

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3711326号

(P3711326)

(45) 発行日 平成17年11月2日(2005.11.2)

(24) 登録日 平成17年8月19日(2005.8.19)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 P 21/02

C 1 2 P 21/02

C

C 0 7 K 16/22

C 1 2 P 21/02

H

C 0 7 K 16/40

C 0 7 K 16/22

C 1 2 N 1/20

C 0 7 K 16/40

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 1/20

A

請求項の数 30 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-578427 (P2000-578427)
 (86) (22) 出願日 平成11年10月21日(1999.10.21)
 (65) 公表番号 特表2002-528071 (P2002-528071A)
 (43) 公表日 平成14年9月3日(2002.9.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1999/024696
 (87) 国際公開番号 W02000/024873
 (87) 国際公開日 平成12年5月4日(2000.5.4)
 審査請求日 平成13年5月1日(2001.5.1)
 (31) 優先権主張番号 60/106,052
 (32) 優先日 平成10年10月28日(1998.10.28)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 596168317
 ジェネンテック・インコーポレーテッド
 GENENTECH, INC.
 アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
 0-4990・サウス・サン・フランシス
 コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義敦
 (72) 発明者 スバルツ、ジェイムズ・アール
 アメリカ合衆国カリフォルニア94025
 、メンロ・パーク、ホワイト・オークス・
 ドライブ1860番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細菌性細胞からの異種ポリペプチドの回収方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

異種ポリペプチドを細菌性細胞から回収する方法であって、

(a) ファージリゾチームをコードする第1の核酸及びDNA-消化タンパク質分泌のためのシグナル配列の制御下でDNA-消化活性を示すタンパク質をコードする第2の核酸であって、両核酸にとって同一である第1のプロモータに作用可能に結合し、かつ、両核酸とも同じ核酸構築物に結合する前記第1及び第2の核酸、さらに、異種ポリペプチド及び異種ポリペプチドの分泌シグナル配列をコードする第3の核酸であって、当該第3の核酸が第2のプロモータに結合する第3の核酸、を含む細胞を培養し、ここで、第2のプロモータは誘導性であり、第1のプロモータは第2のプロモータとは異なり、かつ(i)誘導性(i i) 弱い構成プロモータ又はプロモータとして機能するのにインデューサの添加を必要としない低基本発現を持つプロモータのいずれかであり、

(b) 第2の誘導性プロモータからの異種ポリペプチドをコードする核酸の発現の誘導に特異的なインデューサを添加し、

(c) DNA-消化タンパク質及びファージリゾチームをコードする核酸の発現を指示する第1のプロモータが誘導性プロモータである場合、回収される異種ポリペプチドの最大蓄積の50%以上が蓄積された後に第1のプロモータに特異的なインデューサを添加し、

(d) 細胞を溶解し、この溶解によってブロス溶解物が生じ、そして

(e) ブロス溶解物から蓄積された異種ポリペプチドを回収することを含んでなる方法。

【請求項2】

10

20

異種ポリペプチドが哺乳類ポリペプチドである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

異種ポリペプチドが抗-CD18 抗体又は抗-CD18 抗体断片である請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

回収工程が、EBA 又は沈降を用いて実施される請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

DNA-消化タンパク質が、真核細胞 DNA 分解酵素又は細菌性 endA である請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 6】

細菌性細胞が、グラム陰性細胞である請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

ファージリゾチームが T4-リゾチームである請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

回収工程が、細菌性細胞の外細胞壁を破壊する薬剤の存在下で実施される請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

薬剤がキレート化剤又は双性イオンである請求項 8 に記載の方法。

20

【請求項 10】

回収の前に、細胞溶解物を細胞内に含まれる異種ポリペプチドを放出するのに十分な時間インキュベートする請求項 1 ないし 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

そのプロモータを含む 1 以上の核酸が細菌性細胞のゲノムに組み込まれる請求項 1 ないし 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

培養が、異種ポリペプチド及び DNA-消化タンパク質が細菌の周辺質に分泌される条件下で実施される請求項 1 ないし 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

30

異種ポリペプチドを細菌性細胞から回収する方法であって、

(a) 第 1 の誘導性プロモータに結合した異種ポリペプチドをコードする第 1 の核酸、ファージリゾチームをコードする第 2 の核酸、及び DNA-消化タンパク質分泌のためのシグナル配列の制御下で DNA-消化活性を示すタンパク質をコードする第 3 の核酸、及び遺伝子 t を含む細胞を培養し、ここで：

(i) 前記第 2 及び第 3 の核酸及び遺伝子 t が第 2 の誘導性プロモータに作用可能に結合し、それは 3 つ全てにとって同じであり、3 つ全てが同じ核酸構築物に結合する；

(i i) 前記第 2 及び第 3 の核酸が第 2 の誘導性プロモータに作用可能に結合し、それは両方にとって同じであり、両方が同じ核酸構築物に結合し、遺伝子 t が第 3 の誘導性プロモータに結合する；あるいは

40

(i i i) 前記第 2 及び第 3 の核酸が弱い構成プロモータ又はプロモータとして機能するのにインデューサの添加を必要としない低基本発現を持つプロモータに作用可能に結合し、前記遺伝子 t が第 2 の誘導性プロモータに作用可能に結合する；
のいずれかであり、第 1、第 2、及び第 3 の誘導性プロモータは互いに相違し、異なるインデューサに対して反応し；そして

(b) 培養が上記 (a) (i) による場合、第 1 の誘導性プロモータからの異種ポリペプチドをコードする核酸の発現の誘導に特異的なインデューサを添加し、次いで、回収される異種ポリペプチドの最大蓄積の 50 % 以上が蓄積された後に第 2 の誘導性プロモータに特異的なインデューサを添加するか；又は

(c) 培養が上記 (a) (i i) による場合、第 1 の誘導性プロモータからの異種ポリペ

50

プチドをコードする核酸の発現の誘導に特異的なインデューサを添加し、次いで、回収される異種ポリペプチドの最大蓄積の50%以上が蓄積された後に第2の誘導性プロモータに特異的なインデューサを添加し、次いで、第3の誘導性プロモータに特異的なインデューサを添加するか；又は

(d) 培養が上記(a)(iii)による場合、第1の誘導性プロモータからの異種ポリペプチドをコードする核酸の発現の誘導に特異的なインデューサを添加し、次いで、回収される異種ポリペプチドの最大蓄積の50%以上が蓄積された後に第2の誘導性プロモータに特異的なインデューサを添加し、この場合、細胞は溶解され、この溶解によってブロス溶解物が生じ；そして

(e) そのように生成されたブロス溶解物から蓄積された異種ポリペプチドを回収することを含んでなる方法。 10

【請求項14】

異種ポリペプチドが哺乳類ポリペプチドである請求項13に記載の方法。

【請求項15】

異種ポリペプチドがヒトポリペプチドである請求項13に記載の方法。

【請求項16】

ヒトポリペプチドがインシュリン様成長因子-I (IGF-I)、DNA分解酵素、血管内皮成長因子(VEGF)、又は抗-CD18抗体又はその断片である請求項15に記載の方法。

【請求項17】

ヒトポリペプチドがIGF-I又は抗-CD18抗体断片である請求項15又は16に記載の方法。 20

【請求項18】

シグナル配列が、異種ポリペプチドを細菌細胞の周辺質に分泌するために用いられる請求項13ないし17のいずれかに記載の方法。

【請求項19】

シグナル配列が、DNA-消化タンパク質の天然配列である請求項13ないし18のいずれかに記載の方法。

【請求項20】

DNA-消化タンパク質が、真核生物のDNA分解酵素又は細菌性endAである請求項13ないし19のいずれかに記載の方法。 30

【請求項21】

ファージリゾチームが、T4-リゾチームである請求項13ないし20のいずれかに記載の方法。

【請求項22】

異種ポリペプチドが周辺質空間に可溶であり、回収工程がEBA又は沈降を用いて実施される請求項18に記載の方法。

【請求項23】

異種ポリペプチドが抗-CD18抗体又はその断片である請求項18ないし22のいずれかに記載の方法。 40

【請求項24】

回収の前に、ブロス溶解物を細胞内に含まれる異種ポリペプチドを放出するのに十分な時間インキュベートする請求項13ないし23のいずれかに記載の方法。

【請求項25】

回収が、異種ポリペプチドが可溶性か不溶性かに応じて、不溶性異種ポリペプチドを含む屈折粒子の沈降又は可溶性異種ポリペプチドを含む上清の収集を含む請求項13ないし24のいずれかに記載の方法。

【請求項26】

細菌性細胞が、グラム陰性細胞である請求項13ないし25のいずれかに記載の方法。

【請求項27】

細菌性細胞が、大腸菌である請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

回収工程が、細菌性細胞の外細胞壁を破壊する薬剤の存在下で実施される請求項 1 3 ないし 2 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 9】

薬剤がキレート化剤又は双性イオンである請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

そのプロモータを含む 1 以上の核酸又は遺伝子 t が細菌性細胞のゲノムに組み込まれる請求項 1 3 ないし 2 9 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【0 0 0 1】

(発明の背景)

(発明の分野)

この発明は、細菌細胞から異種ポリペプチドを製造し回収する方法に関する。より詳細には、この発明は可溶性又は凝集した組換え異種ポリペプチドの細菌性細胞質及び周辺質からの回収を促進又は増大させる方法に関する。

【0 0 0 2】

(関連する開示の説明)

大腸菌は、実験室及び工場における異種ポリペプチドの製造のために広く使用されている。大腸菌は一般的にコリシン及びヘモリシン以外のタンパク質を細胞外媒質に排出しない

20

(Pugsley及びSchwartz, Microbiology, 32: 3-38 (1985))。大腸菌に分泌された異種タンパク質は、可溶性生成物又は不溶性凝集物として蓄積される。添付の F i g 1 参照。それらは細胞質中に細胞内で見られるか、又はシグナル配列が先行する場合は周辺質に分泌される。生成物の回収を最初に進める方法は、生成物がどのように何処に蓄積されるかに大きく依存する。一般的に、タンパク質を単離するために、細胞は周辺質抽出のための処理を受けるか、又は分解されて捕捉されて他に接近できない生成物を放出させる。

グラム陰性細菌からの異種ポリペプチドの従来の単離は、これらの細胞を取り囲む強く硬い細胞壁による問題を有している。細菌細胞壁は細胞の形状を保持し、細胞溶解を起こしうる浸透圧から細胞質を保護し；これらの機能は、壁に特徴的な硬さを付与する高度に架橋したペプチドグリカン（ムレインとしても知られる）骨格によってもたらされる。最近のモデルは、細胞質と外膜との間の空間が、外側の高度に架橋したペプチドグリカングルまで延びる内側周辺質多糖類ゲルで満たされた連続相として記載している（Hobot等, J . Bact., 160: 143 (1984))。このペプチドグリカン球形嚢は、細菌により媒質中に排出されない全ての異種ポリペプチドの回収の障壁を構成している。

30

【0 0 0 3】

大腸菌周辺質から組換えタンパク質を放出させるために、クロロホルム（Ames等, J. Bacteriol., 160: 1181-1183 (1984))、グアニジン-H C l、及びトリトン-X（Naglak及びWang, Enzyme Microb. Technol., 12: 603-611 (1990))等の化学品を含む処理が用いられている。しかしながら、これらの化学品は活性でなく、多くの組換えタンパク質生産物及び続く精製手法に悪影響を有する場合がある。大腸菌細胞のグリシン処理は、外膜の浸透化を生ずるが、周辺質内容物を放出させることも報告されている（Ariga等, J. Ferm. Bioeng., 68: 243-246 (1989))。これらの小規模な周辺質放出方法は特定の系のために設計されている。それらは容易かつ有効に変えられず、一般的には大規模な方法に適していない。

40

【0 0 0 4】

組換えタンパク質の周辺質放出で最も広く使用されている方法は、浸透圧衝撃（Nosal及びHeppel, J. Biol. Chem., 241: 3055-3062 (1966); Neu及びHeppel, J. Biol. Chem., 240: 3685-3692 (1965))、ニワトリ卵白（H E W）-リゾチーム／エチレンジアミン四酢酸（E D T A）処理（New及びHeppel, J. Biol. Chem., 239: 3893-3900 (1964); Witholt等, Biochim. Biophys. Acta, 443, 534-544 (1976); Pierce等, ICheme Research Exen

50

t, 2: 995-997 (1995))、及びH E W-リゾチーム／浸透圧衝撃の組み合わせ法 (French等, Enxyme and Microb. Tech., 19: 332-338 (1996))である。典型的には、これらの方法は、最初に浸透圧的に安定化した媒体中での破壊、次いで非安定化媒体中での選択的放出を含む。これらの媒体の組成 (p H、保護剤) 及び使用される破壊方法 (クロロホルム無、H E W-リゾチーム、E D T A、超音波) は、報告された特定の方法間で変化する。E D T Aに換えて極性イオン性洗浄剤を使用したH E W-リゾチーム／E D T A処理の変法が、Stabel等, Veterinary Microbiol., 38: 307-314 (1994)で議論されている。大腸菌を破壊する細胞内酵素系の使用の概説は、Dabora及びCooney の Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol.43, A. Fiechter編 (Spring-Verlag: Berlin, 1990), pp.11-30を参照のこと。

10

【0005】

細胞質から、可溶性タンパク質又は屈折粒子として組換えタンパク質を回収するための従来の方法は、細菌細胞の機械的破壊による崩壊を含んでいた。機械的破壊は典型的には液状懸濁物における局所的空洞化の発生、硬質ビーズでの迅速な攪拌、超音波処理、又は細胞懸濁物の粉碎を含む (Bacterial Cell Surface Techniques, Hancock及びPoxton (John Wiley and Sons Ltd, 1988), Chapter 3, p.55)。これらのプロセスは、かなりの大資本を必要とし、長い処理時間を構成する。

H E W-リゾチームは生化学的に作用して、細胞壁のペプチドグリカン骨格を加水分解する。この方法は、最初にZinder及びArndt, Proc. Natl. acad. Sci. USA, 42: 586-590 (1956)によって開発され、彼らは大腸菌を卵アルブミン (H E W-リゾチームを含む) で処理して、後にスフェロプラストとして知られる丸い細胞性小球を生成した。これらの構造は、幾つかの細胞壁成分を保持しているが、細胞質膜が露出される大きな表面積を有する。

20

【0006】

米国特許第5,169,772号は、細菌からのヘパリナーゼの精製方法を開示し、それは、細菌の包膜を浸透圧的に安定化した媒体、例えば20%スクロース溶液中で、例えばE D T A、リゾチーム、又は有機化合物を用いて破壊し、細菌を低イオン強度バッファーに暴露することにより破壊された細胞の細胞膜周辺腔から非ヘパリナーゼ様タンパク質を放出させ、低イオン強度バッファーで洗浄した細菌を緩衝素お水に暴露することによりヘパリナーゼ様タンパク質を放出させることを含む。

