

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6116565号
(P6116565)

(45) 発行日 平成29年4月19日 (2017. 4. 19)

(24) 登録日 平成29年3月31日 (2017. 3. 31)

(51) Int. Cl.			F I		
C07K	1/18	(2006.01)	C07K	1/18	ZNA
C12P	21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C
C07K	16/28	(2006.01)	C07K	16/28	
C07K	19/00	(2006.01)	C07K	19/00	

請求項の数 13 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2014-526457 (P2014-526457)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成24年8月17日 (2012. 8. 17)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2014-524453 (P2014-524453A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成26年9月22日 (2014. 9. 22)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/066135		T
(87) 国際公開番号	W02013/026803		スイス・シーエイチー4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成25年2月28日 (2013. 2. 28)		グレンツァーヘルストラツセ124
審査請求日	平成27年8月3日 (2015. 8. 3)	(74) 代理人	110001508
(31) 優先権主張番号	11178745.3		特許業務法人 津国
(32) 優先日	平成23年8月25日 (2011. 8. 25)	(74) 代理人	100078662
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 津国 肇
(31) 優先権主張番号	11183862.9	(74) 代理人	100131808
(32) 優先日	平成23年10月4日 (2011. 10. 4)		弁理士 柳橋 泰雄
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100135873
			弁理士 小澤 圭子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 陽イオンおよび陰イオン交換クロマトグラフィー法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリペプチドを精製するための方法であって、以下の工程：

- 勾配をつけた変性剤を含む溶液を用いて一定の伝導率及び一定のpHでイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチドを回収し、それによってポリペプチドを精製する工程であって、該変性剤が尿素または尿素誘導体である、工程を含み、

該イオン交換クロマトグラフィー材料が、イオン性リガンドが結合された架橋ポリ(スチレン-ジビニルベンゼン)のマトリックスを含む、方法。

【請求項2】

ポリペプチドを産生するための方法であって、以下の工程：

- ポリペプチドをコードする核酸を含む原核または真核細胞を培養する工程、
- 細胞またはノおよび培養培地からポリペプチドを回収する工程、
- 以下の工程を含むイオン交換クロマトグラフィー法でポリペプチドを精製する工程：

- 勾配をつけた変性剤を含む溶液を用いて一定の伝導率及び一定のpHでイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチドを回収し、それによってポリペプチドを産生する工程であって、該変性剤が尿素または尿素誘導体である、工程を含み、

該イオン交換クロマトグラフィー材料が、イオン性リガンドが結合された架橋ポリ(ス

チレン - ジビニルベンゼン) のマトリックスを含む、方法。

【請求項 3】

イオン交換クロマトグラフィー材料が、陽イオン交換クロマトグラフィー材料であることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

イオン性リガンドが、スルホプロピルリガンドまたはカルボキシメチルリガンドであることを特徴とする、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

イオン交換クロマトグラフィー材料が、陰イオン交換クロマトグラフィー材料であることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の方法。

10

【請求項 6】

イオン性リガンドが、エチレンイミンリガンドまたは四級化リガンドであることを特徴とする、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の方法であって、以下の工程：

- 勾配をつけた変性剤を含む溶液を適用することによって、第 1 のイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチドを回収する工程、

- 回収されたポリペプチドを第 2 のイオン交換クロマトグラフィー材料に適用する工程、および

- 勾配をつけた変性剤を含む溶液を一定の伝導率及び一定の pH で適用することによって、第 2 のイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチドを回収し、それによってポリペプチドを得るまたは精製する工程であって、該変性剤が尿素または尿素誘導体である、工程

20

を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 8】

第 1 のイオン交換クロマトグラフィー材料が陰イオン交換クロマトグラフィー材料であり、かつ第 2 のイオン交換クロマトグラフィー材料が陽イオン交換クロマトグラフィー材料であるか、または

第 1 のイオン交換クロマトグラフィー材料が陽イオン交換クロマトグラフィー材料であり、かつ第 2 のイオン交換クロマトグラフィー材料が陰イオン交換クロマトグラフィー材料である

30

ことを特徴とする、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

回収されたポリペプチドが、第 2 のイオン交換クロマトグラフィー材料への適用前にリフォールディングされることを特徴とする、請求項 7 または 8 記載の方法。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の方法であって、精製工程が、以下の工程：

- 第 1 の溶液をイオン交換クロマトグラフィー材料に適用する工程、

- ポリペプチドを含む第 2 の溶液をイオン交換クロマトグラフィー材料に適用する工程、および

40

- 変性剤を含む第 4 の溶液でポリペプチドを回収し、それによってポリペプチドを産生または精製する工程

を含み、

第 1 の溶液が第 1 の緩衝物質を含み、第 2 の溶液が第 2 の緩衝物質を含み、第 4 の溶液が第 4 の緩衝物質を含み、ここで、第 4 の緩衝物質が変性剤を含む、方法。

【請求項 11】

請求項 10 記載の方法であって、第 2 の溶液の適用後で第 4 の溶液の適用前に、以下の工程：

- 第 3 の溶液をイオン交換クロマトグラフィー材料に適用する工程

を含むことを特徴とし、

50

第3の溶液が、第3の緩衝物質を含む、方法。

【請求項12】

ポリペプチドが、配列番号01、配列番号02、配列番号03、および配列番号04のアミノ酸配列の群より選択されるアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項1~11のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

架橋ポリ(スチレン-ジビニルベンゼン)のマトリックスを含むイオン交換クロマトグラフィー材料から一定の伝導率及び一定のpHでポリペプチドを回収することにおける、勾配をつけた尿素または尿素誘導体の使用。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本明細書において、変性剤を含む溶液を用いてイオンクロマトグラフィー材料からポリペプチドを溶離することによる、ポリペプチドの精製のためのイオン交換クロマトグラフィー法が報告されている。

【0002】

発明の背景

タンパク質は、今日の医学ポートフォリオにおいて重要な役割を果たしている。リコンビナントポリペプチドの産生のための発現系は、技術の現状において周知である。薬学的適用に使用するためのポリペプチドは、主として、E.coliなどの原核細胞、およびCHO細胞、NS0細胞、Sp2/0細胞、COS細胞、HEK細胞、BHK細胞、PER.C6(登録商標)細胞などの哺乳動物細胞で産生される。

20

【0003】

ヒトへの適用のために、あらゆる薬学的物質が明確な基準を満たさなければならない。ヒトへの生物学的製剤の安全性を確保するために、例えば、重大な危害を及ぼすおそれのある核酸、ウイルス、および宿主細胞タンパク質を除去しなければならない。規制上の規格を満たすために、一つまたは複数の精製工程が製造プロセスに続かなければならない。とりわけ、純度、処理量、および収率が、適切な精製プロセスを決定する際に重要な役割を果たす。

【0004】

30

微生物タンパク質(例えばプロテインAまたはプロテインGアフィニティークロマトグラフィー)を用いたアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー(例えば陽イオン交換(スルホプロピルまたはカルボキシメチル樹脂)、陰イオン交換(アミノエチル樹脂)および混合モードイオン交換)、チオフィリック(thiophilic)吸着(例えば、-メルカプトエタノールおよび他のSHリガンドを用いたもの)、疎水性相互作用または芳香族吸着クロマトグラフィー(例えば、フェニル-セファロース、アザ-アレノフィリック(aza-arenophilic)樹脂、またはm-アミノフェニルボロン酸を用いたもの)、金属キレートアフィニティークロマトグラフィー(例えば、Ni(II)-およびCu(II)-アフィニティー材料を用いたもの)、サイズ排除クロマトグラフィー、および電気泳動法など(ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動など)の様々な方法が十分に確立されており、タンパク質の精製のために広く使用されている(例えばVijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102参照)。

40

【0005】

Necina, R.ら(Biotechnol. Bioeng. 60 (1998) 689-698)は、高電荷密度を示すイオン交換媒体による細胞培養上清からの直接的なヒトモノクローナル抗体の捕捉を報告した。国際公開公報第89/05157号では、細胞培養培地を陽イオン交換処理に直接供することによる、産物免疫グロブリンを精製するための方法が報告されている。マウス腹水からのモノクローナルIgG抗体の一段階精製が、Danielsson, A., et al., J. Immun. Meth. 115 (1988) 79-88によって記載されている。イオン交換クロマトグラフィーによってポリペプチドを精製するための方法が、国際公開公報第2004/024866号に報

