



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C07K 13/00, C12N 15/27, 1/21 C12P 21/02 // A61K 37/02 (C12N 1/21, C12R 1/19) (C12P 21/02, C12R 1/19)	A1	(11) 国際公開番号 WO 91/06567 (43) 国際公開日 1991年5月16日 (16. 05. 1991)
(21) 国際出願番号 PCT/JP90/01439 (22) 国際出願日 1990年11月6日 (06. 11. 90) (30) 優先権データ 特願平1/290730 1989年11月7日 (07. 11. 89) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP] 〒101 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 高橋真行 (TAKAHASHI, Masayuki) [JP/JP] 〒772 徳島県鳴門市大津町木津野字仲ノ越79-7 Tokushima, (JP) 中井 哲 (NAKAI, Satoru) [JP/JP] 〒771-02 徳島県板野郡松茂町広島字南川向67-4 Tokushima, (JP) 西田 勉 (NISHIDA, Tsutomu) [JP/JP] 〒772 徳島県鳴門市大津町大代240-118 Tokushima, (JP) 高野雅明 (TAKANO, Masaaki) [JP/JP] 〒771-12 徳島県板野郡藍住町住吉字乾77-6号 Tokushima, (JP) 関口康代 (SEKIGUCHI, Yasuyo) [JP/JP] 〒771-12 徳島県板野郡藍住町勝瑞成長59の3 第3愛日ハイッ302号 Tokushima, (JP)	山西一也 (YAMANISHI, Kazuya) [JP/JP] 〒770 徳島県徳島市新浜本町4丁目4の30 第2コーポ朝日奈401号 Tokushima, (JP) 大本安一 (OMOTO, Yasukazu) [JP/JP] 〒771-02 徳島県板野郡松茂町笹木野字八下35-6 Tokushima, (JP) 市川弘之 (IOHIKAWA, Hiroyuki) [JP/JP] 〒770 徳島県徳島市中通町3丁目11番地 Tokushima, (JP) 平井嘉勝 (HIRAI, Yoshikatsu) [JP/JP] 〒771-02 徳島県板野郡北島町新喜来字江古川5-49 Tokushima, (JP) (74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541 大阪府大阪市中央区平野町2-1-2 沢の橋ビル Osaka, (JP) (81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title : M-CSF DERIVATIVE, EXPRESSION VECTOR OF SAID DERIVATIVE, PRODUCT OF TRANSFORMATION BY SAID VECTOR, AND PRODUCTION OF THEM		
(54) 発明の名称 M-CSF誘導体、該誘導体発現ベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体及び之等の製造方法		
(57) Abstract The invention provides a biologically active recombinant human M-CSF derivative characterized by having a primary amino acid sequence wherein a C-terminus is present somewhere in the region ranging from 153-position Thr to 522-position Val while an N-terminus is present at 3-position Val or 4-position Ser and Met may optionally be added to the N-terminus of such an amino acid sequence in the mature human M-CSF amino acid sequence; an expression vector of said M-CSF derivative; a product of transformation caused by said vector; and a method of producing the M-CSF derivative by culturing said product of transformation and taking up the M-CSF derivative thus expressed.		

(57) 要約

本発明は、成熟ヒトM-CSFのアミノ酸配列中、153位Thrから522位Valの領域のいずれかにC末端を有し、3位Val又は4位SerをN末端とし、これらそれぞれのアミノ酸配列のN末端にMetを付加されることのあるアミノ酸一次配列を有することを特徴とする生物活性な組換え型ヒトM-CSF誘導体、該M-CSF誘導体の発現ベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体、及び該形質転換体を培養して発現されるM-CSF誘導体を採取するM-CSF誘導体の製造方法を提供するものである。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のハンフレッット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	ES スペイン	MG マダガスカル
AU オーストラリア	FI フィンランド	ML マリ
BB バルバドス	FR フランス	MR モーリタニア
BE ベルギー	GA ガボン	MW マラウイ
BF ブルキナ・ファソ	GB イギリス	NL オランダ
BG ブルガリア	GR ギリシャ	NO ノルウェー
BJ ベナン	HU ハンガリー	PL ポーランド
BR ブラジル	IT イタリア	RO ルーマニア
CA カナダ	JP 日本	SD スーダン
CF 中央アフリカ共和国	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SE スウェーデン
CG コンゴ	KR 大韓民国	SN セネガル
CH スイス	LI リヒテンシュタイン	SU ソビエト連邦
CI コート・ジボアール	LK スリランカ	TD チャード
CM カメルーン	LU ルクセンブルグ	TG トーゴ
DE 西ドイツ	MC モナコ	US 米国
DK デンマーク		

1

明 細 書

M - C S F 誘導体、該誘導体発現ベクター、
該ベクターで形質転換された形質転換体及び
之等の製造方法

5 技 術 分 野

本発明は、医薬として有用なヒトのコロニー刺激因子
(Colony-Stimulating Factor、C S F)、殊に組換え
型ヒト M - C S F の誘導体、該誘導体の発現ベクター、
該ベクターで形質転換された形質転換体、及び之等の製
10 造方法に関する。

従 来 の 技 術

一般に、造血細胞の増殖、分化には特定の増殖及び分
化因子が必要とされており、最終的に成熟した各種の血
球、例えば赤血球、顆粒球、マクロファージ、好酸球、
15 血小板、リンパ球等になるまでの間には、数多くの分化、
増殖因子が関与している〔三浦恭定著、血液幹細胞、中
外医学社、1983年〕。之等の中で顆粒球系前駆細胞
及びマクロファージ系前駆細胞の増殖、分化を刺激する
ものとして C S F が知られており、かかる C S F には、
20 顆粒球の形成に特異性を有する G 型 (G - C S F)、マ
クロファージの形成に特異的な M 型 (M - C S F) 及び
顆粒球とマクロファージの両方の形成を促進する G M 型

(GM-CSF) が知られている。また更に多能性幹細胞に作用するCSFとしてマルチCSF (Multi-CSF ; IL-3) も知られている。

上記CSFは、その生物活性に基づき、癌化学療法及び放射線療法時の共通した欠点である白血球の減少を軽減させるものと考えられ、この観点から臨床研究が行なわれている。

また、上記CSFは白血球の機能を促進させる作用を有することが知られており〔ロペッツら (Lopez, A. F. et al.), J. Immunol., 131, 2983 (1983)、ハンドムら (Handam, E. et al.), 同122, 1134 (1979) 及びバダスら (Vadas, M. A. et al.), 同130, 795 (1983)〕、このことから、種々の感染症の予防及び治療薬としての有効性が確認されている。更に、CSFはその分化誘導作用〔メットカーフら (Metcalf, D. et al., Int. J. Cancer, 30, 773 (1982))〕に基づき、骨髄性白血病の治療剤として有効性が認められている。

しかして、CSFは例えば胎児細胞、脾細胞等の培養液、人尿、種々の株化培養細胞の培養液等にその活性が認められ、該活性画分として分離、利用されているが、いずれの起源のものも該起源に由来する類似した多量の夾雑物質等の混在及びCSF自体の濃度の低さが障害と

なり、その製造面で問題を残しており、均質性、収量、操作等の面から、医薬品としての C S F を産業的に継続して得る手段は、未だ見出されていない。

本発明者らは、先に C S F を常時均質な状態で多量産
5 生することのできる、ヒト白血病 T 細胞由来の培養株化細胞である「A G R - O N」を確立し、該細胞に係わる発明を特許出願した（特開昭 5 9 - 1 6 9 4 8 9 号公報参照）。また本発明者らは、上記 A G R - O N の産生する C S F につき更にその精製を重ねた結果、該 C S F を
10 純粋な形で簡単にしかも高収率で収得する方法を開発し、かくして得られる C S F の構造的特徴及び生化学的特徴を解明し、物質としての C S F に係わる発明を完成した（特開昭 6 2 - 1 6 9 7 9 9 号公報参照）。

更に、本発明者らは上記 C S F を遺伝子工学的手法により製造するための該 C S F をコードする遺伝子、該遺
15 伝子を含むベクター、該ベクターで形質転換された C O S 細胞発現系、大腸菌分泌発現系及び C H O 細胞発現系をそれぞれ開発し、之等に係わる発明を特許出願した（特開平 1 - 1 0 4 1 7 6 号公報参照）。

20 本発明の主な目的は、遺伝子工学的手法を利用して、ヒト M - C S F の生物活性な誘導体を製造する技術及び該技術により得られ、殊に医薬としてより有用な新規な

ヒト M-C-S-F 誘導体を提供することにある。

発 明 の 開 示

本発明によれば、下式(1)で表わされるアミノ酸一次配列の151位Thr から520位Val までの領域のいずれかにC末端を有し、該配列のN末端にMet を付加されるか又はN末端Val を欠失されることのあるアミノ酸一次配列を有することを特徴とする、生物活性な組換え型ヒト M-C-S-F 誘導体、殊に下式(1)で表わされるアミノ酸一次配列の1位Val から182位Ala まで、10 1位Val から212位Pro まで、1位Val から256位Gly まで、1位Val から300位Gln まで、1位Val から332位Ala まで及び1位Val から520位Val まで、のいずれかのアミノ酸一次配列を有するか或は2位Ser から151位Thr まで、2位Ser から182位Ala まで、15 2位Ser から212位Pro まで、2位Ser から256位Gly まで、2位Ser から300位Gln まで及び2位Ser から332位Ala まで、のいずれかのアミノ酸一次配列を有し且つ之等それぞれのアミノ酸配列のN末端に更にMet を付加されることのあるアミノ酸一次配列を有する、20 生物活性な組換え型ヒト M-C-S-F 誘導体が提供される。

式(1) :

Val-Ser-Glu-Tyr-Cys-Ser-His-Met-Ile-Gly-Ser-Gly-

His-Leu-Gln-Ser-Leu-Gln-Arg-Leu-Ile-Asp-Ser-Gln-
Met-Glu-Thr-Ser-Cys-Gln-Ile-Thr-Phe-Glu-Phe-Val-
Asp-Gln-Glu-Gln-Leu-Lys-Asp-Pro-Val-Cys-Tyr-Leu-
Lys-Lys-Ala-Phe-Leu-Leu-Val-Gln-Asp-Ile-Met-Glu-
5 Asp-Thr-Met-Arg-Phe-Arg-Asp-Asn-Thr-Pro-Asn-Ala-
Ile-Ala-Ile-Val-Gln-Leu-Gln-Glu-Leu-Ser-Leu-Arg-
Leu-Lys-Ser-Cys-Phe-Thr-Lys-Asp-Tyr-Glu-Glu-His-
Asp-Lys-Ala-Cys-Val-Arg-Thr-Phe-Tyr-Glu-Thr-Pro-
Leu-Gln-Leu-Leu-Glu-Lys-Val-Lys-Asn-Val-Phe-Asn-
10 Glu-Thr-Lys-Asn-Leu-Leu-Asp-Lys-Asp-Trp-Asn-Ile-
Phe-Ser-Lys-Asn-Cys-Asn-Asn-Ser-Phe-Ala-Glu-Cys-
Ser-Ser-Gln-Asp-Val-Val-Thr-Lys-Pro-Asp-Cys-Asn-
Cys-Leu-Tyr-Pro-Lys-Ala-Ile-Pro-Ser-Ser-Asp-Pro-
Ala-Ser-Val-Ser-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Ala-Pro-Ser-
15 Met-Ala-Pro-Val-Ala-Gly-Leu-Thr-Trp-Glu-Asp-Ser-
Glu-Gly-Thr-Glu-Gly-Ser-Ser-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-
Gln-Pro-Leu-His-Thr-Val-Asp-Pro-Gly-Ser-Ala-Lys-
Gln-Arg-Pro-Pro-Arg-Ser-Thr-Cys-Gln-Ser-Phe-Glu-
Pro-Pro-Glu-Thr-Pro-Val-Val-Lys-Asp-Ser-Thr-Ile-
20 Gly-Gly-Ser-Pro-Gln-Pro-Arg-Pro-Ser-Val-Gly-Ala-
Phe-Asn-Pro-Gly-Met-Glu-Asp-Ile-Leu-Asp-Ser-Ala-
Met-Gly-Thr-Asn-Trp-Val-Pro-Glu-Glu-Ala-Ser-Gly-

