(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5830032号
(P5830032)
(45)発行日　平成27年12月9日(2015.12.9)　(24)登録日　平成27年10月30日(2015.10.30)

(51)Int.Cl.　　F I
C12P 21/02 (2006.01)　　C12P 21/02 ZNAF
C12N 15/09 (2006.01)　　C12N 15/00 A

請求項の数 12　(全 32 頁)

(21)出願番号　特願2012-550482(P2012-550482)
(86)(22)出願日　平成23年1月31日(2011.1.31)
(65)公表番号　特表2013-517788(P2013-517788A)
(43)公表日　平成25年5月20日(2013.5.20)
(86)国際出願番号　PCT/ES2011/070057
(87)国際公開番号　WO2011/092367
(87)国際公開日　平成23年8月4日(2011.8.4)
審査請求日　平成26年1月30日(2014.1.30)
(31)優先権主張番号　10382019.7
(32)優先日　平成22年2月1日(2010.2.1)
(33)優先権主張国　欧州特許庁(EP)

(73)特許権者　511172391
ディグナ　ビオテク、エセ　エレ
ＤＩＧＮＡ　ＢＩＯＴＥＣＨ，Ｓ．Ｌ．
スペイン国ナバーラ、エー－３１００８
パンプローナ、オフィシナ　２、２２、アベニーダ　ピオ　ドセ
(74)代理人　100094640
弁理士　紺野　昭男
(72)発明者　ブメリス、ヴラダス　アルギルダス
リトアニア国　ヴィリニュス　エルティー－０２２４１、ヴィー．エー．　グラシュノ　ストリート８、シコール　バイオテック　ユーエービー

審査官　藤井　美穂

最終頁に続く

(54)【発明の名称】インターフェロンアルファ５を生産する方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ宿主細胞における発現によってインターフェロンアルファ５（ＩＦＮａ５）タンパク質を生産する方法であって、該方法が：
ａ）ＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞を用意する工程と；
ｂ）発酵培地中で前記組換えＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞が前記ＩＦＮａ５タンパク質を発現するのに有効な条件下で、前記ＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主を、炭素供給液を添加しながら培養する工程であって、ここで
－前記発酵培地は、動物起源または酵母起源由来の成分を含まず、かつ
－前記炭素供給液は、炭素源、ならびに添加される炭素供給液１リットルあたり、９０～１１１ｍｇの塩化鉄（ＩＩＩ）六水和物、１２．１５～１４．９８５ｍｇの塩化カルシウム二水和物、２０．２５～２４．９７５ｍｇの硫酸亜鉛（ＩＩ）七水和物、４．５～５．５５ｍｇの硫酸マンガン（ＩＩ）一水和物、９～１１．１ｍｇの硫酸銅（ＩＩ）五水和物、３．４２～４．２１８ｍｇの塩化コバルト（ＩＩ）六水和物、０．９～１．１１ｍｇのモリブデン酸ナトリウム二水和物、および２．０７～２．５５３ｍｇのホウ酸を含んでなる工程と；
ｃ）発現したＩＦＮａ５タンパク質を単離し、そして必要に応じて精製する工程であって、ここで、前記炭素供給液が添加された前記発酵培地１リットルあたりの各濃度が、塩化鉄（ＩＩＩ）六水和物が２８．５～３６．９ｍｇの範囲に、塩化カルシウム二水和物が３．８４７５～４．９８１５ｍｇの範囲に、硫酸亜鉛（ＩＩ）七水和物が６．４１２５～８

．３０２５ｍｇの範囲に、硫酸マンガン（ＩＩ）一水和物が１．４２５～１．８４５ｍｇの範囲に、硫酸銅（ＩＩ）五水和物が２．８５～３．６９ｍｇの範囲に、塩化コバルト（ＩＩ）六水和物が１．０８３～１．４０２２ｍｇの範囲に、モリブデン酸ナトリウム二水和物が０．２８５～０．３６９ｍｇの範囲に、およびホウ酸が０．６５５５～０．８４８７ｍｇの範囲にある工程とを少なくとも含んでなることを特徴とする、方法。

【請求項２】

Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞が、誘導性プロモーターの制御下で、ＩＦＮａ５タンパク質をコードする配列を含んでなるベクターで形質転換されてなるものである、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞が、Ｅ．ｃｏｌｉプロテアーゼ欠損株である、請求項１または２に記載の方法。

【請求項４】

Ｅ．ｃｏｌｉプロテアーゼ欠損株が、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｉｏｎ⁻／ｏｍｐＴ⁻プロテアーゼ欠損宿主株である、請求項３に記載の方法。

【請求項５】

Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｉｏｎ⁻／ｏｍｐＴ⁻プロテアーゼ欠損宿主株が、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）株である、請求項４に記載の方法。

【請求項６】

Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞がＥ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）株であり、工程ｂ）の条件がＩＰＴＧによる誘導を含んでなるものである、請求項３に記載の方法。

【請求項７】

誘導後の平均比増殖速度（μ）が、０．１７以上である、請求項６に記載の方法。

【請求項８】

リフォールディング後の酸化型Ｍｅｔ　ＩＦＮａ５の量が、１％以下である、請求項７に記載の方法。

【請求項９】

前記ＩＦＮａ５タンパク質が、ｈＩＦＮａ５である、請求項１に記載の方法。

【請求項１０】

ＩＦＮａ５タンパク質が、配列番号１のアミノ酸配列を含んでなる、請求項１に記載の方法。

【請求項１１】

前記工程ｂ）においてＩＦＮａ５が封入体（ＩＢ）として得られた場合、

前記ＩＢを可溶化に付して、変性ＩＦＮａ５を含んでなる混合物を得て、

次いで、それを酸化再生処理に付して、再生ＩＦＮａ５を含んでなる混合物を得て、

そして、再生ＩＦＮａ５を含んでなる前記混合物を精製工程に付して、精製ＩＦＮａ５を得ることによって、ＩＦＮａ５タンパク質を、前記ＩＦＮａ５タンパク質を前記ＩＢの形態で含んでなる混合物から単離し、そして必要に応じて精製することを特徴とする、請求項１に記載の方法。

【請求項１２】

再生ＩＦＮａ５を含んでなる混合物を、下記４工程を含むクロマトグラフィー処理に付すことによって、前記混合物を精製することを特徴とする、請求項１１に記載の方法：

１）再生ＩＦＮａ５を含んでなる前記混合物を、疎水性相互作用クロマトグラフィーに付す工程；

２）工程１）で得られた溶液を、陰イオン交換クロマトグラフィーに付す工程；

３）工程２）で得られた溶液を、第１の陽イオン交換クロマトグラフィーに付す工程；および

４）工程３）で得られた溶液を、第２の陽イオン交換クロマトグラフィーに付す工程であって、ここで、前記溶液を、必要に応じて、メチオニンを含む緩衝液で希釈する、工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】
【０００１】
本発明は、インターフェロンアルファ５（ＩＦＮａ５）産生Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａｃｏｌｉ宿主細胞における発現によってＩＦＮａ５タンパク質を生産する方法であって、ポリペプチド鎖のＮ末端への余分なメチオニン残基の組み込み、およびその酸化種の生成が最小限に抑えられた方法に関する。ＩＦＮａ５タンパク質は、効率的な方法によって精製され、生物学的に活性なＩＦＮａ５を得ることができる。
【背景技術】
【０００２】
インターフェロン（ＩＦＮ）は、サイトカインとして知られる天然に産生される多面発現性の糖タンパク質の一群であり、一連の刺激（ウイルス、細菌、細胞、腫瘍および高分子）からの誘導によって様々な種類の細胞（上皮細胞、線維芽細胞、リンパ球、マクロファージ）から分泌され、抗ウイルス特性、抗増殖特性および免疫調節特性ならびに鎮痛作用を有する。インターフェロンは、その内因性産生の後またはその投与の後、細胞表面上の特異的な受容体と相互作用し、細胞質を通過して核までのシグナル伝達を開始し、抗ウイルス活性および免疫賦活活性を有する特異的なタンパク質をコードする遺伝子の発現を誘導する。いくつかの異なるタイプのＩＦＮがヒトでの使用を承認されていることから実証されているように（例えば、多発性硬化症の治療用の薬物としての、ＩＦＮ１ａ（Ｒｅｂｉｆ，Ａｖｏｎｅｘ）、ＩＦＮ１ｂ（Ｂｅｔａｓｅｒｏｎ）、ならびに悪性疾患（癌）およびウイルス性疾患の治療用の薬物としての、組換えヒトＩＦＮａ２ａ（Ｒｏｆｅｒｏｎ　Ａ）およびＩＦＮａ２ｂ（Ｉｎｔｒｏｎ　Ａ））、ＩＦＮの医学上の潜在能力は認識されている。
【０００３】
ＩＦＮがシグナルを伝達する受容体のタイプに基づいて、ヒトＩＦＮは、３つの主要なタイプ、すなわち、（ｉ）ＩＦＮ　Ｉ型［すべてのＩ型ＩＦＮは、ＩＦＮ－アルファ受容体（ＩＦＮＡＲ）として公知の特異的な細胞表面受容体複合体に結合し、ヒトのＩ型ＩＦＮは、ＩＦＮアルファ（ＩＦＮ－α）、ＩＦＮベータ（ＩＦＮ－β）およびＩＦＮオメガ（ＩＦＮ－ω）である。］、（ｉｉ）ＩＦＮ　ＩＩ型［ＩＩ型ＩＦＮは、ＩＦＮ－ガンマ受容体（ＩＦＮＧＲ）に結合し、ヒトのＩＩ型ＩＦＮは、ＩＦＮガンマ（ＩＦＮ－γ）である。］、およびＩＦＮ　ＩＩＩ型［ＩＩＩ型ＩＦＮは、ＩＬ１０Ｒ２およびＩＦＮＬＲ１からなる受容体複合体を通じてシグナルを伝達する。］に分類される。Ｉ型ＩＦＮとして公知のＩＦＮアルファおよびベータは、構造的に相関しており、酸性ｐＨにおいて安定であり、同一細胞受容体（ＩＦＮＡＲ）に対して競合する。
【０００４】
現在、ＩＦＮアルファ、ベータおよびガンマは、組換え型として作製することができ、その組換え型は、天然の起源（白血球、線維芽細胞、リンパ球）からの単離によって得られる量よりもかなり大量の産物を得ることができること、並びにその産物の精製および安全性検査のプロセスの複雑さを低減させることができることの二重の利点を有する。実際に、販売されている医薬品グレードの組換えＩＦＮの大部分が、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａｃｏｌｉから産生され、精製されている。
【０００５】
Ｅ．ｃｏｌｉ組換えタンパク質発現系は、ＩＦＮの生産にとって最適な系であったし、今なおそうである。確かに、ＩＦＮ遺伝子はイントロンを有さず、そのタンパク質産物は通常グリコシル化されない。さらに、Ｅ．ｃｏｌｉは、高い細胞密度まで急速に増殖することができ、組換えタンパク質の生産に使用される株は、そのタンパク質が大規模発酵に対して安全であると一般にみなされるように遺伝的に改変されている。
【０００６】
ＩＦＮ　ｃＤＮＡの発現は、それが初めてクローニングされた直後にＥ．ｃｏｌｉにおいて直接達成された［Ｇｏｅｄｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ．，２８７，４１１－４１６，１９８０；Ｐｅｓｔｋａ，Ｓ．Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．，

２２１（１），１－３７，１９８３；Ｍｉｚｏｇｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．ＤＮＡ．，４，２２１－３２，１９８５；Ｐｅｓｔｋａ ｅｔ ａｌ．Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，５６，７２７－７７７，１９８７；Ｂａｒｏｎ ａｎｄ Ｎａｒｕｌａ．Ｃｒｉｔｉｃａｌ ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０（３），１７９－１９０，１９９０］。実際に、ＩＦＮアルファ（ＩＦＮａ）は、ＤＮＡ組換え技術によってＥ．ｃｏｌｉを用いて生産された最初のタンパク質の１つである［Ｄｅｒｙｎｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２８７，１９３－１９７，１９８０；Ｎａｇａｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２８４，３１６－３２０，１９８０］。

【０００７】

しかしながら、Ｅ．ｃｏｌｉにおけるＩＦＮの発現には、いくつかの問題がある。Ｅ．ｃｏｌｉにおいて大量に発現されるＩＦＮは、一般にミスフォールドしたタンパク質であり、それゆえ生物学的に不活性である［Ｖｉｌｌａｖｅｒｄｅ ａｎｄ Ｃａｒｒｉｏ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｌｅｔｔ．，２５，１３８５－１３９５，２００３］、封入体（ＩＢ）と呼ばれる不溶性の凝集体として沈殿することが多い［Ｓｗａｍｉｎａｔｈａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔ Ｅｘｐｒｅｓｓ．Ｐｕｒｉｆ．，１５，２３６－２４２，１９９９；Ｂｅｄａｒｒａｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，３３，１７３－１８２，２００１；Ｓｒｉｖａｓｔａ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｔ．Ｅｘｐｒｅｓｓ．Ｐｕｒｉｆ ４１，３１３－３２２，２００５］。そのようなタンパク質を天然型で得るためには、前記ＩＢを変性相、続いて再生相に付す必要があり、天然のタンパク質におけるようにジスルフィド架橋が形成される必要がある状況では酸化に付す必要がある。さらに、標的タンパク質配列（例えば、ＩＦＮ）のＮ末端における余分なメチオニン残基の組み込みは、Ｅ．ｃｏｌｉにおけるタンパク質発現の特有な特徴である。公知であるように、タンパク質の配列内に分布するメチオニン残基は酸化しやすい。そのようなプロセスは、そのタンパク質、または前記タンパク質を含む医薬組成物（それを薬物、例えば、ＩＦＮとして使用することができる場合）を製造するプロセス中に生じることがあり、高温での長期間貯蔵中においてより顕著である。

