

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-536832

(P2010-536832A)

(43) 公表日 平成22年12月2日(2010.12.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7K 1/16 (2006.01)</b>	CO7K 1/16	4H045
<b>GO1N 30/88 (2006.01)</b>	GO1N 30/88 J	
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 D	
<b>GO1N 30/26 (2006.01)</b>	GO1N 30/26 A	
	GO1N 30/88 2O1X	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)		

(21) 出願番号 特願2010-521447 (P2010-521447)  
 (86) (22) 出願日 平成20年8月25日 (2008. 8. 25)  
 (85) 翻訳文提出日 平成22年3月15日 (2010. 3. 15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2008/061068  
 (87) 国際公開番号 W02009/024620  
 (87) 国際公開日 平成21年2月26日 (2009. 2. 26)  
 (31) 優先権主張番号 07114856.3  
 (32) 優先日 平成19年8月23日 (2007. 8. 23)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 500376704  
 オクタファルマ・アーゲー  
 スイス国、ラーヘン、CH-8853、ザ  
 イデンシュトラーセ 2  
 (74) 代理人 100079049  
 弁理士 中島 淳  
 (74) 代理人 100084995  
 弁理士 加藤 和詳  
 (74) 代理人 100085279  
 弁理士 西元 勝一  
 (72) 発明者 ギルジャム、グスタヴ  
 スウェーデン エス-142 42 スコ  
 ガス グリニングスヴァーゲン 12

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プリオンタンパク質 (PrP<sup>sc</sup>) を含まない目的タンパク質の単離および精製の方法

(57) 【要約】

プリオン (PrP<sup>sc</sup>) を除去または削減するクロマトグラフィーによる、目的タンパク質の単離および精製の方法であって、PrP<sup>sc</sup> が混入している可能性のある、目的タンパク質を含む試料と、マルチモーダルクロマトグラフィー材料とを接触させる工程と、前記目的タンパク質が前記マルチモーダルクロマトグラフィー材料に結合する一方で、前記PrP<sup>sc</sup> が前記マルチモーダルクロマトグラフィー材料に結合しないよう、バッファー条件を設定する工程と、続いて、前記目的タンパク質を溶出させる工程と、前記目的タンパク質を回収する工程と、を含む方法。プリオンタンパク質 (PrP<sup>sc</sup>) を含まない目的タンパク質を単離および精製する方法。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

プリオン (PrP<sup>Sc</sup>) を除去または削減するクロマトグラフィーによる、目的タンパク質の単離および精製の方法であって、

PrP<sup>Sc</sup> が混入している可能性のある、目的タンパク質を含む試料と、マルチモーダルクロマトグラフィー材料とを接触させる工程と、

前記目的タンパク質が前記マルチモーダルクロマトグラフィー材料に結合する一方で、前記 PrP<sup>Sc</sup> が前記マルチモーダルクロマトグラフィー材料に結合しないよう、バッファ条件を設定する工程と、

続いて、前記目的タンパク質を溶出させる工程と、  
を含む方法。

10

## 【請求項 2】

プリオンを溶出させた後に、

イオン強度を増加または減少させることにより溶出バッファのイオン強度を変える工程、

溶出バッファ (特に、水性溶液) に、モノヒドロキシアルコールまたは、ジヒドロキシアルコール (例えば、メタノール、エタノール、プロパノールのような低級脂肪族アルコール) のようなアルコールを加える工程、および / または、

pH を増加または減少させることにより溶出バッファの pH 値を変える工程  
によって、前記目的タンパク質を溶出させる、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 3】

はじめに樹脂に加えた量から計算した、前記目的タンパク質を含むタンパク質画分のプリオンタンパク質除去値が、1 より大きく 4 l g ( 1 0 ) 以下である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

所期のタンパク質画分の前記プリオンタンパク質分析値が、プリオンウェスタンブロットアッセイの検出限界を下回っている、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記クロマトグラフィー条件が、以下の工程のうち少なくとも 2 つを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

i ) 溶媒および / または非イオン性界面活性剤を含有する添加平衡バッファを使用する工程、

i i ) 溶媒および / または非イオン性界面活性剤を含有しない洗浄バッファを使用する工程、

i i i ) アルコールおよび / またはアミノ酸を含有する洗浄バッファを使用する工程、

i v ) 高塩濃度の洗浄バッファを使用する工程、

v ) 低塩濃度の洗浄バッファを使用する工程、

v i ) アルコールと高塩濃度との組み合わせを含むバッファを使用する工程。

## 【請求項 6】

40

前記クロマトグラフィー条件が、以下の工程のうち少なくとも 2 つを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

i ) 溶媒および / または非イオン性界面活性剤を含有する添加平衡バッファを使用する工程、

i i ) 溶媒および / または非イオン性界面活性剤を含まないバッファである第一の洗浄バッファを使用する工程、

i i i ) アルコールおよびアミノ酸を含む第二の洗浄バッファを使用する工程、

i v ) 高塩濃度の第三の洗浄バッファを使用する工程、

v ) 低塩濃度の第四の洗浄バッファを使用する工程、

v i ) アルコールと高塩濃度との組み合わせを含む溶出バッファを使用する工程。

50

## 【請求項 7】

i) 添加平衡バッファーが、リン酸トリ - n - ブチルおよび / またはトリトン X - 100 を約 0.1 ~ 約 10% (w/w) の濃度範囲で含み、

ii) 前記第二の洗浄バッファーが、エチレングリコールおよび / またはリシン / アルギニンを含み、ここでエチレングリコールは、約 5 ~ 約 30% (w/w) の範囲であり、リシン / アルギニンは、0.2 ~ 約 1.5 M の範囲であり、

iii) 前記第三の洗浄バッファーが、塩化ナトリウムを、約 0.5 ~ 約 4 M、特に約 0.5 ~ 約 1.5 M の濃度範囲で含み、

iv) 前記第四の洗浄バッファーが、塩化ナトリウムを、約 0.01 ~ 約 0.2 M、特に 0.01 ~ 約 0.1 M の濃度範囲で含み、

v) 前記溶出バッファーが、エチレングリコールおよび / または塩化ナトリウムを含み、ここでエチレングリコールは約 25 ~ 約 75% (w/w)、特に約 25 ~ 約 50% の濃度の範囲で含み、NaCl は約 0.5 ~ 約 4 M の濃度で含む、

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記マルチモーダルクロマトグラフィー材料が、

i) 正に帯電した N - ベンジル - N - メチルエタノールアミンリガンド、

ii) 負に帯電した 2 - (ベンゾイルアミノ)ブタン酸リガンド、

iii) フェニルプロピルリガンド、

iv) N - ヘキシルリガンド、

v) 4 - メルカプト - エチル - ピリジンリガンド、

vi) 3 - [ { 3 - メチル - 5 - ( (テトラヒドロフラン - 2 - イルメチル) アミノ ) - フェニル } アミノ ] 安息香酸リガンド、を含む、

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

感染性である可能性を有するタンパク質を含有する供給源から単離されたタンパク質の、プリオンタンパク質が削減された画分であって、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法により得ることができる薬剤的に適用可能なタンパク質を含有する該画分。

## 【請求項 10】

血漿タンパク質、ペプチドホルモン、増殖因子、サイトカインおよびポリクローナル免疫グロブリンタンパク質、フィブリノゲン、プロトロンビン、トロンビン、プロトロンビン複合体、FX、FXa、FIX、FIXa、FVII、FVIIa、FXI、FXIa、FXII、FXIIa、FXIII、FXIIIa、フォン・ヴィレブランド因子などのヒトおよび動物血液凝固因子から選択される血漿タンパク質、アルブミン、トランスフェリン、セルロプラスミン、ハプトグロビン、ヘモグロビンおよびヘモペキシンなどの輸送タンパク質、 $\alpha$ -アンチトロンビン、 $\beta$ -アンチトロンビン、 $\alpha$ -2-マクログロブリン、C1 阻害因子、組織因子経路阻害因子 (TFPI)、ヘパリン補因子 II、プロテイン C 阻害因子 (PAI-3)、プロテイン C およびプロテイン S、 $\alpha$ -1 エステラーゼ阻害因子タンパク質、 $\alpha$ -1 抗トリプシンなどのプロテアーゼ阻害剤、潜在性抗トロンビンなどの抗血管新生タンパク質、 $\alpha$ -1-酸性糖タンパク質、アンチキモトリプシン、インタートリプシンインヒビター、 $\alpha$ -2-HS 糖タンパク質、C-反応性タンパク質などの高グリコシル化タンパク質、ならびに、ヒスチジン高含有糖タンパク質、マンナン結合レクチン、C4-結合タンパク質、フィブロネクチン、GCグロブリン、プラスミノゲン、エリスロポエチンのような血液因子、インターフェロン、腫瘍因子、tPA、CSF などその他のタンパク質を含む、請求項 9 に記載の画分。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、疾病に関連するタンパク質型 PrP<sup>Sc</sup> を含まない目的タンパク質を単離および精製する方法に関する。