30

周辺質タンパク質の単離のためにH E W-リゾチーム添加を使用することには幾つかの欠点がある。細胞は、E D T A、洗浄剤、又は高p Hで処理しなければならず、それらは全て細胞を弱める。またこの方法は、リゾチーム添加は不十分であり、大きな細胞ペレットを通して酵素を分散させるのに困難性があるため、大量の細胞の溶解には適していない。

【0007】

広範な発現系に対してこれらの方法の多数の異なる修正法が用いられたが、成功の度合いは異なっている (Joseph-Liazun等, Gene, 86: 291-295 (1990); Carter等, Bio/Technology, 10: 163-167 (1992))。これらの方法は実験室スケールで行われたが、有効な大規模回収方法には含まれる工程数が多すぎる。

リゾチームを生成するための組換え細胞培養を誘導する努力が報告されている。EP 155,189は、通常はそのような宿主細胞を細胞壁構造を破壊又は溶解することにより殺傷すると予想されるリゾチームを生成するための組換え細胞培養を誘導する手段を開示している。ロシア国特許番号2043415、2071503及び2071501は、組換えタンパク質を製造し、リゾチーム遺伝子を含む水溶性タンパク質凝集物を精製するためのプラスミド及び対応する株を開示している。特に、リゾチーム遺伝子と組み換えタンパク質をコードする遺伝子からなるオペロンの使用により、組換えタンパク質と大腸菌の多糖類膜を破壊するリゾチームの同時合成を可能になる。

40

【0008】

米国特許第4,595,658号は、大腸菌の細胞膜周辺腔に輸送されたタンパク質の外部化 (externalization) を促進する方法を開示している。この方法は、周辺質に局在化するタンパク

50

質を、細胞のリゾチーム処理、機械的粉碎、又は浸透圧衝撃処理をすることなく、選択的に単離することを可能にする。米国特許第4,637,980号は、温度感受性溶原を、産生物を直接又は間接的にコードするDNA分子で形質転換することによる細菌性産生物の製造、遺伝子産物を細胞内発現させる条件下での形質転換体の培養、及び温度を上げてファージコード化機能を誘導することによる産生物の外部化を開示している。1986年11月15日に発行されたJP 61-257931は、HEW-リゾチームを用いるIL-2の回収方法を開示している。Asami等, J. Ferment. and Bioeng., 83: 511-516 (1997)は、T4ファージ感染による大腸菌の同調分裂を開示し、Tanji等, J. Ferment. and Bioeng., 85: 74-78 (1998)は、大腸菌細胞の穏やかな分裂のためのT4ファージでコードされる溶解遺伝子の制御された発現を開示している。

10

大規模用途の適した組換え周辺質タンパク質の回収のための酵素的放出法の開発は、French等, Enzyme and Microbial Technology, 19: 332-338 (1996)に報告されている。この方法は、分画バッファー中での細胞の再懸濁、次いで周辺質分画の回収を含み、リゾチーム処理の直後に浸透圧衝撃が続く。組換えタンパク質、S. サーマボイオラセウス(S. thermophilus) α -アミラーゼの過剰発現、及び宿主生物の成長相の回収に対する影響も議論されている。

【0009】

IGF-Iポリペプチド回収のための10-キロリットル-スケールの方法(Hart等, Bio/Technology, 12: 1113 (1994))において、著者は、機械的な破壊工程に続く固体回収のための遠心分離工程を含む典型的な単離手法を試みた。その結果は、ゴーリン(gaulin)ホモジナイザーを3回通した後、全生成物の約40%が上清中に失われるという失望すべきものであった。Hert等, Bio/Technology 12: 1113 (1994)。このFig. 2を参照。生成物回収は、EDTA及びHEW-リゾチーム添加の古典的技術を採用した場合でも有意に改善されなかった。

20

【0010】

HEW-リゾチームは、大規模プロセスのために実用できる唯一の市販リゾチームだが、リゾチームは宿主細胞の感染時にバクテリオファージによって発現される。バクテリオファージ、例えばT4ファージの天然宿主である大腸菌の溶解は、2つの遺伝子産物：e及びtの作用を必要とする。遺伝子eはリゾチーム(T4ファージに対してT4-リゾチームと呼ばれる)をコードし、ムラニダーゼ(muranidase)として同定されており(Tsugita及びInouye, J. Biol. Chem., 243: 391 (1968))、遺伝子tは溶解に必要であると思われるがリゾチーム活性を有することはわかっていない。遺伝子tは、溶解中に起こる細胞代謝の休止に必要とされ(Mukai等, Vir., 33: 398 (1967))、細胞質膜を破壊又は変化させて、遺伝子産物eを周辺質に到達させて細胞壁に接近させる(Josslin, Vir., 40: 719 (1970))。ファージは遺伝子t-変異によって形成されるが、大腸菌宿主の溶解はクロロホルム添加無しでは起こらない(Josslin, 上掲)。野生型T4-リゾチーム仮性は、37℃でのT4感染の約8分後に最初に検出され、溶解阻害を誘導しても、残りの感染を通して増加する。二次吸着が無い場合、遺伝子e変異体で感染された細胞は子孫生産及び正常時間での代謝を中断する(Molecular Genetics of Bacteriophage T4, J.D. Karam等編(American Society for Microbiology, Washington DC, ASM press, 1994) p.398)。

T4-リゾチームを用いた不溶性IGF-Iの回収は、1997年10月28日に、Engineering Foundation 提供のスイス国ダボスで開催された「Separations for Clean Production」という表題の「Separation Technology VII meeting」において開示された。

30

40

【0011】

細胞溶解の際に、ゲノムDNAが細胞質から媒体中に漏れ、その結果流体粘度がかなり上昇して遠心分離場での固体の沈降を遅延させうる。機械的破壊中にDNAポリマーを分解するために印加するような剪断力が無い場合、粘性流体を通す固体の沈降速度が遅延し、遠心分離中での固体と液体の分離を悪化させる。機械的剪断力以外に、DNAポリマーを分解するヌクレオチド分解性(nucleolytic)酵素も存在する。

大腸菌において、内因性遺伝子endAはエンドヌクレアーゼ(成熟タンパク質の分子量

50

は約24.5 kD)をコードし、それは通常周辺質に分泌され、ヌクレオチド鎖切断的にDNAをオリゴデオキシリボヌクレオチドに切断する。end Aは大腸菌によって比較的弱く発現されることが示唆された(Wackernagel等, Gene, 154: 55-59 (1995))。道具のコストを抑制しプロセス時間を最短にするために、細胞からの異種ポリペプチドの総回収率を増加させる必要性が引き続き存在している。大規模においては、細胞質及び周辺腔から可溶性の又は凝集した組換えポリペプチドを放出させ、続く工程における有効な生成物回収のために溶解物を調整するための機械的細胞破壊を回避する大きな誘因がある。

【0012】

(発明の概要)

従って、この発明は、細菌性細胞から可溶性及び不溶性の異種生成物の両方を回収するための生化学破壊を用いる方法を提供する。

本発明の一態様は、細菌性細胞から異種ポリペプチドを回収する方法を提供し、当該方法は：

(a) 細胞を培養し、当該細胞がファージリゾチームをコードする核酸及びDNA-消化タンパク質分泌のためのシグナル配列の制御下でDNA-消化活性を示すタンパク質をコードする核酸を含み、前記核酸が第1のプロモータ、及び異種ポリペプチド及び異種ポリペプチドシグナル配列の分泌のためのシグナル配列をコードする核酸に結合し、当該異種ポリペプチドをコードする核酸が第2のプロモータに結合し、第2のプロモータが誘導性であり第1のプロモータが低基本発現を持つプロモータ又は誘導性プロモータのいずれかであり、培養が、インデューサを添加したときファージリゾチーム及びDNA-消化タンパク質をコードする核酸の発現が異種ポリペプチドの約50%以上が蓄積された後に誘導される条件、ファージリゾチームが細胞質区画に蓄積される条件、DNA-消化タンパク質が周辺質中に分泌される条件、及び細胞が溶解されてブロス溶解物を生成する条件下であり、そして、

(b) ブロス溶解物から蓄積された異種ポリペプチドを回収することを含む。

【0013】

また他の態様では、本発明は、異種ポリペプチドをそれが産生される細菌性細胞から回収する方法を提供し、当該方法は：

(a) 細胞を培養し、当該細胞がファージリゾチームをコードする核酸、遺伝子t、及びDNA-消化活性を示すタンパク質をコードする核酸を含み、これらの核酸が第1のプロモータ、及び異種ポリペプチドをコードする核酸に結合し、当該核酸が第2のプロモータに結合し、第2のプロモータが誘導性であり第1のプロモータが低基本発現を持つプロモータ又は誘導性プロモータのいずれかであり、培養が、インデューサを添加したときファージリゾチーム、遺伝子t、及びDNA-消化タンパク質をコードする核酸の発現が異種ポリペプチドの約50%以上が蓄積された後に誘導される条件下、及びファージリゾチームが細胞質区画に蓄積される条件、DNA-消化タンパク質が周辺質中に分泌される条件、及び細胞が溶解されてブロス溶解物を生成する条件下であり、そして、

(b) ブロス溶解物から蓄積された異種ポリペプチドを回収することを含む。

【0014】

第3の態様において、本発明は、異種ポリペプチドをそれが産生される細菌性細胞から回収する方法を提供し、当該方法は：

(a) 細胞を培養し、当該細胞がファージリゾチームをコードする核酸、遺伝子t、及びDNA-消化活性を示すタンパク質をコードする核酸を含み、当該ファージリゾチーム及びDNA-消化タンパク質をコードする核酸が誘導性又は低基本発現を持つ第1のプロモータに結合し、遺伝子tが第2の誘導性プロモータに結合し、異種ポリペプチドをコードする核酸が第3の誘導性プロモータに結合し、インデューサを添加し3つ全てのプロモータが誘導性であるときファージリゾチーム、遺伝子t、及びDNA-消化タンパク質をコードする核酸の発現が異種ポリペプチドの約50%以上が蓄積された後に誘導され、第3のプロモータが第1のプロモータの前に誘導され、第3のプロモータが第1のプロモータ

10

20

30

40

50

より前に誘導され、及びファージリゾチーム及びDNA-消化タンパク質が低基本発現を持つプロモータに結合した場合、遺伝子tの発現が異種ポリペプチドの約50%以上が蓄積された後に誘導される条件下、及びファージリゾチームが細胞質区画に蓄積され、DNA-消化タンパク質が周辺質に分泌され、及び細胞が溶解されてブロス溶解物を生成する条件下であり、そして、

(b) ブロス溶解物から蓄積された異種ポリペプチドを回収することを含む。

【0015】

生化学的溶解又は生化学的に補助されたメカニズムの溶解は、細菌性細胞からの異種タンパク質の回収にとって機械的破壊より優れている。遺伝子t及びDNA消化タンパク質を持つファージリゾチームをコードする核酸、及び目的とする異種ポリペプチドをコードする核酸の協調発現は、ペプチドグリカン層と絡み合った不溶性又は可溶性ポリペプチドの放出並びに細胞質に捕捉された産生物の放出のための有効性の高い方法を提供する。ファージリゾチーム遺伝子が密接にコントロールされたプロモータ、例えばpBADプロモータ(arapロモータとも呼ばれる)の後ろにクローン化された場合、ファージリゾチームの細胞質蓄積は、発酵の終了間際の適当な時間においてインデューサ(アラビノース等)の添加によって誘導される。異種ポリペプチドの核酸発現及び溶解酵素を別々のプロモータのコントロール下に置くことにより、発酵中のそれらの産生を別個に調節することができる。シグナル配列無しで、蓄積されたファージリゾチームは細胞質区画に留置され、遺伝子tはファージリゾチームを放出してペプチドグリカン層を破壊するように機能する。さらに、好ましい実施態様であるT4-ファージ-リゾチーム活性の最適pHは約7.3であり、最も典型的な収集ブロスの中性pHに近い。

【0016】

異種ポリペプチドをコードする核酸の発現後のバクテリオファージリゾチーム、DNA-消化タンパク質、及び遺伝子tをコードする遺伝子の誘導は、細菌の細胞質又は周辺質から回収される不溶性又は可溶性異種ポリペプチドの有意な量をもたらす。生産収率以外に、回収プロセスの成功は、作業の容易さ、プロセスの流れ、回転時間、並びに作業コストによって評価される。本発明は、大規模回収プロセスで直面するこれらのボトルネックの全てではなくとも幾つかを軽減する。

また、この方法は、生化学的細胞溶解の高細胞密度での使用及び規模の拡大を可能にする。高密度では、T4-リゾチーム、遺伝子t、及びendAの有効発現は、未成熟細胞溶解及び異種ポリペプチド産生の減少といった悲惨な結果を招く場合があった。さらに、長い発酵プロセスの終了時及び実質的な産生物蓄積の後の誘導が、有効であるのに十分な溶解酵素を産生することは予想できなかった。本プロセスは、粘度の増大及び発酵プロセス中の過剰な発泡といった高密度における問題を持たない。これらのプロセスは、高い細胞密度、系の有効な誘導及び作用、及び高密度培養から誘導されたブロス溶解物の加工を達成することができると予想される。

【0017】

(好ましい実施態様の詳細な説明)

A. 定義

ここで用いられる場合の「ファージリゾチーム」は、ファージ感染細菌性細胞の溶解を促進し、それにより複製されたファージ粒子を放出させる細胞質酵素を意味する。リゾチームは、T7、T4、ラムダ、及びミューバクテリオファージを含む如何なるバクテリオファージ供給源からのものでもよい。ここで好ましいリゾチームはT4-リゾチームである。

ここで用いられる場合の「T4-リゾチーム」又は「Eタンパク質」は、T4-ファージ感染細菌性細胞の溶解を促進し、それにより複製されたファージ粒子を放出させる細胞質ムラミダーゼを意味する(Tsugita及びInouye, J. Mol. Biol., 37: 201-12 (1968); Tsugita及びInouye, J. Biol. Chem., 243: 391-97 (1968))。それはT4バクテリオファージの遺伝子eにコードされ、大腸菌細胞外膜の硬質ペプチドグリカン層のあるN-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミン酸残基との間の結合を加水分解する。この酵素は1

10

20

30

40

50

8. 3 k d の分子量の一本鎖ポリペプチドである。細菌性ペプチドグリカンに対して H E W-リゾチームより約 2 5 倍活性が高い (Matthews 等, J. Mol. Biol., 147: 545-558 (1981))。T 4-リゾチーム活性の最適 p H は 7. 3 であるのに対し H E W-リゾチームは 9 である (The Worthington Manual; pp 219-221)。

【0018】

ここで用いられる場合の「遺伝子 t」又は「t 遺伝子」又は「ホリン」は、溶解には必要だがリゾチーム活性は表さないバクテリオファージ T 4 の溶解遺伝子を意味する。また、Molecular Genetics of Bacteriophage T4, 上掲, p.389-399 も参照。

