

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-5461

(P2016-5461A)

(43) 公開日 平成28年1月14日(2016.1.14)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 5

審査請求 有 請求項の数 15 O L 外国語出願 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2015-139021 (P2015-139021) (22) 出願日 平成27年7月10日 (2015.7.10) (62) 分割の表示 特願2013-526412 (P2013-526412) の分割 原出願日 平成23年8月25日 (2011.8.25) (31) 優先権主張番号 10008997.8 (32) 優先日 平成22年8月30日 (2010.8.30) (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	(71) 出願人 591003013 エフ・ホフマンーラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCHE E AKTIENGESELLSCHAFT スイス・シーエイチー4070バーゼル・ グレンツアーヘルストラッセ124 (74) 代理人 110001508 特許業務法人 津国 (72) 発明者 シャンツ, クリスティアン ドイツ国、82377 ペンツベルク、イ ム・ヴィースフェルト 11 Fターム(参考) 4B024 AA03 BA80 DA06 EA04 4B065 AA26X AB01 AC14 AC20 BA02 BB02 BB03 BB08 BB12 BB15 BC03 BC05 CA24
---	---

(54) 【発明の名称】 アルカリ性フィード

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ポリペプチドを発現する原核細胞を培養する方法の提供。

【解決手段】 ポリペプチドを発現するエシェリキアコリイ細胞を培養するための方法であって、培養中におけるアスパラギン酸塩、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシンから選択されるアミノ酸のアルカリ溶液の添加を含み、アミノ酸はアルカリ溶液中において、20℃及び中性pHにおける水中のその溶解度よりも高い濃度を有し、30g/l以上の濃度を有し、アルカリ溶液は、10% (w/v) 以上のアンモニア溶液である培養方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリペプチドを発現するエシェリキアコリィ (*Escherichia coli*) 細胞を培養するための方法であって、培養は、培養中におけるアスパラギン酸塩 (aspartate)、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンから選択されるアミノ酸のアルカリ溶液の添加を含むことを特徴とし、

アミノ酸はアルカリ溶液中において、20℃および中性 pH における水中のその溶解度よりも高い濃度を有し、そしてアミノ酸は 30 g/l 以上の濃度を有し、そして

アルカリ溶液は、10% (w/v) 以上のアンモニア溶液であり、そして

培養した細菌細胞の乾燥細胞重量は、培養の 1 時点において少なくとも 20 g/l である、前記方法。

【請求項 2】

以下の工程

a) ポリペプチドをコードする核酸を含むエシェリキアコリィ (*Escherichia coli*) 細胞を培養する工程、

b) 培養中にアスパラギン酸塩、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンから選択されるアミノ酸を含むアルカリ溶液を用いて pH 値を調整する工程、

c) 細胞または培養培地からポリペプチドを回収し、そしてそれによりポリペプチドを産生する工程

を含むポリペプチドを産生するための方法であって、

アミノ酸は、アルカリ溶液中において 30 g/l 以上の濃度を有し、そして

アルカリ溶液は、10% (w/v) 以上のアンモニア溶液である、前記方法。

【請求項 3】

細菌細胞がアミノ酸栄養要求性細胞であり、そして栄養要求性が、アスパラギン酸塩、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンから選択されるアミノ酸に対してであることを特徴とする、請求項 1～2 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 4】

アルカリ溶液が、9 以上の pH 値を有することを特徴とする、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

ポリペプチドがヒトアポリポタンパク質 A1 またはその誘導体であることを特徴とする、請求項 1～4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

アポリポタンパク質 A1 が、配列番号 01～35 から選択されるアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

アポリポタンパク質 A1 が、配列番号 01、02、34 および 35 から選択されるアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

アミノ酸が、約 50 g/l の濃度を有することを特徴とする、請求項 1～7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

アルカリ溶液が、アンモニア約 12.5% (w/v) のアンモニア水溶液であることを特徴とする、請求項 1～8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】

アミノ酸がロイシンであることを特徴とする、請求項 1～9 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 1】

アルカリ溶液がロイシンおよびプロリンを含むことを特徴とする、請求項 1～10 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 2】

アルカリ溶液が約 12.5 % (w/v) のアンモニア溶液であり、そして各々約 50 g/l の濃度のアミノ酸のロイシンおよびプロリンを含むことを特徴とする、請求項 1～11 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 3】

細菌細胞の培養におけるフィードとしてのアミノ酸のアルカリ溶液の使用であって、アミノ酸は、アスパラギン酸塩、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンから選択され、そして培養は、20 g/l 以上の乾燥細胞重量までであり、そしてアミノ酸はアルカリ溶液中において 30 g/l 以上の濃度を有し、そしてアルカリ溶液は 10 % (w/v) 以上のアンモニア溶液である、前記使用。

【請求項 1 4】

細菌細胞がアミノ酸栄養要求性細胞であり、そして栄養要求性が、アスパラギン酸塩、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンから選択されるアミノ酸に対してであることを特徴とする、請求項 13 記載の使用。

【請求項 1 5】

エシェリキアコリイ (*Escherichia coli*) 細胞は、アミノ酸栄養要求性エシェリキアコリイ (*Escherichia coli*) 細胞であることを特徴とする、請求項 2～12 のいずれか 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書において、ポリペプチドの産生のための化学的に既知組成培地中におけるエシェリキアコリイ (*Escherichia coli*) 株などの原核細胞の高細胞密度培養のための方法を報告し、アミノ酸が、培養培地の pH を調節し、同時に窒素源としても作用する、濃縮アルカリ溶液によって供給される。

【0002】

発明の背景

近年、タンパク質の生産は着実に増加し、そしてタンパク質は近い将来に種々の疾病の治療に利用できる最大の治療薬群になる可能性がある。タンパク質の効果は、その特異性、例えば特異的なターゲット認識および結合機能から生じる。

【0003】

細胞培養は発酵プロセスで使用され、これにより物質、特にタンパク質が産生される。細胞培養が遺伝子的に改変されておらず、そしてそれ自体の代謝産物を形成するプロセスと、生物が、タンパク質などのより大量のそれ自身の物質を産生するか、または外来物質を産生するように遺伝的に改変されているプロセスとの間で区別される。物質を産生する生物に、生物の生存を保証し、そして所望のターゲット化合物の産生を可能とする、栄養培地を供給する。特定の宿主の最適な培養を可能とするこれらの目的のための数多くの培養培地が知られている。

【0004】

エシェリキアコリイ (*Escherichia coli*) の高細胞密度培養は、Riesenber (Riesenber, D., et al., Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991) 380-384) および Horn (Horn, U., et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 46 (1996) 524-532) によって報告されている。Riesenber, D. および Guthke, R. (Appl. Microbiol. Biotechnol. 51 (1999) 422-430) は

、微生物の高細胞密度培養を報告した。E.coliを高細胞密度まで増殖させることは、Shiloach, J.およびFass, R. (Biotechnol. Advances 23 (2005) 345-357)によって概説されている。

