換えDNA分子に関する。

40

【 0 0 4 1 】

ポリヌクレオチド配列は、別のポリヌクレオチド配列と機能的関係に配置される場合、操作可能に連結される。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合、プロモーターはコード配列に操作可能に連結される。一般的に、操作可能に連結されるは、連結された配列が隣接し、2つのタンパク質コード領域を結合する必要がある

50

場合、共に隣接してリーディングフレームにあることを意味する。しかし、特定の遺伝子エレメント、例えば、エンハンサーが離れているにもかかわらず、すなわち隣接していなくても操作可能に連結され得ることは周知である。

【0042】

当業者にとって、1個または数個、例えば9個までのアミノ酸が融合タンパク質の2つのポリペプチドドメインとの間に配置されるように融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を設計することは、しばしば有利であることは明白である。従って、構築された融合タンパク質およびそれらを明らかにコードするDNA分子もまた、本発明の範囲内である。

【0043】

宿主に導入するために調製されたDNA構築物（所望の標的融合ペプチドをコードする意図されたDNAフラグメントを含む）は、典型的に、宿主により認識される複製系を含み、好ましくはまた、セグメントをコードするポリペプチドに操作可能に連結された転写および翻訳開始調節配列を含む。発現系（発現ベクター）としては、例えば、複製または自律複製配列（ARS）の起点および発現制御配列、プロモーター、エンハンサーおよびプロセシングに必要な情報部位（例えば、リボソーム結合部位、RNAプライス部位、ポリアデニル化部位）、転写ターミネーター配列、およびmRNA安定化配列が挙げられ得る。

【0044】

宿主において機能的であるように適切なプロモーターおよび他の必要なベクター配列が選択される。細胞株および発現ベクターの作用し得る組み合わせの例としては、Sambrook, J.ら, 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(1989)-, J. Sambrook, E.F. FritschおよびT. Maniatis編, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour、またはAusubel, F.ら, 「Current protocols in molecular biology」(1987および定期的改訂版), F. Ausubel, R. BrentおよびK.R.E.編, Wiley & Sons Verlag, New York; ならびにMetzger, D.ら, Nature 334 (1988) 31~6に記載のものが挙げられるがこれらに限定されない。細菌、酵母、哺乳動物、昆虫、植物または他の細胞における発現用の多くの有用なベクターは、当該分野で公知であり、販売会社（Stratagene、New England Biolabs、Promega Biotechなどが挙げられるが、これらに限定されない）から得られ得る。さらに、構築物は、増幅可能な遺伝子（例えば、DHFE）に結合され得、その結果、遺伝子の複数のコピーが得られ得る。

【0045】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、選択可能マーカー（ベクターで形質転換された宿主細胞の生存または増殖に必要なタンパク質をコードする遺伝子）をおそらく含むが、かかるマーカー遺伝子は宿主細胞に同時導入された別のポリヌクレオチド配列上に運ばれ得る。マーカー遺伝子を発現するこれらの宿主のみが、選択条件下で生存および/または増殖する。典型的な選択遺伝子としては、(a) 抗生物質または他の毒性物質（例えば、アンピシリン、テトラサイクリンなど）に対する耐性を与えるタンパク質；(b) 栄養要求性欠損を捕捉するタンパク質；あるいは(c) 複合培地から利用不可能な重大な栄養素を供給するタンパク質をコードするものが挙げられるが、これらに限定されない。好適な選択可能マーカーの選択は宿主細胞に依存し、種々の宿主に適切なマーカーは、当該分野で公知である。

【0046】

目的のポリヌクレオチドを含むベクターは、当該分野で公知の任意の方法により宿主細胞に導入され得る。これらの方法は、細胞宿主の型に依存して変わり、塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、他の物質を利用するトランスフェクション、およびウイルスによる感染が挙げられるが、これらに限定されない。大量の本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、適合宿主においてベクターまたは他の発現ビヒクルにおける本発明のポリヌクレオチドを発現することにより調製され得る。最も一般的に使用される原核生物宿主は、Echerichia coliの株であるが、他の原核生物（例えば、Bacillus subtilis）も使用され得る。Echerichia coliにおける発現は、本発明

10

20

30

40

50

を実施する好ましい様式である。

【0047】

本発明のベクターの構築は、従来のライゲーション技術を利用する。単離されたプラスミドまたはDNAフラグメントは、切断され、調整され、所望の形態に再度ライゲーションされ、必要なプラスミドを生ずる。所望の場合、構築されたプラスミドにおける正確な配列を確認するための分析は、公知の様式で実施される。発現ベクターを構築し、インビトロで転写物を調製し、宿主細胞にDNAを導入し、発現および機能を評価するための分析を実施するための好適な方法は、当業者には公知である。遺伝子存在、増幅および/または発現は、例えば、本明細書に提供される配列に基づき得る適切に標識されたプローブを用いて、従来のサザンブロッティング、mRNAの転写を定量するためのノザンブロッティング、ドットブロッティング（DNAもしくはRNA分析）、またはインサイチュハイブリダイゼーションによりサンプル中で直接測定され得る。当業者は、これらの方法が所望の場合変更されうるかを容易に考え得る。

10

【0048】

好ましい態様において、本発明の組換えDNA分子は、FkpA、SlyDおよびトリガー因子からなる群より選択されるFKBPシャペロンをコードする単一のヌクレオチド配列ならびに標的ポリペプチドをコードする単一のヌクレオチド配列を含む。

【0049】

2つのFKBPシャペロンドメインおよび1つの標的タンパク質ドメインを含む融合タンパク質もまた、非常に有利である。さらに好ましい態様において、本発明の組換えDNA分子は、FKBPシャペロンをコードする2つの配列ならびに標的ポリペプチドをコードする1つの配列を含む。

20

【0050】

DNA分子は、FKBPシャペロンをコードするDNA配列を共に標的タンパク質の上流に含むように設計され得る。あるいは、2つのFKBPドメインは、標的タンパク質をサンドイッチするように配列され得る。標的タンパク質の上流に両FKBPドメインを含む構築物は、本発明の好ましい態様である。

【0051】

2つのシャペロンドメインおよび標的ポリペプチドドメインを含むDNA構築物はまた、好ましくは、これらのドメインの間に2つのリンカーペプチドを含む。意図的なクローニングを可能にするためには、好ましくは、これらの2つのリンカーペプチド配列をコードするヌクレオチド配列は異なる。ヌクレオチド配列におけるこの違いは、必然的に、リンカーペプチドのアミノ酸配列における差を生ずる必要はない。いっそうさらに好ましい態様において、2つのリンカーペプチドのアミノ酸配列は同一である。かかる同一のリンカーペプチド配列は、例えば、FKBPシャペロンドメインおよび標的タンパク質ドメインを含む融合タンパク質が免疫学的測定に使用される場合、有利である。

30

【0052】

シャペロンの1つまたは全てを本発明の融合タンパク質の外に放出することが所望される場合、リンカーペプチドは、タンパク質分解性切断部位を含むように構築される。標的ポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリペプチド配列、その上流にFkpA、SlyDおよびトリガー因子からなる群より選択されるFKBPシャペロンをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む融合タンパク質をコードし、さらにタンパク質分解性切断部位を含むペプチドリナーをコードする核酸配列を含有する組換えDNA分子は、本発明のさらなる態様である。

40

【0053】

操作可能に連結された本発明の組換えDNA分子、すなわち、標的ポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列、および、その上流にFkpA、SlyDおよびトリガー因子から選択されるFKBPシャペロンをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む融合タンパク質をコードする組換えDNA分子を含む発現ベクターは、非常に有利であることが証明されている。

50

【 0 0 5 4 】

本発明の組換えDNAを含む発現ベクターは、無細胞翻訳系において融合タンパク質を発現するために使用され得るか、または宿主細胞を形質転換するために使用され得る。好ましい態様において、本発明は、本発明の発現ベクターで形質転換された宿主細胞に関する。

【 0 0 5 5 】

さらに好ましい態様において、本発明は、融合タンパク質を生成する方法に関する。該方法は、本発明の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養する工程、それぞれの宿主細胞における融合タンパク質の発現工程、および該融合タンパク質の精製工程を含む。

【 0 0 5 6 】

上記で考察したように、FkpA、SlyDまたはトリガー因子のFKBPシャペロンドメインは、それぞれ、天然に存在するか、または人工的に構築され、サイトゾル融合ポリペプチド発現を生ずる。従って、生成された融合タンパク質は、封入体の形態で得られる。当該分野でのおびただしい努力が任意の所望の組換えタンパク質または融合タンパク質を可溶化形態で直接得るために費やされているが、本発明者らは、本発明の融合タンパク質が可溶化形態で容易に封入体から得られることを見出している。従って、さらに好ましい態様において、本発明は、封入体から精製される上記工程の融合タンパク質を生成する方法に関する。

10

【 0 0 5 7 】

封入体からの融合タンパク質の精製は、容易に達成され、当業者に公知の標準的手順（カオトロピック可溶化および再折り畳みの種々の方法）により実施される。

20

【 0 0 5 8 】

融合タンパク質の単離および精製は、可溶化緩衝条件、すなわち、封入体、すなわち融合タンパク質が可溶化される緩衝液から開始する。適切な緩衝液（「非生理的」または「可溶化」緩衝液と称される）は、標的タンパク質およびFKBPシャペロンの両方が不可逆的に変性されないという必要条件がなければならない。かかる緩衝条件から開始すると、シャペロンは、標的タンパク質に密に近接し、非生理条件から生理条件への緩衝条件の変化は、融合タンパク質の沈殿なしに可能である。

【 0 0 5 9 】

適切な（非生理的）緩衝液、すなわち、本質的に不溶性である標的タンパク質およびPPIIシャペロンが共に可溶性である緩衝液は、高もしくは低pH、または高カオトロピック塩濃度あるいはその組み合わせのいずれかを利用する。可溶化緩衝液は、好ましくは、相当に高濃度のカオトロピック塩（例えば、6.0M塩化グアニジニウム）を約6のpHで有する緩衝液である。再生の際、標的タンパク質およびシャペロンは共にその天然様の構造をとり、シャペロンはその肯定的な可溶化効果を働かせる。

30

【 0 0 6 0 】

本発明の文脈において、生理的緩衝条件は、緩衝液に任意に存在し得る他の非塩成分（例えば、糖、アルコール、界面活性剤）とは無関係に、かかる添加剤が標的タンパク質およびシャペロンを含む融合タンパク質の可溶性を損なわない限り、5.0～8.5の間のpH値かつ500mM未満の総塩濃度により定義される。

【 0 0 6 1 】

種々の標的タンパク質が大量に発現されている。

40

【 0 0 6 2 】

生化学的に相当に異なる標的タンパク質（例えば、SlyD、FkpA（直ちに可溶性であるタンパク質）、HIV-1 p17（従来の発現系を用いて大量の発現をすることが困難であるタンパク質）、HTLV gp21（凝集傾向のあるタンパク質）、およびHIV-1 gp41、ならびにHIV-1 gp36（両タンパク質は、極度に凝集性があり、生理的緩衝条件下では本質的に不溶性である））を有する本発明の発現系は、例えば、極度によく役に立つことが示されている。特にこれらのタンパク質に関連する実施例4から容易に推測され得るように、本発明の効率的な発現系は役に立ち、高レベルの融合タンパク質の生成を生ずる。類似の肯定的な知見は、本発明の融合タンパク質として発現される種々の他の標的タンパク質でなされ得る。

50

【0063】

肯定的な例のリストから、本発明で開示される新規な発現系が相当に魅力的な普遍的発現系を提供することは容易に明らかとなる。

【0064】

本明細書で開示される発現系はまた、当該分野で推奨されるキャリアタンパク質（例えば、MBP）を利用する標準的な発現系に匹敵している。試験される標的ポリペプチドを有する新規な系は事実上有利であることが見出されている。本発明で生成される融合タンパク質の比収率は、MBP系の発現を使用する比収率と比較して、少なくともよく、大部分の場合はいっそう高かった。発現の効力は、例えば、種々の融合タンパク質に含まれる標的タンパク質の濃度と比較した、E. coli細胞質量の1gあたり、またはモル基準の融合タンパク質の収率の点の両方で評価され得る。

10

【0065】

好ましい態様において、本発明は、FkpA、SlpDおよびトリガー因子からなる群より選択されるFKBPシャペロンに対応する少なくとも1つのポリペプチド配列ならびに標的ペプチドに対応する少なくとも1つのポリペプチド配列を含む組換え的に生成された融合タンパク質に関する。

【0066】

従って、本発明の融合タンパク質が有利な特性（例えば、生成の容易性、操作性、他の重大なタンパク質の使用）を示すことが見出されている。これは、HIV-1 gp41を含む融合タンパク質も用いて得られた肯定的な結果の記載から容易に明らかとなる。組換え生成されたpg41自身が本質的に不溶性であるのに対して、本発明の融合タンパク質の一部として存在する場合は、容易に可溶性である。

20

【0067】

一般的に、20mMリン酸ナトリウムpH7.4、150mM NaClからなる緩衝液中で50nM以下の濃度で溶解できる場合、タンパク質は「本質的に不溶性である」とみなされる。生理的緩衝条件下（例えば、20mMリン酸ナトリウムpH7.4、150mM NaClからなる緩衝溶液中）でPPIシャペロン複合体に含まれる標的タンパク質が100nM以上の濃度で溶解できる場合、FKBPシャペロンおよび標的タンパク質を含む本発明の融合タンパク質は「可溶性である」とみなされる。

【0068】

本発明者らは、標的タンパク質が凝集傾向タンパク質様HIV-1 gp41である場合でさえ、本発明の組換え的に生成された融合タンパク質が封入体から可溶性形態で容易に得られ得ることを見出した。組換え的に生成されたFkpA-gp41に含まれるgp41の著しい特性は、「シャペロンされていない（unchaperoned）」gp41外部ドメイン（ectodomain）と比較すると、生理的緩衝条件でのその格別な可溶性である。