「DNA-消化活性を示すタンパク質」又は「DNA-消化タンパク質」は、DNA を消化するタンパク質、例えば、哺乳動物又は細菌性 DNA 分解酵素などを意味する。好ましくは、DNA-消化タンパク質はヒト DNA 分解酵素又は細菌性 DNA 分解酵素である。

10

【0019】

ここで用いられる場合の語句「溶解酵素」は、少なくともファージリゾチーム及び DNA-消化タンパク質を集散的に意味し、またファージ遺伝子 t 遺伝子産物又はファージリゾチーム及び DNA-消化タンパク質と組み合わせた等価物を指すのにも使用される。

ここで用いられる場合の語句、細菌の「外側細胞壁を破壊する薬剤」は、キレート剤、例えば EDTA 及び双性イオンといった細菌の外側細胞膜の透過性を増大させる分子を意味する。

ここで用いられる用語「細菌」は、細胞周辺腔に輸送されるタンパク質を産生する任意の細菌を意味する、一般的に、細菌は、グラム陽性又はグラム陰性であり、ファージリゾチーム及びヌクレアーゼをそれらが発酵の終了近くでのみ、又は、好ましい実施態様では、発酵中に低レベルで発現されるような制御下での発現を有する。ヌクレアーゼは一般に周辺質又は媒体中の分泌された場合に比較的安定である。用語「非温度感受性細菌」は、温度変化に有意に感受性でない任意の細菌を意味する。ここで好ましい実施態様は、温度感受性でない細菌である。ここで最も好ましい細菌はグラム陰性細菌である。

20

【0020】

ここで用いられる「細胞質又は周辺質に含まれるポリペプチドを放出するのに十分な時間」とは、細胞質又は周辺質凝集物又は可溶性異種ポリペプチドを放出するのに十分な程度までリゾチームがペプチドグリカンを消化するのに十分な時間量を意味する。

ここで用いられる「シグナル配列」又は「シグナルポリペプチド」は、異種ポリペプチド又は DNA-消化活性を示すタンパク質を細菌の周辺質に分泌するのに用いられるペプチドを意味する。異種ポリペプチド又は DNA-消化タンパク質のためのシグナルは、細菌に対して同種でも又は異種であってもよく、細菌で産生される異種ポリペプチド又は DNA-消化タンパク質に天然のシグナルを含む。

30

【0021】

この発明のプロモータは「誘導」プロモータ、即ち、転写因子に結合したときに向上した又は低下した速度で転写を指示するプロモータであってよい。

ここで用いられる「低基本発現」を持つプロモータ又は「低基本発現プロモータ」は、わずかに弱いプロモータであり、即ち、細胞成長に影響を与えないのに十分に低い基本発現レベルを提供し、未成熟細胞溶解を起こさないのに十分に低いレベルのプロモーションを提供する。

40

【0022】

ここで用いられる「転写因子」は、プロモータの調節又は制御領域に結合でき、それにより転写に影響を与える任意の因子を含む。宿主細胞内の転写因子の合成又はプロモータ結合活性は、宿主を「インデューサ」に暴露する又は宿主細胞培地から「リプレッサー」を除去することにより制御できる。従って、誘導プロモータの発現を調節するために、インデューサが添加されるか、又は宿主細胞の成長培地からリプレッサーが除去される。

ここで用いられる語句「誘導発現」は、特定遺伝子からの転写量を、その遺伝子を含む細胞をエフェクター又はインデューサに暴露することにより増加させることを意味する。

「インデューサ」は、細胞集団に与えられたとき、特定遺伝子からの転写量を増大させる

50

化学的又は物理的薬剤である。これらは通常小分子であり、その効果は特定のオペロン又は遺伝子群に特異的であり、糖、アルコール、金属イオン、ホルモン、熱、冷却、などを含む。例えば、イソプロピルチオ-β-ガラクトシド (IPTG) 及びラクトースは *tacI* プロモータのインデューサであり、L-アラビノースはアラビノースプロモータの好適なインデューサである。

【0023】

「リプレッサー」は、直接的又は間接的にプロモータ作用の休止を導くか、プロモータ作用を低下させる因子である。リプレッサーの一例はリン酸である。リプレッサーリン酸が媒体から枯渇されると、アルカリホスファターゼ (AP) プロモータが誘導される。

ここで用いられる「ポリペプチド」又は「対象とするポリペプチド」は、一般的に約 10 アミノ酸以上を有するペプチド及びタンパク質を指す。ポリペプチドは「異種」、即ち、大腸菌によって産生されるヒトタンパク質のように利用される宿主細胞に外来である。ポリペプチドは不溶性凝集物として、又は可溶性ポリペプチドとして細胞周辺腔又は細胞質中に産生される。

【0024】

哺乳類ポリペプチドの例は、例えば、ヒト成長ホルモン；ウシ成長ホルモンを含む成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポタンパク質；α1-アンチトリプシン；インシュリンA鎖；インシュリンB鎖；プロインシュリン；トロンボポエチン；濾胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；因子 *VIIIC*、因子 *IX*、組織因子、及びウィルブランズ (Willbrands) 因子などの凝固因子；プロテインCなどの抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺表面活性剤；プラスミノゲン活性化剤、例えばウロキナーゼ又はヒト尿素又はそしき型プラスミノゲンアクチベータ (*t-PA*)；ボンベシン；トロンビン；造血成長因子；腫瘍壊死因子-アルファ及びベータ；エンケファリン分解酵素；ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン；ミューラー阻害物質；レラキシンA鎖；レラキシンB鎖；プロレラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；微生物タンパク質；例えばベータ-ラクタマーゼ；DNA分解酵素；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子 (*VEGF*)；ホルモン又は成長因子のレセプター；インテグリン；プロテインA又はD；リウマチ因子；神経栄養因子、例えば脳誘導神経栄養因子 (*BDNF*)、ニューロトロフィン-3、-4、-5又は-6 (*NT-3*、*NT-4*、*NT-5*、又は*NT-6*)、又は神経成長因子、例えば $NGF-\beta$ ；心臓栄養因子 (心臓肥大因子)、例えばカーディオトロフィン-1 (*CT-1*)；血小板誘導成長因子 (*PDGF*)；繊維芽成長因子、例えば $aFGF$ 及び $bFGF$ ；表皮成長因子 (*EGF*)；トランスフォーミング成長因子 (*TGF*)、例えば $TGF-\alpha$ 及び $TGF-\beta 1$ 、 $TGF-\beta 2$ 、 $TGF-\beta 3$ 、 $TGF-\beta 4$ 、又は $TGF-\beta 5$ を含む TGF -ベータ；インシュリン様成長因子-I及び-II ($IGF-I$ 及び $IGF-II$)；*des(1-3)-IGF-I* (脳 $IGF-I$)、インシュリン様成長因子結合性タンパク質；CDタンパク質、例えばCD-3、CD-4、CD-8、及びCD-19；エリスロポエチン；骨誘導因子；免疫毒素；骨形態発生タンパク質 (*BMP*)；インターフェロン、例えばインターフェロン-アルファ、-ベータ及び-ガンマ；コロニー刺激因子 (*CSFs*)；例えばM-CSF、GM-CSF、及びG-CSF；インターロイキン (*ILs*)、例えば $IL-1 \sim IL-10$ ；抗-HER-2抗体；スーパーオキシドジスムターゼ；T細胞レセプター；表面膜タンパク質；減衰促進因子；ウイルス抗原、例えばAIDS外膜の部分；輸送タンパク質；ホーミングレセプター；アドレシン；調節タンパク質；抗体；及び上記のポリペプチドの任意の断片などの分子を含む。

【0025】

相性とする好ましい外因性ポリペプチドは哺乳動物ポリペプチド、最も好ましくはヒトのポリペプチドである。このような哺乳動物ポリペプチドの例は、*t-PA*、*VEGF*、*gp120*、抗-HER-2、抗-CD11a、抗-CD18、DNA分解酵素 (*DNAse*)、 $IGF-I$ 、 $IGF-II$ 、脳 $IGF-I$ 、成長ホルモン、リラキシン鎖、成長ホルモン放出因子、インシュリン鎖又はプロインシュリン、ウロキナーゼ、免疫毒素、ニューロト

10

20

30

40

50

ロフィン、及び抗原を含む。特に好ましい哺乳動物ポリペプチドは、例えば、ポリペプチドが周辺質中で不溶性凝集物として産生される場合は、IGF-I、DNA分解酵素、又はVEGFを含み、最も好ましくはIGF-Iであり、ポリペプチドが周辺質中で可溶性形態で産生される場合は、抗-CD18抗体又はその断片、例えば抗-組換えヒトDC18Fab、Fab'、及び(Fab')₂断片を含む。

ここで用いられる場合の「IGF-I」は、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、そして好ましくはヒトを含む任意の種からのインシュリン様成長因子であり、天然配列又は変異形態であり、組換え生産されたものである。好ましい方法では、IGF-Iはクローン化され、そのDNAを、例えば1984年12月19日に発行されたEP 128,733に記載されたプロセスで発現させる。

10

【0026】

「コントロール配列」という表現は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード化配列を発現するために必要なDNA配列を指す。細菌に好適なコントロール配列は、アルカリホスファターゼプロモータ等のプロモータ、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード化配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を促進するような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、DNA配列が結合し隣接しており、分泌リーダーの場合には隣接して読み枠にあることを意味する。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

20

【0027】

ここで使用される場合、「細胞」、「細胞系」及び「細胞培養」という表現は、互いに交換可能に使用され、そのような名称は全て子孫を含んでいる。従って、「形質転換体」及び「形質転換された細胞」は初代の対象細胞及び、植え継ぎ回数には関係無く、それに由来する培養物を含んでいる。また、故意又は偶然の変異のために、全ての産物はDNA含量が正確に一致しないかもしれないことも理解される。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングされるのと同じ機能又は生物学的活性を有する突然変異子孫が含まれる。明確な規定が意図される場合には、それは文脈から明らかになるだろう。

30

【0028】

B. 発明の実施の形態

一実施態様では、本発明は、可溶性又は不溶性の異種生成物を、それが産生される細菌から回収するための方法を提供する。この方法は、第1の工程に、細胞を培養することを含み、当該細胞は溶解酵素をコードする核酸を含み、これらの核酸は第1のプロモータに結合し、及び異種ポリペプチドをコードする核酸を含み、この核酸は第2の誘導性プロモータに結合している。これに換わる実施態様では、ファージリゾチーム及びDNA-消化タンパク質が第1の誘導性プロモータ又は低基本発現を持つプロモータに結合し、t-遺伝子が第2の誘導性プロモータに結合し、異種ポリペプチドが第3の誘導性プロモータに結合する。

40

培養は、誘導されたとき、溶解酵素をコードする核酸の発現が異種ポリペプチドの約50%以上が蓄積された後に開始されるような条件下、及びファージリゾチームが細胞質区画に蓄積され、DNA-消化タンパク質が細胞周辺腔に分泌される条件下で行われる。

【0029】

ここでの方法において、プロモータの誘導が好ましい；しかし、この方法はまた、低基本発現（僅かに弱い）を持つプロモータであるファージリゾチーム及びDNA-消化タンパク質のプロモータを使用し、誘導が行われない場合も考慮する。このタイプのプロモータ

50

は、未成熟細胞の溶解をもたらさず、細胞成長又は産物蓄積に影響を与えないのに十分に低い基本発現レベルをもたらすのに十分な弱さを有する。

第2の工程において、蓄積された異種ポリペプチドが細菌細胞から回収される。回収工程を実施する前に、細菌細胞の外側細胞壁の透過性を向上させる薬剤を、下記に詳細に説明するように添加してもよい。ファージリゾチームを放出させるために細胞を機械的に破壊する必要性は、低下するか又は完全に消失する。好ましい実施態様では、溶解酵素発現の後に、細胞質又は周辺質に含まれる異種ポリペプチドを放出するのに十分な時間に渡って細胞をインキュベートする。

【0030】

この方法は、製造物の沈降によるIGF-I、VEGF、及びDNA分解酵素等の不溶性凝集物の回収に適用できるが、例えば、抗-CD18抗体断片のような細胞質又は周辺質に可溶性の異種ポリペプチドにも適用可能である。生化学的細胞溶解による可溶性異種ポリペプチドの回収の利点は、機械的溶解の必要性を回避又は低減させ、それにより熱不安定性タンパク質の喪失の回避、及び拡張ベッド吸着技術及び遠心分離といった下流回収プロセスに適合する低く一定な流体粘度の獲得を含む。

10

【0031】

拡張層吸収(expanded bed absorption)(EBA)クロマトグラフィは、例えば、「Expanded Bed Adsorption: Principles and Methods」Pharmacia Biotech, ISBN 91-630-5519-8に記載されており、標的タンパク質を原料飼料貯蔵物又は細胞培地から最初に回収するのに有用である。清澄、濃縮、及び初期精製のプロセス工程は、1つの単位操作にまとめることができ、プロセス工程数の減少により経済性の向上、収率の向上、全プロセス時間の短縮、労働コストの削減、及びコストの低減を提供する。EBAクロマトグラフィにおいて、吸収剤は拡張され、カラムに上向きの流動を適用することにより平衡化される。吸収剤粒子が平衡中に懸濁されたときに、粒子の沈降速度と上向きの流速との間の均衡により安定な流動層が形成される。原料細胞混合物又はブロス溶解物を上向き流動を持つ拡張層に適用する。標的タンパク質は吸収剤に結合するが、細胞細片及び他の汚染物質は妨害されずに通過する。弱く結合した物質は、洗浄バッファの上向き流動を用いて拡張層から洗浄される。次いで、流動を停止して吸収剤をカラム中で沈降させる。次いでカラムアダプターを沈降層表面まで下げる。流動を逆転させて、捕捉されたタンパク質を適当なバッファを用いて溶離する。溶離物は標的タンパク質を減少した溶離プール容量中に含有し、充填層クロマトグラフィのための調製において部分的に精製される(Pharmacia Biotech, 上掲)。EBAは、可溶性製造物を含む全細胞溶解物をカラムを通して汲み上げ、タンパク質を樹脂(流動層)に吸収させて細胞細片を流通させた場合、唯一のクロマトグラフィ工程のみを利用し、それにより工程を省く。

20

30

【0032】

他の実施態様では、本発明は、細菌細胞の細胞質又は周辺質から可溶性の異種ポリペプチドを回収する方法を提供する。この方法は、細胞を培養することを含み、当該細胞はファージリゾチームをコードする核酸及びDNA-消化タンパク質分泌のためのシグナル配列の制御下でDNA-消化活性を示すタンパク質をコードする核酸を含む。この方法において、核酸が第1のプロモータ、及び異種ポリペプチド及び異種ポリペプチドシグナル配列の分泌のためのシグナル配列をコードする核酸に結合し、当該異種ポリペプチドをコードする核酸が第2の誘導性プロモータに結合する。この培養は、ファージリゾチーム及びDNA-消化タンパク質をコードする核酸の過剰発現が弱く連続して促進される、又は、誘導された場合に、異種ポリペプチドの約50%以上が蓄積された後に開始される条件下、及び異種タンパク質及びDNA-消化タンパク質が周辺質中に分泌され、ファージリゾチームが細胞質区画に蓄積される条件下で行われる。

