

(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2012-503178

(P2012-503178A)

(43) 公表日 平成24年2月2日 (2012. 2. 2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G 0 4 3
GO 1 N 33/58 (2006.01)	GO 1 N 33/58 Z	2 G 0 4 5
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 2 O 1 R	4 B 0 6 3
GO 1 N 30/96 (2006.01)	GO 1 N 30/96 B	
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-526868 (P2011-526868)	(71) 出願人	390019585
(86) (22) 出願日	平成21年9月15日 (2009. 9. 15)		ミリポア・コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成23年5月6日 (2011. 5. 6)		MILLIPORE CORPORATION
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/005142		アメリカ合衆国01821マサチューセツ
(87) 国際公開番号	W02010/030393		州ビレリカ、コンコード・ロード290
(87) 国際公開日	平成22年3月18日 (2010. 3. 18)	(74) 代理人	110001173
(31) 優先権主張番号	61/192, 082		特許業務法人川口国際特許事務所
(32) 優先日	平成20年9月15日 (2008. 9. 15)	(72) 発明者	ビアン, ナーニン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国、マサチューセツツ・01
			803、ビレリカ、コンコード・ロード・
			290、ミリポア・コーポレーション気付
			Fターム (参考) 2G043 AA01 BA16 CA06 DA01 EA01
			KA02 KA03 KA05 NA01
			2G045 AA40 DA36 FB12 GC15
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質をベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂からのタンパク質漏出を定量するための方法

(57) 【要約】

本発明は、タンパク質（例えば、免疫グロブリン）に結合する分子を単離するおよび/または除去するために使用される、タンパク質をベースとするアフィニティークロマトグラフィー媒質（例えば、プロテインA、プロテインGおよびプロテインLをベースとするアフィニティークロマトグラフィー媒質）からの、タンパク質漏出を定量する方法を提供する。

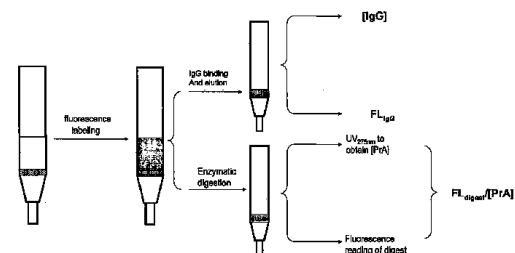


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Pr Aをベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂からのPr A漏出を定量するための方法であって、

(a) Pr Aをベースとするクロマトグラフィー樹脂を、1種以上の蛍光タグで標識するステップ；

(b) 標識された樹脂を、同等の第1および第2の部分に分割するステップ；

(c) 第1の部分に適した手段を用いて処理し、標識されたPr Aを樹脂から解離させ、ならびに第2の部分に過剰量の免疫グロブリン(Ig)を加えるステップ；

(d) ステップ(c)における第1の部分中の処理された樹脂から、蛍光(FL_{digest})およびPr A濃度([Pr A])を測定するステップ；ならびに

(e) ステップ(c)における第2の部分からのIg溶出液中の樹脂Ig溶出液濃度([Ig])および蛍光シグナル(FL_{Ig})を測定するステップ

を含み、

Pr A漏出は、 $\{ (FL_{Ig}) / ((FL_{digest}) / [Pr A]) \} / [Ig]$ を計算することによって定量される、方法。

【請求項 2】

Pr Aをベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂からのPr A漏出を定量するための方法であって、

(a) Pr Aをベースとするクロマトグラフィー樹脂を、1種以上の蛍光タグで標識するステップ；

(b) 標識された樹脂に過剰量の免疫グロブリン(Ig)を加え、樹脂からのIg溶出液(FL_{Ig})中の樹脂Ig溶出液濃度([Ig])および蛍光シグナルを測定するステップ；

(c) 残余のIgを樹脂から除去した後、樹脂に適した手段を用いて処理し、標識されたPr Aを樹脂から解離させるステップ；ならびに

(d) 処理された樹脂から、蛍光(FL_{digest})およびPr A濃度([Pr A])を測定するステップ

を含み、

Pr A漏出は、 $\{ (FL_{Ig}) / ((FL_{digest}) / [Pr A]) \} / [Ig]$ を計算することによって定量される、方法。

