

(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2019-516371

(P2019-516371A)

(43) 公表日 令和1年6月20日(2019.6.20)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 15/62 (2006.01)	C 12 N 15/62	Z NA Z	4 B 0 6 4
C 07 K 19/00 (2006.01)	C 07 K 19/00		4 H 0 4 5
C 12 P 21/02 (2006.01)	C 12 P 21/02	C	
C 07 K 7/06 (2006.01)	C 07 K 7/06		
C 12 N 15/31 (2006.01)	C 12 N 15/31		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-558148 (P2018-558148)	(71) 出願人	513032275 グラクソsmithkline、インテレクチュアル、プロパティー、ディベロップメント、リミテッド GLAXOSMITHKLINE INT ELECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED イギリス国ミドルセックス、ブレントフォード、グレート、ウエスト、ロード、98 O
(86) (22) 出願日	平成29年5月4日 (2017.5.4)	(74) 代理人	110002572 特許業務法人平木国際特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成30年11月30日 (2018.11.30)		
(86) 國際出願番号	PCT/EP2017/060654		
(87) 國際公開番号	W02017/191255		
(87) 國際公開日	平成29年11月9日 (2017.11.9)		
(31) 優先権主張番号	62/332,636		
(32) 優先日	平成28年5月6日 (2016.5.6)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	62/338,045		
(32) 優先日	平成28年5月18日 (2016.5.18)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

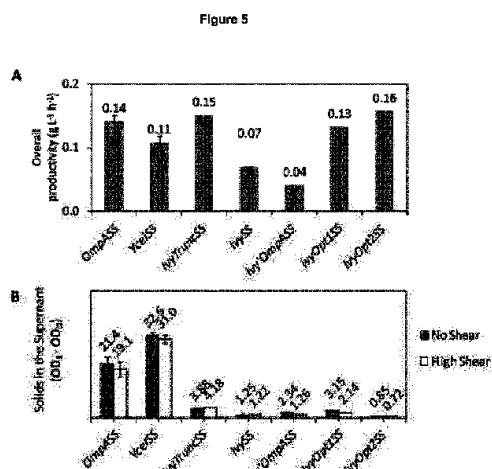
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組み換えタンパク質の生成方法

(57) 【要約】

本発明は、大腸菌由来の組み換えシグナル配列に関する。また本発明は、該シグナル配列及び組み換えタンパク質を含む融合タンパク質、並びに該組み換えタンパク質の生成方法に関する。組み換えシグナル配列を用いて、発酵の粘度を制御し、及び/又は組み換えタンパク質の基底（誘導前）発現を制御するための方法を提供することができる。

【選択図】図5



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の配列：(a) 配列MGRISSGG (配列番号1) 又は1、2若しくは3個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体、及び(b) (a)に対してC末端の異種シグナル配列を含む、組み換えシグナル配列。

【請求項 2】

以下の配列：(a) 請求項1に記載の前記組み換えシグナル配列；及び(b) (a)に対してC末端の異種組み換えタンパク質を含む、組み換え融合タンパク質。

【請求項 3】

請求項1に記載の前記組み換えシグナル配列又は請求項2に定義される通りの組み換え融合タンパク質をコードする組み換え核酸配列。 10

【請求項 4】

配列MGRISSGG (配列番号1) を含むシグナル配列をコードする組み換え核酸配列であつて、該核酸配列は、宿主細胞での発現に関してコドン最適化されている、上記組み換え核酸配列。 20

【請求項 5】

前記コドン最適化された核酸配列が、以下の配列：配列MGRISSGG (配列番号1) 又は1、2若しくは3個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体、及び(b) (a)に対してC末端の異種シグナル配列、を含む組み換えシグナル配列をコードする、請求項4に記載の組み換え核酸配列。 20

【請求項 6】

前記コドン最適化された核酸配列が、配列MGRISSGGMMFKAITTVAALVIATSAMA (配列番号34)、又は1~10個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体を含むシグナル配列をコードする、請求項4に記載の組み換え核酸配列。

【請求項 7】

前記コドン最適化された核酸配列が、配列MGRISSGGMKKTAIAIAVALAGFATVAQA (配列番号55)、又は1~10個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体を含むシグナル配列をコードする、請求項4に記載の組み換え核酸配列。 30

【請求項 8】

前記核酸配列が、宿主細胞での発現に関してコドン最適化されており、かつ0.40以上のコドン適合化指数(CAI)を有する、請求項3~7のいずれか1項に記載の組み換え核酸配列。 30

【請求項 9】

請求項3~8のいずれか1項に記載の前記核酸配列を含む組み換え発現ベクター。

【請求項 10】

前記シグナル配列が、前記組み換えタンパク質に機能的に連結されている、請求項9に記載の組み換え発現ベクター。

【請求項 11】

以下のステップ：

(a) 宿主細胞中に存在する請求項9又は10に記載の前記組み換え発現ベクターからの前記組み換えタンパク質の発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養するステップ；及び 40

(b) 該組み換えタンパク質を回収するステップ

を含む、宿主細胞中で組み換えタンパク質を生成するための方法。

【請求項 12】

以下のステップ：

組み換えタンパク質の発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養するステップであつて、該宿主細胞が、以下の配列：(i) 配列MGRISSGG (配列番号1) 又は1、2若しくは3個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体を含む組み換えシグナル配列、及び(ii) 組み換えタンパク質、をコードする組み換え核酸配列を含む、上記ステップ 50

を含む、組み換えタンパク質を発現する宿主細胞培養液の粘度を制御するための方法。

【請求項 1 3】

誘導前条件下で宿主細胞を培養するステップを含む、宿主細胞培養液により発現される組み換えタンパク質の基底発現を制御するための方法であって、

該宿主細胞が、(i) 以下の配列：配列MGRISGG (配列番号1) 又は1、2若しくは3個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体を含む組み換えシグナル配列、及び(ii) 組み換えタンパク質、をコードする組み換え核酸配列を含む、上記方法。

【請求項 1 4】

前記核酸配列が、請求項3～8のいずれか1項に定義されるものである、請求項12又は13に記載の方法。 10

【請求項 1 5】

前記組み換えタンパク質が、ペリプラズム又は細胞外培地から回収される、請求項11～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記シグナル配列が、前記組み換えタンパク質に機能的に連結されている、請求項11～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記組み換えタンパク質の誘導前発現レベルが0.5g/L以下であり；かつ/又は該組み換えタンパク質の誘導後発現レベルが5g/L以上である、請求項11～16のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項 1 8】

前記シグナル配列が前記組み換えタンパク質から切断される、請求項11～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記組み換えタンパク質が抗原結合性タンパク質である、請求項11～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記宿主細胞が、ペリプラズムを有する微生物細胞である、請求項11～19のいずれか1項に記載の方法。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、組み換えシグナル配列、並びに該シグナル配列及び組み換えタンパク質を含む融合タンパク質に関する。該組み換えシグナル配列を用いた組み換えタンパク質の生成方法が記載される。特に、組み換えシグナル配列は、発酵の粘度を制御し、及び/又は組み換えタンパク質の基底（誘導前）発現を制御するための方法を提供する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

組み換えタンパク質の大規模かつ費用効果の高い製造、回収及び精製は、バイオテクノロジー産業にとって重要な課題である。 40

【0 0 0 3】

微生物宿主細胞は、組み換えタンパク質の生成のために広く使用されている生物である。生成中に考慮すべき事項としては、宿主細胞の増殖及び組み換えタンパク質の発現、タンパク質力価、タンパク質位置（例えば、細胞内、細胞外、ペリプラズムなど）、並びに組み換えタンパク質の最終位置からの選択的回収及び精製が挙げられる。これらの様々な因子のバランスをとつて最適化することは容易ではない。

【0 0 0 4】

グラム陰性真正細菌である大腸菌 (*Escherichia coli* : E. coli) は、その十分に特徴付けられた遺伝学、安価な基質を用いて迅速にバイオマスを蓄積する能力、プロセスのス 50

ケールアップの容易性と多数の利用可能な宿主株及び発現ベクターのために、工業バイオプロセスで使用するための強力な発現系である。大腸菌は、グリコシル化などの複雑な翻訳後修飾を必要としない治療用タンパク質の製造のための一般的な宿主である。ジスルフィド結合形成のため、正しい折りたたみを促進するためにペリプラズムの酸化環境へ発現を導くことができる。これは、専用の輸送系を介した標的化と通過を開始するために、細胞の分泌系の成分によって認識されるN末端シグナル配列の使用によって達成することができる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

10

したがって、組み換えタンパク質を生成、回収及び精製する改良された方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、以下の配列：(a) 配列MGRISGG (配列番号1) 又は1、2若しくは3個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体、及び(b) (a)に対してC末端の異種シグナル配列を含む、組み換えシグナル配列を提供する。

【0007】

本発明はまた、以下の配列：(a) 定義される通りのシグナル配列；及び(b) (a)に対してC末端の異種組み換えタンパク質を含む、組み換え融合タンパク質を提供する。

20

【0008】

本発明はまた、定義される通りのシグナル配列又は融合タンパク質をコードする組み換え核酸配列を提供する。

【0009】

本発明はまた、配列MGRISGG (配列番号1) を含むシグナル配列をコードする組み換え核酸配列を提供し、このとき、該核酸配列は、宿主細胞での発現に対してコドン最適化されている。

【0010】

本発明はまた、定義される通りの核酸配列を含む組み換え発現ベクターを提供する。

【0011】

30

本発明はまた、以下のステップ：

(a) 宿主細胞中に存在する定義される通りの組み換え発現ベクターからの組み換えタンパク質の発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養するステップ；及び

(b) 該組み換えタンパク質を回収するステップ

を含む、宿主細胞中で組み換えタンパク質を生成するための方法を提供する。

【0012】

本発明はまた、以下のステップ：

組み換えタンパク質の発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養するステップであって、該宿主細胞が、(i) 以下の配列：配列MGRISGG (配列番号1) 又は1、2若しくは3個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体を含む組み換えシグナル配列、及び(ii) 組み換えタンパク質、をコードする組み換え核酸配列を含む、上記ステップ

40

を含む、組み換えタンパク質を発現する宿主細胞培養液の粘度を制御するための方法を提供する。

【0013】

本発明はまた、誘導前条件下で宿主細胞を培養するステップを含む、宿主細胞培養液により発現される組み換えタンパク質の基底発現を制御するための方法を提供し、

このとき、該宿主細胞は、(i) 以下の配列：配列MGRISGG (配列番号1) 又は1、2若しくは3個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体を含む組み換えシグナル配列、及び(ii) 組み換えタンパク質、をコードする組み換え核酸配列を含

50

む。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】24dwp培養物中の大腸菌W3110からのdAbの発現に対する種々のN末端シグナル配列の影響を示す図である。凡例：B、細胞外（上清）に局在するdAb；C、細胞内（全細胞溶解物：ペリプラズム+細胞質）に局在するdAb。B+C、総dAb；B/(B+C)、放出された割合。BとCとの総和は、形成された総dAbの視覚的推定を可能にする。サンプルは、誘導から24時間後に採取し、還元して、クマシーカラーチェミカル反応によりSDS-PAGEによりバンドを可視化した。「Std」とは、 $0.5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 濃度でのdAb標準を表わす。

【図2】高細胞密度大腸菌W3110フェッドバッチ培養についての誘導後発酵プロフィールを示す図である。N末端シグナル配列及び基底（誘導前）発現レベル：（白三角）：OmpASS、 $0.30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、（白四角）：YceISS、 $0.64\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 又は（白菱形）：IvySS、 $0.061\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。すべての結果は、IPTGを用いたdAb形成の誘導後に取得される。（A）バイオマスを、 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ により推定した；（B）細胞外可溶性dsDNA濃度；dAb収率を、（C）細胞内（全細胞溶解物）、（D）細胞外（上清）で、（E）形成された総dAb（細胞内+細胞外）及び（F）細胞外空間中の総dAbの割合（%）として決定した。培養液粘度 μ は、べき乗関係 $\mu = K^{n-1}$ （式中、 n はせん断速度である）に関して説明され、（G）Kは流動コンシンテンシー指数であり、かつ（H）nは流動挙動指数である。結果は、複製された培養器（n=2~4）から取得し、平均し、一標準偏差に対応するエラーバーを加えた。

【図3】シグナル配列アミノ酸配列アライメント及びそれらのコドン適合化指数の評価を示す図である。（A）YceISS（配列番号35）及びIvySS（配列番号34）についてのアミノ酸配列アライメントを、OmpASS（配列番号33）を参照として示す。（B）各コドン位置の最適化度合を、かずさDNA研究所大腸菌コドン使用頻度データベース（Kazusa E. coli codon usage database）に由来する大腸菌コドン使用頻度表を参照として、最も豊富な同義語コドンに対するそのコドンの頻度の比率として算出した。「B」のアミノ酸配列は、Ivy'SSカセットの後ろの最初のメチオニンからアライメントしている。

【図4】高細胞密度大腸菌W3110フェッドバッチ培養についての誘導後発酵プロフィールを示す図である。N末端シグナル配列及び基底（誘導前）発現レベル：（白三角）：IvyTruncSS、 $0.90\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、（白四角）：Ivy'OmpASS、 $0.086\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、（白菱形）：IvyOpt1SS、 $0.16\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 及び（黒菱形）：IvyOpt2SS、 $0.089\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。詳細については図2を参照されたい。結果は、単独の発酵サンプルから取得した（m=3）。

