

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 1 月 3 日(03.01.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/003176 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 14/31 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/067865
- (22) 国際出願日: 2013 年 6 月 28 日(28.06.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-146610 2012 年 6 月 29 日(29.06.2012) JP
- (71) 出願人: 旭化成メディカル株式会社(ASAHI KASEI MEDICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目 105 番地 Tokyo (JP). ノマディックバイオサイエンス株式会社(NOMADIC BIOSCIENCE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒7011221 岡山県岡山市北区芳賀 5303 岡山リサーチパーク インキュベーションセンター Okayama (JP).
- (72) 発明者: 奥山 和雄(OKUYAMA Kazuo); 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目 105 番地 Tokyo (JP). 小熊 一郎(KOGUMA Ichiro); 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目 105 番地 Tokyo (JP). 丸本 朝清(MARUMOTO Tomokiyo); 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目 105 番地 Tokyo (JP). 佐藤 聡(SATO Satoshi); 〒7011221 岡山県岡山市北区芳賀 5303 岡山リサーチパーク インキュベーションセンター ノマディックバイオサイエンス株式会社内 Okayama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス(SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: ADSORBENT COMPRISING CARRIER BONDED WITH POLYPEPTIDE COMPRISING B-DOMAIN MUTANT DERIVED FROM PROTEIN A

(54) 発明の名称: プロテイン A の B ドメイン変異体を含むポリペプチドが結合された担体からなる吸着材

(57) Abstract: The objective of the present invention, is to provide an affinity chromatography adsorbent using temperature responsive protein A, wherein the adsorbent can improve the culture productivity and the stability in bacterial cell lysate of temperature responsive protein A. The present invention provides an adsorbent comprising a carrier to which a polypeptide is bonded, said polypeptide comprising, from the N-terminal end, a tag peptide, a linker sequence, and a B-domain mutant derived from protein A. The linker sequence is an amino acid sequence that does not contain a Val-Pro-Arg sequence, and is formed from 7 to 12 amino acid residues. The B-domain mutant derived from protein A can change immunoglobulin-binding properties according to temperature, under conditions of pH 5-9 and a temperature lower than 60°C.

(57) 要約: 本発明の目的は、温度応答性プロテイン A を用いたアフィニティークロマトグラフィー吸着材において、温度応答性プロテイン A の培養生産性及び菌体破碎液中での安定性を向上させることができる吸着材を提供することである。本発明によれば、N 末端側からタグペプチド、リンカー配列、及びプロテイン A の B ドメイン変異体を含むポリペプチドが結合された担体からなる吸着材であって、上記リンカー配列が、Val-Pro-Arg 配列を含まず、かつ 7 から 12 個のアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列であり、前記プロテイン A の B ドメイン変異体が、pH 5~9 及び 60°C 未満の条件下においてイムノグロブリンとの結合性が温度によって変化するものである、上記吸着材が提供される。

WO 2014/003176 A1

明 細 書

発明の名称：

プロテインAのBドメイン変異体を含むポリペプチドが結合された担体からなる吸着材

技術分野

[0001] 本発明は、イムノグロブリンとの結合性が温度によって変化するプロテインAのBドメイン変異体を含むポリペプチドが結合された担体からなる吸着材に関する。本発明の吸着材は、イムノグロブリンの精製のために使用することができる。

背景技術

[0002] イムノグロブリンは、生体内に侵入した異物を認識して免疫反応を引き起こす抗体、並びにこれと構造又は機能的に類似したポリペプチドの総称であり、IgG、IgM、IgA、IgD、IgEなどがある。イムノグロブリンは、ライフサイエンス研究、医薬及び臨床検査等の分野において有用である。高純度のイムノグロブリンの製造方法としてアフィニティークロマトグラフィーが使用されている。イムノグロブリンの精製に用いるアフィニティークロマトグラフィーのリガンドとしては、イムノグロブリンの共通領域に極めて高い特異性と親和性を有するスタフィロコッカス（Staphylococcus）由来のプロテインA（以下、プロテインA）、及びそのイムノグロブリン結合ドメインが知られている。プロテインAは、抗体医薬品の製造工程に広く用いられている。従来から知られているプロテインAまたはその一部をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィー吸着材（以下、従来型プロテインA吸着材）では、吸着したIgGを酸性域（pH 3～4）で溶出させる必要があるため、精製したIgGの立体構造変化や会合凝集などが起こり失活することが問題となっている。

[0003] この問題を解決する手段の一つとして、温度変化によってIgGとの親和性を制御することにより中性域での溶出を可能としたプロテインAの温度感

受性変異体（以下、温度応答性プロテインA）が提案されている（特許文献1）。しかしながら、この温度応答性プロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィー吸着材（以下、温度応答性プロテインA吸着材）は、従来型プロテインA吸着材と比較して1 g G吸着容量等の性能面で十分なものではなく、温度応答性プロテインA吸着材の性能向上が強く求められていた。

[0004] 従来型プロテインA吸着材のさらなる問題は高価なことであり、その使用により抗体医薬品は非常に高価なものとなり、保険財政を圧迫する要因となっている。温度応答性プロテインA吸着材を従来型プロテインA吸着材よりも低コストで提供することは重要な課題である。特許文献1によると、温度応答性プロテインAは、N末端にHis-Tag配列を持つポリペプチドとして、遺伝子組換え大腸菌を培養して生産されているが、培養での生産量が低く、菌体破碎液中での安定性が良くないため、高価なプロテアーゼインヒビターを用いなければならなかった。温度応答性プロテインAの培養生産性と安定性の向上が強く求められていた。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開WO2008/143199

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、温度応答性プロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィー吸着材において、温度応答性プロテインAの培養生産性及び菌体破碎液中での安定性を向上させることができる吸着材を提供することを解決すべき課題とした。さらに本発明は、1 g G吸着容量が向上した温度応答性プロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィー吸着材を提供することを解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、N末端側からタグペプチド、リンカー配列、及びプロテインAのBドメイン変異体を含むポリペプチドにおいて、タグペプチドとプロテインAのBドメイン変異体をつなぐリンカー配列を最適化することにより、上記ポリペプチドの培養生産性及び菌体破碎液中での安定性を向上できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] 即ち、本発明によれば以下の発明が提供される。

(1) N末端側からタグペプチド、リンカー配列、及びプロテインAのBドメイン変異体を含むポリペプチドが結合された担体からなる吸着材であって、

上記リンカー配列が、Val-Pro-Arg配列を含まず、かつ7から12個のアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列であり；前記プロテインAのBドメイン変異体が、pH5～9及び60℃未満の条件下においてイムノグロブリンとの結合性が温度によって変化するものである、上記吸着材。

[0009] (2) リンカー配列が、1から4個のグリシン残基と3から7個のセリン残基を含む、(1)に記載の吸着材。

(3) リンカー配列が、メチオニン残基を含む、(1)又は(2)に記載の吸着材。

(4) リンカー配列が、ロイシン残基を含む、(1)から(3)の何れかに記載の吸着材。

(5) リンカー配列が、ヒスチジン残基を含む、(1)から(4)の何れかに記載の吸着材。

[0010] (6) リンカー配列が、
グリシン残基、セリン残基及びメチオニン残基から構成されるアミノ酸配列；
グリシン残基、セリン残基、メチオニン残基及びヒスチジン残基から構成されるアミノ酸配列；
グリシン残基、セリン残基、メチオニン残基、ヒスチジン残基及びロイシン

