

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6748061号  
(P6748061)

(45) 発行日 令和2年8月26日(2020.8.26)

(24) 登録日 令和2年8月11日(2020.8.11)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 P 21/08 (2006.01)  
C 12 N 15/09 (2006.01)C 12 P 21/08 Z N A  
C 12 N 15/09 Z

請求項の数 7 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2017-500849 (P2017-500849)  
 (86) (22) 出願日 平成27年7月9日 (2015.7.9)  
 (65) 公表番号 特表2017-520261 (P2017-520261A)  
 (43) 公表日 平成29年7月27日 (2017.7.27)  
 (86) 國際出願番号 PCT/IB2015/055189  
 (87) 國際公開番号 WO2016/005931  
 (87) 國際公開日 平成28年1月14日 (2016.1.14)  
 審査請求日 平成30年7月2日 (2018.7.2)  
 (31) 優先権主張番号 2245/MUM/2014  
 (32) 優先日 平成26年7月9日 (2014.7.9)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
インド (IN)

(73) 特許権者 516257291  
ルピン・リミテッド  
インド国 ムンバイ 400055 サン  
タクルズ (イースト) オフ ウエスタン  
エクスプレス ハイウェイ サード フ  
ロア カルパタル インスパイア  
(74) 代理人 110000578  
名古屋国際特許業務法人  
(72) 発明者 サルンクヘ シャーダル  
インド国 ブーネ 412 115 ムル  
シ タルカ ゴータワデ ビレッジ ゲー  
ト ナンバー 1156 ルピン・リミテ  
ッド (バイオテクノロジー ディビジョ  
ン)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】二重シストロン細菌発現システム

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

抗体又はその断片を生産する工程であって、次のステップ：

(i) 宿主細胞を、二重シストロン発現システムからなる単一ベクターを用いて形質転換させること、(i i) 封入体として前記抗体又はその Fab 断片を発現するために、適切な培地内で形質転換された前記宿主細胞を培養すること、

(i i i) 前記封入体の可溶化を行うこと、

(i v) 前記抗体又はその断片の再折りたたみを行うこと、  
を含む、工程であって、

前記二重シストロン発現システムは、

a) 前記抗体又はその Fab 断片の重鎖をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結される T7 プロモーターを含む第一のシストロン、及びb) 前記抗体又はその Fab 断片の軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるアラビノースプロモーターを含む第二のシストロン、  
を含み、ここで、前記第一及び第二のシストロンは、前記単一ベクター中に配置され、前記抗体又はその断片を発現し、前記 (i i) において前記培地に誘導用の IPTG 及びアラビノースがともに添加され前記宿主細胞が培養された後に、前記重鎖及び前記軽鎖は、前記封入体として等モル量で

発現する、工程。

【請求項 2】

前記宿主細胞は、大腸菌 (E. coli)である請求項 1 に記載の工程。

【請求項 3】

1 mM の IPTG 及び 13 mM のアラビノースが誘導に用いられる、請求項 1 に記載の工程。

【請求項 4】

前記第一のシストロン及び前記第二のシストロンは、1 よりも大きい OD 600 で誘導される、請求項 1 に記載の工程。

【請求項 5】

前記第一のシストロン及び前記第二のシストロンは、配列 ID n o 1 及び 2 に記述されるポリヌクレオチド配列をコードしている、請求項 1 に記載の工程。

【請求項 6】

前記二重シストロン発現システムは、配列 ID n o 1 9 に記述されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の工程。

【請求項 7】

ラニビズマブ (Ranibizumab) を生産するための工程であって、次のステップ；

(i) 大腸菌 (E. coli)を、二重シストロン発現システムからなる单一ベクターを用いて形質転換させること、

(ii) 前記第一シストロン及び第二のシストロンが、封入体として前記ラニビズマブの前記重鎖及び軽鎖を発現させるように適切な培地内で形質転換された前記大腸菌 (E. coli)を培養すること、

(iii) 前記封入体の可溶化を行うこと、

(iv) 機能的なラニビズマブを得るために適切な条件で前記封入体の再折りたたみを行うこと、

を含む、工程であって、

前記第一のシストロンは、ラニビズマブの前記重鎖をコードするポリヌクレオチド配列に操作可能に連結された第一のプロモーターを有し、第二のシストロンは、ラニビズマブの前記軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列に操作可能に連結された第二のプロモーターを有し、

前記重鎖及び前記軽鎖は、前記封入体として等モル量発現され、

前記等モル量は、(i)において形質転換され培養された大腸菌 (E. coli) を溶解し遠心分離して得た不溶画分に存在する前記重鎖と前記軽鎖との発現量を SDS-PAGE を用いて測定した結果、前記重鎖と前記軽鎖とが等モル量であることを示し、

前記第一のシストロンが T7 プロモーターを有し、前記第二のシストロンがアラビノースプロモーターからなり、

1 mM の IPTG 及び 13 mM のアラビノースがともにラニビズマブの前記重鎖及び軽鎖の発現に用いられる、請求項 1 に記載の工程。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

[発明の分野]