6

Glu-Ala-Ser-Glu-Ile-Pro-Val-Pro-Gln-Gly-Thr-Glu-
Leu-Ser-Pro-Ser-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Ser-Met-Gln-
Thr-Glu-Pro-Ala-Arg-Pro-Ser-Asn-Phe-Leu-Ser-Ala-
Ser-Ser-Pro-Leu-Pro-Ala-Ser-Ala-Lys-Gly-Gln-Gln-
5 Pro-Ala-Asp-Val-Thr-Gly-Thr-Ala-Leu-Pro-Arg-Val-
Gly-Pro-Val-Arg-Pro-Thr-Gly-Gln-Asp-Trp-Asn-His-
Thr-Pro-Gln-Lys-Thr-Asp-His-Pro-ser-Ala-Leu-Leu-
Arg-Asp-Pro-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Pro-Arg-Ile-Ser-
Ser-Pro-Arg-Pro-Gln-Gly-Leu-Ser-Asn-Pro-Ser-Thr-
10 Leu-Ser-Ala-Gln-Pro-Gln-Leu-Ser-Arg-Ser-His-Ser-
Ser-Gly-Ser-Val-Leu-Pro-Leu-Gly-Glu-Leu-Glu-Gly-
Arg-Arg-Ser-Thr-Arg-Asp-Arg-Arg-Ser-Pro-Ala-Glu-
Pro-Glu-Gly-Gly-Pro-Ala-Ser-Glu-Gly-Ala-Ala-Arg-
Pro-Leu-Pro-Arg-Phe-Asn-Ser-Val-Pro-Leu-Thr-Asp-
15 Thr-Gly-His-Glu-Arg-Gln-Ser-Glu-Gly-Ser-Ser-Ser-
Pro-Gln-Leu-Gln-Glu-Ser-Val-Phe-His-Leu-Leu-Val-
Pro-Ser-Val-Ile-Leu-Val-Leu-Leu-Ala-Val-Gly-Gly-
Leu-Leu-Phe-Tyr-Arg-Trp-Arg-Arg-Arg-Ser-His-Gln-
Glu-Pro-Gln-Arg-Ala-Asp-Ser-Pro-Leu-Glu-Gln-Pro-
20 Glu-Gly-Ser-Pro-Leu-Thr-Gln-Asp-Asp-Arg-Gln-Val-
Glu-Leu-Pro-Val

本明細書において、ペプチド及びアミノ酸の表示は、

I U P A Cにより採択されているアミノ酸命名法における略号乃至当該分野で慣用されているそれに従うものとし、D N A塩基配列及び核酸の表示も同様とする。

本発明のヒトM-C S F誘導体はM-C S F活性を有
5 しており、その生物活性に基づいて、前記した如く例えば白血球減少を伴う疾病もしくは病態の予防及び治療薬として、骨髓移植の補助剤として、各種感染症の予防及び治療薬として、更に抗ガン剤等として、それぞれ医薬分野で有用である。殊に本発明のヒトM-C S F誘導体
10 は、遺伝子工学的手法により、大腸菌(E. coli)を宿主として得られる組換え型M-C S F誘導体であり、その均質性より特に上記分野において有用である。

加えて、本発明誘導体中には、血中半減期が動物細胞で発現させた約8 5 0 0 0の分子量を有するM-C S F
15 [後記参考例1に示す]と同等の長さを有するものがある。即ち、M-C S F活性を有する之等のE. coliで発現させたM-C S F誘導体は、体内での血中半減期が長く、しかも動物細胞で発現させたM-C S Fに比べて、低コストで容易にしかも均一な物質として製造すること
20 ができる。

本発明ヒトM-C S F誘導体は、これをコードする遺伝子を用い、該遺伝子が宿主細胞中で発現されるような

組換えDNAを作成し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換株を培養することにより製造される。

- 上記本発明ヒトM-CSF誘導体の製造に用いられる遺伝子は、M-CSF産生能を有する各種のヒト細胞、
- 5 より具体的且つ有利には前記AGON [特開昭59-169489号公報記載の特性を有するヒト白血病T細胞由来のヒト培養株化細胞、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に「ATCC受託No. CRL-8199」として受託] より分離された
- 10 mRNAから調製できる。該AGONからのmRNAの分離のための抽出操作は、例えばグアニジウム／熱フェノール法 [Guanidinium / Hot Phenol method, T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning, p194-195 (Cold Spring Harbor
- 15 Laboratory), 1982] やグアニジウム／塩化セシウム法 [Guanidinium / Cesium Chloride method, T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning, p196 (Cold Spring Harbor Laboratory), 1982] 等に従い実施でき、精製されたmRNAの
- 20 cDNAへの変換、即ち目的遺伝子の合成は例えばオカヤマーバーグ法 [H. Okayama and P. Berg, Molecular and Cellular Biology, vol. 3, p280 (1983)] やグブラ

ーホフマン法 [V. Gubler and B. J. Hoffman, Gene, vol. 25, p263-269 (1983)] 等に従い実施でき、かくして得られるDNAの宿主細胞への導入による形質転換法及び形質転換体からの目的のM-CSFcDNAを有する株の選出は、いずれも通常の方法に従い行なうことができる。之等の詳細は前記特開平1-104176号公報に示される通りである。

本発明に用いられる上記M-CSF遺伝子としても、該公報記載のものを有利に利用できる。

- 10 尚、上記遺伝子は例えばホスファイト トリエステル法 [Nature, 31, 105 (1984)] 等の常法に従い核酸の化学合成等により製造することもできる。之等の方法において一部DNAの化学合成やDNA鎖の切断、削除、付加乃至は結合を目的とする酵素処理やDNAの単離、精製乃至複製、選別等の各種操作乃至手段は、いずれも常法に従うことができる。例えば上記DNAの単離精製は、アガロースゲル電気泳動法等に従うことができ、核酸配列のコドンの一部の改変は、サイトースペシフィック
- 15 ミュータジェネシス (Site-Specific Mutagenesis)
- 20 [Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 5662-5666 (1984)] 等に従うことができる。尚、上記において所望のアミノ酸に対応する遺伝暗号の選択は、特に限定されるものでは

10

なく、利用する宿主細胞のコドン使用頻度等を考慮して、
常法に従い決定することができる。また、上記方法に従
い得られる目的遺伝子のDNA配列の決定及び確認は、
例えばマキシムーギルバート(Maxam-Gilbert)の化学修
飾法 [Meth. Enzym., 65, 499-560 (1980)] やM13フ
5 ェージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法
[Messing, J. and Vieira, J., Gene, 19, 269-276
(1982)] 等により行ない得る。

本発明ヒトM-C-S-F誘導体は、上記で得られる遺伝
10 子を利用して、遺伝子組換え技術により容易に且つ大量
に製造、取得できる。該方法は、上記特定の遺伝子
(DNA)の利用を必須として、基本的には一般的な遺
伝子組換え技術に従い行ない得る [Molecular Cloning,
T. Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory
15 (1982)等参照]。

より詳細には、本発明遺伝子が宿主細胞中で発現でき
るような組換えDNAを作成し、これを宿主細胞に導入
して形質転換し、該形質転換株を培養すればよい。

ここで宿主細胞としては、真核生物及び原核生物のい
20 ずれをも使用でき、原核生物の宿主としては大腸菌や枯
草菌が一般によく用いられる。本発明では例えば該宿主
菌中で複製可能なプラスミドベクターを用い、このベク

1 1

ター中に M-C S F 遺伝子が発現できるように、該遺伝子の上流にプロモーター及び S D (シャイン・アンド・ダルガーノ) 配列、更に蛋白合成開始に必要な開始コドン (例えば ATG) を付与した発現プラスミドを使用できる。

- 5 上記宿主菌としての大腸菌としては、エシエリヒアコリ (Escherichia coli) K 1 2 株等がよく用いられ、ベクターとしては一般に p B R 3 2 2 が用いられるが、之等に限定されず公知の各種の菌株及びベクターをいずれも利用できる。プロモーターとしては、例えばトリプトファン (trp) プロモーター、lpp プロモーター、lac プロモーター、P_L プロモーター等を使用でき、いずれの場合も目的遺伝子を発現させ得る。
- 10

- 上記遺伝子を利用して本発明ヒト M-C S F 誘導体を製造するための一つの好ましい方法としては、宿主細胞
- 15 として大腸菌等の原核生物を用い、2・シストロン法により目的蛋白を発現させる方法を例示できる。この方法は連続する二つのシストロンよりなる遺伝子発現システムであり、これによれば目的とするヒト M-C S F 誘導体を宿主細胞内に安定して且つ多量に生産蓄積できる。

- 20 該 2・シストロン法に従う本発明ヒト M-C S F 誘導体の製造につき詳述すれば、まずファーストシストロン (first cistron) としての適当なポリペプチドをコード

1 2

する遺伝子とセカンドシストロン(second cistron)としての本発明遺伝子との、二つのシストロンを含む発現プラスミドを作成する。該プラスミドはまたファーストシストロンの上流に該遺伝子の発現のためのプロモーター及びS D配列が配置されていると共に、その下流で且つセカンドシストロンの上流に、セカンドシストロンの発現のためのS D配列とファーストシストロンの終止コードンとセカンドシストロンの開始コードンを、この順序で含む合成リンカーが配置されていることが重要である。

10 上記ファーストシストロンの遺伝子としては、宿主によりこれが発現され得るものである限り、合成遺伝子でも天然物由来のものでもよく、その発現により本発明ヒトM-C S F誘導体とは異なるポリペプチドが同一系内に生産され、引続き該ポリペプチドの分離が必要となることを考慮すれば、該ポリペプチドは疎水性であり且つ本発明誘導体とは十分に離れた分子量を有するものであるのがよい。上記ファーストシストロンは、かかるポリペプチドをコードするものであるのが望ましい。その具体例としては例えばI L-2、I F N- α 、- β 、- γ 等

15 等をコードする遺伝子及びそれらの断片であり、約50
20 ~100のアミノ酸残基をコードするものを例示できる。

上記ファーストシストロンの上流に配置させるプロモ

1 3

- ーター及び S D 配列としては、夫々従来公知の各種のものを使用でき、プロモーターとしては例えば trp プロモーター、tac プロモーター、P_L プロモーター、P_R プロモーター、lpp プロモーター、OmpA プロモーター、
- 5 lac プロモーター等を、特に好ましくは trp プロモーター、P_L プロモーター、P_R プロモーター等を例示できる。また S D 配列としては原核細胞の 16 S rRNA の 3' 末端と水素結合を形成できる 3～9 塩基対の配列、例えば GGAG、AGGA 等を例示できる。
- 10 また上記ファーストシストロンとセカンドシストロンとの間に介在させる合成リンカーにおける開始コドン及び終止コドンは、天然界に存在するすべてのものでよい。之等はそれぞれ完全な形、例えば TGA 及び ATG 等として利用される必要はなく、両者の一部オーバーラップした
- 15 形、例えば TGATG、TAATG 等として利用することもできる。上記 2・シストロン法に利用される発現プラスミドの構築は、通常の方法に従い実施できる。
- 特に好ましい一つの方法によれば、まず M-C S F 遺伝子を含むプラスミドを適当な制限酵素で切断し、M-
- 20 C S F 遺伝子を含む断片を常法に従い単離精製する一方、上記した合成リンカーを常法に従い、例えば DNA シンセサイザー等を用いて合成し、これを上記で得られた断

