

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5948343号  
(P5948343)

(45) 発行日 平成28年7月6日(2016.7.6)

(24) 登録日 平成28年6月10日(2016.6.10)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>CO7K</b> 14/765 (2006.01)		CO7K	14/765
<b>CO7K</b> 1/16 (2006.01)		CO7K	1/16
AO1H 5/00 (2006.01)		AO1H	5/00 A
AO1H 5/10 (2006.01)		AO1H	5/10

請求項の数 20 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2013-545010 (P2013-545010)	(73) 特許権者	513155312
(86) (22) 出願日	平成23年8月18日 (2011.8.18)		ウーハン ヘルスゲン バイオテクノロジー コーポレーション
(65) 公表番号	特表2014-501251 (P2014-501251A)		中華人民共和国 430079 フーペイ ウーハン イーストレイク ハイテク ディベロップメント ゾーン ガオシ ン アベニュー ナンバー666
(43) 公表日	平成26年1月20日 (2014.1.20)	(74) 代理人	100103894
(86) 国際出願番号	PCT/CN2011/001374		弁理士 冢入 健
(87) 国際公開番号	W02012/083580	(72) 発明者	ヤーン ダイチャーン
(87) 国際公開日	平成24年6月28日 (2012.6.28)		中華人民共和国 430079 フーペイ ウーハン イーストレイク ハイテク ディベロップメント ゾーン ガオシ ン アベニュー ナンバー666
審査請求日	平成26年6月19日 (2014.6.19)		
(31) 優先権主張番号	201010606635.8		
(32) 優先日	平成22年12月24日 (2010.12.24)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスジェニックイネの子実からヒト血清アルブミンを精製する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

組換えヒト血清アルブミンの粗抽出物を陽イオン交換クロマトグラフィーにて精製し、一次産物 I を得るステップ (1) と、

前記一次産物 I を陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製し、二次産物 II を得るステップ (2) と、

前記二次産物 II に更に硫酸アンモニウムを加えて硫酸アンモニウムの濃度が 0.1 M ~ 1.0 M となるようにした後、疎水性クロマトグラフィーにて精製し、精製された組換えヒト血清アルブミンを得るステップ (3) とを順に備え、

前記陽イオン交換クロマトグラフィーが、UNO Sphere S (商標)、Capto (登録商標) MMC、Nuvia S (商標) 及び MacroPrep - CM (商標) からなる群より選択されるクロマトグラフィー担体を用いて行われ、

前記陰イオン交換クロマトグラフィーが、Q Sepharose (登録商標) FF、UNO Sphere Q (商標) 及び DEAE Sepharose (登録商標) FF からなる群より選択されるクロマトグラフィー担体を用いて行われ、

前記疎水性クロマトグラフィーが、Phenyl Sepharose (登録商標) HP、Phenyl Sepharose (登録商標) FF、Macro-prep t-butyl (商標) 及び Macro-prep methyl (商標) からなる群より選択されるクロマトグラフィー担体を用いて行われる、

トランスジェニックイネの子実から組換えヒト血清アルブミンを分離及び精製する方法

10

20

。

## 【請求項 2】

前記ステップ(3)の疎水性クロマトグラフィーの前に、前記二次産物 I I をセラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーにて精製するステップを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記陽イオン交換クロマトグラフィーが、UNO Sphere S (商標) または Capt o (登録商標) MMC を用いて行われる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記陰イオン交換クロマトグラフィーが、Q Sepharose (登録商標) FF を用いて行われる、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 5】

前記疎水性クロマトグラフィーが、Phenyl Sepharose (登録商標) HP を用いて行われる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーが、Macro-prep セラミックヒドロキシアパタイト I 型及び II 型からなる群より選択されるクロマトグラフィー担体を用いて行われる、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記組換えヒト血清アルブミンの粗抽出物が、

20

i) 組換えヒト血清アルブミンを含むトランスジェニックイネの子実を砕いたものを抽出用緩衝液と 1 : 5 の重量体積比 (kg/l) で混合し、55 ~ 60 にて 1 ~ 1.5 時間抽出して混合物 I を得るステップであって、その内、抽出用緩衝液は、リン酸塩緩衝液 10 ~ 30 mM に、酢酸ナトリウム 10 ~ 20 mM と、硫酸アンモニウム 15 ~ 30 mM と、オクタン酸ナトリウム 5 ~ 20 mM とを含み、その pH が 6.5 ~ 8 であるステップと、

ii) ステップ i) で得られる混合物 I の pH を 4.0 ~ 4.5 に調整し、更に 3 ~ 12 時間沈降させて混合物 II を得るステップと、

iii) ステップ ii) で得られる混合物 II を、ろ布式のプレートフレームフィルターで加圧ろ過し、その後、孔径が 0.20 μm ~ 0.45 μm のポリエーテルスルホン中空糸膜で精密ろ過した後、ろ液を集めて高濃度の組換えヒト血清アルブミンを含む粗抽出液を得るステップとを含む方法により製造される、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 8】

前記陽イオン交換クロマトグラフィーに使われる注入用緩衝液は、酢酸塩緩衝液で構成され、pH が 5.0 未満である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記陽イオン交換クロマトグラフィーに使われる溶出用緩衝液は、酢酸塩緩衝液に塩化ナトリウムを含み、またはリン酸塩緩衝液に塩化ナトリウムを含み、pH が 5.0 ~ 6.7 である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

40

前記陽イオン交換クロマトグラフィーは、UNO Sphere S (商標) を用いて行い、かつ酢酸塩緩衝液に 0.25 M 塩化ナトリウムを含み、pH が 5.2 である溶出用緩衝液が使われる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

陽イオン交換クロマトグラフィーは、Nuvia S (商標) を用いて行い、かつ酢酸塩緩衝液に 0.25 M 塩化ナトリウムを含み、pH が 5.0 である溶出用緩衝液が使われる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記陽イオン交換クロマトグラフィーは、Capt o (登録商標) MMC を用いて行い、かつ非標的蛋白質の除去のため、酢酸塩緩衝液に 1 M 塩化ナトリウムを含み、pH

50

が4.7である洗浄用緩衝液が使われ、かつ組換えヒト血清アルブミンの溶出のため、リン酸塩緩衝液に1M塩化ナトリウムを含み、pHが6.7である溶出用緩衝液が使われる、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

前記陽イオン交換クロマトグラフィーは、MacroPrep-CM(商標)を用いて行い、かつ非標的蛋白質の除去のため、酢酸塩緩衝液に1M塩化ナトリウムを含み、pHが4.7である洗浄用緩衝液が使われ、かつ組換えヒト血清アルブミンの溶出のため、リン酸塩緩衝液に0.1M塩化ナトリウムを含み、pHが6.5である溶出用緩衝液が使われる、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

前記陰イオン交換クロマトグラフィーは、Q Sepharose(登録商標)FFを用いて行い、かつリン酸塩緩衝液に0.25M塩化ナトリウムを含み、pHが6.0~7.0である溶出用緩衝液が使われる、請求項1に記載の方法。

【請求項15】

前記陰イオン交換クロマトグラフィーは、DEAE Sepharose(登録商標)FFを用いて行い、かつ非標的蛋白質の除去のため、リン酸塩緩衝液に0.1M塩化ナトリウムを含み、pHが6.0~7.0である洗浄用緩衝液が使われ、かつ組換えヒト血清アルブミンの溶出のため、リン酸塩緩衝液に0.25M塩化ナトリウムを含み、pHが6.0~7.0である溶出用緩衝液が使われる、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

前記疎水性クロマトグラフィーにおいて、精製すべき前記二次産物IIには、更に濃度が0.1M~1Mの硫酸アンモニウムを含ませる、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

前記疎水性クロマトグラフィーは、Phenyl Sepharose(登録商標)HPを用いて行い、かつ精製すべき前記二次産物IIには、更に濃度が0.4Mの硫酸アンモニウムを含ませる、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

前記疎水性クロマトグラフィーは、Phenyl Sepharose(登録商標)FFを用いて行い、かつ精製すべき組換えヒト血清アルブミンを含む二次産物IIには、更に濃度が0.1Mの硫酸アンモニウムを含ませる、請求項1に記載の方法。

【請求項19】

前記疎水性クロマトグラフィーは、MacroPrep-t-Butyl(商標)を用いて行い、かつ精製すべき組換えヒト血清アルブミンを含む二次産物IIには、更に濃度が0.6~1.0Mの硫酸アンモニウムを含ませる、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

前記セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーは、リン酸塩緩衝液で構成され、pHが7.0~7.5の溶出用緩衝液が使われる、請求項6に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物工学分野に属するものであり、具体的にはトランスジェニックイネの子実から組換えヒト血清アルブミン(rHSA)を大規模に分離し精製する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト血清アルブミン(human serum albumin, HSA)は、585個のアミノ酸からなる一本鎖構造の非グリコシル化蛋白質であり、分子量が66.5kDであり、等電点が4.7~4.9の範囲にあった。ヒト血漿中に最も多く含まれている蛋白質として、ヒト血清アルブミンは、血漿総蛋白質の60%程度を占め、ヒト血液1リットル当たり約40gのHSAが含まれている。HSAは血漿中のみならず、組織、体の分泌液、皮膚とリンパ腔にも存在する。正常な生理条件において、HSAは、血漿中でコ

