

(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2006-517415
(P2006-517415A)

(43) 公表日 平成18年7月27日(2006.7.27)

(51) Int.Cl.
C 1 2 P 21/02 (2006.01)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)

F I
C 1 2 P 21/02 Z N A C
C 1 2 N 15/00 A

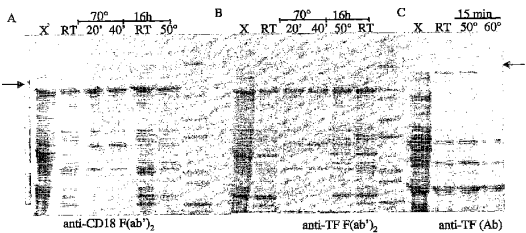
テーマコード (参考)
4 B O 2 4
4 B O 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁)			
(21) 出願番号	特願2006-508590 (P2006-508590)	(71) 出願人	596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・94080-4990・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(86) (22) 出願日	平成16年1月8日 (2004.1.8)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成17年9月12日 (2005.9.12)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/000499	(72) 発明者	レスター, フィリップ, エム. アメリカ合衆国 カリフォルニア 94580, サン ロレンツォ, ヴィア コルサ 15766
(87) 国際公開番号	W02004/092393		
(87) 国際公開日	平成16年10月28日 (2004.10.28)		
(31) 優先権主張番号	60/439, 418		
(32) 優先日	平成15年1月9日 (2003.1.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ポリペプチドの精製

(57) 【要約】

本発明は、それが生成されて可溶化された微生物の発酵ブロス又はホモジネートから所望の異種ポリペプチドを生成するための方法を開示する。本方法は、ポリペプチドの大部分が可溶性を維持する条件下においてブロス又はホモジネートに有効量の6, 9 - ジアミノ - 2 - エトキシアクリジン乳酸塩（乳酸エタクリジン）溶液を添加することにより宿主細胞の不純物を沈降させること、及び所望のポリペプチドをブロス又はホモジネートから分離することを含む。また、乳酸エタクリジン及びポリペプチドを含むブロス又はホモジネートも開示する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

所望の異種ポリペプチドを、それが生成されて可溶化された微生物発酵ブロス又はホモジネートから精製する方法であって、ポリペプチドの大部分が可溶性のまま維持されるような条件下でブロス又はホモジネートに有効量の乳酸エタクリジン溶液を添加することにより宿主細胞不純物を沈降させ、所望のポリペプチドをブロス又はホモジネートから分離することを含む方法。

【請求項 2】

ブロス又はホモジネートが酵母又は原核生物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ブロス又はホモジネートが細菌に由来する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ブロス又はホモジネートが真正細菌に由来する、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

ブロス又はホモジネートがグラム陰性細菌に由来する、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

ブロス又はホモジネートが大腸菌に由来する、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

ポリペプチドがホモジネートから分離される、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

ポリペプチドの p I が、宿主細胞不純物に含まれる宿主細胞の平均 p I よりも高い、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

ポリペプチドの p I が少なくとも約 7 である、請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

ポリペプチドが組換えポリペプチドである、請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

ポリペプチドが抗体である、請求項 1 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

ポリペプチドがヒト化抗体である、請求項 1 ないし 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

ポリペプチドが完全長抗体である、請求項 1 ないし 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

ポリペプチドが抗体断片である、請求項 1 ないし 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

ポリペプチドが軽鎖を有する抗体断片である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

ポリペプチドが 軽鎖を有する抗体断片である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

ポリペプチドが F a b、F a b'、F (a b')₂、又は F (a b')₂ - ロイシンジッパー融合体である、請求項 14 ないし 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

ポリペプチドが F (a b')₂ である、請求項 14 ないし 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

ポリペプチドが、抗 I g E、抗 C D 1 8、抗 V E G F、抗組織因子、2 C 4、抗 H e r - 2、抗 C D 2 0、抗 C D 4 0、或いは抗 C D 1 1 a 抗体又は抗体断片である、請求項 1 ないし 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

ポリペプチドが、抗 C D 1 8 F (a b ')₂、抗組織因子 F (a b ')₂、完全長抗組織因子抗体、又は抗 V E G F 抗体である、請求項 1 ないし 1 1 のいずれか 1 項又は請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 21】

乳酸エタクリジンの濃度が約 0 . 1 ~ 5 重量 % / 容積である、請求項 1 ないし 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 22】

乳酸エタクリジンの濃度が約 0 . 4 ~ 5 重量 % / 容積である、請求項 1 ないし 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

乳酸エタクリジンの濃度が約 0 . 6 ~ 5 重量 % / 容積である、請求項 1 ないし 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

乳酸エタクリジンを添加した後のブロス又はホモジネートの伝導率が約 1 ~ 1 5 m S である、請求項 1 ないし 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 25】

乳酸エタクリジンを添加した後のブロス又はホモジネートの p H が約 5 ~ 9 である、請求項 1 ないし 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

乳酸エタクリジンを添加した後のブロス又はホモジネートの p H が約 6 ~ 9 である、請求項 1 ないし 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

乳酸エタクリジンを添加した後のブロス又はホモジネートの温度を室温 ~ 約 7 0 とする、請求項 1 ないし 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

乳酸エタクリジンを添加した後のブロス又はホモジネートの温度を約 1 ~ 6 0 分間室温 ~ 約 6 5 に保つ、請求項 1 ないし 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 29】

乳酸エタクリジンを添加した後のブロス又はホモジネートの温度を約 1 ~ 6 0 分間約 5 0 ~ 6 5 に保つ、請求項 1 ないし 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

遠心分離又は濾過により分離を行う、請求項 1 ないし 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

ブロス又はホモジネートから分離した後、クロマトグラフィー又は濾過により更にポリペプチドを精製する、請求項 1 ないし 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 32】

乳酸エタクリジンの添加に先立って、ポリペプチドを溶解性断片に製造する、請求項 1 ないし 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 33】

ポリペプチドが非溶解性であり、乳酸エタクリジンの添加に先立って可溶化剤に接触させることによりポリペプチドを溶解する、請求項 1 ないし 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

乳酸エタクリジン及び細胞に対して異種性のポリペプチドを含む微生物細胞発酵ブロス 50

又はホモジネート。

【請求項 35】

細菌細胞に由来する、請求項 34 に記載のプロス又はホモジネート。

【請求項 36】

大腸菌に由来する、請求項 34 又は 35 に記載のプロス又はホモジネート。

【請求項 37】

ポリペプチドが組換えポリペプチドである、請求項 34 ないし 36 のいずれか 1 項に記載のプロス又はホモジネート。

【請求項 38】

ポリペプチドが抗体又は抗体断片である、請求項 34 ないし 37 のいずれか 1 項に記載のプロス又はホモジネート。 10

【請求項 39】

ポリペプチドが $F(a b')_2$ である、請求項 34 ないし 38 のいずれか 1 項に記載のプロス又はホモジネート。

【請求項 40】

ポリペプチドが、抗 IgE、抗 CD18、抗 VEGF、抗組織因子、2C4、抗 Her-2、抗 CD20、抗 CD40、或いは抗 CD11a 抗体である、請求項 34 ないし 38 のいずれか 1 項に記載のプロス又はホモジネート。

【請求項 41】

ポリペプチドが、抗 CD18 $F(a b')_2$ 、抗組織因子 $F(a b')_2$ 、完全長抗組織因子抗体、又は抗 VEGF 抗体である、請求項 34 ないし 38 のいずれか 1 項又は請求項 40 に記載のプロス又はホモジネート。 20

【請求項 42】

乳酸エタクリジンの濃度が約 0.1 ~ 5 重量% / 容積である、請求項 34 ないし 41 のいずれか 1 項に記載のプロス又はホモジネート。

【請求項 43】

ポリペプチドがプロス又はホモジネートに溶解性である、請求項 34 ないし 42 のいずれか 1 項に記載のプロス又はホモジネート。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

30

【0001】

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は、微生物発酵プロス又はホモジネートから対象のポリペプチドを生成する工程に関する。具体的には、プロス又はホモジネートに沈降剤を導入し、例えばタンパク質、DNA、及び細胞片の除去を行う。

【0002】

2. 関連技術の説明

組換え技術の出現により、現在適切に形質転換した宿主細胞内に高いレベルのタンパク質を生成することができる。結果として、組換えにより生成したタンパク質を、速やかに、確実に、且つ効率よく回収できる方法に対する需要が高まっている。通常、タンパク質は、哺乳動物、昆虫、真菌、及び細菌の細胞系等の細胞を、対象のタンパク質の遺伝子を含む組換えプラスミドを挿入することによりタンパク質を生成するように操作したものを培養することにより生成される。使用する細胞系は生きてくる生物体であるので、通常動物血清の調製により供給されるような、糖、アミノ酸及び成長因子を含む複合成長培地を与えなければならない。細胞に与えた化合物の混合体、及び細胞自体の副産物から、ヒトの治療に使用するのに十分な純度まで所望のタンパク質を分離することは、困難な課題である。 40

細胞片からタンパク質を精製する手順は、第一に、タンパク質の発現部位に依存する。タンパク質には、細胞から周辺の成長培地へ直接分泌されるものと、細胞内で生成される 50

ものがある。哺乳動物に細胞内で生成されるポリペプチドの精製の仕組みは、他の種類の宿主細胞に生成されるポリペプチドの同仕組みよりずっと容易である。哺乳動物はポリペプチドを搬出するので、成長培地からそのようなポリペプチドを回収することができる。成長培地において、ポリペプチドは比較的純粋な形態である。しかしながら、非哺乳動物、例えば菌類又は大腸菌等の細胞内にポリペプチドを生成した場合、ポリペプチドは細胞内又は細胞膜周辺腔で回収される (Kipriyanov及びLittle, *Molecular Biotechnology*, 12: 173-201 (1999); Skerra及びPluckthun, *Science*, 240: 1038-1040 (1988))。よって、細胞溶解等の抽出法によりタンパク質を細胞から細胞外培地中に放出しなければならない。そのような破壊により、細胞の内容全体がホモジネート中へと放出され、それに加えて小さすぎることにより除去が困難な細胞成分分画が生成される。これらは通常差動遠心分離又は濾過により除去される。

10

【0003】

一般に、細胞溶解は、均質化又はヘッドミル等の機械的破壊技術を用いて行われる。対象のタンパク質は通常効率的に遊離されるが、そのような技術には複数の欠点がある (Engler, *Protein Purification Process Engineering*, Harrison編, 37-55 (1994))。処理の間にしばしば温度が上昇し、タンパク質の不活性化が起こる場合がある。さらに、結果として得られる懸濁液が幅広いスペクトルの汚染タンパク質、核酸及び多糖類を含む。核酸及び多糖類により溶液の粘度が増大し、その結果その後行われる遠心分離、交流式濾過、又はクロマトグラフィーによる処理が困難となる可能性がある。これら汚染物質が対象のタンパク質と複雑に関連することにより、生成プロセスが複雑化し、その結果十分な産生量が得られない場合がある。

20

よって、細胞内タンパク質を放出するのにもっと感度の良い手段を用いることにより、後続の処理が容易になる。細胞を透過性にするため、及び/又は細胞内タンパク質を抽出するための技術がこれまでに複数報告されている。これらの方法には、溶媒、洗浄剤、カオトロピック剤、抗体、酵素、及びキレート剤の使用により、細胞透過性を増強すること、及び/又は抽出を促進することが含まれている。細胞成長の間に発酵培地に特定の化合物、例えばグリシンを加えることにより、特定の細胞内酵素の放出を促進することもまた報告されている。最後に、凍結融解処理又は浸透圧ショックにより細胞内タンパク質のサブセットを放出することも示されている。

30

【0004】

しかしながら、これら技術は必ずしも全ての細胞内微生物タンパクに適用できるわけではなく、いずれも大量処理への応用に限界を有し、及び/又はその他の欠点を有している。例えば、トルエン及びクロロホルム等の溶媒が細胞内タンパク質の放出を促進するが、これらの物質は毒性及び/又は発癌性を有することが知られている (Windholtz等., *The Merck Index 10th Edition*: 300及び1364 (1983))。SDSのようなイオン性洗浄剤は、単離されたタンパク質を不可逆的に変性させてしまうことが多い。非イオン性洗浄剤により通常変性は起こらないが、回収されたタンパク質がしばしば洗浄剤ミセルと関連し、洗浄剤を含まない細胞を得るためには追加の処理が必要となる。尿素及び塩酸グアニンなどのカオトロピック剤は、完全な放出に必要な濃度において変性を起こす場合があり、その効果は培地の増殖相に依存する。リゾチームの使用は比較的穏やかなタンパク質遊離手段であるが、その原価が比較的高いこと、及びその後酵素試薬から対象タンパク質を生成する必要があることから、その使用には限界がある。加えて、リゾチーム又はトルエン抽出等の他の可溶化/放出技術を強化するためにしばしば用いられるキレート剤は、宿主タンパク質を非特異的に放出するという欠点を有している。

40

他のタンパク質放出法も欠点を有している。例えば、浸透圧ショックでは、細胞は浸透圧の高い培地に置かれ、回収され、その後浸透圧の低い緩衝液中に置かれることになり、他の抽出手段に対して処理段階が多くなる (Moir等, *Separation Processes in Biotechnology*, Asenjo eds: 67-94 (1990))か、又は低温の液体を大量に扱うことが必要になる。この方法のこのような特徴は、大量処理にとって魅力的でない。

【0005】

50

凍結融解処理も細胞内タンパク質を放出するが、複数回の処理では産量が低下することが多いか、又はそれにより追加の処理が必要となる。さらに、他の抽出手段と比較して、細胞ペースト凍結により生じる追加処理の手間は小さくない。

最後に、グリシン等の試薬を発酵段階で添加することにより、細胞外培地へのタンパク質の放出を促進している (Aristidou等, *Biotechnology Letters* 15: 331-336 (1993))。複数の細胞内タンパク質が部分的に放出されることが報告されているが、この方法では発酵と放出戦略が直接結びついていなければならない、その後、場合によっては複雑な細胞外プロスから対象のタンパク質を分離しなければならない。

【0006】

宿主細胞から対象のポリペプチドが放出されたら、他の細胞成分からそれを精製しなければならない。残念ながら、細胞溶解等の多くの抽出方法は、タンパク質を宿主細胞のプロテアーゼによる分解の危険に曝すだけでなく、結果として得られた懸濁液に含まれる他の要素からのタンパク質の分離をさらに困難にする。例えば、DNA、RNA、リン脂質、及びリポ多糖 (LPS) 等の負の電荷を持つ分子の存在により、陰イオン交換クロマトグラフィー (Sassenfeld, *TIBTECH*, 8: 88-93 (1990); Spears, *Biotechnology*, vol. 3-Bioprocessing, Rehm eds:40-51 (1993))、及び/又は、硫酸プロタミン (Kelley等, *Bioseparation*, 1: 333-349 (1991); Scopes, *Protein Purification Principles and Practice*, 2nd edition, Cantor eds., pp. 21-71 (1987))、硫酸ストレプトマイシン (Wang 等, eds, *Fermentation and Enzyme Technology*: 253-256 (1979))、ポリエチレンジアミン (PEI) (Kelley等、上掲; Sassenfeld、上掲; Cumming等, *Bioseparation*, 6: 17-23 (1996); Jendrisak, *The use of polyethyleneimine in protein purification. Protein purification: micro to macro*, ed. Alan R., Liss, Inc, 75-97 (1987); Salt等, *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 107-113 (1995)) 等のポリカチオンによる沈降、及び/又はポリエチレングリコール (PEG) / 硫酸又は PEG / デキストラン等の非混和性ポリマー系を用いた水性二相抽出 (Kelley等、上掲; Strandberg等, *Process Biochemistry* 26: 225-234 (1991)) の使用が必要となる。

別法では、硫酸アンモニウム又は塩化カリウム等の中性塩 (Wheelwright, *Protein Purification: Design and Scale up of Downstream Processing*: 87-98 (1991); Englund等, *Methods in Enzymology Volume 182*, Deutscher eds.: 285-300 (1990)) 及び/又は PEG 又は硫酸デキストラン (Wang等、上掲; Wheelwright上掲) 等のポリマーの添加により、対象のタンパク質を非タンパク質性ポリアニオン性混入物から沈殿させることができる。対象のタンパク質が正の電荷を有すると、そこに存在する負の電荷を有するあらゆる分子に結合する傾向を有するので、タンパク質の精製は殆ど不可能である。

【0007】

一般に、研究者はまず上述のような細分化段階を行って、対象のタンパク質から不要なポリアニオンを分離する。残念ながら、初めに行ういずれの分離法も、特に製薬用試薬に使用される場合、重大な欠点を有している。例えば、細菌性可溶化液中に見られる大量の非タンパク質性ポリアニオン性混入物には、アニオン交換クロマトグラフィー樹脂の結合能を低下させる傾向がある。加えて、ポリアニオンの樹脂への強い結合により、再生プロトコルの効果が失われることがままある (Spears、上掲)。最後に、タンパク質結合に有利なイオン強度の低い条件は、ばらばらなポリアニオン-タンパク質間の相互作用下では効果を失い、その結果分離が十分に行われない (Scopes, *Protein Purification Principles and Practice*, 3rd edition, Cantor eds., p. 171 (1994))。硫酸プロタミンの調製は、プロテアーゼ及びウィルス汚染の懸念から困難である。さらに、この試薬の使用により、不要なタンパク質沈殿が起こりうる (Scopes, *Protein Purification Principles and Practice*, 2nd edition, Cantor eds., 21-71 (1987))。

プロセス試薬として抗生物質を使用することには不安があるので、製薬用タンパク質の処理に一般的に硫酸ストレプトマイシンは使用されていない (Scawen等, *Handbook of Enzyme Biotechnology* 2nd edition, Wiseman eds.: 15-53 (1985))。PEIの調製は、発癌性が疑われる様々な量のエチレンジアミン単量体によって汚染されることが多い (Scawe

n等、上掲)。P E Iはまた、多くのクロマトグラフィー樹脂に不可逆的に結合する性質を有しており、それによりそれらの効果、及びP E I後の清澄に利用可能なクロマトグラフィー樹脂の数に限界がある。一般に、水性二相抽出システムは予想が難しく、また対象のタンパク質を適切な水性相に移動させる条件を決定するのに経験的手法が必要となることが多い(Kelley等、上掲)。

対象のタンパク質を特異的に沈降させる技術は、しばしば沈殿物に非タンパク質性の混入物が捕捉され、分離の効果が失われるという結果を伴う(Scopes、上掲; Wheelwright、上掲)。

【0008】

タンパク質の回収及び精製について開示した特許文献の例は以下の通りである。

10

米国特許第5,665,866号には、正確に折り畳まれ、アセンブルされた形態の可溶性の抗体を得る方法が開示されている。この方法は、プロセス中適切な時点で実用温度を34から60に上げることにより、その後行われる正確に折り畳まれてアセンブルされた可溶性の抗体の分離を、他の抗体に関連する物質を実質的に何も使用せずに行うステップを含む。

【0009】

米国特許第5,760,189号には、溶液にキレート剤を添加することにより、負の電荷を有する非タンパク質性の物質を含め、大腸菌から溶液中にチオレドキシン様融合タンパク質を放出し、該溶液に二価陽イオン/アルコール溶液を添加して、タンパク質を含む第一の可溶性の分画と、不要な混入物を含む第一の不溶性分画とを形成することにより、溶液中の負の電荷を有する非タンパク質性物質を沈降させる方法が開示されている。場合によっては、キレート剤添加前の温度はキレート剤添加後の温度より低くてもよい。二価陽イオンには、例えば、マグネシウム、マンガン、及びカルシウムの1つ又は組合せが含まれる。

20

米国特許第5,714,583号には、溶液中の因子IXの精製法が開示されており、この方法では、因子IXを含む溶液を陽イオン交換樹脂に適用し、樹脂から因子IXを溶出するには少し足りない伝導率を有する溶液で陽イオン交換樹脂を洗浄し、第1の溶出剤を用いて陽イオン交換樹脂を抽出して第1の溶出液を作成し、該溶出液をヘパリン又はヘパリン様(例えば負の電荷を有する基質)樹脂に適用し、第2の溶出液を用いてヘパリン又はヘパリン様樹脂を溶出して第2の溶出液を作成し、第2の溶出液をヒドロキシアパタイト樹脂に適用し、次いで第3の溶出液を用いてヒドロキシアパタイト樹脂を溶出し、精製された因子IXを含む第3の溶出液を形成する。

30

【0010】

米国特許第6,322,997号には、ポリペプチドの回収方法が開示されており、この方法では、ポリペプチドを含む組成物を、該ポリペプチドに結合して修飾する試薬に接触させ、その場合試薬を固相に固定し、次いで該組成物中の試薬の電荷と反対の電荷を有するフィルタに組成物を通すことにより、組成物から浸出した試薬を除去する。