【０００８】

ＩＦＮを細菌においてＩＢとして産生および精製するいくつかの方法が開発されているが［例えば、Ｔｈａｔｃｈｅｒ ａｎｄ Ｐａｎａｙｏｔａｔｏｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１１９，１６６－１７７，１９８６；米国特許第４５１１５０２号；米国特許第４７６５９０３号；米国特許第４８４５０３２号；欧州特許第１３１０５５９号；または欧州特許第１９９０３４９号］、ＩＦＮ、すなわち治療等級のＩＦＮａの産生および精製の成功を妨害する可能性があるさらなる要因（例えば、標的ＩＦＮのＮ末端に余分なメチオニン残基が組み込まれること、および（その産物を薬物として使用する場合）除去する必要のあるその酸化種が生成され、それゆえＩＦＮ生産の全収率が低下し、精製プロセスの複雑さが高まり、治療等級のアルファＩＦＮを生産および精製する方法を面倒なものにすること）が存在する。

【０００９】

したがって、治療等級のＩＦＮａ、特にＩＦＮａ５をＥ．ｃｏｌｉ宿主細胞から高収率かつ対費用効果の高いやり方で生産することを可能にする方法が依然必要とされている。

【発明の概要】

【００１０】

本発明者らは、今般、驚いたことに、発酵培地中の微量元素（痕跡元素）の濃度が、ＩＦＮａ５の翻訳後修飾において重要な役割を果たすことを見出した。したがって、発酵培地中の微量元素の濃度を制御すると、ＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞において産生されるＩＦＮａ５のＮ末端への余分なメチオニン残基の組み込み、およびその酸化種の生成を最小限に抑えることが可能であり、それによって、生産収率が高まり、精製プロセスを単純化できることから、ＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞において産生されるＩＦＮａ５、すなわち、治療等級のＩＦＮａ５を生産および精製する方法を、対費用効果が高く、複雑さの低減された方法とする。

【００１１】
有効なことには、実施例４は、１リットル（Ｌ）の炭素供給液が、約３．０ｍＬ～約３．７ｍＬの微量元素原液を含み、好ましくは、誘導後の平均比増殖速度（μ）が０．１７以上であるとき、酸化型のメチオニル化ヒトＩＦＮアルファ－５（ｈＩＦＮａ５）型の生成が無くなり、アセチル化ｈＩＦＮａ５型の量が２倍減少する（すなわち、半分になる）ことを示している。
【００１２】
それゆえ、一つの態様において、本発明は、インターフェロンアルファ５（ＩＦＮａ５）産生Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ宿主細胞における発現によってＩＦＮａ５タンパク質を生産する方法であって、その方法が：
ａ）ＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞を用意する工程と；
ｂ）発酵培地中で前記組換えＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞が前記ＩＦＮａ５タンパク質を発現するのに有効な条件下でＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞を、炭素供給液を添加しながら培養する工程であって、ここで、
－前記発酵培地は、動物起源または酵母起源由来の成分を含まず、かつ
－前記炭素供給液は、炭素源、および添加される炭素供給液１リットルあたり約３．０～約３．７ｍＬの微量元素溶液を含んでなる工程と；
ｃ）発現したＩＦＮａ５タンパク質を単離し、そして必要に応じて精製する工程とを少なくとも含んでなることを特徴とする方法に関する。
【００１３】
特定の実施形態において、前記Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉプロテアーゼ欠損株、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｉｏｎ⁻／ｏｍｐＴ⁻プロテアーゼ欠損宿主株、好ましくは、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１株、最も好ましくは、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）株である。
【００１４】
別の特定の実施形態において、Ｅ．ｃｏｌｉ株が、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）株であるとき、工程ｂ）の条件は、ＩＰＴＧによる誘導を含む。
【００１５】
別の特定の実施形態において、発現したＩＦＮａ５タンパク質を単離、および精製する工程ｃ）は、精製ＩＦＮａ５を得るために、順次、
Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞を溶解する工程と、
その後、封入体（ＩＢ）を可溶化に付し、そして、得られた混合物を酸化再生に付し、さらに下記を含む一連のクロマトグラフィー：
１）再生ＩＦＮａ５を含んでなる混合物を、疎水性相互作用クロマトグラフィーに付す工程；
２）工程１）で得られた溶液を、陰イオン交換クロマトグラフィーに付す工程；
３）工程２）で得られた溶液を、第１の陽イオン交換クロマトグラフィーに付す工程；および
４）工程３）で得られた溶液を、第２の陽イオン交換クロマトグラフィーに付す工程であって、ここで、前記溶液を、必要に応じて、メチオニンを含む緩衝液で希釈する工程、に付すことによって、前記ＩＦＮａ５タンパク質を前記ＩＢの形態で単離する工程と、を含んでなる。
【００１６】
特定の実施形態において、前記ＩＦＮａ５は、好ましくは、ヒトＩＦＮａ５（ｈＩＦＮａ５）である。
【図面の簡単な説明】
【００１７】
【図１】図１は、ＩＦＮａ５産生株の構築のフローチャートを示す。
【図２】図２は、最初のプラスミドＤＮＡ　ｐＥＴ２８－ＩＦＮアルファ－５の制限酵素解析（ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ　ａｎａｌｙｓｉｓ）の結果を示す。レーン１～３および

５～７：ｐＥＴ２８－ＩＦＮアルファ－５の制限酵素解析；レーン１および５：ｐＥＴ２８－ＩＦＮアルファ－５／ＢａｍＨＩ；レーン２および６：ｐＥＴ２８－ＩＦＮアルファ－５／ＮｄｅＩ；レーン３および７：ｐＥＴ２８－ＩＦＮアルファ－５／ＮｄｅＩ＋ＢａｍＨＩ；レーン４および８：未切断のｐＥＴ２８－ＩＦＮアルファ－５。マーカーＤＮＡ（Ｇｅｎｅ Ｒｕｌｅｒ ＤＮＡ Ｌａｄｄｅｒ Ｍｉｘ，Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ，Ｌｉｔｈｕａｎｉａ）のバンドのサイズが、キロ塩基対（ｋｂｐ）の単位で示されている。

【図３】図３は、中間体プラスミドＩＦＮアルファ－５の制限酵素解析の結果を示す。このプラスミドは、単一クローンから得られた。マーカーＤＮＡ（Ｇｅｎｅ Ｒｕｌｅｒ ＤＮＡ Ｌａｄｄｅｒ Ｍｉｘ，Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ，Ｌｉｔｈｕａｎｉａ）のバンドのサイズが、ｋｂｐの単位で示されている。予想されるフラグメントサイズ（単位はｂｐ）を括弧内に記載する。レーン１：ｐＵＣ５７－ＩＦＮアルファ－５／ＰｓｔＩ（２８；３１９７）；レーン２：ｐＵＣ５７－ＩＦＮアルファ－５／ＰｖｕＩＩ（４５５；４０６；２３６４）；レーン３：ｐＵＣ５７－ＩＦＮアルファ－５／ＮｄｅＩ（２５０；２９７５）。

【図４】図４は、いくつかのコドンをＥ．ｃｏｌｉにおいて使用頻度が最も低いコドンで置き換えることによってＥ．ｃｏｌｉにおける発現について最適化されたヒトＩＦＮアルファ－５（ｈＩＦＮａ５）をコードするフラグメントの完全ヌクレオチド配列を示している。置換したヌクレオチドに下線を引いている。

【図５】図５は、プラスミドｐＥＴ２１－ＩＦＮアルファ－５の制限酵素解析の結果を示す。このプラスミドは、単一クローンから得られた。マーカーＤＮＡ（Ｇｅｎｅ Ｒｕｌｅｒ ＤＮＡ Ｌａｄｄｅｒ Ｍｉｘ，Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ，Ｌｉｔｈｕａｎｉａ）のバンドのサイズが、ｋｂｐの単位で示されている。予想されるフラグメントサイズ（単位はｂｐ）を括弧内に記載する。レーン１：ｐＥＴ２１－ＩＦＮアルファ－５／ＰａｇＩ（６７３；８１７；１００８；３４２３）；レーン２：ｐＥＴ２１－ＩＦＮアルファ－５／ＰｓｔＩ（１３５２；４５６９）；レーン３：ｐＥＴ２１－ＩＦＮアルファ－５／ＮｄｅＩ＋ＢａｍＨＩ（５１６；５４０５）。

【図６】図６は、組換えＩＦＮａ５タンパク質の発現を示す。９つのコロニーから拾った細胞培養Ｅ．ｃｏｌｉ ＢＬ２１（ＤＥ３）ｐＥＴ２１－ＩＦＮアルファ－５（レーン１～９）を、７５０ｍＬフラスコ（ＬＢ培地、体積２５０ｍＬ）内で、$ＯＤ_{６００}$が約１．２になるまで、３７℃で増殖させた。標的タンパク質の発現を、１ｍＭ ＩＰＴＧで２．５時間誘導した。全細胞タンパク質サンプルを、ＢｉｏＲａｄ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｍａｒｋｅｒｓ（単位はｋＤａで、左側に示される）とともに１５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥで泳動した後、クマシーブルーで染色した。

【図７】図７は、組換えｈＩＦＮａ５の生合成のフローチャートを示す。

【図８Ａ】図８は、ｈＩＦＮａ５タンパク質を還元条件下（図８Ａ）および非還元条件下（図８Ｂ）両方においてＳＤＳ－ＰＡＧＥ（１４％）で測定した、本発明によって処理、そして製剤化された組換えｈＩＦＮａ５の純度を表す（この図は、ｈＩＦＮａ５タンパク質の３つの大規模精製バッチの結果を示す）。

【図８Ｂ】図８Ａ参照。

【図９】図９は、「逆相高速液体クロマトグラフィー」（ＲＰ－ＨＰＬＣ）解析によって測定した、本発明によって処理、そして製剤化された組換えｈＩＦＮａ５の純度を示す（この図は、組換えｈＩＦＮａ５の３つの大規模バッチの結果を示す）。

【図１０】図１０は、「サイズ排除ＨＰＬＣ」（ＳＥ－ＨＰＬＣ）解析によって測定した、本発明によって処理、そして製剤化された組換えｈＩＦＮａ５の純度を示す（この図は、組換えｈＩＦＮａ５の３つの大規模バッチの結果を示す）。

【図１１】図１１は、等電点電気泳動解析によって測定した、本発明によって処理、そして製剤化された組換えｈＩＦＮａ５の純度を示す（この図は、組換えｈＩＦＮａ５の３つの大規模バッチの結果を示す）。レーン１、１１：ｐＩスタンダード（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ）；レーン２、３、４：組換えｈＩＦＮａ５，１５μｇ；レーン５、６、７：組換えｈＩＦＮａ５，５μｇ；レーン８、９、１０：組換えｈＩＦＮａ ５，

１μｇ。
【図１２】図１２は、本発明によって精製、そして製剤化された３つの組換えｈＩＦＮａ５調製物の大規模バッチのペプチドマッピングクロマトグラムを示す。
【発明を実施するための形態】
【００１８】
定義
本発明の理解を促すために、本発明との関係において使用されるいくつかの用語および表現の意味をここに提供する。
【００１９】
本明細書において、用語「インターフェロンアルファ５」（または「ＩＦＮアルファ５」または「ＩＦＮａ」）とは、ウイルス感染に対する自然免疫反応に主に関わっていることが明らかで、ＩＦＮａ受容体（ＩＦＮＡＲ）として公知の特異的な細胞表面受容体複合体に結合することができる、白血球によって産生されるタンパク質を指す。
【００２０】
ＩＦＮａ５タンパク質は、例えば、ＷＯ８３／０２４５９号公報に記載されている（ｈＩＦＮａ５）。
【００２１】
用語「ＩＦＮａ５」には、（ｉ）少なくとも天然ＩＦＮａ５タンパク質のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列、および（ｉｉ）天然ＩＦＮａ５と共通の生物学的活性を有するタンパク質が含まれる。実質的に同一のアミノ酸配列とは、その配列が、同一であるか、あるいは合成タンパク質と天然ＩＦＮａ５との間に有害な機能的差異を生じさせない１つ以上のアミノ酸改変（すなわち、欠失、付加、置換）の差で異なっていることを意味し、例えば、言及されるＩＦＮａ５タンパク質のうちの１つと少なくとも７０％の同一性を有するＩＦＮａ５タンパク質である。ＩＦＮａ５タンパク質（Ｐ）と参照のＩＦＮａ５タンパク質（Ｒ）との間のＸ％の同一性とは、それらの２つの配列をアラインメントしたとき、ＰのＸ％のアミノ酸が、配列Ｒ内の対応するアミノ酸と同一であるか、あるいは同じ群のアミノ酸、例えば：
－非極性Ｒ基を有するアミノ酸：アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン；
－無電荷極性Ｒ基を有するアミノ酸：グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン；
－電荷極性Ｒ基（ｐＨ６．０において負に帯電）を有するアミノ酸：アスパラギン酸、グルタミン酸；
－塩基性アミノ酸（ｐＨ６．０において正に帯電）：リジン、アルギニン、ヒスチジン（ｐＨ６．０において）；
－フェニル基を有するアミノ酸：フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン
によって置き換えられていることを意味する。
【００２２】
特に好ましい保存的置換は、以下である：
正電荷が維持され得るような、ＬｙｓのＡｒｇへの置換、その逆もまた同様；
負電荷が維持され得るような、ＧｌｕのＡｓｐへの置換、その逆もまた同様；
遊離－ＯＨが維持され得るような、ＳｅｒのＴｈｒへの置換；ならびに
遊離ＮＨ２が維持され得るような、ＧｌｎのＡｓｎへの置換。
【００２３】
これらの配列同一性のパーセンテージは、ＢＬＡＳＴプログラム（ｂｌａｓｔ２ｓｅｑ，デフォルトパラメータ）［Ｔａｔｕｔｓｏｖａ ａｎｄ Ｍａｄｄｅｎ，ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｌｅｔｔ．，１７４，２４７－２５０（１９９０）］を用いることによって得ることができる。
【００２４】
本明細書において、用語「ＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞」とは、ＩＦＮａ５に

