

(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2017-519734

(P2017-519734A)

(43) 公表日 平成29年7月20日(2017.7.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 1/18 (2006.01)	C 0 7 K 1/18	4 B 0 6 5
C 1 2 N 7/02 (2006.01)	C 1 2 N 7/02	4 D 0 1 7
B 0 1 D 15/00 (2006.01)	B 0 1 D 15/00 K	4 G 0 6 6
B 0 1 D 15/36 (2006.01)	B 0 1 D 15/36	4 H 0 4 5
B 0 1 J 20/281 (2006.01)	B 0 1 J 20/22 D	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)		

(21) 出願番号	特願2016-569418 (P2016-569418)	(71) 出願人	504354117
(86) (22) 出願日	平成26年5月28日 (2014.5.28)		エイジェンシー・フォー・サイエンス、テ
(85) 翻訳文提出日	平成28年11月24日 (2016.11.24)		クノロジー・アンド・リサーチ
(86) 国際出願番号	PCT/SG2014/000232		シンガポール国 シンガポール 1 3 8 6
(87) 国際公開番号	W02015/183180		3 2 コネキシス ノース タワー フェ
(87) 国際公開日	平成27年12月3日 (2015.12.3)		ジオノポリス ウェイ 1 # 2 0 - 1 0
		(74) 代理人	100116872
			弁理士 藤田 和子
		(72) 発明者	ガグノン ピーター スタンレー
			シンガポール国 シンガポール 1 3 8 6
			6 8 セントロス ナンバー06-01
			バイオポリス ウェイ 20
		Fターム(参考)	4B065 AA95X BD14 CA25 CA44
			4D017 AA09 BA07 CA11 CA17 DA03
			DA07 EA05 EB10
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルスの減少方法

(57) 【要約】

タンパク質調製物を第一級アミン、第二級アミンまたはその両方を有する表面と接触させることにより、タンパク質調製物におけるウイルスおよびウイルスDNAのレベルの低下を促進する方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

所望のタンパク質の酸性調製物中のウイルスおよびウイルス DNA のレベルを低下させるための方法であって、前記所望のタンパク質の前記酸性調製物を第一級アミン、第二級アミンまたはその両方を有する表面と接触させるステップを含む方法。

【請求項 2】

前記接触させるステップ中の作用 pH は、(a) 約 2.0 ～ 約 4.0、(b) 約 2.25 ～ 約 3.75、(c) 約 2.5 ～ 約 3.5、(d) 約 2.75 ～ 約 3.25、(e) 約 3.5 ～ 約 3.75 および (f) 約 3.25 ～ 約 3.5 からなる群から選択される範囲にある、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記接触させるステップ中の塩濃度は、(a) 約 0.0 ～ 約 0.5 M、(b) 約 0.05 ～ 約 0.3 M、(c) 約 0.1 ～ 約 0.2 M からなる群から選択される範囲である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記接触させるステップの持続期間は、(a) 約 15 ～ 約 120 分、(b) 約 30 ～ 約 60 分、(c) 約 30 分未満の 0 でない量、(d) 約 15 分未満の 0 でない量、(e) 約 10 分未満の 0 でない量、(f) 約 5 分未満の 0 でない量、(g) 約 2 分未満の 0 でない量、(h) 約 1 分未満の 0 でない量および (i) 前記第一級アミンを有する表面を収容する装置に前記調製物を通すのに必要な時間からなる群から選択される範囲にある、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記表面はエチレンジアミン、トリス(2-アミノエチル)アミン、ジエチルアミントリアミン、トリエチレンテトラアミン、テトラエチレンペンタミンおよびポリアリルアミンからなる群から選択される 1 つまたは複数の部分を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記表面は粒子、膜、モノリス、ヒドロゲル被覆骨格構造体およびそれらの組み合わせからなる群から選択される 1 つの形態である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記接触させるステップは、(a) 第一級または第二級アミンを有する粒子を前記調製物中に分散するステップ、(b) 前記第一級アミンを有する表面と流体接触する装置に前記調製物を通すステップ、(c) 前記第一級アミンを有する表面と流体接触している装置に前記調製物を再循環させるステップ、およびそれらのステップの組み合わせからなる群から選択される操作により行われる、請求項 1 に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書に開示された実施形態は、精製対象の所望のタンパク質を含む調製物中のウイルスおよびウイルスポリヌクレオチドを減少させるための方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

一部のウイルス種は、高酸性 pH など極端な条件への曝露によって不活化することが知られている。これらには、大部分の種の脂質エンベロープウイルスが含まれる。ウイルス種の中には、こうした不活化に対して耐性を持つことが知られているものもある。これらには、タンパク質外被 (protein coat) ウイルスとも呼ばれる多くの非脂質エンベロープウイルス種が含まれる。

【0003】

混入ウイルス種の除去を含むタンパク質の精製には、陰イオン交換クロマトグラフィー

50

が一般に使用される。こうした用途に使用されるアニオン交換体は、第四級アミンイオン交換体であることが多い。これらの用途は中性～ややアルカリ性のpHで行われる。第四級アミンイオン交換体は一般に、そうした条件下で最も強力なウイルス結合を支持するものであり（非特許文献1）、ウイルスの除去と同時に、混入する宿主細胞タンパク質の除去に、そうした条件が必要とされるためである（非特許文献2）。中性～アルカリ性の作用pHでのウイルスおよび宿主細胞タンパク質の除去には、第一級アミンを用いたアニオン交換体も記載されている（非特許文献3）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

