

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6154885号
(P6154885)

(45) 発行日 平成29年6月28日(2017.6.28)

(24) 登録日 平成29年6月9日(2017.6.9)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 P 21/02 (2006.01)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)C 1 2 P 21/02 Z N A C
C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 25 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2015-500866 (P2015-500866)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月18日(2013.3.18)
 (65) 公表番号 特表2015-514398 (P2015-514398A)
 (43) 公表日 平成27年5月21日(2015.5.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/055529
 (87) 国際公開番号 W02013/068602
 (87) 国際公開日 平成25年5月16日(2013.5.16)
 審査請求日 平成28年1月22日(2016.1.22)
 (31) 優先権主張番号 P1200171
 (32) 優先日 平成24年3月19日(2012.3.19)
 (33) 優先権主張国 ハンガリー (HU)

(73) 特許権者 596035695
 リチュテル・ゲデオン・ヴェジェーセティ
 ・ジャール・ニュイルヴァーノシャン・ミ
 ューコエダー・レースヴェーニュタールシ
 ャシャーグ
 Richter Gedeon Nyrt
 .
 ハンガリー、ハー-1103ブダペスト、
 ジョエムロエイ・ウート19-21番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリペチドの生産方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

封入体中での組み換えポリペチドの生産方法であって、

- (a) 微生物宿主細胞を第一の温度で培養し、該宿主細胞は該組み換えポリペチドをコードする核酸を含み、
 (b) 培養温度を第一の温度から第二の温度まで低下させ、そして
 (c) 微生物宿主細胞を第二の温度で培養する
 ことを含み、ここで、核酸が誘導性プロモーターに操作可能に結合しており、温度の低下を、細胞培養物の600nmにおける光学密度が10～50に達したときに行う、方法。

【請求項 2】

微生物宿主が大腸菌である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

第一の温度が36～38である、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

第一の温度が37である、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

第二の温度が25～36である、請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

第二の温度が30～36である、請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

10

20

第二の温度が3 0 ~ 3 5 である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

第二の温度が3 1 ~ 3 3 である、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

第一の温度および / または第二の温度で培養中の pH が 6 ~ 8 である、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

第一の温度および / または第二の温度で培養中の pH が 6 . 8 ~ 7 . 2 である、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

温度の低下を、細胞培養物の 6 0 0 nm における光学密度が 2 7 ~ 3 3 に達したときに行う、請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

組み換えポリペプチドが 4 ヘリックスバンドルポリペプチドである、請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

組み換えポリペプチドが G - C S F である、請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

組み換えポリペプチドが G - C S F であり、該 G - C S F がヒトまたはウシ G - C S F である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

該 G - C S F が - 1 位に開始メチオニンアミノ酸残基を有しているヒトまたはウシ G - C S F である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 16】

工程 (a) ~ (c) の前に宿主細胞に該組み換えポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターを導入する工程を含み、ここで、該核酸が誘導性プロモーターに操作可能に結合している、請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

誘導性プロモーターが T 7 プロモーターである、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 18】

微生物宿主細胞の染色体がバクテリオファージ RNA ポリメラーゼをコードする核酸配列を含み、溶原性バクテリオファージ核酸配列を含まない、請求項 1 ~ 1 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

バクテリオファージ RNA ポリメラーゼをコードする核酸配列が l a c プロモーターに操作可能に結合している、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 20】

バクテリオファージ RNA ポリメラーゼが T 7 ポリメラーゼである、請求項 1 8 または 1 9 に記載の方法。

【請求項 21】

ポリペプチドの発現をインデューサーの添加により実施する、請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】

インデューサーを温度の低下と同時にまたはその後に添加する、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 23】

インデューサーが I P T G である、請求項 2 1 または請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 24】

ベクターが配列番号 4 の配列を含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 2 4 のいずれかに記載の方法であって、該組み換えポリペプチドをコードする核酸が次の

- (i) 配列番号 3 または配列番号 1 のポリペプチドをコードする核酸配列；および
- (ii) 配列番号 3 に記載する配列と少なくとも 9 0 % 配列同一性を有するポリペプチドをコードする核酸配列

から成る群から選択される、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

10

本発明は、ポリペプチド生産の分野、特に封入体で組み換えポリペプチドを生産する宿主細胞における組み換えポリペプチドの生産に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

宿主細胞における組み換えポリペプチド発現は、バイオテクノロジーおよび医薬品産業において広く使用されている標準的技術である。特に例えば大腸菌(*E. coli*)のような微生物宿主が、比較的単純な発現系および細胞培養条件がこれらの宿主細胞に利用可能であるために、一般に使用されている。概して、培養工程はそのために比較的経済的である。

【0003】

20

しかしながら、微生物細胞で発現させたとき、可溶性で活性な形態の目的のポリペプチドを得ることはしばしば困難である。多くの場合、組み換えポリペプチドの発現は、変性形態での難溶性細胞内凝集物であるポリペプチド、いわゆる封入体を生成する[Baneyx, F. and Mujacic, M. (2004) *Nat. Biotechnol.* 22, 1399-1408 and Sorensen, H.P. and Mortensen, K.K. (2005) *Microb. Cell Fact.* 4, 1]。後者は、古典的封入体とも呼ばれている。

【0004】

一般に、古典的封入体は、典型的に中等度の速度での遠心分離による単離が容易である。封入体から、活性な、すなわち正しく折り畳まれた、ポリペプチドを回収するために、封入体を可溶化し、単離後タンパク質を再生しなければならない。いくつかの特許出願および特許が、封入体の可溶化および封入体から得たタンパク質の再生を扱っている。例えば E P 0 5 1 2 0 9 7、E P 0 3 6 4 9 2 6、E P 0 2 1 9 8 7 4、W O 0 1 / 8 7 9 2 5、Rudolph 1996、Rudolph 1990、Marston 1986およびDietrich 2003は、変性タンパク質の可溶化および再生に関する一般的技術を記載する。例えば、E P 0 2 1 9 8 7 4 は、大腸菌封入体からの組み換えタンパク質の再折り畳みに関する一般的方法を記載する。可溶化について、カオトロピック剤である G u H C l およびアルギニンが高 p H で使用された。E P 0 2 1 9 8 7 4 は、G S H / G S S G によりもたらされるレドックス条件下のジスルフィド架橋の形成を記載する。

30

【0005】

封入体の単離および可溶化のための多くの方法が知られているにも関わらず、結果は必ずしも満足いくものではない。一つの大きな問題は、封入体の構造が変わり得ることである。封入体の形成および構造は、例えば培地組成、増殖温度および生成速度を含む、細胞培養過程のパラメーターによる影響を受け得ることが知られている。W O 2 0 0 4 / 0 1 5 1 2 4 は、培養条件の調節による、“非古典的”封入体の形成を記載する。

40

【0006】

封入体から、組み換えタンパク質を、特に活性形態かつ十分な量で得ることは困難であり得る。時として、封入体の構造が柔軟に過ぎ、遠心分離による封入体の単離が困難な状況となる。他方で、封入体がコンパクト過ぎることもある。かかる封入体は、過酷な条件下でも可溶化できないことになる。

【0007】

50

これらの不都合を解決するために、本発明は、組み換えタンパク質の収量を上げるために、容易に単離され、可溶化される封入体中で適切に折り畳まれた大量のタンパク質をもたらし、新規細胞培養法を提供する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】国際公開第03/051922A1号明細書

【特許文献2】国際公開第01/87925A2号明細書

【特許文献3】国際公開第01/04154A1号明細書

【特許文献4】国際公開第00/02901号明細書

10

【特許文献5】米国特許第6,489,450B2号明細書

【特許文献6】米国特許第5,849,883号明細書

【特許文献7】米国特許第5,681,720号明細書

【特許文献8】米国特許第5,055,555号明細書

【特許文献9】欧州特許第1837346A2号明細書

【特許文献10】欧州特許第1630173A2号明細書

【特許文献11】欧州特許第0219874A2号明細書

【特許文献12】国際公開第2010/146599A1号明細書

【特許文献13】国際公開第2008/096370A3号明細書

【特許文献14】国際公開第2006/135176A1号明細書

20

【特許文献15】国際公開第2006/097944A2号明細書

【特許文献16】国際公開第2004/015124A1号明細書

【特許文献17】国際公開第2004/001056A1号明細書

【特許文献18】国際公開第98/53072号明細書

【特許文献19】国際公開第89/10932号明細書

【特許文献20】国際公開第87/01132号明細書

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】R. R. Burgess, 1996 "Purification of over produced E. coli RNA polymerase σ factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from sarkosyl". Methods Enzymol. 273, 145-149

30

【非特許文献2】David C. Dale, 2002 "Colony-Stimulating Factors for the Management of Neutropenia in Cancer Patients", Aids International Limited Drugs 2002; 62 Suppl. 1, 1-15

【非特許文献3】P.E. Devlin, 1988, "Alteration of amino-terminal codons of human granulocyte-colony-stimulating factor increases expression levels and allows processing by methionine aminopeptidase in Escherichia coli", Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division) Gene, 65, 13-22

【非特許文献4】Arndt Dietrich et al., Jan 2003 "Industrial Protein Folding", www.gitverlag.com/go/bioint BIOforum Europe, 1-3

40

【非特許文献5】European Pharmacopoeia, Jul 2010 "Filgrastim concentrated solution"; 2015-2018

【非特許文献6】Elanders Oesterval, April 2007 "Purification and renaturation of recombinant proteins produced in Escherichia coli as inclusion bodies", www.gelifesciences.com/protein-purifaction Application note 18-1112-33 AC, 1-4

【非特許文献7】Glover, D.M. DNA Cloning Volume I: A Practical Approach. IRL Press, Oxford, 1985.

【非特許文献8】M. Heidari et al., May 2001, "Expression, purification, and in vitro biological activities of recombinant bovine granulocyte-colony stimulating factor", www.elsevier.com/locate/vetimm Veterinary Immunology and Immunopathol

50

ogy 81, 45-57

【非特許文献 9】Holloway C.J., 1994, "Applications of Recombinant DNA Technology in the Production of Glycosylated Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor", European Journal of Cancer Vol. 30 A, Suppl. 3, S2-S6

【非特許文献 10】Soo-Hyung Kang et al., July 1995, "High Level Expression and Simple Purification of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor in E. coli", Biotechnology Letters Volume 17 No. 7 687-692

【非特許文献 11】Khalilzadeh R. et al., July 2008, "Process development for production of human granulocyte-colony stimulating factor by high cell density cultivation of recombinant Escherichia coli", J. Ind Microbiol Biotechnol, 1643-1650 10

【非特許文献 12】Fiona A. O. Marston, 1986, "The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in Escherichia coli", Biochem. J. (1986) Vol. 240, 1-12

【非特許文献 13】G. Molineux, 2004, "The Design and Development of Pegfilgrastim", Current Pharmaceutical Design, 2004, 10, 1235-1244

【非特許文献 14】Dasari Venkata Krishna Rao et al., 2008, "A purification method for improving the process yield and quality of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor expressed in Escherichia coli and its characterization", Biotechnol. Appl. Biochem. (2008) 50, 77-87

【非特許文献 15】Harald Tschesche, 1990, "Modern Methods in Protein- and Nucleic Acid Research", Walter de Gruyter, Berlin, NY, 149-171 20

【非特許文献 16】Rainer Rudolph et al., January 1996, "In vitro folding of inclusion body proteins", The FASEB Journal Vol. 10, 49-56

【非特許文献 17】Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989)

【非特許文献 18】Ana LS Vanz et al., April 2008, "Human granulocyte colony stimulating factor 8hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization", Microbial Cell Factories 2008, www.micorbialcellfactories.com/content/7/1/13, 1-12 30

【非特許文献 19】Chao Zhan WANG et al., 2005, "Refolding with Simultaneous Purification of Recombinant Human Granulocyte Colony-stimulating Factor from Escherichia coli", Chinese Chemical Letters Vol. 16 No. 3 www.imm.ac.cn/journal/ccl.html, 389-392

【非特許文献 20】Karl Welte et al., September 1996, "blood", Blood Vol. 88 No. 8, American Society of Hematology www.bloodjournal.org, 1907-1929

【非特許文献 21】Paul WINGFIELD et al., 1988, "Characterization of recombinant-derived granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)", Biochem. J. Vol. 256, 213-218

【非特許文献 22】Krisztina M. Zsebo et al., 1986, "Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor: Molecular and Biological Characterization", Immunobiol., Vol. 173, 175-184 40

【非特許文献 23】Lu et al, 1992, The Journal of biological Chemistry, Vol 267:8 770-8777

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

発明の要約

本発明は、ポリペチド生産の分野、特に封入体で組み換えポリペチドを生産する宿主細胞における組み換えポリペチドの生産に関する。本発明は、活性タンパク質の収量を上げ 50

る、封入体からの組み換えポリペチドの生産のための新規方法を提供する。本発明者らは、ここで、細胞培養条件の調節が活性形態での組み換えポリペチドの収量に良い影響を与えることを証明する。例えば、本発明者らは、第一の高培養温度および第二の低培養温度を含む２段階培養方法が有益であることを発見した。細胞増殖および微生物宿主細胞における組み換えポリペチド発現に良い影響を与える他の培養パラメーターもまたここに記載する。

【課題を解決するための手段】

【００１１】

一つの面において、本発明は、封入体での組み換えポリペチドの生産方法であって、
(a) 微生物宿主細胞を第一の温度で培養し、該宿主細胞は該組み換えポリペチドをコードする核酸を含み、
(b) 培養温度を第一の温度から第二の温度まで低下させ、そして
(c) 微生物宿主細胞を第二の温度で培養する
ことを含む、方法を提供する。

10

【００１２】

微生物宿主細胞は大腸菌細胞であり得る。第一の温度は３６～３８、好ましくは３７であり得る。第二の温度は２５～３６、より好ましくは３０～３６、さらにより好ましくは３２～３５であり得る。第一の温度および／または第二の温度で培養中のpHは６～８、好ましくは６.８～７.２であり得る。

20

【００１３】

ある態様において、細胞培養物が６００nmでの光学密度１０～５０、より好ましくは２７～３３に達したときに、温度の低下を実施する。

【００１４】

ある態様において、組み換えポリペチドは、４ヘリックスバンドルポリペチドである。組み換えポリペチドはG-C-S-Fであり得る。ある態様において、G-C-S-Fは、所望によりそれぞれ-1位に開始メチオニンアミノ酸残基を有してよいヒトまたはウシG-C-S-Fである。