40

第2の工程において、ブロス溶解物から蓄積された得られた異種ポリペプチドが回収される。

【0033】

第3の実施態様では、本発明は、3つの異なるプロモータを用いる、異種ポリペプチドを

50

細菌性細胞から回収する方法を提供する。特に、第1の工程において、細胞が培養され、当該細胞はファージリゾチームをコードする核酸、遺伝子t、及びDNA-消化活性を示すタンパク質をコードする核酸、並びに異種タンパク質をコードする核酸を含む。リゾチーム及びDNA-消化タンパク質をコードする核酸は、誘導性又は低基本発現を持つ第1のプロモータに結合し、遺伝子tは第2の誘導性プロモータに結合し、異種ポリペプチドをコードする核酸は第3の誘導性プロモータに結合する。

培養は、インデューサが添加され3つ全てが誘導性である場合、ファージリゾチーム、遺伝子t、及びDNA-消化タンパク質をコードする核酸の発現が異種ポリペプチドの約50%以上が蓄積された後に誘導され、第3のプロモータが第1のプロモータより前に誘導され、第2のプロモータが最後に誘導される条件下、及びファージリゾチーム及びDNA-消化タンパク質が低基本発現を持つプロモータに結合している場合、遺伝子tの発現が異種ポリペプチドの約50%以上が蓄積された後に誘導される条件下で実施される。培養はまた、ファージリゾチームが細胞質区画に蓄積される条件、DNA-消化タンパク質が周辺質中に蓄積される条件、及び細胞が溶解されてブロス溶解物を生成する条件下でも実施される。

第2の工程ではブロス溶解物から蓄積された異種ポリペプチドが回収される。

上記の方法において、DNA-消化タンパク質は任意の配列でよいが、好ましくは、DNA-消化タンパク質の天然配列である。また、好ましい実施態様では、DNA-消化タンパク質はDNA分解酵素又は細菌性、例えば大腸菌のendA産物である。

【0034】

好ましい実施態様では、培養工程は高い細胞密度で行われ、即ち、一般的には約15～150g乾燥重量/リットル、好ましくは少なくとも約40、より好ましくは約40～150、最も好ましくは約40～100である。光学密度においては、120OD550(A₅₅₀)は約50g乾燥重量/リットルである。さらに、培養は任意のスケール、100,000リットルという非常に大きなスケールでも実施できる。好ましくは、スケールは約100リットル以上、より好ましくは少なくとも約500リットル、最も好ましくは約500～100,000リットルである。

溶解酵素をコードする核酸は一つのプロモータに結合し、即ち、核酸間にリンカーを配することによる等して直列に挿入される。異種ポリペプチド発現のためのプロモータは、溶解酵素ために使用されるものと異なり、一方が他方の前に誘導される。プロモータは、この目的のために適した任意のプロモーターであり、好ましくは、遺伝子t及び異種ポリペプチド有又は無の溶解酵素のためのプロモータは、各々、アラビノースプロモータ及びアルカリホスファターゼプロモータである。

【0035】

この3つの方法全てについて、異種ポリペプチド及び溶解酵素のプロモータは相違しているべきであり、それにより核酸コード化異種ポリペプチド発現は核酸コード化溶解酵素の発現の前に誘導されるか、又はプロモータが誘導性である場合はより高いレベルである。プロモータはこの目的に適した任意のプロモータでよいが、ファージリゾチーム及び異種ポリペプチドのプロモータは、各々、アラビノースプロモータ及びアルカリホスファターゼプロモータである。あるいは、ファージリゾチーム及びDNA-消化タンパク質の区画化により、ファージリゾチーム及びDNA-消化タンパク質をコードする核酸の発現のために低基本発現を持つプロモータを使用するのが可能になる。tac又はtrpプロモータではなく、アラビノース等の低基本発現を持つプロモータが用いられる場合は、誘導の活動工程は必要ない。

溶解酵素をコードする核酸の発現の誘導は、好ましくは培養媒体へのインデューサの添加により実施される。この点において、プロモータのためのインデューサは任意の量で添加してよいが、好ましくはインデューサがアラビノースである場合、約0～1重量%の量で添加され、インデューサが添加される場合は、0.1～1重量%である。

【0036】

上記の方法において、典型的には発現成分が細胞に形質転換によって導入されるが、それ

10

20

30

40

50

らは細胞のゲノム又は染色体に、それらのプロモータ領域に沿って組み込んでもよい。これは、任意の酵素又は異種ポリペプチド遺伝子に適用される。細菌性細胞は、溶解酵素をコードする核酸、及び異種ポリペプチドをコードする核酸を含む一つ又は複数の発現ベクターで形質転換してもよい。そのような一実施態様では、細菌性細胞は、各々が溶解酵素をコードする核酸と異種ポリペプチドをコードする核酸を含む2つのベクターで形質転換される。他の実施態様では、溶解酵素をコードする核酸と異種ポリペプチドをコードする核酸とが1つのベクターに含まれ、それで細菌性細胞が形質転換される。好ましい他の特別な実施態様では、ファージリゾチーム及びDNA-消化酵素がプラスミドに担持されて高いコピー数を確保し、遺伝子tが宿主染色体に組み込まれて発現をダウンレギュレートし、未成熟細胞溶解を防止して漏出を回避する。

10

【0037】

上記の方法の第1工程では、細菌に適したプロモータの制御下での細菌における発現のために、異種核酸（例えば、cDNA又はゲノムDNA）が好適に複製可能なベクターに挿入される。この目的のために多くのベクターが利用可能であり、適したベクターの選択は主にベクターに挿入される核酸のサイズ、そして特にベクターで形質転換される宿主細胞に依存する。各ベクターは、その機能（DNAの増幅又はDNAの発現）及びそれが適合する特定の宿主細胞に依存して種々の成分を含む。細菌形質転換のためのベクター成分は、異種ポリペプチドのためのシグナル配列を含んでよく、DNA-消化タンパク質のためのシグナル配列を含み、また異種ポリペプチドのためのプロモータ及び遺伝子t及び他の溶解酵素のための低基本発現を持つ誘導プロモータ又は非誘導性のものを含みうる。また、これらは一般的に複製開始点及び一又は複数のマーカー遺伝子も含む。

20

【0038】

一般に、レプリコン及び宿主細胞に適合する種から誘導されたコントロール配列を含むプラスミドベクターが、細菌性宿主と組み合わせて使用できる。ベクターは元来複製部位、並びに形質転換された細胞において表現型選択を提供することのできるマーキング配列を有する。例えば、大腸菌は、大腸菌種から誘導されたプラスミドである典型的にはpBR322を用いて形質転換される。例えば、Bolivar等, Gene, 2: 95 (1977)参照。pBR322は、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性を与える遺伝子を含み、よって形質転換された細胞を同定する容易な手段を与える。pBR322プラスミド、又は他の微生物プラスミド又はファージも、選択可能なマーカー遺伝子の発現のために細菌生物体に使用されるプロモータを一般的に含むか、含むように修飾される。

30

【0039】

異種ポリペプチドが分泌されるべき場合、ここで対象とする異種ポリペプチドをコードするDNAは、成熟異種ポリペプチドのN-末端のもののようなシグナル配列を含む。一般に、シグナル配列はベクター成分であってもよく、又はベクターに挿入される異種ポリペプチドDNAの一部であってもよい。選択される異種シグナル配列は、宿主細胞に認識され加工される（即ち、シグナルペプチダーゼで切断される）べきものである。天然異種シグナル配列を認識及び加工しない細菌性宿主細胞では、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp、又は熱安定性エンテロトキシンIIリーダーからなる群から選択された細菌性シグナル配列によって置換される。

40

【0040】

発現ベクターは、一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターを複製可能にする核酸配列を含む。そのような配列は、種々の細菌について良く知られている。pBR322からの複製開始点は、殆どのグラム陰性細菌に適している。また発現ベクターは、選択できるマーカーとも呼ばれる選択遺伝子も含む。この遺伝子は、選択培養培地中で成長した形質転換宿主細胞の生存又は成長に必要なタンパク質をコードする。選択遺伝子を及び含むベクターで形質転換されなかった宿主細胞は、この培養培地中で生存しない。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質又は他の毒素、例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート、又はテトラサイクリンに対する耐性を与え、(b) 栄養要求性欠乏を補完し、又は(c) 複合培地から利用できない重大栄養素を供給するタンパク質をコードし

50

、例えば、バシリについてはD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子である。選択スキームの一例は、宿主細胞の成長を休止させる薬剤を利用する。異種遺伝子で成功裏に形質転換されたこれらの細胞は、薬剤耐性を与えるタンパク質を製造し、よって選択措置で生存する。

【0041】

異種ポリペプチドを製造するための発現ベクターは、宿主細菌生物体に認識され、対象とする異種ポリペプチドをコードする核酸に作用可能に結合した細胞誘導性プロモータも含む。それはまた、溶解酵素をコードする核酸に作用可能に結合した罰の誘導性又は低基本発現プロモータも含む。細菌性宿主での使用に適した誘導性プロモータは、 β -ラクタマーゼ及びラクトースプロモータ系 (Chang等, Nature, 275: 615 (1978); Goddel等, Nature, 281: 544 (1979))、araBADプロモータを含むアラビノースプロモータ系 (Guzman等, J. Bacteriol., 174: 716-7728 (1992); Guzman等, J. Bacteriol., 177: 4121-4130 (1995); Siegele及びHu, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 8168-8172 (1997))、ラムノースプロモータ (Haldimann等, J. Bacteriol., 180: 1277-1286 (1998))、アルカリホスファターゼプロモータ、トリプチFAN (trp) プロモータ系 (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980)及びEP 36,776)、 $P_{LtetO-1}$ 及び $P_{lac/ara-1}$ プロモータ (Lutz及びBujard, Nucleic Acid Res., 25: 1203-1210 (1997))、及びtacプロモータ等のハイブリッドプロモータを含む。deBoer等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983)。しかしながら、他の公知の細菌性誘導性プロモータ及び低基本発現プロモータは好ましい。それらのヌクレオチド配列は公開され、それにより当業者が、対象とする異種ポリペプチドをコードするDNA又は溶解酵素をコードする核酸に (Siebenlist等, Cell, 20: 269 (1980))、必要とされる全ての制限部位を与えるためのリンカー又はアダプターを用いてそれらを結合させることが可能となっている。trpプロモータ等の強くて高度に漏出性のプロモータが使用される場合、それは一般に溶解酵素コード化核酸ではなく異種ポリペプチドコード化核酸の発現のためにのみ使用される。tac及び P_L プロモータは、異種ポリペプチド及び溶解酵素の両方ではなく何れかのために使用しうるが、好ましくはない。好ましいのは、製造物についてのアルカリホスファターゼプロモータ及び溶解酵素についてのアラビノースプロモータである。

【0042】

また、細菌系で使用するためのプロモータは、一般的に対象とする異種ポリペプチドをコードするDNAに作用可能に結合したシャインダルガーノ (S. D.) 配列を含む。プロモータは、制限酵素消化によって細菌性供給源DNAから除去でき、所望のDNAを含むベクターに挿入することができる。phoAプロモータは、制限酵素消化によって細菌性供給源DNAから除去でき、所望のDNAを含むベクターに挿入することができる。上記に列挙した成分の一又は複数を含む好適なベクターの構築は、標準的なライゲーション技術を用いる。単離されたプラスミド又はDNA断片は、切断され、仕立てられ、再結合されて必要なプラスミドを生成するのに望まれる形態とされる。

【0043】

構築されたプラスミド中での正しい配列を確認する分析のために、大腸菌K12株294 (ATCC 31,446) 又は他の株を形質転換するためにライゲーション混合物が使用され、成功した形質転換体は、必要ならばアンピシリン又はテトラサイクリン耐性によって選択される。形質転換体からのプラスミドが調製され、制限エンドヌクレアーゼ消化によって分析され、及び／又はSanger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467 (1977)又はMessing等, Nucleic Acids Res., 9: 309 (1981)の方法、又はMaxam等, Methods in Enzymology, 65: 499 (1980)の方法によって配列決定される。

この目的に適した細菌は、古細菌及び真正細菌を含み、特に真正細菌、より好ましくはグラム陰性細菌、最も好ましくは腸内細菌科である。有用な細菌の例にはエシェリキア (Escherichia)、エンテロバクター (Enterobacter)、アゾトバクター (Azotobacter)、エルウィニア (Erwinia)、バシラス (Bacillus)、シュードモナス (Pseudomonas)、クレブシエラ (Klebsiella)、プロテウス (Proteus)、サルモネラ (Salmonella)

）、セラチア（*Serratia*）、シゲラ（*Shigella*）、リゾビア（*Rhizobia*）、ビトレオスシラ（*Vitreoscilla*）及びパラコッカス（*Paracoccus*）が含まれる。適切な大腸菌宿主には、大腸菌 W 3 1 1 0（ATCC 27,325）、大腸菌 2 9 4（ATCC 31,446）、大腸菌 B および大腸菌 X 1 7 7 6（ATCC 31,537）が含まれる。これらの例は限定するのではなく例示するものである。上記した任意の細菌の変異細胞もまた使用してよい。もちろん、細菌の細胞におけるレプリコンの複製可能性を考慮に入れて適切な細菌を選択することが必要である。例えば、大腸菌、セラチアまたはサルモネラ種は、p B R 3 2 2、p B R 3 2 5、p A C Y C 1 7 7 又は p K N 4 1 0 等のよく知られたプラスミドがレプリコンを提供するのに用いられる場合に好適に使用できる。