10

【非特許文献1】C. カーティス (Curtis) ら著、バイオテクノロジー・アンド・バイオエンジニアリング (Biotechnol. Bioeng.)、第84巻 (2003年) 179～185

【非特許文献2】P. ガニョン (Gagnon) 著、ジャーナル・オブ・クロマトグラフィーA (J. Chromatogr. A) 第1221巻 (2012年) p. 57～70

【非特許文献3】W. リオーダン (Riordan) ら著、バイオテクノロジー・プログレス (Biotechnol. Prog.) 第25巻 (2009年) 1695～1702

【発明の概要】

20

【課題を解決するための手段】

【0005】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるのは、所望のタンパク質の酸性調製物中のウイルスおよびウイルスDNAのレベルを低下させるための方法であって、所望のタンパク質の酸性調製物を第一級アミン、第二級アミンまたはその両方を有する表面と接触させるステップを含む方法である。

【発明を実施するための形態】

【0006】

低pH調製物を、低pH処理中またはその後、第一級および／または第二級アミンを有する固体表面と接触させることにより、所望のタンパク質を含む調製物からのウイルスおよびウイルスDNAの除去の改良のための方法を提供する。本明細書で使用する場合、「低pH」処理とは、ウイルス不活化処理の一環として十分に低いpH、すなわち、少なくとも1つのウイルスを不活化するのに十分に低いpHをいう。したがって、pH範囲の上限は、典型的には約4.0以下である。このためいくつかの実施形態では、低pHは、たとえば約1.0～約4.0、またはいくつかの実施形態では約2.0～約4.0もしくは約2.0～約3.8にわたってもよい。当業者であれば、規制基準に適合するようにpHを選択してもよいことを理解するであろう。典型的な場合には、規制限度の上限pHは約3.8であってもよい。いくつかの実施形態では、所望のタンパク質の酸性調製物中のウイルスおよびウイルスDNAのレベルを低下させるための方法であって、所望のタンパク質の酸性調製物を第一級アミン、第二級アミンまたはその両方を有する表面と接触させるステップを含む方法を提供する。

30

40

【0007】

いくつかの実施形態では、接触させるステップ中の作用pHは、(a) 約2.0～約4.0、(b) 約2.25～約3.75、(c) 約2.5～約3.5、(d) 約2.75～約3.25、(e) 約3.5～約3.75および(f) 約3.25～約3.5、ならびにそれらの範囲の間の中間の範囲または中間の個々の値からなる群から選択される範囲にある。

【0008】

いくつかの実施形態では、接触させるステップ中の塩濃度は、(a) 約0.0、すなわち0でない値から約0.5Mまで、(b) 約0.05～約0.3M、および(c) 約0.

50

1～約0.2 Mからなる群から選択される範囲である。塩濃度は、これらの記載された範囲の間の任意の中間の範囲または中間の個々の値であってもよい。

【0009】

いくつかの実施形態では、接触させるステップの持続期間は、(a) 約15～約120分、(b) 約30～約60分、(c) 約30分未満の0でない量、(d) 約15分未満の0でない量、(e) 約10分未満の0でない量、(f) 約5分未満の0でない量、(g) 約2分未満の0でない量、(h) 約1分未満の0でない量、および(i) 第一級アミンを有する表面を収容する装置に調製物を通すのに必要な時間からなる群から選択される範囲にある。

【0010】

10

いくつかの実施形態では、表面は、エチレンジアミン、トリス(2-アミノエチル)アミン、ジエチルアミントリアミン、トリエチレンテトラアミン、テトラエチレンペンタミン、ポリアルキルアミンからなる群から選択される1つまたは複数の部分を含む。いくつかの実施形態では、表面は任意の第一級アミン、第二級アミンまたはそれらの組み合わせを含んでもよい。表面は、支持体の表面に付着させた任意の直鎖または分岐第一級モノアミンフラグメントに由来しても、あるいはその形態を取ってもよい。例示的な第一級アミン部分として、以下に限定されるものではないが、メチルアミン、エチルアミン、プロピルアミン、イソプロピルアミン、ブチルアミン、sec-ブチルアミン、イソブチルアミン、ヘキシルアミンの任意の異性体、ヘプチルアミンの任意の異性体、オクチルアミン、ノニルアミンの任意の異性体、デシルアミンの任意の異性体に基づくフラグメント、またはそれらの混合物もしくは組み合わせが挙げられる。

20

【0011】

いくつかの実施形態では、ジアミンフラグメントを利用してもよい。好適なジアミンとして、以下に限定されるものではないが、下記のジアミンが挙げられる。



式中、Rは約1および約20の炭素原子を有する直鎖もしくは分岐アルキル基またはアルケニル基、約1および約20の炭素原子を有するシクロアルケニル基、約1および約20の炭素原子を有するアルキルシクロアルケニル基、約1～約20の炭素原子を有するアルカレニル基、約1および約20の炭素原子を有するアラルケニル基もしくは同種のもの、またはそれらの混合物もしくは組み合わせである。R基は、酸素、窒素、フッ素および／または塩素など炭素および水素以外の原子をさらに含んでもよい。