米国特許第6,214,984号には、抗体精製のための低pH疎水性相互作用クロマトグラフィー(LPHIC)が開示されている。特にこの特許文献は混入物から抗体を精製する方法を提供するもので、抗体と混入物とを含む混合物を疎水性相互作用クロマトグラフィーカラムに入れ、約2.5~4.5のpHを有する緩衝液を用いてカラムから抗体を溶出する。通常、カラムに入れられる混合物のpHは溶出緩衝液のpHとほぼ同じである。

40

【0011】

米国特許第6,121,428は、ポリペプチドの回収方法を提供するものであり、この方法では、ポリペプチドを含む組成物を、このポリペプチドに結合して修飾する試薬に接触させ、その場合試薬を固相に固定し、次いで該組成物中の試薬の電荷と反対の電荷を有するフィルタに組成物を通すことにより、組成物から浸出した試薬を除去する。

米国特許第5,641,870号は、抗体の精製方法を提供するもので、抗体と混入物を含む混合物を場合によっては低い塩濃度でLPHICにかける。抗体はそれに結合しない分画でカラムから溶出される。抽出段階において、室温で、5mMのEDTA及び予めエタノー

50

ルに溶解させた20 mMの4, 4'-DTPを含む、pH 6.0の20 mMのMES緩衝液に、凍らせた細胞ペレットを再度懸濁する(緩衝液3リットル/細胞ペレット1 kg)。懸濁された細胞は、Mantin Gaulinホモジナイザーを通る通路により5500~6500 PSIで2つに分けられる。ホモジネートはポリエチレンイミン(PEI)により0.25%(v/v)に調節され、同容量の2~8の精製水により希釈される。次いで希釈したホモジネートの遠心分離を行う。上清に抗体断片が見られるようになる。

【0012】

従来、免疫グロブリンG(IgG)はヒト血清及び血漿から精製されていた(Putnam, ed., The Plasma Proteins, vol. 1 (Academic Press, 1975))。精製プロセスは1又は複数のステップを含むことが多い。IgGの回収に最も広く使用される沈降スキームは、コーンによる分画である(Cohn等, J. Amer. Chem. Soc., 72: 465 (1950))。しかしながら、他の沈降技術も報告されている(Niederauer及びGlatz, Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, v. 47 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992); Steinberg及びHershberger, Biochim. et Biophys. Acta, 342: 195-206 (1974))。芳香及び陽イオン性の高い染料である6, 9-ジアミノ-2-エトキシアクリジン乳酸塩(USAN名及び本明細書で乳酸エタクリジンと呼び、またETHODIN(登録商標)又はRIVANOL(登録商標)としても知られる)を用いて血漿からIgGを精製する先駆的な作業がHorsj i及びSmetana, Acta Med. Scand., 155: 65 (1956)により報告された。続く10年間に、6, 9-ジアミノ-2-エトキシアクリジン乳酸塩が持つ、血漿及び成長培地等の生物学的材料からのIgG及び他のタンパク質精製能が多数の文献に示された(Miller, Nature, 184: 450 (1959); Steinbuch及びNiewiarowski, Nature, 186: 87 (1960); Neurath及びBrunner, Experientia, 25: 668 (1969))。乳酸エタクリジンの使用によるその他の出所からの抗体及びその他のタンパク質の回収が報告されている。例えば、Tchernov等, J. Biotechnol., 69: 69-73 (1999); 1982年7月28日公開のSU 944580; Franek 及びDolnikova, Biotech-Forum-Eur, 7: 468-470 (1990); 1987年12月23日公開のEP 250288; 1987年8月20日公開のDE3604947; Rothwell等, Anal. Biochem., 149: 197-201 (1985); Lutsik及びAntonyuk, Biokhimiya, 47: 1710-1715 (1982); 並びに、Aizenman等, Mikrobiol-Zh., 44: 69-72 (1982)を参照のこと。

微生物からポリペプチドを回収する第一段階は、多くの場合、細胞及び細胞片等の固体物質の除去に参与している。所望の産物を、それと特異的に相互作用する条件培地中の成分から分離する必要性を認識することが重要である。対象のタンパク質が正の電荷を有する場合、そこに存在する負の電荷を有するあらゆる分子に結合するので、従来の方法によりタンパク質の精製を行うことは非常に困難である。この段階で、未精製の微生物抽出物、例えば大腸菌ホモジネートからそれに混入している可溶性タンパク質を追加的に除去するには、単純にその後でクロマトグラフィーを行う。このような追加的除去は工業規模の生産に非常に有益であり、これによりクロマトグラフィーのカラムの大きさと生産時間を縮減できる。

【0013】

発明の概要

本発明は、請求の範囲に記載の精製法に関する。

特に、一態様において、本発明は、それが生成されて可溶化された微生物の発酵ブロス又はホモジネートから、所望の異種ポリペプチドを生成するための方法を提供し、本方法は、ポリペプチドの大部分が可溶性を維持する条件下においてブロス又はホモジネートに有効量の6, 9-ジアミノ-2-エトキシアクリジン乳酸塩(乳酸エタクリジン)溶液を添加することにより宿主細胞の不純物を沈降させること、及び所望のポリペプチドをブロス又はホモジネートから分離することを含む。

【0014】

別の態様では、本発明は、乳酸エタクリジン及び細胞と異種のポリペプチドを含む微生物細胞発酵ブロス又はホモジネートを提供する。

沈降剤として乳酸エタクリジンを添加することにより、思いがけず宿主タンパク質を含

10

20

30

40

50

む宿主片が劇的に除去された。この方法では、宿主タンパク質の大部分が細胞片と共に沈降物として回収され、ポリペプチドが精製された上清中に回収される。乳酸エタクリジンの使用によって精製された抽出物の純度が向上したことにより、カラムに必要な樹脂又はクロマトグラフィー培地の容積が小さくなり、よってその後必要とされる精製の規模を縮減することができる。また、クロマトグラフィーの工程の一部を省略することができるので、処理時間とコストが縮減できる。加えて、本明細書の方法により安定した供給原料が得られ、また本方法は中程度のpHで実施できる。

【0015】

発明の詳細な説明

定義

10

「微生物発酵ブロス又はホモジネート」という表現は、シェークフラスコや発酵槽といった使用する培養容器を問わず、培養され、栄養分を消費する、酵母、菌類、及び細菌等の原核生物を含む微生物由来のブロス、ペースト、又は抽出物を意味する。好ましくは、ブロス又はホモジネートは酵母又は原核生物に由来する。さらに好ましくは、ブロス又はホモジネートは細菌に由来する。本発明ではホモジネートを選択した。溶液の粘度が非常に高い場合、細胞を回収してそれらを再度懸濁することが好ましい場合があるが、そうでない場合は発酵槽から直接得られたホモジネートを使用することが好ましい。ブロス又はホモジネートの成分には、細胞片、宿主細胞タンパク質、DNA、RNA等が含まれる。よって、本発明で乳酸を添加することにより、宿主細胞タンパク質などを選択的に沈降させることができ、乳酸を使用しない場合と比較して精製が向上する。

20

「ポリペプチドの大部分が可溶性を維持する条件下」という表現は、標的のポリペプチドの大部分がブロス又はホモジネート中で沈降しないような量、温度及び伝導率でブロス又はホモジネートに乳酸エタクリジンを添加することをいう。好ましくは、そのような条件により約60%超、さらに好ましくは約70%超、さらに好ましくは約75%超、さらに好ましくは約80%超、さらに好ましくは約85%超、さらに好ましくは約85%超、さらに好ましくは約90%超、及び最も好ましくは約95%超のポリペプチドが沈降しない。この溶解度は、例えばRP-HPLC、アフィニティークロマトグラフィー(HPLC)、ELISA、RIA、及びSDS-PAGEと高性能のアフィニティークロマトグラフィー(HPLC)との組合せといった、適切なアッセイによって測定する。アッセイは、使用する宿主細胞の種類及び生産されるポリペプチドに応じて選択する。

30

【0016】

本発明の目的のための「細菌」には、真正細菌及び古細菌が含まれる。これらのうち好ましいのは真性細菌であり、グラム陽性及びグラム陰性細菌が含まれる。グラム陰性細菌の方が好ましい。好ましい種類の細菌は腸内細菌科である。腸内細菌科に属する細菌として、大腸菌、エンテロバクター、Erwinia、クエルブシラ属、プロテウス属、サルモネラ、セラチア属、及び赤痢菌族が挙げられる。その他の適切な細菌の種類には、アゾトバクタ、シュードモナス属、根粒菌、Vitreoscilla、及びParacoccusが含まれる。本発明では大腸菌を選択した。適切な大腸菌宿主は、大腸菌W3110(ATCC 27,325)、大腸菌294(ATCC 31,446)、大腸菌B、及び大腸菌X1776(ATCC 31,537)を含む。これらの例は、限定のためでなく説明を目的として挙げたのであり、W3110が好ましい。上述の細菌のいずれかの突然変異細胞も使用できる。当然ながら、細菌の細胞中のレプリコンの再製可能性を考慮して適切な細菌を選択しなければならない。例えば、pBR322、pBR325、pACYC177、又はpKN410等の周知の血漿を使用して複製を供給するとき、大腸菌、セラチア属、又はサルモネラ種を宿主として適切に使用することができる。適切な細菌宿主細胞の例に関しては、さらに後述を参照されたい。

40

本明細書で使用する「細胞」、「細胞系」、「菌株」及び「細胞培養」という表現は、互いに交換可能に使用され、そのような名称は全て子孫を含んでいる。従って、「形質転換体」及び「形質転換された細胞」は、形質移入回数には関係無く、それに由来する初代の対象細胞及び培養物を含んでいる。また、故意又は偶然の変異のために、全ての産物のDNA含量が正確に一致しないかもしれないことも理解される。最初に形質転換された細

50

胞においてスクリーニングされるのと同じ機能又は生物学的活性を有する突然変異子孫が含まれる。明確な規定が意図される場合には、それは文脈から明らかになるだろう。

【 0 0 1 7 】

本明細書で使用する「ポリペプチド」とは、約 10 より多いアミノ酸を有する任意の細胞源由来のペプチド及びタンパク質を指す。「異種の」ポリペプチドは、大腸菌によって産生されるヒトタンパク質のような、利用される宿主細胞にとって外来のポリペプチドである。異種ポリペプチドは原核生物のものでも真核生物のものでもよいが、好ましくは真核生物のものであり、より好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトのものである。好ましくは、組換え技術によって生成されたものであるか、組換えポリペプチドである。

ポリペプチドは発酵ブロス又はホモジネート中で生成及び可溶化される。つまり、ポリペプチドはそのようなブロス又はホモジネート中においてつくられ、生成の結果既に可溶性の分画であっても、還元剤（ジチオスレイトール又はメルカトルエタノール等）の存在化又は不在化で、カオトロープ（例えば尿素又はグアニジン）又は洗浄剤（例えばドデシル硫酸ナトリウム（SDS））等の可溶化剤で処理するか、そのような可溶化剤に接触させることにより可溶化される不溶性の分画であるか、不溶性の形態、又は相を有してもよい。本明細書で使用する場合、「可溶性」、「可溶化された」、「可溶化」、或いは「溶解」とは、遠心分離の後でポリペプチドが固体断片ではなく上清にあることを意味する。沈降又は可溶性の度合いは、上述のような適切なアッセイにより決定できる。

【 0 0 1 8 】

哺乳類ポリペプチドの例は、例えば、レニン、ヒト成長ホルモンを含む成長ホルモン；ウシ成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リボタンパク；1-アンチトリプシン；インスリンA-鎖；インスリンB-鎖；プロインスリン；トロンボポエチン；濾胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；因子VIIIC、因子IX、組織因子、及びフォン・ヴィレブランド因子等の凝固因子；プロテインC等の抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺界面活性剤；ウロキナーゼ又はヒト尿又は組織型プラスミノゲン活性化剤（t-PA）等のプラスミノゲン活性化因子及びそれらの変異体、例えばRETEVASE（登録商標）及びTNKASE（登録商標）；ボンベシン；トロンピン；造血性成長因子；腫瘍壊死因子-アルファ及びベータ；2C4等のErbb2ドメインに対する抗体（WO 01/00245；ハイブリドーマATCC HB-12697）であって、Erbb2の細胞外ドメイン内の領域に結合するもの（例えば、Erbb2の概ね残基22～残基584の領域内における1又は複数の残基）、エンケファリナーゼ；ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン；ミューラー阻害物質；リラキシンA-鎖；リラキシンB-鎖；プロリラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；ベータ-ラクタマーゼ等の微生物タンパク質；DNase；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子（VEGF）；ホルモン又は成長因子のレセプター；インテグリン；プロテインA又はD；リウマチ因子；脳由来神経栄養因子（BDNF）、ニューロトロフィン-3、-4、-5又は-6（NT-3、NT-4、NT-5、又はNT-6）などの栄養因子、又はNGF等の神経成長因子；カルジオトロフィン-1（CT-1）等のカルジオトロフィン（心臓肥大因子）；血小板誘導成長因子（PDGF）；aFGF及びbFGF等の線維芽細胞成長因子；上皮成長因子（EGF）；TGF-1、TGF-2、TGF-3、TGF-4、又はTGF-5を含むTGF-及びTGF-などのトランスフォーミング成長因子（TGF）；インスリン様成長因子-I及び-II（IGF-I及びIGF-II）；des(1-3)-IGF-I（脳IGF-I）、インスリン様成長因子結合タンパク質；CD-3、CD-4、CD-8、及びCD-19などのCDタンパク質；エリスロポエチン；骨誘導因子；免疫毒素；骨形成タンパク質（BMP）；インターフェロン-アルファ、-ベータ、及び-ガンマ等のインターフェロン；ヒト血清アルブミン（HSA）又はウシ血清アルブミン（BSA）などの血清アルブミン；コロニー刺激因子（CSF）、例えば、M-CSF、GM-CSF、及びG-CSF；インターロイキン（ILs）、例えば、IL-1からIL-10；抗-HER-2抗体；Apo2リガンド；スーパーオキシドジスムターゼ；T細胞レセプター；表面膜タンパク質；崩壊促進因子；ウイルス性

10

20

30

40

50

抗原、例えばAIDSエンベロープの一部等；輸送タンパク質；ホーミングレセプター；アドレシン；調節タンパク質；抗体；及び上に列挙した任意のポリペプチドの断片などの分子を含む。

【0019】

本発明に好ましいポリペプチドには、ヒト血清アルブミン(HSA)、2C4、組織因子、抗組織因子、抗CD20、抗HER-2、ヘレグリン、抗IgE、抗CD11a、抗CD18、VEGF及び、それらのレセプター及び抗体、例えばrhufab V2及びAVASTIN(登録商標)、成長ホルモンとその変異体、例えばhGH、成長ホルモンレセプター、成長ホルモン放出タンパク質(GHRP)、LIV-1(EP1,263,780)、TRAIL、腫瘍壊死因子(TNF)及びそれに対する抗体、TNFレセプター及びその抗体、TNFレセプター-IgG、TNFレセプター関連因子(TRAFs)及びそのインヒビター、因子VIL-1、因子VIL-1 Bドメイン、インターフェロン等のインターフェロン、TGF-等のトランスフォーミング成長因子(TGF)、抗TGF-等の抗TGF、アクチビン、インヒビン、抗アクチビン、抗インヒビン、組織プラスミノゲン活性化因子及びt-PA、RETENPLASE(登録商標)、及びTNKase等のそれらの変異体、抗Fas抗体、Apo-2リガンド；Apo-2リガンドインヒビター；Apo-2レセプター、Apo-3、アポトーシス因子、Ced-4、DcR3、細胞死受容体及びアゴニスト抗体(DR4、DR5)、リンホトキシン(LT)、プロラクチン、プロラクチンレセプター、SOBタンパク質、WISP(wnt誘発性分泌タンパク質)、神経毒-3(NT-3)、神経成長因子(NGF)及び抗NGF、DNase、肝炎抗原、単純疱疹抗原、レプチン、IGF-1及びIGF-2等のインスリン様成長因子(IGF)、及びそれらの結合タンパク質及びIGFBP-1-IGFBP-6等のレセプター、インスリン、FGF-17等の繊維芽細胞成長因子(FGF)、Tollタンパク質、TIEリガンド、CD40及び抗CD40、イムノアドヘシン、サブチリシン、肝細胞成長因子(HGF)、トロンプオエチン(TPO)、IL-2、IL-12、IL-17、IL-22、IL-8、IL-9等のインターロイキン、及びそれらに対する抗体、及び前立腺特異性癌抗原(PSCA)が含まれる。

【0020】

HER2に結合する抗体の例としては、4D5、7C2、7F3及び2C4、並びにそれらのヒト化変異体を挙げることができ、そのようなヒト化変異体は、米国特許第5,821,337号の表3に記載のhuMab4D5-1、huMAB4D5-2、huMAB4D5-3、huMAB4D5-4、huMAB4D5-5、huMAB4D5-6、huMAB4D5-7及びhuMAB4D5-8、並びにW001/00245に記載のヒト化2C4突然変異番号560、561、562、568、569、570、571、574又は56869を含む。7C2及び7F3、並びにそれらのヒト化変異体はW098/17797に開示されている。

CD20抗原に結合する抗体の例には、現在「リツキシマブ」(「RITUXAN(登録商標)」と呼ばれる「C2B8」(米国特許第5,736,137号)；「Y2B8」と命名されたイトリウム-[90]-標識2B8マウス抗体(米国特許第5,736,137号)；随意で¹³¹Iにより標識されて「¹³¹I-B1」抗体(BEXXAR(登録商標))を生成するマウスIgG2a「B1」(米国特許第5,595,721号)；マウスモノクローナル抗体「1F5」(Press等, Blood, 69(2): 584-591 (1987))；及び国際インターロイキン分類ワークショップ(International Leukocyte Typing Workshop)から入手可能なモノクローナル抗体L27、G28-2、93-1B3、B-C1又はNU-B2(Valentine等, In: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987))が含まれる。

【0021】

比較的好ましいポリペプチドは、2C4、抗組織因子、抗CD20、抗HER-2、ヘレグリン、抗IgE、抗CD11a、抗CD18、rhufab V2等の抗VEGF、hGH、GHRP、LIV-1、TRAIL、TNFに対する抗体及びTNFレセプター

及び関連抗体、T R A Fのインヒビター、T N FレセプターI g G、因子V I I I、因子V I I I Bドメイン、インターフェロン、T G F 及び抗T G F、アクチビン、インヒビン、抗アクチビン、抗インヒビン、t - P A、T N K a s e、抗F a s抗体、A p o - 2リガンド；A p o - 2リガンドインヒビター；A p o - 2レセプター、A p o - 3、D c R 3、細胞死受容体及びアゴニスト抗体（D R 4、D R 5）、リンホトキシン（L T）、プロラクチン、プロラクチンレセプター、W I S P、抗N G F、N G F、N T - 3、抗I L - 8、抗I L - 9、I L - 17、I L - 22、D N a s e、G H R P、肝炎抗原、単純ヘルペス抗原、レプチン、I G F - 1及びI G F B P 1 - 6、インスリン、F G F - 17、T o l lタンパク質、T I Eリガンド、C D 40、イムノアドヘシン、サブチリシン、H G F、並びにT P Oである。

10

その中でさらに好ましいポリペプチドは、2 C F、抗組織因子、抗C D 20、抗H E R - 2、抗I g E、抗C D 11a、抗C D 18、r h u F a b V 2等の抗V E G F、h G H、L I V - 1、T R A I L、T N Fに対する抗体及びT N Fレセプター及び関連抗体、T N FレセプターI g G、因子V I I I、因子V I I I Bドメイン、インターフェロン、T G F、アクチビン、インヒビン、抗アクチビン、抗インヒビン、t - P A、T N K a s e、A p o - 2リガンド；A p o - 2リガンドインヒビター；A p o - 2レセプター、A p o - 3、D c R 3、細胞死受容体及びアゴニスト抗体（D R 4、D R 5）、W I S P、T R A Fのインヒビター、抗N G F、N G F、N T - 3、抗I L - 8、抗I L - 9、I L - 17、I L - 22、抗T G F、D N a s e、G H R P、肝炎抗原、単純疱疹抗原、レプチン、I G F - 1及びI G F B P 1 - 6、インスリン、F G F - 17、T o l lタンパク質、T I Eリガンド、抗C D 40、H G F、並びにT P Oである。

20

【0022】

特に好ましいポリペプチドは組換えポリペプチドであり、さらに好ましくはモノクローナル抗体及びヒト化抗体を含む抗体である。そのような抗体は完全長抗体又は抗体断片でもよい。これらには、例えば、特に好ましいポリペプチドである2 C 4、抗組織因子F a b ' 2及び完全長、抗C D 20、抗H E R - 2、抗I g E、抗C D 11a、抗C D 18 F a b ' 2及び完全長、抗V E G F完全長及びr h u F a b V 2、L I V - 1、D R 4、D R 5、及びT R A I Lが含まれる。

