

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6136236号
(P6136236)

(45) 発行日 平成29年5月31日 (2017.5.31)

(24) 登録日 平成29年5月12日 (2017.5.12)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 1/18 (2006.01)

C O 7 K 1/18 Z N A

C O 7 K 1/22 (2006.01)

C O 7 K 1/22

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 21/00 (2006.01)

C 1 2 P 21/00 C

C O 7 K 14/47 (2006.01)

C O 7 K 14/47

請求項の数 5 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2012-276858 (P2012-276858)
 (22) 出願日 平成24年12月19日 (2012.12.19)
 (65) 公開番号 特開2014-118402 (P2014-118402A)
 (43) 公開日 平成26年6月30日 (2014.6.30)
 審査請求日 平成27年11月18日 (2015.11.18)

(73) 特許権者 000003300
 東ソー株式会社
 山口県周南市開成町4560番地
 (72) 発明者 寺尾 陽介
 神奈川県綾瀬市早川2743-1 東ソー
 株式会社 東京研究センター内
 (72) 発明者 半澤 敏
 神奈川県綾瀬市早川2743-1 東ソー
 株式会社 東京研究センター内

審査官 高山 敏充

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えタンパク質の精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで大腸菌を形質転換して得られる組換え大腸菌の抽出物から、クロマトグラフィーにより前記タンパク質を精製する方法であって、

前記抽出物に第四級アンモニウム塩を添加してから前記クロマトグラフィーによる精製を行ない、かつ前記クロマトグラフィーによる精製が、陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製を少なくとも含みかつ第四級アンモニウム塩が前記抽出物に含まれるエンドトキシンを吸着したものを除去することを少なくとも含む、前記精製方法。

【請求項2】

第四級アンモニウム塩が臭化セチルトリメチルアンモニウムである、請求項1に記載の精製方法。

【請求項3】

陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製が、カルボキシメチル基を導入した担体を用いた精製である、請求項1または2のいずれかに記載の精製方法。

【請求項4】

タンパク質がヒトFc結合性タンパク質である、請求項1から3のいずれかに記載の精製方法。

【請求項5】

ヒトFc結合性タンパク質が、

10

20

配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 16 番目のグルタミンから 289 番目のバリンまでのアミノ酸を含むタンパク質である、
請求項 4 に記載の精製方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、異種タンパク質を発現可能な大腸菌の培養液から、前記タンパク質を精製する方法に関する。特に本発明は、前記培養液からエンドトキシン含量の少ない前記タンパク質を取得するための精製方法に関する。

【背景技術】

【0002】

遺伝子工学的手法を用いて大腸菌で異種タンパク質を発現させる場合、大腸菌をはじめとするグラム陰性菌には、細胞膜の構成成分であるリポ多糖やタンパク質の複合体からなるエンドトキシンが多く含まれている。エンドトキシンは哺乳類の体内に混入すると、発熱を促すサイトカインを放出したり、細胞死を誘発するなど毒性を示す（非特許文献 1）。そのため大腸菌で発現した異種タンパク質を、特に医薬品用途で使用する際は、毒素ショックを避ける意味でも、前記タンパク質へのエンドトキシンの混入を避ける必要がある。

【0003】

エンドトキシンを除去する従来の方法として、活性炭やエンドトキシンを特異的に吸着する多孔体で吸着除去する方法（特許文献 1 および 2）や、限外ろ過膜やろ過助剤を利用したろ過法（特許文献 3）などが知られている。しかしながらこれらの方法は、吸着によるタンパク質の失活や収量の低下が問題であった。また、エンドトキシンを完全に失活する方法として、250℃で 30 分以上加熱する方法（第十四改正日本薬局方エンドトキシン試験法）や、酸/塩基によりエンドトキシンを分解する方法（特許文献 4）が知られているが、これらの方法もタンパク質の失活や分解の問題を有していた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開平 6 - 116298 号公報

【特許文献 2】特開 2011 - 101846 号公報

【特許文献 3】特開 2008 - 088314 号公報

【特許文献 4】特開昭 58 - 073371 号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】Y. Nakagawa 等, J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater., 66B, 347, 2003