本発明は、対象のタンパク質の生産のために、単一のベクターにおける二重の独立したシストロン発現システムに関し、対象のタンパク質は、細菌 E. coli において形成される不溶性の封入体として発現される抗体の組換え型 Fab 断片または他の断片、ペプチドおよびタンパク質を含む。本発明は、前記二重シストロンベクターを用いて対象のタンパク質を発現するための工程も提供する。

【0002】

[発明の背景]

10

20

30

40

50

組換えDNA技術(rDNA)は、治療薬を調製する方法に革命を起こしている。必要なタンパク質は、今、外来細胞の内部で作られ、精製される。

翻訳後修飾(PTM)を有するタンパク質は、哺乳類または酵母のシステムにおいて組換え分子として一般的に発現される。ピキア(Pichia)およびサッカロマイセス(Saccharomyces)のような酵母発現系は、PTMの面で哺乳類システムに近いが、ピキアの場合、高マンノースグリカンのようなグリコシル化の型がまだ異なっており、ヒト使用のための組換え型タンパク質の発現には不適切である。

#### 【0003】

モノクローナル抗体(mAbs)、抗体、融合蛋白質、mAbのFab断片は、治療薬として使用される。rDNA技術は、治療タンパク質の生産のために特別なベクターおよび発現システムを使用する。発現システムは、細菌、酵母、昆虫、または哺乳類発現系から主に成る。最初は、組換え型タンパク質のほとんどは、宿主としてE.Coliを用いる細菌発現システムにおいて発現された。発現宿主としてE.Coliを用いることは、クローニングの容易さ、発現の容易さ、短いタイムライン、短いインキュベーション期間および非常に高い収率のようないくつかの利点がある。したがって、任意のPTMを必要としないタンパク質をE.Coliにおいて安全に発現することができる。

#### 【0004】

Fabは、mAbの抗原結合断片部分であり、抗体のFc部分において存在するグリコシル化部位を含まないような哺乳類系においては、Fabは発現される必要はない。したがって、Fabは、E.Coli系において通常発現される。1980年代～90年代の間では、数人の研究者は、E.ColiにおけるFab発現を試みた。Pluckthunらは(1990 Behring Inst. Mitt. (87): 48-55)、E.ColiからのFab抗体の分泌を報告した研究者で、より早期のいく人かの研究者である。Williamson R.A. et. al., 1991 Biochem J. 277 (Pt 2): 561-3は、E.ColiにおけるFab分子の発現のための、バクテリオファージラムダベクターの使用を報告した。ファージは、E.ColiにおけるFab、二価抗体、またはキメラ抗体断片の生産のためのシステムを示す。

#### 【0005】

さらに、Fabは、誤って折りたたまれた封入体としてE.Coliにおいても生産され、その後、機能的分子を得るために再折りたたまれることによって、抗体の収率の40%増加が得られた。

#### 【0006】

上述の研究のほとんどは、重鎖および軽鎖の両方の発現を起動するために単一のプロモーター、すなわち、phoAを使用した。リボソーム結合部位(rbs)は、重鎖および軽鎖の両方に存在し、第二の遺伝子の転写および翻訳を起動する。

#### 【0007】

US5648237は、分泌産物を得るために、E.ColiにおいてFab遺伝子を発現するために、同様の単一プロモーター(phoA)戦略も使用した。上記戦略の主な欠点は、第二の遺伝子の発現レベルが、第一の遺伝子より一般的により低くなり、したがって、機能的Fabの収率を制限することである。

#### 【0008】

特許WO03018771号は、二つの分離した翻訳ユニットによって抗体を生産する工程を開示し、前記抗体または断片の軽鎖および重鎖をそれぞれコードし、ここで、両鎖は、逐次的方法で発現されることにより、軽鎖及び重鎖の生産を特異的に分離し、軽鎖および重鎖を集合させる。

#### 【0009】

特許EP1356052B1は、原核細胞において完全な抗体を生産するための方法を開示する。免疫グロブリン軽鎖を生産するための第一のプロモーター、および第一のシストロン並びに、免疫グロブリン重鎖を生産するための第二のプロモーター、および第二のシストロンがあり、ここで両鎖は、生物学的に活性な免疫グロブリンを形成するために折

10

20

30

40

50

り置まれ、集められる。

【0010】

【発明の要旨】

実施形態において、本発明は、細菌細胞において不溶性の封入体として発現される組換え型タンパク質およびペプチドを生産するための、単一のベクターにおける二重の独立したシストロン発現システムに関する。

【0011】

他の実施形態において、本発明は、細菌細胞において不溶性の封入体として発現される組換え型タンパク質およびペプチドを生産するための、二つの異なるプロモーターを有する単一のベクターにおける二重の独立したシストロン発現システムの調製工程に関する。

10

【0012】

他の実施形態において、本発明は、細菌細胞において不溶性の封入体として発現される抗体断片を生産するための、二つの異なるプロモーターを有する単一のベクターにおける二重の独立したシストロン発現システムに関する。