30

【0012】

好適な表面アミン部分は、以下に限定されるものではないが、アルキルジアミン、シクロアルキルジアミン、アルカシクロアルキルジアミン、アラルキルジアミン、アリールジアミン、アルカリルジアミンおよび同種のもの、ならびにそれらのアナログを含むジアミンおよびトリアミンに基づいてもよく、その場合1つまたは複数の炭素原子が窒素原子、酸素原子またはそれらの混合物で置換されていてもよく、酸素原子はカルボキシ部分、ヒドロキシ部分および／もしくはエーテル部分を形成し、窒素原子は第三級アミン部分および／もしくはアミド部分を形成し、ならびに／または、1つもしくは複数の水素原子はフッ素原子、塩素原子またはそれらの混合物で置換されていてもよく、2～約20の炭素原子、約3～約15の炭素原子および約4～約10の炭素原子を含む。例示的なアルキルジアミンとして、以下に限定されるものではないが、1,2-ジアミノエタン(1,2-エチレンジアミン)、1,2-ジアミノプロパン、1,3-ジアミノプロパン、1,2-ジアミノブタン、1,3-ジアミノブタン、1,4-ジアミノブタン、1,2-ジアミノペンタン、1,3-ジアミノペンタン、1,4-ジアミノペンタン、1,5-ジアミノペンタン、および類似の高級ジアミノアルカン、ヘキサメチレンジアミン、アミノメチルシクロペンチルアミン、1,2-シクロペンタンジアミン、1,6-ヘキサレンジアミン、1,2-ジアミノベンゼン、リジン(または他のジアミンアミノ酸)、1,2-ジアミノベンゼン、1,4-ジアミンベンゼン、1,2-ジフェニル-1,2-エタンジアミン、フェニレンジアミン、2-ヒドロキシプロピレンジアミン、ヒダントイン、N,N-ビス(ジ

40

50

ヒドロキシエチル) エチレンジアミン、ヘキサヒドロトリアジン、アミノエチルピペラジン (AEP) もしくは同種のもの、またはそれらの混合物もしくは組み合わせが挙げられる。本組成物の製造に満足に使用することができる他の脂肪族ジアミンおよびトリアミンの例としては、1, 4-ジアミノシクロヘキサンおよびビス-ヘキサメチレントリアミンが挙げられる。前述の実施形態のすべてにおいて、支持体の表面上にアミンを提示することは、窒素自体を含むフラグメントのいずれかの任意の原子への結合により達成することができる。いくつかの実施形態では、第二級アミンを利用してもよい。こうした第二級アミンは、別の直鎖または分岐 $C_1 \sim C_{20}$ フラグメントを含んでもよい。

【0013】

いくつかの実施形態では、表面は、粒子、膜、モノリス、ヒドロゲル被覆骨格構造体およびそれらの組み合わせからなる群から選択される1つの形態である。

【0014】

いくつかの実施形態では、接触させるステップは、(a) 第一級および／または第二級アミンを有する粒子を調製物中に分散するステップ、(b) 表面と流体接触する装置に調製物を通すステップ、(c) 表面と流体接触している装置に調製物を再循環させるステップ、および(d) これらのステップの組み合わせからなる群から選択される操作により行われる。

【0015】

固体表面上の第一級および／または第二級アミンに対するウイルス結合は、陰イオン交換クロマトグラフィーの許容されている法則から抜け出すことが意外にも発見された。結合したウイルスまたはウイルスポリヌクレオチドを、第一級アミンを有する表面から溶出するのに必要な塩の濃度により測定される結合強度は、pHの低下に応じて増加し、場合によってはpH8で同じ表面上の結合と比較して2倍超、pH8で第四級の交換体の結合と比較して5倍超、pH6で第四級の交換体の結合と比較しておよそ10倍増加する。結合は、pH値が低くなると徐々に強くなるため、pH3では、第一級および／または第二級アミンを有する表面からDNAを除去するには、5Mまでのグアニジンが必要とされる。同時に、実験データから、約150kDaより小さい分子量を有するペプチドおよびタンパク質の保持はpH8と比較して向上しないことにより、大部分の調製物における所望のタンパク質が、ウイルスおよびウイルスDNAの保持が向上する条件下で、第一級および／または第二級アミンを有する表面に結合しないウィンドウが生じることが示される。実験データにより、これは、低pHによる処理で著しく不活化することがないA型肝炎ウイルス(HAV: Hepatitis A virus) およびマウス微小ウイルス(MVM: Minute virus of Mice) など非脂質エンベロープウイルスを700倍超低下させることに換算されることが示される。第四級アニオン交換体によるウイルス、DNAおよびタンパク質などの溶質の保持は、溶質の電気陽性が強く(および／または電気陰性が弱く) なる結果、pHの低下と共に減少するため、これは予想外である。このため一般に、陰イオン交換クロマトグラフィーは、酸性pHでの、特にウイルス不活化に通常使用される条件など強酸性のpH値でのウイルス除去には役に立たないと理解される。任意の特定の理論に帰するわけではないが、第一級および／または第二級アミンを有する表面上のウイルスおよびウイルスDNAの反対挙動には、水素結合が介在している可能性がある。水素結合は静電気成分に関与することが知られており、その寄与はイオン交換挙動と一致することが示唆される傾向にあるので、これは予想外である。それでも、選択的水素供与体-受容体、たとえばソルビトールとの競合実験のデータからは水素結合が示される。この挙動は、18~78kDaの範囲の大きさのタンパク質についてpH8と比較してpH6で保持が実質的に増加することを示す；pHの低下と結合の増加に大きさの相関関係がないことを示す；および保持が約pH6で最も強くなり、pHが低下すると弱くなり、pH4~5で失われることを示す(米国特許第6, 090, 288号) 当該技術分野において公知の結果と複数の点で異なり、反対であるため、さらに予想外である。本明細書に開示された方法を支持する実験データから、約66kDaのタンパク質の保持の実質的な向上がない一方、大きさと向上との間に強い相関関係があり、約1MDa