残基から構成されるアミノ酸配列；又は

グリシン残基、セリン残基、メチオニン残基、ヒスチジン残基、ロイシン残基及びアルギニン残基から構成されるアミノ酸配列：

の何れかである、（１）から（５）の何れかに記載の吸着材。

[0011] （７） リンカー配列が、Ser-Ser-Gly-(Xaa) n -Met（式中、 n は３から８の整数を示し、 n 個のXaaはそれぞれ独立に、グリシン残基、セリン残基、ヒスチジン残基、ロイシン残基又はアルギニン残基を示す）で示されるアミノ酸配列である、（１）から（６）の何れかに記載の吸着材。

（８） リンカー配列が、Ser-Ser-Gly-Leu-(Xbb) m -His-Met（式中、 m は１から６の整数を示し、 m 個のXbbはそれぞれ独立に、グリシン残基、セリン残基又はアルギニン残基を示す）で示されるアミノ酸配列である、（１）から（７）の何れかに記載の吸着材。

[0012] （９） タグペプチドが６×ヒスチジントグである、（１）から（８）の何れかに記載の吸着材。

（１０） プロテインＡのＢドメイン変異体が、配列番号１のポリペプチドと６０％以上の相同性を有するアミノ酸配列（但し、配列番号１で表されるアミノ酸配列において少なくとも１９位のGly及び／または２２位のGlyは、Ala又はLeuに置換されている）であって、かつpH５～９及び６０℃未満の条件下においてイムノグロブリンとの結合性が温度によって変化するアミノ酸配列を、１分子内に少なくとも１以上含むものである、（１）から（９）の何れかに記載の吸着材。

（１１） プロテインＡのＢドメイン変異体が、配列番号２に記載のアミノ酸配列を１分子内に少なくとも１以上含むものである、（１）から（１０）の何れかに記載の吸着材。

[0013] （１２） 担体が、粒子状のクロマト充填剤である、（１）から（１１）の何れかに記載の吸着材。

（１３） 担体の平均粒子径が２０～２００ μ mである、（１）から（１２）の何れかに記載の吸着材。

(14) 担体が、ポリビニルアルコールの架橋重合体から構成される、(1)から(13)の何れかに記載の吸着材。

[0014] (15) ポリペプチドがアミド結合によって担体に結合されている、(1)から(14)の何れかに記載の吸着材。

(16) 担体に対し、20 mg/mL樹脂以上のポリペプチドが結合している、(1)から(15)の何れかに記載の吸着材。

(17) イムノグロブリンの最大結合容量が、20 mg/mL樹脂以上である、(1)から(16)の何れかに記載の吸着材。

(18) 担体が、カルボキシル基を400~600 μmol /mL樹脂含むものである、(1)から(17)の何れかに記載の吸着材。

[0015] (19) 担体が膜である、(1)から(11)の何れかに記載の吸着材。

(20) 膜が中空糸状である、(19)に記載の吸着材。

(21) 膜が、グラフト高分子鎖を導入した基材膜から製造される、(19)又は(20)に記載の吸着材。

(22) (1)から(21)の何れかに記載の吸着材に、イムノグロブリンを含有する試料を接触させることを含む、イムノグロブリンの精製方法。

発明の効果

[0016] 本発明によれば、プロテインAのBドメイン変異体を含むポリペプチドについて培養生産性を向上することができ、また菌体破碎液中での安定性を向上することができることから、低コストで温度応答性プロテインAを提供することができる。さらに、本発明のプロテインAのBドメイン変異体を含むポリペプチドが結合された担体からなる吸着材においては、IgG吸着容量を向上できた。従って、本発明によれば、より効率的で経済的に優れたIgG精製プロセスを提供することができる。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明について更に詳細に説明する。

本発明の吸着材は、N末端側からタグペプチド、リンカー配列、及びプロテインAのBドメイン変異体を含むポリペプチドが結合された担体からなる

ものである。

[0018] 本発明におけるタグペプチドとしては、例えば2～6個のヒスチジンから構成されるタグ（Hisタグ又は6×His）や、グルタチオン-S-トランスフェラーゼから構成されるタグ（GSTタグ）、マルトース結合ポリペプチド（MBP）タグ、カルモジュリン、Myc-タグ（c-mycタグ）、FLAG-タグまたは緑色蛍光タンパク（GFP）等の公知のタグが挙げられるが、中でもHisタグやGSTタグ等が好ましい。Hisタグは、サイズが小さいために免疫原性が低く、精製されたポリペプチドからタグを除去せずに使用できる。また、Hisタグは、遺伝子を予め導入したプラスミドが市販されており、容易に手に入る。

[0019] 本発明におけるリンカー配列は、Val-Pro-Arg配列を含まず、かつ7から12個のアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列である。

本発明におけるリンカー配列の特徴の一つは、トロニン認識配列であるVal-Pro-Arg配列を含まないことである。Val-Pro-Arg配列を除外したことにより、ポリペプチドの製造時の安定性が向上し、培養生産性を向上することができるとともに、使用時における安定性も向上し、Hisタグなどのタグペプチドの溶出を防止することができる。

[0020] 本発明におけるリンカー配列のもう一つの特徴は、7から12個のアミノ酸残基から構成されることである。リンカー配列のアミノ酸残基が6個以下の場合、又は13個以上の場合には、ポリペプチドの発現量が低下し、十分な培養生産性を達成できなくなることが本発明により明らかになった。

[0021] 好ましくは、リンカー配列は、1から4個のグリシン残基と3から7個のセリン残基を含むことができる。更に好ましくは、リンカー配列は、メチオニン残基、ロイシン残基及びヒスチジン残基から選択される1から3種のアミノ酸残基を含むことができる。

上記した好ましいリンカー配列のアミノ酸配列の具体例としては、グリシン残基、セリン残基及びメチオニン残基から構成されるアミノ酸配列；
グリシン残基、セリン残基、メチオニン残基及びヒスチジン残基から構成さ

れるアミノ酸配列；

グリシン残基、セリン残基、メチオニン残基、ヒスチジン残基及びロイシン残基から構成されるアミノ酸配列；又は

グリシン残基、セリン残基、メチオニン残基、ヒスチジン残基、ロイシン残基及びアルギニン残基から構成されるアミノ酸配列；

などを挙げることができる。

[0022] 更に好ましくは、リンカー配列が、Ser-Ser-Gly-(Xaa)*n*-Met（式中、*n*は3から8の整数を示し、*n*個のXaaはそれぞれ独立に、グリシン残基、セリン残基、ヒスチジン残基、ロイシン残基又はアルギニン残基を示す）で示されるアミノ酸配列、特に好ましくは、Ser-Ser-Gly-Leu-(Xbb)*m*-His-Met（式中、*m*は1から6の整数を示し、*m*個のXbbはそれぞれ独立に、グリシン残基、セリン残基又はアルギニン残基を示す）で示されるアミノ酸配列である。

[0023] 本発明におけるプロテインAのBドメイン変異体は、pH5～9及び60℃未満の条件下においてイムノグロブリンとの結合性が温度によって変化するものである。プロテインAのBドメイン変異体としては、特許文献1（国際公開WO2008/143199）に記載のものを挙げるすることができる。