1 4

- 片の M - C S F 遺伝子の上流側に、T 4 D N A リガーゼ等を用いて連結させ、次いで得られる D N A 断片を、ファーストシストロンを含みこれを発現可能なプラスミドの所定位置に組込む方法を例示できる。また上記方法により得られるセカンドシストロンと合成リンカーとを連結された D N A 断片の上流に、予めファーストシストロンを連結させた後、該 D N A 断片を適当な蛋白質発現系を有するプラスミドに組込む方法によっても、所望の 2・シストロン法に好適な発現プラスミドを収得できる。
- 10 上記で得られるプラスミドを適当な宿主細胞に導入してこれを形質転換させることにより、2・シストロン法による所望の形質転換体を収得でき、該形質転換体の利用によれば、ファーストシストロンに係わる蛋白質とセカンドシストロンに係わる所望のヒト M - C S F 誘導体
- 15 とを夫々別個に発現させ得る。之等は通常の方法例えば S D S - P A G E やウエスタンブロッティング法等により解析、確認でき、また後記する各種の方法により夫々分離、精製できる。

- かくして得られる所望の形質転換体は、常法に従い培養でき、該培養によりヒト M - C S F 誘導体が生産、蓄積される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択使用
- 20

1 5

できる。宿主細胞として大腸菌等を利用した形質転換体の培養には例えばL B培地、E培地、M 9培地、M 6 3培地等を使用でき、之等培地には更に必要に応じ通常公知の各種の炭素源、窒素源、無機塩、ビタミン類、天然
5 物抽出物、生理活性物質等を添加できる。

上記形質転換体の培養条件としては、宿主細胞の生育に適した条件を採用でき、大腸菌の場合は例えばp H約5 ~ 8、好ましくは7又はその付近、温度約2 0 ~ 4 3℃、好ましくは3 7℃又はその付近を採用できる。

10 上記により、形質転換体の細胞内に目的とする本発明ヒトM - C S F誘導体が生産、蓄積される。

これはその物理学的性質、化学的性質等を利用した各種の分離操作により分離精製できる。該方法としては、具体的には通常の再構成処理、蛋白沈澱剤による処理、
15 遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破碎、限外濾過、分子篩クロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、
20 之等の組合せ等を例示でき、かかる分離精製操作の採用により、実施例に示すごとく容易に高収率、高純度で、所望のヒトM - C S F誘導体を工業的規模で製造できる。

16

かくして得られる本発明ヒトM-C-S-F誘導体は、その製造のために利用される遺伝子や該遺伝子の発現のための発現系の種類等に応じ、そのN-末端アミノ酸配列や分子量等を若干異にし、殊に本発明誘導体の発現の過程で開始コドンに対応するMet残基がN末端に付加されることがあり得るが、いずれもC-S-F活性を有する点については共通している。

上記で得られるヒトM-C-S-F誘導体は、その有する生物活性に基づき各種医薬品として利用できる。本発明ヒトM-C-S-F誘導体は、これを医薬として用いるに当り、その有効量を薬理的に許容される通常の無毒性担体と共に含有する薬理組成物の形態に調製され、該形態に応じた各種投与経路で投与される。製剤形態としては、液状形態例えば溶液、懸濁液、乳濁液等が通常採用され、之等は一般に経口、静脈内、皮下、皮内、筋肉内投与されるが、特に之等の形態及び投与経路に限定されず、本発明誘導体は、他の通常採用される経口、非経口投与等に適した各種の製剤形態に調製することもでき、また使用前に適当な担体の添加により液状となし得る乾燥品とすることもできる。上記製剤の投与量は、所望の薬理効果、疾病の種類、患者の年齢、性別、疾患の程度等に応じて適宜決定され、特に限定はないが、通常有効成分が

17

蛋白量として約 0.001 ~ 1 mg/kg/日となる量で 1 日に 1 回乃至数回に分けて投与すればよい。

実 施 例

以下、参考のために実施例で使用する CHO 細胞で発
5 現されたヒト M-CSF 誘導体の製造例を参考例 1 とし
て挙げ、次いで本発明のヒト M-CSF 誘導体の製造の
ための原料プラスミド作製法及びそれに由来する M-
CSF の製造例を参考例 2 として挙げ、更に本発明誘導
体の製造例、その特徴等を実施例として挙げ、本発明を
10 更に詳述する。

尚、各実施例では各ヒト M-CSF 誘導体を次のよう
に定義する。例えば E. coli を宿主として式 (1) で
表わされるアミノ酸配列の 1 位 Val から 151 位 Thr ま
でのアミノ酸を含む発現ベクターにて産生された M-
15 CSF 分子を " E. coli [3-153] M-CSF " と呼び、同様
に 1 位 Val から 212 位 Pro までのアミノ酸配列を含む
発現ベクターにて産生されたものを " E. coli [3-214]
M-CSF " と呼ぶ。また参考例 1 で得られる CHO 細胞を
宿主として、32 個のアミノ酸配列よりなるシグナル
20 ペプチド及び 522 個のアミノ酸配列よりなる成熟ヒト
M-CSF 蛋白質をコードする発現ベクターにより産生
される M-CSF 誘導体は " CHO [-32-522] M-CSF " と

18

呼ぶ。中括弧内の番号はCHO細胞で産生されてくるM-CSFのN末端域が式中1位のValの上流に更に2残基(Glu-Glu)付加した構造をとっていることによる。

また各例で得られる試料のCSF活性は以下の方法により測定されるものとする。

〈CSFの活性測定法〉

牛胎児血清(FCS) 20 ml、 α -培地 30 ml及び2倍濃度 α -培地 20 mlを混和して得られる溶液を37℃にて保温し、その23.3 mlを予め50℃に保温した10%寒天(ディフコ社製)溶液 10 mlと混合して37℃に保温する。

一方BALB/C系マウス大腿骨より採取した骨髓細胞(BMC)を、ハンクス液で2回洗浄後、 α -培地にて細胞濃度が 10^7 個/mlとなるように調製し、その15 mlを上記37℃に保温してある寒天培地に加え、よく混和した後、37℃に保温し、次いでその0.5 mlを、予め50 μ lの供試試料を入れたウェル(ティッシュカルチャークラスター12、コスター社製)に加えて手早く混和して室温に放置する。各ウェルの寒天が固化するのを待って炭酸ガスインキュベーターに移し、更に37℃で7日間培養する。

かくして生じたコロニー数を実体顕微鏡を用いて計測

し、C S F 活性の指標とする。また C S F 活性の単位
(U / ml) は、上記コロニー数より、次式(a) に従って
算出した値を用いた。

$$\text{C S F 活性単位 (U / ml)} = (\text{コロニー数}) \times (\text{希釈倍率}) \div 1.5 \quad (\text{a})$$

- 5 尚、上記で生じるコロニーは、形態学的及び酵素化学
的観察の結果、殆んどすべてがマクロファージコロニー
であった。

参考例 1

CH O [- 3 2 - 5 2 2] M - C S F の製造

- 10 1 % の牛胎児血清含有 O P T I - M E M (ギブコ社製)
中にてマイクロキャリアー培養した C H O 細胞クローン
N o . 2 , 3 - 8 [特開平 1 - 1 0 4 1 7 6 号公報参照]
の培養上清液を用いて、以下の精製工程により目的の均
質な C H O [- 3 2 - 5 2 2] M - C S F を得た。尚、
15 以下の工程において目的蛋白はウエスタンブロッティン
グ法に従い検出した。該ウエスタンブロッティングは、
バイオラッド社のトランスブロットセルを用いて行ない、
トランスファーされたニトロセルロース膜を 1 % スキム
ミルク含有 P B S - にてブロッキング後、M - C S F に
20 対するウサギ抗血清と反応させ、更にパーオキシダーゼ
標識ヤギ抗ウサギ抗体 (バイオラッド社製) を反応させ
た。M - C S F のバンドの検出は、かくして得られたニ

20

トロセルロース膜と発色基質である4-クロロ-1-ナフトール液とを反応させることにより行なった。

(1) Con A-セファロースクロマトグラフィー

上記CHO細胞培養上清液69.3ℓを限外濾過濃縮
5 して得られた濃縮液842ml中の650mlを出発物質として、硫安分画法にて35%~65%飽和硫安沈殿画分を得た後、蒸留水にて溶解し(1120ml)サンプルとした。

一方、約500mlのCon A-セファロースゲルを充填
10 したカラム(5×25cm)を0.15M NaCl含有20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)にて平衡化した後、上記サンプル溶液をアプライし、同緩衝液にて十分に洗浄後、0.5Mメチル- α -D-マンノシドを含む同緩衝液にて溶出を行なった。全溶出液をYM
15 -10膜を用いた限外濾過により濃縮後、20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)に緩衝液を交換した後、以下の条件で7回に分けて陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーに供した。

(2) 陰イオン交換高速液体クロマトグラフィー

20 カラム：TSKゲルDEAE-5PW(21.5mmID
×15cm、トーソー社製)

溶出液A：40mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH

21

7. 4)

溶出液 B : 1. 0 M NaCl 含有 40 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7. 4)

流速 : 3. 0 ml / 分

5 フラクシオン容積 : 6 ml / チューブ / 2 分

濃度勾配	時間 (分)	B %
	0	0
	10	0
	20	10
10	95	30
	100	100
	110	100
	115	0
	130	0

15 上記溶出の結果、目的の M-C S F はフラクシオン No. 26 ~ 38 (0. 18 ~ 0. 25 M NaCl) に溶出された。該活性画分をプールした後、限外濾過にて濃縮 (YM-10 膜使用) し、以下の精製を行なった。

(3) ゲル濾過高速液体クロマトグラフィー

20 上記(2)で得た濃縮サンプルを5回に分けて以下の条件でゲル濾過高速液体クロマトグラフィーを行なった。

カラム : TSK ゲル G3000SWG (21. 5 mm ID

2 2

× 6 0 cm、トーソー社製)

溶離液 : 0 . 3 M N a C l 含有 5 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 4)

流 速 : 3 . 0 ml / 分

5 フラクション容積 : 6 ml / チューブ / 2 分

上記ゲル透過高速液体クロマトグラフィーの結果、M - C S F はフラクション N o . 2 0 ~ 2 7 にかけて検出されたが、その中のフラクション N o . 2 4 ~ 2 7 をプールした後、限外透過濃縮し、以下の精製に供した。

10 (4) T S K ゲル Ether - 5 P W 高速液体クロマトグラフィー

上記(3)で得た濃縮サンプル 1 2 ml を 8 回に分けて以下の条件で精製した。

尚、上記濃縮液はカラム注入前に等量の 8 0 % 飽和硫

15 安含有 2 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 4) と混合した後、クロマトグラフィーに供した。

カラム : T S K ゲル Ether - 5 P W (7 . 5 mm ID × 7 5 mm、トーソー社製)

溶離液 A : 2 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液

20 (p H 7 . 4)

