

(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2006-502098

(P2006-502098A)

(43) 公表日 平成18年1月19日(2006.1.19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 14/765 (2006.01)	CO7K 14/765	4HO45
CO7K 1/18 (2006.01)	CO7K 1/18	
CO7K 1/20 (2006.01)	CO7K 1/20	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2004-506364 (P2004-506364)	(71) 出願人	504422070
(86) (22) 出願日	平成15年5月9日(2003.5.9)		ノース・チャイナ・ファーマスーティカル ・グループ・コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成17年1月14日(2005.1.14)		中華人民共和国 シジャアヅァング 05 0015 へべい・プロビンス へピン グ
(86) 国際出願番号	PCT/SE2003/000766		・イースト・ロード 388 アール・ア ンド・ディー・センター
(87) 国際公開番号	W02003/097692	(71) 出願人	597064713
(87) 国際公開日	平成15年11月27日(2003.11.27)		アメルシャム・バイオサイエンス・ア クチボラグ
(31) 優先権主張番号	0201518-8		Amersham Bioscience s Aktiebolag
(32) 優先日	平成14年5月15日(2002.5.15)		スウェーデン国エスエー751 84 ウブサラ ビヨルクガタン 30
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルブミン精製法

(57) 【要約】

【課題】 溶液から組換えヒト血清アルブミン(rHSA)を分離する方法を提供する。

【解決手段】 本発明では、rHSAを含む細胞培養上清(CCS)を、バイモダル高耐塩性マトリックス上での陽イオン交換、疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)、及び陰イオン交換に付す。バイモダル高耐塩性陽イオン交換マトリックスの使用によって、細胞培養上清の精製を直接(それ以上の希釈を要しないという意味)実施することができる。バイモダル陽イオン交換マトリックスの高い結合容量により、従来の陽イオン交換マトリックスよりもマトリックスの必要量が低減できる。従って、本発明では、体積及び作業コストの実質的な節約が可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

溶液から組換えヒト血清アルブミン (r H S A) を分離する方法であって、 r H S A を含む細胞培養上清 (C C S) を以下のクロマトグラフィー工程に付すことを含む方法。

- (a) バイモダル高耐塩性マトリックスでの陽イオン交換、
- (b) 疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C)、及び
- (c) 陰イオン交換。

【請求項 2】

工程 (a) に付す際の C C S の伝導率が約 1 0 m S / c m 超であり、例えば約 1 5 m S / c m 超、好ましくは約 2 0 m S / c m 超、例えば約 2 5 ~ 5 0 m S / c m である、請求項 1 記載の方法。 10

【請求項 3】

前記バイモダル陽イオン交換マトリックスが、荷電相互作用並びに水素結合及び / 又は疎水性相互作用によって r H S A と相互作用し得る、請求項 1 又は請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

工程 (a) の前に C C S を熱処理することを含む、請求項 1 乃至請求項 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

工程 (b) の前に還元剤存在下で C C S を熱処理することを含む、請求項 1 乃至請求項 4 のいずれか 1 項記載の方法。 20

【請求項 6】

工程 (b) で、フェニルリガンド、脂肪族リガンド及び / 又は複素環式リガンドを含む H I C マトリックスを利用する、請求項 1 乃至請求項 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

工程 (a) で用いる陽イオン交換マトリックスの量が、工程 (b) で用いる H I C マトリックスの約半分の量である、請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

工程 (c) が、弱陰イオン交換工程である、請求項 1 乃至請求項 7 のいずれか 1 項記載の方法。 30

【請求項 9】

弱陰イオン交換体のリガンド密度が、5 0 μ m o l / m l ゲル / マトリックス超、好ましくは 1 0 0 μ m o l / m l ゲル / マトリックス超、最も好ましくは約 1 6 0 μ m o l / m l ゲル / マトリックスである、請求項 1 乃至請求項 8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】

精製 r H S A が工程 (c) の結合画分のみから回収される、請求項 9 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質精製、特にヒト血清アルブミンの精製の分野に関する。本発明の方法は一連のクロマトグラフィー工程を利用し、その結果大規模作業での使用に適した効率的精製が得られる。 40

【背景技術】

【0002】

ヒト血清アルブミン (H S A) は、血漿中に最も豊富に存在するタンパク質であり、その役割は浸透圧の維持に寄与するとともに、栄養物及び代謝物に結合してその輸送を可能にすることである。H S A には、例えばアルブミン欠乏又はアルブミン合成の低下、出血性ショックなどによる低アルブミン血症の治療薬として、多大な医薬及び科学的な関心もたれている。利用可能な最古の方法では、H S A は血液から精製されている。しかし、こうした方法には、例えば血液供給が散発的であること、経済的に不利であること、並び 50

に肝炎ウイルス及び特にAIDSウイルスのような望ましくない物質の混入を引き起こす等の問題がある。こうした問題を避けるため、組換えHSA(rHSA)を生産するための組換えDNA技術に基づく代替法が最近開発されている。多数の組換え方法が示唆されているが、発酵プロセスからのrHSAの精製は重要な工程であって、これを改善する必要性が依然存在していることが示されている。

【0003】

欧州特許出願公開第0612761号には、遊離の非抗原性夾雑物を含まない高純度組換えヒト血清アルブミンの生産法が開示されている。この方法は、イオン交換クロマトグラフィー、ホウ酸又はその塩を用いた処理とその後の限外濾過、及び熱処理のような他の工程と組み合わせた特定の条件下で疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)を利用する。しかし、その一連の多数の工程は、複雑すぎ、工業的な大規模作業に使用するには経費がかかりすぎる。

10

【0004】

欧州特許出願公開第0570916号にも、遺伝子操作によって組換えヒト血清アルブミンを生産する方法が開示されており、その精製は、培養上清を、限外濾過、熱処理、酸処理及び再度の限外濾過に付した後、陽イオン交換体、疎水性クロマトグラフィーキャリア及び陰イオン交換体で処理し、塩析に付すという多数の工程の組合せによって行われる。しかし、上記の欧州特許と同様、この精製スキームは複雑すぎ、時間がかかり、大規模作業用の効率的手順を提供するには経費がかかりすぎる。

【0005】

欧州特許出願公開第0699687号には、rHSAの精製法が開示されており、この方法では、培地をプロテアーゼが不活性化されるまで加熱処理した後、陽イオン交換粒子の流動層と接触させる。溶出液は、次いで限外濾過、HIC及び陰イオン交換クロマトグラフィーに付してもよい。しかし、流動層の使用は従来の充填ベッドクロマトグラフィー工程とは異なる設備を要する。従って、培養プロセスからのrHSAの精製のためのさらに効率的で経済的に魅力のある手順が依然として必要とされている。

