



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 5 C12P 21/02 // C07K 3/12 C07K 3/22, 3/28, 15/04 (C12P 21/02, C12R 1:19)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 92/14832 (43) 国際公開日 1992年9月3日 (03. 09. 1992)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP92/00204 (22) 国際出願日 1992年2月25日(25. 02. 92) (30) 優先権データ 特願平3/115689 1991年2月26日(26. 02. 91) JP 特願平4/29525 1992年2月17日(17. 02. 92) JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP] 〒104 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 江島大輔(EJIMA, Daisuke) [JP/JP] 佐藤 豊(SATO, Yutaka) [JP/JP] 渡辺真弓(WATANABE, Mayumi) [JP/JP] 伊達雅代(DATE, Masayo) [JP/JP] 高原義之(TAKAHARA, Yoshiyuki) [JP/JP] 〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 川口義雄, 外(KAWAGUCHI, Yoshio et al.) 〒160 東京都新宿区新宿1丁目1番14号 山田ビル Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title: PROCESSES FOR PURIFYING HUMAN BCDF</p>		
<p>(54) 発明の名称 ヒトBCDFの精製法</p>		
<p>(57) Abstract</p>		
<p>A process for purifying a human BCDF by subjecting the reduced form of human BCDF, prepared by culturing a microorganism containing a human BCDF gene integrated therewith and solubilizing the culture product with guanidine hydrochloride, to oxidation and refolding, wherein the oxidation product is treated by gel filtration chromatography under the condition of the guanidine hydrochloride concentration of 4 to 7 M to thereby obtain a human BCDF having the intramolecular disulfide linkage and stereochemical structure of a natural human BCDF; a process for purifying a human BCDF by removing an organic solvent from the solution of a human BCDF containing said solvent, wherein the solution is passed through a gel filtration chromatographic column equilibrated with an organic solvent for elution according to the step-wise or linear gradient program to thereby obtain a natural human BCDF monomer; and a process for purifying a human BCDF which further comprises the steps of ion-exchange chromatography and reversed phase HPLC in the above processes. These processes permit the removal of impurities derived from the microorganism and human BCDF analogues, and the obtained natural human BCDF is highly pure so that it can be utilized as a medicine.</p>		

(57) 要約

ヒト B C D F 遺伝子を組み込んだ微生物を培養した後にグアニジン塩酸塩で可溶化した還元型ヒト B C D F を酸化反応及びリフォールディング処理する際に、酸化反応後グアニジン塩酸塩濃度を 4 ~ 7 M の条件下でゲル濾過クロマト処理することにより天然型ヒト B C D F の分子内ジスルフィド結合及び立体構造を有するヒト B C D F を得る精製方法、ヒト B C D F の有機溶媒含有溶液から有機溶媒を除去するに際し、有機溶媒で平衡化したゲル濾過クロマトカラムに通液し、ステップワイズ又はリニアグラジエントプログラムにより溶出して天然型のヒト B C D F 単量体を得る精製方法、及びこれらの方法にイオン交換クロマト処理及び逆相 H P L C 工程を併用するヒト B C D F の精製法である。

これらの精製方法によれば、微生物由来の不純物及びヒト B C D F 類縁体の除去が可能となり、得られた天然型ヒト B C D F は高純度で医薬品への利用ができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	ES	スペイン	MG	マダガスカル
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	ML	マリ
BB	バルバドス	FR	フランス	MN	モンゴル
BE	ベルギー	GA	ガボン	MR	モーリタニア
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MW	マラウイ
BG	ブルガリア	GB	イギリス	NL	オランダ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	NO	ノルウェー
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	PL	ポーランド
CA	カナダ	IE	アイルランド	RO	ルーマニア
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	RU	ロシア連邦
CG	コンゴ	JP	日本	SD	スーダン
CH	スイス	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CI	コート・ジボアール	KR	大韓民国	SN	セネガル
CM	カメルーン	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソヴェエト連邦
CS	チェコスロバキア	LK	スリランカ	TD	チャード
DE	ドイツ	LU	ルクセンブルグ	TG	トゴ
DK	デンマーク	MC	モナコ	US	米国

- 1 -

明 細 書

ヒト B C D F の精製法

(技術分野)

本発明は、医薬品として用いられるヒト B 細胞分化因子（以下、ヒト B C D F という）の精製法に関するものである。具体的には、ヒト B C D F - D N A を組み込んだ微生物由来のヒト B C D F 培養産物より医薬品として使用可能な純度と安全性が保障されうるヒト B C D F の精製法に関する。

(背景技術)

ヒト B 細胞を抗体産生細胞へ分化させる因子であるヒト B C D F (B - c e l l D i f f e r e n c i a t i o n F a c t o r) は 1 9 8 6 年にその c D N A がクローニングされた (N a t u r e , 3 2 4 , 7 3 (1 9 8 6)) 。その後、該物質は B 細胞刺激因子 (B S F - 2 、 B - c e l l S t i m u l a t o r y F a c t o r - 2) またはインターロイキン 6 (I L - 6) ともよばれるようになり、その物性も概略明らかになっている (分子量約 2 1 0 0 0 , 等電点約 6 . 2) 。また、ヒト B C D F は種々の生物活性を示すことが報告されている。このなかでも血球の幹細胞の増殖作用、血しょう

板前駆細胞から血しょう板を分化させる作用、Bリンパ球を抗体産生細胞へ分化させる作用等医薬として有用な作用を有している。すなわち、ヒトBCDFは他の制癌剤使用や骨髄移植に伴う血球の減少を補う薬、あるいはワクチンの作用を増強する薬として医薬分野への利用が期待されているものである。

本発明者らは、既にヒトBCDFのcDNAを組み込んだ大腸菌を生産宿主として、これより得られるヒトBCDF培養物より、簡便にかつ効率的にヒトBCDFを精製処理する方法の一部を開示した（特開平1-83094、同1-300898及び同2-186996号公報参照）。しかし、これらの精製方法は、ヒトBCDF培養物の精製法を検討する中で判明してきたヒトBCDFの類縁体等の不純物をも合わせて除去する為には必ずしも十分な方法とはいえない。また、精製純度も研究レベルで用いるには充分であるが、医薬品として用いるヒトBCDFを製造するには不充分であった。ヒトBCDFを医薬として用いるためには、人に安全に投与するに足る高純度でかつ人体に有害な成分を含まない医薬原体を低コストで生産する工業的生産を前提とした実用的な精製工程を作り上げる必要があった。

一般に、大腸菌を宿主とした組み替えDNAを用いて生理活性蛋白質を生産する際に天然型と一次構造が一部異なる類縁体や、該蛋白質中のジスルフィド結合が天然型と異なる結合の類縁体が混入することが知られている。また、インターロイキン2やインターフェロン等で知られているように、本来モノマー（単量体）で存在するはずの該蛋白質が非共有結合で分子間会合した高分子量体が混入する場合もある。また、精製過程で目的の該蛋白質が切断又は部分修飾されたり、一次構造が変異したり、立体構造が変化したりして類縁体が生じる場合もある。これら類縁体はいずれも人体に繰り返し投与された場合、不要な抗体を生じて有害な免疫反応を引き起こす危険性がある。ヒトBCDFの会合体については、後述の如く、本発明者らがその存在を初めて明らかにしたわけで、従ってその精製方法は従来知られていなかった。

更には、前述の類縁体の除去方法と合わせて、

- (1) 生理活性が低下するおそれのあるヒトBCDFの変性物質の生成を最小限に抑え、
- (2) 人体に有害な危険のおそれがある微生物由来の蛋白質を除去し、

(3) 微生物由来又は工程中に混入する発熱性物質(エンドトキシン等)を除去した高純度のヒトBCDF、
を取得しうる精製法の組み合わせは開示されていなかった。

また、ヒトBCDFのようなリンホカインは本来生体内で数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度の濃度で作用しているものであるが、リンホカインを医薬原料として取り扱う場合は数 mg/ml 程度の高濃度で取り扱うことが望ましい。その理由は、1) 高い投与の毒性試験が行なうことができるので、リンホカインの安全性評価がより精度の高いものとなること、2) 医薬原体から医薬製剤を作る際、種々の添加剤を加えても適正の投与濃度に調製できるので、医薬製剤を作りやすいこと、3) 精製工程のスケールを小さくすることができるので、操作・装置を簡略化できること等の利点があるからである。しかしながら、一般にリンホカインは疎水性が高く、高濃度になると会合・沈殿または変性する危険性が増加するので、本発明のヒトBCDFの精製においても、細胞培養等の希薄濃度条件下での精製と異なり、独自の精製条件を検討しなければならないという問題があった。

(発明の開示)

本発明の課題は、産生宿主由来の不純物蛋白質やエンドトキ

シン、精製工程由来の混入不純物、及びヒト B C D F 由来の一次構造の異なる変異体や会合体（高分子量体）等の類縁体を含まない高純度かつ安定な高濃度のヒト B C D F 溶液を工業的スケールで効率的生産が可能な精製方法を提供することにある。

本発明者は、前記課題を解決する為に鋭意検討を重ねた結果、ヒト B C D F 遺伝子を組み込んだ大腸菌を大量培養して得た菌体中のヒト B C D F を精製するに際し、（１）高濃度の蛋白質変性剤を用いた可溶化（抽出）並びに酸化反応及びリフォールディング工程、（２）イオン交換クロマトグラフィー及び逆相高速液体クロマトグラフィー（以下、逆相 H P L C と略す）を用いた菌体蛋白質、エンドトキシン、ヒト B C D F の一次構造変異体等の除去工程、（３）ゲル濾過法を用いた蛋白質変性剤、有機溶媒、ヒト B C D F の会合体の除去工程を駆使することにより、ヒトに投与可能な高純度かつ工業的にスケールアップ可能なヒト B C D F の精製法を見い出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、

（１）ヒト B C D F 遺伝子を組み込んだ微生物を培養して得られるヒト B C D F 培養物からヒト B C D F を可溶化した還元型

ヒト B C D F 可溶化溶液を酸化反応及びリフォールディング処理に付するに際し、該還元型ヒト B C D F 可溶化溶液を用いて酸化反応せしめた後、グアニジン塩酸塩濃度を 4 ~ 7 M とした酸化型ヒト B C D F 溶液をゲル濾過クロマト処理に付することを特徴とするヒト B C D F の精製法、及び、

(2) 有機溶媒を含有するヒト B C D F 溶液からゲル濾過クロマトカラムを用いて展開溶媒を通液せしめることにより該有機溶媒を除去するに際し、(i) ゲル濾過クロマトカラムに有機溶媒を含む展開溶媒で接液した後、(ii) 該ヒト B C D F 溶液をフィードし、続いて、(iii) 展開溶媒の有機溶媒量をステップワイズグラジエント又はリニアグラジエントプログラムにより (i) で用いた展開溶媒の有機溶媒量より減少せしめて通液することにより、有機溶媒を除去したヒト B C D F 水溶液を取得することを特徴とするヒト B C D F の精製法に関するものである。