【００１５】

ある態様において、核酸は誘導性プロモーターに操作可能に結合している。核酸は、発現ベクターのようなベクターに包含され得る。ある態様において、工程(a)～(c)の前に、宿主細胞に該組み換えポリペチドをコードする核酸を含む発現ベクターを導入する工程があり、ここで、該核酸は誘導性プロモーターに操作可能に結合している。

30

【００１６】

誘導性プロモーターはT7プロモーターであり得る。微生物宿主細胞の染色体は、所望によりlacプロモーターに操作可能に結合してよい、バクテリオファージRNAポリメラーゼをコードする核酸配列を含んでよく、溶原性バクテリオファージ核酸配列を含まなくてよい。バクテリオファージRNAポリメラーゼはT7ポリメラーゼであり得る。

【００１７】

ある態様において、組み換えポリペチドの発現をインデューサーの添加により行う。インデューサーを温度低下と同時にまたは低下後に添加し得る。インデューサーはIPTGであり得る。

40

【００１８】

好ましい態様において、ベクターは、配列番号４の配列を含む。

【００１９】

ある態様において、該組み換えポリペチドをコードする核酸は、(i)配列番号３または配列番号１のポリペプチドをコードする核酸配列または(ii)配列番号３に記載する配列と少なくとも９０％配列同一性を有するポリペプチドをコードする核酸配列から成る群から選択される。

【００２０】

図および表の簡単な説明

50

表 1 : 種々の第二培養温度での細胞培養からの G - C S F の収量

表 2 : 2 回の再折り畳み工程を含む下流プロセッシングのための好ましい条件の一覧

表 3 : 洗浄され、凍結された封入体 6 5 0 g から出発した 3 回の生産操作での純度および収量。収量の計算は、封入体の湿重量による。

表 4 : G - C S F 精製における総純度および 2 種の工程依存不純物(サルコシル、エンドトキシン)の値。数値幅は、異なる分析方法を使用した 3 個の G - C S F 生産ロットの分析の結果を示す。

表 5 : 3 個の G - C S F 生産ロットの純度および活性

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 1 】

10

【図 1 A】実施例 1 の発現ベクターの模式図。

【図 1 B】G - C S F 発現ベクターの配列、配列番号 4。

【図 2】対照としての市販フィルグラスチム製剤(3 A)およびここに記載のとおり精製した生成物の純度を分析した S E C - H P L C クロマトグラム。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 2 】

発明の記載

本発明は、宿主細胞において封入体で発現される組み換えポリペチドの生産方法を提供する。本組み換えポリペチドをコードする核酸を宿主細胞に導入する。次いで、宿主細胞を培養して組み換えポリペチドを発現させ、ここで、該宿主細胞は、該組み換えタンパク質を含有する封入体を形成する。最初の培養期間終了後、培養を継続しながら、培養温度を高温から低温に変更する。次いで、宿主細胞の培養を低温で継続する。

20

【 0 0 2 3 】

本発明者らは、ここで、細胞培養条件の調節が活性形態での組み換えポリペチドの収量に良好な影響を与えることを証明する。本発明者らは、驚くべきことに、宿主細胞の培養中に細胞培養温度を低下することが、組み換えタンパク質の収量増加を導くことを発見した。本発明者らはまた、誘導モード、pH、下流プロセッシングおよび特に発現系の選択などのような他のパラメーターも、収量に良好な影響をもたらす得ることを発見した。ここに記載する好ましい温度と好ましい発現系の組み合わせが特に有益であることが判明した。

30

【 0 0 2 4 】

いかなる理論的拘束も受けることなく、本発明者らは、ここに記載する培養温度の調節が封入体の構造を至適化し、封入体において正しく折り畳まれたタンパク質の量を増加させ、そして、封入体からのより多くの活性組み換えタンパク質の回収を容易にすると考える。本発明者らは、封入体の構造および組成が、再生された活性ポリペチドの収量についての制限因子であり得ると考える。さらに、誘導モード、pH、下流プロセッシングおよび特に発現系のようなここに記載するその余のパラメーターは、収量のさらなる向上を促進する。ここに記載する種々の付加的パラメーターは、個々に適用してよく、またここに記載する方法に 1 個以上のパラメーターを適用して組み合わせてもよい。ここに記載する方法は、細胞増殖の改善および微生物宿主細胞における組み換えポリペチド発現の改善をもたらす。

40

【 0 0 2 5 】

本発明の第一の面において、封入体で発現された組み換えポリペチドの生産方法が提供され、該方法は、(a)微生物宿主細胞の細胞培養物を第一の温度で培養し、ここで、宿主細胞は該組み換えポリペチドをコードする核酸を含み、(b)培養温度を第一の温度から第二の温度へ低下させ、そして(c)微生物宿主細胞の培養物を第二の温度で培養する工程を含む。温度の低下は培養の継続中に行う。核酸は宿主細胞に導入されている。核酸はベクターに包含されていてよい。核酸は誘導性プロモーターに結合され得る。

【 0 0 2 6 】

ここで使用する用語“ポリペチド”および“タンパク質”は、交換可能に使用され、ペ

50

プチド結合により他のアミノ酸残基に結合した一連のアミノ酸残基を指称する。

【0027】

“組み換え核酸”は、他には生物体内で見出されない核酸を生成する、遺伝物質の新規組み合わせを製造する分子工学的方法の使用により得られる核酸である。生存細胞内で組み換え核酸の発現により生成するタンパク質を“組み換えタンパク質”または“組み換えポリペチド”と呼ぶ。組み換えタンパク質をコードする組み換え核酸を宿主細胞に導入する。この方法において使用する“核酸”は異種核酸、すなわち宿主細胞に対して外来の核酸であり得る。または核酸は、宿主由来であってよく、該宿主により自然に発現されるポリペチドをコードし得る。例えば、第二のコピーの導入は発現を増加し得る。あるいは核酸配列が、宿主の該核酸に対して通常作動する転写制御以外の転写制御を受ける。組み換え形態でのタンパク質は、このようにして、異なる発現レベルで発現され、例えばその内因性発現レベルと比較して過剰発現もしくは過少発現され得る。

10

【0028】

目的のタンパク質をコードする組み換え核酸配列は、宿主細胞への導入前に1個以上の変異、挿入、欠失および/または置換により修飾されてよいが、このような修飾配列は、目的のタンパク質と同じ生物学的機能を有する活性タンパク質(すなわち目的のタンパク質の機能的等価物である)をコードしていなければならない。ここでいう組み換え核酸配列は、また宿主細胞における発現を最適化するために原核生物宿主の“コドン使用頻度”に従い修飾されていて、例えばヒト配列のような、真核生物(真核起源)のように、生物の異なるドメイン(エンパイア)を起源とする核酸配列も含む。

20

【0029】

本発明は、封入体で生産される任意のタンパク質に適用できる。封入体は、一般に比較的水性のタンパク質(例えばG-C-S-F)により形成され、それゆえに本発明は、比較的水性のタンパク質、特に(G-C-S-Fに類似して)多すぎるジスルフィド結合を有しないものに容易に適用できる。本発明は、それ故に、G-C-S-Fと類似の特性、例えば類似の溶解度、類似の水溶性、類似のシステイン結合数などを有するタンパク質に特に適し得る。ある態様において、本方法は水溶性タンパク質に適用される。

【0030】

特に、本発明者らは、いわゆる“ヘリックスバンドルタンパク質”、特に“4ヘリックスバンドルタンパク質”が、ここに記載する方法で特に改善された高発現率を示すことを発見した。全てのヘリックスバンドルタンパク質は、共通してコア構造を有する。これらはその二次構造に数個のアルファヘリックスを有し、これは通常、三次構造において互いに平行または逆平行構造に配向されている。4ヘリックスバンドルタンパク質は、本発明の方法で製造するのに特に適している。Ricci et al, 2003およびWeber et al, 1980は、4ヘリックスバンドルファミリーのタンパク質の共通構造およびメンバーを記載している。本発明に特に適するヘリックスバンドルタンパク質の、限定を意図しない例は、G-C-S-F(顆粒球コロニー刺激因子)、GM-C-S-F(顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子)、M-C-S-F(マクロファージ刺激因子)、hGH(ヒト成長ホルモン)、インターフェロン類、例えばIFN- α 2(インターフェロンアルファ2)またはインターフェロンベータ、インターロイキン類、例えばIL-2(インターロイキン-2)、IL-4(インターロイキン-4)、IL-7(インターロイキン-7)またはIL-9(インターロイキン-9)、エリスロポエチン、レプチン、MGDF(巨核球増殖分化因子)および他のサイトカイン類を含む。好ましい態様において、組み換えポリペチドはG-C-S-F、GM-C-S-F、M-C-S-F、hGH、IFN- α 2、IL-2、IL-4、IL-7およびIL-9から成る群から選択される。より好ましい態様において、組み換えポリペチドはG-C-S-F、GM-C-S-FおよびM-C-S-Fから成る群から選択される。

30

40

【0031】

これらの組み換えタンパク質をコードする核酸の配列は、微生物宿主細胞、特に大腸菌での発現のためにコドン最適化されていてよい。

【0032】

50

ある好ましい態様において、組み換えポリペチドは G - C S F である。ヒト顆粒球コロニー刺激因子(h G - C S F)は、好中球の形成に決定的役割を有する造血性増殖因子に属する。G - C S F は、血液学および腫瘍学の分野において医薬として使用される。今日、グリコシル化され、哺乳動物細胞、特に C H O 細胞株で生産されるレノグラスチム(Holloway CJ (1994) Eur J Cancer 30A Suppl 3:S2-S6., E P 1 6 9 5 6 6)およびグリコシル化されておらず、大腸菌で生産されるフィルグラスチム(E P 2 3 7 5 4 5)の2形態の臨床用 G - C S F が上市されている。

【 0 0 3 3 】

本発明において使用する“ G - C S F ”は、例えばヒト G - C S F、ウシ G - C S F などのような G - C S F の種オルソログを含む。ヒト G - C S F のアミノ酸配列は：

TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKI QGDGAALQEKLCATYKLCHEPEELVLLGHSLGIPWA
PLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEG I SPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQ
QMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHLAQP

(配列番号 1)であり、これは、例えばHolloway, 1994またはDrugbank Accession No DB00099の下に維持されている。

【 0 0 3 4 】

ウシ G - C S F のアミノ酸配列は：

TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKI QADGAELQERLCAAHKLCHEPEELMLLRHSLGIPQAP
LSSCSSQSLQLRGCLNQLHGGLFLYQGLLQALAG I SPELAPTLDLTLQLDVDTDFATNIWLQ
MEDLGAAPAVQPTQG AMPFTSAFQRRAGGVLVASQLHRFLELAYRGLRYLAEP

(配列番号 2)であり、これは、例えばU S 5 8 4 9 8 8 3 の図 7 またはPDB Accession No : 1BGC-Aの下に維持されている。

【 0 0 3 5 】

ある好ましい態様において、G - C S F は哺乳動物 G - C S F である。特に好ましい態様において、ポリペチドはヒト G - C S F [Drugbank Accession No: DB00099]、ウシ G - C S F [PDB Accession No: 1BGC-A]またはその機能的変異体である。ある好ましい態様において、組み換えポリペチドはメチオニル - G - C S F (M e t - G - C S F)、例えばヒト M e t - G - C S F (r - m e t - h u - G - C S F = フィルグラスチム)である。

【 0 0 3 6 】

フィルグラスチムのアミノ酸配列は：

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKI QGDGAALQEKLCATYKLCHEPEELVLLGHSLGIPWA
PLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEG I SPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQ
QMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHLAQP

(配列番号 3)である。

【 0 0 3 7 】

ウシ G - C S F もメチオニル - ウシ G - C S F として提供され得る。

【 0 0 3 8 】

本発明において使用する“ G - C S F ”は、G - C S F の機能的変異体を含む。ここの“変異体”は、文脈上これと異なる解釈が必要でない限り、“機能的変異体”を意味する。G - C S F タンパク質の変異体は、G - C S F タンパク質配列と異なるが、なお同じ生物活性を有するタンパク質を意味する(機能的変異体)。G - C S F タンパク質の“変異体”は、1個以上のアミノ酸が対照 G - C S F タンパク質配列(例えばヒト G - C S F 配列)と異なる、タンパク質をいう。“変異体”は、これとは別にまたはこれに加えて、例えば、メチル化、ペグ化、サクシニル化、タグまたは標識の付加などのような、他の修飾を有し得る。変異体は、酵素的にまたは化学的に修飾された G - C S F であり得る。それは他のペプチドまたはポリペチドと融合した融合タンパク質であってもよい。好ましい態様において、G - C S F はペグ化されている。

【 0 0 3 9 】

変異体は、対立遺伝子変異体を含む天然変異体(例えばZsebo 1986参照)または合成により製造した変異体であり得る。G - C S F の修飾形態が封入体で発現されることは先行文

10

20

30

40

50

献に示されている。それゆえに、変異体を、ここに記載する改善された方法を使用して得ることができる。例えば、E P 0 7 1 9 8 6 0 は、実施例 2 および 3 に、修飾ウシ G - C S F の構成および生産を記載している。

【 0 0 4 0 】

ある態様において、G - C S F 変異体は、配列番号 3 (r - m e t - h u - G - C S F = フィルグラスチム)と少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % または少なくとも 9 9 . 5 % 配列同一性を有するタンパク質である。配列同一性は、例えば Clustal、BLAST などのような標準的配列分析ツールまたは例えばニードルマン - ウンシュアルゴリズム、スミス - ウォーターマンアルゴリズムなどのような整列アルゴリズムを使用して決定できる。変異体は 1 個以上の保存的アミノ酸置換を有し得る。アミノ酸が、類似の特性を有するアミノ酸に置換されたならば(例えば極性アミノ酸が他の極性アミノ酸に、酸性アミノ酸が他の酸性アミノ酸になど)、アミノ酸置換は保存的である。保存的置換は化学的特性に、そしてそれゆえにタンパク質の機能に、影響する可能性が低い。それゆえに、G - C S F の“ 変異体 ” は、G - C S F の変異体がなお G - C S F と同じ生物学的機能を示す限り、配列番号 3 と比較して 1 個以上のアミノ酸に 1 個以上の変異、欠失、置換、挿入および/または修飾を有するタンパク質を含む(機能的等価物)。変異体が同じ生物学的機能を有するか否かは、G - C S F の生物活性を決定するアッセイで試験できる(例えば実施例 1 3 に記載する方法参照)。市販 G - C S F を比較対照として使用できる。変異体は、市販 G - C S F 対照に対して、例えばフィルグラスチムの少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % または少なくとも 9 9 . 5 % の活性を有するならば、“ 同じ生物活性 ” を有する、すなわち“ 生物学的に活性 ” または“ 活性 ” であると見なし得る。