【0013】

他の実施形態において、本発明は、細菌細胞において不溶性の封入体として発現される抗体の組換え型 F a b 断片を生産するための、二つの異なるプロモーターを有する単一のベクターにおける二重の独立したシストロン発現システムに関する。

20

【0014】

他の実施形態において、本発明は、細菌細胞において不溶性の封入体として発現される組換え型ペプチドを生産するための、二つの異なるプロモーターを有する単一のベクターにおける二重の独立したシストロン発現システムに関する。

【0015】

他の実施形態において、二重シストロン発現システムは、  
a ) 対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるプロモーターを含む第一のシストロン、  
b ) 対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるプロモーターを含む第二のシストロン、  
を含み、

ここで、第一および第二のシストロンは、単一のベクター中に配置され、細菌細胞において封入体として対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を発現する。

30

【0016】

他の実施形態において、本発明は、対象の遺伝子、リボソーム結合部位、およびターミネーターを含む複数のクローン化部位に操作可能に連結されるプロモーターを含む二重シストロンベクターに関する。

【0017】

さらに他の実施形態において、本発明は、二重シストロン発現システムを用いて対象のタンパク質を生産するための工程に関する。

以下に記述される本発明の一つ以上の実施形態の詳細は、本質的に説明のためだけであり、本発明の範囲を制限することを意図しない。本発明の他の特徴、目的、および利点は、明細書から明らかになるだろう。

40

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、二重シストロンベクターの式を説明する。

【図2】図2は、クローン p E T 2 1 a - H C - L C のベクター地図を説明する。

【図3】図3は、コントロールおよび対照産物と共に E . C o l i B L 2 1 A 1 クローンの不溶性ペレット画分の S D S P A G E 分析を説明する。

【図4】図4は、減少した F a b 分子と比較して、クローンにおいて観察される L C および H C ピークを有する可溶化された I B サンプルの R P - H P L C を説明する。

【図5】図5は、他のタンパク質から重鎖ピークを分離するための H P L C 実行結果を説

50

明する

【図6】図6は、E.Coli BL21A1細胞系列の単一のシストロンクローンと比較して、二重シストロン構成体におけるSAK-Liraクローンの発現の重大な増加を説明する。

【図7】図7は、ベクター地図pBAD24M-LCを説明する。

【発明を実施するための形態】

【0019】

[発明の詳細な説明]

定義：

本願に使用される用語「対象のタンパク質」は、本願において生物学的医薬品産業に、または診断もしくは研究目的のために使用されるタンパク質およびペプチドを含む任意のポリペプチドに関する。

10

【0020】

本願に使用される用語「対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列」は、本願において、遺伝子、好ましくはポリペプチドを発現する異種遺伝子をコードするDNAを含む。

【0021】

本願に使用される用語「組換え型タンパク質およびペプチド」は、生細胞内で組換え型DNAを発現することによって生産されるタンパク質またはペプチドに関する。

【0022】

20

本願に使用される用語「Fab」および「抗体」は、抗体が、二つの部分、すなわち、FabおよびFc領域を含むので交換可能に使用される。

本願に使用される用語「ベクター」は、細菌細胞に外来の遺伝的物質を人工的に運ぶためのビヒクルとして使用されるDNA分子に関し、細菌細胞において当該DNA分子は、複製され、発現されることができる。

【0023】

本願に使用される用語「シストロン」は、単一のポリペプチドのための遺伝暗号を含むDNA断片に関し、遺伝的な単位として機能する。

本願に使用される用語「二重の独立したシストロン発現」は、二つの別々のシストロンに関し、独立して二つの同じ、または異なるタンパク質を発現するために使用される。

30

【0024】

本願に使用される用語「同じ」は、同一または類似と交換できる。

本願に使用される用語「二重シストロン発現システム」は、発現されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、およびプロモーターおよび任意にエンハンサー配列のような当該発現を制御する配列を含む。本発明のプロモーターは、発現される遺伝子、すなわち転写単位に操作可能に連結される、または例えば、異種遺伝子の5' - 非翻訳領域によってなどのようにDNAを介在することによって発現される遺伝子から分離される。好ましくは、発現システムは、ベクターへの発現カセットの挿入、および/またはベクターからの当該切除を可能にするために一つ以上の適切な制限部位によって隣接される。したがって、本発明に係る発現システムは、発現ベクター、特に細菌の発現ベクターの構成のために使用されてもよい。

40

【0025】

本願に使用される用語「プロモーター」は、通常、遺伝子の上流に位置し、調節される遺伝子転写のための制御部位を提供するDNAの調節領域に関する。

本願に使用される用語「操作可能に連結される」は、二つ以上のDNA断片、特に、発現される遺伝子配列、およびそれらの発現を制御する配列との間の機能的関係に関する。

【0026】

本願に使用される用語「小さいペプチド」または「ペプチド」は、生物学的医薬品産業において、リラグルチド(Liraglutide)、エキサネチド(exanetide)、PTHなどのような、診断および研究目的において使用される2kDa~10kD

50

a の範囲のペプチドに関する。

【0027】

本発明は、対象の様々な組換え型タンパク質の生産のための二重シストロン発現システムを提供する。特定の実施形態において、二重シストロン発現システムは、対象のタンパク質およびターミネーターをコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるプロモーターを有する二つのシストロンを含む。