50

告されており、その方法では、一つまたは複数の混入物質から関心が持たれるポリペプチドを分割するために勾配洗浄が使用される。EP 0 530 447では、三つのクロマトグラフィー段階の組み合わせによりIgGモノクローナル抗体を精製するための工程が報告されている。Wangら (Wang, H., et al., Peptides 26 (2005) 1213-1218) は、二段階陽イオン交換クロマトグラフィーによる、E.coliに発現されたhTFF3の精製を報告している。

【0006】

国際公開公報第2010/063717号では、ポリペプチドの精製が報告されている。タンパク質の精製および同定が国際公開公報第2008/002235号に報告されている。Cole, D.R.は、尿素含有緩衝液でのインスリンのクロマトグラフィーを報告している (J. Biol. Chem. 235 (1960) 2294-2299。米国特許第4,129,560号では、非イオン系洗剤を用いた高分子量ペプチドの精製工程が報告されている。より低レベルのアイソフォーム不純物を有する成長ホルモンおよびそのアンタゴニストの調製方法が、国際公開公報第2004/031213号に報告されている。米国特許第6,451,987号では、タンパク質およびペプチドのイオン交換クロマトグラフィーが報告されている。インスリンを精製するための工程およびそのように調製されたインスリンが、EP 0 013 826に報告されている。

10

【0007】

発明の概要

ポリペプチドを、イオン交換クロマトグラフィー材料(陽イオンおよび/または陰イオン交換クロマトグラフィー材料)から、変性剤/カオトロピック剤を含む溶液を用いて、その際、イオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチドを回収する間、適用された溶液の伝導率は一定に維持され、すなわち、伝導率は一定に保たれて、回収できることが見出された。

20

【0008】

本明細書報告の一局面は、イオン交換クロマトグラフィーによって、結合および溶離モードでポリペプチドを得るまたは精製するための方法であって、以下の工程：

- 変性剤を含む溶液を適用することによって、イオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチドを回収する工程、およびそれによってポリペプチドを得るまたは精製する工程、ここで、イオン交換クロマトグラフィー材料が、イオン性リガンドが結合された架橋ポリ(スチレン-ジビニルベンゼン)のマトリックスを含む

30

を含む、方法である。

【0009】

一態様では、その方法は、以下の工程：

- 変性剤を含む溶液を適用することによって、第1のイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチドを回収する工程、

- 回収されたポリペプチドを第2のイオン交換クロマトグラフィー材料に適用する工程、および

- 変性剤を含む溶液を適用することによって、第2のイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチドを回収し、それによってポリペプチドを得るまたは精製する工程を含む。

40

【0010】

一態様では、第1のイオン交換クロマトグラフィー材料は陰イオン交換クロマトグラフィー材料であり、第2のイオン交換クロマトグラフィー材料は陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。

【0011】

一態様では、第1のイオン交換クロマトグラフィー材料は陽イオン交換クロマトグラフィー材料であり、第2のイオン交換クロマトグラフィー材料は陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。

【0012】

一態様では、変性剤は尿素または尿素誘導体である。

50

【 0 0 1 3 】

一態様では、変性剤は、2または3種の変性剤の混合物である。

【 0 0 1 4 】

一態様では、回収に適用される溶液は、一定の伝導率を有する。

【 0 0 1 5 】

一態様では、洗浄段階に適用される溶液は、一定の伝導率を有する。

【 0 0 1 6 】

一態様では、回収に適用される溶液は、一定のpH値を有する。

【 0 0 1 7 】

一態様では、洗浄工程に適用される溶液は、一定のpH値を有する。

10

【 0 0 1 8 】

一態様では、その方法は、以下の工程：

- ネイティブな形態のポリペプチドを含む溶液をイオン交換クロマトグラフィー材料に適用する工程、および
- 変性剤を含む溶液を適用することによってイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチドを回収し、それによってポリペプチドを得るまたは精製する工程を含む。

【 0 0 1 9 】

一態様では、イオン交換クロマトグラフィー材料は陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。一態様では、リガンドは、スルホプロピルまたはカルボキシメチルである。

20

【 0 0 2 0 】

一態様では、イオン交換クロマトグラフィー材料は陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。一態様では、リガンドはポリエチレンイミンまたは四級化エチレンイミンである。

【 0 0 2 1 】

一態様では、ポリペプチドは、抗体、または抗体フラグメント、または少なくとも1個の抗体ドメインを含む融合ポリペプチドである。

【 0 0 2 2 】

一態様では、ポリペプチドは、テトラネクチン(tetranectin) - アポリポタンパク質A - I融合タンパク質である。一態様では、テトラネクチン - アポリポタンパク質A - I融合タンパク質は、配列番号01、または配列番号02、または配列番号03、または配列番号04のアミノ酸配列を有する。

30

【 0 0 2 3 】

本明細書報告の一局面は、ポリペプチドを産生するための方法であって、以下の工程：

- ポリペプチドをコードする核酸を含む原核細胞または真核細胞を培養する工程、
- 細胞および/または培養培地からポリペプチドを回収する工程、
- ポリペプチドが封入体の形態で回収されたならば、ポリペプチドを可溶化および/またはリフォールディングする工程、
- 本明細書報告のイオン交換クロマトグラフィー法でポリペプチドを精製し、それによってポリペプチドを産生する工程を含む、方法である。

40

【 0 0 2 4 】

発明の詳細な説明

本明細書において、イオン交換クロマトグラフィー材料からのポリペプチドの回収に、変性剤を含む溶液が用いられ、回収工程に使用される溶液の伝導率が一定に維持される、ポリペプチドを精製するための結合および溶離モードで実施されたスケラブルイオン交換クロマトグラフィー法が報告されている。

【 0 0 2 5 】

用語「適用する」およびその文法的同義語は、関心が持たれる被精製物質を含有する溶液が固定相と接触される、精製法の一部工程を意味する。これは、a)固定相が位置し

50

ているクロマトグラフィー装置に溶液が添加されること、またはb) 関心が持たれる物質を含む溶液に固定相が添加されることを意味する。a) の場合、関心が持たれる被精製物質を含有する溶液が、固定相を通過し、固定相と溶液中の物質との間の相互作用が可能になる。例えばpH、伝導率、塩濃度、温度、および/または流速などの条件に応じて、溶液の一部の物質が固定相に結合され、それゆえに溶液から除去される。他の物質は溶液中に残る。溶液中に残っている物質は、通過画分中に見出すことができる。「通過画分」は、その起源に関係なく、クロマトグラフィー装置通過後に得られた溶液を意味する。通過画分は、関心が持たれる物質を含有する、適用された溶液、あるいはカラムをフラッシュするために使用される、または固定相に結合した1種もしくは複数の物質の溶離を引き起こすために使用される緩衝液のいずれかでありうる。一態様では、クロマトグラフィー装置は、カラムまたはカセットである。関心が持たれる物質を、精製された形態またはさらには実質的に均一な形態で得るために、精製工程の後に、関心が持たれる物質を例えば沈殿、塩析、限外濾過、ダイアフィルトレーション、凍結乾燥、アフィニティークロマトグラフィー、または溶媒体積減少などの当業者によく知られた方法によって溶液から回収することができる。b) の場合、固定相が、例えば固体として、関心が持たれる被精製物質を含有する溶液に添加され、固定相と溶液中の物質との間の相互作用が可能になる。相互作用の後に、固定相が例えば濾過によって除去され、関心が持たれる物質は、固定相に結合して固定相と共に溶液から除去されるか、または関心が持たれる物質は、固定相に結合せず、溶液中に残るかのいずれかである。

10

【0026】

20

本出願内で使用される用語「緩衝」は、酸性または塩基性物質の添加または有利によるpH変化が緩衝物質によってならされている溶液を意味する。そのような効果を招く任意の緩衝物質を使用することができる。一態様では、緩衝物質は、リン酸もしくはその塩、酢酸もしくはその塩、クエン酸もしくはその塩、モルホリン、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸もしくはその塩、イミダゾールもしくはその塩、ヒスチジンもしくはその塩、グリシンもしくはその塩、またはトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TRIS)もしくはその塩より選択される。一態様では、緩衝物質は、イミダゾールもしくはその塩またはヒスチジンもしくはその塩より選択される。場合により、緩衝溶液は、追加的な無機塩も含みうる。一態様では、無機塩は、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム、硫酸カリウム、クエン酸ナトリウム、およびクエン酸カリウムより選択される。

