

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-530271

(P2016-530271A)

(43) 公表日 平成28年9月29日(2016.9.29)

(51) Int.Cl.

C07K 1/18 (2006.01)
C12N 1/06 (2006.01)
G01N 30/96 (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)
B01J 41/12 (2006.01)

F 1

C07K 1/18
C12N 1/06
G01N 30/96
G01N 30/88
G01N 30/88

テーマコード(参考)

4B065
4H045

B
D
J

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-535505 (P2016-535505)
(86) (22) 出願日 平成26年8月25日 (2014.8.25)
(85) 翻訳文提出日 平成28年4月25日 (2016.4.25)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2014/068015
(87) 國際公開番号 WO2015/025063
(87) 國際公開日 平成27年2月26日 (2015.2.26)
(31) 優先権主張番号 13181540.9
(32) 優先日 平成25年8月23日 (2013.8.23)
(33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号 13181537.5
(32) 優先日 平成25年8月23日 (2013.8.23)
(33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

(71) 出願人 504135837
ベーリンガー インゲルハイム エルツェ
ーファウ ゲゼルシャフト ミット ベシ
ュレンクテル ハフツング ウント コン
パニー コマンディトゲゼルシャフト
オーストリア アー1121 ヴィーン
ドクトル ベーリンガー ガッセ 5-1
1
(71) 出願人 305008042
サンド・アクチエンゲゼルシャフト
スイス国、ツエー・ハーア-4002・バー
ゼル、リヒトシュトラーゼ・35
(74) 代理人 110001508
特許業務法人 津国

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞の破碎及び／又は生体分子の回収のための微粒子

(57) 【要約】

本発明は、細胞を破碎する新規な方法、及び細胞から生体分子を放出させる新規な方法を提供する。本発明は、粉碎した樹脂を含む正に荷電した微粒子及び／又は負に荷電した微粒子の使用を含む。それは、細胞培養液から生体分子を精製するために特に有用である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

生体分子を回収するための正に荷電した微粒子及び／又は負に荷電した微粒子の使用であって、該正に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陰イオン交換樹脂を含み、該負に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陽イオン交換樹脂を含む、使用。

【請求項 2】

生体分子がポリペプチド又はポリヌクレオチドである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

該正に荷電した微粒子及び／又は負に荷電した微粒子がフロックを形成する、請求項 1 に記載の使用。

10

【請求項 4】

細胞を破碎するための正に荷電した微粒子及び／又は負に荷電した微粒子の使用であって、該正に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陰イオン交換樹脂を含み、該負に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陽イオン交換樹脂を含む、使用。

【請求項 5】

陰イオン交換樹脂及び陽イオン交換樹脂が、ポリスチレン系、ヒドロキシエチルメタクリラート（H E M A）系、ジメチルアミノエチルメタクリラート（D M A E M A）系、ジメチルアミノエチルメタクリラート（p D M A E M A）、ポリアクリルアミド系、メタクリル酸（M A A）系である、先行する請求項のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6】

陽イオン交換樹脂及び陰イオン交換樹脂が、ジビニルベンゼンと架橋したポリスチレンである、先行する請求項のいずれか一項に記載の使用。

20

【請求項 7】

微粒子が約 5 μm 未満の平均粒子径を有する、先行する請求項のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 8】

正に荷電した微粒子又は負に荷電した微粒子が、ポリマー陰イオン交換及び／又は陽イオン交換樹脂を粉碎することによって得られ得る、先行する請求項のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 9】

陰イオン交換樹脂が、A m b e r l i t e I R A - 4 0 0 、A m b e r l i t e I R A - 4 8 5 、D o w e x 1 X 2 - 1 0 0 、D o w e x 1 - 8 - 1 0 0 、M a r a t h o n A 2 又はD I A I O N S A 2 0 A である、先行する請求項のいずれか一項に記載の使用。

30

【請求項 10】

陽イオン交換樹脂が、A m b e r l i t e I R C - 7 4 8 、D o w e x 5 0 W X 2 - 1 0 0 、D o w e x 5 0 W X 8 - 1 0 0 、M a r a t h o n M S C 又はD I A I O N S K 1 1 0 である、先行する請求項のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 11】

細胞が真核細胞又は原核細胞である、先行する請求項のいずれか一項に記載の使用。

40

【請求項 12】

生体液から生体分子を得る方法であって、a) 請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に定義される正に荷電した微粒子及び／又は負に荷電した微粒子を生体液に添加すること、並びに該生体液から該生体分子を回収することを含む、方法。

【請求項 13】

b) 前記微粒子にフロックを形成させること、c) 生体液から該フロックを除去すること、及びd) から生体分子を脱離することを更に含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

細胞を破碎する方法であって、正に荷電した微粒子及び／又は負に荷電した微粒子を細胞懸濁液に添加することを含む、方法。

50

【請求項 1 5】

細胞から生体分子を放出させることを更に含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

生体分子がポリペプチド又はポリヌクレオチドである、請求項 1 4 又は 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

正に荷電した微粒子及び / 又は負に荷電した微粒子を含む生体液であって、該正に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陰イオン交換樹脂を含み、該負に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陽イオン交換樹脂を含む、生体液。

【請求項 1 8】

フロックを更に含む、請求項 1 7 における液。

10

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】****〔発明の分野〕**

本発明は、概して、生体分子の回収及び細胞の破碎の分野に関し、特に、細胞懸濁液からの細胞内生体分子（例えば、ポリペプチド又はポリヌクレオチド）の回収に関する。それは、生体液などの液体から生体分子を回収する方法を包含する。更なる局面では、本発明は、細胞培養、及び細胞培養物からの生体分子の精製の分野に関する。

【背景技術】

20

【0 0 0 2】**〔発明の背景〕**

人工生産システムの開発に関するあらゆる過去の努力にもかかわらず、細胞などの生物学的実体は、抗生物質、タンパク質及び核酸などの複雑な物質を产生するそれらの能力の点で無類のものである。今日の工業的に生産されたほぼ全ての細胞起源の物質は、細胞内で產生された後に環境に排出される細胞外産物である。しかしながら、潜在的に有用な物質の大部分は、細胞内に残る。細胞内物質を放出させるために、典型的には、機械的、物理的、化学的又は酵素的な手段によって、細胞を分解する。価値ある細胞産物の回収効率は、生体系内におけるそれらの形成、位置及びそれらの相互作用に密接に関連している。過去数十年間において、分子構造及びこれらの細胞系内におけるそれらの機能の調査により、このような産物及びそれらの大規模処理の多様性が高まってきた。同時に、産物の品質に関する要求により、特に医療分野では、明確に定義された有効かつ高純度の物質を送達する必要性が生じた。

30

【0 0 0 3】

現在の細胞破碎方法としては、機械的方法及び非機械的方法が挙げられる。非機械的方法は、物理的（減圧、浸透圧ショック、熱分解、凍結乾燥、マイクロ波）、化学的（抗生物質、キレート剤、界面活性剤、溶媒、アルカリ、超臨界 CO₂）及び酵素的（溶解、自己融解、ファージ）な方法を含む。一方、細胞破碎のための機械的アプローチ及びデバイスは、ビーズミル、ホモジナイザー、キャビテーション（超音波、流体力学）及びマイクロフリュイダイザーを含む。工業規模では、（主に機械的な）いくつかの細胞破碎方法のみが実施されており、それらは一般的に、下流の（例えば、回収、精製）処理に統合されている。

40

【0 0 0 4】

大規模の場合、最も一般的な機械的方法はビーズミル及び高圧ホモジナイゼーションであり、これらは、典型的には、標準的な操作として実行される。高圧ホモジナイゼーションを使用する場合、細胞溶液は、高圧下で狭いバルブを通して押し出される。バルブを通過することにより、細胞は、排出時に乱流、キャビテーション、高剪断力及び急激な圧力低下に供されて、細胞がバラバラになる。構築では、バルブのストレス及び浸食を考慮しなければならず、ホモジナイゼーション圧力の上昇と共にこれらは増加する。更に、溶液の温度が圧力の増加と共に上昇することにより、この方法はエネルギーを消費するよう

50

なり、特に温度不安定性酵素が放出される場合に、必要なデバイス及び懸濁液が冷却される。ホモジナイザーによって消費される電力の約90%超が熱として散逸し、冷却コストが、細胞破壊の総コストの大部分に相当する。更に、十分に高い収率を達成するためには、連続継代がしばしば必要とされる（非特許文献1）。

【0005】

ビーズミルでは、ビーズを生体液に添加し、これを繰り返して攪拌又は振盪することによって高速攪拌に供する。ビーズとの衝突によって、細胞が破碎され、細胞内容物が放出される。ビーズミルは熱も発生し、冷却を必要とする。それは、ビーズミルの構築、動作パラメータ及び産物特異的な特性を含む様々なパラメータによって影響されるかなり複雑なプロセスである。ビーズミルの構築及び形状は、重要なプロセス変数である。しかしながら、より小さなバージョンは、工業規模のビーズミルとはしばしば幾何学的に似ておらず、このことが、実験室試験のデータからバッチパフォーマンスを推定することを困難にしている（非特許文献1）。

【0006】

機械的破碎方法は、いくつかの欠点に悩まされている。細胞が完全に破碎されるので、全ての細胞内物質が放出され、それにより、中間産物の夾雑物含量が増加する。したがって、タンパク質、核酸及び細胞フラグメントの複雑な混合物から、目的の産物を分離しなければならない。加えて、放出された核酸は溶液の粘度を増加させ得るので、後の処理工程（例えば、クロマトグラフィー）を複雑にし得る。機械的破壊によって生成される細胞残屑は、しばしば小さな細胞フラグメントからなるので、溶液を清澄化することが困難になる。産物の完全な放出は、破碎デバイスに複数回通過させる必要がしばしばあり、フラグメントのサイズを更に減少させることにより問題を悪化させる。デバイスのスループットは粒子径の二乗に反比例するので、これらは、連続遠心分離によって除去することが困難である。ホモジネートの粘着性によって、及び膜を詰まらせるその傾向によって、ろ過は困難である。更に、機械的方法は、定期的なメンテナンス及び高価な装置を必要とし、エネルギーを消費する。それらは熱を発生し、温度感受性酵素で使用可能であるためには大規模な冷却を必要とする。更に、それらは、細胞を、したがって抽出産物を高い剪断応力に曝露する。デバイスが十分に冷却されていないと、ほとんどの産物は、発生した熱によって変性する。

【0007】

上述のように、より選択的な放出方法は、物理的、化学的又は酵素的な処理を含む。化学的な処理は、EDTA、カオトロピック剤、有機溶媒、抗生物質、酸、アルカリ及び界面活性剤の使用を含む。過剰な化学物質の廃棄物処理の問題に加えて、これらの方法はかなり高価であるので、大規模な用途に適さない。所望の産物と化学物質との夾雑は、別の欠点である。いくつかの化学物質はあまり選択的ではなく、感受性タンパク質、酵素及び細胞壁を損傷する傾向がある。

【0008】

酵素的細胞破碎はより特異的であるが、いくつかの別々の層を有する複雑な細胞構造（例えば、細菌細胞壁）に適用する場合にはしばしば限定される。更に、それは、酵素及び緩衝液のコストによって制限される。したがって、酵素処理は、大規模又は工業規模のいずれにおいても適用可能ではない。別の欠点は、所望の産物と酵素との潜在的な夾雫である。

【0009】

物理的透過は、凍結融解又は浸透圧ショック処理によって達成され得る。凍結融解では、産物の効率的な放出のためには複数のサイクルが必要であり、このプロセスが非常に長期であり得る。一方、浸透圧ショック処理は、強固な細胞壁構造を有する細胞を破碎するために十分ではない場合がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

10

20

30

40

50

【非特許文献 1】Kula et al., 「Purification of Proteins and the Disruption of Microbial Cells.」 Biotechnology Progress 1987

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

要するに、これらの方法の欠点としては、コストが比較的高いこと、大規模では実用性が低いこと、効率及び再現性が低いこと、並びに添加した物質を放出後に除去する必要性があることが挙げられる。

【課題を解決するための手段】

【0012】

細胞產生系の可能性を考慮すると、特に細胞懸濁液から生体分子を回収するための別の方法であって、取り扱いが容易で、コスト効率がよく、拡張性がある方法が必要である。更に、前記方法は、感受性生体分子産物にとって十分に穏やかでなければならず、夾雑が少ない産物をもたらす高選択的な生体分子の回収を可能にするものでなければならない。したがって、本発明の1つの目的は、上記欠点の1つ以上を克服する方法又はシステムを提供することである。

【0013】

本明細書で使用される「a」、「an」及び「the」という単数形は、特に文脈上明確な指示がない限り、複数の言及を含むことに留意しなければならない。したがって、例えば、「試薬」への言及は、そのような異なる試薬の1つ以上を含み、「方法」への言及は、本明細書に記載される方法に関して改変及び置換され得る、当業者に公知の同等の工程及び方法への言及を含む。

20

【0014】

特に指示がない限り、一連の要素に先行する「少なくとも」という用語は、その一連におけるあらゆる要素を指すと理解されるべきである。当業者であれば、単なる慣用の実験を使用して、本明細書に記載される本発明の特定の実施態様の多くの均等物を認識するか、又は確かめることができるであろう。そのような均等物は、本発明によって包含されることが意図される。

【0015】

「及び／又は」という用語は、本明細書で使用される場合は常に、「及び」、「又は」及び「前記用語によって接続される要素の全て若しくは任意の他の組み合わせ」の意味を含む。

30

【0016】

本明細書で使用される「約」又は「およそ」という用語は、所定の値又は範囲の20%以内、好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内を意味する。しかしながら、それはまた、具体的な数を含む（例えば、約20は、20を含む）。

【0017】

「未満」又は「超」という用語は、具体的な数を含む。例えば、20未満は、未満又は等しいことを意味する。同様に、超(more than)又は超(greater than)は、それぞれ、超又は等しいこと(more than or equal to)、或いは超又は等しいこと(greater than or equal to)を意味する。

40

【0018】

本明細書及び以下の特許請求の範囲を通して、特に文脈上必要ない限り、「含む(comprise)」という語、並びに「含む(comprises)」及び「含む(comprising)」等の変化形は、記述される整数若しくは工程、又は整数若しくは工程の群を含むことを意味するが、任意の他の整数若しくは工程、又は整数若しくは工程の群を除外することを意味しないと理解される。本明細書で使用される場合、「含む(comprising)」という用語は、「含有する(containing)」若しくは「含む(including)」という用語で置換し得るか、又は本明細書で使用される場合には「有する(having)」という用語で置換し得ることもある。

50

【 0 0 1 9 】

本明細書で使用される場合、「からなる (consisting of)」は、請求項の事項で特定されていない任意の要素、工程及び成分を除外する。本明細書で使用される場合、「から本質的になる (consisting essentially of)」は、請求項の基本的及び新規な特徴に実質的に影響を与えない材料及び工程を除外しない。

【 0 0 2 0 】

本明細書における各事例において、「含む (comprising)」、「から本質的になる (consisting essentially of)」及び「からなる (consisting of)」という用語のいずれかは、他の 2 つの用語のいずれかで代替され得る。

【 0 0 2 1 】

本発明は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコール、材料、試薬及び物質などに限定されず、このようなものは変化し得ることを理解すべきである。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施態様を説明する目的のものに過ぎず、本発明の範囲を限定することを意図せず、本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ定義される。

10

【 0 0 2 2 】

本明細書の本文全体にわたり引用される全ての刊行物及び特許（全ての特許、特許出願、科学刊行物、製造業者の仕様書、説明書などを含む）は、上記又は下記にかかわらず、その全体が参照により本明細書に援用される。本明細書のいかなる記載事項も、本発明が、先行発明によるそのような開示に対する先行権を有しないという自認と解釈されるべきではない。参照により援用される事項が本明細書と矛盾又は相反するまで、本明細書は、いずれのそのような事項にも取って代わる。

20

【 0 0 2 3 】**〔要旨〕**

本発明は、生体分子を得る（生体分子の回収とも称される）ための新規な方法であって、上記欠点の 1 つ以上を克服する新規な方法を提供する。前記方法は、液体及び流体、例えば細胞培養物、細胞ホモジネート、細胞溶解物、細胞懸濁液、発酵プロセス、培養プロセス、発酵上清、培養上清、細胞上清、例えば *E. coli*、*Pichia pastoris* 及び CHO 細胞上清から生体分子を得るために使用され得る。更に、本発明は、細胞に含まれる生体分子を放出させるために使用され得る細胞破碎方法を含む。本明細書に示されるように、本発明は、細胞の破碎及び細胞内生体分子の回収に特に有用である。本明細書に開示される方法は、簡便でコスト効率がよく、工業的適用のために容易に拡張可能である。前記方法は、生体分子を選択的に回収するための簡単な方法であって、複雑な装置も可溶性添加剤（緩衝剤及び塩を除く）も必要としない方法を提供する。前記のように、細胞懸濁液から生体分子を回収するための従来技術の方法は、機械的応力及び / 又は化学的添加剤のいずれかを含む。今日では工業規模で適用される従来の方法とは対照的に、本発明の方法は穏やかであり、細胞及び / 又は所望の生体分子産物を過酷な条件に供さない。したがって、本明細書に開示される方法は、夾雜残屑の量を減少させ、所望の生体分子に対する潜在的に有害な機械的応力及び物理的応力をより一層与えない。

30

【 0 0 2 4 】

本発明者らは、驚くべきことに、粉碎した樹脂を含む荷電した微粒子又は疎水性微粒子が、生体液から生体分子を回収する（本明細書では「抽出する」とも称される）ように作用し得ることを発見した。更に、いくつかの実施態様では、細胞懸濁液に添加した場合、荷電した微粒子は細胞を破碎し得ると同時に、細胞から放出された生体分子を吸着し得る。したがって、一局面では、前記微粒子は、簡便で拡張可能な態様で細胞を破碎し、生体分子を放出させ、生体分子を更に吸着するために使用され得る。いくつかの局面では、前記微粒子は、細胞及び / 又は生体分子及び / 又は逆電荷微粒子との相互作用によりフロックを形成することが見出され、生体液から容易に分離され得る。したがって、放出された生体分子は、生体分子が吸着したフロックを分離することによって容易に回収され得る。したがって、本発明は、下流処理における細胞破碎工程及び生体分子抽出工程を組み合わせた簡易な方法を更に提供する。この技術は、コロイド固相抽出（C S P E）と称される

40

50

。理論に拘束されるものではないが、陰イオン交換樹脂由来の正に荷電した微粒子は、負に荷電した細胞表面に吸着し、それにより、特に細菌細胞の通常負に荷電した細胞表面に会合している陽イオン（特に、カルシウムイオン及び／又はマグネシウムイオン）を置換することによって、細胞とフロックを構築すると想定される。その結果、細胞膜を構築する一連の分子がいくらか不安定になることによって、細胞が漏出性になる。

キレート陽イオン交換樹脂由来の負に荷電した粒子の場合、このような粒子は陽イオン（特に、カルシウム及び／又はマグネシウム）に結合し、それにより、細胞膜を構築する一連の分子を不安定化すると想定される。疎水性微粒子の場合、それらはフロックを形成することも見出された。

【0025】

10

現在のところ、これは、細胞構造（例えば、細胞壁）のフラグメント化が少ない細胞を穏やかに「開放して」、夾雑物レベルの低下をもたらすことによる、細胞内生体分子の独特な抽出方法である。同時に、この新規技術は、生体分子の選択的抽出を可能にし、当技術分野で公知の機械的破碎方法（例えば、高圧ホモジナイゼーション及びビーズミル）と効率の点で同程度であるが、より高い選択性及びより低い夾雑レベルを提供する。同時に、本明細書に開示される新規な方法を使用して、所望の生体分子を回収しつつ、細胞の完全性を維持することが可能である。したがって、しかしながら好ましくは、細胞の「開放」は、細胞が完全には破碎されないことを意味する。したがって、「開放」は、好ましくは、細胞が漏出性になることにより、それらの細胞質内容物が漏出することを意味する。

【0026】

20

第1の局面では、本発明は、生体分子を回収するための正に荷電した微粒子及び／又は負に荷電した微粒子の新規な使用であって、該正に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陰イオン交換樹脂を含み、該負に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陽イオン交換樹脂を含む新規な使用を提供する。一実施態様では、正に荷電した微粒子のみを使用する。別の実施態様では、負に荷電した微粒子のみを使用する。更なる実施態様では、正に荷電した微粒子及び負に荷電した微粒子の両方を使用する。

【0027】

30

本発明の第2の局面では、前記組成物は、疎水性微粒子を含む。これらの疎水性微粒子は、特定のペプチド又はポリペプチドに吸着することができるが、他の生体分子にも吸着することができる。吸着機構は、吸着リガンド（例えば、ペプチド又はポリペプチド）の疎水性部分と、微粒子のポリマー表面との間の疎水性（ファンデルワールス、ロンドンタイプ）引力に基づくものであると考えられる。

【0028】

40

微粒子は、本明細書に記載されるように樹脂を粉碎することによって、例えば、イオン交換樹脂を粉碎し、場合により粉碎した樹脂をコンディショニングすることによって得ることが可能である（得られ得る）。このような粒子は、本明細書では「微粒子」、「吸着剤粒子」、「吸着剤」、「粒子」、「粉碎した粒子」又は「粉碎した樹脂」と称される。これらの用語は、互換的に使用される。好ましくは、微粒子は、従来の大直径小孔粒子（これは通常、水の脱イオン化及び廃水処理を意図されるものである）を粉碎することによって得られる。

【0029】

正に荷電した微粒子は、陰イオン交換樹脂を粉碎することによって調製され得る。陰イオン交換樹脂は、弱塩基性又は強塩基性であり得る。同様に、陽イオン交換樹脂は、負に荷電した微粒子を調製するために使用され得る。陽イオン交換樹脂は、弱強酸性又は強酸性であり得る。本発明のいくつかの実施態様では、陽イオン交換樹脂及び／又は陰イオン交換樹脂は、キレート樹脂であり得る。

【0030】

50

本発明のイオン交換樹脂は、任意の適切な材料をベースとし得る。好ましくは、樹脂は、ポリスチレン系、ヒドロキシエチルメタクリラート（HEMA）系、ジメチルアミノエチルメタクリラート（DMAEMA）系、ジメチルアミノエチルメタクリラート（pDM