【 0 0 4 1 】

ここで使用する用語“ G - C S F ” は、それゆえに、ヒト G - C S F の種オルソログおよび変異体、すなわち機能的変異体を含む。

【 0 0 4 2 】

本発明において、細胞培養中に調節し得るパラメーターは、温度、p H、光学密度、溶存酸素レベル(D O)、供給速度、炭素源および活性組み換えタンパク質の収量に良い影響を与える他のパラメーターを含む。

【 0 0 4 3 】

温度

本発明のある態様において、細胞培養のインキュベーション温度を、第一の高い温度から第二の低い温度に低下させる。温度の低下を、宿主細胞の培養を継続しながら行う。この低い温度で、細胞は増殖相から生産相に変わる。ある態様において、第一の温度は 3 6 ~ 3 8 である。好ましい態様において、第一の温度は 3 6 . 5 ~ 3 7 . 5 または 3 6 . 7 ~ 3 7 . 2 であり、より好ましい態様において第一の温度は約 3 7 、より好ましい態様において第一の温度は 3 7 である。

【 0 0 4 4 】

ここで、数値の範囲が“ x ~ y ” のように示されているとき、数値 x および y は、他に明示的にこれと異なって特定されていない限り、当該範囲に含まれる。

【 0 0 4 5 】

宿主細胞の細胞培養物を、第一の温度で第一の培養時間中、インキュベーションする。第一の培養時間は 6 ~ 4 8 時間であり得るが、実際の細胞培養状況に依存して、これより短くも、長くもできる。好ましい態様において、第一の培養時間は 5 ~ 4 0 時間または 1 0 ~ 3 6 時間または 1 0 ~ 3 2 時間または 1 4 ~ 2 8 時間または 1 8 ~ 2 4 時間であり得る。特に第一の培養時間は、1 0 時間、1 2 時間、1 2 . 5 時間、1 4 時間、1 7 時間、

18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、24時間であってよいが、またこれらの時間の2個の任意の組み合わせにより定義される時間であってもよい。第一の培養時間はまた細胞培養物の光学密度によって決定し得る(下記参照)。

【0046】

第一の培養時間の経過後、インキュベーション温度を、例えば単に発酵槽温度を第二の低い温度に設定し直すことにより下げる。ある態様において、第二の温度は25 ~ 36 または26 ~ 36 または27 ~ 36 または28 ~ 36 または29 ~ 36 であり得る。好ましい態様において、第二の温度は30 ~ 36 または30.5 ~ 36 または31 ~ 36 または32 ~ 36 または33 ~ 36 または34 ~ 36 または35 ~ 36 または30 ~ 35 または30.5 ~ 35 または31 ~ 35 または32 ~ 35 または33 ~ 35 または34 ~ 35 または30 ~ 34 または30.5 ~ 34 または31 ~ 34 または32 ~ 34 または33 ~ 34 であり得る。好ましい態様において、第二の温度は30、30.5、31、32、33、34、35 または36 であり得るが、またこれらの数値の2個の任意の組み合わせにより定義される温度であり得る。好ましくは、第二のインキュベーション温度は30 ~ 35 または30 ~ 34 である。より好ましくは、第二のインキュベーション温度は約31 ~ 約34 または31 ~ 34、より好ましくは31 ~ 33 である。最も好ましくは、第二のインキュベーション温度は約32 または32 である。

【0047】

宿主細胞の細胞培養を、第二の温度で第二の培養時間中、インキュベートする。第二の培養時間は1 ~ 20時間であり得るが、実際の細胞培養状況に依存して、これより短くも、長くもできる。好ましい態様において、第二の培養時間は1 ~ 20時間または2 ~ 16時間または3 ~ 14時間または3 ~ 10時間または3 ~ 8時間または3 ~ 6時間または4 ~ 14時間または4 ~ 10時間または4 ~ 8時間または4 ~ 6時間、好ましくは5時間であり得る。特に第二の培養時間は1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間または20時間であり得るが、これらの数値の2個の任意の組み合わせにより定義される時間であってもよい。

【0048】

pH

pHは、第一および/または第二の培養温度/培養時間中、特定のpH値内に維持される。本発明者らは、6 ~ 8のpHが、発現タンパク質の高収量をさらに促進するために特に有益であり、pH6.8 ~ 7.2が特に好ましいことを発見した。それゆえに、ここに記載する方法は、pHの1回以上の測定操作を含み得る。pHは、第一および/または第二培養温度/培養時間中、6 ~ 8または6.5 ~ 7.8または6.6 ~ 7.4または6.7 ~ 7.3または6.8 ~ 7.2または6.9 ~ 7.1または6.9 ~ 7.0;または6.6 ~ 7.2または6.7 ~ 7.2または6.8 ~ 7.2または6.9 ~ 7.2または7.0 ~ 7.2または7.1 ~ 7.2;または6.6 ~ 7.1または6.7 ~ 7.1または6.8 ~ 7.1または6.9 ~ 7.1または7.0 ~ 7.1;または6.6 ~ 7.0または6.7 ~ 7.0または6.8 ~ 7.0または6.9 ~ 7.0の範囲に維持され得る。pHは、第一および/または第二の培養温度/培養時間中、6.8 ~ 7.2または6.9 ~ 7.2または7.0 ~ 7.2または7.1 ~ 7.2;または6.8 ~ 7.3または6.9 ~ 7.3または7.0 ~ 7.3または7.1 ~ 7.3または7.2 ~ 7.3;または6.8 ~ 7.7または6.9 ~ 7.7または7.0 ~ 7.7または7.1 ~ 7.7または7.2 ~ 7.7または7.3 ~ 7.7または7.4 ~ 7.7または7.5 ~ 7.7または7.6 ~ 7.7の範囲に維持され得る。特にpHは(約)6.8、6.9、7.0、7.1、7.2であり得るかまたはこれらの数値の2個の任意の組み合わせにより定義される範囲であり得る。第一の培養温度/培養時間のpHは、第二の培養温度/培養時間のpHと異なってもよい。

【0049】

光学密度

培養温度を、細胞培養物の光学密度によって、第一の温度から第二の温度に低下させ得る。本発明者らは、光学密度による温度の変更が、発現タンパク質の収量にさらに好影響を有し得ることを発見した。600nmで測定した光学密度(OD)が10～50のときに培養温度を低下させるのが有益であり、27～33で行うのが特に有益であることが判明した。それゆえに、ここに記載する方法は、光学密度の測定を含み得る。600nmにおける細胞培養物の光学密度が、10～50または15～45または20～40または24～36または27～33に達したときに、培養温度を第一の温度から第二の温度に低下させ得る。600nmにおける細胞培養物の光学密度が27～32または27～31または27～30または27～29または27～28；または28～32または28～31または28～30または28～29；または29～32または29～31または29～30または30～32または30～31または31～32に達したときに、培養温度を第一の温度から第二の温度に低下させ得る。600nmにおける細胞培養物の光学密度が25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35またはこれらの値の任意の2個の組み合わせにより規定される密度に達したときに、温度を第一の温度から第二の培養温度に低下させ得る。

10

【0050】

発現系／ベクター／宿主細胞

発現のために、組み換えポリペチドを宿主細胞で発現する。ある態様において、それゆえに、上記方法の工程(a)、(b)および(c)の前に、宿主細胞に核酸を導入する工程があ

20

【0051】

微生物細胞におけるタンパク質の組み換え発現に適する種々の発現系および発現ベクターが知られている。任意の適切な発現ベクターおよび発現系を使用し得る。“ベクター”または“発現ベクター”は、宿主細胞中において特定の核酸配列の転写を可能にする一連の特定のポリ核酸エレメントを用いて、組み換えまたは合成により製造したポリ核酸構築物である。典型的に、ベクターは、プロモーターに操作可能に結合した、翻訳されるべき特定の核酸配列を含む、転写単位を包含する。プロモーターは、試薬添加、温度などの外部刺激により活性化され得る誘導性プロモーターであってよい。ベクターは、一般に“転写開始領域”、“転写停止領域”を含み、“エンハンサー”含んでよい。宿主で発現可能なベクターは、例えば自律-または自己-複製プラスミド、コスミド、ファージ、ウイルスまたはレトロウイルスであり得る。適当なベクターの例は、pBR322 (Fermentas)、pET300ベクター、pDESTベクターおよびpET39bベクター(Novagen)およびそれらの誘導体を含む。さらに適当な発現ベクターは、Laboratory handbook “Sambrook and Russell, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3rd edition 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Chapter 15”に記載されている。ある態様において、ベクターを、宿主細胞のゲノムに組み込み、すなわち組み込みベクターである。ある態様において、ベクターをゲノムに組み込まず、細胞内に別に維持される、すなわち自律的または二次ベクターである。

30

40

【0052】

ここで使用する“プロモーター”は、転写単位の発現を制御する核酸配列をいう。“プロモーター領域”は、細胞中でRNAポリメラーゼと結合し、下流(3'方向)コーディング配列の転写を開始できる制御領域である。プロモーター領域は、一般に推定-35ボックスおよびブリブノーボックス(-10ボックス)のようなRNAポリメラーゼの結合を担うタンパク質結合ドメイン(コンセンサス配列)を含む。さらに、プロモーター領域は、転写開始部位および制御タンパク質の結合部位を含み得る。

【0053】

“転写開始領域”は、シャイン・ダルガーノ配列のような、転写開始を促進し、リボソ

50

ーム結合部位のための配列を含むシグナル領域である。典型的に、転写開始領域は、転写開始部位の下流に位置し、発現する核酸／遺伝子に操作可能に結合する。

【 0 0 5 4 】

“ 転写停止領域 ” は、RNAポリメラーゼに転写を停止させる、配列をいう。転写停止領域は、通常他の近隣核酸／遺伝子の望まない転写または他の潜在的プロモーターによる転写を回避し、mRNAの安定性を高めることができる、転写単位の一部である。

【 0 0 5 5 】

“ エンハンサー ” は、転写単位の同一性、転写単位に対する配列の位置または配列の配向と無関係に、転写単位の転写を増強するために作用する核酸配列である。本発明により使用し得るベクターは、所望によりエンハンサーを含んでよい。

10

【 0 0 5 6 】

核酸配列は、他の核酸配列と機能的関係に置かれたとき、“ 操作可能に結合する ”。例えば、プロモーターは、配列の転写に影響するならばコーディング配列と操作可能に結合し、またはリボソーム結合部位のような転写開始領域は、核酸の転写を促進するように配置されるならば、例えばポリペチドをコードする核酸配列と操作可能に結合する。結合は、例えば好都合な制限部位でのライゲーションにより達成できる。

【 0 0 5 7 】

ここでいう“ 核酸 ” または“ 核酸配列 ” または“ 単離および精製した核酸または核酸配列 ” は、DNA、RNAまたはDNA／RNAハイブリッドである。核酸または核酸配列がベクター内に位置するとき、通常DNAである。ここでいうDNAは、例えば二本鎖DNA、一本鎖DNA、一方または両者の鎖が2個以上のフラグメントから成る二本鎖DNA、一方または両者の鎖が中断されていないホスホジエステル主鎖を有する二本鎖DNA、1個以上の一本鎖部分および1個以上の二本鎖部分を含むDNA、DNA鎖が十分に相補性である二本鎖DNA、DNA鎖が一部のみ相補性である二本鎖DNA、環状DNA、共有結合により閉じたDNA、直鎖状DNA、共有結合により架橋したDNA、cDNA、化学合成DNA、半合成DNA、生合成DNA、自然に単離したDNA、酵素消化DNA、剪断DNA、放射標識DNAおよび蛍光色素標識DNAのような標識DNA、核酸の1個以上の天然に存在しない種を含むDNAを含む、ポリデオキシヌクレオチド配列のいずれかであり得る。DNA配列は、標準的的化学技術により、例えば、ホスホトリエステル方法によりまたは自動化合成方法およびPCR方法を介して合成できる。精製および単離したDNA配列は酵素技術によっても製造できる。ここでいうRNAは、例えば一本鎖RNA、cRNA、二本鎖RNA、一方または両者の鎖が2個以上のフラグメントから成る二本鎖RNA、一方または両者の鎖が中断されていないホスホジエステル主鎖を有する二本鎖RNA、1個以上の一本鎖部分および1個以上の二本鎖部分を含むRNA、RNA鎖が十分に相補性である二本鎖RNA、RNA鎖が一部のみ相補性である二本鎖RNA、共有結合により架橋したRNA、酵素消化RNA、剪断RNA、mRNA、化学合成RNA、半合成RNA、生合成RNA、自然に単離したRNA、放射標識RNAおよび蛍光色素標識RNAのような標識RNA、核酸の1個以上の天然に存在しない種を含むRNAであり得る。

20

30

【 0 0 5 8 】

40

発現系は誘導性発現系であってよく、すなわち組み換えポリペチドの発現がインデューサーに依存し得る。組み換えタンパク質をコードする核酸は、誘導性プロモーターと共に発現ベクターに操作可能に結合し得る。適切なインデューサーを直接的に、例えばそれを添加することによりまたは細胞培養に適用することにより供給でき、または間接的に、すなわち宿主細胞内の第二の構築物を介して供給できる。このような宿主細胞中の第二の構築物は、誘導により、核酸の発現を誘導するシグナルを生じる。第二の構築物は、微生物宿主細胞のゲノムの一部であってよくまたは細胞内に自律的に維持されてもよい。