[0024] 「pH5～9、60℃未満の条件下においてイムノグロブリンとの結合性が温度によって変化し得る」とは、イムノグロブリンの立体構造に影響を及ぼさないpH5～9、60℃未満の条件下で、温度によってイムノグロブリンとの間の「結合力」や結合の「特異性」等が変化し、この性質によってイムノグロブリンを精製することができることを意味し、具体的には、低温領域でポリペプチドのカラム充填・IgGのカラムへの負荷・カラム洗浄を行った際に、イムノグロブリンを結合することができ、その後、高温領域にすることによってポリペプチドの構造等が変化することによって、低温領域で結合したイムノグロブリンを放出し得ることを意味する。具体的には、例えば0～15℃、好ましくは0～8℃、より好ましくは5℃付近の低温領域と、例えば、25～60℃、好ましくは30～45℃、より好ましくは32～38℃、特に好ましくは35℃付近の高温領域で、ポリペプチドとイムノグロブリンとの結合性に、差があることを意

味する。温度によってイムノグロブリンとの結合性が変化し得る変異体であるか否かは、候補となる変異体を、カラムクロマトグラフィー等のリガンドとして用い、実際にイムノグロブリンを精製してみることで容易に確認することができる。

[0025] 本発明で用いるプロテインAのBドメイン変異体の具体例としては、配列番号1のポリペプチドと60%以上の相同性を有するアミノ酸配列（但し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において少なくとも19位のGly及び／または22位のGlyは、Ala又はLeuに置換されている）であって、かつpH5～9及び60℃未満の条件下においてイムノグロブリンとの結合性が温度によって変化するアミノ酸配列を、1分子内に少なくとも1以上含むものである。配列番号1で表されるアミノ酸配列において少なくとも19位のGly及び／または22位のGlyは、Ala又はLeuに置換されているアミノ酸配列としては、19位のGly及び／または22位のGlyは、Ala又はLeuに置換されている変異体に対して、この変異を変更することなく、更に他のアミノ酸の置換、欠失、付加、あるいは挿入が導入された変異体が含まれる。

[0026] 19位と22位の変異以外の変異としては、例えば、タンパク質内部の疎水性アミノ酸を、他の疎水性アミノ酸に変異させるほか、側鎖による水素結合を欠失させる変異等が挙げられる。水素結合を欠失させる変異としては、例えば、Gln（特に、タンパク質表面に露出している、例えば26位のGln）のGlyへの置換等が挙げられる。さらに、親水性のアミノ酸であっても、その側鎖に著しく疎水性を有する部分がある場合、その部分を欠失させる変異であれば、タンパク質立体構造の安定性を低下させることができる。たとえば、中性溶液中で電荷を有する親水性のArgを例えばGly等の疎水性の強いメチレン基を有しない（又は少ない）アミノ酸等に置換すると、そのポリペプチドの天然立体構造が不安定になる傾向にある。但し、これらの変異体は、pH5～9の範囲でイムノグロブリンとの結合性が温度変化に応じて変化し得るものであることが必要である。

[0027] 本発明で用いるポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号1のポリペプチ

ドと60%以上の相同性を有する。相同性としては、例えば、アミノ酸配列の60%以上が一致しているものが好ましく、より好ましくは70%以上、更に好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上が一致している。

[0028] アミノ酸の置換としては、化学的または構造的に類似したアミノ酸の置換が好ましい。化学的または構造的に類似したアミノ酸のグループとしては以下のものが挙げられる。

(グリシン、プロリン、アラニン、バリン)

(ロイシン、イソロイシン)

(グルタミン酸、グルタミン)

(アスパラギン酸、アスパラギン)

(システイン、スレオニン)

(スレオニン、セリン、アラニン)

(リジン、アルギニン)

[0029] プロテインAのBドメイン変異体としては、配列番号2に記載のアミノ酸配列を1分子内に少なくとも1以上含むものが特に好ましい。

[0030] 本発明で用いるポリペプチドは、上記した配列番号1のポリペプチドと60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を1分子内に少なくとも1以上含むものであり、上記アミノ酸配列を2つ以上含むこともできる。含まれるアミノ酸配列の数（以下、 n とする）の上限は特にはないが、アフィニティークロマトグラフィー用リガンドとして用いる場合には、アフィニティークロマトグラフィー用支持体等やアフィニティークロマトグラフィー用カラムの大きさや種類等との相性から、 n は6以下であることが好ましく、5以下がさらに好ましく、4以下が特に好ましい。

[0031] 本発明で用いるポリペプチドは、常法に従いポリペプチド合成装置等を用いて合成することもできるが、対応する遺伝子を作製し、これを発現させることによって製造することもできる。即ち、ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、その形質転換体

を培養することによって、ポリペプチドを製造することができる。

[0032] ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、発現ベクターに挿入することが好ましい。発現ベクターは、市販のプラスミドを利用でき、特に限定されない。例えば、pET系ベクター（メルク社製, 日本）又は、pRSET系ベクター（インビトロジェン社製, 日本）が宿主である大腸菌との組み合わせでポリペプチドを大量に発現できるので好ましい。発現ベクターと宿主細胞は適切に組み合わせて使用することが好ましい。例えば、pET系ベクター及びpRSET系ベクターの場合は、大腸菌BL21(DE3)又はC41(DE3)などを宿主細胞として使用することができる。

[0033] 発現ベクターによる宿主細胞の形質転換は、ヒートショック法又はエレクトロポレーション法などにより行うことができる。発現ベクターにより形質転換された形質転換体は、適切な培地を用いて常法により培養することができる。例えば、宿主が大腸菌の場合には、LB培地又は2×TY培地などの液体培地を使用し、通常15℃から40℃、特に30℃から37℃で培養することが好ましい。培地を振とう又は攪拌し、必要に応じ通気やpH調整を行うことが好ましい。ポリペプチドの発現誘導にはイソプロピル-1-β-D-ガラクトピラノシド（IPTG）等を培地に添加して行うことができる。

[0034] ポリペプチドを発現した宿主細胞は、遠心分離又はフィルター分離等により培地から分離される。宿主細胞を適切な緩衝液に懸濁して細胞破碎を行う。細胞破碎後に遠心分離を行うことで、本発明で用いるポリペプチドを可溶性分画に回収することができる。可溶性分画からポリペプチドを精製するには、公知のポリペプチド精製方法を用いることができ、例えば、塩析法とイオン交換クロマトグラフィーを組み合わせること等で行える。また、ポリペプチドのN末端に存在するタグペプチドを利用して精製することができる。例えばHisタグの場合には、金属キレートアフィニティークロマトグラフィー、GSTタグの場合には、グルタチオンを結合した親和性樹脂を利用した精製方法を用いることができる。金属キレートアフィニティークロマトグラフィーには、ニッケルチャージアガロースゲルであるNi-NTAなどを使用できる。

[0035] 本発明における担体は、アフィニティークロマトグラフィー用の吸着材として使用できるものであれば特に限定されないが、好ましくは、粒子状のクロマト充填剤、又は膜（さらに好ましくは、中空糸状の膜）である。担体が粒子状の場合、担体の平均粒子径は20～200 μm であることが好ましい。

[0036] 担体の材料は、特に限定されないが、膜状の担体の材料は、多孔性の膜を形成しうる高分子材料を使用することができる。例えば、ポリエチレンやポリプロピレン等のオレフィン樹脂、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンテレナフタレート等のポリエステル樹脂、ナイロン6、ナイロン66等のポリアミド樹脂、ポリフッ化ビニリデン、ポリクロロトリフルオロエチレン等の含フッ素樹脂、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン及びポリカーボネート等の非結晶性樹脂などが使用できる。粒子状のクロマト充填剤の材料としては、ガラス、シリカ、ポリスチレン樹脂、メタクリル樹脂、架橋アガロース、架橋デキストラン、架橋ポリビニルアルコール、及び架橋セルロースなどが使用できる。架橋ポリビニルアルコール、及び架橋セルロースは親水性が高く、不純物成分の吸着を抑制できるために好ましい。