【0005】

WO91/10721では攪拌ボイラー発酵槽におけるEscherichia coliの高細胞密度発酵のためのプロセスが報告されている。プラスミドDNA産生および精製の方法がWO97/29190に報告されている。溶存酸素濃度および酸素移動速度を制御することによる好気性水浸微生物培養液の増殖の制御は、DD295867に報告されている。EP0866876では、高細胞密度発酵によるE.coliにおける組換えタンパク質の調製が報告されている。

10

【0006】

WO03/048374では、芳香族アミノ酸代謝物またはその誘導体の産生プロセスが報告されている。高細胞密度発酵によるE.coliにおける組換えタンパク質の調製プロセスがWO97/21829に報告されている。

【0007】

発明の要約

アミノ酸をアルカリ溶液において培養培地に加えるならば、原核細胞、特にアミノ酸栄養要求性E.coli K12株を高細胞密度で化学的に既知組成培地で培養することができることが判明した。

【0008】

本明細書に報告した1つの局面は、細菌細胞、特にE.coli細胞を高細胞密度で培養するための方法であり、前記細胞は組換えポリペプチドを発現し、培養は、培養中におけるアスパラギン酸塩 (aspartate)、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンから選択されたアミノ酸のアルカリ溶液の添加を含み、

アミノ酸はアルカリ溶液において、20℃および中性pHにおける水中のその溶解度よりも高い濃度を有し、そして

培養した細菌細胞の乾燥細胞重量は、培養の1時点において少なくとも20 g/lである。

20

【0009】

本明細書に報告した1つの局面は、以下の工程

a) ポリペプチドをコードする核酸を含む、細菌細胞、特にE.coli細胞を準備する工程

、

b) 準備した細胞を培養する工程、

c) 培養中にアスパラギン酸塩 (aspartate)、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンから選択されたアミノ酸を含むアルカリ溶液を用いてpH値を調整する工程、

d) 細胞または培養培地からポリペプチドを回収し、そしてこれによりポリペプチドを産生する工程

を含む、ポリペプチドを産生するための方法である。

30

40

【0010】

本明細書に報告した別の局面は、細菌細胞の培養中におけるpH値を調整するためのアミノ酸を含むアルカリ溶液の使用である。

【0011】

また、本明細書に報告した局面は、細菌細胞の培養におけるフィード (feed) としてのアミノ酸のアルカリ溶液の使用であり、アミノ酸はアスパラギン酸塩 (aspartate)、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンから選択され、そして培養は、20 g/l以上の乾燥細胞重量までである。

50

【0012】

以下は、以前に概略を示した全ての局面の具体的な態様である。

【0013】

1つの態様において、アミノ酸は水難溶性アミノ酸である。1つの態様において、細菌細胞はアミノ酸栄養要求性細胞であり、そして栄養要求性は、アスパラギン酸塩 (aspartate)、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンから選択されたアミノ酸に対してである。別の態様において、細菌細胞は *Escherichia coli* 細胞またはその突然変異体である。さらなる態様において、アミノ酸は 20℃ の水中において 50 g/l 以下の溶解度を有する。さらなる態様において、アミノ酸は 20℃ の水中において 40 g/l 以下の溶解度を有する。また1つの態様において、アミノ酸は、アスパラギン酸塩 (aspartate)、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンから選択される。別の態様において、アミノ酸は、アスパラギン酸塩 (aspartate)、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、ロイシン、トリプトファンおよびチロシンから選択される。1つの態様において、アミノ酸はロイシンである。さらに別の態様において、アミノ酸はアルカリ溶液中において、20℃ の水中におけるその溶解度よりも高い濃度を有する。1つの態様において、溶解度は、20℃ の水中の溶解度よりも2倍高く、別の態様において3倍高い。別の態様において、溶解度は、20℃ および pH 6~8 の pH 値の水中の溶解度よりも高い。1つの態様において、アミノ酸はアルカリ溶液中において 25 g/l 以上、またはさらなる態様において 30 g/l 以上、またはさらに別の態様において 35 g/l 以上の濃度を有する。1つの態様において、アミノ酸は、アルカリ溶液中において 45 g/l 以上の濃度を有する。1つの態様において、アミノ酸は、アルカリ溶液中において約 50 g/l の濃度を有する。さらなる態様において、アルカリ溶液は、9以上の、さらなる態様において10以上の、また別の態様において10.5以上の pH 値を有する。1つの態様において、アルカリ溶液は、5% (w/v) より高い、または10% (w/v) 以上、または15% (w/v) 以上のアンモニア溶液である。1つの態様において、アルカリ溶液は、約12.5% (w/v) のアンモニア水溶液である。また1つの態様において、ポリペプチドはヒトアポリボタンパク質 A1 またはその誘導体である。さらなる態様において、アポリボタンパク質 A1 は、配列番号 01~配列番号 35 から選択されたアミノ酸配列を有する。1つの態様において、ポリペプチドは、配列番号 01、配列番号 02、配列番号 34 または配列番号 35 から選択されたアミノ酸配列を有する。

【0014】

発明の詳細な説明

本明細書において、原核細胞、例えばアミノ酸栄養要求性細菌細胞を培養するための方法を報告し、少なくとも1つのアミノ酸、例えば細胞が栄養要求性であるアミノ酸を、アルカリ溶液に加える。

【0015】

少なくとも1つのアミノ酸（例えば、細胞が栄養要求性を有するアミノ酸）を含むフィードを、アルカリ溶液において培養培地に加えれば、原核細胞、例えばアミノ酸栄養要求性 *E. coli* K12 株を高細胞密度で培養することができることが判明した。これは、アミノ酸が水に難溶性である場合に特に有利であり、そして、アルカリ溶液中にアミノ酸を溶解することによって溶解度を増加させることができる。同時にアルカリ溶液を使用して、培養培地の pH 値を調整することができる。高度に濃縮された単一フィード溶液においてアミノ酸溶液と pH 調整溶液とを合わせることによって、添加する容量を減少させることができ、従って、原核細胞の高細胞密度培養が可能となる。さらに、アルカリ性フィード溶液中における少なくとも 45 g/l のアミノ酸の濃度により、組換えポリペプチドの増加した産生がもたらされることが判明した。

【0016】

1つの態様において、原核細胞を培養するための方法は、以下の工程

a) 原核細胞を準備する工程、

b) 原核細胞を培養する工程、

c) 原核細胞の培養中に、アスパラギン酸塩 (aspartate)、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンから選択されたアミノ酸を含むアルカリ溶液を用いて pH 値を調整する工程を含む。