【 0 0 5 9 】

誘導性発現系は当分野で周知である。知られるインデューサーは、例えば、IPTG、ラクトース、NaCl、温度などである。ここに記載する方法で特に好ましいのは、IP

50

T Gでの誘導である。I P T Gをインデューサーとして使用するならば、0.1 mM ~ 1 mM、より好ましくは0.2 ~ 0.6 mM、より好ましくは0.25 ~ 0.5 mMの濃度範囲、より好ましくは0.3 ~ 0.35 mM、より好ましくは0.33 mMの濃度で使用し得る。

【0060】

好ましい態様において、発現ベクターは、誘導性プロモーター、好ましくはT7プロモーターに操作可能に結合した組み換えポリペチドをコードする核酸を含む。核酸の発現はインデューサーの存在により誘導される。T7プロモーターの場合、発現は、T7 DNA依存性RNAポリメラーゼの存在により誘導される。好ましい態様において、発現ベクターは配列番号4の配列からなるか、この配列を含む。

【0061】

このような発現ベクターに対応して、宿主細胞は適当な発現系を含み得る。例えば、微生物宿主細胞の染色体は、T7 RNAポリメラーゼのようなバクテリオファージRNAポリメラーゼのための核酸を含み得る。バクテリオファージRNAポリメラーゼは、例えばlacプロモーター(lacZタンパク質ベクター-ガラクトシダーゼプロモーター)のような誘導性プロモーターに操作可能に結合し得る。lacプロモーターは、IPTG(イソプロピル-1-チオ-β-D-チオガラクトピラノシド)の宿主細胞への添加により誘導できる。微生物宿主細胞の染色体は、好ましくは溶原性バクテリオファージ核酸配列を含まない。本発明者らは、このような発現系/発現ベクターの使用が、ここに記載する方法において特に有益であり、封入体から得られる組み換えタンパク質が高収量となることを発見した。特に、本発明者らは、この発現系/発現ベクターをここに記載する培養スキーム、すなわち(i)該微生物宿主細胞を第一の温度で培養し、ここで、宿主細胞は該組み換えポリペチドをコードする核酸を含み、(ii)培養温度を第一の温度から第二の温度まで低下させ、そして(iii)微生物宿主細胞を第二の温度で培養することと組み合わせて使用することが特に有益であることを発見した。

【0062】

それゆえに、本発明の一つの面において、封入体(宿主細胞中)において生産される組み換えポリペチドの生産方法であって、(i)組み換えポリペチドをコードする核酸を含む発現ベクターを宿主細胞に導入し、ここで、該核酸はプロモーター、好ましくは誘導性プロモーターに操作可能に結合し、(ii)該微生物宿主細胞を第一の温度で培養し、ここで、宿主細胞は該組み換えポリペチドをコードする核酸を含み、(iii)培養温度を第一の温度から第二の温度まで低下させ、そして(iv)微生物宿主細胞を第二の温度で培養する工程を含む、方法が提供される。誘導性プロモーターはT7プロモーターであり得る。微生物宿主細胞の染色体は、所望により例えばlacプロモーターのような誘導性プロモーターに操作可能に結合してよいバクテリオファージRNAポリメラーゼをコードする核酸配列を含んでよく、溶原性バクテリオファージ核酸配列を含まない。バクテリオファージRNAポリメラーゼはT7ポリメラーゼであり得る。ポリペプチドの発現をインデューサー(例えば例えばIPTG)の添加により実施する。

【0063】

上記発現系が、ここに記載する方法で特によく機能するとの発見は驚きであった。当分野では、高温での誘導は、しばしば最も一般的な誘導機構として記載されていた。本発明者らは、しかしながら、上記T7駆動発現系を記載の2段階温度培養方法で使用して、特に活性形態での発現タンパク質の収量が改善されることを発見した。

【0064】

最も好ましい態様において、宿主細胞のゲノムは、lacプロモーターに操作可能に結合したバクテリオファージRNA T7ポリメラーゼをコードする核酸を含み、溶原性バクテリオファージ核酸配列を含まない。ベクターは、組み換えポリペチドをコードする核酸を含み、該核酸はT7プロモーターに操作可能に結合する。IPTG添加により、lacプロモーターはT7ポリメラーゼの発現を誘発し、これが続いて、T7プロモーターを介して組み換えタンパク質の発現を誘発する。

【0065】

本発明者らは、インデューサーを、インキュベーション中の特定の時点、例えば、第一の温度から第二の温度への培養温度の低下と同時またはその後の添加が、さらに封入体から得られる組み換えタンパク質の高収量を促進することを発見した。インデューサーは、培養温度の第一の温度から第二の低培養温度への低下と同時または低下後添加し得る。換言すると、インデューサーを、温度を下げる時点で添加してよくまたはその後、すなわち第二の温度での第二の培養時間中に添加してよい。好ましくは、インデューサーを、温度を下げる時点で添加する。

【 0 0 6 6 】

核酸の宿主細胞への導入

目的の組み換えポリペチドを含む発現ベクターを、当分野で知られる標準的方法を使用して宿主細胞に導入し得る。

10

【 0 0 6 7 】

用語“形質転換”、“トランスフォーム”または“宿主細胞への核酸の導入”は、ベクターのような細胞外核酸が、付随する物質を伴いまたは伴わず、宿主細胞に入る過程を言う。用語“形質転換した細胞”または“トランスフォーム細胞”は、核酸が導入されており、それゆえに核酸を保持する細胞またはその子孫をいう。核酸は、該核酸が染色体組み込み体または余剰染色体要素のいずれかとして複製可能なように細胞に導入される。例えば発現ベクターでの適当な宿主細胞の形質転換は、微量注入、エレクトロポレーション、微粒子銃のような周知の方法によりまたは例えばManiatis et al. 1982, Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory or in Ausubel et al. 1994, Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sonsに記載されているリン酸カルシウム介在形質転換のような化学方法により達成できる。

20

【 0 0 6 8 】

宿主細胞

封入体での組み換えタンパク質の発現を可能にする任意の微生物細胞を、本発明により使用し得る。組み換えタンパク質の封入体を生産する微生物細胞は、例えば、細菌および酵母細胞および糸状菌細胞を含む。“宿主細胞”または“宿主”は、細菌、酵母または糸状菌細胞のような任意の微生物細胞であり得る。細菌細胞が好ましい宿主細胞であり、グラム陰性細菌が特に好ましい。例は、C 2 5 2 3、C 2 5 2 3およびB L 2 1 (D E 3)のような細胞を含む(全てNew England Biolabs)。特に好ましい宿主細胞は大腸菌細胞である。特定の発現系の適当な宿主細胞も上に記載している。

30

【 0 0 6 9 】

用語“宿主”、“宿主細胞”および“組み換え宿主細胞”は、ここでは、1個以上のベクターまたは単離および精製した核酸配列が導入されている微生物細胞を示すために、交換可能に使用する。ここでの単数表現“宿主細胞”の使用はまた、文脈から他の解釈が日必要ではない限り、複数の細胞を使用し得ることも示す。実際には、1組み換え宿主細胞での生産において、多数の宿主細胞を細胞培養に使用する。

【 0 0 7 0 】

用語“単離および精製した核酸配列”は、核酸配列が、自然環境でまたはこのような調製物をインビトロまたはインビボで組み換え技術により製造したとき製造した環境(例えば細胞培養)で共存する他の核酸のような、それが自然に共存している物質を含まないまたは実質的に含まない状態をいう。

40

【 0 0 7 1 】

用語“宿主”、“宿主細胞”および“組み換え宿主細胞”は特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の子孫または潜在的子孫もいう。変異または環境的影響によりある種の修飾が後の世代で生じ得るため、このような子孫は、事実、親細胞と同一ではないことがあるが、組み換えタンパク質またはその機能的変異体の活性形態を生産する限り、ここで使用する本用語の範囲内になお包含される(上記機能的変異体に関する記載参照)。

【 0 0 7 2 】

宿主が原核生物種からである場合、組み換え核酸配列は、生物の異なる属または科、異

50

なる目または綱、異なる動物の門(植物の門)または異なるドメイン(エンパイア)由来であり得る。

【 0 0 7 3 】

トランスフォーム宿主細胞を凍結し、保存してよい。マスター細胞バンクおよび作業細胞バンクを調製し、生存能、同一性、純度および安定性について試験し得る。

【 0 0 7 4 】

さらなる細胞培養条件

微生物細胞の培養のための一般的設定および培養条件は十分確立されており、ここで要旨のみを記載する。標準的細胞培養パラメーターを、当分野で共通の一般的知識に基づき調節し得る。

【 0 0 7 5 】

細胞培養培地に、トランスフォーム微生物宿主細胞のサンプルを接種する。適当な培養培地は当分野で知られ、例えばG B A培地、S O C (Super optimal carbon)培地、L B (ルリア)培地またはR B Y培地を含む。種々の量の培養培地が接種され得る。培養は、例えば実験室使用での小規模培養、例えば1 ml ~ 1 Lの培養培地であり得る。ここに記載する方法はまた産業規模、すなわち実製造規模までの大きな体積にまで特に有用である。ここに記載する方法は、それゆえに、産業使用のための大規模処理を含む大細胞培養体積で実施できる。培養物は1 ~ 5 Lまたは1 ~ 1 0 Lまたは1 ~ 1 0 0 Lまたは1 ~ 5 0 0 Lまたは1 ~ 1 0 0 0 Lまたはそれ以上の範囲であり得る。培養物は5 ~ 5 0 0 0 Lまたは1 0 ~ 5 0 0 0 Lまたは5 0 ~ 5 0 0 0 Lまたは1 0 0 ~ 5 0 0 0 Lまたは5 ~ 1 0 0 0 Lまたは1 0 ~ 1 0 0 0 Lまたは5 0 ~ 1 0 0 0 Lまたは1 0 0 ~ 1 0 0 0 Lの範囲であり得る。

【 0 0 7 6 】

ある態様において、最初に種培地を接種する。種培養物を、特定の光学密度に達するまで培養する。種培養物を、6 0 0 nmでの光学密度が0.5 ~ 1.5または0.6 ~ 1.4または0.7 ~ 1.3または0.8 ~ 1.2または0.9 ~ 1.1の範囲内になるまで培養し得る。好ましい光学密度は0.9 ~ 1.1の範囲内である。次いで、種培養物を新鮮培地を仕込んだ大容量バイオリアクターに移す。

【 0 0 7 7 】

当業者には知られているように、効率的細胞増殖を確保にするために、細胞培養物中の、例えば、溶存酸素レベルおよび栄養分をモニターする必要がある。

【 0 0 7 8 】

供給速度は直線的であり得る。ある態様において、溶存酸素(D O)レベルが、炭素源消費により、設定値から急勾配で上昇し始めたら、供給物の直線的添加を開始し得る。D O設定値は1 0 % ~ 5 0 %、2 0 % ~ 4 5 %、3 0 % ~ 4 5 %、3 5 % ~ 4 5 %、3 7 % ~ 4 2 %または3 9 % ~ 4 0 %であり得る。D Oは3 5 %、3 6 %、3 7 %、3 8 %、3 9 %、4 0 %、4 1 %、4 2 %、4 3 %、4 4 %または4 5 %であってよく、またはD Oはこれらの値の2点の任意の組み合わせであり得る。好ましくは、D Oは4 0 %である。

【 0 0 7 9 】

適当な栄養分は当分野で知られている。炭素源として、糖アルコール、好ましくはグリセロールを培地に使用し得る。本発明者らは、炭素源としてのグリセロールが高増殖率および高バイオマスをもたらすことを発見した。供給培地の組成は、特にアミノ酸(主としてL - メチオニン、L - グルタミンおよびL - ロイシン)およびミネラル(例えば塩、リン酸塩、硫酸塩)を含み得る。使用する全物質は非動物源由来である。

【 0 0 8 0 】

1 種以上の消泡剤または選択剤を使用し得る。消泡剤としてP P G 2 0 0 0、J M 6 3 3、S B 2 0 2 0を使用し得る。発酵プロセスは、さらに選択剤として硫酸カナマイシン(アミノグリコシド系抗生物質)を含み得る。

【 0 0 8 1 】

使用する実際の宿主細胞によって、さらなる成分が必要となり得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 2 】

下流プロセッシング

“下流プロセッシング”は、培養物から回収した細胞のさらなる処理を含む。細胞は、組み換えタンパク質を伴う封入体を含む。

【 0 0 8 3 】

トランスフォーム宿主細胞を含む細胞培養物の培養後、細胞を、低速遠心分離または分離器を使用して培養培地から分離できる。細胞溶解後、組み換えタンパク質を含む封入体を得る。ある態様において、本明細書のどこかに記載する方法は、それゆえに、さらに宿主細胞から封入体を得る工程を含み得る。

【 0 0 8 4 】

封入体は標準的方法により得ることができる。宿主細胞から封入体を得る方法は、一般に細胞の溶解および破壊と、その後の遠心分離を含む。封入体は、分離器(例えば遠心分離により、例えば約 1 1 0 0 0 g)中で細胞を回収し、細胞を機械的に、例えば高圧ホモジナイザー(例えば約 1 0 0 0 パールで)で破壊し、続いて細胞残屑から封入体を分離器(例えば遠心分離により、例えば約 1 1 0 0 0 g)中で分離することにより得ることができる。古典的封入体の大部分を含むペレットを、通常界面活性剤を含む適当な緩衝液で洗浄する。封入体は適当な緩衝液中に保存し得る。適当な緩衝液は、例えばリン酸、クエン酸、酢酸、酒石酸緩衝液または水のような、あらゆる生物学的に許容される緩衝液である。封入体は、適当な緩衝液中、- 8 0 で少なくとも 8 ヶ月保存しても、保存工程を経ずさらに処理してもよい。

【 0 0 8 5 】

G - C S F の単離のために、古典的封入体を、例えば 1 % デオキシコレート(Zsebo KM et al (1986) Immunobiology 172:175-184 ; E P 2 3 7 5 4 5 ; U S 5 8 4 9 8 8 3) または 0 . 1 % T w e e n 8 0 を添加した 1 . 0 M N a C l 溶液(Gelunaite L et al (2000) J Chromatogr A 904:131-143)で洗浄するのが好都合であると報告されている。