さらに好ましくは、抗体は抗I g E、抗C D 18、抗V E G F、抗組織因子、2 C 4、抗H e r - 2、抗C D 20、抗C D 40、又は抗C D 11a抗体である。ポリペプチドの定義に含まれる抗体断片は軽鎖を有することが好ましく、さらに好ましくは軽鎖を有する。そのような好ましい断片には、例えば、F a b、F a b '、F (a b ')₂-ロイシンジッパー（L Z）融合物が含まれ、最も好ましくはF (a b ')₂である。最も好ましい抗体は抗C D 18 F (a b ')₂、抗組織因子F (a b ')₂、完全長抗組織因子抗体、及び抗V E G F抗体である。

30

【0023】

本明細書で「抗体」という用語は最も広い意味で用いられ、所望の生物学的活性を示す限り、特に完全な抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷抗体から形成される多重特異性（例えば）二重特異性的抗体、及び抗体断片を含む。

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、つまり、集団を含む個々の抗体（群）は、少量存在するであろう自然発生し得る突然変異を別にすれば同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位を志向する。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物に対し、各モノクローナル抗体は抗原の単一の決定基を認識する。それらの特性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体が混入せずに合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾語句は、実質的に均一な抗体集団から得られたという抗体の特徴を示し、何か特定の方法で生産されたと解釈されるものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、最初にKohler等、Nature, 256: 495 (1975)に記載されたハイブリドーマ法によって作ることができるか、あるいは組換えD N A法によって作ることができる（例えば米国特許第4,816,567号参

40

50

照)。「モノクローナル抗体」は、また、Clackson等, Nature, 352: 624-628(1991)及びMarks等, J. Mol. Biol., 222: 581-597(1991)等に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することができる。

【0024】

ここで、モノクローナル抗体は特に、所望の生物学的活性を示す限りにおいて、重鎖又は軽鎖の一部が特定の種から誘導されたか又は特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同であるが、鎖の残りの部分は他の種から誘導されたか又は他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同である「キメラ」抗体、並びにそれらの抗体の断片を含む(米国特許第4,816,567号; Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984))。本明細書で対象となるキメラ抗体には、ヒト定常領域配列及び非ヒト霊長類(例えば旧世界ザル)由来の可変ドメイン抗原結合配列を含む「霊長類化」抗体が含まれる。 10

「抗体断片」は、完全な抗体の一部、好ましくは完全な抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片; ダイアボディ; 直鎖状抗体; 単鎖抗体分子; 及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

【0025】

「完全な」抗体は、抗原-結合可変部位、並びに軽鎖定常ドメイン(C_L)及び重鎖定常ドメイン、C_H1、C_H2及びC_H3を含む。定常ドメインは天然配列定常ドメイン(例えばヒト天然配列定常ドメイン)でもそのアミノ酸配列変異体でもよい。好ましくは、完全な抗体は1又は複数のエフェクター機能を有する。 20

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域(天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体を持つFc領域)に帰因するこれらの生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例は、C1q結合; 補体依存性細胞障害活性; Fcレセプター結合; 抗体依存性細胞媒介細胞障害活性(ADCC); 食作用; 細胞表面レセプターのダウンレギュレーション(例えばB細胞レセプター; BCR)、等を含む。

【0026】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、完全な抗体は異なる「クラス」に分類できる。五つの免疫グロブリンのクラス: IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、それらはそれぞれ、及びμと命名された重鎖を有している。及びのクラスは更に、C_H配列中の比較的マイナーな差異及び機能に基づいて、サブクラスに分類される。例えば、ヒトは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2のサブクラスを発現する。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び3次元構造がよく知られている。 30

「抗体依存性細胞媒介細胞障害活性」及び「ADCC」は、Fcレセプター(FcR)(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、及びマクロファージ)を発現する非特異性細胞障害性細胞が標的細胞上の結合した抗体を認識し、続いて標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介反応に関する。ADCCを媒介する第1の細胞であるNK細胞はFcRIIのみを発現するのに対し、単球はFcI、FcII及びFcIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現はRavetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92(1991)の464ページの表3に要約されている。対象とする分子のADCC活性を評価するために、例えば米国特許第5,500,362号又は5,821,337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイが実施されうる。このアッセイで利用できるエフェクター細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞を含む。他に、又はさらに対象とする分子のADCC活性は、例えばClynes等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:652-656(1998)に記載されている様な哺乳動物のモデルでインビボの評価がされうる。 40

【0027】

「ヒトエフェクター細胞」は、一つ以上のFcRを発現する白血球であり、エフェクター機能を果たす。好ましくは、細胞は、少なくともFcRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を果たす。ADCCを媒介するヒト白血球の例は、末梢血単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞傷害性T細胞及び好中球を含む; PBMC 50

C 類及びNK細胞が好まれる。エフェクター細胞は、その天然ソースより単離されてもよい；例えばここにおいて記載の血液又はPBM C類である。

「天然抗体」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖からなる、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しており、ジスルフィド結合の数は、異なった免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の中で変化する。また各重鎖と軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド結合を有している。各重鎖は、多くの定常ドメインが続く可変ドメイン(V_H)を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V_L)を、他端に定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

10

【0028】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つの高頻度可変領域により連結されたシート配置を主にとる4つのFRをそれぞれ含んでいる。各鎖の高頻度可変領域は、FRによって近接して結合され、他の鎖の高頻度可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabatら, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害活性(ADCC)への抗体の関与を示す。

20

ここで使用される場合、「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合性を生じる抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメインの残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)及び重鎖可変ドメインの31-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3); Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))又は「高頻度可変ループ」からの残基(すなわち、軽鎖可変ドメインの残基26-32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)及び重鎖可変ドメインの残基26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3); Chothia及びLesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))を含んでなる。「フレームワーク」又は「FR」残基はここに定義した高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

30

【0029】

抗体のパバイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理は $F(ab')_2$ 断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

40

「Fv」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この配置において、各可変ドメインの3つの高頻度可変領域は相互に作用して $V_H - V_L$ 二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つの高頻度可変領域が抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つの高頻度可変領域のみを含むFvの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

またFab断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(CH1)を有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1領域のカル

50

ボキシ末端に数個の残基が付加している点で F a b 断片とは異なる。F a b'-S H は、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担持している F a b' に対するここでの命名である。F (a b')₂ 抗体断片は、間にヒンジシステインを有する F a b' 断片の対として生産された。抗体断片の他の化学結合も知られている。

【0030】

任意の脊椎動物種からの抗体の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ()及びラムダ()と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

「一本鎖 F v」又は「s c F v」抗体断片は、抗体の V_H 及び V_L ドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、F v ポリペプチドは V_H 及び V_L ドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それは s c F v が抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。s c F v の概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg 及び Moore 編, (Springer-Verlag, New York 1994), pp. 269-315 の Pluckthun を参照のこと。抗-E r b B 2 抗体 s c F v 断片は W093/16185; 米国特許第 5,571,894 号; 及び米国特許第 5,587,458 号に記載されている。

10

【0031】

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖(V_H - V_L)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)が結合してなる。非常に短いために同一鎖上で二つのドメインの対形成を可能にするリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディーは、例えば、EP404,097; W O 93/11161; 及び Hollinger ら, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90:6444-6448 (1993) に更に詳細に記載されている。

20

非ヒト(例えば齧歯動物)抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。大部分においてヒト化抗体はレシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンの F v フレームワーク領域残基(F R)は、対応する非ヒト残基によって置換される。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体に、又はドナー抗体に見出されない残基を含んでもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全ての高頻度可変領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全ての F R 領域がヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体はまた、場合によっては免疫グロブリン定常領域(F c)の少なくとも一部、典型的にはヒトの免疫グロブリンのものを含んでなる。さらなる詳細は、Jones ら, Nature 321, 522-525(1986); Reichman ら, Nature 332, 323-329(1988) 及び Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596(1992) を参照。

30

【0032】

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及びタンパク質様又は他の非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、(1)ローリー(Lowry)法によって決定した場合95重量%以上の、最も好ましくは99重量%の抗体まで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分な程度まで、あるいは(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件下での S D S - P A G E による均一性まで精製される。単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。

40

「ロイシンジッパー」とは、複数の反復アミノ酸を有するペプチド(多くの場合約20

50

～40のアミノ酸残基長を有する)であり、反復するアミノ酸の7個ごとにロイシン残基が現れる。このようなロイシンジッパー配列は、両親媒性のヘリックスを形成し、そのロイシン残基は疎水性の側に並んで二量体を形成している。本明細書におけるロイシンジッパーの例は、ヘテロ二量体(例えば二重特異性抗体)の形成に使用できるFos-Junロイシンジッパー(O'Shea等, Science, 245: 646 (1989))、ホモ二量体(例えば単一特異性抗体)の形成に使用できる酵母由来のGCN14ロイシンジッパー(Landschulz等, Science, 240: 1759-1764 (1988))、及びC/EBP及びc-myc等、他のDNA結合タンパク質に見られるロイシンジッパー、並びにそれらの変異体を含む。

【0033】

「制御配列」という表現は、特定の宿主生物において作用可能に結合されたコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。原核生物に好適な対照配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合され」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に寄与するプレタンパク質として発現されているならそのポリペプチドのDNAに作用可能に結合されている；プロモーターは、配列の転写に影響を及ぼすならばコード配列に作用可能に結合されている；又はリボソーム結合部位は、それが翻訳を容易にするような位置にあるならコード配列と作用可能に結合されている。一般的に、「作用可能に結合される」とは、結合されたDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにある。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、通常の手法にしたがって、合成されたオリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

【0034】

ポリペプチドの「回収」という用語は、通常、産生された細胞から遊離したポリペプチドを得ることを意味する。

「宿主細胞不純物」とは、発酵ブロス又はホモジネート中の、DNA及び細胞片等の混入物を含む宿主細胞及びその他の生体分子の不純物を意味する。

【0035】

発明の実行モード

本発明の一態様は、所望の異種ポリペプチドを、それを生成及び可溶化したブロス又はホモジネートから生成する方法を提供する。ポリペプチドは生成の結果既に可溶性の分画であってもよく、不溶性であり(例えば不溶性の分画、相又は形態で生成され)、よってポリペプチドを溶解させるための接触又は処理を要するものでもよい。ポリペプチドが不溶性に生成される場合、乳酸エタクリジンを追加する前に、(上述のような)可溶化剤に曝すか接触させる。例えばそのような作用剤を不溶性ポリペプチドを含む分画に添加する。好ましくは、ポリペプチドは既に可溶性の分画である。本発明の方法は、ブロス又はホモジネートに対し、有効量の乳酸エタクリジンを追加することによりブロス又はホモジネート中に含まれる宿主不純物を沈降させることを含む。そのような添加は、大部分のポリペプチドがその可溶性を維持するような条件下で行う。次の段階では、細胞片、宿主細胞タンパク質、DNA、RNA等を含め、所望のポリペプチドをブロス又はホモジネートから分離する。

乳酸エタクリジンにより沈殿する大部分の宿主タンパク質は負の電荷を有し、一方標的のポリペプチドは正の電荷を有するので、沈殿した宿主タンパク質の上清中に回収されるように、標的ポリペプチドのpIは宿主細胞不純物に含まれる宿主タンパク質の平均pIより高いことが好ましい。そのような平均pIは、宿主タンパク質の2-Dゲルにより決定することができ、その場合のpIの幅は例えば約7.5～5.0であり、平均は6.25である。別法では、等電点電気泳動と同様に、等電点分離法(2-Dゲルの1次元)のみを用いて、平均pIの決定、及びアミノ酸成分による計算を行うことができる。ポリペプチドのpIは、約7以上、好ましくは約7から10であることがさらに好ましい。

使用に好ましいポリペプチドは上記のように定められている。

10

20

30

40

50

【0036】

使用する乳酸エタクリジンの濃度は、例えば、溶液中に存在する宿主細胞不純物の大部分の表面上にある溶液中の負の電荷の量によって決定する。よって、乳酸エタクリジンの濃度は、少なくとも溶液中のDNA及び宿主タンパク質の濃度等の宿主細胞不純物の量に依存する。ホモジネート中の宿主タンパク質及びDNAの濃度が大きい程、大量の乳酸エタクリジンが必要となる。したがって、乳酸エタクリジンと複合し、よって沈殿する負の電荷成分が大きい程、沈殿を最大にするために大量の乳酸エタクリジンが必要となる。乳酸エタクリジンの好ましい濃度は、一般に約0.1重量%/容積より大きい。さらに好ましくは、乳酸エタクリジンの濃度は、約0.1~5、さらには約0.4~5、そして最も好ましくは約0.6~5重量%/容積である。

10

一般に、沈殿を起こす際に溶液の伝導率が小さい程、細胞片及びDNAのポリペプチドの生成は効率的に行われる。伝導率は、例えば、ホモジネート又はブロス中の塩の量、或いは、水又は他の適切な溶媒を用いてホモジネート又はブロスを希釈することにより制御することができる。好ましくは、乳酸エタクリジン添加後のブロス又はホモジネートの伝導率は約16ミリシーメンス(mS)未満、さらに好ましくは1~15mS、さらに好ましくは約1~10mS、最も好ましくは約1~5mSである。

【0037】

沈殿を行っている間の伝導率は、少なくとも部分的に存在する塩の種類に依存する。ハロゲン化物は(例えば塩化化合物又はプロミド)好ましい陰イオンではないが、それらが存在する場合は、乳酸エタクリジン添加前の溶液中に約100mM未満、乳酸エタクリジン添加後は約50mM未満の濃度で存在することが好ましい。本発明に使用する塩の例をいくつか挙げるとすると、緩衝塩、TRIS、MES、MOPS、酢酸塩、クエン酸塩が含まれる。存在する塩の濃度は乳酸エタクリジンを沈殿させる量より大きくてはいけない。正確な量は、主に塩の種類、及び塩と乳酸エタクリジンとの化学量論に依存し、化学量論の下限が限界である。つまり、下限は、乳酸エタクリジンより塩が多いことを意味する。

20

乳酸エタクリジン添加後のブロス又はホモジネートのpHは、例えば、ポリペプチドのpI、ポリペプチドの負の表面電荷の量、溶液中の宿主細胞不純物の量、及び乳酸エタクリジンの濃度に依存する。好ましくは、pHは、ポリペプチドのpI以下である。通常、pHは約4~10であるが、乳酸エタクリジンの電荷はこのpHより上で小さくなるので、宿主細胞の不純物を効率的に沈殿させるためには、乳酸エタクリジン添加後のブロス又はホモジネートのpHは約9以下であることが好ましく、好ましい範囲は約4~9である。さらに好ましくは、乳酸エタクリジン添加後のブロス又はホモジネートのpHは、約5~9、さらに好ましくは約6~9である。ポリペプチドの負の表面電荷が大きくなる程この範囲内のpHは低下し、そのようなポリペプチドに好ましい範囲はpH約6~7である。

30

【0038】

乳酸エタクリジン添加後、随意でブロス又はホモジネートを一定の時間に亘り高温でインキュベートする。温度を上げるかどうか、及びインキュベートを行う時間の長さは、対象ポリペプチドの修理、プロセス中そのような時間に亘り高温に曝した場合、起こるとすればどのような変化がポリペプチドに現れるか等、多くの要因によって決定する。例えば、抗組織因子F(ab')₂精製のためには高温が好ましいが、完全長抗体には熱を用いないか又は、温度を約25度以下に保つことが望ましい。これらの要因に留意すると、乳酸エタクリジン添加後のブロス又はホモジネートの温度は、室温~約70、さらに好ましくは室温~約65に約1~60分の間維持する。温度を上げる必要がある場合に好ましいのは、約50~65で約1~60分維持することである。

40

別の態様では、本発明は、乳酸エタクリジン及び異種ポリペプチドを含む微生物細胞由来の発酵ブロス又はホモジネートである物質からなる組成物を提供する。好ましくはポリペプチドはブロス又はホモジネートに溶解される。細胞、ポリペプチド、濃度、及びブロス又はホモジネートの条件は上述の通りである。ポリペプチドの溶解度は、上述のような

50

アッセイ等の適切なアッセイにより決定できる。培養パラメータを使用し、常套的な方法でポリペプチドの生産を行う。常套的な方法の例を後述する。

【0039】

A. 核酸の選択及びその修飾

本発明のポリペプチド、例えば抗体は、いずれの供給源（例えば完全な抗体の消化切断）からも生産できるが、好ましくは組換え技術により作成する。核酸が対象のポリペプチドをコードするならば、対象のポリペプチドをコードする核酸は、任意のソースに由来するRNA、cDNA、又はゲノムDNAが適当である。微生物宿主中で、異種性のポリペプチド（その変異体を含む）の発現に適切な核酸の選択方法は周知である。適切な核酸を選択し、微生物細胞培養物中に非抗体ポリペプチドを調製する方法が、当技術分野でよく知られている。

10

モノクローナル抗体を産生する場合、モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の方法を用いて（例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）容易に単離され、配列決定される。ハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましいソースとして役に立つ。一度単離されると、DNAは発現ベクター中に配置され、次いで、微生物宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を行うためにここで示す細菌宿主細胞へ形質転換させる。抗体をコードするDNAの細菌中での組換え発現に関する総説には、Skerraら, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256-262 (1993)及びPluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992)が含まれる。

【0040】

20

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。好ましくは、ヒト化抗体には非ヒト由来の1つ又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は、超可変領域配列をヒト化抗体の対応配列と置換することによりWinter及び共同研究者（Jonesら, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmannら, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoevenら, *Science*, 239:1534-1536 (1988)）の方法に従って実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体（米国特許第4,816,567号）である。実際には、ヒト化抗体は典型的には超可変領域残基及びおそらく幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

30

抗原性の軽減のためには、ヒト化抗体を作成するために使用するヒトの可変ドメイン、軽鎖及び重鎖両方の選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット法」に従うと、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。齧歯動物のものと最も近いヒトの配列を次にヒト化抗体のヒトフレームワーク領域（FR）として受け入れる（Sims等, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia等, *J. Mol. Biol.*, 196: 901(1987)）。他の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークを幾つかの異なるヒト化抗体に使用できる（Carter等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285(1992); Presta等, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)）。

40

【0041】

さらに、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、F

50

R 残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、超可変領域残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

ヒト化抗体又は親和性成熟抗体の種々の形態が考えられる。例えばヒト化抗体又は親和性成熟抗体は、免疫結合体を調製するために一又は複数の標的薬剤(類)と随意に結合している抗体断片、例えば Fab であってもよい。あるいは、ヒト化抗体又は親和性成熟抗体は無傷抗体、例えば無傷 IgG1 抗体であってもよい。

【 0 0 4 2 】

Fab'-SH断片は、大腸菌から直接回収され、F(ab')₂断片(Carter等, Bio/Technology, 10:163-167 (1992))を形成するために化学的にカップルされる。他のアプローチによると、F(ab')₂断片は組換え体宿主細胞培養から直接単離することができる。抗体断片の産生のための他の技術は、熟達した技術者にとっては明白である。他の実施態様において、選択された抗体は、単鎖Fv断片(scFv)(W093/16185; 米国特許第5,571,894号及び5,587,458号)である。また、抗体断片は、例えば、米国特許第5,641,870号中に記載されているような「直鎖抗体」であってもよい。このような直鎖抗体断片は単一特異的又は二重特異的であってもよい。

10

二重特異的抗体は少なくとも2つの異なるエピトープに対して特異的に結合する抗体である。例示的な二重特異的抗体は、Dkk-1タンパク質の2つの異なるエピトープに結合してもよい。二重特異的抗体は、全長抗体又は抗体断片(例えば、F(ab')₂二重特異的抗体)として調製することができる。

【 0 0 4 3 】

20

異なるアプローチによると、望ましい結合特異性を有する抗体の可変ドメインは(抗体-抗原結合部位)免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合される。融合は、好ましくは、少なくともヒンジの一部、CH2及びCH3領域を含む、免疫グロブリン重鎖定常ドメインと行われる。軽鎖との結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)を有し、少なくとも融合の片方に存在することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合、必要ならば免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクターに挿入し、安定細菌性宿主生物体に同時形質転換する。このことは、構築物中で用いられる3つのポリペプチド鎖の等しくない割合が至適な収量を提供する場合、実施態様中、3つのポリペプチド断片の相互の割合を調整する点に多大なる柔軟性を提供する。しかし、等しい割合の少なくとも2つのポリペプチドの発現により高い収量を生み出すか、その割合が特に有意でない場合、ある発現ベクターにおいて2又は全3つのポリペプチド鎖に対するコード配列を挿入する事は可能である。

30

このアプローチ法の好適な実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公開第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSureshら, Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。