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、異種タンパク質を発現可能な大腸菌の培養液から、エンドトキシン含量の少ない前記タンパク質を取得するための精製方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは前記課題を解決するために鋭意検討した結果、異種タンパク質を発現可能な大腸菌の抽出物から前記タンパク質を精製する際に、前記抽出物に第四級アンモニウム塩を添加してから、陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製を少なくとも含むクロマトグラフィーによる精製を行なうことで、エンドトキシン含量の少ない前記タンパク質を取得できることを見出し、本発明の完成に至った。

【0008】

すなわち本発明は、以下の発明を包含する：

(i) タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで大腸菌を形質転換して得られる組換え大腸菌の抽出物から、クロマトグラフィーにより前記タンパク質を精製する方法であって、前記抽出物に第四級アンモニウム塩を添加してから前記クロマトグラフィーによる精製を行ない、かつ前記クロマトグラフィーによる精製が陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製を少なくとも含む、前記精製方法。

【 0 0 0 9 】

(i i) 第四級アンモニウム塩が臭化セチルトリメチルアンモニウム塩である、(i) に記載の精製方法。

【 0 0 1 0 】

(i i i) 陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製が、カルボキシメチル基を導入した担体を用いた精製である、(i) または(i i) のいずれかに記載の精製方法。

【 0 0 1 1 】

(i v) タンパク質がヒト F c 結合性タンパク質である、(i) から(i i i) のいずれかに記載の精製方法。

【 0 0 1 2 】

(v) ヒト F c 結合性タンパク質が、(1) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 1 6 番目のグルタミンから 2 8 9 番目のバリンまでのアミノ酸を含むタンパク質、または(2) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも 1 6 番目のグルタミンから 2 8 9 番目のバリンまでのアミノ酸を含み、かつ前記アミノ酸のうちの一つ以上が他のアミノ酸に置換、挿入または欠失したタンパク質である、(i v) に記載の精製方法。

【 0 0 1 3 】

(v i) ヒト F c 結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで大腸菌を形質転換して得られる組換え大腸菌の抽出物に第四級アンモニウム塩を添加後、陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製を少なくとも含むクロマトグラフィーによる精製を行なうことで得られた、ヒト F c 結合性タンパク質。

【 0 0 1 4 】

(v i i) (v i) に記載のヒト F c 結合性タンパク質を担体に固定化して得られる、免疫グロブリン吸着剤。

【 0 0 1 5 】

以下に、本発明を詳細に説明する。

【 0 0 1 6 】

本発明は、タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで大腸菌を形質転換して得られる組換え大腸菌の抽出物から、クロマトグラフィーにより前記タンパク質を精製する際、前記抽出物に第四級アンモニウム塩を添加してから前記クロマトグラフィーによる精製を行ない、かつ前記クロマトグラフィーによる精製が陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製を少なくとも含むことを特徴としている。

【 0 0 1 7 】

本発明における、組換え大腸菌の抽出物は、組換え大腸菌の培養液を遠心分離して得られる菌体を適切な緩衝液で懸濁してから細胞を破碎（物理的破碎、薬剤による破碎等）後、遠心分離により破碎残渣を除去することで取得することができる。破碎に用いる薬剤の一例として、1 5 0 m M N a C l と 1 m M E D T A と 6 m M M g S O ₄ と 2 5 0 U / L B e n z o n a s e（商品名）と 0 . 3 g / L L y s o z y m e と 0 . 2 % T r i t o n X - 1 0 0（商品名）と 0 . 0 5 % デオキシコール酸ナトリウムと 5 0 m M C a C l ₂ を含む 5 0 m M T r i s - H C l（p H 8 . 0）があげられる。なお、細胞破碎後、p H 2 . 5 から p H 5 . 0 の条件下で酸処理すると、破碎液に含まれる夾雑タンパク質が効率的に除去できるため、好ましい（特願 2 0 1 2 - 2 4 4 4 3 5 号）。

