

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6807327号
(P6807327)

(45) 発行日 令和3年1月6日 (2021.1.6)

(24) 登録日 令和2年12月9日 (2020.12.9)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08
C 1 2 N 15/70 (2006.01)	C 1 2 N 15/70 Z

請求項の数 13 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2017-551010 (P2017-551010)	(73) 特許権者	514232085
(86) (22) 出願日	平成27年12月18日 (2015.12.18)		ユーシービー バイオファルマ エスアー ルエル
(65) 公表番号	特表2018-505693 (P2018-505693A)		ベルギー国 1 0 7 0 ブリュッセル ア レ デ ラ レシエルシエ 6 0
(43) 公表日	平成30年3月1日 (2018.3.1)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/080561	(74) 代理人	110000855
(87) 国際公開番号	W02016/102383		特許業務法人浅村特許事務所
(87) 国際公開日	平成28年6月30日 (2016.6.30)	(72) 発明者	バセット、フィリップ
審査請求日	平成30年10月1日 (2018.10.1)		イギリス国、パークシャー、スラウ、バス ロード 2 0 8、ユセベ セルテック、 アイピーディー 気付
(31) 優先権主張番号	14199717.1	(72) 発明者	デイヴィーズ、リチャード
(32) 優先日	平成26年12月22日 (2014.12.22)		イギリス国、パークシャー、スラウ、バス ロード 2 0 8、ユセベ セルテック、 アイピーディー 気付
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質製造

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

大腸菌宿主細胞のペリプラズムにおいて発現される、目的のタンパク質を製造する方法であって、

a) 前記タンパク質を発現する条件下で前記宿主細胞を培養し、

b) 前記細胞培養液から前記宿主細胞を採取し、

c) 前記宿主細胞に抽出バッファーを添加し、

d) 前記宿主細胞を、30℃～70℃で行う熱処理であって、前記熱処理中に前記バッファーのレドックス電位が-0 mV未満に維持される熱処理に供し、それによって、前記目的のタンパク質を前記ペリプラズムから抽出する、上記方法。

10

【請求項 2】

前記熱処理は容器内で行われ、タンパク質抽出中、前記レドックス電位は容器内の気相中に存在する酸素 (O₂) 量を減少させて維持される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

窒素 (N₂) が容器の気相に添加される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記気相が少なくとも 50% の N₂ を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 N₂ は、前記容器の気相中の充填 (overlay) として前記容器に添加され、または前記試料中に N₂ を注入する (sparging) ことによって、前記容器に添加

20

される、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記熱処理工程が、55℃から65℃で行われる、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記温度が1～18時間維持される、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

宿主細胞に添加された後、熱処理前に前記バッファの pH が測定される、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記バッファの pH が pH 6～9 であるか、pH 6～9 に調整される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記タンパク質が、発現ベクターにエンコードされた組換えタンパク質である、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記タンパク質が組換え抗体である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記組換え抗体が組換え抗体断片である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記組換え抗体又は組換え抗体断片が、TNF- α 又は CD154A に結合する、請求項 11 又は 12 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、宿主細胞で発現されるタンパク質の製造方法に関する；より具体的には、本発明は、製品関連の不純物のレベルが減少したタンパク質をもたらすタンパク質の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

治療分野において、特にタンパク質および抗体並びに抗体由来の分子の使用は、常に存在および重要性を獲得しており、その結果、制御された製造プロセスの必要性が並行して啓発されている。治療用タンパク質の商業化は、それらが大量に生成されることを必要とする。この目的のために、投与可能な形態に作成される前に、タンパク質は宿主細胞において頻繁に発現され、続いて回収および精製され得る。発現されるタンパク質に応じて、宿主細胞の選択は、哺乳動物宿主細胞、しばしばCHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞、又は細菌宿主細胞であってよい。第1のケースでは、タンパク質は、典型的には、回収される培養上清中に分泌される、次いで、この溶液をタンパク質精製のために処理する。

【0003】

宿主細胞がグラム陰性原核細胞である場合、しばしば好ましい発現系は、新たに合成されたタンパク質が、ペリプラズム空間内に蓄積され、ペリプラズム空間から分離されることを含む。この場合、所望のレベルのタンパク質発現が達成されると、細胞は収穫され、処理される。次いで、ペリプラズムからのタンパク質を溶液中に放出させ、続いて細胞デブリおよび他の不純物を除去することを含むタンパク質抽出プロセスに、収穫された細胞を供することにより、タンパク質は回収される。タンパク質放出に対する細胞採取のこれらのステップは、典型的には、一次回収と呼ばれるものに含まれる。次いで、得られたタンパク質含有溶液をタンパク質精製のために処理する。ペリプラズム発現に使用される好ましいグラム陰性原核細胞は、一般に、大腸菌株またはシュードモナスフルオレッセンス細胞である。

10

20

30

40

50

【0004】

ペリプラズム空間からの一次抽出中における原核宿主細胞で発現される異種タンパク質の回収は、しばしば課題があった。この点で、従来技術では異なる方法が記載されている。例えば、米国特許第5、855、866号は、熱処理を使用して、抗体の機能性Fab'断片のその後の単離を容易にすることが記載している、国際公開2006/054063号は、熱処理と組み合わせて、一次抽出段階での非溶解処理を包含することを記載している。国際公開第2005/019466号は、発酵後、抽出前に中断ステップの含むことを記載している。米国特許2013/0060009公開公報は、熱処理を受ける前、抽出ステップの間の試料のpHを行うことを記載している。

【0005】

しかしながら、別の重要な課題は、一次抽出の後に存在する高レベルの不純物であり、これは、以降の浄化工程並びに浄化工程全体の全体的な効率に負担を増加させる。これらの不純物は、細胞デブリ、宿主細胞タンパク質(HCP)、DNA、または発現された製品の切断形態のような製品関連の不純物、凝集体或いは、脱アミド化、異性化、酸化または他の共役形態等の他の修飾形態でありうる。これらの中で、製品関連不純物とも称される組換えタンパク質分解産物を、熱抽出プロセス中に除去することが最も困難であり、また、それらが目標タンパク質に非常に類似した融解温度(T_m)などの物理化学的性質を有することを考慮すると、一次回収を行うことがしばしば最も困難である。

【0006】

抽出後に得られたタンパク質溶液は、それからタンパク質精製のために処理されるものの、この溶液の純度のレベルは、浄化ステップに関連する全体的な効率及びコストに影響を与え、それ故、全治療用蛋白質の製造の効率及びコストに影響を与える。この効果は、大規模なタンパク質製造を考慮するとさらに明らかになる。特に、製品関連不純物は、最終製品の品質プロファイルに影響を及ぼし、その制御は、異なるバッチ間の整合性に特に関連している。このように、細胞培養物からのタンパク質抽出中の不純物除去を改善する方法が当該技術分野において依然として必要とされている。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】図1は、抽出の酸化還元(レドックス)電位及び温度プロファイルを示す。図にあるように、熱処理工程中に窒素充填(オーバーレイ)を維持することは、全体にわたって低いレドックス電位測定を維持し、59℃での温度保持の間に最低約-435mVおよび典型的には-375mVを有する。窒素を注入したときに、同様に低いレドックス電位が観察された。宿主細胞を含む緩衝液を、窒素の代わりに空気で充填した場合、熱ステップ抽出中にレドックス電位値が有意に高くなり、59℃の温度保持の間に正(典型的には+45mV付近)になることがわかる。同様に高いレドックス電位が、空気が注入(sparge)されたときに観察された。高レベルの発泡が観察されたために、ガスの散布は、抽出において途中で充填に切り替えられた。