【図5】（A）誘導後の合計時間当たりの、培養液1リットル当たりの細胞外dAbの質量として算出された全体的な生産性を示す図である。（B）以下の種々のN末端シグナル配列を有するdAbを発現する大腸菌回収培養物の遠心分離効率を示す図である：OmpASS（誘導後48時間）、YceISS（48時間）、IvyTruncSS（55時間）、Ivy'OmpA（153時間）並びにIvyコドン最適化シグナル配列IvyOpt1（48時間）及びIvyOpt2（55時間）。細胞培養液を、以下の条件に曝露し：（黒四角）：せん断なし；（白四角）：高せん断応力（20秒間での $0.53 \times 10^6\text{W}\cdot\text{kg}^{-1}$ の最大エネルギー散逸速度）、続いてUSD遠心分離により処理した（V=2.0mL、t=420s、 $= 0.164\text{m}^2$ （本文を参照されたい）、 $V/t = 2.9 \times 10^{-8}\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ）。結果は、OmpASS及びYceISSについては複製された培養器から（n=3）、又は残余のシグナル配列については単一の培養器サンプルから取得した。（B）に関するサンプル特性決定は、三重反復であった（m=3）。結果は、平均±SDとして示されている。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本開示は、特定のシグナル配列の使用が、発酵、組み換えタンパク質発現、及びタンパク質回収可能性に関する利点をもたらすことを実現することを含む。

【0016】

シグナル配列は、組み換えタンパク質のペリプラズム分泌に関して研究してきた。シグナル配列は、低い基底発現から生じる低粘度培養液という利点を提供する。シグナル配列中に含まれる8個のアミノ酸の配列が、この低い基底発現を生じさせるために重要であ

10

20

30

40

50

ることが明らかにされている。シグナル配列のコドン最適化は、組み換えタンパク質の発酵生産性を上昇させつつも、低い基底発現及びそれゆえに低粘度培養液を維持することに成功した。つまり、高い生産性及びフルスケールでの遠心分離による実用的清澄化の組み合わせが達成される。

【0017】

配列「MGRISSGG」（配列番号1）は、いずれのシグナル配列に対してもN末端（5'）で用いることができる。例えば、「MGRISSGG」（配列番号1）は、異種シグナル配列に対してN末端で用いることができる。異種シグナル配列とは、内因性IVYシグナル配列ではないものであり得る。例えば、異種シグナル配列とは、大腸菌由来のペリプラズムシグナル配列である。例えば、大腸菌ペリプラズムシグナル配列は、OmpA、MalE、PebB、OmpT、又はLamBである。例えば、「MGRISSGG」（配列番号1）は、MKKTAIAIAVALAGFATVAQA（配列番号33）、又は表3中のシグナル配列のうちのいずれか、又はいずれかの大腸菌ペリプラズムシグナル配列に対してN末端であり得る。10

【0018】

組み換えシグナル配列は、以下の配列(a) 配列「MGRISSGG」（配列番号1）又は1、2若しくは3個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体、及び(b) (a)に対してC末端の異種シグナル配列を含む。異種シグナル配列は、「MGRISSGG」（配列番号1）に対して、直下のC末端であり得る。例えば、組み換えシグナル配列は、異種大腸菌ペリプラズムシグナル配列に対して直前のN末端に配列「MGRISSGG」（配列番号1）を含むことができる。例えば、組み換えシグナル配列は、異種シグナル配列MKKTAIAIAVALAGFTAQA（配列番号33）に対して直前のN末端に「MGRISSGG」（配列番号1）を含み、それにより組み換えシグナル配列MGRISGGMKKTAIAIAVALAGFATVAQA（配列番号55）を形成することができる。20

【0019】

配列「MGRISSGG」（配列番号1）は、1、2若しくは3個のアミノ酸置換、欠失又は挿入により変異していることができる。配列「MGRISSGG」（配列番号1）+異種シグナル配列は、1~10個のアミノ酸置換、欠失又は挿入により変異していることができる。変異体は、「MGRISSGG」（配列番号1）の活性を保持していることができる。

【0020】

アミノ酸置換は、表1で以下に定義される通りの、同じ分類由来のアミノ酸を用いた少なくとも1個のアミノ酸の置換を含むことができる。30

【0021】

【表1】

表1

アミノ酸分類	アミノ酸残基
疎水性	VILMFWCAGPY
非荷電極性	NQST
塩基性極性	RKH

【0022】

少なくとも1個のアミノ酸置換、欠失又は挿入は、表1で定義される通りの、(i) 1個以上の疎水性アミノ酸、(ii) 1個以上の塩基性極性アミノ酸、(iii) 1個以上の疎水性アミノ酸、及び(iv) 1個以上の非荷電極性アミノ酸を用いてコンセンサス配列を維持することにより、配列「MGRISSGG」（配列番号1）の一次構造を保存することができる。40

【0023】

シグナル配列に対してN末端（5'）である場合の「MGRISSGG」（配列番号1）の活性は、組み換えタンパク質の基底発現（誘導前発現）の制御として定義することができる。基底発現は、宿主細胞の誘導前増殖期中に生じる。この増殖期の間は、組み換えタンパク

10

20

30

40

50

質は、発現されないか又は最小限であるはずであり、その代わり、細胞の代謝負担は増殖に集中している。しかしながら、多数のシグナル配列が、組み換えタンパク質の幾分かの基底発現を許容する。「MGRISSGG」（配列番号1）又はその変異体の活性とは、組み換えタンパク質基底発現を、誘導時で0.5g/L以下のレベルへと制御すること、すなわち、0.5g/L以下の組み換えタンパク質の誘導前発現レベルへと制御することであり得る。「MGRISSGG」（配列番号1）を含むシグナル配列の使用は、組み換えタンパク質の低い誘導前発現レベルを生じさせることができる。例えば、組み換えタンパク質の誘導前発現レベルは、0.5g/L、0.4g/L、0.3g/L、0.2g/L、0.1g/L、又は0.05g/Lであり得る。

【0024】

任意によりこれに加えて、シグナル配列に対してN末端（5'）である場合の「MGRISSGG」（配列番号1）の活性は、組み換えタンパク質を発現する宿主細胞培養液の粘度の制御であると定義することができる。宿主細胞培養液は、宿主細胞及び培養培地を含む上清から構成される。培養液の粘度は、以下の時点：誘導前、誘導時、及び誘導後で、発酵中に変化し得る。「MGRISSGG」（配列番号1）を含むシグナル配列の使用は、発酵中の低粘度の宿主細胞培養液を生じ得る。粘度は、当技術分野で一般的な方法を用いて測定することができる。例えば、粘度は、流動コンシスティンシー指数（K）又は見かけ粘度（ μ ）を用いて測定することができる。

【0025】

例えば、宿主細胞培養液は、K 0.1Nsⁿm⁻²以下の流動コンシスティンシー指数に相当する粘度を有する。例えば、宿主細胞培養液は、K 0.05Nsⁿm⁻²以下、K 0.04Nsⁿm⁻²以下、K 0.03Nsⁿm⁻²以下、K 0.02Nsⁿm⁻²以下、又はK 0.01Nsⁿm⁻²以下の粘度を有する。

【0026】

例えば、「低」粘度とは、約0.001Nsⁿm⁻²～0.01Nsⁿm⁻²のKの値に相当し、「中等度」粘度とは、約0.01Nsⁿm⁻²～0.1Nsⁿm⁻²のKの値に相当し、かつ「高」粘度とは、約0.1Nsⁿm⁻²超のKの値に相当し得る。

【0027】

あるいは、例えば、宿主細胞培養液は、0.1Nsⁿm⁻²以下の見かけ粘度 μ （1s⁻¹のせん断速度で定義される場合）を有する。例えば、宿主細胞培養液は、 μ 0.05Nsⁿm⁻²以下、 μ 0.04Nsⁿm⁻²以下、 μ 0.03Nsⁿm⁻²以下、 μ 0.02Nsⁿm⁻²以下、又は μ 0.01Nsⁿm⁻²以下の見かけ粘度を有する。見かけ粘度は、付与されるせん断速度によって変わり得るであろうし、値は所与の流動拳動指数n及び選択されたせん断速度から演算することができる。

【0028】

一実施形態では、これは、誘導時の培養液粘度である。

【0029】

「MGRISSGG」（配列番号1）を含む組み換えシグナル配列をコードする核酸配列は、宿主細胞での発現のためにコドン最適化されている場合がある。コドン最適化（コドン適合化としても知られる）ための方法は、当技術分野で公知である。例えば、コドン適合化指数（CAI）は、特定の細胞株に対して生来型であるすべての遺伝子に関する、又は高発現遺伝子のみに関する、コドン使用頻度を参照とすることができます。すべての大腸菌遺伝子を参照することができ、又はすべての大腸菌K12遺伝子、又は大腸菌K12クラスII（高発現性）遺伝子を参照することができる。

【0030】

「MGRISSGG」（配列番号1）を含むシグナル配列をコードする核酸配列は、0.40以上、0.45以上、0.50以上、0.55以上、0.60以上、0.65以上、0.70以上、0.75以上、0.80以上、0.85以上、又は0.90以上のCAIスコアを有することができる。

【0031】

例えば、「MGRISSGG」（配列番号1）を含むシグナル配列をコードする核酸配列は、以下のコドン最適化配列を含むことができる：

「atggacgtattctcgccggaaatgtttcaagcaatcaccacagtggcagctctggttattgctacttagcgctatggct」（配列番号49）；又は

10

20

30

40

50

「atgggtcgatatcttccggcggtatgatgttcaaagcaatcactaccgttgacgtctggttattgcgacctctgctatggca」（配列番号50）。

【0032】

任意によりこれに加えて、「MGRISSGG」（配列番号1）又はその変異体若しくはコドン最適化配列の活性とは、5g/L以上のレベルまで誘導時の組み換えタンパク質発現を制御することであり得る。「MGRISSGG」（配列番号1）を含むシグナル配列の使用は、組み換えタンパク質の高い誘導後発現レベルを生じさせることができる。例えば、組み換えタンパク質の誘導後発現レベルは、5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、又は10g/Lであり得る。組み換えタンパク質の発現レベルは、総産生タンパク質、又は細胞外タンパク質であり得る。

10

【0033】

任意によりこれに加えて、「MGRISSGG」（配列番号1）又はその変異体若しくはコドン最適化配列の活性とは、0.1g/L/h以上のレベルまで、誘導時の組み換えタンパク質生産性を制御することであり得る。「MGRISSGG」（配列番号1）を含むシグナル配列の使用は、誘導時に組み換えタンパク質の高い生産性を生じさせることができる。例えば、組み換えタンパク質の誘導後生産性は、0.10g/L/h、0.11g/L/h、0.12g/L/h、0.13g/L/h、0.14g/L/h、又は0.15g/L/hであり得る。組み換えタンパク質の生産性は、総産生タンパク質、又は細胞外タンパク質であり得る。時間（時間）は、誘導時点から算出することができる。

20

【0034】

任意によりこれに加えて、「MGRISSGG」（配列番号1）又はその変異体若しくはコドン最適化配列の活性とは、20%以下のレベルまで、回収物の遠心分離（すなわち、清澄化）後に残留する固形分（%）（600nmでの光学密度の測定により定義される場合）を制御することであり得る。「MGRISSGG」（配列番号1）を含むシグナル配列の使用は、回収物の遠心分離後に残留する低い固形分（%）を生じさせ得る。例えば、回収物の遠心分離後に残留する固形分（%）は、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、又は5%であり得る。

30

【0035】

本開示において使用される細胞培養は、その最も広い意味、すなわち増殖培地中の細胞の大量増殖が与えられる。「発酵すること（fermenting）」及び「培養すること（culturing）」は、本明細書で使用される場合、増殖培地中で細胞を大量増殖させることを意味する。用語「発酵すること」及び「培養すること」は、本明細書では交換可能に使用される。対数期（exponential phase）は、細胞倍加、したがって大量増殖によって特徴付けられる期間である。単位時間当たりに出現する新しい細胞の数は、著しく増加し、既存の集団に比例する。細胞は、誘導前は対数増殖期にあり得る。例えば、組み換えタンパク質の基底発現は、誘導前の対数期の間である。

30

【0036】

定常期（stationary phase）は、細胞の増殖速度及び死亡速度が等しく、線形増殖期に至る場合である。例えば、組み換えタンパク質の発現は定常期の間に誘導される。細胞はしばしば、必須栄養素の枯渇、及び/又は有機酸などの阻害性生成物の形成などの増殖制限因子に起因して定常期に達する。定常期において一定のバイオマスを維持し、したがって大量増殖を維持するために、細胞は増殖し続ける。

40

【0037】

バイオマスはOD^{600nm}により評価することができる。「高細胞密度」バイオマスは、OD^{600nm}が少なくとも30であり得る。例えば、高細胞密度はOD^{600nm}の少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、又は少なくとも60を意味し得る。あるいは、バイオマスは乾燥細胞重量で測定し得る。「高細胞密度」バイオマスは、乾燥細胞重量が少なくとも10gL⁻¹であり得る。例えば、高細胞密度は乾燥細胞重量の少なくとも10gL⁻¹、少なくとも15gL⁻¹、少なくとも20gL⁻¹、又は少なくとも25gL⁻¹を意味し得る。あるいは、バイオマスは湿潤細胞重量で測定し得る。「高細胞密度」バイオマスは、湿潤細胞重量が少なくとも50gL⁻¹で

50

あり得る。例えば、高細胞密度は湿潤細胞重量の少なくとも 50gL^{-1} 、少なくとも 70gL^{-1} 、少なくとも 85gL^{-1} 、又は少なくとも 100gL^{-1} を意味し得る。

【0038】

細胞外培地、上清、細胞外環境、細胞外空間、培養培地及び発酵培地という用語はすべて、細胞培養期間中、誘導時点、及び採取時点における細胞の外部環境を説明するために本明細書において使用される。

【0039】

用語「誘導」又は「発現を誘導すること」は、本明細書で使用される場合、組み換えタンパク質の発現の誘導が開始される点を指す。例えば、組み換えタンパク質の発現は、誘導因子の添加又は温度の変化（誘導が温度依存性である場合）によって誘導され得る。用語「誘導後」は、本明細書において、誘導が開始される点の後の経過時間を表すために使用される。

10

【0040】

「採取（harvest）」という用語は、発酵の終了を意味するために本明細書において使用される。採取は、発酵プロセスを終了させ、発現されている組み換えタンパク質を回収するのに十分であると考えられる発酵中の任意の時点におけるものであってよい。例えば、タンパク質回収は採取の時点に始まる。採取の時間は、上清中の組み換えタンパク質の最適濃度に依存し得る。組み換えタンパク質は、採取時に細胞培養物の細胞外培地から直接回収及び精製されてもよい。あるいは、組み換えタンパク質は、宿主細胞のペリプラズムから採取し精製されてもよい。

20

【0041】

量、分子量、期間などの測定可能な値を指すときに本明細書で使用する「約」は、指定された値からの $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.75\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.25\%$ 、 $\pm 0.2\%$ 、及び $\pm 0.1\%$ の変動を包含することを意味する。そのような変動は、記載される方法を実施するために適切であるためである。

【0042】

組み換えタンパク質

組み換えタンパク質は、抗原結合性タンパク質、例えば、モノクローナル抗体、抗体断片、又はドメイン抗体（dAb）を含み得る。

30

【0043】

組み換えタンパク質は、ウイルスタンパク質、細菌毒素、細菌トキソイド、又はがん抗原を含み得る。

【0044】

本明細書で使用される場合、「組み換えタンパク質」は、組織、系、動物又はヒトの生物学的又は医学的応答を誘発するために哺乳動物に投与することができる任意のタンパク質及び/又はポリペプチドを指す。組み換えタンパク質は、2つ以上の生物学的又は医学的応答を誘発し得る。さらに、用語「治療上有効量」は、そのような量を受けていない対応する被験体と比較して、以下に限定されないが、疾患、障害若しくは副作用の治癒、予防、若しくは改善、又は疾患若しくは障害の進行速度の低下をもたらす任意の量を意味する。この用語はまた、正常な生理学的機能を増強するのに有効な量、及び第2の薬剤の治療効果を増強若しくは補助する患者において生理学的機能を引き起こすのに有効な量をその範囲内に含む。

40

【0045】

用語「抗原結合性タンパク質」は、本明細書で使用される場合、抗原に結合することができる、抗体、抗体断片及び他のタンパク質構築物、例えばドメインを指す。

【0046】

用語「抗体」は、免疫グロブリン様ドメインを有する分子を指すために、最も広い意味で本明細書中で使用される。本明細書で使用される場合、「免疫グロブリン様ドメイン」は、2つの β -シート及び通常は保存されたジスルフィド結合を含む、抗体分子の免疫グロブリンフォールド特性を保持するポリペプチドのファミリーを指す。このファミリーは、

50

モノクローナル（例えば、IgG、IgM、IgA、IgD又はIgE）、組み換え、ポリクローナル、キメラ、ヒト化、二重特異性及びヘテロコンジュゲート抗体；单一可変ドメイン、ドメイン抗体、抗原結合性断片、免疫学的に有効な断片、Fab、F(ab')2、Fv、ジスルフィド連結Fv、一本鎖Fv、ダイアボディ、TANDABS(商標)などを含む。

【0047】

句「单一可変ドメイン」は、異なる可変領域又はドメインとは独立して抗原又はエピトープに特異的に結合する抗原結合性タンパク質可変ドメイン（例えば、VH、VHH、VL）を指す。「ドメイン抗体」又は「dAb」は、「单一可変ドメイン」と同じであると考えることができる。

【0048】

本明細書で使用される場合、「ドメイン」は、タンパク質の残りの部分とは独立してその3次構造を保持する折りたたまれたタンパク質構造を指す。一般に、ドメインは、タンパク質の個別の機能的特性を担い、多くの場合、タンパク質の残りの部分及び/又はドメインの機能を失うことなく、他のタンパク質に付加、除去、又は転移され得る。单一抗体可変ドメイン又は免疫グロブリン单一可変ドメインは、抗体可変ドメインに特徴的な配列を含む折りたたまれたポリペプチドドメインを意味する。したがって、それは、例えば、1つ以上のループが抗体可変ドメインの特徴ではない配列によって置換されている、完全な抗体可変ドメイン及び修飾された可変ドメイン、又は末端切断されている又はN若しくはC末端伸長を含む抗体可変ドメイン、並びに完全長ドメインの結合活性及び特異性を少なくとも部分的に保持する可変ドメインの折りたたまれた断片を含む。

10

20

【0049】

ドメイン抗体は、他の可変領域又は可変ドメインを有するフォーマット（例えば、ホモ又はヘテロ多量体）で存在してよく、ここで、他の領域又はドメインは、单一免疫グロブリン可変ドメインによる抗原結合に必要とされない（すなわち、免疫グロブリン单一可変ドメインは、追加の可変ドメインとは独立して抗原に結合する）。

【0050】

ドメイン抗体（dAb(商標)）は、ヒト抗体可変ドメインであってもよい。dAb(商標)はヒト由来であってもよい。言い換えれば、dAb(商標)は、ヒトIgフレームワーク配列に基づくものであってもよい。

30

【0051】

本明細書で使用される場合、用語「抗原結合部位」は、抗原に特異的に結合することができる抗原結合性タンパク質上の部位を指し、これは單一ドメインであり得るか、又はそれは標準的抗体に見られ得るように対になったVH/VLドメインであり得る。一本鎖Fv (ScFv) ドメインはまた、抗原結合部位を提供し得る。

【0052】

抗原結合性タンパク質は、異なる抗原に対するさらなる抗原結合部位を含んでもよい。例えば、抗原結合性タンパク質は、2つ以上の抗原、例えば2つの抗原、又は3つの抗原、又は4つの抗原に対する特異性を有し得る。

【0053】

抗原結合性タンパク質は、結合ドメインに直接又は間接的に（例えば、リンカー配列を介して）各末端で連結された、抗体のFc領域又はその一部からなる、又は本質的になってよい。このような抗原結合性タンパク質は、Fc領域又はその一部によって分離された2つの結合ドメインを含み得る。分離されたとは、結合ドメインが互いに直接連結されておらず、Fc領域又は他の足場領域の反対側の末端（C及びN末端）に位置し得ることを意味する。

40

【0054】

抗原結合性タンパク質は、直接的又はリンカーを介して間接的に、例えば、各足場領域のN及びC末端で、2つの結合ドメインにそれぞれ結合した2つの足場領域を含み得る。各結合ドメインは、異なる抗原に結合し得る。

【0055】

50

抗原結合性タンパク質は、mAbdAbのタンパク質足場フォーマットをとってもよい。「mAbdAb」及び「dAbmAb」は交換可能に使用され、本明細書で使用されるのと同じ意味を有することが意図される。このような抗原結合性タンパク質は、タンパク質足場、例えばIgGなどのIg足場、例えばモノクローナル抗体、さらなる結合ドメインに連結されているもの、例えばドメイン抗体を含む。mAbdAbは、少なくとも2つの抗原結合部位を有し、そのうちの少なくとも1つはドメイン抗体由来であり、少なくとも1つは対になったVH/VLドメイン由来である。

【0056】

ドメイン抗体は、単量体又は多量体（例えば、二量体）形態で存在し、標的に結合することができ、フォーマット化及び標的化アプローチのための他の分子と組み合わせて使用することができる。例えば、ドメインの1つがアルブミンなどの血清タンパク質に結合する、複数のドメインを有する抗原結合性タンパク質を作製することができる。血清アルブミンに結合するドメイン抗体（AlbuldAbs）は公知であり、ドメイン融合パートナーに独自の権利で延長された血清半減期を提供することができる。

10

【0057】

dAbはまた、他の分子、例えば、薬物、別のタンパク質、抗体分子又は抗体断片とのdAb-コンジュゲート又はdAb-融合物の形態で、他の分子とコンジュゲートされてもよい。例えば、dAb(商標)は、フォーマットされたdAb(商標)として存在してよく、例えば、dAb(商標)は、dAb-Fc融合物又はコンジュゲートとして存在してよい。あるいは、フォーマットされたdAb(商標)は、mAbdAbとして存在することができる。dAb(商標)は、半減期延長タンパク質又はポリペプチド、例えば血清アルブミンに結合するさらなるdAb(商標)（AlbuldAb）、又は半減期延長化学的部分、例えばポリエチレンギリコール（PEG）、との融合物又はコンジュゲートとして存在し得る。dAb(商標)は、さらなる治療分子又は活性分子との融合物又はコンジュゲートとして存在し得る。

20

【0058】

本明細書で使用される場合、「薬物」は、個体に投与して、個体における生物学的標的分子への結合及び/又はその機能の変更を通じて、有益な治療効果又は診断効果を生じることができる任意の化合物（例えば、小有機分子、核酸、ポリペプチド）を指す。標的分子は、個体のゲノムによってコードされる内因性標的分子（例えば、個体のゲノムによってコードされる酵素、受容体、成長因子、サイトカイン）又は病原体のゲノムによってコードされる外因性標的分子であり得る。薬物は、dAb(商標)又はmAbであり得る。

30

【0059】

「dAbコンジュゲート」は、薬物が共有結合又は非共有結合によって化学的に結合されたdAb(商標)を含む組成物を指す。好ましくは、dAb(商標)及び薬物は共有結合している。そのような共有結合は、ペプチド結合又は他の手段、例えば改変側鎖を介するものであってよい。非共有結合は、直接的（例えば、静電相互作用、疎水性相互作用）又は間接的（例えば、一方のパートナーが薬物に共有結合し、相補的な結合パートナーがdAb(商標)に共有結合している、相補的結合パートナー（例えばビオチン及びアビジン）の非共有結合によるもの）であってもよい。相補的結合パートナーが使用される場合、結合パートナーの一方は薬物に直接又は適切なリンカー部分を介して共有結合することができ、相補的結合パートナーはdAb(商標)に直接又は適切なリンカー部分を介して共有結合することができる。

40

【0060】

本明細書で使用される場合、「dAb融合物」は、dAb(商標)及びポリペプチド薬物（ポリペプチド、dAb(商標)又はmAbであり得る）を含む融合タンパク質を指す。dAb(商標)及びポリペプチド薬物は、単一の連続ポリペプチド鎖の個別の一部（部分）として存在する。

【0061】

したがって、本開示の方法は、治療用タンパク質、モノクローナル抗体（mAb）、ドメイン抗体（dAb(商標)）、dAb(商標)コンジュゲート、dAb(商標)融合物、mAbdAb、又は本明細書に記載される任意の他の抗原結合性タンパク質の1つ以上に適用され得る。

50

【0062】

一実施形態では、抗原結合性タンパク質は、TNF シグナル伝達を妨げるdAb(商標)である。一実施形態では、dAb(商標)はTNF を中和する。一実施形態では、dAb(商標)は、TNF

又はTNF 受容体に特異的に結合する。一実施形態では、dAb(商標)はTNFR1に特異的に結合する。一実施形態では、抗原結合性タンパク質は、配列番号53 (DOM0101) のVH dAb(商標) (抗TNFR1) /DOM0101) である。

【0063】

タンパク質の発現：宿主細胞

好適な宿主細胞としては、微生物細胞、例えばグラム陰性細菌、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*) (例えば、W3110及びBL21) 、シュードモナス (*Pseudomonas*) 及びサルモネラ (*Salmonella*) が挙げられる。特定の実施形態では、宿主細胞は大腸菌である。一実施形態では、大腸菌株はW3110である。

10

【0064】

シグナル配列及び組み換えタンパク質をコードする組み換え核酸分子を含むベクターも本明細書に記載される。このようなベクターは、細胞を遺伝子操作して所望のタンパク質生成物を発現させるために使用される。ベクターは、シグナル配列及び組み換え核酸に機能的に連結された1つ以上の発現制御エレメント又は配列を含む発現ベクターであってもよい。ベクターの例としては、プラスミド及びファージミドが挙げられる。