40

【 0 0 4 4 】

米国特許第5,731,168号に記載された他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面は抗体定常領域のC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャピティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

50

二重特異性抗体は、架橋した又は「ヘテロコンジュゲート」抗体もまた含む。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体の一方はアビジンに結合され、他方はビオチンに結合され得る。そのような抗体は、例えば、不要の細胞に対する免疫系細胞をターゲティングするため(米国特許第4,676,980号)、及びHIV感染の治療のために提案された(国際公開第91/00360号、同92/200373号、及び欧州特許第03089号)。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋法を用いて作製することができる。好適な架橋剤は当該分野において良く知られており、幾つかの架橋技術と共に米国特許第4,676,980号等に関示されている。

【0045】

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら, Science, 229:81 (1985) は完全な抗体をタンパク分解性に切断してF(ab')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤、亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたF a b'断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。Fab'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりFab'-チオールに再転換し、他のFab'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作製された二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

さらに、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収され、二重特異的抗体を形成するために化学的にカップリングされ得る(Shalaby等, J. Exp. Med., 175:217-225 (1992))。

【0046】

組換え体の細胞培養物から直接二重特異的抗体断片を調製し、単離するための種々の方法も、記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して産生されている(Kostelny等, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992))。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のFab'部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの産生に対して使用することができる。Hollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)を結合してなる。従って、一つの断片のV_H及びV_Lドメインは他の断片の相補的V_L及びV_Hドメインと強制的に対形成させられ、これにより2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(s Fv)ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている(Gruberら, J. Immunol. 152:5368 (1994))。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる(Tuttら J. Immunol. 147:60(1991))。

【0047】

ポリペプチド変異体をコードする核酸分子は、この分野で知られた種々の方法によって調製される。これらの方法は、これらに限られないが、天然源からの単離(天然発生アミノ酸配列変異体の場合)又はオリゴヌクレオチド媒介(又は部位特異的)突然変異誘発、PCR突然変異誘発、又は該ポリペプチドの初期調製された変異体又は非変異体種のカセット突然変異誘発を含む。

エフェクター機能に関する本発明の抗体を修飾することは、例えばFcレセプター結合性を増強するために、望ましい。このことは、抗体のFc領域に一又は複数のアミノ酸置換を導入することで達成される。あるいは、又は付加的にシステイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させるようにしてもよい。

【0048】

抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第5,739,277号に記載されたようにして、抗体(特に抗体断片)にサルベージレセプター結合エピトープが導入される。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、IgG分子

10

20

30

40

50

のインヴィボ血清半減期を増加させる原因であるIgG分子(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄)のFc領域のエピトープを意味する。

ここでは、抗体の他の修飾が考慮される。例えば、抗体は種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、又はポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマーに結合してもよい。

【0049】

B. 複製可能なベクターへの核酸の挿入

異種の核酸(例えば、cDNA又はゲノムDNA)は、適切なプロモーターのコントロールの下、微生物中における発現のための複製可能なベクターへ適切に挿入される。多くのベクターは、かかる目的のために利用可能であり、適当なベクターの選択は、主として挿入されるべき核酸のサイズ、及びベクターにより形質転換される特定の宿主細胞に依存する。各ベクターは、それが適合する特定の宿主細胞に依存する種々の成分を含む。特定の宿主タイプに依存し、一般にベクター成分には、限定はしないが、以下の一又は複数が含まれる：シグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、プロモーター、及び転写終結配列。

一般には、宿主細胞と適合性のある種に由来するレプリコン及びコントロール配列を含んでいるプラスミドベクターが、微生物宿主との関連で用いられる。そのベクターは、通常、複製部位、並びに形質転換細胞において表現型の選択を提供可能なマーキング配列を保持する。例えば、大腸菌は、典型的には、E.coli種由来のプラスミドであるpBR322を使って形質転換される(例えば、Bolivar等、Gene, 2: 95 (1977)参照)。pBR322は、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性の遺伝子を含んでおり、よって形質転換細胞を同定するための簡単な手段を提供する。そのpBR322プラスミド、もしくは他の微生物プラスミド又はファージもまた、選択マーカー遺伝子の発現のために宿主によって使用され得るプロモーターを含むか、又は含むよう改変される。

【0050】

(i) シグナル配列成分

ここで対象となるポリペプチドをコードするDNAは、直接発現されるだけではなく、好ましくはシグナル配列あるいは成熟ポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合体としても産生される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、又はベクターに挿入されたポリペプチドDNAの一部であってもよい。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され加工される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものである。

天然又は真核生物のポリペプチドシグナル配列を認識しない原核生物宿主細胞に対しては、シグナル配列は、例えばlamB、ompF、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppあるいは熱安定なエンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列により置換できる。酵母分泌については、シグナル配列は、例えば、酵母インベルターゼリーダー、因子リーダー(酵母菌属及びkluyveromyce因子リーダーを含む。kluyveromyce因子リーダーについては米国特許第5,010,182号を参照のこと)、又は酸性ホスファターゼリーダー、白体グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日公開のEP362,179)、又は1990年11月15日公開のW090/13646に開示されているシグナルである。

【0051】

(ii) 複製開始点成分

発現ベクターは、一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は様々な微生物に対してよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製開始点は大腸菌などの大部分のグラム陰性細菌に好適である。

【0052】

(iii) 選択遺伝子成分

通常、発現ベクターは、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含む。この遺伝子は、選択培地中で増殖する形質転換された宿主細胞の生存又は増殖に必要なタンパク質を

10

20

30

40

50

コードする。選択遺伝子を含むベクターで形質転換されない宿主細胞は、培地中で生存できない。この選択可能マーカーは、この発明で利用され、定義されるような遺伝学的マーカーとは区別される。典型的な選択遺伝子は、(a)例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質又はその他の毒素に耐性を付与し、(b)遺伝学的マーカーの存在によって誘導される欠陥以外の栄養要求性欠陥を補い、又は(c)例えばパチラス菌に対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。

選択技術の一例においては、宿主細胞の増殖を抑止する薬物が用いられる。この場合、対象の核酸で首尾よく形質転換したこれらの細胞は、抗薬物性を付与し、選択療法を生存するポリペプチドを産生する。このような優性選択の例としては、薬物ネオマイシン (So 10 uthern等, J. Molec. Appl. Genet, 1:327 (1982))、ミコフェノール酸 (Mulligan等, Science, 209:1422 (1980)) 又はハイグロマイシン (Sugden等, Mol. Cell. Biol., 5:410-413 (1985)) が使用される。上述の3つの例は、各々、適当な薬剤であるG418又はネオマイシン (ジェネティシン)、xgpt (ミコフェノール酸)、又はハイグロマイシンに対する耐性を伝達するために、真核生物でのコントロールの下、細菌性遺伝子を利用する。

【0053】

(iv) プロモーター成分

対象のポリペプチドを産生するための発現ベクターは、宿主生物によって認識され、対象のポリペプチドをコードする核酸と作用可能に連結される適切なプロモーターを含む。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは、-ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 (Chang等, Nature, 275:615 (1978); Goeddel等, Nature, 281:544 (1979))、アラビノースプロモータシステム (Guzman等, J. Bacteriol., 174:7716-7728 (1992))、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系 (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776)、及びハイブリッドプロモーター、例えばtac 20 プロモーター (deBoer 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)) を含む。しかし、他の既知の細菌性プロモーターも適当である。それらのヌクレオチド配列は公表されており、それにより、任意の必要な制限酵素サイトを供給するためのリンカー又はアダプターを用いて、当業者は対象のポリペプチドをコードするDNAにそれらを作用可能に連結する (Siebenlist等, Cell, 20:269 (1980)) ことが可能となる。

また、細菌のシステムで使用されるプロモーターも、通常、対象のポリペプチドをコードするDNAと作用可能に結合したシャイン・ダルガルノ(S.D.)配列を有する。該プロモーターは、制限酵素による切断により細菌由来のDNAから取り外すことができ、所望のDNAを含むベクター中へ挿入することができる。

【0054】

酵母への使用に適切なプロモーターは当技術分野において周知である。酵母宿主での使用に好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ (Hitzeman 等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)) 又は他の糖分解酵素 (Hess等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900(1978))、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホ 40 グリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースを利用する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌による発現に使用するのに適したベクターとプロモータはEP 7 3,657に更に記載されている。

【0055】

(v) ベクターの構築及び解析

10

20

30

40

50

ー又は複数の上に列挙した成分を含む適切なベクターの作成には標準的なライゲーション技術を用いる。単離されたプラスミド又はDNA断片を切断させ、整え、そして必要とされるプラスミドの生成のために望ましい型に再ライゲーションする。

構築されたプラスミド中において正しい配列であることを確認する解析のために、ライゲーション混合物を用いて、大腸菌 K 1 2 菌株 2 9 4 (ATCC31446)又は他の株を形質転換し、適当な場合にはアンピシリン又はテトラサイクリン耐性によって、成功した形質転換細胞を選択する。形質転換細胞からプラスミドを調製し、制限エンドヌクレアーゼ消化により解析し、及び/又はSanger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467 (1977)又はMessing等, Nucleic Acids Res., 9:309 (1981)の方法により、又はMaxam等, Methods in Enzymology, 65:499 (1980)の方法により配列決定を行った。

10

【0056】

C. 宿主細胞の選択及び形質転換

本発明においてベクターにDNAをクローニング又は発現するのに適した宿主細胞は、原核生物及び真菌細胞を含むあらゆる微生物細胞であり、酵母を含む。本発明の目的に適した原核生物には、上述のようなバクテリア、好ましくは真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体が含まれる。例として、大腸菌などの腸内細菌科、例えば大腸菌 (*E. coli*)、エンテロバクター、*Erwinia*、クレブシエラ属、プロテウス属、サルモネラ、例えばネズミチフス菌、セラチア属、例えばセラチア *marcescans*、及び赤痢菌属、並びに枯草菌 (*B. subtilis*) や *B. licheniformis* 等の桿菌 (例えば、1989年4月12日公開のDD266, 710に開示された *B. licheniformis* 41P)、緑膿菌等のシュードモナス属、及びストレプトマイシンが挙げられる。一つの好ましい大腸菌クローニング宿主は大腸菌 294 (ATCC31,446)であるが、他の菌株、例えば大腸菌 B, 大腸菌 X1776 (ATCC31,537)及び大腸菌 W3110 (ATCC27,325)も適している。これらの例は制限ではなく説明を目的としている。上述の菌株のうちいずれかの突然変異細胞もまた、開始宿主として使用することができ、この開始宿主はその後変異して、本発明で必要とされる少なくとも最少の遺伝子型を含む。

20

大腸菌株 W3110は、組換えDNA産物の発酵に広く用いられる宿主株であるので、好ましい親大腸菌宿主である。親宿主として使用される開始大腸菌宿主の例を、その遺伝子型と共に、下記の表に示す。

【0057】

株	遺伝子型
W3110	K-12 F ⁺ lambda ⁻ IN(<i>rrnD-rrnE</i>)I
1A2	W3110 Δ <i>fhuA</i>
9E4	W3110 Δ <i>fhuA ptr3</i>
27A7	W3110 Δ <i>fhuA ptr3 phoAΔE15 Δ(<i>argF-lac</i>)169</i>
27C6	W3110 Δ <i>fhuA ptr3 phoAΔE15 Δ(<i>argF-lac</i>)169 Δ<i>ompT</i></i>
27C7	W3110 Δ <i>fhuA ptr3 phoAΔE15 Δ(<i>argF-lac</i>)169 Δ<i>ompT degP41::kan^R</i></i>
33D3	W3110 Δ <i>fhuA ptr3 lacIq lacL8 Δ<i>ompT degP41::kan^R</i></i>

30

40

36F8	W3110 $\Delta fhuA$ $phoA\Delta E15$ $\Delta(argF-lac)169$ $ptr3$ $degP41::kan^R$ $ilvG2096$
41H1	W3110 $\Delta fhuA$ $phoS^*$ (T104) $\Delta(argF-lac)169$ $degP41::kan^R$ $ptr3$ $ilvG2096(Val^I)$
43D3	W3110 $\Delta fhuA$ $ptr3$ $phoA\Delta E15$ $\Delta(argF-lac)169$ $\Delta ompT$ $degP41$ kan^R $ilvG2096$
43H1	W3110 $\Delta fhuA$ $phoA\Delta E15$ $\Delta(argF-lac)169$ $degP41$ $ilvG2096(Val^I)$ $ptr3$ $\Delta ompT$ $prc::kan^R$ $sprW148R$
43E7	W3110 $\Delta fhuA$ $\Delta(argF-lac)169$ $\Delta ompT$ $ptr3$ $phoA\Delta E15$ $degP41$ $ilvG2096$
44D6	W3110 $\Delta fhuA$ $ptr3$ $\Delta(argF-lac)169$ $degP41::kan^R$ $\Delta ompT$ $ilvG2096$
45F8	W3110 $\Delta fhuA$ $ptr3$ $\Delta(argF-lac)169$ $degP41$ $\Delta ompT$ $phoS^*$ (T10Y) $ilvG2096$
45F9	W3110 $\Delta fhuA$ $ptr3$ $\Delta(argF-lac)169$ $degP41$ $\Delta ompT$ $ilvG2096$ $phoS^*$ (T10Y) $\Delta cyo::kan^R$
49A5	W3110 $\Delta fhuA$ $phoA\Delta E15\Delta$ $(argF-lac)169$ $deoC2$ $degP41$ $ilvG2096$ (Val^I) $\Delta fucP$ $\Delta malE$
58B3	W3110 $\Delta fhuA$ $phoA\Delta E15$ $\Delta(argF-lac)169$ $deoC$ $degP41$ $ilvG2096(Val^I)$ Δprc
58H2	W3110 $\Delta fhuA$ $phoA\Delta E15$ $\Delta(argF-lac)169$ $degP41$ $ilvG2096(Val^I)$ $ptr3$ $\Delta ompT$ $sprW148R$
58H7	W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) $\Delta ptr3$ $\Delta ompT$ $\Delta degP$ lac Iq $\Delta lacY$
59A7	W3110 $\Delta fhuA$ $phoA\Delta E15$ $\Delta(argF-lac)169$ $deoC$ $degP41$ $ilvG2096(Val^I)$ Δprc $sprW148R$
60H4	W3110 $\Delta fhuA\Delta manA$ $phoA\Delta E15$ $\Delta(argF-lac)169$ $deoC2$ $degP41$ $ilvG2096(Val^I)$ Δprc prc -suppressor
61D6	W3110 $\Delta fhuA$ $ptr3$ lac Iq $lacL8$ $\Delta ompT\Delta(nmpc-fepE)$ $degP41$
62A7	W3110 $\Delta fhuA$ $ptr3$ lac Iq $lacL8$ $\Delta ompT\Delta(nmpc-fepE)$ $degP41$ $ilvG2096$

10

20

30

40

50

【 0 0 5 8 】

また、36F8を作製する際の中間体、即ち、27B4（米国特許第5,304,472号）及び35E7（27B4より増殖の優れた自発的溫度耐性単離コロニー）も適当である。さらに適当な株は、米国特許第4,946,783号、1990年8月7日発行中に開示されている変異体ペリプラスムプロ

テアーゼを有する大腸菌株である。

上記の株は、親株の染色体を組み込むこと、又は後述の実施例に記載する技術を含む他の技術により生成できる。

完全長抗体は、2002年8月8日公開のW002/061090に記載の技術に従って大腸菌内で作成できる。

【 0 0 5 9 】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、ポリペプチドコード化ベクターのための適切な発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシヤは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・プロンプ(Schizosaccharomyces pombe)（Beach及びNurse, Nature, 290:140（1981）；1985年5月2日発行のEP 139,383）；クルベロミセス宿主(Kluveromyces hosts)（米国特許第4,943,529号；Fleer等, Bio/Technology, 9:968-975（1991））、例えばクルベロミセスラクチス(K. lactis)（MW98-8C, CBS683, CBS4574；Louvencourt等, J. Bacteriol., 737（1983））、クルベロミセス・フラギリス(K. fragilis)（ATCC 12,424）、クルベロミセス・ブルガリクス(K. bulgaricus)（ATCC 16,045）、クルベロミセス・ウィケラミイ(K. wickerhamii)（ATCC 24,178）、クルベロミセスワルチイ(K. waltii)（ATCC 56,500）、クルベロミセス・ドロソフィラルム(K. drosophilum)（ATCC 36,906；Van den Berg等, Bio/Technology, 8:135（1990））、クルベロミセス・テモトレランス(K. thermotolerans)及びクルベロミセス・マルキシヤナス(K. marxianus)；ヤロウィア(yarrowia)（EP402,226）；ピチア・パストリス(Pichia pastoris)（E

P183,070; Sreekrishna等, J. Basic Microbiol, 28:265-278 (1988)); カンジダ; トリコデル・マレーシア (*Trichoderma reesia*) (EP244,234); アカパンカビ (Case等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 (1979)); シュワニオマイセス (*Schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス (*Schwanniomyces occidentalis*) (1990年10月31日発行のEP394,538); 及び糸状真菌、例えば、ニューロスボラ、ペニシリウム、トリボクラジウム (*Tolypocladium*) (1991年1月10日発行のW091/00357); 及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルス・ニダランス (Balance等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 (1983); Tilburn等, Gene, 26:205-221 (1983); Yelton等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 (1984))、及びアスペルギルス・ニガー (Kelly及びHynes, EMBO J., 4:475-479 (1985)) が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック (C 1 化合物資化性、Methylotropic) 酵母は、これらに限られないが、ハンセンウラ (*Hansenula*)、カンジダ、クロエケラ (*Kloeckera*)、ピチア (*Pichia*)、サッカロミセス、トルロプシス (*Torulopsis*)、及びロドトルラ (*Rhodotorula*) からなる属から選択されたメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982) に記載されている。

10

【0060】

ポリペプチドをコードする核酸を宿主細胞へ挿入する。好ましくは、宿主細胞を上述の発現ベクターで形質転換し、種々のプロモーターを誘導するのに適するように変更された通常の栄養培地中で培養することにより達成される。

使用する宿主細胞に応じて、形質転換はそれらの細胞に適する標準的な技術を用いて行われる。Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) のセクション1.82に記載されるように、塩化カルシウムを利用するカルシウム処理は、一般的に、原核細胞又は実質的に細胞壁障壁を含む他の細胞に用いられる。形質転換のための他の方法では、Chung及びMiller, Nucleic Acids Res., 16:3580 (1988) に記載されるように、ポリエチレングリコール / DMSO が用いられる。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingen等, J. Bact., 130:946 (1977) 及びHsiao等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979) の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチンを用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることができる。

20

30

【0061】

D. 宿主細胞の培養

本発明のポリペプチドを生産するのに使用される原核細胞は、当技術分野で既知の培地において成長させたもので、選択された宿主細胞の培養に適しており、一般的にSambrook等、上掲に記載の培地を含む。細菌に適した培地には、A P 5 培地、栄養ブロス、Luria-Bertani (LB) ブロス、Neidhardt's 最少培地、及びC. R. A. P. 最少又は完全培地に必要な栄養を補ったものが含まれるが、これらに限定されるものではない。好ましい実施形態では、培地は発現ベクターの構造に基づいて選択された選択剤も含み、よって発現ベクターを含む原核細胞を選択的に成長させることができる。例えば、アンピシリン抵抗性の遺伝子を発現する細胞を成長させるために、培地にアンピシリンを加える。炭素、窒素、及び無機リン酸塩の供給源に加え、必要な補充物は、単独で、或いは、別の補充物又は複合窒素源等の培地と組み合わせて導入され、適切な濃度で含有される。場合によっては、培養培地は、グルタチオン、システイン、システアミン、チオグリコール酸、ジチオエリスリトール、及びジチオスレイトールからなる群から選択された1又は複数の還元剤を含んでよい。

40

適切な培地の例は、米国特許第5,304,472号及び同第5,342,763号に見ることができる。C. R. A. P. リン酸塩制限培地は、3.57 g の $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$ 、0.71 g の $\text{Na Citrate} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1.07 g の KCl 、5.36 g の酵母菌抽出物 (認証済み)、5.36 g の Hycase SF (登録商標) - Sheffield からなり、 KOH により pH を 7.3 に、 $\text{SQ} \cdot \text{H}_2\text{O}$ により qs を 872 ml に調整したものをオートク

50

レーブしてから55℃に冷却し、110mlの1M MOPS (pH 7.3)、11mlの50%グルコース、7mlの1M MgSO₄を補ったものである。次いでカルベニシリンを50 µg/mlの濃度で導入培地に添加してもよい。