10

20

30

40

50

ロイド浸透圧の維持、栄養物質と傷口癒着の促進に寄与するとともに、キャリアー物質として、血液中で、例えば、ホルモンと言った多くの疎水性生体分子、生理活性物質、及び血液中の薬物と結合してその輸送に関与することが知られている。従って、HSAは、一つの重要な薬用蛋白質であり、臨床において主に失血、火傷、熱傷、形成外科手術及び脳損傷による低蛋白質血症、並びに肝硬変、腎性浮腫などの治療に用いられている。

#### 【0003】

現在、臨床に使われているHSAは、主にヒト由来の血漿から抽出、単離して製造されている。しかし、このような製造法には以下の欠点があった。一方では、血漿供給源に限界がある。即ち、限られた血液供給源によってはHSAとその関連製剤の製造需要を満たすことができない。他方、血液自体が危険要因になる可能性があった。例えば肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)などの危険な感染性病原体が混入する恐れもあるので、血漿から抽出するHSAの使用に大きな不安を抱える場合があった。そこで、代替法としてDNA組換え技術に基づくヒト血清アルブミン製造法の開発が強く求められている。

10

#### 【0004】

現代新しいDNA組換えと合成技術の進展に伴い、研究者らは組換えヒト血清アルブミン(rHSA)の製造と応用に強い関心を示している。今まで既に様々な発現系によってrHSAを大量製造する試みが行われてきた。例えば、大腸菌(Latta, M. et al., *Bio/Technology*, 5:1309-1314, (1987))、枯草菌(Saunders, C.W. et al., *J. Bacteriol.* 169:2917-2925, (1987))などの原核生物、酵母(WO00/44772、EP0683233A2、US5612196)などの真核生物や培養動物細胞などを利用してrHSAを製造する技術が確立されているが、これらの方法は、その発現レベルが低く、または生産コストが高いことから産業規模の製造に適したものではない。

20

#### 【0005】

本発明者による中国特許出願200510019084号に、生物反応器としてイネ胚乳細胞を利用してrHSAを製造する方法が開示されており、当該方法に、イネ胚乳に特異的に発現するプロモーターとシグナルペプチドを利用してrHSAをイネ胚乳細胞の細胞内膜系に導入し、更にイネ胚乳の蛋白質小体に貯蔵することによってrHSAをイネに大量に蓄積させ、最終的には比較的高い発現レベルに到達させる工程が含まれている。この方法によって得られるrHSAの発現レベルは、少なくともイネの種籾(子実)の重量の0.3%以上であった。当該方法は、発現量が高く、コストが低いなどといった有利な点を示し、蛋白質医薬品の製造のための新しい手段の開発を可能にしている。

30

#### 【0006】

各発現系で製造されるrHSAは、市場投入の前に精製する必要がある。よって、精製手段が産物の品質及び製造コストに影響を与える可能性があった。また、通常、精製プロセスのコストは、製造コスト全体の80~90%を占める。現時点において、イネの子実からrHSAを精製するプロセスが未だ確立されていない。このため、簡便で且つコスト効率の良い方法を開発してイネの子実からrHSAを精製することには、技術的な困難、または、経済的リスクが伴う。

#### 【0007】

酵母や植物の浮遊細胞からrHSAを抽出する技術が既に報告されており、例えば、中国特許出願CN101768206Aにメタノール資化性酵母(*Pichia pastoris*)にて発現するrHSAの精製方法が開示されている。当該方法は、rHSAの発酵培養液をセラミック膜でろ過した後、順次に陽イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーと弱陰イオン交換クロマトグラフィーを経て精製されたrHSAを取得する工程を含む。しかしながら、イネの子実由来の不純物は、酵母や植物の浮遊細胞由来の不純物とは大きく異なり、よって、これらの従来技術のままイネの子実からのrHSAの精製に用いることができない。従って、イネからrHSAを精製する簡便かつ実効的な方法を開発することによって高収率、高純度でrHSAを製造し、将来において工業的生産を可能にすることが期待されている。

40

50

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

本発明は、トランスジェニックイネの子実から組換えヒト血清アルブミン ( r H S A ) を大規模に分離し、精製する方法を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本発明の上述した目的は、以下の技術的解決案により達成される。即ち、トランスジェニックイネの子実から組換えヒト血清アルブミンを分離及び精製する方法であって、順に、

( 1 ) 組換えヒト血清アルブミンの粗抽出物を陽イオン交換クロマトグラフィーにて精製し、一次産物 I を得るステップと、

( 2 ) 一次産物 I を陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製し、二次産物 I I を得るステップと、

( 3 ) 二次産物 I I を疎水性クロマトグラフィーにて精製し、精製された組換えヒト血清アルブミンを得るステップとを備える。

## 【0010】

ステップ ( 1 ) において、陽イオン交換クロマトグラフィーは、U N O S p h e r e S、N u v i a S、C a p t o M M C 及び M a c r o P r e p - C M からなる群より選択される強陽イオンクロマトグラフィー樹脂をクロマトグラフィー担体として行ってもよい。U N O S p h e r e S または C a p t o M M C を用いて行うことが好ましい。

## 【0011】

陽イオン交換クロマトグラフィーは、p H 勾配による溶出または N a C l 濃度勾配による溶出を用いてもよく、p H 勾配による溶出が好ましい。

## 【0012】

一つの実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィーの溶出用緩衝液は、酢酸塩緩衝液に、0 . 2 5 M 塩化ナトリウムを含み、p H が 5 . 2 であった。

## 【0013】

ステップ ( 2 ) において、陰イオン交換クロマトグラフィーは、U N O S p h e r e Q、Q S e p h a r o s e F F 及び D E A E S e p h a r o s e F F からなる群より選択される強陰イオンクロマトグラフィー樹脂をクロマトグラフィー担体として行ってもよく、Q S e p h a r o s e F F を用いて行うことが好ましい。

## 【0014】

一つの実施形態において、陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出用緩衝液は、リン酸塩緩衝液に、0 . 2 M 塩化ナトリウムを含み、p H が 7 . 5 であった。

## 【0015】

ステップ ( 3 ) において、疎水性クロマトグラフィーは、P h e n y l S e p h a r o s e H P、P h e n y l S e p h a r o s e F F、M a c r o - p r e p t - b u t y l 及び M a c r o - p r e p m e t h y l からなる群より選択されるクロマトグラフィー担体を用いて行ってもよい。P h e n y l S e p h a r o s e H P を用いて行うことが好ましい。

## 【0016】

疎水性クロマトグラフィーによって得られる標的蛋白質を含む溶出物は、例えば、限外ろ過による濃縮、冷凍乾燥などの周知の技術で最終産物に加工することができる。

## 【0017】

更に、前記方法において、前記ステップ ( 3 ) の疎水性クロマトグラフィーの前に、二次産物 I I をセラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーにて精製するステップを含んでもよい。即ち、このような実施形態において、ステップ ( 3 ) として、標的蛋白質を含む二次産物についてセラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを行い、

10

20

30

40

50

その後、ステップ(4)として、疎水性クロマトグラフィーを行って精製された標的蛋白質を得る。

【0018】

セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーは、Macro-prepセラミックヒドロキシアパタイトI型及びMacro-prepセラミックヒドロキシアパタイトII型からなる群より選択されるクロマトグラフィー担体を用いてもよく、Macro-prepセラミックヒドロキシアパタイトI型を用いて行うことが好ましい。

【0019】

一つの実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィーに使われる注入用緩衝液は、酢酸塩緩衝液から構成され(を含み)、そのpHが5.0未満であった。

10

【0020】

陽イオン交換クロマトグラフィーに使われる標的蛋白質を溶出するための溶出用緩衝液は、酢酸塩緩衝液に塩化ナトリウムを含み、またはリン酸塩緩衝液に塩化ナトリウムを含み、pHが5.0~6.7であった。好ましくは、塩化ナトリウムの濃度が0.25Mであり、溶出用緩衝液のpHが5.2であった。

【0021】

一つの実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィーは、UNO Sphere SまたはCaptio MMCを用いて行い、ここで使われる溶出用緩衝液は、酢酸塩緩衝液に、0.25M 塩化ナトリウムを含み、pHが5.2または6.7であった。

20

【0022】

一つの実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィーは、Nuvia Sをクロマトグラフィー担体として用い、その溶出用緩衝液は、酢酸塩緩衝液に、0.25M 塩化ナトリウムを含み、pHが5.0または5.2であった。

【0023】

一つの実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィーは、Captio MMCをクロマトグラフィー担体として用い、不純物の除去に用いられる洗浄用緩衝液は、酢酸塩緩衝液に、1M 塩化ナトリウムを含み、pHが4.7である。標的蛋白質の溶出に用いられる溶出用緩衝液は、リン酸塩緩衝液に、1M 塩化ナトリウムを含み、pHが6.7であった。

30

【0024】

一つの実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィーは、MacroPrep-CMをクロマトグラフィー担体として用い、不純物の除去に用いられる洗浄用緩衝液は、酢酸塩緩衝液に、1M 塩化ナトリウムを含み、pHが4.7である。標的蛋白質の溶出に用いられる溶出用緩衝液は、リン酸塩緩衝液に、0.1M 塩化ナトリウムを含み、pHが6.5であった。

【0025】

一つの実施形態において、陰イオン交換クロマトグラフィーは、Q Sepharose FFをクロマトグラフィー担体として用い、ここで使われる溶出用緩衝液は、リン酸塩緩衝液に、0.25M 塩化ナトリウムを含み、pHが6.0~7.0であった。

