

(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2006-512283

(P2006-512283A)

(43) 公表日 平成18年4月13日(2006.4.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7K 14/765 (2006.01)</b>	CO7K 14/765	4CO84
<b>CO7K 1/18 (2006.01)</b>	CO7K 1/18	4GO66
<b>A61P 7/00 (2006.01)</b>	A61P 7/00	4HO45
<b>BO1J 20/281 (2006.01)</b>	BO1J 20/22	D
<b>BO1J 20/34 (2006.01)</b>	BO1J 20/34	G
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-506365 (P2004-506365)	(71) 出願人	597064713 アメルシャム・バイオサイエンス・アクチボラグ Amersham Biosciences Aktiebolag スウェーデン国エスエー751 84 ウプサラ ビヨルクガタン 30
(86) (22) 出願日	平成15年5月15日 (2003.5.15)	(74) 代理人	100093908 弁理士 松本 研一
(85) 翻訳文提出日	平成17年1月14日 (2005.1.14)	(74) 代理人	100105588 弁理士 小倉 博
(86) 国際出願番号	PCT/SE2003/000792	(74) 代理人	100106541 弁理士 伊藤 信和
(87) 国際公開番号	W02003/097693	(74) 代理人	100129779 弁理士 黒川 俊久
(87) 国際公開日	平成15年11月27日 (2003.11.27)		
(31) 優先権主張番号	0201518-8		
(32) 優先日	平成14年5月15日 (2002.5.15)		
(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】 液体中の夾雑物からアルブミンを分離する方法、使用及びキット

## (57) 【要約】

【課題】 液体中の低分子量夾雑物から組換えヒト血清アルブミン ( r H S A ) を分離する方法を提供する。

【解決手段】 本発明の方法では、( a ) ベースマトリックスに結合した陰イオン交換リガンドからなる分離媒体を準備する工程、及び( b ) 前記液体を分離媒体と接触させてリガンドに r H S A を吸着させる工程を含む。一実施形態では、リガンドの官能基は弱陰イオン交換基、好ましくは第二アミンであり、ベースマトリックス上のリガンドの密度は比較的高い。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

液体中の低分子量夾雑物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、

( a ) ベースマトリックスに結合したアニオン交換リガンドからなる分離媒体を準備する工程、及び

( b ) 上記液体を分離媒体と接触させてリガンドに r H S A を吸着させる工程、を含む方法。

## 【請求項 2】

前記リガンドの官能基が、弱陰イオン交換基、好ましくは第二アミンである、請求項 1 記載の方法。 10

## 【請求項 3】

前記分離媒体のリガンド密度が、約  $50 \mu\text{mol} / \text{ml}$  媒体以上、好ましくは約  $100 \mu\text{mol} / \text{ml}$  媒体以上、最も好ましくは約  $160 \mu\text{mol} / \text{ml}$  媒体以上である、請求項 1 又は請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

前記ベースマトリックスが多孔性の実質的に球状の多糖類粒子からなる、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】

前記低分子量夾雑物が H S A 分解生成物である、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】

前記低分子量夾雑物が分子量  $67 \text{kDa}$  未満、例えば約  $10 \sim 46 \text{kDa}$  の夾雑物である、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】

リガンドから r H S A を解離させる溶液の添加によって分離媒体から r H S A を溶出する後工程を含む、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】

吸着工程と溶出工程の間に、緩衝液で媒体を洗浄する中間工程を含む、請求項 7 記載の方法。 30

## 【請求項 9】

前記液体が培養ブロスである、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】

組換えヒト血清アルブミン ( r H S A ) を含む培養ブロスを脱色する方法であって、請求項 1 乃至請求項 9 のいずれか 1 項記載の方法の工程を含む方法。

## 【請求項 11】

組換えヒト血清アルブミン ( r H S A ) を含む培養ブロス中の低分子量夾雑物の量を低下するための陰イオン交換媒体の使用。

## 【請求項 12】

組換えヒト血清アルブミン ( r H S A ) を含む培養ブロスを脱色するための陰イオン交換分離媒体の使用。 40

## 【請求項 13】

前記分離媒体が、r H S A が吸着される弱陰イオン交換基を有する、請求項 11 又は請求項 12 記載の使用。

## 【請求項 14】

陰イオン交換分離媒体のリガンド密度が、約  $50 \mu\text{mol} / \text{ml}$  媒体以上、好ましくは約  $100 \mu\text{mol} / \text{ml}$  媒体以上、最も好ましくは約  $160 \mu\text{mol} / \text{ml}$  媒体以上である、請求項 13 記載の使用。

## 【請求項 15】

組換えヒト血清アルブミン ( r H S A ) を含む培養液の脱色用キットであって、ベース 50

マトリックスに結合した弱陰イオン交換基が存在する陰イオン交換分離媒体と、媒体から r H S A を解離させることができる溶液とを別々の容器に、その使用解説書と共に、備えるキット。

【請求項 1 6】

前記陰イオン交換分離媒体がクロマトグラフィーカラム内に存在する、請求項 1 5 記載のキット。

【請求項 1 7】

陰イオン交換分離媒体のリガンド密度が、約  $50 \mu\text{mol} / \text{ml}$  媒体以上、好ましくは約  $100 \mu\text{mol} / \text{ml}$  媒体以上、最も好ましくは約  $160 \mu\text{mol} / \text{ml}$  媒体以上である、請求項 1 5 又は請求項 1 6 記載のキット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組換えヒト血清アルブミン ( r H S A ) の調製、さらに具体的には培養プロセス中のある種の夾雑物から r H S A を精製する方法に関する。

