

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4798833号
(P4798833)

(45) 発行日 平成23年10月19日(2011.10.19)

(24) 登録日 平成23年8月12日(2011.8.12)

(51) Int.Cl. F I
C O 7 K 1/14 (2006.01) C O 7 K 1/14
C O 7 K 1/30 (2006.01) C O 7 K 1/30
C O 7 K 14/765 (2006.01) C O 7 K 14/765

請求項の数 4 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2000-324030 (P2000-324030)	(73) 特許権者	000173555
(22) 出願日	平成12年10月24日(2000.10.24)		一般財団法人化学及血清療法研究所
(65) 公開番号	特開2002-128796 (P2002-128796A)		熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
(43) 公開日	平成14年5月9日(2002.5.9)	(74) 代理人	100059959
審査請求日	平成19年10月24日(2007.10.24)		弁理士 中村 稔
		(74) 代理人	100067013
			弁理士 大塚 文昭
		(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100065189
			弁理士 宍戸 嘉一
		(74) 代理人	100096194
			弁理士 竹内 英人
		(74) 代理人	100074228
			弁理士 今城 俊夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 加熱処理工程を含むヒト血清アルブミンの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

酵母由来の蛋白質である夾雑物を含有するヒト血清アルブミン溶液を、pH 8.5 ~ 9.5の範囲でかつ0 ~ 65の温度で少なくとも15分間処理して、ヒト血清アルブミンの多量体を単量体に変換する工程、及び前記工程に続いて該夾雑物の等電点近傍のpHで、50 ~ 70の範囲で0.5 ~ 5時間加熱処理することにより夾雑物を除去する工程を含み、前記pHが5.0 ~ 6.0であることを特徴とするヒト血清アルブミンの製造方法。

【請求項2】

加熱処理が、55 ~ 60で行われる請求項1に記載の方法。

【請求項3】

加熱処理が、1時間行われる請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

加熱処理が、pH 5.5 ~ 6.0で行われる請求項1ないし3のいずれか1項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト血清アルブミンの製造方法に関する。より詳細には、遺伝子組換え技術により得られる組換え型ヒト血清アルブミン(以下、rHSAと称することもある)の製造工程において、宿主由来の夾雑物(主として蛋白質)の等電点近傍で加熱処理する工程を

含む r H S A の製造方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【 従来 の 技 術 】

ヒト血清アルブミン（以下、H S A と称することもある）は、血漿中の主要な蛋白質成分で、585個のアミノ酸の単鎖ポリペプチドからなり、約66,000ダルトンの分子量を有する（Minghetti, P. P. et al.(1986) Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within 11-22 of chromosome 4. J.Biol.Chem. 261, 6747-6757）。H S A は、主に血液の正常な浸透圧の維持や血中に現れるカルシウムイオン、脂肪酸、ビリルビン、トリプトファン、薬物など様々なものと結合し、これらを運搬するキャリアーとしての役割を果たすことが知られている。純化したH S A は、例えば、外科手術、出血性ショックあるいは熱傷やネフローゼ症候群などアルブミンの喪失による低アルブミン血症の治療に使用される。

10

【 0 0 0 3 】

従来、H S A は、ヒト血漿からコーンの低温エタノール分画法あるいは該方法に準じて、H S A 画分（H S A は画分Vに分画される）を得た後、更に、種々の精製方法を駆使して製造されている。また近年、原料をヒト血漿に依存しない方法として、遺伝子組換え技術を応用して酵母や大腸菌、枯草菌にヒト血清アルブミンを生産させる技術が開発されている。酵母については、(1) Production of Recombinant Human Serum Albumin from Saccharomyces cerevisiae; Quirk, R. et. al, Biotechnology and Applied Biochemistry 11, 273-287(1989)、(2) Secretory Expression of the Human Serum Albumin Gene in the Yeast, Saccharomyces cerevisiae; Ken. Okabayashi et.al, J. Biochemistry, 110, 103-110 (1991)、(3)Yeast Systems for the Commercial Production of Heterologous Proteins; Richard G. Buckholz and Martin A. G. Gleeson, Bio/Technology 9, 1067-1072(1991)、大腸菌については(4) Construction of DNA sequences and their use for microbial production of proteins, in particular human serum albumin; Lawn, R. M., European Patent Appl. 73,646 (1983)、(5) Synthesis and Purification of mature human serum albumin from E. coli; Latta, L. et. al. Biotechnique 5, 1309-1314 (1987)、枯草菌については(6) Secretion of human serum albumin from Bacillus subtilis ; Saunders, C. W. et. al, J. Bacteriol. 169, 2917-2925 (1987)参照。