20

【特許文献1】欧州特許出願公開第0612761号

【特許文献2】欧州特許出願公開第0570916号

【特許文献3】欧州特許出願公開第0699687号

【発明の開示】

30

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の一つの目的は、大規模作業に容易に適合される組換えHSAの精製法を提供することである。これは、rHSAを含む細胞培養上清(CCS)を以下の工程：

(a) バイモダル高耐塩性マトリックスでの陽イオン交換クロマトグラフィー、

(b) 疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)、

(c) 陰イオン交換クロマトグラフィー、

に付すことを含む方法によって達成される。

【0007】

本発明の方法に含まれるプロセス工程は、上記で引用した方法よりも少ない。さらに、工程(a)で用いるバイモダル高耐塩性陽イオン交換マトリックスは、細胞培養上清を全く希釈せずに使用することができる。これは、従来法に比べると、総体積が大幅に低下し、そのためコストが大幅に低減するので、有利な特徴である。

40

【0008】

本発明のもう一つの目的は、rHSAの精製に用いるクロマトグラフィー工程の吸着力を向上させることである。これは、高塩リガンド(HSL)として知られるリガンドを含む陽イオン交換体を工程(a)で用いる上記の方法によって達成できる。このリガンドは単離すべき物質と相互作用する2以上の部位(荷電相互作用をもたらす部位と水素結合及び/又は疎水性相互作用による相互作用をもたらす部位)を含むという意味でバイモダルである。

50

【0009】

本発明の別の目的は、最終産物の着色分量をさらに低減すること、特に最終産物の純度をさらに向上することである。これは、弱陰イオン交換体を用いる上記の方法を用いることによって達成できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明の第一の態様は、溶液から組換えヒト血清アルブミン(rHSA)を分離する方法であって、rHSAを含む細胞培養上清(CCS)を以下のクロマトグラフィー工程：

- (a) バイモダル高耐塩性マトリックスでの陽イオン交換、
- (b) 疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)、及び
- (c) 陰イオン交換。

10

に付すことを含む方法を提供する。

【0011】

本発明の特定の実施形態では、工程(a)に付す際のCCSの伝導率は約10mS/cm超であり、例えば約15mS/cm超、好ましくは約20mS/cm超、例えば約25~50mS/cm、特に25~30mS/cmであり、これは、ここで用いる高塩リガンド(HSL)として知られるタイプのリガンドを含む陽イオン交換体の種類によって可能となる。このように、本発明に伴う重要な利点は、本発明ではCCSを希釈する必要がなく、そのため従来報告されたrHSAの精製法に比べて、陽イオン交換工程の際のサンプルの使用体積を格段に低減できることである。

20

【0012】

CCSはいかなる発酵プロセスであってもよいが、好ましくは細胞を例えば遠心分離で除去したものである。従って、本発明で単離するrHSAの起源は、例えば大腸菌(*Escherichia coli*)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)のような微生物細胞、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*のような酵母細胞、又は動物細胞株など、適当な宿主であればよい。好適な実施形態では、宿主細胞は、*Pichia pastoris*である。組換え宿主細胞の生産法、及び組換え宿主細胞によるrHSAのようなタンパク質の発現のための条件は周知であり、例えば、この分野の様々な特許出願については上記で引用した欧州特許0612761号を参照されたい。

30

【0013】

工程(a)の主な目的は、負に荷電した色素のような低分子量着色物質を除去することである。従って工程(a)は、高塩リガンド(HSL)として知られるタイプのリガンドを含む陽イオン交換体を利用する。これに関して、「高塩」とは、この部類のイオン交換体に特徴的な高い塩濃度に耐性をもつという上述の特性をいう。この特性は、リガンドの性状によってもたらされ、各リガンドが単離すべき物質(本発明ではrHSA)と相互作用し得る2つの基を含むという意味でバイモダルである。第一の結合モードは、荷電結合基、つまりイオン交換基によってもたらされ、そのためHSL型マトリックスはイオン交換体として分類される。第二の結合モードは第二の結合基によってもたらされ、この結合基は単離すべき物質との付加的な相互作用を与える。通常、第二の結合基は水素結合又は疎水性相互作用をもたすが、以下で詳しく説明する通り、その他の相互作用も想定される。これに関して、本明細書中で用いる「バイモダル」という用語は、2以上の結合モードが関与することを規定するものであり、2通りのみの結合モードに限定されない。本願では、HSL型の陽イオン交換体を利用するが、かかる陽イオン交換体については既に詳細が開示されており、例えば、PCT/EP01/08203(*Amersham Pharmacia Biotech AB*)を参照されたい。ただし、以下、これについて概説する。

40

【0014】

陽イオン高塩リガンド(HSL)に存在する荷電結合基は、スルホン酸(-SO₃- / -SO₃H)、硫酸(-OSO₃- / -OSO₃H)、カルボン酸(-COO- / -COO

50

H)、リン酸(-OPO₃²⁻-/-OPO₃H-/-OPO₃H₂及びホスホン酸(-PO₃²⁻-/-PO₃-H/-PO₃H₂)からなる群から選択し得る。ある好適な実施形態では、HSL型陽イオン交換体は、弱陽イオン交換体、すなわち、pKaが3を超える陽イオン交換体である。別の実施形態では、pKaが3未満の強陽イオン交換体である。かかる弱陽イオン交換体の代表例は、カルボン酸(-COO-/-COOH)、リン酸(-OPO₃²⁻-/-OPO₃H-/-OPO₃H₂)及びホスホン酸(-PO₃²⁻-/-PO₃H-/-PO₃H₂)である。

【0015】

第二結合基は1以上の水素結合原子を含むもので、陽イオン交換基から1~7原子隔てられた箇所に位置する。水素結合原子は、水素結合に関与し得る原子(水素以外のもの)である。Karger他, An Introduction into Separation Science, John Wiley & Sons (1973) 42頁参照。水素結合原子はヘテロ原子からなる基から選択することができ、例えば、酸素(カルボニル酸素、エーテル酸素、エステル酸素、ヒドロキシ酸素、スルホン酸素、スルホンアミド酸素、スルホキシド酸素、芳香族環内の酸素など)、窒素(アミド窒素、芳香族環内の窒素など)、イオウ(チオエーテルイオウ、芳香族環内のイオウなど)、並びにsp-及びsp²-混成炭素、さらにフルオロ、クロロ、ブromo又はヨードのようなハロ基(好ましくはフルオロ)がある。第二の結合基は通例、非荷電原子又はpH変化で荷電し得る原子を含む。