40

【0026】

一つの実施形態において、陰イオン交換クロマトグラフィーは、DEAE Sepharose FFをクロマトグラフィー担体として用い、不純物の除去に用いられる洗浄用緩衝液は、リン酸塩緩衝液に、0.1M 塩化ナトリウムを含み、pHが6.0~7.0である。標的蛋白質の溶出に用いられる溶出用緩衝液は、リン酸塩緩衝液に、0.25M 塩化ナトリウムを含み、pHが6.0~7.0であった。

【0027】

一つの実施形態において、疎水性クロマトグラフィーにて精製すべきrHSA含有画分に、更に硫酸アンモニウムを含んでもよく、硫酸アンモニウムの濃度が0.1M~1Mの範囲にあってもよい。

50

## 【0028】

一つの実施形態において、疎水性クロマトグラフィーは、Phenyl Sepharose HPをクロマトグラフィー担体として用いて行い、精製すべきrHSA含有画分に含まれる硫酸アンモニウムの濃度が0.4Mであった。

## 【0029】

一つの実施形態において、疎水性クロマトグラフィーは、Phenyl Sepharose FFをクロマトグラフィー担体として用いて行い、精製すべきrHSA含有画分に含まれる硫酸アンモニウムの濃度が0.1Mであった。

## 【0030】

一つの実施形態において、疎水性クロマトグラフィーは、MacroPrep-t-Butylをクロマトグラフィー担体として用いて行い、精製すべきrHSA含有画分に含まれる硫酸アンモニウムの濃度が0.6~1.0Mであった。

10

## 【0031】

一つの実施形態において、Macro-prepセラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーにおいて、標的蛋白質の溶出に用いられる溶出用緩衝液は、リン酸塩緩衝液から構成され(を含む)、pHが7.0~7.5であった。

## 【0032】

本発明に係わる前記rHSAは、本出願の出願人によって提出された中国特許出願200510019084.4号に開示されている方法に従い、イネ胚乳細胞を生物反応器として用いて製造することができる。トランスジェニックイネに発現するrHSAは、本出願の出願人によって提出された中国特許出願201010597544.2号に開示されている方法に従って抽出することができ、好ましくは、当該方法に、

20

(i) 粉碎済みのrHSA含有トランスジェニックイネを抽出用緩衝液と、1:5の重量体積比(kg/l)で混合し、55~60にて1~1.5時間抽出を行って混合物Iを得るステップであって、抽出用緩衝液は、リン酸塩緩衝液10~30mMに、酢酸ナトリウム10~20mMと、硫酸アンモニウム15~30mMと、オクタン酸ナトリウム5~20mMとを含み、そのpHが6.5~8であるステップと、

(ii) ステップ(i)で得られる混合物IのpHを4.0~4.5に調整し、更に3~12時間かけて沈降させて混合物IIを得るステップと、

(iii) ステップ(ii)で得られる混合物IIをろ過して澱粉や非標的蛋白質を取り除いた後、ろ液を回収して高濃度のrHSAを含む粗抽出液を得るステップとを含む。

30

## 【0033】

一つの実施形態において、前記ろ過に、ろ布式のプレートフレームフィルターを用いて加圧ろ過し、その後、ポリエーテルスルホン中空糸膜にて精密ろ過するステップが含まれる。前記中空糸膜は、孔径が0.20μm~0.45μmであり、0.22μmのものが好ましい。

## 【発明の効果】

## 【0034】

本発明により提供される技術的解決案は、以下の利点があった。

## 【0035】

40

1) イネに色素と多糖類の物質が比較的高い含有量で含有されていることに対して、本発明において、第1の精製ステップとして陽イオン交換クロマトグラフィーを行い、rHSAを捕集または結合するために許容注入量を有効に高め、クロマトグラフィーの精製効率を高めている。これに対し、第1の精製ステップとして陰イオン交換クロマトグラフィーを用いると、rHSAを捕集するための許容注入量が理論値の20%程度にしかない。また、UNO Sphere SとCpto-MMCは、いずれも水酸化ナトリウムに対して極めて高い安定性と長い寿命を有するので、クロマトグラフィー担体の耐用期限が延長されるとともに、本発明の洗浄作業を容易にできるようにし、最終的に目的産物のコストを削減できる。

## 【0036】

50

2) 本発明において、第2の精製ステップとして陰イオン交換クロマトグラフィーを行っている。溶出条件を最適化した結果、イネの子実に含まれる80%以上の非標的蛋白質を除去することができ、結果として、非標的蛋白質を有効に取り除いた上でrHSAを回収することができた。また、イネの子実に含まれる色素と多糖類の物質が、第1の精製ステップにおいて陽イオン交換クロマトグラフィーを行うことにより既に取り除かれているため、陰イオン交換クロマトグラフィーの許容注入量及び精製効率への影響が取り除かれる。

【0037】

3) 本発明において、第3の精製ステップとしてMacro-prepセラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを行い、二量体以上の多量体を取り除く。rHSAを注射用の薬剤にする場合、過剰量の二量体以上の多量体によってアレルギーを引き起こす恐れがあった。そこで、このステップで純度を著しく向上させ、臨床応用における純度の高さに対する要求またはそれ以上の要求に応えられるようにする。

【0038】

4) 本発明において、仕上げの精製ステップとして疎水性クロマトグラフィーを行う。以上のように、三段階に分けてクロマトグラフィーを行うことにより、目的とする産物のHPLC純度を99.0%以上にすることができる。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】一次精製として異なるクロマトグラフィー担体を用いて陽イオン交換クロマトグラフィーを行い、得られた画分のSDS-PAGE写真であった。その内、AがUNO sphere S担体であり、BがNuvia S担体であり、CがCaptor MMC担体であり、DがMacroPrep-CM担体であった。

【図2】rHSA抽出液の許容注入量(体積)に対する、Nuvia S担体とUNO Sphere S担体の間の、異なる流速(300 cm/h、600 cm/h)における比較結果を示す図であった。

【図3】一次精製として異なるクロマトグラフィー担体を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行うことにより得られる画分のSDS-PAGE写真であった。その内、AがUNO Sphere Q担体であり、BがQ Sepharose FF担体であった。

【図4】透析前後における、Q Sepharose FF担体に対するrHSA抽出液の許容注入量及びrHSA抽出液における透析前後の多糖類の含有量を示す図であった。

【図5】二次精製として異なるクロマトグラフィー担体を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行うことにより得られる画分のSDS-PAGE写真であった。その内、AがQ Sepharose FF担体であり、BがDEAE sepharose FF担体であった。

【図6】三次(仕上げ)精製として異なるクロマトグラフィー担体を用いて疎水性クロマトグラフィーを行うことにより得られる画分のSDS-PAGE写真であった。その内、AがPhenyl Sepharose HP担体であり、BがPhenyl Sepharose FF担体であり、CがMacro Prep-t-Butyl担体であった。

【図7】rHSAを含む粗抽出液に対し順に陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、及び疎水性クロマトグラフィーを行って得られる溶出画分のSDS-PAGE写真であった。その内、クロマトグラフィー担体として、それぞれUNO Sphere S(A)、Q Sepharose FF(B)とPhenyl Sepharose HP(C)が使われている。

【図8】本発明の一つの実施形態に係る精製済みのrHSA産物のHPLCクロマトグラム(HPLC-SEC)であった。

【図9】Macro-prepセラミックヒドロキシアパタイトI型の担体を用いてセラ

10

20

30

40

50



ミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを行うことによって得られる溶出画分の SDS - PAGE 写真であった。

【図10】本発明の他の一つの実施形態に係わる精製済みの r H S A 産物の H P L C クロマトグラムであった。

【図11】順に Macro - prep セラミックヒドロキシアパタイト I I 型の担体を用いてセラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、及び Phenyl S e p h a r o s e H P 担体を用いて疎水性クロマトグラフィーを行うことによって得られる溶出画分の SDS - PAGE 写真であった。

【図12】本発明の他の一つの実施形態に係わる精製済みの r H S A 産物の H P L C クロマトグラムであった。

10

【発明を実施するための形態】

【0040】

以下、本発明の特徴と利点をより容易に理解できるように実施例を挙げて説明する。これらの実施例は本発明を説明するものであり、本発明の範囲はこれらの実施例によって何ら制限されるものではない。

【0041】

陽イオン交換クロマトグラフィーにおけるクロマトグラフィー担体と溶出条件の選定

本発明において、クロマトグラフィー担体を Bio - Rad 社製の UNO S p h e r e S、Nuvia S、Capto MMC などを含む高い作業流速 (working flow rate) を有する陽イオン交換樹脂とした。

20

【0042】

実験より分かるように、Capto MMC、Nuvia S と UNO S p h e r e S は、何れも r H S A の精製に利用可能であった。その内、Capto MMC による蛋白質の精製効果が最もよく、その次に Nuvia S と UNO S p h e r e S であった。Nuvia S と UNO S p h e r e S は、蛋白質精製において両者の効果に明らかな区別がないと確認できる。しかし、同じ作業流速の場合において UNO S p h e r e S の許容注入量が Capto MMC の 1.5 倍である。また、UNO S p h e r e S の作業流速は、Capto MMC と同じであった。なお、UNO S p h e r e S は、高濃度の水酸化ナトリウム中においても極めて優れた安定性を示しており、Capto MMC と比べて洗浄プロセスが簡便で、使用寿命が長く、コストが低いといった利点があった。

30

【0043】

Nuvia S と UNO S p h e r e S は、類似した性質を有しているが、リガンドの伸長長さと基質粒子の大きさに区別があった。両者各自の最適の作業流速において、Nuvia S の許容注入量が UNO S p h e r e S の 1.4 倍になっているが、Nuvia S の作業流速は、UNO S p h e r e S の約半分であった。代わりに、同じ流速の場合、UNO S p h e r e S の許容注入量が Nuvia S より大きく、また、両者の精製能力は同等のレベルにあった。