【0062】

原核宿主細胞を適切な温度で培養する。例えば、大腸菌の成長に好ましい温度は約20℃～約39℃、さらに好ましくは約25℃～約37℃、さらに好ましくは約30℃である。

アルカリホスフェートプロモーターが使用される場合、本発明の対象のポリペプチドの生産のために使用される大腸菌細胞は、Sambrook等、上掲中に一般的に記載されるようにアルカリホスフェートプロモーターが部分的に又は完全に誘導され得る適切な培地中で培養される。必要とされる培養は、無機リン酸塩の非存在下又はリン酸塩欠乏レベル下では、決して起こらない。第一に、培地は無機リン酸塩をタンパク質合成の誘導レベル以上であり、細菌の増殖に十分な量の無機リン酸塩を含む。細胞が増殖し、リン酸塩を利用する場合、培地中のリン酸塩レベルを低下させ、それによりポリペプチドの合成の誘導を引き起こす。

プロモーターが、起こるべき誘導に関し誘導可能なプロモーターである場合、典型的に細胞はある最適な濃度、例えば、高い細胞濃度過程を用い、点誘導が開始される（例えば、誘導因子の添加、培地成分の除去により）約200のA₅₅₀が達成されるまで培養され、対象のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を誘導する。

【0063】

必要ないかなる補充物も、単独で、或いは別の補充物又は複合窒素源等の培地と組み合わせて導入し、当業者に既知の適切な濃度で含めることができる。培地のpHは、主に宿主生物に応じて、約5～9とすることができる。大腸菌については、pHは約6.8～約7.4であることが好ましく、さらに好ましくは約7.0である。

酵母菌の培養に使用できる選択培地は、Kaiser等、Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor press, Cold Spring Harbor, NY, p. 208-210 (1994)に記載されているように調製したウラシルを欠く合成完全デキストロース寒天 (SCD-Ura) である。

【0064】

E. 発現検出

遺伝子の発現は、ここでポリペプチドの配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来のサザンブロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンブロット法 (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980))、ドットブロット法 (DNA分析)、又はインサイツハイブリッド形成法によって、直接的に試料中で測定することができる。種々の標識が使用され、最も一般的なものは、放射性同位体、特に³²Pである。しかしながら、ポリヌクレオチドへの導入のためにビオチン修飾ヌクレオチドを用いるなど、他の技術も使用してよい。次いで、ビオチンはアビジンまたは抗体と結合するための部位として機能し、広範な種々の標識、例えば放射性核種、蛍光、酵素などで標識されてよい。あるいは、タンパク質の検出のためにアッセイ又はゲルが用いられてもよい。

【0065】

F. ポリペプチドの精製

組換え技術を使用する場合、本発明のポリペプチドは、細胞内に、又は細胞膜周辺腔に生産することができる。ポリペプチドが細胞内生産されるときは、第一工程として、宿主細胞であれ溶解断片であれ、粒状細胞を（均質化の過程で生じたもの）、例えば遠心分離又は限外濾過によって除去し、細胞ブロス又はホモジネートを生成する。

次いで、本発明に従って、上述のような条件の下、乳酸エタクリジンを用いた沈降により、ホモジネート又はブロスから上述のような細胞不純物を取り除き、結果として得られる混合物を処理して不溶性の対象ポリペプチドを回収する。

ブロス又はホモジネートからの標的ポリペプチドの分離は、遠心分離や濾過等の当技術分野で周知の手段を含め、任意の適切な手段により行うことができる。好ましくは、分離は、遠心分離、又は例えば約300キログルトン～1ミクロンのフィルタを用いた接線流式濾過によって行う。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 6 】

ブロス又はホモジネートから分離したポリペプチドは、限外濾過 / ダイアフィルトレーション又は接線流式濾過等の濾過、又はクロマトグラフィーを含め、任意の既知の手段により精製できる。特に、単独で又は組合せて行われる以下の手順は、適切な精製の手順の例であり、ポリペプチドの種類に応じて特異的な方法を使用する。それらは、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C)、水性二相分離 (A T P S)、免疫親和性又はイオン交換カラムでの分画、エタノール沈降、逆相 H P L C、疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C)、シリカ上のクロマトグラフィー、イオン交換樹脂、例として S - S E P H A R O S E (登録商標) 及び D E A E 上のクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、S D S - P A G E、硫酸アンモニウム沈降、限外濾過 / ダイアフィルトレーション、接線流式濾過、及び例えば SEPHADEX (登録商標) G-75 を用いたゲル濾過である。

10

例えば、タンパク質の回収プロセスの一部として、ポリペプチドに結合するか、又はポリペプチドを変質させる固定した試薬にポリペプチドを曝す。これにより、ポリペプチドに対し、抗体等のポリペプチドに特異的に結合する固定化試薬により抗体が捕捉されるアフィニティークロマトグラフィーが行われ、不純物はアフィニティークロマトグラフィーのカラムを通過する。次いで、ポリペプチドと固定化試薬の結合を解くような条件に変更することにより、カラムからポリペプチドを溶出することができる。固定化試薬はポリペプチドを変質させるプロテアーゼ等の酵素でもよい (Sahni等, Anal. Biochem., 193: 178-185 (1991) 及び Voyksner等, Anal. Biochem., 188: 72-81 (1990))。

20

【 0 0 6 7 】

別の種類の精製方法は濾過である。流体からの細かい粒子の混入物の濾過は、様々な多孔性フィルタにより行われており、そのようなフィルタを混入組成物が通過すると、フィルタにより混入物が捕捉される。混入物の滞留は、機械的な濾過又は電気運動による粒子の捕捉及び吸収により起こる。機械的な濾過では、粒子がそれよりも小さな孔を通過しようとしたときに物理的に捕捉される。電気運動による捕捉のメカニズムでは、粒子が多孔性フィルタの表面に衝突し、短距離引力により表面上に保持される。電気運動による捕捉を行うには、フィルタの表面電荷の特性を変化させるのに電荷変更システムを用いることができる (例えば WO 90/11814 参照)。例えば、除去すべき混入物が陰イオン性の場合、陽イオン変化モディファイヤーを用いて、フィルタが混入物を保持するようにフィルタの電荷特性を変化させることができる。

30

従来の抗体精製手順、例えばゲル濾過又は電気泳動法、透析法、H I C、アフィニティークロマトグラフィー、例えばプロテイン A SEPHAROSE (登録商標)、プロテイン G、抗原親和性又は抗 I g G 親和性クロマトグラフィー、均質化、遠心分離濾過による清澄、沈降、例えば硫酸アンモニウム、ポリエチレングリコール又はカプリル酸による処理、イオン交換クロマトグラフィー、例えばヒドロキシアパタイト等の樹脂、セラミック - ヒドロキシアパタイト及び BIOGEL HT (登録商標) 等、リン酸カルシウムを含む樹脂、及びジエチルアミノエタン (D E A E)、ポリエチレンイミン (P E I) 及び四級アミノエタン (Q A E) 等、正の電荷を有する成分を有するものを含む陰イオン交換樹脂を用いるもの、例えば Q-SEPHAROSE FAST FLOW (登録商標) 樹脂 (Pharmacia)、DEAE-SEPHAROSE FAST FLOW (登録商標) 樹脂、DEAE-TOYOPEARL (登録商標) 樹脂、QAE-TOYOPEARL (登録商標) 樹脂、POROS-Q (登録商標) 樹脂、FRACTOGEL-DMAE (登録商標) 樹脂、FRACTOGEL EMD-TMAE (登録商標) 樹脂、MATREX CELLUFINE DEAE (登録商標) 樹脂等により、モノクローナル抗体を沈殿物から適切に分離することができる。抗体の単離及び精製法については、さらに、Antibodies: A Laboratory Manual"; Harlow 及び Lane, eds. (Cold Spring Harbor Laboratories, New York: 1988) を参照されたい。

40

【 0 0 6 8 】

特定の実施形態では、回収ステップは、ポリペプチドに結合するか、又はポリペプチドを変性する試薬が固定された固相に、可溶化したポリペプチドを曝すことを含む。一実施形態では、固相をカラムに充填し、固定化した試薬によりポリペプチドを捕捉する。別の

50

実施形態では、試薬はポリペプチドを化学的及び／又は物理的に変性するもので、固相に固定化される、つまりカラムに充填されるなどしており、その組成はカラムに通される。例えば、ポリペプチドは、回収プロセスの一部で固定化した試薬によって除去される前駆ドメインを含んでよく、例えば、回収プロセスにおいて固定化されたペプシンにより除去される前駆ポリペプチドはロイシンジッパー二量体化ドメインを有する抗体である。

この実施形態では、ポリペプチド及び浸出した試薬（及び随意で1以上の混入物）を含む組成物を、組成物のpHにおいて試薬と反対の電荷を有するフィルタに通し、よって浸出された試薬を組成物から除去する。フィルタは、組成物のpHにおいて負の電荷を有する混入物、例えば、酸性プロテアーゼ、プロテインA、プロテインG又はアフィニティークラムから浸出し得るその他試薬等を除去するために正の電荷を有することができる。或いは、塩基性プロテアーゼ等、組成物のpHにおいて正の電荷を有する混入物を除去するためにフィルタの電荷を負としてもよい。好ましくは、フィルタに通す組成物中の対象ポリペプチドは、ポリペプチドがフィルタにあまり保持されずに通過するような電荷特性を有する。フィルタは、前ステップにおいて処理した流出液と「連続して」配置する（つまり、流出液はフィルタを通して直接流出する）。これは、フィルタをカラム流出液口に直接接続した後、貯蔵タンクに溶出液を回収することによって達成される。使用するフィルタの種類に適した技術を使用してフィルタを再生してもよい。

【0069】

HICは抗体断片の精製にも使用されている。例えば、Inouye等, Protein Engineering, pp. 6, 8及び1018-1019 (1993); Inouye等, Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, 5: 609-616 (1993); Inouye等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 26: 27-39 (1993); Morimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24: 107-117 (1992); 及びRea等, Journal of Cell. Biochem., Suppl. 0, Abstract No. X1-206 (17 Part A), p. 50 (1993)を参照されたい。HICカラムは、通常、疎水性リガンド（例えばアルキル基又はアリール基）が結合する基礎となる基質（例えば架橋アガロース又は合成共重合体物質）を有する。多くのHICカラムが市販されている。例えば、置換度が高いか又は低いフェニルSEPHAROSE 6 FAST FLOW（登録商標）カラム（Pharmacia LKB Biotechnology, AB/スウェーデン）、フェニルSEPHAROSE（登録商標）高性能カラム（Pharmacia LKB Biotechnology, AB/スウェーデン）、オクチルSEPHAROSE（登録商標）高性能カラム（Pharmacia LKB Biotechnology, AB/スウェーデン）、FRACTOGEL（登録商標）EMDプロピル又はFRACTOGEL（登録商標）ENDフェニルカラム（E. Merck/ドイツ）、MACRO-PREP（登録商標）メチル又はMACRO-PREP（登録商標）t-ブチルサポート（BioRad/カリフォルニア）、WP HI-Propyl (C3)（登録商標）カラム（J. T. Baker/ニュージャージー）、及びTOYOPEARL（登録商標）エーテル、フェニル又はブチルカラム（TosoHaas/ペンシルベニア）であるが、これらに限定しない。

バッチ式疎水性クロマトグラフィー基質の例は当技術分野で周知であり、それには、SEPHAROSE（登録商標）、アガロース、又はシリカ等の支持基質にリンクするC₁₈。アルキル鎖、例えばブチル、フェニル、又はオクチルSEPHAROSE（登録商標）、又はセルロース又はポリスチレン等のポリマーが含まれる。米国特許第6,214,984号には、抗体及び抗体断片の精製のための低pH疎水性相互作用クロマトグラフィー（LPHIC）の使用が開示されている。この方法は、抗体断片、特に正確に折り畳まれ、ジスルフィド結合した抗体断片（例えばFab断片）を、正確に折り畳まれておらず、及び／又はジスルフィド結合した汚染抗体断片から精製するのに特に有用である。LPHICに先立ち、好ましくは細胞から調製された抗体組成物を、例えばヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動法、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製する。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは特定のヒト重鎖に基づく抗体を精製するために使用することができる（Lindmarkら, J. Immunol. Meth. 62:1-13[1983]）。プロテインGが全てのマウスのアイソタイプ及びヒト 3に対して推奨される（Gussら, EMBO J. 5:1567-1575[1986]）。アフィニティリガンドが結合するマトリッ

クスは最も頻繁にはアガロースであるが、他のマトリックスも利用することができる。調整穴あきガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼンのように機械的に安定なマトリックスを使用すれば、アガロースの場合よりも速い流速と短い処理時間が可能になる。抗体がC_H3ドメインを含む場合は、Bakerbond ABX(商品名)樹脂(J.T. Baker, ニュージャージー州フィリップスバーグ)が精製に有用である。イオン交換カラムによる分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカによるクロマトグラフィー、ヘパリンセファロース(SEPHAROSE(商品名))によるクロマトグラフィー、陰イオン又は陽イオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラムなど)によるクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE及び硫酸アンモニウム沈殿のような他のタンパク質精製技術も、回収しようとする抗体によっては利用できる。

10

【0070】

G. ポリペプチドの使用

このようにして回収されたポリペプチドは、製薬的に許容可能な担体に製剤化することができ、そのような分子に既知の様々な診断的用途、治療的用途、又はその他の用途に使用される。例えば、本明細書に開示するポリペプチドは、酵素イムノアッセイ等のイムノアッセイに使用できる。

本明細書に記載の方法を用いて精製されたポリペプチドの治療的な用途についても考慮する。例えば、成長因子又はホルモンを使用して思いのままに成長を促し、また、抗体をワクチンアジュバントとして細胞傷害性の再方向付け(例えば腫瘍細胞を死滅させるため)に使用することができ、よって血餅への血小板溶解薬の送達、腫瘍細胞への免疫毒素の送達、標的部位(例えば腫瘍)における酵素活性化プロドラッグの変換、感染症の治療、又は免疫複合体の細胞表面レセプターへの標的化を行うことができる。

20

【0071】

所望の純度を有するポリペプチドを、随意で生理学的に許容可能な担体、賦形剤、または安定剤と混合することにより、凍結乾燥させた固形物又は水溶液の形態で、保存用のポリペプチドの治療製剤が調製される(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版、Osol, A.編(1980))。

許容可能な担体、賦形剤、又は安定剤は、使用される投与量及び濃度においてレシピエントに対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及びその他有機塩などのバッファ; アスコルビン酸を含む抗酸化物; 低分子量(約10残基未満)のポリペプチド; タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン; 親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン; アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン; 単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、又はデキストリンを含むその他炭水化物; キレート剤、例えばEDTA; 糖アルコール、例えばマンニトール又はソルビトール; 塩類形成対イオン、例えばナトリウム; 及び/又は非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN(登録商標)、PLURONICS(登録商標)、又はポリエチレングリコール(PEG)を含む。

30

【0072】

ポリペプチドはまた、コロイド性薬物送達システム(例えばリポソーム、アルブミン微粒子、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)、又はマクロエマルジョンにおいて、例えばコアセルベーション技術又は界面重合(例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリル酸)マイクロカプセル)により、マイクロカプセルに調製できる。このような技術は、上掲のRemington's Pharmaceutical Sciencesに開示されている。

40

インビボ投与に使用されるポリペプチドは、無菌でなければならない。これは、無菌濾過膜による濾過の前又は後に、凍結乾燥及び再構成することで容易に達成できる。通常抗体は凍結乾燥させた状態、又は溶液の状態で作成される。

【0073】

治療用ポリペプチド組成物は通常、無菌入り口部を有する容器、例えば静脈内溶液用バッグ又は皮下注射針で穿孔可能なストッパーを有するバイアルに入れられる。

50

ポリペプチドの投与経路は、既知の方法、例えば静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内、又は病巣内を経路とする注射又は注入、又は後述するような持続放出システムにより行う。ポリペプチドは、輸液により連続的に注入されるか、又は大量瞬時投与される。

【0074】

持続放出製剤の好適な例は、本発明のポリペプチドを含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、当該マトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、Langer等、J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981)及びLanger, Chem. Tech., 12:98-105 (1982)に記載されたようなポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号、EP 58,481）、L-グルタミン酸及びガンマエチル-L-グルタメートのコポリマー（Sidman等、Biopolymers, 22: 547-556 (1983)）、非分解性エチレン-酢酸ビニル（Langer等、上掲）、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLupron Depot（登録商標）（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能な微小球）、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸（EP 133,988）を含む。

エチレン-酢酸ビニルや乳酸-グリコール酸等の重合体は100日以上分子を放出できるが、特定のヒドロゲルはより短い時間タンパク質を放出する。カプセル化抗体は、長時間体内に残存すると、37℃で水分に曝されることで、変性又は凝集し、生理活性が喪失したり、免疫原性が変化したりする。使用する機構によって抗体の安定性を得るための合理的な処置が考えられる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合であることが分かたら、スルフヒドリル残基を変更し、酸性溶液から凍結乾燥し、水分量を調整し、適当な添加物を使用し、特定の重合体マトリクス組成物を開発することで安定性を確立することができる。

【0075】

ポリペプチドの持続放出組成物は、リポソーム的に包括されたポリペプチドを含む。抗体を含有するリポソームは、それ自体周知である方法、例えば、DE 3,218,121、Epstein等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985)、Hwang等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4034 (1980)、EP 52,322、EP 36,676、EP 88,046、EP 143,949、EP 142,641、特願昭58-118008、米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号、及びEP 102,324等による方法によって調製する。通常、リポソームは、脂質含有量が約30モル%以上コレステロールであり、選択される割合がポリペプチドによる最適な治療法に対して調整された微小（約200-800オングストローム）な単ラメラ状のものである。

治療的に用いるのに効果的なポリペプチドの量は、例えば、治療目的、投与経路、及び患者の状態によって決まる。従って、治療専門家は、治療効果が最大となるように投与量を決定し、投与経路を修正しなければならない。典型的な毎日の投与量は、上記の要因に応じて、約1µg/kg~10mg/kg以上である。通常、臨床医は、所望の効果が得られる量に達するまでポリペプチドを投与する。この療法の進行状況は、従来のアッセイにより容易にモニターできる。

【実施例】

【0076】

以下の実施例を参照することにより、本発明に対する理解を深めることができる。しかしながら、以下の実施例は本発明の範囲を限定するものではない。本明細書に記載する特許文献及び非特許文献のすべては、参照により本明細書に包含される。

【0077】

実施例1

材料及び方法

A. プラスミド、形質転換、発酵

1. rhufab'2 (xCD18) の生産

a. プラスミドの構築

10

20

30

40

50

コントロールプラスミドの pS1130 は、抗 CD18F (a b')₂ のバイシストロン性の発現のために設計されたもので、Carter 等による Bio/Technology, 10:163-167 (1992) に記載のベクターに基づいている。この設計によって、単独の phoA プロモーターの制御下において C 末端ロイシンジッパーを有する軽鎖及び重鎖断片両方について遺伝子の転写が行われる。転写は、重鎖 - ロイシンジッパーのコード化配列の下流に位置する t₀。転写ターミネーターで終了する (Scholtissek 及び Grosse, Nucleic Acids Res., 15(7):3185 (1987))。熱安定性エンテロトキシン II のシグナル配列 (STII) は各鎖のコード化配列に先行し、周辺質へのポリペプチドの分泌を導く (Lee 等、Infect. Immun., 42:264-268 (1983; Picken 等、Infect. Immun., 42:269-275 (1983))。ロイシンジッパーを重鎖断片の C 末端端部に付着させ、2 つの Fab' アームの二量体化を促した。

10

2 つの分離した翻訳ユニットを包含するデュアルプロモータープラスミド pxC18-7T3 は、重鎖の転写から軽鎖の転写の一時的な分離を可能ならしめる。pS1130 の場合、軽鎖は phoA プロモーターのコントロール下にとどまる。しかし、pxCD18-7T3 中では、t₀ 転写終結因子が軽鎖コード化配列の後に配置される。この終結因子の下流に、tacII プロモーターが重鎖断片 / C 末端ロイシンジッパーの転写をコントロールするために付加された (DeBoer 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983))。第二の t₀ 転写終結因子はこのコード化配列の後に配置される。STII シグナル配列のサイレントコドン変異は、両鎖の分泌を導くために使用された (Simmons 及び Yansura, Nature Biotechnology, 14:629-634 (1996))。

単一のプロモーターコントロールプラスミドと二重プロモータープラスミドとの簡単な比較を図 1 に示す。p x C D 1 8 - 7 T 3 の発現カセット配列を図 2 (配列番号 1) に、2 つの翻訳単位のアミノ酸配列 (配列番号 2 及び 3) をそれぞれ図 3 A (軽鎖) 及び 3 B (重鎖) に示す。