10

20

30

40

50

以上に近づく大きさを有する溶質の保持は6未満のpH値で、特にpH値4未満で引き続き強くなることが示されており、これらすべては必要な実現要因である。

【0016】

いくつかの実施形態では、作用pHは、所望のタンパク質がその臨床的有効性または安全性に影響し得る永久的損傷を受けずに許容できる最低pHまで、pH5もしくはそれ未満、または4もしくはそれ未満、または3.9もしくはそれ未満、または3.8もしくはそれ未満、または3.7もしくはそれ未満、または3.6もしくはそれ未満、または3.5もしくはそれ未満、または3.4もしくはそれ未満、または3.3もしくはそれ未満、または3.3もしくはそれ未満、または3.2もしくはそれ未満、または3.1もしくはそれ未満、または3.0もしくはそれ未満など6未満であってもよい。いくつかの実施形態では、許容可能なpHは2.5もしくはそれ未満、または2.0もしくはそれ未満、または約1.0であってもよい。許容可能な最低pHは、所望の各生成物に特有なものであり、大まかな一般論として表現できないと理解される。いくつかの実施形態では、脂質エンベロープウイルス種でも不活化には、4未満のpHが必要とされるため、最大pHは約4以下である。いくつかの実施形態では、pHは3.25~3.75であろう。

10

【0017】

いくつかの実施形態では、調製物は塩を有していなくてもよい。いくつかの実施形態では、調製物は1つまたは複数の種の塩を含んでもよく、そうした塩の濃度は、0.01Mまでの、0.05Mまでの、0.1Mまでの、0.2Mまでの、0.3Mまでの、0.4Mまでの、0.5Mまでの、またはより高く、場合によっては1.0Mまでの0でない量である。そうしたいくつかの実施形態では、塩の種は塩化ナトリウム(NaCl)であってもよい。いくつかの実施形態では、塩の存在は第一級アミンを有する表面によるウイルス除去に対して無視できる程度の作用を有し得る一方、いくつかの実施形態では、塩の存在は、第一級アミンを有する表面により達成されるウイルス除去の程度を低下させ得る。いくつかの実施形態では、塩の存在はウイルス不活化を促進する、あるいは所望のタンパク質の安定性を高めるまたは所望のタンパク質の溶解性を低下させることがある。こうした作用は、所望のタンパク質の種ごとに判定することができる。いくつかの実施形態では、表記の範囲内での塩濃度の上昇は、低pHでの処理によってのみ達成される不活化の程度よりも、第一級アミンを有する表面によりウイルス除去が促進される程度を限定することもあるが、除去の程度は依然として著しいものである。

20

30

【0018】

いくつかの実施形態では、調製物は、ウイルス不活化を促進することを意図した要素、たとえばエタクリジン、メチレンブルー、ダウノマイシン、ドキシソルビシン、クロルヘキシジン、アレキシジン、塩化ベンザルコニウム、トリス(2-アミノエチル)アミン、トリ(N-ブチル)ホスフェート、界面活性剤、キレート化剤またはそうした要素の組み合わせを含んでもよい。

【0019】

いくつかの実施形態では、第一級アミンを有する表面はさらに、第二級アミン基など他の種の電気陽性化学部分を含んでもよい。他の実施形態では、第一級アミンを有する表面はさらに、第三級または第四級アミン基など他の種の電気陽性化学部分を含んでもよい。いくつかの実施形態では、第一級アミンを有する表面はさらに、2種以上の電気陽性化学部分を含んでもよい。いくつかの実施形態では、第一級アミンを有する表面はさらに、第二級および第三級アミン；第二級および第四級アミン；第三級および第四級アミン；第二級、第三級および第四級アミンからなる電気陽性化学部分の組み合わせを任意の相対的比率で含んでもよい。

40

【0020】

いくつかの実施形態では、第一級アミンを含む化学種はトリス(2-アミノエチル)アミン(TREN)であってもよい。他の実施形態では、第一級アミンを含む化学種はエチレンジアミンであってもよい。他の実施形態では、第一級アミンを含む化学種はポリアリルアミンでも、または別の高分子第一級アミンでもよい。