【0044】

各要素を纏めて見ると、陽イオン交換クロマトグラフィーのクロマトグラフィー担体として UNO S p h e r e S を使うのが好ましい。

40

【0045】

r H S A が担体に完全に吸着できるように、r H S A を含む抽出液を比較的低い pH 値 (pH = 4.4) で UNO S p h e r e S を充填したカラムに添加し、その後、それぞれ pH 勾配を有する溶出用緩衝液と NaCl 勾配を有する溶出用緩衝液で溶出させて基本的な溶出条件を調べる。

【0046】

結果から示されるように、pH 勾配による溶出の際において、UNO S p h e r e S カラムに吸着された r H S A は、溶出用緩衝液の pH が 5.5 を超える場合において僅かながらも脱着する傾向を示したため、注入用緩衝液の pH を 5.5 以下にする必要がある

50

ことが示唆された。また、溶出用緩衝液のpHを5.68にする場合、rHSAは、カラムから完全に脱着する。このことから、rHSAがUNO Sphere スクロマトグラフィーカラムでのpH勾配による溶出に対して非常に敏感であることが分かる。

【0047】

NaCl濃度勾配による溶出で、標的蛋白質rHSAは、35%から60%までの1M塩化ナトリウム(NaCl)濃度勾配において脱着の傾向を示し、従って、rHSAがUNO Sphere スクロマトグラフィーカラムでのNaCl濃度勾配による溶出に敏感に反応しないことが確認された。これらの結果から、pH勾配とNaCl勾配が何れもrHSAの溶出に利用できることが証明された。また、pH勾配の場合、より敏感に且つより少量の溶出用緩衝液を使ってrHSAを溶出することができる。一方、NaCl勾配によってrHSAを溶出し難く、必要とされるNaClの濃度が高く、且つ大量の溶出用緩衝液を使用する必要があった。

【0048】

精製効果と回収率を総合的に考慮すると、好ましい溶出用緩衝液として、0.25M NaClのリン酸塩緩衝液(pH 5.2)が挙げられる。

【0049】

陰イオン交換クロマトグラフィーにおけるクロマトグラフィー担体と溶出条件の選定

陽イオン交換樹脂と同様に、陰イオン交換樹脂もrHSAの精製に用いることができる。本発明において、クロマトグラフィー担体をUNO Sphere Q、Q Sepharose FF及びDEAE Sepharose FFなどを含む、高い流速と高い許容注入量を有する陰イオン交換樹脂とした。

【0050】

実験より分かるように、UNO Sphere Q、Q Sepharose FF及びDEAE Sepharose FFは、何れもrHSAの精製に用いることができる。UNO Sphere QはQ Sepharose FFと比べて流速が大きい、Q Sepharose FFはUNO Sphere Qと比べて精製効率が優れている。また、DEAE Sepharose FFは、Q Sepharose FFと類似した精製効率を示しているが、Q Sepharose FFと比べて流速が低い。

【0051】

上述から分かるように、陽イオン交換クロマトグラフィーにおけるクロマトグラフィー担体として、UNO-sphere Sは、精製性能においてCaptor MMCと比べてやや劣っている。しかし、実験により証明されたように、このような不利な影響は、全体の精製効率を改善することによって受けないようにすることが出来る。また、UNO-sphere Sは、後の陰イオン交換クロマトグラフィーに不利な影響を与えない。一つの好ましい実施形態において、陰イオン交換クロマトグラフィーのクロマトグラフィー担体としてQ Sepharose FFを用いるのが好ましく、標的蛋白質の溶出に用いる溶出用緩衝液は、リン酸塩緩衝液に0.2M NaClを含み、pHが6.8であった。

【0052】

陰イオン交換クロマトグラフィーと陽イオン交換クロマトグラフィーの実施順番の確定

陰イオン交換クロマトグラフィーと陽イオン交換クロマトグラフィーは、何れもrHSAの一次精製に用いることができるが、実験から分かるように、Q Sepharose FF陰イオン交換樹脂を一次精製ステップに用いた時は、その許容注入量が理論上の許容量より遥かに低い。これはイネの子実中に大量に存在する可溶性多糖類と核酸の関与によるものと考えられる。その理由として、可溶性多糖類と核酸は負電荷を持っており、よって、Q Sepharose FFに結合してその許容注入量を低下させることが考えられる。実験により証明されたように、透析によってrHSA抽出液に含まれる可溶性多糖類の含有量を減らすことが出来るため、Q Sepharose FFの許容注入量を高めることができる。

【0053】

その一方、UNO Sphere S、Nuvia SとCapto MMCなどの陽イオン交換クロマトグラフィー担体は、可溶性多糖類及び核酸と結合できず、よって、許容注入量の低下を回避することができる。このことから、本発明において、一次精製に陽イオン交換クロマトグラフィーを用い、二次精製に陰イオン交換クロマトグラフィーを用いることとした。

#### 【0054】

#### 疎水性クロマトグラフィーにおけるクロマトグラフィー担体の選定

本発明において、幾つかの疎水性クロマトグラフィー担体を当該精製ステップに用いた。疎水性クロマトグラフィー担体として、例えば、Phenyl Sepharose HP、Phenyl Sepharose FF(LS)、Macro-prep t-butyl及びMacro-prep methylが挙げられ、これらは類似した性質を持っている。

10

#### 【0055】

Phenyl Sepharose HPは、強い疎水性と優れた精製性能を持っている。粗抽出液からほぼ全ての非標的蛋白質とその他の不純物を除去する性能は、精製効率の向上に鍵となっているが、当該クロマトグラフィー担体は、粒子のサイズが比較的小さく、流速が低く、作業方式が特別であることから、その応用においてやや利便性が低い。

#### 【0056】

Phenyl Sepharose HPと比較して、Phenyl Sepharose FF(LS)は、同じリガンドと基質を有しているが、球状基質の粒径とリガンドの密度が異なっている。Phenyl Sepharose FF(LS)の基質の平均粒径は、Phenyl Sepharose HPと比べて3倍大きく、よって、前者は大きい作業流速を有する。このためrHSAの生産に用いる際に製造時間を短縮することができる。MacroPrep-Butylは、Phenyl Sepharose FFとPhenyl Sepharose HPより疎水性が弱く、Macro-prep methylは、疎水性においてMacroPrep-butylより弱い。

20

#### 【0057】

Phenyl Sepharose FFは、Phenyl Sepharose HPと同様の作業方式で浸透液(transmission fluid)を集めるほうがよい。添加サンプルの塩濃度を選定する際、25mM PB+0.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、pH 6.8の平衡用緩衝液を用いて添加してから100%の水で溶出する場合、50%を超えるrHSAがカラムに保持されていることが確認できる。結果として平衡用緩衝液の塩濃度を低くする必要がある。

30

#### 【0058】

UNO Sphere SとQ Sepharose FFカラムにてろ過した後のサンプルに硫酸アンモニウムを加え、硫酸アンモニウムの濃度をそれぞれ0.2Mと0.1Mとなるように調整した後、Phenyl Sepharose FF(LS)カラムに添加する。浸透液(transmission fluid)と、純水による溶出液を集めてSDS-PAGE解析を行う。結果より示されるように、Phenyl Sepharose FF(LS)は、Phenyl Sepharose HPと比べてより強い疎水性を示し、且つ添加サンプルにおける硫酸アンモニウムの濃度が0.1Mと低くなっている場合においてもなおサンプル中の非標的蛋白質に対する良好な除去効果を有している。また、Phenyl Sepharose FF(LS)により得られる産物の純度は93.5%に達している。一方で、約30%のrHSAがPhenyl Sepharose FF(LS)カラムに保持されて失われる。硫酸アンモニウムの代わりに塩化ナトリウムを用いて上記実験を行う場合、同様の結果となる。カラムに保持されることによるrHSAのロスが一定程度で低減されるが、産物のHPLC純度は依然として約93%であった。

40

#### 【0059】

UNO Sphere SとQ Sepharose FFカラムにてろ過した後のサンプルに硫酸アンモニウムを加え、硫酸アンモニウムの濃度をそれぞれ1M、0.8Mま

50

たは0.6Mとなるように調整した後、Macro-prep t-butylとMacro-prep methylカラムに添加する。浸透液(transmission fluid)と、純水による溶出物とを集めてSDS-PAGE解析を行う。結果より示されるように、Macro-prep t-butylとMacro-prep methylは、何れも疎水性が弱い。更に両者のrHSAに対する精製特性も良好ではなく、得られるrHSAのHPLC純度は90%であった。

#### 【0060】

Macro-prepセラミックヒドロキシアパタイトI型またはII型を選定するために、Bio Rad社製の二つのMacro-prepセラミックヒドロキシアパタイトについて比較を行った。比較の結果から、Macro-prepセラミックヒドロキシアパタイトI型がII型より適しているのが確認された。Macro-prepセラミックヒドロキシアパタイトI型を用いてクロマトグラフィーを行うと、モノマーの含有量を98.998%にまで引き上げることができる。

10

#### 【0061】

上述したことから、Phenyl Sepharose HPと比べて高流速で作業できる点で他のクロマトグラフィー担体が優れていることには間違いはないが、他のクロマトグラフィー担体からは、何れもPhenyl Sepharose HPに匹敵する精製効率を得られない。Phenyl Sepharose HPは、精製速度が比較的低下が、98%より大きい純度を有する標的蛋白質を確保できる。従って、Phenyl Sepharose HPを疎水性クロマトグラフィー担体として用いることが好適であった。