20

【0078】

b. 発酵

発酵に用いた宿主系は、59A7 と命名された大腸菌 W3110 の派生体であった。59A7 の完全な表現型は、W3110 fhuA phoA E15 (argF-lac)169 deoC degP41 ilvG2096 (Val^r) prc sprW148R である。59A7 宿主細胞を pxC18-7T3 プラスミドを用いて形質転換し、培地から成功した形質転換体を選択して成長させた。追加のプラスミドである pMS421 を pxC18-7T3 と同時形質転換した。この追加プラスミド pMS421 は、lacIq を供給して tacII プロモーターの制御を向上させ、且つスペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を与える pSC101 に基づくプラスミドである。

30

10 リットルの発酵毎に、10 ~ 15 % の DMSO 中 1.5 ml の培地を含む単一のバイアルを、0.5 ml のテトラサイクリン溶液 (5 mg/ml) 及び 1 M のリン酸ナトリウム溶液 2.5 ml を補充した 500 ml の LB 培地を含む 1-L シェークフラスコ中に入れて溶かした。この種培養を 30 で約 16 時間成長させ、次いで 10 リットルの発酵槽に播種するのに使用した。

初めに、約 4.4 g のグルコース、1 M の硫酸マグネシウム 100 ml、微量元素溶液 10 ml (最終的容量 1 リットル中、塩酸 100 ml、塩化第二鉄六水化物 27 g、硫酸亜鉛七水化物 8 g、塩化コバルト六水化物 7 g、モリブデートナトリウム二水化物 7 g、硫酸銅ペンタ水和物 8 g、ホウ酸 2 g、硫酸マンガン二水化物 5 g)、テトラサイクリン溶液 20 ml (エタノール中 5 mg/ml)、FERMAX アジュバント 27 (登録商標) (又は何れかの同等な泡止め剤) 10 ml、HCD 塩 1 袋 (硫酸アンモニウム 37.5 g、二塩基性リン酸カリウム 19.5 g、一塩基性リン酸ナトリウム二水和物 9.75 g、クエン酸ナトリウム 7.5 g、一塩基性リン酸カリウム 11.3 g)、及び NZ アミン A (タンパク質加水分解産物) 200 g を含む培地約 6.5 リットルを発酵槽に入れた。30 度で気流 10 slpm で発酵させ、pH を 7.0 ± 0.2 に調節した (時折この範囲を超える変動があった)。発酵槽内の酸素の移動率を操作するために、発酵槽の後の圧力及び攪拌速度を変更し、それにより細胞呼吸数を調節した。

40

50

【 0 0 7 9 】

シェークフラスコの細胞含有培地を用いて発酵槽に播種した後、演算に基づくアルゴリズムを用いて濃縮グルコース溶液を発酵槽に供給し、発酵槽内で培養物を成長させて細胞密度を高めた。また、pHを調節するため、必要に応じて水酸化アンモニウム（58%溶液）及び硫酸（24%溶液）を発酵槽に加えた。さらに、場合によっては泡止め剤を加えて発泡を調節した。培養物の細胞密度が約40 OD550に達したとき、1Mの硫酸マグネシウム約100mlを発酵槽に加えた。これに加えて、培養物が約20 OD550に達したとき、発酵槽に対し、濃縮塩（水1リットル中硫酸アンモニウム約10g、二塩基性リン酸カリウム26g、一塩基性リン酸ナトリウム二水和物13g、クエン酸ナトリウム二水和物2g及び一塩基性リン酸カリウム15g）の供給を2.5ml/分の速度で開始し、供給量が1250mlに達するまで継続した。一般に発酵は72～80時間継続した。

発酵の間、発酵が溶解酸素の設定点に達したとき、溶解酸素プローブシグナルに基づいて濃縮グルコース溶液を供給することにより設定点における溶解酸素濃度を制御した。この結果、この対照スキームでは、攪拌速度や背圧といった発酵において酸素移動容量能力に影響する発酵槽操作パラメータの操作により、対応する細胞の酸素摂取率又は代謝率を操作した。

【 0 0 8 0 】

質量分析計を使用して、発酵からのオフガス消費をモニターすることにより、発酵中の酸素摂取量及び二酸化炭素放出率を計算することができた。

培養物の細胞密度が約220 OD550に達したら、約12時間をかけて攪拌速度を初期値の1000rpmから約725rpmに低下させた。約12時間、培養物の細胞密度が220 OD550に達した後に200mMのイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）50mlを加えて重鎖合成を誘導した。

【 0 0 8 1 】

2. 抗組織因子F(ab')₂の製造

a. プラスミドの構築

上記の二重プロモータープラスミドpXC'D18-7T3に類似の二重プロモータープラスミドpXTF7T3を作成し、抗組織因子軽鎖及び重鎖の発現の一時的分離を可能にするために使用した。また、プラスミドpMS421由来のlacI配列をpXTF7T3に組み入れて、新規二重プロモータープラスミドpJVG3ILを作成した。

b. 発酵

これら発酵に使用する宿主株は、大腸菌W3110の派生体であり、これを60H4と呼ぶ。60H4の完全遺伝子型は、W3110 fhuA manA phoA E15 (argF-lac)169 deoC2 degP41 ilvG2096 (Val^r) prc prc-抑制因子である。60H4宿主細胞をpJVG3ILを用いて形質転換し、形質転換が成功したものを選択して培養物中で成長させた。

発酵は、上記の抗CD18F(ab')₂に用いたものと同様な条件下で行い、但し実行時間を約72～114時間とし、培養物CD550が220に達した後、約4～12時間、IPTGを用いて重鎖を誘発した。

【 0 0 8 2 】

3. 完全長抗TF抗体の製造

a. プラスミドの構築

プラスミドpXTF-7T3FLの発現カセットは、5'～3'に、(1)phoAプロモーター（Kikuchi等、Nucleic Acids Res., 9(21):5671-5678 (1981)）、(2)trp Shine-Dalgarno（Yanofsky等、Nucleic Acids Res., 9:6647-6668 (1981)）、(3)STIIシグナル配列のサイレントコドン変異体（TIR相対強度約7）（Simmons及びYansura, Nature Biotechnology, 14: 629-634 (1996)）、(4)抗組織因子軽鎖コード化配列、(5)ターミネーター（Scholtissek及びGrosse, Nucleic Acids Res., 15: 3185 (1987)）、(6)tacIIプロモーター（DeBoer等、Proc. Natl

. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983))、(7)第二 *trp* *Shine-Dalgarno*、(8) *STII* シグナル配列の第二サイレントコドン変異体 (*TI R* 相対強度約 3)、(9) 抗組織因子完全長重鎖のコード化配列、及び (10) 第二 *t₀* ターミネーターを含む。この発現カセットを大腸菌プラスミド *pBR322* のフレームワークにクロニングした (Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43:77-90 (1978))。

よって、*p x T F - 7 T 3 F L* のベクター設計は、同一ではなく、異なる 2 つのプロモーターを使用するので、各鎖の一時的な分離発現が可能になる。このプラスミドにおいて、軽鎖は *pho A* プロモーターの制御下にある。しかし、重鎖の転写の制御には、*tac I I* プロモーターが使用される。当技術分野で既知であるように、*pho A* 及び *tac I I* プロモーターは実質的に異なる条件下で誘発される。単独プロモータープラスミド *p a T F 1 3 0* と *p x T F - 7 T 3 F L* の概略的な比較を図 4 に示す。*p x T F - 7 T 3 F L* (配列番号 4) の発現カセットの核酸配列を図 5 に、及びそれによってコードされるポリペプチド配列 (配列番号 5 及び 6) を図 6 A (軽鎖) 及び図 6 B (重鎖) に、それぞれ示す。以下の宿主細胞を、*p x T F - 7 T 3 F L* 及び *p J J 2 4 7* を用いて同時形質転換した。*p J J 2 4 7* は、*D s b A* 及び *D s b C* 両方の発現をまず *D s b A* から連続的に駆動する *tac I I* プロモーターをコードする。その作成方法は W002/061090 に開示されている。

10

【0083】

b. 発酵

20

遺伝子型 *W 3 1 1 0 f h u A (t o n A) p t r 3 l a c I q l a c L 8 o m p T (n m p c - f e p E) d e g P 4 1* を有する小規模発現大腸菌株 *6 1 D 6* を宿主細胞として使用した。形質転換の後、選択した形質転換体候補を、30 の培養ホイール上で一晚成長させたカルベニシリン (50 μ g / ml) 及びカナマイシン (50 μ g / ml) を補充した LB 培地 5 ml 中に播種した。W002/061090 に記載の培地を用いて 10 リットル発酵を行った。基本的な発酵条件も W002/061090 に従ったが、以下の点について発酵工程を変更した：300 ml の 1 M NaPO_4 、pH 7.0 を約 40 時間目に加え、濃度を約 30 mM にした。IPTG の 200 mM 溶液 100 ml を約 44 時間目に加え、濃度を約 2 mM にした。播種から 80 時間後に発酵物を回収した。

30

【0084】

B. タンパク質の同定

一次元 SDS - PAGE ゲル電気泳動法を、Novex の線形アクリルアミド勾配 4 ~ 12 % 中で実行した。具体的には、使用したシステムは、NUPAGE (登録商標) Bis - TRIS プレキャストゲル (低 ~ 中程度の分子量のタンパク質用) から構成される NOVE X (登録商標) NUPAGE (登録商標) システムであった。

【0085】

C. 化学薬品

沈降剤乳酸エタクリジンは、Sigma (米国ミズーリ州セントルイス) から購入した純度 98 % のものであった。乳酸エタクリジンの分子量は 361.4 Da である。その他全ての化学薬品については、分析用の等級を使用した。

40

【0086】

D. 沈降

Watts Fluidair Inc. (モデル B 12 - 04 DJC、米国ミネソタ州キタリー) のマイクロフルイダイザーを用いて抗体 - 及び $F(ab')_2$ 含有大腸菌材料をホモジナイズした。細胞は、4 バール圧でマイクロフルイダイザーに 3 回通過させた。タンパク質が熱変性するのを防ぐため、マイクロフルイダイザーに通過させる度毎に冷水槽に材料を通過させた。 $F(ab')_2$ ホモジネート中の総タンパク質濃度は 30 mg / ml であった。完全長抗 TF ホモジネートは、再懸濁ペーストから得られたもので、その総タンパク質濃度は 18 mg / ml であった。抗 TF ペーストを 25 mM の TRIS - HCl バッファー、pH 7.5 に再懸濁した。

50

乳酸エタクリジン沈降剤を所望の最終濃度 (w / v) になるまで水に溶かした。

1. pHの検討

沈降実験は、乳酸エタクリジンの濃度を 0.6 重量% / 容積に保って行われた。0.8 %の乳酸エタクリジン溶液を調製し、大腸菌ホモジネートと 3 : 1 の割合、例えば乳酸エタクリジン 3 ml に対して大腸菌ホモジネート 1 ml の割合で混合した。所望の pH に応じて、HCl 又は NaOH を用いて pH を調節した。

【0087】

2. 乳酸エタクリジン濃度の検討

乳酸エタクリジン保存液 (pH の検討と同様 1 : 3) を用いてホモジネートを 4 倍に希釈し、各標的タンパク質について pH を設定値に保った。抗 CD18 の pH は 8.5 であり、抗 TF の場合は pH 7.5 であった。沈降システムにおける乳酸エタクリジンの最終濃度は 0.15、0.30、0.45、0.60、0.75 及び 0.9 重量% / 容積であって。基準として、乳酸エタクリジン 0% で一連の実験を行った。

10

3. 伝導率 / 希釈度の検討

様々な濃度の NaCl を抗 CD18 ホモジネートに加え、タンパク質の沈降に対する伝導率の影響を評価した。検討した NaCl の濃度は、0、50、100、150、200、及び 400 mM であった。乳酸エタクリジンを含まない基準群についても評価を行い、いずれかのタンパク質が高い塩濃度により沈降するかを決定した。この塩スパイク試験における pH は 8.5 であり、抗 CD18 ホモジネートは 4 倍に希釈したものであった。試料中の乳酸エタクリジン濃度は、基準試験について 0.6% 及び 0% であった。

20

試料の伝導率を変えるため、ホモジネートを希釈する際の量を徐々に増加させ、pH を抗 CD18 については pH 8.5、及び抗 TF については 7.5 で、それぞれ一定に維持した。全ての実験において最終的な乳酸エタクリジン濃度は 0.6 重量% / 容積であった。ホモジネートは 2、3、4、5、6、及び 7 倍に希釈した。

4. 温度の検討

高温で複数の実験を行った。大腸菌ホモジネートを 4 倍に希釈し、乳酸エタクリジンの最終濃度を 0.6% とした。抗 CD18 と抗 TF の pH はそれぞれ 8.5 及び 7.5 であった。所望の温度、即ち 50、60、及び 70 の恒温水槽中で試料をインキュベートした。温度を上昇させて試料を 20 ~ 120 分インキュベートした。50 で、長時間、即ち 16 時間に亘るインキュベーションを 1 回行った。

30

沈降剤と大腸菌ホモジネートを混合し、pH を調節した後、攪拌しながら試料を 30 ~ 60 分間インキュベートした。沈降実験は 4 ml の大きさのガラス管の中で行った。全ての実験は複数回行い、平均値を取った。

【0088】

E. 大腸菌タンパク質アッセイ

乳酸エタクリジンは、最も多く使用されるタンパク質測定アッセイ、例えば Bradford 法、BCA 法及び 280 nm で測定する分光吸収度に反応する。よって、総タンパク質濃度は一般的な大腸菌タンパク質 ELISA を用いて測定した。試料をアイシンググラス含有バッファー (0.15 M の NaCl、0.1 M の NaPO₄、0.1% のアイシンググラス、0.05% の TWEEN 20 (登録商標)、0.05% の PROCLIN (登録商標) 300) で試料を希釈し、抗大腸菌タンパク質抗体に対する非特異的な結合を減らした。コーティングに使用した抗体はヤギ抗 Whole ECP であった。抱合抗体は、西洋わさびペルオキシダーゼに接着させた抗抗体 Whole ECP であった。Molecular Device モデル SPECTRA MAX PLUS (登録商標) (米国カリフォルニア州サニーベール) のプレートリーダーを用いて 405 nm における吸光度を測定した。

40

【0089】

F. タンパク質 G アッセイ

回収された F(ab')₂ 及び抗体濃度を測定するため、タンパク質 G 親和性クロマトグラフィーアッセイを使用した。IMMUNO DETECTION (登録商標) タンパ

50

ク質GカラムをPerSeptive Biosystems（米国マサチューセッツ州
フレイミングム）から購入した。リン酸緩衝食塩水（PBS）を用いてカラムを均衡化し
、HClを用いてpHを2.2に調節したPBSにより溶出した。乳酸エタクリジンによ
る干渉を最小化するため、アッセイに先立って試料を排除スピンカラム（BIO-SPIN
（登録商標）6Trisカラム（Bio-Rad Laboratories / 米国カリ
フォルニア州ハーキュリーズ）で処理した。スピンカラムは製造供給元の推奨に従って
使用した。クロマトグラフィー法に塩化テトラメチルアンモニウム（TMAX）洗浄工程
を導入し（Fahrner等、Biotechnology及びGenetic Engineering Reviews, 18: 302-327（
2001））、試料中の残留乳酸エタクリジンの干渉を最小化した。アッセイにはヒューレッ
トパッカー（米国カリフォルニア州マウンテンビュー）のHPLC（HP 1090（
登録商標）液体クロマトグラフ）を用いた。試料はPBSを用いて希釈した。精製したタン
パク質（Genentech, Inc.）を用いることにより、タンパク質の各々につ
いて検量線を作成した。

10

20

30

40

50

【0090】

G. DNAアッセイ

Molecular Probes（米国オレゴン州ユージーン）のPico Green
キットを用いて沈降後の上清のDNA濃度を測定した。これは蛍光試薬（Pico
green）が二本鎖DNAに結合する蛍光アッセイである。Pico green試薬
は502nmで励起され、523nmにおける発光が報告されている。アッセイは、蛍光
プレートリーダー、Molecular Devices（米国カリフォルニア州サニー
ベール）のSPECTRA MAX GENINI XS（登録商標）を使用して行われ
た。乳酸エタクリジンはPico greenアッセイに反応するので、分析に先立って
溶液中の沈降剤を取り除いた。乳酸エタクリジンは、プロテインG親和性クロマトグラ
フィーアッセイの部分に記載されている、BIO-SPIN（登録商標）6TRISカラム
を用いて試料から除去した。

【0091】

H. SDS-PAGE

乳酸エタクリジン沈降後に得られる上清を、SDS-PAGEにより分析した。Nov
ex（米国カリフォルニア州サンディエゴ）の4~12%の非還元NUPAGE（登録商
標）ゲルを用いて、抗CD18及び抗TFの精製と回収を可視化した。プレキャストゲル
が用いられ、使用した緩衝液はMOPS（Novexから購入した予め作成された濃度）
であった。クーマシーブリアントブルーR250（登録商標）の濾過溶液を用いてゲル
を染色した。各浄化大腸菌抽出物に関して上清の容積を補充した。このようにして、乳
酸エタクリジンによる沈降後に上清に100%の収率が得られた場合、大腸菌抽出物及び試
料中のタンパク質バンドの強度を同定した。よって、ゲルを使用することにより、沈降に
より得られる精製の範囲を正確に示すことができた。

【0092】

I. 乳酸エタクリジンの溶解度

2つの乳酸エタクリジン溶液、即ち0.6%及び1.2%の溶液を試験した。各溶液を
、pH6.0とpH9.0の2つに分割した。システムに若干の緩衝能を持たせるため、
乳酸エタクリジンを10mMのTris-HCl緩衝液に溶解した。各乳酸エタクリジン
溶液に徐々に容量を大きくしたNaCl、即ち0、50、100、150、200、30
0及び600mMのNaClに曝した。試料を3時間インキュベートした後、微量遠心管
（SORVALL MC12V（登録商標）、DuPont / 米国デラウェア州ウィルミ
ントン）中において12000gで20分間遠心分離した。270nmにおける吸光度を
測定することにより、乳酸エタクリジンの上清をアッセイした。使用した分光高度計は、
AGILENT 8453 UV-VIS（登録商標）分光光度計として知られる、ヒュ
ーレットパッカー（デラウェア州ウィルミントン）、現在はAligent Tech
nologies（カリフォルニア州パロアルト）のHP8453 UV-VIS（登録
商標）であった。既知の乳酸エタクリジン濃度を有する溶液から検量線を得た。

【 0 0 9 3 】

J. 濁度

時間及び温度の変化に伴う上清の安定性を測定するため、濁度をモニターした。使用した濁度検量器はHACH製であった(モデル2011N/米国アイオワ州アメス)。室温で試料を希釈することなく試料の測定を行った。

抗CD18ホモジネートを、0.6%の乳酸エタクリジン、0.2%PEI、又は水だけで処理した。3つの試料全てにおいて、抗CD18ホモジネートは4倍に希釈されており、且つpHは 7.2 ± 0.2 であった。4000gで1時間遠心分離した後、上清を回収し、2つの分量に分けた。各試料の一部を室温(21)で、他方の部分を4でインキュベートした。

10

【 0 0 9 4 】

結果と考察

pHの影響

殆どのpH間隔で、乳酸エタクリジン分子は正の電荷を有している(Miller, 上掲; Neurath and Brunner, 上掲; Franek, Methods in Enzymology編、Langone, J.J., Van Vunakis, H., 121: 631-638 (1986))。しかしながら、乳酸エタクリジンとの接触時に、pHの変化がポリペプチドの電荷に影響を与え、またポリペプチドのpIと沈降を起こすpHは相関している(Neurath及びBrunner, 上掲)ので、本発明の方法の精度の度合いに対するpHの影響を試験した。

抗CD18F(ab')₂、抗TF F(ab')₂、及び完全長抗TFをそれぞれ含むホモジネートを、pH範囲4~10をカバーするように調節した0.6%の乳酸エタクリジン溶液に接触させた。これらタンパク質のそれぞれを乳酸エタクリジン処理及び遠心分離した後の浄化相を図8A~8Cに示す。

20

表1では、完全長抗体、及びF(ab')₂として抗TFを試験した。大腸菌ホモジネートを1:3の割合で0.8重量%/容積の乳酸エタクリジン溶液(すなわち試料中の乳酸エタクリジンの最終濃度0.6%)で処理した。所望のpHを得るために、それぞれHClとNaOHを用いてpHを調節した。浄化細胞ホモジネートの各々に対して収率及び精製度を計算した。回収した上清のDNA濃度も表に示す。

【 0 0 9 5 】

表1

乳酸エタクリジンで処理したときのCD18及びTFの精製度及び収率に対するpHの影響

30

	抗 CD18 F(ab') ₂		抗 TF F(ab') ₂		抗 TF 完全長 Ab		
pH	精製度*	収率 (%)	精製度*	収率 (%)	精製度*	収率 (%)	DNA 濃度 (μg/ml)
4	3.2	100	1.8	93	2.4	100	0.2
5	5.3	100	5.1	93	4.4	100	0.1
6	5.6	100	5.1	67	6.7	100	≤0.001
7	5.6	100	5.4	70	7.1	86	≤0.001
8	5.6	87	5.0	42	6.2	65	≤0.001
9	5.4	84	4.7	22	5.3	24	≤0.001
10	4.2	85	4.7	18	0.9	7	0.3