溶離液 B : 4 0 % 飽和硫安含有 2 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 4)

23

流速：1.0 ml/分

フラクション容積：2 ml/チューブ/2分

濃度勾配	時間(分)	B%
5	0	100
	5	100
	65	0
	80	0
	85	100
	100	100

10 上記クロマトグラフィーの結果、M-C S FはフラクションNo. 15～18（22%～17%飽和硫安濃度）に検出されたが、之等のフラクションについてフラクション毎にプールした後、夫々のプールについて3～4回に分けて逆相高速液体クロマトグラフィーを行なった。

15 (5) T S Kゲルフェニル-5 P W R P 逆相高速液体クロマトグラフィー

カラム：T S Kゲルフェニル-5 P W R P（7.5 mm ID
× 75 mm、トーソー社製）

溶離液A：0.1% T F A

20 溶離液B：n-プロパノール：1% T F A（9：1）

流速：0.8 ml/分

フラクション容積：1.6 ml/チューブ/2分

2 4

濃度勾配	時間 (分)	B %
	0	0
	5	0
	1 0	2 5
5	5 0	4 5
	6 0	1 0 0
	7 0	1 0 0
	7 5	0
	9 5	0

- 10 上記クロマトグラフィーの結果、M-C S Fは用いるサンプルの相違により、また実験により多少変動したが、フラクシヨンNo. 5～8 (32%～34% n-プロパノール) の間の連続する2本のフラクシヨンに検出された。

尚、分画は予めチューブ当たり200 μ lの0.8Mリン酸二ナトリウムを入れたチューブにて行なった。M-C S F画分はコンセントレーター (トミー精工社製) にて各チューブ毎に遠心濃縮乾固した後、チューブ当たり500 μ lの蒸留水を用いて溶解し実験に供した。

(6) C H O [- 3 2 - 5 2 2] M - C S F の S D S -

20 P A G E

レムリの方法 [Laemmli, U. K., Nature, 277, 680 (1970)] に従い、上記(5)で得られたC H O [- 3 2 -

25

5 2 2] M-C S Fを、レムリのサンプルバッファー
[2-メルカプトエタノールを含むもの(2-ME⁺)
及び含まないもの(2-ME⁻)の両者]の夫々と混合
した後、95℃で10分間加熱処理後、ミニスラブゲル
5 (ゲル濃度15%)を用いてSDS-PAGEを行なっ
た。分子量マーカーとしてはプレスティンドマーカー
(バイオラッド社製)を用い、染色はシルバーステイン
(和光純薬社製)にて行なった。

その結果、非還元条件下(2-ME⁻状態)での分子
10 量は約85000を主成分として、62000~
115000にかけて、また還元条件(2-ME⁺状態)
では43000を主成分として39000~46000
にかけて、夫々スメアーしたバンドとして検出された。

(7) C H O [-32-522] M-C S FのN末端域ア
15 ミノ酸配列

上記(5)で得られたC H O [-32-522] M-C S
FのN末端域アミノ酸配列を、気相シーケンサー(ア
プライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。

その結果、N端10個のアミノ酸配列として次の配列
20 が確認された。尚、サイクル7におけるアミノ酸(X')
は同定し得ず、遺伝子構造からCysであると推定した。

Glu-Glu-Val-Ser-Glu-Tyr-X'-Ser-His-Met-

26

参考例 2

① プラスミド p trp IL-2X-M-CSF101 の作製

プラスミド pcDM-CSF11-185 [M-C-S-F 遺伝子
(λ c M 1 1 c D N A、約 2.5 kb) を保有するプラス
ミド pcDM-CSF11 から作製した (特開平 1-104176
号公報参照)] を、制限酵素 ScaI 及び BamHI で消化して
ScaI-BamHI D N A 断片 (約 450 bp) をアガロースゲ
ル電気泳動にて単離精製した。次いで得られた D N A 断
片の ScaI 切断端に下記合成リンカー (A) を T4 D N A
リガーゼにより連結させ、ScaI 切断端側に制限酵素 XbaI
の切断端を有する XbaI-BamHI D N A 断片 (約 480 bp)
を得た。

合成リンカー (A) :

	2nd SD	ter	
15	5'-CTA GAA CGG AGG ACT CAT TGATG GTA TCA GAA T-3'		
	TT GCC TCC TGA GTA ACTAC CAT AGT CTT A		
	XbaI	start	ScaI
		(Box)	

かくして得られた D N A 断片を、ヒト I L-2 発現プ
ラスミド p trp IL-2D8 Δ (特開昭 63-12958 号公
報参照) の XbaI、BamHI 切断部位に挿入して、所望のプ
ラスミド p trp IL-2X-M-CSF101 を得た。

27

該プラスミドをエシェリヒア・コリHB101株にトランスフォームさせた形質転換体は、「*Escherichia coli* HB101/p_{trp} IL-2X-M-CSF101」なる名称で、1988年12月26日に工業技術院微生物工業技術研究所に微生物研条寄第2226号(*E. coli* [3-153] FERM BP-2226)として寄託された。

② *E. coli* [3-153] M-C S F の分離、精製

(1) 大腸菌からのM-C S F画分の調製

上記①で得たプラスミドp_{trp} IL-2X-M-CSF 101を保持する大腸菌SG21058株1.5g(湿重量)に、0.5Mショ糖を含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.0) 50mlを加え、十分に攪拌した。次にリゾチーム2mg/mlを6ml、続けて0.14M EDTA 4mlを加え、4℃で15分間攪拌処理し、処理後、10000回転/分で20分間遠心分離を行なった。

上清はすて、沈渣を同緩衝液(0.5Mショ糖を含む50mMトリス塩酸、pH 7.0)にて洗浄し、同じく10000回転/分で20分間遠心操作を行なって、沈渣としてスフェロプラストを得た。次いで、これに50mMトリス塩酸(pH 7.0) 50mlを加えて懸濁させ、超音波処理を20KHz、10分間行ない、その後10000回転/分で20分間遠心分離し、同緩衝液

28

(50 mM トリス塩酸、pH 7.0) にて洗浄後、同条件で再度遠心分離し、沈渣としてM-C S F画分を得た。

(2) M-C S F画分からM-C S Fの再構成

上記(1)の操作により得られたM-C S F画分に、

5 7.0 M 塩酸グアニジンを含む50 mM トリス塩酸

(pH 7.0) 100 μ lを加え、4°Cで1時間スターラ

ーにて攪拌して溶解させた。この溶解液を、予め10

mM トリス塩酸(pH 8.5) 300 μ lの入ったビーカ

ー(スターラーにて攪拌)中に徐々に滴下し、滴下終了

10 後、10 mM トリス塩酸(pH 8.5)に対して4°Cで

十分に透析を行ない、その後、10000回転/分で

20分間遠心分離して、沈澱を除去して上清を得た。

かくして得られた上清中には、再構成したM-C S Fが存在している。

15 (3) M-C S Fの精製

上記で得たM-C S Fの精製を以下の通り行なった。

(3-1) ゲル洅過高速液体クロマトグラフィー

上記(2)で得た遠心上清を限外洅過器(アミコン社製、メンブラン: YM-10膜、アミコン社製)を用い

20 て濃縮し、濃縮液を0.45 μ m ミリポアーフィルター

に通した後、以下の条件でゲル洅過高速液体クロマトグラフィーを行なった。

29

カラム：TSKゲルG3000SW（60 cm × 21.5 mm I.D.、トーソー社製）

溶出液：0.3 M NaCl 含有 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.8）

5 流速：3.0 ml/分

フラクション容積：6 ml/チューブ/2分

上記において、ゲル透過HPLC用標準蛋白（オリエンタル酵母社製）の各溶出位置、即ちグルタメート・デ
10 ・デヒドロゲナーゼ（分子量290000）、ラクテート
ーゼ（分子量67000）及びアデニレート・キナーゼ
（分子量32000）から判断して、M-CSFの分子
量は32000と推定された。

上記活性部分を分取し、上記限外透過器にて40 mM
15 ホウ酸ナトリウム（pH 8.0）に対して溶媒交換を行
なった。

（3-2） TSKゲルDEAE-5PWイオン交換高速液
体クロマトグラフィー

上記（3-1）で得た活性溶出画分を、以下の条件で

20 TSKゲルDEAE-5PWイオン交換高速液体クロマ
トグラフィーにかけた。

カラム：TSKゲルDEAE-5PW（7.5 mm I.D. ×

30

75 mm、トーソー社製)

溶離液 A : 5 % メタノール含有 40 mM ホウ酸ナトリウム
 緩衝液 (pH 8.0)

溶離液 B : 1.0 M NaCl 及び 5 % メタノール含有
 40 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0)

流速 : 1.0 ml / 分

フラクション容積 : 1.0 ml / チューブ / 分

濃度勾配 :		時間 (分)	% B
10		0	0
		7	0
		42	30
		47	100
		52	100
15		57	0
		62	0

上記 TSK ゲル DEAE-5PW イオン交換高速液体
 クロマトグラフィーの結果 (溶出パターン) より、フラ
 クション No. 42 ~ 43 (0.23 ~ 0.25 M
 NaCl 濃度) に認められるピークが M-CSF に相当
 し、該ピークを集め大腸菌から精製 M-CSF を得た。

実施例 1

(1) p trp IL-2X-M-CSF 201 の作製

3 1

プラスミド p trp IL-2X-M-CSF 101 を制限酵素 BstEII と SalI で切断し、IL-2 及び M-CSF DNA 部分を含む 4.7 kb の DNA 断片 (I) を得た。

一方、プラスミド pcDM-CSF11 を制限酵素 EcoRI で切断
5 後、切断部分を DNA ポリメラーゼ I のクレノー断片を用いて平滑末端とした後、SalI リンカー (5'-pGGTCGACC OH^{3'}) (ニューイングランドバイオラボ社製) を連結させた。これを制限酵素 SalI 及び BstEII で切断して、約
1.1 kb の BstEII-SalI DNA 断片 (II) を得た。

10 上記 DNA 断片 (I) と (II) とを T4 DNA リガーゼで連結し、これを大腸菌 HB101 のコンピテントセルに形質転換して、所望のプラスミド p trp IL-2X-M-CSF
201 を有する大腸菌 HB101 を得た。

得られたプラスミド p trp IL-2X-M-CSF 201 は、大腸
15 菌トリプトファンプロモーター支配下の転写ユニット内に、2 種のポリペプチドがコードされている。その一つは翻訳開始のメチオニン、ヒト IL-2 アミノ末端側
60 アミノ酸及び合成 DNA リンカーにコードされる 4
アミノ酸からなる 65 アミノ酸のポリペプチドであり、
20 他の一つは翻訳開始の Met と式 (1) で表わされるアミノ酸配列の 1 位アミノ酸 (Val) から 520 位アミノ酸
(Val) までの 520 アミノ酸とのヒト M-CSF 誘導体

3 2

からなるポリペプチドである。

かかる 2・シストロン(two-cistron) 発現システムにおいて、セカンドシストロン(2nd cistron) の翻訳は、合成 DNA リンカーに置かれた第 2 の SD 配列にリボソームが結合することにより開始される。

(2) p trp IL-2X-M-CSF 202 の作製

プラスミド p trp IL-2X-M-CSF 201 を制限酵素 NcoI と SalI で切断して、約 4.8 kb の NcoI-SalI DNA 断片を得た。この DNA 断片の両端を合成オリゴデオキシヌクレオチド [5'-CATGGCCTGATAAG-3' と 5'-TCGACTTATCAGGC-3'] を用いて T4 DNA リガーゼにより連結し、これを大腸菌 HB101 のコンピテントセルに形質転換して、所望のプラスミド p trp IL-2X-M-CSF 202 を有する大腸菌 HB101 を得た。