【0044】

10

大腸菌 W 3 1 1 0 株は、組換え DNA 産物の発酵のための一般的な宿主株であるため、好ましい宿主である。好ましくは、宿主細胞はタンパク質分解酵素の微量を分泌すべきである。例えば、W 3 1 1 0 株は、タンパク質コード化遺伝子における遺伝的変異に影響を及ぼすよう修飾されてよく、そのような宿主の例は、完全な遺伝子型 tonA Δ を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 1 A 2（Δ fhuA としても知られる）；完全な遺伝子型 tonA Δ ptr 3 を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 9 E 4；完全な遺伝子型 tonA Δ ptr 3 phoA Δ E 1 5 Δ（argF-lac）1 6 9 ompT Δ degP 4 1 kanr を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 2 7 C 7（ATCC 55,244）；完全な遺伝子型 tonA Δ ptr 3 phoA Δ E 1 5 Δ（argF-lac）1 6 9 ompT Δ degP 4 1 kanrrbs 7 Δ ilvG を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 3 7 D 6；非カナマイシン耐性 degP 欠失変異を有する 3 7 D 6 株である大腸菌 W 3 1 1 0 株 4 0 B 4；完全な遺伝子型 tonA ptr 3 lac I q Lac L 8 ompT degP kanr を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 3 3 D 3；完全な遺伝子型 tonA phoA Δ（argF-lac）ptr 3 degP kanR ilvG+ を有し、37℃での温度耐性がある大腸菌 W 3 1 1 0 株 3 6 F 8；完全な遺伝子型 fhuA(tonA) Δ（argF-lac）ptr 3 degP 41(kanS) Δ omp Δ（nmpc-fepE）ilvG+ phoA+ phoS*(T10Y) を有する大腸菌株 W 3 1 1 0 株 4 5 F 8；完全な遺伝子型 tonA phoA Δ（argF-lac）189 deoC degP IlvG+ (kanS) を有する大腸菌株 W 3 1 1 0 株 3 3 B 8；完全な遺伝子型 fhuA(tonA) Δ（argF-lac）ptr 3 degP 41(kanS) Δ ompT Δ（nmpc-fepE）ilvG+ phoA+ を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 4 3 E 7；及び1990年8月7日に発行された米国特許第4,946,783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。

20

【0045】

30

上述した本発明の発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、誘導が行われる場合は種々のプロモーターの誘導に適するように修飾された従来の栄養培地中で培養する。形質転換とは、DNA を生物体に導入し、その DNA を染色体外要素として、または染色体組込みによって複製可能にすることを意味する。使用する宿主細胞に応じて、形質転換はそのような細胞に適した標準的技術を使用して行う。Sambrook等、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989) の、1.82章に記載されたような塩化カルシウムを用いたカルシウム処理は一般的に実質的な細胞壁障害を含む細菌細胞のために使用される。形質転換のための他の方法は Chung 及び Miller, *Nucleic Acids Res.*, 16: 3580 (1988) に記載されているように、ポリエチレングリコール/DMSO を用いる。さらに別の方法は、エレクトロポレーションと名付けられた技術を使用する。

40

本発明に記載された対象とする異種ポリペプチドを産生するため使用される細菌細胞は、例えば上掲の Sambrook 等に一般的に記載されるようにプロモータが誘導できる適切な培地中で培養する。

【0046】

炭素、窒素および無機リン酸供給源以外の必要な任意の補足物もまた、適切な濃度で、単独で又は他の捕捉物又は複合窒素供給源等の他の補足物との混合物として含有せしめてよい。培地の pH は、約 5-9 の任意の pH であってよく、主に宿主生物に依存する。誘導のために、典型的には細胞を所定の光学密度、例えば、（例えば、インデューサーの添加によって、リプレッサー又は培地成分の枯渇などによって）誘導が開始される点であ

50

る約80-100のA₅₅₀まで達するまで培養し、異種ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を誘導する。異種ポリペプチドが約50%以上蓄積されたとき（例えば、光学密度が、所定の異種ポリペプチド蓄積との関連で以前に観察された目的量、例えば約120-140のA₅₅₀に達することによって決定される）、溶解酵素についてプロモータの誘導が行われる。誘導は、典型的には、以前の経験及び検定から決定したとき、接種後全発酵プロセス時間の約75-90%、好ましくは約80-90%の時点で行われる。例えば、プロモータの誘導は、40時間の発酵プロセスの接種後、約30時間、好ましくは32時間から約36時間までに行ってよい。

【0047】

遺伝子発現は、サンプル中で直接的に、例えばmRNAの転写を定量するために従来のノーザンブロットによって測定されてよい(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980))。種々の標識が使用され、最も一般的なものは、放射性同位体、特に³²Pである。しかしながら、ポリヌクレオチドへの導入のためにビオチン修飾ヌクレオチドを用いるなど、他の技術も使用してよい。次いで、ビオチンはアビジンまたは抗体と結合するための部位として機能し、広範な種々の標識、例えば放射性核種、蛍光、酵素などで標識されてよい。

発現された遺伝子産物の蓄積のために、宿主細胞を遺伝子産物の蓄積に十分な条件下で培養する。そのような条件は、例えば、細胞によるタンパク質発現及び蓄積を可能にする温度、滋養物、及び細胞密度条件を含む。さらに、これらの条件は、その下で細胞が転写、翻訳、及び一つの細胞成分から他の分泌タンパク質へのタンパク質の経代の、当業者に知られた基本的細胞機能を実行できるものである。

【0048】

産生物蓄積の後、細胞が発現された溶解酵素によって溶解されたとき、場合によっては産生物回収の前に、ブロス溶解物を細胞内に含まれる異種ポリペプチドが放出されるのに十分な時間に渡ってインキュベートする。この時間は、例えば、回収される異種タンパク質の型及び含まれる温度に依存するが、好ましくは約1-24時間、より好ましくは2-24時間、最も好ましくは2-3時間の範囲である。酵素による過剰消化が存在する場合、産生物回収における改善はあまり大きくない。

本発明の第2の工程では、異種タンパク質が、細胞マトリクスから放出された可溶性又は不溶性産物として、細胞細片が産生物と同時に回収されることを最小にするような方法で溶解物から回収される。回収は任意の手段でなされうるが、好ましくは異種ポリペプチドを含む屈折粒子の沈降又は可溶性産生物を含む上清の回収を含む。沈降の例は遠心分離である。この場合、回収は好ましくはEBA又は沈降の前に、外側細胞壁を分解して透過性を向上させ、より多くの固体を回収させる薬剤の存在下で実施する。このような薬剤の例は、EDTA等のキレート化剤又は極性イオン性洗浄剤、例えばZWITTERGENT 316(商品名)等の双性イオンを含む。上掲のStabel等参照。最も好ましくは、回収はEDTAの存在下で実施する。可溶性産生物の回収のための他の技術は上述したようにEBAである。

【0049】

回収に遠心分離が使用される場合、相対的遠心力(RCF)は重要な要因である。RCFは、細胞細片の溶解の際に細胞壁から放出された屈折粒子との同時沈降を最小にするように調節される。この目的のために用いられる特定のRCFは、例えば回収される産生物の型によって変化するが、好ましくは少なくとも約3000xg、より好ましくは約3500-6000xg、最も好ましくは4000-6000xgである。t遺伝子同時発現の場合、約6000rpmが無傷の細胞と同様に、溶解ブロスからの屈折粒子の良好な回収を提供する。

遠心分離時間は幾つかの要因に依存する。沈降速度は、例えば、屈折粒子のサイズ、形状、及び密度及び流体の密度及び粘度による。固体の沈降時間は、例えば、沈降距離及び速度に依存する。ディスクスタックの遠心機が、放出された異種ポリペプチド凝集物の回収又は大規模での細胞細片の除去に良好に作用すると考えるのが合理的であり、それは、これらの遠心機では、比較的大きな遠心力及び比較的短い沈降距離のために高い流体速度で

10

20

30

40

50

の加工が可能だからである。

【0050】

最初の回収工程で捕捉された異種ポリペプチドは、次いで、混入したタンパク質からさらに精製される。好ましい実施態様では、米国特許第5,288,931に記載されているように、号凝集した異種ポリペプチドが単離され、次いでポリペプチドが同時に可溶化され再折りたたみされる。あるいは、可溶性産生物が標準的な技術によって回収される。

以下の方法は、周辺質又は細胞質から放出された可溶性異種ポリペプチドに適した精製方法の例である：免疫親和性又はイオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はDEAE等のカチオン交換樹脂でのクロマトグラフィ；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；及び例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過。

10

以下の実施例は例示を提供するものであり、限定するものではない。本明細書で引用するすべての特許及び科学文献の開示は、全体を参考としてここに取り入れるものとする。

【0051】

実施例 I

可溶性産生物と溶解酵素の同時発現

A. T4-リゾチーム及びendAエンドヌクレアーゼとの同時発現

背景：

rhuMabは、2つの214残基の軽鎖及び2つの241残基の重鎖を持つ組換えF(ab')₂抗体断片である。それはMAC-1 (CD11b/CD18) レセプターに結合し、好中球の内皮への結合を有効に阻止する。下記の発酵プロセスにおいて、rhuMabCD18が大腸菌においてF(ab')₂-ロイシンジッパー前駆体として産生され、周辺質に分泌される。意図する回収方法は、蓄積された産生物の可溶性画分の回収を標的とし、最初の捕捉のために周辺質に放出されるF(ab')₂-ロイシンジッパーに依存する。

20

T4-リゾチーム同時発現は、ペプチドグリカン球形嚢を弱めるために誘導され、endAタンパク質同時発現は、細胞が透過性になる又は溶解する条件下で細胞から放出されるゲノムDNAを分解するために誘導される。

【0052】

大腸菌において、遺伝子endAは、通常周辺質に分泌されてDNAをヌクレオチド鎖切断的にオリゴデキシルヌクレオチドに切断するエンドヌクレアーゼをコードする。endAは大腸菌において比較的弱く発現されることが示唆されている (Wackernagel等, 上掲)。しかし、それは適合するプラスミドを使用して過剰発現する場合もある。適合するプラスミドpJJ153において、ara-T4-リゾチームカセットの後ろにendA遺伝子をそのシグナル配列とともに挿入すると、もはやpJJ154であるが、T4-リゾチーム及びエンドヌクレアーゼ両方の発現がアラビースの添加時に誘導される。T4-リゾチームは細胞質内にロックされるが、エンドヌクレアーゼは細胞膜周辺腔に分泌され、発酵プロセス中に細胞質内に局在するゲノムDNAから離間している。細胞溶解時のDNAの有効な酵素的分解は、細胞破壊及び粘度低下のために度々必要とされる場合のある操作である機械的破壊装置を複数回通すことを減少させ、全く無くすることも期待される。それに成功すると、回収プロセスの時間及びコストのかなりの縮減をもたらす。

30

40

【0053】

材料及び方法：

pS1130プラスミドの構築：プラスミドpS1130 (Fig 3) は、大腸菌におけるrhuMabCD18F(ab')₂-ロイシンジッパー前駆体の直接生産のために構築された。それは良好に特徴付けされているpBR322に基づいて、EcoRI制限部位に挿入された2138-bpの発現カセット (Fig 4；配列番号：1及び2) を持つ。このプラスミドは、テトラサイクリン及びベータ-ラクタム抗生物質の両方に対する耐性をコードする。発現カセットは、直列に結合した各遺伝子の単一のコピーを含む。各遺伝子のジストロンmRNAへの転写は、大腸菌phoAプロモータによって指示され (Chang等, Gene, 44: 121-125 (1986))、ファージラムダt₀転写終結区で終了する (Scholti

50

ssek及びGrosse、Nuc. Acids Res., 15: 3185 (1987))。各鎖の翻訳開始シグナルは、大腸菌S T I I (熱安定性エンテロトキシン) (Picken等, Infection and Immunity, 42: 269-275 (1983)) シャイン樽が一の配列によって提供される。

【0054】

r h u M a b C D 1 8 は、マウスモノクローナル抗体m u M a b H 5 2 (Hildreth及びAugust, J. Immunology, 134: 3272-3280 (1985)) を他の抗体について既に記載されているプロセス (Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285-4289 (1992); Shalaby等, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992); Presta等, J. Immunol., 151: 2623-2632 (1993)) を用いてヒト化することにより作成した。簡潔に言えば、Hildrethから許可されたハイブリドーマ細胞系 (Hildreth及びAugust, 上掲) からR T - P C Rを用いてm u M a b H 5 2 可変軽鎖 (V_L) 及び可変重鎖 (V_H) ドメインをコードするc D N Aを単離した。m u M a b H 5 2 の相補性決定領域 (C D R s) を。部位特異的突然変異誘発によってh u M A b U C H T 1 - 1 (Shalaby, 上掲) をコードするヒト抗体フレームワーク遺伝子に移植した。ヒト化抗体のその標的ヒトC D 1 8に対する親和性に影響しうる非-C D R、マウスフレームワーク残基を、分子モデルを用いて同定した。これらの残基を部位特異的突然変異誘発によって変化させ、それらのC D 1 8結合性に対する影響を試験した。親和性を有意に向上させたフレームワーク残基をヒト化抗体に導入した。F a b '形式のm u M A b H 5 2 の最終的なヒト化型をコードする発現ベクターを、p H 5 2 - 1 0 . 0 と命名したが、それはp A K 1 9 の誘導体である (Carter等, Bio/Technology, 10: 163-167 (1992))。

【0055】

プラスミドp S 1 1 3 0 は重鎖コード化領域でp H 5 2 - 1 0 . 0 と相違する。重鎖のC - 末端は、CysProProから天然ヒンジ配列ysProProCysProAlaProLeuLeuGlyGly (配列番号: 3) まで延び、次いで酵母転写因子G C N 4 の3 3 - 残基ロイシンジッパードメインに融合させた。上記したように、ロイシンジッパードメインは二量体化して2つのF a b '分子を結合させ、F (a b ')₂ 複合体形成を導く。重鎖ヒンジ領域の2つのシステイン残基は、次いで隣接するF a b 'からのものとジスルフィド結合し、共有結合したF (a b ')₂ を形成する。

【0056】

プラスミドp S 1 1 3 0 は下記に概説する多重工程プロセスにより構築した:
第1に、繊維状ファージ (f 1) 複製開始点をp H 5 2 - 1 0 . 0 に導入してプラスミドp S O 8 5 8 を作成した。プラスミドp S O 8 5 8 は、p H 5 2 - 1 0 . 0 のF a b '発現カセットを含む1 0 7 7 - b p のH i n d I I I - H i n d I I I 断片を、プラスミドp S O 1 9 1 (Fuh等, J. Biol. Chem., 265: 3111-3115 (1990)でp h G H r (1 - 2 3 8) と呼ばれている) の4 8 7 0 - b p のH i n d I I I - H i n d I I I 断片と結合させることにより構築した。
第2に、p S O 8 5 8 にオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発を実施し、プラスミドz p i 1 # 6 を作成した。重鎖コード化領域を延長して2 - ヒンジシステイン残基及びペプシン切断部位 (CysProProCysProAlaProLeuLeuGlyGly; 配列番号: 3) を含有せしめた。N o t I 制限部位も導入した。導入D N A の配列は、D N A 配列決定により確認した。
第3に、N o t I 及びp h I 制限部位に隣接するG C N 4 ロイシンジッパードメインをコードするD N A 断片を製造した (1998年8月27日に発行されたW098/37200)。この1 0 7 - b p のN o t I - S p h I 断片を次いで同様に切断したz i p 1 # 6 にクローン化してプラスミドp S 1 1 1 1 を作成した。