30

【0027】

「ポリペプチド」は、天然に産生されたものであると合成的に産生されたものであると、ペプチド結合によって結合したアミノ酸から成るポリマーである。約20個未満のアミノ酸残基のポリペプチドは、「ペプチド」と呼ぶことができ、一方で、2個以上のポリペプチドから成る分子または100個を超えるアミノ酸残基のポリペプチドを1個含む分子は、「タンパク質」と呼ぶことができる。ポリペプチドは、また、糖質基、金属イオン、またはカルボン酸エステルなどの非アミノ酸成分を含みうる。非アミノ酸成分は、ポリペプチドが発現される細胞によって付加される場合があり、細胞の種類に応じて変動しうる。ポリペプチドは、本明細書において、そのアミノ酸主鎖構造またはそれをコードする核酸に関して定義される。糖質基などの付加は、一般に明記されないが、それでもなお存在しうる。

40

【0028】

用語「抗体」は、少なくとも2本のポリペプチド軽鎖および2本のポリペプチド重鎖を含むタンパク質を意味する。各ポリペプチド重鎖および軽鎖は、抗原と相互作用するための結合ドメインを含む可変領域(一般にポリペプチド鎖のアミノ末端部分)を含む。各ポリペプチド重鎖および軽鎖は、また、多様な免疫系細胞、いくつかの食細胞および古典的補体系の第1成分(C1q)を含めた宿主組織または因子への抗体の結合を媒介しうる定常領域(一般にカルボキシル末端部分)を含む。典型的には、ポリペプチド軽鎖および重鎖は、それぞれ、本質的に可変領域、すなわちV_LまたはV_H、ならびに完全定常領域、すなわちポリペプチド軽鎖の場合はC_L、またはポリペプチド重鎖の場合はC_H1、C

50

H₂、C_H3、および場合によりC_H4から成る完全鎖である。本発明による抗体の可変領域は、他のアイソタイプの定常領域と接ぎ合わせることができる。例えば、あるアイソタイプの重鎖の可変領域をコードするポリヌクレオチドは、別の重鎖クラス（またはサブクラス）の定常領域をコードするポリヌクレオチドと接ぎ合わせることができる。

【0029】

抗体は、例えばF_v、F_ab、およびF_{(a}b)₂ならびに1本鎖を含めた多様な形態で存在しうる（例えばHuston, J.S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 5879-5883; Bird, R.E., et al., Science 242 (1988) 423-426; ならびに一般に、Hood, et al., Immunology, Benjamin N.Y., 2nd edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. (1984)、およびHunkapiller, T. and Hood, L., Nature 323 (1986) 15-16)。一態様では、抗体は、モノクローナル抗体、単離された重鎖もしくは軽鎖、または定常領域のみから成る重鎖もしくは軽鎖ばかりでなく、そのフラグメントより選択される。

10

【0030】

用語「一定」は、ある値が最大で10%の相対変化を有するレベルに維持されることを意味する。一態様では、回収工程における溶液の伝導率は、最大で±10%の変化で一定に維持される。一態様では、回収工程における溶液の伝導率は、最大で±5%の変化で一定に維持される。一態様では、回収工程における溶液の伝導率は、最大で±2%の変化で一定に維持される。

【0031】

用語「結合および溶離モード」は、クロマトグラフィー精製法を行う一方法を意味する。本明細書において、関心が持たれる被精製ポリペプチドを含有する溶液は、固定相、特に固相に適用され、その際、関心が持たれるポリペプチドは、固定相と相互作用し、その上に保持される。関心が持たれない物質は、それぞれ通過画分または上清と共に除去される。その後、関心が持たれるポリペプチドは、第2段階で溶離溶液を適用することによって固定相から回収される。

20

【0032】

用語「封入体」は、原核細胞の全ての細胞成分を含めた総細胞タンパク質のかなりの部分を構成する、関心が持たれる凝集ポリペプチドの密な細胞内塊を意味する。

【0033】

用語「変性」は、ネイティブな構造ではない二次、三次、および/または四次構造を有するポリペプチドの形態を意味する。この非ネイティブ形態のポリペプチドは、可溶性でありうるが、同時に生物学的に不活性なコンフォメーションでありうる。または、ポリペプチドは、不溶性であって、例えばミスマッチまたは未形成のジスルフィド結合を有する生物学的に不活性なコンフォメーションでありうる。この不溶性ポリペプチドは、封入体内に包含される場合があるが、その必要はない。

30

【0034】

用語「リフォールディングされた」は、変性形態から得られたポリペプチドを表す。典型的には、リフォールディングの目的は、リフォールディング工程なしに産生された場合にタンパク質が有するよりも高い活性レベルを有するタンパク質を産生することである。フォールディングされたタンパク質分子は、最小の自由エネルギーを有するコンフォメーションで最も安定である。大部分の水溶性タンパク質は、大部分の疎水性アミノ酸が水から離れて分子内部に入るようにフォールディングする。タンパク質を一緒に保持している弱い結合は、ポリペプチドをアンフォールディングさせる、すなわち変性させるいくつかの処理によって破壊することができる。フォールディングされたタンパク質は、アミノ酸自体とそれらの環境との間の、イオン結合、ファンデルワールス相互作用、水素結合、ジスルフィド結合および共有結合を含めた数種の相互作用の産物である。

40

【0035】

本明細書に使用される用語「変性（denaturedまたはdenaturized）」は、ネイティブな状態またはリフォールディングした状態の分子において存在するイオン結合および共有結

50

合ならびにファンデルワールス相互作用が破壊されたポリペプチドを表す。ポリペプチドの変性は、例えば、8 M 尿素、メルカプトエタノールなどの還元剤、熱、pH、温度および他の化学物質を用いた処理によって達成することができる。8 M 尿素などの試薬は、水素結合と疎水性結合との両方を破壊し、そしてメルカプトエタノールも添加された場合、システイン同士の間で形成されたジスルフィド架橋 (S - S) は、2 個の - S - H 基に還元される。同様に、ネイティブな状態またはリフォールディングした状態でジスルフィド結合を含むポリペプチドのリフォールディングは、タンパク質がジスルフィド結合を再形成するために、システイン残基上に存在する - S - H 基の酸化を要しうる。

【 0 0 3 6 】

互換的に使用できる用語「カオトロピック剤」または「変性剤」は、ポリペプチドの三次元構造を歪める化合物を意味する。この工程も変性と呼ばれる。カオトロピック剤は、水素結合またはファンデルワールス力などの非共有結合力によって相互作用を歪める / 破壊する。一態様では、カオトロピック剤は、ブタノール、エタノール、1 - および 2 - プロパノール、塩化グアニジニウム、塩化マグネシウム、ドデシル硫酸ナトリウム / ラウリル硫酸ナトリウム、尿素、およびチオ尿素を含む群より選択される。

【 0 0 3 7 】

用語「ネイティブな形態」は、ポリペプチドの形態であって、ポリペプチドがその生物学的活性を有する二次、三次、および / または四次構造を有する形態を意味する。

【 0 0 3 8 】

用語「イオン交換クロマトグラフィー材料」は、共有結合した荷電置換基を有する、固定された (immobile) 高分子量マトリックスを意味する。全体的な電荷中性のために、共有結合していない対イオンが、イオン相互作用によって荷電置換基と結合している。「イオン交換クロマトグラフィー材料」は、その共有結合していない対イオンを、周囲の溶液の同様に荷電した結合パートナーまたはイオンと交換する能力を有する。その交換可能な対イオンの電荷に応じて、「イオン交換クロマトグラフィー材料」は、「陽イオン交換クロマトグラフィー材料」または「陰イオン交換クロマトグラフィー材料」と呼ばれる。荷電基 (置換基) の性質に応じて、「イオン交換クロマトグラフィー材料」は、例えば陽イオン交換材料の場合、スルホン酸もしくはスルホプロピル樹脂 (S)、またはカルボキシメチル樹脂 (CM) と呼ばれる。荷電基 / 置換基の化学的性質に応じて、「イオン交換クロマトグラフィー材料」は、追加的に、共有結合した荷電置換基の強度に応じて強または弱イオン交換材料として分類することができる。例えば、強陽イオン交換材料は、荷電置換基としてスルホプロピル基などのスルホン酸基を有し、弱陽イオン交換材料は、荷電置換基としてカルボキシメチル基などのカルボン酸基を有する。強陰イオン交換材料は、第四級アンモニウム基を有し、弱陰イオン交換材料は、荷電置換基としてジエチルアミノエチル基を有する。