10

【0016】

工程(a)で用いる陽イオン交換リガンドの安定性は、概括的には、0.1又は1MのNaOH水溶液に40時間以上耐えることができると規定できる。本発明の工程(a)で有用な陽イオン交換体の適当な化学的リガンド構造の具体例については、上述のPCT/EP01/08203を参照されたい。本発明の特定の実施形態では、工程(a)では、本願の図1Aに例示したHSL陽イオン交換リガンドを用いる。

20

【0017】

本発明の工程(a)で用いる陽イオン交換体は、機能的用語で定義すれば、(a) 0.3M NaClに相当するイオン強度で参照水溶液中での陽イオン交換によってrHSAを結合できるものであり、かつ
(b) 上記物質について、上記のイオン強度で、スルホプロピル基-CH₂CH₂CH₂SO₃-を含む参照陽イオン交換体での上記物質の破過容量の200%以上(例えば300%以上、500%以上又は1000%以上)の破過容量をもたらすことができるものである。

30

【0018】

PCT/EP01/08203には、かかる参照イオン交換体について詳細に記載されている。本発明の方法で用いる陽イオン交換体における陽イオン交換体リガンドの存在量は通常、1~4000µmol/mlマトリックス(例えば2~500µmol/mlマトリックス)の間隔で選択されるが、好ましくは5~300µmol/mlマトリックスである。使用可能な好ましい範囲は、特に、マトリックス、リガンドなどの性状に応じて決まる。例えば、陽イオン交換リガンドのレベルは通常、アガロース系マトリックスでは10~300の範囲内である。デキストラン系マトリックスでは、この間隔は通常、10~600µmol/マトリックスmlである。

40

【0019】

上記PCT/EP01/08203には、HSL型陽イオン交換体に有用なマトリックス材料についても詳細に記載されている。簡単に説明すると、かかるマトリックスは、有機又は無機材料をベースとするものでよい。マトリックスは好ましくは親水性であってポリマーの形態であり、水に不溶性で水中で幾分膨潤し得る。疎水性ポリマーを親水性となるように誘導体化したのも、この定義に包含される。適当なポリマーは、例えば、アガロース、デキストラン、セルロース、デンプン、プルランのような多糖類系のポリヒドロキシポリマー、並びにポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリ(ヒドロキシア

50

ルキルビニルエーテル)、ポリ(ヒドロキシアルキルアクリレート)及びポリメタクリレート(例えば、ポリグリシジルメタクリレート)、ポリビニルアルコールのような完全な合成ポリマー、さらには、スチレンとジビニルベンゼンをベースとしたポリマー、並びに上述のポリマーの対応モノマーの2以上を含むコポリマーも包含される。水溶性ポリマーを、例えば、吸着又は共有結合による不溶物への架橋及び結合によって誘導体化して不溶性になるようにすることもできる。疎水性ポリマー(例えば、モノビニルベンゼンとジビニルベンゼンのコポリマー)への親水基の導入は、OHに変換可能な基を有するモノマーの重合、或いは最終ポリマーの親水性化(例えば、親水性ポリマーのような適当な化合物の吸着)によって行い得る。適当なマトリックスの具体例は、市販のビーズ状 Sepharose であるが、これはアガロース系のもので、Amersham Biosciences (スウェーデン、ウプサラ)から市販されている。支持マトリックス用に適した無機材料は、シリカ、酸化ジルコニウム、グラファイト、酸化タンタルなどである。

10

【0020】

上記PCT/EP01/08203には、HSL型陽イオン交換体の調製について詳しく開示されている。また、リガンド形成化合物を表面に固定する方法の総説が、Hermanson, G.T., Mallia, A.K.及びSmith, P.K.(編), Immobilisation Affinity Ligand Techniques, Academic Press, INC, 1992に記載されている。

【0021】

上述の通り、HSL型イオン交換体の利点の一つは、上述の参照スルホプロピル陽イオン交換体のような従来の陽イオン交換体で通常実施しているイオン強度よりも高いイオン強度で、カラムへの吸着、つまりリガンドへのrHSAの結合を実施できることである。結合の際に用いるべき正確なイオン強度は、タンパク質の性状、マトリックス上のリガンドの種類と濃度に依存する。有用なイオン強度は、NaCl濃度(純水)に換算して0.1M以上(例えば0.3M以上、さらには0.5M以上)であることが多い。脱離は、例えばイオン強度の上昇及び/又はpH変化によって実施し得る。イオン強度の変化に用いられる典型的な塩は、可溶性アンモニウム塩、又はリン酸、硫酸などの金属塩から選択され、特にアルカリ金属塩及び/又はアルカリ土類金属塩から選択される。同じ塩を吸着工程で用いることもできるが、低濃度で用いられることが多い。

20

【0022】

本発明の一実施形態において、工程(a)で用いる陽イオン交換マトリックスの量は、工程(b)で用いるHICマトリックスのほぼ半分の量である。従って、本発明の利点の一つは、バイモダル陽イオン交換マトリックスが結合容量に優れていることであり、従来の陽イオン交換体よりも体積を減らすことができ、運転コストの削減が可能となることである。伝導率約25~30mS/cmのような高塩濃度の存在下では、市販SP SepharoseのrHSA吸着量は約2~4mg/mL充填ゲルであるが、高塩リガンドのプロトタイプ(図1A)の吸着量は50mg/mL以上であることが判明した。従って、バイモダル高塩リガンド(HSL)を使用すると、精製プロセスが格段に簡略化かつ改善され、大規模運転コストが削減されることは明らかである。

30

【0023】

本発明の一実施形態では、工程(a)の前にCCSを熱処理する。加熱は直接、すなわち宿主細胞が存在したまま実施してもよいし、或いは細胞を遠心分離、限外濾過その他の適当な方法で除去した後に実施してもよい。加熱は、50~100で1分~数時間、好ましくは60~75で20分~3時間、最も好ましくは約68で約30分間実施し得る。加熱は、サーモスタットを備えた水浴で好適に実施される。一実施形態では、加熱前に、安定剤(例えばpH約6.0のカプリル酸ナトリウム)を添加する。その他の安定剤、例えばアクリルトリプトファン、有機カルボン酸なども使用できる。加熱後、CCSのpHを好ましくは、その後の陽イオン交換体での吸着に適した低い値(例えばpH4.5)に調整する。