30

【0069】

さらに、本発明の融合タンパク質に含まれる標的タンパク質が天然様構造で容易に得られ得ることを示すことが可能となる。かかる天然様構造、例えば、HIV-1 gp41については、近（Near）UV-CDにより、または免疫反応性により確認されている。近UV-CD分析は、当業者に公知である典型的な「gp41サイン」を示している。

40

【0070】

本発明の融合タンパク質はまた、非常に取り扱いやすい。例えば、かかる融合タンパク質を再生することはかなり容易である。「カオトロピック物質」（すなわち、FkpA-gp41含有6.0~7.0M GuHCl）が別の方法で再折り畳みされ、全て熱力学的安定および可溶性天然様形態を生じ得ることは興味深い。再折り畳みは、透析および迅速希釈の両方により、ならびに再生サイズ排除クロマトグラフィーまたはマトリクス補助再折り畳みにより高い収率で達成される。これらの知見は、共有結合形式でのgp41-FkpA融合ポリペプチドが準安定タンパク質よりもずっと熱力学的に安定であることを示唆する。

【0071】

FKBPシャペロンの幾つか（例えば、FkpA）は、オリゴマーの形態、すなわち、2つ以上の

50

非共有的に結合されたFKBPポリペプチドを含む複合体でそのシャペロン機能をはたらかせる。本発明者らは、驚くべきことに、1つおよび同じポリペプチド上にかかる活性FKBPダイマーを単一の融合タンパク質として設計および生成することが可能であることを見出している。本発明者らは、これらの構築物を一本鎖PPI、または一本鎖FKBPと称している。従って、2つのSlyDドメインを含む一本鎖PPIは、scSlyDと称され、従って、2つのFkpAドメインを含む一本鎖PPIは、scFkpAと称される。一本鎖ペプチジル - プロリル - イソメラーゼ、すなわち、2つのPPIドメインを含む融合タンパク質は、非常に有利であり、従って、本発明の好ましい態様である。本発明のsc-PPIは、パルブリン、シクロフィリンまたはFKBPであり得る。FKBPファミリーのシャペロンから選択されるsc-PPIが好ましい。最も好ましくは、それぞれ、sc SlyDおよびSc FkpAである。

10

【0072】

FkpA、SlyDおよびトリガー因子からなる群より選択されるFKBPシャペロンに対応する少なくとも1つのポリペプチド配列、標的ペプチドに対応する少なくとも1つのポリペプチド配列、ならびに10~100個のアミノ酸の少なくとも1つのペプチドリinker配列を含む組換え的に生成された融合タンパク質は、本発明のさらに好ましい態様である。

【0073】

当業者が認識するように、ペプチドリinkerは、必要な適用に最も適切なアミノ酸を含むように構築され得る。例えば、疎水性標的タンパク質の場合、リンカーポリペプチドは、好ましくは、適切な数の親水性アミノ酸を含む。本発明はまた、特に、標的タンパク質および1つまたは2つのFKBPシャペロンまたはシャペロンドメインおよびドメインの間に適切なペプチドリinker配列を含む融合タンパク質に関する。標的ペプチドが遊離形態で必要とされるかかる適用について、適切なタンパク質分解性切断部位を含むリンカーペプチドが使用される。タンパク質分解性切断に適切なペプチド配列は、当業者に周知であり、なかでも、例えば、アルギニン残基のカルボキシ側で凝固因子Xaにより切断されるIle-Glu-Gly-Arg、またはGly-Leu-Pro-Arg-Gly-Ser、トロンピン切断部位などを含む。

20

【0074】

上記のように、本発明の融合タンパク質は、単純な再折り畳みスキームにより封入体から容易に得られ得る。これらは、容易に溶解でき、かかる融合タンパク質に含まれる標的ポリペプチドは、天然様構造 (confirmation) で容易に得られ得る。かかる天然様ポリペプチドは診断ならびに治療適用において最も有利であるので、これは感染生物由来のポリペプチドにとってかなり有利である。好ましい態様において、本発明の融合タンパク質は、標的タンパク質が感染生物由来であることが公知である目的のポリペプチドであることにさらに特徴を有する。本発明の好ましい感染生物は、HIV、HTLV、およびHCVである。

30

【0075】

科学的文献および特許文献から、ペプチド配列が診断的に直接関係のあるエピトープを含むことは周知である。当業者にとって、現今、かかる直接関係のあるエピトープを同定することには問題はない。さらに好ましい態様において、感染生物由来のポリペプチドに対応する標的タンパク質は、少なくとも1つの診断的に直接関係のあるエピトープを含む。

【0076】

この有利な特性により、さらに好ましい態様において、本発明の組換え的に生成された融合タンパク質は、研究動物の免疫化、ワクチンの生成または免疫学的測定にそれぞれ使用される。

40

【0077】

新規な融合タンパク質の治療適用が意図される場合、好ましくは、本発明の組換え的に生成された融合タンパク質および薬学的に許容され得る賦形剤を含む組成物が製剤化される。

【0078】

以下の実施例、参考文献、配列表および図面は、本発明の理解を助けるために提供され、その真の範囲は添付の特許請求の範囲に示される。本発明の趣旨を逸脱せずに手順における改変がなされ得ることが理解される。

50

【実施例】

【0079】

実施例1 FkpA系の発現系を使用するHIV-1 gp41の組換え生成

1.1 FkpAおよびgp41を含む発現プラスミドの構築

野生型FkpAをクローニングし、発現させ、幾つかの重要でない改変をしたBothmannおよびPlueckthun, J Biol Chem 275 (2000) 17106-17113に従って精製した。貯蔵のため、タンパク質溶液を20mM NaH₂PO₄/NaOH (pH6.0)、100mM NaClに対して透析し、26mg/ml (1mM) に濃縮した。

【0080】

サイトゾル発現のため、上記発現ベクターのFkpAコード配列を、シグナルペプチドをコードする配列部分を欠損するように、かつその代わりに成熟FkpAのコード領域のみを含むように改変した。 10

【0081】

第一の工程において、成熟E. coli FkpAのコード領域における制限部位BamHIを、プライマー：

【0082】

【化1】

5'-gcggtgttccgggtatccaccgaattc-3' (配列番号:1)

5'-gaattcgggtgggatacccggaacaccgc-3' (配列番号:2) 20

【0083】

を有するStratagene (La Jolla, CA; USA) のQuikChange部位指向変異誘発キットを用いて欠失させた。

【0084】

構築物をEcFkpA (BamHI) [GGGS]₃と名づけた。

【0085】

HIV-1 gp41 (535-681) -His₆をクローニングし、T7プロモーター系の発現系において発現した。HIV-1エンベロープタンパク質由来のアミノ酸531-681をコードする遺伝子フラグメントを、プライマー： 30

【0086】

【化2】

5'-cggtatccgggtggcggttcaggcggtgctctggtggcggtacgctg-acggtacaggccag-3' (配列番号:3)

5'-ccgctcgaggtaccacagccaatttgttat-3' (配列番号:4)

【0087】

を用いて、T7系の発現ベクターからPCRにより増幅した。 40

【0088】

フラグメントをBamHIおよびXhoI制限部位を用いてEcFkpA (BamHI) [GGGS]₃に挿入した。

【0089】

FkpAとe-gp41の間のグリシン - セリン - リッチリンカー [GGGS]₃についてのコドン、FkpAのクローニング用のリバースプライマーおよびe-gp41のクローニング用のフォワードプライマーを用いて挿入した。

【0090】

得られた構築物を配列決定し、所望のタンパク質をコードしていることを見出した。このタンパク質のパリアントをまた、標準的手順に従って部位指向変異誘発により生成してい 50

る。野生型配列と比較して4つのアミノ酸置換基を含むgp41のバリエーションは、例えば、配列番号：5および6のDNA構築物によりコードされ、それぞれ発現系としてFkpAまたはSlyDを利用する。

【0091】

1.2 E. coli細胞由来のFkpA-gp41融合タンパク質の精製

発現プラスミドをもつE. coli BL21細胞を0.7のOD₆₀₀に増殖させ、サイトゾル過剰発現を1mMのIPTGを37℃の増殖温度で添加することにより誘導した。誘導4時間後、細胞を遠心分離（5000gで20分）により収穫した。細菌ペレットを50mMリン酸ナトリウムpH7.8、6.0M GuHCl（塩化グアニジニウム）、5mMイミダゾールに再懸濁し、完全溶解のため室温で攪拌した（10分）。遠心分離（Sorvall SS34, 20000rpm, 4℃）を繰り返した後、上清を濾過（0.8/0.2μm）し、溶解緩衝液中で予め平衡化したNi-NTAカラム（NTA：ニトリロトリアセテート；Qiagen；Germantown, MD）に適用した。非特異的に結合したタンパク質を、10カラム容積の溶解緩衝液を適用することにより洗浄工程中で除去した。最後に、結合標識タンパク質を、50mMリン酸ナトリウム、pH2.5、6.0M GuHClで溶出し、4ml画分に収集した。吸光度を280nmで記録した。

10

【0092】

得られた酸性およびカオトロピック溶液を、さらなる精製工程またはインビトロ再折り畳み実験のため4℃で貯蔵し得る。

【0093】

非折り畳み物質で開始すると、種々の再折り畳み方法（例えば、透析、迅速希釈、再生サイズ排除クロマトグラフィーまたはマトリクス補助再折り畳み）が使用され、首尾よく実施され得、それら全ては、同じ天然様折り畳みされ、かつ可溶性なタンパク質を実質上誘発する。

20

【0094】

1.3 透析および迅速希釈による再生

上記のように可溶化した物質を透析により生理的緩衝条件に移動する。透析チューブの選択カットオフ値は、4000～6000ダルトンであった。

【0095】

外部ドメイン（融合タンパク質のHIV-1 gp41部分）の再折り畳みを誘導するため、50mMリン酸ナトリウム、pH2.5、50mM NaCl（塩化ナトリウム）に対する透析により溶出したタンパク質からGuHClを除去した。単離した外部ドメインがすべてらせん状で、この極度のpHで三次接触を形成することは周知である。近UV CDにより組換え的に生成したFkpAを分析する場合、FkpAが同じ条件下では本質的に構築されないことを見出した。透析によるgp41-FkpAの再折り畳みが、共有結合されたgp41およびFkpAタンパク質ドメインを含む直ちに溶解できるタンパク質複合体を生ずることは驚くべきことである。UVスペクトル（図1）は、迷光がない、すなわち300nmより上には明らかな吸収がない。迷光は、凝集体の指標であり、従って、図1に示すスペクトルは再折り畳み物質が有意な量の凝集体を含まないことを暗示する。

30

【0096】

円偏光二色性分光分析（CD）は、タンパク質における二次および三次構造の両方を評価するための選択方法である。芳香領域（260～320nm）における楕円率は、タンパク質中の三次接触（すなわち、規則正しく折り畳まれたタンパク質の球状構造）を知らせ、一方、アミド領域における楕円率は、タンパク質骨格における規則正しい繰り返し要素、すなわち二次構造を反映する。

40

【0097】

図2に示す近UV CDスペクトルは、外部ドメイン（融合タンパク質に関連する）がpH2.5で天然様三次接触を示すやむにやまれぬ徴候を提供する。共有結合されたgp41/FkpAタンパク質ドメインのスペクトルは、同一条件下で単離された外部ドメインのスペクトルとほとんど一致する（データは示さず）。gp41の典型的なサインは、290nmで楕円率の最大値、285nmで特徴的な肩および光学活性のジスルフィド結合を反映する260nmで別の最大値が見

50

られた。FkpAが各条件下で全く近UVシグナルに寄与しないことを示すことは重要である。事実、pH2.5のFkpAの芳香楕円率は、事実上ベースラインに等しい（データは示さず）。

【0098】

近UV領域由来の結果に一致し、融合構築物のpH2.5での遠UV CDは、主として構築されたgp41分子を示す。220nmおよび208nmでの2つの最大値は、全てらせん状の外部ドメインの典型的なサインに近づき、対応する（図3）。FkpA-gp41融合ポリペプチドを、迅速希釈により、示した条件（50mMリン酸ナトリウム、pH2.5、50mM NaCl）から生理的緩衝条件に容易に移動し得る。結論として、近および遠UV CDの両方は、天然様構造のgp41（FkpAをまた含む融合タンパク質に関連する）が種々の従来の様式で利用可能であることを強調する。

10

【0099】

1.4 サイズ排除クロマトグラフィーによる再生（SEC）

非折り畳みgp41-FkpAポリペプチド（50mMリン酸ナトリウム、pH7.8、7.0M GuHClに溶解）を、20mMリン酸ナトリウム、pH7.4、50mM NaCl、1mM EDTAで平衡化したSuperdex 200ゲル濾過カラムに適用した。FkpA-gp41は、本質的に3つの主な画分：高分子付随物として、明白なヘキサマー種として、および明白なトリマー種として溶出する。明白なトリマー画分を濃縮して、近UV CD測定におけるその三次構造について評価した（図4）。

【0100】

得られたグラフは、キャリアタンパク質FkpAおよび標的タンパク質gp41の両方が1:1比で寄与する事実上オーバーレイ曲線である。最も幸いにも、gp41は、中性pHで三次構造を示し、共有結合されたシャペロンにより明らかに可溶化されている。換言すれば、シャペロンFkpAは、天然様構造の外部ドメインgp41を物質として許容し、かつ中性作用pHでこの折り畳みにくい（hard-to-fold）タンパク質を可溶化するのである。従って、診断目的のために大量の可溶性gp41抗原を生成する重大な必要性を満たす。

20

【0101】

pH7.4でのFkpA-gp41の遠UV CD（図5）は、FkpAおよびgp41それぞれのシグナル寄与の相加性を示す近UV CD結果を確認する。予想されるように、スペクトルは非常にらせん状のgp41外部ドメイン（それぞれ220nmおよび208nmでの最大楕円率）により左右される。