【0008】

【図2】図2は抽出後のサンプルのSDS-PAGEゲルを示す。レーンMは分子量標準マーカー(マーク12、Invitrogen)。レーン1が抗TNFαFab'基準標準である。レーン2は、DsbC標準(ジスルフィド結合イソメラーゼ蛋白質)である。レーン3は、抽出時に窒素充填(オーバーレイ)を適用した抽出後サンプルである。レーン4は、抽出中に空気充填を適用した抽出後サンプルである。レーン5は、抽出時にサンプルに窒素が注入された抽出後サンプルである。レーン6は、抽出中にサンプルに空気が注入された抽出後サンプルである。この図は、窒素の存在下でのものである、熱抽出中の還元条件は、空気の存在下で行われる抽出と比較して、生成物関連不純物のレベルを有意に低減するのに十分である。

【0009】

【図3】図3はProtein L精製後CEX HPLCにより測定された全ての生成物関連種の%として表される全Fab'断片を示す。製品関連不純物のクリアランスにお

10

20

30

40

50

ける窒素充填をすることの明確な効果を観察することができる。窒素充填が適用されていない抽出# 8は、有意に高いレベルの製品関連不純物を有していた。一方、抽出1乃至2、及び7乃至8を比較すると、図は、窒素充填の速度が、この不純物のクリアランスに影響を及ぼす可能性があることも示唆している。

【0010】

【図4】図4は、プロテインL精製後CEX HPLCにより測定された全ての生成物関連種の%として表される全Fab'断片を示す。この結果は、窒素の存在の利点を再度示し、熱抽出後に残留する生成物関連不純物のレベルが著しく低減される。さらに有益な効果は、熱抽出前に行われるpH調整から得られる。

【0011】

【図5】図5はエンドポイントレドックス電位測定対振とうフラスコの充填容積を示す。これらの結果は、窒素充填の存在下で調製された振とうフラスコが、空気の下で調製されたフラスコよりも、抽出物中でより多くの還元環境を維持することを示す。図はまた、より大きな充填容積を有するフラスコが、より小さな充填容積を有するフラスコよりも還元していることを示しており、より小さい表面積対体積比による抽出物の酸化速度が遅いためである。空気中に調製されたフラスコは、全て、正のエンドポイントレドックス電位値を有し、充填容積に相関がない。

【0012】

【図6】図6は、プロテインL精製後CEX HPLCにより測定された全ての生成物関連種の%として表される全Fab'断片を示す。これらの結果は、窒素下で調製された振とうフラスコが、抽出後の製品関連不純物のレベルが著しく低いことを示す。全ての窒素で調製されたフラスコ（-10mVから-116mVまでのエンドポイントレドックス電位範囲）は、空気中で調製された全てのフラスコ（+79mVから+97mVまでのエンドポイントレドックス電位範囲）より有意に低い生成物関連不純物レベルを示す。

【0013】

【図7】図7は、精製されたFab'断片のT_mへのpHおよび還元環境の効果を示す。図は、製品関連不純物の2つの主要種の熱安定性の測定の結果を示す。レドックス電位と熱安定性（融解温度）とは相関しており；レドックス電位が低いほど、タンパク質の融解温度が低下する。より中性になると、pHについても同様の効果を説明することができる。両方の変数は、製品関連不純物をより劣化させやすくするので、それらのクリアランスを容易にする。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明は、宿主細胞内で発現される新規なタンパク質製造方法を提供することにより、上記に同定された必要性を解決する。特に、本発明は、工業的製造に適した方法を提供する。

【0015】

第1の実施形態では、本発明は、宿主細胞において発現される目的のタンパク質の製造方法であって；

前記タンパク質を発現する条件下で宿主細胞を培養する工程と、

細胞培養液から宿主細胞を採取する工程と、

宿主細胞にバッファーを加える工程と

バッファーのレドックス電位が0mV未満に維持されるようにしながら、バッファー中の宿主細胞を緩衝液中で熱処理することを含む

上記方法を提供する。

【0016】

特定の実施形態では、宿主細胞は、グラム陰性細菌のような原核細胞である。別の実施形態では、宿主細胞は、大腸菌細胞またはシュドモナス・フルオレッセンス（*P. fluorescens*）細胞である。タンパク質発現のための原核生物宿主細胞は、当該技

10

20

30

40

50

術分野において周知である (Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol 72, 211-222.)。本発明に記載の宿主細胞は、抗体断片のような目的のタンパク質を産生するように遺伝子操作された組換え細胞を含む。組換え大腸菌宿主細胞は、MC4100、TG1、TG2、DHB4、DH5α、DH1、BL21、K12、XL1blue及びJM109を含む任意の適切な大腸菌由来であってもよい。一例は、組換えタンパク質発酵のために一般的に使用される宿主株である大腸菌W3110 (ATCC 27325) である。抗体断片はまた、改変された大腸菌株、例えば国際公開2011/086138号、国際公開2011/086139号、国際公開01/086136号および国際公開緒2013/007388号に開示されているような代謝突然変異体またはプロテアーゼ欠損大腸菌株を培養することにより製造することができ、これらはその全体が本明細書に組み込まれている。

10

【0017】

本発明の方法に従って精製することができる目的のタンパク質は、典型的には、大腸菌宿主細胞のペリプラズムから単離される。この区画にタンパク質を標的化するための方法は、当該技術分野で周知である (Makrides, S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. Microbiol Rev 60, 512-538.)。タンパク質をペリプラズムに導く適切なシグナル配列の例は、大腸菌PhoA、OmpA、OmpT、LamBおよびOmpFシグナル配列が挙げられる。

20

【0018】

大腸菌宿主細胞における組換えタンパク質の発現はまた、誘導性システムの制御下であってもよく、その結果大腸菌における組換え抗体の発現が誘導性プロモーターの制御下であってよい。大腸菌での使用に適した多くの誘導性プロモーターは、当該分野で周知であり、組換えタンパク質のプロモーター発現に依存して、温度または成長培地中の特定の物質の濃度のような様々な因子によって誘導される。誘導性プロモーターの例としては、ラクトースまたは非加水分解性ラクトース類似体であるイソプロピルーβ-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) で誘導可能なことを特徴とするE. coliのLac、tac及びtrcプロモーター；並びにリン酸、トリプトファン、およびL-アラビノースによってそれぞれ誘導されるphoA、trpおよびaraBADプロモーターが挙げられる。発現は、例えば、誘導物質の添加または誘導が温度依存性である場合温度変化によって誘導されてもよい。誘導物質を培養物に添加することにより、組換えタンパク質発現の誘導を達成する場合、誘導物質は、培養システムおよび誘導物質に応じて、任意の適切な方法、例えば、一度または複数回の瞬間的な添加によって、または、培養中誘導物質の漸進的な添加によって達成される。誘導物質の添加と実際のタンパク質発現の誘導との間に遅延が存在し得ることが理解されるであろう、例えば、誘導物質がラクトースの場合、ラクトース前に既存の炭素源が利用されるので、タンパク質発現の誘導が起こる前に遅延が存在し得る。

30

40

【0019】

代わりに、本願発明の方法に従って精製される目的のタンパク質は、シュードモナス・フルオレッセンス (P. fluorescens) のペリプラズムから単離される。P. fluorescensのペリプラズム分画にタンパク質を導く適切な配列は、文献 (D. M. Retallack, et al. Transport of heterologous proteins to the periplasmic space of Pseudomonas fluorescens using a variety of native signal sequences Biotechnol. Let

50

t. , 29 (2007) , pp. 1483-1491) に記載されているような、分泌タイプの分泌リーダーが挙げられる。目的のタンパクの発現は、誘導性システムの制御下にあることができ、先行段落で記載したような誘導性プロモーターの制御下で発現させる。この文献において、IPTGのような周知の誘導物質、或いはPben509およびPben278プロモーターそれぞれを誘導するアントラニレートのア安息香酸塩のような誘導物質が、P. フルオレッセンスの発現システムに記載されている。