10

20

30

40

50

## 【背景技術】

## 【0002】

近年、血漿に由来する薬剤の精製法においてPrP<sup>Sc</sup>の不活性化や除去に焦点を当てることは、より多くの注目を集めてきている。その理由が狂牛病などの発生であることは明らかである。生物医薬品生産用の組換え細胞株の使用でさえ、プリオンタンパク質の発生に関して、完全に安全とはみなされていない (Vorberg et al., The Journal of infectious diseases 2004; 189:431-9. Susceptibility of common fibroblast cell lines to transmissible spongiform encephalopathy agents)。生物医薬品として意図されたタンパク質の精製過程を決定する作業においては、プリオンタンパク質除去工程の候補として様々な精製工程が評価され得る (Foster PR, et al; Distribution of a bovine spongiform encephalopathy-derived agent over ion-exchange chromatography used in the preparation of concentrates of fibrinogen and factor VIII; Vox Sang. 2004 Feb; 86(2):92-9; Trejo SR, et al., Evaluation of virus and prion reduction in a new intravenous immunoglobulin manufacturing process. Vox Sang. 2003 Apr; 84(3): 176-87; Zeiler B, et al, Concentration and removal of prion proteins from biological solutions; Biotechnol Appl Biochem. 2003 Apr, 37(Pt 2):173-82; Foster et al. Studies on the removal of abnormal prion protein by processes used in the manufacture of human blood plasma products, Vox Sang. 2000, 78:86-95; Burnouf et al., Transfus Clin Biol. 2006 Nov; 13(5):320-8. Epub 2007 Jan 23, Current strategies to prevent transmission of prions by human plasma derivatives.)。 10

## 【0003】

クロマトグラフィー樹脂が、精製過程におけるPrP<sup>Sc</sup>の除去に寄与し得ることが知られている (参照文献2~4、6~7)。しかし、様々な化学構造および置換を有するクロマトグラフィー樹脂を用いる過程や様々なバッファーの系において一貫してPrP<sup>Sc</sup>浄化因子 (clearance factors) が見つかっていることは、感染性因子のクロマトグラフィー担体表面上への非特異的結合が発生していることを裏付けるものである、とされている。PrP<sup>Sc</sup>の除去は、再現可能であるようであるが、その除去機構が完全にはわかっていないため、例えば、いかにして (a) TSE因子に結合するクロマトグラフィー担体の最大容量を決定するか、 (b) 再生利用ゲルの効率的な殺菌消毒手順を確保するか、 (c) 生産サイクルを通じて、一貫したPrP<sup>Sc</sup>除去可能量を保証するか、などの課題がある (Thyer J, Prion-removal capacity of chromatographic and ethanol precipitation steps used in the production of albumin and immunoglobulins; Vox Sang. 2006 Nov; 91(4):292-300)。 20

## 【0004】

国際公開第98/0041号は、イオン交換クロマトグラフィーによる、例えばヘモグロビンといった他のタンパク質からプリオンを除去することを開示している。このイオン交換クロマトグラフィー媒体の調製は、第四級アンモニウム基の (均一な) 表面を得るための、 (g-グリシドキシプロピル) トリメトキシシランおよびジメタノールアミンで誘導体化されたシリカゲルを顕示する。 30

## 【0005】

国際公開第03/105911号は、溶出に塩勾配を利用したイオン交換クロマトグラフィーを用いた従来の手段によるヒト血漿の清浄方法を開示している。 40

## 【0006】

国際公開第94/08686号は、単一分離媒体を用いる液体クロマトグラフィーカラムにおいて、連続方式で、相異なるクロマトグラフィー分離方法 (different notes of chromatography) を実行するための方法を開示している。 40

## 【0007】

D. B. Brimacombe et al. in Biochem. J. (1999) 342,605-613は、連続した2つのクロマトグラフィー工程によるrecPrPの精製を開示している。第1の工程は、S-セファロース上で行われる陽イオン交換クロマトグラフィー (150~650 NaCl勾 50

配)である。溜められた所期の溶出物は、第2のクロマトグラフィー工程(垂鉛荷電キレートセファロース; 0~100mMのイミダゾール勾配)に供される。

【0008】

P. R. Foster et al. Vox Sanguinis 2000; 78:86-95は、血漿製品の製造における、多くの工程によるプリオンタンパク質の除去を開示している。この方法は、異なるクロマトグラフィーゲルを用いて、異なるカラムで行われる、4回のイオン交換クロマトグラフィー(工程2、11、13および15)ならびに1回のアフィニティークロマトグラフィー(セファロース-FFにヘパリンを固定; 工程12)からなる。

【0009】

T. Burnouf et al.は、様々な血漿由来凝固因子のクロマトグラフィー工程におけるTSE因子除去の度合を、Tranfusion Clinique et Biologique 13 (2006) 320-328に発表している。その論文は、FVII(DEAE-トヨパール 650M)、vWF(DEAE-トヨパール 650M)、フィブリノゲン(DEAE-トヨパール 650M)、プロトロンビン複合体/FIX(DEAE-セルロース)、PCC(DEAE-セファロース)、FIX(DEAE-セファロースまたはヘパリン-セファロース)およびトロンビン(S-セファロース)の生産に用いられる様々な種類の(大抵は)イオン交換クロマトグラフィー工程に、焦点を当てている。これらの系すべてを、個別に調べている。

10

【0010】

J. Thyer et al.は、Vox Sanguinis (2006)91, 292-300の中で、DEAE-セファロース、CM-セファロースおよびMacro-Prep High Q クロマトグラフィーカラムを通したPrPの低減を報告している(「材料と方法」; 図1、294頁; 表1)。別の実験では、DEAE-セファロース-カラム1種、およびCM-セファロース-カラムまたはMacro-Prep-カラム1種を連続して使用したことを開示している。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の目的のひとつは、例えば、生物に由来する供給源など、PrP<sup>Sc</sup>が混入している可能性のある供給源の分画過程の際、PrP<sup>Sc</sup>を除去するクロマトグラフィーの方法を提供することである。その方法は、従来技術の欠点を回避するはずである。他の目的は、精製過程を、信頼性があるものとし且つクロマトグラフィー担体の再生を可能とすると考えられる方法を設計することである。

30

【0012】

さらに本発明の他の目的は、プリオンが削減されたタンパク質の画分を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明によれば、プリオン(PrP<sup>Sc</sup>)を除去または削減するクロマトグラフィーによる、目的タンパク質の単離および精製の方法であって、

PrP<sup>Sc</sup>が混入している可能性のある、目的タンパク質を含む試料と、マルチモーダルクロマトグラフィー材料(multimodal chromatographic material)とを接触させる工程と、

40

前記目的タンパク質が前記マルチモーダルクロマトグラフィー材料に結合する一方で、前記PrP<sup>Sc</sup>が前記マルチモーダルクロマトグラフィー材料に結合しないよう、バッファ条件を設定する工程と、

続いて、前記目的タンパク質を溶出させる工程と、

前記目的タンパク質を回収する工程と

を含む方法が提供される。

【0014】

前記クロマトグラフィー樹脂は、より弱くPrP<sup>Sc</sup>と結合し、目的タンパク質を溶出さ

50

せる前にクロマトグラフィー樹脂から PrP<sup>Sc</sup>を除去することができる。そのため、本発明の方法は大幅な改善をもたらす。

【0015】

本発明において、「単離および精製」は、特に、所望するタンパク質様の物質を少なくとも濃縮するために用いられる方法、または不要な物質を削減する方法を意味する。本発明においては、できるだけ純粋な所望の生産物を生じることが有利であろう。

【0016】

「目的タンパク質」という語は、PrP<sup>Sc</sup>を含まないように単離および/または精製されるべき、所期のタンパク質を意味する。目的タンパク質は、もし望まれるならば、タンパク質の静止混合物(still mixture)、例えば、集合して作用すると生物学的な効果をもつ種々の因子の混合物でもあり得る。