【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、並びに肝炎ウイルス及び特に A I D S 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 H S A ( r H S A ) を生産するための組換え D N A 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おり、発酵プロセスからの r H S A の精製がこのプロセスの成功に重要な工程であることが示されている。

20

【0003】

例えば、欧州特許出願公開第 0 6 1 2 7 6 1 号 ( 株式会社ミドリ十字 ) には、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。この方法では、特定の条件下での疎水性相互作用クロマトグラフィー ( H I C ) を、イオン交換クロマトグラフィー ( I E C )、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て利用する。イオン交換工程に関して、ヒト血清アルブミンが非吸着画分から回収される pH 及び塩濃度での陰イオン交換が示唆されている。示唆された精製スキームでは、H S A の脱色工程を含んでいてもよく、好ましくは最終工程である。こうした脱色は、N - メチルグルカミン基で例示されるような特定のリガンド基が存在するキレート樹脂に H S A を接触させることによって実施される。

30

【0004】

さらに、欧州特許出願公開第 0 5 7 0 9 1 6 号 ( 三菱ウェルファーマ株式会社 ) には、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代替法が開示されており、その精製は複数の工程の組合せによる。さらに具体的には、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媒体及び陰イオン交換体で処理する。用いられる陰イオン交換体処理は、H S A が吸着されずにカラムを通過する条件下で使用された D E A E - S e p h a r o s e ( 商標 ) で例示される。陰イオン交換体処理又は塩析処理後、産生宿主関連物質として規定された着色成分の量を低減するためのキレート樹脂処理の工程を設けてもよい。好ましくは、この工程で用いるキレート樹脂の担体部分は、例えば N - メチルグルカミン基、イミノ基、アミノ基及びエチレンジアミン基のようなポリオール基で例示されるように疎水性である。さらに、H S A 生産のため原料から誘導された脂肪酸及びそのエステルも、示唆されたキレート樹

40

50

脂処理によって除去されることが示唆されている。

【0005】

米国特許第5710253号(株式会社ミドリ十字)に開示されているように、脱色は、精製プロセスに際して組換えヒト血清アルブミンを還元剤で処理することによっても達成できる。具体的には、還元剤は、システイン、システアミン、シスタミン、アミノプロパンチオール、メチオニン、エチオニン及びグルタチオンからなる群から選択されるSH基を含む低分子量化合物、又は亜硫酸、次亜硫酸、ピロ硫酸、亜リン酸、亜硫酸、亜リン酸、ピロ硫酸、亜硫酸、ピロリン酸、アスコルビン酸、もしくはそれらの塩である。着色を抑制することが知られているアミン化合物を、還元剤と併用してもよい。還元剤は、最初の精製工程又は後段の高度精製工程のいずれかで添加される。

10

【0006】

最後に、欧州特許出願公開第0699687号(株式会社ミドリ十字)には、流動床に懸濁した吸着材粒子との接触による組換えヒト血清アルブミンの精製法が開示されている。しかし、こうした拡大床吸着に常用される酸性条件下では、培地に含まれるrHSAがプロテアーゼによって急速に分解され、そのため製品の収率が低下する。この欧州特許では、分解の問題を解消すべく、流動層との接触の前に培地を熱処理してプロテアーゼを不活性化することが示唆されている。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。

【0007】

しかし、rHSA標品からrHSA分解生成物及び色素のような低分子量夾雑物を効率的に除去するための改良法が当分野では依然として必要とされている。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

そこで、本発明の一つの目的は、培養ブロスにみられるrHSA分解生成物のような低分子量夾雑物からのrHSAの効率的精製を可能にする分離媒体を提供することである。

【0009】

本発明の具体的な目的物は、rHSA分解生成物のような低分子量夾雑物からrHSAを精製する方法であって、添加剤を必要とせず夾雑物を除去できる方法である。

【0010】

本発明の別の目的は、分解生成物のような低分子量夾雑物からrHSAを精製する方法であって、塩の存在(すなわち適度に高い伝導率)に比較的鈍感な方法を提供することである。

30

【0011】

本発明の別の目的は、低分子量分解生成物のような低分子量夾雑物からrHSAを精製する方法であって、従来技術の方法よりも堅牢な方法を提供することである。

【0012】

本発明のさらに別の目的は、分離媒体へのrHSAの吸着によって、分解生成物のような低分子量夾雑物からrHSAを精製するクロマトグラフィーの方法であって、一定組成溶出法で低分子量夾雑物を除去することができる方法を提供することである。

40

【0013】

上述の1以上の目的は、特許請求の範囲に規定されるようにして達成できる。本発明のその他の目的及び利点は、以下の詳細な説明から明らかになる。

【課題を解決するための手段】

【0014】

第一の態様では、本発明は、液体中の低分子量夾雑物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、

(a) ベースマトリックスに結合したアニオン交換リガンドからなる分離媒体を準備する工程、及び

(b) 上記液体を分離媒体と接触させてリガンドにrHSAを吸着させる工程、

50

を含む方法に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

従って、工程(b)では、夾雑物は分離媒体に吸着されない。好適な実施形態では、当ギア方法はクロマトグラフィー方法であり、夾雑物又はその少なくとも一部を液体と共にカラムに流す。一実施形態では、媒体を適当な溶液又は緩衝液で洗浄して、吸着されずに保持されている夾雑物を除去する。好ましい実施形態では、当該方法は、続いて、リガンドからrHSAを解離させる溶液を添加することによって、分離媒体からrHSAを溶出する工程を含む。こうした溶液は溶出液として知られており、大抵は、塩の濃度勾配を含む緩衝液である。

