(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5033177号
(P5033177)

(45)発行日　平成24年9月26日(2012.9.26)　(24)登録日　平成24年7月6日(2012.7.6)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 1/30	(2006.01)	C07K	1/30	
C12N 9/00	(2006.01)	C12N	9/00	101
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00	
C07K 14/565	(2006.01)	C07K	14/565	
C12N 9/06	(2006.01)	C12N	9/06	A

請求項の数 43　(全 25 頁)

(21)出願番号　特願2009-505340 (P2009-505340)
(86)(22)出願日　平成18年4月12日 (2006.4.12)
(65)公表番号　特表2009-533429 (P2009-533429A)
(43)公表日　平成21年9月17日 (2009.9.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2006/013751
(87)国際公開番号　WO2008/051178
(87)国際公開日　平成20年5月2日 (2008.5.2)
審査請求日　平成21年3月8日 (2009.3.8)

(73)特許権者　507334679
サビエント　ファーマセウティカルズ　インク.
アメリカ合衆国　０８８１６　ニュージャージー州、　イースト　ブランスウィック、　フォーティーンス　フロア、ワン　タワー　センター
(74)代理人　100101281
弁理士　辻永　和徳
(72)発明者　フィッシャー　メイヤー
イスラエル国　７６２４８、　レホボット、　イェヒエル　パルディ　ストリート　１２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】陽イオン界面活性剤によるタンパク質の精製

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
標的タンパク質の精製法であって、
ａ）　可溶化された標的タンパク質および可溶化された１つまたはそれ以上の混入タンパク質の混合物を含む溶液であり、標的タンパク質はアルカリ条件下で正電荷を帯び、１つまたはそれ以上の混入タンパク質は多価陰電荷を帯びている溶液を得る工程、
ｂ）　前記の可溶化された標的タンパク質および可溶化された１つまたはそれ以上の混入タンパク質の混合物を含む溶液を、１つまたはそれ以上の混入タンパク質を選択的に沈殿させるのに効果的な量の、１つまたはそれ以上の陽イオン界面活性剤で処理し、溶液中に残存する標的タンパク質の比率を大きくする工程、および
ｃ）　前記の可溶化された標的タンパク質を回収する工程。
【請求項２】
少なくとも１つまたはそれ以上の陽イオン界面活性剤が両親媒性アンモニウム化合物である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
両親媒性アンモニウム化合物が、一般式QN^+で表される第４アンモニウム化合物と、一般式RNH_3^+で表されるパラフィン鎖第１アンモニウム化合物、およびそれらの塩から成る群から選択される、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
両親媒性アンモニウム化合物を、セチルピリジニウム塩、ステアリン酸アミドーメチルピ

リジニウム塩、ラウリルピリジニウム塩、セチルキノリニウム塩、ラウリルアミノプロピオン酸メチルエステル塩、ラウリルアミノプロピオン酸金属塩、ラウリルジメチルベタイン、ステアリルジメチルベタイン、ラウリルジヒドロキシエチルベタインおよびベンゼトニウム塩からなる群から選択する、請求項３に記載の方法。

【請求項５】

両親媒性アンモニウム化合物が、塩化ヘキサデシルピリジニウム、デカリニウムアセテート、塩化ヒキサデシルピリジニウム、塩化セチルトリメチルアンモニウム、混合塩化ｎ－アルキルジメチルベンジルアンモニウム、塩化セチルピリジニウム、塩化Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－［２－［２－［４－（１，１，３，３，－テトラメチルブチル）－フェノキシ］エトキシ］エチル］ベンゼンメタンアンモニウム、塩化アルキル－ジメチルベンジル－アンモニウム、塩化ジクロロ－ベンジルジメチル－アルキルアンモニウム、臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム、臭化ドデシ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、ラウリルジメチルベタイン、ステアリルジメチルベタイン、ラウリルジヒドロキシエチルベタインから選択される、請求項４に記載の方法。

【請求項６】

両親媒性アンモニウム化合物がセチルピリジニウム塩である、請求項４に記載の方法。

【請求項７】

セチルピリジニウム塩がハロゲン化物塩である、請求項６に記載の方法。

【請求項８】

セチルピリジニウムハロゲン化物塩が塩化セチルピリジニウムである、請求項７に記載の方法。

【請求項９】

両親媒性アンモニウム化合物が、６～２０炭素原子を有する脂肪族鎖を少なくとも１本有する、請求項８に記載の方法。

【請求項１０】

脂肪族鎖が炭素原子８～１８個を有する、請求項９に記載の方法。

【請求項１１】

溶液が、さらに１つまたはそれ以上の細胞成分を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項１２】

１つまたはそれ以上の細胞成分が微生物由来である、請求項１１に記載の方法。

【請求項１３】

微生物がバクテリアである、請求項１２に記載の方法。

【請求項１４】

バクテリアがＥ．ｃｏｌｉである、請求項１３に記載の方法。

【請求項１５】

１つまたはそれ以上の細胞成分が１つまたはそれ以上のタンパク質である、請求項１１に記載の方法。

【請求項１６】

標的タンパク質が組み換えタンパク質である、請求項１に記載の方法。

【請求項１７】

組み換えタンパク質が酵素である、請求項１６に記載の方法。

【請求項１８】

標的タンパク質が、抗体、ウリカーゼ、インターフェロンベータ、凝固因子Ｘ阻害剤、ＩＩ型酸性デオキシリボヌクレアーゼ、エラスターゼ、リゾチーム、パパイン、ペルオキシダーゼ、膵臓リボヌクレアーゼ、トリプシノーゲン、トリプシン、シトクロムｃ、エラブトキシン、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンＣ１、インターフェロンおよびモノアミンオキシダーゼＡから成る群から選択される、請求項１６に記載の方法。

【請求項１９】

標的タンパク質がウリカーゼである、請求項１８に記載の方法。

【請求項２０】

ウリカーゼが哺乳類ウリカーゼである、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
哺乳類ウリカーゼがブタウリカーゼである、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
標的タンパク質が抗体である、請求項１６に記載の方法。
【請求項２３】
抗体が単鎖抗体である、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
標的タンパク質がインターフェロンである、請求項１６に記載の方法。
【請求項２５】
インターフェロンがインターフェロンベータである、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
１つまたはそれ以上の陽イオン界面活性剤が０．００１％～５．０％の濃度となるように加えられる、請求項１に記載の方法。
【請求項２７】
１つまたはそれ以上の陽イオン界面活性剤が０．０１％～０．５％の濃度となるように加えられる、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
１つまたはそれ以上の陽イオン界面活性剤が０．０３％～０．２％の濃度となるように加えられる、請求項２６に記載の方法。
【請求項２９】
処理が５分から４８時間施される、請求項１に記載の方法。
【請求項３０】
処理が１０分から２４時間施される、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
処理が４℃～３６℃の温度条件下で行われる、請求項１に記載の方法。
【請求項３２】
処理が４℃～２６℃の温度条件下で行われる、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
溶液に多価陰イオンが含まれない、請求項１に記載の方法。
【請求項３４】
溶液に固形支持体が含まれない、請求項１に記載の方法。
【請求項３５】
溶液に混入タンパク質と他分子の凝集体が含まれない、請求項１に記載の方法。
【請求項３６】
溶液に多価陰イオン、固形支持体、並びに混入タンパク質と他分子の凝集体が含まれない、請求項１に記載の方法。
【請求項３７】
陽イオン界面活性剤がセチルピリジニウム塩である、請求項３３、３４、３５または３６に記載の方法。
【請求項３８】
セチルピリジニウム塩が塩化セチルピリジニウムである、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
標的タンパク質の等電点が７以上である、請求項１に記載の方法。
【請求項４０】
ウリカーゼが、ウリカーゼをコードするＤＮＡを含んでおり、このＤＮＡの発現によってウリカーゼが産生されているバクテリア細胞から得たウリカーゼである、請求項２０に記載のウリカーゼ。
【請求項４１】
ウリカーゼが、バクテリア細胞が産生した封入体から回収したウリカーゼである、請求項

４０に記載のウリカーゼ。
【請求項４２】
以下の工程を含む、可溶化された標的タンパク質の精製法；
ａ） 可溶化された標的タンパク質および可溶化された１つまたはそれ以上の混入タンパク質を含む溶液であって、標的タンパク質はアルカリ条件下で正電荷を帯び、１つまたはそれ以上の混入タンパク質は多価陰電荷を帯びている溶液を得る工程、
ｂ） 前記の可溶化された標的タンパク質および可溶化された１つまたはそれ以上の混入タンパク質を含む溶液を、１つまたはそれ以上の混入タンパク質を選択的に沈殿させるのに効果的な量の、１つまたはそれ以上の両親媒性アンモニウム化合物である陽イオン界面活性剤で処理する工程、および
ｃ） 前記の可溶化された標的タンパク質を回収する工程。
【請求項４３】
下記の工程を含む、複数のタンパク質の溶液において標的タンパク質の割合を増加させる方法；
ａ．標的タンパク質と混入タンパク質を含んでおり、標的タンパク質が溶液の総タンパク質重量に対して第１の百分率を為している、複数のタンパク質が溶解した溶液であって、標的タンパク質はアルカリ条件下で正電荷を帯び、１つまたはそれ以上の混入タンパク質は多価陰電荷を帯びている溶液を得る工程、および
ｂ．前記の溶液を、混入タンパク質を選択的に沈殿させるのに効果的な量の、１つまたはそれ以上の陽イオン界面活性剤で処理する工程；
ここで、標的タンパク質が工程ｂの溶液において総タンパク質重量に対して第２の百分率を為しており、この第２の百分率は、第１の百分率よりも大きい。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連文献の相互参照
本出願は、参照によりここに援用されるところの、２００５年４月１１日出願の米国特許仮出願番号第６０／６７０，５２０号の優先権並びに利益を請求するものである。
【０００２】
技術分野
本発明は、界面活性剤を用いたタンパク質の精製に関する。
【０００３】
背景技術
生体高分子、特にタンパク質の生産工程には、物理的ならびに物理化学的性質を利用した高純度化工程を含むことが多い。このような加工工程にあっては、可溶性分子と不溶性分子を分離する条件の決定、比較的低率な各処理過程後の目的分子の収率、処理過程の中での生理活性の喪失、ｐＨなどの加工工程の条件へのタンパク質の感受性を含むが、これに限定されない問題が生じる。
【０００４】
界面活性剤は、生体高分子の加工に用いられてきた。陽イオン界面活性剤は界面活性剤のサブクラスとして知られており、両親媒性アンモニウム化合物もここに含まれる。両親媒性アンモニウム化合物は、一般式QN^+で表される第４アンモニウム化合物と、一般式RNH_3^+で表されるパラフィン鎖第１アンモニウム化合物を含む。上記２種の両親媒性アンモニウム化合物はどちらも、好ましくは最低６つの炭素原子から成る脂肪族長鎖を有する長鎖アンモニウム界面活性剤を有する（Ｓｃｏｔｔ（１９６０） Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ａｎａｌ．８：１４５－１９７を、参照することによってその全文を本明細書に含む）。長鎖第４アンモニウム界面活性剤は、生体高分子と相互作用することが知られている。長鎖第４アンモニウム化合物は、窒素の位置に、炭素原子６－２０個を有する直鎖アルキル鎖から成る置換基を少なくとも１つ持っている。この種類を代表する、最もよく知られている化合物には、ベンズアルコニウム塩（塩化物および臭化物）、塩化