【 0 0 3 9 】

一般に、イオン交換クロマトグラフィー工程の位置は、ポリペプチドの多工程精製シーケンスの中で可変である。

【 0 0 4 0 】

ポリペプチドを精製するための方法は、十分に確立されており、広く使用されている。それらの方法は、単独で、または組み合わせて採用される。そのような方法は、例えば、錯体化した金属イオンを有するチオールリガンド (例えば Ni (II) - および Cu (II) - アフィニティー材料を用いたもの) または微生物由来タンパク質 (例えばプロテイン A またはプロテイン G アフィニティークロマトグラフィー) を用いたアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー (例えば陽イオン交換 (カルボキシメチル樹脂)、陰イオン交換 (アミノエチル樹脂) および混合モード交換クロマトグラフィー)、チオフィリック吸着 (例えば、メルカプトエタノールおよび他の SH リガンドを用いたもの)、疎水性相互作用または芳香族吸着クロマトグラフィー (例えば、フェニル - セファロース、アザ - アレノフィリック樹脂、または m - アミノフェニルボロン酸を用いたもの)、サイズ排除クロマトグラフィー、および分取用電気泳動法 (ゲル電気泳動

10

20

30

40

50

、キャピラリー電気泳動など)である。

【0041】

免疫グロブリンの精製プロセスは、一般に、多工程クロマトグラフィー部分を含む。第一工程では、非免疫グロブリン性のポリペプチドおよびタンパク質が、アフィニティークロマトグラフィーによって、例えばプロテインAを用いて免疫グロブリン画分から分離される。その後、イオン交換クロマトグラフィーを行うことができる。最終的に、第3のクロマトグラフィー工程を行って、免疫グロブリンモノマーを同クラスのマルチマーおよびフラグメントから分離することができる。時に、凝集物の量が高いので(5%以上)、第3の精製工程でそれらを効率的に分離することが不可能であり、さらなる精製工程が必要になる。

10

【0042】

ポリペプチドを、イオン性リガンドが結合された架橋ポリ(スチレン-ジビニルベンゼン)のマトリックスを含むイオン交換クロマトグラフィー材料から、変性剤を含む溶液を用いて、その際、回収の間、溶液の伝導率は一定に保たれて、回収できることが見出された。一般に、イオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチドを回収するために、イオン強度の増加が用いられるので、この発見は非常に意外であった。同時に、このクロマトグラフィー材料は、工業生産規模の分離のために十分な結合能を有する。

【0043】

したがって、本明細書報告の一局面は、ポリペプチドを得るまたは精製するための方法であって、以下の工程：

20

- 変性剤を含む溶液を適用することによってイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチドを回収し、それによってポリペプチドを得るまたは精製する工程、ここで、イオン交換クロマトグラフィー材料が、イオン性リガンドが結合された架橋ポリ(スチレン-ジビニルベンゼン)のマトリックスを含む、方法である。

【0044】

変性剤は、結合しているポリペプチドを回収するために使用されるので、イオン交換クロマトグラフィー材料に適用される、ポリペプチドを含む溶液は、変性剤を有さない。イオン交換クロマトグラフィー材料上に保持されるポリペプチドは、尿素または尿素誘導体などの変性剤を含む溶液を用いて一定の伝導率で回収される。

30

【0045】

それゆえに、本明細書報告の方法は、結合および溶離モードで実施され、すなわち、ポリペプチドは、最初にイオン交換クロマトグラフィー材料に結合され、その後、さらなる一工程でイオン交換クロマトグラフィー材料から回収される。間欠的な洗浄工程を本明細書報告の方法に含めることができる。これらの洗浄工程で、適用される溶液(1種または複数)は、実質的に変性剤を有さない。用語「実質的に変性剤を有さない」は、変性剤が、適用された(洗浄)溶液中に存在しうるが、イオン交換材料からポリペプチドを回収するために必要な濃度未満の濃度で存在しうることを意味する。

【0046】

本明細書報告の方法において、全ての溶液は、イオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチドを回収するための溶液を除き、変性剤を有さない、すなわち含有しない。一態様では、変性剤を含む溶液は水溶液である。さらなる一態様では、変性剤を含む溶液は、有機溶媒および/または脂肪族アルコールを含まない、すなわち有さない。さらなる一態様では、変性剤を含む溶液は、水、変性剤、緩衝物質、および場合により1種または2種または3種の無機塩から成る。

40

【0047】

本出願内で互換的に使用できる用語「変性剤」または「カオトロピック剤」は、ポリペプチドをそのネイティブな形態から非ネイティブな形態、すなわち変性形態に変える化合物を意味する。変性剤は、一般にカオトロピック剤である。例示的な変性剤は、尿素および尿素誘導体、グアニジンおよびグアニジン誘導体、テトラアルキルアンモニウム塩、長

50

鎖スルホン酸エステル、および過塩素酸リチウムである。

【0048】

尿素の添加は、より正確には尿素の濃度変化は、溶液の伝導率に影響せず、すなわち、溶液の伝導率は、尿素の添加または濃度変化を受けても一定のままである。

【0049】

一態様では、変性剤は尿素または尿素誘導体である。

【0050】

一態様では、変性剤は尿素である。一態様では、尿素は濃度 4 mol/l ~ 9 mol/l を有する。

【0051】

一態様では、変性剤はチオ尿素である。一態様では、チオ尿素は濃度 1.5 mol/l ~ 3 mol/l を有する。

【0052】

一態様では、変性剤は、2または3種の変性剤の混合物である。一態様では、変性剤は、尿素とチオ尿素との混合物である。一態様では、変性剤は尿素とグアニジニウム塩との混合物である。

【0053】

本明細書報告の局面の一態様では、ポリペプチドを精製または得るための方法は、

- 第1の溶液をイオン交換クロマトグラフィー材料に適用して、コンディショニングされたイオン交換クロマトグラフィー材料を産生する工程、

- ポリペプチドを含む第2の溶液を、コンディショニングされたイオン交換クロマトグラフィー材料に適用する工程、

- 場合により、第3の溶液をイオン交換クロマトグラフィー材料に適用する工程、

- 変性剤を含む第4の溶液を用いて、イオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチドを回収し、それによって精製または得る工程を含む。

【0054】

第1および第2の溶液は、実質的に変性剤を有さない。第3の溶液は、実質的に変性剤を有さない。

【0055】

ポリペプチドは、CHO細胞、HEK細胞およびE.coliなどの真核および原核細胞でリコンビナント産生することができる。ポリペプチドが原核細胞で産生される場合、そのポリペプチドは、一般に不溶性封入体の形態で得られる。封入体は、原核細胞および培養培地から容易に回収することができる。封入体内に不溶性形態で得られたポリペプチドは、精製および/またはリフォールディング手順を実施できる前に可溶化しなければならない。

【0056】

それゆえに、本明細書報告の第2の局面は、ポリペプチドを産生するための方法であって、以下の工程：

- ポリペプチドをコードする核酸を含む原核または真核細胞を培養する工程、

- 原核もしくは真核細胞または/および培養培地からポリペプチドを回収する工程、

- 場合により、ポリペプチドが封入体の形態で回収されるならば、ポリペプチドを可溶化および/またはリフォールディングする工程、

- 本明細書報告のイオン交換クロマトグラフィー法でポリペプチドを精製し、それによってポリペプチドを産生する工程を含む、方法である。

【0057】

一態様では、イオン交換クロマトグラフィー法は、以下の工程：

- 第1の溶液をイオン交換クロマトグラフィー材料に適用して、コンディショニングされたイオン交換クロマトグラフィー材料を産生する工程、

10

20

30

40

50

- ポリペプチドを含む第2の溶液を、コンディショニングされたイオン交換クロマトグラフィー材料に適用する工程、

- 場合により、第3の溶液をイオン交換クロマトグラフィー材料に適用する工程（洗浄工程）、

- 1種または複数の変性剤を含む第4の溶液を用いてイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチドを回収し、それによって產生する工程を含み、その際、第1～第3の溶液が、変性剤を有さない。