10

【0017】

「プリオン」は、感染性のタンパク質性物質である。

【0018】

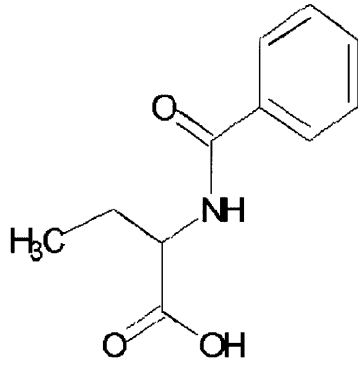
驚くべきことに、単一のクロマトグラフィー樹脂が、クロマトグラフィー条件下において、PrP<sup>Sc</sup>のゲルへの結合を最小限におさえることができ、それに結合する産物に対する優れた減少値(reduction values)を実現することが見出された。このような樹脂は、市販されており、例えば、国際公開第2004/024318号に記述されている。その開示は、参照により本明細書に取り込まれる。PrP<sup>Sc</sup>に対してこの効果を有することを示している樹脂は、マルチモーダル(multimodal)(または混合モード、または疎水性荷電誘導(hydrophobic charged induction))樹脂と呼ばれる。例えばイオン交換体および疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂のような、ひとつの原理のみで働く標準的なクロマトグラフィー媒体とは反対に、マルチモーダル樹脂は、イオン相互作用および疎水性作用の組み合わせを介して働く。例えば、そのような樹脂として、市販されている、GEヘルスケア社のCaptor(登録商標)MMCおよびCaptor(登録商標)Adhere、または、PALL社のMEP、HEAもしくはPPA Hypercel(登録商標)樹脂が挙げられる。これらマルチモーダル樹脂のリガンドは、異なった方法で設計することができ、多種にわたるリガンドの例は、次に挙げる通りである。

20

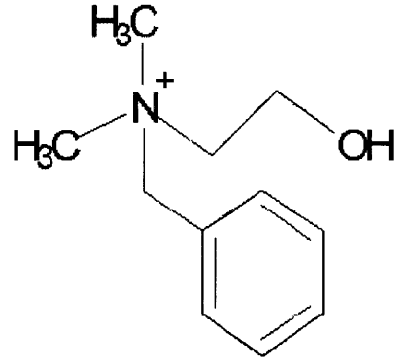
【0019】

30

## 【化 1】

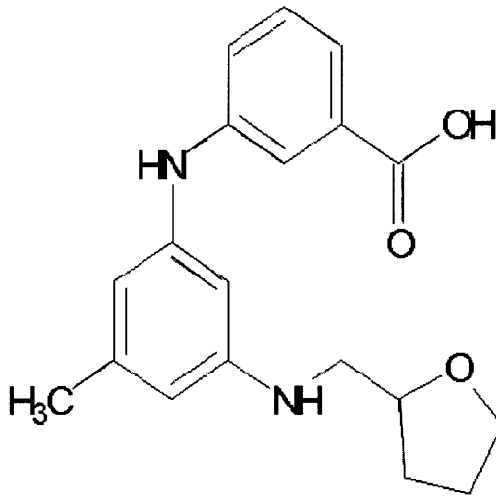


2-(ベンゾイルアミノ)ブタン酸



N-ベンジル-2-ヒドロキシ-N,N-ジメチルエタンアミニウム

10



3-({3-メチル-5-[(テトラヒドロフラン-2-イルメチル)アミノ]フェニル}アミノ)ベンゼン酸

20

30

## 【0020】

次に、マルチモードクロマトグラフィー材料の種類についてまとめる。

## 【0021】

本発明は、様々な生体物質の分離および単離に使用する効果的な吸着体である固体基質を提供する。本発明の固体基質は、例えば、カラムクロマトグラフィー等の調製技術およびバイオチップ等の分析装置に使用し得る。本明細書に記載される本固体基質の利点のひとつは、免疫グロブリン等の生体物質に対するその高い選択性と特異性であり、それと共に、従来技術の基質において必要とされた、コストがかかり、しばしば弊害をもたらす洗浄過程を、回避させることである。第2の利点は、本発明の固体基質は、生理的なpHおよびイオン強度における生体試料との使用にほぼ理想的に適しているので、pH調節や従来技術で処方されるようなリオトロフィック塩の添加の必要性を取り除くことである。第3の利点としては、本基質の容量が大きいことが考えられ、それらを調製するために使用する試薬のコストが低いことを考慮にいと、従来の特別な吸着体の使用に比べ、かなりの経済的な利得を提示するものである。

40

## 【発明を実施するための形態】

## 【0022】

## 混合モードリガンド

本発明の固体基質は、固体担体と、該固体担体に取り付けられているリガンドとを含む

50

。リガンドは、単環式基または多環式基であり得る環式基と、硫黄原子を含んでもよい連結基とを含む。分析物を混合モードの作用で引きつけるリガンドが、固体担体に取り付けられている。

#### 【0023】

リガンドは環式基を含む。該環式基は固体担体につながっており、また、硫酸基、スルホン酸基、リン酸基またはホスホン酸基で置換される単環式基または多環式基であり得る。単環式基または多環式基は、ここに定義されるように、不飽和の炭素-炭素結合のみを含んで芳香族系を与える環状炭化水素である芳香族基であり得る。原則として、いかなる芳香族基を本発明に用いてもよいが、好適な芳香族基は、典型的に、1つ、2つ、または3つの芳香族環を含む。従って、芳香族基の例としては、フェニル基ならびに、トリル基およびキシリル基といったその置換誘導体が挙げられる。二環式芳香族基の範囲には、縮合した個々の環が含まれ、例としてナフチル基が挙げられるがこれに限定されない。多環式芳香族基は、アントラセニル基およびフェナントレニル基、ならびにアセナフチル基のような縮合した異なるサイズの環を含む基を含む。芳香族基が選択される場合、必須ではないが、下に述べるように、ヘテロ環式またはヘテロ芳香族基に縮合している基であることが好ましい。

10

#### 【0024】

「ヘテロ環」は、少なくとも1つのヘテロ原子を含む飽和ないし部分飽和の環である。同様に、「ヘテロ芳香族基」は、少なくとも1つの炭素原子がヘテロ原子で置換された芳香族基である。本発明において、ヘテロ原子は、好ましくは、N、S、またはOである。また、ヘテロ環式またはヘテロ芳香族基は五員環または六員環であることが、これらの基を含む試薬が容易かつ低廉に商業的供給源から入手できる点から好ましい。

20

#### 【0025】

連結基が、下に定義されるように、両価性硫黄原子を含まない場合、ヘテロ環式基またはヘテロ芳香族基は、固体基質に「硫黄親和性(thiophilic)」性質を確立するもしくは寄与するものであること、すなわち、少なくとも1つのS原子を含むものであることが好ましい。

#### 【0026】

2価の硫黄原子を含む他の連結基を使用する場合、好ましいヘテロ環式基またはヘテロ芳香族基は、少なくとも1つのN原子を含んでもよく、または、SおよびN原子の組み合わせを含んでもよい。

30

#### 【0027】

従って、ヘテロ環式基またはヘテロ芳香族基の例としては、チアゾリン、チアゾリドン、イミダゾール、イミダゾリン、チアゾール、トリアゾール、テトラゾール、チアジアゾール、イミダゾール、ピリジンおよびモルホリンが挙げられる。特に好ましい一実施形態において、好適なヘテロ環式またはヘテロ芳香族基は、前述のように、芳香族基と縮合している。この点において、ベンゾイミダゾールとベンゾチアゾールは、容易に入手可能な候補であり、優れた固体基質を生み出す。

#### 【0028】

前記のように、単環式基または多環式基は、硫酸基、スルホン酸基、リン酸基、またはホスホン酸基で置換されている。これらの基は、十分に酸性であり、例えば、pH約2からpH約12といった広いpHの範囲内で、帯電した部分として存在する。そのため、固体担体は、生理学的イオン強度およびpHにおいて、免疫グロブリンのような生体物質を吸収するのに理想的に適している。

40

#### 【0029】

本明細書で使われる「置換」という語は、単環式基または多環式基に、硫酸基、スルホン酸基、リン酸基またはホスホン酸基が直接的もしくは間接的に付加することを指す。間接的な付加は、C1~C6の直鎖または分岐アルキレン基であるスペーサー基を介して起こり得る。アルキレン基は、1つ以上の二価の部分、例えば、特に限定されないが、-C(O)NH-、NH-C(O)-、-O-、-S-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N

50

H -、 - C ( O ) O -、および - O C ( O ) - が間に入ってもよい。つまり、スパーサー基の例として、 - C H<sub>2</sub> -、 - C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> -、 - C H<sub>2</sub> - O - C H<sub>2</sub> -、および - C H<sub>2</sub> C ( O ) N H C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> - が挙げられる。