更には、(3) ヒト B C D F 遺伝子を組み込んだ微生物を培養して得られるヒト B C D F 培養物からのヒト B C D F を精製する方法において、

(i) ヒト B C D F 培養物からヒト B C D F を可溶化した還元

型ヒトBCDF可溶化溶液を用いて酸化反応せしめた後、グアニジン塩酸塩濃度を4.0～7.0Mとした酸化型ヒトBCDF溶液をゲル濾過クロマト処理に付する工程

(ii) ヒトBCDF溶液を多糖、デキストラン又は合成ポリマーをベースとしたイオン交換体をリガンドに有するゲル担体クロマトカラムにフィードした後、溶離液の塩濃度を変化せしめてヒトBCDFを精製するイオン交換クロマト処理工程、

(iii) ヒトBCDF溶液を、炭素数が1～8個のアルキル基をリガンドとしかつポアサイズが250オングストローム以上である逆相クロマト担体を充填したカラムに接触せしめて、ヒトBCDFを精製する逆相クロマト処理工程、

(iv) ゲル濾過クロマトカラムに初めに有機溶媒を含む展開溶媒で接液した後、ヒトBCDF溶液をフィードし、続いて、展開溶媒の有機溶媒量をステップワイズグラジエント又はリニアグラジエントプログラムにより、ゲル濾過クロマトカラムに初めに接液した有機溶媒を含む展開溶媒の有機溶媒量より減少せしめて通液することにより、有機溶媒を除去したヒトBCDF水溶液を取得するゲル濾過クロマト処理工程、

を含むことを特徴とするヒトBCDFの精製法に関する。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明で用いる原料は、ヒトBCDF遺伝子を組み込んだ微生物、例えば、大腸菌等を培養して得られるヒトBCDF培養物である。ヒトBCDF培養物中のヒトBCDFは、通常、大部分が微生物中に不溶性顆粒として存在するので、これを原料としてもよい。これらのヒトBCDFは大部分、構成する4つのシステイン(44、50、73、83 Cys)がジスルフィド結合をしていない遊離のチオール構造である還元型として存在する。

次に、ヒトBCDF不溶性顆粒からヒトBCDFを可溶化する工程について述べる。常法に従い、ヒトBCDF不溶性顆粒は、必要に応じ蒸留水に懸濁後、比較的低回転で遠心分離し、付着した不純物を洗浄除去する。得られたペレットを低濃度のEDTA溶液(1~10mM)に懸濁後、ヒトBCDFの最終濃度が1.0~3.0mg/mlになるように、蛋白質変性剤であるグアニジン塩酸塩の高濃度溶液(例えば6M)で還元型ヒトBCDFを可溶化する。蛋白質変性剤として必要により尿素等を含含有していてもよい。10~35℃、好ましくは20~28℃にて、1~4時間ゆっくりと攪拌するが、その際、pHは5.5~6.0以下に保ち、分子間ジスルフィド結合形成によ

るアグリゲーション（分子間凝集）を引き起こさないようにする。通常、天然型のヒトBCDFは分子内に4個のシステイン（ ^{44}Cys 、 ^{50}Cys 、 ^{73}Cys 、 ^{83}Cys ）を有し、2個の分子内ジスルフィド結合（ $^{44}\text{Cys} - ^{50}\text{Cys}$ 、 $^{73}\text{Cys} - ^{83}\text{Cys}$ ）を形成している。上述の通り、可溶化した段階ではヒトBCDFは殆どのシステインは遊離のチオール構造である為、次の酸化反応及びリフォールディング処理を行なう必要がある。

酸化反応及びリフォールディング処理工程について記述するにあたり、本処理工程の特徴について記載する。

上述の如く、天然型ヒトBCDFでは分子内ジスルフィド結合を有するが、大腸菌等の微生物内で発現し蓄積したヒトBCDFは還元状態（チオール型）かつ不溶性凝集体（*inclusion body*）を形成する。従って、天然型のヒトBCDFに再生するには、分子内ジスルフィド結合を形成させると同時に天然型の立体構造（未変性の高次構造）にする必要がある。本発明の酸化反応及びリフォールディング処理方法は、先ずヒトBCDFを高濃度のグアニジン塩酸塩溶液中で、完全変性状態（ヒトBCDFは還元状態である）で酸化反応させてヒトBCDF単量体の分子内ジスルフィド結合を完

全形成せしめて酸化型ヒト B C D F にし、続いて、特定のグアニジン塩酸塩濃度に保ってグアニジン塩酸塩等を脱塩することにより、天然型ヒト B C D F の立体構造を形成することに特徴がある。本発明の処理工程は、従来の酸化反応及びリフォールディング工程に比べ短時間であり、かつ反応進行中の沈殿によるヒト B C D F の収率低下を防ぐと共に、希釈等による液量増大を抑えることができる点でも優れている。

以下、酸化反応工程について具体的に記述する。可溶化したヒト B C D F 溶液を必要に応じグアニジン塩酸塩溶液で希釈してもよいが、グアニジン塩酸塩濃度は 4 ~ 7 M 好ましくは 5.0 ~ 6.0 M に調整すればよい。グアニジン塩酸塩濃度を 4 M 以下にすると、ヒト B C D F の回収率が低下するので好ましくない。なお、ヒト B C D F の濃度は溶解していれば特に限定されないが、0.1 ~ 2.0 mg/ml 好ましくは 0.5 ~ 0.8 mg/ml がよい。更に、pH 条件は、チオール基の解離を可能にする為に、塩基性物質、例えば水酸化ナトリウム水溶液等を添加して、pH を 6.5 ~ 9.0 好ましくは 8.0 ~ 8.6 に調整するのがよい。こうして、ゆっくり攪拌しながら 10 ~ 35 °C 好ましくは 20 ~ 28 °C の温度で、3 ~ 24 時間

好ましくは10～15時間、ヒトBCDFの酸化反応を行ない、天然型の分子内ジスルフィド結合を完全に形成せしめ酸化型ヒトBCDFにする。なお、 ^{13}C -NMRを利用した研究から、部分還元型ヒトBCDF（例えば、 ^{73}Cys と ^{83}Cys が結合し、 ^{44}Cys と ^{50}Cys は未結合状態にあるもの）はpH6.5以上では極めて短時間のうちに分子内ジスルフィド結合（酸化）されるが、pH5以下では比較的安定に存在するもののはりゆっくりと分子内ジスルフィド結合し、天然型の分子内ジスルフィド結合（酸化型ヒトBCDF）になることがわかる。

更に、天然型のジスルフィド結合形成をより短時間で達成する為に、還元型及び酸化型グルタチオンを適当な組み合わせ（各0.002～0.5mM）で添加することもできる。但し、グルタチオン量が多い場合には（具体的には、還元型グルタチオンの場合は1mM以上、酸化型グルタチオンの場合は0.1mM以上）、ヒトBCDFとグルタチオンとが直接ジスルフィド結合した混合ジスルフィドを形成することがあるので好ましくない。なお、ヒトBCDFの分子内ジスルフィド結合の進行は逆相HPLC（例えば、バイダック社製「214TP54」等）のクロマトグラムの保持時間の変化により確認することが

できる。こうして得られる粗精製の B C D F 溶液は 3 ~ 1 0 °C の低温条件下で少なくとも 1 週間は安定である。

次に、前述の工程で用いたグアニジン塩酸塩を主に除去しつつ、ヒト B C D F をリフォールディングする工程が必要である。本工程では液体クロマト処理、特にゲル濾過クロマト処理が有効である。使用するクロマト担体としては、多糖、デキストランもしくはそれらの化学修飾体、または合成ポリマー体で、分子量が 5 0 0 0 以下であればよい。具体的には「セファデックス G - 2 5」（ファルマシア（株））、「セルロファイン G H - 2 5」（チッソ（株））、「トヨパール H W - 4 0」（東ソー（株））、「セルロース C W - 3 5」（東ソー（株））等が用いられるが、これらに限定されるものではない。クロマト担体は、カラム充填し、緩衝液で平衡化させる。平衡化に用いる緩衝液は次工程を考慮し、5 ~ 5 0 m M の酢酸またはギ酸緩衝液（p H 4 . 0 ~ 5 . 8）、そのカウンターカチオンとしてナトリウムイオン、カリウムイオン、アンモニウムイオン等が使用可能である。前工程で得たヒト B C D F 溶液を該緩衝液で平衡化した担体 1 m l あたり 0 . 1 5 ~ 0 . 2 4 μ l 負荷後、該緩衝液で展開溶離し、ヒト B C D F 画分を得る。この際、

ヒト B C D F 溶液中のきょう雑成分（菌体由来蛋白質、糖蛋白質、糖脂質等）も併せて除去する為には、クロマト担体を選択し、かつ平衡化緩衝液の濃度や pH をコントロールすることにより、より高い精製効果を与えることが可能である。例えば、クロマト担体として「セファデックス G - 2 5」、平衡化緩衝液に pH 4. 7 ~ 5. 3 好ましくは 4. 9 ~ 5. 1 で 5 ~ 1 5 m M 好ましくは 8 ~ 1 0 m M の酢酸ナトリウム緩衝液を用いると、きょう雑成分は該クロマト担体に比較的強い親和性を示し、ヒト B C D F 画分とグアニジン塩酸塩及びきょう雑成分はより良く分離される。

こうして、該ゲル濾過クロマト工程で得られるヒト B C D F は、天然型 B C D F の分子内ジスルフィド結合及び立体構造を有するものであり、その蛋白質純度は、分析用逆相 H P L C 及び S D S - P A G E の分析から少なくとも 8 0 % 以上、通常は 9 0 % 以上である。また、該画分は沈殿物をほとんど含まない清澄溶液で、3 ~ 1 0 °C の低温下で無菌的に保存することで、少なくとも 1 0 日間は安定である。なお、酸化反応及びリフォールディング処理工程の反応の進行は、システインやフェニルアラニン等のアミノ酸のカルボニル炭素を ^{13}C で選択的に標識

したヒト B C D F の ^{13}C -NMR を測定することにより確認できる。

こうして得られるヒト B C D F 溶液から医薬グレードのヒト B C D F を調製する為には、更にイオン交換クロマトグラフィー及び逆相 H P L C による精製を行うことが必須であり、これらにより更に残存するきょう雑成分、特に微生物菌体由来蛋白質、エンドトキシン及びヒト B C D F の一次構造変異体を除去することができる。ここでいうヒト B C D F の一次構造変異体とはペプチド結合切断物や構成アミノ酸の酸化体等をさし、通常培養及び可溶化の段階で生成しているものと推定される。