50

【0021】

いくつかの実施形態では、第一級アミンを有する表面は、それが全体として静電的相互作用、水素結合、疎水性相互作用、 $\pi-\pi$ 結合および金属配位相互作用に従事することを可能にする化学元素を含んでもよい。

【0022】

いくつかの実施形態では、第一級アミンを有する表面は、第一級アミンと反対の電荷を有する元素を含んでもよい。いくつかの実施形態では、第一級アミンを有する表面は、無電荷であるか平衡比率の負電荷および正電荷を含むかのいずれかまたは両方によって、電気的中性の元素を含んでもよい。

【0023】

複数の表面が存在するいくつかの実施形態では、それぞれの表面は、同じ第一級アミンを含む種を有してもよい。複数の表面が存在するいくつかの実施形態では、それぞれの表面は、異なる第一級アミンを含む種を有してもよい。複数の表面が存在するいくつかの実施形態では、それぞれの表面の一部は第一級アミン以外の種を有してもよい。

【0024】

いくつかの実施形態では、第一級アミンを有する固体表面は、粒子、膜、モノリス、巨大網状骨格上のヒドロゲルの物理的形状であってもよい。そうしたいくつかの実施形態では、複数の粒子、または複数の膜、または複数の他の物理的形状、または異なる物理的形状の組み合わせなど複数の物理的単位が存在してもよい。そうしたいくつかの実施形態では、複数の粒子をカラムに充填してもよい。

【0025】

いくつかの実施形態では、複数の第一級アミンの表面は、所望のタンパク質を含む調製物中に懸濁してもよい。そうしたいくつかの実施形態では、懸濁された表面は、処理後に沈降、または濾過、または浮選、または磁場における捕捉、または反対電荷表面上での捕捉、または他の任意の都合のよい手段により除去することができる。いくつかの実施形態では、所望のタンパク質を含む調製物は、ウイルス不活化のための低pH処理が名目上完了した後、1つまたは複数の第一級アミンを有する流体接触表面を含む装置内に流してもよい。いくつかの実施形態では、所望のタンパク質調製物は、1つまたは複数の第一級アミンの流体接触表面を含む装置を通して、低pH処理の全持続期間までの期間、連続的に再循環してもよい。いくつかの実施形態では、所望のタンパク質調製物は、前述の接触様式の任意の組み合わせにより、1つまたは複数の第一級アミン結合表面と接触させてもよい。

【0026】

本開示方法の重要な要素を説明する一実施形態では、IgGモノクローナル抗体など部分的に精製された所望のタンパク質を含む調製物をpH 3.5に滴定し、そのpHで60分間維持する。エチレンジアミンを有するように修飾された表面を有するモノリスを、抗体調製物と名目上同じpHおよび塩条件に平衡化する。次いで調製物をモノリスに流す。モノリスは任意に、所望のタンパク質の回収を最大化するためpH 3.5の洗浄緩衝液でリンスしてもよい。次いでモノリスは任意に廃棄しても、または再生させてもよい。

【0027】

本開示方法の重要な要素を説明する別の実施形態では、部分的に精製された抗体を含む調製物をpH 3.5に滴定する。エチレンジアミンを有するように修飾された表面を有するモノリスを、抗体調製物と名目上同じpHおよび塩条件に平衡化する。次いで所望のタンパク質が60分間または他の何らかの特定の時間間隔でpH 3.5に曝されるまで、調製物をモノリスに再循環させる。

【0028】

本開示方法の重要な要素を説明する別の実施形態では、部分的に精製された抗体を含む調製物をpH 3.5に滴定する。ポリアリルアミンを有するように修飾された表面を有する膜吸着材を、抗体調製物と名目上同じpHおよび塩条件に平衡化する。次いで調製物を60分の期間膜に再循環させる。密接に関連する実施形態では、抗体調製物をpH 3.5

10

20

30

40

50

で60分間インキュベートし、次いでシングルパスで膜吸着材に流す。

【0029】

本開示方法の重要な要素を説明する別の実施形態では、部分的に精製された抗体を含む調製物をpH3.5に滴定する。エチレンジアミン、またはポリアリルアミン、または他の第一級アミンを含むリガンドを有するように修飾された表面を有する粒子を、抗体調製物と名目上同じpHおよび塩条件に平衡化する。粒子を攪拌により60分の期間懸濁状態で維持し、その後粒子を沈降または濾過または他の任意の都合のよい方法により除去する。粒子は任意に、所望のタンパク質の回収を最大化するため、pH3.5の洗浄緩衝液でリンスしてもよい。密接に関連する実施形態では、抗体調製物をpH3.5で60分間インキュベートし、次いでエチレンジアミン、ポリアリルアミン、トリス（2-アミノエチル）アミン、または他の第一級アミンを含むリガンドを有する粒子を充填したカラムに通す。