A E M A) 系、ポリアクリルアミド系又はメタクリル酸 (M A A) 系である。より好ましくは、樹脂は、ジビニルベンゼン (D V B) と架橋したポリスチレンである。

【 0 0 3 1 】

好ましくは、微粒子は、約 10 μm 未満、例えば約 5 μm 未満の平均粒子径を有する粉碎した粒子の形態である。

【 0 0 3 2 】

本発明の微粒子は、陰イオン交換樹脂又は陽イオン交換樹脂を粉碎することによって得られ得る。陰イオン交換樹脂は、例えば、Amberlite IRA-400、Amberlite IRA-485、Dowex 1X2-100、Dowex 1-8-100、DIAION SA 20A、Marathon A2 又は当技術分野で公知の他の陰イオン交換樹脂であり得る。陽イオン交換樹脂は、例えば、Amberlite IRC-748、Dowex 50 WX2-100、Dowex 50 WX8-100、DIAION SK 110、Marathon MSC 又は当技術分野で公知の他の陽イオン交換樹脂であり得る。好ましい陰イオン交換樹脂としては、Amberlite IRA-458 及び Marathon A2 が挙げられる。好ましい陽イオン交換樹脂としては、Amberlite IRC-748 が挙げられる。

10

【 0 0 3 3 】

別の局面では、本発明は、流体から、生体分子、好ましくはタンパク質又はポリヌクレオチド、例えば DNA、例えばプラスミド DNA、コスミド DNA、BAC DNA、YAC DNA、ミニサークル DNA を吸着するための、本明細書に開示される正に荷電した微粒子及び / 又は負に荷電した微粒子又は疎水性微粒子の使用を提供する。流体は、生体液、例えば細胞ホモジネート、発酵上清、発酵プロス、培養プロス、培養上清、細胞溶解物又は細胞懸濁液である。

20

【 0 0 3 4 】

更に、本発明は、細胞を破碎するための本明細書に開示される微粒子の使用を提供する。好ましくは、破碎した細胞は、微粒子に吸着する生体分子を放出する。破碎のための細胞としては、真核細胞及び原核細胞が挙げられる。一実施態様では、細胞は、原核細胞である。細胞は、限定されないが、Enterobacteriaceae、Pseudomonaceae、Lactobacteriaceae 又はBacillaceae を含む群から選択され得る。好ましい一実施態様では、細胞は、E. coli である。

30

【 0 0 3 5 】

更なる局面では、本発明は、生体分子を得るための方法であって、本明細書に記載される正に荷電した微粒子及び / 又は負に荷電した微粒子又は疎水性微粒子を生体液に添加すること、並びに該生体液から該生体分子を回収することを含む方法を提供する。いくつかの実施態様では、前記方法は、微粒子にフロックを形成させること、生体液から該フロックを除去すること、及び該フロックから生体分子を脱離することを更に含む。いくつかの場合では、回収すべき生体分子に応じて、微粒子を使用して、望ましくない細胞構造を有するフロックを形成し得、該フロックを除去した後に、生体分子を流体中に回収する。例えば、遠心分離又はろ過によって、生体液からフロックを除去し得る。一実施態様では、微粒子の添加中及び / 若しくは添加後に、並びに / 又はフロック若しくは生体液からの生体分子の脱離中に、生体液を攪拌する。

40

【 0 0 3 6 】

本発明は更に、細胞を破碎する方法であって、荷電した微粒子及び / 又は疎水性微粒子を細胞懸濁液に添加することを含む方法を提供する。前記荷電した微粒子は、正に荷電した及び / 又は負に荷電したものであり得る。いくつかの局面では、前記方法は、細胞から生体分子を放出させることを更に含む。加えて、本発明はまた、生体液及び正に荷電した微粒子及び / 又は負に荷電した微粒子又は疎水性微粒子を提供する。

【 0 0 3 7 】

本発明の正確な性質及びその利点は、以下の説明及び実施例から当業者に明らかである。本発明は、開示される好ましい実施態様又は実施例に限定されない。当業者であれば、

50

他の実施態様及び適用を生み出すために、本発明の教示を容易に適合し得る。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】Marathon MSC (MMS C)、Marathon A2 (MA2)、Amberlite IRC748 及びAmberlite IRA458に関する、官能基及びそれらのポリマーマトリックスへの結合部位の概略的な化学構造。

【図2】1時間インキュベーション (50 mM TRIS、pH 8.0) した時点における、GFP 発現E. coliからの GFP 回収に対する、Marathon A2 微粒子の体積細胞濃度及び樹脂：細胞の体積比の影響。

【図3】1時間インキュベーション (50 mM TRIS、pH 8.0) した時点における、GFP 発現E. coli (10% v/v) からの GFP 回収に対する、Marathon A2 微粒子の樹脂：細胞の体積比の影響。

【図4】Marathon A2 微粒子（樹脂：細胞の体積比 100%、70%、50%、30%、0%）及び pH 値 (7.5、8.0、8.5) で 0.2 ~ 3 時間静的インキュベーションした時点における、GFP 発現E. coli 含有細胞プロスからの GFP 回収に対する、pH、インキュベーション時間及び樹脂：細胞の体積比の影響。

【図5】Marathon A2 微粒子（樹脂：細胞の体積比 100%、70%、50%、30%、0%）及び異なる NaCl 濃度 (500 mM、100 mM、50 mM、0 mM) で 1 時間インキュベーション (50 mM TRIS、pH 8.0) し、1 M NaCl で溶出した後における、GFP 発現E. coli (10% v/v) からの GFP 回収に対する、塩濃度の影響。

【図6】異なる NaCl 濃度 (500 mM、100 mM、50 mM、0 mM) で 静的インキュベーション (50 mM TRIS、pH 8.0) し、1 M NaCl で溶出した後における、Marathon A2 微粒子（樹脂：細胞の体積比 100%、70%、50%、30%、0%）に対する吸着による、E. coli 細胞 (10% v/v) から抽出した GFP の平衡容量。1 M NaCl 中の溶出の前後に蛍光によって、水相からの GFP を定量した。GFP の量の差分が樹脂に吸着したとみなした。標準「ラングミュア」式を用いて、傾向をフィッティングした。

【図7】キレート Amberlite IRC 748 微粒子（樹脂：細胞の体積比 70%、30%）と共に攪拌 (1 ~ 2 時間、50 mM TRIS、pH 8.0) し、1 M NaCl 中で溶出しなかった後における、GFP 発現E. coli (5% v/v) からの GFP 回収に対する、インキュベーション条件の影響。

【図8】キレート Amberlite IRC 748 微粒子（樹脂：細胞の体積比 100%、70%、30%）と共に 2 時間静的インキュベーション (50 mM TRIS、pH 8.0) し、1 M NaCl 中で溶出し又は溶出しなかった後における、GFP 発現E. coli (5% v/v) からの GFP 回収に対する、樹脂：細胞の体積比及び溶出の影響。

【図9】キレート Amberlite 微粒子（樹脂：細胞の体積比 70%）と共に 2 時間攪拌インキュベーション (50 mM TRIS、pH 8.0) した後における、GFP 回収に対する、GFP 発現E. coli の体積細胞濃度 (20%、15%、10%、5% v/v) の影響。

【図10】キレート Amberlite 微粒子（樹脂：細胞の体積比 70%）と共に 2 時間攪拌インキュベーション (50 mM TRIS、pH 8.0) した後における、異なる体積細胞濃度 (20%、15%、10%、5% v/v) の GFP 発現E. coli の GFP 抽出動態。

【図11】アクリルIRA 458 微粒子比（樹脂：細胞の比 100%、70%、50% v/v）と共に 1 ~ 3 時間静的インキュベーション (50 mM TRIS、pH 8.0) し、異なる NaCl 濃度 (1.0 M、0.5 M、0 M) で溶出した後における、SOD 発現E. coli (10% v/v) からの SOD 回収に対する、樹脂：細胞の体積比の影響。SDS-PAGE デンシトメトリーによって、SOD 量を決定した。

【図12】短時間混合し、アクリル Amberlite IRA 458 微粒子（樹脂：細胞の比 100%、70%、50% v/v）と共にインキュベーション (50 mM TRIS、

10

20

30

40

50

pH 7.7) し、異なる NaCl 濃度 (1.0M, 0.5M, 0M) で溶出した後における、10%v/v 細胞懸濁液から得られた E. coli ホモジネートからの SOD 回収。 SDS-PAGE デンシトメトリーによって、SOD 量を決定した。

【図 13】 SDS-PAGE 及びクーマシー染色によって決定した、E. coli ホモジネート及びホモジネート上清と比較した、異なる NaCl 濃度 (200~1000mM) で溶出した後における、Marathon A2 微粒子（樹脂：細胞の体積比 50%）と共に GFP 発現 E. coli を 3 時間インキュベーション (50mM TRIS, pH 8.0) することによる、非ターゲットタンパク質の抽出。

【図 14】図 13 からの SDS-PAGE のデンシトメトリー分析。

【図 15】 Marathon A2 微粒子（樹脂：細胞の体積比 50%）と共に 3 時間静的インキュベーション (50mM TRIS, pH 8.0) し、300mM NaCl で溶出することによる、E. coli から得られた溶出物と比較した、GFP 発現 E. coli ホモジネート上清のタンパク質プロファイル。

【図 16】 Amberlite IRA 458 及び Marathon A2 (樹脂：細胞の体積比 50%、70%、100%v/v) 微粒子と共に静的インキュベーション (50mM TRIS, pH 8.0) し、続いて NaCl で溶出した後における、E. coli ホモジネート及び細胞懸濁液 (10%v/v) からのタンパク質 (SOD) の抽出の間の dsDNA の減少動態。Invitrogen の「Pico Green QuantIt」アッセイを用いて、DNA 量を推定した。

【図 17】 静的インキュベーション (50mM TRIS, pH 8.0) し、続いて NaCl で溶出した後における、Marathon A2 微粒子を用いた E. coli ホモジネート及び細胞懸濁液 (10%v/v) からのタンパク質 (SOD) の抽出の間のエンドトキシン減少の動態。Lonza から購入した PyroGene (商標) Recombinant Factor C Assay により、エンドトキシン量を推定した。

【図 18】 粉碎した樹脂の原子間力顕微鏡検査 (AFM)。Marathon A2 (画像 1)、Marathon MSC (画像 2) 及び Amberlite IRC748 (画像 3) の高さ測定。

【図 19】 E. coli 細胞の原子間力顕微鏡検査 (AFM)。粉碎した Marathon A2 と共に 1 時間インキュベーションする前 (左側) 及び後の細胞の高さ測定。

【図 20】 微粒子なし (写真 1)、pH 8.0、50mM TRIS 中で、粉碎した Marathon A2 と共に (写真 2) 及び粉碎した Amberlite IRC748 と共に (写真 3) 1 時間インキュベーションした後の E. coli HMS174 (GFPmut3.1) のオーバーレイ画像。

【図 21】 Marathon A2 微粒子（樹脂：細胞の体積比 70%）と共に 2 時間静的インキュベーション (50mM TRIS, pH 8.0) し、生理緩衝液中に 1:10 希釈した後における、E. coli 細胞 (10%v/v) の生存率。Invitrogen の「BacLight」蛍光染色キットを用いて、生 (緑色) / 死 (赤色) 細胞染色を実施した。

【図 22】 SDS ゲルは、細胞ホモジネート由来の GFP を捕捉するために微粒子を使用した溶出プロファイルを示す。

【図 23】 SDS ゲルは、細胞ホモジネート由来の IFN- γ を回収するために微粒子を使用した溶出プロファイルを示す。

【図 24】 化学的破碎方法 (4) を使用した最大 GFP と比較した、捕捉上清 (1) 及び洗浄緩衝液 (2) 中の GFP 量、実施例 13.2 の溶出 GFP (3) を示す棒グラフ。

【発明を実施するための形態】

【0039】

【発明の項目】

本発明はまた、以下の項目によって特徴付けられ得る：

【0040】

1. 生体分子を回収するための正に荷電した微粒子及び / 又は負に荷電した微粒子の使用であって、該正に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陰イオン交換樹脂を含み、該負に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陽イオン交換樹脂を含み、該生体分子が、好ましくは

10

20

30

40

50

ポリペプチド又はポリヌクレオチドである、使用。

【0041】

2. 細胞を破碎するための正に荷電した微粒子及び／又は負に荷電した微粒子の使用であって、該正に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陰イオン交換樹脂を含み、該負に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陽イオン交換樹脂を含む、使用。

【0042】

3. 生体分子を回収するための疎水性微粒子の使用。

【0043】

4. 陽イオン交換樹脂が弱酸性又は強酸性である、項目1又は2に記載の使用。

【0044】

5. 陰イオン交換樹脂が弱塩基性又は強塩基性である、項目1又は2に記載の使用。

10

【0045】

6. 陽イオン交換樹脂及び／又は陰イオン交換樹脂がキレート樹脂である、項目1又は2に記載の使用。

【0046】

7. 陰イオン交換樹脂及び陽イオン交換樹脂が、ポリスチレン系、ヒドロキシエチルメタクリラート(HEMA)系、ジメチルアミノエチルメタクリラート(DMAEMA)系、ジメチルアミノエチルメタクリラート(pDMAEMA)、ポリアクリルアミド系、メタクリル酸(MAA)系である、先行する項目のいずれか一項に記載の使用。

【0047】

8. 陽イオン交換樹脂及び陰イオン交換樹脂が、ジビニルベンゼンと架橋したポリスチレンである、先行する項目のいずれか一項に記載の使用。

20

【0048】

9. 微粒子が約5μm未満の平均粒子径を有する、先行する項目のいずれか一項に記載の使用。

【0049】

10. 正に荷電した微粒子又は負に荷電した微粒子が、ポリマー陰イオン交換及び／又は陽イオン交換樹脂を粉碎することによって得られ得る、先行する項目のいずれか一項に記載の使用。

30

【0050】

11. 陰イオン交換樹脂が、Amberlite IRA-400、Amberlite IRA-485、Dowex 1X2-100、Dowex 1-8-100、Marathon A2又はDIAION SA 20Aである、先行する項目のいずれか一項に記載の使用。

【0051】

12. 陽イオン交換樹脂が、Amberlite IRC-748、Dowex 50 WX2-100、Dowex 50 WX8-100、Marathon MSC又はDIAION SK 110である、先行する項目のいずれか一項に記載の使用。

【0052】

13. 樹脂が非多孔性である、先行する項目のいずれか一項に記載の使用。

40

【0053】

14. 細胞が真核細胞又は原核細胞である、先行する項目のいずれか一項に記載の使用。

.

【0054】

15. 細胞がEnterobacteriaceae、Pseudomonaceae、Lactobacteriaceae又はBacillaceaeから選択される、項目1～14のいずれか一項に記載の使用。

【0055】

16. 細胞がE. coliである、項目14又は15に記載の使用。

【0056】

17. 生体分子がタンパク質又はポリヌクレオチドである、先行する項目のいずれか一

50

項に記載の使用。

【0057】

18. 生体液から生体分子を得る方法であって、a) 項目1~13のいずれか一項に定義される正に荷電した微粒子及び／若しくは負に荷電した微粒子又は疎水性微粒子を生体液に添加すること、並びに該生体液から該生体分子を回収することを含む、方法。

【0058】

19. b) 微粒子にフロックを形成させること、c) 生体液から該フロックを除去すること、及びd) 生体分子を脱離することを更に含む、項目18に記載の方法。

【0059】

20. 生体液が、細胞懸濁液、発酵プロス、培養プロス、細胞ホモジネート又は発酵上清である、項目19に記載の方法。 10

【0060】

21. 工程a)及び／又はd)の後に、生体液を攪拌することを更に含む、項目18~20のいずれかに記載の方法。

【0061】

22. 遠心分離又はろ過などの分離技術によって工程c)を行う、項目18~21のいずれかに記載の方法。

【0062】

23. 陽イオン交換樹脂が弱酸性又は強酸性である、項目18~22のいずれかに記載の方法。 20

【0063】

24. 陰イオン交換樹脂が弱塩基性又は強塩基性である、項目18~22のいずれかに記載の方法。

【0064】

25. 陽イオン交換樹脂及び／又は陰イオン交換樹脂がキレート樹脂である、項目18~22のいずれかに記載の方法。

【0065】

26. 陰イオン交換樹脂及び陽イオン交換樹脂が、ポリスチレン系、ヒドロキシエチルメタクリラート(HEMA)系、ジメチルアミノエチルメタクリラート(DMAEMA)系、ジメチルアミノエチルメタクリラート(pDMAEMA)、ポリアクリルアミド系、メタクリル酸(MAA)系である、項目18~25のいずれかに記載の方法。 30

【0066】

27. 陽イオン交換樹脂及び陰イオン交換樹脂が、ジビニルベンゼンと架橋したポリスチレンである、項目18~26のいずれかに記載の方法。

【0067】

28. 微粒子が約5μm未満の平均粒子径を有する、項目18~28のいずれかに記載の方法。

【0068】

29. 正に荷電した微粒子又は負に荷電した微粒子が、ポリマー陰イオン交換及び／又は陽イオン交換樹脂を粉碎することによって得られ得る、項目18~28のいずれかに記載の方法。 40

【0069】

30. 陰イオン交換樹脂が、Amberlite IRA-400、Amberlite IRA-485、Dowex 1X2-100、Dowex 1-8-100、Marathon A2又はDIAION SA 20Aである、項目18~29のいずれかに記載の方法。

【0070】

31. 陽イオン交換樹脂が、Amberlite IRC-748、Dowex 50WX2-100、Dowex 50WX8-100、Marathon MSC又はDIAION SK 110である、項目18~30のいずれかに記載の方法。 50

【 0 0 7 1 】

3 2 . 樹脂が非多孔性である、項目 1 8 ~ 3 1 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 7 2 】

3 3 . 細胞が真核細胞又は原核細胞である、項目 1 8 ~ 3 2 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 7 3 】

3 4 . 細胞がEnterobacteriaceae、Pseudomonaceae、Lactobacteriacea又はBacillacea
eから選択される、項目 1 8 ~ 3 3 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 7 4 】

3 5 . 細胞がE. coliである、項目 3 4 に記載の方法。

【 0 0 7 5 】

3 6 . 生体分子がタンパク質又はポリヌクレオチドである、項目 1 8 ~ 3 5 のいずれか
に記載の方法。

10

【 0 0 7 6 】

3 7 . 細胞を破碎する方法であって、正に荷電した微粒子及び / 若しくは負に荷電した
微粒子又は疎水性微粒子を細胞懸濁液に添加することを含む、方法。

【 0 0 7 7 】

3 8 . 細胞から生体分子を放出させることを更に含む、項目 3 7 に記載の方法。

【 0 0 7 8 】

3 9 . 生体分子がポリペプチド又はポリヌクレオチドである、項目 3 7 又は 3 8 に記載
の方法。

20

【 0 0 7 9 】

4 0 . 正に荷電した微粒子及び / 若しくは負に荷電した微粒子又は疎水性微粒子を含む
生体液であって、該正に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陰イオン交換樹脂を含み、該
負に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陽イオン交換樹脂を含む、生体液。

【 0 0 8 0 】

4 1 . フロックを更に含む、項目 4 0 に記載の液。

【 0 0 8 1 】

4 2 . 生体分子を回収するための正に荷電した微粒子の使用であって、該正に荷電した
微粒子が粉碎したポリマー陰イオン交換樹脂を含み、該生体分子が酸性又は塩基性である
、使用。

30

【 0 0 8 2 】

4 3 . 細胞溶解物又は細胞ホモジネートから生体分子を回収するための、項目 4 2 に記
載の使用。

【 0 0 8 3 】

4 4 . 細胞懸濁液から生体分子を回収するための、項目 4 2 に記載の使用。

【 0 0 8 4 】

4 5 . 生体分子を回収するための負に荷電した微粒子の使用であって、該負に荷電した
微粒子が粉碎したポリマー陽イオン交換樹脂を含み、該生体分子が酸性又は塩基性である
、使用。

【 0 0 8 5 】

4 6 . 細胞溶解物又は細胞ホモジネートから生体分子を回収するための、項目 4 5 に記
載の使用。

40

【 0 0 8 6 】

4 7 . 細胞懸濁液から生体分子を回収するための、項目 4 5 に記載の使用。

【 0 0 8 7 】

4 8 . 生体分子を回収するための正に荷電した微粒子及び負に荷電した微粒子の使用で
あって、該正に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陰イオン交換樹脂を含み、負に荷電し
た微粒子が粉碎したポリマー陽イオン交換樹脂を含み、該生体分子が酸性又は塩基性である
、使用。

【 0 0 8 8 】

50

49. 細胞溶解物又は細胞ホモジネートから生体分子を回収するための、項目48に記載の使用。

【0089】

50. 細胞懸濁液から生体分子を回収するための、項目48に記載の使用。

【0090】

51. 細胞を破碎して該細胞から生体分子を放出させるための正に荷電した微粒子の使用であって、該正に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陰イオン交換樹脂を含み、該生体分子が酸性又は塩基性である、使用。

【0091】

52. 細胞を破碎するための負に荷電した微粒子の使用であって、負に荷電した微粒子が粉碎したポリマー陽イオン交換樹脂を含み、該生体分子が酸性又は塩基性である、使用。
10

【0092】

53. 生体液から生体分子を得る方法であって、a) 正に荷電した微粒子及び／又は負に荷電した微粒子を生体液に添加すること、並びに該生体液から該生体分子を回収することを含み、該生体分子が酸性又は塩基性である、方法。

【0093】

54. 生体液が、細胞懸濁液、細胞溶解物又は細胞ホモジネートである、項目53に記載の方法。

【0094】

55. 細胞から生体分子を得る方法であって、a) 正に荷電した微粒子及び／又は負に荷電した微粒子を添加して細胞を破碎し、それにより、該細胞から該生体分子を放出させること、並びにb) 該放出された生体分子を回収することを含む、方法。
20