【0020】

原核生物宿主細胞培養物（発酵）は、宿主細胞の増殖および組換えタンパク質の発現を支持する任意の培地中で培養することができる。培地は、例えば、Durany O, et al. (2004) Studies on the expression of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in Escherichia coli. Process Biochem 39, 1677-1684 中の大腸菌用に記載されているような、任意の化学的に定義された媒体であってもよい。

原核生物宿主細胞の発酵は、タンパク質および収率に応じて、任意の適切なシステム、例えば連続培養、回分培養 (batch) 又は流加培養 (fed-batch) のモードで実施することができる。回分培養モードは、必要とされる栄養物または誘導物質の瞬間的添加と共に使用され得る。あるいは、流加培養 (fed-batch) 培養を使用してもよく、すなわち発酵槽に存在する最初の栄養素を使用して持続的な最大の比増殖速度で回分培養モード前培養で成長させた培養し、1つまたは複数の栄養供給体制発酵が完了するまでは、成長率を制御するために使用してもよい。流加培養 (fed-batch) モードは、前誘導時に使用してもよく、原核生物の宿主細胞の代謝を制御して、高い細胞密度を達成できる。

【0021】

それから宿主細胞を発酵培地から回収、つまり試料から遠心分離やろ過、或いは濃縮によって、宿主細胞を回収する。

本発明による方法の一実施形態では、細胞収集のステップは、遠心分離および細胞回収のステップを含む。本発明の特定の好ましい実施形態では、前記遠心分離工程は連続的な遠心分離であり、そこから細胞スラリーが回収される。

【0022】

抗体断片のような目的のタンパク質が宿主細胞のペリプラズム空間に見出される、原核生物（例えば、大腸菌）宿主細胞培養プロセスには、宿主細胞からタンパク質を放出することが必要である。放出は、機械的または圧力処理による細胞溶解、凍結融解処理、浸透性ショック、抽出剤及び／又は熱処理のような任意の適切な方法またはその組み合わせによって達成することができる。タンパク質放出のためのこのような抽出方法は、当該分野でよく知られている。本願発明の方法において、タンパク質抽出は熱処理工程、つまり試料を一定期間高温で維持することによってなされる。

【0023】

本発明の方法によれば、熱処理工程の前に、細胞培養液から採取した細胞に緩衝液を添加する。本発明の方法の特定の実施形態では、前記緩衝液は、pH 7.4 で 100 mM Tris および 10 mM EDTA である、さらなる態様において、前記抽出緩衝液は、pH 7.4 で 75 mM Tris および 7.5 mM EDTA、pH 7.4 の 200 mM Tris および 20 mM EDTA、または pH 7.4 の 300 mM Tris および 30 mM EDTA である。本発明の一態様において、緩衝液は、その全体が本明細書に援用される WO 2012/013930 号に記載されているような熱処理ステップの前で、試料の pH が pH 6~9 であることを確実にする pH、例えば pH 6~8 を有する。好ましくは、前記 pH は、6.5~8、pH 6.8~7.8、または pH 7~7.6 である。

当業者は、タンパク質抽出に使用するために、当該技術分野で説明されているさらに適した緩衝液を知っているであろう。

【0024】

さらに別の実施形態では、前記緩衝液のレドックス電位は、 -100 mV 未満、 -200 mV 以下、 -200 mV 以下、 -300 mV 以下、または 400 mV 未満に維持される。

環境のレドックス電位は、タンパク質分子に存在するシステイン残基上のチオール基間のジスルフィド結合の変動に特に重要である。還元されると、ジスルフィド結合は破壊され、対応するチオール基 ($-SH$) が遊離される。抗体分子はいくつかのジスルフィド結合を有し、それらは抗体の構造そしてその生物学的活性の維持に重要である。ジスルフィド結合のいくつかは、それらに与えられる分子内の位置において、他のものより環境に存在する還元および／または酸化種に対してアクセスできるようになりその結果、より決裂しやすくなる。

10

【0025】

本発明において、生成物関連不純物は、目的のタンパク質の実際の断片であり、したがって、構造がより小さく、より単純である。理論に束縛されることを望むものではないが、前記生成物関連不純物中のシステイン結合は、よりアクセス可能であり、したがって、環境のレドックス電位の結果として、決裂をさらに受けやすい。

本発明の方法の第2の実施形態では、前記熱処理は容器内で行われ、前記レドックス電位は熱処理中に容器内の気相中に存在する酸素 (O_2) 量を減少させることにより維持される。

【0026】

一般に、容器内、バッファーと宿主細胞とからなる試料の上方に、一定の空気（本明細書では気相と呼ぶ）がある。本発明の意味では、気相中の酸素の量を減少させるとは、前記気相の組成を、空気よりも酸素が少ないように変更することを意味する。当該技術分野で知られているように、空気は、典型的には約21%の酸素（体積）を含む。

20

レドックス電位を 0 mV 未満に維持するために、当業者は、抽出サンプルの酸化を防止するために利用可能な異なる手段を知っているであろう。これは、典型的には他の不活性ガスを用いて、容器内の気相中に存在する酸素および他の酸化性ガスを除去することによって達成することができる。前記置換は、窒素 (N_2) 充填 (over lay)、すなわち、前記容器内の前記試料を N_2 を含む気体相に接触させて維持すること、又は、前記試料を通過する不活性ガスを前記容器内に注入 (sparging)、すなわちバブリング又は通過させることにより、前記不活性ガスを前記容器内に注入することの特徴とする。本発明の方法に従ってレドックス電位を維持するために使用され得る他の不活性ガスは、アルゴンおよびヘリウムを含む。

30

【0027】

あるいは、様々な程度の強度を有する、当該技術分野で利用可能な還元剤の選択がある。したがって、当業者は、所望のレドックス電位および維持すべき時間に応じて、最も適切な還元剤を選択する。当該技術分野における既知の還元剤は、グルタチオン、メルカプトエタノール、ジチオスレイトールまたはトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィンを含むが、これらに限定されない。

【0028】

原核宿主細胞の培養は、必要な生産規模に応じて、振とうフラスコや発酵槽などの任意の適切な容器で行うことができる。様々な大規模発酵槽は、 1000 リットルを超える容量から約 100000 リットルまでの容量で利用可能である。好ましくは、 1000 から 50000 リットルの発酵槽を用いる、より好ましくは 1000 から 25000 又は 1000 から 20000 、 1000 から 15000 、 1000 から 10000 、 1000 から 5000 、 20000 、 15000 、 12000 、 10000 、 5000 又は 2000 リットルである。より小規模な発酵槽は、 $0.5 \sim 1$ 、 000 リットルの間の容量で利用することもできる。

40

【0029】

好ましい実施形態では、熱処理工程中に前記気相は20%、15%、12%、10%、8%、5%、2%または1%未満（体積）の酸素を含有する。

50

好ましい実施形態では、前記酸素は、熱処理工程中に気相から本質的に排除される。

【0030】

本発明の方法の第3の実施形態では、容器の気相に窒素 (N_2) を加える。

【0031】

本発明の方法の第4の実施形態では、前記気相は、少なくとも80% N_2 、少なくとも85%、少なくとも90%の N_2 、少なくとも95%の N_2 または少なくとも97%または99%の N_2 を含む。さらに別の実施形態では、前記気相は本質的に N_2 である。

【0032】

典型的には、1分間当たり0.1~1 vvm (液体の体積当たりのガスの体積、すなわち1Lの抽出量に対して1L/分) で100% N_2 ガスを加えることにより、前記 N_2 は、充填 (オーバーレイ) として容器の気相に加えられ、バッファーと宿主細胞を含有する容器のヘッドスペースに維持される。