【0058】

以下に、前に報告されたような全局面の種々の態様を提示する。

【0059】

一態様では、第1の溶液は、第1の緩衝物質を含み、第2の溶液は、第2の緩衝物質を含み、第3の溶液は、第3の緩衝物質を含み、第4の溶液は、第4の緩衝物質を含み、その際、第4の緩衝物質は、1種または複数の変性剤を含む。

【0060】

一態様では、第2の緩衝物質および第3の緩衝物質および第4の緩衝物質は、全て異なる緩衝物質である。

【0061】

一態様では、第1の溶液および/または第2の溶液および/または第3の溶液は、変性剤を有さない。一態様では、第3の溶液は、実質的に変性剤を有さない。

【0062】

一態様では、第1の溶液の適用は、3～20カラム体積にわたる。一態様では、第1の溶液の適用は、3～10カラム体積にわたる。

【0063】

一態様では、第2の溶液の適用は、1～10カラム体積にわたる。

【0064】

一態様では、第3の溶液の適用は、1～10カラム体積にわたる。

【0065】

イオン交換クロマトグラフィー材料は、第1段階において緩衝溶液でコンディショニングされる。この溶液は、変性剤を有さず、すなわち変性剤を含まない。コンディショニングの緩衝物質、すなわち第1の緩衝溶液は、ポリペプチドを含む第2の溶液の緩衝物質と同一であるか、または異なりうる。

【0066】

その後、ポリペプチドを含む第2の溶液が、コンディショニングされたイオン交換クロマトグラフィー材料に適用される。この工程において、ポリペプチドは、イオン交換クロマトグラフィー材料上に保持される。この溶液は変性剤を含まない。ローディングの緩衝物質、すなわち第2の緩衝溶液は、第3の溶液の緩衝物質と同一であるか、または異なりうる。

【0067】

イオン交換クロマトグラフィー材料にポリペプチドをロード後に、場合により、洗浄溶液、すなわち第3の溶液を、ロードされたイオン交換クロマトグラフィー材料に適用することができる。この溶液は、実質的に変性剤を有さない。

【0068】

最終的に、イオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチドを回収するために、回収溶液、すなわち第4の、1種または複数の変性剤を含む溶液がクロマトグラフィー材料に適用される。

【0069】

一態様では、ポリペプチドを精製または得るための方法は、カラムクロマトグラフィー法である。

【0070】

一態様では、回収工程における溶液の伝導率は一定である。

10

20

30

40

50

【0071】

一態様では、回収工程における溶液のpH値は一定である。

【0072】

異なる工程でイオン交換クロマトグラフィー材料に適用される体積は、相互に独立して3～20カラム体積、一態様では4～10カラム体積である。

【0073】

一態様では、イオン交換クロマトグラフィー材料は、官能基で誘導体化されたポリスチレンジビニルベンゼン製である。一態様では、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は、四級化ポリエチレンイミン官能基で誘導体化されたポリスチレンジビニルベンゼンである。一態様では、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、スルホプロピル官能基で誘導体化されたポリスチレンジビニルベンゼンである。

10

【0074】

本明細書報告の方法は、以下に、国際公開公報第2012/028526号報告のテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I融合タンパク質および国際公開公報第2012/007495号報告の抗TSLプレセプター抗体を用いて例示される。

【0075】

以下の実施例および図面は、本発明の理解を助けるために提供され、その真の範囲は、添付の特許請求の範囲に示されている。本発明の精神から逸脱することなしに、示された手順に改変を加えることができることが理解されている。

【図面の簡単な説明】

20

【0076】

【図1】塩化ナトリウム伝導率勾配を加えた陰イオン交換クロマトグラフィーカラムでの配列番号01のテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I融合タンパク質の精製のクロマトグラムである。

【図2】一定の伝導率および一定のpH値で尿素勾配を加えた陰イオン交換クロマトグラフィーカラムでの配列番号01のテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I融合タンパク質の精製のクロマトグラムである。

【図3】一定の伝導率および一定のpH値で尿素勾配を加えた陰イオン交換クロマトグラフィーカラムでの配列番号02のテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I融合タンパク質の精製のクロマトグラムである。

30

【図4】尿素洗浄、イソプロパノール洗浄および塩酸グアニジニウム勾配溶離を加えた陰イオン交換クロマトグラフィーカラムでの配列番号01のテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I融合タンパク質の精製のクロマトグラムである。

【図5】尿素洗浄、塩酸グアニジニウム洗浄および塩化ナトリウム勾配溶離を加えた陰イオン交換クロマトグラフィーカラムでの配列番号01のテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I融合タンパク質の精製のクロマトグラムである。

【図6】尿素洗浄、塩酸グアニジニウム洗浄および塩化ナトリウム勾配溶離を加えた陰イオン交換クロマトグラフィーカラムでの配列番号02のテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I融合タンパク質の精製のクロマトグラムである。

【図7】一定の伝導率および一定のpH値で尿素勾配を加えた陽イオン交換クロマトグラフィーカラムでの配列番号01のテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I融合タンパク質の精製のクロマトグラムである。

40

【図8】トリス緩衝液洗浄および尿素勾配溶離を加えた陰イオン交換クロマトグラフィーカラムでの抗TSLプレセプター抗体の精製のクロマトグラムである。

【0077】

実施例1

材料および方法：

特に明記しない限り、種々のクロマトグラフィー法は、クロマトグラフィー材料の製造業者のマニュアルに準拠して行った。

【0078】

50

リコンビナントDNA技法：

DNAを操作するために、Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)記載の標準法を用いた。分子生物学的試薬は、製造業者の説明書に準拠して使用した。

【0079】

タンパク質の決定：

アミノ酸配列に基づき計算されたモル吸光係数を用いて、参照波長320nmで280nmの吸光度(OD)を決定することによって、タンパク質濃度を決定した。

【0080】

サイズ排除HPLC：

クロマトグラフィーは、Tosoh Haas TSK 3000 SWXLカラムを用いてASI-100 HPLCシステムで行った(Dionex, Idstein, Germany)。溶離ピークは、UVダイオードアレイ検出器(Dionex)によって280nmでモニターした。濃縮試料を1mg/mlに溶解後、安定なベースラインが達成されるまで、200mMリン酸二水素カリウムおよび250mM塩化カリウムから成る緩衝液(pH7.0)でカラムを洗浄した。分析実施は、均一濃度条件で流速0.5ml/minを用いて室温で30分間行った。クロマトグラムは、Chromleon(Dionex, Idstein, Germany)を用いて手作業で積分した。

【0081】

逆相HPLC(RP-HPLC)：

純度はRP-HPLCによって分析する。アッセイは、Phenomenex C18カラムでアセトニトリル/水性TFA勾配を用いて行う。溶離プロファイルは、215nmのUV吸光度としてモニターする。溶離した物質のパーセンテージは、溶離したタンパク質の合計ピーク面積に基づき計算する。

【0082】

DNA閾値システム：

例えばMerrick, H., and Hawlitschek, G., Biotech Forum Europe 9 (1992) 398-403を参照されたい。

【0083】

宿主細胞タンパク質の決定：

血清アルブミンとストレプトアビジンとの混合物を、マイクロタイタープレートのウェルの壁にコーティングする。HCPに対するヤギ由来ポリクローナル抗体を、マイクロタイタープレートのウェルの壁に結合させる。洗浄工程の後に、マイクロタイタープレートの異なるウェルを、異なる濃度のHCP較正シークエンスおよび試料溶液と共にインキュベーションする。インキュベーション後に、結合していない試料物質を、緩衝溶液で洗浄することによって除去する。検出のために、ウェルを、抗体ペルオキシダーゼコンジュゲートと共にインキュベーションし、結合した宿主細胞タンパク質を検出する。固定されたペルオキシダーゼ活性を、ABTSと共のインキュベーションおよび405nmでの検出によって検出する。

【0084】

DNAの決定：

ビオチンを、マイクロタイタープレートに結合させた。ストレプトアビジン、1本鎖DNAおよびビオチン化1本鎖DNA結合タンパク質の反応混合物を添加した。結合タンパク質は、DNAと結合することができ、ビオチン化された。このようにして、DNAを試料混合物から特異的に除去することが可能であった。ストレプトアビジンは、マイクロタイタープレート上のビオチン、および1本鎖DNA結合タンパク質とカップリングしたビオチンと結合した。ウレアーゼとカップリングしたDNA特異的抗体を、この複合体全体に添加した。尿素の添加は、尿素の加水分解を招き、それがpHの局所変化を引き起こした。この変化は、表面電位の変化として検出することができた。表面電位の変化は、結合したDNAの量に比例した。1本鎖DNAは、プロテイナーゼK消化およびSDSを用いた変性によって得られた。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 5 】