関連する生物学的活性を有するタンパク質を産生するように遺伝的に操作したＥ．ｃｏｌｉ宿主細胞を指す。特定の実施形態において、Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉプロテアーゼ欠損株（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｉｏｎ⁻／ｏｍｐＴ⁻プロテアーゼ欠損宿主株、好ましくは、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１株、最も好ましくは、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）株）である。

【００２５】

本明細書において、用語「ＩＦＮａ５の生物学的活性」とは、前記ＩＦＮａ５の治療活性を含む前記ＩＦＮａ５の任意の生物学的活性のことを指す。ＷＯ８３／０２４５９号公報には、ＩＦＮａ５が、ＤＮＡウイルスおよびＲＮＡウイルスに対する抗ウイルス活性、細胞成長活性、ならびに細胞内の酵素および細胞が産生する他の物質の産生を制御する能力を示すことが開示されており；したがって、ＩＦＮａ５を使用することにより、ウイルス感染（例えば、慢性Ｂ型肝炎感染）、腫瘍および癌が治療され得ることが期待される。

【００２６】

本明細書において、発酵培地が「動物起源または酵母起源由来の成分を含まない」という表現は、医薬製品を介して海綿状脳症を引き起こす物質を伝染させるリスクがないこと、医薬品に関連するＢＳＥ汚染またはｖＣＪＤの症例に関するいかなる証拠もないことを意味する。製品は、酵母細胞由来の微量の汚染タンパク質を含まない。

【００２７】

ＩＦＮａ５を生産する方法

一つの態様において、本発明は、ＩＦＮａ５産生Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ宿主細胞における発現によってインターフェロンアルファ５（ＩＦＮａ５）タンパク質を生産する方法（以下「本発明の方法」という。）であって、そのプロセスが：

ａ）ＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞を用意する工程と；

ｂ）発酵培地中で前記組換えＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞が前記ＩＦＮａ５タンパク質を発現するのに有効な条件下でＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞を、炭素供給液を添加しながら培養する工程であって、ここで、

－前記発酵培地は、動物起源または酵母起源由来の成分を含まず、かつ

－前記炭素供給液は、炭素源、および添加される炭素供給液１リットルあたり約３．０～約３．７ｍＬの微量元素溶液を含んでなる、工程と；

ｃ）発現したＩＦＮａ５タンパク質を単離し、そして必要に応じて精製する工程とを少なくとも含んでなることを特徴とする方法に関する。

【００２８】

本発明の方法によって生産され得る組換えＩＦＮａ５は、先に定義した。特定の実施形態において、本発明の方法によって生産され得る前記組換えＩＦＮａ５は、天然ＩＦＮａ５と実質的に同一のＩＦＮａ５タンパク質、すなわち、ＩＦＮａ５をコードする遺伝子、または（１）少なくとも天然ＩＦＮａ５のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列および（２）天然ＩＦＮａ５と共通の生物学的活性を有するタンパク質をコードする、その組換え体で形質転換されたＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞によって産生されるタンパク質である。好ましい実施形態において、前記ＩＦＮａ５は、ｈＩＦＮａ５である。

【００２９】

より特定の実施形態において、本発明の方法によって生産される組換えＩＦＮａ５は、そのポリペプチド鎖のＮ末端に余分なメチオニン残基を有する成熟ｈＩＦＮａ５に対応する配列番号１（図４）に示されるアミノ酸配列を有するＩＦＮａ５である。

【００３０】

本発明の方法によれば、ＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞は、用意される［工程ａ）］。原則、任意のＥ．ｃｏｌｉ株を本発明の方法において使用することができるが、好ましい実施形態において、Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉプロテアーゼ欠損株（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｉｏｎ⁻／ｏｍｐＴ⁻プロテアーゼ欠損宿主株、好ましくは、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１株、最も好ましくは、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）株）である。

【００３１】
ＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞は、ＩＦＮａ５をクローニングおよび発現させる従来の方法およびプロトコルによって得ることができる［例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．Ｓｅｃｏｎｄ ｅｄ．，ＣＳＨ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，１９８９；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．１－３（Ａｕｓｕｂｅｌ Ｆ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．，ｅｄ．）Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｂｒｏｏｋｌｙｎ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９４－１９９８］。特定の実施形態において、ＩＦＮａ５をコードする遺伝子のクローニングおよび発現、ならびに組換えＩＦＮａ５タンパク質を産生する細菌株（すなわち、ＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞）の構築は、ＩＦＮａ５をコードするｃＤＮＡ遺伝子のクローニング、Ｅ．ｃｏｌｉにおけるその発現が最適となるような前記遺伝子のＤＮＡ配列の改変、発現プラスミドの構築、選択されたプラスミドを好適なＥ．ｃｏｌｉ株へ導入する形質転換、そして発現／誘導条件の選択を含んでなる方法によって行うことができる。実施例１は、ｈＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞の構築を開示する。

【００３２】
特定の実施形態において、Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞がＥ．ｃｏｌｉプロテアーゼ欠損株（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ ＢＬ２１（ＤＥ３）株）であるとき、前記宿主細胞は、誘導性プロモーターの制御下で、ＩＦＮａ５タンパク質をコードする配列を含んでなるベクターで形質転換され；この場合、そのタンパク質の発現は、インデューサー（例えば、イソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ））の添加を必要とする。したがって、特定の実施形態によれば、Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞がＥ．ｃｏｌｉ ＢＬ２１株（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ ＢＬ２１（ＤＥ３）株）であるとき、工程ｂ）の条件は、ＩＰＴＧによる誘導を含む。

【００３３】
本発明の方法の工程ｂ）において、ＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞は、発酵培地中で前記組換えＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞が前記ＩＦＮａ５タンパク質を発現するのに有効な条件下で、炭素供給液を添加しながら培養され、ここで
－前記発酵培地は、動物起源または酵母起源由来の成分を含まず、かつ
－前記炭素供給液は、炭素源、および添加される炭素供給液１リットルあたり約３．０～約３．７ｍＬの微量元素溶液を含んでなる。

【００３４】
前記ＩＦＮａ５タンパク質を発現させるためにＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞が培養されなければならない有効な条件は、通常、当業者に公知である。前記条件としては、培養されるＥ．ｃｏｌｉ宿主細胞に適した窒素源、炭素源および金属源を含んでなる発酵培地が挙げられる。ただし、本発明によれば、その発酵培地は、動物起源または酵母起源由来の成分を含まない（例えば、合成化学発酵培地）。

【００３５】
特定の実施形態において、第二リン酸アンモニウムおよびアンモニアを、単独で、またはこれらの併用で、窒素源として使用することができる。別の特定の実施形態において、炭素源は、クエン酸、グルコースまたはそれらの組み合わせであり得る。

【００３６】
実施例２は、ＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ ＢＬ２１（ＤＥ３）株を培養するための発酵培地を開示し、前記培地は、第二リン酸アンモニウム、硫酸マグネシウム、リン酸二水素カリウム、クエン酸、Ｄ（＋）－グルコースおよび微量元素原液を含んでなり、ここで、前記微量元素原液は、鉄、カルシウム、亜鉛、マンガン、銅、コバルト、モリブデン、ホウ素およびそれらの組み合わせからなる微量元素の群から選択される微量元素を含んでなる。特定の実施形態において、前記発酵培地は、塩化鉄（ＩＩＩ）、塩化カルシウム、硫酸亜鉛（ＩＩ）、硫酸マンガン（ＩＩ）、硫酸銅（ＩＩ）、塩化コバルト（ＩＩ）、モ

リブデン酸ナトリウム、ホウ酸およびそれらの組み合わせからなる微量元素源の群から選択される微量元素源を含んでなる。特定の実施形態において、微量元素（痕跡元素）原液は、（単位ｇ／Ｌで）：塩化鉄（ＩＩＩ）六水和物（３０．０）、塩化カルシウム二水和物（４．０５）、硫酸亜鉛（ＩＩ）七水和物（６．７５）、硫酸マンガン（ＩＩ）一水和物（１．５）、硫酸銅（ＩＩ）五水和物（３．０）、塩化コバルト（ＩＩ）六水和物（１．１４）、モリブデン酸ナトリウム二水和物（０．３）およびホウ酸（０．６９）を含んでなる［実施例４］。

【００３７】

本発明の方法の別の特徴は、炭素供給液が、炭素源、および添加される炭素供給液１リットルあたり約３．０～約３．７ｍＬの微量元素溶液を含んでなるという事実を指す。前記微量元素溶液の詳細は、先に定義した。特定の実施形態において、炭素供給液は、炭素源（例えば、クエン酸および／またはグルコース）、硫酸マグネシウム、および本発明によれば、添加される炭素供給液１リットルあたり約３．０ｍＬ～約３．７ｍＬの微量元素溶液という濃度での濃縮微量元素溶液を含んでなる。上で述べたように、実施例２および４は、鉄、カルシウム、亜鉛、マンガン、銅、コバルト、モリブデン、ホウ素およびそれらの組み合わせからなる微量元素の群から選択される微量元素を含んでなる微量元素原液を開示し；特定の実施形態において、前記微量元素原液は、塩化鉄（ＩＩＩ）、塩化カルシウム、硫酸亜鉛（ＩＩ）、硫酸マンガン（ＩＩ）、硫酸銅（ＩＩ）、塩化コバルト（ＩＩ）、モリブデン酸ナトリウム、ホウ酸およびそれらの組み合わせを含んでなる。特定の実施形態において、炭素供給液１リットルあたり約３．０ｍＬ～約３．７ｍＬの微量元素溶液という濃度で含められてなる微量元素原液が、実施例２および４が開示する微量元素原液である。実施例２は、産生株によるｈＩＦＮａ５の生合成プロセスを開示する。

【００３８】

本発明者らによって行われた種々の研究から、組換えＩＦＮａ５（例えば、ｈＩＦＮａ５）の翻訳後修飾に対する微量元素の影響、すなわち、Ｅ．ｃｏｌｉにおいて産生される組換えＩＦＮａ５（例えば、組換えｈＩＦＮａ５）の精製ＡＰＩ（医薬品原薬）に見出される酸化型Ｍｅｔの相対量が、そのポリペプチド鎖のＮ末端における「プロセシングされないメチオニン」の量と密接に関連することが示された。Ｎ末端における１０％未満の前記プロセシングされないメチオニンを得るために、リフォールディング後の酸化型ＭｅｔＩＦＮａ５の量（ＲＰ－ＨＰＬＣによって測定される）は、多くとも１％を構成すべきである。

【００３９】

組換えｈＩＦＮａ５生合成プロセスの最適化において、本発明者らは、発酵培地中の微量元素の濃度が、ｈＩＦＮａ５の翻訳後修飾に対して重要な影響を及ぼすことを観察した。実際に、１Ｌの炭素供給液が、３．０ｍＬ～３．７ｍＬの前記微量元素原液を含むとき、またはそれが０．００４８ｍＬ／Ｌ／ｏ．ｕ．～０．００７０ｍＬ／Ｌ／ｏ．ｕ．［ｏ．ｕ．：光学単位］の限度内であるとき、酸化型のメチオニル化ｈＩＦＮａ５型（酸化型Ｍｅｔ　ｈＩＦＮａ５）の生成が無くなり、アセチル化ｈＩＦＮａ５型の量が２倍減少する（半分になる）ことが明らかになった。

【００４０】

特定の実施形態において、本発明の方法は、誘導後の平均「比増殖速度」（μ）が０．１７以上である条件下で行われる［μ：（（ｌｎ　ＯＤ２－ｌｎ　ＯＤ１）／Ｔ２－Ｔ１）。ここで、ＯＤは、「光学濃度」（光学単位，ｏ．ｕ．）であり、Ｔは、「時間」である。］。本発明者らによって行われた研究から、培養物の増殖と微量元素の濃度とは密接に相互依存的であり、特に、微量元素の濃度が非常に低い／ほぼ限界濃度であるとき、密接に相互依存的であることが示された。培養培地中の微量元素の濃度が、０．９５ｍＬ／Ｌ最終懸濁液体積（実施例４，表３）より低いか、または３．０ｍＬ／Ｌ炭素供給液未満であるとき、誘導後の平均μは、僅か０．１２１～０．１５８、すなわち、０．１７未満となる（Ｍ－８３、Ｍ－８４、Ｍ－８５、Ｍ－８６）。しかしながら、誘導後の平均μが０．１７未満であるとき、酸化型のメチオニル化ＩＦＮａ５型の存在が事実上保証される

。１．２３ｍＬ／Ｌ最終懸濁液体積より高い培養培地中の微量元素の濃度は、より速い増殖（Ｍ－８９、Ｍ－９０）、より大きなＷＣＷ（菌体の湿重量）、そしてより多量のアセチル化ＩＦＮａ５型＋未知タンパク質をもたらす。しかしながら、誘導後の平均μが０．１７以上であるとき、本発明の方法は、微量元素の濃度が０．１２３ｍＬ／Ｌ最終懸濁液体積より高くなるまで、または３．７ｍＬ／Ｌ炭素供給液より高くなるまで、上手く機能する。