【0033】

特定の実施形態では、本発明は、タンパク質が宿主細胞において発現される目的のタンパク質の製造方法であって：

前記タンパク質を発現する条件下で前記宿主細胞を培養し、

前記細胞培養液から前記宿主細胞を採取し、

ホストセルへのバッファーを添加し、そして

前記容器の気相が本質的に N_2 である容器内で、前記宿主細胞を緩衝液中で熱処理することを含む方法に関する。

容器の構成に応じて、容器の気相に N_2 を添加してもよく、容器がその後にシールされ、すなわち、熱処理中に N_2 を気相中に残しながら容器の内部を外部から隔離する。あるいは、外部環境から内部をシールする可能性を許容しない容器の場合、熱処理ステップ中に、容器の気相を介して N_2 の一定の流れが適用される。

【0034】

一実施形態では、熱処理工程の前に、 N_2 を気相に添加し、または気相に導入して、熱処理工程中にレドックス電位が所望の値よりも低く維持されるようにする。

【0035】

特定の実施形態では、本発明の方法は、以下を含む：

対象のタンパク質を発現するような条件下で前記宿主細胞を培養し、

前記細胞培養液から前記宿主細胞を採取し、

容器内の宿主細胞へ緩衝液を添加し、

前記容器の気相に N_2 を添加し、

容器を密封し、そして

前記バッファーのレドックス電位が前記熱処理の間に0mV未満に維持されている容器内で、前記宿主細胞を緩衝液中で熱処理する。

したがって、本発明の方法のさらなる実施形態では、前記 N_2 は、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%または100% N_2 を使用して充填 (オーバーレイ) として導入される。

【0036】

本発明の別の実施形態では、 N_2 は、熱処理中にバッファーを通して N_2 を散布することによって導入される、好ましくは本質的に純粋な N_2 を注入する (sparging) ことによって達成される。

【0037】

本発明の第5の実施形態では、前記 N_2 は、前記容器に加えられる容器の気相中の充填 (オーバーレイ)、またはバッファーを介して N_2 を注入する (sparging) ことによって達成される。

【0038】

本発明の方法は、他のタンパク質関連物質の除去を容易にすることにより、抗体断片のような正確に折り畳まれて組み立てられたタンパク質を提供する、可溶性の試料を得るこ

10

20

30

40

50

とを可能にする熱処理工程を含む。

【0039】

“正確に折り畳まれて組み立てられた”タンパク質は、非還元性SDS-PAGE上で、組み立てられたタンパク質鎖の予想される分子量に対応する単一のバンドの存在によって示される。他のタンパク質関連物質は、典型的には、正確に折り畳まれ、組み立てられたタンパク質の部分的に分解された断片であろう。

【0040】

本発明の方法における熱処理工程は、昇温段階中に所望の高温に達すると、試料の温度を所望の高温に維持する工程である。

熱処理工程は、試料を所望の高温にすることにより行われる。最も好ましくは、30℃から70℃の範囲内で熱処理工程を行う。所望に応じて温度を選択することができ、精製のためのタンパク質の安定性に依存し得る。別の実施形態では、温度は40℃から65℃の範囲内である、好ましくは40℃から60℃の範囲であり、より好ましくは45℃から60℃の範囲内であり、より好ましくは50℃～60℃の範囲であり、最も好ましくは55℃～60℃、58℃から60℃または59℃までの間である。したがって、最低温度は30℃、35℃または40℃であり、最高温度は60℃、65℃又は70℃である。

10

【0041】

本発明の方法の第6の実施形態では、前記熱処理工程は30℃から70℃で行われる。

【0042】

本発明の方法の第7の実施形態では、前記熱処理工程は55℃から65℃で行われる。

20

熱処理工程は、長期間行われることが好ましい。熱処理の長さは1～24時間、又は1～18時間、より好ましくは4～18時間、さらに好ましくは6～16時間、8～14時間または8～12時間、例えば10時間の間であることが最も好ましい。これにより、最小限の熱処理時間が1、2又は3時間であり、最大は20、22又は24時間である。

【0043】

本発明の方法の第8の実施形態では、第6または第7の実施形態の熱処理工程を1時間～18時間維持する。

当業者が知っているように、一般に、反応時間と温度との間に反比例関係が存在し、その結果反応が行われる温度が高くなると、反応に要する時間が短くなる。

特定の実施形態では、熱処理は、50℃～60℃で10～16時間行われる、より好ましくは59℃で10～12時間である。当業者は、問題のサンプルおよび抗体または抗体フラグメントなどの目的のタンパク質の特性に適合するように、温度および時間を選択することができることを理解するであろう。

30

本発明の方法のさらなる代替的な実施形態では、前記タンパク質抽出は、58℃～60℃の温度で8～12時間行われることを特徴とする。

【0044】

熱処理工程は、200ラウンド／分(RPM)のような好適な攪拌速度で動作するように設定されたシェーカーまたは攪拌機などの試料を攪拌しながら行うことが好ましい。しかしながら適切な攪拌速度は、方法の規模に応じて変化する。

【0045】

40

本発明の方法の第9の実施形態では、前記熱処理工程の前に、pHが6～9に調整されている。本発明の方法のさらなる特定の実施形態では、熱処理工程の前に、前記試料のpHは6.5～8、6.5～7.5又は6.8～7.2の範囲である。

特定の実施形態では、試料のpHは、熱処理工程の前に測定または調整され、熱処理工程中の試料のpHが5～9となるようにし、好ましくは熱処理工程中の試料のpHは6～7である。

さらなる実施形態では、pHは、水酸化ナトリウムのような無機塩基、またはトリエチルアミンまたはトリメチルアミンまたはTris baseのような有機塩基で調節される。

任意の適切な薬剤を使用して、サンプルのpHを調整することができる。薬剤は、緩衝

50

剤（バッファー）であってもよいし、緩衝液の前及び／又は後に添加されてもよい。pHを調整するために使用することができる典型的な薬剤は、以下の1つ以上を含む又ははからなる：NaOH、NH₄OH、硫酸、EDTA、Tris緩衝液。

【0046】

さらなる特定の実施形態では、試料のpHは、熱処理工程の前に測定または調整され、そして添加前に調整されるレドックス電位を0mV以下に維持するために、容器の気相に窒素等の不活性ガスを供給する。あるいは、本発明の別の実施形態では、熱処理工程の前に試料のpHを測定及び／又は調整し、熱処理工程の間に試料に窒素等の不活性ガスを通すようにした。

本明細書で参照されるpH測定値は、一般に20℃で正規化される。

10

【0047】

本発明の文脈では、“熱処理ステップ”は、試料が所望の高温に到達し、熱処理工程（高温で保持）が開始する時刻の前及びその時点を含む。熱処理工程のための所望の高温に到達するために、試料は、試料の温度が所望の温度に上昇する“昇温段階”にさらされる一実施形態では、本発明による方法は、試料を昇温段階および熱処理工程に供することを含む。本発明の方法は、試料を昇温段階と熱処理工程とに供することを含む本発明の一態様において、試料は昇温段階の開始前、必要なpHレベルにすること及び／又は昇温段階中に試料を必要なpHレベルにすることができる。

特定の実施形態では、昇温段階の開始前に、N₂を容器の気相に添加する。好ましくは、試料は、前記昇温段階の前に、必要なpHレベルにある。

20

本発明の方法の第10の実施形態では、目的のタンパク質は、発現ベクターでコード化された組換えタンパク質である。

【0048】

第11の実施形態では、本発明の第8の実施形態に係る方法は、タンパク質が組換え抗体であることを特徴とする。

【0049】

第12の態様において、前記組換え抗体は、組換え抗体フラグメントである。Fab、Fab'、F(ab')₂、FvおよびscFv断片を含む当該技術分野で知られている多くの組換え抗体断片が存在する。あるいは、組換え抗体は、ダイアボディー、トリアボディー、テトラボディー、ミニボディー、ドメイン抗体、単鎖抗体、二重特異性、三特異的、四種特異的または多重特異的抗体から選択され、Fab-Fv構築物を含むがこれらに限定されない。