【0017】

「アミノ酸栄養要求性原核細胞」は、例えば対応する生合成経路のタンパク質をコードする構造遺伝子を含む遺伝子座内における突然変異または欠失に因り、必須アミノ酸を合成することができない原核細胞である。それぞれのアミノ酸を培養培地に添加しなければ、細胞は増殖することができない。栄養要求性は、任意のアミノ酸に対してであり得る。原核細胞はまた、1つより多くのアミノ酸に対して栄養要求性であり得る。従って、1つの態様において、アミノ酸栄養要求性原核細胞は、少なくとも1つのアミノ酸に対して栄養要求性である。別の態様において、アミノ酸栄養要求性原核細胞は、少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個のアミノ酸に対して栄養要求性である。さらなる態様において、アミノ酸栄養要求性原核細胞は、5個まで、または10個まで、または15個までのアミノ酸に対して栄養要求性である。別の態様において、アミノ酸栄養要求性原核細胞は、1～5個のアミノ酸、または1～3個のアミノ酸、または1～2個のアミノ酸、または1個のアミノ酸、または2個のアミノ酸、または3個のアミノ酸、または4個のアミノ酸に対して栄養要求性である。アミノ酸栄養要求性原核細胞は、1つの態様において、細菌細胞である。

【0018】

1つの態様において、細胞は、*Escherichia*細胞、またはバチラス (*Bacillus*) 細胞、またはラクトバチラス (*Lactobacillus*) 細胞、またはコリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 細胞、または酵母細胞 (サッカロミセス (*Saccharomyces*)、カンジダ (*Candida*)、またはピキア (*Pichia*) である。さらなる態様において、細胞は *Escherichia coli* 細胞、またはバチラススブチリス (*Bacillus subtilis*) 細胞、またはラクトバチラスアシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) 細胞、またはコリネバクテリウムグルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 細胞、またはピキアパストリス (*Pichia pastoris*) 酵母細胞である。

【0019】

「値を調整する」という用語は、それぞれの値を、培養全期間を通して予め決定されたレベルで維持することを示し、すなわち、値を連続的にまたは予め決定された一定の時間間隔で確認し、そして値が予め設定された許容範囲を外れた場合に修正液の添加により変化させる。例えば、「pH 値を調整する」という用語は、培養培地の pH 値を一定の時点で周期的に、すなわち一定の時間間隔で決定し、そしてもし決定された pH 値が、例えば 0.1 pH 単位、または 0.15 pH 単位、または 0.2 pH 単位だけ許容範囲外であるならば、pH 値を、酸性またはアルカリ性溶液などの修正液の添加によって予め決定された pH 値に再度調整する。

【0020】

原核細胞を培養するための方法およびまたアミノ酸栄養要求性原核細胞を培養するための方法は、当業者には公知である (例えば、Riesenber, D., et al., Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991) 380-384 参照)。培養は、任意の方法を用いてであり得る。1つの態様において、培養は、バッチ培養、流加培養、灌流培養、半連続培養、または完全もしくは部分的に細胞の保持された培養である。培養のための唯一つの必要条件は、アルカリ溶液を加えなければならないことである。この添加は、単にフィード溶液であっても、またはフィードと pH 調整溶液を合わせたものとしてであってもよい。

【0021】

10

20

30

40

50

細胞の培養の開始に使用される培養培地は、当業者に公知の任意の培地であり得、供給されるアミノ酸の濃度は、培地中において、5 g / l 未満、または7.5 g / l 未満、または10 g / l 未満である。それぞれの化合物の濃度を、細胞の増殖と負の干渉が予期されないように選択しなければならないことを指摘しなければならない。1つの態様において、培地は、既知組成のグルコース-ミネラル塩培地である。

【0022】

1つの態様において、培養は高細胞密度培養である。「高細胞密度培養」という用語は、培養した原核細胞の乾燥細胞重量が、培養中の1時点において少なくとも10 g / l である培養法を示す。1つの態様において、乾燥細胞重量は、培養中の1時点において、少なくとも20 g / l、または少なくとも50 g / l、または少なくとも100 g / l、または100 g / l を超える。このような高細胞密度状態に到達するためには、培養中に加えられるフィードおよび／または調整溶液の容量は、できるだけ小さくなければならない。乾燥細胞重量を決定するための方法は、例えば、Riesenbergl, D., et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 34 (1990) 77-82に報告されている。

10

【0023】

準備した培地中の栄養分は、培養中に代謝されるので、制限を回避するために補充しなければならない。アミノ酸が難溶性であれば、低い濃度のフィード溶液しか調製し添加することができない。必要量のアミノ酸を提供するために、大量のフィード溶液を加えなければならない。この結果、全培養容量は増加し、培養プロセスは希釈され、従って高細胞密度プロセスには不利である。

20

【0024】

20個の天然に存在するアミノ酸の溶解度を以下の表に列挙する。

【0025】

【表 1】

表

アミノ酸	水中の溶解度 [g/l] at [°C]		溶解度 [良好/許容可能/不良]
アラニン	166.5	25	良好
アルギニン	150	20	良好
アスパラギン酸塩	22	20	不良
アスパラギン酸	4	20	不良
システイン	280	20	良好
グルタミン	26	18	不良
グルタミン酸	11	25	不良
グリシン	225	20	良好
ヒスチジン	38	20	不良
イソロイシン	40	20	不良
ロイシン	24	20	不良
リジン	300	20	良好
メチオニン	48	20	不良
フェニルアラニン	27	20	不良
プロリン	1500	20	良好
セリン	364	20	良好
トレオニン	90	20	許容可能
トリプトファン	10	20	不良
チロシン	0.4	20	不良
バリン	88	20	許容可能

10

20

【0026】

30

アミノ酸のアスパラギン酸塩 (aspartate)、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンの溶解度は 50 g/l 以下であり、従って、これらのアミノ酸は水難溶性と呼ばれる。

【0027】

例えば、アミノ酸のロイシンは、20℃の水中において 24 g/l の溶解度を有し、従って難溶性である。12.5% (w/v) アンモニアを含むアルカリ溶液中では、溶解度は 76 g/l まで増加し、従って、水中の溶解度の 3 倍を超える。同時に必要とされるフィード容量は 60% 超減少する。同時にアルカリ溶液を、培養液の pH 値を調整するためにも使用するならば、追加する容量をさらにより減少させることができる。例えば、アミノ酸のチロシンは、20℃の水中において 0.4 g/l の溶解度を有し、従って、難溶性である。12.5% (w/v) のアンモニアを含むアルカリ溶液中では、溶解度は 39 g/l まで増加し、従って、水中の溶解度の約 100 倍である。

40

【0028】

1つの態様において、アミノ酸は、アスパラギン酸塩 (aspartate)、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよび／またはチロシンである。また 1つの態様において、アミノ酸は、アスパラギン酸塩 (aspartate)、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、ロイシン、トリプトファンおよび／またはチロシンである。1つの態様においてアミノ酸はロイシンである。1つの態様において、アミ