【0102】

上記条件下で、pH7.4で可溶化された共有結合されたgp41/FkpAタンパク質ドメインを用いて得られたデータは、FkpAおよびgp41がポリペプチド構築物中で独立した折り畳み単位として作用することを示す。

30

【0103】

実施例2 SlyD系の発現ベクターの使用

シャペロンSlyDを、E. coliから慣用的なクローニング手順により単離している。組換え発現について、SlyDのアミノ酸1~165をコードするDNA構築物を調製している。融合パートナーとしてSlyD（1~165）および標的タンパク質としてHIV-1 gp41（配列番号：6を参照）を含む発現ベクターを構築している。融合タンパク質を発現し、上記FkpA-gp41について記載のように首尾よく精製した。興味深いことに、本発明者らは、SlyD（1~165）-gp41型の天然様融合ポリペプチドが室温での50mMリン酸ナトリウムpH7.4、150mM NaClに対するカオトロピック物質（例えば、7.0M GuHClに溶解）の透析によりきわめて従来の様式で得られ得ることを見出した。

40

【0104】

実施例3 scFkpAおよびscSlyDの精製

一本鎖PPIアーゼscSlyD（配列番号：7）およびscFkpA（配列番号：8）をそれぞれ、実施例1に記載されるのと実質的に同じ精製プロトコールに従ってE. coli過剰プロデューサーから得た。簡単には、誘導細胞を収穫し、PBSで洗浄し、50mMリン酸ナトリウムpH7.8、100mM塩化ナトリウム、7.0M GuHClで室温にて溶解した。非折り畳み標的タンパク質をそのC-末端ヘキサ-His-タグを介してNi-NTAカラムに結合し、50mMリン酸ナトリウムpH7.8、100mM塩化ナトリウム中で再折り畳みした。このマトリクス補助再折り畳み手順の後、

50

タンパク質をイミダゾール勾配で溶出し、Superdex 200（登録商標）カラムでのゲル濾過に供した。

【0105】

あるいは、scSlyDおよびscFkpAを溶出後、透析し、イミダゾールの残りの濃縮物を除去してもよい。両タンパク質は、かなり可溶性であることがわかる。例えば、scSlyDは、25mg/mlまでの濃度では凝集傾向がない。再折り畳みされたscPPIアーゼの三次構造を解明するために、本発明者らは、近UV領域におけるCDスペクトルをモニターした。scSlyDおよびscFkpA両方のサインは、互いに似ており、接近した関係、従って、2つのFKBPの構造相同性を反映する。しかし、芳香残基における低含量により、scSlyDのシグナル強度（図6）は、scFkpAの1つよりも有意に低い。

10

【0106】

実施例4 標的タンパク質の改良発現

生化学的にすっかり異なる標的タンパク質HIV-1 gp41、HIV-2 gp36、HIV-1 p17およびHTLV gp21を、融合パートナー（gp41、gp36、p17、gp21）を有さないpET/BL21発現系を使用するか、または同じ標準的発現系であるが本発明の融合タンパク質（SlyD-gp41、FkpA-gp41、FkpA-p17、SlyD-gp36、FkpA-gp21）をコードするDNA構築物を含む系を使用するかのいずれかで発現している。これらの系の効率を、E. coli細胞質量あたりの組換えタンパク質の収率（mg/g）の点で比較している。表1から容易に明らかなように、新規な発現系は、試験した全てのタンパク質について有意な改善を導いた。

【0107】

20

【表1】

表1:

タンパク質	収率 [mg タンパク質 / g E. coli 細胞質量]
gp41	~1-2
SlyD-gp41	~30
FkpA-gp41	~25
p17	~1
FkpA-p17	~15
gp36	~1-2
SlyD-gp36	~45
gp21	~4
FkpA-gp21	~30

30

40

【0108】

参考文献一覧

Sambrook, J.ら, 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(1989)-, J. Sambrook, E. F. FritschおよびT. Maniatis編, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY

Beaucage, S.L.およびCaruthers, M.H., Tetrahedron Letters 22 (1981) 1859 ~ 1862

Ausubel, F.ら, 「Current protocols in molecular biology」(1987および定期的改訂版), F. Ausubel, R. BrentおよびK.R.E.編, Wiley & Sons Verlag, New York

50

Fischer, G.ら, Nature 337 (1989) 476~8
Hottenrott, S.ら, J Biol Chem 272 (1997) 15697~701
Kapust, R.B.およびWaugh, D.S., Protein Sci 8 (1999) 1668~74
Kay, J.E., Biochem J 314 (1996) 361~85
Lane, W.S.ら, J Protein Chem 10 (1991) 151~60
Matteucci, M.D.およびCaruthers, M.H., J. Am. Chem. Soc. 103 (1981) 3185~3191
Metzger, D.ら, Nature 334 (1988) 31~6
Rahfeld, J.U.ら, FEBS Lett 352 (1994) 180~4
Ramm, K.およびPluckthun, A., J Biol Chem 275 (2000) 17106~13
Schmid, F.X., Molecular chaperones in the life cycle of proteins (1998) 361~389, 10
A.L. FinkおよびY. Goto編, Marcel Decker Inc., New York
Scholz, C.ら, Embo J 16 (1997) 54~8
欧州特許第293 249号
W000/28011
W093/25533
W097/10253
W098/1349

【図面の簡単な説明】

【0109】

【図1】図1は、pH2.5でのFkpA-gp41のUVスペクトルを表す。50mMリン酸ナトリウム、pH 20
2.5; 50mM NaClに対する透析後の融合ポリペプチドFkpA-gp41のUVスペクトル。驚くべき
ことに、2ドメイン構築は、可溶化カオトロピック剤GuHClの除去後、完全な可溶性のま
まである。ベースラインドリフトおよび300nmを超えた波長での重大な見かけ吸収を引き
起こすことが予測される迷光凝集の存在の徴候はない。

【図2】図2は、pH2.5でのFkpA-gp41の近UV CDスペクトルを表す。スペクトルは、20mM
リン酸ナトリウム、pH2.5; 50mM NaCl中で20 にてJasco 720分光偏光計で記録され、ノ
イズを減少するため9倍に増大させた。タンパク質濃度は、0.5cmの通過長 (pass length
) で22.5μMであった。芳香の楕円率は、gp41の典型的なサインを示す。pH2.5で、FkpAは
、主として構築されず、近UV-CDにおけるシグナルを全く与えない。

【図3】図3は、pH2.5でのFkpA-gp41の遠UV CDスペクトルを表す。スペクトルは、20mM 30
リン酸ナトリウム、pH2.5; 50mM NaCl中で20 にてJasco 720分光偏光計で記録され、シ
グナル対ノイズ比を改善するため9倍に増大させた。タンパク質濃度は、0.2cmの通過長で
2.25μMであった。220nmおよび208nmでの最小値は、融合タンパク質に関連するgp41の主
たるらせん構造を示す。197nmより下でのスペクトルノイズは、高いアミド吸収により、
融合タンパク質のいずれの構造特性を報告しない。それにもかかわらず、193nmでの典型
的ならせん最大値は、推測され得る。

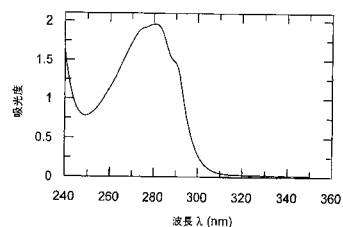
【図4】図4は、生理的緩衝条件下でのFkpA-gp41の近UV CDスペクトルを表す。スペクト
ルは、20mMリン酸ナトリウム、pH7.4; 50mM NaCl中で20 にてJasco 720分光偏光計で記
録され、ノイズを減少するため9倍に増大させた。タンパク質濃度は、0.5cmの通過長で15
.5μMであった。顕著なことに、gp41およびFkpAの共有結合されたタンパク質ドメイン (40
連続線) の芳香の楕円率は、pH3.0での天然様の全てのらせんgp41の寄与 (下の破線) お
よびpH7.4でのFkpAの寄与 (上の破線) から加法的に作成される。これは、ポリペプチド
融合タンパク質に結合される場合に、キャリアFkpAおよび標的gp41 (すなわち、2つの別
個の機能的折り畳みユニット) が可逆的にかつある程度独立して再折り畳みすることを示
す。

【図5】図5は、生理的緩衝条件下でのFkpA-gp41の遠UV CDスペクトルを表す。スペクト
ルは、20mMリン酸ナトリウム、pH7.4; 50mM NaCl中で20 にてJasco 720分光偏光計で記
録され、シグナル対ノイズ比を改善するため9倍に増大させた。タンパク質濃度は、0.2cm
の通過長で1.55μMであった。それぞれ220nmおよび208nmでの強いシグナルは、融合構築
物の文脈におけるgp41の主たるらせん構造を示す。198nmより下のノイズは、高いタンパ 50

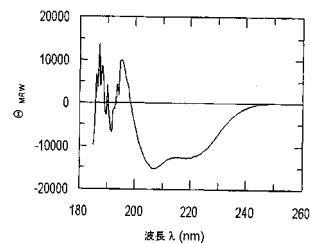
ク質吸収により、FkpA-gp41のいずれの二次構造特性も反映しない。

【図6】図6は、scFkpAおよびscSlyDの近UV-CDスペクトルは、互いに似ていることを示す。CDスペクトルは、0.5cmキュベット中でJasco 720分光偏光計で記録され、シグナル対ノイズ比を改善するために平均された。緩衝条件は、20、50mMリン酸ナトリウムpH7.8、100mM塩化ナトリウムであった。タンパク質濃度は、scFkpA(280nmでの上線)およびscSlyD(280nmでの下線)両方ともそれぞれ45 μ Mであった。両タンパク質の構造類似は、「フィンガープリント領域」における類似のサインにより証明される。

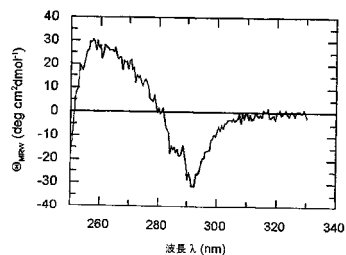
【図1】



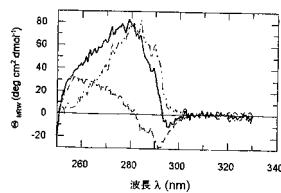
【図3】



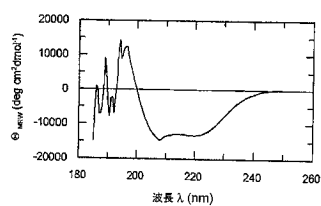
【図2】



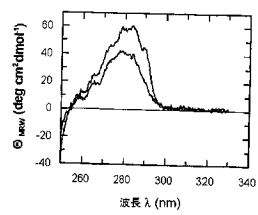
【図4】



【図5】



【 図 6 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/000878 A2

(51) International Patent Classification: C12N 9/90

(21) International Application Number: PCT/EP02/06957

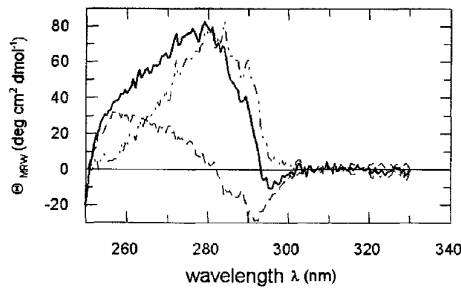
(22) International Filing Date: 24 June 2002 (24.06.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
01 115 225.3 22 June 2001 (22.06.2001) EP
01 120 939.2 31 August 2001 (31.08.2001) EP(71) Applicant (for DE only): ROCHE DIAGNOSTICS
GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, 68305
Mannheim (DE).(71) Applicant (for all designated States except DE): FHOFF-
MANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzscherstr. 124,
CH-4070 Basel (CH).(72) Inventors: SCHOLZ, Christian; Sindelsdorfer Strasse
35a, 82377 Penzberg (DE); ANDRES, Herbert; Kapel-
lenwiese 39, 82377 Penzberg (DE); FAATZ, Elke;
Steinkreuz 1, 82386 Huglfing (DE); ENGEL, Alfred;
Kustermannstrasse 3a, 82377 Tutzing (DE); SCHMITT,Urban; Waldstrasse 36, 82386 Oberhausen (DE);
BAZARSUREN, Ariuna; Birkenstrasse 29, 82377
Penzberg (DE); SCHAARSCHMIDT, Peter; Birken-
strasse 4, 82390 Iherfing (DE).(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NI, SN, TD, TG).Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: USE OF FKBP CHAPERONES AS EXPRESSION TOOL

(57) Abstract: The present invention relates to the cloning and expression of foreign protein or polypeptides in bacteria such as *Escherichia coli*. In particular, this invention relates to expression tools comprising a FKBP-type peptidyl prolyl isomerase selected from the group consisting of FkpA, SlyD, and trigger factor; methods of recombinant protein expression; the recombinant polypeptides thus obtained as well as to the use of such polypeptides.

WO 03/000878 A2

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

Use of FKBP chaperones as expression tool

The present invention relates to the cloning and expression of a heterologous protein or polypeptide in bacteria such as *Escherichia coli*. In particular, this invention relates to expression tools comprising a FKBP-type peptidyl prolyl isomerase selected from the group consisting of FkpA, SlyD, and trigger factor, methods of recombinant protein expression, 5 the recombinant polypeptides thus obtained as well as to the use of such polypeptides.

A large variety of expression systems has been described in the patent as well as in the scientific literature. However, despite the fact that fusion proteins have become a cornerstone of modern biology, obtaining the target protein in a soluble, biologically active form, as well as in high yield, continues to be a major challenge (Kapust, R. B. and Waugh, 10 D. S., Protein Sci 8 (1999) 1668-74).

Examples of fusion partners that have been touted as solubilizing agents include thioredoxin (TRX), glutathione S-transferase (GST), maltose-binding protein (MBP), Protein A, ubiquitin, and DsbA. Although widely recognized and potentially of great importance, this solubilizing effect remains poorly understood. It is not clear, for example, 15 what characteristics besides intrinsically high solubility epitomize an effective solubilizing agent. Are all soluble fusion partners equally proficient at this task, or are some consistently more effective than others? Similarly, it is not known whether the solubility of many different polypeptides can be improved by fusing them to a highly soluble partner or whether this approach is only effective in a small fraction of cases.