30

【0050】

本発明の方法の第13の実施形態では、前記組換え抗体または組換え抗体断片は、TNF-αまたはCD154に特異的に結合する。

【0051】

一実施形態では、本発明は、宿主細胞内で発現される組換え抗体の製造方法：前記タンパク質を発現するような条件下で前記宿主細胞を培養し、前記細胞培養液から前記宿主細胞を採取し、前記宿主細胞にバッファーを添加し、そして前記宿主細胞を熱処理して前記宿主細胞から前記組換え抗体を抽出し、ここで前記バッファーのレドックス電位が0mV未満、-100mV未満、-200mV未満、-300mV未満、又は-400mV未満以下に維持されている容器において、前記宿主細胞から組換え抗体を抽出することを含む製造方法を提供する。

40

【0052】

別の特定の実施形態では、本発明は、宿主細胞内で発現される組換え抗体の製造方法：前記タンパク質を発現するような条件下で前記宿主細胞を培養し、細胞培養液から宿主細胞を採取し、容器内の宿主細胞に緩衝液を添加し、前記容器の気相にN₂を添加し、前記宿主細胞に熱処理を施し、そして前記タンパク質を回収することを含む製造方法を提供する。

【0053】

50

別の特定の実施形態では、本発明は、宿主細胞内で発現される組換え抗体の製造方法：前記タンパク質を発現するような条件下で前記宿主細胞を培養し、細胞培養液から宿主細胞を採取し、容器内の宿主細胞に緩衝液を添加し、前記容器の気相に N_2 を添加し、前記宿主細胞に熱処理を施し、そして前記タンパク質を回収することを含む、ここで前記回収されたタンパク質は、容器の気相中に N_2 が存在せずに行われる熱処理を含む製造方法で回収されたタンパク質と比較して、生成物に関連する不純物のレベルが低い、製造方法を提供する。

【0054】

本発明による方法は、濾過及び／又は遠心分離のような精製手順のような1つ以上のさらなるステップを含むことができる。流動床式クロマトグラフィーも含まれる。好ましいさらなる精製手順は、イオン交換クロマトグラフィー、精密濾過、限外濾過、透析濾過、固定床捕捉及び拡張床捕捉並びに、これらのいずれかの組合せを含む。

【0055】

本明細書で使用される“抗体（単数）”または“抗体（複数）”という用語は、モノクローナルまたはポリクローナル抗体をいう。本明細書で使用される“抗体（単数）”または“抗体（複数）”という用語は、当該技術分野で知られているように、組換え技術によって生成される組換え抗体を含むが、これらに限定されない。“抗体”または“抗体”は、任意の種、特に哺乳動物種の抗体；IgA1、IgA2、IgD、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgE及びIgM及びその改変変異体を含む任意のアイソタイプのヒト抗体などのヒト抗体；非ヒト霊長類抗体（例えばチンパンジー、ヒヒ、アカゲザルまたはカニクイザル）；非ヒト霊長類抗体（例えばマウス、ラットまたはウサギからの齧歯類抗体；ヤギまたはウマ抗体；およびラクダ抗体（例えば、ナノボディ（商標）などのラクダまたはリャマ）およびそれらの誘導体；ニワトリ抗体のような鳥種またはサメ抗体のような魚種のいずれかである。

用語“抗体”または“抗体”はまた、少なくとも1つの重鎖及び／又は軽鎖抗体配列の第一の部分が第一の種由来であり、重鎖及び／又は軽鎖抗体配列の第二部分が第二の種からのものであるキメラ抗体を指す。本明細書中の目的のキメラ抗体は、非ヒト霊長類（例えば、ヒヒ、アカゲザル、カニクイザルなど）由来の可変ドメインの抗原結合配列及びヒト定常領域列を含む“霊長類化された”抗体を含む。“ヒト化”抗体は、非ヒト抗体由来の配列を含むキメラ抗体である。大部分は、ヒト化抗体は、その超可変領域の残基が、所望の特異性、親和性および活性を有する、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリまたは非ヒト霊長類のような非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域（または相補性決定領域（CDR））の残基で置換されているヒト抗体（レシピエント抗体）である。

多くの場合、CDRの外側のヒト（レシピエント）抗体の残基、ようするに フレームワーク領域（FR）は、対応する非ヒト残基にさらに置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に見出されない残基を含むことができる。これらの修飾は、抗体性能をさらに改善するためになされる。ヒト化は、ヒトにおける非ヒト抗体の免疫原性を減少させ、従って、ヒト疾患の治療に対する抗体の適用を容易にする。ヒト化抗体およびそれらを生成するためのいくつかの異なる技術が当該技術分野で周知である。“抗体（単数）”または“抗体（複数）”という用語は、ヒト化の代替として生成することができるヒト抗体も指す。

【0056】

例えば、内因性マウス抗体の産生の無い状態でヒト抗体の完全なレパートリーを免疫化で産生することが可能なトランスジェニック動物（例えば、マウス）を製造することが可能である。例えば、キメラおよび生殖系列突然変異マウスにおける抗体重鎖結合領域（JH）遺伝子のホモ接合欠失は、内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが報告されている。

このような生殖系列突然変異マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列の移植は、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子を担持するトランスジェニック動物を特定抗原で免疫する際に、特定抗原に対する特異性を有するヒト抗体の産生をもたらす。このよ

うなトランスジェニック動物を製造するための技術およびそのようなトランスジェニック動物からヒト抗体を単離および産生するための技術は、当該技術分野で知られている。

前記トランスジェニック動物、例えば、マウスにおいて、マウス抗体の可変領域をコードする免疫グロブリン遺伝子のみを、対応するヒト可変免疫グロブリン遺伝子配列に置換する。抗体定常領域をコードするマウス生殖系列免疫グロブリン遺伝子は変化しないままである。このようにして、抗体エフェクターは、本発明の免疫系において機能し、その結果、B細胞の発現は本質的に変化せず、生体内での抗原刺激に対する抗体応答の改善につながる可能性がある。対象の特定の抗体をコードする遺伝子がこのようなトランスジェニック動物から単離されると、定常領域をコードする遺伝子を、完全なヒト抗体を得るためにヒト定常領域遺伝子に置換することができる。インビトロでヒト抗体／抗体フラグメントを得るための他の方法は、ファージディスプレイ技術またはリボソームディスプレイ技術のようなディスプレイ技術に基づき、少なくとも部分的に人為的にまたはドナーの免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子レパートリーから生成される組換えDNAライブラリーが使用される。ヒト抗体を生成するためのファージおよびリボソームディスプレイ技術は、当該技術分野で周知である。ヒト抗体はまた、対象の抗原で*ex vivo*免疫化され、続いて融合されてハイブリドーマを生成する単離されたヒトB細胞からも生成され得、次いでハイブリドーマは最適なヒト抗体についてスクリーニングされ得る。

【0057】

本明細書で使用される“抗体（単数）”または“抗体（複数）”という用語は、また、脱グリコシル化抗体を意味する。

【0058】

本発明の特定の実施形態では、抗体は、官能基の共有結合；例えばポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレングリコール）とポリ（プロピレングリコール）とのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）またはポリ（プロリン）のような水溶性ポリマーで修飾された抗体であり、その全てが、対応する未修飾タンパク質よりも、静脈注射後の血液中で実質的に長い半減期を示すことが知られている。