【００４１】

本発明の方法の工程ｃ）は、発現したＩＦＮａ５タンパク質を単離し、そして必要に応じて精製することを含んでなる。特定の実施形態において、ＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞を溶解した後、封入体（ＩＢ）を可溶化に付して、変性ＩＦＮａ５を含んでなる混合物を得て、次いでそれを酸化再生処理に付して、再生ＩＦＮａ５を含んでなる混合物を得て、その後その混合物を精製プロセスに付して、対応する精製ＩＦＮａ５を得ることによって、ＩＦＮａ５タンパク質を、前記ＩＢの形態で単離する。特定の実施形態において、前記ＩＦＮａ５は、好ましくはｈＩＦＮａ５である。

【００４２】

本発明の方法によって発現したＩＦＮａ５を単離および精製するためには、まず、前記組換えＩＦＮａ５を封入体（ＩＢ）の形態で単離するために、ＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞を溶解する。つまり、特定の実施形態において、従来の手法（例えば、均質化、超音波処理または圧力循環）を用いることによって、ＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞の細胞膜を溶解する。好ましい方法としては、超音波処理、またはポッター型ホモジナイザー（テフロン（登録商標）／ガラス）を用いた均質化が挙げられる。細胞を溶解した後、ＩＦＮａ５を含むＩＢを、例えば遠心分離によって、溶解物の液相から分離し、適切な緩衝液に再懸濁する。その中の任意の水溶性Ｅ．ｃｏｌｉタンパク質を除去するために、そのＩＢを必要に応じて洗浄してもよい。

【００４３】

続いて、変性ＩＦＮａ５を含む混合物を得るために、通常、水性緩衝液中、可溶化剤（例えば、カオトロピック剤、例えば、水素結合を解離し、タンパク質の三次構造および二次構造に影響してそのアンフォールディングを引き起こすタンパク質変性剤）の存在下で、前記ＩＢを可溶化する。カオトロピック剤の説明に役立つ非限定的な例としては、尿素およびグアニジニウム塩酸塩（ＧｄｍＨＣｌ）、好ましくは、ポリペプチド鎖のカルバモイル化（濃尿素溶液が使用される場合に生じることがある）を妨げる強力なカオトロピック剤であるグアニジニウム塩酸塩が挙げられる。カオトロピック剤の濃度は、使用される特定のカオトロピック剤および存在する細胞材料の量に左右されるであろう。好ましくは、６～７Ｍ、最も好ましくは、６Ｍの濃度を有するグアニジニウム塩酸塩溶液が使用される。ｐＨは、カオトロピック剤を含む好適な緩衝液を加えることによって調整されてよく、好ましくは、ｐＨは、７超、典型的には約８以上、好ましくは８．６以上、より好ましくは９．５５～９．６５であり得る。通常、好ましい実施形態において、ＩＢの可溶化は、リフォールディング工程と同じｐＨで行われるので、リフォールディング工程のために可溶化溶質のｐＨをさらに調整することは回避される。

【００４４】

ＩＦＮａ５を含んでなるＩＢを可溶化した後、不溶性の粒子状物質を分離し、廃棄する。変性ＩＦＮａ５を含んでなる混合物中に存在する変性ＩＦＮａ５を、前記混合物を再生緩衝液などの再生溶液で希釈することによって、再生する。特定の実施形態において、前記再生緩衝液は、７．０を超えるｐＨ、典型的には約８以上のｐＨ、好ましくは８．６以上のｐＨ、より好ましくは９．５５～９．６５のｐＨを有する緩衝液系に、不安定化剤（例えば、Ｌ－アルギニンなど）、酸化還元対（例えば、ＧＳＨ／ＧＳＳＧなど）、および必要に応じてキレート化合物を含んでなる。再生後、任意の残留粒子状物質を除去するために、得られた正しく折り畳まれたＩＦＮａ５を含むタンパク質溶液を、従来の手法、例えば、遠心分離または濾過によって清澄化する。その後、必要であれば、清澄化されたタンパク質溶液のｐＨを好適な酸（例えば、ＨＣｌ）で８．０～８．２０に調整し、次いで

、再生ＩＦＮａ５（タンパク質溶液）を含む混合物をＩＦＮａ５の精製に適した任意のプロセスに付す。

【００４５】

実際には、任意のＩＦＮａ５精製プロセスを使用することができるが、本発明はさらに、ＩＦＮａ５を精製するための効率的なプロセスを提供し、そのプロセスは、再生ＩＦＮａ５を下記４工程のクロマトグラフィー処理に付す工程を含んでなる：

１）再生ＩＦＮａ５を含んでなる前記混合物を、疎水性相互作用クロマトグラフィーに付す工程；

２）工程１）で得られた溶液を、陰イオン交換クロマトグラフィーに付す工程；

３）工程２）で得られた溶液を、第１の陽イオン交換クロマトグラフィーに付す工程；および

４）工程３）で得られた溶液を、第２の陽イオン交換クロマトグラフィーに付す工程であって、ここで、前記溶液を、必要に応じてメチオニンを含む緩衝液で希釈する、工程。

【００４６】

つまり、再生ＩＦＮａ５を他の成分、例えば、残留カオトロピック剤などから分離するために、工程１）において、酸化再生処理後に得られたタンパク質プールを含んでなり、ｐＨが調整された清澄化タンパク質溶液を、Ｐｈｅｎｙｌ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラムに適用する。さらに、再生ＩＦＮａ５と吸着剤の疎水性表面との接触が、ＩＦＮａ５の成熟を促進する。

【００４７】

次いで、工程２）では、工程１）で得られたタンパク質プールを、伝導率について調整し（例えば、１３．００～１４．００ｍＳ／ｃｍ）、そしてｐＨを８．７５～８．８５に調整し、ＩＦＮａ５モノマーをその凝集型から分離するために、Ｑ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（陰イオン交換クロマトグラフィー）に適用する。特定の純度（例えば、５５％以上）を有する画分を、さらなる精製のためにプールすることができる。

【００４８】

続いて、工程３）では、工程２）で得られたタンパク質プールを、伝導性について調整し（例えば、６．００～７．００ｍＳ／ｃｍ）、そしてｐＨを５．１５～５．２０に調整し、Ｎ－メチオニル－ＩＦＮａ５およびアセチル化ＩＦＮａ５（翻訳後修飾の産物の形態）のような荷電アイソフォームから主要なＩＦＮａ５型を分離するために、ＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（第１の陽イオン交換クロマトグラフィー）に適用する。特定の純度（例えば、７０％以上）を有する画分を、さらなる精製のためにプールすることができる。

【００４９】

最後に、工程４）では、工程３）で得られたタンパク質プールを、伝導性について調整し（例えば、６．００～７．００ｍＳ／ｃｍ）、そしてｐＨを５．００～５．２０に調整し、荷電アイソフォームから主要なＩＦＮａ５型を分離するために、第２のＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（第２の陽イオン交換クロマトグラフィー）に適用する。特定の実施形態では、室温で行われるクロマトグラフィー中のＩＦＮａ５の酸化を防止するために、Ｌ－メチオニンをローディング溶液に加える。９５％以上（≧）のＩＦＮａ５の純度（ＲＰ－ＨＰＬＣによって測定される）を達成することができるような方法で、画分をプールすることができる。

【００５０】

所望であれば、そのように得られたＩＦＮａ５を、薬学的に許容可能なビヒクルおよび賦形剤、例えば、塩化ナトリウムを含むリン酸ナトリウム，ｐＨ６．８０～７．２０を用いて製剤化してもよい。そのタンパク質溶液は、所望であれば、所望の濃度まで濃縮することができ、例えば、特定の実施形態では、そのタンパク質溶液は、１０ｍｇ／ｍＬまで、例えば、１．０～１．５ｍｇ／ｍＬまでのタンパク質濃度に濃縮され、限外濾過によって緩衝液交換され、そして０．２２μｍの最大ポアサイズを有する滅菌フィルターでの濾過滅菌によって滅菌される。

【００５１】
実施例３は、ｈＩＦＮａ５産生株からｈＩＦＮａ５を単離および精製するための方法が開示される。
【００５２】
以下の実施例は、本発明の実施形態をさらに説明するために役立つ。
【実施例】
【００５３】
実施例１
ＩＦＮａ５を発現するＥ．ｃｏｌｉ株の構築
この実施例は、組換えヒトインターフェロンアルファ－５（ｈＩＦＮａ５）を産生するＥ．ｃｏｌｉ株の開発および構築を開示する。つまり、ｈＩＦＮａ５遺伝子のクローニングおよび発現、ならびに組換えＩＦＮａ５タンパク質を産生する細菌株の構築は、以下の工程：ｈＩＦＮａ５をコードするｃＤＮＡ遺伝子のクローニング、Ｅ．ｃｏｌｉにおけるその発現が最適となるような前記遺伝子のＤＮＡ配列の改変、発現プラスミドの構築、選択されたプラスミドを好適なＥ．ｃｏｌｉ株へ導入する形質転換、そして発現／誘導条件の選択、を用いることによって、以下に記載するように行った。
【００５４】
方法
ｈＩＦＮａ５のクローニングおよび発現では、従来の方法およびプロトコルを用いた［Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．Ｓｅｃｏｎｄ ｅｄ．，ＣＳＨ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，１９８９；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．１－３（Ａｕｓｕｂｅｌ Ｆ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．，ｅｄ．）Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｂｒｏｏｋｌｙｎ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９４－１９９８］。
【００５５】
酵素、ＤＮＡおよびタンパク質マーカーを用いたすべての操作は、製造業者の説明書［主にＦｅｒｍｅｎｔａｓ（Ｌｉｔｈｕａｎｉａ）］に従って行った。
【００５６】
遺伝的構築物
ｈＩＦＮａ５産生Ｅ．ｃｏｌｉの構築は、図１に示す遺伝的構築物の開発のフローチャートに示す工程に従って行った。
【００５７】
最初のプラスミド
ｈＩＦＮａ５コード配列（シグナルペプチドを含まない）を、インフォームドコンセント後、非肝臓病変のための開腹手術を受けた匿名のドナー患者から得た正常肝臓組織から以下のとおりクローニングした：正常肝臓組織を１ｍＬのＵｌｔｒａｓｐｅｃ溶液（Ｂｉｏｔｅｘ）中でホモジナイズし、全ＲＮＡをＤｎａｓｅ（Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ，Ｐａｉｓｌｅｙ，Ｕ．Ｋ．）で処理した後、ＲｎａｓｅＯＵＴ（Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ）の存在下でＭ－ＭＬＶ逆転写酵素（Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ）を用いて逆転写を行った。予め得ていた相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）から、下記上流プライマーおよび下流プライマー（５’－３’）を用いて、ｈＩＦＮａ５コード配列（シグナルペプチドを含まない）をＰＣＲ増幅した：
【化１】

ＧＧＡＡＴＴＣ<u>ＣＡＴＡＴＧ</u>**ＴＧＴＧＡＴＣＴＧＣＣＴＣＡＧＡＣＣＣＡ**（配列番号２）
および
Ｃ<u>ＧＧＧＡＴＣＣ</u>**ＴＴＧＡＡＣＣＡＧＴＴＴＴＣＡＴＴＣＣＴＴＣ**（配列番号３）。

【００５８】
両方のプライマーが、ｈＩＦＮａ５配列（太字）および制限酵素：ＮｄｅＩおよびＢａｍＨＩに特異的な配列（下線）を含む。ＰＣＲ産物を、アガロースゲル電気泳動によって

解析し、バンドをゲルから切り出し、Ｇｅｎｅ Ｃｌｅａｎ ｋｉｔ（ＭＰ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ）によって精製した。精製したＰＣＲ産物を、ＴＯＰＯ ＴＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｏｇｅｎ）を用いてｐＣＲ２．１ＴＯＰＯプラスミドにクローニングした。インサートに由来するクローンを、色素Ｒｈｏｄａｍｉｎｅターミネーターサイクルシーケンシングキット（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ）を使用して、ＡＢＩＰＲＩＳＭ ３１０ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ）において配列決定し、そのインサートがｈＩＦＮａ５配列と厳密に一致することを確かめた。その後、ｐＣＲ２．１ ＴＯＰＯ－ＩＦＮアルファ５を、ＮｄｅＩおよびＢａｍＨＩ制限酵素で消化し、５３４ｐｂのバンド（ＩＦＮａ５コード配列に対応する）を、予め同じ酵素で消化しておいたｐＥＴ２８ｂベクター（Ｎｏｖａｇｅｎ）にクローニングした。同じ手順を用いて、その配列を再度確かめた。

【００５９】

種々のコロニーから得た最初のプラスミドＤＮＡｐＥＴ２８－ＩＦＮアルファ－５を、制限酵素解析によって解析した（図２）。

【００６０】

プラスミドｐＥＴ２８－ＩＦＮアルファ－５を、ＡＢＩ Ｐｒｉｓｍ ３７７配列分析装置を用いて両方のＤＮＡ鎖を配列決定することによって解析した。この解析から、ｈＩＦＮａ５コード配列が確認された。プラスミドｐＥＴ２８－ＩＦＮアルファ－５を、コドン最適化された成熟構造を構築するために、ＰＣＲ増幅用の鋳型として使用した。

【００６１】

コドン最適化された成熟構造

コドン最適化を含む、ｈＩＦＮａ５コード遺伝子のＰＣＲ増幅

鋳型としてプラスミドｐＥＴ２８－ＩＦＮアルファ－５を使用することによって、ＰＣＲ増幅を行った。以下のオリゴヌクレオチドを合成した：

センスプライマー（ＳＰ）：５’－ＣＡＴＡＴＧＴＧＴＧＡＴＣＴＧＣＣＧＣＡＧＡＣＣＣＡＣＴＣＣＣＴＧＴＣＴＡＡＣＣＧＴＣＧＴＡＣＴＣＴＧＡＴＧＡＴＣＡＴＧＧＣＡＣＡＧＡＴＧＧＧＴＣＧＴＡＴＣＴＣＴＣＣＴＴＴＣ［配列番号４］

アンチセンスプライマー（ＡＳＰ）：５’－ＣＴＧＣＡＧＴＴＡＴＴＣＣＴＴＡＣＧＡＣＧＴＡＡＡＣＧＴＴＣＴＴＧＣＡＡＧ［配列番号５］

Ｅ．ｃｏｌｉにおいて使用頻度が最も低いコドンを置換するために、ＳＰ［配列番号４］およびＡＳＰ［配列番号５］プライマーを適用した。コドン最適化は、主に、アルギニンコドンＡＧＡおよびＡＧＧに関する。