40

【0024】

50

本発明の別の実施形態では、工程 (a) で得られたもの、つまり H S L 型マトリックス充填カラムの結合画分を、工程 (b) の前に熱処理する。好ましくは、システインのような還元剤を添加する。有用な還元剤のその他の例は、メルカプトエタノール、還元型グルタチオンなどである。この目的は、工程 (b) での着色物質の除去を容易にすることである。この加熱処理は概して上記と同様に実施されるが、さらに好ましい実施形態では、約 6 0 のように若干低い温度で、幾分長時間 (例えば約 6 0 分間) 実施される。

【 0 0 2 5 】

上述の通り、本発明の工程 (b) では、疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) を用いる。工程 (b) の主な目的は、r H S A のタンパク質分解生成物 (通常約 1 0 ~ 5 0 k D a の大きさのもの) を除去することである。H I C は、クロマトグラフィー分野で周知の原理であり、表面疎水性の差に基づく様々な分離用ツールを与える。親水性と考えられる多数の生体高分子でも、クロマトグラフィーマトリックスに結合した疎水性リガンドとの相互作用が可能で十分な疎水性基が露出されていることが判明している。r H S A の精製に H I C を用いることは、例えば欧州特許 0 6 9 9 6 8 7 号にみられるように、既に示唆されている。他の周知の分離原理、すなわち逆相クロマトグラフィーと比べると、H I C ではマトリックス上のリガンド密度の低いものが利用される。この特徴によって、目的タンパク質の生物学的活性を保つのに役立つ温和な溶出条件で、選択性を高めることができる。本発明に関しては、H I C 工程は、r H S A のタンパク質分解生成物を吸着させ、完全長 r H S A を非結合画分に溶出するために用いられる。マトリックス上の固定化リガンドと r H S A との疎水性相互作用は、使用する緩衝液のイオン強度を若干高めることによって増大する。現在、H I C 用には多数の市販分離材料があり、本発明は、いかなる特定のマトリックス及び / 又はリガンドにも限定されない。従って、広義には、工程 (b) で用いるマトリックスは、有機材料系のものでも、無機材料系のものでもよい。有機材料の場合、例えば、アガロース、デキストラン、セルロース、デンプンのような天然ポリマーであってもよいし、或いは、ジビニルベンゼン、スチレンのような合成ポリマーであってもよい。無機マトリックス材料の場合、シリカが周知であり、しかも常用されている材料である。好適な実施形態では、マトリックスは架橋アガロースであり、A m e r s h a m B i o s c i e n c e s (スウェーデン、ウプサラ) の S e p h a r o s e (商標) のように多数の企業から市販されている。一実施形態では、工程 (b) で用いる H I C マトリックスは、フェニル、ブチル (n - ブチルなど)、オクチル (n - オクチルなど) からなる群から選択される、r H S A と相互作用し得る 1 つ以上の疎水性リガンドを好ましくはアガロースマトリックス上に有する。或いは、エーテル、イソプロピル又はフェニルのような疎水性リガンドが、A m e r s h a m B i o s c i e n c e s (スウェーデン、ウプサラ) の S o u r c e (商標) のようなジビニル - ベンゼンマトリックス上に存在する。最も好ましい実施形態では、工程 (b) では架橋アガロースマトリックス上のフェニルリガンドを用いる。このマトリックスは好ましくは多孔性ビーズからなり、ビーズは約 9 0 % を上回る水分量、好ましくは約 9 4 % の水含量を有し得る。平均粒度は、例えば、湿性ビーズで測定して 1 0 ~ 1 5 0 μ m、好ましくは 1 0 0 未満 (例えば約 9 0 μ m) である。マトリックス上のリガンド密度は、例えば、2 0 ~ 6 0 μ m o l / m l ゲル (例えば約 4 0 μ m o l / m l ゲル) とし得る。具体例として、使用するマトリックスは、A m e r s h a m B i o s c i e n c e s (スウェーデン、ウプサラ) の P h e n y l S e p h a r o s e (商標) 6 F a s t F l o w である。この具体例では、マトリックスに F a s t F l o w の表示が用いられており、その架橋度は、ベッド高さ 1 5 c m を通して圧力 1 パールでの典型的流速が 3 0 0 ~ 4 0 0 c m / h となるプロセス適応流動特性を与えるように最適化されている。ただし、かかるプロセスパラメーターを操業規模に応じて適合させることは当業者が容易になし得ることである。この工程は、p H 約 4 ~ 8 (例えば 6 . 5 ~ 7)、塩濃度約 0 . 0 1 ~ 0 . 5 M (例えば 0 . 0 5 ~ 0 . 2 M) で実施することができる。

【 0 0 2 6 】

上述の通り、本発明の工程 (c) では、工程 (b) の微量不純物を除去、特に不要化合

物（例えば低分子量色素）を除去するため、陰イオン交換体、好ましくは弱陰イオン交換体を用いる。本発明では、最終rHSA生成物には望ましくない負に荷電した化合物を結合できる十分な量のリガンドが存在していれば、いかなる特定の陰イオン交換体物質の使用にも限定されない。陰イオン交換クロマトグラフィー工程は、不純物除去のため、例えば、pH約5.0~8.0、塩濃度0.01~0.2Mで実施できる。マトリックス材料に関しては、上述の通り、いかなる有機材料又は無機材料であってもよい。ある好ましい実施形態では、マトリックスは、Amersham Biosciences（スウェーデン、ウプサラ）のSephacrose（商標）のような架橋アガロースの多孔性ビーズからなる。これに結合したリガンドは弱陰イオン交換体であり、結合基は、例えば、第一又は第二アミンである。かかる結合基は、例えばマトリックスに近接したエーテル基を有するアルキル鎖を介して、マトリックスに結合させることができる。スパーサー、アームなどを介してマトリックスに結合基を結合させる様々な方法が文献に記載されており、上述の通り、本発明はいかなる特定の構造にも限定されない。例示的な実施形態では、式-O-CH₂CH₂-N⁺(C₂H₅)₂Hのリガンドを有するアガロースビーズ、例えばAmersham BiosciencesのDEAE Sepharose（商標）が用いられる。この実施形態では、カラムの結合画分と溶出される非結合画分の双方でrHSAが得られるが、幾つかの用途では十分である。

【0027】

ただし、最終生成物の純度が問題とされる場合には、さらに好適な別の実施形態では、エステル基を2個、好ましくはヒドロキシル基も2個含むリガンドを有するアガロースビーズを用いる。この場合の結合基は好ましくは第一アミンである。この実施形態の利点は、rHSAがマトリックスに適度に結合した画分にのみ存在し、格段に向上した純度及び操作上の利便性が得られることである。この実施形態についての例示的な一般式を図1に示すが、構造の類似したものを工程(c)に用いる方法も本発明に包含される。

【0028】

本発明は、リガンドの一般構造が同一で、上記マトリックスに類似したマトリックスを使用することも包含する。また、図1Aの式における「ゲル」という表現は、工程(b)について上述した通り、あらゆるマトリックスを包含するものである。上述のリガンドを含むマトリックスの市販品の一例は、Butyl Sepharose（商標）（Amersham Biosciences（スウェーデン、ウプサラ）製）である。後記の実施例では、160 μmol/mlのリガンド密度を用いた。従って、このマトリックスのリガンド密度を最適化すれば特に有益な結果が得られると考えられる。また、最初に記載した種類の陰イオン交換体、つまりDEAE型のマトリックスを用いる場合には、最後に記載したButyl-Sepharose媒体に比べ、必要とされる体積が大きい、例えば約3倍の体積が必要とされることが考えられる。従って、本発明の方法の好ましい実施形態では、工程(c)での陰イオン交換基として第二アミンを利用し、かつ約100 μmol/ml以上のリガンド密度を用いる。

【0029】

特定の実施形態では、陰イオン交換体のリガンド密度は、50~300 μmol/mlの範囲（例えば100~200 μmol/ml）であり、好ましくは約160 μmol/mlである。その一つの利点は、rHSAが結合画分と非結合画分の双方に存在しかねないDEAEと比較して、精製rHSAを工程(c)の結合画分のみから回収できることである。

【0030】

図面の詳細な説明

図1A~Dは、本発明での使用に適したリガンド構造を示す。さらに具体的には、図1Aは高塩リガンド(HSL)型陽イオン交換体を示し、図1Bは疎水性相互作用クロマトグラフィーマトリックス、つまりPhenyl Sepharoseを示し、図1C及び図1Dは2種類の代替的な陰イオン交換体、すなわち市販のDEAE Sepharose（図1Cはn=0の場合）と改質ブチル-Sepharose（後述の通りリガンド密

度を高めたもの)の構造を含む一般式を示す。

【0031】

図2は、工程(a)の結果、すなわち図1Aに示すリガンド構造を有する陽イオン交換マトリックスを含む20mLカラムでの未希釈細胞培養上清(CCS)147mLの陽イオン交換クロマトグラフィーを示す。画分1BにrHSAが含まれるが、画分2Aに代表される不純物からはっきりと分離されている。

【0032】

図3は、工程(b)の結果、すなわち図1Bに示すPhenyl Sepharoseを含む40mLカラムでの図2の画分2Bの疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)を示す。画分AがrHSAに相当する。

10

【0033】

図4は、工程(c)の結果、すなわち以下の実験の項に記載する改質ブチル-Sepharoseを含む40mLカラムでの図3の画分3Aの陰イオンクロマトグラフィーを示す。精製rHSAは画分4Bにある。

【0034】

図5は、本発明による3段階法を用いて得た主画分のネイティブPAGE(8~25%)とSDS-PAGE(10~15%)の分析結果を示す。銀染色した非変性PAGE(5A)では、1スポット当たり約3.3μgのタンパク質を添加した。銀染色したSDS-PAGE(5B)では、1スポット当たり約2μgのタンパク質を添加した。クマーシール染色したSDS-PAGE(5C)では、1スポット当たり約10μgのタンパク質を添加した。1はCCSであり、2はHSL陽イオン交換体(Cat.Ex.) (非結合画分)であり、3はHSL陽イオン交換体(Cat.Ex.) (結合画分)であり、4はPhenyl (非結合画分)であり、5. Phenyl (結合画分)であり、6はHiSub. Butylであり、7はHiSub. Butyl (結合画分)であり、8はHSA (対照)である。矢印はrHSAの位置を示す。

20

【実施例】

【0035】

実験

材料及び方法

rHSAを含む細胞培養上清(CCS)は、遺伝子改変P. pastoris細胞を2週間以上発酵した後、濾過で細胞を分離して調製した。CCSは緑色であり、これを約200mLのアリコートに分けて、使用時まで-20で保存した。CCSの品質は、Superdex(商標)200HR10/30(Amersham Biosciences(スウェーデン、ウプサラ))の分析カラムでのゲル濾過で確認した。この分析で、CCS中の高分子量(HMW)不純物と低分子量(LMW)不純物の相対量、並びに単量体型rHSAの大まかな含有量を得た。

30

【0036】

カプリル酸ナトリウム(オクタン酸、Na塩)及びL-システインは、SIGMA Chemical社から購入した。ヒト血漿からクロマトグラフィー法で精製したHSAは、Amersham Biosciences(スウェーデン、ウプサラ)の血漿処理部門のI. Andersson氏から入手した。各種サンプル中のタンパク濃度はBio-Radタンパク質アッセイキット(Bradford法として知られる)を用いて決定した。標準曲線の作成にはウシ血清アルブミン(BSA)を用いた。紫外/可視吸光度測定は島津UV-160A自記分光光度計(株式会社島津製作所)を用いて行った。その他使用したすべての化学物質は分析又は試薬グレードであった。

40

【0037】

分析用電気泳動は、Phastgel電気泳動システムと適当なPhastGel媒体及び緩衝液Strips(すべてAmersham Biosciences(スウェーデン、ウプサラ))を用いて実施した。電気泳動分析はネイティブPAGE(8~25%)又はSDS-PAGE(非還元、10~15%)ゲルを製造業者の推奨通り用いて実施

50

した。1スポット当たりのサンプル添加量は以下の通りであった。非変性サンプルでは約3.3 μg、SDS処理サンプルでは2 μgであり、いずれもSilver Staining Kit (Amersham Biosciences (スウェーデン、ウプサラ))で染色した。クーマシーブリアントブルー (CBB)で染色したSDS処理サンプルでは10 μgであった。

【0038】

質量分析 (精製rHSA及び血漿由来HSAの質量を求めることを目的)は、Amersham Biosciences (スウェーデン、ウプサラ)のJ. Flensburg博士がMALDI-TOF装置を用いて行った。天然HSA及び組換えHSAのトリプシン消化ペプチドマッピングもこの装置を用いて行った。後者の解析で得られた結果は、精製HSAから得たトリプシンペプチドの公知の配列と対照して、rHSAの最も可能性の高い一次配列を得るのに用いた。

【0039】

マトリックス及びクロマトグラフィーシステム

クロマトグラフィー実験は、UNICORN (商標) (Version 3.1)ソフトウェアで制御したAKTA (商標) Explorer 100システム (Amersham Biosciences (スウェーデン、ウプサラ))を用いて室温 (約23 °C)で実施した。工程 (b)で用いた分離マトリックスは、Amersham Biosciences (スウェーデン、ウプサラ)の定番商品であるPhenyl Sepharose (商標) 6 Fast Flow (high sub)である。工程 (c)では、市販DEAE Sepharose (商標) Fast Flow (Amersham Biosciences (スウェーデン、ウプサラ))又は改質マトリックスのいずれかを用いた。この改質マトリックスは、Butyl Sepharose (商標) 6 Fast Flow (Amersham Biosciences (スウェーデン、ウプサラ))を、市販品 (20 ~ 40 μmol/mlゲル)よりも高いリガンド密度 (バッチ番号U238025: 160 μmol/ml)で製造したものである。この改質マトリックスを、本明細書では「改質Butyl-Sepharose」という。さらに、工程 (a)では、HSL型のプロトタイプマトリックス陽イオン交換体 (図1A参照)を用いた。この媒体を20%エタノール中の濃厚懸濁液としてXK26/20ガラスカラムに充填して、40 mlのベッド体積を得た。300 cm/hの線流速を用いた。充填カラムを約2ベッド体積の脱イオン水を用いて洗浄して、大半のエタノールを溶出し、次いでサンプル添加前に適当な緩衝液で平衡化した。各種媒体を用いたクロマトグラフィーの各工程での緩衝液の必要量を以下の表1に示す。

【0040】

緩衝液

緩衝液A: 25 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.5

25 mLの1 M 酢酸ナトリウムと40 mLの1 M 酢酸を混合し、脱イオン水で1 Lに希釈。伝導率: 室温 (RT)で約2 mS/cm。

【0041】

緩衝液B: 50 mM リン酸ナトリウム、0.1 M NaCl、10 mM カプリル酸ナトリウム、pH 7.0

155 mLの0.2 M Na₂HPO₄と95 mLの0.2 M NaH₂PO₄と5.8 gのNaClと1.66 gのカプリル酸ナトリウムを混合し、脱イオン水で1 Lに希釈。伝導率: RTで約16 mS/cm。

【0042】

緩衝液C: 50 mM リン酸ナトリウム、0.1 M NaCl、pH 6.0

212 mLの0.2 M NaH₂PO₄と38 mLの0.2 M Na₂HPO₄と5.8 gのNaClを混合し、脱イオン水で1 Lに希釈。伝導率: RTで14 mS/cm。

【0043】

緩衝液D: 50 mM リン酸ナトリウム、0.2 M NaCl、pH 6.0

212 mLの0.2 M NaH_2PO_4 と38 mLの0.2 M Na_2HPO_4 と11.7 gのNaClを混合し、脱イオン水で1 Lに希釈。伝導率：RTで22 mS/cm。

【0044】

緩衝液E：現場洗浄(CIP)液

30%イソプロパノールを1 M NaOH溶液に溶解

実施例：rHSAの精製

細胞培養上清(CCS)の熱処理

陽イオン交換クロマトグラフィー工程の前に、まずP. pastorisの発酵時に産生したタンパク分解性酵素を不活性化すべくCCSを熱処理した。これは以下の通り実施した。

10

【0045】

CCSの凍結サンプルを融解し、10 mMカプリル酸Naを溶解した。pHを6.0に調整し、水浴(サーモスタットで68 に維持)中で30分間加熱した。サンプルを室温に冷却し、そのpHを4.5に調整した。SP Sepharose BBのような従来の陽イオン交換媒体を工程(a)に用いる場合、伝導率が約5~10 mS/cm(塩濃度約0.1 M)となるように脱イオン水を用いてCCSを2~8倍(溶液の元の伝導率による)に希釈する必要がある。

【0046】

これに対して、本発明で用いるHSL型マトリックスは高い塩濃度に格段に耐性があり、通常は、熱処理CCSを、その伝導率が約30 mS/cm未満である限り、それ以上希釈せずに工程(a)に用いることができる。

20

【0047】

工程(a)の陽イオン交換工程で得られた部分精製rHSA(すなわち、HSL型マトリックスに結合した画分)も、以下の通り、工程(b)の前に熱処理した。サンプルのpHを1 M NaOHで6.0に調整し、還元剤として機能させるためシステインを5 mM濃度となるように溶解した。この溶液を次いで60 に維持した水浴中で60分間加熱した。この操作の主な目的は、HICマトリックスによる着色物質の除去を容易にすることである。

【0048】

工程(a)：陽イオン交換クロマトグラフィーを用いた吸着

陽イオン交換媒体を、XK16/20カラム(充填ベッド体積20 mL)に充填し、平衡化のため2カラム体積(CV)の緩衝液Aで洗浄した。熱処理CCSを、150 mL Superloop(商標)(Amersham Biosciences(スウェーデン、ウプサラ))によって流速300 mL/h(150 cm/h)でカラムにかけた。rHSAの添加量は約1 g(すなわち、50 mg rHSA/mL充填ゲル)であった。サンプル添加後、非結合物を3 CVの緩衝液Aで溶出した後、5 CVの緩衝液Bで結合rHSAを溶出した。両画分を別々にプールし、1 MのNaOH溶液で結合画分のpHを6.0に調整した。この溶液を次いで上述の通り加熱し、室温に冷却し、さらに後述の通りHICカラムで精製した。プールした各画分の1 mLアリコートは、分析用(すなわち、タンパク量、 A_{350}/A_{280} 比の測定及び電気泳動分析のため)保存した。

30

40

【0049】

再生：カラムは、強く結合した物質を溶出させ、ゲルの機能を回復させるため2 CVの緩衝液Eで洗浄した。カラムを同じ溶液中に一晩放置し、次いで4 CVの脱イオン水で洗浄してNaOH及びイソプロパノールの大半を溶出させた。再生カラムを、次回の吸着/脱離プロセスに用いる前に、4 CVの緩衝液Aで再度平衡化した。

【0050】

工程(b)：HICを用いた精製工程

上記工程で得たrHSA含有画分を、150 mLのSuperloop(商標)に移し、Phenyl Sepharose(商標)Fast Flow(high sub)を充填したXK26/20カラム(充填ベッド体積40 mL)にかけた。カラムは予め3