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、ポリ（エチレングリコール）（PEG）部分などの官能基に結合した抗体である。1つの特定の実施形態では、抗体は抗体フラグメントであり、PEG分子は、抗体断片に位置する利用可能なアミノ酸側鎖または末端アミノ酸官能基、例えば遊離アミノ基、イミノ基、チオール基、ヒドロキシル基、又はカルボキシル基のいずれかを介して結合され得る。このようなアミノ酸は、抗体フラグメント中で自然に発生し得るか、または組換えDNA法を用いてフラグメントに設計され得る（例えば、米国特許第5219996号；米国特許第5667425号；国際公開98/25971号を参照されたい）。

【0059】

本明細書で使用される“抗体（単数）”または“抗体（複数）”という用語は、任意の種の非切断抗体をいうだけではない、ヒト（例えばIgG）および他の哺乳動物種を含むが、抗体フラグメントをもいう。抗体のフラグメントは、当該技術分野で知られている少なくとも1つの重鎖または軽鎖イムノグロブリンドメインを含み、1または複数の抗原に結合する。本発明による抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂並びに、FvおよびscFvフラグメントを含み、ならびにダイアボディー、トリボディー、テトラボディー、ミニボディー、sdAbsのようなドメイン抗体（dAb）、VHHおよびVnAr断片、単鎖抗体、抗体断片または抗体から形成された二重特異性、三特異的、四重特異的または多重特異的抗体を含み、これらに限定されないが、Fab-FvまたはFab-Fv-Fv構築物を含む。上記で定義した抗体断片は、当該技術分野で公知である。

【0060】

本明細書で使用される“レドックス電位（酸化還元電位）”という用語は、化学種が電子を獲得する傾向の尺度をいい、それによって減少させることができる。レドックス電位は、ボルト（V）又はミリボルト（mV）で測定され、各種は、自身の固有の還元電位を

10

20

30

40

50

有し、電位が正であるほど、電子に対する種の親和性が大きくなり、傾向が低減される。

【0061】

本明細書で使用される“抽出”または“タンパク質抽出”という用語は、宿主細胞内で発現されたタンパク質を宿主細胞から分離することをいう。抽出は、宿主細胞の破壊および細胞破片からの細胞内液の単離を含むことができ、または外細胞膜漏洩を有するグラム陰性バクテリア又は他の細胞の外部細胞膜を作製するために宿主を操作すること含み、そのような細胞からペリプラズム空間の液体を放出させることができる。

【実施例】

【0062】

方法

10

発酵工程 A

ヒトTNF- α に特異的に結合するFab'を発現するようにベクターでトランスフェクトされた大腸菌w3110を宿主細胞として用いた。

これらの細胞を含む凍結細胞貯蔵バイアルを使用して、6xペプトン-酵母抽出物(6xP-Y)培地およびテトラサイクリンを含む振とうフラスコ(700ml総容積)に接種した。この振とうフラスコを30℃および230rpmでインキュベートした。必要なOD範囲(OD₆₀₀=2~3)で、振とうフラスコを用いて、SM6化学培地及びテトラサイクリン、並びに炭素源としてグリセリンを含有する種発酵槽(全量10L)に接種した(Popplewell et al., Expression of Antibody Fragments by Periplasmic Secretion in Escherichia coli; Methods in Molecular Biology, vol. 308: Therapeutic Proteins: Methods and Protocols; 2005)。前記炭素源としてグリセリンを用いたテトラサイクリンを含有することを特徴とする。種発酵槽内の細胞培養物は30℃に維持され、溶存酸素濃度(pO₂)を30%に維持し、pHを7.0に制御した。

20

必要なOD範囲(OD₆₀₀=30~37)で、前記種培養物を用いて、炭素源としてグリセロールを有する化学培地を含む前記生産発酵槽(600L総容積)に接種した。生産発酵槽は、最初に30℃、30%pO₂に維持され、pHを7.0に制御し、そして誘導まで回分培養相で増殖させた。回分培養段階中、温度を25℃に下げ、MgSO₄の添加を行い、この代謝物の枯渇を回避した。

30

特定のOD範囲(OD₆₀₀=43~47)で、グリセロール枯渇が発生する間に、ラクトース溶液のボーラス添加を培養物に加えた。次いで、ラクトースは、主炭素源として細胞によって利用され、また、Fab'の発現のインデューサとしても作用する。ラクトースの濃度を連続的な供給を介した誘導相を通じて維持し、誘導後30時間後に細胞を採取した。

【0063】

発酵工程 B

ヒトTNF- α に特異的に結合するFab'を発現する大腸菌MXE012宿主細胞を含有する凍結細胞貯蔵バイアルを用いて、6xペプトン-酵母抽出物(6xP-Y)培地とテトラサイクリンとを含有する振とうフラスコ(700ml総容積)に接種した。この振とうフラスコを30℃および230rpmでインキュベートした。必要なOD範囲(OD₆₀₀=2~3)を用いて、テトラサイクリンと、炭素源としてグリセロールを含むMD化学培地を含む種発酵槽(10L総容積)に接種した(Durany et al., 2004. Studies on the expression of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in Escherichia coli. Process Biochem 39:1677~1684)。種発酵槽内の細胞培養物を30℃に維持し、溶存酸素濃度(pO₂)を30%に維持し、pHを6.9に制御した。

40

必要なOD範囲(OD₆₀₀=30~37)を用いて、前記種培養物を用いて、炭素源としてグリセロールを有する化学培地を含む生産発酵槽(600L総容積)に接種した。

50

生産発酵槽は、最初に 30℃、30% pO₂ に維持し、pH 6.9 に pH を調節し、グリセロールが枯渇するまで回分培養相で増殖させた。この間、この代謝物の枯渇を避けるために MgSO₄ の追加を行った。

回分培養フェーズの終了時に、指数的にグリセロールの供給を行い、培養物に特定量のグリセロールを供給して約 70 ユニットの OD₆₀₀ を達成した。この時点で、グリセロール供給物は指数的な供給から直線状の供給へと切り替えられ、Fab' 発現は、IPTG (38.79 g/kg 培地) の添加によって誘導された。誘導後 40 時間後に細胞を採取した。

大腸菌株 MxE012 は、WO2011/086136 号 (その全体が本明細書に援用される) に記載されているように、spr 遺伝子への変異 sprH145A を含有する代謝性大腸菌突然変異体である。

【0064】

回収および抽出方法

Westfalia PSC 5 卓上式遠心分離機を用いた連続的な遠心分離によって細胞を回収した。濃縮細胞スラリーを、2 L または 5 L ガラス容器中の水と pH 7.4 の抽出緩衝液を加えて、最終抽出緩衝液濃度 10 mM EDTA、100 mM Tris になるようにし、元の細胞採取濃度まで再懸濁させた。

熱工程を介したタンパク質抽出の前に、必要に応じて、2.5 M Tris 塩基を抽出緩衝液に添加することにより、再懸濁細胞を pH 7.2 に調整した。熱抽出のために、細胞を 59℃ まで 10 時間加熱した。温度および混合は、Biostat BPlus 制御ユニット (Sartorius) および複数発酵槽制御システム (MFC S (登録商標)) ソフトウェアを使用して維持された。

【0065】

サンプル精製

Fab' 関連種を抽出サンプルから精製して、製品関連不純物の評価を可能にした。抽出試料は、まず、遠心分離、清澄化上清の回収、0.2 μm フィルターによる濾過によって清澄化された。次いで、清澄化された上清を、1 mL の Protein L カラム (Pierce #89928) にロードし、pH 7.4 の低濃度のリン酸緩衝液で洗浄し、pH 2.8 のグリシンバッファーで溶出した。Protein L 樹脂が Fab' 断片を捕捉することができ、そして回収が実験範囲内において線形で再現可能であることが実証された。

【0066】

サンプル分析

精製試料を分析し、陽イオン交換クロマトグラフィーにより定量した。試料を Dionex ProPac SCX-10 (Thermo Scientific) 分析カラムにロード、塩勾配を用いて溶出した。溶出したタンパク質を 280 nm でモニターし、クロマトグラムのピークを定量し、標準的な手順に従って解釈した。

【0067】

実施例 1

工程 B にしたがって発酵を行い、上記のようにしてタンパク質を抽出した。ORP (酸化還元電位) プローブ (Broadley James Corporation, アーバイン CA) を用いて容器内の抽出工程中にレドックス電位を測定し、MFC S (登録商標) ソフトウェア (Sartorius, ベツレーム PA) を使用して監視した。

還元されたレドックス環境を維持する効果を評価するために、抽出時にある抽出容器は窒素に暴露され、他の抽出容器は空気に曝された、また、気体は、試料を通して容器内に注入され、または容器のヘッドスペースへの充填流として維持された。

【0068】

以下の表 1 は、容器内ガス流状態の概要を示す。全てのガス流は、100% 窒素又は圧縮空気供給を用いて 1 vvm (液体の体積当たり・分当りの気体の量; つまり 1 L 抽出液当たり 1 L/分) の流量で維持された。

【表 1】

抽出番号	条件
1	N ₂ 充填
2	空気充填
3	N ₂ 注入
4	空気注入

10

【0069】

図1及び図2は、抽出の対応するレドックス及び温度プロファイル（図1）と、抽出後のサンプルの SDS PAGEゲル（図2）を示す。

これらの図からわかるように、熱処理工程中に窒素充填（overlay）を維持することは、全体にわたって低いレドックス電位測定を維持し、59℃での温度保持の間に最低約−435mVおよび典型的には−375mVを有する。窒素が注入（sparged）されたときに、同様に低いレドックス電位が観察された。宿主細胞を含む緩衝液を、窒素の代わりに空気を充填した場合、熱ステップ抽出中にレドックス電位値が有意に高くなり、59℃の間の温度保持の間に正（典型的には+45mV付近）になることがわかる。同様に高いレドックス電位が、空気が注入されたときに観察された。高レベルの発泡が観察されたために、ガスの注入は、途中からに切り替えられた。

20

図2は、SDS PAGEにより測定された生成物関連不純物のレベルの有意な差を示す。この図は、窒素の存在下で、熱抽出中の還元条件は、空気の存在下で行われる抽出と比較して、生成物関連不純物のレベルを有意に低減するのに十分である。

【0070】

実施例 2

以上のようにして、工程Aによる発酵およびその後の抽出を行った。表2に従って、様々な攪拌及び充填容積と組み合わせて、ヘッドスペースへの窒素流量を0.1vvmから1vvmまで変化させた。

30

【表 2】

抽出番号	窒素充填 (vvm)	r p m	充填容積
1	0.1	150	1.5
2	1	150	1.5
3	0.1	450	3
4	1	450	3
5	0.55	300	2.25
6	0.55	300	2.25
7	0.55	300	2.25
8	0	300	2.25

40

【0071】

図3に見られるように、製品関連不純物のクリアランス上に窒素充填を有する明確な効果を観察することができる。窒素充填が適用されていない抽出#8は、有意に高いレベルの製品関連不純物を有していた。一方、図は、抽出1乃至2、及び7乃至8を比較すると、窒素充填の速度が、この不純物のクリアランスに影響を及ぼす可能性があることも示唆

50

している。

【0072】

実施例 3

上記のようにして、工程 A および細胞採取に応じた発酵を行った。2.5M Tris 塩基を抽出緩衝液に添加することにより、再懸濁された宿主細胞を熱抽出の直前に pH 7.2 に調整した。この熱抽出は、窒素充填の有無のいずれかでを行った。適用可能な場合、窒素充填は、100%窒素を用いて容器のヘッドスペースを 1 v v m でガス発生することによって維持された。

図 4 では、窒素充填下で抽出 1～3 を実施し、一方抽出 4～6 は空気で重ね合わせたものである。この結果は、窒素の存在の利益を再度示し、熱抽出後に残留する生成物関連不純物のレベルが著しく低減されることとなる。従来例に比べて、製品関連不純物のレベルがさらに低減されるようになるので、さらに有益な効果は、熱抽出前に行われる pH 調整から得られる。

【0073】

実施例 4

また、還元条件下で抽出する効果も、より小さなスケール、すなわち、振とうフラスコを用いて分析された。

25～100 mL のタンパク質誘導細胞培養物を収穫し、水および 3 x 抽出緩衝液 (pH 7.4) を添加することにより、250 mL のエルレンマイヤーフラスコに再懸濁させ、最終的に 1 x 抽出緩衝液濃度 (10 mM EDTA、100 mM Tris) とした。

フラスコは、プラグシールを有し、フラスコ内への酸素の浸透性を最小にするためにポリカーボネートから作られていた。窒素充填は、フラスコの気相に添加された使い捨てグローブバッグ (Aldrich Atmos Bag, cat # Z530220) を用いて、グローブバッグを介して窒素の連続的な流れにより、行われた。グローブバッグから取り外されて熱抽出を行う前にフラスコを密封した。試料はまた、比較のためにベンチ上 (フラスコの気相中の充填として空気を用いて) 調製された。振とうフラスコインキュベーター (New Brunswick Innova 42) で 60℃10 時間熱抽出を行った。Broadley James ORP プローブを用いて、各フラスコの後抽出においてレドックス電位を測定した。また、異なるフラスコ充填容積で熱処理工程を実施して、タンパク質抽出における体積比に対する異なる表面積の効果を評価した。表 3 は、試験された実験条件の概要である。

【0074】

【表 3】

抽出番号	調製	充填容積 (mL)
1	窒素	25
2	窒素	50
3	窒素	100
4	空気	25
5	空気	50
6	空気	100

【0075】

図 5 は、窒素充填の存在下で調製された振とうフラスコが、空気の存在下で調製されたフラスコよりも、抽出物中でより多くの還元環境を維持することを示す。図はまた、より大きな充填容積を有するフラスコが、より小さな充填容積を有するフラスコよりも還元化していることを示している。より小さい表面積対体積比による抽出物の酸化速度が遅いためであるようである。空気中で調製されたフラスコは、全て、正の終点レドックス電位値を有し、充填容積に相関がない。

図6は、窒素下で調製された振とうフラスコが、抽出後の製品関連不純物のレベルが著しく低いことを示している。全ての窒素調製フラスコ（最終レドックス電位範囲 $-10\text{ mV} \sim -116\text{ mV}$ ）は、空気中で調製された全てのフラスコ（最終レドックス電位範囲 $+79\text{ mV} \sim +97\text{ mV}$ ）より有意に低い生成物関連不純物レベルを示す。

【0076】

実施例5

ヒトTNF- α に特異的に結合するFab'は、HCPs（宿主細胞タンパク質）より高い融解温度（ T_m ）を有し、熱処理工程の間に利用される機能を有する。加熱は、有意な量のHCPおよび製品関連不純物を変性させ、抽出中にそれらを凝集させ、排除する。しかし、前述の実施例で説明したように、これらの不純物の除去は、窒素充填が適用され、還元されたレドックス電位が与えられると、大幅に改善される。還元環境は、加熱中のこれらの種における鎖内結合の減少し、不純物中の融解温度が低下することによって不純物の除去を促進すると考えられる。

10

上記を確認するために、生成物関連不純物の2種の主種の融解温度を非還元下及び還元条件下で測定した。これらの還元条件は、TCEP-HCL（Tris（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩を用いて、抽出中に行われた窒素充填によって生成された環境を模擬するように構成されることにより達成された。