[0037] 上記の担体には、カップリング基を導入することができる。カップリング基としては、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性化されたカルボキシル基、カルボキシル基、臭化シアン活性化基、水酸基、エポキシ基、アルデヒド基、及びチオール基などが挙げられる。担体に固定化されるポリペプチドは一級アミノ基を有しているため、上記の中でもこれに結合できるNHSで活性化されたカルボキシル基、カルボキシル基、臭化シアン活性化基、エポキシ基、及びホルミル基が好ましい。特に、NHSで活性化されたカルボキシル基は、カップリング反応時に他の試薬が不要であり、反応が迅速で強固な結合を形成するので、特に好ましい。

[0038] 担体としては、カルボキシル基を400～600 $\mu\text{mol/L}$ 樹脂含むものを用いることが好ましい。

- [0039] 担体へのカップリング基の導入方法は特に限定されないが、担体とカップリング基との間にスペーサーを導入するのが一般的である。カップリング基の導入方法は常法により行うことができる。
- [0040] カップリング基を末端及び／又は側鎖に有するグラフト高分子鎖を担体に導入してもよい。カップリング基を有するグラフト高分子鎖を支持体に導入することで、カップリング基の密度を任意に高める等、制御することが可能となる。カップリング基を有する高分子鎖を担体にグラフトするか、カップリング基に変換しうる前駆体官能基を有する高分子鎖を担体にグラフトし、その後にグラフトした前駆体官能基をカップリング基に変換してもよい。
- [0041] グラフト高分子鎖の導入方法はいかなる方法でもよい。あらかじめ高分子鎖を調製し、担体にカップリングしてもよい。また、「リビングラジカル重合法」や「放射線グラフト重合法」の手法により、担体上で直接グラフト鎖を重合してもよい。「放射線グラフト重合法」は、担体に予め反応開始剤を導入する必要がなく、適応可能な担体が多種であるため、好ましい。
- [0042] ポリペプチドを担体に固定する方法としては、当該技術分野において周知であり文献に記載されている多様な技術が任意に使用できる。例えば、上記したようなN-ヒドロキシスクシンイミド等のカップリング剤、又はカルボキシル基又はチオール基等による固体支持体の活性化による固定化などを使用することができる。例えば、ポリペプチドはアミド結合によって担体に結合することができる。また、ポリペプチドの結合量は、特に限定されないが、担体に対し、20 mg/mL樹脂以上のポリペプチドが結合していることが好ましく、より好ましくは40 mg/mL樹脂以上のポリペプチドが結合していることが、イムノグロブリンの結合容量の観点から好ましい。
- [0043] 本発明の吸着材において、イムノグロブリンの最大結合容量は好ましくは20 mg/mL樹脂以上、より好ましくは40 mg/mL樹脂以上である。
- [0044] 本発明によればさらに、本発明の吸着材に、イムノグロブリンを含有する試料を接触させることによってイムノグロブリンを精製する方法が提供される。

精製の対象となるイムノグロブリンとしては、生体あるいは培養細胞等によるもの他、それらの構造を模して人工的に合成されたものでもよく、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。また、イムノグロブリンは、非ヒト動物由来のイムノグロブリンを、ヒト化等のキメラ化、あるいはヒト型化（完全ヒト化）したものでもよい。また、精製対象であるイムノグロブリンとしては、モノクローナル抗体の重鎖可変領域であるVH鎖と軽鎖可変領域であるVL鎖のみからなるファージ抗体でもよい。

[0045] 本発明においては、pH5～9、60℃未満の条件下において本発明の吸着材を用いて、温度変化によってイムノグロブリンを溶出させることができる。本発明においては、温度のコントロールが必要であるが、温度をコントロールする方法としては、例えばアフィニティークロマトグラフィー用カラムの周囲に、循環する水等が直接接触するように循環用ジャケットを配置し、循環水等の温度を調節することにより該カラムの内部の温度を制御する方法等が挙げられる。

[0046] まず、ジャケットを循環する水等の熱媒体の温度を、0～15℃、好ましくは0～10℃、より好ましくは5℃に調節することにより、該カラム内の温度を同様の温度にする。そして中性pHの適切な緩衝液で平衡化された該カラムにイムノグロブリンを含む試料溶液を注入した後、洗浄用の緩衝液（中性pH）を用いて該カラムに結合しない物質を完全に除去する。平衡化緩衝液及び注入する試料溶液及び洗浄用緩衝液の温度も目的とする温度に保っておくことが好ましい。

[0047] アフィニティリガンドに結合しているイムノグロブリンは、前述同様に、該カラム内の温度を30～45℃、好ましくは32～38℃、より好ましくは37℃前後に安定させた後、同温度に保たれた溶出用の中性緩衝液を該カラムに注入することで、回収することができる。

[0048] 以下の実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、以下の実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0049] 実施例 1 :

(部位特異的変異導入のための鋳型プラスミドの調製)

ヒスチジンタグ配列、リンカー配列（配列番号 5）および温度応答性プロテイン A の反復配列からなるポリペプチドをコードする挿入遺伝子（配列番号 3）の 5' 末端側に NcoI 認識配列（C C A T G G）を、3' 末端側に BamH I 認識配列（G G A T C C）を付加した dsDNA は化学的に合成した。該 DNA の両末端を制限酵素 Nco I と BamH I で切断した後、アガロースゲル電気泳動を行い、Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t（キアゲン社製、日本）を用いて精製したものを挿入遺伝子として用いた。発現ベクターは、pET28b(+) プラスミド（メルク社製、日本）のクローニングサイトを制限酵素 Nco I と BamH I で切断し、前記挿入遺伝子を、T 4 D N A リガーゼでライゲーションして調製した。

[0050] (形質転換と鋳型プラスミドの増幅)

上記発現ベクターを用いて、ヒートショック法により、X L 1 - b l u e コンピテントセル（日本ジーン社製、日本）の形質転換を行った。その反応物を 50 μ g / mL のカナマイシンを含む LB 培地プレートで 18 時間増殖させた。該プレート上に出現したコロニーを 50 μ g / mL のカナマイシンを含む LB 液体培地に接種し、18 時間増殖させて上記発現ベクターで形質転換された大腸菌クローンを得た。

[0051] (鋳型プラスミドの精製)

この大腸菌株から、Q I A p r e p S p i n m i n i p r e p k i t（キアゲン社製、日本）を使用して、部位特異的変異導入のための鋳型プラスミドを精製した。

[0052] (リンカー配列の異なる変異体ポリペプチド発現ベクターの調製および発現)

リンカー配列の異なる変異体ポリペプチドは、上記鋳型プラスミドに、K O D p l u s M u t a g e n e s i s K i t（東洋紡社製、日本）を用いた I n v e r s e P C R 法によって部位特異的に変異導入して作成した

。Inverse PCRの後、メチル化されている鑄型プラスミドをDpn Iで消化した。その後、T4 DNAリガーゼでセルフライゲーションしたものを、リンカー配列の異なる変異体ポリペプチドの発現ベクターとした。作成した変異体ポリペプチドのリンカー配列部分のアミノ酸配列を、配列番号5に示した。得られた変異体ポリペプチドの発現ベクターを用いて、E. coli BL21(DE3)株の形質転換を行い、変異体ポリペプチドを発現する形質転換体1を得た。