得られたプラスミド p trp IL-2X-M-CSF 202 は、大腸菌トリプトファンプロモーター支配下の転写ユニット内のセカンドシストロンに、翻訳開始の Met と式 (1) のアミノ酸配列の 1 位アミノ酸 (Val) から 182 位アミノ酸 (Ala) までの 182 アミノ酸とのヒト M・CSF 誘導体からなるポリペプチドをコードしている。

(3) p trp IL-2X-M-CSF 203 の作製

プラスミド p trp IL-2X-M-CSF 201 を制限酵素 BamHI

3 3

とSalIで切断して、約4.9 kbのBamHI-SalI DNA断片を得た。このDNA断片の両端を合成オリゴデオキシヌクレオチド [5'-GATCCATGATAAG-3' と5'-TCGACTTATCATG-3'] を用いてT4 DNAリガーゼにより連結し、これを大腸菌HB101 のコンピテントセルに形質転換して、所望のプラスミドp trp IL-2X-M-CSF 203 を有する大腸菌HB101 を得た。

得られたプラスミドp trp IL-2X-M-CSF 203 は、大腸菌トリプトファンプロモーター支配下の転写ユニット内のセカンドシストロンに、翻訳開始のMet と式(1)のアミノ酸配列の1位アミノ酸(Val) から212位アミノ酸(Pro) までの212アミノ酸とのヒトM・CSF誘導体からなるポリペプチドをコードしている。

上記プラスミドp trp IL-2X-M-CSF 203 を保有する大腸菌HB101 株は「Escherichia coli HB 101/ptrpIL-2X-M-CSF203」なる表示で、平成1年10月18日に工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第11053号(FERM P-11053) として寄託された。

(4) p trp IL-2X-M-CSF 204 の作製

プラスミドp trp IL-2X-M-CSF 201 を制限酵素SmaIとSalIで切断して、約5.0 kbのSmaI-SalI DNA断片を得た。このDNA断片の両端を合成オリゴデオキシヌク

3 4

レオチド [5'-GGGTGATAAG-3' と 5'-TCGACTTATCACCG-3']
を用いて T 4 D N A リガーゼにより連結し、これを大腸
菌 HB101 のコンピテントセルに形質転換して、所望のプ
ラスミド p trp IL-2X-M-CSF 204 を有する大腸菌 HB101
5 を得た。

得られたプラスミド p trp IL-2X-M-CSF 204 は、大腸
菌トリプトファンプロモーター支配下の転写ユニット内
のセカンドシストロンに、翻訳開始の Met と式 (1) の
アミノ酸配列の 1 位アミノ酸 (Val) から 2 5 6 位アミノ
10 酸 (Gly) までの 2 5 6 アミノ酸とのヒト M・C S F 誘導
体からなるポリペプチドをコードしている。

(5) p trp IL-2X-M-CSF 205 の作製

プラスミド p trp IL-2X-M-CSF 201 を制限酵素 SphI と
SalI で切断して、約 5. 1 kb の SphI-SalI D N A 断片を
15 得た。この D N A 断片の両端を合成オリゴデオキシヌク
レオチド [5'-CAGTGATAAG-3' と 5'-TCGACTTATCACTGCATG-
3'] を用いて T 4 D N A リガーゼにより連結し、これを
大腸菌 HB101 のコンピテントセルに形質転換して、所望
のプラスミド p trp IL-2X-M-CSF 205 を有する大腸菌
20 HB101 を得た。

得られたプラスミド p trp IL-2X-M-CSF 205 は、大腸
菌トリプトファンプロモーター支配下の転写ユニット内

3 5

のセカンドシストロンに、翻訳開始のMet と式 (1) のアミノ酸配列の1位アミノ酸(Val) から300位アミノ酸(Gln) までの300アミノ酸とのヒトM・CSF誘導体からなるポリペプチドをコードしている。

5 (6) p trp IL-2X-M-CSF 206 の作製

プラスミドp trp IL-2X-M-CSF 201 を制限酵素KpnIとSalIで切断して、約5.2 kbのKpnI-SalI DNA断片を得た。このDNA断片の両端を合成オリゴデオキシヌクレオチド [5'-CGCCTGATAAG-3' と5'-TCGACTTATCAGGCGGT
10 AC-3'] を用いてT4 DNAリガーゼにより連結し、これを大腸菌HB101 のコンピテントセルに形質転換して、所望のプラスミドp trp IL-2X-M-CSF 206 を有する大腸菌HB101 を得た。

得られたプラスミドp trp IL-2X-M-CSF 206 は、大腸
15 菌トリプトファンプロモーター支配下の転写ユニット内のセカンドシストロンに、翻訳開始のMet と式 (1) のアミノ酸配列の1位アミノ酸(Val) から332位アミノ酸(Ala) までの332アミノ酸とのヒトM・CSF誘導体からなるポリペプチドをコードしている。

20 (7) M - C S F 誘導体の発現

上記(1)～(6)で得た各プラスミドを、大腸菌SG21058株 [J. Bacteriol., 164, 1124-1135 (1985)] に形

3 6

質転換法により導入して、形質転換体 [夫々 E. coli SG 21058 /p trp IL-2X-M- CSF 201、E. coli SG21058 /p trp IL-2X-M-CSF 202、E. coli SG21058 /p trp IL-2X-M- CSF 203、E. coli SG21058 /p trp IL-2X-M- CSF 204、E. coli SG21058 /p trp IL-2X-M- CSF 205 及び E. coli SG21058 /p trp IL-2X-M- CSF 206 と命名する] を得た。

之等の形質転換体を、 $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ のアンピシリンを含む LB 培地 (T. Maniatis, E.F.Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, p440 (1982), Cold Spring Harbor Laboratory) 中で、 37°C で一晚培養後、その培養液 0.5 ml を、 1% カザミノ酸、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 塩酸チアミン、 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ L-システイン及び $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ アンピシリンを加え、グルコース濃度を 0.4% に調整した M9 培地 (同上文献参照) 50 ml に添加し、 37°C で8時間振盪培養後、遠心 (5000 rpm) して菌体を回収し、生産された蛋白質を SDS-PAGE 及びウエスタンブロッティング法により解析した。

ウエスタンブロッティングは、バイオラッド社のトランスブロットセルを用いて行ない、トランスファーされたニトロセルロース膜を 1% 牛血清アルブミン含有

37

PBS⁻にてブロッキング後、M-CSFに対するウサギ抗血清と反応させ、更にパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ抗体（バイオラッド社製）を反応させた。M-CSFのバンドの検出は、かくして得られたニトロセル
5 ロース膜と発色基質である4-クロロ-1-ナフトール液とを反応させることにより行なった。

その結果、セカンドシストロンにコードされているM-CSFは、E. coli SG21058 /p trp IL-2X-M-CSF 202、E. coli SG21058 /p trp IL-2X-M-CSF 203、E. coli
10 SG21058 /p trp IL-2X-M-CSF 204、E. coli SG21058 /p trp IL-2X-M-CSF 205 及びE. coli SG21058 /p trp IL-2X-M-CSF 206 において、夫々予想される分子量の位置に検出された。

(8) M-CSF誘導体 (E.coli[3-214]-M-CSF) の分離、
15 精製

上記(3)で得たプラスミドp trp IL-2X-M-CSF 203 を保持する大腸菌SG21058株10g（湿重量）に、50mMトリス塩酸緩衝液（pH7.0）を加え全量を100mlとし、十分に攪拌した。次にリゾチーム6mg/
20 mlを4ml、続けて0.14M EDTA 8mlを加え、4℃で15分間攪拌処理後、超音波処理（200KHz、2分間、200W）を行ない、更に10000回転/分

38

で20分間遠心分離を行なった。得られた沈渣を2%トリトンX-100を含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.0)にて充分洗浄後、同条件で再度遠心分離を行なって、沈渣としてM-C-S-F画分を得た。

- 5 かくして得られたM-C-S-F画分に、7.0M塩酸グアニジン及び50mMメルカプトエタノールを含む50mMトリス塩酸(pH7.0)20 μ lを加え、室温で4時間攪拌して蛋白質を還元、変性及び溶解させた。この溶解液を0.5mM還元型グルタチオン、0.1mM酸化型グルタチオン及び2M尿素を含む50mMトリス塩酸(pH8.5)2000 μ lの入ったビーカー(スターラーにて攪拌)中に徐々に滴下して100倍に希釈した。滴下終了後、4℃にて2日間以上放置し、その後、3000回転/分で30分間遠心分離を行ない、沈澱を
10 除去して上清2 μ lを得た。
15

かくして得られた上清中には、再構成したM-C-S-Fが存在している。

- 上記で得た遠心上清の内の1 μ lを、限外濾過器(アミコン社製、YM-10膜(アミコン社製)使用)を用いて濃縮し、濃縮液を10000回転/分で20分間遠心分離し、沈澱を除去して上清を得た。この上清に更に硫酸アンモニウム(硫安)を30%飽和となる量に加え、
20

39

再度同様に遠心分離し、以下の条件で疎水性相互作用クロマトグラフィーを行なった。

カラム：TSKゲルフェニル5PW（7.5mmID×75mm、トーソー社製）

- 5 溶出液A：30%飽和硫安含有50mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4）

溶出液B：50mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4）

流速：1.0ml/分

- 10 フラクション容積：1ml/チューブ/分

	濃度勾配	時間（分）	B %
		0	0
		7	0
		40	100
15		45	100
		50	0
		60	0

上記の結果、M-CSF活性はフラクションNo.40～42（8～6%飽和硫安濃度）の画分に溶出された。

- 20 該活性部分を分取し、上記限外ろ過器にて50mMリン酸ナトリウム（pH7.4）に対して溶媒交換を行ない、以下の条件でDEAE-5PWイオン交換高速液体クロ

40

マトグラフィーを行なった。

カラム：D E A E - 5 P W (7.5 mm I.D. × 75 mm、ト
ーソー社製)

5 溶離液 A：50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH
7.4)

溶離液 B：1.0 M N a C l 含有 50 mM リン酸ナト
リウム緩衝液 (pH 7.4)

流 速：1.0 ml/分

フラクション容積：1.0 ml/チューブ/分

10	濃度勾配：	<u>時間 (分)</u>	<u>% B</u>
		0	0
		7	0
		42	30
		47	100
15		52	100
		57	0
		62	0

上記 D E A E - 5 P W イオン交換高速液体クロマトグ
ラフィーの結果 (溶出パターン) より、フラクション
20 N o. 31 及び 32 (0.18 ~ 0.20 M N a C l 濃
度) に認められるピークが M - C S F に相当し、該ピー
クを集めて、本発明ヒト M - C S F 誘導体を得た。

4 1

上記各精製工程での本発明ヒトM-C S F誘導体の活性、蛋白量、比活性及び精製度を求めた結果を下記第1表に示す。

第 1 表

精 製 工 程	容 積 (μ l)	活 性 (単位)	蛋白量 (mg)	比 活 性 (単位/mg蛋白)	精製度 (倍)
再 構 成 液	1000	4.62×10^7	110	4.20×10^5	1.0
30% 硫酸上清	45	3.93×10^7	10.1	3.89×10^6	9.3
フェニル5-PW HPLC	3.6	1.50×10^7	1.82	8.24×10^6	19.6
DEAE-5PW HPLC	2.0	7.84×10^6	0.514	1.53×10^7	36.4