【0028】

特定の実施形態において、二重シストロン発現システムは、対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を発現する二つのシストロンを含み、2つのシストロンは、単一のベクターにおいて配置される。

10

【0029】

実施形態において、二重シストロン発現システムは、  
a) 対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるプロモーターを含む第一のシストロン、  
b) 対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるプロモーターを含む第二のシストロン、  
を含み、

ここで、第一および第二のシストロンは、単一のベクター中に配置され、宿主細胞において形成される封入体として対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を発現する。

20

【0030】

実施形態において、プロモーターは、T7プロモーター、アラビノースプロモーター p h o A、t a c、l p p、l a c - l p p、l a c、t r p、t r c から選択されてもよく、好ましくは、T7プロモーター、およびアラビノースプロモーターである。特定の実施形態において、二重シストロン発現システムは、二つのプロモーターの制御下で対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を発現する二つのシストロンを含む。一つの実施形態において、プロモーターは共に、同じ対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列の発現を制御する。他の実施形態において、プロモーターは共に、アミノ酸の長さ、または物理化学的性質の異なる対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列の発現を制御する。

30

【0031】

特定の実施形態において、対象のタンパク質は、ペプチドおよびタンパク質から選択されてもよい。

いくつかの実施形態において、タンパク質は、二重シストロンベクターにおいて発現されてもよい。タンパク質は、抗体または抗体断片を含む。抗体断片は、二重シストロン発現システムにおいて発現されてもよい。抗体断片は、抗体の F a b 重鎖および軽鎖、または、例えば s c F v、二量体、三量体、四量体、ビス - s c F v、ミニボディ、F a b<sub>2</sub> (二重特異性)、F a b<sub>3</sub> (三重特異性)などのような他の抗体断片から選択されてもよい。好ましい実施形態において、二重シストロン発現システムは、F a b 抗体を形成する抗体の重鎖および軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列を発現する。当該実施形態において、F a b 抗体は、V E G F 受容体に親和性を示し、前記 F a b 抗体は、ラニビズマブ (R an i b i z u m a b) である。

40

【0032】

他の実施形態において、タンパク質は、G - C S F、I F N、エリスロポイエチン、インスリン、および当該変異体、P T H (1 - 8 4 a a)、F S H、L H、G H、およびブロテインジスルフィドイソメラーゼ (P D I) から選択されてもよいが制限されない。

【0033】

いくつかの実施形態において、ペプチドは二重シストロンベクターにおいて発現される。ペプチドは、少なくとも 40 個未満のアミノ酸、または好ましくは、31 個未満のアミノ酸、またはより好ましくは、10 個未満のアミノ酸から選択されるアミノ酸配列を含む

50

。特定の実施形態において、ペプチドの分子量は、約2kDa～約10kDaから選択される。ペプチドは、リラグルチド(Liraglutide)のようなGLP-1ペプチド類似体、またはテググルチド(teduglutide)のようなエキセンジノール(Exendin-4)GLP-2ペプチド、およびPTH(1-34aa)およびインスリンから選択されてもよいが制限されない。他の好ましい実施形態において、二重シストロン発現システムは、GLP-1アゴニストペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を発現する。当該実施形態において、GLP-1ペプチドは、リラグルチド(Liraglutide)である。

【0034】

他の実施形態において、プロモーターは共に独立して、アミノ酸の長さ、および物理化学的性質の異なる抗体の重鎖または軽鎖のような異なる対象のタンパク質の発現を制御する。

【0035】

実施形態において、二重シストロン発現システムは、  
a) 抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるT7プロモーターを含む第一のシストロン、  
b) 抗体の軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるアラビノースプロモーターを含む第二のシストロン、  
を含み、

ここで、第一および第二のシストロンは、単一のベクター中に配置され、宿主細胞において形成される封入体として抗体の重鎖および軽鎖を発現する。

【0036】

当該実施形態において、抗体の重鎖および軽鎖は、ヌクレオチド配列ID no.1および配列ID no.2、またはアミノ酸配列ID no.3および配列ID no.4を含む。いくつかの実施形態において、第一および第二のシストロンの位置は交換可能であり、ここで、第二のシストロンは、第一のシストロンの位置でベクターにおいてクローニングされてもよく、第一のシストロンは、第二のシストロンの場所に位置されてもよい。抗体の重鎖および軽鎖は、封入体として独立して発現し、VEGF受容体に親和性を示すFab抗体を得るためにさらに処理されてもよく、前記Fab抗体は、ラニビズマブ(Ranibizumab)である。

【0037】

特定の実施形態において、抗体の重鎖および軽鎖は、単一のペプチド、好ましくはpenta Bと組み合わせて任意に発現される。単一のペプチドは、宿主細胞のペリプラズム空間におけるタンパク質の発現を指示する。