20

【 0 0 0 4 】

ヒト血清アルブミンの精製方法としては、一般に、蛋白質化学において通常使用される精製方法、例えば、塩析法、限外濾過法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル濾過クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等を用いることができる。実際には、生体組織、細胞、血液などに由来する多種類の夾雑物が混在するため、ヒト血清アルブミンの精製は、上記方法の複雑な組み合わせにより行われている。例えば、特開平5 - 317079には、ヒト血清アルブミンを産生する組換え酵母の培養上清を、限外濾過し、加熱処理、酸処理し、再び限外濾過した後、陽イオン交換体、疎水性クロマト、陰イオン交換体、塩析の各処理に供することからなる、該ヒト血清アルブミンの製造方法が記載されている。

30

【 0 0 0 5 】

この製造方法は、還元剤の存在下で加熱処理することにより、着色を抑制しようとするものである。他にも加熱処理工程を含むヒト血清アルブミンの製造方法が幾つか報告されており、加熱処理に基づく種々の効果が認められている。

40

【 0 0 0 6 】

例えば、特公平6 - 71434及び特開平8 - 116985には、遺伝子操作により調製されたヒト血清アルブミンの培養上清を、アセチルトリプトファン又は有機カルボン酸の存在下で、50 ~ 70 °C、1 ~ 5時間加熱することにより、プロテアーゼが不活化されることが記載されている。

【 0 0 0 7 】

また、特開平7 - 126182には、組換えヒトアルブミン製剤を、50 ~ 70 °C、30分間

50

以上加熱することによって夾雑微生物が不活化されることが記載されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記の組換えアルブミンの製造工程に組み入れられた加熱処理は、いずれも夾雑蛋白質の除去方法を開示するものではない。したがって、本発明の目的は、ヒト血清アルブミン中に存在する夾雑物を効果的に除去する方法を提供することにある。

【0009】

また、本発明の他の目的は、医薬品として安全性の高いヒト血清アルブミンを提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記事情に鑑みて鋭意研究を進めた結果、ヒト血清アルブミン産生組換え酵母の培養物を希釈、陽イオン交換、アルカリ処理によるアルブミン多量体の単量体化、及び限外濾過処理を行った後、得られた r H S A 含有溶液を宿主由来蛋白質の等電点近傍の pH で加熱処理することによって、該宿主由来の夾雑蛋白質が効果的に除去されることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

本発明は、夾雑物を含有するヒト血清アルブミン溶液を、該夾雑物の等電点近傍の pH で加熱処理する工程を含むことを特徴とするヒト血清アルブミンの製造方法を提供するものである。本発明はまた、該方法により得られた夾雑蛋白質を含有しない高純度 r H S A を包含する。以下、本発明について詳述する。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明の方法は、ヒト血清アルブミンの製造工程において、宿主由来の夾雑蛋白質が混在するヒト血清アルブミン溶液を宿主由来夾雑蛋白質の等電点近傍の pH で加熱処理することを特徴とするものである。この方法を実施することにより、例えば、酵母由来の夾雑物を容易に除去することができ、高純度のヒト血清アルブミンの製造が可能となる。