20

#### 【実施例】

#### 【0062】

##### 材料と装置

ろ布式のプレートフレーム加圧ろ過器は、型番がXMS4/500-UBであり、メーカーが上海天立加圧ろ過器技術有限公司(中国)である。0.20 $\mu$ mの中空糸セルロースカラムは、湖州科濾膜技術有限公司(中国)により購入する。

#### 【0063】

UNO Sphere S、Nuvia S、Capto MMC、MacroPrep-CM、MacroPrep-methyl及びMacroPrep-Butylの各担体は、Bio-Rad社(米国)により購入する。

30

Q Sepharose、Phenyl Sepharose HP、Phenyl Sepharose FF及びDEAE-Sepharose FFの各担体は、GE Healthcare社(米国)により購入する。

C10/10とXK16/20の各クロマトグラフィーカラムは、GE Healthcare社(米国)により購入する。

Biological 15/200クロマトグラフィーカラムは、Bio-Rad社(米国)により購入する。

#### 【0064】

##### [実施例1] トランスジェニックイネからのrHSAの抽出

40

本発明の発明者による中国特許出願200510019084号に開示された方法に従い、トランスジェニックイネが作製された。水稻栽培されたトランスジェニックイネの外皮を除去して半精米を得、その後、粒度が80~100メッシュの米粉となるように砕いた。砕いた米粉を抽出用緩衝液と1:5(重量/体積、kg/L)の割合で混合し、60

にて1.5時間抽出した。抽出用緩衝液は、リン酸塩緩衝液25mMに、酢酸ナトリウム20mMと、硫酸アンモニウム10mMと、オクタン酸ナトリウム10mMとを含み、pHが7.5であった。上記のようにして得られた混合物を酢酸でpH4.5に調整し、更に少なくとも3時間置いて非標的蛋白質を沈降させた。その後、得られた混合物を、順に(ろ布式の)プレートフレーム加圧ろ過器で加圧ろ過してから孔径が0.22 $\mu$ mの中空糸セルロースカラムで精密ろ過し、透明なrHSA抽出液を得た。rHSAの濃度は

50

、約 0.66 mg/ml であった。

【0065】

[実施例2] 陽イオン交換クロマトグラフィーによる一次精製

(1) UNO Sphere S クロマトグラフィー担体を用いる陽イオン交換クロマトグラフィー

XK16/100 カラムに約 8.7 ml の UNO Sphere S を充填し、流出液の pH 値が安定するまで 200 ml の平衡用緩衝液 (無水酢酸ナトリウム 2 g/L、酢酸を加えて pH が 4.5 となるように調整したもの) を使って 300 cm/h (cm/時) の流速で平衡化した。実施例 1 で得られた rHSA 抽出液サンプル 250 ml を、600 cm/h の流速でカラムに注入した。サンプルの導電率が 6.1 mS/cm であり、pH が 4.53 であった。サンプルを添加した後、溶出用緩衝液 (酢酸ナトリウム 2 g/L、酢酸、pH 5.2、塩化ナトリウム 14.61 g/L) を使って 300 cm/h の流速でサンプルを溶出した。溶出液を集めて SDS-PAGE で観察し、rHSA を含む画分を得た。電気泳動図は、図 1A に示した。

10

【0066】

(2) Nuvia S クロマトグラフィー担体を用いる陽イオン交換クロマトグラフィー

XK16/100 カラムに約 9.3 ml の Nuvia S 担体を充填し、流出液の pH 値が安定するまで 200 ml の平衡用緩衝液 (無水酢酸ナトリウム 2 g/L、酢酸を加えて pH が 4.5 となるように調整したもの) を使って 300 cm/h の流速で平衡化した。実施例 1 で得られた rHSA 抽出液サンプル 250 ml を、300 cm/h の流速でカラムに注入した。サンプルの導電率が 6.3 mS/cm であり、pH が 4.56 であった。サンプルを添加した後、溶出用緩衝液 (酢酸ナトリウム 2 g/L、酢酸、pH 5.0、塩化ナトリウム 14.61 g/L) を使って 300 cm/h の流速でサンプルを溶出した。溶出液を集めて SDS-PAGE で観察し、rHSA を含む画分を得た。電気泳動図は、図 1B に示した。

20

【0067】

(3) Cpto MMC クロマトグラフィー担体を用いる陽イオン交換クロマトグラフィー

XK16/100 カラムに約 15.1 ml の Cpto MMC 担体を充填し、流出液の pH 値が 4.5 で安定するまで 200 ml の平衡用緩衝液 (無水酢酸ナトリウム 2 g/L、酢酸を加えて pH が 4.5 となるように調整したもの) を使って 300 cm/h の流速で平衡化した。実施例 1 で得られた rHSA 抽出液サンプル 250 ml を、600 cm/h の流速でカラムに注入した。サンプルの導電率が 6.3 mS/cm であり、pH が 4.56 であった。サンプルを添加した後、溶出用緩衝液 (酢酸ナトリウム 2 g/L、酢酸、pH 4.7、塩化ナトリウム 58.44 g/L) を使って 300 cm/h の流速で不純物を除去し、その後、溶出用緩衝液 (リン酸二水素ナトリウム 0.3 g/L、リン酸水素二ナトリウム 3.5 g/L、塩化ナトリウム 58.44 g/L、pH 6.7) でサンプルを溶出して rHSA を含む画分を得た。電気泳動図は、図 1C に示した。

30

【0068】

(4) MacroPrep - CM クロマトグラフィー担体を用いる陽イオン交換クロマトグラフィー

XK16/100 カラムに約 10 ml の MacroPrep - CM 担体を充填し、流出液の pH 値が 4.5 で安定するまで 300 ml の平衡用緩衝液 (無水酢酸ナトリウム 2 g/L、酢酸を加えて pH が 4.5 となるように調整したもの) を使って 200 cm/h の流速で平衡化した。250 ml の実施例 1 で得られた rHSA 抽出液サンプルを、300 cm/h の流速でカラムに注入した。サンプルの導電率が 6.3 mS/cm であり、pH が 4.56 であった。サンプルを添加した後、洗浄用緩衝液 (酢酸ナトリウム 2 g/L、酢酸、pH 4.7、塩化ナトリウム 58.44 g/L) を使って 200 cm/h の流速で不純物を除去し、その後、溶出用緩衝液 (リン酸二水素ナトリウム 0.3 g/L、リン酸水素二ナトリウム 3.5 g/L、塩化ナトリウム 5.84 g/L、pH 6.5) でサ

40

50

ンプルを溶出して r H S A を含む画分を得た。電気泳動図は、図 1 D に示した。

【 0 0 6 9 】

( 5 ) N u v i a S 担体と U N O S p h e r e S 担体の許容注入量の比較

X K 1 6 / 1 0 0 カラムに、それぞれ約 5 m l の N u v i a S と U N O S p h e r e S 担体を充填し、流出液の pH 値が 4 . 5 となるまで 2 0 0 m l の平衡用緩衝液（無水酢酸ナトリウム 2 g / L、酢酸を加えて pH が 4 . 5 となるように調整したもの）を使って 3 0 0 c m / h の流速で平衡化した。実施例 1 で得られた r H S A 抽出液サンプルを、3 0 0 c m / h の流速で N u v i a S カラムと U N O S p h e r e S カラムにそれぞれ添加した。サンプル添加過程における U V 2 8 0 の吸収値を記録し、当該吸収値が水平域を 1 0 % 分超えるまで記録を続けた。サンプルの添加体積をそれぞれ記録し、3 0 0 c m / h の流速における 1 ミリリットル当たりの N u v i a S または U N O S p h e r e S の実際の許容注入量を算出した。

10

【 0 0 7 0 】

なお、流出液の pH 値が 4 . 5 となるまで平衡用緩衝液（無水酢酸ナトリウム 2 g / L、酢酸を加えて pH が 4 . 5 となるように調整したもの）を使って 3 0 0 c m / h の流速で U N O S p h e r e S カラムを平衡化した。実施例 1 で得られた r H S A 抽出液のサンプルを 6 0 0 c m / h の流速で U N O S p h e r e S カラムに添加し、サンプル添加過程における U V 2 8 0 の吸収値を計測し、当該吸収値が水平域を 1 0 % 分超えるまで計測を続けた。サンプルの添加体積を計測し、6 0 0 c m / h の流速においての 1 ミリリットル当たりの U N O S p h e r e S の実際注入量を算出した。許容注入量の比較結果は、図 2 に示した。

20

【 0 0 7 1 】

[ 実施例 3 ] 陰イオン交換クロマトグラフィーによる一次精製

( 1 ) U N O S p h e r e Q 担体を用いる陰イオン交換クロマトグラフィー

B i o l o g i c a l 1 5 / 2 0 0 カラムに約 1 0 m l の U N O S p h e r e Q 担体を充填し、流出液の pH 値が 7 . 5 となるまで 2 0 0 m l の平衡用緩衝液（リン酸二水素ナトリウム 0 . 3 g / L、リン酸水素二ナトリウム 3 . 5 g / L に、水酸化ナトリウムまたは塩酸を加えて pH 7 . 5 に調整したもの）を使って流速 3 0 0 c m / h でカラムを平衡化した。実施例 1 で得られた r H S A の抽出液サンプル 2 5 0 m l を pH 7 . 5 に調整し、且つ当該緩衝液で導電率が 1 0 . 0 m S 以下となるように希釈した後、3 0 0 c m / h の流速で U N O S p h e r e Q カラムに添加した。当該サンプルを洗浄用緩衝液（リン酸二水素ナトリウム 0 . 3 g / L、リン酸水素二ナトリウム 3 . 5 g / L、塩化ナトリウム 1 1 . 6 8 g / L）で洗浄して不純物を除去した後、溶出用緩衝液（リン酸二水素ナトリウム 0 . 3 g / L、リン酸水素二ナトリウム 3 . 5 g / L、塩化ナトリウム 2 3 . 3 6 g / L）で溶出し、r H S A 含有画分を集めた。電気泳動図は、図 3 A に示した。