20 The state of the art relating to the most potent expression systems has recently been summarized by Kapust et al., *supra*. In their attempt to produce soluble fusion proteins comprising various target proteins they assessed three different and prominent candidate fusion partners. Maltose-binding protein (MBP), glutathione S-transferase (GST), and thioredoxin (TRX) have been tested for their ability to inhibit the aggregation of six diverse 25 proteins that normally accumulate in an insoluble form. All these candidate expression systems are known to the skilled artisan and described in detail elsewhere (e.g., EP 293 249 describes in detail the use of GST as an expression tool).

Remarkably, Kapust et al., *supra*, found that MBP is a far more effective solubilizing agent than the other two fusion partners also widely used in the art. Moreover, they 30 demonstrated that only in some cases fusion to MBP can promote the proper folding of the attached protein into its biologically active conformation.

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 2 -

It is especially critical that many aggregation-prone polypeptides may be rendered soluble by fusing them to an appropriate partner, but that some candidate fusion partners in a more or less unpredictable way are much better solubilizing agents than others.

While working on the recombinant expression of several retroviral surface glycoproteins (rsgps), we investigated the utility of many expression tools as known and recommended in the art, e.g. by Kapust et al., *supra*. However, we found that all the expression systems tested did suffer from one or several of the following shortcomings: low yield, fusion polypeptide difficult to handle, or insolubility of the fusion protein at physiological buffer conditions.

A great demand therefore exists to provide for alternative, efficient expression tools, which are especially appropriate for the recombinant expression of aggregation prone proteins, e.g. like the rsgps.

There is a wealth of patent literature relating to proteins which bind to the immunosuppressant FK-506, the so-called FK-506 binding proteins or FKBP.

These proteins have been extensively studied and commercial applications have been designed centering around the FK-506 binding activity of these proteins. For example, WO 93/25533 makes use of CTP:GMP-3-deoxy-D-manno-octulosonate cytidyl transferase (=CKS) as expression tool. A FKBP is inserted into a CKS-based expression vector downstream of the CKS gene. The fusion protein obtained is used to improve measurements of FK-506 and other immunosuppressants.

WO 00/28011 discloses materials and methods for regulation of biological events such as target gene transcription and growth, proliferation and differentiation of engineered cells.

WO 97/10253 relates to a high throughput assay for screening of compounds capable of binding to a fusion protein which consists of a target protein and an FK-506-binding protein. Disclosed is the use of a FKBP12-Src homology (SH2) fusion protein in an high throughput screening assay. The fusion protein is produced in soluble form in the bacterial periplasm and released by standard freeze-thaw treatment.

It was the task of the present invention to investigate whether it is possible to develop and provide efficient alternative expression systems which can be used for improved expression of a recombinant protein comprising a rsgp as a target protein and which at the same time are also appropriate for less critical target proteins.

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 3 -

To our surprise we have been able to identify certain modular members of the FKBP-type family of the peptidyl prolyl isomerase (PPI or PPIase) chaperones as very promising cloning tools. We found that an expression system based on a FKBP-type family of the chaperone selected from the group consisting of SlyD, FkpA, and trigger factor is ideal to
5 express critical proteins like an *rsgp* and at the same time we could also demonstrate that these chaperones as well represent extremely promising cloning tools for less critical target proteins.

Summary of the invention

The present invention in a first embodiment relates to a recombinant DNA molecule,
10 encoding a fusion protein, comprising at least one nucleotide sequence coding for a target polypeptide and upstream thereto at least one nucleotide sequence coding for a FKBP chaperone, characterized in that the FKBP chaperone is selected from the group consisting of FkpA, SlyD and trigger factor.

Preferred ways of designing such recombinant DNA molecules as well as their use as part of
15 an expression vector, a host cell comprising such expression vector, and in the production of fusion polypeptide are also disclosed.

It has in addition been found that the recombinant fusion polypeptides themselves exhibit surprising and advantageous properties, e.g. with regard to solubilization, purification and handling. In a further embodiment the present invention relates to a recombinantly
20 produced fusion protein comprising at least one polypeptide sequence corresponding to a FKBP chaperone selected from the group consisting of FkpA, SlyD and trigger factor and at least one polypeptide sequence corresponding to a target peptide.

A further embodiment relates to a recombinantly produced fusion protein comprising at least one polypeptide sequence corresponding to a FKBP chaperone selected from the
25 group consisting of FkpA, SlyD and trigger factor, at least one polypeptide sequence corresponding to a target polypeptide, and at least one peptidic linker sequence of 10 - 100 amino acids.

Preferred recombinant fusion polypeptides are also disclosed as well as the use of such fusion polypeptides in various applications.

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 4 -

Description of the Figures

Figure 1 UV spectrum of FkpA-gp41 at pH 2.5

UV-spectrum of the fusion polypeptide FkpA-gp41 after dialysis against 50 mM sodium phosphate, pH 2.5; 50 mM NaCl. Surprisingly, the two-domain construct remains completely soluble after removal of the solubilizing chaotropic agent GuHCl. There is no evidence for the existence of light-straying aggregates that would be expected to cause a baseline drift and significant apparent absorption at wavelengths beyond 300 nm.

Figure 2 Near UV CD spectrum of FkpA-gp41 at pH 2.5

The spectrum was recorded on a Jasco 720 spectropolarimeter in 20 mM sodium phosphate, pH 2.5; 50 mM NaCl at 20°C and was accumulated nine times to lower the noise. Protein concentration was 22.5 µM at a path length of 0.5 cm. The aromatic ellipticity shows the typical signature of gp41. At pH 2.5, FkpA is largely unstructured and does not contribute to the signal in the Near-UV-CD at all.

Figure 3 Far UV CD spectrum of FkpA-gp41 at pH 2.5

The spectrum was recorded on a Jasco 720 spectropolarimeter in 20 mM sodium phosphate pH 2.5; 50 mM NaCl at 20°C and was accumulated nine times to improve the signal-to-noise ratio. Protein concentration was 2.25 µM at a path-length of 0.2 cm. The minima at 220 and 208 nm point to a largely helical structure of gp41 in the context of the fusion protein. The spectral noise below 197 nm is due to the high amide absorption and does not report on any structural features of the fusion protein. Nevertheless, the typical helix-maximum at 193 nm can be guessed.

Figure 4 Near UV CD of FkpA-gp41 under physiological buffer conditions.

The spectrum was recorded on a Jasco 720 spectropolarimeter in 20 mM sodium phosphate, pH 7.4; 50 mM NaCl at 20°C and was accumulated nine times to lower the noise. Protein concentration was 15.5 µM at a path-length of 0.5 cm. Strikingly, the aromatic ellipticity of the covalently linked protein domains of gp41 and FkpA (continuous line) is made up additively from the contributions of native-like all-helical gp41 at pH 3.0 (lower dashed line) and the contributions of FkpA at pH 7.4 (upper dashed line). This indicates that the carrier FkpA and the target gp41 (i.e. two distinct functional folding

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 5 -

units) refold reversibly and quasi-independently when linked in a polypeptide fusion protein.

Figure 5 Far UV CD of FkpA-gp41 under physiological buffer conditions.

The spectrum was recorded on a Jasco 720 spectropolarimeter in 20 mM Sodium phosphate, pH 7.4; 50 mM NaCl at 20°C and accumulated nine times to improve the signal-to-noise ratio. Protein concentration was 1.55 µM at a path-length of 0.2 cm. The strong signals at 222 nm and 208 nm, respectively, point to a largely helical structure of gp41 in the context of the fusion construct. The noise below 198 nm is due to the high protein absorption and does not reflect any secondary structural properties of FkpA-gp41.

Figure 6 The Near-UV-CD-spectra of scFkpA and scSlyD resemble each other

CD spectra were recorded on a Jasco-720 spectropolarimeter in 0.5 cm-cuvettes and averaged to improve the signal-to-noise-ratio. Buffer conditions were 50 mM sodium phosphate pH 7.8, 100 mM sodium chloride at 20 °C. Protein concentration was 45 µM for both scFkpA (top line at 280 nm) and scSlyD (lower line at 280 nm), respectively. The structural similarity of both proteins is evidenced by the similar signature in the „fingerprint region“.

Detailed description

The present invention describes novel polypeptide expression systems. In a preferred embodiment it relates to a recombinant DNA molecule, encoding a fusion protein, comprising at least one nucleotide sequence coding for a target polypeptide and upstream thereto at least one nucleotide sequence coding for a FKBP chaperone, characterized in that the FKBP chaperone is selected from the group consisting of FkpA, SlyD and trigger factor.

As the skilled artisan will appreciate the term “at least one” is used to indicate that one or more nucleotide sequences coding for a target polypeptide, or for a FKBP chaperone, respectively, may be used in construction of a recombinant DNA molecule without departing from the scope of the present invention. Preferably the DNA construct will comprise one or two sequences coding for a target polypeptide, one being most preferred, and at the same time will contain at least one and at most four sequences coding for a chaperone, one or two being most preferred.

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 6 -

The term "recombinant DNA molecule" refers to a DNA molecule which is made by the combination of two otherwise separated segments of sequence accomplished by the artificial manipulation of isolated segments of polynucleotides by genetic engineering techniques or by chemical synthesis. In so doing one may join together polynucleotide
5 segments of desired functions to generate a desired combination of functions.

Large amounts of the polynucleotides may be produced by replication in a suitable host cell. Natural or synthetic DNA fragments coding for proteins or fragments thereof will be incorporated into recombinant polynucleotide constructs, typically DNA constructs, capable of introduction into and replication in a prokaryotic or eukaryotic cell.

10 The polynucleotides may also be produced by chemical synthesis, including, but not limited to, the phosphoramidite method described by Beaucage, S. L. and Caruthers, M. H., Tetrahedron Letters 22 (1981) 1859-1862 and the triester method according to Matteucci, M. D. and Caruthers, M. H., J. Am. Chem. Soc. 103 (1981) 3185-3191. A double-stranded fragment may be obtained from the single-stranded product of chemical synthesis either by
15 synthesizing the complementary strand and annealing the strands together under appropriate conditions or by adding the complementary strand using DNA polymerase with an appropriate primer sequence.

A polynucleotide is said to "encode" a polypeptide if, in its native state or when manipulated by methods known in the art, the polynucleotide can be transcribed and/or
20 translated to produce the polypeptide or a fragment thereof.

A target polypeptide according to the present invention may be any polypeptide required in larger amounts and therefore difficult to isolate or purify from other non-recombinant sources. Examples of target proteins preferably produced by the present methods include mammalian gene products such as enzymes, cytokines, growth factors, hormones, vaccines,
25 antibodies and the like. More particularly, preferred overexpressed gene products of the present invention include gene products such as erythropoietin, insulin, somatotropin, growth hormone releasing factor, platelet derived growth factor, epidermal growth factor, transforming growth factor α , transforming growth factor β , epidermal growth factor, fibroblast growth factor, nerve growth factor, insulin-like growth factor I, insulin-like
30 growth factor II, clotting Factor VIII, superoxide dismutase, α -interferon, γ -interferon, interleukin-1, interleukin-2, interleukin-3, interleukin-4, interleukin-5, interleukin-6, granulocyte colony stimulating factor, multi-lineage colony stimulating activity, granulocyte-macrophage stimulating factor, macrophage colony stimulating factor, T cell

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 7 -

growth factor, lymphotoxin and the like. Preferred overexpressed gene products are human gene products. Moreover, the present methods can readily be adapted to enhance secretion of any overexpressed gene product which can be used as a vaccine. Overexpressed gene products which can be used as vaccines include any structural, membrane-associated, 5 membrane-bound or secreted gene product of a mammalian pathogen. Mammalian pathogens include viruses, bacteria, single-celled or multi-celled parasites which can infect or attack a mammal. For example, viral vaccines can include vaccines against viruses such as human immunodeficiency virus (HIV), vaccinia, poliovirus, adenovirus, influenza, hepatitis A, hepatitis B, dengue virus, Japanese B encephalitis, Varicella zoster, 10 cytomegalovirus, hepatitis A, rotavirus, as well as vaccines against viral diseases like measles, yellow fever, mumps, rabies, herpes, influenza, parainfluenza and the like. Bacterial vaccines can include vaccines against bacteria such as *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenza*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium leprae*, *R. rickettsii*, *Shigella*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Coccidioides immitis*, *Borellia burgdorferi*, and the like. 15

Preferably, the target protein is a member of a group consisting of HIV-1 gp41, HIV-2 gp36, HTLV gp21, HIV-1 p17, SlyD, FkpA, and trigger factor.

A target polypeptide according to the present invention may also comprise sequences, e.g., diagnostically relevant epitopes, from several different proteins constructed to be expressed 20 as a single recombinant polypeptide.

The folding helpers termed peptidyl prolyl isomerases (PPIs or PPIases) are subdivided into three families, the parvulines (Schmid, F. X., Molecular chaperones in the life cycle of proteins (1998) 361-389, Eds. A. L. Fink and Y. Goto, Marcel Decker Inc., New York), Rahfeld, J. U., et al., FEBS Lett 352 (1994) 180-4) the cyclophilins (Fischer, G., et al., 25 Nature 337 (1989) 476-8, and the FKBP family (Lane, W. S., et al., J Protein Chem 10 (1991) 151-60). The FKBP family exhibits an interesting biochemical feature since its members have originally been identified by their ability to bind to macrolides, e.g., FK 506 and rapamycin (Kay, J. E., Biochem J 314 (1996) 361-85).

According to the present invention the preferred modular PPIases are FkpA (Ramm, K. 30 and Pluckthun, A., J Biol Chem 275 (2000) 17106-13), SlyD (Hottenrott, S., et al., J Biol Chem 272 (1997) 15697-701) and trigger factor (Scholz, C., et al., Embo J 16 (1997) 54-8), all members of the FKBP family. Most preferred are the chaperones FkpA and SlyD.