10

【0016】

従って、本発明は、rHSAが陰イオン交換体に吸着されるという点で上記で引用した従来技術とは異なる。従前、陰イオン交換体はrHSA精製プロセスの一工程として利用されているが、rHSAがカラムを通過するが、夾雑物は結合及び/又は保持されるような条件下で用いられている。本発明では、媒体にrHSAを吸着させることによって、低分子量夾雑物からのrHSAの極めて効率的な分離、ひいてはサンプルの効率的な脱色が達成できるという予想外の知見が得られた。さらに、本発明の吸着材は吸着rHSAの効率的な洗浄が可能となる十分な強さをもつことが判明しており、生成物を高収率で得るのに有利である。以下で詳しく説明する通り、本発明の方法は最も好適にはrHSA精製プロセスにおける高度精製工程として用いられる。

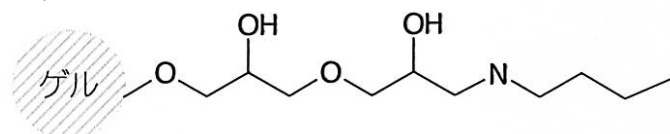
20

【0017】

好適な実施形態では、リガンドの官能基は、弱陰イオン交換基、好ましくは第二アミンである。一実施形態では、リガンドは脂肪族であり、1個以上のヒドロキシル基及び好ましくはエーテル基も含む。本発明の方法で好適に利用されるリガンド構造の例としては、市販品のButyl Sepharose(商標)があり、以下のように模式的に示される。

【0018】

【化1】



30

【0019】

別の実施形態では、本発明は、上記に示すような吸着材で、アミンの右側(つまりアミンからみてOH基とは反対側)の炭素鎖は長鎖炭素鎖からなる。つまり、吸着材は、例えば、...N-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(ただし、nは1~8の整数である)を末端とするものであってもよい。

【0020】

さらに、ベースマトリックスに結合した高密度リガンドで有利な結果が得られることが判明した。この点に関して、「高」とは、上記Butyl Sepharose(商標)よりもリガンド密度が高いことを意味する。従って、本発明の方法の一実施形態では、分離媒体のリガンド密度は約50 μmol/ml媒体以上、好ましくは約100 μmol/ml媒体以上、最も好ましくは約160 μmol/ml媒体以上である。以下の実験の項で示す通り、プロトタイプの第二アミンを含む高リガンド密度陰イオン交換分離媒体を用いる本発明の高度精製工程を、ジエチルアミノエチルの形態の第三アミン基を含む市販の弱陰イオン交換媒体DEAE Sepharose(商標)と対比する。このプロトタイプで脱色及び堅牢性に優れる方法が得られることが判明したが、これは、rHSAがすべて又は実質的にすべて吸着されること、つまりプロトタイプ陰イオン交換体に結合されるのに対して、DEAE Sepharose(商標)を用いた場合には、rHSAが非結合ではあるが非常に遅いた画分から回収されるためであると考えられる。その結果、DE

40

50

A E S e p h a r o s e (商標)を高度精製に使用するには、再現性のある結果を得るための注意深いサンプル調製手順が必要とされる。

【0021】

本発明の別の利点は、非一定組成法を用いることである。従って、本発明は再現性が高い。さらに、リガンド密度の高いプロトタイプ弱陰イオン交換体は、従来の方法よりも耐塩性が高いことが判明した。従って、塩濃度が比較的高いことがある培養ブロスを実質的に希釈せずに直接用いることができる。そのため、処理体積を比較的低く保つことができるので、特に大規模処理では実質的な節約が可能となる。

【0022】

リガンドが結合したベースマトリックスは、有機ポリマー(天然のものでも合成品でもよい)、シリカのような無機材料などの、常用されるいかなる材料のものであってもよい。ベースマトリックスは、粒子、モノリス、表面、フィルターなど、適当ないかなる形態のものであってもよい。

【0023】

一実施形態では、高分子ベースマトリックスは、アガロース、寒天、セルロース、デキストラン、キトサン、コンニャク、カラギーナン、ジェラン、アルギン酸塩のような架橋炭水化物材料からなる。かかるベースマトリックスは、逆懸濁ゲル化(S H j e r t e n : B i o c h i m B i o p h y s A c t a 79(2), 393~398(1964))のような常法で容易に調製できる。別法として、ベースマトリックスは、S e p h a r o s e (商標) F F (A m e r s h a m B i o s c i e n c e s A B (スウェーデン、ウプサラ))のような市販品である。従って、一実施形態では、本発明で用いるベースマトリックスは、アガロース粒子のような多孔性の実質的に球状の多糖類粒子からなる。

【0024】

別の実施形態では、ベースマトリックスは、スチレン又はスチレン誘導体、ジビニルベンゼン、アクリルアミド、アクリレートエステル、メタクリレートエステル、ビニルエステル、ビニルアミドなどの架橋合成ポリマーからなる。かかるポリマーは常法で容易に合成される。例えば、" S t y r e n e b a s e d p o l y m e r s u p p o r t s d e v e l o p e d b y s u s p e n s i o n p o l y m e r i z a t i o n " (R A r s h a d y : C h i m i c a e L ' I n d u s t r i a 70(9), 70-75(1988))参照。別法として、例えば、S o u r c e (商標) (A m e r s h a m B i o s c i e n c e s A B (スウェーデン、ウプサラ))のような市販品を本発明で用いることもできる。

【0025】

上述のいずれかのベースマトリックスへの陰イオン交換リガンドの結合は、周知の標準法で当業者が容易に実施できる。例えば、J . P o r a t h 及び T . K r i s t i a n s e n 著 : T H E P R O T E I N S , 第1巻、第3版 (H . N e u r a t h & R . L . H i l l 編) B i o s p e c i f i c A f f i n i t y C h r o m a t o g r a p h y & R e l a t e d M e t h o d s (1975) 95~177頁参照。

【0026】

本発明において、「夾雑物」という用語は、最終 r H S A 標品に望ましくないあらゆる物質又は化合物に用いる。周知の通り、r H S A 標品は、原料に含まれる又は宿主微生物の培養時に微生物から分泌されるある種の着色成分で汚染されることが多々あり、こうした夾雑物は r H S A に結合してその着色を起こす。脱色は r H S A の分解生成物によっても生じるが、そうした分解は培養ブロス中に存在する分解プロテアーゼによって起こる。そこで、本発明の方法は、r H S A を含む培養ブロスの脱色法として定義することができる。例えば、一実施形態では、本発明を用いて生成物 ( r H S A ) から分離される低分子量夾雑物は r H S A 分解生成物である。別の実施形態では、低分子量夾雑物は分子量 67 k D a 未満 (例えば 0 ~ 67 又は 0 ~ 50 k D a ) のものである。一実施形態では、低分子量夾雑物は、分子量約 10 ~ 46 k D a の r H S A 分解生成物である。

10

20

30

40

50

## 【0027】

以上から明らかな通り、本発明の一般的な実施形態では、分離媒体に付される液体は培養ブロスである。本願に関して、「培養ブロス」という用語は、rHSA産生組換え微生物が培養される発酵ブロスを意味する。

## 【0028】

以上から明らかな通り、組換え技術によるrHSAの生産は当技術分野で周知であり、発現に適した菌株及び適当な培養条件は当業者が容易に選択することができる。簡単に説明すると、宿主は、様々な刊行物で既に報告されている宿主から選択することができる。宿主の代表例としては、大腸菌 (*Escherichia coli*)、各種の酵母、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) のような、HSA産生株とした微生物細胞並びに動物細胞が挙げられる。特に好ましい宿主は酵母種、特に *Saccharomyces Cerevisiae* のような *Saccharomyces* 属、*Pichia pastoris* のような *Pichia* 属、又は *Kluyveromyces lactis* のような *Kluyveromyces* 属に属するものが挙げられる。また、栄養要求性株又は抗生物質感受性株を用いてもよい。

10

## 【0029】

HSA産生宿主の調製、宿主の培養によるHSA産生、得られた培養ブロスからのHSAの単離及び回収は、公知の技術又はその改変法を用いて達成し得る。例えば、HSA産生宿主(又はHSA産生株)の調製は、天然又は改変ヒト血清アルブミン遺伝子を用いるプロセスで実施し得る。HSA産生宿主の培養、並びにHSAの初期単離及び回収は、例えば、上述の引用文献に開示されているような公知のプロセスを用いて実施できる。本発明によるrHSA精製のための一連の工程の例では、SP Spharose (商標) Fast Flow (Amersham Biosciences (スウェーデン、ウプサラ)) のような従来の陽イオン交換体を用いる最初の吸着工程、次いで Phenyl Spharose (商標) 6 Fast Flow (high sub) (Amersham Biosciences (スウェーデン、ウプサラ)) のような疎水性相互作用クロマトグラフィーを用いる精製工程、次いで本発明に記載の弱陰イオン交換体を用いる高度精製工程を含む。

20

## 【0030】

第二の態様では、本発明は、組換えヒト血清アルブミン (rHSA) を含む培養ブロス中の低分子量夾雑物の量を減らすための陰イオン交換分離媒体の使用に関する。

30

## 【0031】

一実施形態では、rHSAを含む培養ブロスを陰イオン交換分離媒体を用いて脱色する。好適な実施形態では、陰イオン交換分離媒体は弱陰イオン交換基を含むもので、これにrHSAを吸着させる。本発明の使用の最も好ましい実施形態では、陰イオン交換分離媒体のリガンド密度は、約  $50 \mu\text{mol}/\text{ml}$  媒体以上、好ましくは約  $100 \mu\text{mol}/\text{ml}$  媒体以上、最も好ましくは約  $160 \mu\text{mol}/\text{ml}$  媒体以上である。さらに、本発明の使用に関するこれ以上の詳細は、例えば本発明の第一の態様に関して上記で説明した通りである。

## 【0032】

第三の態様では、本発明は、rHSAを含む培養液の脱色用キットであって、ベースマトリックスに結合した弱陰イオン交換基が存在する陰イオン交換分離媒体と、媒体からrHSAを解離させることができる溶液とを別々の容器に、その使用解説書と共に、備えるキットに関する。好適な実施形態では、陰イオン交換分離媒体は、例えば実験室規模での作業用に、クロマトグラフィーカラム内に存在する。本発明のキットの最も好適な実施形態では、陰イオン交換分離媒体のリガンド密度は、約  $50 \mu\text{mol}/\text{ml}$  媒体以上、好ましくは約  $100 \mu\text{mol}/\text{ml}$  媒体以上、最も好ましくは約  $160 \mu\text{mol}/\text{ml}$  媒体以上である。この陰イオン交換分離媒体及びその使用に関するこれ以上の詳細は、例えば上記で説明した通りである。

40

## 【0033】

50

### 図面の詳細な説明

図 1 では、発酵槽で増殖させた酵母細胞の細胞培養上清からの r H S A の精製に用いられる下流精製プロセスをまとめた表 1 を示す。具体的には、表 1 には、高耐塩性の吸着材を用いて実施し得る陽イオン交換クロマトグラフィー工程、次いで疎水性相互作用クロマトグラフィー工程、最後に本発明による陰イオン交換クロマトグラフィー工程が規定されている。この順序の工程で、純度 99% 超のような高純度の精製 r H S A 画分が得られる。

#### 【0034】

図 2 は、本発明の弱陰イオン交換体を用いて、r H S A の最終第 3 クロマトグラフィー精製工程で得られた溶出プロフィールを示す（表 1 参照）。精製 r H S A は画分 1 B にある。

10

#### 【0035】

図 3 は、表 1 に示す 3 段階精製法で得た主な画分のネイティブ P A G E ( 8 ~ 25% ) と S D S - P A G E ( 10 ~ 15% ) の分析結果を示す。最終段階の第 3 工程は本発明で用いる方法である。銀染色した非変性 P A G E ( 図 2 A ) では、1 スポット当たり約 3.3  $\mu$ g のタンパク質を添加した。銀染色した S D S - P A G E ( 2 B ) では、1 スポット当たり約 2  $\mu$ g のタンパク質を添加した。クマーシー染色した S D S - P A G E ( 2 C ) では、1 スポット当たり約 10  $\mu$ g のタンパク質を添加した。

( 1 ) : 清澄化した細胞培養上清 ( C C S ) ; ( 2 ) : 工程 1 の非結合画分 ; ( 3 ) : 工程 1 の結合画分 ( r H S A を含む ) ; ( 4 ) 工程 2 の非結合画分 ( r H S A を含む ) ; ( 5 ) 工程 2 の結合画分 ; ( 6 ) : 工程 3 の非結合画分 ; ( 7 ) 工程 3 の結合画分 ( r H S A を含む ) ; ( 8 ) 精製血漿 H S A ( 対照 ) 。

20

#### 【0036】

図 4 は、市販の陰イオン交換体並びに本発明で用いる高リガンド密度の弱陰イオン交換体への精製 H S A の結合に対する p H の影響を示す。

#### 【実施例】

#### 【0037】

##### 実験

以下の実施例は、例示のみを目的とするものであり、特許請求の範囲によって規定すべき本発明を限定するものではない。本明細書で引用する文献の開示内容は援用によって本明細書の内容の一部をなす。

30

#### 【0038】

##### 実施例 1 : 以下に用いられる弱陰イオン交換体ゲルの調製

1 : 1 . アリルグリシジルエーテルを用いた S e p h a r o s e ( 商標 ) 6 F F の活性化

これは、アリルグリシジルエーテルをアルカリ条件下で S e p h a r o s e ( 商標 ) 6 F F と反応させることによって実施する。

#### 【0039】

適当な反応容器中で、100g の S e p h a r o s e ( 商標 ) 6 F F を、45mL の 50% ( w / w ) N a O H 水溶液、0.5g の N a B H<sub>4</sub> 及び 13g の N a<sub>2</sub>S O<sub>4</sub> と混合した。混合物を 50 で 1 時間攪拌して、100mL のアリルグリシジルエーテルを添加した。懸濁液を 50 でさらに 18 時間攪拌した。混合物を濾過して、ゲルを 500mL の脱イオン水、500mL のエタノール、200mL の脱イオン水、200mL の 0.2M 酢酸、500mL の脱イオン水を用いて逐次洗浄した。

40

#### 【0040】

滴定分析の結果、0.23mmol アリル基 / mL ゲルという置換度が得られた。以下、このアリル誘導体化 S e p h a r o s e ( 商標 ) 6 F F を「生成物 I」という。

#### 【0041】

##### 1 : 2 . 生成物 I ( アリル化 S e p h a r o s e ( 商標 ) 6 F F ) の活性化

典型的手順では、100mL の生成物 I と 4g の酢酸ナトリウムと 100mL の脱イオ

50



ン水の攪拌懸濁液に、持続的な黄色が得られるまで臭素水を添加した。過剰臭素の低減は、黄色味が消失するまでギ酸ナトリウムを懸濁液に添加することによって達成した。反応混合物を濾過して、アリル誘導体化ゲルを500 mLの脱イオン水で洗浄した。

【0042】

#### 1 : 3 . 活性化生成物 I への N ブチルアミンのカップリング

活性化ゲル (生成物 I) を、反応容器に移し、次いで50 mLのN - ブチルアミンを添加した。懸濁液を60 で18時間攪拌した後、濾過した。ゲルを500 mLの脱イオン水で洗浄し、そのアミン基含量を滴定で決定した。その結果、約0.2 mmol / mlゲルというブチルアミン基の置換度が得られた。

【0043】

#### 実施例 2 : r H S A の精製

以下に示す実施例では、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3段階精製プロセスを開示する。

- ( 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 ) 本発明による陰イオン交換クロマトグラフィー。

【0044】

以下の工程 ( a ) 及び ( b ) の開示は、工程 ( c ) で例示される本発明の方法に先だっ  
て行うことができるサンプル処理の方法を例示するものにすぎない。本発明は、出発材料  
として、あらゆるサンプル、好ましくは同様の吸着及び精製工程に付したものを使用でき  
る。

【0045】

#### 材料及び方法

r H S A を含む細胞培養上清 ( C C S ) は、遺伝子改変 P . p a s t o r i s 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。C C S は緑色であり、これを約2  
00 mlのアリコートに分けて、使用時まで - 20 で保存した。C C S の品質は、S u  
p e r d e x ( 商標 ) 200 H R 10 / 30 ( 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、ウブサラ ) ) の分析カラムでのゲル濾過で確認した。この分析で、C  
C S 中の高分子量 ( H M W ) 不純物と低分子量 ( L M W ) 不純物の相対量、並びに単量体  
型 r H S A の大まかな含有量を得た。

【0046】

カプリル酸ナトリウム ( オクタン酸 N a 塩 ) 及び L - システインは、S I G M A C h  
e m i c a l 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 H S A 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、ウブサラ ) の血漿処理部門  
の I . A n d e r s s o n 氏から入手した。各種サンプル中のタンパク濃度は B i o - R  
a d タンパク質アッセイキット ( B r a d f o r d 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 ( B S A ) を用いた。紫外 / 可視吸光度測定は  
島津 U V - 160 A 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。

【0047】

分析用電気泳動は、P h a s t G e l 電気泳動システムと適当な P h a s t G e l 媒体  
及び緩衝液 S t r i p s ( すべて 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、ウブサラ ) ) を用いて実施した。電気泳動分析はネイティブ P A G E ( 8 ~ 25 %  
 ) 又は S D S - P A G E ( 非還元、10 ~ 15 % ) ゲルを製造業者の推奨通り用いて実施  
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、S D S 処理サンプルでは2 µgであり、いずれも S i l v e r S t a i n  
i n g K i t ( 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、ウブサラ  
 ) ) で染色した。クーマシーブリリアントブルー ( C B B ) で染色した S D S 処理サン  
プルでは10 µgであった。

【0048】

10

20

30

40

50

質量分析（精製 r H S A 及び血漿由来 H S A の質量を求めることを目的）は M A L D I - T O F を用いて行った。天然 H S A 及び組換え H S A 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 H S A から得たトリプシンペプチドの公知の配列と対照して、r H S A の最も可能性の高い一次配列を得るのに用いた。

【0049】

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 U 238025 : 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、高耐塩性型のプロトタイプ陽イオン交換体を用いた。この媒体を 20 % エタノール中の濃厚懸濁液として XK 26 / 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。

【0050】

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。

【0051】

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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  と 95 mL の 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  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。

【0052】

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  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  と 38 mL の 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  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。

【0053】

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  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  と 38 mL の 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  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。

【0054】

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

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

20

30

40

50

## 【0055】

CCSの凍結サンプルを融解し、10mM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。

## 【0056】

SP S e p h a r o s e（商標）B i g B e a d s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5～10mS/cm（塩濃度約0.1M）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。

## 【0057】

これに対して、本発明で用いるHSL型媒体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30mS/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。

## 【0058】

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型媒体に結合した画分）も、以下の通り、工程（b）の前に熱処理した。サンプルのpHを1M 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5mM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媒体による着色物質の除去を容易にすることである。

## 【0059】

実施例2（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20mL）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、150mL Superloop（商標）（Amersham Biosciences（スウェーデン、ウプサラ））によって流速300mL/h（150cm/h）でカラムにかけた。rHSAの添加量は約1g（すなわち、50mg rHSA/mL充填ゲル）であった。サンプル添加後、非結合物を3CVの緩衝液Aで溶出した後、5CV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、1M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1mL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。

## 【0060】

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2CV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4CV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、4CVの緩衝液Aで再度平衡化した。

## 【0061】

実施例2（b）：HICを用いた精製工程

上記工程で得たrHSA含有画分を、150mLのSuperloop（商標）に移し、Phenyl S e p h a r o s e（商標）F a s t F l o w（h i g h s u b）を充填したXK26/20カラム（充填ベッド体積40mL）にかけた。カラムは予め3CV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2CVの緩衝液Cで洗浄し、rHSAを含む非結合物を溶出させた。結合物（主にrHSAの45kDa分解物を含む）は2CVの脱イオン水で溶出させた。

## 【0062】

再生：上記と同じ手順。

## 【0063】

実施例2（c）：弱陰イオン交換体を用いた本発明の高度精製工程

前段のHIC工程で得た2つの画分をプールして各々の1mLアリコートを分析用（上記参照）に保存した。カラム（XK26/20）にDEAE S e p h a r o s e（商標