【0013】

本発明の加熱処理に供される対象として、遺伝子組換え技術によって得られた r H S A 産生宿主由来の夾雑蛋白質が混在する r H S A 含有溶液が挙げられる。斯かる宿主には特に制限はなく、酵母、大腸菌、枯草菌及び動物細胞などが挙げられる。好ましくは、酵母、例えば、サッカロミセス属、ピキア属が使用されるが、更に好ましくは、サッカロミセスセレピシエ A H 22 株又はその変異株が用いられる。本発明の方法は、r H S A 産生性の組換え体宿主に限らず、血漿由来の蛋白成分が夾雑物として含まれている場合にも適用することが出来る。

【0014】

本発明の加熱処理は、r H S A (又は血漿由来のヒト血清アルブミン)製造工程の任意の段階で使用することが出来る。例えば、本発明の方法は、ヒト血清アルブミンを生産する組換え酵母の培養上清若しくは酵母の破砕液、これらを適当に前処理した r H S A 含有溶液、又はイオン交換体、吸着クロマト、ゲル濾過、塩析などの処理を経て精製が進んだ段階で使用することが望ましい。好ましくは、本発明の方法は、r H S A 産生酵母の培養上清を精製水で 2 ~ 3 倍に希釈した後、陽イオン交換体、アルカリ処理及び限外濾過後に適用される。

【0015】

該陽イオン交換体処理は、通常の方法に準じて行われる。陽イオン交換体としては、スルホ - アガロース、スルホ - セルロース、スルホプロピル - アガロース、スルホプロピル - デキストラン、スルホプロピル - ポリビニル、カルボキシメチル - アガロース、カルボキシメチル - デキストラン、カルボキシメチル - セルロースなどが挙げられるが、いずれの担体を使用しても良い。例えば、50 m M 塩化ナトリウムを含む 50 m M 酢酸緩衝液 (p H 4.5) で平衡化した陽イオン交換カラムに、同 pH に調整したヒト血清アルブミン溶液を添加

10

20

30

40

50

し、洗浄後、300mM塩化ナトリウムを含む50mMリン酸緩衝液(pH9.0)で溶出しHSA画分を得る方法が取られる。

【0016】

次いで、培養又は製造工程で生じたヒト血清アルブミンの多量体を単量体化するためにアルカリ処理が行われる。多量体の単量体化には、pH8~11、好ましくは、pH8.5~9.5の範囲のアルカリ水溶液が使用される。

【0017】

アルカリ処理を行う際の温度は、必ずしも室温である必要はなく、HSA及びrHSAを変性しない温度、例えば、0~65の範囲で処理することができる。好ましくは、室温(約25)で放置する方法が取られる。

10

【0018】

ヒト血清アルブミンの多量体の単量体化は、多量体を含有する水溶液とアルカリ性溶液を混合した後、15分以上放置することにより行われる。好ましくは、3時間以上であり、上限は特に限定されない。

【0019】

アルカリ処理液のpHをアルカリ性にするのに使用される化学物質は、特に限定されない。例えば、アルカリ性有機化合物、アルカリ性無機化合物、具体的には、アンモニア、アンモニウム塩、塩基性金属水酸化物(例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム)、ホウ酸塩、リン酸塩、酢酸塩、蔞酸塩、クエン酸塩、トリスヒドロキシアミノメタン及びこれらの2種以上の混合物からなる群より選ばれる物質が挙げられる。

20

かかる化学物質は、ヒト血清アルブミンを変性させない濃度で使用される。

【0020】

アルカリ処理において、そのアルカリ処理液中にSH基を有する化合物を添加すると、HSA分子内及び/又はHSA分子間、さらにはHSAと夾雑物(主として、蛋白質と考えられる)とのミスホールディングが抑制され、より効果的に単量体化が達成される。

当該処理に用いるSH基含有化合物としては、官能基SH基を含む化合物であるならば特に限定されないが、SH基を有する低分子化合物が好ましい。具体的には、システイン、システアミン、シスタミン、メチオニンなどが挙げられるが、好ましくは、システインが用いられる。