【 0 0 8 6 】

封入体を得た後、組み換えタンパク質を封入体から可溶化しなければならない。ある態様において、本明細書のどこかに記載する方法は、さらに(i)封入体を得て、そして(ii)封入体から組み換えタンパク質を得る工程を含み得る。本発明はまたここに記載する方法により得られるまたは得た組み換えタンパク質も提供する。

【 0 0 8 7 】

封入体は、上に示す一般的技術を使用して得ることができる。天然の条件下一般的水性緩衝液または水溶液に不溶性である正しく折り畳まれた生物学的に活性なタンパク質を封入体から生産するために、封入体を細胞から単離し、洗浄し、可溶化し、次いでインビトロで再生を行う。

【 0 0 8 8 】

封入体から組み換えタンパク質を、一般的技術を使用して得ることができる。例えば、E P 0 2 1 9 8 7 4 は、大腸菌封入体からの組み換えタンパク質の再折り畳みのための一般的方法を開示する。可溶化のために、カオトロピック剤である G u H C l およびアルギニンを高 pH で用いている。E P 0 2 1 9 8 7 4 は、G S H / G S S G により提供されるレドックス条件下のジスルフィド架橋の形成を記載する。単量体可溶性 G - C S F を得る方法は、例えば Zsebo 1986、W O 8 7 / 0 1 1 3 2、Devlin 1988、Holloway 1994、W O 0 1 / 0 4 1 5 4、U S 5 0 5 5 5 5 5 に記載されている。さらなる方法が、W O 8 9 / 1 0 9 3 2、Lu 1992、Heidari 2001、Wingfield 1988、Kang 1998、W O 9 8 / 5 3 0 7 2、Wang 2005、W O 0 1 / 8 7 9 2 5、W O 2 0 0 4 / 0 1 5 1 2 4、W O 2 0 0 4 / 0 0 1 0 5 6、W O 2 0 0 6 / 0 9 7 9 4 4、W O 2 0 0 6 / 1 3 5 1 7 6、E P 1 6 3 0 1 7 3、E P 1 8 3 7 3 4 6、Rao 2008、Khalilzadeh 2008、W O 2 0 0 8 / 0 9 6 3 7 0、W O 2 0 1 0 / 1 4 6 5 9 9 に記載されている。

【 0 0 8 9 】

例えば W O 8 9 / 1 0 9 3 2 および E P 0 7 1 9 8 6 0 は、組み換え G - C S F を微生物

10

20

30

40

50

物から単離および精製する方法を記載する。WO 89 / 10932 および EP 0719860 に記載の方法は、微生物を溶解し、G - C S F を含む不溶性物質を可溶性タンパク質性物質から単離し、可溶化剤および酸化剤存在下で G - C S F を可溶化および酸化し、架橋スチレン - ジビニルベンゼンポリマーマトリックスを有するDOWEXイオン交換樹脂を使用して可溶化剤を除去し、G - C S F をイオン交換クロマトグラフィーに付し、精製 G - C S F を回収することを含む。イオン交換クロマトグラフィーは、アニオン交換クロマトグラフィー(A E X)と、続くカチオン交換クロマトグラフィー(C E X)であり得る。細胞溶解は、Gaulinホモジナイザーと、続くペレット回収のための遠心分離により実施し得る。封入体の洗浄は、例えば、デオキシコレートまたは他の胆汁酸塩または非イオン性界面活性剤を用いて実施し得る。可溶化剤はサルコシルであってよく、酸化剤は硫酸銅であってよい。次いで、サルコシルをDowexまたは他のイオン交換樹脂を用いるバッチ吸着を使用して除去する。次いで、A E X および / または C E X クロマトグラフィーをさらなる精製のために使用してよい。

10

【0090】

このような精製方法は、封入体から G - C S F を可溶性の、単量体でかつ正しく折り畳まれた形態で得ることを可能にする。タンパク質を、さらにイオン交換クロマトグラフィーを使用して、単量体および酸化形態のみに使用し得る。凝集物、二量体または他に誤って折り畳まれたタンパク質は沈殿し、フィルターおよびカラム上に残る。G - C S F は、正しく折り畳まれた、単量体形態で生物学的に活性である。

【0091】

20

それゆえに、ここに記載する方法により得た単量体の可溶性 G - C S F は正しく折り畳まれ、ゆえに生物学的に活性であることが推定できる。G - C S F の生物活性は、実施例 13 に示す方法を使用して試験し得る。

【0092】

本発明者らは、またここに新規かつ進歩性のある下流プロセッシング方法を記載し、これは、ここに記載する上流細胞培養(発酵)方法と組み合わせて使用し得る。これは、さらに正しく折り畳まれた組み換えタンパク質の収量を増やす。下流プロセッシング方法は、組み換えタンパク質を可溶化し、酸化および1回目の再折り畳み工程を実施し、可溶化剤を除去し、2回目の再折り畳み工程を実施する工程を含む。特に、ここに記載する培養方法は、封入体からの組み換えタンパク質の再折り畳みのための方法と組み合わせて実施でき、該方法は：

30

- a) 可溶化剤の存在下で組み換えタンパク質を可溶化し；
- b) 酸化剤および可溶化剤の存在下で組み換えタンパク質をインキュベートすることを含む、酸化および1回目の再折り畳み工程を実施し；
- c) イオン交換樹脂吸着および / またはイオン交換クロマトグラフィーにより可溶化剤を除去し、所望により酸沈殿を実施し；そして
- d) 工程(c)の組み換えタンパク質を可溶化剤非存在下で希釈およびインキュベートすることを含む、2回目の再折り畳み工程を実施することを含む。

【0093】

40

封入体は微生物、好ましくは大腸菌から得ることができる。可溶化剤はN - ラウロイルザルコシンであり得る。酸化剤はC u S O₄であり得る。可溶化はp H 7 より高いp H 値で実施し得る。可溶化剤は、約0.5% ~ 約1.5%の濃度のN - ラウロイルザルコシンであり得る。酸化および1回目の再折り畳み工程は少なくとも2時間実施し得る。酸化および1回目の再折り畳み工程は、通気下、冷却せずに実施し得る。酸化および1回目の再折り畳み工程は、約7 ~ 9のp H 値および / または約20 ~ 28 の温度および / または15 ~ 25時間実施し得る。

【0094】

上記工程(c)における可溶化剤は、A E X (アニオン交換)およびC E X (カチオン交換)を、所望によりこの順番で含み得る。上記工程(c)における可溶化剤の除去は：

50

- a) 組み換えタンパク質溶液と懸濁樹脂物質の混合によるイオン交換樹脂物質への結合および濾過による樹脂物質の除去および/または
- b) 可溶化剤が樹脂と結合し、組み換えタンパク質が通過画分に残る条件下でのイオン交換クロマトグラフィーおよび/または、
- c) 組み換えタンパク質が樹脂と結合し、可溶化剤が通過画分に残る条件下でのイオン交換クロマトグラフィーを含む。

【0095】

可溶化剤および他の不純物を、次の工程の連続的適用により除去し得る：AEX、酸沈殿、AEXおよびCEX。可溶化剤および他の不純物を、次の工程の連続的適用により除去し得る：

10

- a) 組み換えタンパク質溶液と懸濁樹脂物質の混合による可溶化剤のイオン交換樹脂物質への結合および濾過による樹脂物質の除去；
- b) pHをpH5より低く下げることによる不純物の沈殿および濾過による沈殿の除去；
- c) 残留可溶化剤が樹脂に結合し、組み換えタンパク質が通過画分に残る条件下で行うアニオン交換クロマトグラフィー；
- d) 組み換えタンパク質が樹脂に結合し、残留可溶化剤が通過画分に残る条件下で行うカチオン交換クロマトグラフィー；および
- e) pHまたは塩濃度を増加させながら溶出緩衝液を使用することによる、段階的または勾配溶出による、カチオン交換樹脂からの結合した組み換えタンパク質の溶出。

20

【0096】

2回目の再折り畳み工程は低伝導率緩衝液中および/または冷却条件下および/または12時間を越える時間で実施し得る。2回目の再折り畳み工程は、2.0mS/cm未満の伝導率および/または約2~8の温度および/または少なくとも24時間かけて実施し得る。2回目の再折り畳み工程は、pH7を超えるpH値で実施し得る。

【0097】

上記の封入体からの組み換えタンパク質を再折り畳みする方法は、さらに1回以上のイオン交換クロマトグラフィーを含み得る、仕上げ工程(Polishing step)を含み得る。仕上げ工程における1回以上のイオン交換クロマトグラフィーは、アニオン交換クロマトグラフィーと、続くカチオン交換クロマトグラフィーを含み得る。

30

【0098】

ここで、種々の工程を記載する：

可溶化：封入体(IB)フラクションの組み換え物を可溶化剤存在下に可溶化する。任意の適当な可溶化剤を使用し得る。このような可溶化剤は、例えば(しかし限定されない)GuHClまたはウレアのような変性剤またはカオトロピック剤の群または例えば(しかし限定されない)N-ラウロイルサルコシン(サルコシル)、ラウリン酸、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)またはN-セチルトリメチルアンモニウム塩化物のような洗剤、界面活性剤またはサーファクタントの群から、例えば、選択される(しかしこれらに限定されない)。好ましい態様において、可溶化を、サルコシルをアルカリpHで、優先的にpH8で用いて、好ましくは0.2~2.0%(w/v)、より好ましい態様において約0.5%~1%(w/v)および最も好ましくは約1%(w/v)または1%(w/v)のサルコシルの濃度で行う。可溶化のための好ましい緩衝液は、Tris-HCl/pH8、優先的に40mM Tris-HCl/pH8である。可溶化後、希釈工程を、水または低伝導率(すなわち少なくとも2mS/cmより低い、より好ましくは1mS/cmより低い伝導率)の緩衝液を用いて実施し得る。

40

【0099】

1回目の再折り畳み(酸化的折り畳み)：1回目の酸化的再折り畳み工程を、有効量の可溶化剤、例えばサルコシルおよび酸化剤、例えばCuSO₄(または酸素または気流(通気))、GSSG(グルタチオン-ox)、金属イオン(Cu²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺...)、過酸

50

化物(H_2O_2)のような他のもの)の存在下で実施する。本発明者らは、可溶化剤、例えばサルコシルの存在下で、組み換えタンパク質の折り畳みは十分には達成できないことを発見した。本発明者らは、可溶化剤の完全な除去と、続く可溶化剤非存在下の2回目の折り畳み工程が組み換えタンパク質の収量を改善することを発見した。

【0100】

可溶化剤および酸化剤の除去および他の不純物の除去：任意の適当な除去方法を使用し得る。例えば、イオン交換樹脂吸着および/または酸沈殿および/またはイオン交換クロマトグラフィーにより十分な除去が達成できる。これらの技術の任意の一つまたは組み合わせの適用により、サルコシルのような可溶化剤の濃度を、2回目の再折り畳み工程における再折り畳みを妨害しない濃度、好ましくは 0.01 mg/ml 、好ましくは検出限界未満にする(残留可溶化剤の濃度は、HPLCとUVでの検出により測定し得る。本方法は、Burgess, R. R. 1996. Purification of over produced E. coli RNA polymerase σ factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from sarkosyl. Methods Enzymol. 273:145-149にさらに詳細に記載されている)。これらの精製工程は、可溶化剤の完全な除去に至るならば、任意の順番および/または任意の組み合わせで適用し得る。他の適当な精製方法も使用できる。可溶化剤および他の不純物を、次の工程の連続的適用により除去し得る：AEX、酸沈殿、AEXおよびCEX。イオン交換樹脂吸着、酸沈殿およびイオン交換クロマトグラフィー、例えばAEXまたはCEXを実施するための適当な物質および条件は当分野で知られ、市販されている。

【0101】

2回目の再折り畳み(折り畳みの完了)：2回目の再折り畳み工程は、水または低伝導率緩衝液での、例えば、2倍の希釈、次いで、一部再折り畳みされたG-CSFの、好ましくはpH8のような穏やかなアルカリpHでのインキュベーションを含む。2回目の再折り畳み工程のための好ましい緩衝液はTris-HCl/pH8、優先的に $10\text{ mM Tris-HCl/pH8}$ である。

【0102】

最終精製(仕上げ工程)：さらに、所望により組み換えタンパク質の所望の程度の純度が達成されるまで、AEXおよび/またはCEXを含む、仕上げ工程を所望により実施してよい。

【実施例】

【0103】

実施例1：

G-CSFの製造

物質および方法

1. 宿主細胞株の生産

T7 RNAポリメラーゼカセットの製造

lacオペロンの制御ドメインに操作可能に結合した機能的T7 RNAポリメラーゼ(受託番号AY264774、タンパク質AAP33914.1)を含む 4.44 kb 遺伝子カセットを単離するために、大腸菌BL21(DE3)株(Novagene)からのゲノムDNAを使用した。DNAを、標準的プロトコールを使用してQuiagen Genomic tip-20キット(Quiagen, Hilden, Germany)を用いて製造した。次いでT7カセットをPCR反応により増幅した。増幅を、 $100\text{ }\mu\text{l}$ 反応体積で、KOD HiFi DNAポリメラーゼ(Merck, Darmstadt, Germany)を使用して行った。反応混合物は、DNAポリメラーゼ緩衝液、 $5\text{ U KOD HiFi DNAポリメラーゼ}$ 、 2 mM MgCl_2 、 $250\text{ }\mu\text{M dNTPs}$ 、 100 ng DNA 鋳型、 $10\text{ }\mu\text{M}$ 順方向プライマー(IntLambd 1)、 $10\text{ }\mu\text{M}$ 逆方向プライマー(IntLambd 2)を含んだ。反応のために、PCRサイクラー[MJ Research PTC-200]を次の設定で使用した：変性 98°C で30秒、続いて35サイクル30秒、 98°C (変性)、30秒、 65°C (アニーリング)、2分、 72°C (合成)。最終合成を10分、 72°C で行った。