10

20

* 値 1 は、乳酸エタクリジンで処理しない系に得られる精製度と同じであることを示す。

【0096】

3つのタンパク質全てについて、pH 範囲 4 ~ 10 の DNA 濃度及び精製の範囲に対して逆 U 字型曲線が得られたことが分かる。中程度の pH 値、つまり pH 5 ~ 9 では、約 5 倍の精製が得られた。抗 CD18 F(ab')₂ 及び抗 TF 抗体完全長及び F(ab')₂ の収率は pH が高まると減少し、抗 TF 抗体完全長及び F(ab')₂ の pH 依存性は抗 CD18 F(ab')₂ の同依存性よりも大きかった。pH 範囲 4 ~ 10 において、抗 CD18 F(ab')₂ の収率は 100 から 85 % へ、抗 TF F(ab')₂ の場合は 93 から 18 % へ低下した。1つの理論に限定されることなく、これは部分的には抗 CD 30
18 と比較して抗 TF の pI が低いこと、例えばそれぞれ pI が 8.9 及び 7.5 であることによるものであるが、これらは理論的に計算された pI 値である。

完全長抗 TF タンパク質の pH 依存性はタンパク質の F(ab')₂ バージョンよりもさらに大きい。完全長抗 TF の純度は pH 7.0 で最も高い。8 より大きい pH では収率の減少が見られる (図 8C)。完全長抗 TF については、約 7.0 の pH、つまり、7.1 倍の精製、及び 86 % の収率が好ましい。抗 CD18 と比較した場合に抗 TF の減少が大きいことの原因として、その pI より大きな pI でインキュベートされると、抗 TF は抗 CD18 よりも大きな負の表面電荷を有することが挙げられるが、1つの理論に限定するものではない。これと同様に 1つの理論に限定するものではないが、さらに大きな完全長抗 TF は、その pI より大きな pI でインキュベートされると、対応する F(ab')₂ よりもさらに大きな負の表面電荷を有する場合があります、よって pH を増大させると有意に大きな収率現象が観察される。 40

【0097】

しかしながら、細胞片及び宿主タンパク質以外の成分を標的ポリペプチドから除去しなければならない。そのような要素の 1つは DNA である。標的ポリペプチドに高い DNA 濃度を持つことの欠点は、溶液の粘度が上昇することである。これは、その後の処理に悪影響を及ぼす。加えて、陰イオン交換カラムを第一捕捉カラムとして使用した場合、負の電荷を持つ DNA が樹脂に結合し、よってカラムのタンパク質能が低下する。

よって、乳酸エタクリジンによる沈降後の上清における DNA 濃度を測定した。その結果、大腸菌ホモジネートに得られた初期 DNA 濃度と比較して乳酸エタクリジン沈降後の 50

上清中のDNA濃度が有意に減少することが示された。しかしながら、そのpHを低下させると上清中のDNA濃度は上昇し、pH 5.0及び4.0においてそれぞれ0.1及び0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。1つの理論に限定するものではないが、これは、DNAのリン酸の負の電荷が、低いpHで減少することに起因している場合がある。pHが非常に高い場合、例えばpH 10.0では、DNA濃度が有意に増大し(0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、タンパク質の純度も低下した。1つの理論に限定するものではないが、これは、部分的には、pHが抗体及び $\text{F}(\text{ab}')_2$ のpIよりも高いことに起因する。しかしながら、部分的には乳酸エタクリジンの電荷がこのpHで小さいことに部分的に起因している可能性もある。

【0098】

10

乳酸エタクリジン濃度の影響

大腸菌ホモジネートを乳酸エタクリジン溶液と1:3の割合で混合した。試料中の乳酸エタクリジンの濃度は、0~0.9重量%/容積まで0.15%ずつ増大させた。本試験は、抗CD18、抗TF $\text{F}(\text{ab}')_2$ 、及び完全長抗体それぞれについて、pH 8.5、7.5、及び6.0で実施した。

表2は、精製及び収率に対する乳酸エタクリジン濃度の影響を示す。表2では、完全長抗体、及び $\text{F}(\text{ab}')_2$ として抗TFを試験した。大腸菌ホモジネートを異なる濃度の乳酸エタクリジン溶液と1:3の割合で処理した。試料中の乳酸エタクリジンの最終濃度が報告されている。抗CD18、抗TF ($\text{F}(\text{ab}')_2$)、及び完全長抗TFのpHはそれぞれ8.5、7.5及び6.0であった。回収した上清のDNA濃度も表に示す。

20

【0099】

表2

乳酸エタクリジンの濃度を上げながら処理したときの抗CD18及び抗TFの純度及び収率に対する影響

	抗 CD18 F(ab') ₂		抗 TF F(ab') ₂		抗 TF 完全長 Ab		
乳酸エタ クリジン (% w/v)	精製度*	収率 (%)	精製度*	収率 (%)	精製度*	収率 (%)	DNA 濃度 (μg/ml)
0	1.0	100	1.0	100	1.0	100	77.9
0.15	1.1	100	1.3	97	3.4	100	3.9
0.30	1.7	100	2.2	93	6.7	100	0.4
0.45	4.0	100	5.2	96	6.5	100	0.2
0.60	5.8	100	5.6	98	6.5	100	≤0.001
0.75	5.9	100	5.6	78	6.3	100	≤0.001
0.90	5.9	100	5.4	70	6.3	100	≤0.001

10

20

* 値 1 は、乳酸エタクリジンで処理しない系に得られる精製度と同じであることを示す。

【 0 1 0 0 】

抗体の純度が乳酸エタクリジンの濃度と強い相関関係を有することが示された（図 9 A ~ 9 C 及び表 2）。乳酸エタクリジンの濃度が約 0.6% を超えると、乳酸エタクリジン濃度が純度の上昇に与える影響は小さい。しかしながら、乳酸エタクリジンの濃度が低いとき、つまり乳酸エタクリジンが不十分であるとき、わずかな沈降剤の添加によって必ず F (a b ')₂ の純度が増大した。

抗 C D 1 8 F (a b ')₂ の収率は、様々な濃度の乳酸エタクリジンを添加しても影響されなかった。両方の F (a b ')₂ のステップ回収は、全ての実験について約 90% であった。しかしながら、抗 T F F (a b ')₂ よりも F (a b ')₂ 抗 C D 1 8 の定量的回収を得るほうが容易であるように思われた。1つの理論に限定するものではないが、これは、試験した pH において、抗 C D 1 8 F (a b ')₂ よりも抗 T F F (a b ')₂ に負の表面電荷が多いことによるものであろう。完全長抗 T F の最大純度は、乳酸エタクリジン濃度が対応する F (a b ')₂ タンパク質よりも低いときに、即ちそれぞれ 0.3% と 0.6% で得られた。1つの理論に限定するものではないが、これはおそらく、抗 T F 完全長ホモジネート中の全体のタンパク質濃度が低い、即ち完全長及び F (a b ')₂ 抗 T F についてそれぞれ 18 及び 80 mg / ml であることによるものであろう。完全長及び抗 T F も再懸濁ペーストから得たものであり、F (a b ')₂ はブロスとして発酵槽から直接採取した。従って、大腸菌ブロス中に存在する可溶性の培養培地要素は、再懸濁した完全長抗 T F 物質中には存在せず、これが唯一の理論というわけではないが、観察された差異を部分的に説明すると思われた。

上清中の DNA 濃度はタンパク質精製について得られたデータと強い相関関係を有していた。0.6% 以上の乳酸エタクリジンを添加したとき、上清から DNA はまったく検出

30

40

50

されなかった。また、DNA濃度が減少する明らかな傾向があり、乳酸エタクリジン濃度を0から0.6%に増大すると、上清中のDNA濃度は78から0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に低下した。

【0101】

伝導率の影響

乳酸エタクリジンは、一つには分子の電荷特性によりタンパク質を沈降させる（Neurath及びBrunner、上掲）ので、試料の伝導率が、沈降後の抗体及び $\text{F}(\text{ab}')_2$ の純度に影響する場合がある。従って、試料の塩濃度が高い場合、つまり伝導率が高い場合、塩が乳酸エタクリジンからタンパク質を遮蔽することにより、精製効果を低減させる場合がある。

10

試料中のタンパク質濃度から伝導率の影響を分離するため、抗CD18ホモジネートに2組の実験を行った。2組の実験両方にNaClを加えた（0～400mM）。一方の組の実験は0.6%の乳酸エタクリジンを含み、他方の組には水を使用した。NaClによって沈降が生じる場合、それを乳酸エタクリジンによって得られる沈降と区別するために、水を含む系を対照群として使用した。乳酸エタクリジンを含まない系、つまり水を含む系では、NaCl濃度0～400mMにおいてタンパク質の沈降が観察されなかった（図10A）。乳酸エタクリジンを含む実験では、伝導率が低下すると抗CD18の精製が大きく増大することが示された（図10B）。

1つの理論に限定するわけではないが、低い伝導率で抗CD18の精製が改善された1つの理由は、低い塩濃度では帯電した乳酸エタクリジンの遮蔽能が小さいことであると思われる。同様の遮蔽効果が、塩濃度を高めてタンパク質精製にPEIを使用したときに見られた（Jendrisak、上掲）。しかしながら、さらに重要な因子は、塩濃度が高い程乳酸エタクリジンの可溶性が低下することである（Miller、上掲；Neurath及びBrunner、上掲；Franek、上掲）。100mMのNaClにより、抽出系に乳酸エタクリジンの沈降が観察され、塩濃度を上昇させると、乳酸エタクリジンの沈降が増大した。これは、系中に可溶であり、且つタンパク質及びその他生体分子を沈降させるのに利用可能な乳酸エタクリジンが少なくなったことを意味する。

20

【0102】

NaCl濃度の変化に連動する乳酸エタクリジンの可溶性の研究において、pH依存性が観察された（図11）。pH6では、0.6%の乳酸エタクリジン溶液と1.2%の乳酸エタクリジン溶液に有意な差異は観察されなかった。両方の溶液がNaClが50mMである場合に可溶であったが、100mMでは殆どすべてが沈降した。乳酸エタクリジンの電荷が小さいpH9の溶液では、乳酸エタクリジンの2つの濃度における可溶性に有意な差異が見られた。0.6%の乳酸エタクリジン溶液は、それよりも高濃度の乳酸エタクリジン溶液よりも低い塩濃度で沈降した（図11）。塩素イオンが乳酸エタクリジンを特に効率的に沈降させることが分かっている（Franek、上掲）。

30

実際には、沈降実験の伝導率は希釈因子によって決定する。従って、1組の実験を行って大腸菌ホモジネートの希釈因子の影響を試験した。全体の乳酸エタクリジン濃度を一定、つまり0.6重量%/容積に保ったが、試料の伝導率を希釈の増大に従って低下させた。結果を表3に示す。表3では、完全長抗体、及び $\text{F}(\text{ab}')_2$ として抗TFを試験した。各実験において乳酸エタクリジンの濃度は0.6重量%/容積であった。抗CD18、抗TF（ $\text{F}(\text{ab}')_2$ ）、及び完全長抗TFのpHはそれぞれ8.5、7.5、及び6.0であった。浄化細胞ホモジネートの各々について、収率と精製度を計算した。回収した上清中のDNA濃度も表に示す。

40

【0103】

表3

異なる量の大腸菌ホモジネートの希釈後の、抗CD18及び抗TFの純度及び収率に対する影響

		抗 CD18 F(ab') ₂		抗 TF F(ab') ₂		抗 TF 完全長 Ab		
希釈 (倍)	伝導 率 (mS)	精製度*	収率 (%)	精製度*	収率 (%)	精製度*	収率 (%)	DNA 濃度 (μg/ml)
2	5.0	2.4	72	2.3	77	3.4	70	20.7
3	4.0	4.1	76	4.0	60	6.7	82	0.5
4	3.2	5.5	71	4.9	95	6.7	95	≤0.001
5	2.7	6.1	88	5.2	100	6.5	100	≤0.001
6	2.4	6.1	92	5.0	100	6.0	100	≤0.001
7	2.1	6.3	100	5.1	100	6.0	100	≤0.001

10

20

* 値 1 は、乳酸エタクリジンで処理しない系に得られる精製度と同じであることを示す。

【 0 1 0 4 】

結果は、希釈を増大させて伝導率を低下させた場合、F (a b ')₂ の精製が増大したことを示すものであった。しかしながら、3 . 5 m S 以下の伝導率では、伝導率の影響は小さかった。本実施例に使用した大腸菌ホモジネートに対しては、伝導率を 3 . 5 m S 未 30
満にするために 4 倍の希釈を施す必要があった。完全長抗 T F 抗体については、F (a b ')₂ ホモジネートよりもやや小さい希釈を施すことができた。1 つの理論に限定するものでないが、これは、完全長ホモジネートのタンパク質濃度が低いことが一因であると思われる。さらに、完全長材料は再懸濁ペースト由来であるので、沈降に影響を与え得る培地要素の一部は、乳酸エタクリジンの沈降に先立って除去されている。

これらの実験において、希釈の増大 (伝導率の低下) に伴いタンパク質濃度は減少した。従って、乳酸エタクリジン濃度の検討において過剰濃度であることが分かった 0 . 6 % の乳酸エタクリジンを添加した場合も、希釈の足りない試料においては宿主タンパク質及 40
び D N A の最大除去が達成されなかった。これは、乳酸エタクリジン濃度の検討において用いられた試料と比較した場合、これら試料におけるホモジネート濃度、つまりタンパク質及び D N A 全体の濃度が大きかったことによるものである。よって、タンパク質、D N A 、及びその他要素の全体的な濃度は乳酸エタクリジン濃度に影響するか、又は逆に必要な希釈に影響する。抗 C D 1 8 F (a b ')₂ 及び完全長及び F (a b ')₂ 抗 T F の収率は、伝導率の低下と共に増大した。

D N A 除去の影響はまた、伝導率に依存していることが分かった。2 倍に希釈した場合、つまり 5 . 0 m S の場合、上清に高濃度の D N A 、2 0 . 7 μ / g が得られた。しかしながら、3 倍の希釈を行った場合、つまり 4 . 0 m S では、濃度は 0 . 5 μ g / m l に低下し、さらに希釈度を大きくした場合、D N A は全く検出できなかった。上述したように、この場合、希釈が大きくなるにつれて、つまり伝導率が低下するにつれて、タンパク質 50
及び D N A に対する乳酸エタクリジンの総量は増大する。よって、本実施例に見られる影

響は、伝導率の低下及び乳酸エタクリジンの量の増大の両方である。

【0105】

温度の影響

気温は沈降実験を行う際の重要であることが知られている因子である。よって、高温条件下で乳酸エタクリジンを使用する場合を試験した。高温におけるインキュベーション時間の影響についても調査した。

高温、つまり50～70℃でのインキュベーションは、2つのF(ab')₂タンパク質の純度に良好に作用する(図12A及び12B)。温度が高い程、精製の効率が良い。70℃でのインキュベーションはF(ab')₂タンパク質の純度を有意に向上させた。70℃で試料を長時間、つまり20分ではなく40分間インキュベートしても、F(ab')₂の純度は向上しなかったが、収率が約10%低下した。しかし、試料を70℃より高温でインキュベートした場合、F(ab')₂並びに他の大腸菌タンパク質の温度沈降により、F(ab')₂は回収されなかった。

10

インキュベーション時間をさらに詳しく調査するため、試料を50℃で16時間、及び30分間インキュベートする実験を行った。その結果、この温度において、30分間のインキュベートを行った試料と比較して16時間のインキュベートを行った試料に有意な精製の向上は無かったことが示された。これは、温度沈降が急激に起こる現象であることを示し、長時間に亘るインキュベーションよりも、適切な温度まで急速に加熱する方が適当であることを示す。

完全長抗TFについても高温で試験した。50℃で15分間インキュベーションしたところ、抗体の純度に若干の効果が見られ、室温でインキュベートした試料と比較して回収される物質に減少が見られなかった(図12C)。しかしながら、温度を60℃まで上昇させると、ほぼ全ての抗TFが沈降した。データにより、F(ab')₂抗TFタンパク質と比べて高温における完全長抗TFの安定性は低いことが示された。

20

温度の上昇は標的ポリペプチドに変化を生じさせるので、実施前に、対象とする特定のポリペプチドの高温での安定性を評価する必要がある。

【0106】

フィード流の安定性

可能な限りきれいなフィード流を回収することが重要である。しかし、フィード流の別の重要な特性は、長時間に亘る安定性である。したがって、乳酸エタクリジン又はPEI処理後の上清の安定性と、単に遠心分離を行った後の上清の安定性を比較した。各上清を2つの温度、つまり室温(21℃)と4℃でインキュベートした。各試料の濁度を測定することにより安定性をモニターした。

30

図13に、時間の経過に伴う濁度の変化を、3つの異なる上清、つまり乳酸エタクリジン、PEI、及び非処理の浄化上清それぞれについて示す。多可電解質、つまり乳酸エタクリジン及びPEIが上清の濁度を有意に低下させたことが明瞭に示されている。清澄の直後、浄化された非処理の上清の濁度は約700 NTUであり、それに対しPEI処理した試料の濁度はその半分、つまり327 NTUに過ぎず、また乳酸エタクリジン上清の濁度は1 NTUであった。PEI処理した上清の濁度をモニターしたところ、経過時間及びインキュベーション温度のいずれについてもそれによる大きな差異は見られなかった。遠心分離だけを行った上清については、最初の48時間は室温の試料の濁度が低い傾向があった。しかしながら、72時間を経過した室温の試料は、試料の濁度が高いために測定不可能であった。乳酸エタクリジンで処理した上清の濁度は低く、4℃でインキュベートしてもそれ程上昇しなかった。試料を21℃でインキュベートしたとき、その濁度は有意に、つまり72時間で1から100 NTUまで、増大した。しかしながら、100 NTUという数字は、清澄直後の他の2つの上清に得られた濁度よりも小さい。従って、pH7の乳酸エタクリジン処理を行った後に回収される上清は安定したフィード流と結論付けることができる。

40

【0107】

結論

50

乳酸エタクリジンは、培養ブロス又はホモジネートからの異種ポリペプチドの一時的回収のための沈降剤として成功裏に使用することができる。乳酸エタクリジンを沈降剤として使用するとき、理想的な標的ポリペプチドは平均宿主タンパク質よりも高いpIを有することが好ましい。従って、多くのタンパク質は負の電荷を有し、乳酸エタクリジンにより沈降できると同時に、標的タンパク質は正の電荷を有し、上清中に回収される。

沈降に好ましい乳酸エタクリジンの濃度は、ブロス又はホモジネート中の宿主タンパク質及びDNAの濃度に大きく依存する。ブロス又はホモジネート中のタンパク質及びDNAの濃度が高い程、必要な乳酸エタクリジンの量は大きくなる。従って、乳酸エタクリジンと複合し、よって沈降する負の電荷を有する要素が多くなる程、沈降に好適な乳酸エタクリジンの量は大きくなる。沈降を行う際の溶液の伝導率が低い程、ポリペプチド精製の効率は大きくなる。沈降の段階を踏むことにより、細胞が除去され、有意義なポリペプチドの精製及びDNAの減少が同時に行われる。

効率的な宿主タンパク質及びDNAの精製のため、pHは通常約4～10であり、これを超えるpHでは分子の電荷が小さくなる。好ましくは約pH9以下である。さらに好ましくは、ポリペプチド精製の際には乳酸エタクリジンは約pH5～9で使用される。精製を向上させるため、高温で短時間のインキュベーションを行うことができる。しかしながら、標的ポリペプチドの沈降を避けるため、対象とする特定のポリペプチドについて高温での安定性を確認しなければならない。また、標的ポリペプチドに変化が生じていないことを確認するため、回収された標的ポリペプチドの質も調査しなければならない。

【図面の簡単な説明】

【0108】

【図1】抗CD18F(ab')₂(-ロイシンジッパー)プラスミドpS1130(単一プロモーター)及びpXC18-7T3(二重プロモーター)の構成を示す概略図である。

【図2】二重プロモーターコンストラクトpXC18-7T3の核酸配列の挿入された核酸配列(抗CD18-7T3, DNAと命名される; 配列番号1)を示す。

【図3】それぞれSTII+抗CD18軽鎖(図3A)及びSTII+抗CD18重鎖(図3B)と命名されたコンストラクトpXC18-7T3内部の2つの翻訳ユニットによりコードされるアミノ酸配列(抗CD18-7T3, タンパク質として組み合わせて命名する)(配列番号2及び3)を示す。