【請求項 3】

免疫グロブリンがIg Gである、請求項1の方法。

【請求項 4】

1種以上の、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーおよび疎水性交換クロマトグラフィー、弱分配クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーまたはこれらの任意の組合せを使用して、浸出されたPr Aを除去するステップをさらに含む、請求項1の方法。

【請求項 5】

蛍光タグが、Alexa Fluor 488、Dylight 488、Hilyte Fluor 488、5-FAM、SEおよび6-FAM、SEからなる群から選択される、請求項1の方法。

【請求項 6】

適した手段が化学的処理を含む、請求項1の方法。

【請求項 7】

適した手段が酵素的処理を含む、請求項1の方法。

【請求項 8】

酵素的処理が、トリプシン、ペプシン、キモトリプシン、サーモリシンおよびスブトレリシン(subtlelysin)の使用を含む、請求項7の方法。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

化学的処理が、酸または塩基の使用を含む、請求項 6 の方法。

【請求項 10】

Pr A をベースとするクロマトグラフィー樹脂が、ProSep A high capacity、ProSep A Ultra、ProSep Ultra Plus、Mabselect、Mabselect Xtra、Mabselect Sure、Sephacrose Protein A、Sartobind Protein A および Protein Sepharose Fast Flow からなる群から選択される、請求項 1 の方法。

【請求項 11】

蛍光が、蛍光光度計を使用して測定される、請求項 1 の方法。

10

【請求項 12】

Ig が、適した pH を使用して溶出される、請求項 1 の方法。

【請求項 13】

Ig がモノクロナルである、請求項 1 の方法。

【請求項 14】

Ig がポリクロナルである、請求項 1 の方法。

【請求項 15】

免疫グロブリンが Ig G である、請求項 2 の方法。

【請求項 16】

1 種以上の、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーおよび疎水性交換クロマトグラフィー、弱分配クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーまたはこれらの任意の組合せを使用して、浸出された Pr A を除去するステップをさらに含む、請求項 2 の方法。

20

【請求項 17】

蛍光タグが、Alexa Fluor 488、Dylight 488、HiLyte Fluor 488、5-FAM、SE および 6-FAM、SE からなる群から選択される、請求項 2 の方法。

【請求項 18】

適した手段が化学的処理を含む、請求項 2 の方法。

【請求項 19】

適した手段が酵素的処理を含む、請求項 2 の方法。

30

【請求項 20】

酵素的処理が、トリプシン、ペプシン、キモトリプシン、サーモリシンおよびスブトレリシンの使用を含む、請求項 19 の方法。

【請求項 21】

化学的処理が、酸または塩基の使用を含む、請求項 18 の方法。

【請求項 22】

Pr A をベースとするクロマトグラフィー樹脂が、ProSep A high capacity、ProSep A Ultra、ProSep Ultra Plus、Mabselect、Mabselect Xtra、Mabselect Sure、Sephacrose Protein A、Sartobind Protein A および Protein Sepharose Fast Flow からなる群から選択される、請求項 2 の方法。

40

【請求項 23】

蛍光が、蛍光光度計を使用して測定される、請求項 2 の方法。

【請求項 24】

Ig が、適した pH を使用して溶出される、請求項 2 の方法。

【請求項 25】

Ig がモノクロナルである、請求項 2 の方法。

【請求項 26】

50

I g がポリクロナールである、請求項 2 の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本出願は、2008年9月15日に出版された米国仮特許出願第61/192,082号の優先権の利益を主張するものである。この全内容は、参照により本明細書に完全に組み込まれる。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、限定されないが、プロテインA、プロテインGおよびプロテインLをベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂を含む、タンパク質をベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂からのタンパク質漏出を定量するための方法に関する。

10

【背景技術】

【0003】

(背景)

タンパク質をベースとするアフィニティークロマトグラフィーは、タンパク質、DNAおよび他の化学分子および生物分子の精製に、実験室規模から、パイロット規模、生産規模までの範囲に及ぶ種々の規模で、幅広く使用されている。例えば、Hermanson他、Immobilized Affinity Ligand Techniques、Academic Press, Inc. San Diego, CA, 317-346頁(1992)を参照されたい。これらの中で、プロテインA(PrA)、プロテインG(PrG)およびプロテインL(PrL)をベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂は、免疫グロブリン(Ig)の検出および/または精製のための、よく知られており幅広く使用されている方法であるが、それらはそれぞれ、Igとの結合に関して異なる特異性を有する。