【0095】

56. 生体分子が酸性又は塩基性である、項目55に記載の方法。

【0096】

57. 正に荷電した微粒子を添加する、項目55に記載の方法。

【0097】

58. 負に荷電した微粒子を添加する、項目55に記載の方法。

【0098】

〔発明の詳細な説明〕

本発明は、生体分子を回収するための、及び／又は細胞を破碎するための方法であって、本明細書に記載される荷電した微粒子又は疎水性微粒子を使用する簡便かつ高速な方法を提供する。それは、微粒子、特に荷電した微粒子が細胞を破碎し得、更に、細胞から生体分子を放出させ及び吸着し得ることにより、生体分子の高速かつ効率的な回収を可能にするという驚くべき知見に部分的に基づくものである。更に、微粒子が細胞と相互作用し得／細胞に吸着し得、及び／又は生体分子を吸着し得るように生体液に添加した場合に、荷電した微粒子は、大直径（例えば、少なくとも5μm）のフロックを即座に形成することが見出されたが、これは、微粒子並びに／又は微粒子及び生体分子によって構築されたフロックに吸着した生体分子の容易な分離を可能にする。同じことが、疎水性微粒子の場合にも当てはまる。
30

【0099】

当業者であれば認識するように、本発明は、本明細書に記載されるように、パイロット又は工業規模を含む大規模適用において、生体液（例えば、細胞懸濁液）からタンパク質又はプラスミドを分離するために特に有用である。荷電した微粒子及び／又は疎水性微粒子は、有利には、バッチプロセス（本明細書では「バッチ吸着」と称される）で使用され得る。

【0100】

更に、本明細書に記載される新規な方法は、高い回収効率及び低い夾雑物レベルを提供する。特に、生体分子が温度感受性又は剪断感受性であり、従来の生体分子抽出方法を適

10

20

30

40

50

用すると変性する傾向がある場合、本発明は、有利には、生体分子を回収するために適用され得る。

【0101】

細胞及び生体分子

上記のように、本発明は、生体液などの流体から生体分子を回収するための方法を提供する。いくつかの実施態様では、本発明の方法は、生体液中の細胞を破碎すること、及び該細胞から生体分子を放出させることを含む。生体分子は、好ましくは、細胞内生体分子、例えばタンパク質又はプラスミドである。続いて、放出された生体分子を生体液から回収し得る。

【0102】

本明細書で定義される「細胞内」という用語は、細胞内に見られる任意の物質を指す。本明細書で定義される「生体分子」は、通常、細胞内に見られるか、又は細胞によって合成される任意の分子（ポリペプチド又はポリヌクレオチドを含む）を含む。生体分子は、酸性又は塩基性の生体分子であり得る。生体分子の例としては、限定されないが、オリゴ糖、多糖、リポ多糖、オリゴペプチド、タンパク質、ヌクレオシド、フラボノイド、オリゴヌクレオチド、DNA（ds又はssDNA）、プラスミドDNA、RNA（ds又はssRNA）、有機金属化合物、アミノ酸、脂質、ピリミジン、プリン、炭水化物、ペプチド模倣化合物、毒素、ステロイド及び酵素が挙げられる。

【0103】

本明細書で使用される場合の「細胞」は、生体分子を産生（発現）することができる細胞、好ましくは「宿主細胞」を指す。このような細胞を本発明の方法に適用し得る。生体分子を生産するために、外来ヌクレオチド配列を細胞に導入し得る。

【0104】

本発明の方法に使用され得る細胞又は宿主細胞は、原核細胞、真核細胞又はその両方のいずれかであり得る。より好ましくは、本発明の方法に使用される細胞は、哺乳類細胞、鳥類細胞、両生類細胞及び魚類細胞を含む脊椎動物細胞並びに昆虫細胞である。また、細胞又は宿主細胞には、真核細胞が含まれる。典型的には、真核細胞は、哺乳類細胞、鳥類細胞又は昆虫細胞である。細胞又は宿主細胞はまた、酵母細胞又は真菌細胞を含む。しかしながら、宿主細胞は、グラム陰性菌由来の細菌細胞、例えばEnterobacteriaceae（例えば、E. coli）若しくはPseudomonadaceae（例えば、P. putida）由来の細胞、又はグラム陽性菌由来の細菌細胞、例えばLactobacteriaceae若しくはBacillaceae由来の細胞を含む原核細胞であることが好ましい。しかしながら、最も好ましくは、宿主細胞は、E. coliである。

【0105】

微粒子

本明細書で定義される「荷電した微粒子」は、正に荷電した微粒子及び／又は負に荷電した微粒子である。「正に荷電した」微粒子は、中性pHで、少なくとも1の（より典型的には、1より多い）陽子の電気素量を有する。「負に荷電した」微粒子は、中性pHで、少なくとも1の（より典型的には、1より多い）電子の電気素量を有する。

【0106】

微粒子は、粉碎した樹脂を含み得る。本発明に有用な樹脂は、様々な要素と相互作用してそれに付着することができる固体不溶性ポリマー材料であって、混合物から該要素を捕捉することを可能にする固体不溶性ポリマー材料である。樹脂は、限定されないが、セファデックス、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリメタクリラート又は中性多糖を含む不活性化合物から一般に構成される。それらとしては、セルロース、デキストラン又はアガロースのような架橋した天然ポリマーも挙げられ得る。

【0107】

好ましい実施態様による微粒子は、イオン交換樹脂、より好ましくはポリマー陰イオン交換樹脂及び／又は陽イオン交換樹脂から調製される。イオン交換樹脂は、交換可能なイオンを有する固定された官能基又は部位を保有する電荷ポリマーの不溶性担体を含有する

10

20

30

40

50

固体支持体を指す。微粒子を調製するために適切なイオン交換樹脂の具体例としては、陰イオン交換樹脂、陽イオン交換樹脂及び混合モードクロマトグラフィー樹脂（本明細書では、混合モードイオン交換樹脂とも称されることがある）が挙げられる。交換可能なイオン形態は、一般に、イオン交換樹脂の種類に応じて、 Na^+ 、 H^+ 、 OH^- 又は Cl^- イオンの1つ以上である。イオン交換樹脂としては、弱酸性及び強酸性の陽イオン交換樹脂、並びに弱塩基性及び強塩基性の陰イオン交換樹脂が挙げられる。適切なイオン交換樹脂としては更に、キレート樹脂が挙げられる。

【0108】

イオン交換樹脂は、様々な産業分野で広く使用されている。イオン交換樹脂は、一般的に、例えば、水処理の分野では水の脱塩のために、ボイラーフィルターのために、若しくは発電所における復水処理のために、食品の分野では糖溶液の精製のために、又は超純水の分野では半導体の調製のために使用されている。

10

【0109】

本発明の好ましい実施態様では、微粒子は、多孔性球状イオン交換樹脂から調製される。球状イオン交換樹脂は、単官能付加重合性モノマー及びラジカル重合開始剤を含むモノマー混合物を水性媒体に添加し、次いで攪拌して、モノマー混合物の懸濁液を調製する懸濁重合によって作製される。次いで、懸濁液を重合温度で一定時間維持して、球状架橋コポリマーを得る。水処理のためのイオン交換樹脂の直径は、典型的には、300～600 μm である。他の実施態様では、微粒子は、ゲル型及び/又はマクロ多孔性イオン交換樹脂から調製され得る。

20

【0110】

イオン交換樹脂のポリマーマトリックスとしては、ポリスチレン、ポリスチレンとスチレンとのコポリマー、ポリアクリラート、芳香族置換ビニルコポリマー、ポリメタクリラート、フェノール・ホルムアルデヒド、ポリアルキルアミン、それらの組み合わせなどが挙げられ得る。好ましい実施態様では、ポリマーマトリックスは、ポリスチレンとスチレンとのコポリマー、ポリアクリラート又はポリメタクリラートであり、別の実施態様では、ポリマーマトリックスは、スチレン-ジビニルベンゼン（DVB）コポリマーである。好ましくは、微粒子を調製するためのイオン交換樹脂は、ポリスチレン系、ヒドロキシエチルメタクリラート（HEMA）系、ジメチルアミノエチルメタクリラート（DMAEM）系、ジメチルアミノエチルメタクリラート（pDMAEMA）、メタクリル酸（MAA）系である樹脂を使用する。最も好ましくは、樹脂は、ジビニルベンゼン（DVB）と架橋したポリスチレンから作製される。

30

【0111】

本明細書で使用される陽イオン交換樹脂は、弱酸性又は強酸性であり得る。本明細書で使用される「弱酸性陽イオン交換樹脂」という用語は、従来の方法（例えば、Fisher et al., 「Effect of Cross-linking on the Properties of Carboxylic Polymers. I. Apparent Dissociation Constants of Acrylic and Methacrylic Acid Polymers」 J. Phys. Chem., 60(8), 1030 (1956)）によって測定した場合に、約4.5超の見掛けの解離定数又はイオン化定数（ pK_a ）を有する樹脂を指す。それは、交換基として、カルボン酸基、フェノール性水酸基、ホスホン酸基及びアルセノ基（arsono group）を有し得る。一方、「強酸性陽イオン交換樹脂」という用語は、約1.5未満の pK_a を有する樹脂を指す。強酸性陽イオン交換樹脂は、スルホン酸基、例えばポリスチレンスルホン酸ナトリウム又はポリAMPSを有し得る。スルホン酸基（- HSO_3^- ）は交換基であり、アルカリ性溶液中では、及び酸性溶液中であっても、強酸のように振る舞って、（- SO_3^- ）⁻及び H^+ に解離する。

40

【0112】

本明細書で使用される陰イオン交換樹脂は、弱塩基性又は強塩基性であり得る。本明細書で使用される「弱塩基性陽イオン交換樹脂」という用語は、従来の方法（例えば、Fisher et al., 「Effect of Cross-linking on the Properties of Carboxylic Polymers. I. Apparent Dissociation Constants of Acrylic and Methacrylic Acid Polymers」 J.

50

Phys. Chem., 60(8), 1030 (1956)) によって測定した場合に、約 8 . 5 超の見掛けの解離定数又はイオン化定数 (p K a) を有する樹脂を指す。それは、交換基として第 1 級アミノ基、第 2 級アミノ基及び / 又は第 3 級アミノ基、例えばポリエチレンアミンを有し得る。一方、「強塩基性陰イオン交換樹脂」という用語は、約 12 未満の p K a を有する樹脂を指す。強塩基性陰イオン交換樹脂は、交換基として第 4 級アミノ基、例えばトリメチルアンモニウム基、例えばポリ A P T A C 又はジメチルエタノールアミンを有し得る。

【 0 1 1 3 】

本明細書で使用される陰イオン交換樹脂及び陽イオン交換樹脂は、金属イオンとキレート（錯体）を形成することができる官能基を含むキレート樹脂を更に含む。キレート樹脂は、典型的には、特定の金属イオンに対する高い選択性を特徴とする。いくつかのキレート樹脂は、それらの官能基及び pH に応じて、塩基性及び / 又は酸性であり得る。キレート樹脂の典型的な官能基としては、限定されないが、イミノ二酢酸、ポリアミン、メチルグルカミド、チオウロニウム及びアミノホスホン酸が挙げられる。Amberlite I R C 748 は、イミノ二酢酸の官能基を有する例示的なキレート陽イオン交換樹脂であり、例えば細胞懸濁液から、生体分子を回収するための微粒子を調製するために使用され得る。

【 0 1 1 4 】

市販のイオン交換樹脂は、例えば、Rohm & Haas of Philadelphia, Pennsylvania USA によって Amberlite、Amberjet、Duolite 及び I mac 樹脂として提供されており、Bayer of Leverkusen, Germany から Lewatit 樹脂として提供されており、Dow Chemical of Midland, Michigan USA から Dow 樹脂として提供されており、Mitsubishi Chemical of Tokyo, Japan から Diaion 及び Relite 樹脂として提供されており、Purolite of Bala Cynwyd, Pennsylvania USA から Purolite 樹脂として提供されており、Sybron of Birmingham, N.J. USA から Ionac 樹脂として提供されており、Resintech of West Berlin, N.J. USA から提供されている。

【 0 1 1 5 】

正に荷電した微粒子は、ポリマー陰イオン交換樹脂から調製され得る。市販の陰イオン交換樹脂は、典型的には、OH⁻型又は Cl⁻型のいずれかである。一実施態様では、陰イオン交換樹脂は、OH⁻型である。樹脂は、例えば、「Diaion」陰イオン交換樹脂、例えば Diaion SA 樹脂 (DIAION SA 20A を含む) 及び Diaion SK 樹脂 (DIAION SK 110 を含む) (Mitsubishi Chemical) 、「Amberlite」樹脂、例えば Amberlite IRA-400、Amberlite IRA-458、Amberlite IRA-734 及び Amberlite IRA-900 (Rohm & Haas Co.) 又は「Dowex」樹脂、例えば Dowex 1、Dowex 2、Dowex 11、Dowex 21K、Dowex 1x2、Dowex 1x4、Dowex 1x8 及び Dowex、Marathon 樹脂、例えば Marathon A2 (Dow Chemical Co) であり得る。好ましい実施態様では、陰イオン交換樹脂は、Amberlite IRA-458 又は Marathon A2 である。陰イオン交換樹脂中の官能基としては、第 4 級アンモニウム基、例えばベンジルトリメチルアンモニウム基 (1 型樹脂) 、ベンジルジメチルエタノールアンモニウム基 (2 型樹脂) 、トリアルキルベンジルアンモニウム基 (1 型樹脂) 、ジメチルエタノールアミン (2 型樹脂) 又は第 3 アミン官能基が挙げられ得る。細胞破碎の場合、Marathon MA2 及び Amberlite IRA-458 は、正に荷電した微粒子を調製するため特に好ましい陰イオン交換樹脂である。

【 0 1 1 6 】

負に荷電した微粒子は、ポリマー陽イオン交換樹脂から調製され得る。本明細書で使用されるポリマー材料は、ポリマー、ポリマーの混合物、架橋ポリマー、それらの混合物又はポリマーネットワークを指し得る。しばしば、ポリマー材料は、ポリマーと単に称される。市販の陽イオン交換樹脂は、典型的には、H⁺型又は Na⁺型のいずれかである。一実施態様では、陽イオン交換樹脂は、H⁺型である。樹脂は、例えば、「Diaion」

10

20

30

40

50

陽イオン交換樹脂、例えばDiaion PK樹脂及びDiaion SK樹脂(Mitsubishi Chemical)、「Amberlite」樹脂、例えばAmberlite I.R.C.-748(Rohm & Haas Co.)又は「Dowex」樹脂、例えばDowex 50WX2、Dowex 50WX8及びDowex、Marathon樹脂、例えばMarathon C、Marathon MSC(Dow Chemical Co)であり得る。陽イオン交換樹脂の官能基としては、スルホン酸基(-SO₃H)、ホスホン酸基(-PO₃H)、ホスフィン酸基(-PO₂H)、カルボン酸基(-COOH又は-C(CH₃)₂COOH)、それらの組み合わせが挙げられ得る。一実施態様では、陽イオン交換樹脂中の官能基は、-SO₃H、-PO₃H又は-COOHであり、最も好ましい実施態様では、陽イオン交換樹脂中の官能基は、-SO₃Hである。細胞破碎の場合、キレート官能基を有する陽イオン交換樹脂、例えばAmberlite I.R.C.748は、負に荷電した微粒子を調製するために特に好ましい。

10

【0117】

本明細書で使用されるポリマー陽イオン交換樹脂は、1以上の陽子の電気素量を有するポリマー材料又はこのような高分子それ自体を指す。ポリマー陰イオン交換樹脂は、1以上の電子の電気素量を有する。

20

【0118】

本発明の正に荷電した微粒子は、中性pHで、少なくとも1の(より典型的には、1より多い)陽子の電気素量を有する粒子であるのに対して、負に荷電した微粒子は、中性pHで、少なくとも1の電子の基本電荷を有する。

【0119】

微粒子の構成成分の少なくとも一部がイオン的に帯電している場合、正に荷電した微粒子又は負に荷電した微粒子が得られる。

【0120】

本発明はまた、生体分子を捕捉するための新規な吸着材料として、固体で疎水性である微粒子を提供する。微粒子は粉碎された形態であり、疎水性吸着材料、例えばAmberlite XAD4、Amberlite XAD7HP、Amberlite XAD761を粉碎することによって調製され得る。

30

【0121】

一実施態様では、正に荷電した微粒子のみを生体液に添加する。別の実施態様では、負に荷電した微粒子のみを生体液に添加する。更に別の実施態様では、正に荷電した微粒子及び負に荷電した微粒子の両方を生体液に添加する。正に荷電した微粒子及び負に荷電した微粒子の両方を生体液に添加する場合、正に荷電した微粒子と負に荷電した微粒子との比は、約0.1:99.9(w/w)~99.9:0.1(w/w)であり得る。例えば、それは約50:50であり得るが、それはまた異なるものでもよい(例えば、90:10、80:20、75:25、60:40、40:60、20:80、25:75、10:90など)。更に別の実施態様では、疎水性微粒子を生体液に添加する。

【0122】

好ましい一実施態様では、微粒子は、約10μm未満、例えば約9μm未満、8μm未満、7μm未満、6μm未満、5μm未満、4μm未満、3μm未満、2μm未満及び1μm未満の平均粒子径を有する粉碎した粒子の形態である。好ましくは、粉碎した粒子は、約5μm未満、より好ましくは2.5μm未満の平均粒子径を有する。好ましくは、粉碎した粒子は、0.5μm超の平均粒子径を有する。したがって、粉碎した粒子は、好ましくは、約10μm~0.5μm、約9μm~約0.5μm、約8μm~約0.5μm、約7μm~約0.5μm、約6μm~約0.5μm、約5μm~約0.5μm、約4μm~約0.5μm、約3μm~約0.5μm又は約2.5μm~約0.5μmの範囲内の平均粒子径を有し得る。しかしながら、粉碎した粒子は、10μm超及び0.5μm未満の粒子径を有し得る。

40

【0123】

微粒子の調製

微粒子は、陰イオン交換樹脂及び/又は陽イオン交換樹脂を粉碎することによって得ら

50

れ得るか、又は得られる。好ましくは、本発明の微粒子は、樹脂を粉碎し、樹脂をコンディショニングすることによって得られ得る（又は、によって得られる）。

【0124】

樹脂の製造プロセスでは、粉碎した粒子をコンディショニングして、残存副産物を除去することが好ましい。イオン交換樹脂の典型的なコンディショニング方法は当技術分野で周知であり、供給業者によって説明もされている。

【0125】

必要な場合、樹脂をH⁺又はOH⁻からNa⁺又はCl⁻型に転換するために、「コンディショニング」を実施し得る。一実施態様では、NaCl及び水を使用する反復洗浄工程によって、コンディショニングを実施する。前記プロセスでは、樹脂を水中で粉碎し得、遠心分離することによって沈殿を行い得る。あるいは、既にNa⁺又はCl⁻型の樹脂が市販されており、供給業者から入手され得る。

10

【0126】

好ましい実施態様では、(a)イオン交換樹脂を粉碎し、(b)前記粉碎した樹脂を水に再懸濁し、(c)前記粉碎した樹脂を沈殿させ、(d)沈殿した懸濁液の上清から粉碎した樹脂を収集し、(e)収集した粉碎した樹脂を約2M塩化ナトリウムに再懸濁し、(f)前記粉碎した樹脂を沈殿させ、(g)(f)の沈殿した懸濁液の上清から粉碎した樹脂を収集し、(h)前記粉碎した樹脂を沈殿させ、(i)(h)の粉碎した樹脂の沈殿物を収集し、(j)前記収集した粉碎した樹脂を洗浄することによって、微粒子を調製する。

20

【0127】

好ましくは、本発明の疎水性微粒子を一晩粉碎する。粉碎した樹脂を水に懸濁する。上清を遠心分離する。樹脂を塩溶液（例えば、2M塩化ナトリウム）に再懸濁し、遠心分離し、ペレットを廃棄する。上清を移し、再度遠心分離する。上清を廃棄する。粉碎した樹脂を水に再懸濁し、チューブに移す。樹脂を遠心分離し、上清を廃棄し、樹脂を水性洗浄溶液に再懸濁する。洗浄の順序は、以下のとおりである：

- 1 × 50% EtOH（有機残留物の希釈）
- 3 × 脱イオン水（EtOHの希釈）

【0128】

粉碎

30

限定されないが、粉碎デバイス、例えば粉碎ミル（ジェットミル、ポールミル、ハンマーミルなどを含む）による、又は例えば乳鉢及び乳棒を用いて手によることを含む、当技術分野で公知の任意の方法で粉碎を行い得る。本明細書で使用される「粉碎」は、粒子径の減少につながる操作を指す。当業者であれば、樹脂を調製するための粉碎方法を容易に選択し得る。例えば、一実施態様では、乳鉢内で1つ以上の乳棒を動かすことによって、樹脂を自動化された様式で湿式粉碎する。得られる粒子の大部分が約10μm未満、例えば9μm未満、8μm未満、7μm未満、6μm未満、5μm未満、4μm未満、3μm未満、2μm未満、1μm未満、0.5μm未満のサイズを有するまで、粉碎プロセスを継続し得る。大部分とは、50%超、例えば60%超、70%超、80%超、90%超又は95%超を意味する。他の実施態様では、粒子の大部分は、少なくとも0.1μm、例えば0.2μm、0.3μm、0.4μm、0.5μm、0.6μm、0.7μm、0.8μm、0.9μm、1.0μm、1.1μm、1.2μm、1.3μm、1.4μm、1.5μm、1.6μm、1.7μm、1.8μm、1.9μm、2.0μm、3μm、4μm又は5μmの平均粒子径を有する。

40

【0129】

当業者であれば、当技術分野で公知の方法を用いて、粉碎した粒子のサイズを容易に決定し得る。そのことから、当技術分野で公知の手段及び方法によって、平均粒子径を決定し得る。例えば、ソフトウェアベースのサイズ決定（例えば、実施例で説明されているもの）を使用して光学顕微鏡検査によって、サイズを決定し得る。円相当径の推定によって、粉碎した樹脂の粒子径を倍率1000倍で決定し得る。好ましくは、1%v/vにおける

50

約100～500個の粒子の直径サイズの比較によって、分布を計算する。粉碎は、表面積を劇的に増加させて、生体分子（特に、タンパク質又はポリペプチド）の結合能の有意な増加をもたらす効果を有する。好ましくは、技術的手段、例えば粒子を認識して直径を測定するソフトウェアを用いて、直径の決定を行う。

【0130】

本明細書で使用される場合、「再懸濁」又は「懸濁」又はその任意の文法形は、微粒子を懸濁液にすることを意味する。

【0131】

本明細書で使用される場合、「沈殿させる」は、微粒子を、それらが取り込まれている流体から沈殿させて、障壁に寄りかからせるようにすることを意味する。沈殿は、粒子に對して作用する力に応答した、流体を介した粒子の運動に起因する。これらの力は、重力又は遠心加速度（例えば、遠心分離による）であり得、後者が好ましい。

10

【0132】

「収集」は、懸濁液から微粒子を採取することを意味する。

【0133】

本明細書で使用される場合、「洗浄」は、微粒子の性能を阻害又はそれに干渉するであろう流体の残量を減少させることを意味する。例えば、50% (v/v) エタノール (EtOH) 及び二重脱イオン水 (ddH₂O) で樹脂を洗浄し、上記のようにプレコンディショニングし、続いて、ddH₂Oで繰り返し洗浄し得る。これらの流体それぞれの容量は、微粒子の容量よりも過剰であり、好ましくは10倍又は20倍過剰である。

20

【0134】

粉碎プロセスの後、例えば、遠心分離、沈殿、ろ過又は当業者に公知の任意の他の方法によって、好ましい範囲外の粒子を場合により除去し得る。

【0135】

驚くべきことに、粉碎した粒子の粗表面は、高い結合能を有する従来のクロマトグラフ媒体（例えば、Bio-Rad Laboratories (USA) が開発したNuvia媒体）のような同程度のタンパク質吸着容量を提供することが見出された。

30

【0136】

微粒子の添加

第1の工程では、微粒子を生体液に添加する。開示される本微粒子は、実験室規模、パイロット規模又は工業規模で使用され得る。本明細書で使用される「実験室規模」は、流体約1又は10mlから流体約1000mlまでの生体分子のバッチ吸着を含む。本明細書で使用される「パイロット規模」は、流体約1リットルから流体約10リットルまでの生体分子のバッチ吸着を含む。本明細書で使用される「工業規模」又は大規模は、流体約10リットルから流体約1000リットル又は更に10000リットル又はそれ以上までの生体分子のバッチ吸着を含む。

【0137】

本明細書に記載される方法は、生体液中に、正に荷電した微粒子を添加すること、又は負に荷電した微粒子を添加すること、又は正に荷電した微粒子及び負に荷電した微粒子の両方若しくは疎水性微粒子を添加することを含む。正に荷電した微粒子及び負に荷電した微粒子の両方を添加する場合、それらを調製混合物として、又は別個に、同時に若しくは逐次に、添加し得る。したがって、正に荷電した微粒子及び負に荷電した微粒子を逐次に（すなわち、順々に）添加する場合、本発明は、第1に、正に荷電した微粒子又は負に荷電した微粒子のいずれかを生体液に添加し、第2に、逆に電荷した微粒子を生体液に添加することを包含する。当業者であれば、例えば、生体液及び生体液から回収すべき所望の生体分子を考慮して、正に荷電した微粒子のみ、又は負に荷電した微粒子のみ、又は正に荷電した微粒子及び負に荷電した微粒子の両方を使用するかどうかを決定することができる。

40

【0138】

あるいは、本発明による吸着剤は、粉碎した粒子の形態の疎水性樹脂を含む。このよう

50

な疎水性微粒子の優れたタンパク質吸着容量は、低塩濃度において従来のクロマトグラフ媒体よりも優れており、例えば、ポリヌクレオチド又は親水性タンパク質の逆精製 (negative purification) に特に有用である。したがって、本発明は、疎水性微粒子を適用することによって、ポリヌクレオチド又は親水性タンパク質を逆精製するための使用及び方法を提供する。その目的の場合、ホモジネート又は標準タンパク質溶液に、50% (v/v) 疎水性微粒子懸濁液をホモジネート又はタンパク質溶液に添加する。微粒子懸濁液を、例えば30分間、インキュベーションする。その後、微粒子を遠心分離し、溶出緩衝液を添加し、混合し、例えば30分間、インキュベーションすることによって、結合したタンパク質の溶出を実施する。場合により、溶出緩衝液による第2の洗浄工程を含め得る。溶出後、先のように、微粒子を再度遠心分離する。例えば、光分析によって、上清中のタンパク質の濃度を定量し得、SDS-PAGEによって、ターゲットタンパク質の純度をチェックし得る。

10

【0139】

生体分子をそこから分離すべき生体液中に、微粒子を添加し得る。「生体液」という用語は、広く理解されるべきである。それらは、生物に関連する(例えば、任意の生物から得られるか、又は任意の生物によって産生される)任意の流体を指す。生体液の例としては、細胞培養培地、発酵上清、発酵プロス、細胞懸濁液、細胞溶解物が挙げられる。生体液の更なる例は、本明細書の上記に記載されている。他の実施態様では、生体液はまた、唾液、尿、リンパ液、前立腺液、精液、血液、血漿、血清、汗、粘液性分泌物、乳、乳清、腹水、器官抽出物、植物抽出物、動物抽出物であり得る。好ましい実施態様では、生体液は、本明細書に記載される任意の生体液、例えばポリペプチド又はポリヌクレオチド、例えばプラスミドDNA、コスマイドDNA、BAC DNA、ミニサークルDNAなどを含有する流体であって、様々なin vitro又はin vivoプロセスに由来する流体、特に、発酵プロス、培養プロス、発酵上清、培養上清、細胞ホモジネート、細胞溶解物又は細胞懸濁液物である。「細胞ホモジネート」は、一般に、破壊された細胞の混合物と理解される。細胞ホモジネートは、機械的方法又は化学的方法によって得られ得る。例えば、従来の方法(例えば、発酵ホモジネートにするためには、ホモジナイザー中の高圧)によって、又は溶解溶液(アルカリ溶解を含む)中で単に混合することによって、細胞をホモジナイズし得る。

20

【0140】

30

したがって、本発明はまた、生体分子と、正に荷電した微粒子及び負に荷電した微粒子とを含む流体を含む。好ましい実施態様では、本発明の方法の工程のいずれかの間及び/又は後に、生体液を攪拌するが、好ましくは、粒子にフロックを形成させる及び/又は生体液からフロックを除去する工程の間ではない。

【0141】

40

「細胞ホモジネート」は、一般に、破壊された細胞の混合物と理解される。細胞ホモジネートは、機械的方法又は化学的方法によって得られ得る。例えば、従来の方法(例えば、細胞ホモジネート/溶解物にするためには、ホモジナイザー中の高圧)によって、又は溶解溶液(アルカリ溶解を含む)中で細胞を単にボルテックスすることによって、細胞をホモジナイズし得る。

【0142】

生体液の例としては、細胞培養物、細胞ホモジネート並びに細胞溶解物及び発酵上清(例えばE. coli由来の及びCHO細胞培養物)が挙げられる。発酵上清又は細胞ホモジネートを更にろ過、濃縮、透析、コンディショニング又は別の方法で処理し得る。

【0143】

50

本発明の好ましい実施態様では、生体液は、細胞懸濁液である。本明細書で使用される「細胞懸濁液」という用語は、好ましくはインタクトな細胞を含む、液体、例えば細胞培養培地、緩衝液又は任意の他の適切な液体を指す。「インタクト」は、細胞の細胞内成分を囲む細胞膜の物理的連續性を指し、細胞の細胞内成分を放出させるであろう任意の様式で、従来の培養条件下における細胞膜の透過性を超える程度までは、細胞膜が破碎されて

いないことを意味する。

【0144】

微粒子を生体液中に添加する間及び／又は後、攪拌又は振盪（MPの添加後のみ）することによってそれらを混合して、均質な混合物を得ることができる。いくつかの実施態様では、混合は、細胞及び／又は生体分子と微粒子との間の接触を容易にすることによって、凝集及び／又は細胞破碎を増強し得る。粒子を生体液と混合する間に、吸着が自然に起こる。しかしながら、いくつかの実施態様では、微粒子の添加後に、混合は全く必要ない（実施例では、静的インキュベーションと称される）。

【0145】

インキュベーションパラメータ

微粒子を生体液に添加する場合、細胞の最適な体積濃度（各体積割合の比を指す「%（v/v）」によって示される）を調整し得る。いくつかの実施態様では、体積細胞濃度は、30%（v/v）未満、例えば約25%（v/v）未満、約20%（v/v）未満、約15%（v/v）未満、約10%（v/v）未満、約9%（v/v）未満、約8%（v/v）未満、約7%（v/v）未満、約6%（v/v）未満、約5%（v/v）未満、約4%（v/v）未満、約3%（v/v）未満、約2%（v/v）未満又は約1%（v/v）未満である。混合は、細胞及び微粒子の均質な混合物を得るために有用であり得る。

【0146】

本発明のいくつかの局面では、微粒子の濃度は、好ましくは、約300%（v/v）未満、例えば約200%未満、100%（v/v）、80%（v/v）、70%（v/v）、60%（v/v）、50%（v/v）、40%（v/v）、30%（v/v）、20%（v/v）、10%（v/v）又はそれ以下である。樹脂：細胞の体積比の選択は、例えば、微粒子サイズ分布（有効表面積）及び電荷密度（アクセス可能な面積当たりの官能基）に依存し得る。

【0147】

凝集

いくつかの実施態様では、微粒子を生体液に添加した後の次の工程は、フロックの形成を可能にすることである。驚くべきことに、微粒子は、微粒子に対する細胞及び／又は生体分子の吸着により、生体液中の細胞及び／又は生体分子と大直径のフロックを迅速に形成し得ることが見出された。

【0148】

微粒子を細胞懸濁液に添加する場合、微粒子に対する吸着によって、細胞をフロック中に固定化し得る。いくつかの実施態様では、細胞は生体分子を放出し、依然として生存可能である。放出された生体分子は、微粒子に吸着してもよいし、又は吸着しなくてもよい。

【0149】

微粒子を生体液、例えば細胞溶解物又は細胞ホモジネート又は発酵上清に添加する場合、微粒子に対する生体分子の吸着により、フロックが形成し得る。いくつかの実施態様では、最初に、正に荷電した微粒子及び負に荷電した微粒子を混合し、次いで、生体液に添加すると、微粒子混合物と生体液との接触により、凝集が起こる。他の実施態様では、最初に、正に荷電した微粒子又は負に荷電した微粒子を生体液に添加し、続いて、逆に電荷した微粒子を別個に添加すると、フロックが形成される。

【0150】

一実施態様では、生体分子は、酸性である。この場合、吸着のために、正に荷電した微粒子を生体液、例えば細胞溶解物又は細胞ホモジネートに添加する。また、細胞を破碎して生体分子を放出させるのみに十分な量、又は細胞を破碎し生体分子を吸着するより多い量のいずれかで、正に荷電した微粒子を細胞懸濁液に添加し得る。当業者であれば、細胞を部分的に又は完全に破碎するために必要な量を決定することができる。その後、負に荷電した微粒子（これは架橋剤として機能して、フロックの粒子径及び安定性を増加させる）を添加し得る。あるいは、更なる精製のために、細胞を破碎して生体分子を放出させるために十分な量で、負に荷電した微粒子（例えば、キレート陽イオン交換樹脂から調製さ

10

20

30

40

50

れたもの)も細胞懸濁液に添加し得る。場合により、その後、正に荷電した微粒子を添加して、凝集を増加させ得る。

【0151】

別の実施態様では、生体分子は、塩基性である。この場合、正に荷電した微粒子を生体液、例えば細胞溶解物又は細胞ホモジネートに添加して、細胞残屑又は他の不純物、例えばDNA、宿主細胞タンパク質及び細胞フラグメントを有するフロックを形成し得る。負に荷電した微粒子を添加して、フロックの粒子径及び安定性を増加させ得るので、フロックを容易に分離及び廃棄し得る。塩基性生体分子は正に荷電した微粒子に結合しないだろうから、次いで、上清から塩基性生体分子を回収し得る。あるいは、更なる精製のために、細胞を破碎して生体分子を放出させるために十分な量で、正に荷電した微粒子又は負に荷電した微粒子を細胞懸濁液に添加し得る。フロックは、典型的には、それらを視覚可能としそれらの分離を容易にする100μm又は更にそれ以上のサイズを有する。これは、他の望ましくない材料、例えば細胞及び/又は細胞残屑をろ過によって容易に除去し得、遠心分離を不要とすることを意味する。したがって、本発明は、従来技術の方法よりも高速かつ簡便である。カラムクロマトグラフィーを使用した場合、他の方法で必要とされるであろう樹脂の再生は必ずしも必要ではないが、樹脂の再生を行うことも可能である。更に、微粒子は安価な材料であるので、使用後に廃棄され得る。

10

【0152】

好ましい実施態様では、形成されるフロックは、少なくとも5μm、例えば少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000μm、2000μm又はそれ以上の平均粒子径を有する。

20

【0153】

吸着容量

本明細書で使用される「吸着容量」は、平衡状態において、樹脂1ml当たりに吸着した生体分子の量(mg単位)と定義される。本明細書で使用される平衡は、吸着速度が脱離速度に等しい状態である。所望の生体分子(特に、可溶性のポリペプチド又はポリヌクレオチド)に対する微粒子の吸着容量は、例えば、生体分子の溶出の前後に、例えば蛍光又は分光光度法によって、上清中の前記ポリペプチド又はポリヌクレオチドを定量することによって決定され得る。次いで、生体分子の量の差分が微粒子に吸着されたとみなす。当業者であれば理解するように、吸着容量は、様々なパラメータ、例えば微粒子の特性、生体分子、pH、温度、塩濃度及び他のパラメータ又はそれらの組み合わせに依存し得る。いくつかの実施態様では、正に荷電した微粒子は、実施例3.1.5に記載されている条件下において、樹脂1ml当たりGFP少なくとも5mg、例えば少なくとも6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100mgを吸着し得る。他の実施態様では、正に荷電した微粒子は、実施例4.1.3に記載されている条件下において、樹脂1ml当たりSOD少なくとも5mg、例えば少なくとも6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100mgを吸着し得る。

30

【0154】

フロックの除去

一般に、液体(例えば、生体液又は緩衝液)からのフロックの除去は、ろ過、遠心分離、沈殿又は任意の他の適切な手段によって実施され得る。当業者であれば、流体からフロックを分離又は脱離するために使用され得る方法を容易に決定することができる。例えば、パイロット及び工業規模の操作の場合、バケット遠心分離機(実験室規模)、管状遠心機、デカンター又はディスクスタック遠心分離機のいずれかで、フロックの懸濁液を処理し得る。同様に、フロックを保持するろ過によって、又は沈殿若しくは抽出によって、フロックを除去することが可能である。向流抽出デカンター、ミキサーセトラー又はカラム抽出器によって、脱離を達成し得る。他の有用な除去方法は、タンジェンシャルフローろ

40

50

過、深層ろ過、デッドエンドろ過であり得るか、又はフィルタープレス、ヌッヂェフィルターの使用を含む方法であり得る。

【0155】

生体分子の脱離

当技術分野で公知の任意の方法を使用して、脱離を行い得る。例えば、タンパク質のような生体分子の脱離を可能にする緩衝液（脱離緩衝液）にフロックを再懸濁することによって、脱離を行い得る。管状（静的）ミキサー又は他の混合デバイス、例えば攪拌タンクを含む当技術分野で公知の任意の手段を使用することによって、これを達成し得る。また、向流抽出デカンター、ミキサーセトラー又はカラム抽出器によって、脱離を達成し得る。

10

【0156】

次いで、懸濁液を脱離に適切な条件に供する。当業者であれば、フロックに吸着した生体分子を脱離するための条件を容易に決定し得る。一般に、従来のイオン交換クロマトグラフィーで使用される脱離方法を用い得る。例えば、等電点未満の若しくは等電点を超えるpHにおける溶出によって、又は高い塩濃度によって、脱離を行い得る。

【0157】

当技術分野で公知の方法によって、生体分子を更に精製又は濃縮し得る。これらとしては、例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、擬似アフィニティーコロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー若しくは陽イオン交換クロマトグラフィー及び／又はサイズ排除クロマトグラフィーからなる群より選択される沈殿、結晶化及び／又はクロマトグラフィーが挙げられる。したがって、好ましい実施態様では、本明細書に記載される方法は、沈殿及び／又はクロマトグラフィーを使用することによって、所望の生体分子（特に、タンパク質）を精製及び／又は濃縮する更なる工程を含む。

20

【0158】

しかしながら、いくつかの実施態様では、細胞は、微粒子に吸着せずに、前記微粒子との相互作用により、生体分子を放出し得ることが発見された。この場合、細胞は微粒子に吸着せず、凝集は起こらない。例えば、逆の表面正味電荷を有する細胞の細胞懸濁液に荷電した微粒子を添加する場合、細胞は微粒子に吸着せず、凝集は全く観察されない。細胞の「表面正味電荷」は、本明細書では、細胞表面に存在する全ての電荷の合計と定義され、周囲溶液のpHに依存し得る。

30

【0159】

放出された生体分子は、微粒子に吸着してもよいし、又は吸着しなくてもよい。生体分子が微粒子に吸着しない場合、生体分子の脱離は全く行われない。この場合、例えば遠心分離又はろ過又は任意の他の手段によって、流体から細胞及び微粒子を分離することによって、上清から生体分子を回収し得る。生体分子が微粒子に吸着する場合、微粒子の状態を変化させて、例えば脱離緩衝液による生体分子の溶出を可能にすることによって、脱離を行う。フロックのサイズにより、脱離緩衝液によって生体分子を脱離した後に、形成されたフロックを脱離緩衝液から分離することは容易である。

30

【0160】

当業者であれば、微粒子及び／又は細胞からの上清の分離を達成するためにどの方法を適用するかが容易に分かる。

40

【0161】

回収

本発明は、生体液及び／又は細胞から生体分子を回収するために使用され得る。生体分子の回収は、その全ての文法形において、生体分子を得、採取し、獲得し、受け取り、又は入手することを意味し得る。生体分子は、プラスミド、ポリヌクレオチド又は発現産物、例えばペプチド、タンパク質（グリコシリ化又は翻訳後(post-transnationally)修飾されたタンパク質を含む）であり得る。当技術分野で公知の及び／又は本明細書に記載される手段及び方法によって、生体分子を単離及び／又は更に処理（例えば、更に精製）し得

50

る。更に、回収は、細胞を破碎して細胞から生体分子を放出させ、細胞培養物からのその分離を可能にする実施態様も含む。後の工程として、生体分子の更なる精製及び／又は濃縮を行い得る。

【0162】

細胞破碎

本発明は更に、荷電した微粒子を細胞懸濁液に添加することによって、細胞を破碎するための方法を提供する。細胞から生体分子が放出される程度に細胞を透過性にするための方法又はプロセスに関して、「細胞破碎」又は「細胞の破碎」という用語は、本明細書では互換的に使用される。細胞破碎は、細胞死を伴うものでもよいし、又は細胞死を伴わないものでもよい。好ましくは、細胞破碎は、細胞構造、例えば細胞壁の完全なフラグメント化を伴わないので、細胞のフラグメント化が減少し、これは望ましくない夾雜物（細胞残屑を含む）のレベルを低下する。本発明のいくつかの実施態様では、本明細書に記載される方法によって破碎されている細胞は生体分子を放出し、依然として生存可能である。「生存可能な」という用語は、適切な成長条件下で増殖することができる細胞を指す。

10

【0163】

放出された生体分子は、細胞を破碎するために使用される微粒子に吸着してもよいし、又は吸着しなくてもよい。続いて、本明細書に記載される方法又は他の公知の技術を使用して、生体液から生体分子を回収し得る。したがって、本発明は、単純化された2段階プロセスで、細胞を破碎し、生体分子を放出させ、続いて生体分子を回収するための新規な方法を提供する。本発明の微粒子は、生体分子の酸性度にかかわらず（すなわち、生体分子は、酸性、塩基性又は中性であり得る）、細胞懸濁液中で生体分子を回収し得るように、細胞を開放して生体分子を放出させるために使用され得る。

20

【0164】

選択性

本発明の方法は、従来の細胞破碎方法によって得られる生体分子と比較して高い純度の生体分子を提供し得る。特に、本発明の方法は、回収される生体分子画分中の非ターゲット物質の量が少ないので、従来技術で使用される従来の方法よりも高い選択性を有する。回収される生体分子の高い純度は、更なる連続する精製工程の必要性を除去し得るので好ましい。好ましくは、本発明の方法は、非ターゲット生体分子に比較して30%超、例えば40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超又は更に100%濃縮された生体分子を提供する。非ターゲット生体分子と比較した所定の生体分子の純度を評価するための方法は、当業者に利用可能である。ポリペプチドの場合、例示的な方法は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）による分離後にクーマシブルーで染色されたタンパク質の定量的デンシティメトリーである。

30

【0165】

従来の細胞破碎方法を適用すると、細胞が破壊され、核酸、細胞壁成分及び他のフラグメントが放出される。したがって、夾雜物を除去するためには、回収された生体分子を更に精製しなければならない。しかしながら、本明細書に記載される方法は、高分子夾雜物の放出の減少を可能にする。このような夾雜物としては、限定されないが、dsDNA、RNA、宿主細胞タンパク質、宿主細胞残屑及びエンドトキシンが挙げられ得る。驚くべきことに、本発明の方法は、実施例2.2に記載されているように、標準的なHPHプロトコールによって得られる細胞ホモジネート中のdsDNA含量と比較して、dsDNA含量を最大2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍又は10倍又はそれ以上著しく減少させることが見出された。当業者であれば、例えば市販の蛍光アッセイ又は比色アッセイによって、所定のサンプル中のdsDNA含量を決定し得る。好ましくは、本発明の方法を適用する場合、5倍少ないdsDNAが細胞によって放出され、より好ましくは、10倍少ないdsDNA又はそれ以下、例えば100倍又は1000倍少ないdsDNAが放出される。