【0038】

実施形態において、単一ベクターにおける二重シストロン発現システムは、二つの異なるプロモーターであるアラビノースおよびT7プロモーターを有し、アラビノースおよびT7プロモーターは、それぞれ、組換え型Fab断片の重鎖および軽鎖の生産を調節し、共に、E.Coliのペリプラズム空間において不溶性の封入体として生産されるpenta Bタグを有する。

【0039】

特定の実施形態において、抗体の重鎖または軽鎖は、タンパク質の発現をさらに増加させるために、レギュレーター、好ましくはArac遺伝子と組み合わせて任意に発現される。

【0040】

二重シストロン発現システムは、対象のタンパク質の等モル発現を提供する。等モル発現は、適切な質および量で対象のタンパク質を得るために、非常に望ましい。等モル発現は、重鎖および軽鎖の比率、またはベクター中にクローニングされるポリペプチドのサブユニットの比率次第である。特定の実施形態において、重鎖および軽鎖は、適切な比率でクローニングされ、重鎖および軽鎖の等モル発現を得るために、重鎖は少なくとも軽鎖と同じ

10

20

30

40

50

、または軽鎖より高い比率である。重鎖および軽鎖は、1.3:0.8、1.2:0.9、1.2:1、1:1を含む、1.5:0.7~1:1から選択される比率でクローニングされる。

#### 【0041】

実施形態において、二重シストロン発現システムは、配列ID no.19で記述されるヌクレオチド配列を含む。

他の実施形態において、二重シストロン発現システムは、  
 a)ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるT7プロモーターを含む第一のシストロン、  
 b)ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるアラビノース突破口モーターを含む第二のシストロン、  
 を含み、

ここで、第一および第二のシストロンは、単一のベクター中に配置され、宿主細胞において形成される封入体としてペプチドを発現する。

#### 【0042】

当該実施形態において、ペプチドは、GLP-1類似体であり、GLP-1アゴニストペプチドをコードする配列ID no.6に記述されるヌクレオチド配列を含み、GLP-1アゴニストペプチドは、配列ID no.7のアミノ酸配列を有するリラグルチド(Liraglutide)である。

#### 【0043】

特定の実施形態において、ペプチドは、当業者に公知のシグナルペプチド、またはレギュレーター/エンハンサーを用いて任意に発現されてもよい。

特定の実施形態において、ペプチドは、ペプチドの分解を防ぐために、融合パートナーと共に、または融合タグと共に任意に発現されてもよい。融合パートナーは、30個のアミノ酸~300個のアミノ酸のアミノ酸配列を含む。融合パートナーは、約50個のアミノ酸、100個のアミノ酸、約136個のアミノ酸、約175個のアミノ酸、約250個のアミノ酸、300個のアミノ酸、好ましくは約136個のアミノ酸から選択されるアミノ酸配列を含む。融合タグは、ヒスチジン-タグ、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、NusA、チオレドキシン(TRX)、ポリヒスチジン(HIS)、低分子ユビキチン様修飾因子(SUMO)、およびユビキチン(Ub)およびスタフィロキナーゼ(SAK)遺伝子から選択されてもよいが制限されない。好ましい実施形態において、融合タグは、SAK遺伝子である。融合タグとしてSAK遺伝子の対象のタンパク質との使用の詳細は、US8853380に開示されており、本願において参照として組み込まれる。

#### 【0044】

いくつかの実施形態において、二重シストロン発現システムは、選択マーカーをさらに含み、選択マーカーは、アンピシリン、カナマイシンから選択され、好ましくはアンピシリンである。

#### 【0045】

他の実施形態において、本発明は、次のステップ：  
 (i)宿主細胞を、二重シストロン発現システムからなる単一ベクターを用いて基本的に形質転換させること、  
 (ii)対象のタンパク質を発現するために、適切な培地中で形質転換細胞を培養すること、ここで、第一および第二のシストロンは、封入体において対象のタンパク質を発現し、  
 (iii)封入体の可溶化を行うこと、  
 (iv)対象のタンパク質の再折りたたみを行うこと、  
 を含む、対象のタンパク質を生産する工程を提供する。

#### 【0046】

実施形態において、二重シストロン発現システムは、対象のタンパク質を発現するため

に適切な細菌宿主細胞において形質転換される。適切な細菌宿主細胞は、E. coli であり、E. coliにおいて、対象のタンパク質は、封入体の形態で発現される。封入体は、E. coliのペリプラズムまたは細胞質において形成される不溶性の物質である。封入体は、単離され、可溶化されてもよく、対象のタンパク質は、当該技術分野においてよく知られた技術によって活性形態で回収されてもよい。

【0047】

実施形態において、抗体のFab重鎖および軽鎖、または、例えばscFv、二量体、三量体、四量体、ビス-scFv、ミニボディ、Fab<sub>2</sub>（二重特異性）、Fab<sub>3</sub>（三重特異性）などの他の抗体断片は、二つの異なるプロモーターであるアラビノースおよびT7プロモーターを有する单一のベクターにおいて二つの独立したシストロンを構成することによって、E. coliのペリプラズム空間に不溶性の封入体として発現された。二つの異なるプロモーター、すなわち、T7プロモーターおよびアラビノースプロモーターは、それぞれFab分子の重鎖および軽鎖の発現を助けた。抗体の重鎖および軽鎖は、細菌細胞、すなわち、E. coliの非官能性封入体として生産され、続いて抽出、再折りたたみ、および精製される。