20

【0004】

例として、PrAをベースとする試薬は、バイオテクノロジーの分野において、例えば、抗体の捕捉および精製のためのアフィニティークロマトグラフィーにおいてならびに抗体検出方法において、広範囲に及ぶ使用を特に見出されている。現在において、PrAをベースとするアフィニティ媒質または樹脂は恐らく、細胞培養物を含む種々のサンプルからモノクロナール抗体およびこれらの断片を単離するための、最も幅広く使用されているアフィニティ媒質である。したがって、プロテインA-リガンドを含む種々のマトリックスが市販されており、これには例えば、ProSep(登録商標)-vA High Capacity、ProSep(登録商標)vA UltraおよびProSep(登録商標)UltraPlus(Millipore)ならびにProtein A Sepharose(商標)、rmp Protein A Sepharose Fast Flow、MabSelect(商標)、MabSelect Xtra(商標)およびMabSelect SuRe(登録商標)(GE Healthcare)、Poros MabCapture A(Applied Biosystems)ならびに Sartobind Protein A(Sartorius)が含まれる。

30

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Hermanson他、Immobilized Affinity Ligand Techniques、Academic Press, Inc. San Diego, CA, 317-346頁(1992)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

50

(発明の要旨)

タンパク質をベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂、例えば、プロテインA、GおよびLをベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂は、これらに結合する分析物または分子、例えば、PrA、PrGおよびPrLの場合には免疫グロブリン(Ig)の精製に非常に望ましいが、1つの欠点は、クロマトグラフィーカラムから、関心対象の分析物または分子、例えば、免疫グロブリンと一緒に、タンパク質、例えば、プロテインA、GまたはLが漏出することである。例えば、プロテインAをベースとするアフィニティークロマトグラフィーは、例えば、高い捕集容量で抗体を特異的に結合させるその能力のために、抗体の大規模精製におよび高純度を達成するのに非常に望ましいが、それ自体の生物活性および毒性学プロファイルのために、浸出されたPrAは通常、免疫グロブリン溶出液中の望ましくない不純物と考えられている。したがって、本発明のいくつかの態様において、PrA漏出をモニターし、その後のクロマトグラフィーステップにおいて、最後にそれを除去することが望ましい。例えば、PrA漏出を最小限に抑えるための1つのやり方は、クロマトグラフィーカラムからの最小量のPrA漏出を示すPrA樹脂を使用することである。したがって、いくつかの態様において、本発明の方法は、クロマトグラフィーカラムからの最小量の漏出を示す、限定されないが、PrA、PrGおよびPrLをベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂を含む、タンパク質をベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂を明らかにするために使用され得る。そのようなタンパク質をベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂は、知られている樹脂および将来開発され得る樹脂を含む。

10

20

【0007】

多くの酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)に基づいたスクリーニングアッセイが、クロマトグラフィーカラムからのPrA漏出を検出するために開発されている。しかし、これらのアッセイの多くは、アフィニティークロマトグラフィーおよびその後のクロマトグラフィーステップの後に、例えば、PrAをベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂の比較を提供するための、最小量のPrA漏出を示す樹脂を明らかにするためのおよび抗体溶出プール中に浸出されたPrAをモニターするための分析ツールとして適しているにしては、事実上定性的であり、一般に、より高い変動性(例えば、25%以上)を示す。

【0008】

30

蛍光タグは、そのようなタグに伴う高感度および高選択性のために、生化学および化学の研究において幅広く使用されている。例えば、アフィニティークロマトグラフィーから浸出されたプロテインAは、これまで蛍光色素を使用して検出されてきたが、そのような色素は、定性的な情報を生み出すために、例えば検出するために普通は使用されており、いずれの定量的な情報も、例えば、浸出されたPrAの量をもたらしさない。例えば、Carter - Franklin他、Journal of Chromatography A、1163:105-111頁(2007)を参照されたい。