SH基含有化合物の添加量は、1~100mg/mlのrHSA濃度に対し、0.1~50mM、好ましくは0.2~15mM、更に好ましくは0.5~5mMである。

30

【0021】

次いで、限外濾過膜(分画分子量1万)を用いてHSA含有溶液を濃縮した後、pHを夾雑物の等電点近傍に調整し、加熱処理が行われる。

【0022】

加熱処理は、好ましくは50~70、更に好ましくは55~60、最も好ましくは60で行われる。加熱時間は、好ましくは30分間~5時間、更に好ましくは1時間である。

【0023】

加熱処理する際のpHは、夾雑物の等電点付近が好ましく、例えば、酵母サッカロミセスレビジエAH22株又はその変異株をヒト血清アルブミン産生宿主とした場合、好ましくはpH4~7、更に好ましくはpH5~6、最も好ましくはpH5.5である。

40

【0024】

また、加熱処理する際のヒト血清アルブミン濃度は、該ヒト血清アルブミンが溶解する濃度であれば特に制限はないが、好ましくは、10~250mg/ml、更に好ましくは、80~120mg/mlである。

【0025】

加熱処理工程後のヒト血清アルブミンの純度は、ゲル濾過HPLC分析により測定することができる。カラムには、例えば、TSKgel G300SW(東ソー社製)を用い、0.1MKH₂PO₄/0.3MNaCl緩衝液で展開し、280nmの吸光度を測定する。コントロールとして、同様の方法により得た非加熱処理のヒト血清アルブミン溶液を用いる。

50

また、ヒト血清アルブミン非産生酵母の培養液を本法と同様の方法で粗精製したものをウサギに免疫し、得られた抗血清を用いて精製 r H S A 中に存在する酵母由来成分を、酵素免疫測定法 (E I A 法) により測定することもできる。

【 0 0 2 6 】

【 発明の効果 】

本発明によれば、宿主由来の夾雑蛋白質が混在するヒト血清アルブミン含有溶液を、該夾雑物の等電点近傍の p H で加熱処理をすることによって、該夾雑蛋白質を簡単に、且つ効果的に除去することができる。

また、本発明によれば、ヒトに投与された場合アレルギーなどの副作用の原因となる宿主由来物質の含有量が低減された高純度のヒト血清アルブミンが提供される。本発明を他の精製方法と組み合わせて利用することによって、更に高純度のヒト血清アルブミンを製造することが可能となる。

【 0 0 2 7 】

【 実施例 】

調製例 1 : 多量体を含有するヒト血清アルブミン溶液の調製

特表平 1 1 - 5 0 9 5 2 5 に述べられている方法に従って、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) により r H S A を生産させた。この r H S A を含む培養液を精製水で約 2 倍容量になるように希釈後、酢酸水溶液を用いて p H 4.5 に調整した。50 mM 塩化ナトリウムを含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 4.5) で平衡化したストリームライン S P カラム (アマシヤム・ファルマシア・バイオテク社製) (径 60 c m x 16 c m) に適用した。次に、カラムの平衡化に用いた緩衝液と同じ緩衝液で洗浄し、次に、300 mM 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液 (p H 9.0) を送液して r H S A 含有画分を得た。

【 0 0 2 8 】

調製例 2 : システイン含有ヒト血清アルブミン溶液のアルカリ処理

得られた r H S A 含有画分 (10 m l) に 1 m M システインを添加し、5 % (W / V) 四ホウ酸二カリウム液 (15 m l) を終濃度 3 % (p H 約 9.0) となるように添加し、室温で 5 時間放置した。次いで、該溶液に酢酸水溶液を加え、p H 7.0 に調整しアルカリ処理を終了した。

【 0 0 2 9 】

実施例 1 : 加熱処理

続いて、該 r H S A 水溶液を、分画分子量 1 万の限外濾過膜 (ザルトリウス社製) を用いて r H S A 濃度約 1 0 0 m g / m l まで濃縮すると共に、5 m M カプリル酸ナトリウムを含む 5 0 m M リン酸緩衝液 (p H 5.5) に交換した。該 r H S A 溶液を、60 、 1 時間加熱処理した。続いて、室温まで冷却し、生じた沈殿を遠心除去し、上清を回収した。