【0104】

ラムダファージのInt遺伝子からの次のプライマーをPCR反応に使用した：

IntLambd 1: GTCCGACTTATGCCCGAGAAGATGTTGAGCAAACCTTATCGCTTATC

IntLambd 2: TGCAAAGAGATTCTTGCGGAGAAACCATAATTGCATCTACTCG

【 0 1 0 5 】

DNAを、PCR溶液からMillipore Montage PCR Cleanup Kitを用いて精製した。Qiaquick Gel Extraction Kitからの3体積ゲル可溶化溶液を反応溶液に添加し、サンプルを遠心分離した。その後400 µlの水およびゲル可溶化溶液混合物(1:3比に混合)を添加した。遠心分離後、フィルター上に保持されたDNAを3×400 µl TE緩衝液で洗浄し、DNAを45 µlの無菌水に取り込んだ。5 µlのBamHI緩衝液を単離したPCR産物に添加し、混合物を10単位のBamHI制限酵素で4時間、37℃で消化させ、上記方法に従い精製した。pBR322プラスミドを、XL1-Blue MRF細胞から、HiSpeed Plasmid Midi Kitを使用して精製した。1 µgの精製プラスミドを5単位のBamHI酵素で4時間、37℃で、BamHI緩衝液で調製した20 µl反応混合物中で消化させた。ベクターの自己閉鎖を避けるために、末端に結合したリン酸基を0.5単位のBAP(細菌アルカリホスファターゼ)酵素で消化した(30分、60℃でインキュベーション)。ベクターを1%TAEアガロースゲルで分離し、Qiaquick Gel Extraction Kitの使用により精製した。精製をキットのプロトコールに従い行い、最後にベクターを50 µl体積で溶出した。精製ベクターおよびインサートを混合し、T4 DNAリガーゼで、一夜、16℃で200 µl反応混合物中処理した。処理後、DNAを、3体積のエタノールで沈殿させ、蒸発後、50 µlの無菌水に溶解した。

【 0 1 0 6 】

組込み構築物の製造

上記単離T7 RNAポリメラーゼカセットを、修飾BL21大腸菌株C2523H(New England Biolabs)の染色体DNAに導入するために、上記単離T7 RNAポリメラーゼカセットを705-pmjプラスミドにクローン化した。このプラスミドは、温度感受性複製起点を含む。

【 0 1 0 7 】

組込み構築物の製造のために、HiSpeed Plasmid Midi Kitを使用してXL1-Blue MRF細胞[Stratagene]から得た4 µg pBR322/T7プラスミドからのインサートを、50 µl SalI緩衝液中ClaI/SalI酵素により開裂した。消化を4時間、37℃で続けた。消化により、pBR322のClaI/SalIフラグメントおよびT7ポリメラーゼ含有フラグメントの2個のフラグメントが得られた。

【 0 1 0 8 】

pLacZベクターを、HiSpeed Plasmid Midi Kitを使用してXL1-Blue MRF細胞から獲得した。LacZ遺伝子の末端を、EcoRI/ClaI酵素を4時間、37℃適用することにより、pLacZベクターから除去した。HiSpeed Plasmid Midi Kitを使用して精製した2 µgのDH5α[Invitroge]トランスフォーム705-pMJプラスミド[Gene Bridges GmbH]を、0.01単位EcoRI酵素含有EcoRI緩衝液で30分消化した。一部消化したプラスミドDNAを、Qiaquick Gel Extraction Kitにより精製し、SalI酵素含有SalI緩衝液で4時間、37℃で消化し、プラスミドを0.5単位のBAP酵素(細菌アルカリホスファターゼ)で30分、60℃で脱リン酸化した。

【 0 1 0 9 】

インサートおよびベクターを、それぞれ1%TAEアガロースゲルで流し、Qiaquick Gel Extraction Kitを使用して精製し、混合し、16時間、200 µl体積でライゲートした。

【 0 1 1 0 】

その後、DNAをエタノールで沈殿させ、蒸発後、pET3dに挿入されたRFPタンパク質の遺伝子を含むDH5α細胞に電気穿孔で入れた。ベクター(705-pMJプラスミドおよびその誘導体の増殖のために、適当な得るためにDH5α細胞を使用した)。赤色細胞の4個を増幅し、プラスミドを、全インサートを含むか否かについて分析した。得られた構築物をpMJ-LacI-LacUV-T7Pol-LacZと命名した。その後、pMJ-LacI-LacUV-T7Po

10

20

30

40

50

I-LacZプラスミドをHiSpeed Plasmid Midi Kit(Quiagen)で精製し、C 2 5 2 3 修飾 B L 2 1 細胞にトランスフォームした。

【 0 1 1 1 】

2. G - C S F 発現ベクターおよびトランスフォーム宿主細胞の製造

G - C S F 発現ベクター：

G - C S F のための特異的発現ベクターを構築した。N - (L - メチオニル)顆粒球 - コロニー刺激因子(m e t H u G - C S F)の5 2 5 bp長完全長ヒトc D N A 配列は、例えばE P 0 4 0 1 3 8 4 に公表された付加的N末端メチオニン残基を有する、ヒトG - C S F の1 7 4 アミノ酸アイソフォームと同一のタンパク質をコードする。

【 0 1 1 2 】

発現構築物を、r - m e t H u G - C S F D N A [受託番号AR049895]を修飾p E T 3 9 b ベクター(New England Biolabs)のN d e I - X h o I 位置することにより製造し、S ambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989) and Glover, D.M., IRL Press, Oxford, 1985に記載のとおり、p R G / G C S F a プラスミドを製造した。

【 0 1 1 3 】

5 2 3 4 bp長p R G / G C S F a ベクターは、抗生物質(カナマイシン)耐性遺伝子(K a n)を8 2 2 - 7 位に、T 7 プロモーター、合成r - m e t H u G - C S F 遺伝子(G - C S F)、T 7 ターミネーター、l a c I リプレッサー(L a c I)および複製起点(O r i)を含む。本ベクターの模式図を図1に示す。

【 0 1 1 4 】

本ベクターを、エレクトロポレーションを使用して、項目1の下で得た宿主細胞にトランスフォームした。

【 0 1 1 5 】

3. 細胞培養

1 0 0 mlの無菌種培養培地(R B Y)に、W C B (作業細胞バンク)細菌細胞懸濁液を、無菌条件下接種した。摂取した種培養物を、3 7 °C で、1 8 5 rpmで一定撹拌しながら2 4 時間インキュベートした。種培養物の光学密度が、6 0 0 nmの光学密度で1.0に達したとき、種培養液を2 0 L バイオリアクター(可動容積1 5 L)に移す。接種した種培養液を、1 8 時間、3 7 °C で、4 0 0 rpmで一定に撹拌し、1 5 L / 分の速度で通気しながらインキュベートした。種培養物の6 0 0 nmの光学密度が約0.9に達したとき、回収した種培養物を、合成成分および炭素源としてのグリセロールを含むG B A 培地を含む1 0 0 0 L バイオリアクター(可動容積5 0 0 L)に移す。培養を、3 7 °C での液内培養により厳密な好気条件(D O = 3 0 %)下に行った。全培養期間中、p H 値を6.8 ~ 7.2の範囲に維持した。

【 0 1 1 6 】

溶存酸素(D O)レベルが設定値(D O = 4 0 %)から急勾配で上昇し始めたら、直線的供給物添加を開始した。培養物の光学密度が、6 0 0 nmの光学密度で3.0に達したら、発酵温度を3 2 °C に下げた。温度の低下に続き、I P T G を培養に添加して、高レベル標的タンパク質発現を誘導した。5 時間の誘導時間後、炭素源供給を止め、撹拌および通気を低下させることにより発酵を停止し、細胞培養物を1 5 分未満まで冷却し、細胞を回収した。主発酵は全体で2 1 時間を要した。

【 0 1 1 7 】

炭素源として、グリセロールを培地に使用した。炭素源としてのグリセロールは高増殖率および高バイオマスをもたらした。供給培地組成は、アミノ酸(L - メチオニン、L - グルタミンおよびL - ロイシン)および鉱物(例えば塩、ホスフェート、スルフェート)を含んだ。使用するすべての物質は、非動物源由来であった。消泡剤として、S B 2 0 2 0 を使用した。発酵プロセスは、さらに硫酸カナマイシン(アミノグリコシド系抗生物質)を選択剤として含んだ。

【 0 1 1 8 】

10

20

30

40

50

4. 中流プロセッシング

1. 封入体(I B)の調製

発酵後、封入体の調製を実施した。攪拌、通気および炭素源供給を停止し、培養物を15 未満に冷却し、細菌を、11000 gで分離することにより回収した。細胞は回転子中に沈降し、水により洗い出した(排出)。細菌細胞濃縮物を回収し、水により半分の体積まで希釈し戻し、0.5 M NaH_2PO_4 を10 mMの最終濃度まで添加した。細胞を、ホモジナイザーを3回通すことにより、加圧(100 MPa)下に破壊した。封入体を、分離器中、11000 gでの沈降により細胞残屑から分離した。沈降した封入体を、5 mM DTT、10 mM NaH_2PO_4 、5 mM EDTAおよび2% Tween 20含有洗浄緩衝液、pH 7.2に排出した。濃縮I B懸濁液を同緩衝液で2倍に希釈し、再び沈降させた。この洗浄工程を10 mM NaH_2PO_4 緩衝液を使用して2回繰り返し、2回目の終了時には希釈しなかった。I Bの最終沈降物を-80 で保存したものは、8ヶ月安定であった。

10

【0119】

凍結封入体を融解後、G-CSFを、当分野で十分に確立されている方法により可溶化、再折り畳みおよびさらなる精製をすることができる。適当な方法は、例えばUS 5849883に記載されている。

【0120】

結果

表1は、上記形質転換宿主細胞の発酵の結果を示し、ここで、第一の培養温度は37であり、第二の培養温度はそれぞれ25、30、32、35 または37であった。

20

【0121】

結果は、培養中の温度の低下が可溶化G-CSFの収量増加に至ることを明らかに示す。特に、32~35の第二の培養温度でのインキュベーションが収量増加をもたらすことは明らかである。32の第二のインキュベーション温度が特に有効であった。

【0122】

実施例2：発酵および発現

G-CSF(フィルグラスチム)を、組み換え大腸菌C2523 T7 pol pRG/GCSFaクローン(G-CSF含有発現ベクターでトランスフォームした大腸菌)を用いて生産した。無菌条件下、調製した種培養培地に、液体窒素中で保存していた融解作業細胞バンクバイアルから得た0.10~0.15 cm³細胞懸濁液を接種した。接種した種培養フラスコを、旋回シェーカーインキュベーター中、37で185 rpmで、24~28時間インキュベートした。6個の振盪フラスコ培養の600 nmでの光学密度(OD)の平均値が0.9~1.1に達したとき、フラスコの内容物を、シリコンチューブを備えた無菌5 dm³ガラスフラスコに回収した。回収した3 dm³体積種培養を、WM 323 U/Rポンプで、無菌および補給生産培地(GBA、合成培地と炭素源としてのグリセロール)で75 dm³を仕込んだ100 dm³発酵槽に移した。培養を、厳しい好気条件下、37での液内培養で行った。培地の炭素源が使い尽くされたら、グリセロール供給溶液を、適当な速度で培養に添加した。溶存酸素濃度を、全培養期中、30%以下にならないレベルに維持した。培養物のOD値が30に達したら、温度を32に下げ、0.33 mM IPTGを添加して、G-CSF発現を誘発した。細菌を、さらに5時間、80~95のODまでG-CSFを生産するために培養した。

30

40

【0123】

実施例3：細菌回収

攪拌、通気および炭素源供給を停止し、培養物を15 未満に冷却し、細菌を11000 gでの分離により回収した。細胞は回転子中に沈降し、水により洗い出した(排出)。細菌細胞濃縮物を回収し、水により半分の体積まで希釈し戻し、0.5 M NaH_2PO_4 を10 mMの最終濃度まで添加した。湿細菌細胞(バイオマス)の総質量は約10~11.5 kgであった。

50

【 0 1 2 4 】

実施例 4：細菌および封入体調製物の溶解

分離し、洗浄した細菌を、ホモジナイザーを 3 回通すことにより、加圧 (100 MPa) 下に破壊した。封入体を、分離器中、11000 g での沈降により細胞残屑から分離した。沈降した封入体を、5 mM DTT、10 mM NaH_2PO_4 、5 mM EDTA および 2 % Tween 20 含有洗浄緩衝液、pH 7.2 に排出した。濃縮 IB 懸濁液を同緩衝液で 2 倍に希釈し、再び沈降させた。この洗浄工程を 10 mM NaH_2PO_4 緩衝液を使用して 2 回繰り返し、2 回目の終了時には希釈しなかった。IB の最終沈降物を -80 で保存した。

【 0 1 2 5 】

実施例 5：封入体の可溶化

凍結封入体 (650 g 湿質量) を融解し、総体積 32.5 dm^3 で 40 mM Tris-HCl、pH 8 および 1 % (w/v) N-ラウロイルサルコシル (サルコシル) を含む可溶化緩衝液に溶解した。懸濁液を、室温で連続的攪拌下にインキュベートした。

【 0 1 2 6 】

実施例 6：酸化の再折り畳み (1 回目の再折り畳み)

可溶化 IB 懸濁液を、総体積の 65 dm^3 中最終濃度として 0.5 % サルコシル および 20 mM Tris-HCl まで水で 2 倍濃縮した。 CuSO_4 を、最終濃度 $40 \mu\text{M}$ まで添加した。G-CSF は、ヘッドスペースに通気しながら、室温で少なくとも 20 時間連続的攪拌して酸化することにより、一部再折り畳みされた。酸化を、最終濃度 1 mM の EDTA 添加により停止させた。

【 0 1 2 7 】

実施例 7：AEX バッチ吸着によるサルコシル除去

サルコシルを、アニオン交換 (AEX) 樹脂にバッチ・モードで吸着させた。サルコシル 1 g あたり 20 g AG 1-X8 樹脂 (BioRad, USA) の量を適用し、溶液に添加した。懸濁液を 2 時間攪拌して、大部分のサルコシルを結合させた。樹脂を、 $100 \mu\text{m}$ 細孔径ナイロンバッグフィルターメッシュで濾過した。濾液に残存するサルコシルを、続く精製工程 (実施例 8 および 9) により生成物から完全に除去した。