[0053] [表1]

配列番号3

```

1  ATGGGCAGCA GCCATCATCA TCATCATCAC AGCAGCGGCC
41  TGGGCAGCCA TATGGCCGAT AACAAATTTA ATAAAGAAACA
81  GCAAAATGCG TTCTATGAGA TCTTGCAATGG TCCGAATGCC
121 AATGAGGAAC AACGTAACGC GTTTATTTCAG TCTCTCAAGG
161 ATGATCCGAG TCAGAGCGCC AACCTGTTAG CTGAAGCGAA
201 GAAACTGAAC GATGCACAGG CGCCTAAAGC GTCTCGAGCC
241 GATAACAAAT TTAATAAAGA ACAGCAAAAT GCGTTCTATG
281 AGATCTTGCA TGGTCCGAAT GCCAATGAGG AACCAACGTAA
321 CGCGTTTATT CAGTCTCTCA AGGATGATCC GAGTCAGAGC
361 GCCAACCTGT TAGCTGAAGC GAAGAAACTG AACGATGCAC
401 AGGCGCCTAA AGCG

```

一重下線部はHisタグ配列、二重下線部はリンカー配列、点線部は温度応答性プロテインAをコードする配列を示す。

[0054]

[表2]

配列番号	リンカー配列のアミノ酸配列	備考
4	SSGLVPRGSHM	比較例
5	SSGLGSHM	本発明
6	SSGLSHM	本発明
7	SSGLSSHM	本発明
8	SSGLSSRHM	本発明
9	SSGLSSRGHM	本発明
10	SSGLSSRGSHM	本発明
11	SSGLSSRGSSHM	本発明
12	SSGLHM	比較例
13	SSGLSSRGSSGHM	比較例
14	SSGLSSRGSSGSHM	比較例
15	SSGSSGSGSHM	本発明
16	SSGSSGSGSSM	本発明

[0055] (変異体の発現量確認)

変異体ポリペプチドを発現する形質転換体1を、50 μ g/mLカナマイシンを含むLB培地プレートで、37 $^{\circ}$ Cで、16時間増殖させた。出現したコロニーを1つ選び、50 μ g/mLカナマイシンを含むLB液体培地に接種して、37 $^{\circ}$ Cで振とう培養した。培養開始から5時間目に終濃度1mMとなるようにIPTGを添加してさらに3時間振とう培養を続けた。形質転換体1の菌体量を、分光光度計を用いて波長600nmの濁度で測定した値は14.8であった。

[0056] 得られた形質転換体1の培養液から、遠心分離によって菌体を回収し、10mM Tris-HCl(pH8.0)に懸濁した。この懸濁液にリゾチームを加えて、15 $^{\circ}$ C、30分間処理した後、さらに凍結解凍法によって菌体を破碎し、遠心分離によって、変異体ポリペプチドを上澄みに回収した。

得られた上澄み液に含まれる各変異体ポリペプチドの発現量はHPLC法で測定した。発現量は1.13mg/mLであった。

[0057] 実施例2～9

変異体ポリペプチドのリンカー配列を、配列番号 6～11 又は 15～16 に示すものに変更し、それぞれに対応する形質転換体 2～7 及び 12～13 を得た以外は、実施例 1 と同様に、部位特異的変異導入、形質転換体の調製および発現量の確認を行った。結果を表 3 に示した。

[0058] 比較例 1～4

変異体ポリペプチドのリンカー配列を、配列番号 4 又は配列番号 12～14 に示すものに変更し、それぞれに対応する形質転換体 10～13 を得た以外は、実施例 1 と同様に、部位特異的変異導入、形質転換体の調製および発現量の確認を行った。結果を表 3 に示した。

[0059] [表3]

	形質転換体	リンカー配列の 配列番号	菌体量 (600nm濁度)	発現量 (mg/ml)
実施例 1	1	5	14.8	1.13
実施例 2	2	6	13.9	0.70
実施例 3	3	7	14.3	0.72
実施例 4	4	8	15.2	0.80
実施例 5	5	9	15.1	0.91
実施例 6	6	10	14.8	0.93
実施例 7	7	11	14.4	0.86
実施例 8	8	15	14.6	0.69
実施例 9	9	16	14.3	0.61
比較例 1	10	4	14.2	0.71
比較例 2	11	12	13.2	0.51
比較例 3	12	13	13.8	0.59
比較例 4	13	14	12.1	0.48

[0060] 実施例 10

(形質転換体 1 の大量培養および安定性確認)

実施例 1 の形質転換体 1 を、50 μ g/mL カナマイシンを含む LB 培地プレートで、37℃で、16 時間増殖させた。出現したコロニーを 1 つ選び、50 μ g/mL カナマイシンを含む LB 液体培地に接種して、37℃で 7 時間振とう培養し

た。得られた培養液の0.5 mLを、5 L容量の加圧通気攪拌培養槽（培地
液量3 L、培地組成：2% グルコース、0.1% ラクトース1水和物、
0.5% 酵母エキス、1.0% ペプトン、0.5% NaCl）に接種
して、37℃で16時間、通気攪拌培養を行った。実施例1と同様に、菌体
量を測定し、菌体を破碎して変異体ポリペプチドの発現量を測定した。菌体
量は、600 nm濁度で35であり、変異体ポリペプチドの発現量は、培養
液当たりで2.3 g/Lであった（表4）。得られた菌体破碎液を10℃条
件下で24時間放置した後、変異体ポリペプチドの濃度を再度測定したとこ
ろ、2.3 g/Lであった（表4）。

[0061] 実施例11～18

形質転換体1の代わりに、形質転換体2～9をそれぞれ用いること以外は
、実施例10と同様に、形質転換体2～9の大量培養および安定性確認を行
った。結果を表4に示した。

[0062] 比較例5

（形質転換体10の大量培養および安定性確認）

形質転換体10を用いた以外は、実施例10と同様に培養を行った。菌体
量は、600 nm濁度で32であり、変異体ポリペプチドの発現量は、培養
液当たりで1.2 g/Lであった（表4）。実施例10と同様に菌体破碎液
を10℃条件下で24時間放置した後、変異体ポリペプチドの濃度を再度測
定したところ、0.9 g/Lであった（表4）。SDS-PAGEで確認し
たところ、変異体ポリペプチドのバンドよりも低分子量のバンドが出現して
いた。

[0063] 比較例6～8

形質転換体10の代わりに、形質転換体11～13をそれぞれ用いること
以外は、比較例5と同様に、形質転換体11～13の大量培養および安定性
確認を行った。結果を表4に示した。

[0064]

[表4]

	形質 転換体	リンカー配列 の配列番号	600nm 濁度	変異体ポリペプチドの濃度	
				発現量	24時間放置後
実施例10	1	5	35	2.3	2.3
実施例11	2	6	33	2.0	2.0
実施例12	3	7	35	2.1	2.1
実施例13	4	8	37	1.9	1.9
実施例14	5	9	33	2.0	2.0
実施例15	6	10	36	2.2	2.2
実施例16	7	11	34	2.1	2.1
実施例17	8	15	34	1.8	1.8
実施例18	9	16	35	1.9	1.9
比較例5	10	4	32	1.2	0.9
比較例6	11	12	33	1.4	1.0
比較例7	12	13	29	0.9	0.7
比較例8	13	14	30	0.9	0.6