50

C Vの緩衝液Cで平衡化しておいた。サンプル添加後、カラムを2 C Vの緩衝液Cで洗浄し、r H S Aを含む非結合物を溶出させた。結合物（主にr H S Aの4 5 k D a分解物を含む）は2 C Vの脱イオン水で溶出させた。

【0051】

再生：上記と同じ手順。

【0052】

工程(c)：弱陰イオン交換体を用いた高度精製工程

前段のH I C工程で得た2つの画分をプールして各々の1 m Lアリコート进行分析用（上記参照）に保存した。カラム（X K 2 6 / 2 0）にD E A E S e p h a r o s e（商標）F a s t F l o w又は上述の改質B u t y l - S e p h a r o s eで充填して、4 0 m Lの充填ベッド体積を得た。各充填媒体を2 C Vの脱イオン水で洗浄し、次いで約5 C Vの緩衝液Cで平衡化した。H I C工程で得られた非結合画分を1 5 0 m LのS u p e r l o o pに移して、上記の2つのカラムのいずれかに加えた。非結合画分は6 C Vの緩衝液Cで（D E A E S e p h a r o s e F a s t F l o wカラムから）、又は改質B u t y l - S e p h a r o s eカラムから2 C Vで溶出した。結合画分は、D E A Eカラムでは2 C Vの2 M N a C l溶液で、又は改質B u t y l - S e p h a r o s eカラムでは5 C Vの緩衝液Dで溶出した。流速は、全体を通して9 0 c m / hに維持した。

【0053】

再生：上記と同じ手順。

【0054】

使用した各媒体について本発明に従って最適化した溶出プロトコールを表1にまとめた。当業者であれば、上記プロセスをパイロット又は生産規模の操作へ容易に大規模化することができる。

【0055】

【表1】

表1:

各クロマトグラフィー工程で必要とされる

平衡化液、溶出液及び再生液のカラム体積数(CV)

マトリックス	平衡化	洗浄 (緩衝液)	溶出	再生	洗浄 (脱イオン水)
HSL 型陽イオン交換体	4 [A]	3 [A]	5 [B]	2 [E]	4
Phenyl-Sepharose	3 [C]	2 [C]	2 [*]	2 [E]	4
DEAE-Sepharose	5 [C]	6 [C]	2 [**]	2 [E]	4
改質ブチル-Sepharose	6 [C]	2 [C]	5 [D]		4

* 脱イオン水

** 2M NaCl

【0056】

結果

本3段階精製プロセスは段階的溶出に基づくものであり、大規模作業に容易に適合可能である。工程(c)に高リガンドB u t y l S e p h a r o s eを使用すると、非結合画分中に一群として溶出するL M W不純物が効率的に除去される。高リガンドB u t y l S e p h a r o s eを使用すると、工程(c)のためのD E A E型マトリックスの使用よりも優れたA₃₅₀ / A₂₈₀比が得られた。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

【 図 1 】 図 1 A ~ D は、本発明による陽イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィーの各種工程での使用に適したマトリックス材料を示す。

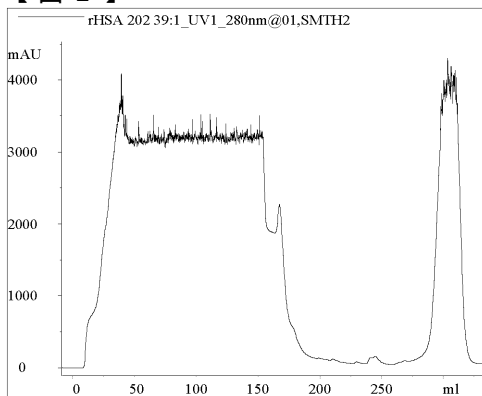
【 図 2 】 本発明の方法の工程 (a) による未希釈細胞培養上清 (C C S) の陽イオン交換クロマトグラフィーの結果を示す。画分 2 B に r H S A が含まれる。

【 図 3 】 図 2 の画分 2 B の H I C の結果を示す。r H S A は画分 3 A に溶出される。

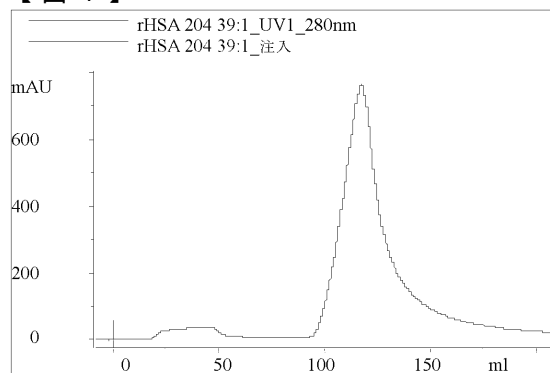
【 図 4 】 図 3 の画分 3 A の陰イオン交換クロマトグラフィーの結果を示す。精製 r H S A は画分 4 B に溶出される。