ヘキサデシルピリジニウム　デカリニウムアセテート、臭化セチルジメチルアンモニウム（ＣＴＡＢ）、塩化ヘキサデシルピリジニウム（ＣＰＣＩ）、および塩化ベンゼトニウムがある。第４アンモニウム界面活性剤には、塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）などのセチルピリジニウム塩、ステアリン酸アミド－メチルピリジニウム塩、ラウリルピリジニウム塩、セチルキノリニウム塩、ラウリルアミノプロピオン酸メチルエステル塩、ラウリルアミノプロピオン酸金属塩、ラウリルジメチルベタイン、ステアリルジメチルベタイン、ラウリルジヒドロキシエチルベタインおよびベンゼトニウム塩がある。アルキルピリジニウム塩には、ステアリル－トリメチルアンモニウム塩、塩化アルキル－ジメチルベンジル－アンモニウム、塩化ジクロロ－ベンジルジメチル－アルキルアンモニウムがある。

【０００５】

生体高分子の精製における陽イオン界面活性剤の既知の用途は、１）タンパク質凝集体を含む凝集体の可溶化、２）クロマトグラフィーカラムに結合した生体高分子の溶出、および３）ヒアルロン酸（ＨＡ）、核酸、ヘパリンなどの多価陰イオン（および多価陰イオンと共沈する分子）の沈殿を含む。

【０００６】

陽イオン界面活性剤は、タンパク質凝集体を可溶化するのに用いられてきた。オッタ（Ｏｔｔａ）とベルティーニ（Ｂｅｒｔｉｎｉ）（（１９７５）　Ａｃｔａ　Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｌａｔｉｎｏａｍ．２５：４５１－４５７を、参照することによってその全文を本明細書に含む）は、齧歯類の肝臓から得たペルオキシソームから、第４アンモニウム界面活性剤であるハイアミン２３８９を用いて、活性ウリカーゼを可溶化することができることを示した。アンモニウム界面活性剤濃度の増加は、ウリカーゼ（酵素活性に基づく）と総タンパク質両方の溶解を増加させ、従って総タンパク質量に対してのウリカーゼタンパク質の相対量は増加しなかった。すなわち、総タンパク質に対してのウリカーゼタンパク質の選択的な可溶化は認められず、陽イオン界面活性剤による可溶化によって、ウリカーゼタンパク質が総タンパク質中でより高い割合を占めることはなかった。従って、この処理過程にあっては、総タンパク質量に対するウリカーゼの純度は、第４アンモニウム界面活性剤による可溶化によって向上されていないことが示唆される。

【０００７】

別の研究では、トゥルスコー（Ｔｒｕｓｃｏｅ）（（１９６７）　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｉａ　３３：１　１９－３２を、参照することによってその全文を本明細書に含む）が数種の陽イオン性、陰イオン性および中性界面活性剤について、ウシ腎臓粉末からの尿酸オキシダーゼ（ウリカーゼ）の抽出効率を調べた。中性界面活性剤および陰イオン界面活性剤は可溶性尿酸オキシダーゼの活性を向上させることが分かったが、第４アンモニウム塩などの陽イオン界面活性剤は、濃度の増加に伴って総酵素活性を低下させることが明らかとなった。著者らは、陽イオン界面活性剤はウシ腎臓尿酸オキシダーゼの精製に有用ではないと結論づけた。

【０００８】

Ｅ．ｃｏｌｉ封入体または細胞からの、陽イオン界面活性剤を用いた、組換えタンパク質、ブタ成長ホルモン、メチオニル－ブタ成長ホルモン、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスタンパク質、Ｂ－ガラクトシダーゼ融合タンパク質の可溶化は、米国特許番号第４，７９７，４７４号、米国特許番号第４，９９２，５３１号、米国特許番号第４，９６６，９６３号および米国特許番号第５，００８，３７７号に記載されており、これらを参照することによりその全文を本明細書に含む。アルカリ性条件下での可溶化は、塩化セチルトリメチルアンモニウム、混合塩化ｎ－アルキルジメチルベンジルアンモニウム、ＣＰＣ、塩化Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－［２－［２－［４－（１，１，３，３，－テトラメチルブチル）－フェノキシ］エトキシ］エチル］ベンゼンメタンアンモニウム、臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム、臭化ドデシ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を含む第４アンモニウム化合物を用いることで達成される。これらの文献は、溶液はそれぞれの可溶化プロセスの後に遠心分離にかけられるが、それぞれの場合において沈殿物は全く認められないか、それに近い、としている。このような観察結果は、標

的タンパク質の選択的な可溶化が起こっておらず、タンパク質の大部分または全てが可溶化されていることを示唆している。回収されたタンパク質の純度は、示されていない。参照することによって全文を本明細書に含む、米国特許番号第５，９２９，２３１号は塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）による、デンプンを含む顆粒および凝集体の分解を記載している。従って、従来の技術は、陽イオン界面活性剤による、粒子状生体高分子の全体的、非選択的な可溶化に関するものである。これらの既知の方法は、陽イオン界面活性剤を用いて、目的の標的タンパク質の純度を総タンパク質に対して高める方法を示していない。

【０００９】

陽イオン界面活性剤は、陽イオン交換樹脂またはアルミニウムを含有するアジュバンドに吸収された生体高分子の溶出にも使われてきた（Ａｎｔｏｎｏｐｏｕｌｏｓ，ｅｔ ａｌ．（１９６１） Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ ５４：２１３－２２６、Ｅｍｂｅｒｙ（１９７６） Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｂｕｃｃａｌｅ ４：２２９－２３６およびＲｉｎｅｌｌａ，ｅｔ ａｌ．（１９９８） Ｊ．Ｃｏｌｌｏｉｄ Ｉｎｔｅｒｆａｃｅ Ｓｃｉ．１９７：４８－５６のそれぞれを参照することによってその全文を本明細書に含む）。参照することによって全文を本明細書に含む米国特許番号第４，１６９，７６４は、多種多様な陽イオン界面活性剤溶液によってカルボキシメチルセルロースカラムからウロキナーゼを溶出する方法を記載している。著者らは、１つのアルキル基が最高２０炭素原子から成る高級アルキル基であり、その他のアルキル基が最高６炭素原子から成る低級アルキル基であるテトラ置換アンモニウム塩の使用が好ましいと記している。このような陽イオン界面活性剤の使用は、固体マトリクスに結合した生体高分子の分離を可能にする。

【００１０】

逆に、陽イオン界面活性剤を使用した、ナイロンなどから作られるフィルターの含浸は、多糖類または核酸の固定化を可能にする（Ｍａｃｃａｒｉ ａｎｄ Ｖｏｌｐｉ（２００２）Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ ２３：３２７０－３２７７、Ｂｅｎｉｔｚ，ｅｔ ａｌ．（１９９０） 米国特許番号第４，９４５，０８６号、 Ｍａｃｆａｒｌａｎｅ（１９９１） 米国特許番号第５，０１０，１８３号を、それぞれを参照することによって全文を本明細書に含む）。この現象は、多価陰イオンの沈降を可能にする、陽イオン界面活性剤－多価陰イオン間の相互作用によるものであると見られている。

【００１１】

一般式QN^+で表される第４アンモニウム化合物と、一般式RNH_3^+で表されるパラフィン鎖第１アンモニウム化合物を含む両親媒性アンモニウム化合物は、定められた条件下で多価陰イオンを沈降させることができることは、よく知られている（総説：Ｓｃｏｔｔ（１９５５） Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ１８：４２８－４２９、Ｓｃｏｔｔ（１９６０） Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ａｎａｌ．８：１４５－１９７、Ｌａｕｒｅｎｔ，ｅｔ ａｌ．，（１９６０） Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ ４２：４７６－４８５、Ｓｃｏｔｔ（１９６１） Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．８１：４１８－４２４、Ｐｅａｒｃｅ ａｎｄ Ｍａｔｈｉｅｓｏｎ（１９６７） Ｃａｎ．Ｊ． Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４５：１５６５－１５７６、Ｌｅｅ（１９７３） Ｆｕｋｕｓｈｉｍａ Ｊ．Ｍｅｄ．Ｓｃｉ．１９：３３－３９、Ｂａｌａｚｓ，（１９７９） 米国特許番号第４，１４１，９７３号、Ｔａｋｅｍｏｔｏ，ｅｔ ａｌ．，（１９８２） 米国特許番号第４，３１２，９７９号、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ（１９８１）米国特許番号４，３０１，１５３号、Ｔａｋｅｍｏｔｏ，ｅｔ ａｌ．，（１９８４） 米国特許番号第４，４２５，４３１号、ｄ’Ｈｉｎｔｅｒｌａｎｄ，ｅｔ ａｌ．，（１９８４）

米国特許番号第４，４６０，５７５号、Ｋｏｚｍａ，ｅｔ ａｌ．（２０００） Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０３：１０３－１１２をそれぞれ参照することによって全文を本明細書に含む）。このような沈降は、沈降する化学種が、高い多価陰イオン電荷密度および高い分子量を有することに依存する（Ｓａｉｔｏ（１９５５） Ｋｏｌｌｏｉｄ－Ｚ １４３：６６を参照することによって全文を本明細書に含む）。塩類の存在は