#### 【 0 0 3 0 】

単環式基または多環式基は、メルカプト含有部分、エーテル含有部分、またはアミノ含有部分を含む連結基によって、固体担体に繋がれている。後述の構造的な考慮事項に従って、連結基は静電気的および疎水性の相互作用の両方を通して生体物質の結合が起こる pH において、固体担体に疎水的な性質を与えるよう、疎水性であることが好ましい。疎水性部としては、直鎖または分岐の C 1 ~ C 6 のアルキレン基、C 2 ~ C 6 のアルケニレン基および C 2 の ~ C 6 アルケニレン基が挙げられるが、これらに限定されない。特に有用な部分はエチレンとプロピレンである。疎水性部分としては他に、前述のように芳香族基が挙げられ、例えばフェニルエチレン ( p h e n e t h y l e n e ) を形成する。従って、先述の部分は、その間にメルカプト部分、エーテル部分、もしくはアミノ部分の少なくとも 1 つが入っている ( interrupt ) か、または、メルカプト部分、エーテル部分、もしくはアミノ部分の少なくとも 1 つによりキャップ ( cap ) されている。単環式基または多環式基が、硫黄原子を含まない実施形態では、連結基は、好ましくは、メルカプト部分を含む。これに関連して、連結基は、疎水性および硫黄親和性の性質を固体基質に与える。好ましいメルカプト含有連結基のひとつを、構造式に表す。

10

#### 【 0 0 3 1 】

連結基の疎水性は、ヒドロキシル、ハロゲン化物もしくはニトロといった極性置換体を導入すること、公知の方法によりメルカプト部分を酸化すること、エーテル部分もしくはアミノ部分を連結基に導入すること、またはこれらの組み合わせにより、容易に調整することができる。このような、容易に利用可能なメルカプト含有連結基の 1 つを、構造式に示す。

20

#### 【 0 0 3 2 】

アミノ含有連結基の例を、構造式に示す。

アミノ含有連結基からなる固体基質、または、酸化されたメルカプト部分からなる固体基質は、少なくともひとつの S 原子を含む単環式基または多環式基も含むことが好ましい。この場合、固体基質は、幾分か硫黄親和性な性質を保持することができる。

30

#### 【 0 0 3 3 】

他の好ましい一実施形態において、連結基、それ自体が、ヒドロキシエチルセルロース、デンプン、アミロースまたはアガロースのような多糖類を含む。ここで好ましい多糖類は、デキストランである。よって、固体担体は、後述のように、連結基で誘導体化される多糖類で修飾される。

#### 【 0 0 3 4 】

いかなる特定の理論に縛られるものではないが、本発明者らは、本発明の固体基質が、固体基質と生体物質の間の相互作用の「混合モード」を通して機能すると考える。前記の単環式および多環式基は、4 未満の p K 値を有し、従って、前述のような使用の pH 範囲内では、負に帯電している。免疫グロブリンのような生体物質は、生体物質が全体として正または中性の電荷をもつ、約 4 から 6 の pH の間で、固体基質と接触する。この pH 範囲において、生体物質は、単または多環式基との一種以上の相互作用を介して、固体基質と結合する。相互作用は、クーロン引力および弱い疎水性会合を含む。p H が、約 8 を超えて上がる場合、生体物質は、全体として、負に帯電し、これによって、負に帯電した固体基質と負に帯電した生体物質との間で、静電反発力が生まれる。従って、生体物質は、静電反発力によって、固体基質から引き離され、その後単離され得る。これらの反発イオン力は、上記の弱い引力よりも強いと考えられている。

40

#### 【 0 0 3 5 】

##### 固体基質

本発明は、混合モードリガンドが取り付けられた固体担体を意図する。特に、二つの異なるフォーマットを意図する。1 つのフォーマットでは、固体担体が、クロマトグラフィ

50

一媒体に用いられる典型的な形、すなわち、ビーズまたは粒子の形である。これらのビーズまたは粒子は、混合モードリガンドで誘導体化される。ビーズまたは粒子は、カラムに充填可能なクロマトグラフィー担体を形成する。もうひとつのフォーマットでは、固体担体は、チップの形をとる。すなわち、混合モードリガンドが共有結合またはその他の結合で取り付けられる、一般的に平面の表面を有する固体担体の形をとる。検出装置のプロブのインターフェイスに適應するチップも「プロブ ( p r o b e s ) 」と呼ばれる。

#### 【 0 0 3 6 】

##### ビーズおよび粒子

本発明の教示によれば、固体基質は、まず、有機材料を含んでもよい固体担体を含む。有機材料の例として、セルロース、デンプン、寒天、アガロースおよびデキストランのような多糖類が挙げられる。置換もしくは非置換のポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリアクリレート、ポリメタアクリレート、ポリビニル親水性ポリマー、ポリスチレン、ポリスルホン、ならびにスチレンとジビニルベンゼンとの共重合体を含む親水性合成ポリマーが意図される。あるいは、無機材料を固体担体材料として用いてもよい。そのような無機材料として、シリカのような多孔性の無機材料；ハイドロゲル含有シリカ、ジルコニア、チタニア、アルミナ；およびその他のセラミック材料が挙げられるが、これらに限定されない。これら材料の混合物、または二種の材料の共重合もしくは相互侵入網によって形成された複合材料を用いることも可能である。それらは例えば、米国特許第 5 , 2 6 8 , 0 9 7 号、米国特許第 5 , 2 3 4 , 9 9 1 号、および米国特許第 5 , 0 7 5 , 3 7 1 号に開示されている。

10

20

#### 【 0 0 3 7 】

固体担体は、直径約 0 . 1 m m から約 1 0 0 0 m m のビーズまたは不規則形状粒子の形であってよい。あるいは、固体担体は、繊維、膜、または、ミクロンから数ミリメートル大の細孔が通っているスポンジ状材料に成形され得る。

#### 【 0 0 3 8 】

前述の単環式基または多環式基は、固体担体と連結基との間、および、連結基と単環式基または多環式基との間に、共有結合を形成することによって、固体担体上に化学的に固定される。典型的な状況では、固体担体をまず、連結基の一部または全体を形成する反応基を固体担体に導入する役割をする二官能基試薬 ( b i f u n c t i o n a l r e a g e n t ) で処理する。セルロース、ハイドロゲルを含む複合体、またはヒドロキシル基を提示するその他の材料など、いくつかの固体担体に対しては、例えば二官能基試薬との反応の前に、水酸化物供給源でヒドロキシル基を脱プロトン化することが有利である場合が多い。二官能基試薬は、固体担体及び単環式基または多環式基を含む試薬の両方と反応することができる。官能基群が同じまたは異なっているものを包含する二官能基試薬の例としては、エピクロロヒドリン、エピプロモヒドリン、ジプロモプロパノール、ジクロロプロパノール、ジプロモブタン、エチレングリコールジグリシジルエーテル、ブタンジオールジグリシジルエーテル、ジビニルスルホン、アリルグリシジルエーテルおよび臭化アリルが挙げられるが、これらに限定されない。

30

#### 【 0 0 3 9 】

いったん官能化すると、次に、固体担体を 1 つ以上溶媒で何度も洗浄し、未反応の二官能基試薬、反応副産物またはその両方を除去する。これに関して用いられる典型的な溶媒は、水である。

40

#### 【 0 0 4 0 】

次いで、単環式基または多環式基を、メルカプト、ヒドロキシルまたはアミノ基で置換した基を含む試薬によって導入する。そのような試薬は、前述のように官能化された固体担体によって提示される官能基と反応する。

#### 【 0 0 4 1 】

二官能基試薬と単環式基または複環式基試薬との特定の組み合わせは、周知の化学的性質によって導かれる。例えば、エポキシドで官能化された固体担体は、メルカプト、ヒドロキシまたはアミノ含有試薬と反応し、エチレン含有連結基を基質に与える。アリル臭化

50

物で修飾された他の固体担体は、例えば、メルカプト含有試薬と直接反応し得るアルケン基を提示する。あるいは、アルケン基はさらに臭素化され、好適な反応性を有する臭化誘導体を与える。

【0042】

固定される単環式基または多環式基の濃度は、固体担体の作製に用いる二官能基試薬の濃度に応じて、固体担体ミリリットルあたり、数分の1マイクロモルと数百マイクロモルの間で変えることができる。