20

【0065】

好適な発現ベクターは、いくつかの成分、例えば、複製起点、選択可能マーカー遺伝子、1つ以上の発現制御エレメント、例えば転写制御エレメント (例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター) 及び/又は1つ以上の翻訳シグナル、シグナル配列又はリーダー配列を含有し得る。発現制御エレメント及びシグナル配列は、存在する場合、ベクター又は他の供給源によって提供され得る。例えば、抗体鎖をコードするクローニングされた核酸の転写及び/又は翻訳制御配列を用いて発現を指令することができる。

20

【0066】

プロモーターは、所望の細胞における発現のために提供され得る。プロモーターは、構成的又は誘導的であり得る。例えば、プロモーターは、核酸の転写を指令するように、抗体、抗体鎖又はその一部をコードする核酸に機能的に連結され得る。グラム陰性細菌 (例えば、大腸菌のためのlac、tac、trp、phoA、lambdapL、T3、T7 (T7A1、T7A2、T7A3) プロモーター) のための種々の好適なプロモーターを使用し得る。使用され得るオペレーター配列としては、lac、gal、deo及びginが挙げられる。1つ以上の完全なパリンドロームオペレーター配列を使用し得る。一実施形態では、本開示の組み換えタンパク質の発現は、誘導性プロモーターの制御下にある。例えば、大腸菌lac、tac及びtrcプロモーターは、ラクトース又は非加水分解性ラクトース類似体であるイソプロピル-β-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) で誘導可能であり、phoA、trp及びaraBADプロモーターは、それぞれ、ホスフェート、トリプトファン及びL-アラビノースによって誘導可能である。

30

【0067】

さらに、発現ベクターは、典型的には、ベクターを保有する細胞の選択のための選択可能マーカー、及び複製可能な発現ベクターの場合は複製起点を含む。抗生物質又は薬物耐性を付与する生成物をコードする遺伝子は、一般的な選択可能マーカーであり、使用することができる (例えば、ラクタマーゼ遺伝子 (アンピシリン耐性) 、テトラサイクリン耐性のためのTet遺伝子) 。ジヒドロ葉酸レダクターゼマーカー遺伝子は、様々な細胞においてメトトレキサートによる選択を可能にする。

40

【0068】

WO2007/088371に記載の発現ベクター (例えば、pAVE037、pAVE007、又はpAVE011) を用いてタンパク質を発現させてもよい。一実施形態では、ベクターはpAVE011である。あるいは、pJExpress401などのベクターを用いてタンパク質を発現させてもよい。

【0069】

例示的な代替発現ベクター及び方法 (例えば、CHO、PerC6などと共に使用するための)

50

も公知である。

【0070】

宿主細胞は、上記の組み換え核酸分子又はベクターを含む。

【0071】

本開示の宿主細胞培養物は、宿主細胞の増殖及び組み換えタンパク質の発現を支持する任意の培地で培養され得る。そのような培地は、当業者に周知である。

【0072】

タンパク質標的化

組み換えタンパク質の発現は細胞質で起こるが、組み換えタンパク質の最終的な位置は、組み換えタンパク質の性質、使用される宿主細胞及び使用される発酵条件に依存して、細胞質、ペリプラズム又は細胞外であり得る。10

【0073】

本発明におけるシグナル配列の使用は、組み換えタンパク質に関して細胞のペリプラズム（例えば、グラム陰性細菌において）に向かわせることができる。

【0074】

グラム陰性細菌では、一部の分泌タンパク質は、I型、III型、IV型又はVI型分泌経路を介して一段階で内膜及び外膜を通って輸出されるが、他のタンパク質は、ユニバーサルSec又はTat経路を介してペリプラズムに最初に輸出され、次いで、主にII型又はV型機構を介して外膜を横切って転位される。II型系は、Secリーダー配列を含む未成熟タンパク質がSec経路を使用してペリプラズムへ輸送される、2段階プロセスを含む。シグナル配列は、タンパク質分解によって除去され、ペリプラズムに存在する成熟したプロセシングされたタンパク質をもたらし、タンパク質が培養培地に分泌されるか否かは、リーダー配列、タンパク質、細胞及び培養条件の特性に大きく依存する。また、細胞溶解（自己溶解）の場合、培養培地中のタンパク質の大部分がペリプラズムに由来し、したがってプロセシングされると見なすことができる。組み換えタンパク質は、シグナル配列を介して培養培地中に能動的に分泌され得る；又は当技術分野で公知の他の細胞経路を介してペリプラズムから培養培地に受動的に分泌され得る。

【0075】

シグナル配列のプロセシングは、タンパク質からのシグナル配列の切断及び除去を含む。しかし、シグナルのいくつかのアミノ酸は、タンパク質のN末端に残存し、シグナル配列が適切にプロセシングされないことがある。シグナル配列は、配列の10%以下がタンパク質のN末端に残るように、90%以上プロセシングされていてもよい。シグナル配列は、少なくとも91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%プロセシングされてもよい。シグナル配列は、細胞の分泌経路を通過した後にタンパク質のN末端に残存しないように、約100%プロセシングされてもよい。30

【0076】

シグナル配列は、ペリプラズム標的化シグナル配列、例えば、N末端ペリプラズム標的化配列であり得る。タンパク質をペリプラズム又は細胞外環境に導くためのシグナル配列は、当技術分野で公知である。シグナル配列は異種シグナル配列を含み得る。

【0077】

採取 (harvest)

採取は発酵の終了である。採取は、発酵プロセスを終了させ、発現される組み換えタンパク質を回収するのに十分であると考えられる発酵中の任意の時点におけるものであつてよい。採取は、誘導後10～160時間に起こり得る。例えば、採取は、誘導後15～60時間で起こり得る。採取は、誘導後24、48又は55時間で起こってもよい。採取時に、微生物細胞集団の固体物量は、5～30%湿潤細胞重量 (WCW) であり得る。

【0078】

発酵槽の容量は、

(i) 約10,000リットル；約5,000リットル；約2,000リットル；約1,000リットル；約500リットル；約125リットル；約50リットル；約20リットル；約10リットル；約5リットル；40

10

20

30

40

50

又は

(ii) 5～10,000リットル；10～5,000リットル；20～2,000リットル；50～1,000リットルであってよい。

【0079】

採取物は、自己溶解としても知られる、自然に溶解した細胞を含み得る。例えば、採取物中の細胞の1～50%は、自己溶解を受けていてもよい。あるいは、採取物中の細胞の20～50%、又は30～50%、又は40～50%は自己溶解している。あるいは、採取物中の細胞の10%以上、20%以上、30%以上、40%以上又は50%以上は自己溶解している。自己溶解は、清澄化採取物中のDNA濃度によって又はキャパシタンスによって間接的に決定され得る。

10

【0080】

採取は、細胞及び細胞外培地（すなわち、細胞培養物又は培養液）の発酵槽を空にする選択的ステップを含み得る。

【0081】

採取物の選択的前処理

宿主細胞及び組み換えタンパク質に応じて、採取物の前処理は、採取物を調整する方法である。このステップは、発酵槽内で、又は発酵槽から採取物を取り出した後に行い得る。前処理としては、採取物を熱的、機械的又は化学的に溶解すること（例えば、ホモジナイゼーション、凍結融解、溶解）；及びペリプラズム抽出が挙げられる。少なくとも1つのペリプラズム抽出物は、当技術分野で公知の方法を用いて抽出され得る。あるいは、十分な生成物が既に細胞外環境に存在する場合、このような前処理は必要とされなくてもよい。

20

【0082】

清澄化

清澄化は、固体微粒子を除去するプロセスである。清澄化は、精製中のその後のクロマトグラフィーステップにおける負担を軽減することができる。典型的な清澄化ステップは、沈降（sedimentation）（例えば重力による）としても知られる沈降（settling）ステップ、及び/又は遠心分離ステップ、及び/又はろ過ステップを含む。

【0083】

遠心分離ステップは、連続遠心分離（例えば、連続供給領域を用いる）であってもよい。遠心分離機は、それ自体、固体を排出することに関して「バッチで」又は「断続的に」又は「連続的に」動作してもよい。例えば、連続遠心分離ステップとして、管状ボウル遠心分離機を使用してもよい。

30

【0084】

組み換えタンパク質の精製

組み換えタンパク質は、培養培地から直接回収され得る。組み換えタンパク質の回収に統いて、組み換えタンパク質の十分な純度を確保するための精製が行われる。1つ以上のクロマトグラフィーステップ、例えば1つ以上のクロマトグラフィー樹脂；及び/又は1つ以上のろ過ステップが、精製に使用され得る。例えば、プロテインA又はLなどの樹脂を使用するアフィニティーコロマトグラフィーを用いて、組み換えタンパク質を精製し得る。あるいは、又はこれに加えて、陽イオン交換などのイオン交換樹脂を用いて、組み換えタンパク質を精製し得る。

40

【実施例】

【0085】

一定範囲の生来型内因性大腸菌N末端シグナル配列（SS）を、大腸菌W3110宿主株からのドメイン抗体（dAb）発現について研究した。有望な属性を有する2種類の配列YcelISS及びIvySSを、現在用いられているシグナル配列OmpASSと比較して、バイオリアクター研究に進めた。研究されたバイオリアクター条件に関して、OmpASSの使用は、短い発酵時間での高生成物力値を生じたが、高度に粘稠な培養液を伴い、これは、フルスケールでの遠心分離による清澄化のためには困難を伴うことが、超小規模化研究によって予測された。Ycel

50

SSの使用は、力価及び粘度並びに遠心分離の困難性についてOmpASSについてのものと同等の結果をもたらし、一方で、IvySSの使用は、遠心分離が比較的容易であった低粘度培養液、及び高生成物力価を生じたが、これは比較的長い発酵時間で達成された。IvySSのコドン最適化により、遠心分離に好適な同様に低い粘度の培養液及び高力価が生じたが、これはこの場合には、OmpASSを用いた対照についてのものと同等に比較的短い発酵時間で得られた。IvySS又はその最適化型を用いて達成される改善は、dAbの基底発現、すなわち、誘導前の発現の低下に関連するようである。この発現低下は、シグナル配列のN末端から8コドンのカセットの存在によるものであると考えられ、このカセットは、除去されると、OmpASSを用いて得られるものと同様の高粘度培養液を生じた。基底発現と培養液粘度との関係が調べられる。

10

【 0 0 8 6 】

材料及び方法

分泌カセットの分子クローニング：大腸菌株One ShotTM TOP10 (Life Technologies, California, USA) 及びW3110 (ATCC 27325) を、それぞれ、クローニング及び組み換えタンパク質発現のための宿主菌株として用いた。種々の上流シグナル配列を含むdAb分泌カセットの生成のために設計されたオリゴヌクレオチド（表2）を、仕様通りに構築した（Invitrogen, Paisley, UK）。用いた試薬は、制限酵素（NdeI及びXhoI）、T4 DNAリガーゼ（New England Biolabs UK Ltd., Hertfordshire, UK）及びDNAポリメラーゼ（PhusionTM flash high-fidelity PCRマスターMix，Finnzymes Oy, Espoo, Finland）であった。テトラサイクリン抵抗性遺伝子tetA及びイソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド（IPTG）誘導性T7A3プロモーターを含む、pAVEwayTM発現ベクターであるpAVE011（本明細書中ではp11と記載される）（国際公開第2007/088371号；Fujifilm Diosynth Biotechnologies UK Ltd., Billingham, UK）を、dAb分泌カセットのための骨格として用いた。

20

【 0 0 8 7 】

【表2】

表2 種々のシグナル配列を含む dAb 遺伝子構築物の構築に用いたオリゴヌクレオチド。制限部位 *NdeI* (CATATG) および *XbaI* (CTCGAG) には下線を施してある。