(9) M-C S F誘導体 (E.coli[3-214]-M-CSF) の

S D S - P A G E

レムリの方法 [Laemmli, U. K., Nature, 277, 680 (1970)] に従い、上記精製サンプルをレムリのサンプルバッファー [2-ME⁺ 及び 2-ME⁻] の夫々に溶解し、95℃で5分間加熱処理後、マイクロスラブゲルを用いて電気泳動を行なった [装置：マリソル産業社製又は第一化学薬品社製]。尚、分子量マーカーとしては、プレステインドマーカー (バイオラッド社製) を用い、染色はクマシーブリリアントブルー R-250 によった。

4 2

その結果、E.coli[3-214]-M-CSF の分子量は、 $2 - ME^-$ 状態で約 5 2 5 0 0 であり、 $2 - ME^+$ 状態で約 2 6 9 0 0 であり、この位置に単一バンドとして泳動された。

5 実施例 2

(1) プラスミド p trp IL-2X-M-CSF109 の作製

プラスミド pcDM-CSF11-185 [M - C S F 遺伝子
(λ c M 1 1 c D N A、約 2. 5 kb) を保有するプラス
ミド pcDM-CSF11 から作製した (特開平 1 - 1 0 4 1 7 6
10 号公報参照)] を、制限酵素 ScaI 及び BamHI で消化して
ScaI - BamHI D N A 断片 (約 4 5 0 bp) をアガロースゲ
ル電気泳動にて単離精製した。

次いで得られた D N A 断片の ScaI 切断端に下記合成リ
ンカー (B) を T 4 D N A リガーゼにより連結させ、
15 ScaI 切断端側に制限酵素 XbaI の切断端を有する XbaI-Bam
HI D N A 断片 (約 4 8 0 bp) を得た。

合成リンカー (B) :

	2nd SD	ter
5'	CTA GAA CGG AGG ACT CAT TGATG TCA GAA T-3'	
20	TT GCC TCC TGA GTA ACTAC AGT CTT A	
	start	
	(Box)	

4 3

かくして得られたDNA断片を、ヒトIL-2発現プラスミドp trp IL-2D8Δ（特開昭63-12958号公報参照）のXbaI、BamHI 切断部位に挿入して、所望のプラスミドp trp IL-2X-M-CSF109を得た。

- 5 得られたプラスミドp trp IL-2X-M-CSF 109 は、大腸菌トリプトファンプロモーター支配下の転写ユニット内に、2種のポリペプチドがコードされている。その一つは翻訳開始のMet、ヒトIL-2アミノ末端側60アミノ酸及び合成リンカーDNA配列により生じる4アミノ
- 10 酸からなる65アミノ酸のポリペプチドであり、他の一つは翻訳開始のMetと式(1)で表わされるアミノ酸配列の2位アミノ酸(Ser)から151位アミノ酸(Thr)までの150アミノ酸とからなるポリペプチドである。

(2) p trp IL-2X-M-CSF 402 の作製

- 15 プラスミドp trp IL-2X-M-CSF 109 を制限酵素BstEIIとSalIで切断して、約1.5 kbのDNA断片を得た。

一方、プラスミドp trp IL-2X-M-CSF 202 を同様に制限酵素BstEII及びScaIで切断して、約3.3 kbのDNA断片を得た。

- 20 上記両DNA断片をT4 DNAリガーゼを用いて連結し、これを大腸菌HB101のコンピテントセルに形質転換して、所望のプラスミドp trp IL-2X-M-CSF 402 を有す

る大腸菌HB101 を得た。

かくして得られたプラスミドp trp IL-2X-M-CSF 402
は、大腸菌トリプトファンプロモーター支配下の転写ユ
ニット内のセカンドシストロンに、翻訳開始のMet と式
5 (1) のアミノ酸配列の2位アミノ酸(Ser) から182
位アミノ酸(Ala) までの181アミノ酸とのヒトM・
CSF誘導体からなるポリペプチドをコードしている。

(3) p trp IL-2X-M-CSF 403 の作製

プラスミドp trp IL-2X-M-CSF 109 を制限酵素BstEII
10 とScaIで切断して、約1.5 kbのDNA断片を得た。

一方、プラスミドp trp IL-2X-M-CSF 203 を同様に制
限酵素BstEII及びScaIで切断して、約3.4 kbのDNA
断片を得た。

上記両DNA断片をT4 DNAリガーゼを用いて連結
15 し、これを大腸菌HB101 のコンピテントセルに形質転換
して、所望のプラスミドp trp IL-2X-M-CSF 403 を有す
る大腸菌HB101 を得た。

かくして得られたプラスミドp trp IL-2X-M-CSF 403
は、大腸菌トリプトファンプロモーター支配下の転写ユ
20 ニット内のセカンドシストロンに、翻訳開始のMet と式
(1) のアミノ酸配列の2位アミノ酸(Ser) から212
位アミノ酸(Pro) までの211アミノ酸とのヒトM・

4 5

C S F 誘導体からなるポリペプチドをコードしている。

(4) p trp IL-2X-M-CSF 404 の作製

プラスミド p trp IL-2X-M-CSF 109 を制限酵素 BstEII と ScaI で切断して、約 1.5 kb の DNA 断片を得た。

5 一方、プラスミド p trp IL-2X-M-CSF 204 を同様に制限酵素 BstEII 及び ScaI で切断して、約 3.5 kb の DNA 断片を得た。

上記両 DNA 断片を T4 DNA リガーゼを用いて連結し、これを大腸菌 HB101 のコンピテントセルに形質転換
10 して、所望のプラスミド p trp IL-2X-M-CSF 404 を有する大腸菌 HB101 を得た。

かくして得られたプラスミド p trp IL-2X-M-CSF 404 は、大腸菌トリプトファンプロモーター支配下の転写ユニット内のセカンドシストロンに、翻訳開始の Met と式
15 (1) のアミノ酸配列の 2 位アミノ酸 (Ser) から 256 位アミノ酸 (Gly) までの 255 アミノ酸とのヒト M・C S F 誘導体からなるポリペプチドをコードしている。

(5) p trp IL-2X-M-CSF 405 の作製

プラスミド p trp IL-2X-M-CSF 109 を制限酵素 BstEII
20 と ScaI で切断して、約 1.5 kb の DNA 断片を得た。

一方、プラスミド p trp IL-2X-M-CSF 205 を同様に制限酵素 BstEII 及び ScaI で切断して、約 3.6 kb の DNA

断片を得た。

上記両DNA断片をT4DNAリガーゼを用いて連結し、これを大腸菌HB101のコンピテントセルに形質転換して、所望のプラスミドp trp IL-2X-M-CSF 405を有する大腸菌HB101を得た。

かくして得られたプラスミドp trp IL-2X-M-CSF 405は、大腸菌トリプトファンプロモーター支配下の転写ユニット内のセカンドシストロンに、翻訳開始のMetと式(1)のアミノ酸配列の2位アミノ酸(Ser)から300位アミノ酸(Gln)までの299アミノ酸とのヒトM・CSF誘導体からなるポリペプチドをコードしている。

(6) p trp IL-2X-M-CSF 406 の作製

プラスミドp trp IL-2X-M-CSF 109を制限酵素BstEIIとScaIで切断して、約1.5 kbのDNA断片を得た。

一方、プラスミドp trp IL-2X-M-CSF 206を同様に制限酵素BstEII及びScaIで切断して、約3.7 kbのDNA断片を得た。

上記両DNA断片をT4DNAリガーゼを用いて連結し、これを大腸菌HB101のコンピテントセルに形質転換して、所望のプラスミドp trp IL-2X-M-CSF 406を有する大腸菌HB101を得た。

かくして得られたプラスミドp trp IL-2X-M-CSF 406

は、大腸菌トリプトファンプロモーター支配下の転写ユニット内のセカンドシストロンに、翻訳開始のMet と式(1)のアミノ酸配列の2位アミノ酸(Ser) から332位アミノ酸(Ala) までの331アミノ酸とのヒトM・

5 CSF誘導体からなるポリペプチドをコードしている。

(7) M-CSF誘導体の発現

上記(1)~(6)で得た各プラスミドを、大腸菌SG21058株 [J. Bacteriol., 164, 1124-1135 (1985)] に形質転換法により導入して、形質転換体 [夫々E. coli SG
10 21058 /p trp IL-2X-M- CSF 109、E. coli SG21058 /p trp IL-2X-M-CSF 402、E. coli SG21058 /p trp IL-2X-M- CSF 403、E. coli SG21058 /p trp IL-2X-M- CSF 404、E. coli SG21058 /p trp IL-2X-M- CSF 405 及びE. coli SG21058 /p trp IL-2X-M- CSF 406 と命名する]
15 を得た。

之等の形質転換体を、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアmpiシリンを含むLB培地 (T. Maniatis, E.F.Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, p440 (1982), Cold Spring Harbor Laboratory) 中で、
20 37°C で一晩培養後、その培養液 0.5 ml を、1%カザミノ酸、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 塩酸チアミン、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ L-システイン及び $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ アmpiシリンを加え、グルコ

ース濃度を0.4%に調整したM9培地（同上文献参照）
50 μ lに添加し、37℃で8時間振盪培養後、遠心
（5000 rpm）して菌体を回収し、生産された蛋白質
を実施例1の(7)と同様にして、SDS-PAGE及びウ
5 エスタンブロッティング法により解析した。

その結果、セカンドシストロンにコードされているM
-CSFは、E. coli SG21058 /p trp IL-2X-M-CSF 109、
E. coli SG21058 /p trp IL-2X-M- CSF 402、E. coli
SG21058 /p trp IL-2X-M- CSF 403、E. coli SG21058
10 /p trp IL-2X-M- CSF 404、E. coli SG21058 /p trp
IL-2X-M-CSF405及びE. coli SG21058 /p trp IL-2X-M-
CSF 406において、夫々予想される分子量の位置に検出
された。

(8) M-CSF誘導体（E.coli[4-153]-M-CSF）の分離、
15 精製

(1) 大腸菌からのM-CSF画分の調製

上記(1)で得たプラスミドp trp IL-2X-M-CSF 109を保
持する大腸菌SG21058株7.5g（湿重量）に、
50 mMトリス塩酸緩衝液（pH 7.0）を加え全量を
20 100 μ lとし、十分に攪拌した。次にリゾチーム2 mg/
 μ lを6 μ l、続けて0.14 M EDTA 4 μ lを加え、4
℃で15分間攪拌処理し、超音波処理（20 KHz、

10 分間、200 W)を行ない、更に10000回転／
分で20分間遠心分離を行ない沈渣を得た。これを更に
洗浄用緩衝液(2%トリトンX100を含む50 mMト
リス塩酸緩衝液、pH 7.0)にて洗浄後、同条件で再
5 度遠心分離を行ない、この操作を2回繰返して、M-
CSF画分(沈渣)を得た。

(2) M-CSF画分からM-CSFの再構成

上記(1)で得たM-CSF画分に、7 M塩酸グアニ
ジン及び25 mM 2-メルカプトエタノールを含む50
10 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.0) 20 μ lを加え、室
温で4時間以上攪拌して蛋白質を還元、変性及び溶解さ
せた。この溶解液を予め0.5 mM還元型グルタチオン、
0.1 mM酸化型グルタチオン及び2 M尿素を含む50
mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.5) 2000 μ lの入っ
15 たビーカー(スターラーにて攪拌)中に徐々に滴下し、
その後、4℃にて2日間以上放置した。次に溶液を
3500回転／分で30分間遠心分離を行ない、沈澱を
除去して上清を得た。