イオン交換クロマトグラフィーによる処理を行う場合は、特に含有されるきょう雑成分及びエンドトキシンの殆どを除去することができる。ここで用いるイオン交換体は、陽イオン交換クロマト担体及び陰イオン交換クロマト担体のいずれでもよい。

陽イオン交換クロマト担体を用いる場合は、多糖、デキストラン、合成ポリマー等をベースとした弱酸性又は強酸性陽イオン交換体をリガンドに有するゲルであれば何でもよく、例えば、「CMセファロース FF」（ファルマシア（株））、「CMセルロファイン C-500」（チッソ（株））等がある。これを、

カラムに充填し、酢酸又はギ酸緩衝液 (pH 4.5 ~ 5.5) で平衡化しておき、ヒト B C D F 溶液を負荷 (クロマト担体 1 ml あたり蛋白質 1 ~ 10 mg) して吸着せしめた後、十分に平衡化緩衝液で洗浄する。その後、平衡化緩衝液に塩類、例えば塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム、ギ酸ナトリウムもしくはそれらのナトリウム塩のかわりにカリウム塩またはアンモニウム塩をグラジエント (濃度勾配) 変化をつけて添加し、ヒト B C D F を溶出する。例えば、10 mM 酢酸ナトリウム平衡化緩衝液 (pH 5.0) 及び 0.5 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) を使用して溶出する。その際、後者の割合を順次高める (リニアグラジエント溶出)。なお、溶出液の総使用量は、カラム容量の 10 倍程度とすればよい。溶出液として用いる酢酸又はギ酸緩衝液の pH は、平衡化緩衝液より 0.5 ~ 1.0 上昇させてもよい。こうして得られるヒト B C D F は天然型ヒト B C D F であり、該画分の蛋白質純度は少なくとも 95% 以上、通常 98% 以上で、エンドトキシン含量は蛋白質 1 mg あたり 0.5 エンドトキシニンユニット (EU) 以下である。

一方、陰イオン交換クロマト担体を用いる場合は、多糖、デキストラン、合成ポリマー等をベースとした弱塩基性または強塩基性陰イオン交換体をリガンドに有するゲルであれば何でも

よく、例えば、「D E A E セファロース F F」（ファルマシア（株））、「D E A E セルロファイン A - 5 0 0」（チッソ（株））等が用いられる。これを、カラムに充填し、p H 7. 5 ~ 1 0. 0 で緩衝作用を有する緩衝液（例えば、トリス、ジエタノールアミン等）で予め平衡化しておき、ヒト B C D F 溶液を負荷（クロマト担体 1 ml あたり蛋白質 1 ~ 1 0 mg）した後、十分に平衡化緩衝液で洗浄する。

この際、該ヒト B C D F 溶液は前述の変性剤を含まないヒト B C D F 溶液に該平衡化緩衝液を添加し、p H を 8. 5 ~ 9. 5 に調整したものがより好ましい。

その後、平衡化緩衝液に塩類、例えば塩化ナトリウム又は塩化カリウム等の塩化物をグラジエント変化をつけて添加し、ヒト B C D F を溶出する。例えば、5 0 m M トリス - 塩酸塩平衡化緩衝液（p H 8. 5）及び 0. 5 m M 塩化ナトリウム水溶液を使用して溶出する。その際、後者の割合を順次高める（リニアグラジエント溶出）。なお、溶出液の総使用量は、カラム容量の 1 0 倍程度とすればよい。得られるヒト B C D F はもちろん天然型ヒト B C D F であり、該画分の蛋白質純度は 9 0 % 以上、エンドトキシン含量は蛋白質 1 mg あたり 5 0 E U 以下である。

上記の陽イオン又は陰イオン交換クロマト処理により得られるヒトBCDF溶液は、3～10℃の低温下で無菌的に保存することで少なくとも1ヶ月間は安定である。

次に、逆相HPLCによる処理は、残存するきょう雑物、エンドトキシン及びヒトBCDF一次構造変異体を除去するのに適する。逆相HPLCクロマト担体としては、250オングストローム以上のポアサイズを有するシリカゲルまたは合成ポリマーをベースとし、炭素数が1～8個のアルキル基等をリガンドとして有するものが用いられる。例えば、「214TP1022」（バイダック社）、「YMC AP-803」（山村化学研究所（株））等があるが、これらに限定されるものではない。

溶出液として、イオンペア試薬である0.01～1.0%濃度のトリフルオロ酢酸、ヘプタフルオロ酪酸、酢酸、ギ酸及びそれらのナトリウム塩を含み、かつpH2.0～5.5に調整した水溶液と該イオンペア試薬0.01～1.0%を含むアセトニトリル、エタノール、プロパノール等の有機溶媒の組み合わせが好ましい。また、供されるヒトBCDF溶液は、適宜、蒸留水等を添加することにより、該ヒトBCDF溶液に含有す

る塩濃度を十分に低下させて最終塩濃度を100 mM以下にし、かつ該イオンペア試薬を添加してpHを2.0～5.5好ましくは3.0～3.5に調整するのがよい。該ヒトBCDF溶液をクロマト担体1 mlあたり蛋白質1～4 mg負荷した後、溶出液のグラジエント変化をつけて有機溶媒濃度をゆるやかに上昇させ、ヒトBCDFを単離精製する。きょう雑物、エンドトキシン、一次構造変異体等の不純物とヒトBCDFの分離効率は、特にイオンペア試薬の濃度とpHにより大きく影響される為、これら不純物の含有量に合わせて至適条件を選択するとよい。

こうして得られるヒトBCDFは、前記イオン交換クロマト処理と組み合わせた場合、蛋白質純度は99%以上(SDS-PAGE分析ではきょう雑物は検出されない)、エンドトキシン含量は蛋白質1 mgあたり0.1 EU以下となる。また、得られたヒトBCDFは、3～10℃の低温下で無菌的に保存することで少なくとも1週間は安定である。

さて、逆相HPLC工程で得られるヒトBCDF画分には有機溶媒を含有している為、これを除去する工程が必要である。しかしながら、単純に有機溶媒を除去したのでは、ヒトBCDFの分子間会合が進んで、ヒトBCDF会合体になり易

く、ヒト B C D F モノマーの回収率が大きく低下する場合があることを本発明者らは見出した。該ヒト B C D F 会合体は、G P C - L A L L S 法 (A. C. Ouano, Journal of Polymer Science, 12, 1151-1162, 1974) により主にヒト B C D F の二量体であることがわかり、主に疎水性相互作用に基づく非共有結合により会合していると推定される。

逆相 H P L C 工程で得られるヒト B C D F 画分のヒト B C D F は、適当量の有機溶媒の添加により可逆的に会合・解離をすることから、有機溶媒の除去に際しては特段の手法が要求される。有機溶媒除去方法としては、通常、ゲル濾過クロマト法、膜透析法、限外濾過法、減圧濃縮法、凍結乾燥法及び冷却相分離法 (特開平 1 - 8 3 0 9 4 号公報参照) 等が考えられる。しかし、減圧濃縮法や凍結乾燥法では、該ヒト B C D F 会合体が 6 0 ~ 8 0 % も生成するので適用できない。

本発明は、好ましい除去方法として、ゲル濾過クロマト法に採用したものであり、必要に応じて前記の方法と組み合わせてももちろんかまわない。本工程で用いるゲル濾過クロマト担体は、前述のリフォールディング処理工程で用いたクロマト担体と同様のものでよい。該担体をカラム充填し、これに有機溶

媒を含むヒト B C D F 溶液を負荷した後、有機溶媒を含む展開溶媒を用い、かつ展開溶媒中の有機溶媒量を段階的（ステップワイズ）に又は経時的（リニア）に減少させて通液し、当初含有した有機溶媒を含まないヒト B C D F 溶液を分取する。すなわち、本発明は、有機溶媒を含むヒト B C D F 溶液から有機溶媒を徐々に除くことでヒト B C D F 会合体の生成を最小限に抑えることができる。

以下に具体的方法を記述する。

カラム充填したゲル濾過クロマト担体を予めアセトニトリル、エタノールまたはプロパノール等の有機溶媒を 5 ~ 50 %、好ましくは 7 ~ 15 % 含む 5 ~ 50 mM の酢酸等の有機酸又はその塩の緩衝液で平衡化しておき、これに有機溶媒を含むヒト B C D F 溶液をゲル濾過クロマト担体 1 ml あたり 0.15 ~ 0.24 ml 負荷し、該緩衝液を展開溶媒として通液し、ヒト B C D F 画分を分取する。続いて、有機溶媒を含まない 3 ~ 20 mM の酢酸、ギ酸又はクエン酸等の有機酸のアルカリ金属塩等の、pH 3.5 ~ 7.5 好ましくは 4.0 ~ 5.5 の緩衝液で前記と同様のゲル濾過クロマト担体カラムを平衡化し、前述のゲル濾過クロマト処理で得られたヒト B C D F 画分を該担体 1 ml あたり 0.15 ~ 0.24 ml 負荷し、該緩衝液で展開す

る。

こうして、ステップワイズプログラムで2段階のゲル濾過クロマト処理で得られるヒトBCDF画分は、逆相HPLC工程のヒトBCDF画分と同様の蛋白質純度を有し、ヒトBCDF会合体の含有量は10%以下、通常は5%以下であり、3～10℃の低温下で無菌的に保存することで少なくとも1週間は安定である。

しかしながら、直接、有機溶媒を含まない展開溶媒（緩衝液）でゲル濾過クロマト担体を平衡化し、有機溶媒を含むヒトBCDF溶液をフィード後、該展開溶媒だけを通液するゲル濾過クロマト処理では、展開溶媒のpH、有機酸塩の種類に関係なくヒトBCDFの40%以上が会合するので本発明の目的には適さない。ただし、1段階のゲル濾過クロマト処理でも、予めゲル濾過クロマト担体を前述のアセトニトリル、エタノールまたはプロパノール等の有機溶媒を含む有機酸又はその塩の緩衝液で平衡化した後、展開溶媒中の有機溶媒量をステップワイズグラジエントまたはリニアグラジエントのプログラムで減少させることによりヒトBCDFの会合体生成は有効に防止できるものである。