50

ノ酸は、20℃で約7のpH値の水中において難溶性であるアミノ酸である。また1つの態様において、アミノ酸はロイシンおよびプロリンであるか、またはアミノ酸はロイシンおよびプロリンおよびトリプトファンである。さらなる態様において、アミノ酸はアルカリ溶液中において、20℃における水中の溶解度よりも高い溶解度を有する。さらなる態様において、アルカリ溶液中の溶解度は、20℃の水中の溶解度の2倍から10倍である。1つの態様において、アミノ酸は40 g/l以下の水中の溶解度を有する。別の態様において、アミノ酸は、30 g/l以下の水中の溶解度を有する。また1つの態様において、アミノ酸は、アルカリ溶液中において25 g/l以上の溶解度を有する。さらなる態様において、アミノ酸は、アルカリ溶液中において30 g/l以上の濃度を有する。別の態様において、アミノ酸は、アルカリ溶液中において35 g/l以上の濃度を有する。また1つの態様において、アミノ酸は、アルカリ溶液中において50 g/l以上の溶解度を有する。

10

【0029】

以下の表において、異なるフィーディングモードを用いて得られた10リットルの作業容量の同じロイシンおよびプロリン栄養要求性E.coli細胞を用いての培養容器中の培養結果を示す。

【0030】

【表2】

表

20

実験	フィード	全バイオマス (乾物) [g/l]	組換えタンパク 質の収率 [g/l]	最終培養容量 [l]
1	別々のフィード: - 20 g/lのL-ロイシン - 100 g/lのL-プロリン	49.4	10.0	11.8
2	別々のフィード: - 20 g/lのL-ロイシン - 100 g/lのL-プロリン	50.6	9.0	12.2
3	混合性のフィード: 50 g/lのL-ロイシンお よび50 g/lのL-プロリ ンを含む12.5 % (w/v) NH ₃ 溶液	75.7	16.5	10.2
4	混合性のフィード: 33 g/lのL-ロイシンお よび33 g/lのL-プロリ ンを含む12.5 % (w/v) NH ₃ 溶液	56.5	13.5	9.3

30

40

【0031】

2つのアミノ酸が培養培地に別々のフィードとして加えられている実験1および2では、培養の終了時に得られる全バイオマスおよび組換えタンパク質の収率は、アミノ酸が、混合性のアルカリ性フィード（これは同時に培養培地のpH値を調整するためにも使用される）として加えられている実験3および4と比較して低いことが分かる。

【0032】

50

また、実験 3 および 4 における最終培養容量は、実験 1 および 2 の培養容器の作業容量を超えていない。

【0033】

1 つの態様において、アルカリ溶液は、12.5% (w/v) アンモニア水溶液であり、そして約 50 g/l 以上の濃度の少なくとも 1 つのアミノ酸を含む。1 つの態様において、アルカリ溶液は、約 50 g/l の濃度のロイシンおよびプロリンを含む。

【0034】

本明細書に報告した方法において使用することのできる原核細胞は、1 つ以上のアミノ酸栄養要求性を含み得る。例えば、ロイシン生合成経路の欠損した E.coli 細胞は、LeuB6 欠損細胞 13-6, χ 148, χ 156, χ 2224, χ 462, χ 463, χ 474, χ 478, χ 515, χ 65, χ 697, χ 760, 2000k MSE248, 342-167, 342MG, 679-680, A586, A592, A593, AA100, AA7852, AA787, AB1102, AB1111, AB1115, AB1122, AB1129, AB113, AB1132, AB1133, AB114, AB1157, AB1157-D, AB1314, AB1330, AB1331, AB1881, AB1884, AB1885, AB188, CP78, CP79, CR34 Thy-, CR34 Thy- SR, CR34/308, CR34/313, CR34/399, CR34/43, CR34/454, CR34/500, CR34/7a, CS130, CS312, CS419, CS425, CS426, CS460, CS471, CS472, CS50, CS81, CS85, CSR06, CSR603, CSR603/pDR1996, CT28-3b, DA10, DA11, DB1161, DB1257, DE1878, DE1882, DE2345, DF225, DF41, JRG94, JS10 C600r-m-, T6R, P678SSR pro-, PA20SR, PA200 SR, PA201 SR, PA214SRT6R, PA265 SR, PA309, PDE70, PA340, PA340/T6, PA360, PA414, PAM161, PAM162, PAM163, PAM164, PAM660, PAT84, PB349, PB69, PC1, PC2, PC3, PC5, PC6, PC8, PJ1, PJ2, PJ3, PJ4, PJ5, PJ C600 (= CRSR), W208 SR AzR, W2660, LAM-, W945his, WA2127, WA2379, WA2548, WA2552, WA2574, WA2899, WA921, WA946, WA960, Y10, Y46, Y53, Y70, YYC100 から選択され得る。

【0035】

1 つの態様において、原核細胞は、E.coli K12 細胞または E.coli B 細胞である。

【0036】

1 つの態様において、アルカリ溶液は強アルカリ性の溶液である。別の態様において、アルカリ溶液は、pH 9 以上、または pH 10 以上、または pH 10.5 以上の pH 値を有する。さらなる態様において、アルカリ溶液中のアミノ酸の溶解度は、水中のアミノ酸の溶解度の少なくとも 2 倍である。

【0037】

1 つの態様において、以下の工程

- a) ポリペプチドをコードする核酸を含むアミノ酸栄養要求性細菌細胞を準備する工程、
 - b) 準備した細胞を培養する工程、
 - c) 培養中に、細菌細胞が栄養要求性であるアミノ酸を含むアルカリ溶液を用いて pH 値を調整する工程、
 - d) 細胞または培養培地からポリペプチドを回収し、そしてそれによりポリペプチドを産生する工程
- を含む、本明細書において報告したポリペプチドを産生するための方法。

【0038】

本発明の具体的な態様

1. ポリペプチドを発現する Escherichia coli 細胞を培養するための方法であって、培養は、培養中におけるアスパラギン酸塩 (aspartate)、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンから選択されたアミノ酸のアルカリ溶液の添加を含むことを特徴とし、

アミノ酸はアルカリ溶液において、20℃ および中性 pH における水中のその溶解度よりも高い濃度を有し、そしてアミノ酸は 30 g/l 以上の濃度を有し、そして

アルカリ溶液は、10% (w/v) 以上のアンモニア溶液であり、そして

培養した細菌細胞の乾燥細胞重量は、培養の 1 時点において少なくとも 20 g/l であ

る、前記方法。

【0039】

2. 以下の工程

a) ポリペプチドをコードする核酸を含む *Escherichia coli* 細胞を培養する工程、

b) 培養中にアスパラギン酸塩 (aspartate)、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンから選択されたアミノ酸を含むアルカリ溶液を用いて pH 値を調整する工程、

c) 細胞または培養培地からポリペプチドを回収し、そしてそれによりポリペプチドを産生する工程

10

を含むポリペプチドを産生するための方法であって、

アミノ酸は、アルカリ溶液において 30 g/l 以上の濃度を有し、そして

アルカリ溶液は、10% (w/v) 以上のアンモニア溶液である、前記方法。

【0040】

3. 細菌細胞がアミノ酸栄養要求性細胞であり、そして栄養要求性が、アスパラギン酸塩 (aspartate)、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンから選択されたアミノ酸に対してであることを特徴とする、上記態様 1~2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0041】