【 0 0 3 0 】

実験例 1 : ゲル濾過 H P L C 分析

前記上清 0.2 m l を、0.1 M $K H_2 P O_4$ / 0.3 M $N a C l$ 緩衝液で平衡化した T S K g e l G 3 0 0 S W (東ソー社製) カラム (径 0.75 c m x 30 c m) にかき、同緩衝液で溶出し、溶出液を、波長 2 8 0 n m で測定した。コントロールとして、同様の方法により得た非加熱処理のヒト血清アルブミン溶液を用いた。その分析結果を図 1 に示す。

【 0 0 3 1 】

実験例 2 : 酵母由来成分の分析

ヒト血清アルブミン非産生酵母培養液を本発明と同様の方法で粗精製したものを、ウサギに免疫し、得られた抗血清を用いて ELISA 測定系を定法に従って構築し、本発明で得た H S A 含有溶液中に存在する酵母由来成分を測定した。その結果を表 1 に示す。

【 0 0 3 2 】

【 表 1 】

10

20

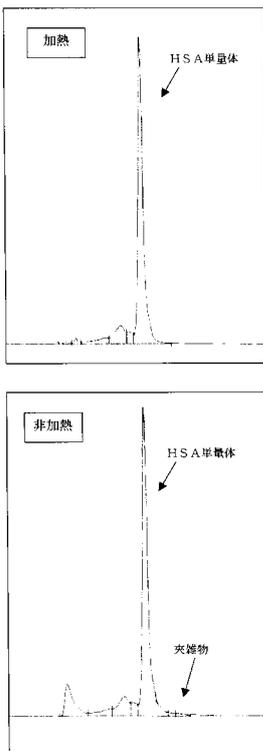
30

40

試料	rHSA 1 g 当りの 蛋白質量 (μ g)	クリアランス
加熱処理前	1140	
加熱処理後	194	5.9

【図面の簡単な説明】

【図1】ゲル濾過HPLCの分析結果を示す図面である。

【図1】

フロントページの続き

- (74)代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
- (74)代理人 100082821
弁理士 村社 厚夫
- (74)代理人 100086771
弁理士 西島 孝喜
- (74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
- (72)発明者 野内 俊伸
熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖1314-1 菊池研究所内
- (72)発明者 溝上 寛
熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖1314-1 菊池研究所内
- (72)発明者 田嶋 義高
熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖1314-1 菊池研究所内
- (72)発明者 宮津 嘉信
熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖1314-1 菊池研究所内
- (72)発明者 坂口 正浩
熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖1314-1 菊池研究所内
- (72)発明者 屋宜 和成
熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖1314-1 菊池研究所内

審査官 野村 英雄

- (56)参考文献 特開平08-116985(JP,A)
特開平01-311028(JP,A)
国際公開第98/007873(WO,A1)
特開平03-103188(JP,A)
特開平06-022784(JP,A)
特開平03-017023(JP,A)
特開平04-234326(JP,A)
特開平09-176195(JP,A)
特開平07-126182(JP,A)
ANDERSSON, L. O. , "Hydrolysis of disulfide bonds in weakly alkaline media. II. Bovine serum albumin dimer." , BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA , 1970年 2月17日 , Vol.200, No.2 , P.363-369
HANSEN, J.F. et al. , "A new high quality albumin for therapeutic use." , DEV. BIOL. STAND. , 1980年 , Vol.48 , P.105-112
BUENTEMEYER, K. et al. , "Process for large-scale recovery of intracellular yeast invertase based on heat- and pH-shift treatment" , PROCESS BIOCHEM. , 1989年12月 , Vol.24, No.12 , P.212-216

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C07K 1/00-19/00
C12N 15/00
C12P 1/00-41/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
WPI