【００６２】

ＰＣＲフラグメントの中間体プラスミドへのクローニング

約５００ｂｐの精製された増幅産物を、Ｒａｐｉｄ ＤＮＡ ｌｉｇａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（＃Ｋ１４２１，Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ，Ｌｉｔｈｕａｎｉａ）を用いて、ｐＵＣ５７／Ｔプラスミド（＃ＳＤ０１７１ Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ，Ｌｉｔｈｕａｎｉａ）にクローニングし、Ｅ．ｃｏｌｉ ＪＭ１０９（ＡＴＣＣ５３３２３，ＡＴＣＣ Ｂａｃｔｅｒｉａ ａｎｄ Ｂａｃｔｅｒｉｏｐｈａｇｅｓ，１９th ｅｄｉｔｉｏｎ，１９９６）に形質転換した。組換えクローンを制限酵素解析によって選択した（図３）。２つのクローンを選択し、抽出されたプラスミドを配列決定した。

【００６３】

中間体プラスミドＩＦＮアルファ－５の配列解析およびヒトＩＦＮアルファ－５コード配列のプラスミドｐＥＴ２１ｂ（＋）への再クローニング

ヌクレオチド配列解析によって、ｈＩＦＮａ５コード部分の配列を確認し、その配列を図４に示す。

【００６４】

ｈＩＦＮａ５をコードするフラグメントを、ＮｄｅＩ＋ＢａｍＨＩで切り出し、精製されたＤＮＡフラグメントを、ＮｄｅＩ＋ＢａｍＨＩで切断したベクターｐＥＴ２１ｂ（＋）（Ｎｏｖａｇｅｎ）にライゲートすることにより、プラスミドｐＥＴ２１－ＩＦＮアル

ファー５を得た。Ｅ．ｃｏｌｉ　ＪＭ１０９株に形質転換した後、１００μｇ／ｍＬのアンピシリンを加えることによって、細菌を選択した。形質転換された細胞に由来するコロニーの組換え挿入解析を、コロニーＰＣＲ試験法を用いて行った。ＰＣＲ陽性クローンから精製されたプラスミドｐＥＴ２１－ＩＦＮアルファ－５の詳細な制限酵素解析から、予想した制限酵素パターンが得られた（図５）。

【００６５】

組換えｈＩＦＮａ５の発現

非発現宿主においてプラスミドｐＥＴ２１－ＩＦＮアルファ－５を確立した（安定化した）後、それを、標的タンパク質の発現に対して関連する遺伝因子を有する宿主Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）に形質転換することにより、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）ｐＥＴ２１－ＩＦＮａ－５株を得た。ｈＩＦＮａ５の発現を、１ｍＭ　ＩＰＴＧ（イソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシド）で誘導し、その結果を図６に示す。

【００６６】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥによれば、ｈＩＦＮａ５の分子量は約２０ｋＤａであり、これは計算値の１９．７ｋＤａと相関する。

【００６７】

組換えｈＩＦＮａ５は、全細胞溶解物の不溶性画分において検出された；標的タンパク質の収率は、全細胞タンパク質の約２０％であった。ｈＩＦＮａ５は、細胞溶解物の不溶性画分のおよそ４０％を構成した。得られた発現株の１つのコロニーを、リサーチマスターセルバンク（ＲＭＣＢ）を確立するために使用した。

【００６８】

実施例２

産生株によるｈＩＦＮａ５の生合成プロセス

Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）ｐＥＴ２１－ＩＦＮａ－５株（実施例１）を、以下の組成（ｇ／Ｌ）を有する培地中で培養した：

ａ）フラスコ内における接種材料の調製（培養）用（ｇ／Ｌ）：リン酸水素二ナトリウム（１７．０）、リン酸二水素カリウム（１．８２）、硫酸アンモニウム（３．０）、硫酸マグネシウム七水和物（０．５）、Ｄ（＋）－グルコース一水和物（１５．０）および微量元素原液ｅ）（０．１６ｍＬ）；

ｂ）発酵用（ｇ／Ｌ）：第二リン酸アンモニウム（４．０）、硫酸マグネシウム七水和物（０．５）、リン酸二水素カリウム（１３．３）、クエン酸一水和物（１．６）、Ｄ（＋）－グルコース一水和物（３０．０）および微量元素原液ｅ）（０．２５ｍＬ）；

ｃ）供給液Ａ（ｇ／Ｌ）：Ｄ（＋）－グルコース一水和物（７００．０）、硫酸マグネシウム七水和物（２０．７）および微量元素原液ｅ）（３．４ｍＬ／Ｌ）；

ｄ）供給液Ｂ（ｇ／Ｌ）：第二リン酸アンモニウム（３６０．０）およびリン酸二水素カリウム（３０６．７）；ならびに

ｅ）微量元素（痕跡元素）原液（ｇ／Ｌ）：塩化鉄（ＩＩＩ）六水和物（３０．０）、塩化カルシウム二水和物（４．０５）、硫酸亜鉛（ＩＩ）七水和物（６．７５）、硫酸マンガン（ＩＩ）一水和物（１．５）、硫酸銅（ＩＩ）五水和物（３．０）、塩化コバルト（ＩＩ）六水和物（１．１４）、モリブデン酸ナトリウム二水和物（０．３）およびホウ酸（０．６９）。

【００６９】

図７は、ヒトＩＦＮアルファ－５生合成プロセスの完全なスキームを示す。

【００７０】

接種材料の調製：そのフラスコに培養用の５００ｍＬの滅菌培地［ａ）］を含むエルレンマイヤーフラスコに、０．２５ｍＬの保存培養ＷＣＢ（ワーキングセルバンク）Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）ｐＥＴ２１－ＩＦＮａ－５を接種した。その後、そのフラスコを撹拌速度３００ｒｐｍの回転振盪機において３０℃の温度で２１～２２時間インキュベートした。インキュベーション後の光学濃度は、４．５０　ｏ．ｕ．（光学単位）［λ＝５９５ｎｍ］以上でなければならない。

【００７１】
発酵：７．０Ｌの発酵培地［ｂ）］を含む発酵槽（総体積１３．７Ｌ）に、接種フラスコにおいて得られた培養物の１．５～１．６％を接種した。自動的に制御される温度（３７℃）、ｐＨ（６．８）およびｐＯ$_2$（２０％）で発酵を行った。２５％アンモニウム溶液をｐＨ補正のために使用した。８～９時間培養した後、追加の供給を開始した。培養培地中のグルコース濃度を約３ｇ／Ｌ～２２ｇ／Ｌに維持するために、供給液Ａ［ｃ）］を特定用量注入した。最終ＩＰＴＧ濃度が０．５ｍＭとなるように、９０～１１０　ｏ．ｕ．（λ＝５９５ｎｍ）においてＩＰＴＧを用いて誘導を行った。誘導後に十分な比増殖速度を得るために、誘導時の比増殖速度は０．４５以上であるべきである。誘導後の平均比増殖速度は、０．１７より高くあるべきである。供給液Ｂ［ｄ）］を別々の用量で注入した：６０～７０　ｏ．ｕ．において１５０ｍＬ、１２０～１４０　ｏ．ｕ．において１５０ｍＬ、誘導の１．５時間（９０分）後に７５ｍＬ、および２時間後に７５ｍＬ。誘導後３時間にわたって同一条件で発酵を続けた。次いで、細胞懸濁液を発酵槽内で１２～１５℃に冷却し、蠕動ポンプによって遠心機に移した（３５Ｌ／ｈ）。その細胞懸濁液を、４℃で、５，０００ｒｐｍの速度で遠心分離した。

【００７２】
回収されたバイオマスを、ポリエチレンバッグに集め、凍結のため、およびその後の貯蔵のために、（－３３±５）℃の冷却装置に置いた。凍結されたバイオマスの一部を、総タンパク質の評価およびｈＩＦＮａ５の発現の評価のために採取した。

【００７３】
実施例３
産生株からｈＩＦＮａ５を単離および精製するプロセス
１．バイオマスの均質化、破砕、および封入体（ＩＢ）の単離
実施例２で得られた６８０．０～７００．０ｇのバイオマスを、再懸濁緩衝液（２ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００および１ｍＭ　ＰＭＳＦを含む０．１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．８０～８．００）中で、１／１０（ｗ／ｖ）の比、すなわち、１ｇの湿バイオマス／１０ｍＬの再懸濁緩衝液中で、ホモジナイズした。

【００７４】
ポッター型ホモジナイザー（テフロン（登録商標）／ガラス）において再懸濁を行い、次いで、高圧ホモジナイザーを４～１０℃の温度、６００～８００ｂａｒにおいて用いて、細胞を破砕した。細胞の崩壊の後、８，０００ｒｐｍで３０～３５分間の遠心分離によって封入体（ＩＢ）を分離した。

【００７５】
２．封入体（ＩＢ）の洗浄
単離されたＩＢの予備洗浄を、洗浄緩衝液Ｉ～ＩＩＩを用いて連続した４工程のプロセスによって行った：
洗浄緩衝液Ｉ：１Ｍ　ＮａＣｌ、０．１％Ｐｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ－８０を含む、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液，ｐＨ７．４５～７．５５；
洗浄緩衝液ＩＩ：６Ｍ尿素を含む、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液，ｐＨ８．００～８．２０；
洗浄緩衝液ＩＩＩ：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液，ｐＨ８．００～８．２０。

【００７６】
つまり、ＩＢの洗浄は、以下のとおり行った：
ａ）最初の２回の洗浄（工程１および２）、ＩＢを洗浄緩衝液Ｉで洗浄した；
ｂ）３番目の洗浄（工程３）、ＩＢを洗浄緩衝液ＩＩで洗浄した；そして
ｃ）４番目の洗浄（工程４）、ＩＢを洗浄緩衝液ＩＩＩで洗浄した。

【００７７】
ＩＢ洗浄手順の全体にわたって、１０ｍＬの緩衝液／１ｇの湿バイオマスという洗浄緩衝液／湿バイオマス比を維持した。

【００７８】

３．ＩＢの可溶化

ＩＢを可溶化するために、可溶化緩衝液（６Ｍ ＧｄｍＨＣｌを含む、５０ｍＭグリシン／ＮａＯＨ緩衝液，ｐＨ９．５５～９．６５）を使用した。可溶化の比率：２～８℃で、２時間、６ｍＬの可溶化緩衝液中において１ｇのバイオマスからＩＢを単離し、そしてその後８，０００ｒｐｍで２５～３０分間遠心分離。

【００７９】

４．再生

再生緩衝液：１．２Ｍ ＮａＣｌ、０．２２Ｍ Ｌ－アルギニン、２．８５ｍＭ ＧＳＨ（還元型グルタチオン）、０．２８５ｍＭ ＧＳＳＧ（酸化型グルタチオン）を含む、５０ｍＭグリシン／ＮａＯＨ緩衝液，ｐＨ９．５５～９．６５、４～１０℃における伝導率１１０～１１０ｍＳ／ｃｍ。

【００８０】

０．２Ｍ Ｌ－アルギニン、２．５／０．２５ｍＭ ＧＳＨ／ＧＳＳＧという再生混合物中の最終濃度を達成するようにＩＢ可溶化物（ｓｏｌｕｂｉｌｉｓａｔｅ）を再生緩衝液に（体積比１：７）滴下することによって、ＧｄｍＨＣｌ－変性ヒトＩＦＮアルファ５を再生した。再生混合物を、２～８℃で４４～６６時間、連続撹拌した。再生後、タンパク質溶液を８，０００ｒｐｍで３０～３５分間の遠心分離によって清澄化した。

【００８１】

５．クロマトグラフィー

ｈＩＦＮａ５を、以下で述べるように４工程のクロマトグラフィープロセスによって精製した。

【００８２】

５．１ Ｐｈｅｎｙｌ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（疎水性相互作用クロマトグラフィー）によるクロマトグラフィー

Ｐｈｅｎｙｌ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラムは、再生したｈＩＦＮａ５を残留カオトロピック剤ＧｄｍＨＣｌから分離することを目的としている。さらに、再生したｈＩＦＮａ５と吸着剤の疎水性表面との接触が、ＩＦＮａ５の成熟を促進させる。

【００８３】

つまり、清澄化したタンパク質溶液のｐＨを６Ｍ ＨＣｌで８．００～８．２０に調整し、次いでそのタンパク質溶液を、以下のプロセスパラメータを用いてＰｈｅｎｙｌ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅクロマトグラフィーカラムに適用した：

クロマトグラフィー媒体：Ｐｈｅｎｙｌ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ ＡＢ）；

使用カラム：ＢＰＧ１００×５００ｍｍ，直径１０ｃｍ；

線流速：６０ｃｍ／時；

クロマトグラフィー媒体ベッド体積：２．７±０．３Ｌ

平衡緩衝液：１．５Ｍ塩化ナトリウムを含む２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液，ｐＨ８．００～８．２０、１５～２５℃における伝導率１１５～１２５ｍＳ／ｃｍ（４～１０℃では１１０～１２０ｍＳ／ｃｍ）；

溶出緩衝液：１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液，ｐＨ９．２０～９．２５、１５～２５℃における伝導率０．１～０．２ｍＳ／ｃｍ；

溶出を、６カラム体積（ＣＶ）［すなわち、６ＣＶ］にわたる溶離緩衝液で行う。回収されたタンパク質溶液２～６ＣＶ。

【００８４】

５．２ Ｑ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（陰イオン交換クロマトグラフィー）によるクロマトグラフィー