20

4. アルカリ溶液が、9 以上の pH 値を有することを特徴とする、上記態様 1~3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0042】

5. ポリペプチドがヒトアポリポタンパク質 A1 またはその誘導体であることを特徴とする、上記態様 1~4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0043】

6. アポリポタンパク質 A1 が、配列番号 01~35 から選択されたアミノ酸配列を有することを特徴とする、態様 5 記載の方法。

【0044】

7. アポリポタンパク質 A1 が、配列番号 01、02、34 および 35 から選択されたアミノ酸配列を有することを特徴とする、態様 6 記載の方法。

30

【0045】

8. アミノ酸が、約 50 g/l の濃度を有することを特徴とする、上記態様 1~7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0046】

9. アルカリ溶液が、約 12.5% (w/v) のアンモニア水溶液であることを特徴とする、上記態様 1~8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0047】

10. アミノ酸がロイシンであることを特徴とする、上記態様 1~9 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0048】

11. アルカリ溶液がロイシンおよびプロリンを含むことを特徴とする、上記態様 1~10 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0049】

12. アルカリ溶液が約 12.5% (w/v) のアンモニア溶液であり、そして各々約 50 g/l の濃度のアミノ酸のロイシンおよびプロリンを含むことを特徴とする、上記態様 1~11 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0050】

13. 細菌細胞の培養におけるフィードとしてのアミノ酸のアルカリ溶液の使用であって、アミノ酸は、アスパラギン酸塩 (aspartate)、アスパラギン酸、グルタミン、グル

50

タミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンから選択され、そして培養は、20 g/l以上の乾燥細胞重量までであり、そしてアミノ酸はアルカリ溶液中において30 g/l以上の濃度を有し、そしてアルカリ溶液は10% (w/v) 以上のアンモニア溶液である、前記使用。

【0051】

14. 細菌細胞がアミノ酸栄養要求性細胞であり、そして栄養要求性が、アスパラギン酸塩 (aspartate)、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンから選択されたアミノ酸に対してであることを特徴とする、態様13記載の使用。

10

【0052】

15. *Escherichia coli*細胞は、アミノ酸栄養要求性*Escherichia coli*細胞であることを特徴とする、態様2～12のいずれか1つに記載の方法。

【0053】

以下の実施例、配列表および図面は、本発明の理解を助けるために提供され、そ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なく示された手順に改変を行なうことができることが理解される。

【図面の簡単な説明】

【0054】

20

【図1】 実施例3のパラメータプロットー別々のアミノ酸フィーディング

【図2】 実施例3のパラメータプロットー別々のアミノ酸のフィーディング

【図3】 実施例4のパラメータプロットー混合したアミノ酸のフィーディング

【図4】 実施例4のパラメータプロットー混合したアミノ酸のフィーディング

【0055】

材料および方法

培養液の吸光度を、DR2800光度計 (Hach-Lange, Dusseldorf, Germany) を用いて578 nmで測定した。

【0056】

タンパク質濃度を、SDS-PAGEゲル上で、標準タンパク質バンドの容積と、発酵試料内の産生されたタンパク質のバンド容積とを比較することによって濃度測定的に決定した。

30

【0057】

実施例1

アンモニア溶液中のロイシンの溶解度の決定

計算された量のロイシンを、500 mlのフラスコに評量した。250 mlの脱イオン水の添加後、溶液をオートクレーブにかけることにより滅菌する。その後、250 mlの25% (w/v) アンモニア溶液を加え、そしてロイシンが溶解したかしないかを決定する。ロイシンの溶解後、溶液の最終容量を決定した。それが500 mlよりも顕著に逸脱している場合には、溶液を、再度、減量した水を用いて調製した (表3参照)。

40

【0058】

【表 3】

表 3

ロイシン濃度 [g/l]	17	18	19	20	21	25	30	40	50
水 [ml]	250	250	250	250	250	250	250	250	250
アンモニア溶液 [ml]	250	250	250	250	250	250	250	250	250
可溶性	はい	はい	はい	はい	はい	はい	はい	はい	はい
最終容量 [ml]	500	500	500	500	500	500	500	500	500

10

ロイシン濃度 [g/l]	60	70	71	72	73	74	75	76	77
水 [ml]	250	250	250	250	250	250	250	250	250
アンモニア溶液 [ml]	250	250	250	250	250	250	250	250	250
可溶性	はい	はい	はい	はい	はい	はい	はい	はい	いいえ
最終容量 [ml]	500	500	500	500	500	500	500	500	500

20

【 0 0 5 9 】

実施例 2

E.coli 発現 プラスミドの作製および説明

テトラネクチン-アポリボタンパク質 A-I 融合ポリペプチドを組換え手段によって調製した。N 末端から C 末端の方向の発現された融合ポリペプチドのアミノ酸配列は以下の通りである：

- － アミノ酸メチオニン（M）、
 - － CDLPQTHSL（配列番号 36）のアミノ酸配列を有するインターフェロン配列のフラグメント、
 - － GS リンカー、
 - － HHHHHH（配列番号 37）のアミノ酸配列を有するヘキサヒスチジンタグ、
 - － GS リンカー、
 - － VVAPPAP（配列番号 38）のアミノ酸配列を有する IgA プロテアーゼ開裂部位、
- および
- － 配列番号 02 のアミノ酸配列を有するテトラネクチン-アポリボタンパク質 A-I

30

【 0 0 6 0 】

前記したようなテトラネクチン-アポリボタンパク質 A-I 融合ポリペプチドは、前駆体ポリペプチドであり、これからテトラネクチン-アポリボタンパク質 A-I 融合ポリペプチドが、IgA プロテアーゼを使用して in vitro において酵素的開裂によって放出された。

40

【 0 0 6 1 】

前駆体ポリペプチドをコードする融合遺伝子は、適切な核酸セグメントの接続によって公知の組換え法および技術を用いて構築された。化学合成によって作製された核酸配列は、DNA シークエンスによって確認された。テトラネクチン-アポリボタンパク質 A-I の産生のための発現プラスミドを以下のように調製した。

【 0 0 6 2 】

E.coli 発現 プラスミドの作製

プラスミド 4980（4980-pBRori-URA3-LACI-SAC）は、E.