10

20

30

40

50

) Fast Flow又は又は本発明の弱陰イオン交換体(高度に置換したButyl Spharose 6 Fast Flow)を充填して、40mLの充填ベッド体積を得た。各充填媒体を2CVの脱イオン水で洗浄し、次いで約5CVの緩衝液Cで平衡化した。HIC工程で得られた非結合画分を150mLのSuperloop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6CVの緩衝液Cで(DEAE Spharose Fast Flowカラムから)、又は改質Butyl-Spharoseカラムから2CVで溶出した。結合画分は、DEAEカラムでは2CVの2M NaCl溶液で、又は本発明の弱陰イオン交換体を充填したカラムでは5CVの緩衝液Dで溶出した。流速は、全体を通して90cm/hに維持した。

【0064】

10

#### 結果

得られたクロマトグラフィー溶出プロフィールを図1に示す。この実験(工程3)で得られた各画分のPhastGel(商標)グラジエント電気泳動分析の結果を図2に示す。この結果から、本発明の弱陰イオン交換体を使用すると、非結合画分中に一群として溶出するLMW不純物が効率的に除去されることが分かる。さらに、このIEC媒体を用いて得られた精製画分(図1の画分1B参照)の $A_{350}/A_{280}$ 比は、DEAE Spharose(商標) Fast Flow媒体を用いて得られたものよりも低かった。

【0065】

再生：上記と同じ手順。

【図面の簡単な説明】

20

【0066】

【図1】発酵プロセス中で増殖した形質転換酵母細胞で産生したrHSAに適合させた基本的に3段階精製プロセスである表1を示す。

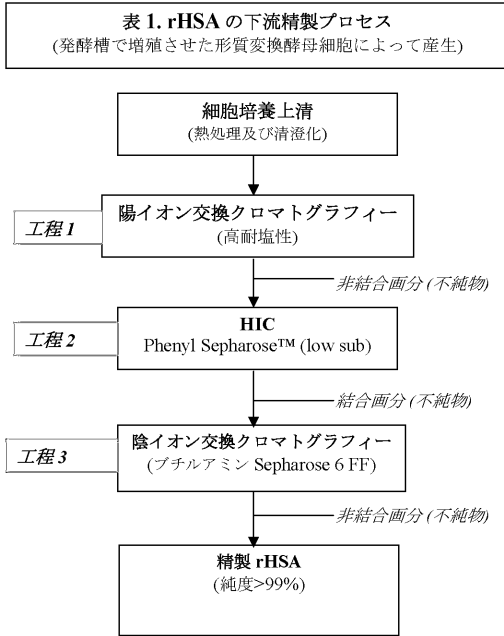
【図2】rHSAの最終第3精製工程で得られたクロマトグラフィーの溶出プロフィールを示す(表1参照)。この最終高度精製工程で用いられる陰イオン交換体は、本発明に記載されるものである。精製rHSAは画分1Bに溶出される。

【図3】表1に示す3段階精製プロセスを用いて得られる主画分の電気泳動分析の結果を示し、その最終工程は本発明による高度精製法である。8つのレーンからなる最初の群(A)ではネイティブPAGE/銀染色を用い、第二の群(B)ではSDS PAGE/銀染色を用い、最後の群(C)ではSDS PAGE/クマーシーBBを用いる。