【0043】

典型的には、固定された基の濃度が低ければ、固体基質の分離能は低くなり、反対に濃度が高ければ、一般的に分離能は高くなる。

10

【0044】

上述のように、PrP<sup>Sc</sup>に大部分結合しないPrP<sup>Sc</sup>除去樹脂を有することには、いくつかの利点がある。そのひとつは、産物を溶出させる前に、異なるバッファー組成物を用いて樹脂を何度も洗浄することが可能であり、それにより、様々な生化学的組成のPrP<sup>Sc</sup>の数を、少なくともかなり低いレベルまで減じること、または、組成物からPrP<sup>Sc</sup>を除去することが可能になる。例えば、高濃度塩バッファー、場合により、低濃度塩バッファーなどの異なる種類の洗浄バッファーで、産物を溶出させる前に、樹脂を洗浄し、少量のプリオンが樹脂または産物にも結合し得るイオン相互作用、場合により、疎水性相互作用を妨げることが可能である。界面活性剤、アルコールおよびアミノ酸もまた、最適な純度を得るために、産物を溶出させる前に洗浄バッファーに添加し得るものの例である。例えば、PrP<sup>Sc</sup>が結合する様々な種類のイオン交換樹脂などの、他の種類の「標準的な」クロマトグラフィー媒体に、同様な洗浄工程を行うことは、非常に難しい。結合親和性が、産物と比べて非常に高い場合でさえ、PrP<sup>Sc</sup>がある程度、樹脂から産物と共に溶出される危険性が常にある。従って、PrP<sup>Sc</sup>が比較的低い親和性を有する一方で、産物が「マルチモーダル」に結合する樹脂を用いることは、大変有利であり、これにより、産物を溶出させる前に、適切な洗浄工程を適用することが可能となる。

20

【0045】

本発明によると、PrP<sup>Sc</sup>を溶出させた後に、例えば、下記によって、目的タンパク質を溶出させる。

イオン強度を増加または減少させることにより溶出バッファーのイオン強度を変える工程、

30

溶出バッファー（特に、水性溶液であるもの）に、モノヒドロキシアルコールもしくはジヒドロキシアルコール（例えば、メタノール、エタノール、プロパノールのような低級脂肪族アルコール）のようなアルコールを加える工程、および/または、

pHを増加または減少させることにより溶出バッファーのpH値を変える工程。

【0046】

また、上述の溶出技術を複数組み合わせることもできる。例えば、本発明においては、イオン強度を上げ、かつエチレングリコール量を増加させる。

【0047】

また、他の溶出条件も用いることができる。例えば、アミノ酸の濃度を増加させたり、「ホフマイスターシリーズ」に従って特定の塩の濃度を増加させる。

40

【0048】

目的タンパク質の溶出は、該目的タンパク質の生化学的性質に依存する。例えば、目的タンパク質の補酵素、または、目的タンパク質の三次構造を高度に認識する他の物質を使用することが可能である。目的タンパク質の例として、ヘパリンの濃度を上げることで溶出されるアンチトロンピンが挙げられる。

【0049】

はじめに樹脂に加えた量から計算した、目的タンパク質を含むタンパク質画分のプリオンタンパク質除去値（reduction value）は、1より大きく41g（10）以下である。所期のタンパク質画分のプリオンタンパク質分析値（analytica

50

l value) は、プリオンのウェスタンブロットアッセイの検出限界を下回っている。

【0050】

本発明の一実施形態において、クロマトグラフィー条件は、次の工程の少なくとも2つを含む：

i) 溶媒および/または非イオン性界面活性剤を含有する添加平衡バッファーを使用する工程、

ii) 溶媒および/または非イオン性界面活性剤を含有しない洗浄バッファーを使用する工程、

iii) アルコールおよび/またはアミノ酸を含有する洗浄バッファーを使用する工程

10

iv) 高塩濃度の洗浄バッファーを使用する工程、

v) 低塩濃度の洗浄バッファーを使用する工程、

vi) アルコールと高塩濃度との組み合わせを含むバッファーを使用する工程。

【0051】

本発明のさらなる一実施形態において、クロマトグラフィー条件は、次の工程のうち少なくとも二つを含む：

i) 溶媒および/または非イオン性界面活性剤を含有する添加平衡バッファーを使用する工程、

ii) 溶媒および非イオン性界面活性剤を含有しないバッファーである第一の洗浄バッファーを使用する工程、

20

iii) アルコールおよびアミノ酸を含有する第二の洗浄バッファーを使用する工程、

iv) 高塩濃度の第三の洗浄バッファーを使用する工程、

v) 低塩濃度の第四の洗浄バッファーを使用する工程、

vi) アルコールと高塩濃度との組み合わせを含む溶出バッファーを使用する工程。

【0052】

さらに、他の本発明の他の一実施形態において、用いられるバッファーは、次の通りである：

i) 添加平衡バッファーは、リン酸トリ-n-ブチルおよび/またはトリトンX-100を約0.1~10%(w/w)の濃度範囲で含む；

30

ii) 第二の洗浄バッファーは、エチレングリコールおよび/またはリシン/アルギニンを含み、ここでエチレングリコールは、約5~約30%(w/w)の範囲であり、リシン/アルギニンは、0.2~約1.5Mの範囲である；

iii) 第三の洗浄バッファーは、塩化ナトリウムを、約0.5~約4M、特に約0.5~約1.5Mの濃度範囲で含む；

iv) 第四の洗浄バッファーは、塩化ナトリウムを約0.01~約0.2M、特に0.01~約0.1Mの濃度範囲で含む；

v) 溶出バッファーは、エチレングリコールおよび/または塩化ナトリウムを含み、エチレングリコールを、約25~約75%(w/w)、特に、約25から約50%の濃度の範囲で、NaClは、約0.5~約4Mの濃度で含む。

40

【0053】

本発明のさらなる一実施形態において、クロマトグラフィー条件は、次の工程のうち少なくとも二つを含む。

i) 添加平衡バッファーは、リン酸トリブチルおよび/またはトリトンX-100を0.3~5%(w/w)の濃度範囲で含む；

ii) エチレングリコールを10~25%(w/w)の範囲で、および/またはリシン/アルギニンを0.3~1.0Mの範囲で含む、カラム容量の10倍より多い第二の洗浄バッファーで洗浄する工程；

iii) 塩化ナトリウムを0.8~1.5Mの濃度範囲で含む、カラム容量の10倍より多い第三の洗浄バッファーで洗浄する工程；

50

i v) 塩化ナトリウムを 0.03 ~ 0.15 M の濃度の範囲で含む、カラム容量の 10 倍より多い第四の洗浄バッファーで洗浄する工程；

v) 溶出バッファーは、エチレングリコールおよび/または塩化ナトリウムを含み、ここで EG は 35 ~ 65 % (w/w) の濃度の範囲で、また NaCl は 0.8 ~ 3.0 の濃度の範囲で含まれる。

#### 【0054】

本発明の他の一実施形態において、用いられるバッファーは、次の通りである：

i) 添加平衡バッファーは、リン酸トリブチルおよび/またはトリトン X - 100 を 0.8 ~ 1.2 % (w/w) の濃度の範囲で含む；

i i) エチレングリコールを 18 ~ 22 % (w/w) で、および/またはリシン/アルギニンを含む、カラム容量の 20 倍より多い洗浄バッファーで洗浄する工程；

i i i) 塩化ナトリウムを 0.8 ~ 1.2 M の濃度範囲で含む、カラム容量の 20 倍より多い第三の洗浄バッファーで洗浄する工程；

i v) 塩化ナトリウムを 0.08 ~ 0.12 M の濃度の範囲で含む、カラム容量の 20 倍より多い第四の洗浄バッファーで洗浄する工程；

v) 溶出バッファーは、エチレングリコールおよび/または塩化ナトリウムを含み、ここで EG は 45 ~ 55 % (w/w) の濃度の範囲で、また NaCl は 1.3 ~ 1.7 の濃度の範囲で含まれる。

#### 【0055】

異なった種類の洗浄バッファーを適用することの利点は、それによって、異なった種類のプリオンや、樹脂または目的タンパク質に異なる相互作用で結合しているプリオンを除去できる可能性が上がることである。また、各バッファーの量（すなわち、1カラム容量は、樹脂の容量に等しい）を増やすことによって、加えたバッファーに対して「ゆっくりと作用する (slow acting)」いくつかの残存プリオンに対する安全性が増加し得る。

#### 【0056】

マルチモーダルクロマトグラフィー材料は、

i) 正に帯電した N - ベンジル - N - メチル エタノールアミンリガンド、

i i) 負に帯電した 2 - (ベンゾイルアミノ)ブタン酸リガンド、

i i i) フェニルプロピルリガンド、

i v) N - ヘキシルリガンド、

v) 4 - メルカプト - エチル - ピリジンリガンド、

v i) 3 - [ { 3 - メチル - 5 - ( ( テトラヒドロフラン - 2 - イルメチル ) アミノ ) - フェニル } アミノ ] 安息香酸リガンド、