配列番号	オリゴ名	オリゴヌクレオチド配列 (5' → 3')
2	IvySS fwd1	ctctggtcatcgctaccagtgcataatggcgaaagtacaactgctggagag
3	IvySS fwd2	tgtatgttaaggcaataacgcacagtcggccgtctggatcgctaccagt
4	IvySS fwd3	<u>gaccat</u> atggcaggataagctcgggaggaatgtttaaggcaataacg
5	YceISS fwd1	ttctctgcccgttcagcgggtgccgaagtacaactgctggagag
6	YceISS fwd2	ggtttaacacctcgccgtccctgatgttctctgcccgttcagc
7	YceISS fwd2	<u>gaccat</u> atgaaaaaaaaagcctgctttaacacctcgccgtccctg
8	YgiWSS fwd1	gtgcagcgcaccgggtatggcagaagtacaactgctggagag
9	YgiWSS fwd2	cagtaatcgcatgtatggccctgtgcagcgcaccgggtatgg
10	YgiWSS fwd3	<u>gaccat</u> atgaaaaaaaaattcgcagcagtaatcgcatgtatggccctgtg
11	YncESS fwd1	gtttcatcattcagtaacgcaggccgaagtacaactgctggagag
12	YncESS fwd2	ttactgttaggttcattgttgtttcatcattcagtaacgcaggc
13	YncESS fwd3	ttttcatcgccctgcgtgggttcatactgttaggttcattgttgt
14	YncESS fwd4	<u>gaccat</u> atgcattacgtcatgtttcatcgccctgcgtgg
15	FimASS fwd1	cctcaaggctacagcggctctggccgaagtacaactgctggagag
16	FimASS fwd2	caatcggttctgtcggctctgtccctcagttcacagcggctctgg
17	FimASS fwd3	<u>gaccat</u> atgaaaaaaaaatttactctggcaatcggttctgtcggctctg
18	YehZSS fwd1	ggcagccgtgagccgtccgcataaaggcagaagtacaactgctggagag
19	YehZSS fwd2	ctggggcagggttactggttatgttggcagccgtgagccgtccgcataaag
20	YehZSS fwd3	<u>gaccat</u> atgcccactttaaagctctggcagggttactggttatg
21	YcdOSS fwd1	gttttctctgttttatggctaaccgcgaagtacaactgctggagag
22	YcdOSS fwd2	acgcattcgcaggtagcgtggctgcgtgtttctctgtttatggctaac
23	YcdOSS fwd3	<u>gaccat</u> atgaccat�acttccgcgttaacgcattgcagttgagcgtg
24	IvyOpt1SS fwd1	gctctggttattgtctactagcgctatggctgaagtacaactgctggagagc
25	IvyOpt1SS fwd2	atgatgttcaaagcaatcaccacagtggcagctgttttttgcgtactagcg
26	IvyOpt1SS fwd3	<u>gaccat</u> atgggacgttttctcgccggaaatgttcaaagcaatcaccacag
27	IvyOpt2SS fwd1	gctctggttattgcgcacctctgtatggcagaagtacaactgctggagagcg
28	IvyOpt2SS fwd2	atgatgttcaaagcaatcactaccgttgcagctgttttttgcgtactac
29	IvyOpt2SS fwd3	<u>gaccat</u> atgggtcgatcttccggcggtatgttcaaagcaatcactac
30	IvyTruncSS fwd	<u>gaccat</u> atgtttaaggcaataacgcacagtcggccgtctg
31	Ivy'OmpASS fwd	<u>gaccat</u> atggcaggataagctcgggaggaatgaagaaaaactgtatcg
32	dAb reverse	cttactcgagtcattagctgttacggtgaccagag

10

20

30

40

【0088】

選択された7種類の内因性大腸菌シグナル配列（表3）を、約13.1kDaの分子量を有するT NFR1に対するV_Hドメイン抗体（本明細書中ではdAbと記載される、配列番号53）をコードする遺伝子の上流に遺伝的に融合させた。最大で4回の連続的PCR反応を用いて、所望のシグナル配列を有するDNAを含むdAbの上流端部を伸長させた。これは、3種類又は4種類のフォワードオリゴ（各連続PCR反応に対して1種類）、リバースオリゴ（配列番号32）（表2を参照されたい）及び初期鋳型としてのp11発現プラスミド（pDAB01、表3を参照されたい）を必要とした。PCR反応物は、適切なフォワード（fwd）オリゴ及びリバース（rev）オリゴ（配列番号32、表2）、DNA鋳型及びPhusionTM flash high-fidelity PCRマスター

50

クスを含有した。熱サイクルは、以下の条件を用いて行なった：98 10秒間、続いて98 1秒間、55 5秒間及び72 15秒間を30サイクル、並びに72 1分間の最終インキュベーション。PCRの各ラウンド後、生成物を、カラムクロマトグラフィーを用いて精製し(QIA quick™ PCR精製キット, QIAGEN Ltd., Manchester, UK)、NdeI及びXhol制限部位に挟まれたシグナル配列-dAb融合力セットが生成されるまで、次の連続的PCR反応のためのDNA鑄型として用いた。分泌カセットを、NdeI及びXholを用いて消化し、NdeI-Xhol消化p11発現ベクターへと、T4 DNAリガーゼを用いてライゲーションし、その後、熱ショックにより大腸菌One Shot™ TOP10細胞に形質転換して、vLB塞天テトラサイクリン平板上で選択した。プラスミドpDAB02～pDAB08(表3)をDNA配列決定により確認し、続いて、タンパク質発現研究のために大腸菌W3110細胞へと形質転換した。調製された各構築物の細胞バンク(10
グリセロールストック、20% v/v)を-80°で保存した。

【0089】

【表3】

表3. dAb 発現研究に用いた発現プラスミドおよび大腸菌シグナル配列。^a シグナル配列名および[コドン数]；^b 配列の終端にC末端切断部位をするシグナル配列アミノ酸配列。^c 各シグナル配列に関するコドン適合化指数(CAI)は、大腸菌クラスII(高発現性)遺伝子のコドン使用頻度(Ecoli_high.cut)を参照としてEMBOSSスイートを用いて解析した。

プラスミド名	^a シグナル配列	^b アミノ酸配列	ヌクレオチド配列(配列番号)	^c CAI
pDAB01 OmpASS [21]	MKKTAIAIAVALAGFATVAQA(配列番号33)	atgaagaaaaactgtatcgctattgcgggtgcgttgcaggtttgccacggtgtgcgaggcc(配列番号41)	0.701	
pDAB02 IvySS [28]*	MGRISGGMMFKAITTVAALVIATSAMA(配列番号34)	atggcaggataagctcgggaggaaatgtgttaaggcaataacgacagtcgcgtctgtcatcgctaccatgtcaatggcg(配列番号42)	0.267	
pDAB03 YceSS [22]	MKKSLLGLTFASLMFSAGSAVA(配列番号35)	ataaaaaaaaacgcctgtcggttaacccttcgcgtccctgtatgttcgtccggttcagcggtgc(配列番号43)	0.639	
pDAB04 YgiWSS [20]	MKKFAAVIAVMALCSAPVMA(配列番号36)	atgaaaaaaattgcacgactaatcgacgtatggccctgtgcacgcacccgtatggca(配列番号44)	0.808	
pDAB05 YncESS [30]	MHLRHLFSSRLRGSLLLGSLLVVSFSTQAA(配列番号37)	atgcatttaacgtcatctgtttcatcgccgtcggttcattactgttaggttcattgtgtttcatcattcgtacgcaggcc(配列番号45)	0.316	
pDAB06 FimASS [23]	MKIKTLAIVVLSALSLSSTAALA(配列番号38)	atgaaaattaaacactctgcaactcggtgttcgtcggtctgtccctcagtttacagcggtctggcc(配列番号46)	0.606	
pDAB07 YehZSS [23]	MPLLKLWAGSLVMLAASLPLQA(配列番号39)	atgcactttaaagctcggtcactgggtatgttgcagccgtga(配列番号47)	0.377	
pDAB08 YcdOSS [26]	MTINFRNALQLSVAALFSSAFMANA(配列番号40)	atgaccattaactcccggtaaacgcattgcagttgagcgtggctgcgtttctgttatggctacgcc(配列番号48)	0.652	

*アミノ酸配列はIvyssに対する通りである。23位のコドン配列がgccからgctへと改変してある。

【0090】

【表4】

表4. モデルdAbの発現速度に対するコドン適合化指数(CAI)の影響および高細胞密度フェッドバッチ発酵中の培養液粘度に対する後続の影響を調べるための、変形型大腸菌Ivyシグナル配列を含む発現プラスミド。^a シグナル配列名および[コドン数]。^b 各シグナル配列に関するコドン使用頻度指数は、大腸菌クラスII(高発現性)遺伝子のコドン使用頻度(Ecoli_high.cut)を参照としてEMBOSSスイートを用いて解析した。

プラスミド名	^a シグナル配列	説明	ヌクレオチド配列	^b CAI
pDAB021 IvyOpt1SS [28]	大腸菌遺伝子を参照として完全にコドン最適化	Atgggacgtatttcgtccggcgaaatgtgtcaaaggcaataccacatggcagctgtttatgtctactagcgctatggct(配列番号49)	0.580	
pDAB022 IvyOpt2SS [28]	クラスII遺伝子のみを参照として完全にコドン最適化	atgggtcgatcttcgtccggcggtatgtgttcaaggcaatcactccgtcgctgttattgcgacccctgtatggca(配列番号50)	0.899	
pDAB023 IvyTruncSS [20]	最初の8個のIvySSコドンを除去	atgatgtttaaggcaataacgcacgtcgccgtctggtcatcgctaccagtgcattggcg(配列番号51)	0.403	
pDAB011 Ivy'OmpASS [29]	最初の8個のIvySSコドン+OmpASS	atgggcaggataagctcggtggaggaaatgaagaaaactgtatgcatttgcgttgcgtggct(配列番号52)	0.396	
	MGRISGGGMKKTAIAIAVALAGFATVAQA(配列番号55)			

【0091】

【表5】

表5. 高細胞密度大腸菌発酵中の基底dAb発現のレベル、培養液粘度および初期生産性に対するN末端シグナルペプチド配列の影響。^a 初期生産性は、誘導後の最初の24時間に発現された総dAbである(図2Eおよび図4E)。^b N末端カセットは、IvySS由來の最初の8アミノ酸に対するコドンを含む。

出力	シグナル配列 [CAI, コドン数, CAI/コドン数]		
	カセットなし	^b カセット	
OmpASS [0.702, 21, 0.033]	IvySS [0.267, 28, 0.009]	IvyOpt1SS [0.580, 28, 0.021]	
Yce/SS [0.639, 21, 0.029]	Ivy'OptASS [0.396, 29, 0.013]	IvyOpt2SS [0.899, 28, 0.032]	
IvyTruncSS [0.403, 20, 0.020]			
基底発現	高	低	低
粘度(誘導前)	高	低	低
^a 初期生産性	高	低	高

10

【0092】

コドン最適化されたIvyシグナル配列IvyOpt1SS及びIvyOpt2SSを含むdAb発現プラスミドpDAB021及びpDAB022(表4)のための分泌カセットは、それぞれfwdオリゴ23~25及び26~28並びにリバースオリゴ(配列番号32、表2)を用いて、pDAB01(上記の通り)からの、dAbをコードする遺伝子のPCR増幅により生成した。dAbの上流に切断型Ivyシグナル配列(IvyTruncSS)を含むpDAB023(表4)のための分泌カセットは、pDAB02を鑄型として(表3)並びにfwdオリゴ29及びrevオリゴ31を用いるPCR増幅により生成した。pDAB011のための分泌カセットは、OmpASSに融合されたIvySSの最初の8個のコドンから構成される上流シグナル配列Ivy'OptASSを含むdAbをコードしていた。これは、fwdオリゴ30及びrevオリゴ(配列番号32)を用いてpDAB01(表3)から、OmpASS-dAbをコードする遺伝子を増幅することにより生成した。その後に、すべての分泌カセットを、NdeI/XhoI部位でp11ベクターにライゲーションし、大腸菌W3110株へと形質転換した。

20

【0093】

各シグナル配列についてのコドン適合化指数(CAI)(Sharp and Li 1987)は、クラスII(高発現性)遺伝子のみについてのコドン使用頻度(Ecoli_high.cut)を参照して、EMBOSSスイート(Rice et al. 2000)を用いて決定した。IvySSは、コドン適合化アルゴリズムを用いて大腸菌での発現についてコドン最適化した(LeTo Software, version 1.0.2.6, Entelechon GmbH, Regensburg, Germany)。コドン(LeTo)閾値は、大腸菌K12遺伝子のすべてを参照として、また、それぞれIvyOpt1SS及びIvyOpt2SS(表4)を作製するためには大腸菌K12クラスII(高発現性)遺伝子のみを参照として、70%に設定した。

30

【0094】

発酵: すべての培地及び試薬は、特に記載しない限り、Sigma-Aldrich社(Dorset, UK)から購入した。接種培養及び深型24ウェルプレート(24dwp)培養は、ルリア・ベルタニ(vLB)培地(pH7.0):10g.L⁻¹DifcoTMSelect Soytone(Becton Dickinson and Co. (BD), New Jersey, USA)、5g.L⁻¹BactoTM酵母抽出物(BD社)及び5g.L⁻¹NaCl中で行なった。24dwp培養に対する10倍濃縮グリセロールブースト(pH7.0)は、以下の成分を含んだ:70g.L⁻¹グリセロール、50g.L⁻¹酵母抽出物(BD社)、25g.L⁻¹(NH₄)₂SO₄及び1.0μg.mL⁻¹チアミン。高細胞密度発酵は、他の文献に記載された通りの複合培地中で行なった(Voulgaris et al. 2015)。すべての発酵培地(TB/SBフィードを除く)には、p11発現プラスミドを含有する大腸菌クローニングの選択性のために、15μg.mL⁻¹テトラサイクリン(Tet)を添加した。

40

【0095】

深型ウェルプレート発酵のために、vLB培地(20mL)中の接種培養物を、125mLのバッフル付きベントキャップエルレンマイヤー振盪フラスコ(Corning Life Sciences, Amsterdam, Netherlands)中で、pDAB発現プラスミドを用いて形質転換された0.5%v/v大腸菌W3110を用いて調製した。培養物は、25mmのオフセットを有する軌道シェーカー(Clismo-shaker ISF1-X, Kuhner Shaker Ltd., Derbyshire, UK)で、23°、230rpmにて一晩、OD_{600nm}が1~2となるまでインキュベートした。これを用いて、OD_{600nm}が0.05となるように、新鮮なvLB培地に接種し、深型24ウェルマイクロタイープレート(24dwp; Porvair Sciences Ltd., Wrexham, UK)のピラミッド型平底四角形ウェル(2mL規定容量)へと分注し、