【課題を解決するための手段】

【0009】

40

本発明は、少なくとも1つには、例えば、蛍光タグを使用して、クロマトグラフィー媒質または樹脂からのタンパク質の漏出、例えば、PrAの漏出を検出するための定量的な方法に関する。本発明による方法は、10%未満の変動性を示し、最小量のPrA漏出を示すPrAクロマトグラフィー樹脂を明らかにするのに特に適している。

【0010】

本発明による一態様において、(a)PrAをベースとするクロマトグラフィー樹脂を、1種以上の蛍光タグで標識するステップ；(b)標識された樹脂を、同等の第1および第2の部分に分割するステップ；(c)第1の部分に適した手段を用いて処理し、標識されたPrAを樹脂から解離させ、第2の部分に過剰量のIgを加えるステップ；(d)ステップ(c)における第1の部分中の処理された樹脂から、蛍光(FL digest)およびPrA濃度([PrA])を測定するステップ；ならびに(e)ステップ(c)にお

50

ける第2の部分からのI_g溶出液中の樹脂I_g溶出濃度([I_g])および蛍光シグナル(F_{L_{I_g}})を測定するステップを含み、PrA漏出は、{(F_{L_{I_g}})/(F_{L_{d_{i_ge_st}}})/[PrA])}/[I_g]を計算することによって定量される、PrAをベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂からのPrA漏出を定量するための方法が提供される。

【0011】

本発明による別の態様において、(a)PrAをベースとするクロマトグラフィー樹脂を、1種以上の蛍光タグで標識するステップ；(b)標識された樹脂に過剰量のI_gを加え、樹脂からのI_g溶出液(F_{L_{I_g}})中の樹脂I_g溶出濃度([I_g])および蛍光シグナルを測定するステップ；(c)残余のI_gを樹脂から除去した後、樹脂に適した手段を用いて処理し、標識されたPrAを樹脂から解離させるステップ；ならびに(d)処理された樹脂から、蛍光(F_{L_{d_{i_ge_st}}})およびPrA濃度([PrA])を測定するステップを含み、PrA漏出は、{(F_{L_{I_g}})/(F_{L_{d_{i_ge_st}}})/[PrA])}/[I_g]を計算することによって定量される、PrAをベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂からのPrA漏出を定量するための方法が提供される。

10

【0012】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、PrGをベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂からのプロテインG(PrG)の漏出を定量するために使用される。

【0013】

したがって、本発明によるさらに別の態様において、(a)PrGをベースとするクロマトグラフィー樹脂を、1種以上の蛍光タグで標識するステップ；(b)標識された樹脂を、同等の第1および第2の部分に分割するステップ；(c)第1の部分に適した手段を用いて処理し、標識されたPrGを樹脂から解離させ、第2の部分に過剰量のI_gを加えるステップ；(d)ステップ(c)における第1の部分中の処理された樹脂から、蛍光(F_{L_{d_{i_ge_st}}})およびPrG濃度([PrG])を測定するステップ；ならびに(e)ステップ(c)における第2の部分からのI_g溶出液中の樹脂I_g溶出濃度([I_g])および蛍光シグナル(F_{L_{I_g}})を測定するステップを含み、PrG漏出は、{(F_{L_{I_g}})/(F_{L_{d_{i_ge_st}}})/[PrG])}/[I_g]を計算することによって定量される、PrGをベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂からのPrG漏出を定量するための方法が提供される。

20

30

【0014】

さらに別の態様において、PrGをベースとするクロマトグラフィー樹脂からのPrG漏出を定量するための方法は、(a)PrGをベースとするクロマトグラフィー樹脂を、1種以上の蛍光タグで標識するステップ；(b)標識された樹脂に過剰量のI_gを加え、樹脂からのI_g溶出液(F_{L_{I_g}})中の樹脂I_g溶出濃度([I_g])および蛍光シグナルを測定するステップ；(c)残余のI_gを樹脂から除去した後、樹脂に適した手段を用いて処理し、標識されたPrGを樹脂から解離させるステップ；ならびに(d)処理された樹脂から、蛍光(F_{L_{d_{i_ge_st}}})およびPrG濃度([PrG])を測定するステップを含み、PrG漏出は、{(F_{L_{I_g}})/(F_{L_{d_{i_ge_st}}})/[PrG])}/[I_g]を計算することによって定量される。