を含み得る。

#### 【0057】

本発明の主題はまた、感染性である可能性を有するタンパク質を含有する供給源から単離されたタンパク質の、プリオンタンパク質が削減された画分でもある。該画分は、本発明の方法によって得ることができる、薬剤的に適用可能なタンパク質を含有する。

#### 【0058】

特に、タンパク質画分は、血漿タンパク質、ペプチドホルモン、増殖因子、サイトカインおよびポリクローナル免疫グロブリンタンパク質、フィブリノゲン、プロトロンビン、トロンビン、プロトロンビン複合体、FX、FXa、FIX、FIXa、FVII、FVIIa、FXI、FXIa、FXII、FXIIa、FXIII、FXIIIa、フォン・ヴィレブランド因子などのヒトおよび動物血液凝固因子から選択される血漿タンパク質、アルブミン、トランスフェリン、セルロプラスミン、ハプトグロビン、ヘモグロビンおよびヘモペキシンなどの輸送タンパク質、 $\alpha$  - アンチトロンビン、 $\beta$  - アンチトロンビン、 $\alpha_2$  - マクログロブリン、C1 阻害因子、組織因子経路阻害因子 (TFPI)、ヘパリン補因子 II、プロテイン C 阻害因子 (PAI - 3)、プロテイン C およびプロテイン

10

20

30

40

50

S、 $\alpha$ -1 エステラーゼ阻害因子タンパク質、 $\alpha$ -1 抗トリプシンなどのプロテアーゼ阻害剤、潜在性抗トロンビンなどの抗血管新生タンパク質、 $\alpha$ -1 - 酸性糖タンパク質、アンチキモトリプシン、インター  $\alpha$ -トリプシンインヒビター、 $\alpha$ -2 - HS 糖タンパク質、C - 反応性タンパク質などの高グリコシル化タンパク質、ならびに、ヒスチジン高含有糖タンパク質、マンナン結合レクチン、C4 - 結合タンパク質、フィブロネクチン、GCグロブリン、プラスミノゲン、エリスロポエチンのような血液因子、インターフェロン、腫瘍因子、tPA、CSF などその他のタンパク質を含むことを求められる。

【0059】

さらに、本発明を次の実施例により説明するが、これらに限定されない。

【実施例】

【0060】

実施例 1

カラムおよび樹脂

Tricorn カラム (GEヘルスケア社、スウェーデン、断面積： $0.2 \text{ cm}^2$ 、直径： $0.5 \text{ cm}$ ) に、CaptomMC 樹脂 (GEヘルスケア社、カタログ番号 17 - 5317 - 10、ロット番号 308581) を、9 cm のベッド高、カラム容量： $1.8 \text{ ml}$  で、充填する。

【0061】

出発材料

HEK 293 細胞由来組換えタンパク質の、キャプチャーカラム工程を経て濃縮された混合物を、出発材料として用いた。(バッチ番号：BPP 047 S P e l u a t e、 $117 \mu\text{g}$  のタンパク質 / ml)。

【0062】

バッファー組成 \*

バッファー 1 (S/D が添加された平衡バッファー)

$0.3 \text{ M NaCl}$ 、 $0.01 \text{ M CaCl}_2 (2 \times \text{H}_2\text{O})$ 、 $0.01 \text{ M L - ヒスチジン}$ 、 $1\% \text{ w/w}$  トリトン X - 100、 $0.3\% \text{ w/w}$  TNBP、pH： $7.0 \pm 0.1$ 、導電率： $29 \pm 3 \text{ mS/cm}^2 (+25)$

バッファー 2 (S/D 無し平衡バッファー)

$0.3 \text{ M NaCl}$ 、 $0.01 \text{ M CaCl}_2 (2 \times \text{H}_2\text{O})$ 、 $0.01 \text{ M L - ヒスチジン}$ 、 $0.02\% (w/w)$  ツイーン 80、pH： $6.5 \pm 0.1$ 、導電率： $31 \pm 3 \text{ mS/cm}^2 (+25)$

バッファー 3 (洗浄 1：リシンおよびエチレングリコール (= EG))

$0.3 \text{ M NaCl}$ 、 $0.01 \text{ M CaCl}_2 (2 \times \text{H}_2\text{O})$ 、 $0.01 \text{ M L - ヒスチジン}$ 、 $0.02\% (w/w)$  ツイーン 80、 $0.5 \text{ M}$  一塩化 (L-) リシン (L - L y s i n m o n o c h l o r i d)、 $20\% (w/w)$  エチレングリコール (= EG)、pH： $6.5 \pm 0.1$ 、導電率： $37 \pm 3 \text{ mS/cm}^2 (+25)$

バッファー 4 (洗浄 2：高濃度塩洗浄)

$1.0 \text{ M NaCl}$ 、 $0.05 \text{ M CaCl}_2 (2 \times \text{H}_2\text{O})$ 、 $0.05 \text{ M L - ヒスチジン}$ 、 $0.02\% (w/w)$  ツイーン 80、pH： $6.5 \pm 0.1$ 、導電率： $89 \pm 5 \text{ mS/cm}^2 (+25)$

バッファー 5 (洗浄 3：低濃度塩洗浄)

$0.1 \text{ M NaCl}$ 、 $0.01 \text{ M CaCl}_2 (2 \times \text{H}_2\text{O})$ 、 $0.01 \text{ M L - ヒスチジン}$ 、 $0.02\% (w/w)$  ツイーン 80、pH： $6.5 \pm 0.1$ 、導電率： $13 \pm 3 \text{ mS/cm}^2 (+25)$

バッファー 6 (溶出バッファー)

$1.5 \text{ M NaCl}$ 、 $0.02 \text{ M CaCl}_2 (2 \times \text{H}_2\text{O})$ 、 $0.02 \text{ M L - ヒスチジン}$ 、 $0.02\% (w/w)$  ツイーン 80、 $50\% (w/w)$  エチレングリコール (EG)、pH： $6.5 \pm 0.1$  (EG 添加前に pH を調整)、導電率 (+25、EG 添加後に測定)： $39 \pm 3 \text{ mS/cm}^2$

10

20

30

40

50

バッファー 7 (再生バッファー)

1 M 水酸化ナトリウム

【0063】

pH調整用:

1 M HCl

\* バッファーは、最終体積 1 L としてではなく、加えた水 1 kg に対して、調製された。添加物によって最終体積が少し増加することがあるので、この調製は最終モル濃度に小さい影響を及ぼすであろう。

【0064】

クロマトグラフィー条件:

表 1 は適用されたバッファーの概ねの量、ml / 分および cm / 時で表わされた流速の概要である。各バッファーの工程に要する時間、およびタンパク質溶液についてのゲルとの接触時間も示す。

【0065】

【表 1】

C a p t o MMC 実行						
カラム容量 = (ml) 1.8						
ブロック	カラム容量 に対する倍 数	ml	流速 ml / 分	流速 cm / 時	時間 (分)	接触時 間 (分)
平衡バッファー+SD	5	9	1.00	306	9	1.8
試料供給	27	48	1.00	306	48	1.8
平衡-SD	10	18	1.00	306	18	1.8
リシン+EG洗浄	20	35	0.60	183	59	2.9
高濃度塩洗浄	10	18	1.00	306	18	1.8
低濃度塩洗浄	5	9	1.00	306	9	1.8
溶出バッファー、 1.5M NaCl	7	12	0.20	61	62	8.8

【0066】

MMC 樹脂を、Tricorn カラムに約 9 cm のベッド高で充てんした。クロマトグラフィー工程は、導電率について 280 nm でモニターした。タンパク質添加は、樹脂 1 ml に対して約 3 mg であった。

【0067】

はじめに、カラムを、安定したベースラインが得られるまで、S/D 化学物質を含む平衡バッファーで、適切に平衡化した。出発材料に、1 kg 当たり 14 g の割合でストックの S/D を加え、平衡バッファーと同じ濃度にした。タンパク質溶液をカラムにのせる前に、これを少なくとも 10 分間攪拌した。下記のバッファーの画分を回収し、全タンパク質 (および PrP<sup>Sc</sup> 打ち込み実験におけるプリオン) の分析をした。吸光度 280 nm で測定したクロマトグラフィー分析結果は、付録 2 で見ることができる。

- フロースルー (バッファー 1 + タンパク質)
- バッファー 1 (高濃度非イオン洗浄バッファー; 0.3 M NaCl, 0.01 M CaCl<sub>2</sub>, 0.01 M L-ヒスチジン、1% w/w トリトン X-100、0.3% w/w TNBP、pH: 7.0)
- バッファー 2 (低濃度非イオン性洗浄バッファー; 0.3 M NaCl, 0.01 M CaCl<sub>2</sub>, 0.01 M L-ヒスチジン、0.02% (w/w) ツイーン 80、p