第4に、G C N 4 ロイシンジッパー断片のD N A 配列決定によりコード化配列の誤差を明らかにした。この誤差は、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発によって修正してD N A 配列決定により確認した。得られた正しいプラスミドをp S 1 1 1 7 と命名した。

p S 1 1 3 0 構築の最終工程は、テトラサイクリン耐性遺伝子を修復してf 1 開始点をp S 1 1 1 7 から除去することである。これは、F a b ' - ジッパー発現カセットを含むp S 1 1 1 7 の2 8 8 4 - b p のP s t I - S p h I 断片をp H 5 2 - 1 0 . 0 の3 6 1 5 - b p

10

20

30

40

50

の P s t I - S p h I 断片と結合させることにより達成した。

【0057】

p J J 1 5 4 プラスミド構築：プラスミド p J J 1 5 4 (F i g 5) は p A C Y C 1 7 7 誘導体であり p B R 3 2 2 ベクターに適合する。p J J 1 5 4 を構築するために、下記のような p J J 1 5 3 を M l u I で消化し、ベクター断片を M l u I 末端をコードするように設計された P C R 増幅した e n d A 遺伝子と結合した。プラスミドの正しい方向を、p J J 1 5 4 を生成する制限消化によりスクリーニングした。

p J J 1 5 3 (p B R ベクターに適合する p A C Y C 1 7 7 誘導体) の構築を F i g 5 に示した。p B R 3 2 2 からの C l a I / A l w N I 断片を C l a I / A l w N I -消化 p B A D 1 8 (Guzman等, 上掲) に挿入して p J J 7 0 を作成した。次いで1ラウンドの部位特異的突然変異誘発を実施し、H i n d I I I を S t u I に変化させて p J J 7 5 を得た。第2ラウンドの部位特異的突然変異誘発を行って M l u I を S a c I I に変化させて p J J 7 6 を作成した。次いで、p J J 7 6 及び p B K I G F 2 B からの X b a I / H i n d I I I 断片を結合し、このライゲーション作成物及び T 4 リゾチーム / t a c プラスミドからの X b a I / H i n d I I I 断片を結合して p T 4 L y s A r a を作製した。次いで、B a m H I (充填) / S c a I -消化 p A C Y C 1 7 7 を C l a I / H i n d I I I (両末端充填) -消化 p T 4 L y s A r a と結合して p J J 1 5 3 を作製した。p A C Y C 1 7 7、p T 4 L y s A r a、及び p J J 1 5 3 のマップを F i g 5 に示す。

【0058】

細菌株及び成長条件：プラスミド p J J 1 5 4 からの T 4 -リゾチーム及び D N A -消化タンパク質の同時発現及びプラスミド p S 1 1 3 0 からの r h u M A b C D 1 8 F (a b ')₂ -ロイシンジッパーの発現のための生産宿主として株 3 3 B 8 (大腸菌 W 3 1 1 0 t o n A p h o A Δ (a r g F - l a c) 1 8 9 d e o C d e g P i l v G + (k a n S)) を使用した。3 3 B 8 の競合細胞を標準的技術を用いて p J J 1 5 4 及び p S 1 1 3 0 で同時形質転換した。形質転換体を、20 μ g / m l テトラサイクリン及び 50 μ g / m l カナマイシンを含む L B プレート (L B + T e t 2 0 + K a n 5 0) から摘み取り、画線精製し、20 μ g / m l テトラサイクリン及び 50 μ g / m l カナマイシンを含む L B ブロス中、3 7 ° C 又は 3 0 ° C 振盪機 / インキュベータにおいて成長させた後、- 8 0 ° C において D M S O 中で貯蔵した。

対照実験として、宿主 3 3 B 8 を p S 1 1 3 0 及び p J J 9 6 (T 4 -リゾチーム及び e n d A 生成物をコードする核酸がベクターに挿入されていない以外は p J J 1 5 4 と類似のもの) で形質転換し、類似の選択培地から単離した。

【0059】

r h u M A b C D 1 8 F (a b ')₂ -ロイシンジッパー発酵プロセス：新たに解凍した貯蔵培養バイアルを用いて無菌培地に播種することにより振盪フラスコ種菌を調製した。適当な抗生物質を培地に含有せしめて選択圧を提供し、プラスミドの保持を確実にした。振盪フラスコ媒体組成を表 1 に与える。振盪フラスコを約 3 0 ° C (2 8 ° C - 3 2 ° C) で振盪しながら 1 4 - 1 8 時間印キュベートした。次いでこの培地を製造発酵容器の播種に使用した。播種容量は培地の初期容量の 0.1% から 10% とした。

r h u M A b C D 1 8 の F (a b ')₂ -ロイシンジッパー前駆体の製造を表 2 に与えた生産培地で実施した。発酵プロセスは、約 3 0 ° C (2 8 - 3 2 ° C) 及び p H 7 . 0 (6 . 5 - 7 . 9) で実施した。通気速度及び攪拌速度は、培地への十分な酸素輸送を与えるように設定した。培地のリン酸塩が枯渇したとき、典型的には播種後 3 6 - 6 0 時間で r h u M A b C D 1 8 の F (a b ')₂ -ロイシンジッパー前駆体が生じた。

【0060】

10

20

30

40

表 1
振盪フラスコ媒体組成

成 分	量／リットル
テトラサイクリン	4-20 mg
トリプトン	8-12 g
酵母抽出物	4-6 g
塩化ナトリウム	8-12 g
リン酸ナトリウム、pH7溶液として添加	4-6 mmol

10

【0061】

表 2
生産培地組成

成 分	量／リットル
テトラサイクリン	4-20 mg
グルコース ^a	10-250 g
硫酸アンモニウム ^a	2-8 g
リン酸ナトリウム、一塩基性、 二水和物 ^a	1-5 g
リン酸カリウム、二塩基性 ^a	1-5 g
リン酸カリウム、一塩基性 ^a	0.5-5 g
クエン酸ナトリウム、二水和物 ^a	0.5-5 g
硫酸マグネシウム、七水和物 ^a	1.0-10 g
FERMAX(商品名) ^a (除泡剤)	0-5 ml
塩化第二鉄、六水和物 ^a	20-200 mg
硫酸亜鉛、七水和物 ^a	0.2-20 mg
塩化コバルト、六水和物 ^a	0.2-20 mg
モリブデン酸ナトリウム、二水和物 ^a	0.2-20 mg
硫酸銅、五水和物 ^a	0.2-20 mg
ホウ酸 ^a	0.2-20 mg
硫酸マンガン、一水和物 ^a	0.2-20 mg
カゼイン消化物	15-25 g
メチオニン ^a	0-5 g
ロイシン ^a	0-5 g

20

30

aこれらの成分の一部は最初に発酵機に添加し、残りは発酵中に供給した。水産課アンモニウムはpH制御に必要なときに添加した。

40

【0062】

アラビノース添加のタイミングは播種後50～60時間の範囲である。T4-リゾチーム及びendAエンドヌクレアーゼの同時発現の誘導のために、0.1%～1%（最終濃度）のアラビノースのボラス添加を試験した。

発酵は約65時間（60～72時間）進行させ、その後、生成物回収のための続く処理のためにブロスを集めた。

【0063】

endAエンドヌクレアーゼ過剰発現によるブロス粘度低下の評価：上述のファージリゾチームに加えてendA産物の同時発現の有又は無でのrhuMAbCD18F(ab')₂-ロイシンジッパー発酵からの収集ブロスに、1サイクルの凍結-解凍を施した。解凍し

50

たブросを水又は20mMのMgCl₂中で1:3に希釈した後、37℃の水浴中で攪拌しながらインキュベートした。間隔をとって試料を取り出し、希釈ブросの粘度を落下球粘度計を用いて測定した。

【0064】

結果：

T4-リゾチームに加えてEndAの過剰発現がブрос粘度に与える影響：表3に示すように、endA過剰発現が無い上記の発酵プロセスから収集した希釈凍結-解凍ブросは、37℃にインキュベーション開始時に800cPを越える粘度を有していた。60分間のインキュベーションの後、H₂O-希釈凍結-解凍発酵ブрос粘度に僅かな変化があったが、MgCl₂-緩衝液-希釈ブросはブрос粘度のかかなりの低下を示した。37℃インキュベーションを2.5時間に延長すると、T4-リゾチームに加えてendAの過剰発現の無い凍結-解凍希釈ブросの粘度は、約40cPのレベルに低下した。endA過剰発現の有る希釈凍結-解凍収集ブросの粘度は37℃インキュベーションの前で20cP未満であった。

【0065】

表 3

同時発現	処 理	37℃ インキュベーション (分)	ブрос粘度 (cP)
T4-リゾチーム + endA (pJJ154)	H ₂ O コントロール + 20 mM MgCl ₂	0 0	<20 <20
	H ₂ O コントロール + 20 mM MgCl ₂	60 60	<20 <20
T4-リゾチーム のみ (pJJ153)	H ₂ O コントロール + 20 mM MgCl ₂	0 0	>800 >800
	H ₂ O コントロール + 20 mM MgCl ₂	60 60	>800 36
	H ₂ O コントロール + 20 mM MgCl ₂	120 120	41 36
	H ₂ O コントロール + 20 mM MgCl ₂	165 165	40 42

【0066】

B. T4-リゾチーム、遺伝子t、及びEndAエンドヌクレアーゼの同時発現：

背景：

実施例IAに記載したように、endAの過剰発現は透過性化又は溶解ブросの粘度の低下に有意な効果をもたらす。これは、続く生成物回収工程のための発酵ブросのコンディショニングを助ける。endAに加えてT4-リゾチームとt-遺伝子を同時発現させることにより、細胞は生化学的に溶解されると同時に良好にコンディショニングされたブрос溶解物を生成し、それは十分に低く遠心分離又はEBA等の生成物単離工程に適合する流体粘度を持つ。

上記の発酵プロセスは、プラスミドpJJ155に指示される溶解酵素及びDNA-消化タンパク質の同時発現を伴う、大腸菌内のプラスミドpS1130によって指示されるrhumaBCD18F(ab')₂-ロイシンジッパー前駆体の製造に使用した。抗体断片産生物が分泌され、周辺質に蓄積された。溶解酵素は、t-遺伝子産生物の作用で放出されるまで、それらの基質から離れて区画された。意図する回収方法は、最初の捕捉のために周辺質から放出されるF(ab')₂-ロイシンジッパーの可溶性画分を標的とする。

【0067】

材料及び方法：

PJJ155プラスミド構築：pJJ154と同様に、pJJ155はpACYC177誘導体でありpBR322ベクターに適合性である。pJJ155を構築するために、上述したようなpJJ154をKpnIで消化し、ベクター断片をPCR増幅したKpnI

末端をコードするよう設計された t-遺伝子に結合した。プラスミドの正しい方向は、p J J 1 5 5 を産生する制限消化によってスクリーニングした。p J J 1 5 5 のマップを F i g 7 に示した。

細菌株及び成長条件：ほとんどの実験は、p J J 1 5 4 を p J J 1 5 5 に換えた以外は上記したような形質転換 3 3 B 8 で実施した。

発酵プロセスの説明：実施例 I A 参照。

【0068】

結果：

p S 1 1 3 0 及び p J J 1 5 5 と℃叔父発現させた 3 3 B 8 (3 3 B 8 / p S 1 1 3 0 / p J J 1 5 5) の細胞成長は、対照 (p S 1 1 3 0 のみで形質転換した 3 3 B 8) と有意に相違しなかった。50-65 時間に 0.5%~1% のアラビノースを添加して溶解酵素及び D N A -消化タンパク質の同時発現を誘導した後、

3 3 B 8 / p S 1 1 3 0 / p J J 1 5 5 培地の O D 5 5 0 はピーク細胞密度の 30-40% に定常的に低下し、細胞溶解を示唆した。

【0069】

表 4 は、T 4 -リゾチーム + e n d A + t -遺伝子の同時発現の、可溶性抗 -C D 1 8 抗体断片の培地中への放出に対する影響を示す。25mM の E D T A 存在下でのインキュベーションの後、収集ブロス溶解物の遠心分離からの上清を、イオン交換 H P L C クロマトグラフィーで生成物量について検定した。溶解酵素及び D N A -消化タンパク質の同時発現が誘導される条件では可溶性抗 -C D 1 8 抗体の 80% 以上が上清画分中で見いだされたのに比較して、t -遺伝子 (p J J 1 5 4) が無い又は機械的破壊の条件の対照では 10% 未満しか見られなかった。

表 4

同時発現	全生産物の%
無し (対照)	<10
T4-リゾチーム + endA (pJJ154)	<10
T4-リゾチーム + endA + t-遺伝子 (pJJ155)	>80

【0070】

結論：

エンドヌクレアーゼは D N A を分解しブロス粘度を低下させる。T 4 -リゾチームに加えて大腸菌外因性エンドヌクレアーゼの過剰発現は、放出された D N A を剪断するための機械的細胞破壊の必要性を低下させる。発現された t -遺伝子タンパク質に媒介される細胞膜周辺腔からのファージリゾチームの放出が生化学的分解プロセスを開始させ、細胞溶解をもたらしてこの時点までに周辺質又は細胞質のいずれかに捕捉された異種タンパク質、ゲノム D N A 、及び D N A -消化タンパク質を含む細胞内容物を放出させる。ブロス溶解物を、同時発現された溶解酵素及び D N A -消化タンパク質による適当な基質消化におくことにより、ブロス粘度及び細胞性混合物からの生成物放出が生成物回収にとって良いように改善される。

【0071】

溶解酵素と I G F - I との同時発現

背景：

大規模に必要なため、屈折粒子回収の評価のための異種ポリペプチドとして I G F - I を選択した。溶解酵素及び D N A -消化タンパク質の同時発現は、機械的破壊が無い場合の細胞壁構造からの I G F - I 屈折粒子の放出を促進するのに用いた。

細胞溶解に際して、細胞質区画からの T 4 -リゾチーム放出に加えて、細胞質から放出されるゲノム D N A もブロス溶解物流体の粘度に有意に寄与すると思われる。従って、溶解酵素とともに大腸菌エンドヌクレアーゼを同時発現させることは、細胞溶解に続いて流体粘度を低下させて遠心分離中の生成物回収を向上させるのに有用であった。

【0072】

材料及び方法：

pLBIGF57プラスミド構築：IGF-Iの発現のためのプラスミドpLBIGF57 (Fig 6) は、pBR322の基本骨格から構築した。IGF-Iをコードする核酸の発現に必要な転写及び翻訳配列は、phoAプロモータ及びtrpシャインダルガーノ配列によって提供した。タンパク質の分泌はlamBシグナル配列のTIR変異体によって指示した。このTIR変異体はlamBシグナルの一次アミノ酸配列は変化させない；しかし、この特定の変異体においてサイレントヌクレオチド配列変化は翻訳されるタンパク質のレベルを向上させる。

pLBIGF57構築の詳細は以下の通り。異なる強さの翻訳開始領域 (TIR) 変異体をスクリーニングするためにlamBシグナル配列のコドンライブラリを構築した。特に、lamBシグナル配列のコドン3～7の第3の位置を変化させた。この設計を野生型アミノ酸配列に変換し、さらにヌクレオチド配列内で発散させた。