50

coliにおけるコアストレプトアビジンの発現のための発現プラスミドである。それは、プラスミド1966に由来する3142bp長のEcoRI/CelIIベクターフラグメント(1966-pBRori-URA3-LACI-T-リピーター; EP-B1422237に報告)を、435bp長のコアストレプトアビジンをコードするEcoRI/CelIIフラグメントとライゲーションすることによって作製された。

【0063】

コアストレプトアビジンE.coli発現プラスミドは、以下のエレメントを含む：

- － E.coliにおける複製のためのベクターpBR322に由来する複製起点(Sutcliffe, J.G., et al., Quant. Biol. 43 (1979) 77-90に記載のbp位置2517～3160に対応)、

10

- － E.coli pyrF突然変異株の補完によるプラスミド選択を可能とする(ウラシル栄養要求性)、オロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードするSaccharomyces cerevisiaeのURA3遺伝子(Rose, M., et al., Gene 29 (1984) 113-124)、

- － 以下を含むコアストレプトアビジン発現カセット

- － Stueber, D., et al. (後記参照)に記載の合成リボソーム結合部位を含む、T5ハイブリッドプロモーター(Bujard, H., et al., Methods. Enzymol. 155 (1987) 416-433およびStueber, D., et al., Immunol. Methods IV (1990) 121-152に記載のT5-PN25/03/04ハイブリッドプロモーター)、

- － コアストレプトアビジン遺伝子、

- － バクテリオファージに由来する2つの転写終結因子であるλ-T0終結因子(Shwarz, E., et al., Nature 272 (1978) 410-414)およびfd終結因子(Beck, E., and Zink, B., Gene 1-3 (1981) 35-58)、

20

- － E.coli由来のlacIリプレッサー遺伝子(Farabaugh, P.J., Nature 274 (1978) 765-769)。

【0064】

単一のフランキングしているEcoRIおよびCelII制限エンドヌクレアーゼ開裂部位を使用してベクター4980からコアストレプトアビジン構造遺伝子を切り出し、そして、前駆体ポリペプチドをコードする核酸にフランキングするEcoRI/CelII制限酵素部位を、3142bp長のEcoRI/CelII-4980ベクターフラグメントに挿入することによって、テトラネクチン-アポリポタンパク質A-I前駆体ポリペプチドの発現のための最終発現プラスミドを調製した。

30

【0065】

実施例3

別々の溶液としてのロイシンおよびプロリンのフィーディング

この参照実施例において、アミノ酸のL-ロイシンおよびL-プロリンの別々のフィーディングと組み合わせたRiesenberget al.(1991、前記)によって報告された高細胞密度培養法を用いての栄養要求性E.coli株の培養を実施した。

【0066】

E.coli K12株CSPZ-2(leuB、proC、trpE、thi-1、ΔpyrF)を使用した。前記株を、治療タンパク質の産生のための発現プラスミドを用いて形質転換し、そして、既知組成のプレ培養培地上で約1の吸光度(578nmにおいて決定)となるまで増殖させた1mlの株および1mlのグリセロール85%(v/v)を含むアンプル中において初代シードバンクとして維持し、そして-80℃で保存した。

40

【0067】

既知組成のプレ培養培地は、

1. 0g/lのL-ロイシン、
1. 0g/lのL-プロリン、および
1. 0mg/lのチアミンHCl

の補充されたSambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)に

50

記載のM9培地であった。

【0068】

発酵のためにRiesenberg, et al., (1991、前記) によるバッチ培地を使用した：

- 27.6 g/l のグルコース、
- 13.3 g/l の KH_2PO_4 、
- 4.0 g/l の $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、
- 1.7 g/l のクエン酸塩、
- 1.2 g/l の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、
- 60 mg/l のクエン酸鉄 (III)、
- 2.5 mg/l の $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、
- 15 mg/l の $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、
- 1.5 mg/l の $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、
- 3 mg/l の H_3BO_3 、
- 2.5 mg/l の $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、
- 8 mg/l の $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、
- 8.4 mg/l の Titriplex III、および
- 1.3 ml/l の Synperonic 10% 消泡剤。

10

【0069】

バッチ培地に、

- 5.4 mg/l のチアミンHCl、並びに
- 1.2 g/l の L-ロイシンおよび L-プロリンをそれぞれ補充した。

20

【0070】

フィード1溶液は、

- 700 g/l のグルコース、および
- 19.7 g/l の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を含んでいた。

【0071】

フィード2溶液は、20 g/l の L-ロイシンを含んでいた。

【0072】

フィード3溶液は、100 g/l の L-プロリンを含んでいた。

【0073】

30

アミノ酸を評量し、アミノ酸を水中に溶解し、そして前記溶液をオートクレーブにかけることによってフィード2および3を調製した。その後、溶液のpH値が、フィード2については約6.15、フィード3については約6.43であると決定された。

【0074】

pH調節のために使用されたアルカリ溶液は12.5% (w/v) NH_3 水溶液であった。

【0075】

全成分を脱イオン水に溶解した。

【0076】

プレ培養のために、3個の整流装置のついた1000mlのエーレンマイヤーフラスコ中の300mlのM9培地に、2mlの初代シードバンクアンプルを接種した。1~3の吸光度(578nmにおいて決定)に到達するまで、培養を回転振とう器で13時間かけて37℃で実施した。

40

【0077】

主な発酵を、10リットルのBiostat C DCU3発酵槽 (Sartorius, Melsungen, Germany) で実施した。6.4リットルの無菌バッチ培地と300mlのプレ培養液で開始して、バッチ発酵を、37℃、pH 6.9 ± 0.2、500 mbar および通気速度10リットル/分で実施した。最初に補充したグルコースが枯渇した後、温度を28℃にシフトさせ、そして発酵は、溶存酸素 (pO₂) を50%に維持し (DO-stat、例えばShay, L.K., et al., (1987、下記) 参照)、一定して増加している攪拌速度 (10時間で550 rpmから100

50

0 rpmに、16時間で1000rpmから1400rpmに）および通気速度（10時間で10リットル/分から16リットル/分に、5時間で16リットル/分から20リットル/分に）と組み合わせてフィード1を添加することによって流加培養モードに入った。pHが下限の調節限界、すなわちpH6.70に到達した時に、追加のアミノ酸を用いての供給を、フィード2（14時間の間は33.8ml/hで開始し、その後、97.6ml/hまで増加）およびフィード3（14時間の間は6.8ml/hで開始し、その後、19.5ml/hまで増加）の追加により開始した。流速を別々の発酵実行から計算し（実施例4参照）、これにより、フィーディング戦略に関係なく正確に同じ量のアミノ酸を培養液にそれぞれ適用した。組換え治療タンパク質の発現は、70の吸光度において1mMのIPTGの添加によって誘導された。

10

【0078】

この発酵のパラメータープロットを図1および2に示す。

【0079】

接種、そしてその後の短い誘導期の後、細胞は、 $\mu_{\max} = 0.30$ リットル/hの最大比増殖速度で増殖していた。8時間の培養後に下限のpH調節限界に到達し、そしてpHを、6.70において、12.5% NH_4OH 溶液の添加により制御した。同時にアミノ酸フィーディングをフィード2およびフィード3の添加によって開始した。16時間後、グルコースを使い尽くし、これはpO2値の急勾配の増加によって示された。この時、培養温度は37℃から28℃にシフトしていた。さらに15分後、pO2-フィード制御を開始し、そしてpO2を、50%においてフィード1の添加によって、攪拌速度および通気速度をそのそれぞれの最大値である1400rpmおよび20リットル/分まで連続的に増加させながら制御した。増殖速度は、0.15リットル/hから約0.05リットル/hまで連続的に減少していた。同時に攪拌速度は、36時間の培養後に段階的に減少させた。吸光度のさらなる増加を決定することができなければ、発酵を終了し、そして細菌細胞を収集前に一晩かけて4℃まで冷却した。