次に、ヒト B C D F を更に濃縮したい場合、及び／又はゲル濾過法により有機溶媒除去したヒト B C D F 溶液の保存中等で生成した若干量のヒト B C D F 分解物を除去したい場合は、必要に応じて、陽イオン交換クロマト処理をするのが好ましい。すなわち、多糖、デキストラン又は合成ポリマーをベースとした弱酸性又は強酸性陽イオン交換体をリガンドに有するゲル、例えば、「CMフセァロースFF」（ファルマシア（株））、「CMセルロファインC-500」（チッソ（株））などをカラムに充填し、これを10～25 mM好ましくは15～20 mMの酢酸、ギ酸もしくはクエン酸のナトリウム塩又はカリウム塩を含有する緩衝液（pH 4.0～5.5）で平衡化し、前工程で得たヒト B C D F 画分をクロマト担体1 mlあたり蛋白質10～30 mgの割合でカラムに負荷し、十分に平衡化緩衝液で非吸着分を洗浄する。その後、平衡化緩衝液に塩化ナトリウム等の塩類を10～500 mMまで経時的に添加せしめてヒト B C D F をグラジエント溶出するか、pH 6.0～6.7好ましくはpH 6.4～6.6にした5～20 mM好ましくは8～15 mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に、30～100 mM好ましくは40～60 mMになるように塩化ナトリウム等の塩を

含有させた緩衝液へ一挙に変更してヒトBCDFを溶出させるとよい。特に、後者の溶出方法は、ヒトBCDF会合体を増加させずに高濃度ヒトBCDF溶液を得るのに有効である。そしてヒトBCDFは酸性条件下で切断されやすい配列を有する(140 Asp - 141 Pro)が、保存中にこの分解物が生成した場合は当該処理法により除去することができる。こうして得られるヒトBCDF純度は該分解物含量が低下することで向上し、濃度は3~8 mg/mlと飛躍的に上昇する。

ところで、有機溶媒除去処理したヒトBCDF溶液又は続いて陽イオン交換クロマト処理で濃縮されたヒトBCDF溶液は、ヒトBCDF会合体が若干量残存する場合がある。その場合、直ちにゲル濾過クロマト処理に付して、該会合体を完全に分離、除去してもよい。この場合、デキストラン、アガロースのデキストラン架橋体、親水性シリカゲルまたは合成ポリマーをベースとするゲル濾過担体カラム例えば、「セファクリルS-200」, 「スーパーデックス75」(以上、ファルマシア(株))、「TSK G-2000SW」(東ソー(株))などを用いる。これに予め緩衝液として5~100 mM好ましくは10~20 mMのクエン酸、リン酸もしくはクエン酸とリン

酸混合物のナトリウム塩又はカリウム塩でかつ pH を 5 ~ 8 好ましくは 6.0 ~ 7.0 に調製したものをを用いて平衡化しておき、有機溶媒除去処理又は次の陽イオン交換クロマト処理で得たヒト B C D F 溶液をゲル濾過担体 1 ml あたり 0.01 ~ 0.05 ml 負荷した後、該平衡化緩衝液で展開することにより、ヒト B C D F 会合体と分離された純粋なヒト B C D F モノマーを得ることが出来る。なお、ヒト B C D F は疎水性が高く、ゲル濾過担体と親和性を有することが多いので、例えば浸透圧の調整を目的として塩化ナトリウム等の塩を添加する場合は、当該工程の後に行なうのが好ましい。

こうして、ヒト B C D F 遺伝子を組み込んだ微生物を培養して得られるヒト B C D F 培養物からのヒト B C D F を精製するに際し、

(i) ヒト B C D F 可溶化溶液の酸化反応及びリフォールディング処理工程、

(ii) イオン交換クロマト処理工程かつ逆相 H P L C 工程、

(iii) ゲル濾過クロマトによる有機溶媒除去工程、

を組み合わせ得られるヒト B C D F 溶液 (濃度は 0.1 ~ 5 mg/ml) は、銀染色法を用いる S D S - P A G E にてきょう

雑成分由来バンドが検出されず、逆相 H P L C、イオン交換 H P L C 及びゲル濾過 H P L C にて単一ピークを示し、 ^{13}C -N M R 等から、天然型ヒト B C D F であることがわかる。又、微生物（大腸菌等）由来蛋白質又はその部分精製物を抗原として常法により調製したポリクローナル抗大腸菌蛋白質抗体等を用いたウエスタンブロッティングまたは、該抗体を用いた酵素免疫測定法（E L I S A）による測定においても該ヒト B C D F 溶液中の微生物由来蛋白質は数 p p m 以下である。更に、エンドトキシン含量はヒト B C D F 1 m g あたり 0. 1 E U 以下（通常は 0. 0 1 E U 以下）であり、以上の品質純度は本発明の精製法により得られるヒト B C D F が治療を目的とする医薬品製剤の原料として使用可能であることを示すものである。本発明の方法で得られたヒト B C D F 溶液は直ちにまたは凍結や低温保存を経てしかるべき製剤化工程を経て、安定な製剤とすることができる。

（図面の簡単な説明）

図 1 は、ヒト B C D F 可溶化後、ジスルフィド結合が還元状態にあるヒト B C D F の逆相 H P L C 分析のクロマトグラムを示す。

図 2 は、リフォールディング後の正しい分子内ジスルフィド

結合を形成した天然型ヒトBCDFの逆相HPLC分析のクロマトグラムを示す。

図3は、濃縮されたヒトBCDF溶液を精製するゲル濾過クロマト工程のクロマトグラムを示す。

図4は、精製ヒトBCDFの逆相HPLCクロマトグラムを示す。

図5は、精製ヒトBCDFのイオン交換HPLCクロマトグラムを示す。

図6は、精製ヒトBCDFのゲル濾過HPLCクロマトグラムを示す。

(発明を実施するための最良の形態)

以下、本発明を実施例にて具体的に説明する。

実施例1

ヒトBCDFをコードするDNAを導入した大腸菌HB 101 / pBSF2-SD7 AJ 12448 (FERM P-10758、FERM BP-3753) を合成培地で培養し、トリプトファンプロモーターをインドールアクリル酸 (IAA) で誘導することにより、ヒトBCDFを不溶性顆粒として菌体内に著量に蓄積させた (特開平3-53884号公

報記載の方法)。

この顆粒を常法(特開昭61-257931号公報記載の方法)に従い、顆粒懸濁液(10 mM EDTA, 1.6 L)に調製後、グアニジン塩酸塩を最終濃度6 Mになる様に添加し、室温にて、pH約5.5で4時間攪拌し、ヒトBCDFを可溶化した。

ヒトBCDF量は図1に示した様に、逆相HPLCカラム(バイダック社製「214TP54」, 4.6 mmφ×250 mm)により分析した(以下、同様の方法)。分析条件を第1表にまとめて示す。

第1表: HPLC分析条件

カラム: バイダック「214TP54」		
溶出液: A, 0.1% TFA		
溶出液: B, 0.1% TFAかつ80% アセトニトリル		
溶出プログラム: 1 ml/min (リニアグラジエント溶出)		
時間(min)	A (%)	B (%)
0	60	40
27	25	75
30	0	100
検出: 280nm (0.04 Abs)		

次に、ヒト B C D F 濃度が 0.7 mg/ml になるように 6 M グアニジン塩酸塩水溶液を添加した後、最終濃度 10 mM のトリス-塩酸塩、及び若干量の水酸化ナトリウム水溶液を添加することにより pH を 8.5 に調整した。室温にて緩やかに 15 時間攪拌した後、分子内ジスルフィド結合を有するヒト B C D F に変換した。該ヒト B C D F の逆相 H P L C 分析（分析条件は前記と同様）によるピークは抽出直後のヒト B C D F のピークに比べ保持時間が約 2 分間短縮した（図 2）。

得られた溶液のうち 2.4 L を 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）で平衡化した「セファデックス G-25」カラム（25.2 cmφ × 25 cm、ファルマシア社製）に添加後、該緩衝液で展開して、ヒト B C D F 画分 2.9 L を得た。ヒト B C D F 純度は約 92%、供した蛋白質の 88% を回収できた。

これらの工程を繰り返して得たヒト B C D F 画分 4.5 L を、該緩衝液で平衡化した「CM-セファロース FF」カラム（11.3 cmφ × 9 cm、ファルマシア社製）へ負荷し、1 L の該緩衝液で洗浄した。その後、該緩衝液及び 0.5 M 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）を用いて溶出した。その際、後者の割合を順次高めた（リニアグラジエント溶出法（流速 100 ml/min））。なお、溶出液の総使用量は、カラム容積の 10 倍

量とした。かくして、ヒトBCDF画分を得た。ヒトBCDF純度は約98%、供した蛋白質の75%を回収した。エンドトキシン含量は0.3 EU/mgヒトBCDF以下であった（生化学工業（株）製、LALアッセイキット「トキシカラーシステム」による）。

得られたBCDF画分のうち100ml（ヒトBCDF 260mg）を蒸留水200mlで希釈し、塩濃度を1/3に低下させた後、2Nギ酸水溶液を滴下してpHを3.5に調整し、更に最終濃度10%のアセトニトリルを添加して室温で5分間、緩やかに攪拌した。これを0.5%ギ酸ナトリウム緩衝液（pH 4.0）で平衡化した逆相HPLCカラム（バイダック社製「214TP1022」、22mmφ×250mm）に負荷し、該緩衝液にアセトニトリルを最終濃度60%になるように添加した溶出緩衝液（B液）とのリニアグラジエント溶出法（流速9ml/min）により、ヒトBCDF画分63ml（ヒトBCDF 190mg）を得た。該処理を同様に繰り返して精製したところ、ヒトBCDF純度は99%以上（逆相HPLC, SDS-PAGEによる）、エンドトキシン含量は0.01 EU/mgヒトBCDF以下であり、負荷したうち75%を回収出来た。

次いで、前工程のヒトBCDF画分63mlを20mM酢酸カ

つ10%アセトニトリルの緩衝液で平衡化した「セファデックスG-25」カラム(9cmφ×5cm、ファルマシア社製)に負荷し、該緩衝液で展開し、ヒトBCDF画分150mlを得た。該カラムを今度は5mM酢酸ナトリウムの緩衝液(pH4.5)で平衡化し、前工程画分のうち、75mlを負荷し、該緩衝液で展開し、ヒトBCDF画分85mlを得た。これら2段階ゲル濾過工程で、負荷したヒトBCDFのうち70%を回収すると共に溶液中のアセトニトリルを除去した。当該工程で生成したヒトBCDF会合体量は約5%であった。

次に、20mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)で平衡化した「CM-セファロースFF」(5cmφ×2.5cm、ファルマシア社製)に前工程で得たヒトBCDFの総合画分1.3Lを負荷し、100mlの該緩衝液で洗浄後、10mMクエン酸ナトリウムかつ50mM塩化ナトリウムの緩衝液(pH6.5)で一挙に溶出し、濃縮ヒトBCDF画分110ml(ヒトBCDF750mg)を得た。ヒトBCDF会合体量は5%以下、負荷したうち75%のヒトBCDFを回収すると共に濃度は6.8mg/mlまで上昇した。

更に、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)で

平衡化した「スーパーデックス75」 prep grade
(6 cmφ × 60 cm、ファルマシア社製) に対し、前工程で得た
濃縮ヒトBCDF溶液70 mlを負荷し、該緩衝液で展開して、
ヒトBCDFモノマー画分70 ml(精製ヒトBCDF 300
mg)を得た(図3の斜線部分)。