【 0 0 1 8 】

本発明の特徴の一つである、組換え大腸菌の抽出物に添加する第四級アンモニウム塩は、負電荷に帯電しているエンドトキシンを吸着除去できることが期待される。第四級アン

10

20

30

40

50

モニウム塩の例としては、塩化ステアリルトリメチルアンモニウム、塩化ラウリルトリメチルアンモニウム、臭化ラウリルトリメチルアンモニウム、臭化セチルトリメチルアンモニウム等のアルキルトリメチルアンモニウム塩、塩化ジステアリルジメチルアンモニウム塩等のジアルキルジメチルアンモニウム塩、塩化セチルピリジウム等のアルキルピリジウム塩、アルキルジメチルベンジルアンモニウム塩、塩化ベンゼトニウム、塩化ベンザルコニウムがあげられる。この中でも、臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）が本発明で用いる第四級アンモニウム塩として好ましい。

【0019】

第四級アンモニウム塩の添加濃度については、抽出物中の夾雑物の影響や臨界ミセル濃度などを考慮し、適宜設定すればよく、一例としてCTABの場合、終濃度で0.05%（w/v）から2%（w/v）の間、好ましくは終濃度0.1%（w/v）から1%（w/v）の間、特に好ましくは終濃度0.3%（w/v）から0.7%（w/v）の間である。

10

【0020】

本発明では、組換え大腸菌の抽出物に第四級アンモニウム塩を添加した後は、クロマトグラフィーによる精製を行なうが、その際、陽イオンクロマトグラフィーによる精製を少なくとも含むことを特徴としている。陽イオンクロマトグラフィーによる精製で用いる担体の一例として、TOYOPEARL CM-650（東ソー製）やCM Sepharose Fast Flow（GEヘルスケア製）といったカルボキシメチル基を導入した担体や、TOYOPEARL SP-650（東ソー製）といったスルホプロピル基を導入した担体があげられる。中でも、カルボキシメチル基を導入した担体を用いて陽イオンクロマトグラフィーによる精製を行なうと好ましい。なお陽イオンクロマトグラフィーによる精製において、組換え大腸菌の抽出物や溶出に用いる緩衝液に尿素を添加すると、高純度かつ高い回収率でFc結合性タンパク質を精製することができるため好ましい（特願2011-126084号）。

20

【0021】

なお本発明における、クロマトグラフィーによる精製は、陽イオンクロマトグラフィーによる精製を少なくとも含んでいればよく、陽イオンクロマトグラフィー以外の原理を利用したクロマトグラフィーによる精製をさらに行なってもよい。特に、疎水クロマトグラフィーによる精製をさらに行なうと、組換え大腸菌の抽出物に含まれる夾雑物を効率的に除去できるため好ましい。疎水クロマトグラフィーによる精製で用いる担体の一例として、TOYOPEARL Ether-650（東ソー製）といったエーテル基を導入した担体や、TOYOPEARL Phenyl-650（東ソー製）といったフェニル基を導入した担体や、TOYOPEARL Butyl-650（東ソー製）といったブチル基を導入した担体があげられる。中でも、フェニル基を導入した担体を用いて疎水クロマトグラフィーによる精製を行なうと好ましい。

30

【0022】

クロマトグラフィーによる精製を行なう際は、精製対象溶液に含まれるタンパク量や各クロマトグラフィー用担体が有するタンパク吸着性能を考慮して決定した量の前記担体を、適切なオープンカラム等に充填して行なえばよい。また、クロマトグラフィー用担体は、精製対象溶液を導入する前に、あらかじめ適切な緩衝液（トリス/塩酸緩衝液、グリシン/水酸化ナトリウム緩衝液、リン酸緩衝液等）により平衡化しておくともよい。

40

【0023】

本発明で精製したタンパク質の分析方法は、従来から知られている安定かつ効率的に定量できる方法の中から適宜選択すればよい。例えば、タンパク質濃度の測定はBio-Rad Protein Assay（BioRad製）等の市販のキットを用いればよく、精製溶液中に含まれるエンドキシンの測定もEndosafe-PTS（和光純薬製）等の市販のキットを用いればよい。