封入体からのポリペプチドを単離、可溶化およびリフォールディングするための一般法：

引用文献で行われた方法に加えて、封入体の調製は、例えば、Rudolphらによる方法（Rudolph, R., et al., Folding Proteins, In: Creighton, T.E., (ed.): Protein function: A Practical Approach, Oxford University Press (1997) 57-99）にしたがって行うことができる。封入体は - 7 0 で保存した。封入体の可溶化も同様に、Rudolphらによる方法（Rudolph, R., et al., Folding Proteins, In: Creighton, T.E., (ed.): Protein function: A Practical Approach, Oxford University Press (1997) 57-99）にしたがって行うことができる。

【 0 0 8 6 】

実施例 2（比較実施例）

塩化ナトリウム伝導率勾配を加えた陰イオン交換クロマトグラフィーカラムでの配列番号 0 1 のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 融合タンパク質の精製

樹脂：POROS（登録商標）HQ

ロード：ポリペプチド 4 4 3 mg

カラムのロード：3 0 mg/ml

溶離法：0 M ~ 1 M 塩化ナトリウムの直線勾配

【 0 0 8 7 】

結果：

図 1 から分かるように、融合タンパク質は、明確なピークで得ることができない。分析結果を次表に示す。

【 0 0 8 8 】

【表 1】

表

	DNA [pg/mg]	ECP [ng/ml]	LAL [EU/ml]	c (融合 タンパク質) [mg/ml]	収率 [%]
適用された溶液	1210000	4844100	21845	2.4	
通過	<495458	35500	827	1.2	
洗浄	<37337	79950	549	1.6	
ピーク 1	<2999	482490	21856	2.0	44.7
ピーク 2	<26786	79850	19573	0.2	3.3
ピーク後	23981818	35000	17476	0.1	

【 0 0 8 9 】

実施例 3

一定の伝導率および一定の pH 値で尿素勾配を加えた陰イオン交換クロマトグラフィーカラムでの配列番号 0 1 のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 融合タンパク質の精製

樹脂：POROS（登録商標）HQ

ロード：ポリペプチド 3 6 6 mg

カラムのロード：2 4 . 8 mg/ml

溶離法：0 M ~ 6 M 尿素の直線勾配

【 0 0 9 0 】

結果：

図 2 から分かるように、融合タンパク質は、明確なピークで得ることができる。分析結果を次表に示す。

【 0 0 9 1 】

10

20

30

40

50

【表 2】

表

	DNA [pg/mg]	ECP [ng/ml]	LAL [EU/ml]	c (融合 タンパク質) [mg/ml]	収率 [%]
適用された溶液	989196	732700	9099	3.3	
通過	<60000	11933	53	0	
洗浄	<2400000	8153	140	0.03	
ピーク 1	<28860	4999	44	2.1	56.2
ピーク 2	<62959	3424	20	1.0	9.4
ピーク後	<78431	83300	2089	0.8	

10

【 0 0 9 2 】

実施例 4

一定の伝導率および一定の pH 値で尿素勾配を加えた陰イオン交換クロマトグラフィーカラムでの配列番号 0 2 のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 融合タンパク質の精製

樹脂：POROS (登録商標) HQ

溶離法：0 M ~ 6 M 尿素の直線勾配

20

【 0 0 9 3 】

結果：

図 3 から分かるように、融合タンパク質は明確なピークで得ることができる。分析結果を次表に示す。

【 0 0 9 4 】

【表 3】

表

	DNA [pg/mg]	ECP [ng/ml]	LAL [EU/ml]	c (融合 タンパク質) [mg/ml]	収率 [%]
適用された溶液	8025	247340	1565	2.3	
ピーク 1	<2.2	137	<3	2.3	54.0
ピーク後	11144	24420	198	1.2	

30

【 0 0 9 5 】

実施例 5 (比較実施例)

尿素洗浄、イソプロパノール洗浄および塩酸グアニジニウム勾配溶離を加えた陰イオン交換クロマトグラフィーカラムでの配列番号 0 1 のテトラネクチン - アポリポタンパク質 A - I 融合タンパク質の精製

樹脂：Q - Sepharose (登録商標) FF (GE Healthcare)

ロード：ポリペプチド 2 8 1 mg

カラムのロード：1 5 mg/ml

平衡化：3 0 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 8 . 0) ; 5 . 9 4 mS/cm

尿素洗浄：6 M 尿素溶液 (pH 8 . 0) ; 4 3 5 μS/cm

2 - プロパノール洗浄：2 0 % (v/v) 2 - プロパノール

溶離溶液：6 M 塩酸グアニジニウム (pH 8 . 0) ; L F = 2 7 8 mS/cm

洗浄工程：5 カラム体積の 6 M 尿素溶液で洗浄；

5 カラム体積の 2 0 % 2 - プロパノールで洗浄

40

50

溶離法：10カラム体積の0M～6M塩酸グアニジニウムの直線勾配

【0096】

結果：

図4から分かるように、融合タンパク質は、尿素溶液および2-プロパノール溶液を用いた洗浄工程の間に得ることができない。溶離は、塩酸グアニジニウム溶液を用いることでのみ成し遂げることができる。

【0097】

実施例6（比較実施例）

尿素洗浄、塩酸グアニジニウム洗浄および塩化ナトリウム勾配溶離を与えた陰イオン交換クロマトグラフィーカラムでの配列番号01のテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I融合タンパク質の精製

樹脂：Q-Sepharose（登録商標）FF（GE Healthcare）

ロード：ポリペプチド280mg

カラムのロード：20mg/ml

平衡化：30mMリン酸カリウム緩衝液（pH8.0）；5.9mS/cm

尿素洗浄：6M尿素溶液（pH8.0）；435μS/cm

塩酸グアニジニウム溶液：0.1M塩酸グアニジニウム（pH8.0）

溶離溶液：50mMリン酸カリウム緩衝液（pH8.0）に溶かした1M塩化ナトリウム；91.7mS/cm

洗浄工程：5カラム体積の6M尿素溶液で洗浄；5カラム体積の0.1M塩酸グアニジニウム溶液で洗浄

溶離法：10カラム体積の0M～1M塩化ナトリウムの直線勾配

【0098】

結果：

図5から分かるように、各洗浄工程で融合タンパク質の小画分だけを得ることができる。分析結果を次表に示す。

【0099】

【表4】

表

	DNA [pg/mg]	ECP [ng/ml]	LAL [EU/ml]	c(融合 タンパク質) [mg/ml]	収率 [%]
適用された溶液	1210000	4844100	21845	4.0	
通過	88000	379270	4572	n.d.	
尿素洗浄	69700	22220	286	n.d.	
グアニジニウム 洗浄	2330	30810	1229	n.d.	
ピーク1	117	308650	23484	4.3	37.7
ピーク2	19040	139645	6827	1.3	13.3

n.d. = 未決定

【0100】

実施例7（比較実施例）

尿素洗浄、塩酸グアニジニウム洗浄および塩化ナトリウム勾配溶離を加えた陰イオン交換クロマトグラフィーカラムでの配列番号02のテトラネクチン-アポリポタンパク質A-I融合タンパク質の精製

樹脂：Q-Sepharose（登録商標）FF（GE Healthcare）

ロード：ポリペプチド239mg

カラムのロード：15 mg/ml

平衡化：30 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 8.0）；5.9 mS/cm

尿素洗浄：6 M尿素溶液（pH 8.0）

塩酸グアニジニウム溶液：0.1 M塩酸グアニジニウム（pH 8.0）

溶離溶液：20 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 8.0）に溶かした0.35 M塩化ナトリウム