【0048】

本発明の実施形態において、シストロンは、各遺伝子（重鎖および軽鎖）が单一のベクターにおいてそれ自身のプロモーターおよびターミネーターを有することになるようなものを含む。重鎖がT7プロモーターの制御下でクローニングされ、一方、軽鎖は、アラビノースプロモーターの制御下でクローニングされた。両方の鎖は、細菌膜のペリプラズム空間において産物を得るために、シグナル配列pelBタグを先に付けた。

【0049】

二重シストロン発現システムの利点は、アラビノースおよびT7は共に強いプロモーターであることであり、軽鎖および重鎖の両方の高発現が、軽鎖および重鎖クローニングと発酵物を分離する代わりに单一の発酵工程から得られる。二重シストロン発現システムは、軽鎖および重鎖のクローニングのための細胞バンクを分離する代わりに单一の細胞バンクを特徴付けし維持することをより簡単にする。さらに、こうして得られる封入体は、細菌細胞のペリプラズム空間から抽出される場合、相対的に純粋である。封入体として得られる軽鎖および重鎖の高レベル発現およびより純粋な形態は、エクスピボ(ex vivo)で機能性Fabに折り畳むことを相対的により簡単にし、これにより、産物の収率を大いに向上させる。

【0050】

本発明におけるシステムの他の利点は、対象のタンパク質を、アラビノースおよびT7プロモーター下でクローニングされ、発現されてもよく、タンパク質の発現レベルを重大に向上させてもよい。

以下に開示される実施例は、本発明の実例となることを目的とするだけであり、本発明を限定することを意図するものではない。

【0051】

実施例1：pET21aベクターにおける重鎖のクローニング  
Fab断片における重鎖および軽鎖のクローニングのために使用されるDNA配列は、ID no. 1およびno. 2でそれぞれ与えられる。挿入された重鎖を、遺伝子特異的プライマーを用いて合成DNAから増幅した。プライマーは当該技術分野でよく知られた方法に従って設計される。重鎖PCR産物は、その後、NdeI-HindIII酵素を用いて消化され、同じ酵素を用いて消化されるpET21aベクターにライゲーションされた。クローニングをコロニーPCRによってスクリーニングし、制限分析によって確認した。結果として生じるクローニングをpET21a-HCと呼んだ。組換え体ベクターを、BL21A1細胞系列に導入し、重鎖の発現を確認した。

【0052】

実施例2：pBAD24Mベクターにおける軽鎖のクローニング  
挿入された軽鎖を、遺伝子特異的プライマーを用いて合成DNAから増幅した。プライ

10

20

30

40

50

マーは当該技術分野でよく知られた方法に従って設計される。増幅された軽鎖は、Nde I - Hind III 酵素を用いて消化され、同じ部位で消化される pBAD24Mベクター（実験室で利用できる）にライゲーションされた。クローンをコロニーPCRによってスクリーニングし、制限分析によって確認した。結果として生じるクローンを pBAD24M-LCと呼んだ。組換え体ベクターを、BL21A1細胞系列に導入し、軽鎖の発現を確認した。

#### 【0053】

##### 実施例3：同じベクターにおける二つの独立したシストロンの構築

プライマーは、アラビノースプロモーター、ターミネーター、およびaraC遺伝子と一緒に軽鎖を増幅するために設計された。プライマーは当該技術分野でよく知られた方法に従って設計される。プライマーは、増幅された産物に対してBGI I I リンカーを加えた。pET21aベクターは、T7プロモーターの上流に単一のBGI I I 部位を有した。軽鎖発現力セットを、ベクター特異的プライマーを用いて鋳型pBAD24Mから増幅し、BGI I I 部位でpET21a-HCクローンにクローン化した。クローンを制限消化およびシーケンスによって確認した。最終的なクローンをpET21a-HC-LCと呼び、適切なクローンを発現に基づいてショートリストした。pET21a-HC-LCのクローン地図を、図2に示す。

そのように生成されたクローンは、重鎖および軽鎖の両方の独立した制御および発現のために必要とされる全ての断片を含む。

#### 【0054】

##### 実施例4：発現分析

E.coli BL21 A1細胞系列を発現ホストとして使用した。BL21 A1とは別に、ゲノムにおいてT7プロモーターを含むBL21 DE3、または任意の他の細胞系列を使用する。BL21 A1細胞を、コントロールとしてpET21a-HCおよびpBAD24M-LCと一緒に上記の選択されたクローンを用いて形質転換した。重鎖は、IPTGによって誘導され、軽鎖は、アラビノースによって誘導された。インデューサー濃度は、13mMアラビノースおよび1mM IPTGであり、誘導は、培養OD<sub>600</sub>が~1になった時に行われた。細胞を、誘導後、4時間で採取した。実験を振とうフラスコ中で行った。得られた採取物を、ビーズ溶解し、可溶性および不溶性画分を分離するために遠心分離した。発現を確認するために、試料を12%SDS-PAGEゲルに載せた。SDS-PAGE分析を図3に示す。減少した軽鎖および重鎖の発現を確認するために、減じたラニビズマブを、図3のレーン5において載せた。