Ｑ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラムは、ｈＩＦＮａ５モノマーをその凝集型から分離するために使用される。

【００８５】

つまり、前述の工程（５．１）で得られたタンパク質プールを、５Ｍ ＮａＣｌを含む

２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液，ｐＨ８．７５～８．８５を加えることによって、１３．００～１４．００ｍＳ／ｃｍという伝導率に調整し、ｐＨを６Ｍ　ＨＣｌで８．７５～８．８５に調整した。次いで、そのタンパク質溶液を、以下のプロセスパラメータを用いてＱ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅクロマトグラフィーカラムに適用した：

クロマトグラフィー媒体：Ｑ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＡＢ）；

使用カラム：ＢＰＧ１４０×５００ＭＭ，直径１４ｃｍ；

線流速：６０ｃｍ／時；

クロマトグラフィー媒体ベッド体積：３．３±０．３Ｌ

平衡緩衝液：０．１２Ｍ塩化ナトリウムを含む２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液，ｐＨ８．７５～８．８５、１５～２５℃における伝導率１３．００～１４．００ｍＳ／ｃｍ；

溶出緩衝液：０．２３ｍＭ塩化ナトリウムを含む２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液，ｐＨ８．７５～８．８５、１５～２５℃における伝導率２３．００～２５．００ｍＳ／ｃｍ；

溶出：５カラム体積（５ＣＶ）にわたる１００％までの直線勾配の溶出緩衝液、および５ＣＶの１００％溶出緩衝液。

【００８６】

画分体積は、４００～１０００ｍＬであった。

【００８７】

５５％以上（≧）の純度のｈＩＦＮａ５（ＲＰ－ＨＰＬＣによって測定される）の画分のみをさらなる精製のためにプールした。

【００８８】

５．３　ＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（陽イオン交換クロマトグラフィーＩ）による第１のクロマトグラフィー

Ｎ－メチオニル－ｈＩＦＮａ５およびアセチル化ｈＩＦＮａ５（翻訳後修飾の産物である形態）のような荷電アイソフォームから主要なｈＩＦＮａ５型を分離するために、ＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラムを３番目および４番目のクロマトグラフィー工程のために使用する。

【００８９】

つまり、前述の工程（５．２）で得られたタンパク質プールを、１０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液，ｐＨ４．９５～５．０５を加えることによって、６．００～７．００ｍＳ／ｃｍという伝導率に調整し、ｐＨを４Ｍ酢酸で５．１５～５．２０に調整した。次いで、そのタンパク質溶液を、以下のプロセスパラメータを用いてＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅクロマトグラフィーカラムに適用した：

クロマトグラフィー媒体：ＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＡＢ）；

使用カラム：ＢＰＧ１００×５００ｍｍ，直径１０ｃｍ；

線流速：６０ｃｍ／時；

クロマトグラフィー媒体ベッド体積：３．３±０．３Ｌ

平衡緩衝液：５０ｍＭ塩化ナトリウムを含む２０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液，ｐＨ５．１５～５．２０、１５～２５℃における伝導率６．００～７．００ｍＳ／ｃｍ；

溶出緩衝液：２ｍＭ　Ｌ－メチオニンおよび０．１Ｍ　ＮａＣｌを含む２０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液，ｐＨ５．１５～５．２０、１５～２５℃における伝導率１１．００～１３．００ｍＳ／ｃｍ；

溶出を、１０カラム体積（１０ＣＶ）にわたる溶出緩衝液で行った。

【００９０】

画分体積は、４００～２０００ｍＬであった。

【００９１】

７０％以上（≧）の純度のｈＩＦＮａ５（ＲＰ－ＨＰＬＣによって測定される）の画分

のみをさらなる精製のためにプールした。

【００９２】

５．４　ＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（陽イオン交換クロマトグラフィーＩＩ）による第２のクロマトグラフィー

つまり、ローディング溶液［第１のＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（工程５．３）から回収したタンパク質画分のプール］を、２ｍＭ　Ｌ－メチオニンを含む５ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液，ｐＨ５．００～５．２０で希釈し、１５～２５℃において０．２００～０．８００ｍＳ／ｃｍという伝導率から１５～２５℃において６．００～７．００ｍＳ／ｃｍという伝導率に調整した。室温で行われるクロマトグラフィー中のｈＩＦＮａ５の酸化を防止するために、ローディング溶液に２ｍＭ　Ｌ－メチオニンを加えた。ローディング溶液を、以下のプロセスパラメータを用いてＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅクロマトグラフィーカラムに適用した：

クロマトグラフィー媒体：ＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＡＢ）；

使用カラム：ＢＰＧ１００×５００ｍｍ，直径１０ｃｍ；

線流速：６０ｃｍ／時；

クロマトグラフィー媒体ベッド体積：３．０±０．３Ｌ

平衡緩衝液：５０ｍＭ塩化ナトリウムを含む２０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液，ｐＨ５．１５～５．２０、１５～２５℃における伝導率６．００～７．００ｍＳ／ｃｍ；

溶出緩衝液：０．１Ｍ　ＮａＣｌを含む２０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液，ｐＨ５．１５～５．２０、１５～２５℃における伝導率１１．００～１３．００ｍＳ／ｃｍ；

溶出線流速：４５ｃｍ／時；

溶出：２０カラム体積（２０ＣＶ）にわたる１００％までの溶出緩衝液の直線勾配。

【００９３】

画分体積は、４００～２０００ｍＬであった。

【００９４】

ｈＩＦＮａ５のＲＰ－ＨＰＬＣ純度が９５％以上（≧）となるように画分をプールした。

【００９５】

製剤化、濃縮、濾過滅菌

製剤化緩衝液：０．１Ｍ塩化ナトリウムを含む２５ｍＭリン酸ナトリウム，ｐＨ６．８０～７．２０、１５～２５℃における伝導率１０．００～１４．００ｍＳ／ｃｍ。

【００９６】

タンパク質溶液の緩衝液交換／濃縮を、Ｂｉｏｍａｘ　１０ｋＤａ膜で透析濾過／濃縮により行って１．００ｍｇ／ｍＬ以上（≧）とし、滅菌０．２２μｍフィルター（Ｍｉｌｌｉｐａｋ２０）で濾過滅菌し、ガラスバイアルに充填した。

【００９７】

図８は、組換えｈＩＦＮａ５タンパク質の３つの大規模精製バッチを還元条件下および非還元条件下両方においてＳＤＳ－ＰＡＧＥ（１４％）で測定した、本発明によって処理、そして製剤化された組換えｈＩＦＮａ５の純度を示す。

【００９８】

図９は、「逆相高速液体クロマトグラフィー」（ＲＰ－ＨＰＬＣ）解析によって測定した、本発明によって処理、そして製剤化された組換えｈＩＦＮａ５の純度を示す（この図は、組換えｈＩＦＮａ５の３つの大規模バッチの結果を示す）。

【００９９】

図１０は、３つの組換えｈＩＦＮａ５大規模バッチについて「サイズ排除ＨＰＬＣ」（ＳＥ－ＨＰＬＣ）解析によって測定した、本発明によって処理、そして製剤化された組換えｈＩＦＮａ５の純度を示す。

【０１００】

図１１は、３つの組換えｈＩＦＮａ５大規模バッチについて等電点電気泳動解析によっ

て測定した、本発明によって処理、そして製剤化された組換えｈＩＦＮａ５の純度を示す。レーン１、１１：ｐＩスタンダード（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ）；レーン２、３、４：組換えｈＩＦＮａ５，１５μｇ；レーン５、６、７：組換えｈＩＦＮａ５，５μｇ；レーン８、９、１０：組換えｈＩＦＮａ５，１μｇ。

【０１０１】

図１２は、本発明によって精製、そして製剤化された３つの組換えｈＩＦＮａ５調製物の大規模バッチのペプチドマッピングクロマトグラムを表す。

【０１０２】

実施例４

組換えヒトＩＦＮアルファ－５の生合成に対する微量元素濃度およびグルコース濃度の影響の評価

この実施例の目的は、組換えヒトＩＦＮアルファ－５（ｈＩＦＮａ５）の翻訳後修飾に対する微量元素の影響を確認すること、炭素供給液中の臨界微量元素濃度の限界を確定すること、および組換えｈＩＦＮａ５の生合成に対するグルコース濃度の影響を評価することであった。したがって、この実施例は、本試験中に行われた解析および得られた結果を説明し、そして組換えｈＩＦＮａ５の生合成プロセスにおける炭素供給液中の微量元素濃度の根拠およびグルコース濃度の根拠としての役割を果たす。

【０１０３】

ｈＩＦＮａ５生合成プロセスを最適化する中で、発酵培地中の金属または微量元素（痕跡元素）の濃度がｈＩＦＮａ５タンパク質の翻訳後修飾に対して影響を及ぼすことが認められた。したがって、本試験の目的は、ｈＩＦＮａ５タンパク質の翻訳後修飾に対する前記痕跡元素の影響を確かめること、および炭素供給液中の臨界微量元素濃度の限界を確定することであった。それに加えて、各炭素供給用量が供給された後の発酵培地中のグルコース濃度（１７ｇ／Ｌおよび２２ｇ／Ｌ）が、培養物の増殖に対して影響を及ぼすか（すなわち、発酵培地中のグルコース濃度は、培養物の増殖の限界に関わり、それゆえバイオマス収率に影響するか、または培養物の増殖に影響しないか）、および標的タンパク質（組換えｈＩＦＮａ５）の質に対して影響を及ぼすかを調べるために、発酵培地中のグルコース濃度を評価すると決定した。

【０１０４】

材料および方法

実験の計画をデザインし、「実験計画法」（ＤＯＥ）の助けを借りてモニターし、それを表１に示す。

【０１０５】

【表１】

デザインされ行われた実験

ショートバッチ Ｎｏ.	炭素供給液中の微量元素溶液の濃度, ｍＬ／Ｌ	発酵培地中のグルコース濃度の上限, ｇ／Ｌ
M-83	2.2	17
M-84	2.2	22
M-85	2.7	17
M-86	2.7	22
M-87	3.7	17
M-88	3.7	22
M-89	4.2	17
M-90	4.2	22
M-92	3.2	22
M-80*;M-81*	3.0	22
M-82*	3.4	22
F-0030811*	4.0	22

以前同じ条件下で既に行っている実験（*）を含む。

【０１０６】
高細胞密度の流加発酵を既知組成の無機塩／グルコース培地中で行った。
－フラスコ内での培養用の無機塩／グルコース培地の組成（ｇ／Ｌ）：リン酸水素二ナトリウム－１７．０、リン酸二水素カリウム－１．８２、硫酸アンモニウム－３．０、硫酸マグネシウム七水和物－０．５、Ｄ（＋）－グルコース一水和物－１５．０、微量元素原液－０．１６ｍＬ。
－微量元素（痕跡元素または金属）原液（ｇ／Ｌ）：塩化鉄（ＩＩＩ）六水和物－３０．０、塩化カルシウム二水和物－４．０５、硫酸亜鉛（ＩＩ）七水和物－６．７５、硫酸マンガン（ＩＩ）一水和物－１．５、硫酸銅（ＩＩ）五水和物－３．０、塩化コバルト（ＩＩ）六水和物－１．１４、モリブデン酸ナトリウム二水和物－０．３、ホウ酸－０．６９。
－発酵用の無機塩／グルコース培地の組成（ｇ／Ｌ）：第二リン酸アンモニウム－４．０、硫酸マグネシウム七水和物－０．５、リン酸二水素カリウム－１３．３、クエン酸一水和物－１．６、Ｄ（＋）－グルコース一水和物－３０．０、微量元素原液－０．２５ｍＬ。
－炭素供給液：７０．０％グルコース、２．１％$MgSO_4 \times 7H_2O$および実験計画に応じた微量元素原液。
【０１０７】
培養８時間目から開始して、グルコース濃度を（１５～３０）分ごとに測定し、その後、（実験計画に応じて、１７ｇ／Ｌまたは２２ｇ／Ｌの上限グルコース濃度に達するように）算出された用量の炭素供給を加えた。
【０１０８】
さらに、別々の用量での７０ｍＬの両方のリン酸塩溶液（第二リン酸アンモニウム－２５．０ｇ、リン酸二水素カリウム－２１．０ｇを３用量に分けた：２：２：１または２８：２８：１４ｍＬの比）を、６０～７５、１２０～１３５、および１７０～１８０ｏ．ｕ．において加えた。
【０１０９】
必要であれば、溶存酸素濃度を２０％に維持するために、流入空気を純粋な酸素で自動的に富ませた（発酵槽総体積１リットルあたり最大６０％）。
【０１１０】
ＷＣＢ（－７０℃にて貯蔵）［実施例２］から得た０．２５ｍＬの保存培養Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）ｐＥＴ２１－ＩＦＮａ－５を、５００ｍＬの無機塩／グルコース培地（ｐＨ約７．７）中で、３０℃で２２時間オービタルシェーカー（３００ｒｐｍ）でインキュベートし、増殖させた。
【０１１１】
接種材料は、使用発酵槽の体積の約１．０％（２０ｍＬ）であり、それは、実際の体積の１．５４％であった。
【０１１２】
ｐＨ６．８、pO_2－２０％、温度－３７℃で、総体積３Ｌ／使用体積２Ｌの発酵槽「Ｂｉｏｓｔａｔ　Ｂ」において発酵を行った。発酵プロセスのオンライン変数（温度、撹拌、ｐＨ、pO_2、酸／塩基消費）は、自動的に制御され、オフライン変数－光学濃度は、ＭＦＣＳ／ｗｉｎプロットにおいて追跡される。
【０１１３】
３５％オルト－リン酸および２５％アンモニア溶液をｐＨ補正のために使用した。
【０１１４】
２０％Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）３１Ｒ１を用いて泡沫を消泡した。
【０１１５】
９１．６～１０３．６ｏ．ｕ．（λ＝６００ｎｍ）のＯＤにおいて、最終的な使用体積に対して最終ＩＰＴＧ濃度が０．５ｍＭとなるＩＰＴＧで誘導を行った。発酵をさらに３時間続けた。