洗浄工程：4カラム体積の6 M尿素溶液で洗浄；4カラム体積の0.1 M塩酸グアニジニウム溶液で洗浄

溶離法：0.35 M塩化ナトリウムを用いて7カラム体積にわたり段階溶離

【0101】

10

結果：

図6から分かるように、各洗浄工程で融合タンパク質の小画分のみを得ることができる。3回の実施の分析結果を次表に示す。

【0102】

【表5】

表

実施		DNA [pg/mg]	ECP [ng/ml]	LAL [EU/ml]	c(融合 タンパク質) [mg/ml]	収率 [%]
1	適用された 溶液	2280	477300	28115	2.6	
2		2280	477300	28115	2.6	
3		2833	108250	216531	1.2	
1	ピーク1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9.3
2		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16.1
3		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11.1
1	ピーク2	99	38550	263	0.8	31.7
2		25	45200	670	1.0	35.1
3		25	31920	38	0.9	37.1
1	ピーク後	66929	29520	22195	0.3	9.4
2		23265	35900	928	0.3	12.7
3		15619	11510	45	0.5	23.1

n.d. = 未決定

【0103】

実施例8a

一定の伝導率および一定のpH値で尿素勾配を加えた陽イオン交換クロマトグラフィーカラムでの配列番号01のテトラネクチン-アポリボタンパク質A-I融合タンパク質の精製

40

樹脂：POROS（登録商標）HS

ロード：ポリペプチド5.58 g

洗浄1：pH 3.0に調整した50 mMギ酸ナトリウム

洗浄2：pH 8.0に調整した1 M塩化ナトリウム、30 mMリン酸カリウム緩衝液

洗浄3：pH 8.0に調整した30 mMリン酸カリウム緩衝液

溶離溶液：10 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 8.0）に溶かした6 M尿素

溶離法：3カラム体積にわたり洗浄1、

20カラム体積にわたり洗浄2、

5カラム体積にわたり洗浄3

10カラム体積の0 M～6 M尿素の直線勾配

50

【 0 1 0 4 】

結果：

図 7 から分かるように、融合タンパク質を明確なピークで得ることができる。分析結果を次表に示す。

【 0 1 0 5 】

【表 6】

表

	DNA [pg/mg]	ECP [ng/ml]	LAL [EU/ml]	c (融合 タンパク質) [mg/ml]	収率 [%]
適用された溶液	1933426	>99661	1712	3.3	
回収された溶液	428784	145887	458	2.7	64.4

10

【 0 1 0 6 】

実施例 8 b

陽イオン交換クロマトグラフィー材料に続く、一定の伝導率および一定の pH 値で尿素勾配を加えた陰イオン交換クロマトグラフィーカラムでの配列番号 0 1 のテトラネクチン - アポリボタンパク質 A - I 融合タンパク質の精製

樹脂：POROS (登録商標) HQ

ロード：実施例 8 a で得られたポリペプチド 3 . 1 9 g (上記参照)

20

【 0 1 0 7 】

結果：

第 2 のクロマトグラフィー工程の分析結果を次表に示す。

【 0 1 0 8 】

【表 7】

表

	DNA [pg/mg]	ECP [ng/ml]	LAL [EU/ml]	c (融合 タンパク質) [mg/ml]	収率 [%]
適用された溶液	354545	81055	94	0.55	
回収された溶液	6	203	6	4.3	82.8

30

【 0 1 0 9 】

実施例 9

トリス緩衝液洗浄および尿素勾配溶離を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーカラムでの抗 T S L P レセプター抗体の精製