【 図 5 】 本発明による 3 段階精製プロトコルを用いて得られた主画分の電気泳動分析を示す。 10

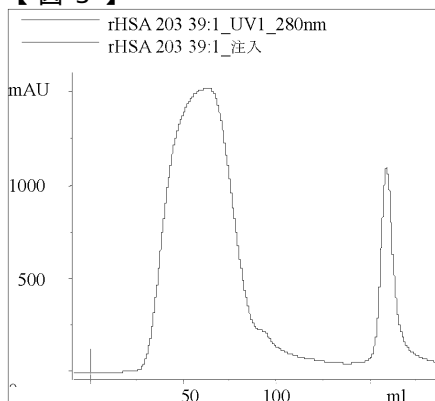
【 図 2 】



【 図 4 】



【 図 3 】



【 図 1 】

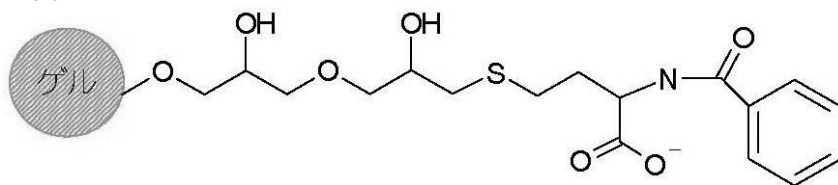


Fig 1A. 代表的 HSL 型陽イオン交換体

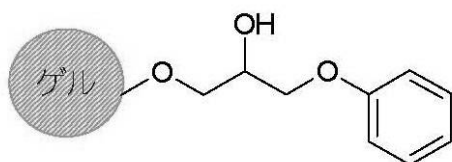


Fig 1B. 代表的 HIC マトリックス

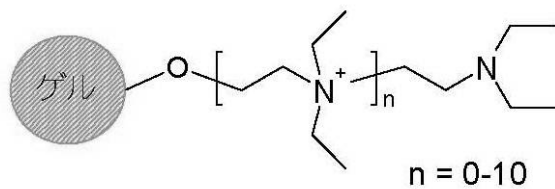


Fig 1C. 代表的陰イオン交換体

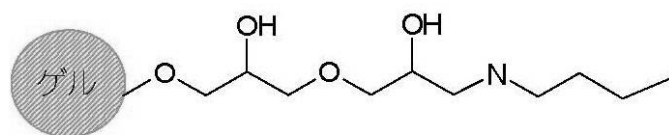
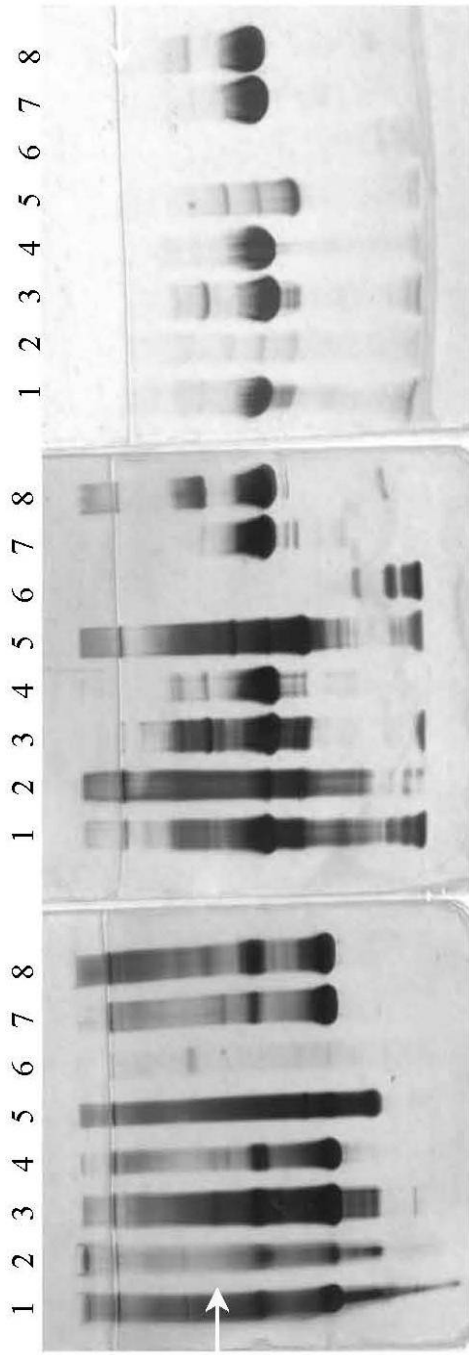


Fig 1D. 代表的陰イオン交換体 (Butyl Sepharose™)

【 図 5 】
A: ネイティブPAGE/銀染色; B: SDS PAGE/銀染色; C: SDS PAGE/クマシーBB染色



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 03/00766
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: C07K 14/765, C07K 1/16 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)		
IPC7: C07K, C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-INTERNAL, WPI DATA, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0612761 A1 (THE GREEN CROSS CORPORATION), 31 August 1994 (31.08.94) --	1-10
A	EP 0570916 A2 (THE GREEN CROSS CORPORATION), 24 November 1993 (24.11.93) --	1-10
A	WO 0205959 A2 (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB), 24 January 2002 (24.01.02) -- -----	1-10
<input 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 application or patent 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		Date of mailing of the international search report
6 August 2003		07-08-2003
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Bertil Dahl/SN Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 03/00766

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0612761 A1	31/08/94	CA 2116385 A	26/08/94
		JP 6245788 A	06/09/94
		JP 8001238 U	09/08/96
		TW 390889 B	00/00/00
		TW 408130 B	00/00/00
		US 5521287 A	28/05/96
		US 5986062 A	16/11/99
		JP 6245789 A	06/09/94
EP 0570916 A2	24/11/93	SE 0570916 T3	
		CA 2096572 A	21/11/93
		DE 69331507 D,T	29/08/02
		DK 570916 T	13/05/02
		EP 1099708 A	16/05/01
		ES 2170060 T	01/08/02
		JP 5317079 A	03/12/93
		JP 7102148 B	08/11/95
		US 5440018 A	08/08/95
		US 5521287 A	28/05/96
		US 5986062 A	16/11/99
		JP 1953732 C	28/07/95
		JP 5328991 A	14/12/93
		JP 6075513 B	28/09/94
		JP 2115757 C	06/12/96
		JP 6056883 A	01/03/94
		JP 7033398 B	12/04/95
JP 6072891 A	15/03/94		
JP 2869417 B	10/03/99		
JP 6100592 A	12/04/94		
WO 0205959 A2	24/01/02	AU 2894001 A	24/07/01
		AU 8394501 A	30/01/02
		CA 2412586 A	24/01/02
		EP 1246535 A	09/10/02
		EP 1301279 A	16/04/03
		SE 0002688 D	00/00/00
		SE 0004933 D	00/00/00

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100093908

弁理士 松本 研一

(74) 代理人 100105588

弁理士 小倉 博

(74) 代理人 100106541

弁理士 伊藤 信和

(74) 代理人 100129779

弁理士 黒川 俊久

(72) 発明者 ブリュウ, マCONNEN

スウェーデン、エス - 7 5 1 ・ 8 4 ・ ウプサラ、ピヨルクガタン・3 0、アメルシャム・バイオサイエンス・アクチボラグ(番地なし)

(72) 発明者 リー, メイ・ヤン

中華人民共和国、0 5 0 0 1 5 ・ シジャアヅァング、ヘBei・プロビンス、3 8 8 ・ ヘピング・イースト・ロード、ノース・チャイナ・ファーマスーティカル・グループ・シーオーアールピー(番地なし)

(72) 発明者 チャン, ウエイ

中華人民共和国、0 5 0 0 1 5 ・ シジャアヅァング、ヘBei・プロビンス、3 8 8 ・ ヘピング・イースト・ロード、ノース・チャイナ・ファーマスーティカル・グループ・シーオーアールピー(番地なし)

Fターム(参考) 4H045 AA20 BA10 CA43 DA70 EA20 FA72 FA74 GA23 GA25