【０１１６】
比増殖速度（μ）、流入体積（ｉｎｃｏｍｉｎｇ　ｖｏｌｕｍｅ）（追加供給分）および採取体積（ｏｕｔ　ｃｏｍｉｎｇ　ｖｏｌｕｍｅ）（ＯＤおよびグルコースの測定のためのサンプリング分）をすべての発酵について厳密に計算した。
【０１１７】
結果およびデータ解析
本試験中に行った解析および得られた結果から、Ｅ．ｃｏｌｉにおいて産生された組換えｈＩＦＮａ５タンパク質の翻訳後修飾が、培養培地中の微量元素の濃度に依存することが裏付けられた。
【０１１８】
微量元素（原液）の濃度が、３．０ｍＬ／Ｌ炭素供給液以上であるか、または０．９５ｍＬ／Ｌ実際の最終懸濁液体積以上であり、かつ誘導後の平均比増殖速度（μ）が、０．１７以上（≧）であるとき、酸化型のメチオニル化ｈＩＦＮａ５関連タンパク質が排除された（表２～３）。
【０１１９】

【表２】

炭素供給液中の種々の微量元素濃度における生合成パラメータ

ショートバッチNo.	フラスコOD（600nm）	微量元素液（mL／L炭素供給）	グルコース上限（g／L）	発酵					総タンパク質（mg／gバイオマス）	総タンパク質に対するhIFNa5発現（%）
				誘導前の経過時間（h）	OD（600nm）		WCW（g／L）	DCW（%）		
					誘導時	発酵終了時				
M-83	5.1	2.2	17	11.25	94.6	136.2	169.1	30.12	115.00	18.95
M-84	4.9	2.2	22	11.25	91.8	139.2	161.4	31.89	98.33	18.95
M-85	5.6	2.7	17	11.75	95.8	149.3	158.5	30.98	101.33	17.95
M-86	5.4	2.7	22	11.50	91.6	147.0	170.7	30.26	113.33	17.35
M-80	5.3	3.0	22	11.75	103.6*	180.6*	175.4	32.11	120.33	18.53
M-81	5.2	3.0	22	11.00	96.8*	184.0*	185.9	33.47	122.20	18.47
M-92	4.8	3.2	22	11.50	103.6	172.5	188.3	30.31	112.00	20.00
M-82	5.5	3.4	22	11.50	99.5*	184.6*	178.8	32.08	116.00	18.13
M-87	4.5	3.7	17	11.75	99.6	179.0	183.4	30.82	114.33	18.75
M-88	5.0	3.7	22	11.75	96.0	158.5	175.3	30.49	116.33	18.40
M-89	4.8	4.2	17	13.00	92.4	173.5	182.4	31.09	126.70	21.45
M-90	4.5	4.2	22	11.75	98.8	178.0	194.1	30.67	151.00	20.95

*－先に行われたバッチでは、ODはBioPhotometer（Eppendorf、A＝595nm）で測定され、その他は、Spectrometer EZ 150（PerkinElmer、A＝600nm）で測定された；WCW：細胞湿重量（g／L細胞懸濁液）；DCW：細胞乾燥重量（%）。

【０１２０】

【表３】

種々の微量元素濃度における生合成およびリフォールディングパラメータ

ショートバッチNo.	μ		微量元素原液（mL／L炭素供給）	総微量元素（mL／L／o.u.）（最終）	総微量元素（mL／L懸濁液）（最終体積による）	hIFNa5 mg／mL6MGdHCl	RP−HPLC, リフォールディング後の%		
	誘導時	誘導後平均					OxidMet hIFNa5	正しく折り畳まれたhIFNa5	アセチル化hIFNa5
									ピーク−1	ピーク−2
M-83	0.470	0.121	2.2	0.00581	0.790	1.84	12.60	50.35	3.02	4.08
M-84	0.457	0.139	2.2	0.00559	0.778	1.74	14.44	46.67	3.08	**4.15**
M-85	0.350	0.148	2.7	0.00627	0.935	1.95	15.48	41.10	2.93	4.38
M-86	0.427	0.158	2.7	0.00639	0.939	1.85	5.61	52.65	3.33	4.63
M-80	0.563	0.185	3.0	0.00543	0.980	2.52	0	62.01	4.08	5.07
M-81	0.578	0.214	3.0	0.00498	0.950	2.53	0	60.63	4.2	**4.56**
M-92	0.497	0.170	3.2	0.00641	1.105	2.26	0	66.58	4.07	5.45
M-82	0.452	0.194	3.4	0.00591	1.130	2.34	0	59.98	4.53	5.0
M-87	0.433	0.181	3.7	0.00687	1.229	2.02	0	63.04	5.22	5.52
M-88	0.575	**0.163**	3.7	0.00745	1.166	1.78	**1.43****	63.15	2.61	3.47
F-0030811*	0.498	0.180	4.0	NT	NT	NT	0	48.36	7.75	7.11 ***
M-89	0.466	0.21	4.2	0.00787	1.365	1.82	0	54.06	7.25	5.99***
M-90	0.522	0.196	4.2	0.00788	1.403	1.68	0	55.57	7.66	5.94***

*１０Ｌ（使用体積）発酵；＊＊−誘導後のより遅い増殖速度（消泡センサーが故障していたので、８４ｍＬの消泡溶液が加えられたことによる希釈）。＊＊＊−主要ピークとアセチル化型の２つのピークの間に追加（未知）の形態の形成が認められる。ＮＴ：試験せず。

【０１２１】

本明細書に記載されるように、表２は、炭素供給液中の種々の微量元素濃度における生合成パラメータを示しているのに対し、表３は、種々の微量元素濃度における生合成およびリフォールディングパラメータを示している。

【０１２２】

以下のようないくつかの試験を行った：（ｉ）炭素供給液中または細胞懸濁液中の微量元素の濃度に対する、比増殖速度（μ）の依存性；（ｉｉ）誘導後の平均比増殖速度（μ）に対する、リフォールディング後の酸化型のメチオニル化ｈＩＦＮａ５（ＯｘｉｄＭｅ

ｔ　ｈＩＦＮａ５）、およびリフォールディング後の全アセチル化ｈＩＦＮａ５の依存性；（ｉｉｉ）炭素供給液中の微量元素の濃度に対する、ｈＩＦＮａ５タンパク質の翻訳後修飾（リフォールディング後のＯｘｉｄＭｅｔ　ｈＩＦＮａ５、リフォールディング後のアセチル化ｈＩＦＮａ５、およびリフォールディング後の正しく折り畳まれたｈＩＦＮａ５）の依存性；並びに（ｉｖ）炭素供給液中または細胞懸濁液中の微量元素の濃度に対する、ｈＩＦＮａ５関連型（リフォールディング後のアセチル化ｈＩＦＮａ５、およびリフォールディング後のＯｘｉｄＭｅｔ　ｈＩＦＮａ５）の依存性。さらに、全てのバッチをリフォールディング後にＲＰ－ＨＰＬＣに付した。それらの結果から、比増殖速度（μ）およびバイオマス収率が、培養培地中の微量元素の濃度に依存することは明らかである（表２～３）。

【０１２３】

要約すると、得られた結果は、下記を示す：

－最大量の酸化型のメチオニル化ｈＩＦＮａ５において、最小含有量のアセチル化ｈＩＦＮａ５が観察され、その逆もまた同じである（ショートバッチＮｏ．Ｍ－８３、Ｍ－８４、Ｍ－８５およびＭ－８６）；

－微量元素（原液）の濃度が、３．０～３．７ｍＬ／Ｌ炭素供給液の限度内（ショートバッチＮｏ．Ｍ－８０、Ｍ－８１、Ｍ－９２、Ｍ－８２およびＭ－８７）または０．９５～１．２３ｍＬ／Ｌ実際の最終懸濁液体積の限度内であるとき、アセチル化ｈＩＦＮａ５の量は、約８～１１％である（表３）；並びに

－炭素供給液中の微量元素の濃度が、４ｍＬ／Ｌを超えるかまたは１．２３ｍＬ／Ｌ実際の最終細胞懸濁液体積を超えるとき、さらなる未知（未同定）の型が検出された［それは、主要ピークおよびアセチル化型の２つのピークの後に観察される（データ示さず）］。

【０１２４】

得られた結果は、またグルコース濃度の上限（１７ｇ／Ｌまたは２２ｇ／Ｌ）が、実際に標的タンパク質（ｈＩＦＮａ５）の質およびバイオマス収率に影響しないことを示し、実際に得られた値は、誤差範囲内であった（表２）。

【０１２５】

結論

－本試験において得られた結果は、組換えｈＩＦＮａ５の生合成プロセスにおける炭素供給液中の微量元素濃度の根拠およびグルコース濃度の根拠としての役割を果たす。

－微量元素の濃度が、３．０ｍＬ／Ｌ炭素供給液以上であるか、または０．９５ｍＬ／Ｌ実際の最終懸濁液体積より高く、かつ誘導後の平均比増殖速度（μ）が、０．１７以上であるとき、酸化型のメチオニル化ｈＩＦＮａ５タンパク質は、排除される。

－微量元素の濃度が、約３．０～約３．７ｍＬ／Ｌ炭素供給液の限度内であるか、または約０．９５～約１．２３ｍＬ／Ｌ実際の最終懸濁液体積の限度内であるとき、アセチル化ｈＩＦＮａ５タンパク質は、約８～１１％である。

－炭素供給液中の微量元素の濃度が、３．７ｍＬ／Ｌより高いか、または１．２３ｍＬ／Ｌ実際の最終懸濁液体積より高いとき、未知（未同定）タンパク質型が合成される。

－最大収率を決定する微量元素の至適濃度および標的ｈＩＦＮａ５タンパク質の最高の質は、約３．０～約３．７ｍＬ／Ｌ炭素供給液の限度内である。

－１７ｇ／Ｌ～２２ｇ／Ｌの範囲内のグルコース濃度は、実際には、標的タンパク質（組換えｈＩＦＮａ５）の質およびバイオマス収率に影響しない。

【図１】

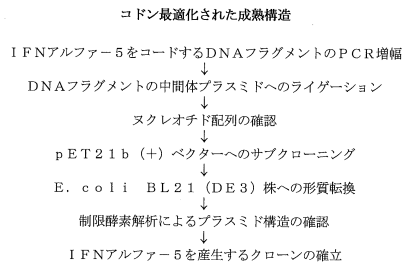


Fig 1

【図２】

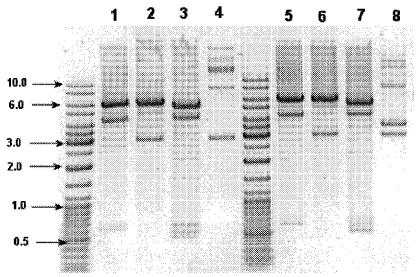


Fig. 2

【図３】

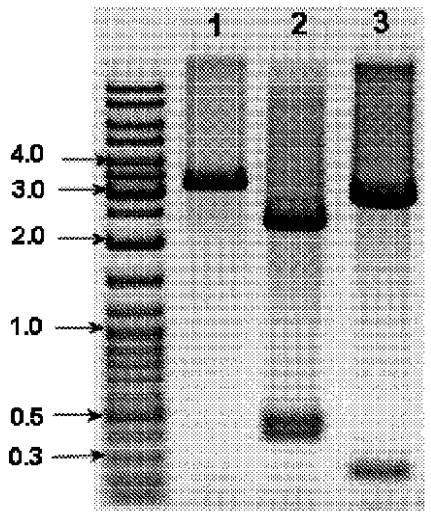


Fig. 3

【図４】

```
1    atg tgt gat ctg ccg cag acc cac tcc ctg tct aac cgt cgt act ctg atg atc atg gca
      M  C  D  L  P  Q  T  H  S  L  S  N  R  R  T  L  M  I  M  A
61   cag atg ggt cgt atc tct cct ttc tcc tgc ctg aag gac aga cat gac ttt gga ttt cct

      Q  M  G  R  I  S  P  F  S  C  L  K  D  R  H  D  F  G  F  P
121  cag gag gag ttt gat ggc aac cag ttc cag aag gct caa gcc atc tct gtc ctc cat gag

      Q  E  E  F  D  G  N  Q  F  Q  K  A  Q  A  I  S  V  L  H  E
181  atg atc cag cag acc ttc aat ctc ttc agc aca aag gac tca tct gct act tgg gat gag

      M  I  Q  Q  T  F  N  L  F  S  T  K  D  S  S  A  T  W  D  E
241  aca ctt cta gac aaa ttc tac act gaa ctt tac cag cag ctg aat gac ctg gaa gcc tgt

      T  L  L  D  K  F  Y  T  E  L  Y  Q  Q  L  N  D  L  E  A  C
301  atg atg cag gag gtt gga gtg gaa gac act cct ctg atg aat gtg gac tct atc ctg act

      M  M  Q  E  V  G  V  E  D  T  P  L  M  N  V  D  S  I  L  T
361  gtg aga aaa tac ttt caa aga atc act ctc tat ctg aca gag aag aaa tac agc cct tgt

      V  R  K  Y  F  Q  R  I  T  L  Y  L  T  E  K  K  Y  S  P  C
421  gca tgg gag gtt gtc aga gca gaa atc atg aga tcc ttc tct tta tca gca aac ttg caa

      A  W  E  V  V  R  A  E  I  M  R  S  F  S  L  S  A  N  L  Q
481  gaa cgt tta cgt cgt aag gaa taa 504
      E  R  L  R  R  K  E  -
```