【0024】

本発明の方法で精製するタンパク質は、タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含

50

むベクターを用いて大腸菌を形質転換して得られた組換え大腸菌の菌体内に発現するタンパク質であれば特に限定されない。ここでは前記タンパク質の一例である、ヒトFc結合性タンパク質について詳細に説明する。

【0025】

本明細書においてヒトFc結合性タンパク質は、ヒトFcRIの細胞外領域（具体的には天然型ヒトFcRIの場合、配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち16番目から292番目までの領域（図1ではEC領域））を構成するタンパク質のことをいう。ただし必ずしもヒトFcRI細胞外領域の全領域でなくてもよく、ヒトFcRI細胞外領域を構成するポリペプチドのうち、少なくとも抗体（免疫グロブリンG）のFc領域に結合する本来の機能を発現し得る領域のポリペプチドを含んでいればよい。当該ヒトFc結合性タンパク質の一例として、

（i）配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも16番目のグルタミンから289番目のバリンまでのアミノ酸を含むタンパク質や、
（ii）配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも16番目のグルタミンから289番目のバリンまでのアミノ酸を含み、かつ前記アミノ酸のうちの一つ以上が他のアミノ酸に置換、挿入または欠失したタンパク質、
があげられる。前記（ii）の具体例としては、特開2011-206046号公報に開示のヒトFc結合性タンパク質があげられる。

【0026】

本発明の精製方法で得られたタンパク質は、宿主（大腸菌）に多く含まれるエンドトキシンの含有量が大幅に削減されている。そのため、本発明の精製方法により得られたヒトFc結合性タンパク質は、医薬品、バイオセンサー、臨床検査薬等の医薬品用途での利用が可能となる。特に本発明の精製方法で得られたヒトFc結合性タンパク質を担体に固定化すると、抗体医薬といった、医薬品用途で利用する免疫グロブリンを精製するための吸着剤としての利用ができるため好ましい。

【発明の効果】

【0027】

本発明は、タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで大腸菌を形質転換して得られる組換え大腸菌の抽出物から、クロマトグラフィーにより前記タンパク質を精製する方法において、前記抽出物に第四級アンモニウム塩を添加してから前記クロマトグラフィーによる精製を行ない、かつ前記クロマトグラフィーによる精製が陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製を少なくとも含むことを特徴とする。本発明の精製方法は、組換え大腸菌の抽出物に多く含まれる、リボ多糖やタンパク質の複合体等のエンドトキシンを効果的に削減することができる。そのため、本発明の精製方法により得られた前記タンパク質は、医薬品用途目的に利用することができる。また本発明の精製方法は、スケールに関係なく実施できることから、前記タンパク質を工業的に生産する場合においても有用である。

【0028】

特に、前記タンパク質がヒトFc結合性タンパク質の場合、本発明の精製方法で得られたヒトFc結合性タンパク質を担体に固定化することで、抗体医薬等医薬品用途で使用する免疫グロブリン吸着剤を製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】ヒト型FcRIの構造を示す図。

【実施例】

【0030】

以下、ヒトFc結合性タンパク質の精製を例として、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0031】

実施例1

10

20

30

40

50

(1) ヒトFc結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで大腸菌を形質転換して得られた組換え大腸菌を、特開2012-034591号公報に記載の方法で培養することで、前記タンパク質を発現させた。

(2) 組換え大腸菌の培養液より菌体を回収後、抽出液(650mM NaCl、1mM EDTA、6mM MgSO₄、250U/L Benzonase(商品名)、0.05g/L Lysozyme、0.4% Triton X-100(商品名)および50mM CaCl₂を含む50mM Tris-HCl(pH8.0))を添加して回収した菌体を懸濁させ、さらに臭化セチルトリメチルアンモニウム塩(CTAB)を終濃度で0.5%(w/v)添加して攪拌することで、菌体内に発現した前記タンパク質を抽出した。