30

【 0 0 7 2 】

( 2 ) Q S e p h a r o s e F F 担体を用いる陰イオン交換クロマトグラフィー

B i o l o g i c a l 1 5 / 2 0 0 カラムに約 1 0 m l の Q S e p h a r o s e F F 担体を充填し、流出液の pH 値が 7 . 0 となるまで 2 0 0 m l の平衡用緩衝液（リン酸二水素ナトリウム 0 . 3 g / L、リン酸水素二ナトリウム 3 . 5 g / L に、水酸化ナトリウムまたは塩酸を加えて pH 7 . 0 に調整したもの）を使って流速 3 0 0 c m / h でカラムを平衡化した。実施例 1 で得られた r H S A の抽出液サンプル 2 5 0 m l を pH 6 . 8 に調整し、且つ当該緩衝液で導電率が 1 0 . 0 m S 以下となるように希釈した後、3 0 0 c m / h の流速で Q S e p h a r o s e F F カラムに添加した。当該サンプルを溶出用緩衝液（リン酸二水素ナトリウム 0 . 3 g / L、リン酸水素二ナトリウム 3 . 5 g / L、塩化ナトリウム 5 . 8 4 g / L）で溶出し、r H S A 含有画分を集めた。電気泳動図は、図 3 B に示した。

40

【 0 0 7 3 】

( 3 ) Q S e p h a r o s e F F の実際注入量の測定

50

10 / 100 カラムに約 5 ml の Q Sepharose FF 担体を充填し、流出液の pH 値が 7.0 に安定するまで 200 ml の平衡用緩衝液（リン酸二水素ナトリウム 0.3 g / L、リン酸水素二ナトリウム 3.5 g / L に、水酸化ナトリウムまたは塩酸を加えて pH が 7.0 となるように調整したもの）を使って流速 300 cm / h でカラムを平衡化した。実施例 1 で得られた r H S A の抽出液サンプル 250 ml を pH 7.5 に調整し、当該緩衝液で導電率が 10.0 m S 以下に、かつ総体積が 1000 ml になるまで希釈した。得られたサンプルを 300 cm / h の流速で Q Sepharose FF カラムに添加した。サンプル添加過程における UV 280 の吸収値を計測し、当該吸収値が水平域を 10 % 分超えるまで計測を続けた。サンプルの添加体積を記録し、300 cm / h の流速における Q Sepharose FF 1 ミリリットル当たりの実際の許容注入量を算出した。その後、樹脂を再生した。

10

## 【0074】

実施例 1 で得られた r H S A の抽出液のサンプルを pH 7.0 に調整し、且つ当該緩衝液で導電率が 10.0 m S 以下となるように希釈した後、GE 30KD メンブレンカセットで 400 ml に濃縮した。硫酸フェノール法を用いて透析前後の多糖類含有量を測定した後、当該サンプルを平衡化済みの Q Sepharose FF カラムに添加した。サンプル添加過程における UV 280 の吸収値を計測し、当該吸収値が水平域を 10 % 分超えるまで記録を続けた。サンプルの添加体積を計測し、300 cm / h の流速における 1 ミリリットル当たりの Q Sepharose FF の実際の許容注入量を算出した。許容注入量の変化と多糖類含有量の変化は、図 4 に示した。

20

## 【0075】

[実施例 4] 陰イオン交換クロマトグラフィーによる二次精製

実施例 2 で得られた r H S A 含有画分を均一に 2 等分し、以下の実験に用いた。

## 【0076】

(1) Q Sepharose FF 担体を用いる陰イオン交換クロマトグラフィー

15 / 200 カラムに約 7 ml の Q Sepharose FF 担体を充填し、流出液の pH 値が 7.0 となるまで 200 ml の平衡用緩衝液（リン酸二水素ナトリウム 0.3 g / L、リン酸水素二ナトリウム 3.5 g / L に、水酸化ナトリウムまたは塩酸を加えて pH が 7.0 となるように調整したもの）を使って流速 300 cm / h でカラムを平衡化した。上記画分的一方を pH が 7.0 になるように調整し、且つ当該緩衝液で導電率が 10.0 m S 以下となるように希釈した。当該サンプルを 300 cm / h の流速で Q Sepharose FF カラムに添加した後、溶出用緩衝液（リン酸二水素ナトリウム 0.3 g / L、リン酸水素二ナトリウム 3.5 g / L、塩化ナトリウム 11.68 g / L）で溶出し、r H S A 含有画分を集めた。電気泳動図は、図 5 A に示した。

30

## 【0077】

(2) DEAE Sepharose FF 担体を用いる陰イオン交換クロマトグラフィー

Biological 15 / 200 カラムに約 8 ml の DEAE Sepharose FF 担体を充填し、流出液の pH 値が 7.0 となるまで 200 ml の平衡用緩衝液（リン酸二水素ナトリウム 0.3 g / L、リン酸水素二ナトリウム 3.5 g / L に、水酸化ナトリウムまたは塩酸を加えて pH が 7.0 となるように調整したもの）を使って流速 300 cm / h でカラムを平衡化した。上記画分の方を pH が 7.5 になるように調整し、且つ当該緩衝液で導電率が 10.0 m S 以下となるように希釈した。当該サンプルを 300 cm / h の流速で DEAE Sepharose FF カラムに添加した後、溶出用緩衝液（リン酸二水素ナトリウム 0.3 g / L、リン酸水素二ナトリウム 3.5 g / L、塩化ナトリウム 11.68 g / L）で溶出し、r H S A 含有画分を集めた。電気泳動図は、図 5 B に示した。

40

## 【0078】

[実施例 5] 疎水性クロマトグラフィーによる三次（仕上げ）精製

(1) Phenyl Sepharose HP 担体を用いる疎水性クロマトグラフィー

50

XK16/100カラムに約8mlのPhenyl Sepharose HP充填し、200mlの平衡用緩衝液(無水酢酸ナトリウム2.32g/L、リン酸二水素ナトリウム2.81g/L、硫酸アンモニウム66g/L)を使って流速100cm/hでカラムを平衡化した。実施例4(Q Sepharose FF)で得られたrHSA含有画分20mlに硫酸アンモニウム(0.4M)を加え、導電率が80.0mSとなるようにした。その後、当該サンプルを100cm/hの流速でカラムに添加した。浸透液を集めてrHSA含有画分を得た。電気泳動図は、図6Aに示した。

【0079】

(2) Phenyl Sepharose FF担体を用いる疎水性クロマトグラフィー  
XK16/100カラムに約10mlのPhenyl Sepharose FFを充填し、200mlの平衡用緩衝液(無水酢酸ナトリウム2.32g/L、リン酸二水素ナトリウム2.81g/L、硫酸アンモニウム13.2g/L)を使って流速150cm/hでカラムを平衡化した。実施例4(Q Sepharose FF)で得られたrHSA含有画分20mlに硫酸アンモニウム(0.1M)を加え、導電率が80.0mSとなるようにした。その後、当該サンプルを150cm/hの流速でカラムに添加した。浸透液を集めてrHSA含有画分を得た。電気泳動図は、図6Bに示した。

10

【0080】

(3) MacroPrep-t-butyl担体を用いる疎水性クロマトグラフィー  
15/200カラムに約6mlのMacroPrep-t-butyl担体を充填し、200mlの平衡用緩衝液(無水酢酸ナトリウム2.32g/L、リン酸二水素ナトリウム2.81g/L、硫酸アンモニウム13.2g/L)を使って流速150cm/hでカラムを平衡化した。実施例3(Q Sepharose FF)で得られたrHSA含有画分20mlに硫酸アンモニウム(それぞれ1.0M、0.8M、0.6M)を加え、導電率がそれぞれ130.0mS、90.0mS、70.0mSとなるようにした。その後、当該サンプルを150cm/hの流速でカラムに添加した。浸透液を集めてrHSA含有画分を得た。電気泳動図は、図6Cに示した。

20

【0081】

[実施例6] rHSA含有抽出液からのrHSAの分離及び精製

ステップ(1): UNO Sphere Sを用いる陽イオン交換クロマトグラフィーによる一次精製

30

XK16/20カラムに約12mlのUNO Sphere S担体を充填し、500mlの平衡用緩衝液(無水酢酸ナトリウム2g/L、酢酸、pH4.5)を使って流速300cm/hでカラムを平衡化した。実施例1で得られたrHSA含有抽出液のサンプル300mlを600cm/hの流速でカラムに添加した。サンプルの導電率が6.5mS/cmであり、pHが4.5であった。サンプルを添加した後、溶出用緩衝液(酢酸ナトリウム2g/L、酢酸、pH5.0、塩化ナトリウム14.61g/L)を使って200cm/hの流速でサンプルを溶出した。溶出液を集めてSDS-PAGEで観察を行い、rHSA含有画分を得た。電気泳動図は、図7Aに示した。