#### 【0055】

SDS-PAGE分析は、不溶性のペレット画分において両鎖の発現を示し、同じことをRP-HPLCによって確認した。ここで、参照産物の軽鎖および重鎖の保持時間は、自家産物の保持時間に相当した。使用されるコントロールは、Fab分子（参照産物）、並びにpET21a-HCクローンおよびpBAD24Mクローン産物を減少させた。したがって、単一のクローンからの重鎖および軽鎖の両方の発現を確認した。RP-HPLC分析を図4および図5に示す。RP-HPLCにおいて、二重シストロンクローンの可溶化された、および減少したIBは、減少したラニビズマブ（RMP）と比較され、クローンは、重鎖および軽鎖、すなわちpET21a-HCおよびpBAD24MLCを別々に発現していた。

#### 【0056】

軽鎖のみを発現するpBAD24MLCの可溶化されたIBの主なピークの保持時間（RT）は、減少したRMPの軽鎖のRTと一致する。RT13分での不純物ピークは、重鎖の保持時間と一致し、そのことは、同様の疎水性を有すること示した。したがって、不純物は、LC-MS/MSによって特徴付けられ、最終的に、RT17分で、宿主細胞のタンパク質OMP C、および非切断リード配列を有する軽鎖として注釈付けした。pET21a-HCによって発現された重鎖は、参照の標準重鎖と一致した。プロファイルもRT19分でポストピークを示し、そのことは非切断リード配列を有する重鎖と特徴付け

10

20

30

40

50

られた。LC および HC の両方を発現する二重シストロンクローン pET21a\_HC\_LC は、二つの主なピークを有し、参照標準の LC および HC の保持時間と同等の保持時間有する。しかし、OMP\_C は、重鎖と共に溶出するので、逆相の試験方法がより良く分解することになり、これを図 4 に示す。

【0057】

Zorbax C8 RP カラムにおける既存の方法を、Aeriswidepore C8 カラムに変更し、共溶出種を分解した。Aeriswidepore C8 カラムにおける pET21a\_HC\_LC の可溶化された IB は、明確な LC、HC、およびOMP\_C ピークを示し、図 5 で明らかのように IB において個々のサブユニットの同定、および正確な定量化を可能にした。

10

【0058】

特定の実施形態および実施例を、上記の詳細に記載しているけれども、多くの変更がその教示から逸脱することがなく実施形態および実施例において可能であることを、当業者は明らかに理解するだろう。

【0059】

実施例 no 5 : pET24a ベクターにおいてスタフィロキナーゼ (SAK) 融合タグを有する小ペプチド (リラグルチド) のクローニング

SAK およびリラグルチド遺伝子を、遺伝子特異的プライマーを用いて合成 DNA から増幅した。プライマーは、当該技術分野でよく知られた方法に従って設計され、PCR 産物を、NdeI - BamHI および BamHI - HindIII 酵素を用いて消化し、NdeI - HindIII 部位で消化された pET24a ベクターにライゲーションした。クローンを、コロニー PCR によってスクリーニングし、制限分析によって確認した。結果として生じるクローンを、pET24a - SAK - Lira として設定した。

20

【0060】

実施例 no 6 : pBAD24M ベクターにおいてスタフィロキナーゼ融合タグを有する小ペプチド (リラグルチド) のクローニング

実施例 no 6 において与えらるるように、SAK タグを有するリラグルチドを、pBAD24M ベクターにクローン化した。クローンを、pBAD24M - SAK - Lira として設定した。

30

【0061】

実施例 no 7 : SAK - Lira 融合ペプチドを発現する二つのシストロンを有する同じのベクターにおける二つの独立したシストロンの構築

実施例 no . 3 において使用されるクローン設計戦略を、リラグルチドの二重シストロンクローンを構築するために使用し、ここで、二重シストロン構築を構築するために、アラビノース発現カセットと共に SAK - Lira 融合遺伝子を、pBAD24M - SAK - Lira クローンから増幅し、pET24a - SAK - Lira クローンにクローン化した。クローンを、pET - ara - SAK - Lira として標識化した。

【0062】

実施例 no 8 : SAK - Lira 融合タンパク質を有する二重シストロンクローンの発現分析

40

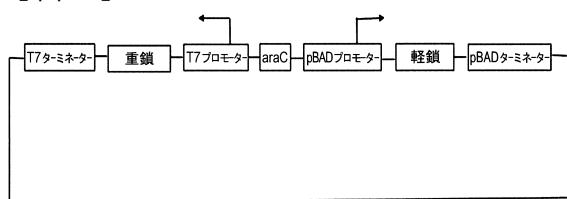
E. coli BL21 A1 細胞系列を発現ホストとして使用した。BL21 A1 とは別に、ゲノムにおいて T7 プロモーターを含む BL21 DE3、または任意の他の細胞系列を使用する。BL21 A1 細胞を、上記の単一のおよび二重のシストロン構築物を用いて形質転換した。クローンを、IPTG およびアラビノースによって誘導した。インデューサー濃度は、13 mM アラビノースおよび 1 mM IPTG であり、誘導は、培養 OD<sub>600</sub> が ~1 になった時に行われた。細胞を、誘導後、4 時間で採取した。実験を振とうフラスコ中で行った。得られた採取物を、ビーズ溶解し、可溶性および不溶性画分を分離するために遠心分離した。発現を確認するために、試料を 12% SDS-PAGE ゲルにロードした。