20

【0080】

発酵終了時に全バイオマス収率は、49.4 g/l（乾物）であった。発酵中にアセテートはほぼ全く排出されなかったが、終了にむけて濃度は急勾配に7 g/lまで増加した。組換えタンパク質の形成は9.96 g/lであった。培養プロセスの容量は発酵容器の通常の作業容量を超え、そして11.8リットルまで増加した。

30

【0081】

発酵を繰り返し、そして最終吸光度130、最終バイオマス収率50.6 g/l、および組換えタンパク質収率9.0 g/lが得られ、発酵終了時の培養プロセス容量は12.2リットルであった。

【0082】

実施例4

pH調節のためのアルカリ溶液に取り込まれたロイシンおよびプロリンのフィーディング
この発酵においては、アミノ酸フィーディングを、アルカリ性pH制御溶液に取り込んだ。この発酵の基本は、実施例3に使用したRiesenberg, et al., (1991、上記)によるのと同じ高細胞密度培養法である。アミノ酸のL-ロイシンおよびL-プロリンを12.5% NH_3 水溶液に取り込み、pH制御中にアルカリの添加と共に与えた。

40

【0083】

E.coli K12株CSPZ-2 (leuB, proC, trpE, th-1, Δ pyrF) を使用した。前記株を、治療タンパク質の産生のための発現プラスミドを用いて形質転換し、そして、既知組成のプレ培養培地上で約1の吸光度（578nmにおいて決定）となるまで増殖させた1mlの株および1mlのグリセロール85% (v/v) を含むアンプル中において初代シードバンクとして維持し、そして-80℃で保存した。

【0084】

既知組成のプレ培養培地は、

1.0 g/l のL-ロイシン、

50

1. 0 g/l の L-プロリン、および

1. 0 mg/l の チアミン HCl

の補充された Sambrook, J., et al., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)) による M9 培地であった。

【0085】

発酵のために Riesenbergl, et al., (1991、前記) による バッチ 培地 を使用した:

27. 6 g/l の グルコース、

13. 3 g/l の KH_2PO_4 、

4. 0 g/l の $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、

1. 7 g/l の クエン酸塩、

1. 2 g/l の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、

60 mg/l の クエン酸鉄 (III)、

2. 5 mg/l の $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、

15 mg/l の $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、

1. 5 mg/l の $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、

3 mg/l の H_3BO_3 、

2. 5 mg/l の $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、

8 mg/l の $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、

8. 4 mg/l の Titriplex III、および

1. 3 ml/l の Synperonic 10% 消泡剤。

【0086】

バッチ 培地 に、

5. 4 mg/l の チアミン HCl、並びに

1. 2 g/l の L-ロイシンおよび L-プロリンをそれぞれ補充した。

【0087】

フィード 1 溶液は、

700 g/l の グルコース、および

19. 7 g/l の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を含んでいた。

【0088】

pH 調節のために使用したアルカリ溶液は、50 g/l の L-ロイシンおよび 50 g/l の L-プロリンのそれぞれ補充された 12. 5% (w/v) NH_3 水溶液であった。

【0089】

全成分を脱イオン水に溶解した。

【0090】

主な発酵を、10 リットルの Biostat C DCU3 発酵槽 (Sartorius, Melsungen, Germany) で実施した。6. 4 リットルの無菌バッチ培地と 300 ml のプレ培養液で開始して、バッチ発酵を、37°C、pH 6. 9 ± 0. 2、500 mbar および通気速度 10 リットル/分で実施した。最初に補充したグルコースが枯渇した後、温度を 28°C にシフトさせ、そして発酵は、溶存酸素 (pO_2) を 50% に維持し (DO-stat、例えば Shay, L.K., et al., (Shay, L.K., et al., J. Indus. Microbiol. 2 (1987) 79-85) 参照)、一定して増加している攪拌速度 (10 時間で 550 rpm から 1000 rpm に、16 時間で 1000 rpm から 1400 rpm に) および通気速度 (10 時間で 10 リットル/分から 16 リットル/分に、5 時間で 16 リットル/分から 20 リットル/分に) と組み合わせてフィード 1 を添加することによって流加培養モードに入った。pH が pH 6. 70 の下限の調節限界に到達した時に、追加のアミノ酸を用いての供給はアルカリの追加から行なわれた。アルカリ追加の時間経過から、実施例 2 のフィード 2 および 3 に対する流速を計算し、これにより、フィード戦略に関係なく正確に同じ量のアミノ酸を培養液にそれぞれ適用した。組換え治療タンパク質の発現は、70 の吸光度において 1 mM の IPTG の添加によって誘導された。

10

20

30

40

50

【0091】

典型的には、この発酵のパラメータープロットを図3および4に示す。

【0092】

接種、そしてその後の短い誘導期の後、細胞は、 $\mu_{\max} = 0.30$ リットル/hの最大比増殖速度で増殖していた。8時間の培養後に下限のpH調節限界に到達し、そしてpHを、pH 6.70において、50 g/lのL-ロイシンおよび50 g/lのL-プロリンのそれぞれ補充された12.5% NH_3 水溶液の添加により制御した。これにより同時にアミノ酸フィーディングを開始する。16時間後、与えられたグルコースを使い尽くした。この時、培養温度は37℃から28℃にシフトしていた。さらに15分後、 pO_2 -フィード制御を開始し、そして pO_2 を、50%においてフィード1の添加によって、攪拌速度および通気速度をそのそれぞれの最大値である1400 rpmおよび20リットル/分まで連続的に増加させながら制御した。増殖速度は、0.15リットル/hから約0.05リットル/hまで連続的に減少していた。吸光度のさらなる増加が認識されなければ、発酵を終了し、そして細菌細胞を収集前に一晩かけて4℃まで冷却した。