40

【0015】

その上さらなる実施形態において、本発明の方法は、PrLをベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂からのプロテインL(PrL)の漏出を定量するために使用される。

【0016】

したがって、本発明によるさらに別の態様において、(a)PrLをベースとするクロマトグラフィー樹脂を、1種以上の蛍光タグで標識するステップ；(b)標識された樹脂を、同等の第1および第2の部分に分割するステップ；(c)第1の部分に適した手段を用いて処理し、標識されたPrLを樹脂から解離させ、第2の部分に過剰量のI_gを加え

50

るステップ；(d)ステップ(c)における第1の部分中の処理された樹脂から、蛍光(FL_{digest})およびPrL濃度($[PrL]$)を測定するステップ；ならびに(e)ステップ(c)における第2の部分からのIg溶出液中の樹脂Ig溶出濃度($[Ig]$)および蛍光シグナル(FL_{Ig})を測定するステップを含み、PrL漏出は、 $\{(FL_{Ig}) / ((FL_{digest}) / [PrL])\} / [Ig]$ を計算することによって定量される、PrLをベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂からのPrL漏出を定量するための方法が提供される。

【0017】

別の態様において、PrLをベースとするクロマトグラフィー樹脂からのPrL漏出を定量するための方法は、(a)PrLをベースとするクロマトグラフィー樹脂を、1種以上の蛍光タグで標識するステップ；(b)標識された樹脂に過剰量のIgを加え、樹脂からのIg溶出液(FL_{Ig})中の樹脂Ig溶出濃度($[Ig]$)および蛍光シグナルを測定するステップ；(c)残余のIgを樹脂から除去した後、樹脂に適した手段を用いて処理し、標識されたPrLを樹脂から解離させるステップ；ならびに(d)処理された樹脂から、蛍光(FL_{digest})およびPrL濃度($[PrL]$)を測定するステップを含み、PrL漏出は、 $\{(FL_{Ig}) / ((FL_{digest}) / [PrL])\} / [Ig]$ を計算することによって定量される。

10

【0018】

加えて、理論によって制限されることを所望することなく、本発明の方法は、タンパク質に結合する分析物または分子を、混合物から単離するまたは除去するために使用される、タンパク質をベースとするアフィニティークロマトグラフィー法からの、任意のタンパク質および/またはこの断片の漏出を定量するために使用され得ることが企図される。

20

【0019】

したがって、本発明によるさらに別の態様において、(a)タンパク質をベースとするクロマトグラフィー樹脂を、1種以上の蛍光タグで標識するステップ；(b)標識された樹脂を、同等の第1および第2の部分に分割するステップ；(c)第1の部分に適した手段を用いて処理し、標識されたタンパク質を樹脂から解離させ、第2の部分に、タンパク質に結合する過剰量の分析物を加えるステップ；(d)ステップ(c)における第1の部分中の処理された樹脂から、蛍光(FL_{digest})およびタンパク質濃度($[Pr]$)を測定するステップ；ならびに(e)ステップ(c)における第2の部分からの分析物溶出液中の樹脂分析物溶出濃度($[分析物]$)および蛍光シグナル($FL_{analyte}$)を測定するステップを含み、Pr漏出は、 $\{(FL_{analyte}) / ((FL_{digest}) / [Pr])\} / [分析物]$ を計算することによって定量される、タンパク質をベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂からのタンパク質漏出を定量するための方法が提供される。

30

【0020】

本発明による別の態様において、(a)タンパク質をベースとするクロマトグラフィー樹脂を、1種以上の蛍光タグで標識するステップ；(b)標識された樹脂に過剰量の分析物を加え、樹脂からの分析物溶出液($FL_{analyte}$)中の樹脂分析物溶出濃度($[分析物]$)および蛍光シグナルを測定するステップ；(c)残余の分析物を樹脂から除去した後、樹脂に適した手段を用いて処理し、標識されたタンパク質を樹脂から解離させるステップ；ならびに(d)処理された樹脂から、蛍光(FL_{digest})およびタンパク質濃度($[Pr]$)を測定するステップを含み、Pr漏出は、 $\{(FL_{analyte}) / ((FL_{digest}) / [Pr])\} / [分析物]$ を計算することによって定量される、タンパク質をベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂からのタンパク質漏出を定量するための方法が提供される。