10

【0030】

本明細書の実施形態をより容易に理解できるように、下記の用語を定義する。他の定義は、詳細な説明を通じて記載される。

【0031】

「アミン」は、有機ラジカルとの、多くの場合、メチル基またはエチル基などの炭化水素との、1つまたは複数の水素原子の置換によりアンモニアから誘導される有機化合物と定義される。「第一級アミン」では、1個の水素原子が有機ラジカルで置換されている。「第二級アミン」では、2個の水素が有機ラジカルで置換されている。「第三級アミン」では、3個の水素が有機ラジカルで置換されている。「第四級アミン」では、3個の水素が有機ラジカルで置換されており、第四の有機ラジカルが置換のないアミン上に存在する電子対に置き換わっている。第一級アミンを含む化合物は、他の種類のアミンまたは非アミン種を含んでもよい。

20

【0032】

「水素結合」は、1つには、1つの分子のプロトンと、もう1つの分子の電気陰性原子との間の静電引力に、1つには共有結合性相互作用に起因する2つの分子間の弱い結合と定義される。

【0033】

「ウイルス」または「ビリオン」とは、超顕微鏡的（直径およそ20～300nm）で代謝的に不活性な感染病原体をいい、生きている宿主、主に細菌、植物および動物の細胞内でのみ複製し、RNAまたはDNAコアと、タンパク質外被と、より複雑なタイプの場合、1つまたは2つの脂質層を含む周囲のエンベロープとからなる。例として、以下に限定されるものではないが、dsDNAウイルス、ssDNAウイルス、dsRNAウイルス、（+）ssRNAウイルス、（-）ssRNAウイルス、ssRNA RTウイルスおよびdsDNA-RTウイルス；アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ボックスウイルス、パルボウイルス、レオウイルス、ノロウイルス、ピコルナウイルス、トガウイルス、オルソミクソウイルス、ラブドウイルス、レトロウイルス、ヘパドナウイルス（hepadnavirus）、パピローマウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、インフルエンザウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスおよびバクテリオファージが挙げられる。ウイルスという用語は、遺伝子治療のベクターとして使用される、ワクチンとして使用される、および抗生物質の代替品としてのウイルス粒子を含むものと理解される。ウイルスという用語はまた、いわゆる偽ウイルス粒子も含むものと理解され、偽ウイルス粒子は、防御免疫を発現するその能力を保存しつつ、感染を引き起こすその能力を除去するように組換えにより改変されたウイルス粒子ということもでき、さらに異なるウイルスの種が、両方に感染した宿主内で遺伝子を一方から他方に自然に伝達する異種指向性ウイルス種ということもできる。

30

40

【0034】

「ウイルス不活化」とは、その複製能力を停止するようにウイルスを損傷させるプロセスをいう。この目的のためには、加熱が一般に使用され、さらに化学薬品または高酸性も

50

しくは高アルカリ性条件などの極端な化学環境への曝露、あるいは特に有機溶媒への曝露も使用される。

【0035】

「ウイルス除去」とは、調製物からウイルスを除去するプロセスをいう。こうした除去は、濾過装置の空隙がウイルスの通過を妨げる濾過、またはウイルスの大きさにより、ウイルスがより小さなタンパク質から分画されるサイズ排除クロマトグラフィーなど物理的方法によるものであってもよい。除去はまた、イオン交換、親和性、疎水性相互作用もしくはヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、または他のクロマトグラフィー法などのクロマトグラフィー表面など相補的表面とのウイルスの化学結合によるものであってもよい。

10

【0036】

「ウイルスの減少」とは、不活化および除去による調製物からの全体的なウイルス量の減少をいう。

【0037】

「ウイルスポリヌクレオチド」とは、ウイルスの遺伝子材料、ある例ではDNA、場合によってはRNAをいう。

【0038】

ある種の実施形態では、本開示方法は、ウイルスの減少を促進するための上述の一般的な例を変更せずに適用してもよい。不活化溶液のpHは、第一級アミンを有する固体材料を考慮することなく、可能な最高度のウイルス不活化を達成するように選択すべきである。pH 4より低い値から約pH 3の値であってもよい、目的の産物を永久的に損傷しない、ウイルスを不活化することが分かっているpH値の有効範囲内であれば、固体材料は、実質的に正味のウイルス低下を促進すると予想され得る。曝露時間も、第一級アミンを有する固体材料に関係なく選択してもよい。曝露温度も、第一級アミンを有する固体材料に関係なく選択してもよい。抗ウイルス要素の添加は考慮してもよいが、しかしながら、その個別および全体の影響を評価するため、いくつかの変動要素を点検することが賢明であろう。非イオン添加剤、両性イオン添加剤または正電荷を帯びた添加剤は、第一級アミンを有する固体材料がウイルスまたはウイルスDNAを保持する能力を大きく妨害することなく、許容されると予想され得る。電気陰性の添加剤は、第一級アミンを有する固体材料へのウイルス結合に干渉する傾向があり得る。塩などの導電性添加剤は、第一級アミンを有する固体材料がウイルスに結合する能力を限定する可能性があるけれども、一般に、およそ生理的導電率以下を生じる塩濃度は、十分に許容され、いくつかの実施形態では、生理的導電率の2倍または3倍の塩濃度でもなお、第一級アミンを有する固体材料は、全体としてウイルスの減少の相当な促進を発揮することができる。第一級アミンを有する固体材料がウイルスを減少させる能力を、添加剤が低下させ得る程度を判定するには、様々なレベルの添加剤で単純な実験を行うことができる。所与の変動要素のセットに最適な条件を特定するため統計学的に妥当な多くのデータを得るのに必要とされる試験数を最小限に抑えるには、実験計画法(DoE: Design of Experiments)と呼ばれる技法が、当該技術分野において広く知られている。一般的な事柄として、第一級アミンを有する固体材料に関係なく、最も効果的なウイルス不活化を支持する条件は、第一級アミンを有する固体材料と組み合わせて、全体としてウイルスの最大の減少を支持する。