50

高細胞密度通気性蓋システム (Applikon Biotechnology, Tewkesbury, UK) を用いて覆った。プレートを、OD_{600nm}が0.7~1.0となるまで、37℃、230rpmにてインキュベートし、続いて、0.1mM IPTGを10×グリセロールブースト（調合については上記を参照されたい）の同時添加と共に用いて、dAb形成を誘導した。培養物を、さらに24時間、23℃、230rpmにてインキュベートした。回収培養物（2mL）をペレット化し（16100×g、10分間）、培養液上清を抽出した。ペレットを1mLの0.1M PBS中に再懸濁し、上述の通りに再度遠心分離した。培養液上清及びペレットを、-20℃で保存した。

【0096】

バイオリアクター発現のために、vLB培地（200mL）中の接種培養物を、500mLのバッフル付きベントキャップエルレンマイヤー振盪フラスコ（Corning Life Sciences社）中で、0.5%v/vグリセロールストックを用いて調製した。培養物を、OD_{600nm}が1~2となるまで4~5時間、軌道シェーカーで37℃、230rpmにてインキュベートし、上述の複合培地が入った1Lの規定容量のリアクター（SR1000DLLバイオリアクター、容器直径100mm、アスペクト比2.4:1、頂部駆動型三重Rushton 6枚羽、46mm径、インペラ-付き、DASGIP AG, Jülich, Germany）に接種するために0.05%v/vで用いた。リアクターを、以下の条件で維持した：30℃、pH7.0±0.05（25%v/v H₃PO₄及び30%v/v NH₄OHを用いて）；溶存酸素（DO）3.0±5%（以下の条件を用いるカスケード制御により：(1) インペラ-速度（400~1200rpm）；(2) 気体流速（1~2vvm）及び(3) 酸素含量（21~100%））。フィード培地は、完全なグリセロール消費を示すDOスパイクの10分後から始まって、6.0mL·L⁻¹·h⁻¹で自動的に添加した。培養物がOD_{600nm}=75±3（約25dcw g·L⁻¹のバイオマスに対応する）に達したら、0.2mM IPTGの添加を用いてdAbの産生を誘導し、発酵の休止のために、フィード速度を3.6mL·L⁻¹·h⁻¹まで低下させた。pH、溶存酸素、攪拌速度、温度、気流速度、酸素割合（%）、酸素取り込み速度、二酸化炭素発生速度のリアルタイム値を記録した（DASGIP Control, Jülich, Germany）。新鮮細胞培養液のレオロジー特性を、25℃で、漸増及び漸減するせん断運動（shear sweep）（5段階の増分で1.3~110s⁻¹、各増分につき30s保持）にわたって測定した（DV-II+ Programmable Viscometer、ULA、1.233N又はSSA、1.32Nスピンドルのいずれかを装着、Brookfield Engineering Laboratories Inc., Massachusetts, USA）。レオロジーは、例えば遠心分離による、培養液の加工容易性の指標として用いられる。

【0097】

細胞培養液処理：超小規模化せん断デバイス（20mLステンレス鋼チャンバー、50mm径×10mm高、ステンレス鋼回転盤（40mm径×0.1mm厚、12000rpm）を装着、UCL機械工場で製作）を用いて、細胞培養液サンプルを、0.53×10⁶W·kg⁻¹の最大エネルギー散逸速度（）に20秒間曝露した（Chatel et al. 2014a）。そのような 値は、高せん断継続流動工業スケール遠心分離（high shear continues-flow industrial scale centrifuge）のフィード期間中に生じるものと、典型的に模倣する。次に、サンプル（2mLのせん断済み又は非せん断培養液）を遠心分離し（3400×g、7分間、21℃、Centrifuge 5415R, Eppendorf, Cambridge, UK）、上清（0.8mL）を回収した。これらを、十分に清澄化したサンプル（16100×g、30分間）についてのベースラインOD_{600nm}値に対して補正したOD_{600nm}での測定により、残留する固形分に関して特性決定した。遠心分離条件は、群V/t^{1/2}（式中、Vは遠心分離される体積（2.0mL）であり、tは遠心分離の時間（420s）であり、^{1/2}は、使用される回転数及び遠心分離ヘッドの形状に対する遠心管の相当する沈降面積（=0.164m²、計算の詳細についてはChatel et al. 2014aを参照されたい）である）に関して特性決定された。

【0098】

解析方法：細胞ペレットを解凍し、1mL（24dwpサンプル）又は4mL（1Lバイオリアクターサンプル）の50mM Tris-HCl pH7.5へと再懸濁した。各再懸濁ペレットのうちの1mLを、30秒間オン、10秒間オフ、強度8.0の2種類のパルスを用いて溶解させた（Soniprep 150 Plus Ultrasonic disintegrator、指數マイクロプローブを装着、カタログ番号38121-114A、MSE (UK) Ltd., London, UK）。溶解させた全細胞サンプルを、続いて、16100×gで20

10

20

30

40

50

分間遠心分離し、上清を回収した。発酵培養液サンプル及び全細胞溶解物を、次に、0.22 μmフィルタープレートを3000×gで30分間遠心して用いて、ろ過した (GHP membrane, AcroPrep™ 96 Filter Plate, Pall Life Sciences, Portsmouth, UK)。大腸菌24dwp培養物からのdAbの発現は、SDS-PAGEにより分析した。サンプルを還元し、変性させ、SDS-PAGEゲル (NuPAGE(登録商標) 4-12% Bis-Tris, Invitrogen社) にロードして、1×MESランディングバッファー (Invitrogen社) 中で、製造業者の使用説明書通りにゲル電気泳動を行なった。タンパク質をクマシーカラーカードにより検出し、生成物を、濃度測定ソフトウェアを用いて定量した (Image Lab version 3.0, Bio-Rad Laboratories社)。高細胞密度大腸菌発酵に関しては、培養液上清及び全細胞溶解物中のdAb生成物力価を、1mL HiTrap MabSelect Xtraカラム (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK) を装着したプロテインA HPLC (HP1100、冷却オートサンプラー装備、Agilent Technologies UK Limited, Cheshire, UK) により決定した。カラムを、0.1M PBS pH7.3を用いて平衡化及び洗浄し、かつ、20mM HCl pH1.8を、生成物溶出のために用いた (タンパク質濃度は280nmでモニタリングした)。dAbの濃度は、標準曲線を用いて決定した。精製されたdAbの分子量は、液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析を用いて決定した (Agilent HP1100 (Agilent Technologies UK Ltd.) (Micromass LCT質量分析計 (Waters, Massachusetts, USA) と組み合わせ、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) プローブを装着し、MassLynxバージョン4.1 (Waters社) ソフトウェアを用いて制御した) を用いるGSK社内手法)。二本鎖DNAは、蛍光光度法 (Qubit™ dsDNA BRアッセイキット、Life Technologies社) を用いて、製造業者の説明書通りに測定した。

【0099】

実施例1

図1は、細胞外局在及び細胞内局在、N末端シグナル配列の初期のスクリーニングについてdAbの発現を詳述する、最終バイオマスレベル及びSDS-PAGEゲルを示す。

【0100】

24dwp発酵での大腸菌W3110からのdAbの発現に対する種々のN末端シグナル配列の影響を、図1に示す。凡例：B、細胞外（上清）に局在するdAb；C、細胞内（全細胞溶解物：ペリプラズム + 細胞質）に局在するdAb。B+C、総dAb；B/(B+C)、放出された割合。BとCとの総和は、形成された総dAbの視覚的推定を可能にする。サンプルは、誘導から24時間後に採取し、還元して、クマシーカラーカードによりバンドを可視化した。「Std」とは、0.5mg·mL⁻¹濃度でのdAb標準を表わす。

【0101】

OmpAシグナル配列 (OmpASS)、IvySS及びYceISSの使用は、単位体積の培養液（培養液 = 細胞 + 上清、すなわち、細胞外培地）当たりの高いdAb発現レベルをもたらすが、YgiWS、YncESS、FimASS、YehZSS及びYcdOSSシグナル配列の使用は、中等度の発現レベルを生じる。OmpASS、IvySS、YceISS及びFimASSは、単位OD_{600nm}当たりに高い細胞内生成物レベルをもたらすが、YgiWSS、YncESS、YehZSS及びYcdOSSは、中等度のレベルを生じる。単位OD_{600nm}当たりの細胞内生成物レベル及び上清への生成物放出の間には、OmpASS、YceISS、YgiWSS、FimASS、及びYehZSSに関して、幾つかの正の相関がある。YceISS、YncESS及びYcdOSSの使用は、高放出レベルを引き起こすように見え、YceISSに関しては、これに加えて高力価が達成され、このことにより、該配列はさらなる研究に対する候補となる。IvySSは、上清への比較的低い放出及び高いOD_{600nm}を示し、このことは、dAb形成に対するさらなる可能性を表わすものであり得る。このことに加えて、得られた比較的高い合計での生成物及び培養液へのdAbの比較的低い放出割合により、この配列が、さらなる研究に対する第2の候補であること特定される。これらの2種類の菌株を、対照としてのOmpASSの使用と比較して、バイオリアクター中の増殖のより詳細な研究へと進められる。

【0102】

実施例2

大腸菌W3110のフェッドバッチ発酵に対するOmpASS、YceISS及びIvySS使用の影響を、図2に記載する。発酵は、細胞増殖の指標としてのOD_{600nm}、溶菌の指標としてのdsDNA放出

10

20

30

40

50

、生産性及び生成物局在の指標としての細胞外及び細胞内dAb、培養液加工容易性（例えば、遠心分離による）の指標としてのレオロジーを介して、誘導後期間にモニタリングした。

【0103】

図2は、高細胞密度大腸菌W3110フェッドバッチ培養物についての誘導後発酵プロファイルを示す。N末端シグナル配列及び基底（誘導前）発現レベル：(白三角)：OmpASS、 0.30 g.L^{-1} 、(白四角)：YceISS、 0.64 g.L^{-1} 又は(白菱形)：IvySS、 0.061 g.L^{-1} 。すべての結果は、IPTGを用いたdAb形成の誘導後に取得される。(A) バイオマスを、OD_{600nm}により推定した；(B) 細胞外可溶性dsDNA濃度；dAb収率を、(C) 細胞内（全細胞溶解物）、(D) 細胞外（上清）で、(E) 形成された総dAb（細胞内+細胞外）及び(F) 細胞外空間中での総dAbの割合(%)として決定した。培養液粘度 μ は、べき乗関係 $\mu = K^{n-1}$ （式中、 n はせん断速度である）に関して説明され、(G) Kは流動コンステンシー指数であり、かつ(H) nは流動挙動指数である。結果は、複製された培養器($n=2\sim4$)から取得し、平均し、一標準偏差に対応するエラーバーを加えた。
10

【0104】

【表6】

表6

シグナル配列	dAb 誘導前基底発現, g.L ⁻¹ (+/- sd または範囲)
OmpASS	0.30 ± 0.15
YceISS	0.64 ± 0.06
IvySS	0.061 ± 0.006

【0105】

OmpASS（白三角）を用いた菌株は、典型的な急速増殖期と、それに続く細胞自己溶解（OD_{600nm}の低下（図2A）及び細胞外dsDNAの増加（図2B）が同時に生じることにより示される）を実証した。これは、細胞外環境/上清への放出（図2C及び図2D）を伴いdAbの迅速な形成と同時に起こる。形成された総dAbを図2Eにまとめて示し、この形成は、発酵の終了により細胞外でほとんどすべてが生じる（図2F）。誘導の時点では、著明な量（ 0.30 g.L^{-1} ）のdAbが細胞内で既に発現されていた（図2C及び説明文）。これは、誘導期の開始により、非常に粘稠かつせん断薄化した培養液の形成を伴った（図2G及び図2H）。培養液粘度は、誘導後期間の間、24時間にわたって増大し続け（図2G）、細胞外dsDNAレベルの並行した増大がこれに伴っていた。
30

【0106】

OmpASS培養の使用に類似した傾向が、YceISSの使用（白四角）に関して観察される。ここで、誘導時の生成物発現レベル（ 0.64 g.L^{-1} ）は、OmpASSを用いた菌株よりも高い。これには、誘導時の比較的高い培養液粘度が伴い、続いて、細胞増殖の低下及び総dAb又は細胞外dAbのいずれかとしての若干低い生成物レベルを伴う。

【0107】

対照的に、IvySSの使用（白菱形）は、誘導時に 0.061 g.L^{-1} の低いdAb発現レベル及び低粘度の培養液をもたらした。これには、発酵の進行を通しての粘度上昇及び並行するdsDNA放出の増加が続く（図2B）。細胞増殖は、約72時間での溶菌の開始まで、すなわち、OmpASS及びYceISSの使用に関して観察された約12時間と比較して、より長時間にわたって継続する。結果として得られる影響は、緩やかなdAb発現速度及び細胞外空間へのdAb放出の遅延である（図2D及び図2F）。全体として、IvySSの使用は、OmpASS及びYceISSと比較して、誘導前のdAb形成の、より厳重な制御を提供するようである。
40