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 8 -

It is also well known and appreciated that it is not necessary to always use the complete sequence of a molecular chaperone. Functional fragments of chaperones (so-called modules) which still possess the required abilities and functions may also be used (cf. WO 98/13496).

- 5 For instance, FkpA is a periplasmic PPI that is synthesized as an inactive precursor molecule in the bacterial cytosol and translocated across the cytoplasmic membrane. The active form of FkpA (mature FkpA or periplasmic FkpA) lacks the signal sequence (amino acids 1 to 25) and thus comprises amino acids 26 to 270 of the precursor molecule. Relevant sequence information relating to FkpA can easily be obtained from public
10 databases, e.g., from "SWISS-PROT" under accession number P 45523. The FkpA used as expression tool according to the present invention lacks the N-terminal signal sequence.

- A close relative of FkpA, namely SlyD, consists of a structured N-terminal domain responsible for catalytic and chaperone functions and of a largely unstructured C-terminus that is exceptionally rich in histidine and cysteine residues (Hottenrott, supra). We found
15 that a C-terminally truncated variant of SlyD comprising amino acids 1-165 exerts exceptionally positive effects on the efficient expression of target proteins. Unlike in the wild-type SlyD, the danger of compromising disulfide shuffling is successfully circumvented in the truncated SlyD-variant (1-165) used. A recombinant DNA molecule comprising a truncated SlyD (1-165) represents a preferred embodiment of the present
20 invention.

- In a preferred mode of designing a DNA construct according to the present invention no signal peptides are included. The expression systems according to the present invention have been found most advantageous when working as cytosolic expression system. This cytosolic expression results in the formation of inclusion bodies. Different from the
25 pronounced and well-known problems usually associated with inclusion bodies, we now have found that not only an exceptionally high amount of protein is produced, but that the recombinant proteins according to the present invention are also easy to handle, e.g. easy to solubilize and to refold. In a preferred embodiment the present invention thus relates to a recombinant DNA molecule, encoding a fusion protein, comprising at least one nucleotide
30 sequence coding for a target polypeptide and upstream thereto at least one nucleotide sequence coding for a FKBP chaperone, wherein the FKBP chaperone is selected from the group consisting of FkpA, SlyD and trigger factor further characterized in that the DNA construct lacks a signal peptide.

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 9 -

The term "lacks a signal peptide" must not be understood as an undue limitation. As the skilled artisan will readily appreciate either the construct may in fact lack the signal peptide sequence. As an alternative, however, the sequence may simply be modified to lack signal peptide function.

- 5 Variants of the above-discussed chaperones, bearing one or several amino acid substitutions or deletions, may also be used to obtain a recombinant DNA or a fusion polypeptide according to the present invention. The skilled artisan can easily assert whether such variants, e.g., fragments or mutants of chaperones or chaperones from alternative
10 in the Examples section.

The term "recombinant" or "fusion polypeptide" as used in the present invention, refers to a polypeptide comprising at least one polypeptide domain corresponding to the FKBP-chaperone used as expression tool and at least one polypeptide domain corresponding to the target protein. Optionally such fusion protein may additionally comprise a linker
15 polypeptide of 10 – 100 amino acid residues. As the skilled artisan will appreciate such linker polypeptide is designed as most appropriate for the intended application, especially in terms of length, flexibility, charge, and hydrophilicity.

Preferably the DNA construct of the present invention encodes a fusion protein comprising a polypeptide linker in between the polypeptide sequence corresponding to the FKBP-chaperone and the polypeptide sequence corresponding to the target protein. Such DNA
20 sequence coding for a linker in addition to e.g., provide for a proteolytic cleavage site, may also serve as a polylinker, i.e., it may provide multiple DNA restriction sites to facilitate fusion of the DNA fragments coding for a target protein and a chaperone domain.

The present invention makes use of recombinant DNA technology in order to construct
25 appropriate DNA molecules.

In a further preferred embodiment the present invention relates a recombinant DNA molecule, encoding a fusion protein, comprising operably linked at least one nucleotide sequence coding for a target polypeptide and upstream thereto at least one nucleotide sequence coding for a FKBP chaperone, characterized in that the FKBP chaperone is
30 selected from the group consisting of FkpA, SlyD and trigger factor.

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 10 -

Polynucleotide sequences are operably linked when they are placed into a functional relationship with another polynucleotide sequence. For instance, a promoter is operably linked to a coding sequence if the promoter affects transcription or expression of the coding sequence. Generally, operably linked means that the linked sequences are
5 contiguous and, where necessary to join two protein coding regions, both contiguous and in reading frame. However, it is well known that certain genetic elements, such as enhancers, may be operably linked even at a distance, i.e., even if not contiguous.

As the skilled artisan will appreciate it is often advantageous to design a nucleotide sequence coding for a fusion protein such that one or a few, e.g., up to nine, amino acids
10 are located in between the two polypeptide domains of said fusion protein. Fusion proteins thus constructed, as well as the DNA molecules encoding them obviously are also within the scope of the present invention.

DNA constructs prepared for introduction into a host typically comprise a replication system recognized by the host, including the intended DNA fragment encoding the desired
15 target fusion peptide, and will preferably also include transcription and translational initiation regulatory sequences operably linked to the polypeptide encoding segment. Expression systems (expression vectors) may include, for example, an origin of replication or autonomously replicating sequence (ARS) and expression control sequences, a promoter, an enhancer and necessary processing information sites, such as ribosome-
20 binding sites, RNA splice sites, polyadenylation sites, transcriptional terminator sequences, and mRNA stabilizing sequences.

The appropriate promoter and other necessary vector sequences are selected so as to be functional in the host. Examples of workable combinations of cell lines and expression vectors include but are not limited to those described Sambrook, J., et al., in "Molecular
25 Cloning: A Laboratory Manual" (1989) -, Eds. J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, or Ausubel, F., et al., in "Current protocols in molecular biology" (1987 and periodic updates), Eds. F. Ausubel, R. Brent and K. R.E., Wiley & Sons Verlag, New York; and Metzger, D., et al., Nature 334 (1988) 31-6. Many useful vectors for expression in bacteria, yeast, mammalian, insect, plant
30 or other cells are known in the art and may be obtained from vendors including but not limited to Stratagene, New England Biolabs, Promega Biotech, and others. In addition, the construct may be joined to an amplifiable gene (e.g., DHFE) so that multiple copies of the gene may be obtained.

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 11 -

Expression and cloning vectors will likely contain a selectable marker, a gene encoding a protein necessary for the survival or growth of a host cell transformed with the vector, although such a marker gene may be carried on another polynucleotide sequence co-introduced into the host cell. Only those host cells expressing the marker gene will survive
5 and/or grow under selective conditions. Typical selection genes include but are not limited to those encoding proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxic substances, e.g. ampicillin, tetracycline, etc.; (b) complement auxotrophic deficiencies; or (c) supply critical nutrients not available from complex media. The choice of the proper selectable marker will depend on the host cell, and appropriate markers for different hosts
10 are known in the art.

The vectors containing the polynucleotides of interest can be introduced into the host cell by any method known in the art. These methods vary depending upon the type of cellular host, including but not limited to transfection employing calcium chloride, rubidium chloride, calcium phosphate, DEAE-dextran, other substances, and infection by viruses.
15 Large quantities of the polynucleotides and polypeptides of the present invention may be prepared by expressing the polynucleotides of the present invention in vectors or other expression vehicles in compatible host cells. The most commonly used prokaryotic hosts are strains of *Escherichia coli*, although other prokaryotes, such as *Bacillus subtilis* may also be used. Expression in *Escherichia coli* represents a preferred mode of carrying out the
20 present invention.

Construction of a vector according to the present invention employs conventional ligation techniques. Isolated plasmids or DNA fragments are cleaved, tailored, and religated in the form desired to generate the plasmids required. If desired, analysis to confirm correct sequences in the constructed plasmids is performed in a known fashion. Suitable methods
25 for constructing expression vectors, preparing in vitro transcripts, introducing DNA into host cells, and performing analyses for assessing expression and function are known to those skilled in the art. Gene presence, amplification and/or expression may be measured in a sample directly, for example, by conventional Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA, dot blotting (DNA or RNA analysis), or in situ
30 hybridization, using an appropriately labeled probe which may be based on a sequence provided herein. Those skilled in the art will readily envisage how these methods may be modified, if desired.

In a preferred embodiment a recombinant DNA molecule according to the present invention comprises a single nucleotide sequence coding for a FKBP-chaperone selected

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 12 -

from the group consisting of FkpA, SlyD, and trigger factor and a single nucleotide sequence coding for a target polypeptide.

A fusion protein comprising two FKBP-chaperone domains and one target protein domain is also very advantageous. In a further preferred embodiment the recombinant DNA molecule according to the present invention comprises two sequences coding for a FKBP-chaperone and one sequence coding for a target polypeptide.

The DNA molecule may be designed to comprise both the DNA sequences coding for the FKBP-chaperone upstream to the target protein. Alternatively the two FKBP-domains may be arranged to sandwich the target protein. The construct comprising both FKBP-domains upstream to the target protein represents a preferred embodiment according to the present invention.

The DNA construct comprising two chaperone domains as well as a target polypeptide domain preferably also contains two linker peptides in between these domains. In order to allow for a systematic cloning the nucleotide sequences coding for these two linker peptide sequences preferably are different. This difference in nucleotide sequence must not necessarily result in a difference in the amino-acid sequence of the linker peptides. In yet a further preferred embodiment the amino acid sequences of the two linker peptides are identical. Such identical linker peptide sequences for example are advantageous if the fusion protein comprising two FKBP-chaperone domains as well as their target protein domain is to be used in an immunoassay.

In cases where it is desired to release one or all of the chaperones out of a fusion protein according to the present invention the linker peptide is constructed to comprise a proteolytic cleavage site. A recombinant DNA molecule encoding a fusion protein comprising at least one polypeptide sequence coding for a target polypeptide, upstream thereto at least one nucleotide sequence coding for a FKBP-chaperone selected from the group consisting of FkpA, SlyD, and trigger factor and additionally comprising a nucleic acid sequence coding for a peptidic linker comprising a proteolytic cleavage site, represents a further embodiment of this invention.

An expression vector comprising operably linked a recombinant DNA molecule according to the present invention, i.e., a recombinant DNA molecule encoding a fusion protein comprising at least one polynucleotide sequence coding for a target polypeptide and upstream thereto at least one nucleotide sequence coding for a FKBP-chaperone, wherein

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 13 -

the FKBP-chaperone is selected from FkpA, SlyD, and trigger factor, has proven to be very advantageous.

The expression vector comprising a recombinant DNA according to the present invention may be used to express the fusion protein in a cell free translation system or may be used to
5 transform a host cell. In a preferred embodiment the present invention relates to a host cell transformed with an expression vector according to the present invention.

In a further preferred embodiment the present invention relates to a method of producing a fusion protein. Said method comprising the steps of culturing a host cell transformed with an expression vector according to the present invention, expression of that fusion
10 protein in the respective host cell and purification of said fusion protein.

As discussed above the FKBP-chaperone domain of FkpA, SlyD, or trigger factor, respectively, is naturally or artificially constructed to yield a cytosolic fusion polypeptide expression. The fusion protein thus produced is obtained in form of inclusion bodies. Whereas in the art tremendous efforts are spent to obtain any desired recombinant protein
15 or the fusion protein directly in a soluble form, we have found that the fusion protein according to the present invention is easily obtained in soluble form from inclusion bodies. In a further preferred embodiment the present invention therefore relates to a method of producing a fusion protein according to the steps described above, wherein said fusion protein is purified from inclusion bodies.

20 The purification of fusion protein from inclusion bodies is easily achieved and performed according to standard procedures known to the skilled artisan, like chaotropic solubilization and various ways of refolding.

Isolation and purification of the fusion protein starts from solubilizing buffer conditions, i.e. from a buffer wherein the inclusion bodies, i.e., the fusion protein, are/is solubilized. An
25 appropriate buffer, which may be termed "non-physiological" or "solubilizing" buffer has to meet the requirement that both the target protein and the FKBP chaperone are not irreversibly denatured. Starting from such buffer conditions, the chaperone is in close proximity to the target protein, and a change of the buffer conditions from non-physiological to physiological conditions is possible without precipitation of the fusion
30 protein.

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 14 -

An appropriate (non-physiological) buffer, i.e., a buffer wherein both the target protein which is essentially insoluble and the PPI-chaperone are soluble either makes use of high or low pH, or of a high chaotropic salt concentration or of a combination thereof. The solubilizing buffer preferably is a buffer with rather a high concentration of a chaotropic salt, e.g., 6.0 M guanidinium chloride at a pH of about 6. Upon renaturation both the target
5 protein as well as the chaperone assume their native-like structure and the chaperone exerts its positive solubilizing effect..

In the context of this invention physiological buffer conditions are defined by a pH value between 5.0 and 8.5 and a total salt concentration below 500 mM, irrespective of other
10 non-salt ingredients that optionally may be present in the buffer (e.g. sugars, alcohols, detergents) as long as such additives do not impair the solubility of the fusion protein comprising the target protein and the chaperone.

A variety of target proteins has been expressed in large amounts.

The expression system according to the present invention, for example, has been shown to
15 work extremely well with biochemically rather different target proteins, e.g. SlyD, FkpA (proteins which are readily soluble), HIV-1 p17 (a protein which is difficult to express in high amounts using conventional expression systems), HTLV gp21 (a protein which tends to aggregate), and HIV-1 gp41, as well as HIV-2 gp36 (both proteins are extremely prone to aggregation and essentially insoluble under physiological buffer conditions). As can be
20 easily gathered from Example 4 specifically relating to these proteins the efficient expression systems according to the present invention work and result in high levels of fusion protein produced. Similar positive findings have been made with a variety of other target proteins expressed as a fusion protein according to the present invention.