20

30

40

【0039】

いくつかの実施形態では、本開示方法は、ウイルスの減少を促進すると同時にDNAおよび／または混入タンパク質の除去を促進する。実験データから、これがウイルスの減少と同じ化学的機構により起こり、意外にもpHの低下と共に高まることが示される。そうしたいくつかの実施形態では、たとえば第一級アミンを有する表面に結合するのがまさに所望の産物である場合、ウイルスの最高の減少に都合がよい実際に即した最低の塩濃度を利用すると有利であり得る。他の実施形態では、たとえば所望のタンパク質が第一級アミンを有する表面に引き付けられる場合、所望の産物の減少を防止する、および結合した所

50

望のタンパク質がウイルス結合能に干渉するのを防止するという二重の目的で塩濃度を高めることが必要であるかもしれない。そうしたいくつかの実施形態では、塩濃度の上昇は一般に、所望のタンパク質の減少および／またはウイルス結合への所望のタンパク質の干渉を防止するのに必要とされる以上に高くするべきでない。所望のタンパク質種は各々、異なる特性を示すため、塩が必要かどうかを判定するのに、およびその最小有効濃度を判定するのに実験が必要とされることがあることが理解される。単純な実験により有効濃度を判定することは、当業者の能力の範囲内である。

【0040】

いくつかの実施形態では、ウイルスの減少にはどれが最も効果的な接触および最高の性能を与えるかを判定するため、第一級アミンを有する表面と様々な形態および組成の装置とを評価することが有益になる。一般的な事柄として、膜はモノリスより流れ抵抗が少ないけれども、モノリスの方がウイルス結合能が高い。所望のタンパク質調製物に懸濁した多孔質粒子は一般に、ウイルスおよび荷電粒子間の分子距離が大きいため、性能が不十分であり、ウイルス結合反応速度が遅いという難点がある。多孔質粒子を充填したカラムは、懸濁粒子より反応速度は速いものの、膜およびモノリスに比較してやはり遅く、依然として低性能という難点があるが、それでも多孔質粒子は、ウイルスの減少の相当の促進を達成し得る。

【実施例】

【0041】

実施例 1

エチレンジアミンを有するモノリス（C I M E D A、B I A セパレーションズ（B I A S e p a r a t i o n s））の pH に応じた DNA 結合。サケ精子由来のゲノム DNA をウイルス DNA の代替として使用した。別の実験で E D A モノリスを pH 8.0 ~ 3.5 の範囲の緩衝液で平衡化した。50 mM のトリス、pH 8 に懸濁した DNA をモノリスに通液した。非結合サンプル要素を排除するための洗浄ステップ後、NaCl またはグアニジンの直線グラジエントで DNA を溶出した。どちらの場合も結果は、pH 4 から保持の強度の不釣り合いな増加を示す。実験結果を下記表 1 に示す。

【0042】

【表 1】

表1

pH	緩衝種	M NaCl溶出	M グアニジン溶出
8.0	50mMのトリス	1.65	1.84
7.0	50mMのHepes	2.00	2.15
6.0	50mMのMES	2.82	2.79
5.0	50mMのアセテート	3.35	3.06
4.0	50mMのアセテート	4.85	5.39
3.0	50mMのアセテート	4.85	5.41

【0043】

実施例 2

第一級アミンを有する表面上の DNA 保持の向上と第四級アミンを有する表面上の保持の低下。サケ精子由来のゲノム DNA をウイルス DNA の代替として使用した。第一級アミンを有するモノリス（C I M E D A、B I A セパレーションズ）上と第四級アミンを

有するモノリス（C I M Q A、B I Aセパレーションズ）上とのDNAの保持をp H 8、7および6で評価した。DNAはQ Aからp H 8. 0では0. 6 MのN a C lで溶出し、p H 7. 0では0. 5 5 MのN a C lに低下し、p H 6. 0では0. 4 7 MのN a C lにさらに低下した。DNAはE D Aからp H 8. 0では0. 8 3 MのN a C l、p H 7. 0では1. 1 1 MのN a C l、p H 6. 0では1. 8 MのN a C lで溶出した。これらの結果は、第一級アミンを有する表面上の保持は、p Hの動向と反対であり、かつ第四級アミンを有する表面で観察されるより劇的にはるかに大きいということを浮き彫りにする。