[0065] 実施例 1 9

(形質転換体 1 培養液からの変異体ポリペプチドの精製)

実施例 1 0 で得られた変異体ポリペプチドを含む菌体破砕液を遠心分離して、変異体ポリペプチドを含む上澄み液を得た。得られた上澄み液を、N i - S e p h a r o s e C L - 6 B (G E ヘルスケア社製) カラムに吸着させて、2 5 0 m M イミダゾールを含む 1 0 m M T r i s - H C l 緩衝液 (p H 8 . 0) で溶出した。溶出液は、さらに、陰イオン交換カラムに吸着させて、N a C l 濃度グラジエントで溶出させることにより精製した。陰イオン交換カラムの溶出画分は、限外濾過膜 (分画分子量 3 0 0 0 k D a) で濃縮と脱塩を行って、変異体ポリペプチドの濃縮液 2 0 m L を得た。濃縮液中に含まれる変異体ポリペプチドの量は、1 . 0 g であった。

[0066] (変異体ポリペプチドの架橋ポリビニルアルコールビーズへの固定化)

得られた変異体ポリペプチドを、以下の方法により、架橋ポリビニルアルコールビーズへ固定化した。

1) カルボキシル基の導入

無水コハク酸 3.0 g 及び 4-ジメチルアミノピリジン 3.6 g をトルエン 450 mL に溶解させたものを反応液として用いた。架橋ポリビニルアルコールビーズ（平均粒子径 100 μm ）1 g を上記反応液と 50°C で接触させ、2 時間攪拌した。その後、架橋ポリビニルアルコールビーズを脱水イソプロピルアルコールで洗浄した。カルボキシル基導入量を測定した結果、443 $\mu\text{mol/mL}$ ビーズ体積であった。

[0067] 2) カラムパッキング

上記架橋ポリビニルアルコールビーズを、空カラム（Tricorn 5/20、GEヘルスケア社製）に充填した。

[0068] 3) NHS 活性化

上記カラムを 40°C に加温しながら、NHS 活性化反応液（NHS 0.7 g、脱水イソプロピルアルコール 45 mL、ジイソプロピルカルボジイミド 0.09 mL）を、0.4 mL/分の流速で 30 分間透過し、カルボキシル基を NHS 活性化した。反応後、脱水イソプロピルアルコールを透過させることで洗浄した。

[0069] 4) 変異体ポリペプチドのカップリング

上記 NHS 活性化カラムに氷冷した 1 mM 塩酸を 2 mL 透過して、脱水イソプロピルアルコールを置換した。ついで、変異体ポリペプチド 30 mg を 1 mL のカップリング緩衝液（0.2 M リン酸緩衝液、0.5 M NaCl、pH 8.3）に溶解後に 2°C に冷却し、0.4 mL/分の流速でカラムに供給した後、16 時間保持させた。所定時間経過後、カラムにカップリング緩衝液を透過させることで、NHS 活性基とカップリング反応しなかった変異体ポリペプチドを洗浄・回収した。

[0070] 5) ブロッキング

変異体ポリペプチドをカップリングしたカラムにブロッキング反応液（0.5 M エタノールアミン、0.5 M NaCl、pH 8.0）を 10 mL 透過し、残留 NHS をエタノールアミンでブロッキングした。反応後、このカラムを純水で洗浄し、その後 20% エタノールでカラムに封入した状態で

4℃で保存した。

[0071] 6) 免疫グロブリンの最大結合容量および動的吸着容量測定

クロマトグラフィーシステム (AKTA FPLC、GEヘルスケア社製) を用いて、温度変化による免疫グロブリン (献血ヴェノグロブリンーIH、ベネシス社製) の吸着・溶出試験を行った。カラムの温度変化操作は、クロマトグラフィーシステムのポンプを一度停止し、カラムを所定温度の恒温水槽に浸漬し、その後10分以上放置した後にクロマトグラフィーシステムのポンプを再度起動することにより行った。吸着温度を2℃、溶出温度を40℃とした。温度溶出後、溶出しきれなかった抗体を、低pHの溶出緩衝液 (0.1Mクエン酸緩衝液、pH3.0) で溶出させた。各溶出画分のUV吸収 (280nm) を測定し、下記式より免疫グロブリン濃度を算出することにより、免疫グロブリンの最大結合容量を算出した。

免疫グロブリン濃度 (mg/mL) = 280nmの吸光度 / 14×10

最大結合容量 (mg/mL) =

温度溶出画分の免疫グロブリン濃度 × 温度溶出画分の液量 / ビーズ体積
動的吸着容量は、得られた破過曲線の10%破過点の溶出容量から算出した。

[0072] (結果)

免疫グロブリンの最大結合容量は34.0mg/mLービーズ体積、動的吸着容量は19.9mg/mLービーズ体積であった (表5)。

[0073] 実施例20

架橋ポリビニルアルコールビーズの平均粒子径が60μmであること以外は、実施例19と同じ条件で実施した。免疫グロブリンの最大結合容量は47.0mg/mLービーズ体積、動的吸着容量は26.0mg/mLービーズ体積であった (表5)。

[0074] 実施例21

架橋ポリビニルアルコールビーズの代わりに、架橋セルロースビーズを用いること以外は、実施例19と同じ条件で実施した。免疫グロブリンの最大

結合容量は18.9 mg/mLービーズ体積、動的吸着容量は2.9 mg/mLービーズ体積であった（表5）。

[0075] 実施例22

架橋ポリビニルアルコールビーズの代わりに、架橋アガロースビーズを用いること以外は、実施例19と同じ条件で実施した。免疫グロブリンの最大結合容量は18.0 mg/mLービーズ体積、動的吸着容量は6.1 mg/mLービーズ体積であった（表5）。

[0076] 実施例23

実施例19で得られた変異体ポリペプチドの濃縮液を用いて、中空糸への固定化を行った。

1) 表面グラフト重合

GMA 20 gをメタノール180 mLに溶解させ、30分間、窒素バブリングしたものを反応液として用いた。ポリエチレン製中空糸（内径2.0 mm、外径3.0 mm、平均孔径0.25 μ m）2 gを窒素雰囲気下において、ドライアイスで-60℃に冷却しながら、コバルト60を線源として γ 線を200 kGy照射した。照射後の中空糸は、13.4 Pa以下の減圧下に5分間静置した後、20 mLの上記反応液と該中空糸を40℃で接触させ、16時間静置した。その後、中空糸をエタノールで洗浄し、真空乾燥機で真空乾燥させた。

[0077] 2) エポキシ基のジオール化

表面グラフト重合した中空糸を0.5 mol/L硫酸中に投入し、80℃で2時間反応を行うことで、グラフト鎖中に残存していたエポキシ基をジオール基に変換した。反応後、この中空糸を純水で洗浄した後、膜をエタノールで洗浄し、真空乾燥機で真空乾燥させた。

[0078] 3) カルボキシル基の導入

エポキシ基をジオール化した中空糸を、無水コハク酸3.0 g及び4-ジメチルアミノピリジン3.6 gをトルエン900 mLに溶解させた反応液に浸漬し、40℃で60分間反応させることで、グラフト鎖にカルボキシル基