、陽イオン界面活性剤による多価陰イオンの沈降に干渉、またはこれを逆行させることがある。

【００１２】

加えて、多価陰イオンはタンパク質混入物を含む溶液から、アルカリｐＨ条件下で分画沈降させることができる。このような場合は、多価陰イオンに化学的に結合していないタンパク質は溶液中に残るが、多価陰イオンおよび多価陰イオンに結合しているその他の分子は沈降する。例えば、多糖類および核酸などの多価陰イオンの沈降は、プロテオグリカンおよび多価陰イオンと相互作用しているタンパク質の共沈を伴う（Ｂｌｕｍｂｅｒｇ ａｎｄ Ｏｇｓｔｏｎ（１９５８） Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．６８：１８３－１８８、Ｍａｔｓｕｍｕｒａ，ｅｔ ａｌ．，（１９６３） Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ ６９：５７４－５７６、Ｓｅｒａｆｉｎｉ－Ｆｒａｃａｓｓｉｎｉ，ｅｔ ａｌ．（１９６７） Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．１０５：５６９－５７５、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．（１９８４） Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５９：１１０４６－１１０５１、Ｆｕｋｓ ａｎｄ Ｖｌｏｄａｖｓｋｙ（１９９４） 米国特許番号第５，３６２，６４１号、Ｈａｓｃａｌｌ ａｎｄ Ｈｅｉｎｅｇａｒｄ（１９７４） Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２４９：４２３２－４２４１，４２４２－４２４９および４２５０－４２５６、Ｈｅｉｎｅｇａｒｄ ａｎｄ Ｈａｓｃａｌｌ（１９７４） Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．１６５：４２７－４４１、Ｍｏｒｅｎｏ，ｅｔ ａｌ．（１９８８） 米国特許番号第４，７５３，７９６号、Ｌｅｅ，ｅｔ ａｌ．（１９９２） Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１１６：５４５－５５７、Ｖａｒｅｌａｓ，ｅｔ ａｌ．（１９９５） Ａｒｃｈ． Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．３２１：２１－３０を、それぞれ参照することによって全文を本明細書に含む）。

【００１３】

タンパク質の等電点（またはｐＩ）とは、タンパク質が同じ数の陽電荷と負電荷を持っているｐＨ条件のことを言う。溶液のｐＨ値がタンパク質の等電点に近い（特に、等電点より低い）場合、タンパク質はヘパリンなどの強酸性の多価陰イオンと安定な塩を作ることができる。このような多価陰イオンの沈降を促進する条件化では、多価陰イオンと複合体を作っているタンパク質も共に沈降する（ＬＢ Ｊａｑｕｅｓ（１９４３） Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．３７：１８９－１９５、ＡＳ Ｊｏｎｅｓ（１９５３） Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ １０：６０７－６１２、ＪＥ Ｓｃｏｔｔ（１９５５） Ｃｈｅｍ ａｎｄ Ｉｎｄ １６８－１６９、米国特許番号第３，９３１，３９９号（Ｂｏｈｎ，ｅｔ ａｌ．，１９７６）、および米国特許番号第４，２９７，３４４号（Ｓｃｈｗｉｎｎ，ｅｔ ａｌ．，１９８１）をそれぞれ参照することによって全文を本明細書に含む）。

【００１４】

それぞれ参照することによって本明細書に含める、米国特許第４，４２１，６５０号、米国特許番号第５，６３３，２２７号およびＳｍｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．（（１９８４） Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５９：１１０４６－１１０５１）は、陽イオン界面活性剤および硫酸アンモニウム（これは、多価陰イオン－陽イオン界面活性剤複合体の乖離を可能にする）による逐次処理に引き続いて、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって、多価陰イオンを精製する方法を記載している。参照することによって全文を本明細書に含める、欧州特許ＥＰ０５５１８８は、陽イオン界面活性剤によって可能になっている、リポ多糖類からのＲＴＸ毒素の分離を記載している。しかしながら、エンドトキシン活性測定によって定量されるリポ多糖類の量で、物質収支がバランスしていない。強い相互作用を有する陽イオン複合体によってエンドトキシン活性が中和されることが、示されている（Ｃｏｏｐｅｒ ＪＦ（１９９０） Ｊ Ｐａｒｅｎｔｅｒ Ｓｃｉ Ｔｅｃｈｎｏｌ ４４：１３－５を参照することによって全文を本明細書に含む）。従って、ＥＰ０５５１８８における、より多量の陽イオン界面活性剤で処理した後に、沈殿物がエンドトキシン活性を欠くのは、界面活性剤－リポ多糖類複合体が生じることによる活性の中和によるものと考えられる。

【００１５】
陽イオン界面活性剤による可溶性タンパク質の精製が可能になるためには、上記の方法は、陽イオン界面活性剤による選択的な可溶性を有するタンパク質を含む、媒介多価陰イオン、固形支持体または凝集体を必要とする。従って、従来の技術は、標的タンパク質以外のタンパク質、すなわち混入タンパク質を選択的に沈降させるのに効果的な量の陽イオン界面活性剤をタンパク質に作用させることで、標的タンパク質を精製する方法、特に、このような処理を媒介多価陰イオン、固形支持体またはタンパク質凝集体の非存在下で行う方法を提供していない。当該分野に精通している技術者は、しばしば可溶性タンパク質の混合物に遭遇し、これを前にして目的のタンパク質を精製するシンプルで効率的な方法を欠く。本明細書に記載の、この新規のタンパク質精製法は、標的タンパク質以外のタンパク質を選択的に沈降させるために陽イオン界面活性剤を用いることで、標的タンパク質の効率的な精製を可能にする。好ましくは、このような混入タンパク質の沈降は直接的であって、混入タンパク質およびその他の分子を含む多価陰イオン、固形支持体または凝集体の存在に依存しない。

【００１６】
発明の要約
本発明は標的タンパク質および混入タンパク質を含む混合物からの、標的タンパク質の精製法を提供するものであって、混合物を、混入タンパク質を選択的に沈降させるのに効果的な量の陽イオン界面活性剤に曝露させるステップおよび標的タンパク質を回収するステップを含む。

【００１７】
図の簡単な説明
図１はＣＰＣ濃度のウリカーゼ活性およびその純度への影響を示した図である。

【００１８】
溶解したＥ．ｃｏｌｉ封入体から得た哺乳類ウリカーゼのタンパク質濃度（Ａ）および酵素活性（Ｂ）を、示された通りのＣＰＣ処理および遠心分離の後に測定した。それぞれの単離物の比活性度（Ｃ）は、これらの値の比として計算した（活性／タンパク質濃度）。

【００１９】
図２は、封入体から調製し、０．０７５％　ＣＰＣで処理した後の哺乳類粗ウリカーゼのＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィー分析の結果を示した図である。

【００２０】
ＡはＣＰＣ処理を施さない可溶化したＥ．ｃｏｌｉ封入体の、ＢはＣＰＣ（０．０７５％）沈殿および濾過を施した後の上清の、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィー分析のプロファイルを示した図である。それぞれのピークのエリアおよびその総エリアに対する比率は、その下の表にまとめた。

【００２１】
図３は、ＣＰＣ処理を施したウリカーゼのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析（１５％ゲル）の結果を示した図である。

【００２２】
ウリカーゼを含有するサンプルは、実施例１に記載の通りの方法で調製した。様々なプロセスステップから得たサンプルは、次のように分割した。レーン１：溶解したＩＢ、　レーン２：ＣＰＣ処理後の上精、レーン３：ＣＰＣ処理後のペレット。

【００２３】
図４は０．０２％　ＣＰＣ処理後の粗ｓｃＦｖ抗体のＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィー分析の結果を示した図である。

【００２４】
Ａは標準試料ＢＴＧ－２７１ｓｃＦｖ抗体の、Ｂは可溶化した封入体の、Ｃはリフォールディングおよびｃｐｃ（０．０２％）沈殿および濾過処理後の上精の、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィープロファイルの分析の結果を示した図である。それぞれのピーク

のエリアおよびその総エリアに対する比率は、その下の表にまとめた。
【００２５】
図５は、ＣＰＣ処理を施したｓｃＦｖ抗体のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析（１５％ゲル）の結果を示した図である。
【００２６】
様々なプロセスステップから得たｓｃＦｖ抗体を含むサンプルおよび標準試料は、次の順序で示してある。レーン１：分子量マーカー、レーン２：溶解したＩＢ、レーン３：リフォールディングしたタンパク質、レーン４：ＣＰＣペレット、レーン５：ＣＰＣ処理後の上精。
【００２７】
図６は、ＣＰＣ処理前および処理後のインターフェロンベータのＨＰＬＣゲル濾過クロマトグラフィー分析を示している。
Ａ．　ＣＰＣ処理前
Ｂ．　ＣＰＣ処理後
０．１ｍｇ／ｍｌのインターフェロンベータ溶液から２００μｌをカラムに分注した。
【００２８】
発明の詳細な説明
タンパク質は陽電荷、負電荷両方を持つため、両性電解質である。溶液のｐＨおよび、タンパク質と相互作用する荷電分子は、そのタンパク質の正味荷電に影響する。タンパク質の正味電荷が中性（等電点）であるとき、タンパク質間で強い相互作用が起こりえる。溶液のｐＨがタンパク質の等電点より下である場合、そのタンパク質は正味の正電荷を帯びており、他のタンパク質を含むカチオン性分子との間に静電反発力を生じる場合がある。
【００２９】
本発明は、標的タンパク質と混入タンパク質の混合物を含む溶液から、可溶化された標的タンパク質を精製する方法を提供することを目的とするものであって、可溶化された混合物に、効果的な量の陽イオン界面活性剤を作用させ、標的タンパク質を回収する工程を含む。陽イオン界面活性剤とは、正電荷を帯びた界面活性分子である。一般的にこれらの化合物は、加えて少なくとも一つの非極性脂肪族基を有する。好ましくは、標的タンパク質の等電点は７よりも大きい。特定の一実施形態にあっては、溶液のｐＨは標的タンパク質の等電点と概ね等しい。好ましい実施形態にあっては、溶液のｐＨは標的タンパク質の等電点よりも小さい。特定の一実施形態にあっては、溶液のｐＨが標的タンパク質の等電点よりも大きい場合、溶液のｐＨは標的タンパク質の等電点から、１～２ｐＨ単位の範囲内である。特定の一実施形態にあっては、溶液のｐＨが標的タンパク質の等電点よりも大きい場合、溶液のｐＨは標的タンパク質の等電点から、１ｐＨ単位の範囲内である。
【００３０】
特定の一実施形態にあっては、混入タンパク質または混入タンパク質群は選択的に沈降され、よって標的タンパク質を代表とする、溶液に残存するタンパク質の比率を増加させる。例えば、総タンパク質量のうち、標的タンパク質が２０％を占めている、標的タンパク質と混入タンパク質の溶液から出発して、ここに提供された方法を用いて、標的タンパク質が溶液に残存する総タンパク質の３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、９５％以上を占める溶液に到達するよう、標的タンパク質を精製することができる。
【００３１】
本明細書では、「選択的沈殿」を、任意のタンパク質またはタンパク質群が、他のタンパク質またはタンパク質群より、より多く沈殿することを意味する語として用いる。例えば、標的タンパク質と混入タンパク質の混合物にあっては、混入タンパク質の２０％以上が沈殿すると同時に、標的タンパク質の２０％未満しか沈殿しない場合は、混入タンパク質が、標的タンパク質に対して選択的に沈殿したものとする。混入タンパク質は高い割合で沈殿され、標的タンパク質は低い割合で沈殿されることが好ましい。好ましい実施形態

にあっては、混入タンパク質の３０％以上が沈殿すると同時に、標的タンパク質は３０％未満の割合で沈殿する；混入タンパク質の４０％以上が沈殿すると同時に、標的タンパク質は４０％未満の割合で沈殿する；混入タンパク質の５０％以上が沈殿すると同時に、標的タンパク質は５０％未満の割合で沈殿する；混入タンパク質の６０％以上が沈殿すると同時に、標的タンパク質は６０％未満の割合で沈殿する；混入タンパク質の７０％以上が沈殿すると同時に、標的タンパク質は７０％未満の割合で沈殿する；混入タンパク質の８０％以上が沈殿すると同時に、標的タンパク質は８０％未満の割合で沈殿する；混入タンパク質の９０％以上が沈殿すると同時に、標的タンパク質は９０％未満の割合で沈殿する；混入タンパク質の９５％以上が沈殿すると同時に、標的タンパク質は９５％未満の割合で沈殿する。標的タンパク質の少ない割合が沈殿することが好ましい。例えば、標的タンパク質の６０％未満、５０％未満、４０％未満、３０％未満、２０％未満、１０％未満、５％未満、１％未満が沈殿する。

【００３２】

特定の一実施形態にあっては、本発明の精製法を実施する前の、溶液中の総タンパク質量（標的タンパク質と混入タンパク質を加えたもの）は、０．１～１０ｍｇ／ｍｌである。特定の実施形態にあっては、本発明の精製法を実施する前の、溶液中の総タンパク質量は、０．１～３ｍｇ／ｍｌ、０．３～２ｍｇ／ｍｌ、０．５～２ｍｇ／ｍｌ、０．５～１ｍｇ／ｍｌ、１～２ｍｇ／ｍｌまたは約１ｍｇ／ｍｌである。

【００３３】

特定の実施形態にあっては、混入タンパク質の選択的沈殿は直接的であり、多価陰イオンの存在に実質的に依存することはないか、または依存しない。他の実施形態にあっては、混入タンパク質の選択的沈殿は直接的であり、固形支持体の存在に実質的に依存することはないか、または依存しない。他の実施形態にあっては、混入タンパク質の選択的沈殿は直接的であり、混入タンパク質と他の分子の間の凝集体の存在に実質的に依存することはないか、または依存しない。混入タンパク質の選択的沈殿にあっては、例えば、その要素の存在に実質的に依存することはないか、または依存しない場合、任意の要素（例えば、多価陰イオン、固形支持体、混入タンパク質と他の分子の凝集体）を除いた場合でも、混入タンパク質の選択的沈殿に影響しないか、または大きく影響しない。ある要素の除去による影響が実質的に影響しない例としては、その要素の存在下および非存在下両方の条件で混入タンパク質が選択的に沈殿することが挙げられる。さらなる例としては、その要素の存在下および非存在下両方の条件で、混入タンパク質が同程度に選択的に沈殿することが挙げられる。好ましくは、その要素の非存在下、または実質的な非存在下で、要素の存在下と同量または実質的に同量の混入タンパク質が沈殿する。

【００３４】

他の実施形態にあっては、本方法は多価陰イオンの非存在下または実質的に存在しない条件下で実施される。他の実施形態にあっては、本方法は固形支持体の非存在下または実質的に存在しない条件下で実施される。他の実施形態にあっては、本方法は混入タンパク質と他の分子の間の凝集体の非存在下または実質的に存在しない条件下で実施される。好ましくは、本方法は多価陰イオン、固形支持体、混入タンパク質と他の分子の間の凝集体のうち２つまたは３つの要素の非存在下または実質的に存在しない条件下で実施される。

【００３５】

本発明の方法が一旦提供されれば、当該分野に精通している技術者にとっては、使用する特定の界面活性剤、および例えばｐＨ、温度、塩分、陽イオン界面活性剤濃度、総タンパク質濃度などの条件を、特定の標的タンパク質の精製効率を高めるように本方法が適用できるよう選定することは容易である。例えば、異なったｐＨ値および界面活性剤濃度の下で実施された精製の結果を比較して、最適な精製条件を求めることができる。この方法の例を、下記の実施例のセクションに示している。特定の一実施形態にあっては、溶液のｐＨは、標的タンパク質の回収量を実質的に減少させない範囲で、最も高い値となるように選ばれる。

【００３６】

本発明のさらなる目的は、陽イオン界面活性剤の作用下における可溶性に基づいて、標的タンパク質の効率的な精製を可能にする条件を決定する方法を提供することである。

【００３７】

効果的な陽イオン界面活性剤の量とは、混入タンパク質の選択的沈殿を生じさせる界面活性剤の量である。特定の実施形態にあっては、効果的な量の界面活性剤は混入タンパク質の４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％を沈殿させる。

【００３８】

本発明の一実施形態にあっては、陽イオン界面活性剤はその濃度が０．００１％～５．０％となるように加えられ、好ましくは、陽イオン界面活性剤はその濃度が０．０１％～０．５％となるように加えられ、さらに好ましくは、陽イオン界面活性剤はその濃度が０．０３％～０．２％となるように加えられる。特定の実施形態にあっては、陽イオン界面活性剤はその濃度が０．０１％～０．１％、０．０１％～０．０７５％、０．０１％～０．０５％または０．０１％～０．０３％となるように加えられる。

【００３９】

本発明の一実施形態にあっては、上記の方法は、陽イオン界面活性剤が両親媒性アンモニウム化合物の際に達成される。

【００４０】

好ましい実施形態にあっては、可溶化された標的タンパク質は、混入タンパク質を選択的に沈殿させた後に、さらなる処理を施される。このようなさらなる処理には、追加的な精製ステップ、活性または濃度の測定、透析、クロマトグラフィー（例えばＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィー）、電気泳動などを含めることができる。

【００４１】

本明細書で用いる定義では、両親媒性アンモニウム化合物はカチオン性および非極性要素を有し、一般式QN^+またはRNH_3^+表される化合物を含む。Ｑは、窒素が第４アンモニウム（４つの、互いに結合を有するかまたは有しない有機基と共有結合を為している）であることを示している。有機基が互いに結合を有している場合、環状構造を作る要素間の結合の電気的構成に依存して、環式脂肪族化合物または芳香族化合物を形成する。選択した両親媒性アンモニウム化合物が一般式RNH_3^+で表される場合は、化合物はＲが脂肪族基である第１アミンである。脂肪族基は開鎖有機基である。

【００４２】

一実施形態にあっては、選択された両親媒性アンモニウム化合物はハロゲン化物と塩を形成する場合がある。一般に、ハロゲン化物塩とはフッ化物、塩化物、臭化物、ヨウ化物イオンを含むものを指す。

【００４３】

本発明の一実施形態にあっては、両親媒性アンモニウム化合物は６～２０炭素原子を含む脂肪族鎖を少なくとも１本を有し、好ましくは、両親媒性アンモニウム化合物は８～１８炭素原子を含む脂肪族鎖を少なくとも１本有する。

【００４４】

本発明の一実施形態にあっては、選択した両親媒性アンモニウム化合物は、セチルピリジニウム塩、ステアリン酸アミド－メチルピリジニウム塩、ラウリルピリジニウム塩、セチルキノリニウム塩、ラウリルアミノプロピオン酸メチルエステル塩、ラウリルアミノプロピオン酸金属塩、ラウリルジメチルベタイン、ステアリルジメチルベタイン、ラウリルジヒドロキシエチルベタインおよびベンゼトニウム塩からなる化合物群から選択される。

【００４５】

使用することのできる両親媒性アンモニウム化合物は、塩化ヘキサデシルピリジニウムデカリニウムアセテート、塩化ヘキサデシルピリジニウム、塩化セチルトリメチルアンモニウム、混合塩化ｎ－アルキルジメチルベンジルアンモニウム、塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）、塩化Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－［２－［２－［４－（１，１，３，３，－テトラメチルブチル）－フェノキシ］エトキシ］エチル］ベンゼンメタンアンモニウム、塩化アルキル－ジメチルベンジル－アンモニウムおよび塩化ジクロロ－ベンジルジメチル－ア

ルキルアンモニウム、臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム、臭化ドデシ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、ラウリルジメチルベタイン、ステアリルジメチルベタイン、ラウリルジヒドロキシエチルベタインを含むが、これに限定されない。

【００４６】

本発明の一実施形態にあっては、両親媒性アンモニウム化合物は塩化セチルピリジニウムなどのセチルピリジニウム塩である。

【００４７】

本発明の一実施形態にあっては、目的のタンパク質を含む混合物は、さらに、例えばＥ．ｃｏｌｉなどのバクテリアなどの微生物を由来とする細胞成分などの、細胞成分を含む。

【００４８】

本発明の一実施形態にあっては、細胞成分は１つまたはそれ以上のタンパク質である。

【００４９】

本発明の一実施形態にあっては、標的タンパク質は組換えタンパク質、例えば、酵素であり得る。

【００５０】

本発明の方法は、多様なタンパク質の精製に用いることができる。このようなタンパク質は、抗体、ウリカーゼ、インターフェロンベータ、ヒル凝固因子Ｘ阻害剤、ＩＩ型酸性デオキシリボヌクレアーゼ、エラスターゼ、リゾチーム、パパイン、ペルオキシダーゼ、膵臓リボヌクレアーゼ、トリプシノーゲン、トリプシン、シトクロムｃ、エラブトキシン、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンＣ１およびモノアミンオキシダーゼＡおよびその他の、アルカリ性条件下で正電荷を帯びているタンパク質を含むが、これに限定されない。

【００５１】

本発明の一実施形態にあっては、標的タンパク質は抗体、受容体、酵素、輸送タンパク質、ホルモン、またはこれらの断片または複合体、例えば第２のタンパク質または化学物質または毒素に結合したものであり得る。

【００５２】

抗体はモノクローナル、ヒト化、キメラ、単鎖、二特異性、Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ‘）２フラグメント、Ｆａｂ発現ライブラリーより作製された断片、抗イディオタイプ（ａｎｔｉ－Ｉｄ）抗体、および上記全てのエピトープ結合断片を含むがこれに限定されない。ただし、精製条件下で抗体が正電荷を帯びている事が条件である。

【００５３】

モノクローナル抗体の調製には、株化細胞の連続培養を用いて抗体分子を産生するあらゆる技術を用いることができる。これには、Ｋｏｈｌｅｒ&Ｍｉｌｓｔｅｉｎ（１９７５，Ｎａｔｕｒｅ ２５６，４９５－４９７および米国特許番号第４，３７６，１１０号）のハイブリドーマ技術、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Ｋｏｚｂｏｒ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ ４，７２、Ｃｏｌｅ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８０，２０２６－２０３０）およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのＥＢＶハイブリドーマ技術（Ｃｏｌｅ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，ｐｐ．７７－９６）を含むが、これに限定されない。

【００５４】

このような抗体は、クローン化をおこなうベースとして用いることができ、よって単一の重鎖と軽鎖を組み換えタンパク質として発現させることができる。２つの鎖は、組換えにより同じ細胞で発現させるか、別個に発現させ、精製してｉｎ ｖｉｔｒｏで組み合わせることができる。目的の重鎖または軽鎖、または目的の重鎖または軽鎖の可変領域を含む分子をコードする核酸（例えば、プラスミドベクター上の）を、異なった抗体の重鎖または軽鎖、または重鎖または軽鎖を含む分子を発現している細胞に形質転換し、多量体タ

ンパク質を発現させることができる。加えて、重鎖または、重鎖の可変領域またはその相補性決定領域を含む分子を発現することもでき、これは相補的な軽鎖または軽鎖可変領域の非存在下で用いることができる。他の実施形態にあっては、このような抗体やタンパク質のＮまたはＣ末端の修飾を、例えばＣ末端アミド化またはＮ末端アセチル化によって行うことができる。

【００５５】

キメラ抗体とは、異なった部分が異なった動物種由来である分子で、例えばマウスｍＡｂ由来の可変領域とヒト免疫グロブリン定常部からなるようなものである（例えばＣａｂｉｌｌｙ　ｅｔ　ａｌ．，米国特許番号第４，８１６，５６７号およびＢｏｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，米国特許番号第５，８１６，３９７号を参照）。キメラ抗体の産生に用いる技術には、適切な抗原特異性を有するマウス抗体分子の遺伝子と、適切な生理活性を有するヒト抗体分子の遺伝子とを接合する技術が含まれる（例えば、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，１９８４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，８１，６８５１－６８５５、Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，１９８４，Ｎａｔｕｒｅ　３１２，６０４－６０８、Ｔａｋｅｄａ，ｅｔ　ａｌ．，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ　３１４，４５２－４５４を参照）。

【００５６】

ヒト化抗体とは、非ヒト由来の抗体分子のうち、１つまたはそれ以上の非ヒト由来相補性決定領域（ＣＤＲ）およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有するものである。ヒト化抗体の産生に用いる技術は、例えばＱｕｅｅｎ（米国特許番号第５，５８５，０８９号）およびＷｉｎｔｅｒ（米国特許番号第５，２２５，５３９号）に記載されている。フレームワーク領域およびＣＤＲの範囲は、正確に定義されている（”Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ”，Ｋａｂａｔ，Ｅ．ｅｔ　ａｌ．，米国保険社会福祉省（１９８３）を参照）。

【００５７】

単鎖抗体は、Ｆｖ領域の重鎖および軽鎖断片をアミノ酸架橋を介して結合させることによって形成され、単鎖ポリペプチドとなる。単鎖抗体の産生に用いる技術は、例えば米国特許番号第４，９４６，７７８号、Ｂｉｒｄ，１９８８，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２，４２３－４２６、Ｈｕｓｔｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，１９８８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５，５８７９－５８８３およびＷａｒｄ，ｅｔ　ａｌ．，１９８９，Ｎａｔｕｒｅ　３３４，５４４－５４６に記載されている。

【００５８】

二特異性抗体とは遺伝的に改変した抗体であって、例えば（１）１つの特異的なエピトープおよび、（２）例えば骨髄細胞上のＦｃ受容体などの、「トリガー」分子、のように、２種類の標的を認識するものである。このような二特異性抗体は、化学的な接合、ハイブリドーマ、または組換え分子生物学的技術によって調製することができる。

【００５９】

抗体断片は、抗体分子のペプシン処理によって得られるＦ（ａｂ’）２フラグメント、Ｆ（ａｂ’）２フラグメントのジスフィルド架橋を還元することで得られるＦ（ａｂ‘）断片を含むが、これに限定されない。加えて、目的の特異性を有するモノクローナルＦａｂ断片を迅速、容易に同定するために、Ｆａｂ発現ライブラリを作製（Ｈｕｓｅ，ｅｔ　ａｌ．，１９８９，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４６，１２７５－１２８１）することができる。

【００６０】

本発明の一実施形態にあっては、タンパク質はウリカーゼである。

【００６１】

本発明の他の実施形態にあっては、ウリカーゼは哺乳類ウリカーゼである。

【００６２】

本発明の他の実施形態にあっては、哺乳類ウリカーゼは変異型哺乳類ウリカーゼである。

【００６３】
本発明の他の実施形態にあっては、哺乳類ウリカーゼはブタウリカーゼである。
【００６４】
本発明の他の実施形態にあっては、ブタウリカーゼ変異体はＰＫＳΔＮウリカーゼと命名されている。
【００６５】
本発明の他の実施形態にあっては、タンパク質は抗体である。
【００６６】
本発明の他の実施形態にあっては、抗体は単鎖抗体である。
【００６７】
本発明の他の実施形態にあっては、タンパク質はインターフェロンである。
【００６８】
本発明の他の実施形態にあっては、インターフェロンはインターフェロンベータである。本発明の他の実施形態にあっては、インターフェロンはインターフェロンベータ１ｂである。Ｎａｇｏｌａ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２８４：３１６（１９８０）、Ｇｏｅｄｄｅｌ，Ｄ．Ｖ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２８７：４１１（１９８０）、Ｙｅｌｖｅｒｔｏｎ，Ｅ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．，９：７３１（１９８１）、Ｓｔｒｅｕｌｉ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（Ｕ．Ｓ．），７８：２８４８（１９８１）、１９８１年５月６日公開の欧州特許出願番号第２８０３３号、１９８１年６月１５日公開の第３２１１３４号、１９８１年８月２６日公開の、第３４３０７号、および１９８１年７月１日発行のベルギー特許第８３７３７９号は、組換えＤＮＡ技術を用いたベータインターフェロンの産生法を記載している。バクテリアによって生産したＩＦＮの回収および精製の方法は、米国特許番号第４，４５０，１０３号、第４，３１５，８５２号、第４，３４３，７３５、第４，３４３，７３６号、およびＤｅｒｙｎｃｋら，Ｎａｔｕｒｅ（１９８０）２８７：１９３－１９７およびＳｃａｎｄｅｌｌａ＆Ｋｏｒｎｂｅｒｇ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１０：４４４７（１９７１）　に記載されている。
【００６９】
特定の実施形態にあっては、標的タンパク質はヒル凝固因子Ｘａ阻害物質である。ヒル凝固因子Ｘａ阻害物質は、当該分野に精通する者に知られているあらゆる方法、例えば、米国特許番号第６，２１１，３４１号および国際公開第９４／２３７３５号パンフレットに記載されている方法によって生産されうる。
【００７０】
本発明の一実施形態にあっては、処理時間は約１～約４８時間の間であって、より好ましくは約１０分～約２４時間、約３０分から約１２時間、約３０分から約８時間、約３０分から約６時間、約３０分～約４時間、約３０分～約２時間、約３０分から約１時間、または約１時間～２時間である。
【００７１】
本発明の一実施形態にあっては、処理の際の温度条件は約４℃～約３６℃、より好ましくは約４℃～約２６℃である。
【００７２】
本発明はさらに、陽イオン界面活性剤を、アルカリ性条件下で等電点が７以上であるタンパク質の精製に単剤として用いる方法をも提供する。
【００７３】
本発明はさらに、混合物を塩化セチルピリジニウムを加えることによってアルカリ性条件下で混合物から精製したウリカーゼをも提供する。
【００７４】
本発明の一実施形態にあっては、ウリカーゼは、ウリカーゼをコードするＤＮＡ配列を含むバクテリア細胞から、バクテリア細胞にＤＮＡ配列を発現させ、ウリカーゼを産生させる処理およびウリカーゼの回収を含む方法によって、得る。

【００７５】
本発明の一実施形態にあっては、ウリカーゼはバクテリア細胞内の沈殿物から回収される。
【００７６】
本発明はさらに、ウリカーゼポリマー複合体の調製に用いる精製ウリカーゼをも提供する。
【００７７】
本発明はさらに、タンパク質を含む混合物を効果的な量の陽イオン界面活性剤によって、タンパク質が正電荷を帯びるまたは正電荷を帯びた表面を有するような条件下で処理し、タンパク質を回収するステップを含む方法によって、得られることが可能となる等電点が７以上である精製されたタンパク質をも提供する。
【００７８】
本発明は、等電点が７以上であるタンパク質の精製にセチルピリジニウム塩を用いる方法を提供する
【００７９】
ｐＨに関しては、混合物を効果的な量の陽イオン界面活性剤によって、タンパク質が正電荷を帯びるような条件下で処理する実施形態にあっては、ｐＨは標的タンパク質の性質によって異なる。しかしながら、ｐＨは好ましくはｐＨ７～ｐＨ１１、好ましい範囲は、約ｐＨ７～約ｐＨ１０、約ｐＨ７～約ｐＨ９、約ｐＨ８～約ｐＨ１１、約ｐＨ８～約ｐＨ１０、または約ｐＨ８～約ｐＨ９である。
【００８０】
実施例
以下の実施例は本発明の理解を助けるために提供するものであり、決して本発明を限定することを意図するものではなく、またそう解釈されるものではない。
実施例　１．ＣＰＣを用いた、組換え哺乳類ウリカーゼの精製
【００８１】
１．１．背景
医薬品グレードのウリカーゼは、基本的に非ウリカーゼタンパク質を全く含まないものでなければならない。Ｅ．ｃｏｌｉで産生された哺乳類ウリカーゼ（等電点８．６７）は、さらなる精製処理を施すために容易に単離できる、封入体（ＩＢ）と称される細胞内小器官に似た沈殿物に、細胞内で蓄積した。ＩＢはスクランブル／ミスフォールドされて発現されたタンパク質を含むものと従来考えられてきたが、対照的に、これらのＩＢ様エレメントは正しい折りたたみ構造を有するウリカーゼを沈殿物の形態で含んでいる。ウリカーゼＩＢ様エレメントのアルカリ性ｐＨ、例えば約ｐＨ９～１１への曝露によって、沈殿しているタンパク質は再溶解した。可溶化されたＩＢ様エレメントのウリカーゼ含有率は約４０～６０％であり、均質なウリカーゼ調製物を得るためには、高度な精製を要した。ここに、多様な方法によって評価可能である、ＣＰＣを用いた、ウリカーゼならびにその他のタンパク質の精製を示す。例えば、哺乳類ウリカーゼの純度は、比活性度の測定、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルでの電気泳動および染色処理後に現れるバンドの数、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィー分析で現れるピークのサイズと数によって評価することができる。
【００８２】
１．２．材料と方法
１．２．１．５０　ｍＭ　ＮａＨＣＯ$_3$　バッファー　（ｐＨ　１０．３）
このバッファーは、ＮａＨＣＯ$_3$を最終濃度が５０ｍＭになるように溶解して調製した。ｐＨは１０．２～１０．４になるように調整した。ｐＨの初期値によって、０．１ＭＨＣｌまたは１Ｎ　ＮａＯＨを用いることができる。
１．２．２．１０％　ＣＰＣ　溶液
【００８３】
１０％　ＣＰＣ溶液は、ＣＰＣを最終濃度が１０ｇ／１００ｍｌとなるように、蒸留水

に溶解して調製した。

【００８４】

１．２．３．組換えブタウリカーゼの発現

組換え哺乳類ウリカーゼ（尿酸オキシダーゼ）は、参照することによって全文を本明細書に含む、デューク大学の国際公開第００／０８１９６号パンフレットおよび米国特許番号第６０／０９５，４８９号に記載のとおり、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｋ－１２株Ｗ３１１０　Ｆ⁻で発現させた。

【００８５】

１．２．４．ウリカーゼを産生するバクテリアの培養と回収

バクテリアは、カゼイン加水分解産物、酵母抽出物、塩、グルコース、アンモニアを含有する成長培地中で、３７℃で培養した。

【００８６】

培養の後、ウリカーゼを蓄積したバクテリアを遠心処理によって回収し、残存する成長

【００８７】

培地を除くために、水で洗浄した。

１．２．５．細胞破壊および回収

回収した細胞ペレットをｐＨ８．０の５０ｍＭトリスバッファーと１０ｍＭのＥＤＴＡ溶液に懸濁し、最終的に乾燥菌体重量（ＤＣＷ）のほぼ２０倍の体積となるように調製した。撹拌中のペレット懸濁液に、２０００－３０００　ｕｎｉｔｓ／ｍｌの濃度でライソザイムを加え、４℃～８℃で、１６～２０時間インキュベートした。

【００８８】

細胞可溶化液は、強くせん断混合した後、超音波処理を施した。懸濁液を等量の脱イオン水で希釈し、遠心処理した。ウリカーゼ封入体を含んだペレットを、脱イオン水（ｗ／ｗ）で希釈して遠心処理し、さらに不純物を除いた。この最後の洗浄ステップで得たペレットをこの後の処理に用い、上精は廃棄した。

【００８９】

１．２．６．溶解

封入体（ＩＢ）ペレットをｐＨ１０．３～０．１±０．１の５０　ｍＭ　$NaHCO_3$ バッファーに懸濁した。懸濁液を２５±２℃で約０．５～２時間インキュベーションし、ＩＢ由来のウリカーゼが溶解できるようにした。

【００９０】

１．２．７．ＣＰＣ処理

ホモジェナイズしたＩＢ（ｐＨ１０．３）のアリコットに、目的のＣＰＣ濃度が得られるよう、活発に混和しながら１０％ＣＰＣ溶液を加えた。示したとおりに、サンプルを１時間から２４時間インキュベートし、この間に沈殿物のフレークが生じた。サンプルを、１２，０００　ｘ　ｇで１５分間遠心した。ペレットと上精を分離し、ペレットは５０ｍＭ　$NaHCO_3$ バッファー（ｐＨ　１０．３）に、元の体積となるよう懸濁した。それぞれの分画の酵素活性を測定し、分画は濃縮し透析して、残ったＣＰＣを除いた。

【００９１】

１．２．８．タンパク質アッセイ

処理したＩＢサンプルと非処理のＩＢサンプルのアリコットの、タンパク質含有量を、改変ブラッドフォード法によって測定した（Ｍａｃａｒｔ　ａｎｄ　Ｇｅｒｂａｕｔ（１９８２）　Ｃｌｉｎ　Ｃｈｉｍ　Ａｃｔａ　１２２：９３－１０１）。

【００９２】

１．２．９．ウリカーゼアッセイ

１．２．９．１．酵素活性

ウリカーゼの活性を、ＵＶ法（Ｆｒｉｄｏｖｉｃｈ，Ｉ．（１９６５）Ｔｈｅ　ｃｏｍｐｅｔｉｔｉｖｅ　ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ　ｏｆ　ｕｒｉｃａｓｅ　ｂｙ　ｏｘｏｎａｔｅ　ａｎｄ　ｂｙ　ｒｅｌａｔｅｄ　ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ　ｏｆ　ｓ－ｔｒｉａｚｉｎｅｓ．Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ，２４０，２４９１－２４９４を、１ｍｇ／ｍｌ　ＢＳ

Ａを含めることで改変）用いて測定した。酵素反応速度は、２つのサンプルで、尿酸のアラントインへの酸化による、２９２ｎｍ波長分光の吸光度の減少を測定することによって求めた。１活性単位は、定められた条件下で、２５℃で１分間に１μモルの尿酸を分解するのに要するウリカーゼの量と定義する。ウリカーゼの力価は、１ｍｇタンパク質あたりの活性単位（Ｕ／ｍｇ）として表す。

【００９３】

測定光路長が１ｃｍの場合の、１ｍＭ尿酸の２９２ｎｍにおける消衰係数は１２．２である。よって、反応溶液１ｍｌあたりの１μモルの尿酸の酸化は、１２．２ｍA_{292}の吸光度減少となる。吸光度の経時的な変化（ΔA_{292}／分）は、曲線の直線部から得た。よって、ウリカーゼ活性は、次のように算出した：

【数１】

$$\text{活性 (U/ml)} = \frac{\Delta A_{292nm}\,(\text{AU/分}) \times DF \times V_{RM}}{V_S \times 12.2}$$

ただし：ＤＦ＝　希釈係数、

V_{RM}＝反応液の総量（単位はμｌ）

V_S＝反応液に分注した希釈したサンプル（単位はμｌ）

【００９４】

１．２．９．２．Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００を用いたＨＰＬＣ分析

未変性のウリカーゼ酵素ならびに混入物の、量およびその相対的な割合は、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００カラムを用いたＨＰＬＣによって得た溶出プロファイルより定量された。２つのウリカーゼ溶液のサンプルをカラムに分注した。それぞれのピークならびに総エリアに占める割合は自動的に計算され、これを図の次に示した表にまとめた。

【００９５】

１．２．１０．ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析

１レーンあたり～２０□ｇのタンパク質を含むサンプルを、１５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で分離した。得られたゲルは、クーマシーブリリアントブルーで染色した。

【００９６】

１．３．結果

上精に回収されたウリカーゼ活性および純度への、ＣＰＣ処理（０．００５％～０．０７５％、１～２４時間）の影響は、表１および図１に示した。（ｐＨ１０．３の下での）ＣＰＣ処理前にあっては、タンパク質濃度は１．９５ｍｇ／ｍｌであり、比酵素活性度は３．４－４．６７Ｕ／ｍｇであった。図１Ｂに示した結果は、それぞれのインキュベーション時間で、ＣＰＣ濃度が増えるにつれ、上精のタンパク質濃度が減少していることを示している。０．０４％以下の濃度では、ＣＰＣのタンパク質濃度に与える影響は比較的小さかった。０．０４％～０．０７５％の濃度では、ＣＰＣはタンパク質濃度を元の濃度の約５０％にする場合がある。

【００９７】

ＣＰＣの総タンパク質への影響とは対照的に、総可溶性ウリカーゼ活性はＣＰＣ濃度およびインキュベーション時間の増加に顕著な影響を受けなかった（図１Ａ）。それぞれのインキュベーション時間の中で、比酵素活性度（図１Ｃ）は０．０４％～０．０７５％の範囲内で、ＣＰＣ濃度の関数として一貫して増加した。この増加は、非ウリカーゼタンパク質の特異的な除去によるものである。最終的に得た精製酵素の比酵素活性度が約９　Ｕ／ｍｇであったことから、混入タンパク質の大部分が、ＣＰＣ沈殿によって除去されたことが分かる。ＨＰＬＣおよびＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分析でも、この結論を指示する結果が得られた。

表１：　ＣＰＣへの暴露のウリカーゼの活性および純度への影響

【表１】

インキュベーション時間(時間)	[CPC] (%)	ウリカーゼ活性 (U/ml)	[タンパク質] (mg/ml)	ウリカーゼ比活性度 (U/mg)
1	0 (load)	6.63	1.95	3.4
1	0.005	7.1	1.8	3.9
1	0.01	6.63	1.75	3.7
1	0.02	6.63	1.75	3.7
1	0.04	6.4	1.47	4.35
1	0.06	5.9	0.95	6.2
1	0.075	6.4	0.9	7.1
4	0.005	8.61	1.7	5.06
4	0.01	8.36	1.66	5.04
4	0.02	8.36	1.6	5.04
4	0.04	7.38	1.32	5.59
4	0.06	6.4	0.9	7.1
4	0.075	6.9	0.82	8.4
24	0.005	8.8	1.9	4.66
24	0.01	7.9	1.9	4.14
24	0.02	7.9	1.9	4.14
24	0.04	7.3	1.5	4.9
24	0.06	6.9	0.97	7.1
24	0.075	6.6	0.9	7.4
24	0 (load)	9.1	1.95	4.67

【００９８】

１．４．ＣＰＣによるウリカーゼの高純度化の確認

ウリカーゼを含有するＩＢを、１．３に記載したとおりの方法で単離し、可溶化した。ＣＰＣ処理前、およびＣＰＣにより沈殿したタンパク質を濾過で除いた後の可溶物のサンプルを分析した。

【００９９】

１．４．１．　０．０７５％ＣＰＣ処理後の、非ウリカーゼタンパク質のＨＰＬＣ分析

可溶化したＩＢのＨＰＬＣ分析は、ウリカーゼのピーク（保持時間（ＲＴ）～２５．５分）が、粗ＩＢサンプルのタンパク質の約４６％を占めることを示した（図２Ａ）。ＣＰＣ処理後は、ウリカーゼのピークがタンパク質の約９２％にまで増加し（図２Ｂ）、ＲＴ１５～２２分の間で溶出する混入物が顕著に減少している（図２Ａ）。ウリカーゼピークのエリアは、図２Ａの約７０％である。従って、これらの結果は、ＣＰＣ処理による非ウリカーゼタンパク質の除去によって、ウリカーゼの純度が２倍になったことを示している。

【０１００】

１．４．２．　０．０７５％　ＣＰＣの、酵素活性への影響

（表２に示した）結果は、ウリカーゼ活性の物質収支が、処理過程を通じて保持されていたことを示している。ＣＰＣへの曝露は、溶液中の総タンパク質の６０％を沈殿させることが示された。溶液の酵素活性の８５％以上が残存したので、外来タンパク質の除去は、生成された上精の比酵素活性度を１１０％以上増加させたことになる。ほとんどの精製処理でそうであるように、目的の活性の一部は、ペレットに残存した。この例では、元の活性の１７．６％のみがペレットに残存し（これを、分析のため５０ｍＭ重炭酸ナトリウム（７ｍ　Ｓｉ、ｐＨ　１０．３）で抽出した）、総量に占める割合は比較的低かった。

表２：ＣＰＣ処理のウリカーゼの活性への影響

【表２】

サンプル	総活性 (U)	活性 (U/ml)	[タンパク質] (mg/ml)	比活性度 (U/mg)	活性の回収率(%)
ＣＰＣ処理前	490	4.9	2	2.46	100
ＣＰＣ処理後	418	4.18	0.8	5.2	85.3
ＣＰＣ処理後のペレット	86	0.8	-	-	17.6

【０１０１】

１．４．３．　０．０７５％　ＣＰＣ　後のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析

粗ウリカーゼのＣＰＣ処理前および、その後の可溶性物質と不溶性物質の分離、ＣＰＣ処理、遠心処理による分画、遠心によって得たペレットの再構成、の各処理過程から得た、等量のタンパク質を含むサンプルを、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。結果（図３参照）は、ＣＰＣ処理前では、混入タンパク質が存在していることを示している。ＣＰＣ処理後では、ペレットにほとんどの混入タンパク質が含まれており、上精ではウリカーゼが主要な単バンドを形成していた。

【０１０２】

実施例　２．　ＣＰＣ処理の、単鎖（ｓｃＦｖ）抗体の精製に与える影響

２．１．材料と方法

２．１．１．緩衝液

２．１．１．１．封入体溶解液

溶解バッファーは、６Ｍ尿素、５０ｍＭトリス、１ｍＭ　ＥＤＴＡおよび０．１Ｍシステインを含有する。バッファーのｐＨは８．５に滴定した。

【０１０３】

２．１．１．２．フォールディングバッファー

フォールディングバッファーは、１Ｍ尿素、０．２５ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡおよび０．１Ｍシステインを含有する。バッファーのｐＨは１０．０に滴定した。

【０１０４】

２．１．２．バクテリアでの、ｓｃＦｖ抗体の発現

ｓｃＦｖ抗体（ｐＩ８．９）は、参照することによって全文を本明細書に含むＰＣＴ公報ＷＯ０２／０５９２６４に記載の、カルボキシ末端にシステイン－リシン－アラニン－リシンを有するｓｃＦｖをコードするベクターで形質転換したＥ．ｃｏｌｉで発現させた。

【０１０５】

２．１．３．ｓｃＦｖ抗体を産生するバクテリアの培養と回収

ｓｃＦｖを含有するバクテリア細胞は、誘導を行う前培養として、５時間、最終濃度０．５％となるようにＬ－アルギニンを加え、ｐＨを７．２に調整した最小培地で培養した。ｓｃＦｖ発現の誘導は、培地のグルコース量を限定することで行った。ｓｃＦｖを含有するバクテリア細胞の培地からの回収は、限外濾過によって行った。

【０１０６】

２．１．４．細胞破壊および封入体の回収

回収した細胞ペレットをｐＨ８．０の５０ｍＭトリスバッファーと１０ｍＭのＥＤＴＡ溶液に懸濁し、最終的に乾燥菌体重量（ＤＣＷ）の２０倍の体積となるように調製した。撹拌中のペレット懸濁液に、２０００－３０００　ｕｎｉｔｓ／ｍｌの濃度でライソザイムを加え、４℃で、１６～２０時間インキュベートした。

【０１０７】

細胞可溶化液は、強くせん断混合した後、超音波処理を施した。ｓｃＦｖ抗体含有封入体は１０，０００ｘ　ｇの遠心処理で回収した。ペレットは脱イオン水（ｗ／ｗ）で約１６倍に希釈して遠心処理し、さらに不純物を除いた。この最後の洗浄ステップで得たペレットをこの後の処理に用いた。

【０１０８】
２．１．５．溶解およびリフォールディング
ＩＢを多く含んだペレットを、封入体溶解バッファー（上記参照）に懸濁し、室温で５時間インキュベーションし、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでアルギニン／酸化型グルタチオンをベースとする溶液でリフォールドさせた。リフォールディング後、タンパク質に透析処理を施し、尿素／リン酸を含有するバッファーに対して、タンジェンシャルフロー濾過によって濃縮した。
【０１０９】
２．１．６．ＣＰＣ処理
ｓｃＦｖを含有するリフォールディング混合物に、最終濃度が０．０２％となるよう１０％ＣＰＣ溶液を加えた。室温で１～２時間インキュベーションした後、沈殿物は濾過によって除去した。上精が、ｓｃＦｖ抗体を含有する。
【０１１０】
２．２．結果
２．２．１．回収可能なｓｃＦｖ抗体への、ＣＰＣ濃度の影響
（ｐＨ７．５または１０における）ＣＰＣ処理の、ｓｃＦｖ抗体の純度および回収に与える影響は、表３に示してある。ＣＰＣ処理前の、ＩＢタンパク質の初期量は７３ｍｇであり、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　７５によるＨＰＬＣ分析で１５．８７ｍｇのｓｃＦｖ抗体を含んでいることが示された。ｓｃＦｖ抗体を含有するピークの保持時間（ＲＴ）は約２０．６分であった。結果は、ＣＰＣ濃度の増加に伴って総タンパク質の回収量が減少し、ＣＰＣ濃度が０．０３％未満であるときは、ｓｃＦｖ抗体の回収量は８０％より高い範囲に留まったことを示していた。ｐＨ１０の条件下に比べて、ｐＨ７．５の条件下では、より効率的な混入タンパク質の除去が達成された。従って、ｓｃＦｖ抗体の精製は、０．０１から０．０３％　ＣＰＣ処理によって達成された。
表３：ＣＰＣ処理のｓｃＦｖ抗体の回収および純度への影響
【表３】

可溶性ＩＢの処理	総タンパク質 (mg)	HPLC に基づく総 scFv (mg)	精製係数	HPLC に基づく scFv 回収%
コントロール(ＣＰＣ処理前)	73	15.87		100
0.01% CPC (pH 10)	64	15.66	1.13	98.68
0.01% CPC (pH 7.5)	50.76	14.97	1.36	94.33
0.015% CPC (pH 10)	54	14.49	1.23	91.30
0.015% CPC (pH 7.5)	39.96	14.22	1.64	89.60
0.02% CPC (pH 10)	43	13.35	1.43	84.12
0.02% CPC (pH 7.5)	37.8	13.02	1.58	82.04
0.03% CPC (pH 10)	35	11.12	1.46	70.07
0.03% CPC (pH 7.5)	37.8	12.47	1.52	78.58

【０１１１】
２．３．ＣＰＣによるｓｃＦｖ　抗体の高純度化の確認
２．３．１．ＣＰＣ処理後の、　ｓｃＦｖ　回収物のＨＰＬＣ分析
リフォールドされたタンパク質のＨＰＬＣ分析は、ｓｃＦｖ抗体のピーク（保持時間（ＲＴ）～２０．６分）が総タンパク質量の２２．７％を占めることを示した（図４Ｂ）。図４Ｃのクロマトグラムは、０．０２％ＣＰＣ処理の後に、上精のｓｃＦｖ抗体のピークが、注入した総タンパク質の約７５．９％を占めたことを示しており、これは３．３倍の精製となる。従って、ＣＰＣ処理は、ｓｃＦｖ抗体溶液のタンパク質混入物を除去した。

【０１１２】
２．３．２．ＣＰＣ処理後のｓｃＦｖ回収物のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析
結果（図５参照）は、ＣＰＣ処理前には、サンプルには多くの種類のタンパク質が、相当量含まれていたことを示している。同様に、ＣＰＣ処理後では、ペレットに多くの種類のタンパク質が含まれていた。これに比して、ＣＰＣ処理後の上精は、ｓｃＦｖ抗体の、１本の大きなバンドを示した。
【０１１３】
実施例　３．ＣＰＣの、組み換えインターフェロンベータの精製に与える影響
インターフェロンベータ（ＩＦＮ－ｂｅｔａ、ｐＩ８．５～８．９）は、既知の方法によって、Ｅ．ｃｏｌｉで発現させた。Ｎａｇｏｌａ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２８４：３１６（１９８０）、Ｇｏｅｄｄｅｌ，Ｄ．Ｖ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２８７：４１１（１９８０）、Ｙｅｌｖｅｒｔｏｎ，Ｅ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．，９：７３１（１９８１）、Ｓｔｒｅｕｌｉ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（Ｕ．Ｓ．），７８：２８４８（１９８１）、１９８１年５月６日公開の欧州特許出願番号第２８０３３号、１９８１年６月１５日公開の第３２１１３４号、１９８１年８月２６日公開の、第３４３０７号、および１９８１年７月１日発行のベルギー特許第８３７３７９号は、組換えＤＮＡ技術を用いたベータインターフェロンの産生法を記載している。バクテリアによって生産したＩＦＮの回収および精製の方法は、米国特許番号第４，４５０，１０３号、第４，３１５，８５２号、第４，３４３，７３５、第４，３４３，７３６号、およびＤｅｒｙｎｃｋら，Ｎａｔｕｒｅ（１９８０）２８７：１９３－１９７および　Ｓｃａｎｄｅｌｌａ　ａｎｄ　Ｋｏｒｎｂｅｒｇ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１０：４４４７（１９７１）に記載されている。ＩＦＮ－ｂｅｔａを含む封入体を単離し、可溶化した。
【０１１４】
得た溶液を、ＣＰＣで処理した。図６に示した結果は、ＣＰＣ処理後、混入タンパク質量が顕著に減少したことを示している。ＣＰＣ処理後の、ＩＦＮ－ｂｅｔａの実際の量（ピークの下のエリア）の検出できる変化は認められなかった。
【０１１５】
表４は、ＣＰＣ処理の影響をまとめたものである。総タンパク質量（ブラッドフォード法）は４０％減少し、ＵＶ吸光度は４０％減少したが、ＩＦＮ－ｂｅｔａの量は変化しなかった。
【表４】

サンプル及び処理	タンパク質 (mg/ml)	O.D A_{280}	IFNb 含有量 (mg/ml)[a]	SEC プロファイル
コントロール（フォールディング後、CPC なし、1049-31)	0.51	1.55	0.069	R.T. 13[b] 分のピークは、総エリアの 15%
試験（フォールディング後、0.05% CPC 処理、1049-31)	0.3	1.0	0.069	R.T. 13[b] 分のピークは、総エリアの 7.34%

ａ　　Ｖｙｄａｃ　Ｃ４カラムによって定量
ｂ　　ＳＥＣプロファイルはいくつかのピークを含んでいた。１３分（保持時間１３分）で溶出したピークは、ＣＰＣ処理によって減少し、この領域は高分子量のタンパク質ならびにその変異型が溶出するところにあたる。
【０１１６】
実施例　４．ＣＰＣ処理の、ヒル凝固Ｘａ因子阻害物質の精製に与える影響
ＣＰＣを、ヒル凝固Ｘａ因子阻害物質の精製に用いた。ヒル凝固因子阻害剤（ＦＸａＩ、ｐＩ　８．４～９．１）は、米国特許番号第６，２１１，３４１号および国際公開第９４／２３７３５号パンフレットに記載されている方法によって生産されうる。ＦＸａＩを

含有する封入体（ＩＢ）の単離の後、実施例１に記したとおりに、ＦＸａＩはこの封入体から実質的に精製された。ＩＢペレットの溶解の後、調整物を１０％ＣＰＣ溶液と共にインキュベーションした。この後、混合物を１２，０００ｘｇで１５分間遠心処理した。ペレットと、上精が分離された。ペレットを５０ ｍＭ ＮａＨＣＯ$_3$バッファーに、元の体積に等しくなるように懸濁した。ペレットと上精は、それぞれ別に濃縮および透析し、残存したＣＰＣを除いた。含有タンパク質ならびに活性を測定し、ＦＸａＩが、上精で主要なコンポーネントを占めており、ペレットにはほとんど存在していないことが示された。これらの結果は、ＣＰＣ処理が、回収したＦｘａＩの収率ならびに純度を向上させたことを示している。

【０１１７】

実施例 ５．ＣＰＣによる、カルボキシペプチダーゼＢ（ＣＰＢ）の精製

ＣＰＢを発現しているクローンから得た等量の封入体を、８Ｍ尿素ｐＨ ９．５で可溶化した（対照及び試験）。ＣＰＢの生成法については、国際公開第９６／２３０６４号パンフレットならびに米国特許番号第５，９４８，６６８号に記載されている。試験サンプルは、０．１１％ＣＰＣで処理し、リフォールディング前に濾過によって不溶物を除いた。コントロールならびにテストサンプルのリフォールディングは、溶液をリフォールディングバッファーに１：８で希釈することによって行った。室温で一晩、エンドプロテイナーゼで処理した後、等量のコントロール溶液ならびに試験溶液を、ＤＥＡＥセファロースカラムにロードした。カラムをウォッシュし、引き続いて活性酵素を、６０ｍＭ塩化ナトリウムによって、２０ｍＭトリスバッファーｐＨ８に溶出した。

【表５】

処理工程	パラメータ	処理	
		コントロール	0.11% CPC
8 M 尿素への溶解 濾過後	総 A_{280}	960	494
	タンパク質含有量 (mg)*	490	272
	pH	9.5	9.5
	酵素活性 (Units)	不活性 (**)	不活性 (**)
リフォールド産物 26.5 mg のクロマトグラフィー後 (DEAE MP)	タンパク質含有量 (mg)*	5.67	8.41
	酵素活性 (Units)	258	4043
	比活性度 (Units/mg)	98	481

（＊） タンパク質含有量はブラッドフォード法によって測定した。

（＊＊） リフォールディング前には、タンパク質は不活性であった。

【０１１８】

表５に示した結果は、ＣＰＣで処理した物質の総ＯＤが４９．５％減少し、総タンパク質量が４４．５％減少したことを示している。興味深いことに、ＣＰＣ処理を施したサンプルでは、酵素活性が７９％増加した。これは、ＣＰＣが、活性を持った酵素の生成を部分的に阻害していた成分を除いたことを示唆している。

【０１１９】

本出願に引用される全ての文献を、各個々の刊行物、特許または特許出願を具体的かつ個々に、参照することによって援用すると示したのと同程度に、全ての目的のためにその全文を参照することによって本明細書に含める。

【０１２０】

当該分野に精通する者は、本発明にあっては、その思想および範囲から逸脱することな

く、様々な変更ならびに形態様が可能であることを理解するであろう。上記の具体的な実施例は単に例を示すのみであって、本発明は添付した特許請求項、ならびに、このような請求に権利が与えられるあらゆる等価例によってのみ制限されるものである。

【図面の簡単な説明】

【０１２１】

【図１】図１はＣＰＣ濃度のウリカーゼ活性およびその純度への影響を示した図である。

【図２】図２は、封入体から調製し、０．０７５％　ＣＰＣで処理した後の哺乳類粗ウリカーゼのＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィー分析の結果を示す。

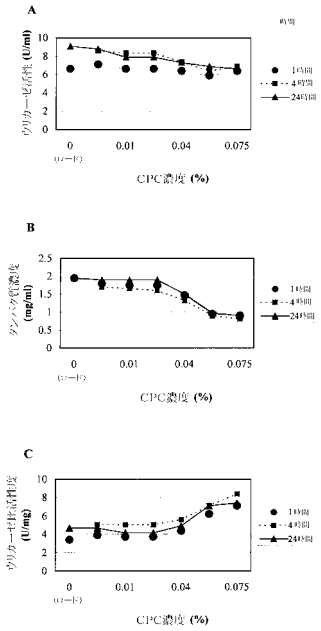
【図３】図３は、ＣＰＣ処理を施したウリカーゼのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析（１５％ゲル）の結果を示す。

【図４】図４は０．０２％　ＣＰＣ処理後の粗ｓｃＦｖ抗体のＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィー分析の結果を示す。

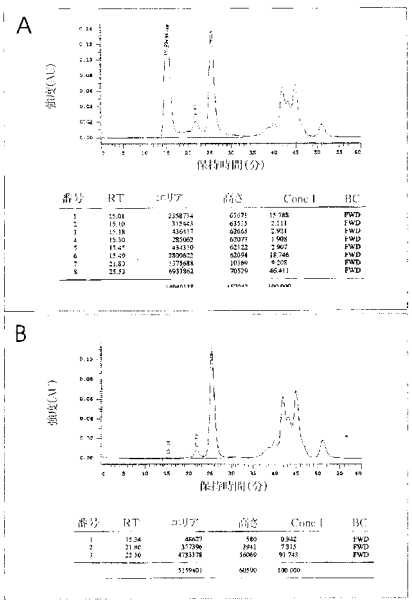
【図５】図５は、ＣＰＣ処理を施したｓｃＦｖ抗体のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析（１５％ゲル）の結果を示す。

【図６】図６は、ＣＰＣ処理前および処理後のインターフェロンベータのＨＰＬＣゲル濾過クロマトグラフィー分析の結果を示す。

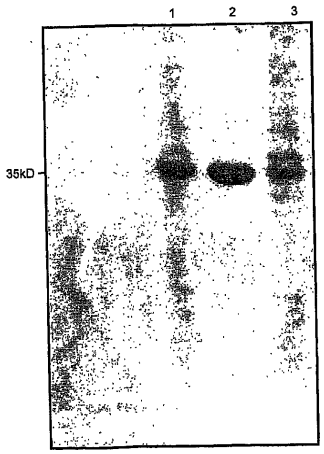
【図１】



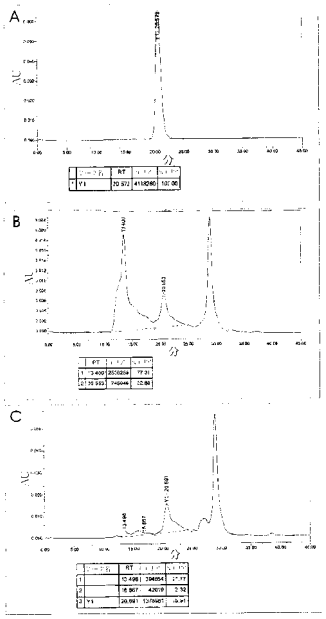
【図２】



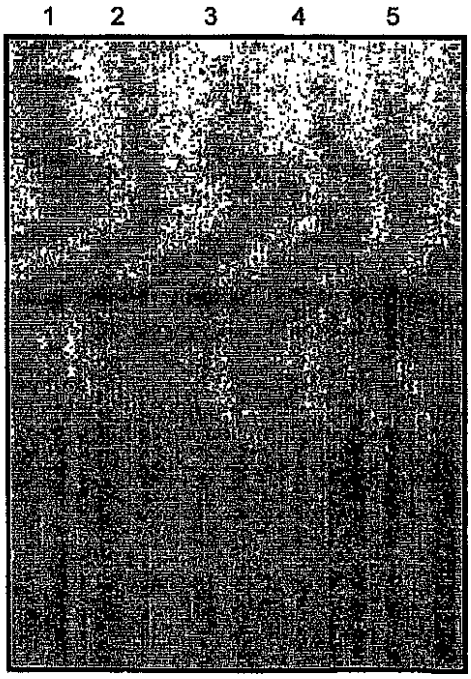
【図３】
FIG. 3



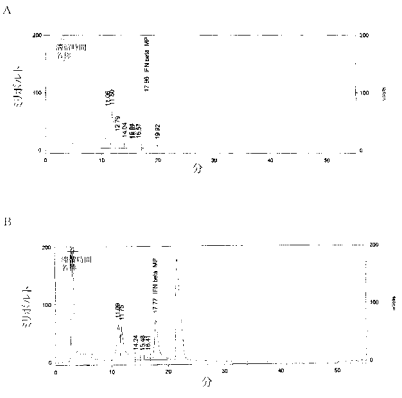
【図４】



【図５】
FIG. 5



【図６】



フロントページの続き

(72)発明者　ハロシュ　エリヤフ
イスラエル国　７７７０６、　アッシュドット、　ナカル　ラチシュ　ストリート　２／１０

審査官　福澤　洋光

(56)参考文献　特開平０１－２１６９３９（ＪＰ，Ａ）
特表２００２－５２２３９９（ＪＰ，Ａ）
特表平０４－５０１８０７（ＪＰ，Ａ）
特開昭６２－２２３１９２（ＪＰ，Ａ）
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, １９８９年, Vol.86, p.9412-9416

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C07K1/00-19/00
C12Q1/00-1/68
C12N1/00-15/90
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus(JDreamII)
PubMed