【0082】

ステップ(2): Q Sepharose FFを用いる陰イオン交換クロマトグラフィーによる二次精製

40

XK16/100カラムに約13mlのQ Sepharose FF担体を充填し、400mlの平衡用緩衝液(無水酢酸ナトリウム6.51g/L、リン酸二水素ナトリウム0.72g/L、pH6.8)を使って流速300cm/hでカラムを平衡化した。上記ステップで得られたrHSA含有画分を約200mlに希釈し、導電率が10.0mS未満となるようにした後、300cm/hの流速でカラムに添加した。サンプルの導電率が8.3mS/cmであり、pHが6.8であった。サンプルを添加した後、溶出用緩衝液(リン酸水素二ナトリウム6.51g/L、リン酸二水素ナトリウム0.72g/L、塩化ナトリウム11.69g/L)を使って100cm/hの流速でサンプルを溶出した。溶出液を集めてSDS-PAGEで観察を行い、rHSA含有画分を集めた。電気泳

50



動図は、図7Bに示した。

【0083】

ステップ(3): Phenyl Sepharose HPを用いる疎水性クロマトグラフィーによる三次(仕上げ)精製

XK16/100カラムに約12mlのPhenyl Sepharose HPを充填し、200mlの平衡用緩衝液(無水酢酸ナトリウム2.32g/L、リン酸二水素ナトリウム2.81g/L、硫酸アンモニウム66g/L)を使って流速100cm/hでカラムを平衡化した。上記ステップで得られた20mlのrHSA含有画分に硫酸アンモニウムを加え、導電率が90.0mSとなるようにした。その後、サンプルを100cm/hの流速でカラムに添加した。浸透液を集めてrHSA含有画分を得た。電気泳動図は、図7Cに示した。精製されたrHSA産物のHPLCクロマトグラムは、図8に示した。HPLC解析により、rHSAが(モノマーに、二量体と多量体を合わせて)99%を超える純度を有することが確認できる。

10

【0084】

[実施例7] rHSA含有抽出液からのrHSAの精製

本実施例において、4ステップを有する精製法にてrHSAを分離、精製するため、実施例1で得られたrHSAの粗抽出液を、それぞれUNO Sphere S、Q Sepharose FF、Macro-prepセラミックヒドロキシアパタイトI型及びPhenyl Sepharose HPをクロマトグラフィー担体とする陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー及び疎水性クロマトグラフィーで順に処理した。陽イオン交換クロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーは、実施例6と同様に行われる。

20

【0085】

CHTカラムに約15mlのMacro-prepセラミックヒドロキシアパタイトI型の担体を充填し、200mlの平衡用緩衝液(20mM リン酸ナトリウム+50mM NaCl、pH7.5)を使って流速100cm/hでカラムを平衡化した。陰イオン交換クロマトグラフィーから得るrHSA含有画分を、そのまま流速100cm/hでカラムに添加した。サンプルの導電率が26mS/cmであり、pHが7.4~7.6であった。サンプルを添加した後、溶出用緩衝液(500mMリン酸ナトリウム、pH7.5)でサンプルを溶出し、浸透液を集めてrHSA含有画分を得た。rHSAの精製容量が30mg/g CHT Iであったと推定され、rHSAの回収率が80%以上に達した。最後に、CHTセラミックヒドロキシアパタイトカラムを、カラム容積の3~5倍量の緩衝液(500mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0)で再生した。必要に応じてカラムを1~2N NaOHで殺菌し、0.1N NaOHに保存した。電気泳動図は、図9に示した。

30

【0086】

その後、上記で得られたrHSA含有画分を実施例6と同様の方法を用いて疎水性クロマトグラフィーで処理した。浸透液を集めてrHSA含有画分を得た。精製されたrHSA産物のHPLCクロマトグラムは、図10に示した。HPLC解析により、rHSAが約99%(モノマーのみ)の純度を有することが確認できる。

40

【0087】

[実施例8] rHSA含有抽出液からのrHSAの精製

本実施例において、セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーとしてMacro-prepセラミックヒドロキシアパタイトII型のクロマトグラフィー担体を用いる以外、実施例7と同様の方法で精製を行った。

【0088】

CHTカラムに約15mlのMacro-prepセラミックヒドロキシアパタイトII型のクロマトグラフィー担体を充填し、200mlの平衡用緩衝液(20mM リン酸ナトリウム+50mM NaCl、pH7.0)を使って流速100cm/hでカラムを平行化した。その後、陰イオン交換クロマトグラフィーから得るrHSA含有画分を、そ

50

のまま流速 100 cm/h でカラムに添加した。サンプルの導電率が 26 mS/cm であり、pH が 7.4 ~ 7.6 であった。サンプルを添加した後、溶出用緩衝液 (500 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0) でサンプルを溶出し、浸透液を集めて rHSA 含有画分を得た。rHSA の精製量が 25 mg/g CHT II であったと推定され、rHSA の回収率は 85% 以上に達した。最後に、CHT カラムをカラム容積の 3 ~ 5 倍量の緩衝液 (500 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0) で再生した。必要に応じてカラムを 1 ~ 2 N NaOH で殺菌し、0.1 N NaOH に保存した。

【0089】

その後、実施例 7 と同様の方法に従い、上記ステップで得られた rHSA 含有画分を疎水性クロマトグラフィーで処理した。浸透液を集めて rHSA 含有画分を得た。電気泳動図は、図 11 に示した。精製された rHSA 産物の HPLC クロマトグラムは、図 12 に示した。HPLC 解析により、rHSA が約 99% (モノマーのみ) の純度を有することが確認できる。

10

【0090】

実施例 6 ~ 8 の結果から示されるように、セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーは、rHSA 最終産物におけるモノマーの含有量を有効に高めることができ、その純度が約 99% に達した。なお、セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーは、Phenyl Sepharose HP を用いる精製ステップで使われる方式と同様の通過方式を用いて rHSA を更に精製し、且つ同じ溶出液を、塩濃度と pH 値を調整しなくとも適用できるので、その操作が簡便である。セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを用いることで、上記精製された rHSA は、臨床応用の要求水準を満たすことができる。

20

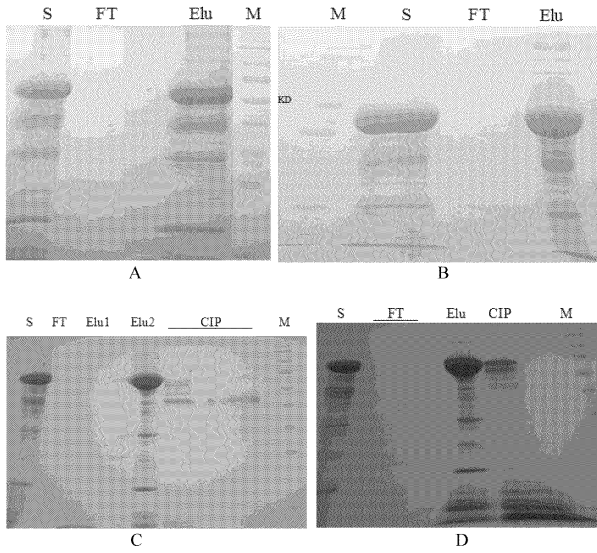
【符号の説明】

【0091】

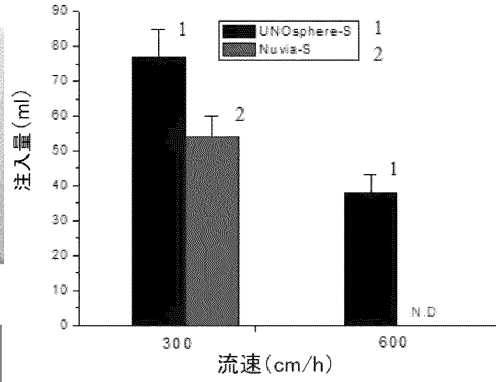
S 添加サンプル  
 FT 浸透液 (通過画分、flow through、transmission fluid)  
 Elu rHSA を含む溶出液  
 Elu1 非標的蛋白質の溶出液  
 Elu2 rHSA の溶出液  
 CIP 定置洗浄画分