10

【0073】

STIIシグナルコドンライブラリのスクリーニングについて既に記載されているように (S. African Pat. No. ZA 96/1688; Simmons及びYansura, Nature Biotechnology, 14: 629-634 (1996))、phoA遺伝子産物は、lamBTIR変異体の選択のためのレポーターとして供給した。lamBシグナル配列のコドンライブラリをphoAプロモータ及びtrpシャインダルガーノの下流かつphoA遺伝子の下流に挿入した。低転写活性の条件下で、各構築物に分泌されるアルカリホスファターゼの量は、このときライブラリの各TIR変異体によって提供される転写開始の有効性に依存していた。この方法を用いて、約10倍の活性範囲をカバーするようにlamBTIR変異体を選択した。特に、lamBTIR変異体#57は、phoA活性検定に基づいて、野生型lamBコドンより約1.8倍強いTIRを提供した。

20

pLBIGF57の構築のためのベクター断片は、pBK131RanをXbaI及びSphIで消化することにより製造した。このXbaI-Sphベクターは、phoA及びtrpシャインダルガーノ配列を含む。IGF-Iのコード化配列及びラムダt。転写終結配列をpBKIGF-2B (米国特許第5,342,763号) から単離し、次いでNcoI-SphIで消化した。lamBシグナル配列断片をpLBPhoTBK#57 (TIR変異体#57；上記のように製造) から単離してXbaI-NcoIで消化した。これら3つの断片を次いで結合させてpLBIGF57を構築した。

30

【0074】

細菌株及び成長条件：ほとんどの実験は、株43E7 (大腸菌W3110 fhu(tonA) Δ(argF-lac) ptr3 degP41(kanS) ΔompTΔ(nmpc-fepE) ilvG+phoA+) で実施した。溶解酵素のために生成プラスミド (pLBIGF57) 及びpJJ155を含む2つのプラスミドを用いた。43E7の競合細胞を標準的手法を用いてpLBIGF57及びpJJ155と同時形質転換した。50µg/mlカルベニシリン (LB+CARB50(商品名)) 及び50µg/mlカナマイシンを含むLBプレート上での成長の後に形質転換体を摘み取り、定常精製し、50µg/mlのCARB50(商品名) 及び50µg/mlカナマイシンを含むLBブロス中、37℃の振盪機/インキュベータ内で成長させた後に発酵機内で試験した。

40

比較のため、pLBIGF57のみで形質転換した43E7を同様の条件下で実施した対照ケースで使用した。pLBIGF57は生産宿主にカルベニシリン及びテトラサイクリン両方の耐性を付与し、いずれかの抗生物質の存在下で43E7/pLBIGF57を成長させることを可能にした。

【0075】

発酵プロセス：IGF-I、endA、T4-リゾチームをコードする核酸、及び使用するならt-遺伝子の同時発現に使用した発酵媒体組成及び実験プロトコールは、スケールダウンした高代謝速度、高収率の10キロリットルプロセスのものと同様であった。簡潔に言えば、43E7pLBIGF57又は43E7pLBIGF57/pJJ155の振盪フラスコ種培地を富化生産培地の播種に使用した。培地の組成を (初期培地1リットル当

50

たりの各成分の量とともに) 以下に記載する。

成分	量 / L	
グルコース*	200-500 g	
硫酸アンモニウム	2-10 g	
リン酸ナトリウム、一塩基二水和物	1-5 g	
リン酸カリウム、二塩基	1-5 g	
クエン酸ナトリウム、二水和物	0.5-5 g	
塩化カリウム	0.5-5 g	
硫酸マグネシウム、七水和物	0.5-5 g	
PLURONIC(商品名)ポリオール、L61	0.1-5 g	10
塩化第一鉄、七水和物	10-100 mg	
硫酸亜鉛、七水和物	0.1-10 mg	
塩化コバルト、六水和物	0.1-10 mg	
モリブデン酸ナトリウム、二水和物	0.1-10 mg	
硫酸銅、五水和物	0.1-10 mg	
ホウ酸	0.1-10 mg	
硫酸マンガン、一水和物	0.1-10 mg	
塩酸	10-100 mg	
テトラサイクリン	4-30 mg	
酵母抽出物*	5-25 g	20
NZアミンA S*	5-25 g	
メチオニン*	0-5 g	
水酸化アンモニウム	pH調整に必要な場合	
硫酸	pH調整に必要な場合	

*グルコース、酵母抽出物、NZアミンA S、及びメチオニンの一部は最初に培地に添加し、残りは発酵の最中に供給した。

【0076】

発酵は、以下に設定した発酵パラメータでの供給バッチプロセスであった。

攪拌： 最初は800RPM、80Dで1000RPMまで上昇。

通気： 15.0 slpm

pH調整： 7.3

温度： 37°C

バック圧： 0.7bar

グルコース供給： 発酵初期は成長速度を最大の約95%に調整し、次いでDO₂が30%に低下した後は溶解酸素濃度(DO₂)を空気飽和の30%に調節するアルゴリズムを用いてコンピュータ制御。

複合窒素供給： 実行中を通して0.5mL/分の一定供給速度

実行時間： 40時間

アラビノース添加のタイミングは24時間～36時間の範囲とした。

遠心分離工程におけるより良い回収のために最も好ましいT4-リゾチーム量を生産するために必要な誘導強度を決定するために、0.1%～1%（最終濃度）のアラビノースのボーラス添加を試験した。 40

【0077】

収穫ブロスからの屈折粒子の回収：OD₅₅₀の目的とする低下が観察された発酵終了時にブロスを収穫し、即座に加工するか、又は使用まで4°Cで貯蔵した。用いた試験プロトコルは4つの工程を含んでいた。

I. 収穫ブロスに1MのEDTAを添加してEDTAの最終濃度を25mMとする。EDTAは二価カチオンをキレートして外側細胞壁構造を破壊する。これにより、未破壊細胞内のペプチドグリカン層がT4-リゾチームによる分解を受けやすくなり、細胞壁を弱体化して細胞溶解を促進する。 50

I I . 溶解物を室温に保持するか、又は 37℃でインキュベートして細胞壁をさらに分解させる。この工程は大規模プロセスに伴う長いプロセス時間を模倣する。

I I I . 遠心分離により溶解物から屈折粒子及び固体を回収する。固体をペレットとして収集するために、SORVALL(商品名)GSAロー他での異なる速度の卓上規模の遠心分離 (3000 rpmから6000rpm; 各々、 r_{max} での約2500gから6000gのRCFと等価) を用いた。

ペレットをバッファーで洗浄する付加的工程は、ペレットに付随する溶解物を除去し、屈折粒子調製物中の大腸菌タンパク質の汚染を最小にする。

【0078】

ブロス溶解物の遠心分離からの上清及びペレットの試料をバッファー中に再懸濁して、HPLC逆相法により分析した。産生物回収効率は、プロセス工程によりペレット中に回収された産生物量を、ペレット及び上清を合わせた中に存在する全産生物のパーセントとして表すことにより計算した。回収された屈折粒子の質を評価するために、ペレット及び上清中に存在する全タンパク質の量をローリ法 (J. Biol. Chem., 193: 265 (1951)) によって測定した。

エンドヌクレアーゼの寄与は、遠心分離によるブロス溶解物からの沈降中の固体回収効率により評価した。また、ペレット及び上清中に存在する核酸の量はOD₂₆₀の読みみによって測定した。

【0079】

結果:

I GF - I 発酵及び産生物発現:

Fig 8は一般に、pJJ155を用いたI GF - I と溶解酵素及びend Aとの同時発現のためにこの実施例で使用した2-プラスミド系を示す。43E7/pLBIGF57/pJJ155の初期成長速度は、43E7/pLBIGF57の対照と有意な相違がなかった。これらのブロスのピーク細胞密度は同様であった。しかしながら、対照と比較すると、溶解酵素同時発現の誘導後の培地において有意な光学密度の低下が観察され、細胞溶解を示す。位相差顕微鏡による収穫ブロスの検査により、同時発現無しの対照と比較して、溶解酵素及びDNA-消化タンパク質の同時発現の結果として、無傷の大腸菌細胞はほとんど存在せず、明らかに屈折粒子を含まないことが示された。Fig 9A-9Eを参照のこと。

この実施を通した呼吸速度は、アラビノース添加の直後にklaにおける低下を伴って、酸素取り込み量 (OUR) の有意な連続的な低下を除いて対照ときわめて類似していた。

【0080】

この発明で記載した生化学的細胞溶解技術の成功は、同時発現の無い対照に体して溶解酵素及びDNA-消化タンパク質の同時発現の結果としての、固体 (ペレット) 及び液体 (上清) 画分間の核酸及び全タンパク質の分配の相違から明らかである (各々、Fig 10A及び10B)。A260の読みから計算した全核酸のパーセント及びローリーのタンパク質検定法で測定した全タンパク質のパーセントはともに、生化学的溶解ブロスの遠心分離からの上清では対照ブロスからよりも増加した。

2条件からの産生物回収をFig 11にまとめた。生化学的に溶解したI GF - I ブロスでは、I GF - I 産物は分解されたDNAポリマーとともにブロス溶解物中に放出された。この小さく密な屈折粒子の回収の有効性は、遠心分離中に用いられるRCFとともに増加した。より強い力を用いると、ペレットとして回収された溶解ブロスのパーセント (%ペレットとして報告した) が増加し (Fig 12)、従ってペレット中のI GF - I 産生物の量も増加した。約6000xgにおいて、産生物95%近くがペレット中に捕捉された。

【0081】

結論:

ここに開示したように、発酵プロセス中の遺伝子発現の試料操作は生化学的な細胞溶解をもたらし、それは製造スケールでの産生物回収に伝統的に用いられていた従来の機械的分解に置き換えることができる。T4-リゾチーム及びt-遺伝子産物のインビボ同時発現又

10

20

30

40

50

は同調発現は細胞を崩壊させるための効率の高い技術である一方、過剰発現された *end A* タンパク質は漏出 DNA を分解し、ブロス溶解物を最初の産生物捕捉工程における産生物回収のためにコンディショニングする。生化学的細胞溶解は、可溶性並びに不溶性産物の回収に適用できる。同時発現された酵素を細胞溶解の所定の瞬間までそれらの基質から区画することは、本発明において必要であり重要な設定である。本発明は、プロセスコスト、プロセス時間、従って同じ生産設備を占める他の産物のオポチュニティ・コストを有意に低減する。

【図面の簡単な説明】

【F i g 1】 ポリペプチド産物が細胞質及び周辺質で処理される、即ち、凝集体、タンパク質分解断片、又は折り畳まれた可溶性ポリペプチドを形成する方法を示す模式図である。 10

【F i g 2】 機械的細胞破壊に次ぐ遠心分離を含む典型的な単離方法による上清及びペレットからの、3回のガウリンホモジナイザーを通した後の I G F - I 凝集物の回収を示すグラフである。

【F i g 3】 *r h u M a b C D 1 8 F (a b ')₂* -ロイシンジッパー前駆体（ここでまた抗-CD 1 8 抗体断片とも呼ばれる）のための発現プラスミドである *p S 1 1 3 0* のプラスミドマップを示す図である。

【F i g 4 A - 4 B】 *p S 1 1 3 0* の発現カセットの配列（配列番号：1 及び 2）を示すである。

【F i g 5】 T 4 -リゾチーム及び *end A*（大腸菌 DNA 分解酵素）の同時発現に用いられた *p J J 1 5 4* のプラスミド構築を示す図である。 20

【F i g 6】 I G F - I の発現に用いられた *p L B I G F 5 7* のプラスミドマップを示す図である。

【F i g 7】 T 4 -リゾチーム、*end A*、及び遺伝子 *t* の発現に用いられた *p J J 1 5 5* のプラスミド構築を示す図であり、この構築は *p J J 1 5 4* からである。

【F i g 8】 本発明の実施例に従う、T 4 -リゾチーム、好ましいファージリゾチーム、*end A*、好ましい DNA -消化タンパク質、及び遺伝子 *t*（*p J J 1 5 5*）と、I G F - I コード化核酸との同時発現のための 2 プラスミド系の模式図である。

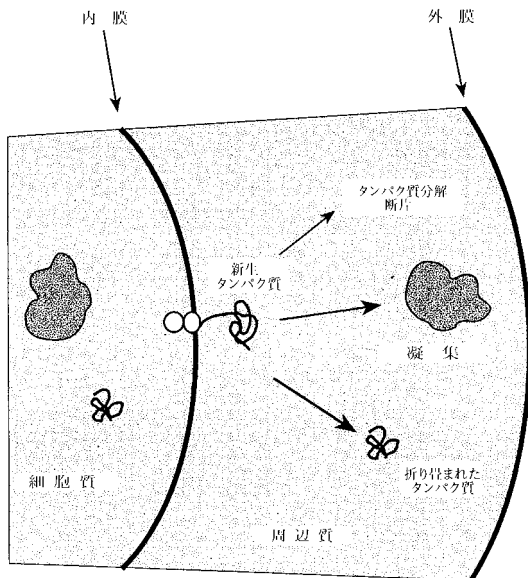
【F i g 9 A - 9 E】 T 4 -リゾチーム及び *end A* 及び *t* -遺伝子の同時発現有又は無、及び E D T A 添加前又は後の、回収ブロス及び発酵ブロスの遠心分離からの再懸濁ペレットの位相差顕微鏡からの写真である。特に、写真は、溶解酵素同時発現無しで各々 E D T A 添加前又は後の対照ブロスの遠心分離からの再懸濁ペレット（F i g 9 A 及び 9 B）、I G F - I と 3 つの溶解酵素である T 4 -リゾチーム、*end A*、及び *t* -遺伝子との同時発酵から得た発酵回収非希釈全ブロス（F i g 9 C）、I G F - I と 3 つの溶解酵素との同時発現で E D T A 添加の無い回収ブロスの遠心分離からの再懸濁ペレット（F i g 9 D）、及び I G F - I と 3 つの溶解酵素との同時発現で E D T A を添加した回収ブロスの遠心分離からの再懸濁ペレット（F i g 9 E）を示す。 30

【F i g 1 0 A 及び 1 0 B】 各々、対照に対する、3 つの溶解酵素との同時発現の I G F - I 発現大腸菌についての O D 2 6 0 測定による上清及びペレットにおける定量化、及び同時発現の無い対照に対する、3 つの溶解酵素との同時発現の I G F - I 発現大腸菌からの上清及びペレットにおける全タンパク質を示すグラフである。 40