タンパク質に結合する疎水性蛍光体の使用に基づいて、Thermofluorアッセイを用いて測定を行った。この特定の場合、蛍光体は、SYPROオレンジ（5000x濃度DMSO中；Life Technologies S-6650）であった。これにより、リアルタイムPCRシステム（7900ht高速リアルタイムPCRシステムLife Technologies社製）を使用して、蛍光体がたんぱく質に結合した時のdyeによって放出される蛍光を測定することにより、変性条件（例えば、温度を上昇）での変性（unfold）プロセスを監視することができる。

20

試料は、上昇温度（30秒の保持と0.5℃ずつの上昇で、25℃から99℃まで）でインキュベートされ、蛍光発光が記録された。データは、勾配の変曲点を見出すことにより決定されたタンパク質の融点でプロットされている。

この場合、2つの精製生成物関連不純物は、クエン酸-リン酸緩衝液pH5.0および7.0並びにリン酸緩衝生理食塩水pH7.4で測定された。2つの異なる濃度のTCEP-HCLを使用して、還元剤を達成した：タンパク質モル比が2:1~10:1であり、TCEP-HCLを含まない試料を対照として走行させた。

30

【0077】

図7は、製品関連不純物の2つの主要種についての熱安定性の決定の結果を示す。レドックス電位と熱安定性（融解温度）とが相関しており；レドックス電位が低いほど、タンパク質の融解温度が低下する。より中性になると、pHについても同様の効果を説明することができる。両方の変数は、製品関連の不純物をより劣化させやすくするので、それらの排除を容易にする。

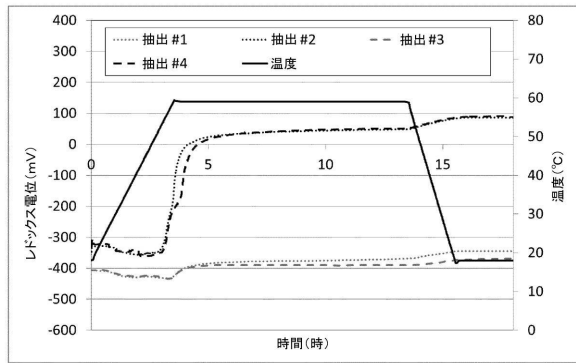
【0078】

結論

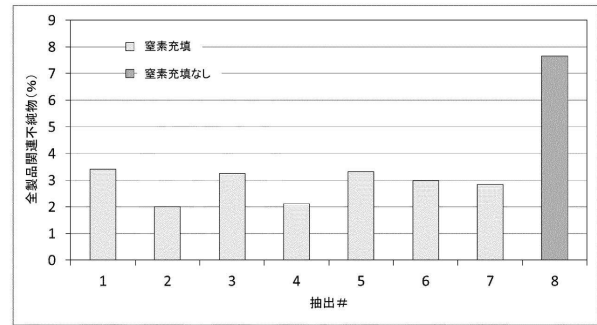
全体的に、データは、加熱ステップの間、還元環境（低いレドックス電位）を維持して、タンパク質抽出中に生成物関連不純物のレベルの有意な低下を可能にすることの重要性を示す。さらに、データは、窒素充填（オーバーレイ）を適用することによって、この還元環境が可能であり、そして窒素充填がない場合には、環境のレドックス電位は著しく減少せず、それは、より高いレベルの製品関連不純物をもたらす。

40

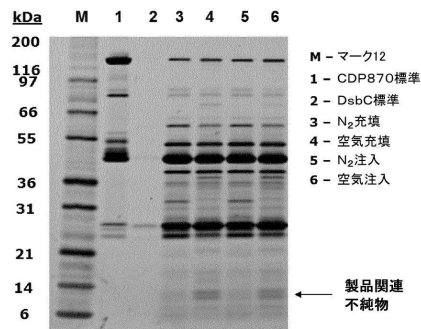
【図 1】



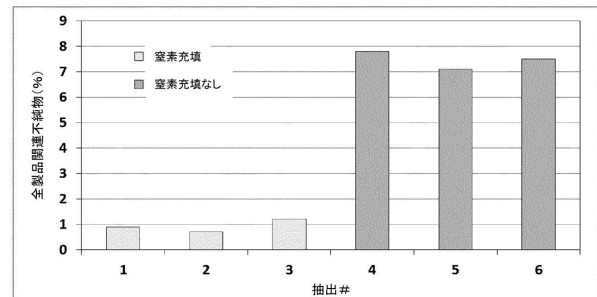
【図 3】



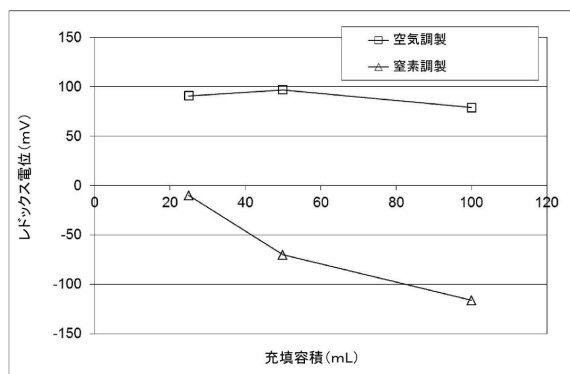
【図 2】



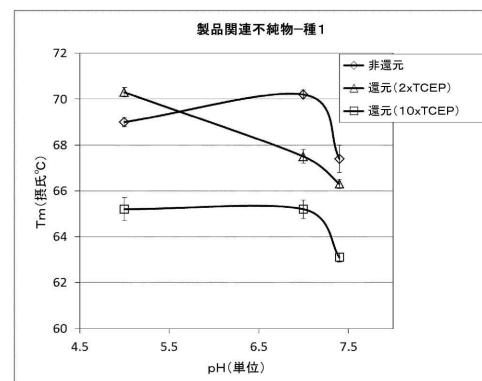
【図 4】



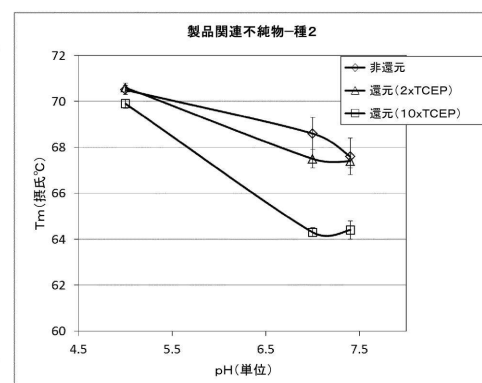
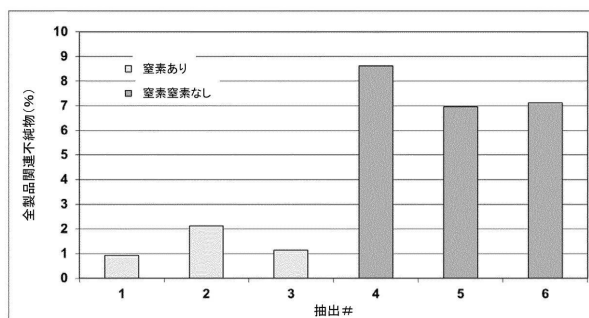
【図 5】



【図 7】



【図 6】



フロントページの続き

- (72)発明者 ゴンザレス、エレナ
イギリス国、パークシャー、スラウ、バス ロード 208、ユセベ セルテック、アイピーディ
ー 気付
- (72)発明者 ピアースー ヒギンズ、マーク
イギリス国、パークシャー、スラウ、バス ロード 208、ユセベ セルテック、アイピーディ
ー 気付

審査官 水野 浩之

- (56)参考文献 米国特許第05665866 (US, A)
Biotech. Bioeng., 2010年, 106(3), 452-461
J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2012年, 39, 1189-1198
mAbs, 2013年, 5:4, 608-613
Blood, 1994年, 83(8), 2334-2344

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C12P 1/00-41/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)