【0044】

実施例3

第一級アミンを有する表面上のウイルス保持の向上と第四級アミンを有する表面上の保持の低下。バクテリオファージM 1 3を試験ウイルスとして使用した。第一級アミンを有するモノリス（C I M E D A、B I Aセパレーションズ）上と第四級アミンを有するモノリス（C I M Q A、B I Aセパレーションズ）上とのDNAの保持をp H 8、7および6にて評価した。DNAはQ Aからp H 8. 0では0. 7 MのN a C lで溶出し、p H 7. 0では0. 6 1 MのN a C lに低下し、p H 6. 0では0. 5 3 MのN a C lにさらに低下した。DNAはE D Aからp H 8. 0では1. 0 2 MのN a C l、p H 7. 0では1. 4 7 MのN a C l、およびp H 6. 0では2. 5 MのN a C lで溶出した。これらの結果は、第一級アミンを有する表面上保持は、p Hの動向と反対であり、かつ第四級アミンを有する表面で観察されるより劇的に大きいということを浮き彫りにする。

【0045】

実施例4

第一級アミンを有するモノリスを用いたマウス微小ウイルス（M V M）の減少の促進。M V Mを含むウイルス細胞培養物をp H 3. 5に60分間曝した。M V Mは、これらの条件により不活化されないことが知られている。固形物を濾過により除去し、濾液を、p H 3. 5に平衡化したE D Aモノリスに通液した。M V M含有量は、2. 8 5 l o g₁₀倍低下した。これは、ウイルスの減少の約700倍の向上に相当し、特に、とりわけM V Mなどのレトロウイルス種を含む非エンベロップウイルス種の除去を促進する本開示方法の能力を浮き彫りにする。

【0046】

実施例5

第一級アミンを有するモノリスを用いた、A型肝炎ウイルス（H A V）の減少の促進。H A Vを含むウイルス細胞培養物をp H 3. 5に60分間曝した。H A Vは、これらの条件により不活化されないことが知られている。固形物を濾過により除去し、濾液を、p H 3. 5に平衡化したE D Aモノリスに通液した。M V M含有量は、2. 8 5 l o g₁₀倍低下した。これは、ウイルスの減少の約700倍の向上に相当し、非エンベロップウイルス種の除去を促進する本開示方法の能力を浮き彫りにする。

【0047】

本開示方法がさらに、ウイルス、特に非脂質エンベロップウイルスの精製にも使用され得、低p Hの結合が、精製と共に脂質エンベロップウイルスを不活化する第2の利益となり得ることは、当業者に明らかであろう。同じ理由で、本開示方法はさらに、脂質エンベロップウイルスが混入している可能性がある調製物からのDNAの単離にも使用され得ることも同様に明らかであろう。どちらの場合も、標的産物の保持をその大きさに応じて大きく向上させる本開示方法の能力は、タンパク質などのより小さな混入物の排除にも都合がよい。

【0048】

本明細書に引用する参考文献はすべて、1つ1つの刊行物または特許または特許出願について、それらの全体をあらゆる目的において援用するために具体的に個々に示しているかのように、それらの全体をあらゆる目的において援用する。援用する刊行物および特許または特許出願が本明細書に含まれる開示と矛盾する範囲で、本明細書は、そうした任意の矛盾する材料に取って代わるおよび／または優先する。

【0049】

本明細書および特許請求の範囲に記載された成分、クロマトグラフィー条件などの量を表す数字はすべて、あらゆる場合において、「約」という語で修飾されているものと理解すべきである。したがって、異なる記載がない限り、本明細書および添付の特許請求の範囲に記載された数値パラメータは、本実施形態が得ようとする所望の性能によって変動してもよい近似値である。

【0050】

当業者に明らかなように、本明細書における実施形態の多くの修正および変形は、その精神および範囲から逸脱しない範囲でなし得る。本明細書に記載の特定の実施形態は、例示を提供するものに過ぎず、いかなる意味でも限定を意図するものではない。本明細書および例は、単なる例示と見なされることを意図しており、実施形態の真の範囲および精神は、添付の特許請求の範囲により示される。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SG2014/000232
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 1/14 (2006.01)		
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)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Medline, WPI, EPODOC, CAPLUS, Biosis. Keywords: virus, viral, viral DNA, virus DNA, reduce, decrease, limit, remove, lower, chromatograph, purify, separate, isolate, acid, low pH, protein, peptide, polypeptide, antibody, immunoglobulin, TREN, tris(2-aminoethyl)amine, diethylenetriamine, triethylenetetramine, tetraethylenepentamine, amine, particle, membrane, monolith hydrogel-coated skeletal framework, Gagnon P and related terms.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ 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 26 August 2014	Date of mailing of the international search report 26 August 2014	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au	Authorised officer Ishanee Mookerjee AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262256167	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/SG2014/000232
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/062841 A1 (BIO-RAD LABORATORIES INC.) 02 May 2013 [0021], [0025], [0032]-[0034], [0035], [0040], [0041]	1-4, 6, 7
X	WO 2013/180655 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH) 05 December 2013 [0004], [0007], [0009], [0024], [0033], [0034]	1, 2, 4, 5, 7

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SG2014/000232	
Information on patent family members			
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2013/062841 A1	02 May 2013	CN 103906762 A	02 Jul 2014
		US 2013109807 A1	02 May 2013
WO 2013/180655 A1	05 December 2013	None	
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

フロントページの続き

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

Fターム(参考) 4G066 AB10B AB13B AC12B AC33B BA01 BA03 BA09 BA28 CA01 CA56
DA07 EA01
4H045 AA20 DA76 EA20 GA23