10

20

30

40

50

H : 6 . 5 )

- バッファー 3 (アミノ酸 / アルコールバッファー ; 0 . 3 M NaCl、0 . 0 1 M CaCl<sub>2</sub>、0 . 0 1 M L - ヒスチジン、0 . 0 2 % ( w / w ) ツイーン 8 0、0 . 5 M ー塩化 ( L - ) リシン、2 0 % ( w / w ) エチレングリコール、pH : 6 . 5 )
- バッファー 4 (高濃度塩バッファー ; 1 . 0 M NaCl、0 . 0 5 M CaCl<sub>2</sub>、0 . 0 5 M L - ヒスチジン、0 . 0 2 % ( w / w ) ツイーン 8 0、pH : 6 . 5 )
- バッファー 5 (低濃度塩バッファー ; 0 . 1 M NaCl、0 . 0 1 M CaCl<sub>2</sub>、0 . 0 1 M L - ヒスチジン、0 . 0 2 % ( w / w ) ツイーン 8 0、pH : 6 . 5 )
- バッファー 6 (高濃度塩 / 高濃度アルコールバッファー) 1 . 5 M NaCl、0 . 0 2 M CaCl<sub>2</sub>、0 . 0 2 M L - ヒスチジン、0 . 0 2 % ( w / w ) ツイーン 8 0、5 0 % ( w / w ) エチレングリコール ( E G )、pH : 6 . 5
- バッファー 7 (再生バッファー ; 2 M NaCl)

10

【 0 0 6 8 】

カラムを、2 0 カラム容量の 1 M NaOH で再生し、さらなる使用のために、2 0 % ( v / v ) エタノール中で保存した。

【 0 0 6 9 】

結果

表 2 はプリオン無しの実験における全タンパク質の検出を示す。

【 0 0 7 0 】

【 表 2 】

20

試料	試料容量 (ml)	全タンパク質 μg/ml	全タンパク質 mg	全タンパク質 %
出発材料 (添加試料)	47	117	5.5	100
フロースルー (バッファー 1)	40	na	na	na
バッファー 2	20	na	na	na
バッファー 3	40	17.9	0.7	13%
バッファー 4	20	10.7	0.2	4%
バッファー 5	10	13.6	0.1	2%
バッファー 6	9	150	1.4	25%
バッファー 7	18	na	na	na

na = バッファーが全タンパク質分析法を妨げたため分析せず。

30

【 0 0 7 1 】

実施例 2 (プリオン打ち込み実験)

実施例 1 で述べたクロマトグラフィー手順のプリオンタンパク質除去の測定を可能にするために、プリオン打ち込み実験を行った。実施例 1 と同じカラム、樹脂、バッファーおよび出発材料を用いた。

40

【 0 0 7 2 】

プリオンタンパク質感染性出発材料

スクレイピーに感染させたハムスターの 2 6 3 K 株のマイクロソーム / 細胞質画分を、この実験に用いた。

【 0 0 7 3 】

1 1 7 μg / ml のタンパク質を含む、約 5 4 g のタンパク質出発材料 (実施例 1 と同様、バッチ番号 : B P P 0 4 7 S P e l u a t ) を、水槽中、2 5 で解凍し、温度 2 4 . 0 (目安 : 2 0 ~ 2 5 ) まで温めた。次に、5 1 . 1 2 g (目安 : 5 0 ± 2

50

g) の出発材料を計量し、2.6 ml (目安: 2.5 ± 0.2 ml) のマイクロソーム/細胞質画分を打ち込み、最終濃度 5.1% とした。打ち込み済出発材料の pH をチェックしたところ、6.994 (目安: 7.0 ± 0.1) であった。次いで、6 ml の分量 (aliquot) を取り、分注して、-60 以下で保存した (打ち込み済出発材料試料 - SSM)。

#### 【0074】

1.955 g のトリトン X-100 を、0.582 g の TnBP (目安となる割合: 10部 + 3部、重量による測定) と混合し、36 分間攪拌した。直ちに、0.665 g の S/D 試薬を、残り 47.72 g の打ち込み済出発材料 (目安となる割合: 打ち込み済出発材料 1 Kg あたり 14 g の S/D 試薬) に添加し、31 分間攪拌した。出発材料の温度を 10  
チェックしたところ、攪拌段階の開始時 24.5、および攪拌段階の終了時 23.7 (目安となる範囲: 18 ~ 25) であった。

#### 【0075】

##### クロマトグラフィー工程

CaptomMC 樹脂を充てんした GEヘルスケア社の 1.8 ml Tricorn カラム (CV = 1.0 ml、ベッド高 = 9 cm) を、8.3 CV のバッファー 1 (S/D を含む平衡バッファー) を用い流速 1.0 ml / 分 (目安: 1.0 ml / 分で 5 CV) で平衡化した。次に、47.29 g の S/D で処理した打ち込み済出発材料を、1.0 ml / 分 (目安: 1.0 ml / 分で、45 ± 2 g) の流速をかけながら、カラムに充てんした。それに続いて、カラムを流速 0.8 ml / 分で 10.0 CV のバッファー 2 (S/D 無し平衡バッファー) (目安: 1.0 ml / 分で 10 CV) で洗い流した。フロースルーの回収は、UV シグナルが上がり始めた時に開始し、吸光度が落ち始めるまで継続した。フロースルー画分の重量を測定し (実重量: 48.23 g)、16 ml の分量を取り、分注して、-60 以下で保存した (フロースルー試料 - FT)。洗浄画分 1 を、バッファー 2 で流した際に、回収した。この画分の実重量を測定したところ、12.75 g であった。また、12 ml の分量を取り、分注して、-60 以下で保存した (洗浄 1 試料 - W1)。

20

#### 【0076】

次いで、カラムを、22.2 CV のバッファー 3 (リシンおよびエチレングリコール洗浄) を用い、流速 0.6 ml / 分 (目安: 0.6 ml / 分で 20 CV) で洗浄した。バッファー 3 での洗浄の際、洗浄画分 2 を回収した。この画分の実重量を測定したところ、40  
0.35 g であった。16 ml の分量を取り、分注して、-60 以下で保存した (洗浄 2 試料 - W2)。

#### 【0077】

カラムを、10.0 CV のバッファー 4 (高濃度塩洗浄) を用い、流速 0.9 ml / 分 (目安: 1.0 ml / 分で 10 CV) で洗浄した際、洗浄画分 3 を回収した。実重量 18.48 g を測定し、16 ml の分量を取り、分注して、-60 以下で保存した (洗浄 3 試料 - W3)。

30

#### 【0078】

カラムを、5.0 CV のバッファー 5 (低濃度塩洗浄) を用い、流速 1.0 ml / 分 (目安: 1 ml / 分で 5 CV) で洗浄した際、洗浄画分 4 を回収した。この画分の実重量を 40  
測定したところ、12.22 g であった。11.5 ml の分量を取り、-60 以下で保存した (洗浄 4 試料 - W4)。

#### 【0079】

次いで、産物を、8.3 CV のバッファー 6 (溶出バッファー) を用い、0.2 ml / 分 (目安: 0.2 ml / 分で 7 CV) の流速をかけて溶出させた。溶出物の回収は、バッファー 6 でカラムを洗う間全体を通して行われた。溶出画分の実重量を測定したところ、13.54 g であった。12.5 ml の分量を取り、-60 以下で保存した (溶出試料 - E)。

#### 【0080】

9.4 CV のバッファー 7 (再生バッファー) を用い、流速 0.6 ml / 分 (目安: 0.

50

6 ml / 分で 20 CV) でカラムを再生する際に、再生画分を回収した。17.97 ml の実重量を測定した。16 ml の分量を取り、-60 以下で保存した (再生試料 - Reg)。

【0081】

【表3】

プリオン打ち込み実験の結果

試料	試料容量 (ml)	PrP <sup>Sc</sup> 含有量 Log <sub>10</sub>	PrP <sup>Sc</sup> 含有量 %
出発材料 (試料 - SSM)	54	4.67	100
フロースルー、バッ ファー1 (試料 - FT)	48	4.68	102
バッファー2 (試料 - W1)	13	3.61	9.5
バッファー3 (試料 - W2)	40	2.61	0.9
バッファー4 (試料 - W3)	18	<1.27	<0.04
バッファー5 (試料 - W4)	12	<1.09	<0.03
バッファー6 (試料 - E)	14	<1.13	<0.03
バッファー7 (試料 - Reg)	18	<1.26	<0.04