From the list of positive example it becomes readily obvious that the novel expression
25 system as disclosed in the present invention, provide for extremely attractive universal expression systems.

The expression systems as disclosed herein also have been compared to standard expression systems making use of carrier proteins as recommended in the art, like MBP. It has been found that the novel systems with the target polypeptides tested are quite advantageous.
30 The relative yield of fusion protein produced according to the present invention was at least as good and in the majority of cases even higher as compared to the relative yield using MBP-based expression. Efficacy of expression can be assessed both in terms of yield of

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 15 -

fusion protein, e.g., per g of *E. coli* cell mass or on a molar basis, comparing the concentrations of a target protein comprised in different fusion proteins.

The present invention in a preferred embodiment relates to a recombinantly produced fusion protein comprising at least one polypeptide sequence corresponding to a FKBP
5 chaperone selected from the group consisting of FkpA, SlyD and trigger factor and at least one polypeptide sequence corresponding to a target peptide.

It has been found that the fusion proteins according to the present invention exhibit advantageous properties, thus e.g., facilitating production, handling and use of otherwise critical proteins. This becomes readily obvious from the description of the positive results
10 obtained with a fusion protein comprising HIV-1 gp41. Whereas recombinantly produced gp41 itself is essentially insoluble, it is readily soluble if present as part of a fusion protein according to the present invention.

In general a protein is considered "essentially insoluble" if in a buffer consisting of 20 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM NaCl it is soluble in a concentration of 50 nM or less. A
15 fusion protein according to the present invention comprising a FKBP chaperone and a target protein is considered "soluble" if under physiological buffer conditions, e. g., in a buffer consisting of 20 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM NaCl the target protein comprised in the PPI-chaperone complex is soluble in a concentration of 100 nM or more.

We found that the recombinantly produced fusion protein according to the present
20 invention can be readily obtained from inclusion bodies in soluble form, even if the target protein is an aggregation prone protein like HIV-1 gp41. A striking feature of gp41 comprised in a recombinantly produced FkpA-gp41 is its exceptional solubility at physiological buffer conditions as compared to the "unchaperoned" gp41 ectodomain.

Moreover, it has been possible to demonstrate that the target protein comprised in a fusion
25 protein according to the present invention readily can be obtained in a native-like structure. Such native-like structure, e.g., for HIV-1 gp41 has been confirmed by Near-UV-CD or by its immunoreactivity. Near-UV-CD analysis has shown the typical "gp41-signature" which is known to the skilled artisan.

The fusion protein according to the present invention also is very easy to handle, e.g., it is
30 quite easy to renature such fusion protein. It is interesting that the "chaotropic material" (i.e. FkpA-gp41 in 6.0-7.0 M GuHCl) can be refolded in different ways, all resulting in a

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 16 -

thermodynamically stable and soluble native-like form. Refolding is achieved at high yields, both by dialysis and by rapid dilution, as well as by renaturing size exclusion chromatography or matrix-assisted refolding. These findings suggest that in this covalently linked form, the gp41-FkpA fusion polypeptide is a thermodynamically stable rather than a metastable protein.

Some of the FKBP-chaperones (e.g. FkpA) exert their chaperone function in form of oligomers, i.e., in a complex comprising two or more noncovalently associated FKBP polypeptides. We have surprisingly found that it is possible to design and produce such an active FKBP-dimer as a single fusion protein on one and the same polypeptide. We have termed these constructs single-chain PPIs, or single-chain FKBP. The single-chain PPI comprising two SlyD domains therefore is termed scSlyD and the single-chain PPI comprising two FkpA domains therefore is termed scFkpA. A single-chain peptidyl-prolyl-isomerase, i.e. a fusion protein comprising two PPI-domains represents a very advantageous and therefore preferred embodiment of the present invention. The sc-PPI according to the present invention may be a parvuline, a cyclophilin or a FKBP. The sc-PPIs selected from the FKBP family of chaperones are preferred. Most preferred are sc SlyD and Sc FkpA, respectively.

A recombinantly produced fusion protein comprising at least one polypeptide sequence corresponding to a FKBP chaperone selected from the group consisting of FkpA, SlyD and trigger factor, at least one polypeptide sequence corresponding to a target polypeptide, and at least one peptidic linker sequence of 10 - 100 amino acids represents a further preferred embodiment of the present invention.

As the skilled artisan will appreciate the peptidic linker may be constructed to contain the amino acids which are most appropriate for the required application. E.g., in case of a hydrophobic target protein the linker polypeptide preferably will contain an appropriate number of hydrophilic amino acids. The present invention specifically also relates to fusion proteins which comprise the target polypeptide and one, or two FKBP-chaperones or chaperone domains and an appropriate peptidic linker sequences between domains. For such applications where the target protein is required in free form a linker peptide or linker peptides are used, which contain an appropriate proteolytic cleavage site. Peptide sequences appropriate for proteolytic cleavage are well-known to the skilled artisan and comprise amongst others, e.g., Ile-Glu-Gly-Arg, cleaved at the carboxy side of the arginine residue by coagulation factor Xa, or Gly-Leu Pro-Arg-Gly-Ser, a thrombin cleavage site, etc..

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 17 -

As mentioned above the fusion proteins according to the present invention can easily be obtained from inclusion bodies following a simple refolding scheme. They are readily soluble and target polypeptides comprised in such fusion proteins can easily be obtained in native-like confirmation. This is quite advantageous for polypeptides derived from an infectious organism because such native-like polypeptides are most advantageous in diagnostic as well as in therapeutic applications. In a preferred embodiment the fusion protein according to the present invention is further characterized in that a target protein is a polypeptide of interest as known from an infectious organism. Preferred infectious organisms according to the present invention are HIV, HTLV, and HCV.

10 From the scientific as well as from the patent literature it is well-known which peptide sequences contain diagnostically relevant epitopes. For the skilled artisan it is nowadays no problem to identify such relevant epitopes. In a further preferred embodiment the target protein corresponding to a polypeptide derived from an infectious organism will contain at least one diagnostically relevant epitope.

15 Due to their advantageous properties the recombinantly produced fusion proteins according to the present invention in further preferred embodiments are used for the immunization of laboratory animals, in the production of a vaccine or in an immunoassay, respectively.

20 In case a therapeutic application of the novel fusion proteins is intended, preferably a composition comprising a recombinantly produced fusion protein according to the present invention and a pharmaceutically acceptable excipient will be formulated.

The following examples, references, sequence listing and figures are provided to aid the understanding of the present invention, the true scope of which is set forth in the appended claims. It is understood that modifications can be made in the procedures set forth without departing from the spirit of the invention.

Examples

Example 1 Recombinant production of HIV-1 gp41 using an FkpA-based expression system

30 1.1 Construction of an expression plasmid comprising FkpA and gp41

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 18 -

Wild-type FkpA was cloned, expressed and purified according to Bothmann and Plückthun, *J Biol Chem* 275 (2000) 17106-17113 with some minor modifications. For storage, the protein solution was dialyzed against 20 mM NaH₂PO₄/NaOH (pH 6.0), 100 mM NaCl and concentrated to 26 mg/ml (1 mM).

- 5 For cytosolic expression, the FkpA-coding sequence of the above expression vector was modified to lack the sequence part coding for the signal peptide and to comprise instead only the coding region of mature FkpA.

In the first step, the restriction site *Bam*HI in the coding region of the mature *E. coli* FkpA was deleted using the QuikChange site-directed mutagenesis kit of Stratagene (La Jolla, CA; USA) with the primers:

5'-gcgggtgtccgggtatccacgaattc-3' (SEQ ID NO: 1)

5'-gaattcgggtgggataccgggaacccgc-3' (SEQ ID NO: 2)

The construct was named EcFkpA(Δ BamHI)[GGGS]₃.

- 15 HIV-1 gp41 (535-681)-His₆ was cloned and expressed in a T7 promotor-based expression system. The gene fragment encoding amino acids 535-681 from HIV-1 envelope protein was amplified by PCR from the T7-based expression vector using the primers:

5'-cgggatacgggtggcgttcaggcgggtggctctggtgggtacgctg-acgggtacggccag-3' (SEQ ID NO: 3)

5'-ccgctcgagggtaccacagcccaattgttat-3' (SEQ ID NO: 4)

- 20 The fragment was inserted into EcFkpA(Δ BamHI)[GGGS]₃ using *Bam*HI and *Xho*I restriction sites.

The codons for a glycine-serine-rich linker [GGGS]₃ between FkpA and e-gp41 were inserted with reverse primer for cloning of FkpA and with forward primer for cloning of e-gp41.

- 25 The resulting construct was sequenced and found to encode the desired protein. Variants of this protein have also been generated by site-directed mutagenesis according to standard procedures. A variant of gp41 comprising four amino acid substitutions as compared to the

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 19 -

wild-type sequence is, e.g. encoded by the DNA-constructs of SEQ ID NO: 5 and 6, making use of FkpA or SlyD as expression system, respectively.

1.2 Purification of the FkpA-gp41 fusion protein from *E. coli* cells

E. coli BL21 cells harboring the expression plasmid were grown to a OD_{600} of 0.7, and cytosolic overexpression was induced by adding 1 mM of IPTG at a growth temperature of 37°C. Four hours after induction, the cells were harvested by centrifugation (20 min at 5000 g). The bacterial pellet was resuspended in 50 mM sodium phosphate pH 7.8, 6.0 M GuHCl (guanidinium chloride), 5 mM imidazole and stirred at room temperature (10 min) for complete lysis. After repeated centrifugation (Sorvall SS34, 20000 rpm, 4°C), the supernatant was filtered (0.8/0.2 μ m) and applied to a Ni-NTA-column (NTA: Nitrilotriacetate; Qiagen; Germantown, MD), pre-equilibrated in lysis buffer. Unspecifically bound proteins were removed in a washing step by applying 10 column volumes of lysis buffer. Finally, the bound target protein was eluted with 50 mM sodium phosphate, pH 2.5, 6.0 M GuHCl, and was collected in 4 ml fractions. The absorbance was recorded at 280 nm.

The resulting acidic and chaotropic solution may be stored at 4°C for further purification steps or *in vitro* refolding experiments.

Starting with this unfolded material, different refolding methods, such as dialysis, rapid dilution, renaturing size exclusion chromatography or matrix-assisted refolding can be used and carried out successfully, all of them leading to virtually the same native-like folded and soluble protein.

1.3 Renaturation by dialysis and rapid dilution

Material, solubilized as described above, is transferred into physiological buffer conditions by dialysis. The chosen cut-off value of the dialysis tubing was 4000 – 6000 Daltons.

To induce refolding of the ectodomain (the HIV-1 gp41 part of the fusion protein), GuHCl was removed from the eluted protein by dialysis against 50 mM sodium phosphate, pH 2.5, 50 mM NaCl (sodium chloride). It is well known that the isolated ectodomain is all-helical and forms tertiary contacts at this extreme pH. When analyzing recombinantly produced FkpA by means of near UV CD, it was found that FkpA is essentially unstructured under the same conditions. It is surprising that refolding of gp41-FkpA by dialysis results in a

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 20 -

readily soluble protein complex comprising the covalently linked gp41 and FkpA protein domains. The UV spectrum (Figure 1) lacks stray light, *i.e.*, apparent absorption beyond 300 nm. Stray light would be indicative of aggregates, thus the spectrum shown in Figure 1 implies that the re-folded material does not contain significant amounts of aggregates.

- 5 Circular dichroism spectroscopy (CD) is the method of choice to assess both secondary and tertiary structure in proteins. Ellipticity in the aromatic region (260-320 nm) reports on tertiary contacts within a protein (*i.e.*, the globular structure of a regularly folded protein), whereas ellipticity in the amide region reflects regular repetitive elements in the protein backbone, *i.e.*, secondary structure.
- 10 The near UV CD spectrum shown in Figure 2 provides compelling evidence that the ectodomain (in the context of the fusion protein) displays native-like tertiary contacts at pH 2.5. The spectrum of the covalently linked gp41/FkpA protein domains almost coincides with the spectrum of the isolated ectodomain under identical conditions (data not shown). The typical signature of gp41 was found: a maximum of ellipticity at 290 nm,
- 15 a characteristic shoulder at 285 nm and another maximum at 260 nm reflecting an optically active disulfide bridge. It is important to note that FkpA does not contribute to the near UV signal at all under the respective conditions. In fact, the aromatic ellipticity of FkpA at pH 2.5 virtually equals the baseline (data not shown).

- In agreement with the results from the near UV region, the far UV CD of the fusion
- 20 construct at pH 2.5 points to a largely structured gp41 molecule. The two maxima at 220 nm and 208 nm make up, and correspond to, the typical signature of an all-helical ectodomain (Figure 3). From the conditions indicated (50 mM sodium phosphate, pH 2.5, 50 mM NaCl), the FkpA-gp41 fusion polypeptide can easily be transferred to physiological buffer conditions by rapid dilution. In conclusion, both near and far UV CD underline that
- 25 native-like structured gp41 is available (in the context of the fusion protein also containing FkpA) in a very convenient fashion.

1.4 Renaturation by size exclusion chromatography (SEC)

- Unfolded gp41-FkpA polypeptide (dissolved in 50 mM sodium phosphate, pH 7.8, 7.0 M GuHCl) was applied onto a Superdex 200 gel filtration column equilibrated with 20 mM
- 30 sodium phosphate, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA. FkpA-gp41 elutes essentially in three main fractions: as a high molecular associate, as an apparent hexamer species and as

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 21 -

an apparent trimer species. The apparent trimer fraction was concentrated and assessed for its tertiary structure in a near UV CD measurement (Figure 4).

The resulting graph is virtually an overlay curve to which both the carrier protein FkpA and the target protein gp41 contribute in a 1:1 ratio. Most fortunately, gp41 displays tertiary structure at neutral pH and is evidently solubilized by the covalently bound chaperone. In other words, the chaperone FkpA seems to accept the native-like structured ectodomain gp41 as a substrate and to solubilize this hard-to-fold protein at a neutral working pH. Thus, a crucial requirement for producing high amounts of soluble gp41 antigen for diagnostic purposes is fulfilled.