40

【0021】

種々の実施形態において、本発明の方法は、1種もしくは複数種の、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーおよび疎水性交換クロマトグラフィー、弱分配クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーまたはこれらの

50

任意の組合せを使用して、浸出されたタンパク質、例えば、Pr A、Pr GまたはPr Lを除去するステップをさらに含み得る。例示的なクロマトグラフィー形式は、限定されないが、充填カラムおよび膜デバイスの形式を含む。

【0022】

本発明の方法の種々の実施形態において、蛍光タグは、Alexa Fluor 488 (商標) (Invitrogen、Carlsbad、CA)、Dylight 488 (商標) (ThermoFisher、Waltham、MA)、Hilyte Fluor (商標) 488、5-FAM (商標)、SEおよび6-FAM (商標)、SE (Anaspec、San Jose、CA) からなる群から選択される。

【0023】

種々の実施形態において、樹脂から、標識されたタンパク質、例えば、Pr A、Pr GおよびPr Lを解離させるのに適した、本発明の方法において使用される手段は、化学的処理または酵素的処理を含む。例示的な酵素的処理は、タンパク質、例えば、Pr A、Pr GまたはPr Lを消化する酵素の使用を含み、かかる酵素は、限定されないが、例えば、トリプシン、ペプシン、キモトリプシン、サーモリシンおよびスブトレリシン (subtilisin) を含む。例示的な化学的処理は、適した酸または塩基の使用を含む。

【0024】

本発明の方法の種々の実施形態において、市販されているPr Aをベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂は、最小量のPr A漏出を示すものを明らかにするために、本発明の方法を使用して比較される。例示的な樹脂は、限定されないが、ProSep (登録商標) - vA High Capacity、ProSep (登録商標) vA UltraおよびProSep (登録商標) UltraPlus (Millipore) ; Protein A Sepharose (商標)、MabSelect (商標)、MabSelect Xtra (商標) およびMabSelect SuRe (登録商標) (GE Healthcare) ; Sartobind Protein A (Sartorius) ; ならびにPOROS (登録商標) MabCapture (商標) A (Applied Biosystems) を含む。

【0025】

本発明の方法のいくつかの態様において、残余のIg (例えば、IgG) は、当技術分野においてよく知られている技術、例えば、6 M グアニジニウムHCLまたは4 - 8 M 尿素の使用を含む技術を使用して、樹脂から除去され得る。

【0026】

本発明の方法のいくつかの態様において、分析物または分子 (例えば、Ig) の過剰量は、分析物または分子を単離するまたは除去するために使用される、タンパク質をベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂または媒質の最大結合容量に比べて少なくとも2 - 5 倍大きい量である。いくつかの態様において、分析物または分子は、Pr Aをベースとするアフィニティークロマトグラフィー媒質または樹脂に結合するIg (例えば、IgG) であり、Ig (例えば、IgG) の過剰量は、樹脂の結合容量の、少なくとも2 倍であるまたは少なくとも3 倍であるまたは少なくとも4 倍であるまたは少なくとも5 倍であるまたは5 倍を超える。一般に、分析物または分子 (例えば、Ig) の過剰量は、樹脂の製造業者によって典型的に提供される、樹脂の最大結合容量に基づいて決定することができるまたは当技術分野においてよく知られている技術に基づいて、当業者によって容易に計算され得る。

【0027】

蛍光は、限定されないが、蛍光光度計の使用を含む任意の適した手段を使用して、測定することができる。蛍光光度計を使用する検出用にロードするサンプルは、キュベットまたはウェル - プレートの形式であり得る。

【0028】

本発明の方法の種々の実施形態において、Ig (例えば、IgG) は、例えば、適したpHの使用などの任意の適した手段を使用して、溶出させることができる。例示的な実施

