

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6325544号  
(P6325544)

(45) 発行日 平成30年5月16日 (2018. 5. 16)

(24) 登録日 平成30年4月20日 (2018. 4. 20)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 P 21/00 (2006. 01)	C 1 2 P 21/00 B
C O 7 K 1/14 (2006. 01)	C O 7 K 1/14
C O 7 K 14/245 (2006. 01)	C O 7 K 14/245
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 5 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2015-531568 (P2015-531568)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成25年9月13日 (2013. 9. 13)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2015-528477 (P2015-528477A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成27年9月28日 (2015. 9. 28)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/068993		スイス・シーエイチー４０７０バーゼル・
(87) 国際公開番号	W02014/041116		グレンツァーヘルストラツセ１２４
(87) 国際公開日	平成26年3月20日 (2014. 3. 20)	(74) 代理人	100102978
審査請求日	平成28年9月12日 (2016. 9. 12)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	12184738.8	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成24年9月17日 (2012. 9. 17)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 原核細胞のペリプラズムにおけるポリペプチドの産生のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

大腸菌 (E.coli) 細胞を、10mM ~ 95mM の Tris と 2mM ~ 6mM の EDTA とを含む 7 ~ 10 の pH 値の溶液中で、15 分間 ~ 6 時間、20 ~ 33 でインキュベーションする段階を含む、ポリペプチドを産生するための方法であって、該溶液がペプチドグリカン加水分解酵素および糖を実質的に含んでいない、方法。

【請求項 2】

pH 値が 8 であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

インキュベーション時間が 30 分間であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

Tris の濃度が 20mM であることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

大腸菌細胞からペリプラズムポリペプチドを単離するための、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

原核細胞においてポリペプチドを産生するための方法を本明細書において報告し、ここで、組換えにより産生されたポリペプチドは、キレート剤の存在下、規定のpHおよび温度値の緩衝化系におけるインキュベーション段階を用いて、原核細胞のペリプラズムから回収される。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

##### 発明の背景

組換えにより産生されたポリペプチドは、適切なシグナル配列を有する場合、大腸菌 (*E. coli*) 細胞のペリプラズム空間中へ分泌され得る (Joly, J.C. and Laird, M.W., *The Periplasm* ed. Ehrmann, M., ASM Press, Washington D.C., (2007) 345-360 (非特許文献1))。化学的酸化環境においては、ジスルフィド結合の形成、およびそれによるポリペプチドの機能的に正確なフォールディングが起きやすい。これらのポリペプチドをペリプラズム空間から選択的に単離することが、大腸菌由来の宿主細胞タンパク質 (HCP) の混入を回避するために望ましい。それにより、ポリペプチドのその後の精製が容易になる。

#### 【0003】

例示的な単離法は、例えば、Ren, G. et al., *J. of Bacteriology* 189 (2007) 2777-2786 (非特許文献2) により記載されているような、浸透圧ショックである。この方法を用いると、TRIS緩衝液 (pH 7.2) 中に溶解されたEDTAが、原核細胞の外膜を不安定化し、それによりペリプラズム空間中へのスクロースの浸透が可能になる。内膜は、スクロース透過性ではない。その後、TRIS-EDTA緩衝液を遠心分離により除去し、細胞を素早く、氷冷蒸留水中に再懸濁する。それにより、スクロースで満たされたペリプラズム空間中に水が染みこみ、ペリプラズム容積の増大によって、不安定化された外膜が崩壊する。MgCl<sub>2</sub>の添加により、外膜が再安定化される。

#### 【0004】

さらなる方法を、Humphreys, D.P. (*The Periplasm* (ed.) Ehrmann, M. pp. 361-388. Washington, D.C.: ASM Press (2007)) (非特許文献3) およびMiddelberg, A.P. (*Biotechnol. Adv.* 13 (1995) 491-551) (非特許文献4) 中に見出すことができる。

#### 【0005】

Joly and Laird (上記参照) によると、「スフェロプラスト化または浸透圧ショック処理などの小規模でペリプラズム画分を単離するための一般的な方法は、培養物が10リットルおよび10リットルより多くの容積に達すると、実用的に達成されない」。「外部の培地からのタンパク質の回収、または外膜およびペプチドグリカンのみの破壊後のタンパク質の回収は、依然として、大規模で実行されていない目標である」(354ページ)。

#### 【0006】

国際公開公報第2012/013930号 (特許文献1) において、組換えタンパク質とジスルフィドイソメラーゼDsbCとを発現するグラム陰性細菌宿主細胞の試料または抽出物からの組換えタンパク質の精製は、DsbCを沈殿させかつ分離するために試料または抽出物のpHを調整する段階を含むことが報告されている。ヒト腫瘍壊死因子 (TNF) - 媒介性疾患、例えば、うつ血性心不全、敗血症性または内毒素性ショック、悪液質および成人呼吸窮迫症候群を処置するために有用な、TNF- に特異的な新たな抗体が、国際公開公報第01/94585号 (特許文献2) において報告されている。米国特許出願公開第2005/048056号 (特許文献3) において、重鎖および軽鎖を有する腫瘍壊死因子- 抗体の調製は、細胞混合物を発酵させる段階、細胞ペレットを形成させる段階、およびペレットをホールド時間置いておく段階を含むことが報告されている。

#### 【0007】

国際公開公報第2007/106120号 (特許文献4) において、ペプチド分子の組織分布の調整は、血清アルブミン結合性ペプチドを含むコンジュゲート分子を組織に投与する段階を含むことが報告されている。コンジュゲート型であり、かつ循環からの活性作用物質の排出半減期を延長するために使用され得る、免疫グロブリン (Ig) G、IgM、および/またはヒ

ト血清アルブミンに対する親和性を有するペプチドリガンドが、国際公開公報第01/45746号（特許文献5）において報告されている。米国特許出願公開第2004/001827号（特許文献6）において、治療効力を増強するためおよび副作用を低減させるための、ペプチド分子の組織分布の調整は、ペプチドリガンドドメインおよび活性ドメインを含むコンジュゲート分子を組織に投与する段階を含むことが報告されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】国際公開公報第2012/013930号

【特許文献2】国際公開公報第01/94585号

10

【特許文献3】米国特許出願公開第2005/048056号

【特許文献4】国際公開公報第2007/106120号

【特許文献5】国際公開公報第01/45746号

【特許文献6】米国特許出願公開第2004/001827号

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Joly, J.C. and Laird, M.W., The Periplasm ed. Ehrmann, M., ASM Press, Washington D.C., (2007) 345-360

【非特許文献2】Ren, G. et al., J. of Bacteriology 189 (2007) 2777-2786

【非特許文献3】Humphreys, D.P. The Periplasm (ed.) Ehrmann, M. pp. 361-388. Washington, D.C.: ASM Press (2007)

20

【非特許文献4】Middelberg, A.P. Biotechnol. Adv. 13 (1995) 491-551

【発明の概要】

【0010】

本発明において、原核細胞を、緩衝剤（例えば、Tris）およびキレート剤（例えば、EDTA）を含む約8のpH値の溶液と室温で接触させるまたはインキュベーションすることによって、組換えにより産生されたポリペプチドを該細胞のペリプラズムから単離できることが見出された。本方法により、組換えにより産生されたポリペプチドの、大規模生産プロセスにおける高収率および高純度での単離が可能になる。単離されたポリペプチドは、下流のプロセス（例えば、精製）について良好な実現可能性を示す。

30

【0011】

本明細書において報告される1つの局面は、原核細胞を、約10mM～約95mMの緩衝剤と約0.5mM～約9.5mMのキレート剤とを含む約7～約10のpH値の溶液中で、約15分間～約6時間インキュベーションする段階を含む、ポリペプチドを産生するための方法である。

【0012】

1つの態様において、キレート剤は、エチレンジアミン、ニトリロ三酢酸（NTA）、エチレングリコール四酢酸（EGTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、1,2-ビス(o-アミノフェノキシ)エタン-N,N,N',N'-四酢酸（BAPTA）、エチレンジアミン-N,N'-ジコハク酸（EDDS）、ホスホナート（例えば、エチレンジアミンテトラ(メチレンホスホン酸) EDTMPまたはジエチレントリアミンペンタ(メチレンホスホン酸) DTPMP）、シトラート、ボルフィリン（例えば、ヘム、クロロフィル、またはビタミンB12）を含む群から選択される。1つの態様において、キレート剤は、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）である。

40

【0013】

本明細書において報告される1つの局面は、（再懸濁した）原核細胞を、約10mM～約95mMのTris-HClと約2mM～約6mMのEDTAとを含む約7～約10のpH値の溶液中で、約15分間～約6時間、約25 でインキュベーションする段階を含む、ポリペプチドを産生するための方法である。

【0014】

本明細書において報告される1つの局面は、（再懸濁した）原核細胞を、約10mM～約95mMのTris-HClと約2mM～約4mMのEDTAとを含む約7～約10のpH値の溶液中で、約15分間～約6

50

時間、約25 でインキュベーションする段階を含む、ポリペプチドを産生するための方法である。

【 0 0 1 5 】

1つの態様において、キレート剤の濃度は約1mM～約6mMである。1つの態様において、キレート剤の濃度は約1mM～約4mMである。1つの態様において、キレート剤の濃度は約1mM～約3mMである。1つの態様において、キレート剤の濃度は約2mM～約6mMである。1つの態様において、キレート剤の濃度は約2mM～約4mMである。1つの態様において、キレート剤の濃度は約2mMである。1つの態様において、キレート剤の濃度は約4mMである。1つの態様において、キレート剤の濃度は約6mMである。

【 0 0 1 6 】

1つの態様において、EDTAの濃度は約0.5mM～9.5mMである。1つの態様において、EDTAの濃度は約1mM～約3mMである。1つの態様において、EDTAの濃度は約2mMである。1つの態様において、EDTAの濃度は約4mMである。1つの態様において、EDTAの濃度は約6mMである。

【 0 0 1 7 】

1つの態様において、本明細書中で報告される方法は、EDTA濃度が約2mMであることを特徴とする。

【 0 0 1 8 】

1つの態様において、本明細書中で報告される方法は、EDTA濃度が約4mMであることを特徴とする。

【 0 0 1 9 】

1つの態様において、本明細書中で報告される方法は、EDTA濃度が約6mMであることを特徴とする。

【 0 0 2 0 】

1つの態様において、溶液は、約7.5～約8.5のpH値を有する。1つの態様において、本明細書中で報告される方法は、pH値が約8であることを特徴とする。

【 0 0 2 1 】

1つの態様において、インキュベーション時間は約20分間～約3.5時間である。1つの態様において、本明細書中で報告される方法は、インキュベーション時間が約30分間であることを特徴とする。

【 0 0 2 2 】

1つの態様において、緩衝剤は、原核細胞の外膜と相互作用する物質である。

【 0 0 2 3 】

1つの態様において、緩衝剤は一価の有機アミンである。1つの態様において、緩衝剤はトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン (Tris) またはその塩である。

【 0 0 2 4 】

1つの態様において、緩衝剤は、リン酸もしくはその塩、モルホリンもしくはその塩 (MOPS)、3-[[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ]プロパンスルホン酸 (TAPS)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン (ピシン)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン (トリシン)、3-[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸 (TAPSO)、4-2-ヒドロキシエチル-1-ピペラジンエタンスルホン酸 (HEPES)、2-[[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ]エタンスルホン酸 (TES)、ヒスチジンもしくはその塩、グリシンもしくはその塩、またはトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン (Tris) もしくはその塩を含む群から選択される。1つの態様において、塩はTris-HClである。

【 0 0 2 5 】

1つの態様において、Tris-HClの濃度は約10mM～約95mMである。1つの態様において、Tris-HClの濃度は約15mM～約50mMである。1つの態様において、Tris-HClの濃度は約20mM～約60mMである。1つの態様において、本明細書中で報告される方法は、Tris-HClの濃度が約20mMであることを特徴とする。1つの態様において、本明細書中で報告される方法は、Tris-HClの濃度が約40mMであることを特徴とする。1つの態様において、本明細書中で報告

10

20

30

40

50

される方法は、Tris-HClの濃度が約60mMであることを特徴とする。

【0026】

1つの態様において、本方法は室温で行われる。1つの態様において、本明細書中で報告される方法は20 ~ 33で行われる。1つの態様において、本明細書中で報告される方法は約25で行われる。

【0027】

1つの態様において、ポリペプチドを産生するための方法は、（再懸濁した）原核細胞を、約10mM～約95mMのTris-HClと約2mMのEDTAとを含む約7～約10のpH値の溶液中で、約15分間～約6時間、約25でインキュベーションする段階を含む。

【0028】

1つの態様において、本明細書中で報告される方法は、原核細胞がグラム陰性細胞であることを特徴とする。

【0029】

1つの態様において、原核細胞は再懸濁した細胞である。

【0030】

1つの態様において、原核細胞は、外膜を有するグラム陰性細菌の群から選択される。1つの態様において、原核細胞は、アセトバクター（*Acetobacter*）属、バクテロイデス（*Bacteroides*）属、ボレリア（*Borrelia*）属、ボルタデラ（*Bortadella*）属、バークホルデリア（*Burkholderia*）属、カンピロバクター（*Campylobacter*）属、クラミジア（*Chlamydia*）属、シトロバクター（*Citrobacter*）属、エンテロバクター（*Enterobacter*）属、エシェリキア（*Escherichia*）属、フゾバクテリウム（*Fusobacterium*）属、ヘリコバクター（*Helicobacter*）属、ヘモフィルス（*Hemophilus*）属、クレブシエラ（*Klebsiella*）属、レジオネラ（*Legionella*）属、レプトスピラ（*Leptospira*）属、ナイセリア（*Neisseria*）属、ニトロバクター（*Nitrobacter*）属、プロテウス（*Proteus*）属、シュードモナス（*Pseudomonas*）属、リケッチア（*Rickettsia*）属、サルモネラ（*Salmonella*）属、セラチア（*Serratia*）属、シゲラ（*Shigella*）属、チオバクター（*Thiobacter*）属、トレポネマ（*Treponema*）属、ビブリオ（*Vibrio*）属、キサントモナス（*Xanthomonas*）属、またはエルシニア（*Yersinia*）属から選択される。1つの態様において、本明細書中で報告される方法は、原核細胞が大腸菌細胞であることを特徴とする。

【0031】

1つの態様において、ポリペプチドは非グリコシル化ポリペプチドである。

【0032】

1つの態様において、ポリペプチドは抗体または抗体断片である。1つの態様において、抗体断片は、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>；ダイアボディ；直鎖状抗体；一本鎖抗体分子（例えば、scFv）；および抗体断片から形成された多重特異性抗体から選択される。

【0033】

1つの態様において、本明細書中で報告される方法において使用される溶液は、ペプチドグリカン加水分解酵素を実質的に含んでいない。1つの態様において、ペプチドグリカン加水分解酵素は、リゾチーム（ムラミダーゼ）、溶解性トランスグリコシラーゼ、N-アセチル-D-グルコサミニダーゼ、N-アセチルムラミル-L-アラニンアミダーゼ、またはエンドペプチダーゼから選択される。

【0034】

1つの態様において、本明細書中で報告される方法において使用される溶液は、糖を実質的に含んでいない。1つの態様において、糖はスクロースである。

【0035】

1つの態様において、本明細書中で報告される方法において使用される溶液は、糖を実質的に含んでおらず、かつペプチドグリカン加水分解酵素を実質的に含んでいない。1つの態様において、本明細書中で報告される方法において使用される溶液は、スクロースを実質的に含んでおらず、かつリゾチームを実質的に含んでいない。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 6 】

1つの態様において、本方法は、インキュベーションする段階の後にポリペプチドを単離する段階をさらに含む。

## 【 0 0 3 7 】

1つの態様において、本方法は、単離されたポリペプチドを精製する段階を含む。

## 【 0 0 3 8 】

1つの態様において、本方法は、EDTA濃度が約2mMであり、pH値が約8であり、インキュベーション時間が約30分間であり、Tris-HClの濃度が約20mMであり、インキュベーション温度が約25 であり、かつ原核細胞が大腸菌細胞であることを特徴とする。

## 【 0 0 3 9 】

1つの態様において、本方法は、EDTA濃度が約4mMであり、pH値が約8であり、インキュベーション時間が約30分間であり、Tris-HClの濃度が約40mMであり、インキュベーション温度が約25 であり、かつ原核細胞が大腸菌細胞であることを特徴とする。

## 【 0 0 4 0 】

1つの態様において、本方法は、EDTA濃度が約6mMであり、pH値が約8であり、インキュベーション時間が約30分間であり、Tris-HClの濃度が約60mMであり、インキュベーション温度が約25 であり、かつ原核細胞が大腸菌細胞であることを特徴とする。本明細書において報告される1つの局面は、原核細胞からペリプラズムポリペプチドを単離するための、本明細書において報告される方法の使用である。

## [本発明1001]

(再懸濁した)原核細胞を、約10mM～約95mMのTris-HClと約2mM～約6mMのEDTAとを含む約7～約10のpH値の溶液中で、約15分間～約6時間、約25 でインキュベーションする段階を含む、ポリペプチドを産生するための方法であって、該溶液がペプチドグリカン加水分解酵素および糖を実質的に含んでいない、方法。

## [本発明1002]

pH値が約8であることを特徴とする、前記本発明のいずれかの方法。

## [本発明1003]

インキュベーション時間が約30分間であることを特徴とする、前記本発明のいずれかの方法。

## [本発明1004]

Tris-HClの濃度が約20mMであることを特徴とする、前記本発明のいずれかの方法。

## [本発明1005]

原核細胞がグラム陰性細胞であることを特徴とする、前記本発明のいずれかの方法。

## [本発明1006]

原核細胞が大腸菌(E.coli)細胞であることを特徴とする、前記本発明のいずれかの方法。

## [本発明1007]

原核細胞からペリプラズムポリペプチドを単離するための、前記本発明のいずれかの方法の使用。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 4 1 】

【図1】本明細書において報告される方法での、ペリプラズムに発現されたタンパク質(-シヌクレイン)の大規模単離のSDS-Pageゲル；レーン：LS = 長さの標準、WC = 細胞全体、Pe = 細胞ペレット、IPP = 単離されたペリプラズムタンパク質。

【図2】本明細書において報告される方法での、シュードモナス外毒素(NIys-PE25-LR8M)の大規模単離のSDS-Pageゲル；レーン：LS = 長さの標準、WC = 細胞全体、IPP = 単離されたペリプラズムタンパク質、Pe = 細胞ペレット。

## 【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 4 2 】

発明の詳細な説明

10

20

30

40

50

## 定義

「ペリプラズム空間」または「ペリプラズム」という用語は、2つの選択的透過性バリア、例えば生体膜によって境界をつけられた空間を意味する。1つの態様において、ペリプラズムは、グラム陰性細菌において内膜（すなわち細胞質膜）と外膜との間に位置する。

### 【0043】

「キレート剤」という用語は、単一の金属イオンに対するいくつかの結合を生じさせることができる物質を意味する。換言すると、キレート剤は多座配位子である。

### 【0044】

本明細書における「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、それらが所望の抗原結合活性を呈する限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体断片を含むがそれらに限定されない、種々の抗体構造を包含する。

### 【0045】

「抗体断片」とは、無傷の抗体が結合する抗原に結合する無傷の抗体の一部を含む、無傷の抗体以外の分子を指す。抗体断片の例は、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>；ダイアボディ；直鎖状抗体；一本鎖抗体分子（例えば、scFv）；および抗体断片から形成された多重特異性抗体を含むが、それらに限定されない。

### 【0046】

本出願内で使用される「緩衝化」という用語は、酸性または塩基性の物質の添加または放出によるpHの変化が緩衝剤によって均される溶液を意味する。そのような効果をもたらす任意の緩衝剤を、使用することができる。1つの態様において、薬学的に許容される緩衝剤、例えば、リン酸もしくはその塩（有効pH範囲6.8~8.2）、モルホリンもしくはその塩（MOPS、有効pH範囲6.5~7.9）、3-[[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ]プロパンスルホン酸（TAPS、有効pH範囲7.7~9.1）、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン（ピシン、有効pH範囲7.6~9.0）、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン（トリシン、有効pH範囲7.4~8.8）、3-[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸（TAPSO、有効pH範囲7.0~8.2）、4-2-ヒドロキシエチル-1-ピペラジンエタンスルホン酸（HEPES、有効pH範囲6.8~8.2）、2-[[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ]エタンスルホン酸（TES、有効pH範囲6.8~8.2）、ヒスチジンもしくはその塩（5.5~7.5）、グリシンもしくはその塩（8.7~10.7）、またはトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン（Tris、有効pH範囲7.5~9.0）もしくはその塩などが使用される。1つの態様において、薬学的に許容される緩衝剤は、リン酸もしくはその塩、またはトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン（Tris）もしくはその塩である。

### 【0047】

緩衝剤の緩衝能は、 $p[H^+] = pK_a$ で最大である。これは、 $p[H^+] = pK_a \pm 1$ で最大値の33%にまで、 $p[H^+] = pK_a \pm 1.5$ で10%にまで下がる。この理由により、有効範囲はおおよそ $pK_a \pm 1$ である。

### 【0048】

「組換え体」という用語は、組換え法により意図的に改変されているアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を指す。本明細書における「組換え核酸」という用語は、一般的に、エンドヌクレアーゼによる核酸の操作によってインビトロで本来形成された、天然においては通常見出されない形態の核酸を意味する。したがって、直鎖状形態における、または通常連結されていないDNA分子をライゲーションすることによりインビトロで形成された発現ベクターにおける、単離された変異DNAポリメラーゼ核酸は両方とも、本発明の目的の組換え体と考えられる。ひとたび組換え核酸が作製されて宿主細胞中に再導入されると、それは、非組換え的に、すなわち、インビトロの操作よりむしろ宿主細胞のインビボ細胞機構を用いて複製すると考えられる；しかしながら、そのような核酸は、ひとたび組換えにより産生されたら、その後非組換え的に複製されたとはいえ、依然として本発明の目的の組換え体であると考えられる。「組換えポリペプチド」とは、組換え技術を用いて、

10

20

30

40

50

すなわち、上記に示されるような組換え核酸の発現を通して作製されたポリペプチドである。これは、任意で単離または精製される。

【0049】

「単離されたポリペプチド」とは、天然においてポリペプチドと関連している炭水化物、脂質、または他のタンパク質性不純物などの、混入細胞成分を本質的に含んでいないポリペプチドである。典型的には、単離されたポリペプチドの調製物は、高度に精製された形態の、すなわち、少なくとも約80%純粋、少なくとも約90%純粋、少なくとも約95%純粋、95%超純粋、または99%超純粋なポリペプチドを含有する。特定のタンパク質調製物が、単離されたポリペプチドを含有することを示す1つの手段は、タンパク質調製物をドデシル硫酸ナトリウム (SDS) - ポリアクリルアミドゲルで電気泳動しかつゲルをクマシーブリリアントブルーで染色した後の、単一バンドの出現によるものである。いくつかの態様において、ポリペプチドは、例えば、電気泳動 (例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動 (IEF)、キャピラリー電気泳動) またはクロマトグラフィー (例えば、イオン交換または逆相HPLC) により判定されるように、95%または99%より高い純度に精製される。抗体純度の評価のための方法の概説については、例えば、Flatman, S. et al., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87を参照されたい。しかしながら、「単離された」という用語は、二量体、誘導体化された形態、正確にフォールディングされていない形態、正確にジスルフィド架橋されていない形態、またはスクランブル形態などの、代替的な物理形態での同じポリペプチドの存在を除外しない。

【0050】

「ポリペプチド」とは、天然に産生されていようとまたは合成で産生されていようと、ペプチド結合により連結されたアミノ酸残基のポリマーである。約20アミノ酸残基未満のポリペプチドを、「ペプチド」と呼ぶ。「タンパク質」とは、1つまたは複数のポリペプチド鎖を含み、そのうちの少なくとも1つが100個またはそれより多いアミノ酸残基を含む分子である。ポリペプチドおよびタンパク質はまた、炭水化物基 (carbohydrate group) などの非アミノ酸成分を含んでもよい。炭水化物基および他の非アミノ酸成分は、そのポリペプチドまたはタンパク質を産生する細胞によって付加されてもよく、細胞のタイプによって異なると考えられる。ポリペプチドおよびタンパク質は、そのアミノ酸骨格構造の観点から本明細書において定義される；炭水化物基などの置換基は概して特定されないが、それにもかかわらず存在していてもよい。

【0051】

本明細書において報告される方法

本明細書において報告される1つの局面は、原核細胞を、約10mM ~ 約95mMの緩衝剤と約0.5mM ~ 約9.5mMのキレート剤とを含む約7 ~ 約10のpH値の溶液中で、約15分間 ~ 約6時間インキュベーションする段階を含む、ポリペプチドを産生するための方法である。

【0052】

ポリペプチドの組換え生産のために、ポリペプチドをコードする核酸を単離し、宿主細胞におけるさらなるクローニングおよび/または発現のために1つまたは複数のベクター中に挿入する。

【0053】

ポリペプチドをコードするベクターのクローニングまたは発現に適した宿主細胞は、本明細書において記載される原核細胞を含む。例えば、抗体は、特にグリコシル化およびFcエフェクター機能が必要とされない場合には、細菌において産生されてもよい。細菌における抗体断片およびポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、米国特許第5,789,199号、および米国特許第5,840,523号を参照されたい。(大腸菌における抗体断片の発現を記載しているCharlton, K.A., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254も参照されたい。) 発現後、抗体を、可溶性画分において細菌細胞ペーストから単離してもよく、さらに精製することができる。

【0054】



本発明において、原核細胞を、緩衝剤（例えば、Tris）およびキレート剤（例えば、EDTA）を含む約8のpH値の溶液と室温で接触させるまたはインキュベーションすることによって、組換えにより産生されたポリペプチドを該細胞のペリプラズムから単離できることが見出された。本方法により、組換えにより産生されたポリペプチドの、大規模生産プロセスにおける高収率および高純度での単離が可能になる。単離されたポリペプチドは、下流のプロセス（例えば、精製）について良好な実現可能性を示す。

#### 【0055】

本明細書において報告される方法によって、ペリプラズムポリペプチドは、例えば細胞全体の溶解／機械的破壊と比較して、細胞から選択的に遊離される。

#### 【0056】

加えて、本明細書において報告される方法は、リゾチームなどのペプチドグリカン加水分解酵素の存在を必要とせず、すなわち、本方法は、リゾチームまたは任意の他のペプチドグリカン加水分解酵素の非存在下で行われ、すなわち、溶液は、リゾチームまたは任意の他のペプチドグリカン加水分解酵素を実質的に含んでいない。

#### 【0057】

さらに、本明細書において報告される方法は、温度感受性ポリペプチドの調製に適している。

#### 【0058】

その上、本明細書において報告される方法は、スクロースまたは任意の他の糖の存在を必要とせず、すなわち、本方法は、スクロースまたは任意の他の糖の非存在下で行われ、すなわち、溶液は、スクロースまたは任意の他の糖を実質的に含んでいない。

#### 【0059】

以下の表に、様々な条件下で得られる例示的な収率を示す。

実験	EDTA [mM]	インキュベーション時間 [h]	インキュベーション温度 [°C]	pH 値	TRIS [mM]	単離された 関心対象の タンパク質 [%]
参照 (インキュベーションを伴わない細胞全体)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	100
本明細書 において報告 される条件	2	0.5	25	8	20	104
比較条件 1	2	0.5	31	8	100	95
比較条件 10	2	0.5	49	8	100	85
比較条件 18	0	16	25	8	20	94
比較条件 21	0	0.5	25	8	20	66
比較条件 12	18	0.5	31	8	100	84
比較条件 17	18	0.5	49	8	100	48

10

20

30

40

50

## 【0060】

EDTAの非存在下で16時間のインキュベーション時間を用いて、タンパク質の良好な収率を得ることができる（比較条件18）。

## 【0061】

低濃度、例えば10mM未満、例えば2mMまたは4mMまたは6mMなどのEDTAをインキュベーション混合物に添加した場合に、インキュベーション時間を短縮できることが、本発明において見出された。EDTAの存在下でのこれらの条件下では、EDTAの非存在下でのインキュベーションと比較して同等の収率を、達成することができる。

## 【0062】

約25℃より上の温度の上昇は、得られる収率の低下をもたらすことが見出された。

10

## 【0063】

約8のpH値を下回るpH値（例えば、pH6.8）は、得られる収率の低下をもたらすことが見出された。pH値の増大は、収率の増大をもたらす得る。

## 【0064】

使用されるTris緩衝液の濃度は、100mM未満、例えば50mM未満、例えば約20mMなどでなければならないことが見出された。

## 【0065】

小規模（150  $\mu$ Lの単離容積）で生じたこれらの結果を、発酵槽で培養された細胞からペリプラズムタンパク質を単離するために、より大きい規模へ移せることが見出された。これにより、市場供給のための組換えタンパク質の産生が容易になると考えられる。

20

## 【0066】

大規模生産にとって、場合によっては、緩衝液容積を低減させることと共に緩衝剤およびキレート剤の濃度を増大させることが有利であり得る。

## 【0067】

本発明において、ペリプラズムに発現された関心対象のタンパク質は、本発明の方法を用いて効率的に単離できることが見出された（図1を参照されたい）。

## 【0068】

ある特定の態様において、ポリペプチドは抗体断片である。抗体断片は、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、およびscFv断片、ならびに以下に記載される他の断片を含むが、それらに限定されない。ある特定の抗体断片の概説については、Hudson, P.J. et al., *Nat. Med.* 9 (2003) 129-134を参照されたい。scFv断片の概説については、例えば、Pluckhthun, A., *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315を参照されたい；国際公開公報第93/16185号；ならびに米国特許第5,571,894号および米国特許第5,587,458号もまた参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、増大したインビボ半減期を有するFabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片の考察については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。

30

## 【0069】

ダイアボディとは、二価または二重特異性であり得る2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許第0 404 097号；国際公開公報第1993/01161号；Hudson, P.J. et al., *Nat. Med.* 9 (2003) 129-134；およびHolliger, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6444-6448を参照されたい。トリアボディ（triabody）およびテトラボディ（tetrabody）もまた、Hudson, P.J. et al., *Nat. Med.* 9 (2003) 129-134に記載されている。

40

## 【0070】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインのすべてもしくは一部、または軽鎖可変ドメインのすべてもしくは一部を含む抗体断片である。ある特定の態様において、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である（Domantis, Inc., Waltham, MA；例えば、米国特許第6,248,516 B1号を参照されたい）。

## 【0071】

50

抗体断片は、本明細書において記載されるように、組換え宿主細胞（例えば、大腸菌またはファージ）による産生を含む、種々の技術により作製することができる。

#### 【0072】

一般的なクロマトグラフィー法およびその使用は、当業者に公知である。例えば、Chromatography, 5<sup>th</sup> edition, Part A: Fundamentals and Techniques, Heftmann, E. (ed), Elsevier Science Publishing Company, New York, (1992); Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences, Deyl, Z. (ed.), Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, (1998); Chromatography Today, Poole, C. F., and Poole, S. K., Elsevier Science Publishing Company, New York, (1991); Scopes, Proteins in Purification: Principles and Practice (1982); Sambrook, J., et al. (ed), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M., et al. (eds), John Wiley & Sons, Inc., New York; または Freitag, R., Chromatographical processes in the downstream processing of (recombinant) proteins, Meth. Biotechnol. 24 (2007) 421-453 (Animal cell biotechnology 2<sup>nd</sup> Edition)を参照されたい。

#### 【0073】

ポリペプチドを精製するための方法は、十分に確立されており、広く用いられている。それらは、単独または組合せのいずれかで使用される。そのような方法は、例えば、複合体化された金属イオンを有するチオールリガンドを用いる親和性クロマトグラフィー（例えば、Ni(II)-およびCu(II)-親和性材料での）または微生物由来のタンパク質を用いる親和性クロマトグラフィー（例えば、プロテインAもしくはプロテインG親和性クロマトグラフィー）、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、陽イオン交換（カルボキシメチル樹脂）、陰イオン交換（アミノエチル樹脂）、および混合モード交換クロマトグラフィー）、チオフィリック吸着（例えば、 $\gamma$ -メルカプトエタノールおよび他のSHリガンドでの）、疎水性相互作用または芳香族吸着クロマトグラフィー（例えば、フェニル-sepharose、アザ-アレノフィリック（aza-arenophilic）樹脂、もしくはm-アミノフェニルボロン酸での）、サイズ排除クロマトグラフィー、および調製用電気泳動法（ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動など）である（Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102）。

#### 【0074】

以下の実施例、図、および配列は、本発明の理解を助けるために提供され、本発明の真の範囲は、添付の特許請求の範囲に示される。本発明の精神から逸脱すること無く、示される手順において改変がなされ得ることが、理解される。

#### 【実施例】

#### 【0075】

本明細書において報告される一般的な方法：

収集した細胞を20mM Tris-HCl緩衝液（pH 8）中に再懸濁する

20mM Tris-HCl-4mM EDTA緩衝液（pH 8）の1:1比での添加

30分間、25℃での振盪を伴うインキュベーション

ペリプラズム空間のタンパク質を含有する上清からの細胞の分離

#### 【0076】

##### 実施例1：

組換えにより産生されたタンパク質の量の測定

本実施例は、様々な方法を用いて大腸菌のペリプラズム空間から単離可能な、組換えにより産生された関心対象のタンパク質の量を測定するために行った。

#### 【0077】

参照値：

いかなる前処置も無く細胞を崩壊させることにより得られた関心対象のタンパク質の100%に対応する、細胞全体の溶解物。

## 【 0 0 7 8 】

試料の量：

すべての方法を、3 OD値に対応する培養試料（3/OD = ml）中に含まれる細胞を採取して行った。細胞は、遠心分離により取得した。

## 【 0 0 7 9 】

SDS-PAGE解析のための細胞全体の試料調製：

細胞にPBS 150  $\mu$ lを添加し、その後SDS試料調製用緩衝液150  $\mu$ lを添加した。振盪しながら10分間95℃に加熱した後、5  $\mu$ lをSDSゲルにアプライした。

## 【 0 0 8 0 】

SDS-PAGE解析のためのペリプラズム回収を用いた細胞抽出物の試料調製：

10

ペレットにした細胞を、EDTAを含むまたは含まない氷冷TRIS緩衝液150  $\mu$ lを用いて再懸濁した。

## 【 0 0 8 1 】

再懸濁した細胞を、規定の温度で振盪しながらインキュベーションした。インキュベーション後、混合物を10,000  $\times$  gで10分間遠心分離した。

## 【 0 0 8 2 】

ペレットを廃棄した。

## 【 0 0 8 3 】

上清にSDS試料調製用緩衝液150  $\mu$ lを添加した。振盪しながら10分間95℃に加熱した後、5  $\mu$ lをSDSゲルにアプライした。

20

## 【 0 0 8 4 】

比較実験のパラメータおよび結果（セット1）：

実験	EDTA [mM]	インキュベーション時間 [h]	インキュベーション温度 [°C]	pH 値	TRIS [mM]	単離された 関心対象の タンパク質 [%]
参照 (細胞全体)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	100
比較条件 1	2	0.5	31	8	100	95
比較条件 2	2	1.5	31	8	100	92
比較条件 3	18	1.5	31	8	100	91
比較条件 4	10	1.5	37	8	100	89
比較条件 5	10	1	31	8	100	87
比較条件 6	2	1	37	8	100	87
比較条件 7	10	1	37	8	100	87
比較条件 8	18	1	37	8	100	87
比較条件 9	10	0.5	37	8	100	85
比較条件 10	2	0.5	49	8	100	85
比較条件 11	2	1.5	49	8	100	85
比較条件 12	18	0.5	31	8	100	84
比較条件 13	10	1	37	8	100	84
比較条件 14	10	1	37	8	100	84
比較条件 15	10	1	49	8	100	84
比較条件 16	18	1.5	49	8	100	74
比較条件 17	18	0.5	49	8	100	48

10

20

30

40

【 0 0 8 5 】

比較実験のパラメータおよび結果（セット2）：

実験	EDTA	インキュベーション時間	インキュベーション温度	pH 値	TRIS	単離された 関心対象の タンパク質
	[mM]	[h]	[°C]		[mM]	[%]
参照 (細胞全体)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	100
比較条件 18	0	16	25	8	20	94
比較条件 19	0	16	25	6.8	20	72
比較条件 20	0	4	25	8	20	68
比較条件 21	0	0.5	25	8	20	66
比較条件 22	0	16	25	8	100	62
比較条件 23	0	16	25	6.8	100	57
比較条件 24	0	4	25	8	100	48
比較条件 25	0	4	25	6.8	20	42
比較条件 26	0	0.5	25	8	100	40
比較条件 27	0	0.5	25	6.8	20	35
比較条件 28	0	0.5	25	6.8	100	35
比較条件 29	0	4	25	6.8	100	34
比較条件 30	0	4	25	7.4	60	34
比較条件 31	0	4	25	7.4	60	32
比較条件 32	0	4	25	7.4	60	27

10

20

30

40

【 0 0 8 6 】

比較実験のパラメータおよび結果（セット3）：

実験	EDTA	インキュベーション時間	インキュベーション温度	pH値	TRIS	単離された 関心対象の タンパク質
	[mM]	[h]	[°C]		[mM]	[%]
参照 (細胞全体)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	100
本明細書 において報告 される条件	2	0.5	25	8	20	104
比較条件 33	2	0.5	25	8	50	96
比較条件 34	2	0.5	25	8	100	98

10

【 0 0 8 7 】

実施例2：低分子量輸送タンパク質（ $\alpha$ -シヌクレイン）の大規模生産

低分子量輸送タンパク質（ $\alpha$ -シヌクレイン）をコードする核酸を含む大腸菌細胞を、10Lの発酵槽で培養した。培養の終わりに、578nmで測定した78のOD値を有する9.52Lを収集した。これは、細胞湿重量817gに対応する。

【 0 0 8 8 】

20

これらのうち、ペレットにした細胞110gを、5Lのインキュベーション緩衝液（20mM TRIS、2mM EDTA、pH 8）中に再懸濁した。撹拌を伴う25、30分間のインキュベーション後に、4、60分間の4700rpmでの遠心分離により、細胞を、ペリプラズム空間由来の関心対象のタンパク質を含有する上清から分離した。