Fig. 4

【図５】

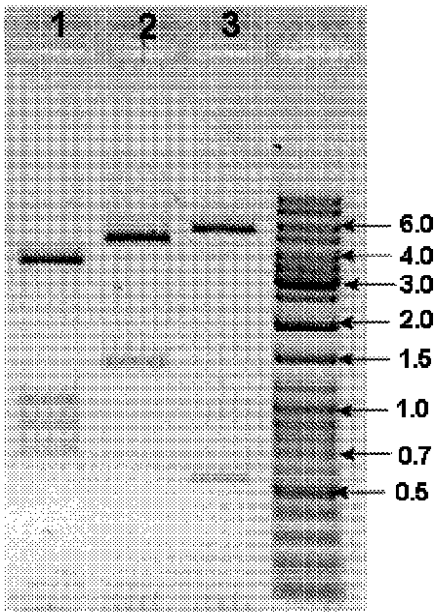


Fig. 5

【図６】

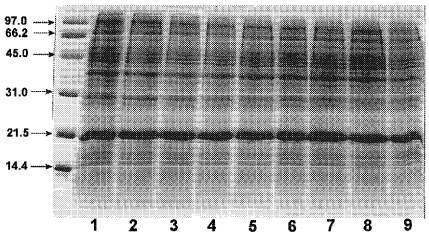


Fig. 6

【図７】

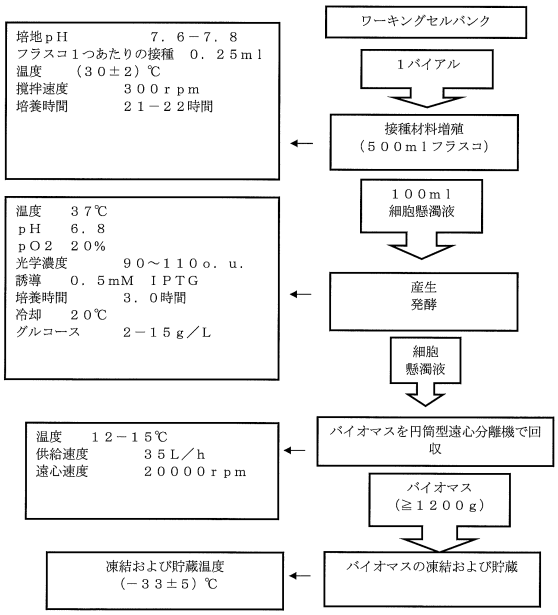


Fig.7

【図９】

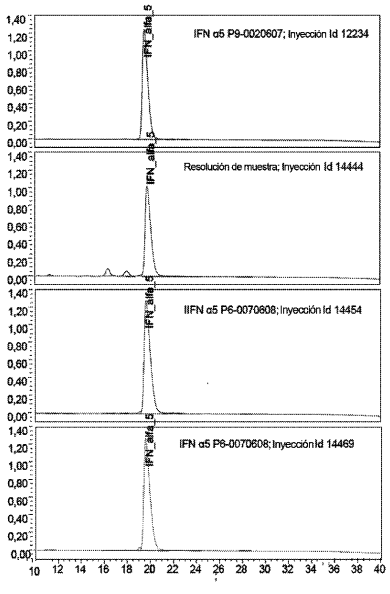


Fig.9

【図１０】

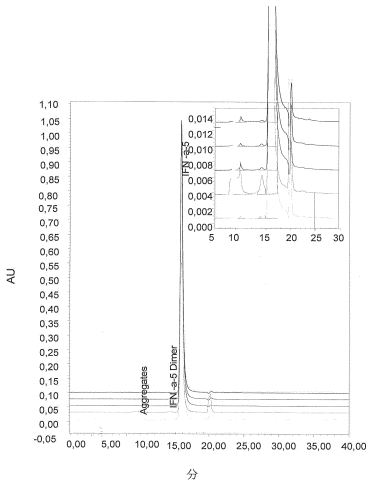


Fig. 10

【図１２】

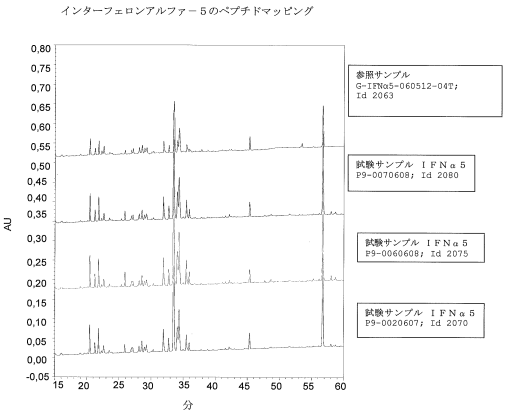
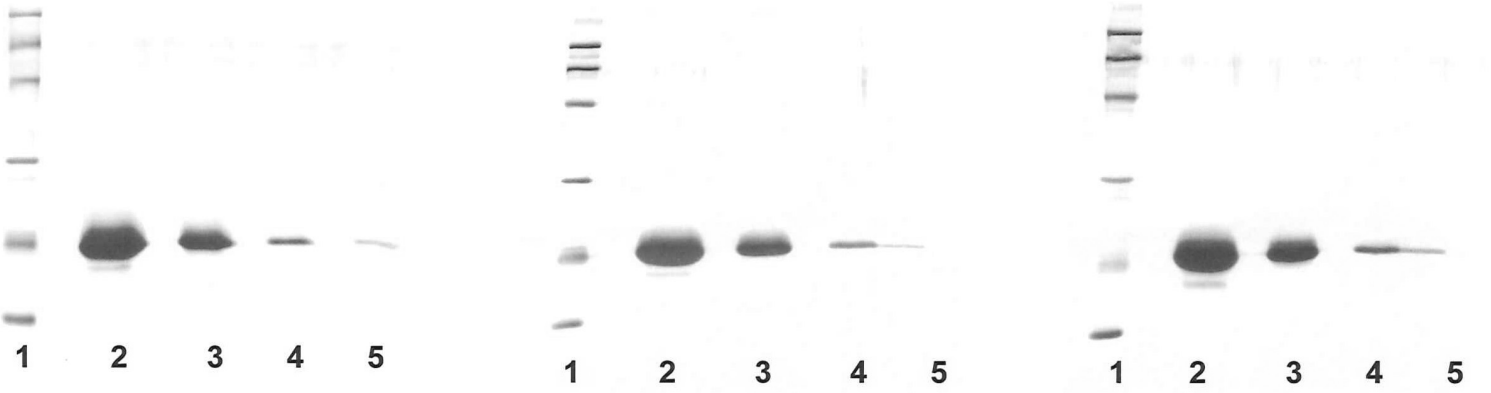


Fig. 12

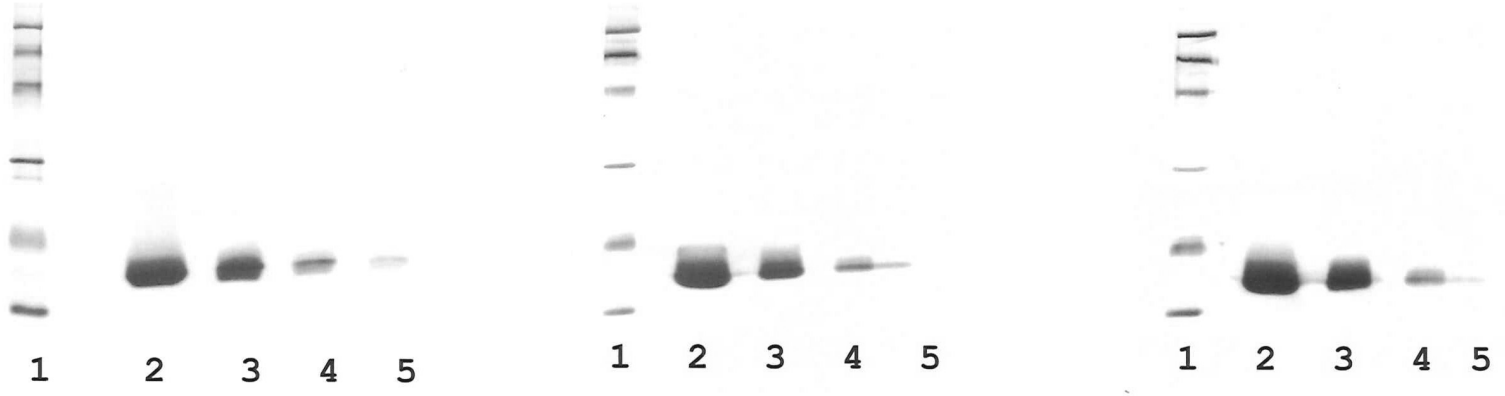
還元条件



バッチＰ９－００２０６０７	バッチＰ９－００６０６０８	バッチＰ９－００７０６０８
レーン： １．－ＬＭＷタンパク質スタンダード（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，上から下に向かって、９７．４００；６６．２００；４５．００；３１．００；２１．５００；１４．４００） 2. - 25 μg 3. - 5 μg 4. - 0.25 μg; 5. - 0.05 μg;	レーン： １．－ＬＭＷタンパク質スタンダード（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，上から下に向かって、９７．４００；６６．２００；４５．００；３１．００；２１．５００；１４．４００） 2. - 25 μg 3. - 5 μg 4. - 0.25 μg; 5. - 0.05 μg;	レーン： １．－ＬＭＷタンパク質スタンダード（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，上から下に向かって、９７．４００；６６．２００；４５．００；３１．００；２１．５００；１４．４００） 2. - 25 μg 3. - 5 μg 4. - 0.25 μg; 5. - 0.05 μg;

Fig.8A

非還元条件



バッチＰ９－００２０６０７ レーン： １．－ＬＭＷ　タンパク質スタンダード（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，上から下に向かって、97.400; 66.200; 45.00;31.00; 21.500; 14.400) 2. - 25 µg 3. - 5 µg 4. - 0.25 µg; 5. - 0.05 µg;	バッチＰ９－００６０６０８ レーン： １．－ＬＭＷタンパク質スタンダード（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，上から下に向かって、97.400; 66.200; 45.00;31.00; 21.500; 14.400) 2. - 25 µg 3. - 5 µg 4. - 0.25 µg; 5. - 0.05 µg;	バッチＰ９－００７０６０８ レーン： １．－ＬＭＷタンパク質スタンダード（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，上から下に向かって、97.400; 66.200; 45.00;31.00; 21.500; 14.400) 2. - 25 µg 3. - 5 µg 4. - 0.25 µg; 5. - 0.05 µg;

Fig.8B

JP 5830032 B2 2015.12.9

【図１１】

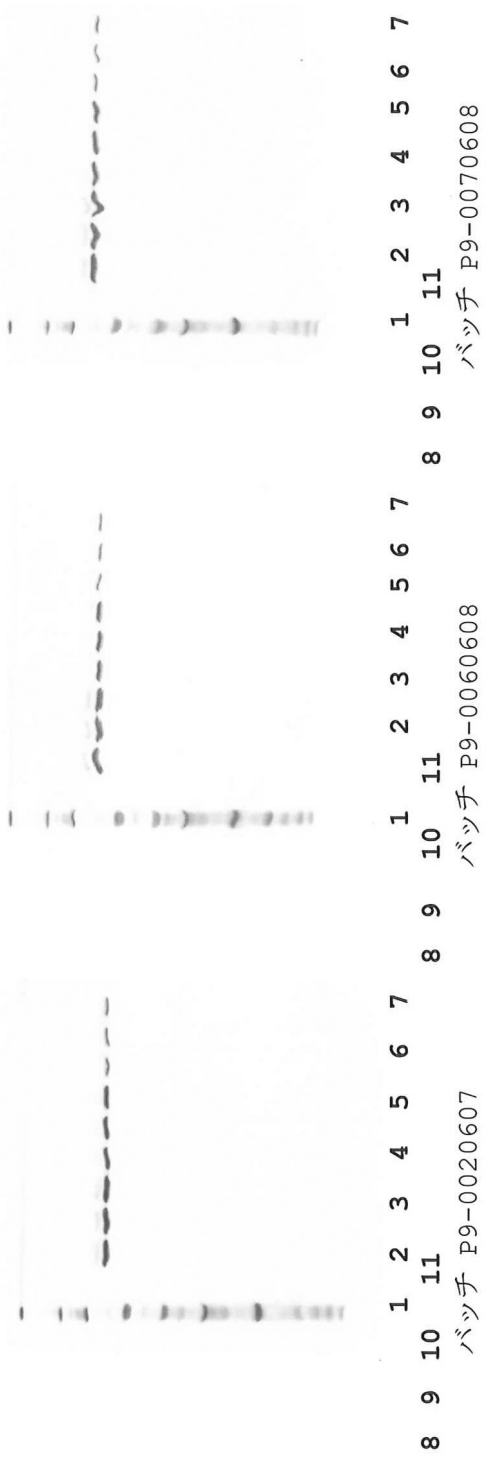


Fig. 11

【配列表】
0005830032000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 特表２０００－５０１９３６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００５／０８７９４０（WO，Ａ１）
米国特許第０４５６９９０８（ＵＳ，Ａ）
特表平１１－５０１８２０（ＪＰ，Ａ）
Journal of Biotechnology，１９９５年，Vol.39，pp.59-65
BIO/TECHNOLOGY，１９９３年，Vol.11，pp.1271-1277
J. Ind. Microbiol. Biotechnol.，２００４年，Vol.31，pp.63-69
Microbial Cell Factories，２００９年，Vol.8，#68

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｐ　２１／００
Ｃ１２Ｎ　１５／００　－　１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＰｕｂＭｅｄ