

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4303885号
(P4303885)

(45) 発行日 平成21年7月29日 (2009. 7. 29)

(24) 登録日 平成21年5月1日 (2009. 5. 1)

(51) Int. Cl.

F 1

B O 1 D 15/08 (2006. 01)
B O 1 D 15/02 (2006. 01)
B O 1 D 61/02 (2006. 01)
B O 1 D 61/14 (2006. 01)
C O 7 K 1/20 (2006. 01)

B O 1 D 15/08
 B O 1 D 15/02 1 O 2
 B O 1 D 61/02
 B O 1 D 61/14
 C O 7 K 1/20

請求項の数 12 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-526537 (P2000-526537)
 (86) (22) 出願日 平成10年12月10日 (1998. 12. 10)
 (65) 公表番号 特表2001-526960 (P2001-526960A)
 (43) 公表日 平成13年12月25日 (2001. 12. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/026251
 (87) 国際公開番号 W01999/033862
 (87) 国際公開日 平成11年7月8日 (1999. 7. 8)
 審査請求日 平成17年12月1日 (2005. 12. 1)
 (31) 優先権主張番号 08/998, 413
 (32) 優先日 平成9年12月24日 (1997. 12. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 596168317
 ジェネンテック・インコーポレーテッド
 GENENTECH, INC.
 アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
 0-4990・サウス・サン・フランシス
 コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義敦
 (72) 発明者 バン ライス, ロバート, ディー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 62, レッドウッド シティ, ヒル
 クレスト ウェイ 421

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自由溶液リガンド相互作用分子分離方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象とする第 1 の種と対象とする第 2 の種とがおよそ同じ流体力学的体積を持ち、前記対象とする第 1 の種と第 2 の種とを含む自由溶液混合物中の対象とする第 1 の種を対象とする第 2 の種から分離する方法であって、

前記自由溶液混合物を前記自由溶液混合物に溶解したリガンドに接触させ、ここで前記リガンドが前記第 1 の種と結合し、前記リガンドの分子量が前記対象とする第 1 の種の分子量より小さいものであり、自由溶液中で前記第 2 の種より大なる流体力学的体積を有する対象とする第 1 の種／リガンド複合体が、前記結合によって形成され；

前記対象とする第 1 の種／リガンド複合体を、サイズ排除クロマトグラフィー又は膜濾過法により前記対象とする第 2 の種から分離し；

前記対象とする第 2 の種を本質的に含まない組成物を提供することを含み、；及び

前記対象とする第 1 の種が、タンパク質又はポリペプチドである、方法。

【請求項 2】

対象とする第 1 の種が抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

対象とする第 1 の種が免疫ガンマグロブリンを含み、前記リガンドがプロテイン A である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記サイズ排除クロマトグラフィーが、1 0 0 m M 以下のイオン強度で実施される、請

10

20

求項 1 ないし 3 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記分離工程が、膜濾過法によって達成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記膜濾過法が、接線方向流動濾過法である、請求項 1 ないし 5 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記接線方向流動濾過法が、高性能接線方向流動濾過法である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記膜濾過法が、限外濾過法、逆浸透法、又は精密濾過法である、請求項 1 ないし 7 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記対象とする第 1 の種／リガンド複合体を個々の成分に分解する工程をさらに含み、分解が分離工程の後に起こる、請求項 1 ないし 8 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

1 より多いリガンドが前記対象とする第 1 の種と相互作用する、請求項 1 ないし 9 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記リガンドが前記対象とする第 2 の種と相互作用しない、請求項 1 ないし 10 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記対象とする第 1 の種が不純物である、請求項 1 ないし 11 の何れか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、自由溶液から種、特に生物学的興味のあるものを精製及び分離する方法に関し、当該方法は、対象とする種と特異的に相互作用することのできる可溶性の小分子量リガンドを用いる。

【0002】

(発明の背景)

バイオテクノロジー分野における多くの研究プロジェクトの成功は、1 又はそれ以上の対象とする分子を、これら対象とする分子を含む複雑な混合物から分離及び精製する事のできる技術の利用可能性に依存している。この点において、現在、タンパク質などの生物学的興味のある分子を、それらの複雑な混合物から分離及び精製するために幾つかの技術が利用可能である。これらの技術は、例えば、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー (I E C)、サイズ排除クロマトグラフィー (S E C)、高性能液体クロマトグラフィー (H P L C)、疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C)、限外濾過法、精密濾過法、逆浸透法などの膜濾過法の種々の変形法を含む。しかしながら、これらの分離技術は様々な用途において有用であることはわかっているが、それらの使用が制限される多くの用途が存在する。

【0003】

これらの分離能力を向上させる努力において、研究者等は多数の類似した分離技術を開発したが、それらは少なくとも部分的に親和性分子の対象とする実体に結合する能力に基づいており、それにより対象とする実体を流体混合物中の他の成分から分離可能にする。このような親和性分子をベースとする分離技術の一つはアフィニティクロマトグラフィーであり、それは生物学的分子を、それらが親和性マトリクス又はゲルに特異的かつ選択的に結合する能力に基づいて分離する。親和性ゲルは典型的にゲル支持体上に固定化されたリガンド結合部位を有する。例えば、GB 2,178,742 は、天然 (オキシ) ヘモグロビンがあ

10

20

30

40

50

る種の親和性ゲルのポリアニオン性官能基に特異的に結合するという事実に基づいて、ヘモグロビン及びその化学修飾誘導体を精製するためにアフィニティクロマトグラフィーを利用した。この方法では、修飾されていないヘモグロビンは親和性ゲルに保持されるが、修飾ヘモグロビンは、ゲルのポリアニオン性結合部位が修飾試薬で共有的に占有されてしまうためゲルに結合せずに溶離される。

【0004】

しかし、アフィニティクロマトグラフィーは種々の用途に有用であることはわかったが、この技術には本来的な制限がある。例えば、アフィニティクロマトグラフィーはリガンドの固相マトリクス（ポリマービーズ又は他の型のポリマーマトリクス）への結合に依存しているので、結合したリガンド分子並びにマトリクス結合リガンド分子に結合し始めるタンパク質に対しては、かなりの立体配置的制限が存在する。さらに、固相マトリクスは反応混合物の種々の成分の潜在的な非特異的結語部位を提供し、それにより完全に有効な分離に達しないことが多い。また、アフィニティクロマトグラフィー系の全能力は、固相の利用可能な表面積により及びその表面積にリガンドが置換され得る密度により制限される。

【0005】

他の良く知られた親和性分子をベースとする分離技術は、アフィニティー限外濾過法という親和性結合と膜をベースとする限外濾過法とを組み合わせた技術である。より詳細には、アフィニティー限界濾過法は、対象とするタンパク質が結合できる大きなポリマー親和性リガンドを用い、次いで、複合ポリマー親和性リガンドを混合物の他の成分から限外濾過法に基づいて分離する。（例えば、Mattiasson等, Journal of Chromatography 283: 323-330 (1984), Loung等, Biotechnology and Bioengineering 31: 516-520 (1988)及び Male等, Biotechnology and Bioengineering 35: 87-93 (1990)参照。）しかしながら、大きなポリマー親和性リガンドが親和性結合分子として用いられるので、それらの親和性リガンドの本来の不溶性により分離能力がかなり制限される。さらに、ポリマー親和性リガンドは、容易に入手できないことが多く、比較的低い収率及び／又は精製因子 (purification factors)を与える。

【0006】

van Eijndhoven等, Biotechnology and Bioengineering 48: 406-414 (1995)は、タンパク質含有溶液のイオン強度を変えることが溶液中のタンパク質の見掛けのサイズを変えるように作用することを示した。より詳細には、van Eijndhoven等は、一価イオン（Cl⁻等）とウシ血清アルブミン等のタンパク質との相互作用がタンパク質の流体力学的体積を変化させる用に作用することを示した。しかしながら、小さな一価イオンのタンパク質への結合がタンパク質の流体力学的体積の十分有意な変化を提供し、それを複雑な混合物中の他の類似サイズのタンパク質から周知の分離技術を用いて分離可能とする否かは現在のところ知られていない。

【0007】

従って、複雑な自由溶液混合物から対象とする種を分離及び精製するための新規な方法であって、他の知られた親和性分子ベースの分離が本来有している制限を受けない方法の開発が必要とされている。特に、アフィニティクロマトグラフィーに付随する立体配置的な制限や非特異的結合の問題を受けない親和性分子をベースとする技術が必要とされている。さらに、アフィニティー限外濾過法の上記した制限を受けない親和性分子をベースとする技術も必要とされている。本発明はこれらの問題の多くの解決を与えるものである。

【0008】

（発明の概要）

本発明は、対象とする種をその自由溶液混合物中の他の異なる種から分離する新規な方法に係るものであり、可溶性の小分子量リガンドと対象とする種との間に生ずる親和性及び他の相互作用を利用する。特に本発明は、対象とする第1の種と対象とする第2の種とが異なる場合に、対象とする第1の種と第2の種とを含む自由溶液混合物中の対象とする第1の種を対象とする第2の種から分離する方法に係るものである。ここに記載する方法

は、自由溶液混合物を、自由溶液中で前記対象とする第1の種と相互作用するが、対象とする第2の種とは有意な程度で相互作用しない可溶性の小分子量リガンドと接触させる工程を含み、それにより対象とする第1の種／リガンド複合体を形成し、当該リガンドが対象とする第2の種から、サイズ排除クロマトグラフィー及び膜濾過法を含む種々の異なる分子分離技術によって分離できるものである。小分子量リガンドは、それが相互作用する対象とする第1の種より小さな分子量を持つ。

【0009】

特別な実施態様では、対象とする第1の種は、タンパク質又はポリペプチド（天然又は組換え生産されたもの）、アミノ酸、コロイド、エンドトキシン、ウイルス及び核酸等であってよい。本発明での使用が見出された小分子量リガンドは、自由溶液系に可溶であり、例えば、タンパク質、ペプチド、抗体、核酸、アミノ酸、有機及び無機分子、多イオン性分子等を含む。典型的には、対象とする第1の種とリガンドとの相互作用は、親和性、疎水性及び／又はイオン性相互作用を介して起こる。

10

【0010】

本発明の種々の実施態様において、対象とする第1及び第2の種は、最初はほぼ同じ流体力学的体積、分子量及び／又は等電点を持ち、それにより従来の分離技術での分離が困難とされている。しかしながら、これらの特性の1又はそれ以上は、リガンドが対象とする第1の種と相互作用する際に相違しはじめる。対象とする第1の種／リガンド複合体と対象とする第2の種とがほぼ同じ流体力学的体積である場合、系のpH又はイオン強度を変化させて、対象とする第1の種／リガンドと対象とする第2の種との流体力学的体積の違いを拡大させ、それにより従来の分離技術を用いたそれらの分離の効率を向上させてもよい。

20

【0011】

本発明のさらに他の実施態様では、最初に対象とする第2の種から分離した複合体の対象とする第1の種とリガンド成分とを分解し、それにより対象とする第1の種の相対的に純粋な調製物を与えるようにしてもよい。この分解を誘発する方法は、一般的に系のpHを変化させること、系の1又はそれ以上の可溶性成分を変化させること等を含む。

【0012】

本発明のさらに他の実施態様は、本明細書を読めば当業者に明らかになるであろう。

【0013】

（発明の詳細な説明）

30

A. 定義

ここで用いられる「種」又は「対象とする種」は、一般的には自由溶液又は流体混合物、例えば液体から分離される粒子又は分子を意味する。種は、自由溶液混合物、殆どの場合に、混合物中に存在する他の粒子、分子又は種から分離される。好ましくは、対象とする種は、天然、生物学的又は生化学的起源の、又は生物学的又は生化学的方法で製造された生物学的実体である。好ましい対象とする種の例は、本発明を限定するものではないが、例えば、ポリペプチド等の分子、天然又は組換え生産したタンパク質、天然又は組換え生産した細胞成分、DNAとRNAの両方を含む核酸、コロイド、マイコプラズマ、エンドトキシン、ウイルス、細菌、炭水化物、及び種々の他の対象とする生物学的分子を含み、これらはグリコシル化されていてもいなくてもよい。1又はそれ以上の対象とする種は、混合物の望ましくない成分であり、混合物から分離されるべき成分を意味する「不純物」であってもよい。また、対象とする種は融合タンパク質でもよく、融合タンパク質の少なくとも一部は、少なくとも1つの小分子量リガンドが容易に利用可能なポリペプチドである。例えば、対象とする第1の種は、プロテインAリガンドが特異的結合親和性を持つ免疫グロブリン由来のポリペプチドを含むタンパク質であってもよい。

40

【0014】

ここで用いられる種の「混合物」は、2又はそれ以上の異なる種を含有する自由溶液（例えば、液体）又は懸濁物を意味する。任意の混合物に存在する種の型及びそれらの混合物中の存在量は大きく相違していてもよく、混合物は、例えば種々の異なるポリペプチド

50

、バッファー、塩、細胞及び細胞成分などを含んでもよい。混合物は、多数の異なる種が提示される複雑であってもよく、あるいは少量の異なる種のみが提示される比較的単純であってもよい。

【0015】

ここで用いられる「リガンド」は、自由溶液に可溶性であり（即ち、溶液に或る程度の溶解度を持ち）、対象とする種と相互作用して、リガンドが相互作用する種の物理的特性の少なくとも1つを変化させる分子を意味する。ここでの使用が見出されたリガンドは、1又はそれ以上が対象とする種の単一分子と相互作用するようなものである。対象とする種と「相互作用する」とは、リガンド（又は複数リガンド）が、可逆的又は不可逆的に、対象とする種と物理的結合できること、あるいは種の1又はそれ以上の物理的特性、例えば流体力学的体積、分子量、等電点等を変えることができることを意味する。しばしば、対象とする第1の種とリガンドとの間の相互作用は「特異的」であり、リガンドが、混合物中に存在する他の全ての実体に比較して、対象とする第1の種と「優先的に相互作用する」又は「優先的に結合する」ことを意味する。「優先的な」相互作用又は結合とは、リガンドが対象とする第1の種に、自由溶液中の全ての他の種よりも大きな程度で相互作用又は結合することを意味する。一般的に、「優先的に」結合するリガンドは、結合親和性及び／又は停留時間において、溶液中に存在する他の種より少なくとも約2倍効率的に、好ましくは少なくとも約5倍効率的に、より好ましくは少なくとも約10倍効率的に対象とする種と相互作用する。幾つかの場合には、リガンドは自由溶液中の他の成分と相互作用しうが、対象とする第1の種とは大きな程度（例えば、種の分子当たりにより多くのリガンド）で相互作用し、それにより分子量、流体力学的体積及び／又は等電点に所望の変化をもたらす。

【0016】

本発明での使用が見出されたリガンドは「小分子量」リガンドであり、それらは分子量において、それらが相互作用する対象とする第1の種より小さいことを意味する。この点において、「小さい」とは、リガンドの分子量がそれが相互作用する種の分子量の約0.5から99%、好ましくは約10から80%、通常はそれが相互作用する種の分子量の約20から75%であることを意味する。本発明での使用が見出されたリガンドは、対象とする第1の種と、親和性、疎水性及び／又はイオン性相互作用を介して相互作用でき、例えば、抗体を含むタンパク質、ペプチド、核酸、糖類、アミノ酸、有機及び無機分子、多イオン性分子（即ち、1以上のイオン性基を持つ分子）等を含む。ここで定義される「リガンド」という用語は、プロトン、金属イオンなどの一価のイオン性種を含むことは意図しない。

【0017】

本発明での使用が見出されたリガンドは、当業者に知られ、利用可能であり、又は日常的なスクリーニング技術を用いて容易に同定される。例えば、対象とする第1の種と相互作用できるライブラリメンバーを同定するためにコンビナトリアルオリゴペプチド又はオリゴペプチドライブラリをスクリーニングすることができ、それにより本発明における使用が見出される可能性のあるリガンドを同定することができる。これらの対象とする第1の種と相互作用するライブラリメンバーは、場合によっては、次に対象とする第2の種との相互作用の不可能性についてスクリーニングすることもできる。この点において、標的分子と相互作用することのできるメンバーについてのコンビナトリアルライブラリの調製及びスクリーニングのための技術はこの分野で良く知られていることを記しておく。

【0018】

「対象とする種／リガンド複合体」又はその文法的に等価なものは、小分子量リガンドが対象とする種と相互作用したときに形成され、それにより対象とする種の分子量、流体力学的体積及び／又は等電点を変え、翻って自由溶液混合物中に存在する他の種から分離できるようにする複合体を意味する。「分離できる」又はその文法的に等価なものは、現在知られている、又は将来開発されるであろう分子分離技術が、対象とする第1の種／リガンド複合体を対象とする第2の種から分離し、対象とする第2の種を実質的に含まない

10

20

30

40

50

組成物を提供することができることを意味する。「実質的に含まない」とは、対象とする第2の種が組成物中に存在しないか、精製された対象とする第1の種の所望の機能を阻害しない程度で組成物中に存在するかのいずれかを意味する。対象とする第1の種／リガンド複合体の個々の成分は、しばしば分解でき、それにより、複合体が流体混合物中に存在する他の成分から分離された後に、これら個々の成分の分離及び精製を可能にする。

【0019】

対象とする種及びリガンドについて、「分離する」という用語は、成分が流体混合物中に存在する他の成分から精製することを意味する。膜濾過法及びクロマトグラフィー技術を含む様々な分子分離技術がこの分野で知られており、ここでの使用が見出される。

【0020】

ここで用いられる「膜濾過法」なる語句は、異なる相対的サイズの分子を分離するために多孔膜を用いるあらゆる型の濾過方法を意味する。様々な型の膜濾過方法はこの分野で知られており、例えば、高性能接線方向流動濾過法、限外濾過法、逆浸透法及び精密濾過法を含む。

【0021】

ここで用いられる「接線方向流動濾過法」又は「TTF」は、膜濾過法で分離されるべき成分を含有する自由溶液混合物が、濾過膜の面に接して再循環され、逆拡散の物質移動係数を増大させる方法を意味する。このような膜濾過法では、圧力差が濾過膜の長さに沿って印加され、溶液及び濾過可能な溶質の膜を通した流動が起こる。この膜濾過法は、バッチプロセス並びに連続流動プロセスとして好適に実施される。例えば、溶液が濾過膜を繰り返して通過し、膜を通過した流体が別のユニット中に連続的に引き込まれるか、溶液が濾過膜を一度だけ通過し、膜を通過した流体が下流で連続して処理される。

【0022】

ここで用いられる「高性能接線方向流動濾過法」又は「HP TFF」なる語句は、米国特許第5,256,294号及び第5,490,937号に記載された膜濾過方法を意味し、これら両方を明示してそれら全体をここに参考として取り入れる。

【0023】

ここで用いられる「限外濾過法」又は「UF」なる用語は、約1 kDaから1000 kDaの分子量を持つ溶質を残すように格付けされた濾過膜を用いる膜濾過方法を意味する。

【0024】

ここで用いられる「逆浸透法」又は「RO」なる語句は、約1 kDa未満の分子量の溶質、例えば塩及び他の低分子量溶質を残すことのできる膜を用いる膜濾過法を意味する。

【0025】

ここで用いられる「精密濾過法」又は「MF」なる用語は、0.1から10ミクロンの孔サイズ範囲の膜を用いる膜濾過法を意味する。

【0026】

ここで用いられる「サイズ排除クロマトグラフィー」なる語句は、サイズに基づいて少なくとも1つの分子を少なくとも1つの他の分子から分離するためのクロマトグラフィー技術を用いる良く知られた方法を意味する。ここで特許請求する方法について、サイズ排除クロマトグラフィーは一般的に低イオン強度、例えば約150 mM未満、好ましくは約100 mM未満、より好ましくは約75 mM未満、通常は約50 mM未満で実施される。

【0027】

B. 発明の実施の形態

最も広い態様において、本発明は、対象とする第1及び第2の種を含有する自由溶液混合物中の対象とする第1の種を対象とする第2の種から分離する方法に係る。この方法は、自由溶液混合物を、前記対象とする第1の種と相互作用する可溶性の小分子量リガンドと接触させて、対象とする第1の種／リガンド複合体を自由溶液中に形成させ、それにより対象とする第1の種の物理的特性の少なくとも1つを変えることを含む。好ましくは、対象とする第1の種と相互作用することにより、リガンドが対象とする第1の種の流体力

10

20

30

40

50

学的体積、分子量を増加させ及び／又は等電点を変化させるように作用して、それにより対象とする第２の種から良く知られた分離技術によって分離できるようにする。本発明は、対象とする第１及び第２の種が、例えば類似した流体力学的体積、分子量及び／又は等電点を持つために最初は有効に分離することができない状況における特別な用途を見出した。そのような場合、対象とする第１の種はリガンドと相互作用し、それによりその流体力学的体積を増大させて、対象とする第２の種から（複合体として）分離できるようにする。対象とする第１の種は、次いで分解してリガンドから分離し、リガンド及び対象とする第２の種を実質的に含まない純粋な対象とする第１の種のプールを提供してもよい。

【００２８】

リガンドは、種々の手段によって系に導入することができるが、それらは本発明にとって重要ではない。好ましくは、リガンドは、対象とする第１及び第２の種を両方含有する自由溶液混合物中に直接導入される。このような場合、リガンドは、対象とする第１の種と、第２に比較して優先的に相互作用する。リガンドは自由溶液混合物に１回のボーラスとして導入してもよく、あるいは長期間に渡って複数工程で添加してもよい。

【００２９】

上記したように、対象とする第１及び第２の種は、生物学的又は他の多数の異なる実体の任意のものでよく、例えば、ポリペプチド等の分子、天然又は組換え生産したタンパク質、天然又は組換え生産した細胞成分、DNAとRNAの両方を含む核酸、コロイド、マイコプラズマ、エンドトキシン、ウイルス、細菌、炭水化物、及び種々の他の対象とする生物学的分子を含み、これらはグリコシル化されていてもいなくてもよい。好ましくは、対象とする第１の種は組換え生産されたタンパク質である。

【００３０】

本発明での使用が見出されたリガンドは、自由溶液に可溶性（それらが系において少なくとも或程度の溶解性を持つことを意味する）であり、それらが相互作用できる対象とする第１の種より小さな分子量を持つ。殆どの場合、リガンド実体は、対象とする第１の種に非共有結合することができ、一般的には抗体等のタンパク質、核酸、糖類、アミノ酸、有機及び無機分子、多イオン性分子等であり、特に、プロトンや金属イオンなどの一価の実体は除外される。本発明での使用が見出されたリガンドは容易に入手可能であり、それは商業的あるいはコンビナトリアルライブラリの調製及びスクリーニングを通すなどして、日常的な方法で容易に合成及び同定できる。選択したリガンドがタンパク質の場合、プロテインA等のタンパク質は商業的に入手可能であり、あるいは組換えDNA発現技術によって容易に調製される。

【００３１】

リガンドが対象とする第１の種と特異的に結合できる抗体である場合、そのような抗体は、常套的な技術によって所望の結合特異性について調製しスクリーニングすることができる。例えば、当業者は、任意の対象とするタンパク質に対するポリクローナルあるいはモノクローナル抗体を、即座に、容易に、かつ常套的に得ることができる。タンパク質に対するポリクローナル抗体は、一般的に動物において、アジュバントと組み合わせたタンパク質の複数回の皮下（s.c.）又は腹膜内（i.p.）注射により生ずる。対象とするタンパク質又は断片を、免疫化する種において免疫原性であるタンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又はダイズトリプシンインヒビターに、二官能性誘導体化試薬、例えばマレイミドベンゾイル、スルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介した抱合）、N-ヒドロキシスクシンイミド（リシン残基を介する）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、SOC12、又はR1N=C=NR、但しR及びR1は異なるアルキル基を用いて抱合させるのが有用であろう。

【００３２】

宿主動物は、次いで適当なアジュバントと抱合体を混合し、溶液を複数部位の皮膚内に注射することにより免疫原性抱合体又は誘導体に対して免疫化される。１ヶ月後、動物を、複数部位に皮下注射することにより、適当なアジュバント中の元の抱合体量の１／５から１／１０で追加免疫する。７から１４日後、動物を出血させ、血清を対象とする抗体力

10

20

30

40

50

価の抗-タンパク質の存在について検定する。動物は、力価がプラトーになるまで追加免疫してもよい。また、免疫反応を促進するためにミョウバン等の凝集剤を用いてもよい。ポリクローナル抗体は、次いで、常套技術を用いて免疫血清から精製される。

【0033】

対象とするタンパク質に対するモノクローナル抗体は、実質的に均一な抗体の集団、即ち、集団を構成する個々の抗体があったとしても少量の起こりうる自然発生突然変異を除いて同一である集団から得られる。例えば、対象とするタンパク質に対するモノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature 256: 495 (1975)によって最初に記述されたハイブリドーマ法を用いて作成してもよく、あるいは組換えDNA法によって作成してもよい。

10

【0034】

ハイブリドーマ法では、マウス又は多の適当な宿主動物、例えばハムスターを免疫化してリンパ球を生じさせ、それが免疫化に用いたタンパク質に特異的に結合する抗体を製造するか、又は製造しうる。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫化してもよい。リンパ球は、次いでポリエチレングリコールなどの適当な融合剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986))。

【0035】

次ぎに、このように調製されたハイブリドーマ細胞を、好ましくは融合していない親の骨髓腫細胞の成長及び生存を阻害する1又はそれ以上の物質を含有する適当な培養培地に播種して成長させる。例えば、親骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT又はHPRRT) を欠く場合、ハイブリドーマ用の培養培地は典型的にはヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含み (HAT培地)、これらの物質はHGPRT-欠失細胞の成長を抑制する。

20

【0036】

好ましい骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択した抗体産生細胞による抗体の安定した高レベル発現を支持し、HAT培地などの培地に感受性を持つものである。これらの中で、好ましい骨髓腫細胞系はマウス骨髓腫系、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USAから入手可能なMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍から誘導されたもの、及びAmerican Type Culture Collection, Rockville, Maryland USAから入手可能なSP-2細胞である。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓腫細胞系も、ヒトモノクローナル抗体の作成のために記載されている (Kozbor, J. Immunol. 133: 3001 (1984)及びBrodeur等, Monoclonal Antibody Production techniques and Applications, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

30

【0037】

ハイブリドーマ細胞が生育する培養培地は、次いで対象とするタンパク質に対するモノクローナル抗体の産生について検定される。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生産されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降法あるいはラジオイムノアッセイ (RIA) 又は応訴結合免疫吸着測定法 (ELISA) 等のインビトロ結合アッセイによって決定される。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson及びPollard, Anal. Biochem. 107: 220(1980)のスキッチャード分析によって決定できる。

40

【0038】

オリゴヌクレオチドであるリガンドは、リン酸トリエステル、垂リン酸エステル、又はホスホラミダイト化学などの知られた方法によって、1988年5月4日に発行されたEP 266, 032に記載されたもののような固相技術を用いて、あるいはFroehler等, Nucl. Acids Res. 14: 5399 (1986)に記載されたようなデオキシヌクレオシドH-ホスホネート中間体を介して化学的に合成される。合成に続いて、オリゴヌクレオチドプローブは、次いでポリアクリルアミドゲル上で精製され得る。ペプチドであるリガンドは、標準的なメリフィールド固相合成法を用いて、手動で又は自動化ペプチド合成器、標準タンパク質化学 (例えば、t-Boc又はFmoc化学) 及び樹脂 (例えば、4-メチルベンズヒドリルアミン又は

50

リンクアミド樹脂)を用いて合成される。末端アミノ基の脱保護及びアミノ酸モノマーの結合の連続的ラウンドの後、脱保護に続いてペプチドを樹脂から切断し、所望の配列及び長さのオリゴペプチドが合成される。さらに、液層ペプチド合成もこの分野で良く知られ、用いることもできる。コンビナトリアルオリゴヌクレオチド又はオリゴペプチドライブラリは、従来のコンビナトリアル技術を用いて調製され、これらのライブラリはスクリーニングされて、ここに記載する方法で小分子量リガンドとして機能するライブラリメンバーが同定されるが、そのような方法論はこの分野で良く知られている。

【0039】

流体混合物中に存在する場合、対象とする第1及び第2の種は、流体混合物を、対象とする第1の種と相互作用するが対象とする第2の種とはしない（又は対象とする第2の種とは少ない程度でしかしない）小分子量リガンドと接触させることにより有効に分離できる。この方法は、対象とする第1及び第2の種が、ほぼ同じサイズ、流体力学的体積及び／又は等電点を持ち、それにより従来の分子分離技術を用いて分離することが困難な状況において特に有用である。しかしながら、対象とする第1の種と相互作用することにより、リガンドは、対象とする第1の種の分子量及び／又は流体力学的体積を増大させ（及び／又は、対象とする第1の種の等電点を変化させ）、それにより従来の分子分離技術によって分離することを可能にする。

10

【0040】

一般的に、対象とする第1の種の流体力学的体積は、サイズ排除クロマトグラフィーというこの分野で良く知られた技術によって決定される。対象とする他の種と「ほぼ同じ」流体力学的体積を持つとは、2つの対象とする種が互いに約10%以内の流体力学的体積を持つことである。

20

【0041】

対象とする種の等電点は、その対象とする種が電氣的に中性となるpHである。対象とする種の等電点は、種にpH勾配と電場の両方をかけて種が電氣的に中性となるpHを決定する、即ち、どのpHで種が電場の一方向又は他の方向に向けて泳動しないかを決定する従来の技術によって決定できる。対象とする他の種と「ほぼ同じ」等電点を持つとは、2つの種の等電点が互いに約0.5ポイント以内にあることである。

【0042】

本発明の或る実施態様では、流体混合物のpH又はイオン強度を変えることにより、対象とする第1及び第2の種を分離する能力を向上させてもよい。この工程は、対象とする第1の種／リガンド複合体が対象とする第2の種とほぼ同じ流体力学的体積を持つ状況において特に用途が見出される。系のpH及び／又はイオン強度を変えることにより、タンパク質又はタンパク質抱合体の見掛けのサイズ（流体力学的体積又は分子量で表される）を約10倍まで変えることができる（Pujar及びZydney, [Analysis of Electrostatic Interactions on Protein Sieving: Experimental and Theoretical Investigations], North America Membrane Society Meeting, Ottawa, Canada, 1996参照）。流体混合物のpH及び／又はイオン強度を変えることによって対象とする第1の種／リガンド複合体と対象とする第2の種（又は対象とする第1の種と対象とする第2の種）の間の流体力学的体積の差を拡大させることにより、対象とする第1及び第2の種を従来の分子分離技術を用いて、より効率的に分離することができる。

30

40

【0043】

流体混合物中で小分子量リガンドが対象とする第1の種と相互作用することが可能になると、対象とする第1の種／リガンド複合体を従来から用いられる分子分離技術を用いて対象とする第2の種から分離することができる。例えば、成分を分離する工程は、従来の膜濾過技術、例えば接線方向流動濾過法、高性能接線方向流動濾過法、限外濾過法、精密濾過法、及び逆浸透法などを含んでよい。対象とする第1の種／リガンド複合体及び対象とする第2の種は、例えば、SEC、HPLCなどを含む従来のクロマトグラフィー技術を用いて分離することもできる。対象とする第1の種／リガンド複合体が一度対象とする第2の種から分離されれば、複合体の成分を分解し、対象とする第2の種から複合体を分

50

離するために上記した同じ技術の一つを用いて分離できる。複合体は、2つの分子間の相互作用を破壊する任意の処理、例えば、それらが存在する系のpHの低下、リガンドからの対象とする第1の種の解離を起こす任意の成分の系への添加によって分解してよい。

【0044】

ここに記載する方法は、事実上混合物中の1つの実体を混合物中に存在する他の実体から分離することが求められるすべての用途に有用である。好ましい用途は、例えば、特に大規模組換えタンパク質生産の間の異なるタンパク質の複雑な混合物からの1又はそれ以上のタンパク質の分離及び精製を含む。本発明の方法は、広範な生物学的分子、例えば天然又は遺伝子的に加工した微生物発酵のタンパク質様生成物、ポリペプチド、抗体、細胞分泌物、コロイド、マイコプラズマ、エンドトキシン、ウイルス、細菌、アミノ酸、DNA、RNA、炭水化物などの分離及び精製に適用可能である。

10

【0045】

本発明は、現存する従来技術を越える多くの利点を有する。例えば、ここに記載した方法は、自由溶液に可溶性小分子量のリガンドを用いる点で、標準的な固体マトリクスアフィニティークロマトグラフィー法を越えて有利である。このように、アフィニティークロマトグラフィーにおいては、リガンド及びそれに結合する種の両方に立体配置的制限があるが、ここに記載した方法には無い。さらに、アフィニティークロマトグラフィー系の分離能力は、用いる固体マトリクスの表面積及びリガンドで置換される表面積の密度によって制限される。それに対して、ここに記載した方法の分離能力は、流体混合物中のリガンドの溶解性によってのみ制限される。さらに、アフィニティークロマトグラフィー系における固体マトリクスの存在は、非特異的なタンパク質-マトリクス相互作用の機会を増大させ、それにより有効な分子分離を低下させる。

20

【0046】

また、ここに記載した方法は、親和性限外濾過法で用いられる大きなポリマーリガンドは、容易に入手できないか容易に合成できないものが多いが、本発明で用いられる可溶性の小分子量リガンドは容易に入手でき及び／又は日常的に合成できる点において、親和性限外濾過法より有利である。さらに、親和性限外濾過法は、限外濾過工程を用いる用途が制限されるが、本発明の方法は、例えば多くの型の膜濾過法並びにクロマトグラフィー法を含む種々の異なる分子分離技術で用いることができる。さらに、親和性限外濾過は、溶液中の多数の大きなポリマーリガンドの制限された溶解性のために比較的低い収率及び精製因子を与えることが多いが、本発明のように可溶性の小分子量リガンドを用いることによりこの問題は解消される。

30

本発明のさらなる詳細は、以下の非限定的な実施例において例示される。

【0047】

C. 実施例

実施例1：可溶性プロテインAリガンドを用いたウシ血清アルブミン不純物からの組換えヒト化IgGの分子分離

ここに記載したリガンド相互作用分子分離法を、スルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミンタンパク質も不純物として含有する混合物から組換えヒト化IgGタンパク質を分離するのに用いた。個々の分子の同定、並びに、複合体形成、分解及びリガンドからのタンパク質分離を示すのに高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)SECを用いた。HPLC系は、四次ポンプ、自動サンプラー、及びインジェクター、紫外線吸収検出器、インターフェースモジュール、コンピュータ及びヒューレット・パッカートのケムステーション・データ取得及び処理ソフトウェア(Model 1050HPLC, Hewlett Packard, Inc., Palo Alto, California)からなる。

40

【0048】

対象とするタンパク質生成物として組換えヒト化IgG(rhuIgG)及び小分子量リガンドとしてそれと相互作用する組換えプロテインA(rPrA)を用いて複合体を形成した。移動相バッファー(0.025MのNaCl、0.025Mのトリス塩基、0.005MのEDTA、pH7.1±0.1)中にストック溶液を、各々8mg/ml及び

50

5 mg/ml の濃度で調製した。ストック溶液をこのバッファーと混合して希釈し、0.8 mg/ml の r h u I g G と 0.2 mg/ml の r P r A を含有する複合体を形成した。

【0049】

ウシ血清アルブミン (B S A) モノマーは、Miles Corporationからのスルフヒドリル修飾 B S A からサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した。このモノマーを不純物として用いた。移動相バッファー (0.025 M の N a C l、0.025 M の トリス塩基、0.005 M の E D T A、p H 7.1 ± 0.1) 中に、最終濃度 5 mg/ml でストック溶液を調製した。

【0050】

不純物の存在下で複合体を形成するため、移動相バッファー (0.025 M の N a C l、0.025 M の トリス塩基、0.005 M の E D T A、p H 7.1 ± 0.1) 中の r h u I g G 及び B S A の溶液に r P r A を添加して最終濃度を 0.8 mg/ml の r h u I g G、0.2 mg/ml の r P r A、及び 0.3 mg/ml の B S A とした。対照として、複合体無しでの生成物からの不純物の分離を示すため、r h u I g G 及び B S A ストック溶液を混合して移動相バッファーで希釈し、最終濃度を小野の 0.8 mg/ml 及び 0.3 mg/ml とした。

【0051】

3つの個々の溶液の試料、並びに、複合体、複合体-不純物、及びタンパク質-不純物溶液の試料を、以下に記載するようにサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) カラムに注入し、滞留時間及び異なる種の分離を測定した。

【0052】

上記の個々のストック溶液、及びそれらの種々の混合物は、次のようにしてサイズ排除クロマトグラフィーにより分析した。試料を連続して配置した2本のスーパーデックス 200 カラム (内径 = 10 mm、長さ = カラム当たり 300 mm、Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, New York, New Jersey) に注入した。0.025 M の N a C l、0.025 M の トリス塩基、0.005 M の E D T A、p H 7.1 ± 0.1 を含むバッファーを移動相として用いた。カラムに注入後、試料は、0.5 ml/分の体積流速でカラム中で分離された。サンプルの全流動時間は 90 分間であった。タンパク質溶離物は 280 nm における紫外線吸収によって測定した。これらのパラメータを表 1 にまとめた。

【0053】

表 1 H P L C - S E C 法：複合体-不純物分離

カラム： スーパードックス 200 10/30 2本連続 (60cm)

分離範囲：10,000 から 600,000 Mr

全カラム容積 48 ml

流動バッファー：N a C l 0.025 M

トリス塩基 0.025 M

E D T A 0.005 M

p H 7.1 ± 0.1

流速： 0.5 ml/分

流動時間： 90 分間

UV 波長： 280 nm

上記の分離条件下では、r h u I g G 生成物からの B S A の分離は達成できなかった。例えば、図 1 及び 2 に示すように、個々の B S A 及び r h u I g G 分子は極めて近い滞留時間を示し、r h u I g G は 55.9 分 (図 1) であり B S A は 57.7 分 (図 2) である。r h u I g G と B S A 分子の混合物を調製し、上記の H P L C - S E C 分離法で分析した場合、滞留時間 56.7 分に単一のピークが観察され (図 3)、所望のタンパク質生成物 (r h u I g G) を不純物 (B S A) から分離するのが不可能であることが明らかになった。

【0054】

r h u I g G / B S A 複合体の形成は、上記の H P L C - S E C 法で、0.8 mg / m l の r h u I g G 及び 0.2 mg / m l の r P r A から形成された複合体を含む溶液を注入した際に 47.3 分に単一のピークが観察されることによって示された（図 4）。別々に注入した場合、r h u I g G 及び r P r A は各々 55.9 分（図 1）及び 52.3 分（図 5）の滞留時間を有する。2つの個々の分子のいずれよりも短い滞留時間の単一のピークにシフトしたことは、より大きな分子量及び流体力学的体積を持つ複合体の形成を示している。

【0055】

r h u I g G と r P r A が複合体を形成し、それによりタンパク質の有効流体力学的体積が変化したことにより、もはや r h u I g G / r P r A 複合体から B S A を分離することが可能となった。例えば、図 6 に示すように、複合体の滞留時間は 47.8 分であるが、明らかに区別される B S A の滞留時間は 56.9 分である。よって、生成タンパク質と相互作用できる小分子量リガンドを導入し、それによりタンパク質生成物の有効分子量及び流体力学的体積が変化することにより、生成タンパク質を（リガンドとの複合体の形態で）、個々に混合したときには生成タンパク質から分離できない不純物から効率的に分離することができる。

【0056】

上記のように r h u I g G / r P r A 複合体から B S A 不純物を分離した後、複合体を個々の成分に分解し、それは翻って、B S A 及び r P r A を含まない純粋な r h u I g G タンパク質生成物が分離して得られたことになる。r h u I g G / r P r A 複合体の個々の r h u I g G 及び P r A 成分への分解は、溶液の p H 及びイオン強度を以下のように変えることにより観察された。

【0057】

特に 2 本のスーパーコース 6 カラム（内径 = 10 mm、長さ = カラム当たり 300 mm、Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, New Yourk, New Jersey）を連続して流動させた。0.1 M の酢酸、0.15 M の N a C l、p H 3.5 ± 0.1 を含むバッファーを移動相として用い、0.4 m l / 分の体積速度とした。タンパク質溶離は 214 nm の紫外線吸収で監視した。試料注入当たりの全流動時間は 110 分間であった。これらのパラメータを表 2 にまとめた。

【0058】

表 2 H P L C - S E C 法：複合体分解及び成分分離

カラム： スーパ° ロース 6 10/30 2 本連続
 分離範囲：5,000 から 5,000,000 Mr
 全カラム容積 48 ml
 流動バッファー：酢酸 0.1 M
 N a C l 0.15 M
 p H 3.5 ± 0.1
 流速： 0.4 ml / 分
 流動時間： 110 分間
 UV 波長： 214 nm

r h u I g G 及び r P r A ストック溶液個々の試料、並びに 0.8 mg / m l の r h u I g G 及び 0.2 mg / m l の r P r A を含む複合体溶液をカラム上に注入し、滞留時間及び異なる種の分離を測定した。試料は、0.025 M の N a C l、0.025 M のトリス塩基、0.005 M の E D T A、p H 7.1 ± 0.1 のランニングバッファー中で調製した。注入した試料はカラムの全容量に比較して非常に少量（0.2 % 負荷）であったので、理論的計算では、試料がカラム長の最初の 1 センチメートル以内に 0.1 M の酢酸、0.15 M の N a C l、p H 3.5 ± 0.1 の移動相に交換されたことを示した。

【0059】

この新たな、より酸性のバッファー条件下で、r h u I g G 及び r P r A の個々の試料の分析は、滞留時間が r h u I g G については 91.8 分（図 7）及び r P r A について

は80.6分(図8)であることを示した。

【0060】

複合体の注入の分析は、r h u I g G及びr P r A各々のピークに対応する滞留時間の2つのピークのベースライン分離を示した(図9:各々91.8分及び80.4分)。これらの結果は、複合体がこれらの条件下で個々のr h u I g G及びr P r Aに分離され、r h u I g Gプールが精製された生成物として回収できることを示した。

【0061】

上記の結果は、タンパク質生成物からの不純物の分離が、タンパク質生成物と相互作用でき、それによりタンパク質生成物の分子量及び流体力学的体積を変化させて不純物から分離できるようにする小分子量リガンドの添加により、自由溶液中で達成できることを示している。上述したように、親和性結合がタンパク質／リガンド複合体r h u I g G／r P r Aの形成を可能にした。この相互作用はタンパク質r h u I g Gの特性を変化させ、それにより大きな流体力学的体積を持つ分子が形成された。これらの新たな特性は、H P L C - S E Cを用いたr h u I g GからのB S A不純物の分離を可能にした。複合体の不純物からの分離の後に、複合体は次いで、溶液条件、p H及びイオン強度を変化させることによって個々の成分に良好に分解された。r h u I g G生成物の最終的な精製は、H P L C - S E Cを用いた個々のタンパク質及びリガンドの分離によって達成された。

【0062】

以上の記載は、本発明を実施するために用いられる特定の方法を詳述している。そのような特定の方法の詳細を知れば、当業者は、本発明の成果を用いる上で同じ情報に達したときに、代替的な信頼性のある方法を如何に工夫するかを十分に知ることができるであろう。しかしながら、上記の詳細は、この文書において、すべての範囲を制限すると解釈すべきではなく、本発明の範囲は、添付する特許請求の法的構成によって決定されるべきものであることは明らかであろう。ここの引用した全ての文献は明示して参考として取り入れるものとする。

【図面の簡単な説明】

【図1】 組換えヒト化I g G (r h u I g G) のスーパーデックス200サイズ排除クロマトグラフィーカラムでの溶離。

図1は、スーパーデックス200サイズ排除クロマトグラフィーカラムのr h u I g Gの溶離プロフィールを示す。r h u I g Gタンパク質はカラムに0.025MのN a C l、0.025Mのトリス塩基、0.005MのE D T A、p H 7.1 ± 0.1のバッファー中8 m g / m l の濃度及び0.04%の負荷容量で負荷した。データは、分(分)で表した時間に対して紫外線吸収単位(m A U)をプロットした。

【図2】 スルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミン(B S A)のスーパーデックス200サイズ排除クロマトグラフィーカラムでの溶離。

図2は、スーパーデックス200サイズ排除クロマトグラフィーカラムのB S Aの溶離プロフィールを示す。B S Aタンパク質はカラムに0.025MのN a C l、0.025Mのトリス塩基、0.005MのE D T A、p H 7.1 ± 0.1のバッファー中0.3 m g / m l の濃度及び0.2%の負荷容量で負荷した。データは、分(分)で表した時間に対して紫外線吸収単位(m A U)をプロットした。

【図3】 組換えヒト化I g G (r h u I g G) 及びスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミン(B S A)の混合物のスーパーデックス200サイズ排除クロマトグラフィーカラムでの溶離。

図3は、スーパーデックス200サイズ排除クロマトグラフィーカラムのr h u I g G及びB S A混合物の溶離プロフィールを示す。r h u I g G及びB S Aタンパク質はカラムに0.025MのN a C l、0.025Mのトリス塩基、0.005MのE D T A、p H 7.1 ± 0.1のバッファー中、各々0.8 m g / m l 及び0.3 m g / m l の濃度及び0.2%の負荷容量で負荷した。データは、分(分)で表した時間に対して紫外線吸収単位(m A U)をプロットした。

【図4】 組換えヒト化I g G (r h u I g G) / 組換えプロテインA (r P r A) 複合

体のスーパーデックス200サイズ排除クロマトグラフィーカラムでの溶離。

図4は、スーパーデックス200サイズ排除クロマトグラフィーカラムのr h u I g G / r P r A複合体の溶離プロファイルを示す。r h u I g G及びr P r Aタンパク質はカラムに0.025MのNaCl、0.025Mのトリス塩基、0.005MのEDTA、pH7.1±0.1のバッファー中、各々0.8mg/ml及び0.2mg/mlの濃度及び0.2%の負荷容量で負荷した。データは、分(分)で表した時間に対して紫外線吸収単位(mAU)をプロットした。

【図5】 組換えプロテインA (r P r A) 複合体のスーパーデックス200サイズ排除クロマトグラフィーカラムでの溶離。

図5は、スーパーデックス200サイズ排除クロマトグラフィーカラムのr P r Aの溶離プロファイルを示す。r P r Aタンパク質はカラムに0.025MのNaCl、0.025Mのトリス塩基、0.005MのEDTA、pH7.1±0.1のバッファー中、2mg/mlの濃度及び0.2%の負荷容量で負荷した。データは、分(分)で表した時間に対して紫外線吸収単位(mAU)をプロットした。

【図6】 組換えヒト化I g G (r h u I g G) /組換えプロテインA (r P r A) 複合体及びスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミン(B S A)の混合物のスーパーデックス200サイズ排除クロマトグラフィーカラムでの溶離。

図6は、スーパーデックス200サイズ排除クロマトグラフィーカラムのr h u I g G / r P r A複合体及びB S Aの混合物の溶離プロファイルを示す。r h u I g G、r P r A及びB S Aタンパク質はカラムに0.025MのNaCl、0.025Mのトリス塩基、0.005MのEDTA、pH7.1±0.1のバッファー中、各々0.8mg/ml、0.2mg/ml及び0.3mg/mlの濃度及び0.2%の負荷容量で負荷した。データは、分(分)で表した時間に対して紫外線吸収単位(mAU)をプロットした。

【図7】 組換えヒト化I g G (r h u I g G) のスーパーロース6サイズ排除クロマトグラフィーカラムでの溶離。

図7は、スーパーロース6サイズ排除クロマトグラフィーカラムのr h u I g Gの溶離プロファイルを示す。r h u I g Gタンパク質はカラムに0.1Mの酢酸、0.15MのNaCl、pH3.5±0.1のバッファー中0.8mg/mlの濃度及び0.2%の負荷容量で負荷した。データは、分(分)で表した時間に対して紫外線吸収単位(mAU)をプロットした。

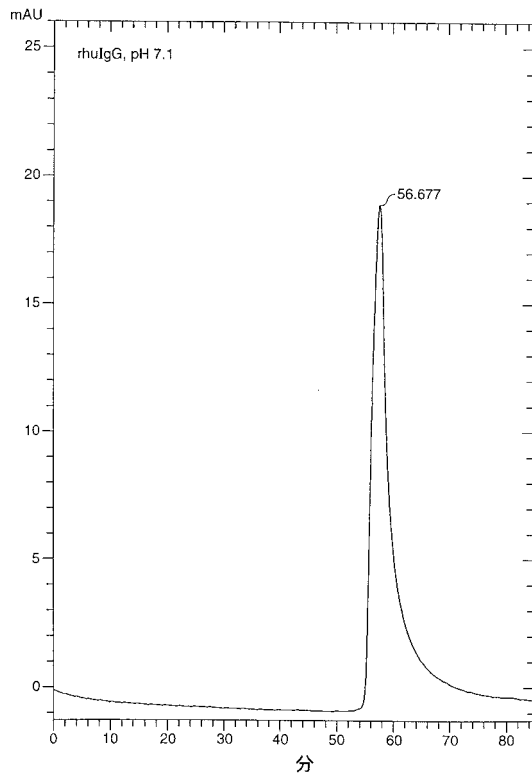
【図8】 組換えプロテインA (r P r A) のスーパーロース6サイズ排除クロマトグラフィーカラムでの溶離。

図8は、スーパーロース6サイズ排除クロマトグラフィーカラムのr P r Aの溶離プロファイルを示す。r P r Aタンパク質はカラムに0.1Mの酢酸、0.15MのNaCl、pH3.5±0.1のバッファー中0.2mg/mlの濃度及び0.2%の負荷容量で負荷した。データは、分(分)で表した時間に対して紫外線吸収単位(mAU)をプロットした。

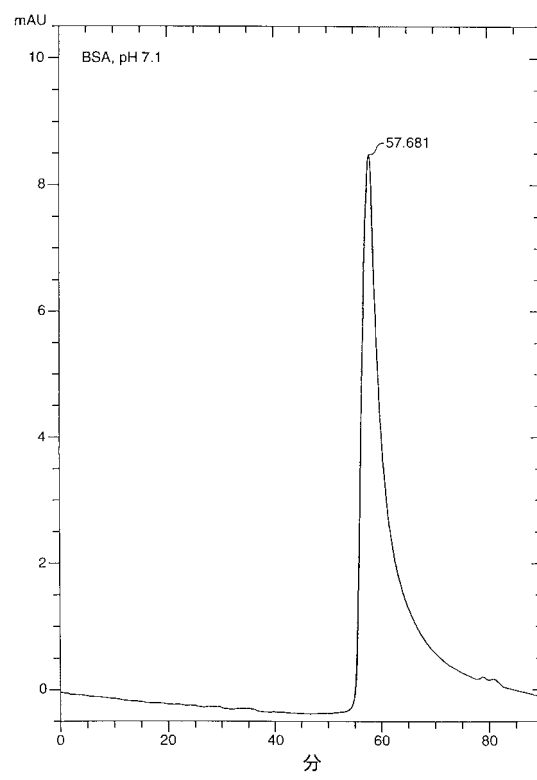
【図9】 組換えヒト化I g G (r h u I g G) /組換えプロテインA (r P r A) 複合体のスーパーロース6サイズ排除クロマトグラフィーカラムでのpH3.5における溶離。

図9は、スーパーロース6サイズ排除クロマトグラフィーカラムのr h u I g G / r P r A複合体の溶離プロファイルを示す。r h u I g G及びr P r Aタンパク質はカラムに0.1Mの酢酸、0.15MのNaCl、pH3.5±0.1のバッファー中、各々0.8mg/ml及び0.2mg/mlの濃度及び0.2%の負荷容量で負荷した。データは、分(分)で表した時間に対して紫外線吸収単位(mAU)をプロットした。

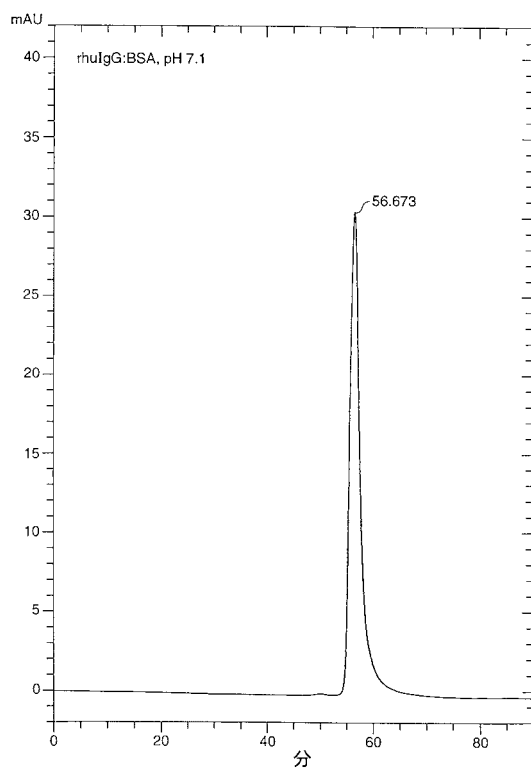
【図 1】



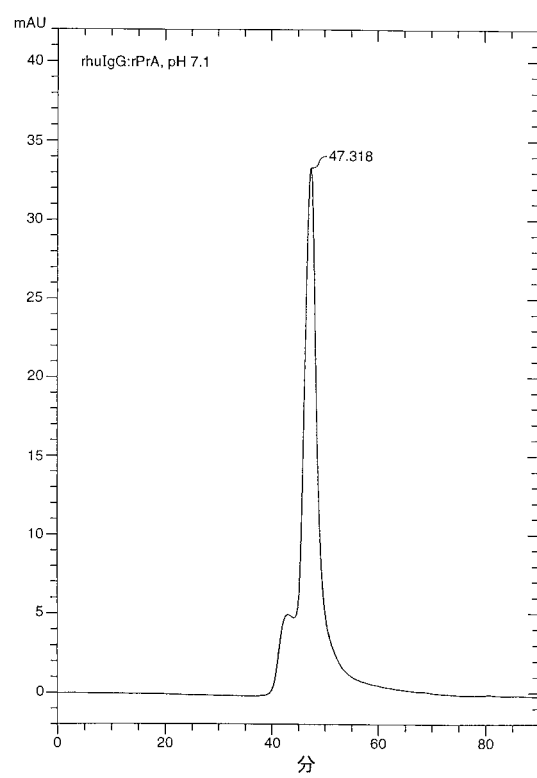
【図 2】



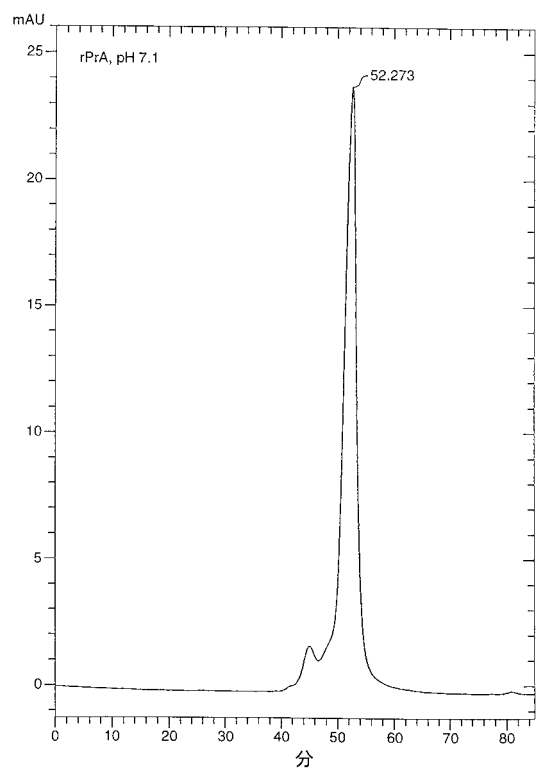
【図 3】



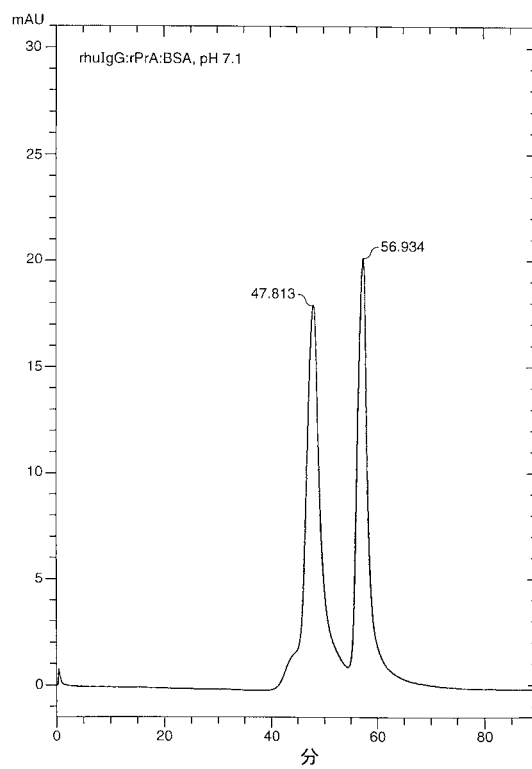
【図 4】



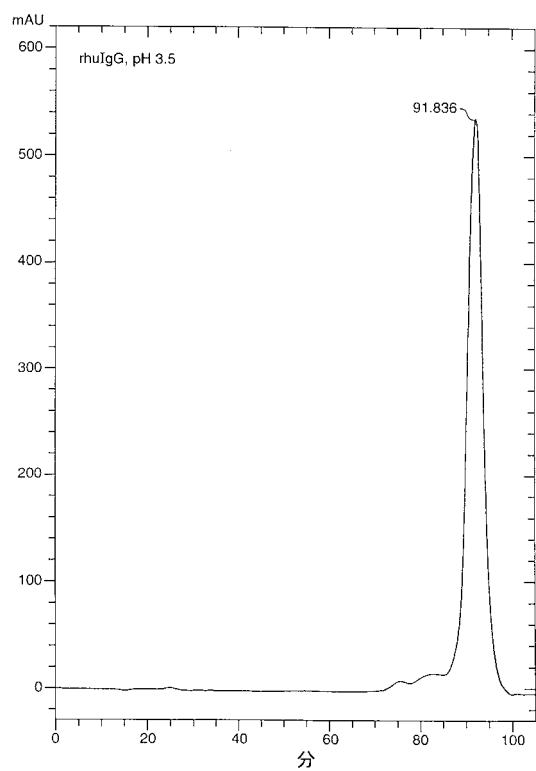
【図 5】



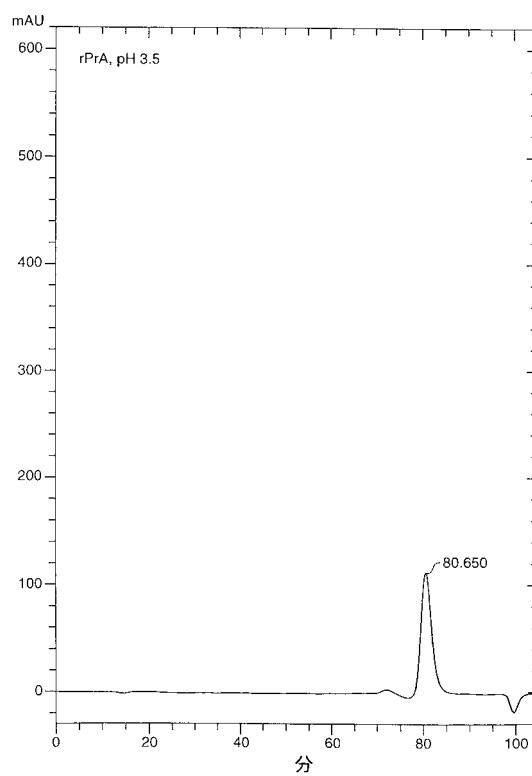
【図 6】



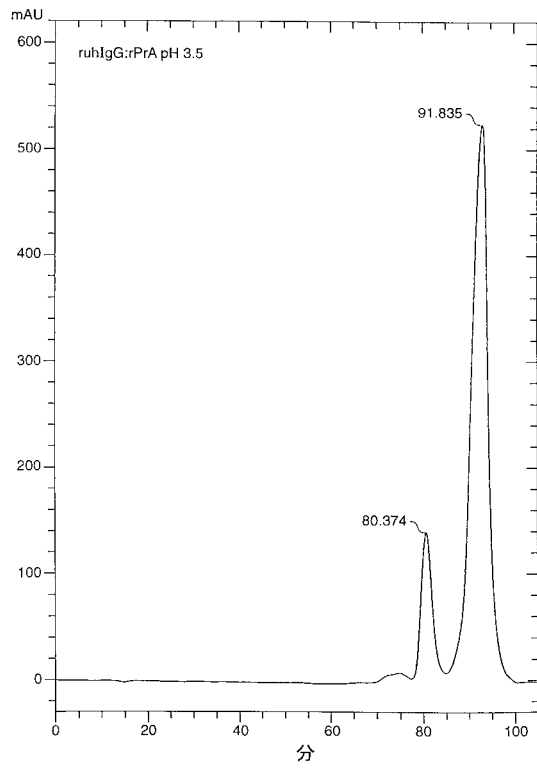
【図 7】



【図 8】



【図 9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 0 7 K	1/22	(2006.01)	C 0 7 K	1/22	
C 0 7 K	1/32	(2006.01)	C 0 7 K	1/32	
B 0 1 D	11/04	(2006.01)	B 0 1 D	11/04	C
C 1 2 N	7/02	(2006.01)	C 1 2 N	7/02	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

審査官 三崎 仁

(56)参考文献 特開昭59-044322 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

B01D15/00-15/42

B01D61/00-61/58

B01D11/00-11/04

C07K1/00-1/30