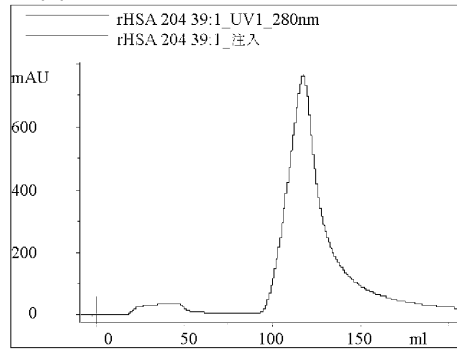
30

【図4】幾つかの市販陰イオン交換体並びに本発明で用いる弱陰イオン交換体への精製HSAの結合に対するpHの影響を示す。

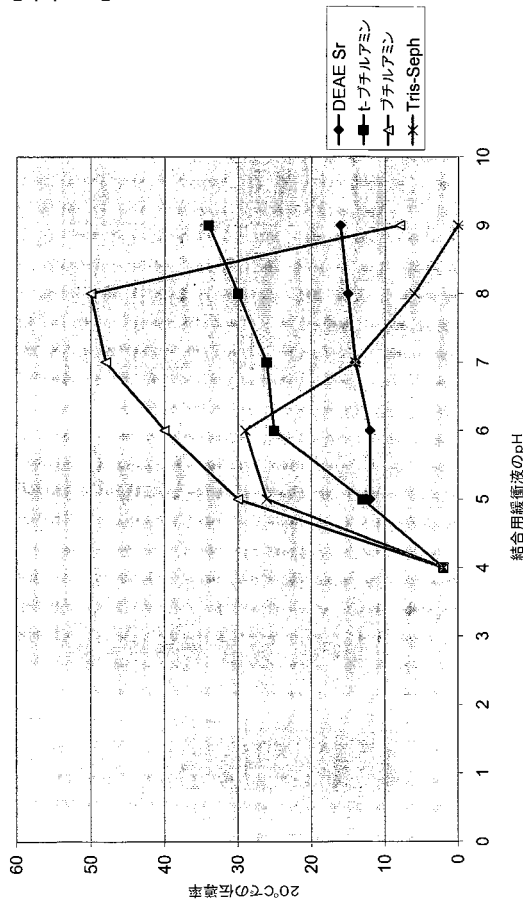
【 図 1 】



【 図 2 】

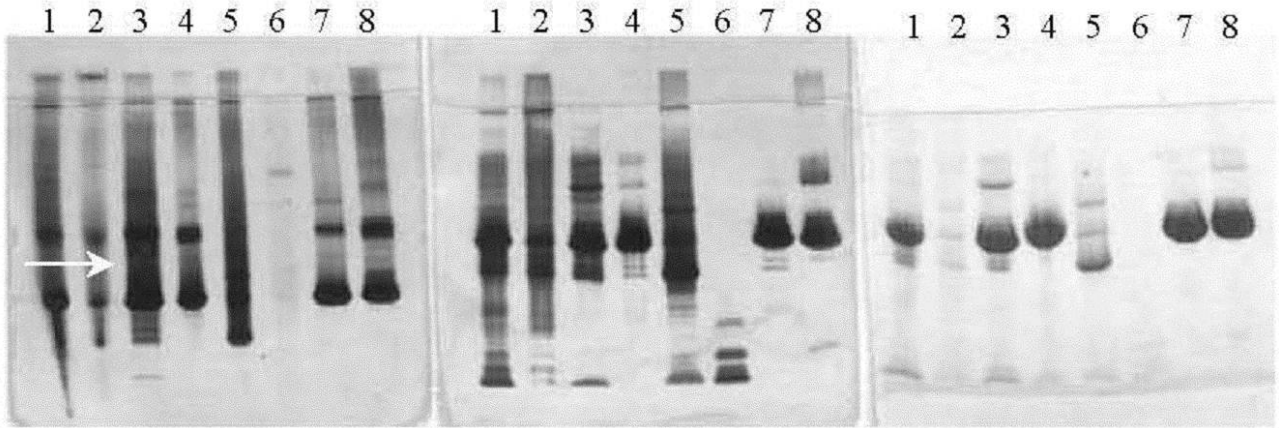


【 図 4 】



【図3】

A: ネイティブ PAGE/銀染色; B: SDS PAGE/銀染色; C: SDS PAGE/クーマシーBB



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 03/00792
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: C07K 14/765, C07K 1/18 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.
X	EP 0612761 A1 (THE GREEN CROSS CORPORATION), 31 August 1994 (31.08.94)	11-12
A	--	1-10, 13-17
X	EP 0570916 A2 (THE GREEN CROSS CORPORATION), 24 November 1993 (24.11.93)	11-12
A	--	1-10, 13-17
A	CA 2395589 A1 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE), 2 May 2002 (02.05.02)	1-17
	--	
<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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
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 03/00792

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4093612 A (TRAVIS ET AL), 6 June 1978 (06.06.78)  --	1-17
A	EP 0699687 A2 (THE GREEN CROSS CORPORATION), 6 March 1996 (06.03.96)  --	1-17
A	US 5710253 A (OHTANI ET AL), 20 January 1998 (20.01.98)  --	1-17
A	US 4308254 A (TAYOT ET AL), 29 December 1981 (29.12.81)  -- -----	1-17



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 03/00792

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		
CA 2395589 A1	02/05/02	AU 1093502 A	06/05/02
		CN 1406245 T	26/03/03
		EP 1329461 A	23/07/03
		JP 2002128795 A	09/05/02
		US 2002183492 A	05/12/02
		WO 0234786 A	02/05/02
US 4093612 A	06/06/78	US 4016149 A	05/04/77
EP 0699687 A2	06/03/96	CN 1080301 B	06/03/02
		CN 1127299 A	24/07/96
		CN 1364643 A	21/08/02
		JP 8116985 A	14/05/96
		US 5962649 A	05/10/99
US 5710253 A	20/01/98	CA 2138349 A	18/06/95
		EP 0658569 A	21/06/95
		JP 7170993 A	11/07/95
		JP 7170994 A	11/07/95

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 03/00792

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4308254 A	29/12/81	BE 870565 A	19/03/79
		CH 642862 A	15/05/84
		DE 2840503 A,C	29/03/79
		DK 411478 A	20/03/79
		FR 2403098 A,B	13/04/79
		GB 2006642 A,B	10/05/79
		IT 1174426 B	01/07/87
		IT 7827802 D	00/00/00
		JP 1205319 C	11/05/84
		JP 54063894 A	23/05/79
		JP 58039576 B	31/08/83
		NL 7809486 A	21/03/79
		NO 783154 A	20/03/79
		SE 444268 B,C	07/04/86
		SE 7809789 A	20/03/79

---

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 30/88 (2006.01)</b>	B 0 1 J 20/34	Z
<b>G 0 1 N 30/00 (2006.01)</b>	G 0 1 N 30/88	J
<b>G 0 1 N 30/50 (2006.01)</b>	G 0 1 N 30/48	R
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	G 0 1 N 30/00	A
	G 0 1 N 30/48	G
	G 0 1 N 30/48	N
	G 0 1 N 30/50	
	A 6 1 K 37/02	

(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

(72) 発明者 ブリュウ , マコンネン

スウェーデン、エス - 7 5 1 ・ 8 4 ・ ウブサラ、ビヨルクガタン・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)

F ターム(参考) 4C084 AA02 BA01 BA44 CA18 CA53 DA37 MA01 NA01 NA06 ZA512  
 4G066 AB13B AC01C AD10B AE10B BA38 CA56 DA12 EA01 GA11  
 4H045 AA20 BA10 CA40 DA70 EA20 FA74 GA23