この精製ヒトBCDFは、逆相HPLC、イオン交換
HPLC、ゲル濾過HPLCの各分析により単一ピークを示し
(図4, 5及び6参照)、SDS-PAGE(銀染色)に
より単一バンドを示した。第2表(a)~(c)にこれらの
HPLCの分析条件を示す。

第2表：HPLC分析条件

(a) 逆相HPLCクロマト条件 (ヒトBCDF, 25 μ g)カラム：「214TP54」(4.6mm ϕ ×250mm, バイダック)

溶出液：A, 0.05%テトラフルオロ酪酸

B, 0.05%テトラフルオロ酪酸かつ80%アセトニトリル

溶出プログラム：1ml/min (リニアグラジエント溶出)

時間(min)	A (%)	B (%)
0	50	50
20	25	75
22	0	100

(b) イオン交換HPLCクロマト条件

カラム：「TSK SpNPR」(4.6mm ϕ ×3.5mm, 東ソー製)

溶出液：A, 0.01M酢酸ナトリウム, pH 5.0

B, 0.5 M酢酸ナトリウム, pH 5.5

溶出プログラム：1ml/min (リニアグラジエント溶出)

時間(min)	A (%)	B (%)
0	100	0
1.0	80	20
6.0	30	70
6.5	0	100
7.0	0	100

(c) ゲル透過HPLCクロマト条件 (精製ヒトBCDF, 250 μ g (100 μ l))カラム：「Superdex 75HR」10/30 (1cm ϕ ×30cm, ファルマシア製)

溶出液：10mMクエン酸かつ 8.7mMリン酸

pH 7.0 (水酸化ナトリウム水溶液で調整)

流速：0.8ml/min

図5中、約0.5分のピークはインジェクションショックによるものであり、そして6.37分のそれは分析中に生じた凝集体によるものである。また、図6中、約19分のピークはサンプル中の塩によるものである。

また、ポリクローナル抗大腸菌抗体を用いるウエスタンブロットティングでもバンドは検出されず、また、同抗体を用いた酵素免疫測定法による測定でも大腸菌由来蛋白質の混入は数 ppm 以下であり、大腸菌由来蛋白質の混入が充分低いレベルであることが示された。LALアッセイによるエンドトキシン含量は 0.01 EU / μ g ヒトBCDF 以下であった。以上の精製工程によるヒトBCDFの総合回収率は15%であった。

第3表に本実施例の精製の概要を記した。

第3表：ヒトBCDF精製の概要

精製工程	試薬・条件	精製効果	工程収率	トータル収率
不溶性顆粒回収	菌体破碎・遠心分離	可溶性菌体成分の除去	—	—
可溶化	6Mグアニジン塩酸塩 pH約 5.5	ヒトBCDFの完全な可溶化	100%	100%
酸化	6Mグアニジン塩酸塩 pH約 8.5 室温下15時間	天然型ジスルフィド結合の形成	90%	90%
リフォルディング	「セファデックスG-25」 10mM酢酸ナトリウム pH 5.0	天然型高次構造の形成、グアニジン塩酸塩及び不溶性菌体成分の除去	88%	79%
陽イオン交換クロマトグラフィー	「CMセファロースFF」 酢酸ナトリウム リニアグラジエント pH 5.0→5.5	可溶性菌体成分の除去 エンドトキシン の除去	75%	59%
逆相HPLC	バイダックC ₄ (300Å) 0.5%ギ酸ナトリウム pH 4.0 アセトニトリル リニアグラジエント	ヒトBCDF類縁体（一次構造変異体）の除去 エンドトキシン の除去	75%	45%
脱有機溶媒	「セファデックスG-25」 20mM酢酸、10%アセトニトリル（1段目）、 5mM酢酸ナトリウム（2段目）	アセトニトリルの除去 ヒトBCDF会合体の生成防止（5%以下）	70%	31%
陽イオン交換クロマトグラフィー	「CMセファロースFF」 20mM酢酸ナトリウム →10mMクエン酸ナトリウムかつ50mM NaCl, pH 6.5 ステップワイズグラジエント	ヒトBCDF濃縮ペプチド結合切断物の除去	75%	23%
ゲル濾過	「スーパーデックス75」 10mMクエン酸ナトリウム, pH 6.0	ヒトBCDF会合体の除去	65%	15%

実施例 2

実施例 1 と同様にして得られた可溶化したヒト B C D F 溶液 (20 ml) を用いて、以下に述べる以外は実施例 1 と同様の方法で酸化反応及びリフォールディング処理をした。すなわち、ヒト B C D F 濃度を一定 (0.7 mg/ml 又は 0.17 mg/ml) にして、グアニジン塩酸塩濃度を 2 M ~ 6 M 又は 0.6 M、還元型グルタチオン及び酸化型グルタチオンの濃度をそれぞれ 10 mM ~ 0 mM 及び 1 mM ~ 0 mM の条件下で酸化反応、続いてゲル濾過クロマト処理を行なった。なお、ゲル濾過条件は第 4 表に示す通りである。

第 4 表 : ゲル濾過条件

カ	ラ	ム	: 2.6 cm ϕ × 18 cm (96 ml)
充	填	剤	: 「セファデックス G - 25」 (ファルマシア (株))
展	開	液	: 10 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.0
検	出		: 吸光度 (280 nm)
サ	ン	プ	ル 容 量 : 20 ml

その結果は、第 5 表に示すとおりであった。

第5表：ゲル濾過クロマト処理

酸化条件	回収率*	形成されたジスルフィド結合**
(1) 2M グアニジン塩酸塩 pH 8.0 還元型グルタチオン 10mM 酸化型グルタチオン 1mM	20 %	天然型
(2) 4M グアニジン塩酸塩 pH 8.5 還元型グルタチオン 10mM 酸化型グルタチオン 1mM	46 %	天然型及び混合ジスルフィド結合の混合物
(3) 6M グアニジン塩酸塩 pH 8.5 還元型グルタチオン 1mM 酸化型グルタチオン 0.1mM	90 %	天然型及び混合ジスルフィド結合の混合物
(4) 6M グアニジン塩酸塩 pH 8.5 還元型グルタチオン 0.01mM 酸化型グルタチオン 0.002mM	90 %	天然型
(5) 6M グアニジン塩酸塩 pH 8.5 還元型グルタチオン 添加せず 酸化型グルタチオン 添加せず	90 %	天然型及び分子間ジスルフィド結合 (ヒトBCDF二量体)の混合物
(6) 0.6M グアニジン塩酸塩 pH 8.5 還元型グルタチオン 1mM 酸化型グルタチオン 0.1mM ヒトBCDF 0.17mg/ml	38 %	天然型。なお、溶液中に還元型が 36%及び沈澱物中に還元型が22% 存在した。

* 回収率は、酸化反応開始時の還元型ヒトBCDF量を100%としたときの15時間後の天然型ヒトBCDFの生成率を示す。

** 形成されたジスルフィド結合の確認は、逆相HPLC（分析条件は図1に同じ）による。

註) 上記酸化条件(1)～(5)のヒトBCDF濃度は、全て0.7mg/mlである。

第5表中の(3)の条件では、酸化反応の進行が速く(3~6時間で終了)、ヒトBCDF回収率も高いが、形成されたジスルフィド結合の中にはグルタチオンとの混合ジスルフィドが含まれていた。同表(4)の条件では、酸化反応の進行は同表(3)の条件より遅いが(10~15時間要す)、ヒトBCDF回収率は高く、形成されたジスルフィド結合は天然型のみであった。同表(5)の条件では、ヒトBCDF回収率は高いが、ヒトBCDFの数%が分子間ジスルフィド結合したヒトBCDF二量体を形成していた。また、同表(6)のように、ヒトBCDF濃度を0.17mg/mlまで希釈してもグアニジン塩酸塩濃度が充分高くないとヒトBCDFを効率よく回収できないことがわかった。これは、原料である可溶化したヒトBCDFが再び沈澱(殆ど、ジスルフィド結合を形成していない還元型のヒトBCDF)したことによる。なお、ヒトBCDF濃度を高くすると沈澱画分に失う比率が更に高まった。

こうして、高濃度グアニジン塩酸塩及び低濃度チオールジスルフィド試薬を用いることにより、グルタチオンとの混合ジスルフィド結合やヒトBCDFの分子間ジスルフィド結合を防止でき、天然型のヒトBCDFを高収率で得られることがわかった。

た。

なお、ジスルフィド結合形成の確認は図1に示した逆相HPLCで行い、混合ジスルフィド結合形成の確認はマススペクトル(MS)測定による分子量増加を検出することで行い、また、分子間ジスルフィド結合を形成するヒトBCDF会合体の確認は、SDS-PAGE法(非還元条件)で行った。

実施例3

公知文献(内田ら、*Journal of Biomolecular NMR*, 1, 49-64, 1991)の方法に従い、ヒトBCDF培養の栄養源として、システイン(Cys)及びヒトBCDFの一次構造上広範囲に分布しているフェニルアラニン(Phе)の各カルボニル炭素を ^{13}C で標識したアミノ酸をそれぞれ別々に用いて、標識ヒトBCDFを培養調製し、実施例1の方法でそれぞれ精製した。

ヒトBCDFの分子内ジスルフィド結合を再度リフォーミングするために、得られたヒトBCDF画分10ml中に100mMジチオスレイトール(DTT)0.04mlを添加してヒトBCDFの分子内ジスルフィド結合を還元した(逆相HPLCで確認)。続いて、塩酸でpH5に調整し、6Mグアニジン塩酸塩で平衡化した「セファデックスG-25」に通液

してD T Tを完全除去した。得られたヒトB C D F画分を6 M グアニジン塩酸塩で希釈してヒトB C D F濃度を0.7 mg/ml とした。再び、第5表の条件(4)で酸化反応及びリフォルディング処理し、得られたヒトB C D Fの高次構造を ^{13}C -N M Rを用いて観察した。タンパク質の主鎖カルボニル炭素 ^{13}C -N M Rスペクトルは溶液内のタンパク質分子の高次構造に関し、有用な指標となるものである。

2種の標識ヒトB C D Fは、本発明の精製法によるものところを再度リフォルディングしたものとで ^{13}C -N M Rスペクトルに相違はなく、それぞれのアミノ酸残基に対応するシグナルのみが観察された(C y s 4本; P h e 7本)。

従って、本発明の精製品とこれを再度リフォルディングしたヒトB C D Fの高次構造は同一かつ均一であることが分かった。

また、2種の標識ヒトB C D Fの緩衝液を0.1 Mホウ酸緩衝液(p H 8.5)で置換し、標識ヒトB C D F 1分子に対し当量のD T Tを添加し30分放置した後、 ^{13}C -N M Rスペクトルを測定した。C y s - ^{13}C で標識したヒトB C D Fの酸化型と還元型(部分還元型を含む)の ^{13}C -N M Rスペクトルの比較とC末端側の $^{73}\text{C y s}$ 及び $^{83}\text{C y s}$ を ^{13}C - ^{15}N 二重標識

法で標識したスペクトルの比較によりジスルフィド結合の有無や状態を推定できることがわかった。これによると、 ^{73}Cys と ^{83}Cys が結合し、 ^{44}Cys と ^{50}Cys は未結合状態にある部分還元型ヒトBCDFはpH 6.5以上では極めて短時間のうちに分子内ジスルフィド結合(酸化)されるが、pH 5以下では比較的安定に存在するもののやはりゆっくりと分子内ジスルフィド結合することが判明した。

ヒトBCDFの酸化及びリフォールディングについては、酸化反応の不十分さや再還元も懸念されるが、ヒトBCDFにおいては第5表の条件(4)を用いて酸化反応及びリフォールディング処理をすれば、部分還元型ヒトBCDFは生成しないことが分かった。

実施例 4

実施例1で得られた逆相HPLCのヒトBCDF画分(アセトニトリル含量45~55%)を用い、下記条件の減圧濃縮法、凍結乾燥法及びゲル濾過法により該画分中の有機溶媒除去を行った。

その結果を第6表に示した。なお、ゲル濾過法によって得られたヒトBCDF画分のアセトニトリル含量はいずれも1%以下であった。

第6表：有機溶媒除去

有機溶媒除去条件	生成したヒトBCDF会合体量*
(1) 減圧濃縮法	60～80%
(2) 凍結乾燥法	60～80%
(3) ゲル濾過法 (1段処理) 0.1%トリフルオロ酢酸、pH1.8	50～60%
(4) ゲル濾過法 (1段処理) 10mM酢酸ナトリウム、pH4.5	40～50%
(5) ゲル濾過法 (1段処理) 10mMクエン酸ナトリウム、pH6.0	40～50%
(6) ゲル濾過法 (1段処理) 10mMリン酸ナトリウム、pH8.0	40～50%
(7) ゲル濾過法 (2段処理) 20mM酢酸かつ10%アセトニトリル (1段目) 5mM酢酸ナトリウム pH4.5 (2段目)	<5%

* 生成したヒトBCDF会合体量は陽イオン交換HPLC (分析条件は図5と同じ) で確認した。ヒトBCDF会合体はGPC-LALLS法によりヒトBCDFの非共有結合による二量体であることを確認した。

第7表に第6表に記した以外の有機溶媒除去の条件を示す。

第7表：有機溶媒除去条件

(a) 減圧濃縮条件 (第6表の(1))

装置：遠心形エバポレータ「RD-31」
(ヤマト科学(株))

真空度：2 Torr

加温：40℃, 40分

サンプル量：5 ml

(b) 凍結乾燥条件 (第6表の(2))

装置：「モデルTD-3」(FTSシステムズ社)

真空度：10 m Torr

加温：5℃, 15時間

サンプル量：10 mlバイアルに5 ml入れる。

(c) ゲル濾過条件 (第6表の(3)～(7))

カラム：2.6 cmφ × 18 cm (96 ml)

充填剤：「セファデックスG-25」(ファルマシア)

展開液：第6表に示す

検出：吸光度 (280 nm)

サンプル：14.4 ml

(3)～(6) 及び (7) の1段目)

21.0 ml ((7) の2段目)

これより、ゲル濾過法において有機溶媒を段階的に減少させることによりヒトBCDF会合体の生成を顕著に抑えることができることが判明した。

(産業上の利用可能性)

本発明の精製法によれば、ヒトBCDF遺伝子を組み込んだ微生物から生産されるヒトBCDFをヒトの治療目的に使用可能な純度まで効率よく精製することができ、かつ工業的スケールに適用できることから産業上での利用が可能となる。

請 求 の 範 囲

1. ヒト B C D F 遺伝子を組み込んだ微生物を培養して得られるヒト B C D F 培養物からヒト B C D F を可溶化した還元型ヒト B C D F 可溶化溶液を酸化反応及びリフォールディング処理に付するに際し、該還元型ヒト B C D F 可溶化溶液を用いて酸化反応せしめた後、グアニジン塩酸塩濃度を 4 ~ 7 M とした酸化型ヒト B C D F 溶液をゲル濾過クロマト処理に付することを特徴とするヒト B C D F の精製法。

2. 有機溶媒を含有するヒト B C D F 溶液からゲル濾過クロマトカラムを用いて展開溶媒を通液せしめることにより該有機溶媒を除去するに際し、(i) ゲル濾過クロマトカラムに有機溶媒を含む展開溶媒で接液した後、(ii) 該ヒト B C D F 溶液をフィードし、続いて、(iii) 展開溶媒の有機溶媒量をステップワイズグラジエント又はリニアグラジエントプログラムにより (i) で用いた展開溶媒の有機溶媒量より減少せしめて通液することにより、有機溶媒を除去したヒト B C D F 水溶液を取得することを特徴とするヒト B C D F の精製法。

3. ヒト B C D F 遺伝子を組み込んだ微生物を培養して得られ

るヒト B C D F 培養物からのヒト B C D F を精製する方法において、

(i) ヒト B C D F 培養物からヒト B C D F を可溶化した還元型ヒト B C D F 可溶化溶液を用いて酸化反応せしめた後、グアニジン塩酸塩濃度を 4 ~ 7 M とした酸化型ヒト B C D F 溶液をゲル濾過クロマト処理に付する工程、

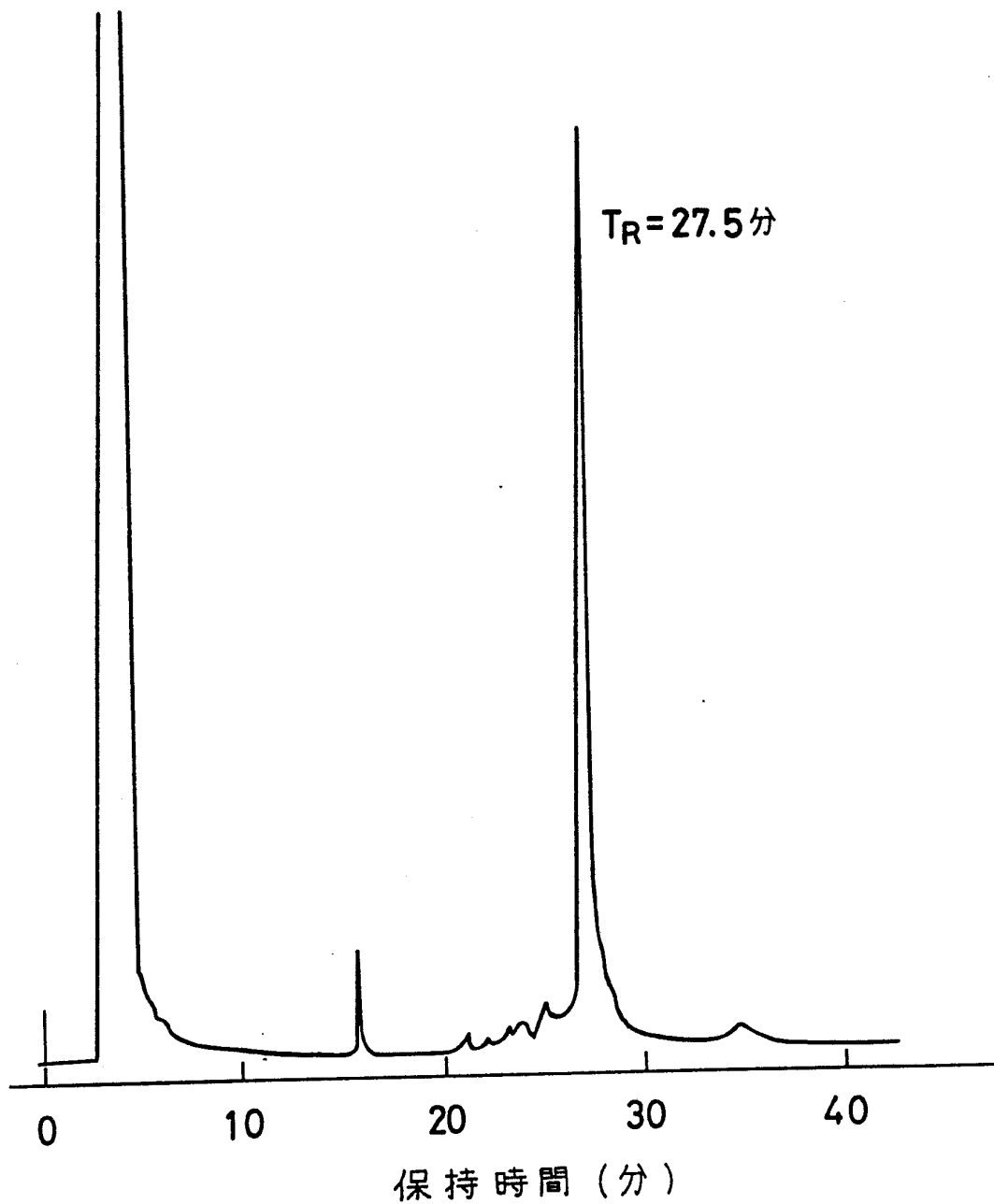
(i i) ヒト B C D F 溶液を多糖、デキストラン又は合成ポリマーをベースとしたイオン交換体をリガンドに有するゲル担体クロマトカラムにフィードした後、溶離液の塩濃度を変化せしめてヒト B C D F を精製するイオン交換クロマト処理工程、

(i i i) ヒト B C D F 溶液を、炭素数 1 ~ 8 個のアルキル基をリガンドとしかつポアサイズが 250 オングストローム以上である逆相クロマト担体を充填したカラムに接触せしめて、ヒト B C D F を精製する逆相クロマト処理工程、

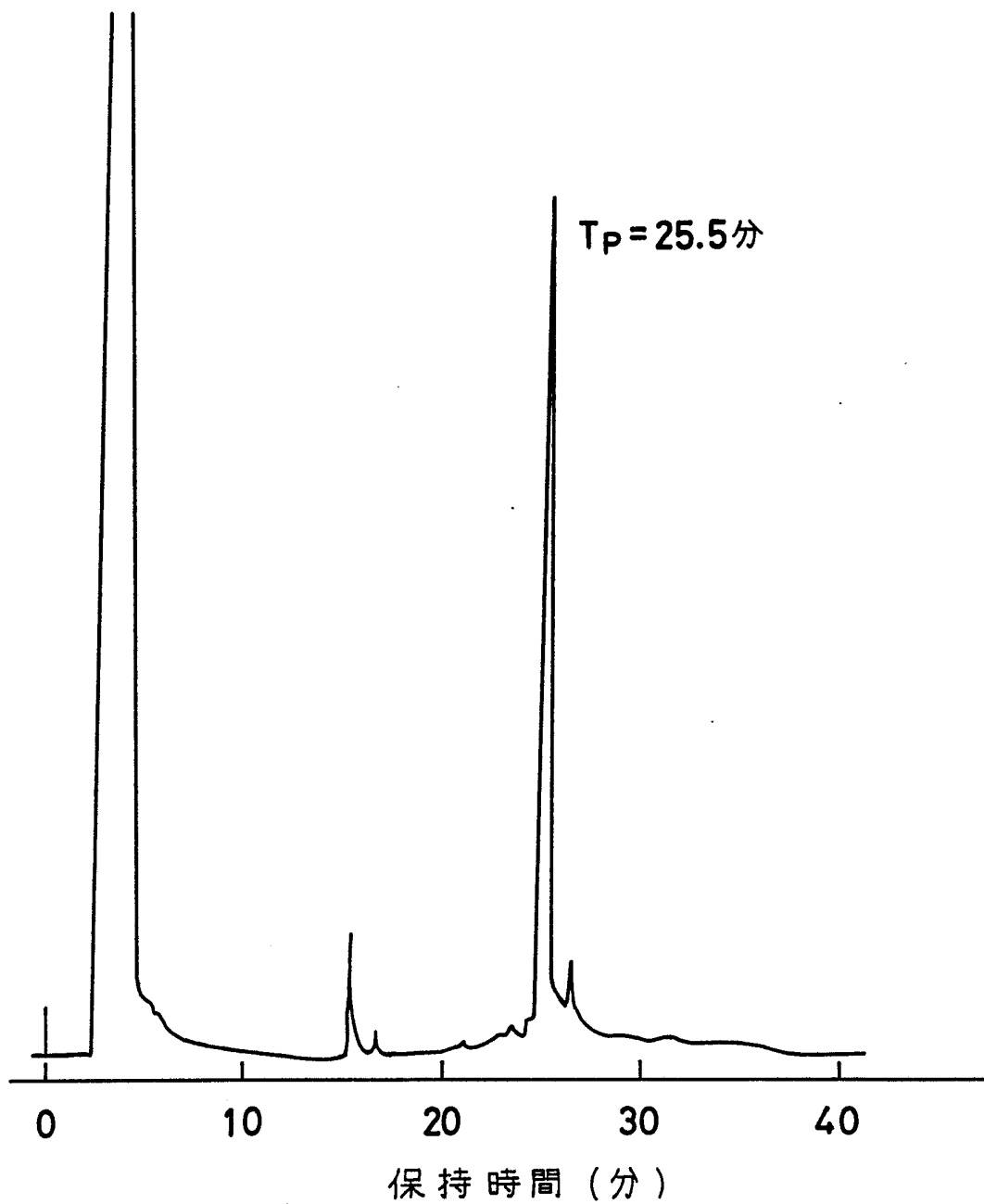
(i v) ゲル濾過クロマトカラムに初めに有機溶媒を含む展開溶媒で接液した後、ヒト B C D F 溶液をフィードし、続いて、展開溶媒の有機溶媒量をステップグラジエント又はリニアグラジエントプログラムにより、ゲル濾過クロマトカラムに初めに接液した有機溶媒を含む展開溶媒の有機溶媒量より減少せしめ

て通液することにより、有機溶媒を除去したヒト B C D F 水溶液を取得するゲル濾過クロマト処理工程、を含むことを特徴とするヒト B C D F の精製法。

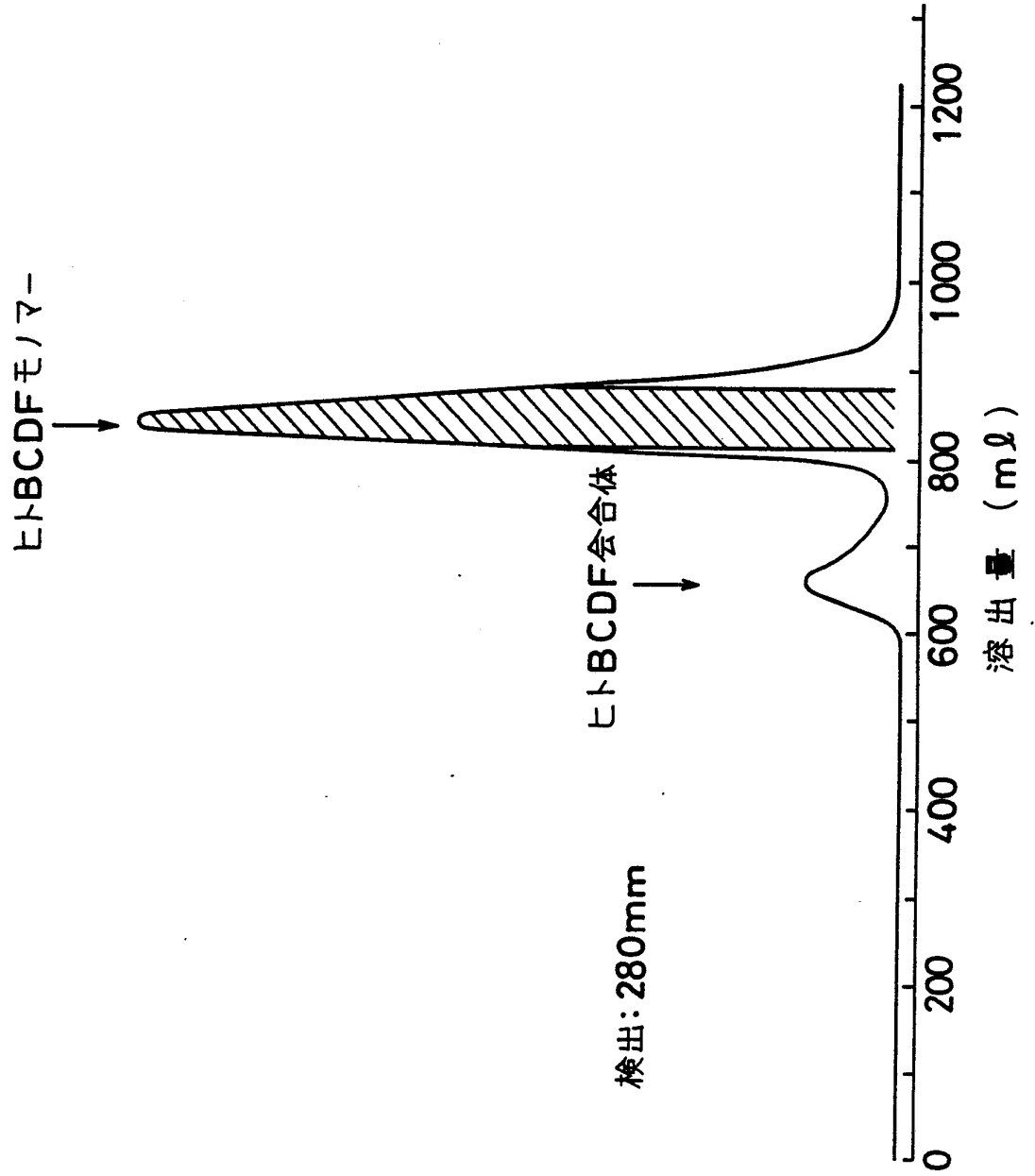
第 1 図



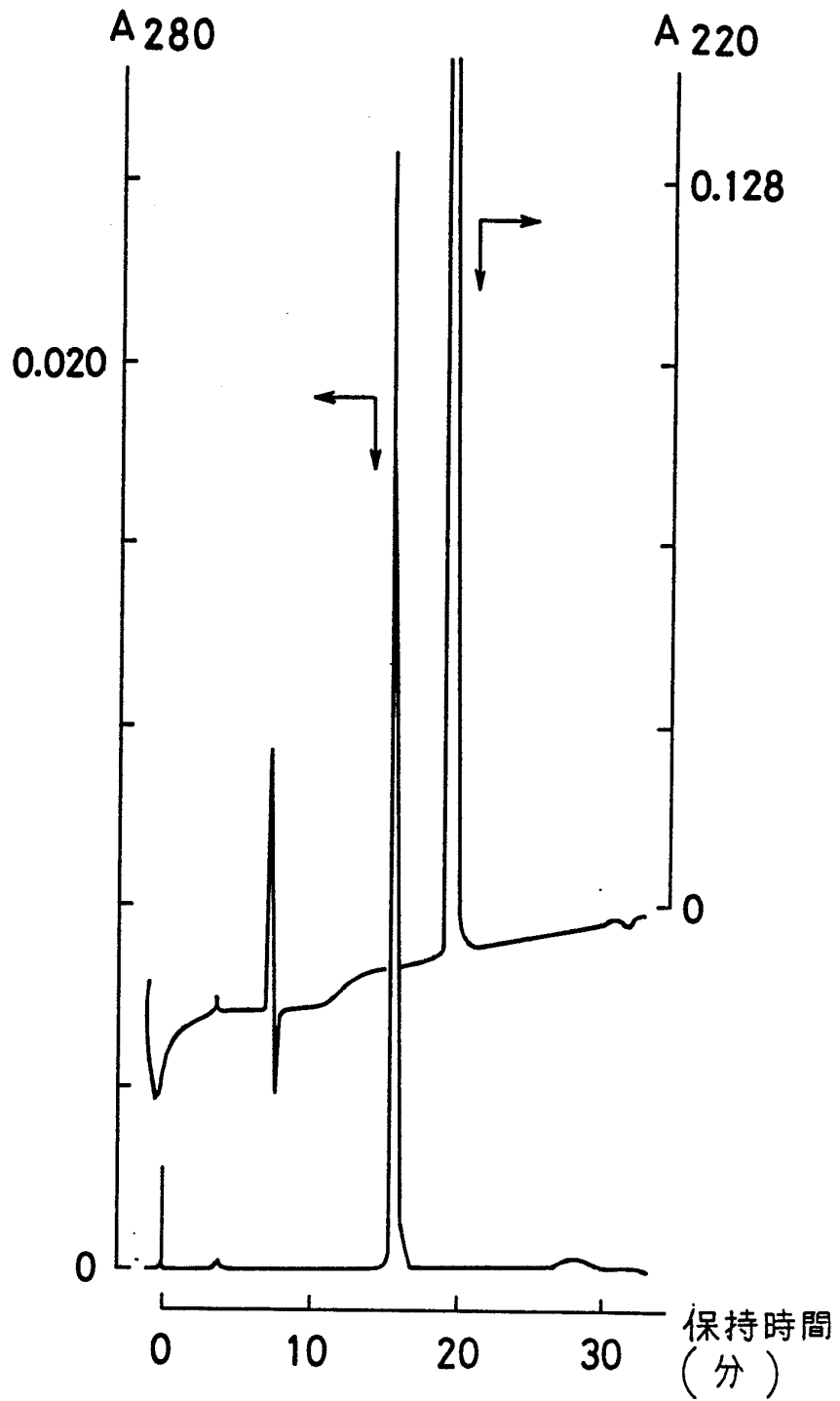
第 2 図



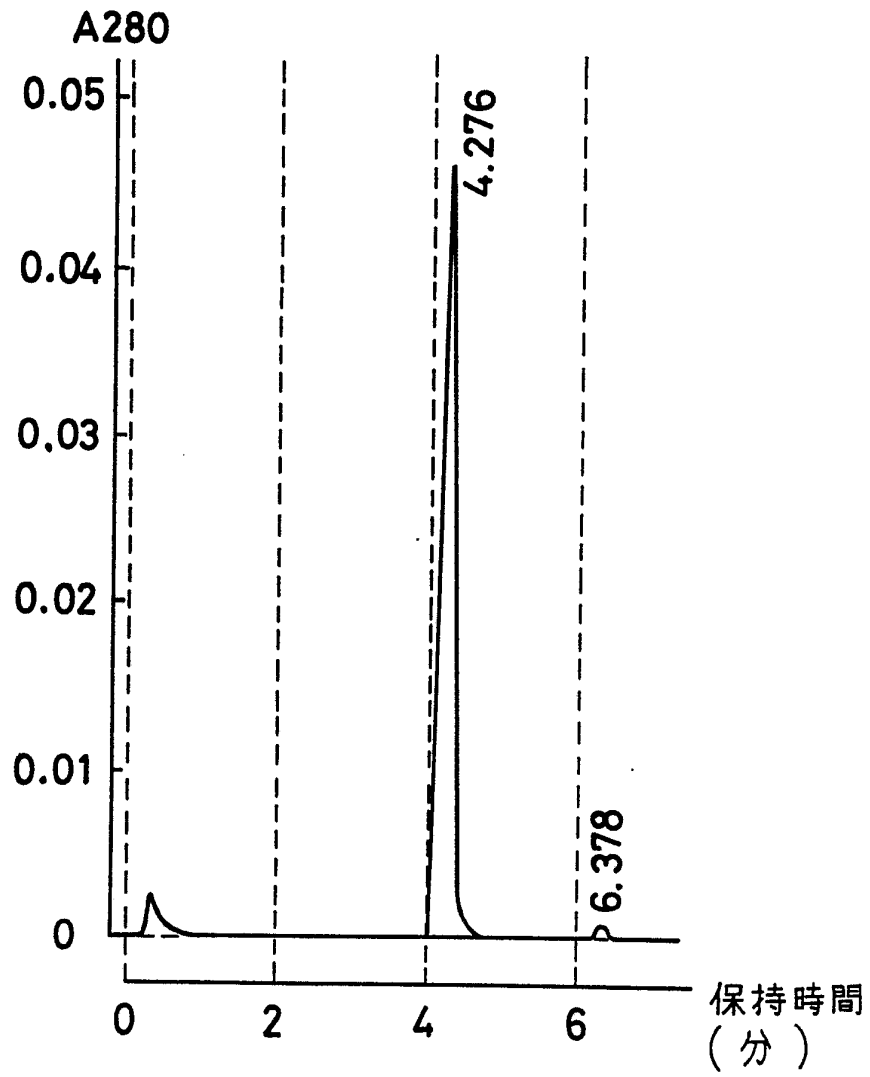
第 3 図



第 4 図

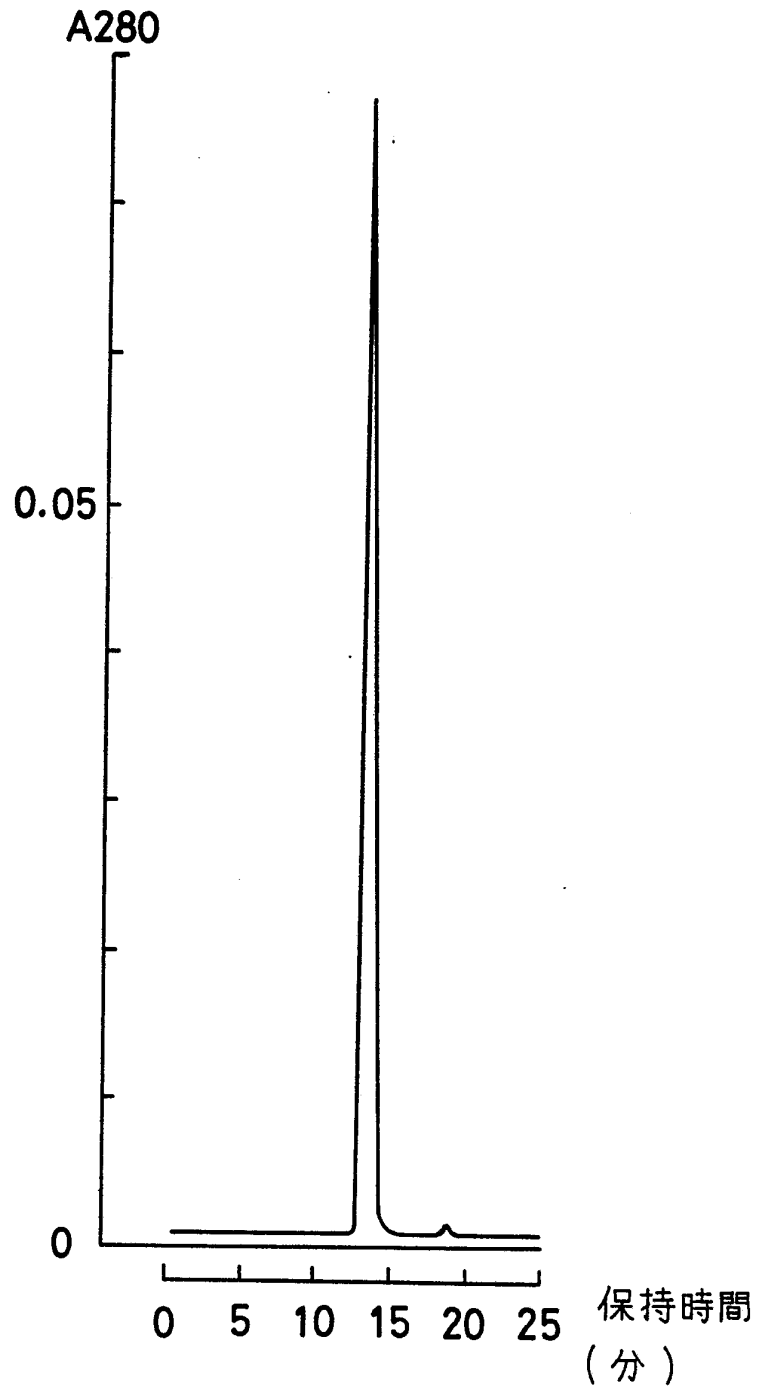


第 5 図



6/6

第 6 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP92/00204

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl ⁵ C12P21/02//C07K3/12, 3/22, 3/28, 15/04 (C12P21/02, C12R1:19)		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C12P21/00, 21/02, C07K3/12-3/28, 15/04	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y/A	JP, A, 63-157996 (Ajinomoto Co., Inc. and another), June 30, 1988 (30. 06. 88), & EP, A2, 257406	1, 2/3
Y/A	JP, A, 61-257931 (Ajinomoto Co., Inc.), November 15, 1986 (15. 11. 86), (Family: none)	1, 2/3
Y/A	JP, A, 1-257491 (Tosoh Corp.), October 13, 1989 (13. 10. 89), & EP, A1, 336324 & US, A, 5043430	1/2, 3
Y/A	JP, A, 2-186996 (Ajinomoto Co., Inc.), July 23, 1990 (23. 07. 90), (Family: none)	1, 2/3
A	JP, A, 1-6292 (Bunge (Australia) Pty. Ltd.), January 10, 1989 (10. 01. 89), & EP, A2, 288280 & US, A, 5008377	1-3
A	JP, A, 1-233299 (Consortium fur elektrochemische Industrie GmbH.),	1-3
<p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
May 15, 1992 (15. 05. 92)	June 9, 1992 (09. 06. 92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office		

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

September 19, 1989 (19. 09. 89),
& EP, A2, 325691 & US, A, 5051497

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. Claim numbers because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim numbers because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claim numbers because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

31/66 747°

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
4. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ⁴ C12P21/02//C07K3/12, 3/22, 3/28, 15/04 (C12P21/02, C12B1:19)		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C12P21/00, 21/02, C07K3/12-3/28, 15/04	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
Y/A	JP, A, 63-157996 (味の素株式会社 外1名), 30. 6月. 1988 (30. 06. 88) & EP, A2, 257406	1, 2/3
Y/A	JP, A, 61-257931 (味の素株式会社), 15. 11月. 1986 (15. 11. 86), (ファミリーなし)	1, 2/3
Y/A	JP, A, 1-257491 (東ソー株式会社), 13. 10月. 1989 (13. 10. 89) & EP, A1, 336324 & US, A, 5043430	1/2, 3
Y/A	JP, A, 2-186996 (味の素株式会社), 23. 7月. 1990 (23. 07. 90), (ファミリーなし)	1, 2/3
A	JP, A, 1-6292 (バンジ・(オーストラリア)・プロブ ライアタリー・リミテッド),	1-3
*引用文献のカテゴリー		
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリーの文献		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日 15. 05. 92	国際調査報告の発送日 09.06.92	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 内 田 俊 生	4B 8214

第2ページから続く情報

(Ⅲ欄の続き)

10. 1月. 1989 (10. 01. 89)
& EP, A2, 288280 & US, A, 5008377

A JP, A, 1-233299 (コンソルテイウム・フユア・エレ 1-3
クトロケミツシェ・インドウストリー・ゲゼルシャフト・ミッ
ト・ベシュレンクテル・ハフツング),
19. 9月. 1989 (19. 09. 89)
& EP, A2, 325691 & US, A, 5051497

V. 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. 請求の範囲 _____ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI. 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

請求の範囲 1, 3は、還元型ヒトBCDF可溶化溶液を酸化反応及びリフォールディング処理に付す、ヒトBCDF培養物からのヒトBCDFの精製法に関するものであり、請求の範囲 2は、有機溶媒を含有するヒトBCDF溶液から該有機溶媒を除去するヒトBC

1. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部しか納付されなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲 _____
3. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲 _____
4. 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたため、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

- 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。
- 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。

(VI欄の続き)

D Fの精製法に関するものである。そして、これら2つの発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。