10 The far UV CD of FkpA-gp41 at pH 7.4 (Figure 5) confirms the near UV CD results in that it shows the additivity of the signal contributions of FkpA and gp41, respectively. As expected, the spectrum is dominated by the highly helical gp41 ectodomain (maximal ellipticity at 220 nm and 208 nm, respectively).

15 The data obtained with the covalently linked gp41/FkpA protein domains solubilized at pH 7.4 under the conditions mentioned above indicate that FkpA and gp41 behave as independently folding units within the polypeptide construct.

Example 2 Use of a SlyD-based expression vector

The chaperone SlyD has been isolated by routine cloning procedures from *E. coli*. For recombinant expression a DNA construct has been prepared coding for amino acids 1 to 165 of SlyD. An expression vector has been constructed comprising SlyD(1-165) as fusion partner and HIV-1 gp41 as target protein (cf.: SEQ ID NO: 6). The fusion protein was expressed and successfully purified as described for FkpA-gp41 above. Interestingly, we found that a native-like fusion polypeptide of the SlyD(1-165)-gp41 type can be obtained in a very convenient manner by dialysis of the chaotropic material (dissolved, e.g. in 7.0 M GuHCl) against 50 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM NaCl at room temperature.

Example 3 Purification of scFkpA and scSlyD

30 The single-chain PPases scSlyD (SEQ ID NO: 7) and scFkpA (SEQ ID NO: 8), respectively, were obtained from an *E. coli* overproducer according to virtually the same purification protocol as described in Example 1. In short: the induced cells were harvested, washed in PBS and lysed in 50 mM sodium phosphate pH 7.8, 100 mM sodium chloride,

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 22 -

7.0 M GuHCl at room temperature. The unfolded target proteins were bound to a Ni-NTA-column via their C-terminal hexa-His-tag and were refolded in 50 mM sodium phosphate pH 7.8, 100 mM sodium chloride. After this matrix-assisted refolding procedure, the proteins were eluted in an imidazole gradient and subjected to a gel
5 filtration on a Superdex 200® column.

Alternatively, scSlyD and scFkpA may be dialysed after elution to remove residual concentrations of imidazole. Both proteins turn out to be highly soluble. ScSlyD, for example, does not tend to aggregation at concentrations up to 25 mg/ml. In order to elucidate the tertiary structure of the refolded scPPases, we monitored CD-spectra in the
10 Near-UV-region. The signatures of both scSlyD and scFkpA resemble each other and reflect the close relationship and thus structural homology of the two FKBP. Due to the low content in aromatic residues, the signal intensity of scSlyD (Fig. 6) is, however, significantly lower than the one of scFkpA.

Example 4 Improved expression of target proteins

15 The biochemically quite different target proteins HIV-1 gp41, HIV-2 gp36, HIV-1 p17 and HTLV gp21 have been expressed using the pET/B1.21 expression system either without fusion partner (gp41, gp36, p17, gp21) or using same standard expression system but comprising a DNA-construct coding for a fusion protein according to the present invention (SlyD-gp41, FkpA-gp41, FkpA-p17, SlyD-gp36, FkpA-gp21). The efficiency of
20 these systems has been compared in terms of yield of recombinant protein per *E. coli* cell mass [mg/g]. As becomes readily obvious from table 1, the novel expression systems lead to a significant improvement for all proteins tested.

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 23 -

Table 1:

Protein	Yield [mg protein/g E. coli cell mass]
gp41	~1-2
SlyD-gp41	~30
FkpA-gp41	~25
p17	~1
FkpA-p17	~15
gp36	~1-2
SlyD-gp36	~45
gp21	~4
FkpA-gp21	~30

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 24 -

List of References

- Sambrook, J., et al., in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989) -, Eds. J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY
- 5 Beaucage, S. L. and Caruthers, M. H., Tetrahedron Letters 22 (1981) 1859-1862
- Ausubel, F., et al., in "Current protocols in molecular biology" (1987 and periodic updates), Eds. F. Ausubel, R. Brent and K. R.E., Wiley & Sons Verlag, New York
- Fischer, G., et al., Nature 337 (1989) 476-8
- Hottenrott, S., et al., J Biol Chem 272 (1997) 15697-701
- 10 Kapust, R. B. and Waugh, D. S., Protein Sci 8 (1999) 1668-74
- Kay, J. E., Biochem J 314 (1996) 361-85
- Lane, W. S., et al., J Protein Chem 10 (1991) 151-60
- Matteucci, M. D. and Caruthers, M. H., J. Am. Chem. Soc. 103 (1981) 3185-3191
- Metzger, D., et al., Nature 334 (1988) 31-6
- 15 Rahfeld, J. U., et al., FEBS Lett 352 (1994) 180-4
- Ramm, K. and Pluckthun, A., J Biol Chem 275 (2000) 17106-13
- Schmid, F. X., Molecular chaperones in the life cycle of proteins (1998) 361-389, Eds. A. L. Fink and Y. Goto, Marcel Dekker Inc., New York
- Scholz, C., et al., Embo J 16 (1997) 54-8
- 20 EP 293 249
- WO 00/28011
- WO 93/25533
- WO 97/10253
- 25 WO 98/1349

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 25 -

Patent Claims

1. A recombinant DNA molecule, encoding a fusion protein, comprising at least one nucleotide sequence coding for a target polypeptide and upstream thereto at least one nucleotide sequence coding for a FKBP chaperone, characterized in that the FKBP chaperone is selected from the group consisting of FkpA, SlyD and trigger factor.
5
2. The recombinant DNA molecule according to claim 1 further characterized in that it comprises at least one nucleotide sequence coding for a peptidic linker of 10 - 100 amino acids located in between said sequence coding for the target polypeptide and said sequence coding for the FKBP chaperone.
- 10 3. A recombinant DNA molecule according to claim 1 or 2, comprising one nucleotide sequence coding for said FKBP chaperone.
4. A recombinant DNA molecule according to claim 1 or 2, comprising two sequences coding for a FKBP chaperone.
5. The recombinant DNA molecule of claim 4 further characterized in that the two
15 sequences coding for a FKBP chaperone are located upstream of the sequence coding for the target polypeptide.
6. The recombinant DNA molecule of claim 4 further characterized in that one sequence coding for a PPI chaperone is located upstream of the target polypeptide and the other sequence coding for a PPI chaperone is located downstream of the
20 sequence coding for the target peptide.
7. The recombinant DNA molecule according to claim 4 to 6, further characterized in that, it comprises two nucleic acid sequences coding for a linker polypeptide of 10 - 100 amino acids.
8. The recombinant DNA molecule according to claim 7, wherein the two nucleic acid
25 sequences coding for a linker of 10 - 100 amino acids are different.
9. The recombinant DNA molecule according to any of claims 2 to 8, wherein at least one of said linker sequences codes for a polypeptide linker comprising a proteolytic cleavage site.

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 26 -

10. An expression vector comprising operably linked a recombinant DNA molecule according to any of claims 1- 9.
11. A host cell transformed with an expression vector according to claim 10.
12. A method of producing a fusion protein said method comprising the steps of
 - 5 a. culturing host cells according to claim 11
 - b. expression of said fusion protein and
 - c. purification of said fusion protein.
13. A recombinantly produced fusion protein comprising at least one polypeptide sequence corresponding to a FKBP chaperone selected from the group consisting of
10 FkpA, SlyD and trigger factor and at least one polypeptide sequence corresponding to a target peptide.
14. A recombinantly produced fusion protein comprising at least one polypeptide sequence corresponding to a FKBP chaperone selected from the group consisting of FkpA, SlyD and trigger factor, at least one polypeptide sequence corresponding to a
15 target polypeptide, and at least one peptidic linker sequence of 10 - 100 amino acids.
15. The fusion protein according to claim 13 or 14, further characterized in that, it comprises one polypeptide sequence corresponding to said FKBP chaperone.
16. The fusion protein according to claim 13 or 14, further characterized in that, it comprises two polypeptide sequences corresponding to said FKBP chaperone
- 20 17. The fusion protein according to claim 16, further characterized in that, said two FKBP chaperones are located N-terminal with respect to the target polypeptide.
18. The fusion protein according to claim 16, further characterized in that, one of said two FKBP chaperones is located N-terminal and one of said FKBP chaperones is located C-terminal to the target polypeptide.

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

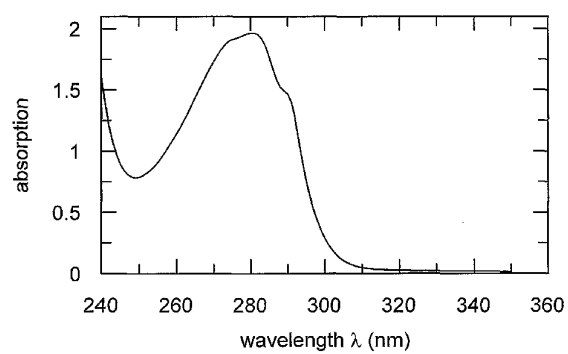
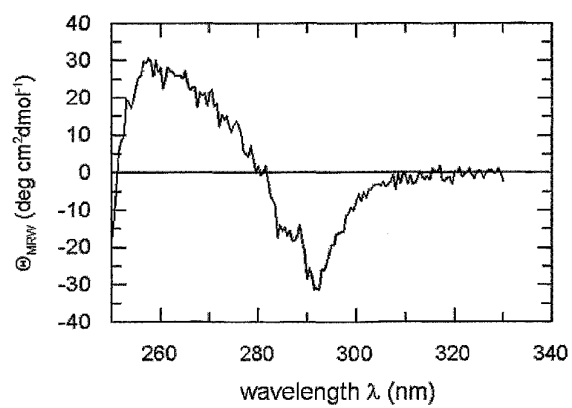
- 27 -

19. A recombinantly produced fusion protein comprising at least one target polypeptide, two sequences corresponding to FKBP chaperones selected from the group consisting of FkpA, SlyD and trigger factor and two peptidic linker sequences of 10 - 100 amino acids.
- 5 20. The fusion protein according to claim 19, wherein at least one of said peptidic linker sequences comprises a proteolytic cleavage site.
21. The fusion protein according to any of claims 13 - 20, wherein said target protein comprises a polypeptide from an infectious organism.
22. The fusion protein according to claims 21, further characterized in that said
10 polypeptide comprises at least one diagnostically relevant epitope of an infectious organism.
23. Use of a recombinantly produced fusion protein according to any of claims 13 - 22, for immunization of laboratory animals.
24. Use of a recombinantly produced fusion protein according to any of claims 13 - 22,
15 in the production of a vaccine.
25. Use of a recombinantly produced fusion protein according to any of claims 13 - 22, in an immunoassay.
26. A composition comprising a recombinantly produced fusion protein according to any of claims 13 - 22, and a pharmaceutically acceptable excipient.

WO 03/000878

1/3

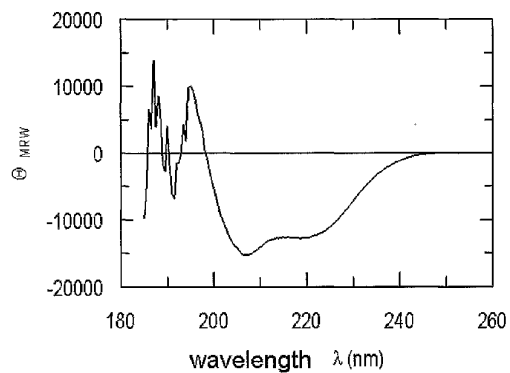
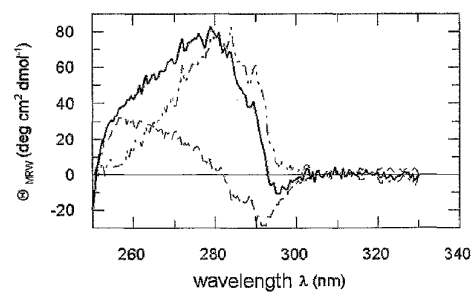
PCT/EP02/06957

Figure 1:Figure 2

WO 03/000878

2/3

PCT/EP02/06957

Figure 3Figure 4

WO 03/000878

3/3

PCT/EP02/06957

Figure 5

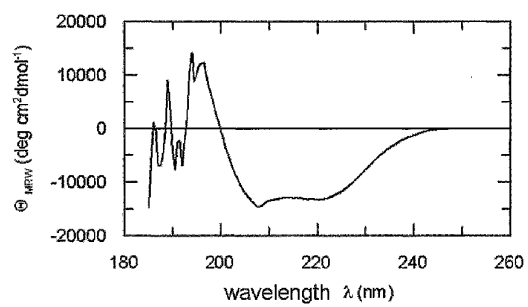
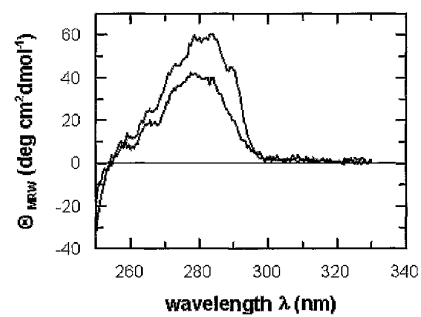


Figure 6



WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 1 -

Sequenzprotokoll

<110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> Use of FKBP chaperones as expression tool
<130> 21306WO

10 <140>
<141>

<150> EP01115225.3
<151> 2001-06-22

15 <150> EP01120939.2
<151> 2001-08-31

<160> 8

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 29
<212> DNA
25 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer 1

30 <400> 1
gcgggtgttc cgggtatccc accgaattc 29

35 <210> 2
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

40 <220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer 2

<400> 2
gaattcgggtg ggatacccggaacaccgc 29

45

<210> 3
<211> 61
<212> DNA
50 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer 3

55 <400> 3

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 2 -

cgggatccgg tggcgggttca ggcgggtggct ctgggtggcgg tacgctgacg gtacaggcca 60
g 61

5 <210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10 <220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer 4