10

(3) (2)で得られた菌体抽出液に、酢酸を、液のpHが3.5となるよう、攪拌しながら滴下することで酸処理を行ない、遠心分離により回収した上清を酸処理液とした。

(4) 酸処理液に尿素を終濃度1mol/Lとなるよう添加後、あらかじめ平衡化緩衝液A(1mol/L 尿素を含む20mmol/L リン酸緩衝液(pH 6.0))で平衡化した、陽イオン交換クロマトグラフィー用ゲル(TOYOPEARL CM-650、東ソー製)を充填したカラムに添加し、平衡化緩衝液Aで十分洗浄後、1mol/L NaClを含む平衡化緩衝液AでFc結合性タンパク質を溶出した。

(5) (4)の溶出液を、特開2011-126827号に記載の疎水クロマトグラフィーを用いた方法によりヒトFc結合性タンパク質を精製した。

(6) あらかじめ平衡化緩衝液B(脱エンドトキシン化した20mM リン酸緩衝液(pH 7.0))で平衡化した、陽イオン交換クロマトグラフィー用ゲル(TOYOPEARL CM-650、東ソー製)を充填したカラムに、(5)で精製したFc結合性タンパク質溶液を添加した。

20

(7) 平衡化緩衝液Bで十分量洗浄後、脱エンドトキシン化した1M NaClを含む平衡化緩衝液Bで溶出することで、高度に精製したヒトFc結合性タンパク質を含む溶液を得た。

(8) タンパク質濃度をProtein Assay Reagent(バイオラッド社製)で、エンドトキシン濃度をEndosafe-PTS(和光純薬社製)で、それぞれ測定したところ、タンパク質あたりのエンドトキシン含有量は3.4EU/mgであった(EU:エンドトキシン活性単位)。

30

【0032】

実施例2

実施例1の(2)で添加するCTABを終濃度で0.1%(w/v)とした他は、実施例1と同様の実験を行なった。結果、7.5EU/mgであった。

【0033】

実施例3

実施例1の(2)で添加するCTABを終濃度で1%(w/v)とした他は、実施例1と同様の実験を行なった。結果、5.9EU/mgであった。

【0034】

比較例1

実施例1(2)でCTABを添加しない他は、実施例1と同様の実験を行なった。結果、エンドトキシン含有量は>100EU/mgであった。

40

【0035】

比較例2

実施例1(4)および実施例1(6)に記載の陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行なわない他は、実施例1と同様の実験を行なった。結果、エンドトキシン含有量は>10000EU/mgであった。

【0036】

実施例および比較例の結果をまとめたものを表1に示す。タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで大腸菌を形質転換して得られる組換え大腸菌の抽出物

50

からクロマトグラフィーにより前記タンパク質を精製する際、前記抽出物に第四級アンモニウム塩であるCTABを添加後、陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製を含むクロマトグラフィーによる精製を行なうことで、組換え大腸菌により得られた異種タンパク質であっても、エンドトキシンの含有がほとんどない異種タンパク質を製造することができる。

【0037】

【表1】

| | 精製条件 | | エンドトキシン濃度 [EC/mg] |
|------|-------------------|---------------------|----------------------|
| | CTAB [% (w/v)] | 陽イオン交換 クロマトグラフィー | |
| 実施例1 | 0.5 | 実施 | 3.4 |
| 実施例2 | 0.1 | 実施 | 7.5 |
| 実施例3 | 1 | 実施 | 5.9 |
| 比較例1 | 添加せず ^a | 実施 | >100 |
| 比較例2 | 0.5 | 実施せず ^a | >10000 |

10

20

【図1】

| | | | | |
|---------------|--------------|--------------|-------------|-----|
| 1 | 15 16 | 292 293 | 313 314 | 374 |
| SS: シグナル配列 | EC: 細胞外領域 | TM: 膜貫通領域 | C: 細胞内領域 | |

【配列表】

0006136236000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 特開2000-072659(JP,A)
特開2011-206046(JP,A)
特開2011-153152(JP,A)
特表2011-515387(JP,A)
特表2008-528035(JP,A)
特開平8-19736(JP,A)
米国特許出願公開第2005/0080245(US,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-19/00
C12N 15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Japio-GPG/FX