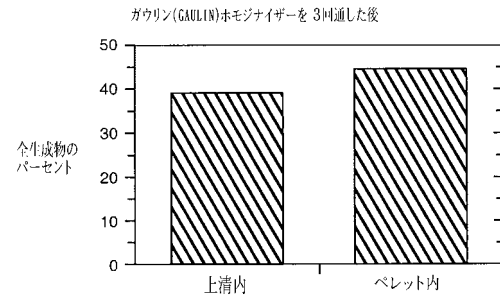
【F i g 1 1】 種々の遠心分離速度についての、溶解無しの対照ブロスに対する、3 つの酵素を用いた遠心分離による I G F - I 産物回収を示すグラフである。

【F i g 1 2】 種々の遠心分離速度についての、溶解無しの対照ブロスに対する、I G F - I と同時発現させた 3 つの酵素を用いた遠心分離中の固体回収を示すグラフである。

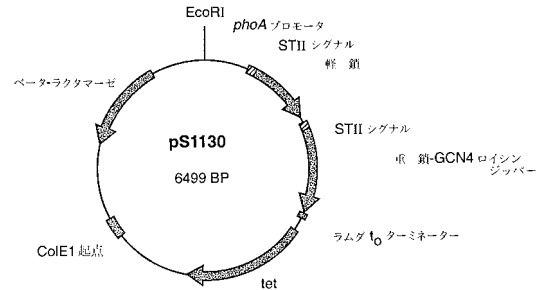
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【図 4 A - 1】

1 GAATTCAACT TCTCCATCT TTGGATRAGG AATACAGAC ATGAAAATC TCATTCGTGA
 61 GTTGTATTTT AAGCTTTGGA GATTATCGTC ACTGCAATGC TTGCAATAT GCGCAAAAT
 121 GACCAACAGC GGTTCATGTA TCAGGTAGAG GGGGCGCTGT ACCAGGTAAA CCCCAGTGCC
 181 AGCATTCCTG ACAGCAGATAC GGAGCTGCTG CCGGATTACG TAAAGAAGTT ATTGAAGCAT
 241 CCTCGTCACT AAAAGTTAA TCTTTTCAAC AGCTGTCATA AAGTTGTCAC GGGCGAGACT
 301 TATAGTCGCT TGTGTTTAT TTTTATGCT ATTGTAACT AGAATTCGAG CTCGCCGGGG
 361 ATCCTCTAGA GGTGAGGTG ATTTT ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT
 -23 M K K N I A F L L
 413 GCA TCT ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA AAC GCG TAC GCT GAT ATC
 -14 A S M F V F S I A T N A Y A D I
 461 CAG ATG ACC CAG TCC CCG AGC TCC CTG TCC GCC TCT GTG GGC GAT AGG
 3 Q M T Q S P S L S A S V G D R
 509 GTC ACC ATC ACC TGT CGT GCC AGT CAG GAC ATC AAC AAT TAT CTG AAC
 19 V T I T C R A S Q D I N N Y L N
 557 TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA AAA GCT CCG AAA CTA CTG ATT TAC TAT
 35 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y Y
 605 ACC TCC ACC CTC CAC TCT GGA GTC CCT TCT CGC TTC TCT GGT TCT GGT
 51 T S T L H S G V P S R F S G S G

【図 4 A - 2】

653 TCT GGG AGC GAT TAC ACT CTG ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCG GAG GAC
 67 S G T D Y T L T I S S L Q P E D
 701 TTC GCA ACT TAT TAC TGT CAG CAA GGT AAT ACT CTG CCG CCG AGC TTC
 83 F A T Y Y C Q G N T L P P T F
 749 GGA CAG GGC AGC AAG GTG GAG ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT
 99 G Q T K V E I K R T V A A P S
 797 GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC
 115 V F I F P P S D E Q L K S G T A
 845 TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA
 131 S V V C L N F Y P R E A K V
 893 CAG TGG AAG GTG GAT AAC GGC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT
 147 Q W K V D N A L Q S G N S Q E S
 941 GTC ACA CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
 163 V T E Q D S K D S T Y S L S T
 989 CTG AGC CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC
 179 L T L S K A D Y E K H K V Y A C
 1037 GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC
 195 E V T H Q G L S S P V T K S F N
 1085 AGG GGA GAG TGT TAA G CTGATCTCT ACGCGGACG CATCGTGGCG
 211 R G E C

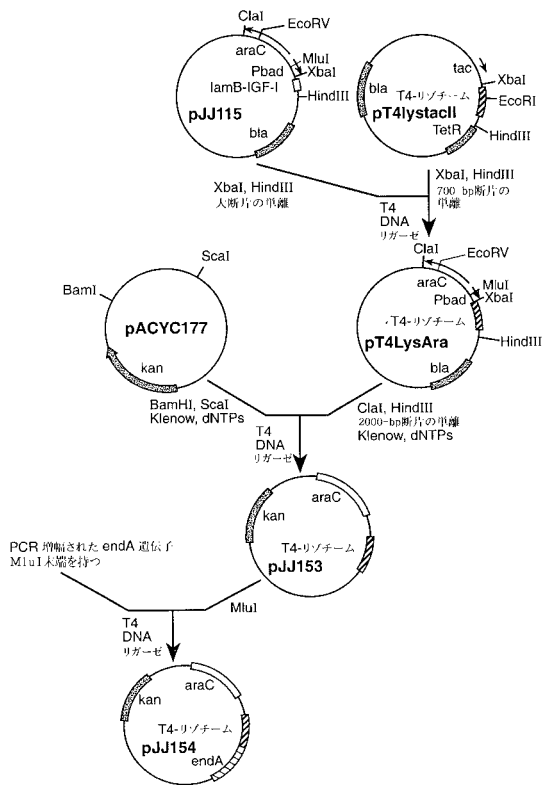
【図 4 B - 1】

1131 CTAGTACGCA AGTTCACGTA AAAACGGTAT CTAGAGGTG AGGTGATTTT ATG AAA
 -23 M K
 1187 AAG AAT ATC GCA TTT CTT GCA TCT ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT
 -21 K N I A F L L A S M F V F S I A
 1235 ACA AAC GCG TAC GCT GAG GTT CAG GTG GAG TCT GGC GGT GGC CTG
 -5 T N A Y A E V Q L V E S G G L
 1283 GTG CAG CCA GGG GGC TCA CTC CGT TTG TCC TGT GCA ACT TCT GGC TAC
 12 V Q P G G S L R L S C A T S G Y
 1331 ACC TTT ACC GAA TAC ACT ATG CAC TGG ATG CGT CAG GCC CGG GGT AAG
 28 T F T E Y T M H W M R Q A P G K
 1379 GGC CTG GAA TGG GTT GCA GGG ATT AAT CCT AAA AAC GGT ACC ACC AGC
 44 G L E W V A G I N P K N G G T S
 1427 CAC AAC CAG AGG TTC ATG GAC CGT TTC ACT ATA AGC GTA GAT AAA TCC
 60 H N Q R F D R F I I S V D K S
 1475 ACC AGT ACA GCC TAC ATG CAA ATG AAC AGC CTG CGT GCT GAG GAC ACT
 76 T S T A Y M Q M N S L R A E D I
 1523 GCC GTC TAT TAT TGT GCT AGA TGG CGA GGC CTG AAC TAC GGC TTT GAC
 92 A V Y C A R W R G L N Y G F D
 1571 GTC CGT TAT TTT GAC GTC TGG GGT CAA GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC
 108 V R Y F D V W G Q G T L V T V S
 1619 TCG GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC
 124 S A S T K G P S V F P L A P S S

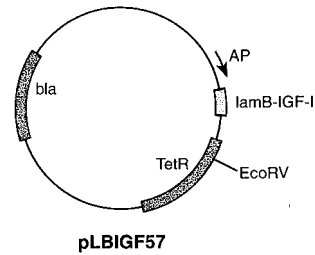
【図 4 B - 2】

1667 AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAC GAC
 140 K S T S G G T A L G C L V K D
 1715 TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC
 156 Y F P E P V T V S W N S G A L T
 1763 AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC
 172 S G V H T F P A V L Q S S G L Y
 1811 TCC CTC AGC AGC GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG
 188 S L S S V V T V P S S S L G T Q
 1859 ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAC CCC AGC AAC ACC AAG GTC GAC
 204 T Y I C N V N H K P S N T K V D
 1907 AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCG CCG
 220 K K V E P K S C D K T H T C P P
 1955 TGC CCA GCA CCA GAA CTG GGC GGC CGC ATG AAA CAG CTA GAG GAC
 236 C P A P E L L G G R M K Q L E D
 2003 AAG GTC GAA GAG CTA CTC TCC AAG AAC TAC CAC CTA GAG AAT GAA GTG
 252 K V E E L L S K N Y H L E N E V
 2051 GCA AGA CTC AAA AAG CTT GTC GGG GAG CGC TAA GCATGCG ACGGCCCTAG
 268 A R L K K L V G E R
 2101 AGTCCCTAAC GCTCGGTGC CGCCGGGCGT TTTTATTGT TAA

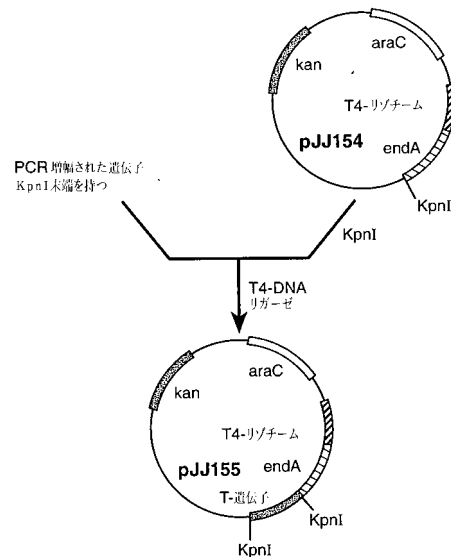
【図 5】



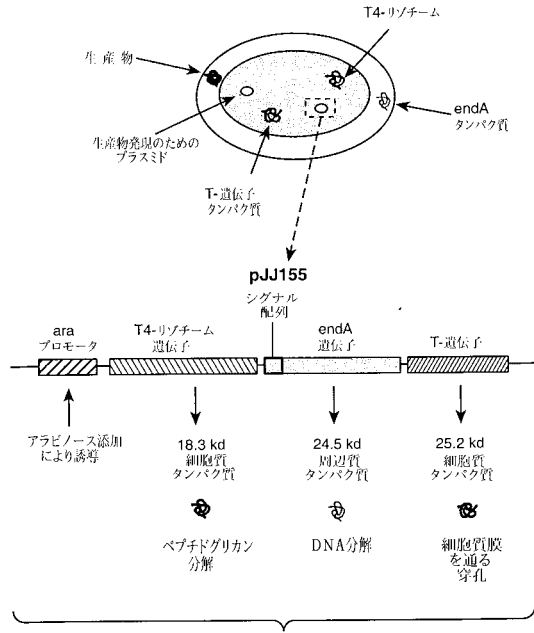
【図 6】



【図 7】



【図 8】



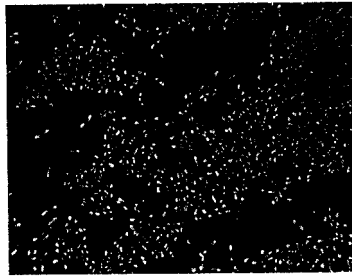
【図 9 A】

EDTA添加前の対照プロス
再懸濁ペレット



【図 9 B】

EDTA添加後の対照プロス
再懸濁ペレット



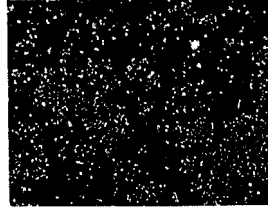
【図 9 C】

プロスとT4-リゾチーム+endA+
t-遺伝子同時発現発酵収穫全プロス
-非希釈の全プロス



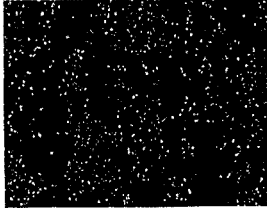
【図 9 E】

プロスとT4-リゾチーム+endA
+t-遺伝子同時発現EDTA添加後
-再懸濁ペレット

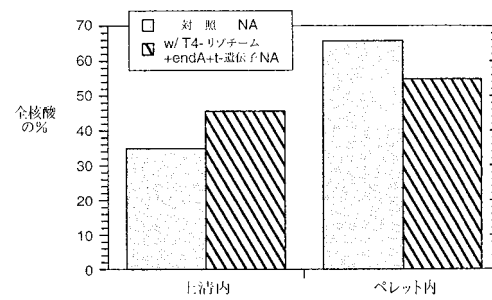


【図 9 D】

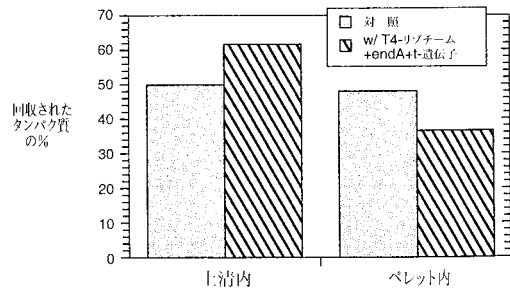
プロスとT4-リゾチーム+endA
+t-遺伝子同時発現EDTA添加前
-再懸濁ペレット



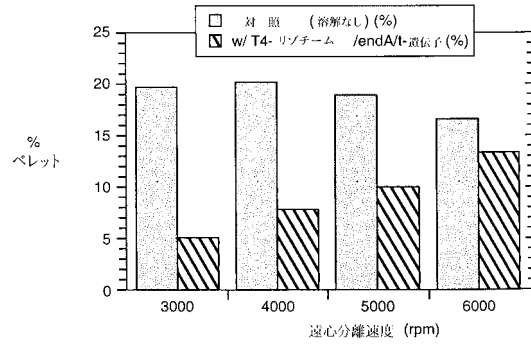
【図 10 A】



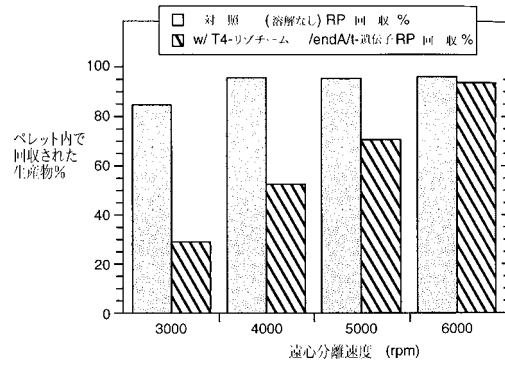
【図 10B】



【図 12】



【図 11】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I
C 1 2 P 21/08 C 1 2 P 21/08
C 1 2 N 15/00 Z N A A

(72)発明者 ルング、ウォンーラム、スーザン
アメリカ合衆国カリフォルニア94403、サン・マテオ、ケスタ・アベニュー609番

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 Journal of Biothchnology,1996,Vol.49,p.231-238

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)
C12N 15/00-15/90
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
CA(STN)