40

【0166】

本明細書で使用される「エンドトキシン」は、グラム陰性菌の外側細胞膜の主要な構成

50

成分であるリポ多糖（LPS）と互換的に使用される。エンドトキシンは、典型的には、細菌の外側細胞膜の破壊により放出される。本発明の方法は、驚くべきことに、実施例2.2におけるように、標準的なHPHプロトコールによって得られる細胞ホモジネート中のエンドトキシン含量と比較して、放出されるエンドトキシンの量を減少させることが示された。好ましくは、本発明の方法を適用する場合、5倍少ないエンドトキシン、より好ましくは10倍少ないエンドトキシン又は更にそれ以下、例えば100倍、1000倍、 10^4 倍、 10^5 又は 10^6 倍少ないエンドトキシンが細胞によって放出される。当業者であれば、例えばカブトガニ血球抽出成分（LAL）ゲル凝固試験、LAL発色試験及び市販の又は当技術分野で公知の他の発色試験を使用することによって、エンドトキシン含量を容易に決定し得る。

10

【0167】

生体分子（「産物」）を生産する細胞の培養

本発明の吸着剤を適用する前に、本明細書に定義及び記載される生体分子を得る方法は、生体分子（「産物」）、好ましくは発現産物、例えばタンパク質又はポリヌクレオチドを產生（例えば、発現）する（宿主）細胞を培養する工程を場合により含み得る。本発明の宿主細胞との関連では、培地（血清又は無血清のいずれか）中での「細胞の培養」又は「細胞を培養する」という用語は、それぞれ、細胞を培養容器に播種すること、接着培養の場合には単層が形成されるまで、若しくは懸濁培養の場合には十分な細胞密度が確立されるまで培地中で細胞を成長させること、及び／又は単層が形成されたら可能な限りすぐに培地中で細胞を維持すること、若しくは懸濁液中で細胞を維持することを指す。培地中での「細胞の培養」又は「細胞を培養する」という用語はまた、細胞の培養プロセス全体にわたって動物血清産物が全く存在しないように、又は本質的に存在しないように、無血清培地を用いて上記工程の全てを実施することを含む。指数的フィード又は直線的フィード又は一定フィード又は他の種類のフィード、フェドバッチ培養又は高密度培養によって、細胞を培養し得る。しかし、あるいは、血清含有培地を用いても、上記工程を実施し得る。

20

【0168】

ヌクレオチド配列及び／又はコードされたポリペプチドは、細胞に関して異種でもよいし、又は異種でなくてもよい。「異種」によって、これは異なるゲノム背景を有する細胞若しくは生物に由来することを意味するか、又は（宿主）細胞に関して同種であるが、前記ヌクレオチド配列の天然に存在するカウンターパートとは異なるゲノム環境にあることを意味する。これは、ヌクレオチド配列が宿主に関して同種である場合、それが、前記宿主のゲノム中のその天然の位置にない（特に、それが異なる遺伝子によって囲まれている）ことを意味する。

30

【0169】

本発明の好ましい実施態様では、発現産物は、タンパク質産物(proteinaceous product)である。本明細書で使用される場合、「タンパク質(proteinaceous)」は、炭素、水素、酸素、窒素及び通常は硫黄を含有し、1本以上のアミノ酸鎖から構成される複雑な有機高分子の群のいずれかを指す。好ましいタンパク質発現産物は、ポリペプチドである。「タンパク質(proteinaceous)」という用語はまた、タンパク質に関係すること、タンパク質からなること、タンパク質に似ていること、又はタンパク質に関する意味を意味する。本発明のより好ましい実施態様では、産物は、産生される目的のポリペプチドである。産物は、生物学的に活性であることが好ましい。タンパク質産物は、酸性又は塩基性であり得る。

40

【0170】

発現産物は、ヌクレオチド配列（好ましくは、遺伝子工学的宿主細胞との関連で当技術分野で一般的に公知の手段及び方法によって、細胞に外因的に付加されるヌクレオチド配列）の転写及び／又は翻訳の産物であり得る。産物は、例えば、プラスミド、ミニサークルDNA、コスミド、BAC、ssDNA若しくはdsDNA配列又はRNA配列（リボザイム、アンチセンスRNA、siRNA、iRNA、miRNAなど）（これらは全て

50

、細胞中で產生可能である)を含むスクレオチド配列であり得るか、又はそれは、転写されたRNAの翻訳によって細胞中で生成されるペプチド若しくはポリペプチドであり得る。

【0171】

本明細書で使用される「ポリペプチド」は、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド及びそれらのフラグメントを含み、前記「ポリペプチド」は全て、好ましくは生物学的に活性である。「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、任意の長さのアミノ酸、一般には約10、20又は30よりも多いアミノ酸のポリマーを指すために互換的に使用される。これらの用語はまた、グリコシル化、アセチル化及びリン酸化を含む反応を介して翻訳後修飾されているタンパク質を含む。ポリペプチドは、半減期を延長するための融合パートナー(例えば、Fc融合物、アルブミン融合物)、又はアフィニティークロマトグラフィー用のアフィニティータグとしての融合パートナー、又は正しいN末端を提供するための若しくは目的のタンパク質の產生収量を増加させるための融合パートナー、に融合した融合ポリペプチドであり得る。「ペプチド」という用語は、より短いアミノ酸ストレッチ、一般には約30未満のアミノ酸を指す。ポリペプチドは、アゴニスト若しくはアンタゴニストとして機能し得、及び/又は治療用途若しくは診断用途を有し得る。

10

【0172】

更に、本発明の細胞で発現されるポリペプチドは、哺乳類由来であり得るが、微生物産物及び酵母産物も產生され得る。

20

【0173】

哺乳類ポリペプチド又はタンパク質の例としては、ホルモン、サイトカイン及びリンフォカイン、抗体、例えばF(ab)2、ナノボディ、dAb、scFv、レセプター、接着分子、及び酵素、並びにそれらのフラグメントが挙げられる。所望の産物の非包括的なリストとしては、例えば、ヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモン、副甲状腺ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、卵胞刺激ホルモン成長、黄体形成ホルモン；ホルモン放出因子；リポタンパク質；-1-抗トリプシン；インスリンA鎖；インスリンB鎖；プロインスリン；カルシトニン；グルカゴン；レニンなどの分子；因子VIIIC、因子IX、組織因子、及びウォン・ヴィレブランド因子などの凝固因子；Cタンパク質、心房性ナトリウム利尿因子、肺表面活性剤などの抗凝固因子；ウロキナーゼ又はヒト尿又は組織型プラスミノーゲン活性化因子(t-PA)などのプラスミノーゲン活性化因子；ボンベシン；トロンビン；造血成長因子；腫瘍壊死因子-α及び-β；エンケファリナーゼ；ランテス(正常なT細胞発現及び分泌の活性化を調節)；ヒトマクロファージ炎症性タンパク質(MIP-1α)；ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン；ミュラー管抑制物質；レラキシンA鎖又はB鎖；プロレラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；デオキシリボスクレアーゼ；インヒビン；アクチビン；ホルモン又は成長因子のレセプター；インテグリン；A又はDタンパク質；リウマチ因子；骨由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロphins-3、-4、-5、若しくは-6(NT-3、NT-4、NT-5、若しくはNT-6)などの神経栄養因子、血管内皮成長因子(VEGF)、NGF-などの神経成長因子を含む成長因子；血小板由来成長因子(PDGF)；aFGF、bFGF、FGF-4、FGF-5、FGF-6などの線維芽成長因子；上皮成長因子(EGF)；TGF- α 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、又はTGF- β 5を含む、TGF- β 及び- α などの形質転換成長因子(TGF)；インスリン様成長因子-1(IIGF-1)及び-2(IIGF-2)；des(1-3)-IGF-I(脳IGF-I)、インスリン様成長因子結合タンパク質；CD-3、CD-4、CD-8、及びCD-19などのCDタンパク質；エリスロポエチン；骨誘導因子；免疫毒；骨形成タンパク質(BMP)；インターフェロン- α 、- β 、及び- γ などのインターフェロン；コロニー刺激因子(CSF)；例えは、M-CSF、GM-CSF、及びG-CSF；インターロイキン(IL)；例えは、IL-1~IL-10；スーパーオキシドジスマターゼ；エリスロポエチン；T-細胞レセプター；表面膜タンパク質；例えは、HER2；崩壊促進因子；ウイルス抗原；例えは、AIDSエンベロープの一部分など；輸送タンパク；ホーミングレセプター

30

(continued)

；ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン；ミュラー管抑制物質；レラキシンA鎖又はB鎖；プロレラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；デオキシリボスクレアーゼ；インヒビン；アクチビン；ホルモン又は成長因子のレセプター；インテグリン；A又はDタンパク質；リウマチ因子；骨由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロphins-3、-4、-5、若しくは-6(NT-3、NT-4、NT-5、若しくはNT-6)などの神経栄養因子、血管内皮成長因子(VEGF)、NGF-などの神経成長因子を含む成長因子；血小板由来成長因子(PDGF)；aFGF、bFGF、FGF-4、FGF-5、FGF-6などの線維芽成長因子；上皮成長因子(EGF)；TGF- α 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、又はTGF- β 5を含む、TGF- β 及び- α などの形質転換成長因子(TGF)；インスリン様成長因子-1(IIGF-1)及び-2(IIGF-2)；des(1-3)-IGF-I(脳IGF-I)、インスリン様成長因子結合タンパク質；CD-3、CD-4、CD-8、及びCD-19などのCDタンパク質；エリスロポエチン；骨誘導因子；免疫毒；骨形成タンパク質(BMP)；インターフェロン- α 、- β 、及び- γ などのインターフェロン；コロニー刺激因子(CSF)；例えは、M-CSF、GM-CSF、及びG-CSF；インターロイキン(IL)；例えは、IL-1~IL-10；スーパーオキシドジスマターゼ；エリスロポエチン；T-細胞レセプター；表面膜タンパク質；例えは、HER2；崩壊促進因子；ウイルス抗原；例えは、AIDSエンベロープの一部分など；輸送タンパク；ホーミングレセプター

40

50

; アドレシン ; 調節タンパク質 ; 抗体 ; イムノアドヘシンなどのキメラタンパク質、並びに上記ポリペプチドのいずれかのフラグメントが挙げられる。

【0174】

本明細書における好ましいポリペプチド及びタンパク質は、治療用タンパク質、例えば TGF- α 、TGF- β 、PDGF、EGF、FGF、IGF-I、デオキシリボヌクレアーゼ、プラスミノーゲン活性化因子、例えば t-PA、凝固因子、例えば組織因子及び因子 V_{II}I、ホルモン、例えばレラキシン及びインスリン、サイトカイン、例えば INF- γ 、キメラタンパク質、例えば TNF レセプター IgG イムノアドヘシン (TNFr-IgG) 又は抗体、例えば二重特異性抗体、ラクダ抗体及びそのフラグメント、V_HH ドメイン抗体、ドメイン抗体、免疫グロブリン、例えば抗 IgG、抗 IgA、抗 IgM、抗 IgD 又は抗 IgE である。好ましい治療用タンパク質は、ヒト起源のもの、又は「ヒト化」タンパク質、例えば本明細書に記載されるヒト化抗体である。10

【0175】

産物がポリペプチドである場合、ポリペプチドをタグ付けし得る（すなわち、好ましくは、前記ポリペプチドの単離及び / 又は精製を可能にする異種ポリペプチドと融合し得る）。異種ポリペプチドは、例えば、ヒスチジンタグ、Flag タグ、ストレプトアビジンタグ、strep II tag、インテイン、マルトース結合タンパク質、IgA 又は IgG Fc 部分、A タンパク質又は G タンパク質であり得る

【0176】

産物が、ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドである場合、ヌクレオチド配列を、ヌクレオチド配列である前記発現産物の単離及び / 又は精製を可能にする異種ヌクレオチド配列と融合し得る。例えば、異種ヌクレオチド配列は、相補的ヌクレオチド配列に結合し得、それにより前記ヌクレオチド配列の単離及び / 又は精製が可能になる。異種ポリペプチド又はヌクレオチド配列との関連で使用される場合、「異種」は、ポリペプチド又はヌクレオチド配列が、所望の発現産物であるポリペプチド又はヌクレオチド配列と異なることを意味する。20

【0177】

ポリヌクレオチドの一例として、産物がプラスミドである場合、前記プラスミドは、遺伝子治療若しくは DNA ワクチン接種に有用であるか、又は治療用タンパク質、例えば本明細書に記載されるものをコードし得る。

【0178】

一方、細胞は、ウイルスを発現し得る（すなわち、宿主細胞は、いわばウイルスが複製及び / 又は増殖される適切な環境を提供する産生細胞株として機能する）。したがって、産物は、ウイルスであり得るだろう。実際的には、本発明の方法によって、dsDNA ウィルス（例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス）、ssDNA ウィルス（例えば、パルボウイルス）、dsRNA ウィルス（例えば、レオウイルス）(+) ssRNA ウィルス（例えば、ピコルナウイルス、トガウイルス）、(-) ssRNA (例えは、オルトミクソウイルス、ラブドウイルス)、ssRNA - RT ウィルス（例えは、レトロウイルス）、及び dsDNA - RT ウィルス（例えは、ヘパドナウイルス）などの任意のウイルスを回収し得る。ウイルス複製は、ターゲット細胞での感染及び増殖プロセスの間のウイルスの形成を説明するために使用される用語である。ウイルスの観点から、ウイルス複製の目的は、その種の産生及び生存を可能にすることである。そのゲノムの大量のコピーを生成し、これらのコピーをウイルス中にパッケージングすることによって、ウイルスは、新たな宿主に感染し続けることができる。本発明との関連では、適切な宿主細胞により産生されたウイルスは、例えば溶解又は出芽によって宿主細胞から出ることができないか、又は本質的に出ることができないことが好ましい。40

【0179】

前述のように、産物はまた、ウイルスであり得る。「ウイルス」は、「ネイティブな」ウイルス及び「組換え」ウイルスを含み、「ネイティブ」は、天然から単離されたウイルスであって、遺伝子操作されていないウイルス（例えは、臨床分離株）、又は天然に見ら50

れ得る（すなわち、天然に存在する）ウイルス、又は例えば免疫目的で使用される典型的な樹立ウイルス株（例えば、弱毒化ウイルス）を意味する。

【0180】

要するに、本発明は、工業規模に容易に適用され得る高速で効率的で単純化され安価な方法を提供する。

【実施例】

【0181】

実施例1 イオン交換樹脂からの微粒子の調製

水処理のための樹脂ビーズは、DOWから購入した。試験した樹脂の概要を表1に示す。

【表1】

名称	マトリックス		樹脂			
	ポリマー	種類	基	種類	交換されるイオン	容量(eq/l)
Marathon MSC	スチレン-DVB	マクロ多孔性	スルホン酸	強酸	陽イオン	≥ 1.7 (Na)
Marathon A2	スチレン-DVB	ゲル	ジメチルエタノールアンモニウム	強塩基	陰イオン	≥ 1.2 (Cl)
Amblerlite IRC748	スチレン-DVB	マクロ多孔性	イミノ二酢酸	キレート	陽イオン	≥ 1.25 (Na)
Amblerlite IRA458	アクリル	ゲル	トリメチルアンモニウム	強塩基	陰イオン	≥ 1.25 (Cl)

表1

【0182】

それぞれ陽イオン交換体（Marathon MSC、Amberlite IRC748）及び陰イオン交換体（Marathon A2、Amberlite IRA458）のために、全ての樹脂をそれらのナトリウム型又は塩化物型にプレコンディショニングした。その後、脱イオン水で粒子を繰り返し洗浄した(<1mS/cm及び中性pH)。樹脂の官能基の概要を図1に示す。

【0183】

NETSCH社でLabstar LS1 millを用いて、又は乳棒及び乳鉢を用いて手動で、微粒子を湿式粉碎した。粉碎することによって得られた平均粒子径分布(PSD)の概要を表2に示す。倍率1000倍の光学顕微鏡によって粒子径を測定し、500~50000個の個別の投影をカウントすることによって平均円相当径を推定した。

【表2】

樹脂	サイズ d50 (μm)	分布 d1-d99 (μm)
Marathon MSC	0.9	0.4-1.9
Marathon A2	1	0.4-2.4
Amblerlite IRC748	1	0.2-4.5
Amberlite IRA458	1.4	0.4-5.1

表2 粒子径分布

【0184】

光学投影から粉碎した粒子の形状は、不明確であると考えられた。懸濁液の濃度を、遠心分離によって調整し、脱イオン水中の充填層体積から推定した。湿潤樹脂及び乾燥樹脂の重量差から、水分含量を計算した。

【0185】

実施例2 ターゲットタンパク質の回収

実施例2.1：C S P Eによるターゲットタンパク質の回収

E. coli (HMS174)細胞を37(GFPmut3.1)及び30(SOD)でフェドバッチ培養した。組換えタンパク質の発現をIPTG誘導した。遠心分離によって、細胞を回収した。室温でアリコートを用いて、タンパク質抽出実験を実施した。最初、体積細胞濃度(湿潤充填層)は、約10%v/vであった。懸濁液50mlを4000rcfで

10

20

30

40

50

10分間遠心分離することによって、これを決定した。様々な細胞及び塩濃度による実験の場合、各緩衝液中で激しく混合することによって、ペレットを懸濁した。10×ストック溶液を50%懸濁液に添加し、ddH₂Oで作業容量(20ml)に希釈することによって、最終的な細胞、粒子、緩衝液及び塩の濃度を調整した。攪拌ビーカー(混合)中で、又はチューブ(静的)中で、インキュベーションを室温(約23℃)で最大3時間実施した。両方とも、同様の高さ：直径の比を有していた。簡便なマグネチックスターラーを底に入れて、混合強度を800rpmに調整した。放出されたタンパク質を定量するために、各緩衝液で1mlアリコートを1:2希釈した。その上で、サンプルを8000rcfで最大10分間(約23℃)遠心分離し、更なる調査のために上清を収集した。

【0186】

10

実施例2.2 HPHによるターゲットタンパク質の抽出

E. coli(HMS174)細胞を37(GFPmut3.1)及び30(SOD)でフェドバッチ培養した。細胞を緩衝液(50mM Tris、pH8.0、100mM NaCl)に懸濁して25%v/vにし、高圧ホモジナイゼーション(Niro-Soave Panda 2k、100MPaで2回通過)によって破碎した。

【0187】

20

実施例3 蛍光によるターゲットタンパク質の定量実施例3.1 蛍光

陰イオン交換(AIEX CaptoQ)、疎水性相互作用(ButylSepharose)及びゲルろ過(SuperdexG75 prep. grade)クロマトグラフィーを用いて、(10000rcfで60分間遠心分離し、0.2マイクロでろ過した)清澄化*E. coli*ホモジネートから逐次精製することによって、GFPmut3.1標準(>95%)を調製した。280nmの吸光度から、濃度を決定した(8M尿素によって100で10分間変性させた)。プレートリーダー(Tecan GENios Pro)によって、485nm(励起)及び535/20nm(発光)の標準的なキャリブレーションから、同等の蛍光を決定した。

【0188】

HPH細胞破碎と比べて、GFPの回収効率(%回収)を定量した(実施例2.2に記載されているように、100MPaで2回通過)。

【0189】

30

実施例3.1.1 細胞濃度

粉碎したMarathon A2(MA2)に吸着させ、NaClで溶出することによって回収した*E. coli*細胞由来のGFPの回収を決定した。遠心分離によって細胞プロスから細胞を分離し、体積濃度20%(v/v)、6%(v/v)及び1%(v/v)で50mM TRI S(pH8.0)に懸濁した。細胞懸濁液を様々な体積比200%、100%、50%及び0%の樹脂と混合し、1時間静的インキュベーションした。2M NaClで懸濁液アリコートを1:2希釈することによって、溶出を実施した。蛍光によって、水相中のGFPを定量した。陽イオン性樹脂との比較のために、粉碎したMarathon MSC(MMSC)と同じ条件で使用した。

【0190】

40

図2は、6%(v/v)の細胞濃度において、100%のGFP回収が達成されたことを示している。20%(v/v)の細胞濃度では、抽出されたタンパク質の量は、50%未満に減少した。対照的に、より少量の微粒子を20%(v/v)細胞懸濁液に添加すると、より多くの回収(最大45%)がもたらされた。1%では、回収されたGFPの量は、微粒子の量に比例して減少した。微粒子を添加しない場合、上清中のGFPの量は20%未満であった。同じ条件で細胞を粉碎したMarathon MSC(陽イオン交換)と共にインキュベーションすることによっては、タンパク質抽出及び細胞破碎の効果を観察することはできなかった。

【0191】

実施例3.1.2 樹脂：細胞の体積比

異なる樹脂：細胞の体積比において、粉碎したMarathon A2(MA2)に吸

50

着させ、NaClで溶出することによって回収したE.coli細胞由来の抽出GFPの回収を決定した。遠心分離によって細胞プロスから細胞を分離し、10%（v/v）で50mM TRIS（pH 8.0）に懸濁した。細胞懸濁液を様々な体積比200%、100%、70%、50%、30%及び0%の樹脂と混合し、1時間静的インキュベーションした。2M NaClで懸濁液のアリコートを1：2希釈することによって、溶出を実施した。蛍光によって、水相中のGFPを定量した。

【0192】

図3は、1時間のインキュベーション後において、粉碎したMarathon A2から脱離することによって、GFPのほぼ100%を回収したことを示している。Marathon A2なしの場合、総可溶性GFPの20%未満を細胞から抽出した。

10

【0193】

実施例3.1.3 pH及びインキュベーション時間

異なるpH値及び異なるインキュベーション時間において、粉碎したMarathon A2（MA2）に吸着させ、NaClで溶出することによって回収したE.coli細胞由来の抽出GFPの回収を決定した。NaOHを添加することによって、細胞プロス懸濁液のpHを7.5、8.0及び8.5に調整した。細胞懸濁液を体積比100%の樹脂と混合し、3時間静的インキュベーションした。2M NaClで懸濁液のアリコートを1：2希釈することによって、定期的な（10分間、60分間、120分間、180分間）溶出を実施した。蛍光によって、水相中のGFPを定量した。最大3時間のインキュベーション後において、pH 7.5及び8.0では、総可溶性GFPの約40%及び70%を細胞プロスから回収することができた。pH 8.5においてのみ、100%の回収が達成された。

20

【0194】

実施例3.1.4 pH、樹脂：細胞の体積比及びインキュベーション時間

0～100%の間での樹脂：細胞の体積比の影響を更に調査した。NaOHを添加することによって、細胞プロス懸濁液のpHを7.5、8.0及び8.5に調整した。細胞懸濁液を様々な樹脂：細胞の体積比100%、70%、50%、30%及び0%で混合し、3時間静的インキュベーションした。2M NaClで懸濁液のアリコートを1：2希釈することによって、定期的な（10分間、60分間、120分間、180分間）溶出を実施した。蛍光によって、水相中のGFPを定量した。

30

【0195】

図4は、pHは最大回収に対して有意な影響を有したが、添加した樹脂量の効果は無視できるものであったことを示している。10%（v/v）の細胞懸濁液を破碎し、細胞プロスからGFPを直接回収する場合、pH 8.5では、2時間の静的インキュベーション後において、70%の樹脂：細胞の比（v/v）が効率的であると考えられた。

【0196】

実施例3.1.5 塩濃度及びGFP吸着容量

異なるNaCl濃度（0～500mM）において、粉碎したMarathon A2（MA2）に吸着させ、NaClで溶出することによって回収したE.coli細胞由来の抽出GFPの回収を決定した。遠心分離によって細胞プロスから細胞を分離し、10%v/vで50mM TRIS（pH 8.0）に懸濁した。2M NaCl緩衝液で懸濁液のNaCl濃度を調整した。細胞懸濁液を樹脂：細胞の様々な体積比100%、70%、50%、30%及び0%の樹脂と混合し、1時間静的インキュベーションした。2M NaClで懸濁液のアリコートを1：2希釈することによって、溶出を実施した。蛍光によって、水相中のGFPを定量した。

40

【0197】

図5は、0mM NaClにおいて、最大100%のGFP回収が達成されたことを示している。

【0198】

脱離前後の水相（上清）中の濃度を比較することによって、微粒子に結合したGFPの

50

量を調査した(図6)。GFPの量の差分が樹脂に吸着したとみなした。標準ラングミュア式を用いて、傾向をフィッティングした。

【0199】

実施例3.1.6 陰イオンキレート樹脂による抽出

また、E. coli細胞をキレート微粒子と共にインキュベーションして、タンパク質抽出も実証した(図7)。Marathon A2の強塩基性第4級基とは対照的に、Amberlite IRA 748から自作した微粒子のイミノ二酢酸基は、多価陽イオンに対して高い親和性を有する陽イオン交換体である。その場合、懸濁液の凝集は観察されなかった。

【0200】

50mM TRIS緩衝液(pH8.0)中、細胞(5%v/v)に対して体積比30%及び70%v/vの樹脂でインキュベーションし、続いて1M NaClで溶出した後における、キレート(粉碎したAmberlite IRA 748)及び陽イオン微粒子(粉碎したMarathon A2)による細胞懸濁液(E. coli)からのGFP抽出を、塩で溶出しない以外は同じ条件下におけるGFP抽出と比較して決定した(図7a、b)。更に、攪拌インキュベーション条件及び静的インキュベーション条件下におけるGFP抽出を決定した(図7a、b)。脱離によってタンパク質を回収した粉碎したMA2とは対照的に、GFPはキレート微粒子に吸着しなかった。実施した規模では、タンパク質の収量は、キレート微粒子とのインキュベーションの間の静的条件又は攪拌条件によって影響されないとと思われる。

10

20

30

40

【0201】

実施例3.1.7 タンパク質抽出に対する溶出条件の影響

50mM TRIS緩衝液(pH8.0)中、細胞(5%v/v)に対して体積比30%、70%及び100%v/vの樹脂で2時間インキュベーションし、続いて1M NaClで溶出した後における、キレート(粉碎したAmberlite IRA 748)及び陽イオン微粒子(粉碎したMarathon A2)による細胞懸濁液(E. coli)からのGFP抽出を、塩で溶出しない以外は同じ条件下におけるGFP抽出と比較して決定した。50mM TRIS(pH8.0)中で、E. coli細胞を粉碎したAmberlite IRA 748と共に2時間インキュベーションすることによって、最大100%のGFP抽出率が得られた(図8)。回収したGFPの収量は、添加したキレート微粒子の体積比と共に増加した。

【0202】

実施例3.1.8 タンパク質抽出に対する細胞濃度の影響

塩で溶出せずに、攪拌ビーカー中の50mM TRIS緩衝液(pH8.0)中、20%、15%、10%及び5%体積細胞濃度の細胞に対して体積比70%v/vの樹脂でインキュベーションした後における、キレート樹脂(粉碎したAmberlite IRA 748)による細胞懸濁液(E. coli)からのタンパク質(GFP)抽出を決定した(図9)。懸濁液中のより高い細胞濃度は、キレート微粒子の抽出収率に好ましい影響を及ぼした。E. coliの乾燥生物量(dry biomass)(d.m.)に関する抽出したタンパク質量のGFP抽出動態を決定した(図10)。

【0203】

実施例4 SDS Pageによるターゲットタンパク質の定量

4000rcfで15分間遠心分離することによって、E. coliホモジネートの重い固体画分を分離した。上清を移し、4000rcfで60分間遠心分離した後に、軽い画分を集めた。ペレットを脱イオン水に懸濁し、先のように2回逐次洗浄した。10M尿素(pH8.0)で細胞残屑及び粗ホモジネートの参照サンプルを1:5希釈し、ロータリーシェーカー上で1時間インキュベーションした。

【0204】

1:4 SDSサンプル緩衝液及び0, 2M DTT中で、全てのサンプルを100度10分間加熱した。MES-SDSランニング緩衝液中、8~12%ポリアクリルアミド

50

ゲル上で、電気泳動を200V及び最大400mAで60分間実施した。CoomassieR250及びBismarkBraunR (Choi et al. 1996)を用いて、染色を実施した。光学ゲルスキャニング (Epson Perfection Scan V770、600 dpi、16 bit グレースケール) 及びLumi Analyst (v3.0 Roche Diagnostics)ソフトウェアによる評価を用いて、デンシトメトリーを実施した。

【0205】

実施例4.1 SOD抽出

Amberlite IRA458から得られた陽イオン微粒子と共にE. coli細胞をインキュベーションすることにより、タンパク質抽出を実証した。Marathon A2のスチレンジビニルベンゼン (PS/DVB) マトリックスとは対照的に、アクリル樹脂から得られた微粒子は、同じ充填層体積でより多くの水を含有していた。アクリル微粒子では、凝集が明らかにより強力であったが(より大きなフロック及びより早い沈殿)、これは詳細には調査しなかった。加えて、ターゲットタンパク質は、GFPではなくスーパーオキシドダブルエヌクレオツチド還元酵素(SOD)であった。

10

【0206】

実施例4.1.1 様々なインキュベーション条件におけるタンパク質の収率

チューブ内において、50mM TRIS緩衝液 (pH 8.0) [示してください(please indicate)] 中、細胞 (10%v/v) に対して体積比50、70及び100%v/vの樹脂で静的インキュベーションし、続いてNaClで溶出した後に、アクリル樹脂(粉碎したAmberlite IRA458)によって、細胞懸濁液(E. coli)から、タンパク質(SOD)の抽出収率を決定した。SDS-PAGEの標準的なキャリブレーションから、デンシトメトリーによってタンパク質の量を推定した(図11)。アクリル樹脂と共に1時間静的インキュベーションした後に、SODの放出動態がほぼ終了した。同量の0.5M及び1.0M NaClを用いて、アクリル微粒子に吸着したSODを回収した。

20

【0207】

実施例4.1.2 E. coliホモジネートからのSOD回収

短時間混合し、インキュベーション(50mM TRIS、pH 8.0)し、続いてNaCl (0.0M、0.5M、1.0M)で溶出した後、Amberlite IRA458微粒子(100%、70%、50%v/vの樹脂：細胞の体積比)と共にインキュベーションした後に、10%(v/v)細胞懸濁液から得られたE. coliホモジネートからのSOD回収を決定した。0.5M及び1.0Mによる溶出では、Amberlite IRA458微粒子に吸着したSODを同量で回収した(図12)。

30

【0208】

実施例4.1.3 SOD吸着容量

微粒子に結合したSODの量を調査した。

【0209】

A2微粒子を用いてE. coli細胞から抽出し、0.2M NaClを含む50mM TRIS緩衝液(pH 8.0)中、70%v/v(樹脂/細胞)で2時間インキュベーションした後に脱離することによって、SOD標準(SDS-PAGEのクーマシー染色による評価では>95%)を調製し、続いて、ゲルろ過(GEのSuperdexG75 prep. grade)によって精製した。280nmの吸光度から、濃度を決定した(8M尿素中、100で10分間変性させた)。SDS-pageの5点キャリブレーションから、デンシトメトリーによってサンプルの濃度を評価した。抽出及びホモジナイズによって得られたSODサンプルの濃度を、標準に対する積分によって比較した。

40

【0210】

実施例5：非ターゲットタンパク質の抽出

粉碎したMarathon A2に吸着させることによって抽出したGFPの純度を、SDS-PAGEによって、ホモジネートと比較してチェックした。HPHの後、E. coliホモジネートの(例えば、GFP封入体を含有する)重い固体画分を、4000rcfで15分間遠心分離することによって分離した。上清を移し、4000rcfで60分間遠心分

50

離した後に、軽いホモジネート画分を集めた。軽いホモジネートの画分は、細胞残屑及び膜タンパク質、例えば外膜Aタンパク質(OmpA)を含有し、細胞破碎の指標として機能する。ペレットを脱イオン水に懸濁し、先のように2回逐次洗浄した。10M尿素(pH 8.0)で細胞残屑及び粗ホモジネートの参考サンプルを1:5希釈し、ロータリーシェーカー上で1時間インキュベーションした。粗ホモジネート、ホモジネート上清、及び50mM TRIS中で細胞を50%v/v粉碎したMarathon A2と共にpH 8.0で3時間インキュベーションすることによって抽出した溶出タンパク質を用いて、SDS-PAGEを実施した。200、250、300、350、400、450、500及び1000mM NaClで1:2希釈することによって、懸濁液のアリコートを溶出した。全てのサンプルのSDS-PAGEと同じ希釈率で実施し、タンパク質の量を評価するために、クーマシー染色のデンシトメトリーを使用した。約39kDaの主要な膜タンパク質(OMP)のために、洗浄した細胞残屑をレファレンスとして適用した。

10

【0211】

300mM NaClの脱離条件では、抽出後に、粗ホモジネート及び清澄化ホモジネートと比較して、非ターゲットタンパク質のそれわずか15%及び17%が検出された。同じ条件において、軽いホモジネート画分由来のタンパク質の6%及び12%が、それぞれ上清中に見られた。

20

【0212】

更に、50mM TRIS(pH 8.0)中、静的条件で混合しながら、細胞をそれぞれ70%v/v粉碎したAmberlite IRC 748及び粉碎したMarathon A2と共に2時間インキュベーションした後に、ホモジネート上清及び溶出タンパク質を比較した。50mM TRIS緩衝液又は1M NaClで、懸濁液のアリコートを1:2希釈した。全てのサンプルのSDS-PAGEと同じ希釈率で実施し、タンパク質の量を評価するために、クーマシー染色のデンシトメトリーを使用した。

20

【0213】

SDS-PAGE(クーマシー)のデンシトメトリーによってGFPの回収を評価し、溶出した宿主細胞タンパク質(特に、膜タンパク質)と比較した(図13、図14、図15)。50mM TRIS(pH 8.0)中で、細胞を50%v/v粉碎したMarathon A2と共に3時間インキュベーションした後に、抽出したタンパク質を比較した。200、250、300、350、400、450、500及び1000mM NaClで1:2希釈することによって、懸濁液のアリコートを溶出した。全てのサンプルのSDS-PAGEと同じ希釈率で実施し、タンパク質の量を評価するために、クーマシー染色のデンシトメトリーを使用した(図13)。300mM NaClでは、Marathon A2からGFPをほぼ100%まで上清に回収した。より高い塩濃度で脱離すると、より多量の非ターゲットタンパク質及び軽画分タンパク質が回収された(図14)。上清中の高压ホモジナイゼーションと比較して、平均15%の軽画分タンパク質及び20%の非ターゲットタンパク質を、微粒子により、細胞からそれぞれ抽出した。

30

【0214】

クーマシー染色によって検出されたタンパク質のプロファイルにより、HPHによって破碎した細胞の上清と、微粒子による抽出によって破碎した細胞の上清との間の純度の差が示された。ホモジネート上清、及び50mM TRIS(pH 8.0)中で細胞を50%v/v粉碎したMarathon A2と共に3時間インキュベーションした後に300mM NaClで溶出したタンパク質のタンパク質プロファイルを図15に示す。サンプルのSDS-PAGEと同じ希釈率で実施し、相対的なタンパク質の量を評価するために、クーマシー染色のデンシトメトリーを使用した。GFPの相対純度は、ホモジネートでは9.8%であり、300mM NaClの溶出液では37.4%であり、抽出後の平均は33.2%±2.9%であった。

40

【0215】

別のアプローチでは、50mM TRIS(pH 8.0)中で、細胞を70%粉碎したAmberlite 748と共に2時間インキュベーションした後に、ホモジネート上清

50

及び抽出タンパク質のタンパク質プロファイルを決定した。サンプルの S D S - P a g e を同じ希釈率で実施し、相対的なタンパク質の量を評価するために、クーマシー染色のデンシトメトリーを使用した。G F P の相対純度は、ホモジネートでは 1 2 . 4 % であり、上清では 3 8 . 4 % であり、抽出後の平均は 4 1 . 6 % ± 2 . 7 % であった。

【 0 2 1 6 】

5 0 mM T R I S 緩衝液 (p H 8 . 0) 中で静的インキュベーション (1 0 % v/v) し、続いて N a C l で溶出した後に、陽イオン性樹脂 (M a r a t h o n A 2) による細胞懸濁液 (E. c o l i) からのタンパク質 (S O D) の抽出動態中に、非ターゲットタンパク質の減少を決定した。S D S - P a g e からのデンシトメトリーによって、非ターゲットタンパク質の量を推定した。細胞から抽出した S O D の純度は、スチレン微粒子によってホモジネートから捕捉したものよりも 2 倍高かった。
10

【 0 2 1 7 】

実施例 6 : S O D 活性

5 0 mM T R I S 緩衝液 (p H 8 . 0) 中、細胞 (1 0 % v/v) に対して体積比 7 0 % v/v の樹脂で静的インキュベーションし、続いて 0 . 5 M N a C l で溶出した後、細胞懸濁液 (E. c o l i) 及びホモジネートから抽出した後に、スチレン陽イオン微粒子 M a r a t h o n A 2 (M A 2) によって細胞から抽出した S O D の酵素活性を決定した。上清を遠心分離 (1 m l 、 3 0 分間、 2 3 及び 1 6 0 0 0 rcf) し、ろ過 (P V D F 膜、 0 . 2 μ m) し、各緩衝液で有効測定範囲まで 1 : 1 0 の段階希釈をした。Sigma から購入した 19 160 SOD determination kit によって、 S O D 活性を決定した。 M A 2 微粒子によって細胞から抽出した S O D の酵素活性は、ホモジネートから捕捉したものと比較して平均で 1 ユニット増加した。
20

【 0 2 1 8 】

実施例 7 : 夾雑物

Invitrogen から購入した Quant-iT (商標) PicoGreen (登録商標) dsDNA Assay Kit を用いて、 D N A を定量した。 Lonza から購入した PyroGene (商標) Recombinant Factor C Assay を用いて、エンドトキシンを定量した。全ての上清サンプルを遠心分離 (1 m l 、 3 0 分間、 2 3 及び 1 6 0 0 0 rcf) し、ろ過 (P V D F 膜、 0 . 2 μ m) し、各緩衝液で有効測定範囲まで 1 : 1 0 の段階希釈をした。各キットの説明表記にしたがってプレートリーダー (Tecan の GENios Pro 又は Infinite 200M) によって、測定を実施した。
30

【 0 2 1 9 】

実施例 7 . 1 d s D N A

5 0 mM T R I S 緩衝液 (p H 8 . 0) 中、細胞 (1 0 % v/v) に対して体積比 5 0 、 7 0 、 1 0 0 % v/v の樹脂で静的インキュベーションし、続いて N a C l で溶出した後、アクリル (A m b e r l i t e I R A 4 5 8) 及び陽イオン性樹脂 (M a r a t h o n A 2) による細胞懸濁液 (E. c o l i) からのタンパク質 (S O D) の抽出中に、 d s D N A の減少を決定した。上記のように、 D N A を定量した。細胞を微粒子と共にインキュベーションすることによって、最大 1 0 ² より少ない d s D N A を放出させた。タンパク質溶出条件 (0 . 5 M N a C l) では、上清中の d s D N A の減少は、 1 0 ² ~ 1 0 ³ であった (図 1 6)。
40

【 0 2 2 0 】

実施例 7 . 2 エンドトキシン

5 0 mM T R I S 緩衝液 (p H 8 . 0) 中で静的インキュベーション (1 0 % v/v) し、続いて N a C l で溶出した後、陽イオン性樹脂 (M a r a t h o n A 2) による細胞懸濁液 (E. c o l i) からのタンパク質 (S O D) の抽出動態中に、エンドトキシンの減少を決定した。上記のように、エンドトキシンの量を定量した。

【 0 2 2 1 】

抽出条件では、ホモジネートからの吸着と比較して、 1 0 ³ より少ないエンドトキシンが上清に放出された (図 1 7)。 0 . 5 M N a C l 及び 1 . 0 M N a C l では、エンドトキシンは約 1 0 倍減少した。
50

【0222】

実施例8：顕微鏡検査実施例8.1：原子間力顕微鏡検査(AFM)

スクロース(50 mM)溶液、脱イオン水及び微粒子の希釈懸濁液で正に荷電した顕微鏡スライドを逐次処理した。各工程の後、乾燥を65°で24時間実施した。Department of Nanobiotechnology, BOKU (Dr. Gerhard Sekhon)において、測定を行った。

【0223】

オープンソースソフトウェアのGwyddion(v2.60)をAFMデータの可視化に使用した。元のビーズの機械的摩耗の結果として、端表面トポグラフィーが明確に生成された。粉碎した粒子は、類似の表面トポグラフィーを有していた(図18)。

10

【0224】

粉碎したMarathon A2と共にインキュベーションする前後のE. coliのAFMによって生成された画像(図19)により、細胞のフラグメント化を伴わずにタンパク質が抽出されたことが示された。

20

【0225】

実施例8.2：光学顕微鏡検査

Vienna Institute of Biotechnology(VIBT)において、Leica「Live Cell」wide-field microscopeによって、共焦点顕微鏡検査及び蛍光顕微鏡検査を実施した。各緩衝液でサンプルを約1%v/vの固体濃度に希釈し、倍率1000倍(Leica HCX PL APO 100x 1.4 oil)で可視化した。

20

【0226】

明視野(BF)、微分干渉コントラスト(DIC)及び蛍光顕微鏡検査を倍率1000倍で実施した。GFPのデフォルトの励起波長及び発光波長では、細胞は、移動性の明るい蛍光であった。微粒子に吸着させることによって、細胞は固定化された(図20)。

【0227】

実施例9：細胞生存率実施例9.1：BacLite

Marathon A2微粒子(70%の樹脂：細胞の体積比)と共に2時間静的インキュベーション(50 mM TRIS、pH 8.0)し、生理的緩衝液で1:10希釈した後のE. coli細胞(10%v/v)の生存率。「BacLite」(Invitrogen)で細胞を染色した。生細胞(緑色)及び死細胞(赤色)が図21に示されている。

30

【0228】

実施例9.2：コッホのプレート

50 mM TRIS(pH 8.0)中で、E. coli細胞(10%v/v)を、粉碎したMarathon A2及びAmberlite IRA 458から得られた微粒子(70%v/vの樹脂：細胞の比)と共に3時間静的インキュベーションした後に、細胞生存率を決定した。細胞(E. coli GFP)及び細胞/樹脂懸濁液(1mlアリコート)を徐々に希釈し、滅菌0.9%w/w NaCl中で激しく1:10で混合した。ddH₂O中の微生物Merck 20g/l用栄養寒天(NA)を、121°の蒸気オートクレーブ内で15分間加熱した。希釈した懸濁液のアリコート(1ml)を培養皿に注ぎ、55°でテンパリングしたNA溶液と混合した。室温で30分経過した後、ゲル形成が完了したと考え、オーバーヘッドでプレートを37°で30時間インキュベーションした。

40

【0229】

陽イオン微粒子と共にインキュベーション後に、最大10³超のコロニー形成単位(CFU)を決定した。生理的緩衝液で1000倍希釈した後に、微粒子について関連するCFU値を求めたところ、吸着した細胞は増殖することができなかったことが示された。

【0230】

1000倍希釈した細胞(樹脂なし)、及び陽イオン微粒子によるGFP抽出後に1000倍希釈した細胞から、光学顕微鏡検査によって、細胞の同一性を決定した。サイズ、形状及び蛍光は、E. coli GFPに対応する。

50

【0231】

実施例10 疎水性微粒子

疏水性微粒子の調製

【0232】

DOWが提供している吸着型樹脂：Amberlite XAD4、Amberlite XAD7HP及びAmberlite XAD761は、Sigma Aldrich, Vienna, Austria, 2011から購入した。

【0233】

電気モーター駆動式セラミックコーティング乳鉢を用いて、樹脂を一晩粉碎（20gで約12時間）した。粉碎した樹脂を水（約10%v/v及びad. 50ml）に懸濁した。上清を $4000 \times g$ （相対遠心力と同等）で30分間遠心分離した。樹脂を2M塩化ナトリウム（50ml）に再懸濁し、1分間（ $4000 \times g$ ）遠心分離した。1分間遠心分離のペレットを廃棄した。上清を移し、再度30分間（ $4000 \times g$ ）遠心分離した。上清を廃棄した。粉碎した樹脂を水に（1:2で）再懸濁し、チューブに移した。樹脂を $4000 \times g$ で遠心分離し、上清を廃棄し、樹脂を水性洗浄溶液50mlに再懸濁した。

10

【0234】

洗浄手順は、以下のとおりであった：

1×50% EtOH（有機残留物の希釈）

3×脱イオン水（EtOHの希釈）

20

【0235】

疏水性微粒子の粒子径

【0236】

1%v/v及び倍率600倍における約500個の粒子の明視野顕微鏡の投影を測定することによって、微粒子の粒子径分布を円相当径から計算した。

20

【0237】

微粒子及び従来のクロマトグラフ媒体の吸着／脱離に関する一般的なプロトコール

【0238】

1mLバッヂ（ホモジネート又は標準タンパク質溶液）で吸着・脱離研究を実施した。様々な量の50%（v/v）微粒子懸濁液（μL単位）を、2mLチューブ内のタンパク質溶液に添加した。タンパク質濃度及び導電率に関する希釈係数を考慮した。

30

【0239】

微粒子懸濁液を30分間インキュベーションし、従来のクロマトグラフ媒体懸濁液を $12 \times g$ で10分間遠心分離し、溶出緩衝液1mLを添加し、激しく混合し、インキュベーションすることによって、結合したタンパク質の溶出を実施した。いくつかの場合では、溶出緩衝液による第2の洗浄工程を含めた。溶出後、先のように、微粒子又は従来のクロマトグラフ媒体を再度遠心分離した。光分析によって、上清中のタンパク質の濃度を定量し、SDS-PAGEによって、ターゲットタンパク質の純度をチェックした。

【0240】

実施例11 酸性生体分子の回収

40

以下の工程によって、微粒子（MP）（粉碎したクロマトグラフィー樹脂MARTHON A2（MA2））を使用して、E. coliの粗ホモジネート由来の組換えGFPのバッヂ吸着を実施した。本実施例では、酸性細胞内可溶性タンパク質としてGFPを使用する。

【0241】

5Lスケールのフェドバッヂプロセスで、E. coli株HMS174（DE3）（pET11a GFPmut3.1）を発酵した。IPTG（イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド）を使用して、細胞内可溶性ターゲットタンパク質GFP（緑色蛍光タンパク質）の発現を誘導した。

【0242】

50

採取及びホモジナイゼーション：E. coli懸濁液（バイオマス含量約30重量%）を4に冷却し、15000gで20分間遠心分離した。上清を廃棄し、細胞ペレットを更に処理した。細胞ペレットを50mM Tris（pH7.5）に再懸濁し、バイオマス含量20重量%細胞／緩衝液に希釈した。2継代の1000barでの高圧ホモジナイゼーションによって細胞を破碎して、粗細胞溶解物を得た。

【0243】

E. coli溶解物からのバッチ吸着の場合、凍結されたバイオマスを使用することも可能である。この場合、バイオマス（20%w/v）を50mM Tris（pH7.5）に再懸濁し、新鮮発酵E. coli細胞の場合と同じ破碎手順も適用し得る。

【0244】

ターゲットタンパク質の捕捉

【0245】

チューブでは1mL容量の小規模で、及びガラスピーカーでは最大100mLスケールで、バッチ吸着を室温（rt）で実施した。MA2を粗細胞溶解物に添加し（細胞ペレット1μg当たり50%v/v%MA2 1μLを添加した）、ラボボルテックスで約5秒間混合し、又はより大規模ではオーバーヘッドスターーラーで約30秒間混合した。混合中に、凝集が起り、MA2は、ターゲットタンパク質、並びにDNA、hcp（宿主細胞タンパク質）及び細胞フラグメントのような不純物に結合した。凝集後、サンプルを13400gで3分間遠心分離し、又はオーバーヘッド圧力のデッドエンドろ過において、1.5barで0.2μmフィルタープレートを使用してろ過した。上清を廃棄し、洗浄工程のためにペレット／フィルターケーキを更に処理した。

【0246】

凝集物の洗浄

75mM NaClを含む50mM Tris洗浄緩衝液（pH7.5）に、凝集物のペレットを再懸濁した。短時間インキュベーションした後、遠心分離（13400gで3分間）を使用して、凝集物を分離した。ろ過プロセスを使用して分離を行った際、フィルターケーキを再懸濁しなかったが、洗浄緩衝液をフィルターケーキ（0.2μmフィルタープレート、1.5bar）に通してろ過することによって洗浄した。上清を廃棄し、溶出工程のために、ペレット／フィルターケーキを更に処理した。低い塩濃度は、結合強度が弱い不純物を溶出することができる。

【0247】

溶出：溶出工程では、400mM NaClを含有する50mM Tris緩衝液（pH7.5）に、洗浄した凝集物を再懸濁した。タンブラー内で、凝集物を5分間混合した。400mM NaCl濃度では、MPからターゲットタンパク質が溶出して、上清中に存在している。遠心分離（13400gで3分間）を使用して又はデッドエンドろ過（0.2μmフィルタープレート、1.5bar）により、凝集物から上清を分離した。不純物が結合したMPを含有するペレット／フィルターケーキを廃棄し、目的のタンパク質（GFP）を含有する上清を更に処理した。

【0248】

GFPの溶出プロファイルを図22に示す。溶解物サンプルは、レーン1に見られ得る（これは、精製プロセスの出発物質である）。レーン2は、マーカー（Mark12TM）である。レーン3は、捕捉後の上清を示す。GFPバンドの欠如は、全てのGFP分子がMPに結合していることを示す。レーン4は、洗浄工程である。溶出は、100～400mM NaClで起こる。GFPの場合、溶出サンプルのプールにより、98%の収率及び約60%のレーン純度が得られた。

【0249】

実施例12 正に荷電した微粒子を使用した塩基性生体分子の回収

本実施例では、粉碎したMARATHON A2（MA2）樹脂由来のMPを使用した、細胞ホモジネートからの組換え発現塩基性タンパク質の回収を実証する。タンパク質インターフェロンガンマ（IFN-）は、発現した細胞内可溶性塩基性タンパク質の例と

10

20

30

40

50

して機能する。本実施例では、望ましくない細胞構造及び細胞内物質に結合させることによって、正に荷電した交換樹脂を生体分子の回収に使用し得ることを示す（逆精製と称される）。

【0250】

フェドバッチ発酵によって、*E. coli*においてIFN- γ を細胞内可溶性で発現させた。

【0251】

採取及びホモジナイゼーション

【0252】

インターフェロンガンマ(IFN- γ)を発現する細胞の凍結バイオマス(20%w/v)を使用し、溶解緩衝液(20mM Tris、10mM EDTA、1M尿素、0.1%β-メリカプトエタノール)に再懸濁した。3継代の950barでの高圧ホモジナイゼーションによって、細胞を破碎して、粗細胞溶解物を得た。細胞破碎はまた、新鮮なバイオマスでも機能するであろう。10

【0253】

ターゲットタンパク質の逆精製

【0254】

チューブ中、2mL容量の小規模で、バッチ吸着を室温(rt)で実施した。粗細胞溶解物をMA2(50%v/v)と混合し、ラボボルテックス内で約5秒間混合した(湿潤細胞ペレット1μg当たり50%v/v%MA2 0.7μLを添加した)。混合中に、凝集が起こり、MA2は、DNA、hcp(宿主細胞タンパク質)及び細胞フラグメントのような負に荷電した不純物に結合する。凝集後、サンプルを13400gで3分間遠心分離し、又はオーバーヘッド圧力のデッドエンドろ過において、1.5barで0.2μmフィルタープレートを使用してろ過した。不純物が結合したMPを含有するペレット/フィルターケーキを廃棄し、目的のタンパク質(IFN- γ)を含有する上清を更に処理した。20

【0255】

インターフェロンガンマ(IFN- γ)の溶出プロファイルを図23に示す。定量のために、レーン1はマークマーカーM12TMであり、その次のレーン2~4はBSAである。レーン5は、細胞ホモジネートである。レーン6は、HCP、DNA及び細胞フラグメントに結合する正に荷電した微粒子(Marathon A2)を添加した上清サンプルである。レーン7は、不純物を溶出するための1000mM NaClによる例示的なペレットの洗浄及びストリップを示す。収率は最大99%であり、純度は30%である。30

【0256】

実施例13 正に荷電した微粒子を使用した、*E. coli*細胞からの酸性生体分子の回収

本実施例では、MA2から調製した正に荷電したMPを使用した、インタクトな*E. coli*細胞からの酸性細胞内可溶性タンパク質の抽出を示す。本実施例では、使用するターゲットタンパク質は、GFPである。異なるGFP分子(それぞれGFPmut3.1及びGFP.1)を有する2つの異なる*E. coli*株(HMS174(DE3)及びBL21)を使用して、タンパク質抽出を示した。タンパク質抽出のための2つの変異体を行った。40

【0257】

実施例13.1

5Lスケールのフェドバッチプロセスで、*E. coli*株HMS174(DE3)(pET11a(GFPmut3.1)及びBL21(pBI1KT7ix.1_GFP.1))を発酵した。IPTG(イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド)を使用して、細胞内可溶性ターゲットタンパク質GFP(緑色蛍光タンパク質)の発現を誘導した。

【0258】

細胞の採取及び洗浄

【0259】

細胞を採取し、Flexboy(登録商標)Bags内において4℃で一晩(約12時間)保存し

50

た。E. coli懸濁液(バイオマス含量約30重量%)を4に冷却し、15000gで20分間遠心分離し、その後、同じバイオマス含量を含有する50mM Tris緩衝液(pH7.5)に再懸濁した。

【0260】

細胞の凝集及びタンパク質の回収

【0261】

実施例13.1では、E.coli細胞を結合及び凝集させるために、少量のMP(30%湿潤バイオマス含量において細胞懸濁液1mL当たりMA2(50%v/v)85μL)を使用する。MPが細胞と接触している間に、抽出が起こり、ターゲットタンパク質(ここではGFP)が放出され、上清中に蓄積した。2~3時間インキュベーションした後、抽出が完了し、デッドエンドろ過(0.2μmフィルターブレート、1.5bar)又は遠心分離(13000gで3分間)を使用して、凝集した細胞を分離した。細胞ペレット/フィルターケーキを廃棄し、ターゲットタンパク質を含有する上清を更に処理した。
10

【0262】

実施例13.2

本実施例では、より多くの微粒子を細胞懸濁液に添加した。より多量の微粒子は、直接的にターゲットタンパク質の結合及び抽出を可能にした。

【0263】

5Lスケールのフェッドバッチプロセスで、E.coli株HMS174(DE3)(pET11a(GFPmut3.1)及びBL21(pB11KT7ix.1_GFP.1)を発酵した。IPTG(イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド)を使用して、細胞内可溶性ターゲットタンパク質GFP(緑色蛍光タンパク質)の発現を誘導した。
20

【0264】

細胞の採取及び洗浄

【0265】

細胞を採取し、Flexboy(登録商標)Bags内において4で一晩(約12時間)保存した。E.coli懸濁液(バイオマス含量約30%湿潤)を4に冷却し、15000gで20分間遠心分離し、その後、同じバイオマス含量を含有する50mM Tris緩衝液(pH7.5)に再懸濁した。

【0266】

細胞の凝集及びタンパク質の回収

【0267】

実施例13.2では、E.coli細胞を結合及び凝集させるために、実施例13.1と比較して多量の微粒子(30%湿潤バイオマス含量において細胞懸濁液1mL当たりMA2(50%v/v)350μL)を使用する。微粒子が細胞と接触している間に、ターゲットタンパク質の抽出が起こり、MPがタンパク質に直接結合した。1.5~2.5時間インキュベーションした後、抽出が完了した。デッドエンドろ過(0.2μmフィルターブレート、1.5bar)又は遠心分離(13000gで3分間)を使用して、上清を分離した。上清を廃棄し、凝集物のペレット(ターゲットタンパク質)を更に処理した。
30

【0268】

凝集物の洗浄

【0269】

75mM NaClを含む50mM Tris洗浄緩衝液(pH7.5)に、凝集物のペレットを再懸濁した。短時間インキュベーションした後、遠心分離(13400gで3分間)を使用して、凝集物を分離した。ろ過プロセスを使用して分離を行った際、フィルターケーキを再懸濁しなかったが、洗浄緩衝液をフィルターケーキ(0.2μmフィルターブレート、1.5bar)に通してろ過することによって洗浄した。上清を廃棄し、溶出工程のために、ペレット/フィルターケーキを更に処理した。低い塩濃度は、結合強度が弱い不純物を溶出することができる。
40

【0270】

10

20

30

40

50

溶出

【0271】

溶出工程では、400mM NaClを含有する50mM Tris緩衝液(pH7.5)に、洗浄した凝集物を再懸濁した。タンブラー内で、凝集物を5分間混合した。400mM NaCl濃度では、MPからターゲットタンパク質が溶出して、上清中に存在している。遠心分離(13400gで3分間)を使用して又はデッドエンドろ過(0.2μmフィルターブレート、1.5bar)により、凝集物から上清を分離した。不純物が結合したMPを含有するペレット/フィルターケーキを廃棄し、目的のタンパク質(GFP)を含有する上清を更に処理した。

【0272】

図24は、2つの異なるインキュベーション時間(1時間及び2時間)に関する実施例13.2のGFPの収率を示す棒グラフである。1は、捕捉上清中のGFPの量を示す。2は、凝集物の洗浄工程における洗浄緩衝液中のGFPの量を示す。1及び2では、GFPの漏出は見られなかった。3は、50mM Tris中の400mM NaClによる溶出を示しており、MPからGFPが溶出し、上清中に蓄積した。4は、化学的破碎方法を使用して溶解した細胞における最大GFP量を示す。

【0273】

実施例14 正に荷電した微粒子を使用した、細胞からの塩基性タンパク質の回収

実施例1に記載されているように、Dowex M-A2陰イオン交換樹脂を粉碎して微粒子を得ることによって、正に荷電した微粒子を調製する。

【0274】

フェドバッチ発酵によって、E. coliにおいてIFN- α を細胞内可溶性で発現させた。

【0275】

細胞の採取及び洗浄

【0276】

細胞を採取し、Flexboy(登録商標)Bags内において4℃で一晩(約12時間)保存した。E. coli懸濁液(バイオマス含量約30重量%)を4℃に冷却し、15000gで20分間遠心分離し、その後、同じバイオマス含量を含有する緩衝液(20mM Tris、10mM EDTA、1M尿素、0.1%β-メルカプトエタノール)に再懸濁した。

【0277】

細胞の凝集及びタンパク質の回収

【0278】

E. coli細胞を結合及び凝集させるために、(30%湿潤バイオマス含量において)細胞懸濁液1mL当たりMP(MA2(50%v/v)85μL)を細胞懸濁液に添加する。MPが細胞と接触している間に、抽出が起こり、ターゲットタンパク質(ここではIFN- α)が放出され、上清中に蓄積した。2~3時間インキュベーションした後、抽出が完了し、デッドエンドろ過(0.2μmフィルターブレート、1.5bar)又は遠心分離(13000gで3分間)を使用して、凝集した細胞を分離した。細胞ペレット/フィルターケーキを廃棄し、ターゲットタンパク質を含有する上清を更に処理した。

【0279】

実施例15 負に荷電したキレート微粒子を使用した、細胞からの塩基性タンパク質の回収

キレート陽イオン交換樹脂Amberlite IRC748から、微粒子を調製する。

【0280】

フェドバッチ発酵によって、E. coliにおいてIFN- α を細胞内可溶性で発現させた。

【0281】

細胞の採取及び洗浄

10

20

30

40

50

【0282】

細胞を採取し、Flexboy（登録商標）Bags内において4度一晩（約12時間）保存した。E. coli懸濁液（バイオマス含量約30重量%）を4度に冷却し、15000gで20分間遠心分離し、その後、同じバイオマス含量を含有する緩衝液（20mM Tris、10mM EDTA、1M尿素、0.1% - メルカプトエタノール）に再懸濁した。

【0283】

細胞の凝集及びタンパク質の回収

【0284】

E.coli細胞を結合及び凝集させるために、（30%湿潤バイオマス含量において）細胞懸濁液1mL当たりMP（Amberlite IRA-748（50%v/v）85μLを細胞懸濁液に添加する。MPが細胞と接触している間に、抽出が起り、ターゲットタンパク質（ここではIFN-）が放出され、上清中に蓄積した。2~3時間インキュベーションした後、抽出が完了し、デッドエンドろ過（0.2μmフィルターブレード、1.5bar）又は遠心分離（13000gで3分間）を使用して、凝集した細胞を分離した。細胞ペレット／フィルターケーキを廃棄し、ターゲットタンパク質を含有する上清を更に処理した。

10

【0285】

実施例16 イオン交換樹脂からの微粒子の調製

異なるタイプのイオン交換樹脂をSigma Aldrich及びDIAIONから購入した。

20

【0286】

以下の陰イオン交換樹脂を使用した：Amberlite IRA-400、Amberlite IRA-743、Dowex 1X2-100、Dowex 1X2-400、Dowex 1X8-100、Marathon A2、DIAION SA20A、DIAION SA10A、DIAION SA312

【0287】

以下の陽イオン交換樹脂を使用した：Dowex 50 WX2-100、Dowex 50 WX8-100、Marathon C、Marathon MSC、DIAION PK216、DIAION SK110。

【0288】

コーティングセラミック乳鉢において、樹脂を手動で約30分間湿式粉碎（20gで1/2時間）した。粉碎した樹脂を水（ad 50ml）に懸濁した。一定期間（約96時間）後、樹脂沈殿物の上清をチューブに移した。チューブ当たり樹脂約200μlを収集するまで、上清を7000rcf（相対遠心力）で区分的（1ml）に15分間遠心分離した。樹脂を2M塩化ナトリウム（1.5ml）に再懸濁し、1分間遠心分離（7000rcf）した。1分間遠心分離のペレットを廃棄した（Amberlite IRA-743を除く）。上清を移し、再度15分間遠心分離（7000rcf）した。15分間遠心分離の上清を廃棄した。また、2M塩化ナトリウム中で、微粒子(micro particle)（約200μl）を遠心分離した。微粒子(micro particle)（約150μL）及び他の粉碎した樹脂（50~200μl）を水に再懸濁（1:4）し、少しづつ（樹脂50μl）チューブに移した。

30

【0289】

樹脂のアリコートを7000rcfで遠心分離し、上清を廃棄し、樹脂を20倍容量（約1ml）の水性洗浄溶液に再懸濁した。溶液中のインキュベーション時間は、30分間であった。

40

【0290】

洗浄手順：

- 1×50% EtOH（有機残留物の希釈）
- 3×脱イオン水（EtOHの希釈）
- ほぼ中性pHのチェック
- 微粒子(micro particle)及び粉碎した樹脂を脱イオン水に再懸濁（約70%v/v）
- 特定の実験に使用した対応する緩衝液で樹脂を平衡化した。

50

【0291】

光学顕微鏡検査を使用した粒子径の決定

ソフトウェアベースのサイズ決定を使用して光学顕微鏡検査によって、調製した微粒子の粒子径を決定した。相対直径の推定によって、粉碎した材料及び微粒子(micro particle)の粒子径を倍率1000倍で測定した。1%v/vにおける1000~5000個の粒子の直径サイズの比較によって、分布を計算した。結果を表3に示す。

【表3】

陰イオン型交換体	リガンド	d (mm)	q BSA
Amberlite IRA-400	-N ⁺ -(CH ₃) ₃ (1型)	0.3-1.2	0.3±0.11
Amberlite IRA-743	メチルグルカミン	0.5-0.7	6.1±0.25
Dowex 1X2-100	-N ⁺ -(CH ₃) ₃ (1型)	0.1-0.5	0.5±0.18
Dowex 1X2-400	-N ⁺ -(CH ₃) ₃ (1型)	0.04-0.07	0.8±0.01
Dowex 1X8-100	-N ⁺ -(CH ₃) ₃ (1型)	0.1-0.5	0.4±0.03
Marathon A2	-N ⁺ -(CH ₂ -CH ₂ OH)-(CH ₃) ₂ (2型)	0.4-0.6	0.2±0.02
DIAION SA20A	ジメチルエタノールアミン	0.3 - 1.18	n.a.
DIAION SA10A	トリメチルアミン	0.3 - 1.18	n.a.
DIAION SA312	トリメチルアミン	0.3 - 1.18	n.a.
陽イオン型交換体	リガンド	d (mm)	
Dowex 50 WX2-100	-SO ₃ ⁻	n.a.	n.a.
Dowex 50 WX8-100	-SO ₃ ⁻	n.a.	n.a.
Marathon C	-SO ₃ ⁻	1.2	n.a.
Marathon MSC	-SO ₃ ⁻	1.2	n.a.
DIAION PK216	スルホン	0.3 - 1.18	n.a.
DIAION SK110	スルホン	0.3 - 1.18	n.a.