30

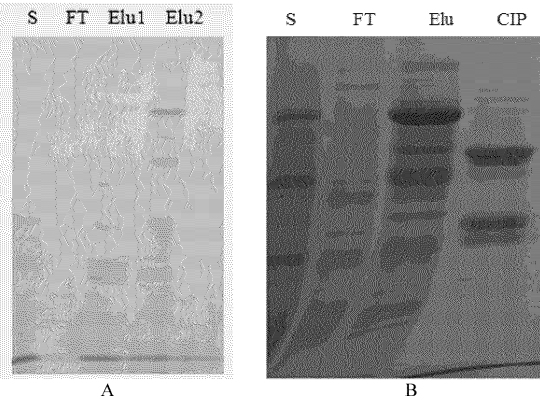
【 図 1 】



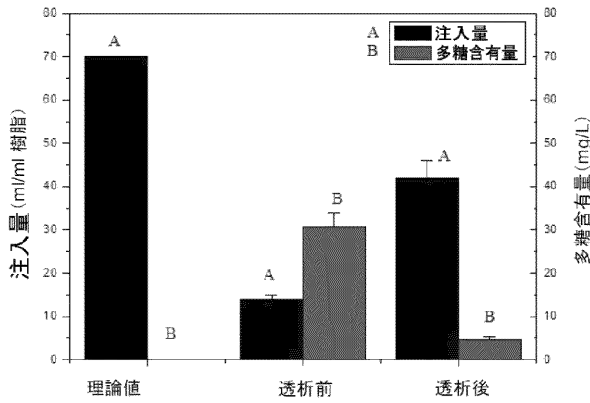
【 図 2 】



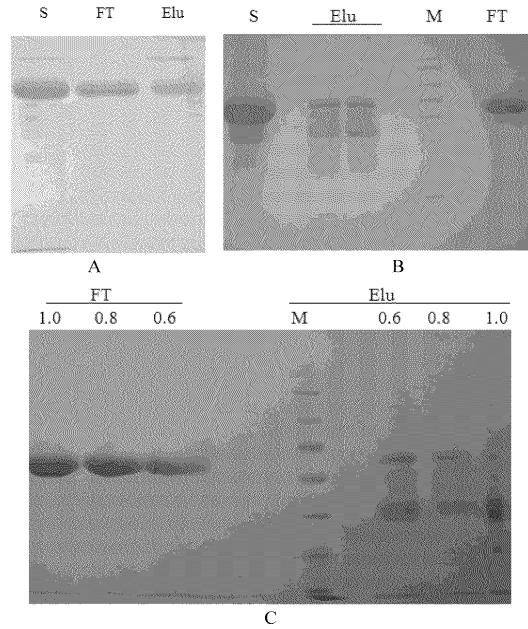
【 図 3 】



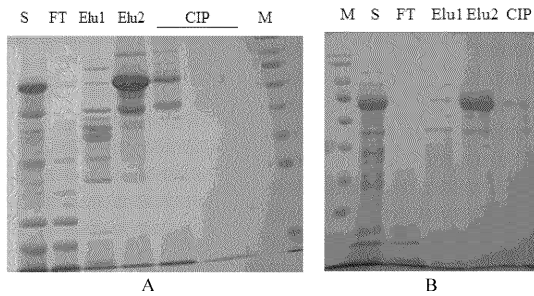
【 図 4 】



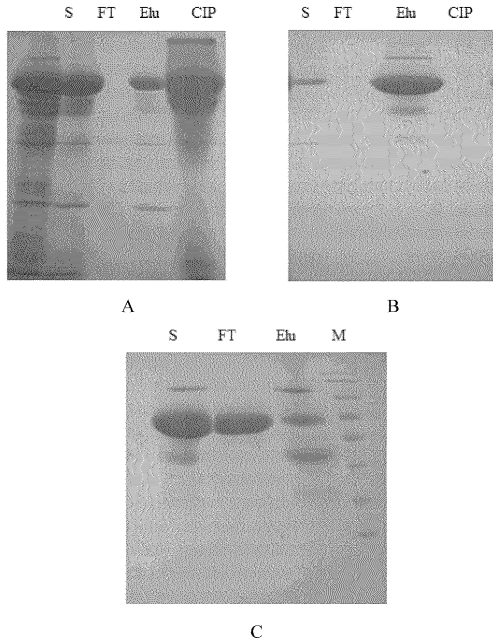
【 図 6 】



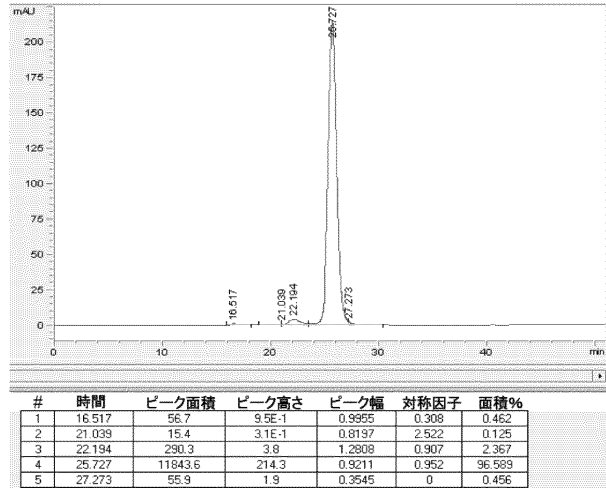
【 図 5 】



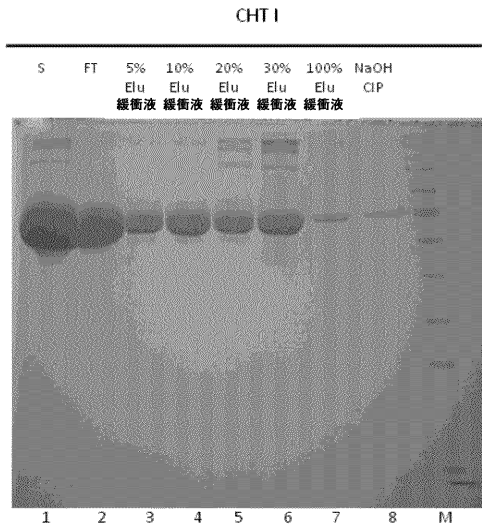
【図7】



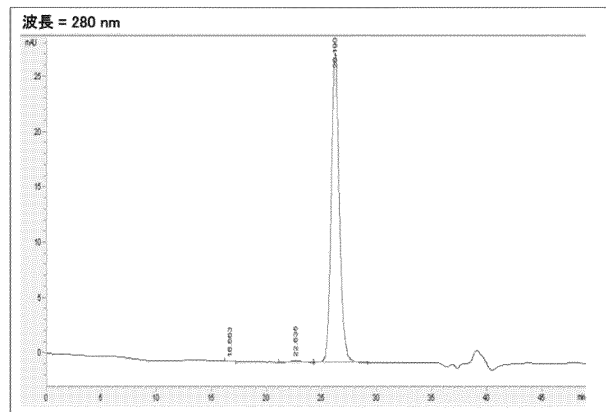
【図8】



【図9】



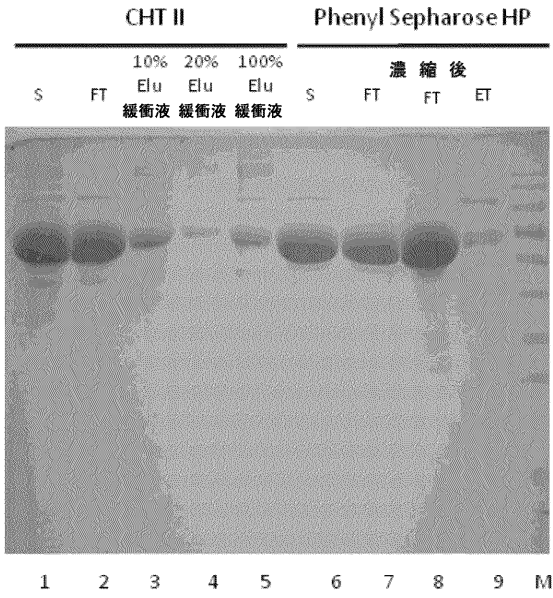
【図10】



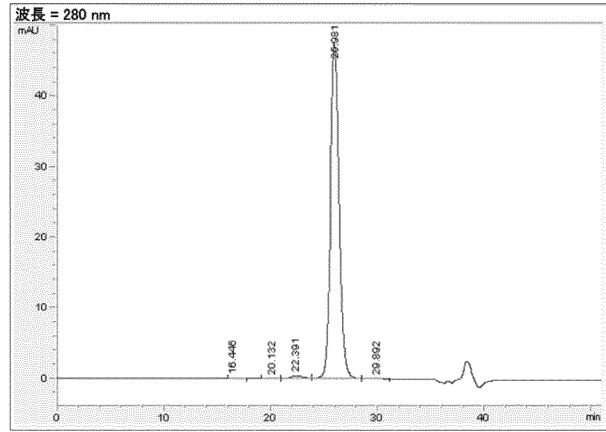
#	時間	ピーク面積	ピーク高さ	ピーク幅	対称因子	面積%
1	16.663	1	2.9E-2	0.5724	0.966	0.069
2	22.635	13.6	1.8E-1	1.2672	0.836	0.934
3	26.19	1445.4	27.9	0.8619	0.853	99.998

	多量体(%)	二量体(%)	モノマー(%)
含有量	0.069	0.934	99.998

【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



#	時間	ピーク面積	ピーク高さ	ピーク幅	対称因子	面積%
1	18.448	4	8.1E-2	0.8184	0.232	0.145
2	20.132	2.4	4.9E-2	0.923	0.891	0.087
3	22.391	34.9	4.2E-1	1.3828	0.787	1.269
4	25.981	2704.6	47.6	0.9461	0.905	98.312
5	29.892	5.1	5.7E-2	1.5028	1.82	0.187

	多量体(%)	二量体(%)	モノマー(%)
含有量	0.145	1.269	98.312

## フロントページの続き

- (72)発明者 ホー ヤーン  
中華人民共和国 430079 フーベイ ウーハン イーストレイク ハイ-テック ディベロ  
ップメント ゾーン ガオシン アベニュー ナンバー666
- (72)発明者 リー グワンフェイ  
中華人民共和国 430079 フーベイ ウーハン イーストレイク ハイ-テック ディベロ  
ップメント ゾーン ガオシン アベニュー ナンバー666
- (72)発明者 リウ ジーンルウ  
中華人民共和国 430079 フーベイ ウーハン イーストレイク ハイ-テック ディベロ  
ップメント ゾーン ガオシン アベニュー ナンバー666

審査官 松岡 徹

- (56)参考文献 国際公開第2010/096588(WO, A1)  
特開平05-317079(JP, A)  
特開昭62-294621(JP, A)  
Pharmaceutical Biotechnology, 2003年, Vol.10, No.1, p.25-28  
Journal of Chromatography, 1993年10月22日, Vol.620, No.1, p.149-152
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C07K  
C12N  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)