かくして得られた上清中には、再構成したM-CSF
20 が存在している。

(3) M-CSFの精製

上記(2)で得た遠心上清を以下の通り精製した。

50

(3-1) 疎水性高速液体クロマトグラフィー

上記遠心上清を限外濾過器（アミコン社製、メンブラン：YM-10膜（アミコン社製）使用）を用いて濃縮し、濃縮液に硫酸アンモニウムを30%飽和溶液となる
 5 ように加え、10000回転/分で20分間遠心分離し、沈殿を除去して上清を得た。この上清を0.45 μ mミリポアーフィルターに通した後、2回に分けて以下の条件で疎水性相互作用クロマトグラフィーを行なった。

10 カラム：TSKゲルフェニル5PW（7.5mmID×75mm、トーソー社製）

溶出液A：30%飽和硫酸含有40mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4）

溶出液B：40mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4）

15 流速：1.0ml/分

フラクション容積：1ml/チューブ/分

濃度勾配	<u>時間（分）</u>	<u>B %</u>
	0	0
	7	0
20	40	100
	45	100
	50	0

5 1

上記の結果、M-C S F 活性は硫酸濃度 1 1 ~ 6 % の画分に溶出された。該活性部分を分取し、上記限外濾過器にて 4 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 4) に対して溶媒交換を行なった。

5 (3-2) 陰イオン交換高速液体クロマトグラフィー

上記 (3-1) で得た画分を 4 回に分けて、以下の条件で D E A E - 5 P W 陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーを行なった。

カラム : T S K ゲル D E A E - 5 P W (7 . 5 m m I . D . ×
10 7 5 m m 、 トーソー社製)

溶離液 A : 5 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H
7 . 4)

溶離液 B : 1 . 0 M N a C l 含有 5 0 m M リン酸ナト
リウム緩衝液 (p H 7 . 4)

15 流 速 : 1 . 0 m l / 分

フラクション容積 : 1 . 0 m l / チューブ / 分

濃度勾配 :

時間 (分)

% B

0 0

5 0

20

5 5 3 0

6 0 1 0 0

6 5 1 0 0

5 2

7 0

0

上記 D E A E - 5 P W イオン交換高速液体クロマトグラフィーの結果（溶出パターン）より、フラクション N o . 4 1 及び 4 2 （ 0 . 2 1 ~ 0 . 2 2 M N a C l 濃度）に認められるピークが M - C S F に相当し、該ピークを集めて、精製された本発明ヒト M - C S F 誘導体（E.coli[4-153]-M-CSF）を得た。

(9) M - C S F 誘導体（E.coli[3-214]-M-CSF）の N - 末端アミノ酸配列の決定

10 上記(8)の(3-2)で得られた M - C S F 誘導体（E.coli[4-153]-M-CSF）の N - 末端アミノ酸配列を、気相シーケンサー（アプライド・バイオシステムズ社製）を用いて決定した。

その結果、Ser-Glu-Tyr-X'-Serの配列と Met-Ser-Glu-Tyr-X'-Serの配列とが、約 7 ~ 8 対 1 の割合で認められた。

尚、上記配列中、アミノ酸（X'）は同定し得ず、遺伝子構造から Cys であると推定した。

10 (10) M - C S F 誘導体（E.coli[3-153]-M-CSF）の改良分離、精製

(1) 大腸菌からの M - C S F 画分の調製

プラスミド p trp IL-2X-M-CSF 101 を保持する大腸菌

53

S G 2 1 0 5 8 株 7.5 g (湿重量) に、50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) 1.0 ml を加えて十分に攪拌した。次にリゾチーム 4 mg/ml を 6 ml 及び EDTA を最終濃度が 10 mM となるように加え、4℃ で 15 分間
5 攪拌処理し、超音波処理 (20 KHz、10 分間、200 W) を行ない、更に 10000 × g / 分で 20 分間遠心分離を行ない沈渣を得た。これを更に洗浄用緩衝液 (2% トリトン X 100 を含む 50 mM トリス塩酸、pH 7.0) にて洗浄後、同条件で再度遠心分離を行ない、この操作を 2 回繰返して、M-C S F 画分 (沈渣)
10 を得た。

(2) M-C S F 画分から M-C S F の再構成

上記 (1) で得た M-C S F 画分に、7 M 塩酸グアニジン及び 25 mM 2-メルカプトエタノールを含む 50
15 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) 20 ml を加え、室温で 4 時間以上攪拌して溶解させた。この溶解液を予め 0.5 mM 還元型グルタチオン、0.1 mM 酸化型グルタチオン及び 2 M 尿素を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 2000 ml の入ったビーカー (スターラーにて攪拌) 中に徐々に滴下し、その後、4℃ にて 2 日
20 間以上放置した。次に溶液を 10000 × g / 分で 30 分間遠心分離を行ない、沈澱を除去して上清を得た。

5 4

かくして得られた上清中には、再構成したM-C-S-Fが存在している。

(3) M-C-S-Fの精製

上記(2)で得た遠心上清を以下の通り精製した。

5 (3-1) イオン交換クロマトグラフィーによる濃縮

予め50mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.5)で平衡化しておいたQAE-ゼータ・プレップ100(ファルマシアーL B K社製)に上記(2)で得た再構成液をかけ、次に上記緩衝液で充分洗浄後、0.5M NaCl
10 を含む上記緩衝液にてM-C-S-F画分の溶出を行なった。

(3-2) 疎水性高速液体クロマトグラフィー

上記で得られた画分に硫酸アンモニウムを30%飽和溶液となるように加え、10000×g/分で20分間遠心分離し、沈殿を除去して上清を得た。この上清を
15 0.45μmミリポアーフィルターに通した後、以下の条件で疎水性高速液体クロマトグラフィーを行なった。

カラム：TSKゲルフェニル5PW(21.5mmID×
150mm、トーソー社製)

溶出液A：30%飽和硫酸含有40mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)
20

溶出液B：40mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH
7.4)

5 5

流 速 : 3 . 0 ml / 分

フラクション容積 : 3 . 0 ml / チューブ / 分

濃度勾配	時間 (分)	B %
	0	0
5	7	0
	4 7	1 0 0
	5 2	1 0 0
	5 7	0

上記の結果、M - C S F 活性は硫安濃度 6 ~ 3 % の画
 10 分に溶出された。該活性部分を分取し、限外濾過器にて
 4 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 4) に対して溶媒
 交換を行なった。

(3-3) 陰イオン交換高速液体クロマトグラフィー

上記 (3-2) で得た画分を、以下の条件で陰イオン交換
 15 高速液体クロマトグラフィーにかけた。

カラム : T S K ゲル D E A E - 5 P W (2 1 . 5 mm I . D .
 × 1 5 0 mm、トーソー社製)

溶離液 A : 4 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H
 7 . 4)

20 溶離液 B : 1 . 0 M N a C l 含有 4 0 m M リン酸ナト
 リウム緩衝液 (p H 7 . 4)

流 速 : 3 . 0 ml / 分

5 6

フラクシ ョ ン 容 積 : 3 . 0 μ l / チ ュ ー プ / 分

濃度勾配 :	<u>時間 (分)</u>	<u>% B</u>
	0	0
	5	0
5	4 3	3 0
	4 8	1 0 0
	5 3	1 0 0
	5 8	0

10 上記陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーの結果
 (溶出パターン) より、フラクシ ョ ン N o . 3 5 及び 3 6
 (0 . 2 8 ~ 0 . 2 9 M N a C l 濃度) に認められる
 ピークが M - C S F に相当し、該ピークを集めて、精製
 された本発明ヒト M - C S F 誘導体 (E . coli [3 - 1 5 3] - M -
 CSF) を得た。

15 < 本発明ヒト M - C S F 誘導体の生物活性 >

(1) 血中半減期の測定

実施例で得た各ヒト M - C S F 誘導体 (E . coli [3 - 2 1 4]
 - M - CSF) 及び参考例 1 で得た CHO [- 3 2 - 5 2 2] - M - CSF のそれ
 ぞれを M S A (マウス血清アルブミン) 含有生理食塩水
 20 (3 0 μ g / μ l) にて 2 0 μ g / μ l の濃度となるように
 希釈調整し、之等を 1 群 4 匹からなる各群マウス
 (B A L B / c 雄性、7 週齢) に 1 匹当たり 0 . 2 5 μ l

($200 \mu\text{g} / \text{kg}$) の量で静脈内(I.V.)投与した。投与後、経時的に血中M-C S F量をR I Aにより求めた。

該R I Aによる血中半減期の測定は、次の方法により実施した。即ち、検体サンプル(血液)又は標準M-C S F (参考例2で得たE. coli [3- 153] M-CSF) 溶液
5 $100 \mu\text{l}$ 、Na ^{125}I で標識したM-C S F (上記標準M-C S Fをヨードゲン法により ^{125}I にて標識したもの) を $100 \mu\text{l}$ 中に 10000 cpm 含む溶液、及び抗M-C S Fウサギ血清(後記する方法により得られる
10 ポリクローナル抗体O C T 5 1 1を、 0.1% B S A / P B S / 0.05% チメロザールで 40000 倍希釈したもの) $200 \mu\text{l}$ の混合液を、室温で 20 時間又は 4°C で 48 時間放置して、抗原抗体反応を行なわせ、反応終了後、標識M-C S Fの結合物と非結合物を2抗体法
15 にて分離する。該分離は、まず 0.1% B S A / P B S / 0.05% チメロザールで 400 倍に希釈した正常ウサギ血清 $100 \mu\text{l}$ と、同様に 40 倍に希釈した抗ウサギI g G血清 $100 \mu\text{l}$ 、及び $200 \mu\text{l}$ のP B Sに溶かした 12.5% ポリエチレングリコールを加え、 30
20 分間 4°C で反応させ、 15 分間 3000 rpm で遠心分離し、デカンテーションして標識M-C S Fと抗体との結合物である沈渣を得る。沈渣はガンマーカウンターで1

5 8

分間カウントして標準溶液からスタンダードカーブを作成し、本発明M-C-S-F誘導体を含む検体サンプルにつき、上記操作を繰り返して同様にして測定したカウント数を、上記スタンダードカーブ上にプロットして、

- 5 該検体中のM-C-S-F濃度を求める。

かくして得られた結果を下記第2表に示す。

第 2 表

時間 (分)	M-C-S-F (I. V. 投与)	
	CHO[-32-522]-M-CSF	E.coli[3-214]-M-CSF
5	1335	3850
15	891	3368
30	623	2715
60	434	1751
120	272	447
240	44	124
1360	10	19
半減期	53.0分	46.2分

尚表中単位はng/ μ lである。

上記表よりE.coli[3-214]-M-CSF 及びCHO[-32-522]-M-CSFの血中半減期は、それぞれ46.2分及び53.0分であることが判る。

尚、上記 R I A において用いた M - C S F に対するポリクローナル抗体は次のような性質を有する。

1) 本発明で用いられるポリクローナル抗体は以下の方法により作製された。

- 5 ポリクローナル抗体の作製は、2.5 kg から 3.0 kg の雌のニュージーランドホワイ種種のウサギに、CHO[-32-522]-M-CSF の精製品 (P B S に溶解) を一羽当り 20 μ g を等量のフロイントの完全アジュバントと共にウサギの皮内に多点免疫し、それ以降は同 20 μ g をフロイントの不完全アジュバントと共に 1 ヶ月おきに免疫し、
10 最初の免疫に合わせて合計 7 回免疫した。免疫終了後、1 週間後にウサギより全採血して抗血清を得た。