10

20

30

【0082】

考察

表3および付録1 (図1~5) からわかるように、バッファー4~7画分では優れたプリオンタンパク質除去値が見られる。よって、これらの画分に溶出するタンパク質産物は、PrP<sup>Sc</sup>除去に関して、非常に良好な安全マージンを有すると思われる。また、非常に重要なことに、PrP<sup>Sc</sup>が、フロースルーや初期の洗浄バッファー以外の画分中に全く見られないことが、加えたプリオンタンパク質の物質収支から示されている。我々の知る限りでは、このことはこれまで従来技術では示されていなかった。文献にみられるプリオンタンパク質除去工程としてのクロマトグラフィー樹脂の例において、たとえ、比較的許容可能なプリオンタンパク質除去値が達成されても、プリオンタンパク質は、普通、産物画分を処理する前後の数画分の中に見出すことができ、このことは、クロスオーバー混入の危険性を示唆している。

40

【0083】

分析についての説明

ブラッドフォード法による全タンパク質の測定

ブラッドフォード法によるタンパク質測定は、クマシーブリリアントブルー G-250の酸性溶液に対する吸光度極大が、タンパク質への結合が起こった際に、465 nm から595 nmに変わるという観察に基づいている。疎水性相互作用およびイオン性相互作用の両方が、この染料の陰イオンの形を安定化し、目でわかる色の変化を引き起こす。こ

50

のアッセイは、染料 - アルブミン複合体溶液の吸光係数が、10倍の濃度範囲にわたって一定であるため、有用である。さらに詳しい情報は、Bradford, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254. 1976.も参照のこと。

【0084】

PrP<sup>Sc</sup>を検出するためのウェスタンブロットアッセイ

ウェスタンブロットアッセイは、プロテイナーゼK耐性スクレイピー関連プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) を半定量的に測定するものである。ウェスタンブロットアッセイは、DC Lee et al., Journal of Virological Methods 2000;84:77-89に記述されている通りに行った。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2008/061068
---

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61L2/00 C07K14/47 G01N33/68 C07K1/16		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K G01N A61L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/00441 A (BIOPURE CORP [US]) 8 January 1998 (1998-01-08)	1, 9, 10
Y	see pages 3-6, 14, claim 1 and 12 the whole document	1-6
X	WO 03/105911 A (COMMON SERVICES AGENCY [GB]; FOSTER PETER REYNOLDS [GB]; GRIFFIN BREND) 24 December 2003 (2003-12-24)	1, 9, 10
Y	in particular see page 3-5, 8-12 and claims 1-2, 11 and 17 the whole document	1-6
Y	WO 94/08686 A (CORNELL RES FOUNDATION INC [US]) 28 April 1994 (1994-04-28) see page 5-6, 7-9, page 41, claim 1-2 the whole document	1-6
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 February 2009		Date of mailing of the international search report 09/03/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vix, Olivier

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No  
 PCT/EP2008/061068

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRIMACOMBE D B ET AL: "Characterization and polyanion-binding properties of purified recombinant prion protein" BIOCHEMICAL JOURNAL, PORTLAND PRESS, LONDON, GB, vol. 342, 1999, pages 605-613, XP002253306 ISSN: 0264-6021	1,9,10
Y	in particular see figure 1, page 606-608 the whole document	1-6
X	FOSTER P R ET AL: "STUDIES ON THE REMOVAL OF ABNORMAL PRION PROTEIN BY PROCESSES USED IN THE MANUFACTURE OF HUMAN PLASMA PRODUCTS" VOX SANGUINIS, S. KARGER AG, BASEL, CH, vol. 78, no. 2, March 2000 (2000-03), pages 86-95, XP009015791 ISSN: 0042-9007	1,9,10
Y	see abstract, page 89-90, table 1 and 2-5 for the purified protein products the whole document	1-6
X	BURNOUF ET AL: "Current strategies to prevent transmission of prions by human plasma derivatives" TRANSFUSION CLINIQUE ET BIOLOGIQUE, ARNETTE-BLACKWELL, PARIS, FR, vol. 13, no. 5, 1 February 2007 (2007-02-01), pages 320-328, XP005869901 ISSN: 1246-7820	1,9,10
Y	in particular see page 323-324, Table 2 the whole document	1-6
X	THYER J ET AL: "Prion-removal capacity of chromatographic and ethanol precipitation steps used in the production of albumin and immunoglobulins" VOX SANGUINIS, vol. 91, no. 4, 2006, pages 292-300, XP002464418 ISSN: 0042-9007	1,9,10
Y	see page 292, page 293 right col., Table 1 the whole document	1-6
A	WO 2004/024318 A (CIPHERGEN BIOSYSTEMS INC [US]; BOSCHETTI EGISTO [FR]; GIROT PIERRE [FR] 25 March 2004 (2004-03-25) the whole document	1-6

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No  
 PCT/EP2008/061068

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZEILER B ET AL: "Concentration and removal of prion proteins from biological solutions" BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 37, no. Pt 2, April 2003 (2003-04), pages 173-182, XP002324177 ISSN: 0885-4513 the whole document	1-8
A	PAN K-M ET AL: "PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE CELLULAR PRION PROTEIN FROM SYRIAN HAMSTER BRAIN" PROTEIN SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, GB, vol. 1, 1992, pages 1343-1352, XP002043228 ISSN: 0961-8368 the whole document	1-8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/061068

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9800441 A	08-01-1998	AT 267212 T	15-06-2004
		AU 718557 B2	13-04-2000
		AU 3580297 A	21-01-1998
		BR 9710035 A	10-08-1999
		CA 2259632 A1	08-01-1998
		CN 1221425 A	30-06-1999
		CN 1743340 A	08-03-2006
		DE 69729217 D1	24-06-2004
		DE 69729217 T2	04-05-2005
		EP 0954528 A1	10-11-1999
		ES 2221957 T3	16-01-2005
		HK 1019151 A1	03-08-2007
		JP 4031833 B2	09-01-2008
		JP 2000513377 T	10-10-2000
		TW 390887 B	21-05-2000
		US 5808011 A	15-09-1998
WO 03105911 A	24-12-2003	AT 347380 T	15-12-2006
		AU 2003242838 A1	31-12-2003
		CA 2488502 A1	24-12-2003
		DE 60310240 T2	05-07-2007
		EP 1534348 A1	01-06-2005
		ES 2278194 T3	01-08-2007
		US 2006096619 A1	11-05-2006
WO 9408686 A	28-04-1994	US 5431807 A	11-07-1995
		US 5316680 A	31-05-1994
WO 2004024318 A	25-03-2004	AU 2003270601 A1	30-04-2004
		CA 2500903 A1	25-03-2004
		EP 1578527 A1	28-09-2005
		JP 2005539223 T	22-12-2005

---

 フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 イェルンベルグ、マッツ  
スウェーデン エス - 1 2 0 6 6 ストックホルム トルクヒュースガータン 2 2 トラッパン

(72)発明者 ウィング、ステファン  
スウェーデン エス - 1 2 0 5 0 アルスタ ラングハルスヴァーゲン 1 7

(72)発明者 ネイサー - スヴェイ、アンドレア  
オーストリア エー - 2 3 4 0 メードリング カールスガッセ 9

Fターム(参考) 4H045 AA20 AA50 CA40 DA01 DA30 DA75 EA20 EA34 GA21

专利名称(译)	分离和纯化不含朊病毒蛋白的目的蛋白质的方法 ( PrPsc )		
公开(公告)号	<a href="#">JP2010536832A</a>	公开(公告)日	2010-12-02
申请号	JP2010521447	申请日	2008-08-25
申请(专利权)人(译)	Octapharma公司AG		
[标]发明人	ギルジャムグスタヴ イエレンベルグマツツ ウインゲステファン ネイスースヴェイアンドレア		
发明人	ギルジャム、グスタヴ イエレンベルグ、マツツ ウインゲ、ステファン ネイスースヴェイ、アンドレア		
IPC分类号	C07K1/16 G01N30/88 G01N33/53 G01N30/26		
FI分类号	C07K1/16 G01N30/88.J G01N33/53.D G01N30/26.A G01N30/88.201.X		
F-TERM分类号	4H045/AA20 4H045/AA50 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA30 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA34 4H045/GA21		
代理人(译)	中島敦		
优先权	2007114856 2007-08-23 EP		
其他公开文献	JP2010536832A5 JP5797404B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种通过色谱法分离和纯化目标蛋白质的方法，包括以下步骤：使包含靶蛋白质的潜在PrP SC污染的样品与多峰色谱材料接触；- 设定缓冲液条件，使目标蛋白质与多峰色谱材料结合，洗脱PrP SC;然后洗脱目标蛋白质。