樹脂：POROS (登録商標) HQ

ロード：ポリペプチド 1 8 9 mg

40

トリス洗浄：1 0 mM塩化ナトリウムを有する 5 mMトリス緩衝液 (pH 8 . 4) ; 4 mS/cm

溶離溶液：1 0 mM塩化ナトリウムおよび 6 M尿素を有する 5 mMトリス緩衝液 (pH 8 . 4) ; 4 mS/cm

洗浄工程：3 カラム体積のトリス緩衝溶液で洗浄

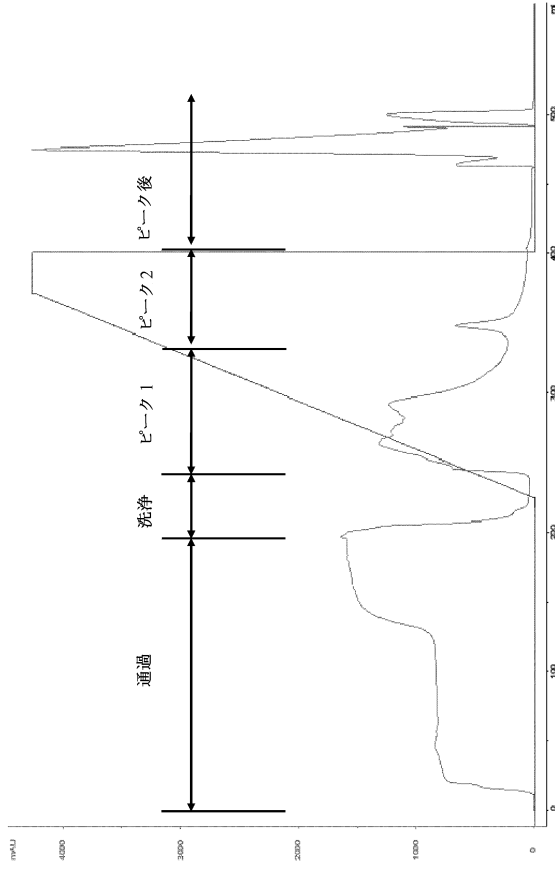
溶離法：3 0 カラム体積で 0 M ~ 6 M尿素の直線勾配

【 0 1 1 0 】

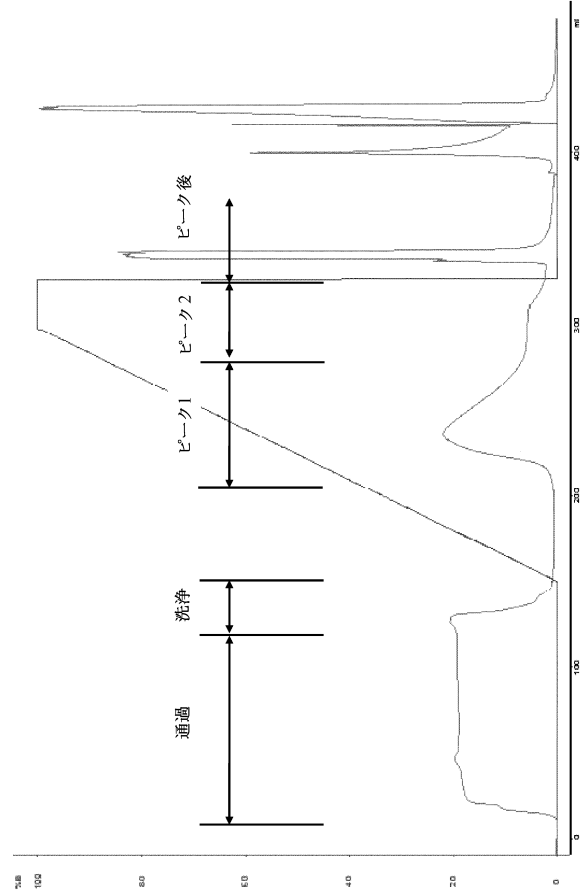
結果：

図 8 から分かるように、抗体を得ることができる。

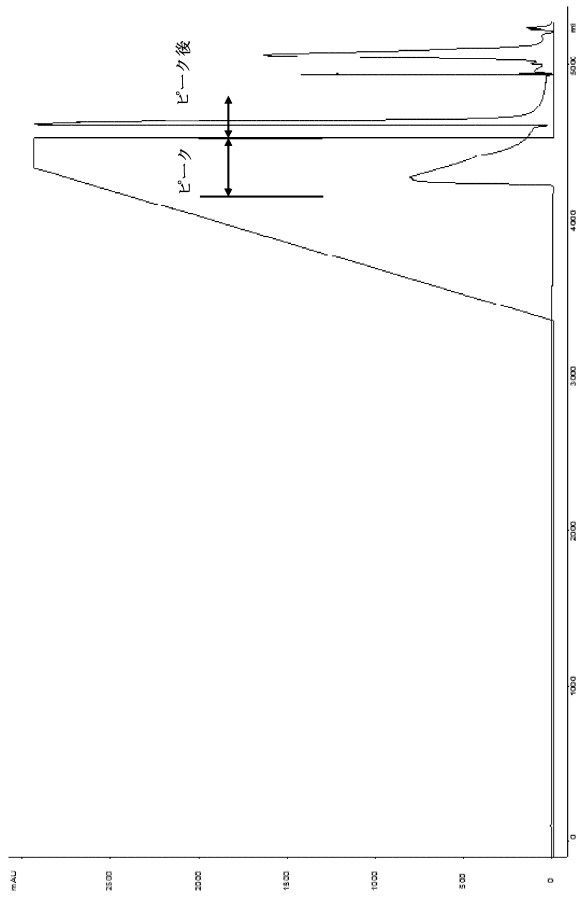
【図1】



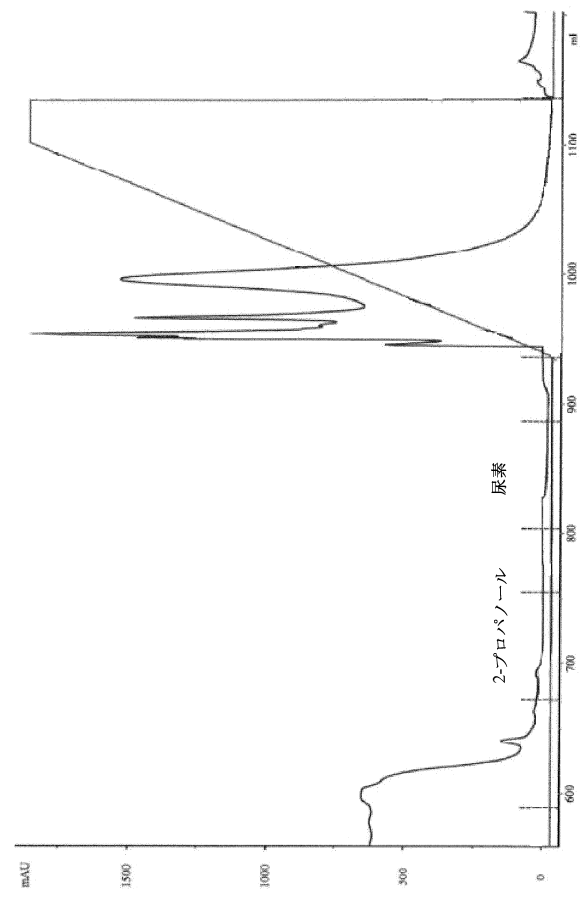
【図2】



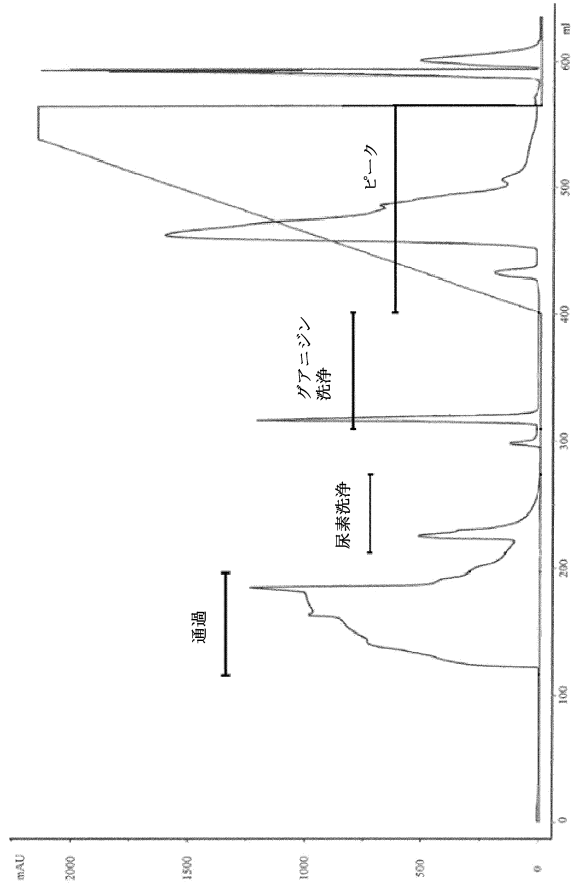
【図3】



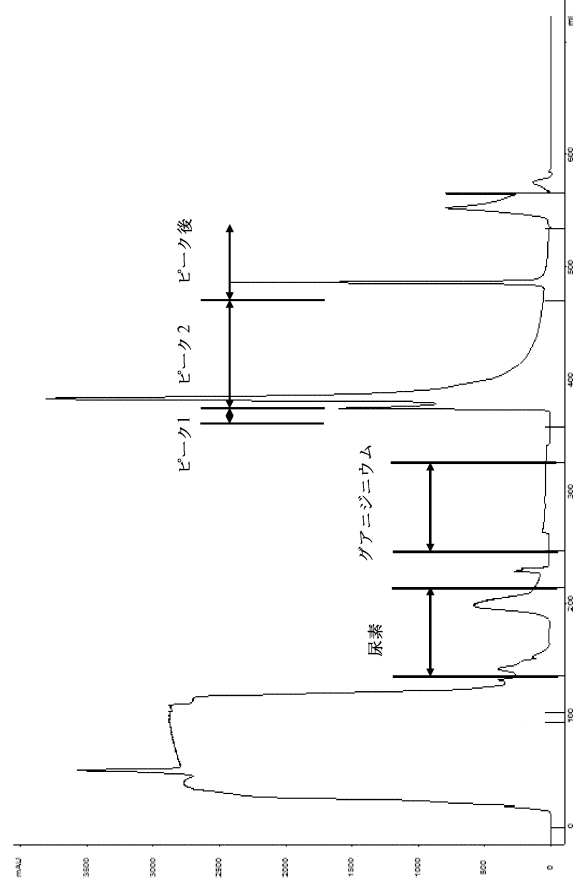
【図4】



【 図 5 】

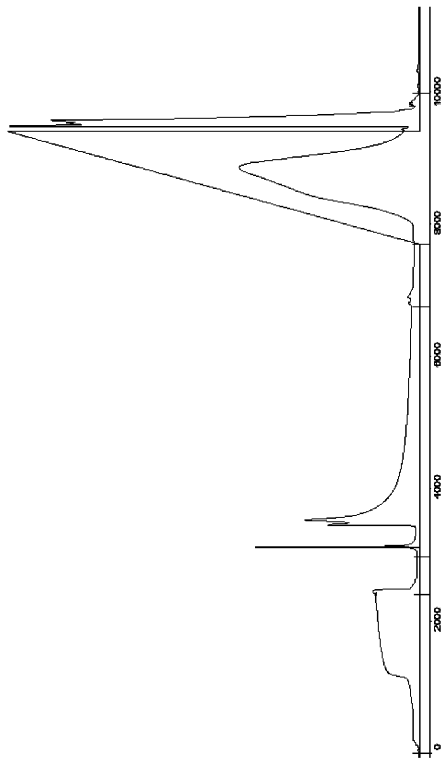


【 図 6 】



【 図 7 】

Figure 7



【 図 8 】

Figure 8



【配列表】

0006116565000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100116528
弁理士 三宅 俊男
- (74)代理人 100122736
弁理士 小國 泰弘
- (74)代理人 100122747
弁理士 田中 洋子
- (74)代理人 100132540
弁理士 生川 芳徳
- (74)代理人 100146031
弁理士 柴田 明夫
- (74)代理人 100181102
弁理士 後藤 孝明
- (72)発明者 ファルケンシュタイン, ロベルト
ドイツ国、8 0 6 8 9 ミュンヘン、ヴァストル - ヴィット - シュトラーセ 5
- (72)発明者 マーグリ, マリア・ローラ
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、ヴァルザーシュトラーセ 5アー
- (72)発明者 メール, ミヒャエラ
ドイツ国、8 2 4 4 9 ウッフینگ、ドルフシュトラーセ 3
- (72)発明者 シュベンドナー, クラウス
ドイツ国、8 2 3 6 2 ヴァイルハイム、アム・オブストガルテン 4 7
- (72)発明者 シュペンスベルガー, ベルンハルト
ドイツ国、8 2 3 9 0 エーバーフィンク、リングシュトラーセ 1アー

審査官 松原 寛子

- (56)参考文献 国際公開第2008/002235(WO, A1)
特表2006-502727(JP, A)
特表2009-530378(JP, A)
特表2005-524092(JP, A)
特表2004-522424(JP, A)
国際公開第2004/031213(WO, A1)
国際公開第2010/063717(WO, A1)
JBC, 1960年, Vol.235, p.2294-2299
GRAVERSEN, J.H. et al., "Trimerization of apolipoprotein A-I retards plasma clearance and preserves antiatherosclerotic prop, J. CARDIOVASC. PHARMACOL., 2008年 2月, Vol.51, No.2, P.170-177

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/18
C12P 21/02
C07K 16/28
C07K 19/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)