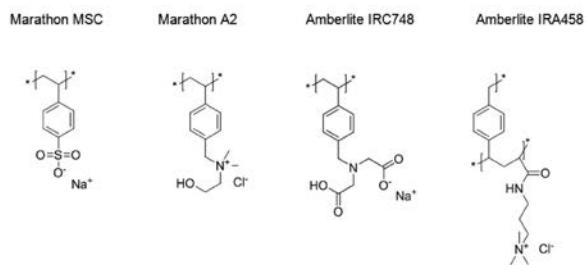
表3には、微粒子の調製に使用した樹脂が記載されている。

10

20

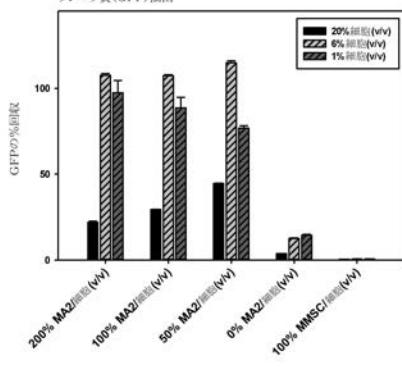
30

【図1】



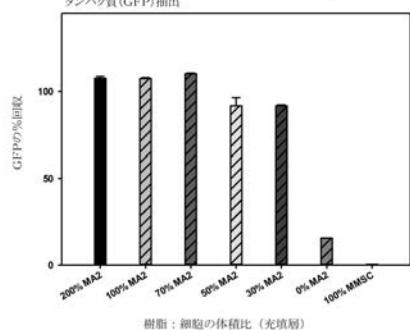
【図2】

様々な細胞濃度で1時間インキュベーション(50mM Tris, pH8.0)した後における、陰イオン微粒子(粉碎したMarathon A2及びMarathon MSC)による細胞(E.coli)からのタンパク質(GFP)抽出



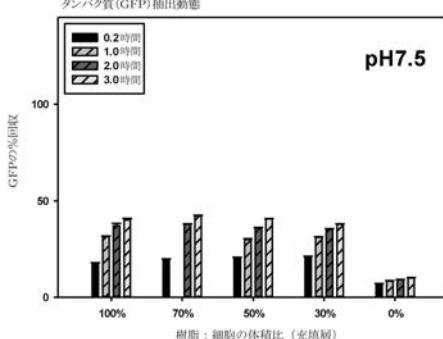
【図3】

1時間インキュベーション(50mM Tris, pH8.0)した後における、陰イオン微粒子(粉碎したMarathon A2)による細胞(E.coli)からのタンパク質(GFP)抽出



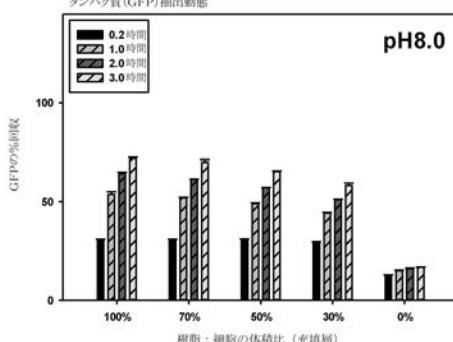
【図4 a】

様々な体積比の樹脂と共にpH7.5でインキュベーションした後における、陰イオン微粒子(粉碎したMarathon A2)による細胞プロス(E.coli)からのタンパク質(GFP)抽出動態



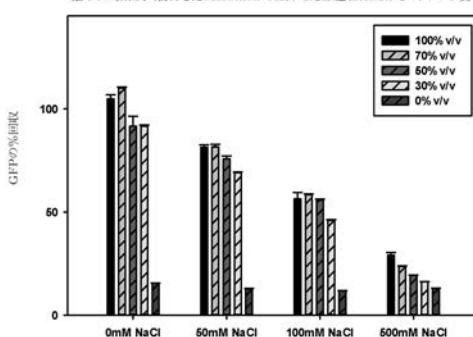
【図4 b】

様々な体積比の樹脂と共にpH8.0でインキュベーションした後における、陰イオン微粒子(粉碎したMarathon A2)による細胞プロス(E.coli)からのタンパク質(GFP)抽出動態



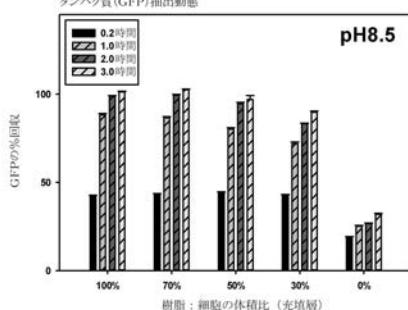
【図5】

1時間インキュベーション(50mM Tris, pH8.0)した後における、陰イオン微粒子(粉碎したMarathon A2)による細胞(E.coli)からのタンパク質(GFP)抽出



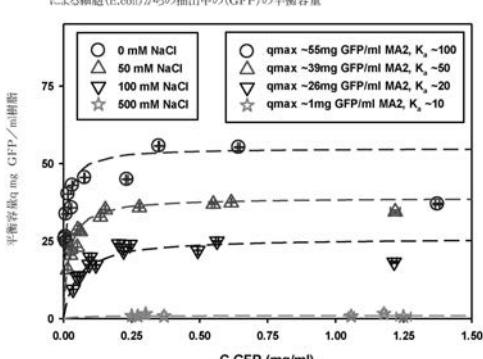
【図4 c】

様々な体積比の樹脂と共にpH8.5でインキュベーションした後における、陰イオン微粒子(粉碎したMarathon A2)による細胞プロス(E.coli)からのタンパク質(GFP)抽出動態

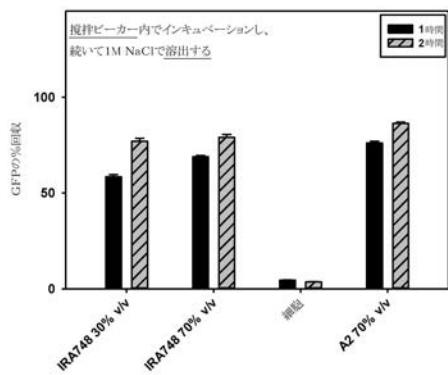


【図6】

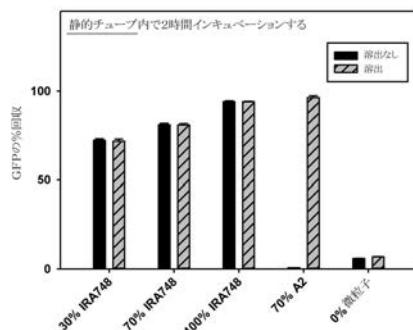
様々なNaCl濃度(50mM Tris, pH8.0)における、陰イオン微粒子(粉碎したMarathon A2)による細胞(E.coli)からの抽出中の(GFP)の平衡容量



【図 7 a】

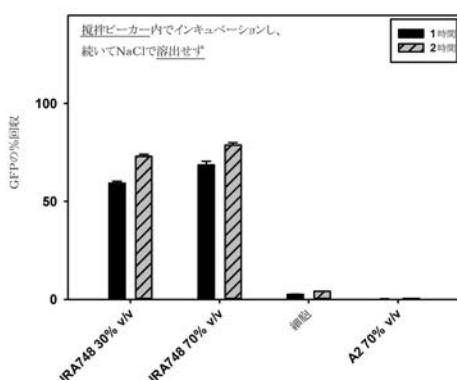


【図 8】

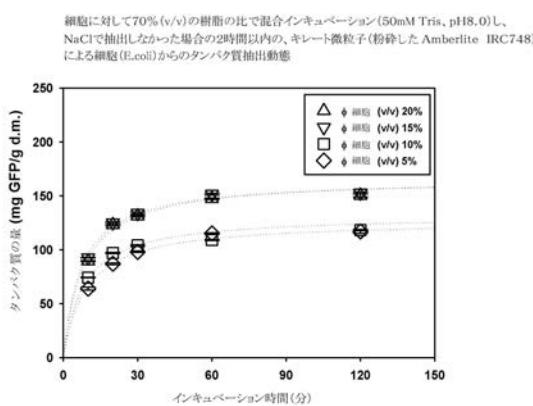


【図 9】

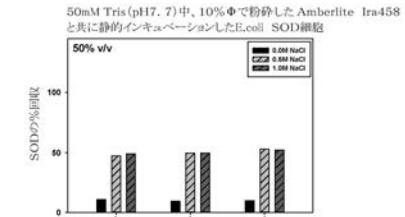
【図 7 b】



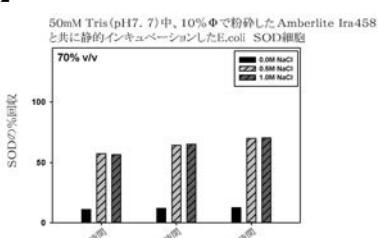
【図 10】



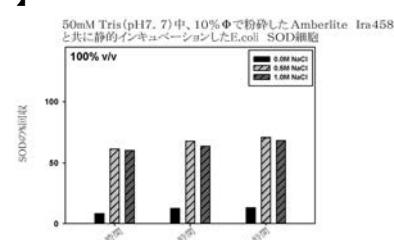
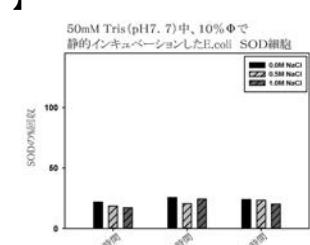
【図 11 b】



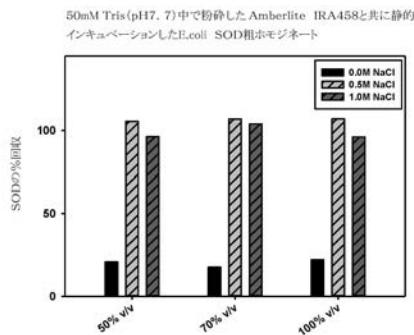
【図 11 c】



【図 11 d】

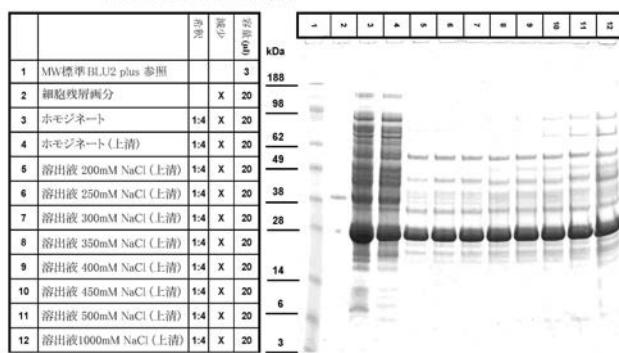


【図12】



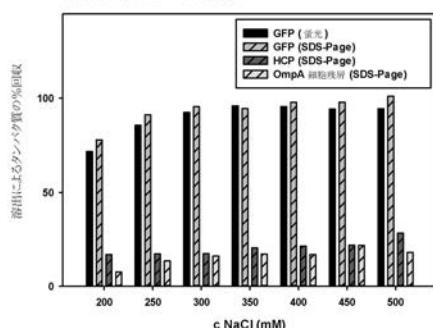
【図13】

50mM Tris(pH8.0)中で粉砕したMarathon A2吸着(3時間)及びNaClによる溶出による、E.coli HMS174からのGFPmut3.1抽出



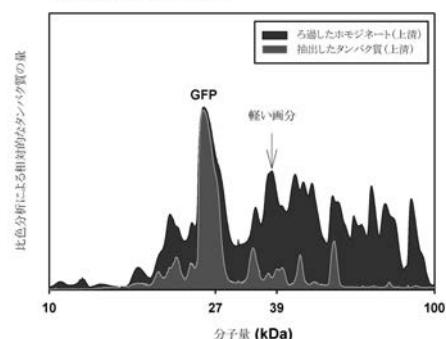
【図14】

3時間インキュベーション(50mM Tris, pH8.0)し、漸増濃度のNaClで溶出した後における、陰イオン微粒子(粉砕したMarathon A2)による、細胞(E.coli)からのタンパク質抽出



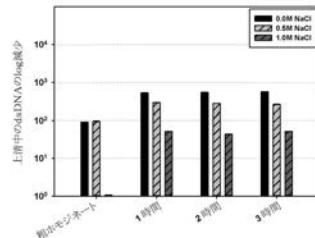
【図15】

3時間静的インキュベーション(50mM Tris, pH8.0)し、350mM NaClで溶出した後における、陰イオン微粒子(粉砕したMarathon A2)による、細胞(E.coli)からのタンパク質抽出



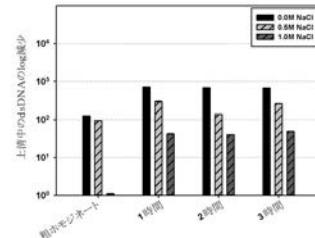
【図16a】

10%Φの細胞に対する50%(v/v)の樹脂の比で粉砕したAmberlite IRA458と共にインキュベーションしたE.coli SOD粗ホモジネート及び細胞



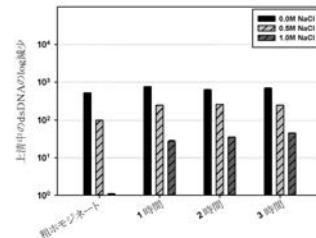
【図16b】

10%Φの細胞に対する70%(v/v)の樹脂の比で粉砕したAmberlite IRA458と共にインキュベーションしたE.coli SOD粗ホモジネート及び細胞



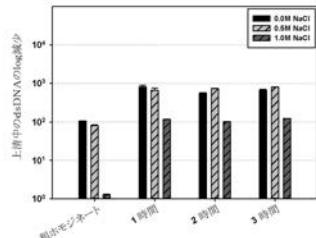
【図16c】

10%Φの細胞に対する100%(v/v)の樹脂の比で粉砕したAmberlite IRA458と共にインキュベーションしたE.coli SOD粗ホモジネート及び細胞

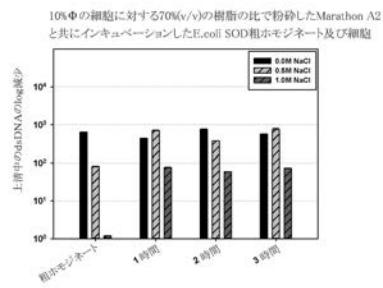


【図16d】

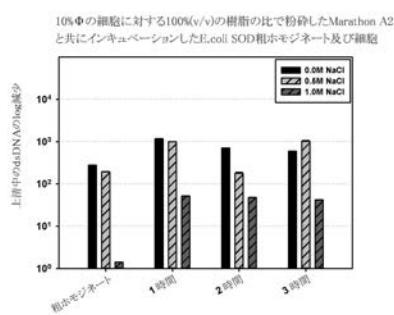
10%Φの細胞に対する50%(v/v)の樹脂の比で粉砕したMarathon A2と共にインキュベーションしたE.coli SOD粗ホモジネート及び細胞



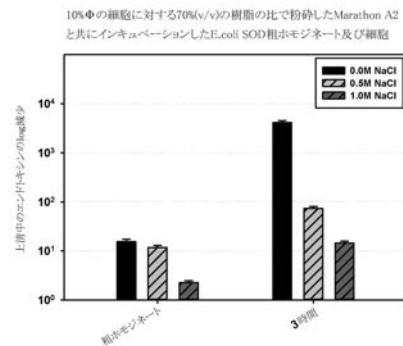
【図 16 e】



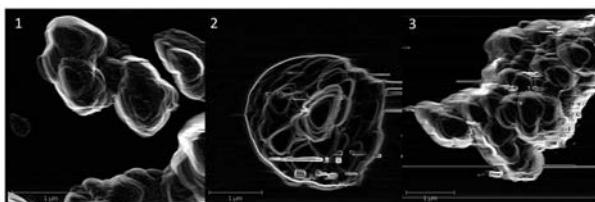
【図 16 f】



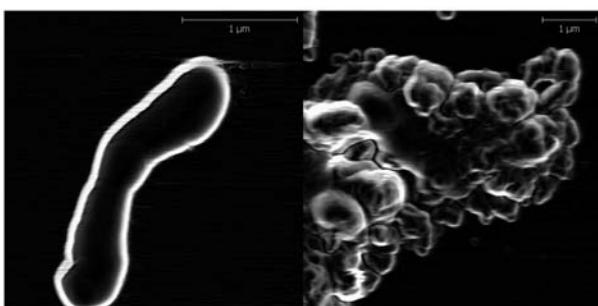
【図 17】



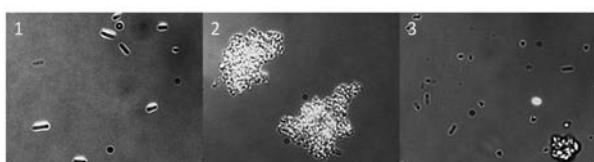
【図 18】



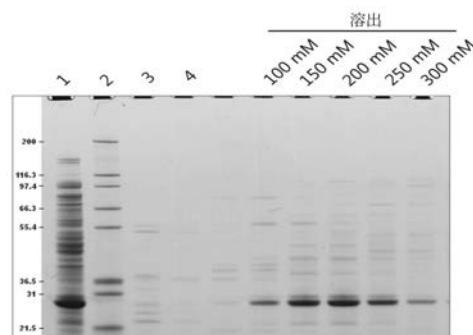
【図 19】



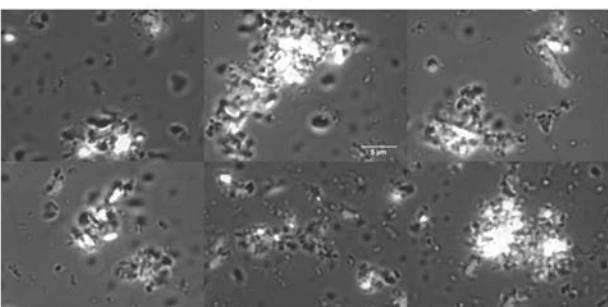
【図 20】



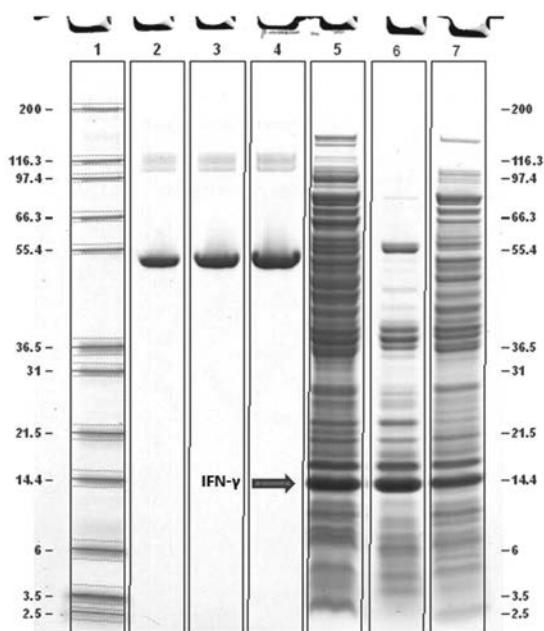
【図 22】



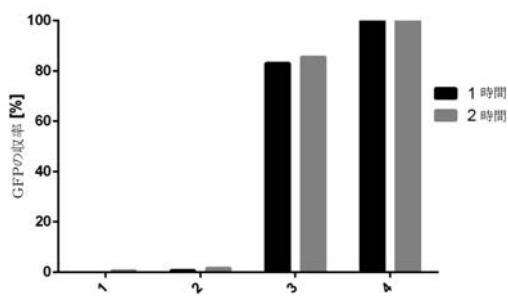
【図 21】



【図23】



【図24】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/068015

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K1/18
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data, EMBASE, FSTA, MEDLINE, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PARIL CHRISTINA ET AL: "Adsorption of pDNA on microparticulate charged surface", OPTIMISED MAMMALIAN EXPRESSION THROUGH THE COUPLING OF CODON ADAPTATION WITH GENE AMPLIFICATION: MAXIMUM YIELDS WITH MINIMUM EFFORT,, vol. 141, no. 1-2, 20 April 2009 (2009-04-20), pages 47-57, XP026049501, ISSN: 1873-4863 abstract page 48, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 4 page 52 - page 56 -----	1-3,8, 11,12
Y	page 48, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 4 page 52 - page 56 -----	9 -/-

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

17 October 2014

21/01/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Strobel, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/068015

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROUNDS M A ET AL: "Poly(styrene-divinylbenzene)-based strong anion-exchange packing material for high-performance liquid chromatography of proteins", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V, NL, vol. 397, 26 June 1987 (1987-06-26), pages 25-38, XP026509709, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/S0021-9673(01)84987-6 [retrieved on 1987-06-26] the whole document -----	1,2,8,12
Y	KRIZKOVA SONA ET AL: "Rapid superparamagnetic-beads-based automated immunoseparation of Zn-proteins from Staphylococcus aureus with nanogram yield.", ELECTROPHORESIS JAN 2013, vol. 34, no. 2, January 2013 (2013-01), pages 224-234, XP002717971, ISSN: 1522-2683 abstract page 225, right-hand column, paragraph 3 - page 227, left-hand column, paragraph 1; figures 1,3 -----	9
X	WO 86/06727 A1 (COMMW SERUM LAB COMMISSION [AU]) 20 November 1986 (1986-11-20) page 13, line 17 - page 14, line 7; claims 1-3,5 -----	1,2,7,8, 12
Y		9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP2014/068015

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-3, 7-9, 11, 12(all partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2014/ 068015

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-3, 7-9, 11, 12(all partially)

Use of positively charged microparticles for biomolecule recovery

2. claims: 1-3, 5-12(all partially)

Use of positively charged microparticles and of negatively charged microparticles for biomolecule recovery

3. claims: 1-3, 7, 8, 10-12(all partially)

Use of negatively charged microparticles for biomolecule recovery

4. claims: 4, 7-9, 11, 13-16(all partially)

Use of positively charged microparticles for cell disruption

5. claims: 4-11, 13-16(all partially)

Use of positively charged microparticles and of negatively charged microparticles for cell disruption

6. claims: 4, 7, 8, 10, 11, 13-16(all partially)

Use of negatively charged microparticles for cell disruption

7. claims: 17, 18(partially)

A biological fluid comprising positively charged microparticles

8. claims: 17, 18(partially)

A biological fluid comprising positively charged microparticles and negatively charged microparticles

9. claims: 17, 18(partially)

A biological fluid comprising negatively charged microparticles

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/068015

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8606727 A1	20-11-1986	DK 21187 A EP 0222838 A1 JP S63500656 A NZ 216094 A WO 8606727 A1	13-03-1987 27-05-1987 10-03-1988 28-06-1989 20-11-1986

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
B 01 J	39/18	(2006.01)	G 01 N	30/88 101S
B 01 J	39/20	(2006.01)	G 01 N	30/88 101M
B 01 J	41/14	(2006.01)	B 01 J	41/12
B 01 J	47/10	(2006.01)	B 01 J	39/18
B 01 J	39/04	(2006.01)	B 01 J	39/20
B 01 J	41/04	(2006.01)	B 01 J	41/14
B 01 J	45/00	(2006.01)	B 01 J	47/10
			B 01 J	39/04 110
			B 01 J	39/04 120
			B 01 J	41/04 110
			B 01 J	41/04 120
			B 01 J	45/00

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG

(72)発明者 ハーン , ライナー

オーストリア国 アー - 1180 ヴィーン、レオポルト - エルнст - ガッセ 4 / 2 / 1

(72)発明者 ユングバウアー , アロイス

オーストリア国 アー - 1210 ヴィーン、イハガッセ 31 - 1

(72)発明者 トレフィロフ , アレクサンドゥル

オーストリア国 アー - 1170 ヴィーン、クロップシュトックガッセ 26 / 11

F ターム(参考) 4B065 AA01X AA26X AA87X AB01 AC14 BD01 BD02 CA23 CA24

4H045 AA50 CA11 CA40 FA71 FA74 GA20 GA23