【0108】

実施例3

OmpASS、YceISS及びIvySSの間でのアミノ酸配列アライメント（図3A）とそれらのコド

ン適合化指数(CAI)の評価(図3B及び表3)により、アミノ酸配列に関してはOmpASS及びYceISSとは顕著に異なるが、これもまた大きな割合で稀なコドンを含む(表3)、IvySSのN末端の8個のアミノ酸のカセット(Ivy'SS)が明らかになった。

【0109】

図3は、シグナル配列のアミノ酸配列アライメント及びそれらのコドン適合化指数の評価を示す。(A) YceISS(配列番号35)及びIvySS(配列番号34)についてのアミノ酸配列アライメントを、OmpASS(配列番号33)を参照として示す。保存されたアミノ酸は網掛けされている。(B) 各コドン位置の最適化度合を、かずさDNA研究所大腸菌コドン使用頻度データベース(Kazusa E. coli codon usage database)に由来する大腸菌コドン使用頻度表を参照として、最も豊富な同義語コドンに対するそのコドンの頻度の比率として算出した。「B」のアミノ酸配列は、Ivy'SSカセットの後ろの最初のメチオニンからアライメントしている。

10

【0110】

この8コドンのカセットの存在又はIvySSに関して結果として生じるアミノ酸は、誘導前のdAb発現のレベル及び速度(すなわち、基底レベル)に影響し得ることが仮説となつた。高細胞密度フェッドバッチ発酵中のdAb形成を促進する上での、特定されたIvy'SSカセットの影響を調べるために、2種類の改変型シグナル配列を開発した:IvyTruncSSは、IvySSについてのシグナル配列に基づき、Ivy'SSが除去されたシグナル配列であり；及びIvy'OmpASSは、OmpASSのN末端にIvy'SSに対するコドンを融合させた生成物である。それに加えて、dAbの発現速度を、基底dAb発現レベル及び培養液粘度を変化させることなく上昇させることができるか否かを研究するために、2種類のコドン最適化IvySSシグナル配列であるIvyOpt1SS及びIvyOpt2SSを作製した(図3B、詳細については、材料及び方法を参照されたい)。4種類の改変型Ivy関連シグナル配列についての得られたCAI値は、表4に提供する。

20

【0111】

実施例4

改変型シグナル配列を有するdAbを発現する大腸菌W3110培養物の増殖を、図4に記載する。図4に提示されるすべての改変型シグナル配列は、効率よく切断されて、適正にフォールディングされたdAb分子を生じた。

30

【0112】

図4は、高細胞密度大腸菌W3110フェッドバッチ培養についての誘導後発酵プロフィールを示す。N末端シグナル配列及び基底(誘導前)発現レベル:(白三角):IvyTruncSS、0.90g.L⁻¹、(白四角):Ivy'OmpASS、0.086g.L⁻¹、(白菱形):IvyOpt1SS、0.16g.L⁻¹及び(黒菱形):IvyOpt2SS、0.089g.L⁻¹。詳細については図2を参照されたい。結果は、単独の発酵サンプルから取得した(m=3)。

40

【0113】

【表7】

表7

シグナル配列	dAb 誘導前基底発現, g.L ⁻¹ (+/- sd または範囲)
IvyTruncSS	0.90 ± 0.09
Ivy'OmpASS	0.086 ± 0.008
IvyOpt1SS	0.16 ± 0.01
IvyOpt2SS	0.089 ± 0.008

【0114】

IvyTruncSSの使用は、IvySSの使用に関して観察されるのと比較して、早期の増殖停止、dsDNA放出の増加及びdAb形成の低下を生じた(図2)。誘導時のdAbの基底発現のレベルは、IvySSの使用に関するよりも高く、誘導直前及び誘導後の両方の粘度が、著明に高かった。それゆえ、Ivy'SSの存在は、誘導前の早期発現、したがって結果として生じる高い

50

粘度レベルの低下に対して必須であると思われる(図4G)。観察される発現速度の増大(図4E)は、大きな割合の稀なコドンを含む配列の除去と一貫している。Ivy'OmpASSの使用は、IvySSを用いる場合(図2)に観察されるものと同様の、増殖、dsDNA放出、dAb形成並びに局在及び粘度プロフィールをもたらし、このことは、基底dAb発現を低下させる上でのIvy'SSの重要性を確認した。また、誘導期の開始時にIvy'OmpASSに対して低粘度が観察され、引き続く粘度上昇は、細胞外dsDNAの存在が原因である。同様に、IvySSと同じく、発酵時間の延長が、dAbの顕著な発現レベル及び細胞外環境への放出を得るために必要であった。IvyOpt1SS及びIvyOpt2SSの使用は、誘導時でのdAbの低い基底発現をもたらした(図4説明文)。結果は、低粘度培養液である(図4G)。予測される通り、最適化されたシグナル配列中の稀なコドンの発生率を減少させることにより、dAb形成の速度が増大する(図4E)。また、IvySSの使用と同じく、誘導後の培養液の粘度上昇は、dsDNA放出が原因であり得る。IvyOpt2SSは、IvyOpt1SSに対するよりも、低い基底発現、高いdAb力価及び低粘度の培養液を生じるようである。

10

【0115】

実施例5

誘導後の合計力価について測定した場合の培養器生産性を、研究対象のシグナル配列の範囲について図5Aで比較する。IvySS及びIvy'OmpASSを用いた菌株についてのdAbの低い値は、明らかに、生成物形成及び放出に要した時間の延長(約150時間)に起因する。IvyOpt1SS、IvyOpt2SS及びIvyTruncSSを用いた菌株はすべて、誘導後24時間以内に最大dAb濃度を生じ、高い発酵器生産性レベルをもたらす。質量分析(本明細書中では示していない)は、シグナル配列が、図5で研究された構築物のうちのすべてについてdAbから完全に除去されていたことを示唆した。USD遠心分離を用いた最終培養液の清澄化を、図5Bにまとめて示す。用いた条件は、工業的スケールのディスク積層型又は固定ボウル連続流遠心分離機について代表的なものであり、この流速許容範囲のうちの下限で操業され、かつ高せん断応力フィード帯が装着されている。卓上型遠心分離機のように、せん断応力がないフィードが、比較可能な対照として模倣される。

20

【0116】

図5(A)は、誘導後の合計時間当たりの、培養液1リットル当たりの細胞外dAbの質量として算出された全体的な生産性を示し；図5(B)は、以下の種々のN末端シグナル配列を有するdAbを発現する大腸菌回収培養物の遠心分離効率を示す：OmpASS(誘導後48時間)、YceISS(48時間)、IvyTruncSS(55時間)、Ivy'OmpA(153時間)並びにIvyコドン最適化シグナル配列IvyOpt1(48時間)及びIvyOpt2(55時間)。細胞培養液を、以下の条件に曝露し：(黒四角)：せん断なし；(白四角)：高せん断応力(20秒間での $0.53 \times 10^6 \text{W} \cdot \text{kg}^{-1}$ の最大エネルギー散逸速度())、続いてUSD遠心分離により処理した($V = 2.0 \text{mL}$ 、 $t = 420 \text{s}$ 、 $= 0.164 \text{m}^2$ (本文を参照されたい)、 $V/t = 2.9 \times 10^{-8} \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)。結果は、OmpASS及びYceISSについては、複製された培養器から($n = 3$)、又は残余のシグナル配列については単一の培養器サンプルから取得した。(B)に関するサンプル特性決定は、三重反復であった($m = 3$)。結果は、平均±SDとして示されている。

30

【0117】

OmpASS及びYceISSを用いて得られた培養液の高い粘度は、それぞれ約50%及び約80%の固形分が上清中に未だ存在する、あまり清澄化されない上清をもたらした。残余の培養液はすべて、10倍超は高い程度まで(約1~4%の残留固形分)清澄化され、それにより、性能の差異はあまり明らかではない。IvyTruncSSを用いる場合(図4G)に得られた中等度の粘度の培養液は、この範囲では上限(約4%)での清澄化された培養液をもたらした。残余の培養液はすべて、それよりも高い程度まで清澄化され、このことは、最終培養液でのさらに低い粘度を反映する。ほとんどすべての場合に、高いせん断応力の作用は、清澄化での5~30%の改善を生じ、このことは、例えば、流体構造(高分子架橋など)の破壊に起因する、粘度低下の可能性を示す。数種類の菌株は、高い培養器生産性及び良好な遠心分離清澄化をもたらす。IvyOpt2SS及びその次にはIvyOpt1SSを用いた菌株が、本研究に基づけば、最も有力な選択肢となる。IvyTruncSSの使用もまた良好な性能を示したが、遠心

40

50

分離による清澄化は、より困難であることが示唆される。

【0118】

実施例のまとめ

2種類のシグナル配列IvySS及びYceISSが特定され、これらは、大腸菌ペリプラズム空間での異種タンパク質の分泌を可能にする。YceISSを用いた菌株は、1Lフェッドバッチ搅拌槽培養器中で、OmpASSの使用と同等な性能を示した（図2）。IvySSの使用は、比較的緩やかな産生速度（図2及び表3）及び比較的低い全体的生産性（図5A）ではあるが、OmpASS及びYceISSを用いて得られるものと比較して著明に低い培養液粘度を生じた。本発明者らは、最初に、本明細書中で用いられる培地及び発酵戦略に伴う高粘度培養液の形成についての理由を議論し、第2に、IvySSに基づくシグナル配列の開発について議論する。

10

【0119】

OmpASS、YceISS及びIvySSを用いた当初の研究は、dAbの高い基底（すなわち、誘導前）発現が、誘導開始時に高度に粘稠な発酵培養液の形成をもたらすことを示唆する（図2）。そのような高い粘度は、いずれかのさらなる増加を伴って、残余の発酵期間にわたって継続され、これは細胞自己溶解の増加を伴うDNA放出が原因である可能性がある。基底発現と粘度とのこの関連性は、一定範囲の他のシグナル配列を用いる知見（図4）により支持され、かつ表5にまとめられている。本明細書中に示されていない予備研究は、指数増殖期の終了後よりもむしろ、指数増殖期中に誘導が行なわれた場合に、IvySSに関して高粘度培養液（K約 $1.1\text{Ns}^n\text{m}^{-2}$ ）を示し、これは高い基底発現と類似していた。

20

【0120】

誘導時までに観察される高粘度は、おそらくは、発酵中の細胞外高分子物質（EPS）の形成が原因であり得、EPSは、微生物バイオフィルムの主要成分である。増殖期、培地組成、温度、酸素制限、窒素及びカチオン欠乏などの因子が、EPS生合成を制御することが示されている。他の微生物系に関して、指数増殖自体が、EPS及びバイオフィルムの形成に関連付けられている。酢酸塩もまた、EPS形成に関連付けられている。一般的に、バイオフィルム及びEPS形成は、増殖速度の低下を引き起こすことが示されている。本研究での知見は、dAbの発現が、誘導前の環境条件の影響と組み合わせて、EPS形成を促進し得る可能性があることを示唆する。

【0121】

本明細書中で研究された発酵に関して、DOについての制御戦略は、低酸素条件を引き起こす酸素制限（DO約0%）が、誘導前の指数増殖期に起こるようにする。低酸素と指数増殖の両方が、発酵代謝副生成物の形成及び酢酸塩などの代謝生成物の過剰と、それぞれ関連している。そのような条件は、dAbの高い基底レベルの存在と組み合わされて、EPS形成をもたらす可能性がある。誘導後には、条件は、形成されるいかなる酢酸塩も、栄養供給の開始前に消費されている可能性が高くなる。この観点から、制御された一定の栄養供給速度は、細胞が、線形増殖期又は増殖休止期にあり、DO制御は30%に効率的に維持され、すなわち、dAbの高レベルにもかかわらず、いかなる明らかなレベルの酢酸塩形成も存在し難く、それゆえ、さらなるEPS形成は生じないことを意味するであろう。したがって、誘導前の発酵条件の制御は、酢酸塩形成を回避するために用いることができる。あるいは、培地調整、例えば、ダイズの存在量の低下、又は炭素源としてグリセロール（本研究で用いられている通り）ではなくグルコースを用いることにより、バイオフィルム形成を低減させることができる。本研究では、発酵は、ソイトーン（soytone）含有培地を用いて行なわれ；同じdAbを産生させるためにOmpASSを用いた場合の高粘度培養液の欠点を、ダイズ不含発酵培地を用いることにより克服した。基底発現（及びそれゆえ、本明細書中で研究される系に関しては、EPS形成）は、より厳密に制御された発現系の使用により低減され得るであろうが、このことは、他の加工に関連する困難性を生じさせる可能性がある。EPS形成を排除するための他の考えられる経路は、バイオフィルム欠損型大腸菌株の使用によるものである。さらなる研究は、本研究で観察された高粘度を引き起こすEPSの影響を確認することが目的であろう。本明細書中では、既存の培地及び発酵作業条件を用いて低粘度発酵を実現するために、いかにして選択されるシグナル配列を改善し得るか、に焦