を導入した。反応後、この中空糸をエタノールで洗浄し、真空乾燥機で真空乾燥させた。

[0079] 4) N H S 活性化

モジュール化した中空糸（中空糸 1 本モジュール、有効糸長 4 c m）を 4 0℃に加温しながら、N H S 活性化反応後（N H S 0. 0 7 g、脱水イソプロピルアルコール 4 5 m L、ジイソプロピルカルボジイミド 0. 0 9 m L）を 0. 4 m L / 分の流速で 6 0 分間透過し、カルボキシル基を N H S 活性化した。反応後、中空糸モジュールを氷冷しながら、中空糸モジュールに脱水イソプロピルアルコールを 0. 4 m L / 分の流速で 6 0 分間透過させることで洗浄した。洗浄後の中空糸モジュールは、脱水イソプロピルアルコールを封入した状態で、4℃で保存した。

[0080] 5) 変異ポリペプチドのカップリング

カルボキシル基を N H S 活性化した中空糸モジュールに氷冷した 1 m m o l / L 塩酸を 1 0 m L 透過して、保存液である脱水イソプロピルアルコールを置換した。次いで、実施例 1 9 で得られた変異体ポリペプチド 2 0 m g を 7 m L のカップリング緩衝液（0. 2 m o l / L リン酸緩衝液、0. 5 m o l / L N a C l、p H 8. 3）に溶解後に 2℃に冷却し、0. 4 m L / 分の流速で中空糸モジュールを透過させ、透過液を供給液に連続的に加えることで、1 6 時間循環させた。循環中もモジュールを 2℃に保つことで、カップリング時の温度を 2℃に保った。所定時間経過後、中空糸モジュールにカップリング緩衝液を透過させることで、N H S 活性基とカップリングしなかった変異体ポリペプチドを洗浄・回収した。

[0081] 6) ブロッキング

変異体ポリペプチドをカップリングした中空糸モジュールにブロッキング反応液（0. 5 m o l / L エタノールアミン、0. 5 m o l / L N a C l、p H 8. 0）を 1 0 m L 透過し、室温で 3 0 分間放置することで、残留 N H S をエタノールアミンでブロッキングした。反応後、この中空糸モジュールを純水で洗浄し、その後 2 0 %エタノールでモジュールに封入した状態

で4℃で保存した。

[0082] 6) 免疫グロブリンの最大結合容量および動的吸着容量測定

実施例19と同様にクロマトグラフィーシステム (AKTA FPLC、GEヘルスケア社製) を用いて、温度変化による免疫グロブリン (献血ヴェノグロブリンーIH、ベネシス社製) の吸着・溶出試験を行った。下記式より免疫グロブリン濃度を算出することにより、免疫グロブリンの最大結合容量を算出した。

免疫グロブリン濃度 (mg/mL) = 280nmの吸光度 / 1.4×10

最大結合容量 (mg/mL) =

温度溶出画分の免疫グロブリン濃度 × 温度溶出画分の液量 / 膜体積

[0083] (結果)

免疫グロブリンの最大結合容量は15.3mg/mL-膜体積であった (表5)。

[0084] 実施例24～31

形質転換体2～8を使用し、架橋ポリビニルアルコールビーズの平均粒子径が60μmであること以外は実施例19と同じ条件で、培養液から変異体ポリペプチドを精製し、架橋ポリビニルアルコールビーズに固定化し、免疫グロブリンの最大結合容量、及び動的吸着容量を測定した。結果を表5に示した。

[0085] 比較例9～12

形質転換体10～13を使用し、架橋ポリビニルアルコールビーズの平均粒子径が60μmであること以外は実施例19と同じ条件で、培養液から変異体ポリペプチドを精製し、架橋ポリビニルアルコールビーズに固定化し、免疫グロブリンの最大結合容量、及び動的吸着容量を測定した。結果を表5に示した。

[0086]

[表5]

	形質転換体	リンカー配列 の配列番号	担体	最大結合 容量	動的結合 容量
実施例19	1	5	架橋PVA(100um)	34	19.9
実施例20	1	5	架橋PVA(60um)	47	26
実施例21	1	5	架橋セルロース	18.9	2.9
実施例22	1	5	架橋アガロース	18	6.1
実施例23	1	5	中空糸膜	15.3	-
実施例24	2	6	架橋PVA(60um)	43	22
実施例25	3	7	架橋PVA(60um)	46	24
実施例26	4	8	架橋PVA(60um)	45	24
実施例27	5	9	架橋PVA(60um)	40	22
実施例28	6	10	架橋PVA(60um)	41	24
実施例29	7	11	架橋PVA(60um)	44	25
実施例30	8	15	架橋PVA(60um)	42	20
実施例31	9	16	架橋PVA(60um)	41	21
比較例9	10	4	架橋PVA(60um)	33	12.5
比較例10	11	12	架橋PVA(60um)	35	13.7
比較例11	12	13	架橋PVA(60um)	33	13.6
比較例12	13	14	架橋PVA(60um)	34	12.7

請求の範囲

- [請求項1] N末端側からタグペプチド、リンカー配列、及びプロテインAのBドメイン変異体を含むポリペプチドが結合された担体からなる吸着材であって、
上記リンカー配列が、Val-Pro-Arg配列を含まず、かつ7から12個のアミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列であり；前記プロテインAのBドメイン変異体が、pH5～9及び60℃未満の条件下においてイムノグロブリンとの結合性が温度によって変化するものである、上記吸着材。
- [請求項2] リンカー配列が、1から4個のグリシン残基と3から7個のセリン残基を含む、請求項1に記載の吸着材。
- [請求項3] リンカー配列が、メチオニン残基を含む、請求項1又は2に記載の吸着材。
- [請求項4] リンカー配列が、ロイシン残基を含む、請求項1から3の何れか1項に記載の吸着材。
- [請求項5] リンカー配列が、ヒスチジン残基を含む、請求項1から4の何れか1項に記載の吸着材。
- [請求項6] リンカー配列が、
グリシン残基、セリン残基及びメチオニン残基から構成されるアミノ酸配列；
グリシン残基、セリン残基、メチオニン残基及びヒスチジン残基から構成されるアミノ酸配列；
グリシン残基、セリン残基、メチオニン残基、ヒスチジン残基及びロイシン残基から構成されるアミノ酸配列；又は
グリシン残基、セリン残基、メチオニン残基、ヒスチジン残基、ロイシン残基及びアルギニン残基から構成されるアミノ酸配列；
の何れかである、請求項1から5の何れか1項に記載の吸着材。
- [請求項7] リンカー配列が、Ser-Ser-Gly-(Xaa)_n-Met（式中、nは3から8の整

数を示し、n個のXaaはそれぞれ独立に、グリシン残基、セリン残基、ヒスチジン残基、ロイシン残基又はアルギニン残基を示す）で示されるアミノ酸配列である、請求項1から6の何れか1項に記載の吸着材。