【 0 1 2 8 】

実施例 8：酸 pH での混入物の沈殿

pH 4.3 ~ 4.5 での酸性沈殿により、G-CSF は溶存したままで、幾分かの不純物は容易に除去された。G-CSF の非特異的な、望まない共沈を、最終濃度 1 M ウレアの添加により阻止した。ウレアは、6 M 原液として提供され、実施例 6 の濾液に 1 dm^3 / 分の速度でゆっくり添加した。その後、pH を 1/20 体積の 1 M 酢酸ナトリウム pH 4.8 により低下させた。pH を、50 % 酢酸での滴定によりさらに 4.3 ~ 4.5 まで低下させ、少なくとも 1 時間沈殿させた。次いで、沈殿物質を、デブスフィルター (Pall K700/KS50 dual layer) による濾過により除去した。

【 0 1 2 9 】

実施例 9：直列接続 AEX + CEX クロマトグラフィーによる残留サルコシル除去および緩衝液交換

酢酸ナトリウム 50 mM / pH 4.5 緩衝液を、1) DEAE Macro-Prep (Bio-Rad, USA) AEX 樹脂充填 4 dm^3 カラム および 2) Toyopearl SP-650C (東ソー、日本) CEX 樹脂充填 8 dm^3 カラムの平衡化に使用した。両カラムを、直列配置で AEKTA プロセスクロマトグラフィー系 (GE Healthcare, Sweden) と接続した。 $0.2 \mu\text{m}$ 無菌フィルターで浄化後、実施例 7 の濾液を第一のカラムに載せた。残留サルコシルは DEAE 樹脂に結合し、一方 G-CSF は未結合のままであり (非結合モード)、第一のカラムの通過画分に溶出された。この通過画分を直接第二のカラム (SP 樹脂) に乗せ、これは G-CSF と結合した (結合モード)。20 mM Tris-HCl / pH 8 での 1 工程溶出で、樹脂から G-CSF を脱離させた。この二段操作により、残留サルコシルの除去とともに、酢酸 Na / pH 4.5 から Tris-HCl / pH 8 への緩衝液交換もこの方法により達成した。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 0 】

実施例 1 0 : 2 回目の再折り畳み(折り畳みの仕上げ)

この段階で、タンパク質フラクションの約半分の折り畳みが完了していたが、残りのタンパク質は不完全に折り畳まれているかまたは誤って折り畳まれていた。G - C S F 溶液は、Toyopearl SP-650Cから 2 0 m M T r i s - H C l、p H 8 中に溶出し、0.2 μm 無菌フィルターを通してステンレススチール容器に入れた。濾過した溶液を水で 2 倍に希釈した。タンパク質折り畳み(2 回目の再折り畳み)のための 2 回目のインキュベーションを、低電導率環境(< 1 m S / c m)で、p H 8 で 2 ~ 8 に冷却下、3 2 ~ 4 2 時間行った。

【 0 1 3 1 】

実施例 1 1 : A E X クロマトグラフィーによる精製(仕上げ工程 1)

10

カラムに、DEAE Macro-Prep(Bio-Rad, USA)を充填し、1 0 m M T r i s - H C l / p H 8 で平衡化した。2 回目の再折り畳み(実施例 9)由来の溶液を D E A E カラムに充填した。正しく折り畳まれた G - C S F を、1 0 m M T r i s - H C l / p H 8 中、0 m M ~ 2 0 0 m M への直線的 N a C l 増加勾配で溶出した。溶出 G - C S F を貯留し、水で 2 倍に希釈した。p H を、5 0 % 酢酸での滴定により 4.5 に調節した。

【 0 1 3 2 】

実施例 1 2 : C E X クロマトグラフィーによる精製(仕上げ工程 2)

最終仕上げ工程のために、正しく折り畳まれたタンパク質から成る A E X クロマトグラフィー(実施例 1 0)から回収した G - C S F プールを、Toyopearl CM-650S 樹脂を充填した C E X カラムに直接載せた。カラムを 2 0 m M 酢酸ナトリウム、p H 5.3 で平衡化した。結合した G - C S F を、2 4 カラム体積内で、p H 5.3 の、2 0 m M ~ 4 0 0 m M 酢酸ナトリウムの直線的 N a C l 増加勾配により溶出した。純粋 G - C S F を含むフラクションを回収し、製剤のためにプールした。

20

【 0 1 3 3 】

実施例 1 2 b : ゲルクロマトグラフィーによる精製 G - C S F の製剤

C E X カラム(実施例 1 1)から溶出した精製 G - C S F を、0.2 μm 無菌フィルターで濾過し、製剤緩衝液(1 0 m M 酢酸ナトリウム、p H 4、5 % ソルビトールおよび 0.0 0 6 % ポリソルベート 8 0)で平衡化した Sephadex G-25 ファインレジン を充填した 1 4 d m³ カラムを通した。同じ緩衝液をランニング緩衝液として使用した。G - C S F は、製剤緩衝液の空隙容積中に溶出した。全バッチ(3 5 ~ 4 8 g G - C S F)のために、各々、濾過した C E X 溶離液の 1 / 3 を用いる Sephadex G-25 上での 3 連続製剤ランを行った。製剤した G - C S F を、製剤緩衝液での希釈により 0.9 ~ 1.0 m g / m l 濃度に調製し、最終に 0.2 μm 無菌フィルターカプセルで濾過した。無菌溶液として製剤した G - C S F はきわめて安定であり、2 ~ 8 °で、数ヶ月間保存できる(数年は無理でも)。

30

【 0 1 3 4 】

実施例 1 3 : 分析方法

周知の標準的分析方法を、特定分析方法を記載するフィルグラスチムのモノグラフを含む欧州薬局方(Ph. Eur.)に従って実施した(European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care (EDQM) (2010): Filgrastim concentrated solution. European Pharmacopoeia 7.0, 2015-2018)。該モノグラフは、基本的方法について、欧州薬局方内の他の章を相互に引用する。技術についてさらに詳細な記載を提供するこれらの具体的記述部分を、下記実施例中で角括弧内に引用する。利用された対照標準品は、欧州連合により医薬として承認された購入製剤(フィルグラスチム)または該市販対照を使用してキャリブレートした社内標準品であった。国際単位(I U)による相対力価の分析には、世界保健機関(W H O)の国際的 G - C S F 標準を使用した。純度、特定不純物、G - C S F 関連タンパク質および生物活性(力価)の分析に使用した試験方法は、Ph. Eur. モノグラフに則り、わずかな変更のみを施し適用した。以下では、当分野で知られるこれらの標準的分析方法の使用を簡単に記載しない。

40

【 0 1 3 5 】

実施例 1 3.1 - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(S D S - P A G E) : [Ph. Eur. 7

50

、2.2.31]。S D S - P A G E を、分子サイズ、G - C S F の同一性および純度の決定のために使用した。ゲルは12% P A を有し、ドデシル硫酸ナトリウム(S D S)を含んだ。本方法を還元および非還元条件下で使用した。ゲルをSypro rubyで染色した。相対的分子量(M r)計算のために、既知分子量のマーカータンパク質群を使用した。

【0136】

実施例13.2 - 高速分子ふるいクロマトグラフィー(S E C - H P L C) : [Ph. Eur. 7, 2.2.30]。S E C を使用して、不純物またはフィルグラスチムのものより高い分子量のG - C S F 関連物質(二量体、凝集物)を検出した。タンパク質の検出はU V 吸収に基づいた。純度(主ピーク)および不純物(二量体、凝集物)を、各成分に対する活性物質の面積%で表した。試験結果を、反復測定の前平均から計算した。図2は、対照標準品(3A)と比較した、精製G - C S F パッチ(3B)のS E C クロマトグラムを示す。凝集物の痕跡量が、主ピークの左に観察される。主ピークの右のピークは溶媒に起因し、不純物ではない。

10

【0137】

実施例13.3 - 逆相高速液体クロマトグラフィー(R P - H P L C) : [Ph. Eur. 7, 2.2.29]。R P - H P L C を使用して、G - C S F の同一性を決定し、G - C S F 含量および純度を計算した。本方法をまた生成物関連物質の同定および定量化に使用した。タンパク質の検出はU V 吸収に基づいた。関連タンパク質不純物は活性物質のパーセント(%面積)として表した。試験結果は、反復測定の前平均から計算した。

【0138】

実施例13.4 - 分画ゲル電気泳動(I E F) : [Ph. Eur. 7, 2.2.54]。この方法を使用して、不純物またはG - C S F と異なる荷電を有する生成物関連物質(例えば脱アミド化G - C S F)を検出した。両性電解質に基づく固定化p H 勾配を含むポリアクリルアミドゲルで分離を行った。さらに、各タンパク質バンドの等電点(p I)を、定義されたp I を有する一連のマーカータンパク質を使用して計算した。

20

【0139】

実施例13.5 - 酵素結合免疫吸着検定法(E L I S A) : この方法を、大腸菌宿主細胞タンパク質(H C P)レベルの定量的のために使用した。試験を、市販の(一般的)免疫酵素アッセイキット(Cygnus Technologies, no. F410)を使用して行った。マイクロタイターストリップの固相を、親和性精製ポリクローナル抗大腸菌抗体でコートし、これは、試験サンプルからのH C P を捕獲した。ホースラディッシュペルオキシダーゼ(H R P)で標識したトレーサー抗大腸菌抗体は、同時にH C P に結合し、得られたサンドイッチは洗浄工程に耐えた。結合したH C P のそれぞれについて、H R P を過酸化水素存在下、基質であるテトラメチルベンジジン(T M B)の酸化により検出した。光学密度をE L I S A リーダーにより測定した。種々の濃度でのH C P キャリブレーター(キットに包含)の測定により得た検量線図を用いて定量化した。本方法は、供給者の指示に厳密に従った。H C P 濃度をng / mlまたはng / mg(ppm)で表した。

30

【0140】

実施例13.6 - 定量的ポリメラーゼ連鎖反応(q P C R) : このアッセイを大腸菌宿主細胞D N A の決定に使用する。リアルタイムTaqMan(登録商標) q P C R 技術(Applied Biosystems)に基づく“resDNASEQ™ E. coli Residual DNA Quantitation System”という名の市販キットを適用した。本方法は極めてD N A 混入の検出に感受性であり、特異的である。本アッセイは、配列特異的プライマー(S S P)および蛍光標識ハイブリダイゼーションプローブ(TaqMan(登録商標))を使用するポリメラーゼ連鎖反応(P C R)による十分に定義されたD N A フラグメントの配列特異的増幅およびリアルタイム蛍光検出に基づく。装置、試薬、サンプリングおよびソフトウェアを利用した計算を含む方法全体を、供給者の指示に従った。

40

【0141】

実施例13.7 - 細菌エンドトキシン : [Ph. Eur. 7, 2.6.14, 方法C]。グラム陰性細菌エンドトキシンの検出は、カプトガニ(リムルス・ポリフェムス(Limulus polyphemus))からのアメボサイトライゼートを利用する世界的に統一された標準的方法である。この

50

リムルス試験(“LAL試験”)を、欧州薬局方に従う比濁法(方法C)を使用して行った。結果を、国際的エンドトキシン標準BRPに対する国際単位(IU)として表した。

【0142】

実施例13.8 - 生物活性のアッセイ(相対力価): G-CSFサンプルの生物活性を、フィルグラスチムモノグラフに記載されているものに、次の修飾をした、細胞でのインビトロ増殖アッセイにおいて試験した。生物検定方法は、マウス骨髄芽球性細胞株由来のNFS-60細胞の細胞増殖の変化に基づいた。NFS-60細胞を平行で試験サンプルおよび参照溶液の希釈シリーズで処理した。NFS-60細胞の増殖は、G-CSFで顕著にかつ特異的に刺激され得る。細胞増殖を、マイクロ試験プレートで72時間行った。増殖効果を、生存可能細胞により蛍光色素レゾルフィンに変換される基質レサズリン(alamar(登録商標)Blue)を使用して検出した。蛍光シグナルは高感受性で検出可能であった。曲線の直線部分の少なくとも3点を用いる用量応答曲線の平行線アッセイ計算を統計的評価として使用した。許容範囲は、参照溶液に対し80%~125%であった。相対効力を、フィルグラスチムの国際的WHOに対して計算した内部標準により定義した国際単位(IU)として表した。十分に活性な、純粋ヒトG-CSFは、 1.0×10^8 IU/mgの特異的生物活性を有する。

【0143】

実施例13.9 - ペプチドマッピング: [Ph. Eur. 7, 2.2.55]。ペプチドマッピングと続く質量分析(MS)を、ジスルフィド架橋の分析に使用した。ペプチド結合の酵素開裂の手順は、フィルグラスチムのPh. Eur. モノグラフに基づき開発された。開裂に使用したプロテアーゼはグルタミルエンドペプチダーゼ(EndoGlu-C)であった。インキュベーションを37で24時間行い、8M GuHCl添加および煮沸により停止させた。ペプチドマッピング法を還元および非還元条件で行った。還元および非還元条件でのペプチドプロファイルのMSスペクトルにおける得られた差が、ジスルフィド結合の位置を証明した。完全に折り畳まれた無傷のG-CSF(フィルグラスチム)は、Cys37-Cys43およびCys65-Cys75の位置に2個のジスルフィド架橋を有し、18位の1個のシステイン残基は遊離していた。

【0144】

あるいは、タンパク分解性消化後のG-CSFサンプルから得たペプチドをRP-HPLC系で分離し、UVで検出してよい。この方法は、試験溶液で得たフィンガープリント様クロマトグラムを参照物質で得たクロマトグラムと比較するため、比較データを提供する。

【0145】

表:

【表1】

表1:

可溶化後のG-CSFの収量

誘導前温度	誘導時/後温度	IBの総収量	IBのGCSF含量	可溶化G-CSFの総収量
37℃	25℃	180 g	60%	108 g
37℃	30℃	410 g	45%	185 g
37℃	32℃	650 g	35%	228 g
37℃	35℃	830 g	20%	166 g
37℃	37℃	950 g	10%	95 g

【0146】

【表 2】

表 2 :

2 個の再折り畳み工程の好ましい条件

条件	第一の再折り畳み	第二の再折り畳み
G-C S F 純度	60～70%	80～90%
サルコシル濃度	0.5%	0
C u S O ₄ 濃度	40 μM	0
T r i s-H C l (p H 8)	20mM	10mM
p H 値	8	8
温度	R T	2～8℃
インキュベーション時間	20～24時間	32～42時間

10

【0147】

【表 3】

表 3 :

3 個の G-C S F 生産ロットの収量

パラメーター	ロット 1	ロット 2	ロット 3
封入体(湿質量)	650 g	650 g	650 g
精製 G-C S F (バッチサイズ)	48.5 g	35.0 g	34.5 g
収率(I B 湿質量あたり)	7.5%	5.4%	5.3%
最終純度(H P L C)	97.5%	96.9%	97.0%

20

【0148】

【表 4】

表 4 :

G-C S F の精製 : 工程管理内で選択(3 個の生産ロット)

工程	純度(%)H P L C (主ピーク)	サルコシル(mg/ml)	エンドトキシン (E U/mg)
第一の再折り畳み	60.5～72.9	5.0(#)	n. t.
A G 1×8(バッチ方法)	n. t.	0.01～0.04	n. t.
酸沈殿	77.6～90.0	n. d.	47.9～62.0
第二の再折り畳み	80.3～90.4	n. t.	2.6～60.5
研磨(D E A E→C M)	96.5～97.4	n. t.	n. d.
製剤 G-C S F	97.0～97.5	n. d.	n. d.