<400> 4
ccgctcgagg taccacagcc aatttggtat 30

15 <210> 5
<211> 1269
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:coding for a
FkpA-gp41 fusion protein

25 <400> 5
atggctgaag ctgcaaaacc tgcataaact gctgacagca aagcagcgtt caaaaatgac 60
gatcagaaat cagcttatgc actgggtgct tgcgtgggtc gttacatgga aaactctctt 120
aaagaacaag aaaaactggg catcaaaactg gataaagatc agctgatcgc tgggtgttcag 180
30 gatgcatttg ctgataagag caaactctcc gaccaagaga tgcacacagc tctgcagaac 240
ttcgaagctc cgtgaagtc ttctgctcag gcgaagatgg aaaaagacgc ggctgataac 300
gaagcaaaag gtaaaagta ccgcagaaa tttgccaaag agaaaggtgt gaaaacctct 360
tcaactggtc tggtttatca ggtagtagaa gccggtaaag gcaagacac gaaagacagc 420
gatactgttg tagtgaacta caaaggtagc ctgacgagc gtaaaagagt cgaacaactct 480
35 tacacccgtg gtgaaccgct ctctttccgt ctggacggtg ttatcccggt ttggacagaa 540
ggtctgaaga acatcaagaa aggcggtaag atcaaaactgg ttattccacc agaactggct 600
tacggcaaaag cgggtgttcc gggatatcca cogaattcta ccttggtgtt tgaactagag 660
ctgctggatg tgaaccagc gccgaaggct gatgcaaac cgggaagctga tgcgaaagcc 720
gcagattctg ctaaaaaagg tggcggttcc ggcgggtggct ctgggtggcg atccgggtggc 780
40 ggttcggcg gtggctctgg tggcgtagc ctgaacgtac aggcagaca attattgtct 840
ggtatagtc agcagagaa caatgagctg agggctattg aggcgcaca gcatctggag 900
caactcacag tctggggcac caagcagctc caggcaagag aactggctgt ggaagatac 960
ctaaaggatc aacagctcct ggggatttgg ggttgctctg gaaaactcat ttgcaccact
1020

45 gctgtgctctt ggaatgctag ttggagtaat aaatctctgg aacagatttg gaataacatg
1080
acctggatgg agtgggacag agaaattaac aattacacaa gcttaataca ttcttaatt
1140
gaagaatgc aaaaaccagc agaaaagaat gaacaagaat tattggaatt agataaatgg
50 1200
gcaagtttgt ggaattggtt taacataaca aattggctgt ggtacctcga gcaccaccac
1260
caccaccac
1269

55

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 3 -

<210> 6
 <211> 1026
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: coding for a
 SlyD-gp41 fusion protein
 10 <400> 6
 atgaaagtag caaaagacct ggtgggtcagc ctggcctatc aggtacgtac agaagacggt 60
 gtgttggttg atgagttctcc ggtgagtgcg ccgctggact acctgcatgg tcacgggttcc 120
 ctgattctctg gcctgggaaac ggcgtgggaa ggtcatgaag ttggcgacaa atttgatgtc 180
 gctgttggcg cgaacgacgc ttacggtcag tacgacgaaa acctgggtgca acgtgttctc 240
 15 aaagacgtat ttatgggctg tgatgaactg caggtaggta tgcgtttcct ggctgaaacc 300
 gaccagggtc cgggtaccgtg tgaatacact gcggttgaag acgatcacgt cgtgggttgat 360
 ggtaaccaca tgcctggccgg tcagaacctg aaattcaacg ttgaagttgt ggcatctgc 420
 gaagcgactg aagaagaact ggtcatggtt caggttcacg gcgcgcacga taccaccac 480
 gatcacgacc acgacggtgg cggttccggc ggtggctctg gtggcgatc cgtggcggt 540
 20 tccggcggtg gctctggtgg cgttacgctg acggtacagg ccagacaatt attgtctggt 600
 atagtgacgc agcagaacaa tgagctgagg gctattgagg cgcaacagca tctggagcaa 660
 ctcacagtct ggggcaccaa gcagctccag gcaagagaac tggctgtgga aagataccta 720
 aaggatcaac agctcctggg gatttgggtt tgctctgga aactcatttg caccactgct 780
 gtcccttgga atgctagtgt gattataaaa tctctggaac agatttggaa taacatgacc 840
 25 tggatggagt gggacagaga aattaacaat tacacaagct taatacatc cttaatgaa 900
 gaatcgcaaa accagcaaga aaagaatgaa caagaattat tggattaga taaatgggca 960
 agtttgtgga attggtttta catacaaat tggctgtggt acctgagca ccaccaccac
 1020
 caccac
 30 1026

 <210> 7
 <211> 367
 35 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: single-chain
 40 SlyD

 <400> 7
 Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg
 1 5 10 15
 45 Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu
 20 25 30

 50 Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
 35 40 45

 Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
 50 55 60
 55 Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro
 65 70 75 80

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 4 -

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

WO 03/000878

PCT/EP02/06957

- 5 -

<210> 8
 <211> 537
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:single-chain
 FkpA
 10 <400> 8
 Met Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala Thr Thr Ala Asp Ser Lys Ala Ala
 1 5 10 15
 Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu
 15 20 25 30
 Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile
 35 40 45
 20 Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala
 50 55 60
 Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala
 65 70 75 80
 25 Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp
 85 90 95
 Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala
 100 105 110
 30 Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val
 115 120 125
 35 Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val
 130 135 140
 Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 40 Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro
 165 170 175
 Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys
 180 185 190
 Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly
 195 200 205
 50 Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val
 210 215 220
 Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala
 225 230 235 240
 55 Ala Asp Ser Ala Lys Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

PCT/EP02/06957

- 6 -

[illegible]

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/000878 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/62,
A61K 38/00, C12N 5/10BAZARSUREN, Ariuna; Birkenstrasse 29, 82377
Penzberg (DE); SCHAAERSCHMIDT, Peter; Birken-
strasse 4, 82390 Eberling (DE).

(21) International Application Number: PCT/EP02/06957

(22) International Filing Date: 24 June 2002 (24.06.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
01 115 225.3 22 June 2001 (22.06.2001) EP
01 120 939.2 31 August 2001 (31.08.2001) EP

(81) Designated States (national): AT, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for DE only): ROCHE DIAGNOSTICS
GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, 68305
Mannheim (DE).(71) Applicant (for all designated States except DE): F.HOFF-
MANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzachstr. 124,
CH-4070 Basel (CH).Published:
— with international search report(72) Inventors: SCHOLZ, Christian; Sindelsdorfer Strasse
35a, 82377 Penzberg (DE); ANDRES, Herbert; Kapel-
lenwiese 39, 82377 Penzberg (DE); FÄTZ, Elke;
Steinkreuz 1, 82386 Huglfing (DE); ENGEL, Alfred;
Kusermannstrasse 3a, 82327 Tutzing (DE); SCHMITT,
Urban; Waldstrasse 36, 82386 Oberhausen (DE).(88) Date of publication of the international search report:
9 October 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/000878 A3

(54) Title: USE OF FKBP CHAPERONES AS EXPRESSION TOOL.

(57) Abstract: The present invention relates to the cloning and expression of foreign protein or polypeptides in bacteria such as *Escherichia coli*. In particular, this invention relates to expression tools comprising a FKBP-type peptidyl prolyl isomerase selected from the group consisting of FkpA, SlyD, and trigger factor; methods of recombinant protein expression; the recombinant polypeptides thus obtained as well as to the use of such polypeptides.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/06957
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/62 A61K38/00 C12N5/10		
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) IPC 7 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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, FSTA, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 207 420 B1 (DAVIS GREGORY D ET AL) 27 March 2001 (2001-03-27) the whole document, in particular Fig. 2 and claim 13 A WO 00 20606 A (REIMANN HANSJOERG ;SCHIRMBECK REINHOLD (DE)) 13 April 2000 (2000-04-13) the whole document -/-	1-3, 9-15, 23-26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in an 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 document 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 claim(s) or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 January 2003		Date of mailing of the international search report 12/02/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentamt 2 NL - 2280 LV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Bassias, I

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/06957

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SPRENG S ET AL: "Construction of chromosomally encoded secreted hemolysin fusion proteins by use of mini-TnhyAs transposon." FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 165, no. 1, 1 August 1998 (1998-08-01), pages 187-192, XP002228406 ISSN: 0378-1097 the whole document, in particular Fig.2 (SS 4) ----	
A	SCHEIN C H: "PRODUCTION OF SOLUBLE RECOMBINANT PROTEINS IN BACTERIA" BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US, vol. 7, no. 11, 1 November 1989 (1989-11-01), pages 1141-1149, XP000068927 ISSN: 0733-222X the whole document ----	
A	NISHIHARA KAZUYO ET AL: "Overexpression of Trigger Factor prevent aggregation of recombinant proteins in Escherichia coli" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 66, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 884-889, XP002156141 ISSN: 0099-2240 the whole document -----	

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational Application No.
PCT/EP 02/06957

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6207420	B1	27-03-2001	US 5989868 A 23-11-1999
		AU 9482098 A 29-03-1999	
		WO 9913091 A1 18-03-1999	
WO 0020606	A	13-04-2000	WO 0020606 A1 13-04-2000
		AU 9629498 A 26-04-2000	
		CA 2344993 A1 13-04-2000	
		EP 1117803 A1 25-07-2001	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/20	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/20	C 0 7 K 14/00	
C 0 7 K 14/00	C 0 7 K 14/195	
C 0 7 K 14/195	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 P 21/02	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 アンドレス, ヘルベルト
ドイツ連邦共和国 ペンツベルク 8 2 3 7 7 カペレンヴィーゼ 3 9
(72)発明者 ファーツ, エルケ
ドイツ連邦共和国 フグルフィンゲ 8 2 3 8 6 シュタインクロイツ 1
(72)発明者 エンゲル, アルフレート
ドイツ連邦共和国 トゥーツィング 8 2 3 2 7 クスターマンシュトラッセ 3 アー
(72)発明者 シュミット, ウルバーン
ドイツ連邦共和国 オーベルハウゼン 8 2 3 8 6 ヴァルトシュトラッセ 3 6
(72)発明者 バツァルスウレン, アリウナ
ドイツ連邦共和国 ペンツベルク 8 2 3 7 7 ビルケンシュトラッセ 2 9
(72)発明者 シャールシュミット, ペーター
ドイツ連邦共和国 エーベルフィンゲ 8 2 3 9 0 ビルケンシュトラッセ 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA80 CA02 DA06 EA04 GA11 HA01 HA03
HA14
4B064 AG01 CA02 CA19 CE02 CE03 CE12 DA01 DA13 DA20
4B065 AA26X AA26Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46 CA60
4C084 AA02 AA07 BA20 NA14 ZB331
4C085 AA03 BB11 DD62
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 EA20 EA50 EA60 FA74
GA01 GA15 GA22 GA26

专利名称(译)	使用FKBP伴侣作为表达工具		
公开(公告)号	JP2004535195A	公开(公告)日	2004-11-25
申请号	JP2003507263	申请日	2002-06-24
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ショルツクリスチャン アンドレスヘルベルト ファーツエルケ エンゲルアルフレート シュミットウルバーン バツアルスウレンアリウナ シャールシュミットペーター		
发明人	ショルツ,クリスチャン アンドレス,ヘルベルト ファーツ,エルケ エンゲル,アルフレート シュミット,ウルバーン バツアルスウレン,アリウナ シャールシュミット,ペーター		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/21 A61K47/48 A61P31/12 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/20 A61P37/02 C07K14/00 C07K14/16 C07K14/195 C07K14/245 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N5/10 C12N9/90 C12N15/62 C12P21/02 G01N33/532 G01N33/543 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61K47/64 A61P31/12 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/20 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P43/00 C07K14/005 C07K2319/00 C12N9/90 C12N2740/16122 G01N33/54306 G01N33/56911 G01N33/56983 G01N33/56988 G01N2333/005 G01N2333/16 G01N2333/195 G01N2469/20		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61P31/12 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/20 C07K14/00 C07K14/195 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA14 4B064/AG01 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CE02 4B064/CE03 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B064/DA20 4B065/AA26X 4B065/AA26Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4B065/CA60 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA20 4C084/NA14 4C084/ZB331 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/DD62 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/EA60 4H045/FA74 4H045/GA01 4H045/GA15 4H045/GA22 4H045/GA26		
优先权	2001115225 2001-06-22 EP 2001120939 2001-08-31 EP		
其他公开文献	JP4174422B2 JP2004535195A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及在诸如大肠杆菌 (Escherichia coli) 的细菌中克隆和表达外源蛋白质或多肽。特别地, 本发明涉及包含FKBP型肽基丙基异构酶的表达式, 所述FKBP型肽基丙基异构酶选自FkpA, SlyD和触发因子, 重组蛋白表达方法, 重组多肽和这些多肽的用途。

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	H 4 B 0 6 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 P 31/12	4 B 0 6 5
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/16	4 C 0 8 4
A 6 1 P 31/16	A 6 1 P 31/18	4 C 0 8 5
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 62 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-507263 (P2003-507263)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成14年6月24日 (2002. 6. 24)		エフ・ホフマンーラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月19日 (2003.12.19)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/006957		E AKTIENGESELLSCHAF
(87) 国際公開番号	W02003/000878		T
(87) 国際公開日	平成15年1月3日 (2003.1.3)		スイス・シーエイチー4070バーゼル・
(31) 優先権主張番号	01 115 225.3		グレンツァーヘルストラツセ124
(32) 優先日	平成13年6月22日 (2001. 6. 22)	(74) 代理人	100095832
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 細田 秀徳
(31) 優先権主張番号	01 120 939.2	(72) 発明者	ショルツ, クリスチヤン
(32) 優先日	平成13年8月31日 (2001. 8. 31)		ドイツ連邦共和国 ベンツベルク 823
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		77 ジンデルスドルファアー シュトラー
			セ 35アー