- [請求項8] リンカー配列が、Ser-Ser-Gly-Leu-(Xbb)_m-His-Met（式中、mは1から6の整数を示し、m個のXbbはそれぞれ独立に、グリシン残基、セリン残基又はアルギニン残基を示す）で示されるアミノ酸配列である、請求項1から7の何れか1項に記載の吸着材。
- [請求項9] タグペプチドが6×ヒスチジントグである、請求項1から8の何れか1項に記載の吸着材。
- [請求項10] プロテインAのBドメイン変異体が、配列番号1のポリペプチドと60%以上の相同性を有するアミノ酸配列（但し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において少なくとも19位のGly及び／または22位のGlyは、Ala又はLeuに置換されている）であって、かつpH5～9及び60℃未満の条件下においてイムノグロブリンとの結合性が温度によって変化するアミノ酸配列を、1分子内に少なくとも1以上含むものである、請求項1から9の何れか1項に記載の吸着材。
- [請求項11] プロテインAのBドメイン変異体が、配列番号2に記載のアミノ酸配列を1分子内に少なくとも1以上含むものである、請求項1から10の何れか1項に記載の吸着材。
- [請求項12] 担体が、粒子状のクロマト充填剤である、請求項1から11の何れか1項に記載の吸着材。
- [請求項13] 担体の平均粒子径が20～200 μmである、請求項1から12の何れか1項に記載の吸着材。
- [請求項14] 担体が、ポリビニルアルコールの架橋重合体から構成される、請求項1から13の何れか1項に記載の吸着材。
- [請求項15] ポリペプチドがアミド結合によって担体に結合されている、請求項1から14の何れか1項に記載の吸着材。

- [請求項16] 担体に対し、20 mg/mL樹脂以上のポリペプチドが結合している、請求項1から15の何れか1項に記載の吸着材。
- [請求項17] イムノグロブリンの最大結合容量が、20 mg/mL樹脂以上である、請求項1から16の何れか1項に記載の吸着材。
- [請求項18] 担体が、カルボキシル基を400～600 μmol /mL樹脂含むものである、請求項1から17の何れか1項に記載の吸着材。
- [請求項19] 担体が膜である、請求項1から11の何れか1項に記載の吸着材。
- [請求項20] 膜が中空糸状である、請求項19に記載の吸着材。
- [請求項21] 膜が、グラフト高分子鎖を導入した基材膜から製造される、請求項19又は20に記載の吸着材。
- [請求項22] 請求項1から21の何れかに記載の吸着材に、イムノグロブリンを含有する試料を接触させることを含む、イムノグロブリンの精製方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/067865

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/31(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K14/31

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq,
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2008/143199 A1 (Nomadic Bioscience Co., Ltd.), 27 November 2008 (27.11.2008), claims; paragraphs [0160] to [0169] & US 2010/0168395 A1 & US 2012/0184711 A1	1-5, 9-22 6-8
Y A	WO 2011/125673 A1 (JSR Corp.), 13 October 2011 (13.10.2011), claims; paragraphs [0062], [0072] to [0087] & US 2013/0023650 A1 & EP 2562178 A1 & WO 2011/125673 A & CN 102834407 A & KR 10-2013-0055569 A	1-5, 9-22 6-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 September, 2013 (09.09.13)

Date of mailing of the international search report
17 September, 2013 (17.09.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/067865

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	Cocca B A et al, Tandem Affinity Tags for the Purification of Bivalent Anti-DNA Single Chain Fv Expressed in Escherichia coli, Protein Expression and Purification, Vol.17, p.290-298, 1999	1-5, 9-22 6-8
Y A	JP 2003-508023 A (Bolder Biotechnology Inc.), 04 March 2003 (04.03.2003), claims & US 7754855 B1 & US 2010/0285014 A1 & EP 1200124 A & WO 2001/003737 A1 & DE 60040225 D & AU 6102200 A & CA 2379388 A & NZ 517184 A & AU 782496 B & AT 407697 T & ES 2317843 T	1-5, 9-22 6-8
Y A	JP 2007-289200 A (Genentech, Inc.), 08 November 2007 (08.11.2007), paragraph [0028]; example 1	1-5, 9-22 6-8
Y A	JP 61-268193 A (Chiron Corp.), 27 November 1986 (27.11.1986), page 5, lower left column & US 4751180 A & US 5342921 A & US 5523215 A & US 5866362 A & US 2002/0028481 A1 & US 2002/0146764 A1 & EP 196056 A2 & WO 1993/021303 A2 & DE 3679343 D & CA 1260858 A & DK 142186 A & AT 63757 T	1-5, 9-22 6-8
A	JP 63-214195 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 06 September 1988 (06.09.1988), entire text (Family: none)	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2013/067865

JP 2007-289200 A 2007.11.08

JP 2003-518075 A
JP 2007-289187 A
US 2004/0253247 A1
US 2006/0228364 A1
US 2007/0160534 A1
US 2010/0121039 A1
EP 1240337 A
EP 1757311 A2
EP 1757701 A1
EP 2180054 A1
WO 2001/045746 A2
WO 2007/106120 A2
DE 60030323 D
DE 60030323 T
DE 60041564 D
AU 2458701 A
CA 2390691 A
AU 784285 B
AT 337403 T
ES 2270893 T
AT 422369 T
PT 1240337 E
AU 2006202341 A
AU 2009201933 A

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07K14/31 (2006.01) i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07K14/31

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, CAPplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	WO 2008/143199 A1 (ノマディックバイオサイエンス株式会社) 2008.11.27, 特許請求の範囲, [0160]-[0169] & US 2010/0168395 A1 & US 2012/0184711 A1	1-5, 9-22 6-8
Y A	WO 2011/125673 A1 (J S R株式会社) 2011.10.13, 特許請求の範囲, [0062], [0072]-[0087] & US 2013/0023650 A1 & EP 2562178 A1 & WO 2011/125673 A & CN 102834407 A & KR 10-2013-0055569 A	1-5, 9-22 6-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 9 . 0 9 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 7 . 0 9 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

櫛引 明佳

4 N

3 2 3 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	Cocca B A et al, Tandem Affinity Tags for the Purification of Bivalent Anti-DNA Single Chain Fv Expressed in Escherichia coli, Protein Expression and Purification, Vol.17, p.290-298, 1999	1-5, 9-22 6-8
Y A	JP 2003-508023 A (ボルダー バイオテクノロジー, インコーポレイテッド) 2003.03.04, 特許請求の範囲 & US 7754855 B1 & US 2010/0285014 A1 & EP 1200124 A & WO 2001/003737 A1 & DE 60040225 D & AU 6102200 A & CA 2379388 A & NZ 517184 A & AU 782496 B & AT 407697 T & ES 2317843 T	1-5, 9-22 6-8
Y A	JP 2007-289200 A (ジェネンテック・インコーポレイテッド) 2007.11.08, 【0028】, 実施例 1	1-5, 9-22 6-8
Y A	JP 61-268193 A (チロン コーポレイション) 1986.11.27, 第5頁 左下欄 & US 4751180 A & US 5342921 A & US 5523215 A & US 5866362 A & US 2002/0028481 A1 & US 2002/0146764 A1 & EP 196056 A2 & WO 1993/021303 A2 & DE 3679343 D & CA 1260858 A & DK 142186 A & AT 63757 T	1-5, 9-22 6-8
A	JP 63-214195 A (協和醗酵工業株式会社) 1988.09.06, 全文 (ファミリーなし)	1-22

JP 2007-289200 A	2007. 11. 08	JP 2003-518075 A
		JP 2007-289187 A
		US 2004/0253247 A1
		US 2006/0228364 A1
		US 2007/0160534 A1
		US 2010/0121039 A1
		EP 1240337 A
		EP 1757311 A2
		EP 1757701 A1
		EP 2180054 A1
		WO 2001/045746 A2
		WO 2007/106120 A2
		DE 60030323 D
		DE 60030323 T
		DE 60041564 D
		AU 2458701 A
		CA 2390691 A
		AU 784285 B
		AT 337403 T
		ES 2270893 T
		AT 422369 T
		PT 1240337 E
		AU 2006202341 A
		AU 2009201933 A