【図4】抗組織因子IgG1プラスミドpATF130(phoA/phoAプロモーター)及びpXTF-7T3FL(phoA/tacII-プロモーター)の構造図である。

【図5】phoA/tacIIプロモーターコンストラクトpXTF-7T3FLの挿入された核酸配列(抗TF-7T3FL, DNAと命名される; 配列番号4)を示す。

【図6】それぞれSTII+抗TF軽鎖(図6A)及びSTII+抗TF重鎖(図6B)と命名されたコンストラクトpXTF-7T3FL内部の2つの翻訳ユニットによりコードされるアミノ酸配列(抗TF-7T3FL, タンパク質として組み合わせて命名する)(配列番号5及び6)を示す。

【図7】乳酸エタクリジンの化学構造を示す。

【図8】A～Cは、乳酸エタクリジンによる沈降後の3つの上清の非還元SDS-PAGEクマシーブルー染色ゲル分析を示す。沈降は、各列に示す異なるpH値で行った。Xで示した列は、各大腸菌ホモジネート、即ち抗CD18F(ab')₂、抗TF-F(ab')₂、及び完全長抗TF(それぞれ図8A、図8B及び図8C)の清澄した上清である。ホモジネートを0.8%の乳酸エタクリジン溶液を用いて4倍に希釈し、つまり各実験における最終的な乳酸エタクリジン濃度を0.6%にした。ゲルにかけ前に全ての試料の容積を補充した。従って、100%の回収が得られた場合、抽出物(X)に対しバンド強度を比較可能である。矢印は生成物バンドを示す。

【図9】A～Cは、乳酸エタクリジンによる沈降後の3つの上清の非還元SDS-PAGEクマシーブルー染色ゲル分析を示す。沈降は、各列に示す異なる乳酸エタクリジン濃

10

20

30

40

50

度で行った。Xで示した列は、各大腸菌ホモジネート、即ち抗CD18F(ab')₂、抗TF F(ab')₂、及び完全長抗TF(それぞれ図9A、図9B及び図9C)の清澄した上清である。抗CD18F(ab')₂、抗TF F(ab')₂、及び完全長抗TFのpHはそれぞれ8.5、7.5、及び6.0であった。試料の伝導率は3.2±0.2 mS/cmであった。ゲルにかける前に全ての試料の容積を補充した。従って、100%の回収が得られた場合、抽出物(X)に対しバンド強度を比較可能である。矢印は生成物バンドを示す。

【図10】A及びBは、それぞれ水及び乳酸エタクリジンで希釈した2つの上清の非還元SDS-PAGEクーマシーブルー染色ゲル分析を示す。沈降は、異なる伝導率で行った。本試験には抗CD18F(ab')₂を含む大腸菌ホモジネートを使用した。水(図10A)、又は各実験で最終的な乳酸エタクリジン濃度が0.6%となるように0.8%の乳酸エタクリジン(図10B)を用いてホモジネートを4倍に希釈し、pHを8.3に調節した。伝導率を変化させるために、試料に対し、(図示するように)0~400 mMの異なる濃度のNaClを添加した。矢印は生成物バンドを示す。

10

【図11】塩化ナトリウム濃度を上昇させたときの乳酸エタクリジンの溶解性を示すグラフである。試料を室温で3時間インキュベートした後、溶解性の乳酸エタクリジンの濃度を決定した。白い丸又は四角は1.2%の乳酸エタクリジン溶液を、黒い丸又は四角は0.6%の同溶液を示す。実線はpH6.0における0.6%の乳酸エタクリジン溶液を、破線はpH6.0における1.2%の乳酸エタクリジン溶液を、点線はpH9における0.6%の乳酸エタクリジン溶液を、点破線はpH9における1.2%の乳酸エタクリジン溶液を示す。

20

【図12】A~Cは、乳酸エタクリジンによる沈降後の3つの上清の非還元SDS-PAGEクーマシーブルー染色ゲル分析を示す。沈降は、高温で行った。Xで示した列は、各大腸菌ホモジネート、即ち抗CD18F(ab')₂、抗TF F(ab')₂、及び完全長抗TF(それぞれ図12A、図12B及び図12C)の清澄した上清である。ホモジネートを4倍に希釈して最終的な乳酸エタクリジン濃度を0.6%とし、抗CD18F(ab')₂、抗TF F(ab')₂、及び完全長抗TFのpHをそれぞれ8.5、7.5、及び6.0に調節した。インキュベーションの温度と時間は図に示す。矢印は生成物バンドを示す。

【図13】3つの異なる上清の時間の経過に伴う濁度の変化を示すグラフである。0.6%の乳酸エタクリジンで処理した抗CD18ホモジネート由来の上清を、黒丸(4)又は白丸(21)で、0.2%のPEIで処理した試料を黒四角(4)又は白四角(21)で示す。水で希釈後濃縮した清澄抗CD18ホモジネートから回収した上清を、黒三角(4)又は白三角(21)で示す。いずれの場合も、抗CD18ホモジネートは4倍に希釈されており、pHは7.2であった。

30

【 図 5 】

抗-TF-7T3FL.DNA

[illegible]

(配列番号4)

【 図 6 】

抗-TF-7T3FL.タンパク質

A: STII + 抗-TF 經銷

MKKNIAPLLASMFVFSIATNAYADIQMTQSPSSLSASVGRVTTTCRASDIKSYLNWY
 QQRPGKAPKVLIIYYATSLAEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLSQPEDFATYYCLQHGES
 WTPGQGTKEVTKITVAAPSVFIFPPSPDQLKSGTASVVCCLNNFYPRAKGVQWKVDNAL
 QSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 C

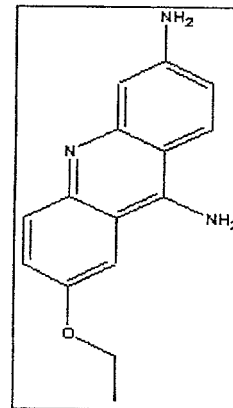
(配列番号5)

B: STII + 抗-TF 重鑄

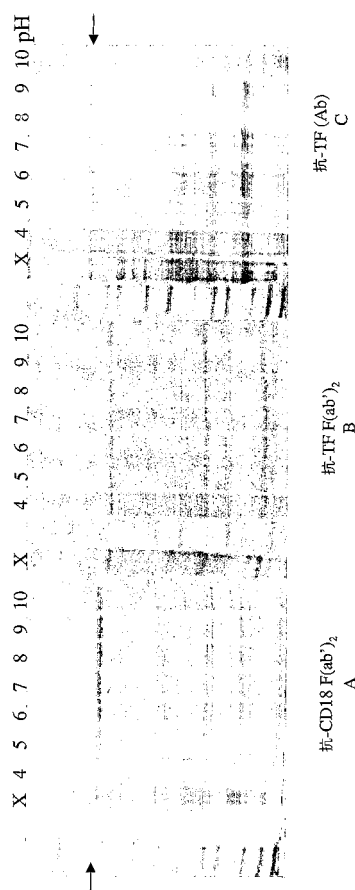
MKXIALFV LASFVFEV LKXIAVSVVLVGVGGGLVVGQGSILVCSANCSILKEIYMHV
 VQAPQKGLWGLVLDIPQCNITVDPKFCORTISADNSNKTAYLXNLSRAEDVATYV
 CARDTAYAFVVGQOGLTVLSSVSVFVPLPSSKTSGGTALAGCKLVQYFVFEV
 TVSNWNGSLVSGVHTVPAVLQSSGSLVSGSVTVPSSSLGTQVTVI CNVHSGPNTKVDV
 KVSPEKCDKHTVPCPPAPALGGGSLVPLFPKPKPTDILMSRTPEVTVVDVSHEDPE
 VKPNVYVGVHNAKTPKREOYNQTVSYVSVLTVHLQWJLHGKGYKCKVSNKALPA
 IETKISAKQGPDSFVQVTVLPKSRKQOQVSVLTVLGVGFPSDIAVWESNGSPNN
 YKTVTPQSGDPSGLFVSLKLTVPKRWQGNQVSVLCSVGHALNIEYTKQSLISLSPG

(配列番号6)

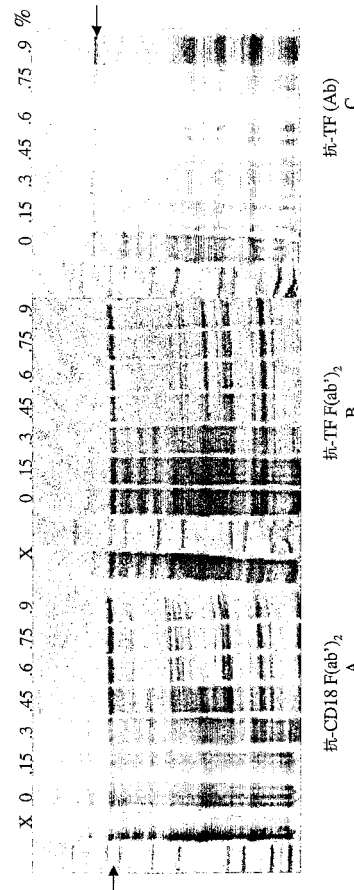
【 図 7 】



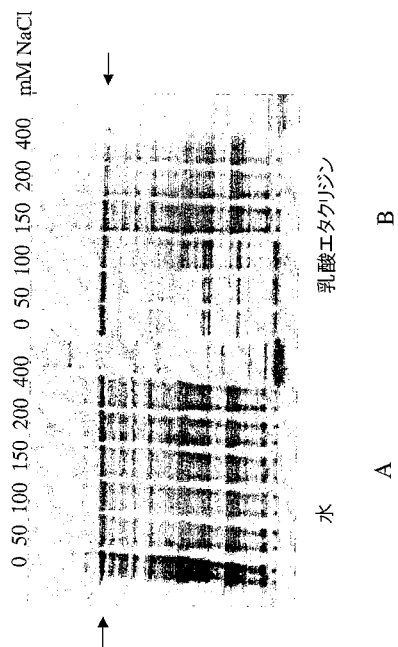
【圖 8】



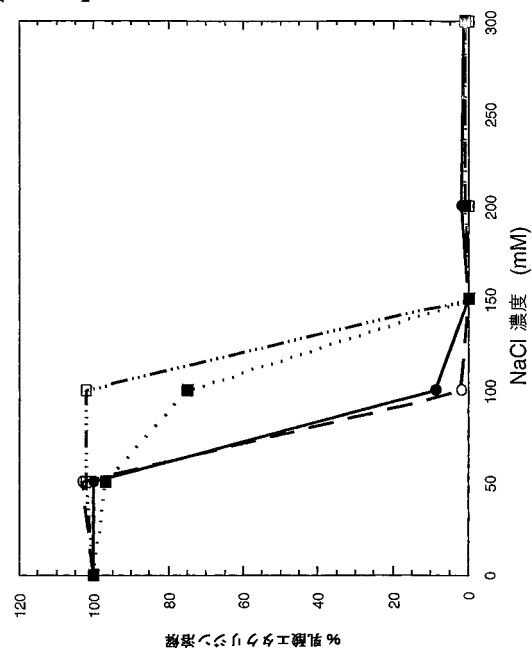
【 図 9 】



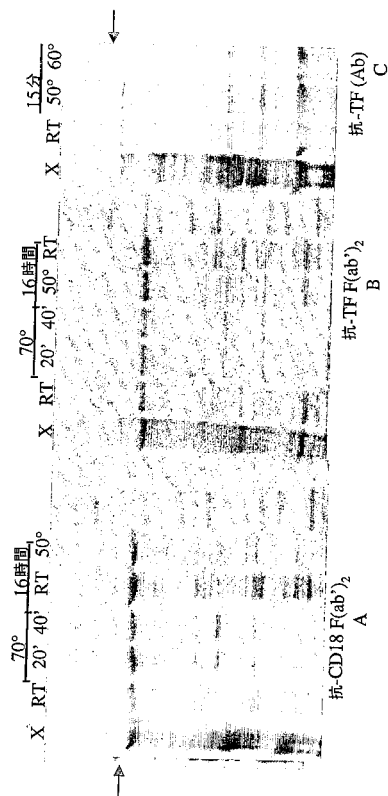
【図 1 0】



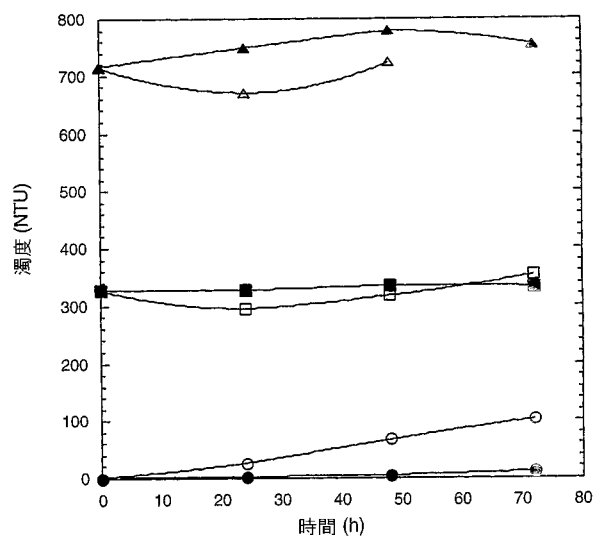
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ational Application No

/US2004/000499

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12P21/02		
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 C12P C07K		
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, WPI Data, PAJ, BIOSIS, FSTA, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 0101, no. 31 (C-346), 15 May 1986 (1986-05-15) -& JP 60 258127 A (MIDORI JUJI KK), 20 December 1985 (1985-12-20) abstract page 198, right-hand column, lines 26-41 page 199, left-hand column, lines 1-20 page 199, columns 1-4 ----- -/--	1-7, 10, 21, 22, 25, 26, 30-32, 34-37, 42, 43
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not 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. "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 September 2004		Date of mailing of the international search report 17/09/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer van de Kamp, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

/US2004/000499

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 198606 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1986-038608 XP002294562 & JP 60 258127 A (GREEN CROSS CORP) 20 December 1985 (1985-12-20) abstract</p>	<p>1-7, 10, 21, 22, 25, 26, 30-32, 34-37, 42, 43</p>
Y	<p>PLÜCKTHUN A: "Escherichia coli producing recombinant antibodies" BIOPROCESS TECHNOLOGY (SERIES); RECOMBINANT MICROBES FOR INDUSTRIAL AND AGRICULTURAL APPLICATIONS. MARCEL DEKKER, NEW YORK, 1994, pages 233-252, XP008034889 ISSN: 0-8247-9141-X paragraph V</p>	<p>1-26, 30-43</p>
Y	<p>RAFFAI R ET AL: "Bacterial expression and purification of the Fab fragment of a monoclonal antibody specific for the low-density lipoprotein receptor-binding site of human apolipoprotein E" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol. 16, no. 1, June 1999 (1999-06), pages 84-90, XP002294588 ISSN: 1046-5928 abstract page 85, right-hand column, lines 25-37</p>	<p>1-26, 30-43</p>
Y	<p>FLAMEZ D ET AL: "Production in Escherichia coli of a functional murine and murine::human chimeric F(ab')₂-2 fragment and mature antibody directed against human placental alkaline phosphatase" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 42, no. 2, 1995, pages 133-143, XP002294589 ISSN: 0168-1656 abstract paragraph 2.6</p>	<p>1-26, 30-43</p>
Y	<p>EP 0 227 833 A (GREEN CROSS CORP) 8 July 1987 (1987-07-08) page 5, lines 7-13</p>	<p>1-26, 30-43</p>
Y	<p>EP 0 226 639 A (GREEN CROSS CORP) 1 July 1987 (1987-07-01) page 5, lines 7-15</p>	<p>1-26, 30-43</p>

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ational Application No
/US2004/000499

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 418 647 A (BEHRINGWERKE AG) 27 March 1991 (1991-03-27) the whole document page 2, lines 41,42 claim 2	1-26, 30-43
Y	TCHERNOV A A ET AL: "Purification of phycobiliproteins from Nostoc sp. by aminohexyl-Sepharose chromatography" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 69, no. 1, 26 March 1999 (1999-03-26), pages 69-73, XP004163235 ISSN: 0168-1656 abstract	1-26, 30-43
Y	AZEGAMI M ET AL: "Induction of bacteriolytic enzyme from pyocinogenic Pseudomonas aeruginosa and its enzymatic properties" MICROBIOS, vol. 23, no. 92, 1978, pages 73-82, XP008034710 ISSN: 0026-2633 abstract	1-26, 30-43
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 197119 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1971-32854S XP002294542 & SU 275 027 A (MOSCOW LOMONOSOV FINE CHE) 19 October 1970 (1970-10-19) abstract	1-26, 30-43
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 197541 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1975-68014W XP002294543 & JP 50 070586 A (NODA INST FOR SCIEN) 12 June 1975 (1975-06-12) abstract	1-26, 30-43
Y	US 3 930 953 A (STARK JOSEF) 6 January 1976 (1976-01-06) the whole document	1-26, 30-43
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ational Application No
/US2004/000499

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FRANEK F: "Purification of IgG monoclonal antibodies from ascitic fluid based on Rivanol precipitation." METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 121, 1986, pages 631-638, XP008034707 ISSN: 0076-6879 cited in the application the whole document	1-26, 30-43
Y	NEURATH A R ET AL: "Fractionation of proteins with different isoelectric points by rivanol" EXPERIENTIA, vol. 25, no. 6, 15 June 1969 (1969-06-15), pages 668-671, XP008034708 cited in the application the whole document	1-26, 30-43
A	AUDRAN R ET AL: "Preparation of immunoglobulins G,A,M (IgGAM) for therapeutic use. Conditions for enrichment in IgA or in IgM" REVUE FRANCAISE DE TRANSFUSION ET IMMUNO-HEMATOLOGIE, vol. 18, no. 2, June 1975 (1975-06), pages 119-135, XP008034704 ISSN: 0338-4535 the whole document figures 1-5 abstract	1,7-13, 21-26, 30-32, 34,37, 38,42,43
A	PAGE M ET AL: "IgG purification" METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY; IMMUNOCHEMICAL PROTOCOLS, vol. 80, 1998, pages 95-111, XP008034705 ISSN: 0-89603-388-0 0-89603-493-3 paragraph 2.1 paragraph 3.2	1,11,34, 38
A	FAHRNER R L ET AL: "Industrial purification of pharmaceutical antibodies: development, operation, and validation of chromatography processes." BIOTECHNOLOGY & GENETIC ENGINEERING REVIEWS, vol. 18, 2001, pages 301-327, XP008034714 ISSN: 0264-8725 the whole document	1,11,34, 38

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ational Application No
/US2004/000499

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>PERSSON J ET AL: "Purification of antibody and antibody-fragment from E. coli homogenate using 6,9-diamino-2-ethoxyacridine lactate as precipitation agent." BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 87, no. 3, 5 August 2004 (2004-08-05), pages 424-434, XP002294541 ISSN: 0006-3592 the whole document</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2004/000499

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ in written format
- ☒ in computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- ☐ contained in the international application as filed
- ☐ filed together with the international application in computer readable form
- ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

/US2004/000499

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 60258127	A	20-12-1985	NONE	
EP 0227833	A	08-07-1987	WO 8700553 A1 DE 3581412 D1 EP 0227833 A1	29-01-1987 21-02-1991 08-07-1987
EP 0226639	A	01-07-1987	WO 8607093 A1 DE 3580590 D1 EP 0226639 A1	04-12-1986 20-12-1990 01-07-1987
EP 0418647	A	27-03-1991	DE 3929504 A1 AT 115589 T AU 642661 B2 AU 6217590 A CA 2024701 A1 DE 59008002 D1 DK 418647 T3 EP 0418647 A1 ES 2066066 T3 IE 903230 A1 JP 3093798 A PT 95205 A US 5204256 A	07-03-1991 15-12-1994 28-10-1993 14-03-1991 07-03-1991 26-01-1995 15-05-1995 27-03-1991 01-03-1995 13-03-1991 18-04-1991 22-05-1991 20-04-1993
SU 275027	A		NONE	
JP 50070586	A	12-06-1975	JP 833547 C JP 51009035 B	30-10-1976 23-03-1976
US 3930953	A	06-01-1976	DE 2308013 A1 AT 327849 B AT 123374 A AU 6564674 A BE 811198 A1 CA 1009973 A1 FI 51593 B FR 2218346 A1 GB 1466982 A IT 1008840 B JP 49110883 A NL 7401891 A	12-09-1974 25-02-1976 15-05-1975 21-08-1975 19-08-1974 10-05-1977 01-11-1976 13-09-1974 16-03-1977 30-11-1976 22-10-1974 20-08-1974

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, 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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 パーソン, ジョセフィン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリングゲーム, エル カミノ リアル 747
, # 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA44 CA02 DA06 EA04

4B064 AG27 CA02 CA19 CE03 CE10 CE20 DA01 DA20