得られた 3 種の抗体の内の一つを O C T 5 1 1 と命名し、-80℃で保存した。

- 15 2) 本発明誘導体の血中半減期の測定に用いるポリクローナル抗体 O C T 5 1 1 は以下の性質を有する。

① 抗体力価

- CHO[-32-522]-M-CSF を、ヨードゲン法にて 125 I を標識してこの 125 I 標識 CHO[-32-522]-M-CSF 10 kcpm の内、
20 50% と結合できる抗血清の希釈倍率を抗体価とした。

その結果、O C T 5 1 1 の抗体力価は 80000 であった。

② 中和活性

マウスの骨髓細胞を使用したコロニーアッセイ法で中和活性を求めた所、OCT 511の中和活性は、OCT 511 1 μ l当りでCHO [-32-522]-M-CSF を $1 \sim 2 \times 10^6$ 単位が中和できた。

③ 交差反応性

このOCT 511はマウスCSF (L-Cellの培養上清) 及びヒトGM-CSF (アマシャム社) と全く交差せず、更にヒトIL-1 α (特開昭63-164899号公報参照)、IL-1 β (特開昭63-152398号公報参照)、IL-2 (アマシャム社)、TNF- α (アマシャム社) にも全く交差しなかった。

請 求 の 範 囲

- ① 下式で表わされるアミノ酸配列中、151位Thr から520位Val の領域のいずれかにC末端を有し、該配列のN末端にMet が付加されるか又はN末端Val が
5 欠失されることのあるアミノ酸一次配列を有することを特徴とする生物活性な組換え型ヒトM-C-S-F誘導体。

Val-Ser-Glu-Tyr-Cys-Ser-His-Met-Ile-Gly-Ser-Gly-
His-Leu-Gln-Ser-Leu-Gln-Arg-Leu-Ile-Asp-Ser-Gln-
10 Met-Glu-Thr-Ser-Cys-Gln-Ile-Thr-Phe-Glu-Phe-Val-
Asp-Gln-Glu-Gln-Leu-Lys-Asp-Pro-Val-Cys-Tyr-Leu-
Lys-Lys-Ala-Phe-Leu-Leu-Val-Gln-Asp-Ile-Met-Glu-
Asp-Thr-Met-Arg-Phe-Arg-Asp-Asn-Thr-Pro-Asn-Ala-
Ile-Ala-Ile-Val-Gln-Leu-Gln-Glu-Leu-Ser-Leu-Arg-
15 Leu-Lys-Ser-Cys-Phe-Thr-Lys-Asp-Tyr-Glu-Glu-His-
Asp-Lys-Ala-Cys-Val-Arg-Thr-Phe-Tyr-Glu-Thr-Pro-
Leu-Gln-Leu-Leu-Glu-Lys-Val-Lys-Asn-Val-Phe-Asn-
Glu-Thr-Lys-Asn-Leu-Leu-Asp-Lys-Asp-Trp-Asn-Ile-
Phe-Ser-Lys-Asn-Cys-Asn-Asn-Ser-Phe-Ala-Glu-Cys-
20 Ser-Ser-Gln-Asp-Val-Val-Thr-Lys-Pro-Asp-Cys-Asn-
Cys-Leu-Tyr-Pro-Lys-Ala-Ile-Pro-Ser-Ser-Asp-Pro-
Ala-Ser-Val-Ser-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Ala-Pro-Ser-

6 2

Met-Ala-Pro-Val-Ala-Gly-Leu-Thr-Trp-Glu-Asp-Ser-
Glu-Gly-Thr-Glu-Gly-Ser-Ser-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-
Gln-Pro-Leu-His-Thr-Val-Asp-Pro-Gly-Ser-Ala-Lys-
Gln-Arg-Pro-Pro-Arg-Ser-Thr-Cys-Gln-Ser-Phe-Glu-
5 Pro-Pro-Glu-Thr-Pro-Val-Val-Lys-Asp-Ser-Thr-Ile-
Gly-Gly-Ser-Pro-Gln-Pro-Arg-Pro-Ser-Val-Gly-Ala-
Phe-Asn-Pro-Gly-Met-Glu-Asp-Ile-Leu-Asp-Ser-Ala-
Met-Gly-Thr-Asn-Trp-Val-Pro-Glu-Glu-Ala-Ser-Gly-
Glu-Ala-Ser-Glu-Ile-Pro-Val-Pro-Gln-Gly-Thr-Glu-
10 Leu-Ser-Pro-Ser-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Ser-Met-Gln-
Thr-Glu-Pro-Ala-Arg-Pro-Ser-Asn-Phe-Leu-Ser-Ala-
Ser-Ser-Pro-Leu-Pro-Ala-Ser-Ala-Lys-Gly-Gln-Gln-
Pro-Ala-Asp-Val-Thr-Gly-Thr-Ala-Leu-Pro-Arg-Val-
Gly-Pro-Val-Arg-Pro-Thr-Gly-Gln-Asp-Trp-Asn-His-
15 Thr-Pro-Gln-Lys-Thr-Asp-His-Pro-ser-Ala-Leu-Leu-
Arg-Asp-Pro-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Pro-Arg-Ile-Ser-
Ser-Pro-Arg-Pro-Gln-Gly-Leu-Ser-Asn-Pro-Ser-Thr-
Leu-Ser-Ala-Gln-Pro-Gln-Leu-Ser-Arg-Ser-His-Ser-
Ser-Gly-Ser-Val-Leu-Pro-Leu-Gly-Glu-Leu-Glu-Gly-
20 Arg-Arg-Ser-Thr-Arg-Asp-Arg-Arg-Ser-Pro-Ala-Glu-
Pro-Glu-Gly-Gly-Pro-Ala-Ser-Glu-Gly-Ala-Ala-Arg-
Pro-Leu-Pro-Arg-Phe-Asn-Ser-Val-Pro-Leu-Thr-Asp-

Thr-Gly-His-Glu-Arg-Gln-Ser-Glu-Gly-Ser-Ser-Ser-
Pro-Gln-Leu-Gln-Glu-Ser-Val-Phe-His-Leu-Leu-Val-
Pro-Ser-Val-Ile-Leu-Val-Leu-Leu-Ala-Val-Gly-Gly-
Leu-Leu-Phe-Tyr-Arg-Trp-Arg-Arg-Arg-Ser-His-Gln-
5 Glu-Pro-Gln-Arg-Ala-Asp-Ser-Pro-Leu-Glu-Gln-Pro-
Glu-Gly-Ser-Pro-Leu-Thr-Gln-Asp-Asp-Arg-Gln-Val-
Glu-Leu-Pro-Val

- ② 1位Val から182位Ala までのアミノ酸一次配列
を有する請求項①に記載のM-C-S-F誘導体。
- 10 ③ 1位Val から212位Pro までのアミノ酸一次配列
を有する請求項①に記載のM-C-S-F誘導体。
- ④ 1位Val から256位Gly までのアミノ酸一次配列
を有する請求項①に記載のM-C-S-F誘導体。
- ⑤ 1位Val から300位Gln までのアミノ酸一次配列
15 を有する請求項①に記載のM-C-S-F誘導体。
- ⑥ 1位Val から332位Ala までのアミノ酸一次配列
を有する請求項①に記載のM-C-S-F誘導体。
- ⑦ 1位Val から520位Val までのアミノ酸一次配列
を有する請求項①に記載のM-C-S-F誘導体。
- 20 ⑧ 2位Ser から151位Thr までのアミノ酸一次配列
を有する請求項①に記載のM-C-S-F誘導体。
- ⑨ 2位Ser から182位Ala までのアミノ酸一次配列

を有する請求項①に記載のM-C S F誘導体。

⑩ 2位Ser から212位Pro までのアミノ酸一次配列
を有する請求項①に記載のM-C S F誘導体。

⑪ 2位Ser から256位Gly までのアミノ酸一次配列
5 有する請求項①に記載のM-C S F誘導体。

⑫ 2位Ser から300位Gln までのアミノ酸一次配列
を有する請求項①に記載のM-C S F誘導体。

⑬ 2位Ser から332位Ala までのアミノ酸一次配列
を有する請求項①に記載のM-C S F誘導体。

10 ⑭ 請求項②～⑬に記載のM-C S F誘導体の発現ベク
ター。

⑮ p trp IL-2X-M-CSF 201、p trp IL-2X-M-CSF 202、
p trp IL-2X-M-CSF 203、p trp IL-2X-M-CSF 204、
p trp IL-2X-M-CSF 205、p trp IL-2X-M-CSF 206、
15 p trp IL-2X-M-CSF 109、p trp IL-2X-M-CSF 402、
p trp IL-2X-M-CSF 403、p trp IL-2X-M-CSF 404、
p trp IL-2X-M-CSF 405 及びp trp IL-2X-M-CSF 406
である請求項⑭に記載のベクター。

⑯ 請求項⑭に記載のベクターで形質転換された形質転
20 換体。

⑰ E. coli SG21058 / p trp IL-2X-M-CSF 201、
E. coli SG21058 / p trp IL-2X-M-CSF 202、

- E. coli SG21058 / p trp IL-2X-M-CSF 203 、
E. coli SG21058 / p trp IL-2X-M-CSF 204 、
E. coli SG21058 / p trp IL-2X-M-CSF 205 、
E. coli SG21058 / p trp IL-2X-M-CSF 206 、
5 E. coli SG21058 / p trp IL-2X-M-CSF 109 、
E. coli SG21058 / p trp IL-2X-M-CSF 402 、
E. coli SG21058 / p trp IL-2X-M-CSF 403 、
E. coli SG21058 / p trp IL-2X-M-CSF 404 、
E. coli SG21058 / p trp IL-2X-M-CSF 405 及び
10 E. coli SG21058 / p trp IL-2X-M-CSF 406 である請
求項⑯に記載の形質転換体。

⑱ 請求項⑯に記載の形質転換体を培養して、発現されるM-C-S-Fを採取することを特徴とする請求項①に記載のM-C-S-F誘導体の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP90/01439

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl ⁵ C07K13/00, C12N15/27, 1/21, C12P21/02//A61K37/02 (C12N1/21, C12R1:19) (C12P21/02, C12R1:19)		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C07K13/00, C12N1/21, 15/27, C12P21/02, A61K37/02	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	JP, A, 1-104176 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), April 21, 1989 (21. 04. 89), & EP, A1, 261592	1-18
A	JP, A, 1-501283 (Shitas Corp.), May 11, 1989 (11. 05. 89), & WO, A1, 88/3173 & EP, A2, 272779	1-18
[*] Special categories of cited documents: ¹⁰ "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 "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 "&" document member of the same patent family		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
January 25, 1991 (25. 01. 91)		February 12, 1991 (12. 02. 91)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office		

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP90/01439

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. C⁵ C07K13/00, C12N15/27, 1/21, C12P21/02/A61K37/02 (C12N1/21, C12R1:19) (C12P21/02, C12R1:19)		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分 類 体 系	分 類 記 号	
IPC	C07K13/00, C12N1/21, 15/27, C12P21/02, A61K37/02	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	JP, A, 1-104176 (大塚製薬株式会社), 21. 4月. 1989 (21. 04. 89), &EP, A1, 261592	1-18
A	JP, A, 1-501283 (シタス コーポレイション), 11. 5月. 1989 (11. 05. 89), &WO, A1, 88/3173&EP, A2, 272779	1-18
※引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリーの文献		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
25. 01. 91	12.02.91	
国際調査機関	権限のある職員	
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	4 B 8 2 1 4
		内 田 俊 生