10

【0093】

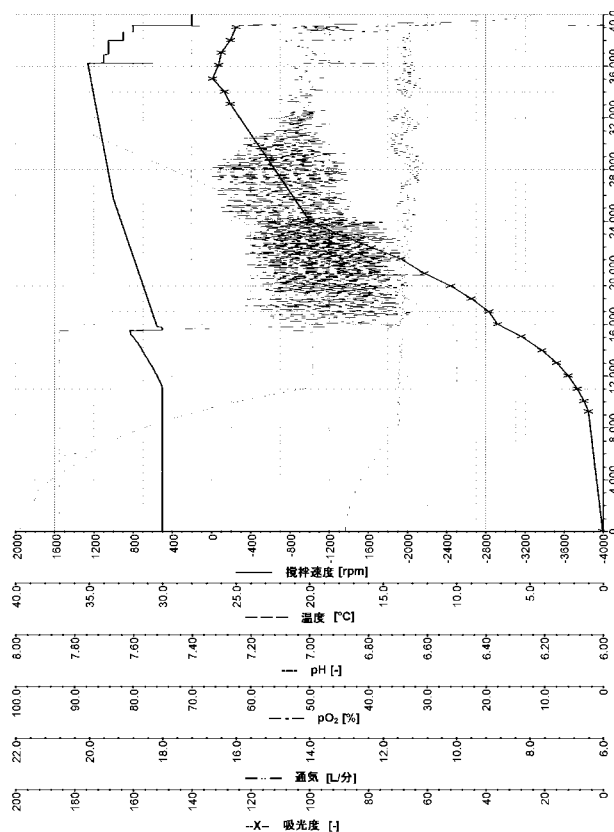
発酵終了時の吸光度は169であり、そして全バイオマス収率は75.7 g/l（乾物）であった。発酵中にアセテートはほぼ全く排出されず、終了にむけて濃度は1 g/lまで増加した。組換えタンパク質の形成は16.5 g/lであった。培養ブ罗斯の容量は10.2リットルであった。

【0094】

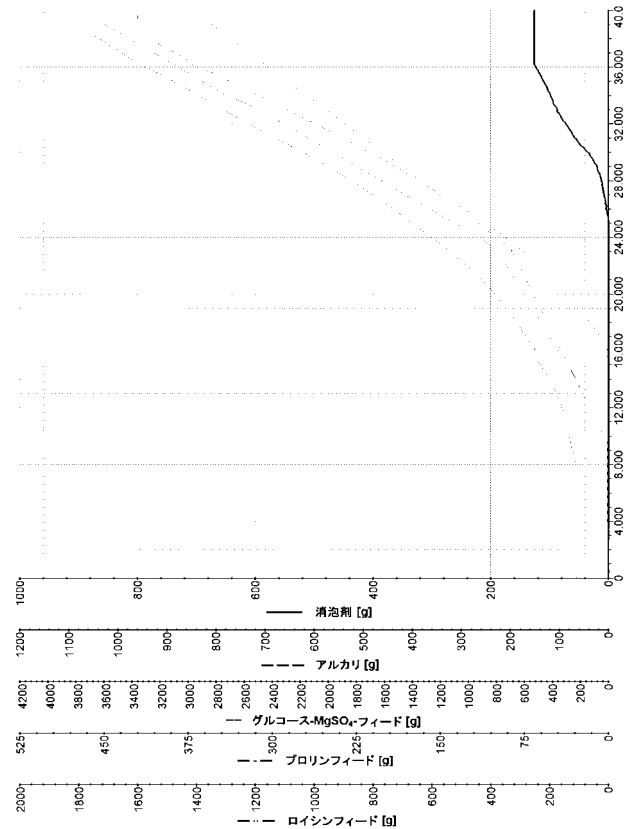
発酵を、アルカリ溶液に溶解した種々の量のアミノ酸（33 g/lのL-ロイシンおよびL-プロリン）を用いて繰り返した。供給されたアミノ酸の量はより少なく、そして吸光度145、最終バイオマス収率56.5 g/l、および組換えタンパク質収率13.5 g/lが得られ、発酵終了時における培養ブ罗斯容量は9.3リットルであった。

20

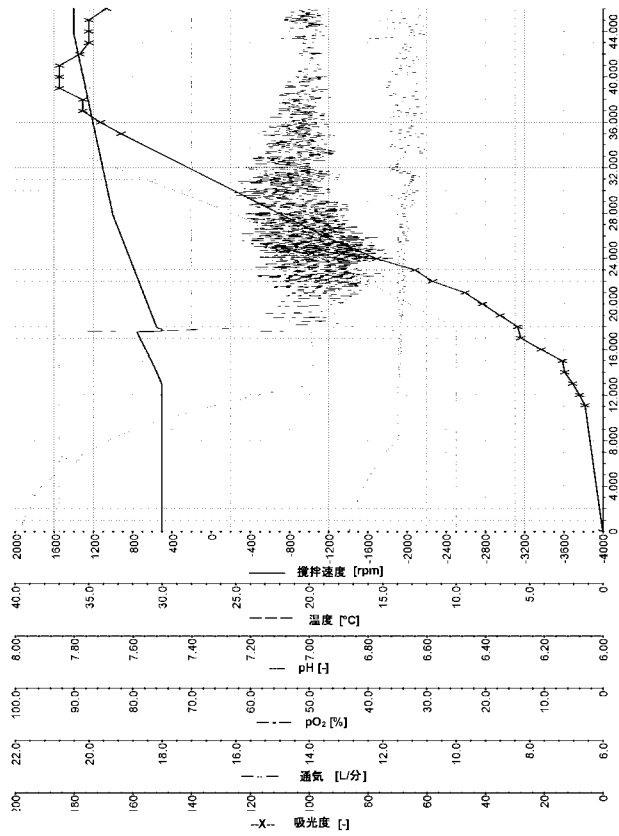
【図1】



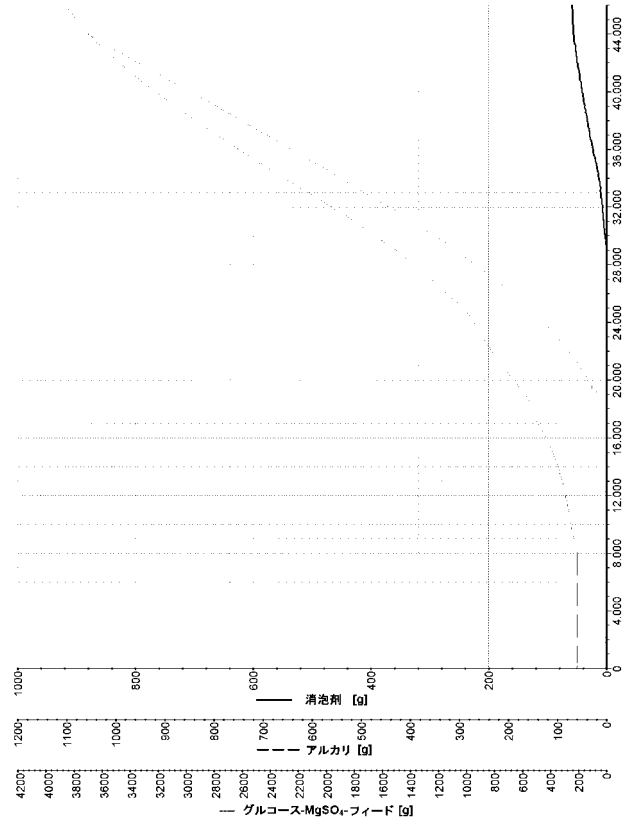
【図2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

2016005461000001.app

【外国語明細書】
2016005461000001.pdf