30

40

50

点が当てられている。

【 0 1 2 2 】

IvySSの作製の2つの側面が、dAbの基底発現及び誘導後生産性を決定する上でのその性能に関連すると思われる。第1に、IvySSの出発部の8コドンのカセット(Ivy'SS)の存在は、誘導前のタンパク質発現の厳正な制御、すなわち、低い基底発現を生じさせる。第2に、低いコドン適合化指数(CAI)は、タンパク質の低い発現速度をもたらすようである。生産性を増大させながら低い基底発現を維持するための、改変型Ivyシグナル配列をはじめとするシグナル配列の選択の影響が、表5にまとめられている。Ivy'SSがシグナル配列のN末端に存在した場合、dAb発現の誘導前の基底発現のレベルは低く、低粘度の培養液が得られた。IvyOpt1SS及びIvyOpt2SSを用いて達成された低い基底レベル(図4)は、基底発現レベルを決定するのは、アミノ酸配列であり、遺伝子配列中の稀なコドンの存在ではないことを示唆する。

10

【 0 1 2 3 】

初期生産性は、おそらく、CAIに関連し、したがって、翻訳伸長及びdAb形成の速度に関連する。mRNAの5'末端での稀なコドンの存在は、リボソームでの渋滞を低減させる、翻訳中の新生ポリペプチドのゆっくりとした伸長を導き、このことは、比較的低い初期細胞生産性を生じさせるとの仮説が立てられた。表5から、配列長の値に対する低いCAIは、例えば、IvySS及びIvy'OmpASSに関して見て取れる通り、低い初期生産性を生じさせたが、すべての他のシグナル配列に関しては、コドン数の値に対する高いCAIは、高い初期生産性をもたらす。理想的には、この分析は、構築物のN末端に重きを置かれるはずである。このことは、IvySS及びIvy'OmpASSを用いたものと同様に、低い初期生産性を生じる2種類の菌株に関して、稀なコドンが存在する場合に特に当てはまる。IvySSを用いて得られるものと比較して、IvyOpt1SS及びIvyOpt2SSに関するdAbの初期生産性の増大は、改変されたコドン配列又は稀なコドンの除去のいずれかに起因し得るであろう。

20

【 0 1 2 4 】

IvyOpt2SSは、指數増殖中に多量かつ継続的に発現される遺伝子中で頻繁に現われる最適コドンの参照セットに基づく最適化により設計されているが、IvyOpt1SSは、すべての大腸菌遺伝子の発現に基づいて設計されている。前者はコドン数当たりの比較的高いCAIをもたらし(表5)、このことにより、より高い全体的生産性が見られたであろう(図5A)。今後の研究は、高粘度培養液を生じさせる顕著な基底発現を予防しつつも、全体的な発現レベルをさらに改善するための、そのような最適化に対する可能性をさらに模索するであろう。

30

【 0 1 2 5 】

参考雑誌

Rice P, Longden I, Bleasby A. 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trend Genet* 16(6):276-277.

Voulgaris I, Finka G, Uden M, Hoare M. 2015. Enhancing the selective extracellular location of a recombinant *E. coli* domain antibody by management of fermentation conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(20):8441-8453.

Chatel A, Kumpalume P, Hoare M. 2014a. Ultra scale-down characterization of the impact of conditioning methods for harvested cell broths on clarification by continuous centrifugation—Recovery of domain antibodies from rec *E. coli*. *Biotechnol Bioeng* 111(5):913-924.

Sharp PM, Li W-H. 1987. The codon adaptation index-a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* 15(3):1281-1295.

【 0 1 2 6 】

他の配列

配列番号53 : DOM0101のアミノ酸配列

EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQD
PFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGWPFDYWGGQGTLV
TVSS

配列番号54 : DOM0101のDNA配列 - (シグナル配列なし)

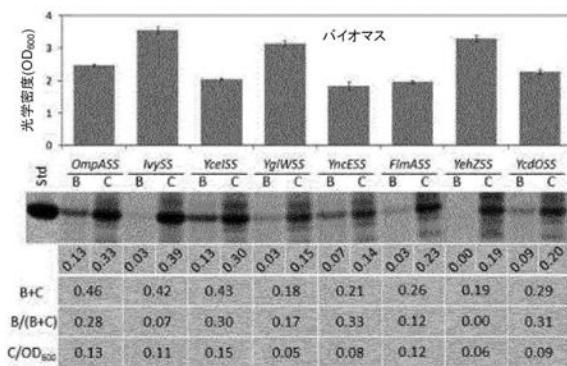
GAAGTACAAC TGCTGGAGAGCGGTGGCGGCCTGGTTCAACCGGGTGGTCCCTGC
GCCTGTCCTGTGCGGCATCTGGTTCACCTTCGACACGAAACCATGGTGTGGT
CGCCAAGCTCCGGCAAAGGCCTGGAATGGTAAGGCCACATTCCCTCCAGATGGCCA
GGACCCATTCTATGCGGATTCCGTTAAGGGTCGCTTACCATTCTCGTGATAACTC
AAAAAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACCCCTGCGCGCCGAGGATACTGCGGTGT
ACCATTGTGCGCTGCTGCCTAACGTGGCCCGTGGTCGATTACTGGGTCAAGGGT
ACTCTGGTCACCGTAAGCAGC

10

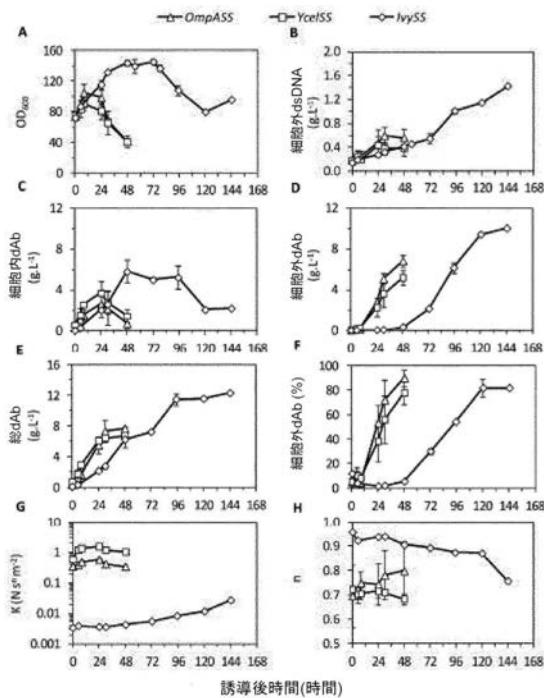
20

30

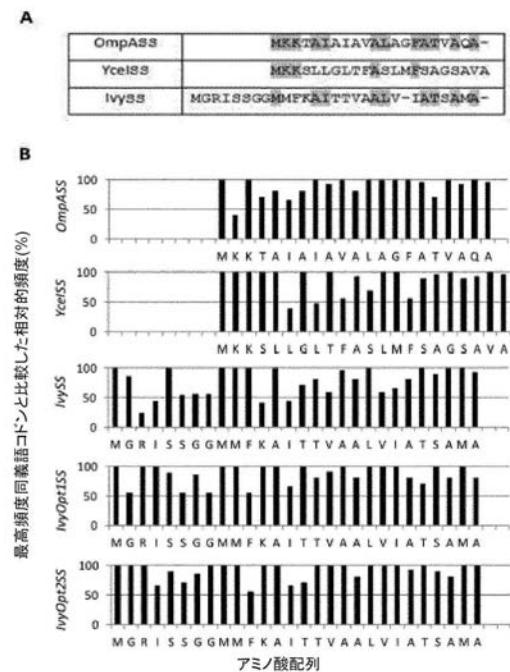
【図1】



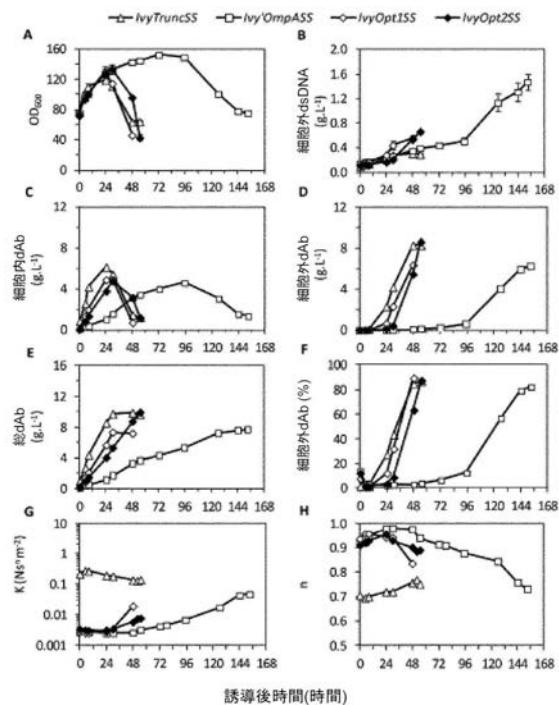
【図2】



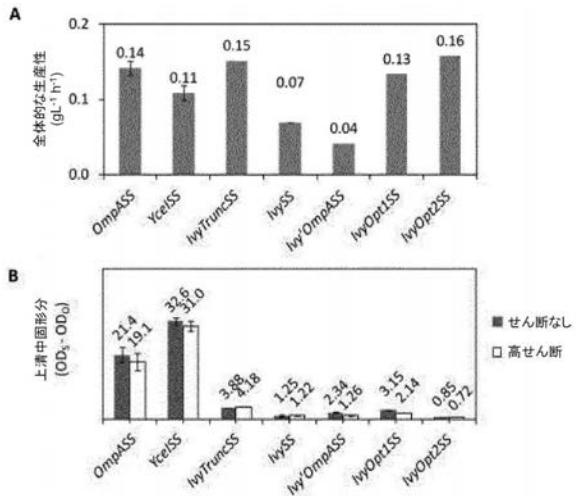
【図3】



【図4】



【図5】



【配列表】

2019516371000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/060654

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/245 C12N15/70
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 C12N

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, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014/244228 A1 (LEE DONG-YUP [SG] ET AL) 28 August 2014 (2014-08-28) example 2 table 4 sequences 12,1814 -----	4,6, 8-11,15, 16,18-20
Y	WO 2009/021548 A1 (WACKER CHEMIE AG [DE]; OSTENDORP RALF [DE]; POPP ANDREAS [DE]; FISCHER) 19 February 2009 (2009-02-19) page 17 page 28; example 1 -----	1-3, 9-11,15, 16,18,20
Y	US 2009/011995 A1 (LEE SANG JUN [KR] ET AL) 8 January 2009 (2009-01-08) page 18; table 4 -----	1-3, 9-11,15, 16,18,20 -/-

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

20 July 2017

28/07/2017

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

Blanco Urgoiti, B

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/060654

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YIZHOU ZHOU ET AL: "Enhancing full-length antibody production by signal peptide engineering", MICROBIAL CELL FACTORIES, vol. 15, no. 1, 2 March 2016 (2016-03-02), XP055392427, DOI: 10.1186/s12934-016-0445-3 the whole document -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2017/060654

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 2014244228	A1	28-08-2014	SG 10201602115P A US 2014244228 A1		30-05-2016 28-08-2014
WO 2009021548	A1	19-02-2009	EP 2176291 A1 US 2010168392 A1 WO 2009021548 A1		21-04-2010 01-07-2010 19-02-2009
US 2009011995	A1	08-01-2009	AU 2007210396 A1 CA 2637881 A1 EP 1981979 A1 JP 2009525042 A KR 20070079025 A US 2009011995 A1 WO 2007089093 A1		09-08-2007 09-08-2007 22-10-2008 09-07-2009 03-08-2007 08-01-2009 09-08-2007

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/67 (2006.01)	C 1 2 N 15/67	Z
C 1 2 N 15/70 (2006.01)	C 1 2 N 15/70	Z
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 14/245 (2006.01)	C 0 7 K 14/245	

(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,C1,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,DJ,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,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,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

- (72)発明者 エミンズ , ロビン アレクサン德拉
イギリス国 エスジー 1 2エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ , ガンネルズ
ウッド ロード , グラクソスミスクライン
- (72)発明者 フィンカ , ゲイリー ブライアン
イギリス国 エスジー 1 2エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ , ガンネルズ
ウッド ロード , グラクソスミスクライン
- (72)発明者 ホア , マイケル
イギリス国 エヌ 2 9キューエル グレーター ロンドン ロンドン , イースト フィンチリー , チェリー トゥリー ロード 32
- (72)発明者 レヴィス , アラン ピーター
イギリス国 エスジー 1 2エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ , ガンネルズ
ウッド ロード , グラクソスミスクライン
- (72)発明者 レヴィス , ウィリアム ジョン ケネス
イギリス国 エスジー 1 2エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ , ガンネルズ
ウッド ロード , グラクソスミスクライン
- (72)発明者 マッキナリー , アダム ダニエル
イギリス国 ジー 3 8エスダブリュ グラスゴー , ヨークヒル パレード 9 1 / 2
- (72)発明者 ウーデン , マーク
イギリス国 エスジー 1 2エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ , ガンネルズ
ウッド ロード , グラクソスミスクライン
- (72)発明者 ブルガリス , イオアニス
イギリス国 ダブリュシー 1エイチ 0エーエイチ ロンドン , ゴードン ストリート , バーナード カツ ビルディング , ユニバーシティ カレッジ ロンドン , デパートメント オブ バイオケミカル エンジニアリング , ジ アドバンスド センター フォー バイオケミカル エンジニアリング

F ターム(参考) 4B064 AG01 AG27 CA02 CA19 CC05 CC24 DA13
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA11 DA76 EA50 FA74