【0063】

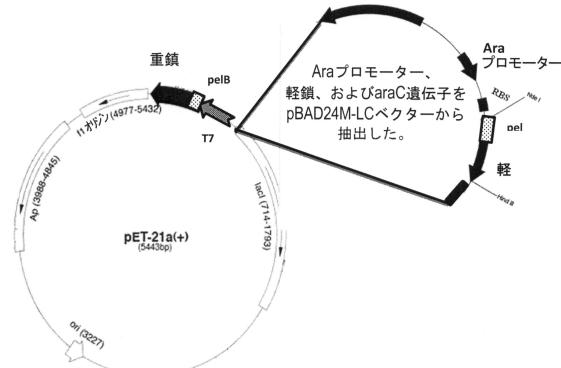
50

S D S P A G E ゲル分析は、単一のシストロン p E T 2 4 a - S A K - L i r a クローン（図 6 レーン 3）と比較して、二重シストロンクローン（図 6 レーン 2）において S A K - L i r a 融合タンパク質の発現の上昇を明確に示す。

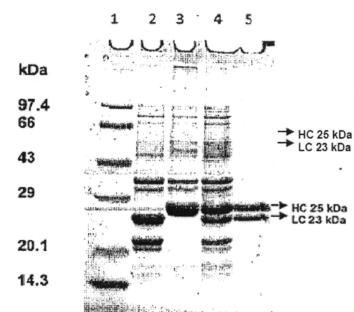
【図 1】



【図 2】



【図 3】



レーンNo	レーン説明
1	タンパク質分子量マーカー
2	軽鎖pBAD/BL21 A1
3	重鎖pET21a/BL21A1
4	二重シストロンクローンpET21a-HC-LC/BL21 A1
5	ラニビズマブ(Ranibizumab)標準

【図 4】

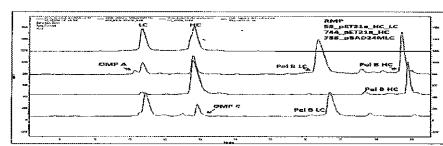
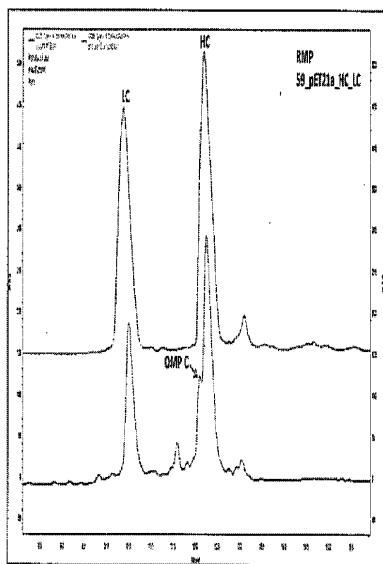


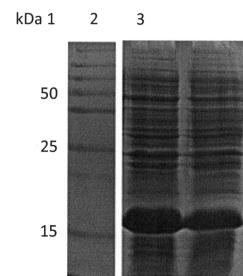
Figure 4

【 図 5 】



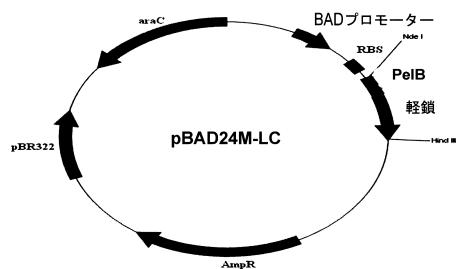
**Figure 5**

【 四 6 】



レーンNo	レーン説明
1	タンパク質分子量マーカー
2	二重シストロンクローンpET-ara- <u>SAK-Lir</u> a/ <u>BL21</u> A1
3	単一シストロンクローンpET- <u>SAK-Lir</u> a

【図7】



## 【配列表】

0006748061000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 バーシュニー ブラジエス

インド国 ブーネ 412 115 ムルシ タルカ ゴータワデ ビレッジ ゲート ナンバー  
1156 ルピン・リミテッド (バイオテクノロジー ディビジョン)

(72)発明者 ソーラパネニ スダヒーバブ

インド国 ブーネ 412 115 ムルシ タルカ ゴータワデ ビレッジ ゲート ナンバー  
1156 ルピン・リミテッド (バイオテクノロジー ディビジョン)

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 特表2005-517385 (JP, A)

特表2009-542232 (JP, A)

特表2013-519721 (JP, A)

Protein Sci., 2004, 13(6), pp.1698-1703

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 1/00 - 19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)