30

(#) 計算値 ; n. d. = 検出不可能 / 検出限界未満 ; n. t. = 試験せず

40

【0149】

【表 5】

表 5:

3 個の G-C S F 生産ロットの純度および生物活性

パラメーター	アッセイ方法	ロット 1	ロット 2	ロット 3
不純物(合計)	SDS-PAGE(還元/非還元)	n.d.	n.d.	n.d.
不純物(合計)	I E F	n.d.	n.d.	n.d.
生成物関連不純物(合計)	R P-H P L C	2.5 %	1.6 %	3.1 %
生成物関連不純物(凝集物)	S E C-H P L C	0.2 0 %	0.1 8 %	0.1 4 %
宿主細胞タンパク質	E L I S A	2.7 ppm	n.d.	n.d.
宿主細胞 DNA	q P C R	n.d.	n.d.	5 ppm
エンドトキシン	L A L 試験	0.2 8 8 E U / ml	n.d.	n.d.
生物活性(効力)	インビトロ細胞増殖アッセイ	1 0 7 %	9 9 %	1 0 7 %

10

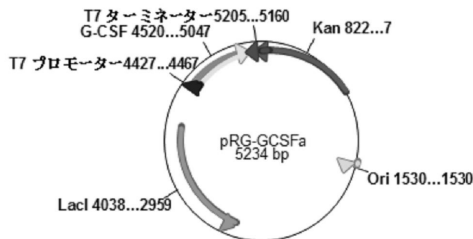
20

n.d. = 検出不可能 / 検出限界未満

【図 1 A】

Fig. 1A

"G-CSF 発現ベクター"



【図 1 B - 1】

Fig. 1B

配列番号 4: "G-CSF ベクターの配列"

CAATTCTAGAAAAATCATCGAGCATCAAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTA
TCAATACCATATTTTGAAGAAAGCGCTTCTGTAATGAAGAGAAATCTCACGAGGCGAGT
TCCATAGGATGCGAAGATCTGTATCGGTCTCGCATCCGACTCGTCCAACATCAATACA
ACCTATTAAATTTCCCTCGTCAAAAATAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGAGC
ACTGAATCCGGTGAGAAATGGCAAAAGTTTATGCAATTTCTTCAGACTTGTCAACAGGCC
AGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAACCGTTATTCATTCGTGATTG
CGCTGACGAGACGAAATACGCGATCGCTGTAAAGGACAAATACAAACAGGAATCGAA
TGCAACCGGCGCAGGAACTGCGACGCGATCAACAAATATTTACCTGAATCAGGATATT
CTCTAAATACCTGGAATGCTGTCTTCGCGGAGATCGAGTGGTGAATCAACATGCATCATC
AGGAGTACGATAAATGCTTGATGCTCGGAAGGCGCATAAATCCGTCAGCCAGTTTAGT
CTGACCACTCACTGTAAACATCATTTGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACT
CTGGCGCATCGGCTTCCATACATCATGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCGACATATC
GCGAGCCCATTTATACCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCTAGAG
CAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAAACCCCTTGATTAATCTGTTATGTAAGCAG
ACAGTTTATTGTTTATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAG
ACCCGCTAGAAAAGATCAAGGATCTTCTTGAGATCTTTTTCGCGCGTAAATCTGCTGCTG
CTTGCAAAACAAAAAACACCCGCTACAGCGGTGGTTTGTTCGCCGATCAAGAGCTACCA
ACTCTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTACGAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTCTCTAG
TGTAGCGGTAGTTAGCGCAACCTTCAAGAACCTGTGACACCGCTACATACCTCGCTCT
GCTAATCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAGTGCGCATAGTCTGTGCTTACCGGGTTGGAC

【図 1 B - 2】

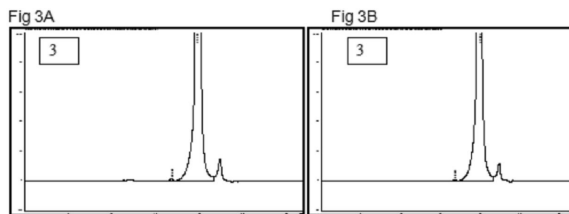
TCAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTCTGGGCTGAACGGGGGGTTCTGTCACAC
AGCCAGCTTGGAGCGACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA
AAGCGCCACGCTTCCGAAAGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCGAGGTCCGA
ACAGGAGAGCGCACGAGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATATGCTCTGTCG
GGTTTCGCCACCTCTGACTGTGACGCTGATTTTGTGATGCTCTGACGGGGGCGAGGCT
ATGAAAAACGCGACGACGCGGCTTTTACGGTCTGTCGCTTTTCTGCGCTTTTGTCTGCT
CAGATGTTCTTTCTGCTGCTTATCCCTGATTCCTGTTGATTAACCGTATTACCGCTTTGAGT
GAGCTGATACCGCTCGCGCGAGCGGAAACGAGCGGAGCGAGTCACTGAGCGAGGAGGAGC
GGAGAGCGGCTGATGCGGTATTTCTCTTACGCTCTGTCGCTATTTTCAACCGCAAT
GGTGACCTCTCACTACATCTGCTCTGATGCGGCTAGTTAAGCGCATATACACTCCGCTA
TCGCTACGCTGACTGGGTCTGCGCTGCGCGCGGACACCGCGCAACCGCTGAGCGGCTCT
GACGGCTTGTCTGCTCGCGCATCCGCTTACAGCAAGCTGTGACGCTCTCGCGGAGCTG
CATGTCAGAGGTTTTCACCGTCTACCGGAAACGCGGAGCGAGCTGCGGTAAAGCTCA
TCAGCGTGGTCTGAGCGATTCACAGATGCTGCTGCTTCTCATCCGCTCCAGCTCTGTTGA
GTTTCTCCAGAAAGCGTTAATGTCTGCTTCTGATAAAGCGGCGCATTTAAGGCGGTTTT
TTCTGTTTGGTCACTGATGCTCTGCTGTAAGGGGATTTCTGTTATGGGGTAAATGATA
CCGATGAAACGAGAGAGGATGCTACGATACCGGTTTCTGATGATGAACATGCCCGTTAC
TGGAGCTTGTGAGGTAACAACTGCGGCTATGGATGCGCGGAGCAGAGAAAAATCAC
TCAGGCTCAATGCGAGCGCTTCTGTAATACAGATGATGTTTCCACAGGCTAGCCAGCAG
CATCTGCGATGCGATCGGAAACATAATGTTGAGGCGCTGACTTCCGCTTTCCAGAC
TTTACGAAACACGAAACCGGAAGACCATTCATGTTGTGCTCAGGTCGACAGCGTTTTCGA
CGAGCAGTCTGCTTACGTTCTGCTGCGTATCGGTGATTCATTCGTAACCAAGTAAAGCAA
CCCCGCCAGCTAGCGGGTCTTCAACGACAGGAGCAGATCATGCCACCCGTGGGGCGC
CCATGCCGGCGATAATGGCTCTCTCTCGCGAAACGTTTGTGGCGGGACAGTGAACGAA
GGCTTGAAGCGGCGTGAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCGATCATCTGCGCG
CTCCAGCGAAAGCGGCTCTCGCGAAATGACCGAGCGGCTGCGCGCACTGCTCTACGA
GTTGCATGATAAGAAAGACAGTCATAAGTGGCGGACGATAGTTCATGCCCGCGCGCCACCG
GAAGGAGCTGACTGGGTGAAGGCTCTCAAGGCGCATCGGTGAGATCCCGGTGCTCAATGA
GTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCGCGCTTCCAGTCCGGAACCTGT
CGTGCCAGCTGATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGAGAGGCGGTTTGGTATTTGGCGC
CCAGGTTGGTTTTCTTTTCACTGAGAGCGGCAACAGCTGATTGCCCTTCAACCGCTG
GCCTGAGAGAGTTGACAGAGCGGCTCAAGCTGTTTGGCCGACGAGCGGAAATCTGCT
TTGAGTGGTTAAGCGCGGATATAACATGAGCTGCTCTCGGTATCTGCTATCCACTA
CCGAGATGTCCGCAACCGCGCGGCTCGGATCGGTAATGGCGGCGATTCGCCCGCGC
CATCTGATCGTTGGCAACAGCATCGAGTGGAGCAGATGCCCTCATTCAGCATTTGCAATG
TTTGTGTTGAAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCCGCTTCCGCTGCTTCACTGCTGAATTT
GATTGCGAGTGATATTTATGCGAGCGAGCGAGCGCGCGGAGACAGAACTTAA
TGGGCGGCTTAAACGCGGATTTGCTGCTGAGCAGCAATGCGACAGATGCTCCAGCGCAGT
CGGCTACGCTCTTATGGGAGAAATAACTGTTGAGGTTGCTCGCTCAGAGACATCAA
GAAATACCGCGGAGCACTTATGTCAGGCGAGCTTCCACAGCAATGGCATCTGCTGCTCAG
CGATAGTTAATGATCAGCCCATGACGCGTTGCGCGAGAGATGTTGCAACGCGCGCTTAA
GAGGTTTCCAGCGCGCTTCTGTTTACCATCGACCAACCGCTGCGGACCGCATTTGATCGG
CGGAGATTTAATCGCCGCGACAAATTTGCGACGGCGGTGCGAGGCGGAGACTGGAGGTGGC
AAGCCCATCAGCAACGACTGTTGCCGCGCATGTTGTCGACGCGGTGGGAATGTAA
TTGACGCTCGCCATCGCGCTTCCACTTTTTCGCGGTTTTCGCAAGAACGTTGGCGGCT
GGTTTACCGCGGGAACCGGTCTGATAGGAGACACCGGCTACTGCTGCGATCTGATTA
CGTTACTGCTTACATTCACCCCTGAATGACTCTCTTCGCGGCGATCATGCGCAT
CCGCGAAAGGTTTTCGCGCATTCGATGCTGTCGCGGATCTCGAGCTCTCTTATGCGAC
TCTGCTATTAGGAAGCAGCCAGTAGTGGTTGAGCGCTTGGAGCACCGCGCGCAGGA

【図 1 B - 3】

```
ATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACC  
CAGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCGGAAGTGGCGAGCCGATCTTCCCCATCGGTGATG  
TCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGCCACGATGCGTC  
CGGCGTAGAGGATCGAGATCGATCTCGATCCC GGAAATTAAACGACTCACATAGGGGA  
ATTGTGAGCGGATAACAATTCCTCTAGAAATAATT TTGTTTAACCTTAAGAAAGGAGATA  
TACATATGACTCCATTAGGTCCCTGCTTCTCTCTGCCGCAAGCTTTCTGCTGAAATGCT  
GGAAAGGTTCTGTAATAATCCAGGGTGACGGTGTGCACTGCAAGAAAACCTGTGGGTACT  
TACAACGTGTGCCATCCGGAAGAGCTGGTACTGCTGGGTCTCTCTTGGGATCCCGTGGG  
CTCCGCTGTCTCTGTCCATCTCAAGCTCTTCACTGGCTGGTGTCTGTCTCAACTGCA  
TTCTGGTCTGTTCTGTATCAGGGTCTTCTGCAAGCTCTGGAAGGTATCTCTCCGGAAGT  
GGTCGACTCTGGACACTCTGCAGCTAGTGTAGTGAATTTGCTACTACTATTGGCAAC  
AGATGGAAGAGCTCGGTATGGCACCAGCTCTGCAACGACTCAAGGTGCTATGCCGGCATT  
CGCTTCTGCATTCCAGCGTCTGTCAGGAGGTGACTGTTGCTTCTCATCTGCAATCTTTC  
CTGGAAGTATCTTACCGTGTCTGCGT CATCTGGCTCAGCGTAATAAGCTCAGCAACAC  
CACCACCACCACCACTAATTGATTAAATACCTAGGCTGCTAAACAAGCCGAAAGGAA  
GCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATACTAGCATAA CCCCCTGGGGCCTCTAAAC  
GGTCTTGAGGGTTTTTGTCTGAAAGGAGGAATATATCCGATCTAG
```

【図 2】

Figure 2: 対照としての市販フィラグラスチム製剤(3 A)およびここに記載のとおり精製した生成物の純度を分析したSEC-HPLCクロマトグラムの比較。詳細は実施例に記載する。



【配列表】

0006154885000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 フェレンツ・フェルフォルディ
ハンガリー、ハー - 1 0 7 7 ブダペスト、ヨーシカ・ストリート 2 5 番セカンド / 1 8
- (72)発明者 カタリン・オラス
ハンガリー、ハー - 1 1 6 3 ブダペスト、エールメステル・ストリート 7 番
- (72)発明者 ヨーージェフ・コズマ
ハンガリー、ハー - 1 2 0 4 ブダペスト、トロク・フロリーシュ・ストリート 1 3 0 番

審査官 伊藤 良子

- (56)参考文献 中国特許出願公開第 1 0 1 6 9 1 5 6 0 (C N , A)
特開昭 6 2 - 2 5 2 7 3 1 (J P , A)
Protein Expression and Purification , 2 0 0 6 年 , Vol.47 , p.645-650

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
- C 1 2 P 2 1 / 0 2
 - C 1 2 N 1 5 / 0 0 1 - 1 5 / 9 0
 - J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 - C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
 - U n i P r o t / G e n e S e q
 - P u b M e d