【 0 0 8 9 】

低分子量輸送タンパク質は、94.9%の収率で、ペリプラズム空間から選択的に単離された。

【 0 0 9 0 】

ペリプラズムに発現された関心対象のタンパク質が、本発明の方法を用いて効率的に単離できることが見出された（図1を参照されたい）。

30

【 0 0 9 1 】

実施例3：

シュドモナス外毒素（Nlys-PE25-LR8M）の大規模生産

シュドモナス外毒素（Nlys-PE25-LR8M）をコードする核酸を含む大腸菌細胞を、実施例2に従って培養し、収集した。

【 0 0 9 2 】

ペレットにした細胞106gを、5Lのインキュベーション緩衝液（20mM TRIS、2mM EDTA、pH 8）中に再懸濁した。撹拌を伴う25、30分間のインキュベーション後に、4、60分間の4700rpmでの遠心分離により、細胞を、ペリプラズム空間由来の関心対象のタンパク質を含有する上清から分離した。

40

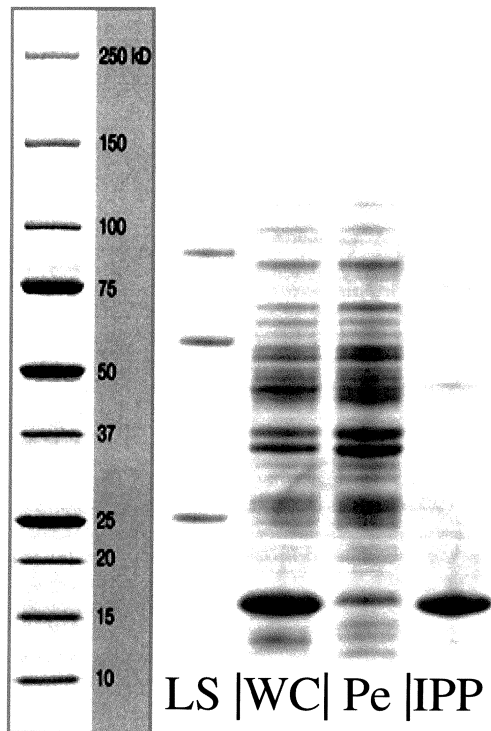
【 0 0 9 3 】

シュドモナス外毒素は、ペリプラズム空間から選択的に単離された。

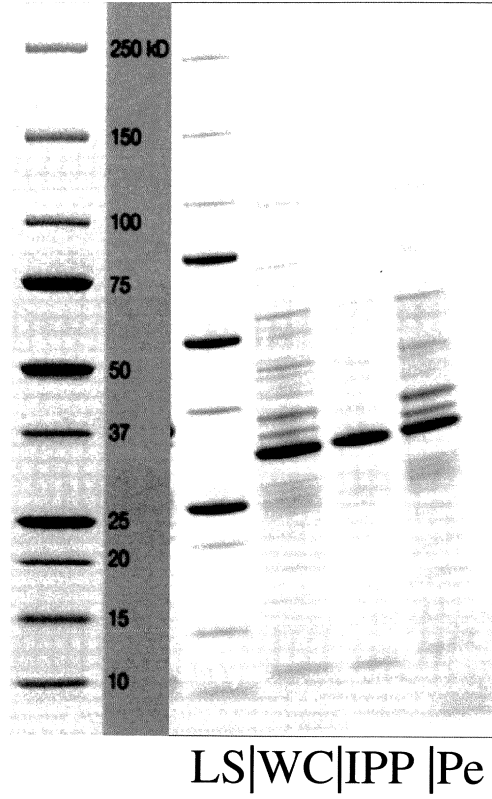
【 0 0 9 4 】

関心対象のタンパク質が、本発明の方法を用いてペリプラズム空間から効率的に単離できることが見出された（図2を参照されたい）。

【図 1】



【図 2】





---

 フロントページの続き

(74)代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一  
 (74)代理人 100148699  
 弁理士 佐藤 利光  
 (74)代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一  
 (74)代理人 100129506  
 弁理士 小林 智彦  
 (74)代理人 100114340  
 弁理士 大関 雅人  
 (74)代理人 100114889  
 弁理士 五十嵐 義弘  
 (74)代理人 100121072  
 弁理士 川本 和弥  
 (72)発明者 シャンツ クリスチャン  
 ドイツ連邦共和国 ペンツベルク イム ヴィーシュフェルト 11

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 国際公開第2011/095506(WO, A1)  
 特開平07-184680(JP, A)  
 国際公開第03/059386(WO, A2)  
 特表2002-536979(JP, A)  
 木田中, 第65話 研究とは何だろう - アイデアはどのようにして生まれるか -, [オンライン]  
 , <[http://www.rikasuki.jp/rika\\_no65/rika\\_no65.htm](http://www.rikasuki.jp/rika_no65/rika_no65.htm)>, 公知日: 2009年8月20日, [2017年7月21日検索]  
 MICROBIOLOGICAL REVIEWS, 1992年 9月, Vol. 56, No. 3, pp. 395-411  
 JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2007年 4月, Vol. 189, No. 7, pp. 2777-2786  
 J. Mol. Biol., 1995年 2月, Vol. 246, No. 1, pp. 82-94  
 J. Mol. Biol., 1998年 7月, Vol. 280, No. 1, pp. 117-127

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 1/36  
 C07K 14/245  
 C12P 21/00 - 21/08  
 C12N 15/09  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )  
 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 )  
 P u b M e d