10

20

30

40

50

形態において、I g G 溶出に使用される適した pH は、約 2.0 から約 4.0 までの pH である。特定の実施形態において、pH 2.0 のグリシンが、I g G 溶出に使用される。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】PrA が蛍光色素 (Alexa Fluor (商標) 488) で標識される、本発明による例示的な方法を示す概略図である。簡単に言えば、図1に描かれているように、標識された媒質は、2つの1ml画分に分けられる。一方の画分は、トリプシンで酵素的に処理される。比 $FL_{di g e s t} / [PrA]$ は、上清を、UV/Vis 分光光度計において、 UV_{275nm} にて読み取ることによっておよび励起波長 495 nm の蛍光光度計において、発光波長 519 nm にて読み取ることによって得られる。他方の画分は、過剰量の I g G を構成する、媒質の推定容量のおよそ5倍を用いて、I g (例えば、I g G) に曝される。過剰の I g G が、PBS (10 mM リン酸生理食塩緩衝液) を用いて洗い流されるとすぐに、PrA 媒質に結合している I g G は、0.1 M グリシン pH 2 で溶出される。穏やかに混合した後、I g G 溶出が、UV/Vis 分光光度計において、 UV_{280nm} にて分析され ($[I g G]$)、励起波長 495 nm の蛍光光度計において、発光波長 519 nm にて分析される ($FL_{I g G}$)。

【図2】標識された (例えば、Alexa Fluor 488 を用いて) および標識されていない PrA の静的 I g G 結合は同等であることを示すグラフである。簡単に言えば、同一バッチ由来の、蛍光標識されたタイプ A 樹脂 (FL-A-1 から FL-A-5 まで) および標識されていない樹脂 (A-1 から A-3 まで) が、これらの I g G 静的結合容量について、異なる3日に分けて試験された。結果は、図2のグラフに描かれているように、標識されたおよび標識されていないタイプ A PrA をベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂が、同等の静的結合容量値を有することを実証している。同一の実験が、異なる PrA をベースとするアフィニティークロマトグラフィータイプ B 樹脂を用いて行われ、標識された樹脂については FL-B-1 から FL-B-4 までおよび標識されていない樹脂については B1 から B3 までによって表された。この場合も同様に、図2のグラフによって実証されているように、標識されたおよび標識されていないタイプ B 樹脂の両方が、同等の I g G 静的結合容量値を示している。したがって、蛍光標識は、異なる樹脂に対する PrA - I g G アフィニティー相互作用に関して、最小限の干渉を与える。結果はまた、図2の表にまとめられている。標識されたおよび標識されていないタイプ A 樹脂 (媒質 A) 由来の、樹脂の静的結合容量 (Q_s) は、表の左側に示されており、標識されたおよび標識されていないタイプ B 樹脂 (媒質 B) 由来の同容量は、表の右側に示されている。標準偏差 (STD) および変動係数 (CV) が、同様に提示されている。標識されたおよび標識されていない媒質 A についての試験変動 (4% 対 3%) ならびに媒質 B についての試験変動 (7% 対 6%) が比較できる。

【図3】2つの異なるバッチの Alexa Fluor 488 を用いてそれぞれ試験された、5つの異なるロットのシリカをベースとするタンパク質アフィニティークロマトグラフィー樹脂の PrA 漏出値を要約する表である。表に示されているように、8.4% 未満の変動が、2つの異なるバッチの蛍光色素を使用した2セットの実験に対して得られている。

【発明を実施するための形態】

【0030】

(発明の詳細な記述)

本発明は、タンパク質をベースとするアフィニティークロマトグラフィー媒質または樹脂、例えば、PrA、PrG および PrL をベースとするアフィニティークロマトグラフィー媒質または樹脂からの、タンパク質、例えば、PrA、PrG または PrL 漏出を定量する方法に関する。理論によって制限されることを所望することなく、本発明による方法は、タンパク質に結合する分子、限定されないが、例えば、I g に結合するプロテイン A、プロテイン G およびプロテイン L を含む、分子を単離するまたは除去するために使用されるタンパク質をベースとするクロマトグラフィー媒質または樹脂からの、いかなるタンパク質の漏出も定量するために使用することができることが企図される。

【0031】

本開示をより容易に理解することができるように、ある特定の用語は、最初に定義される。追加の定義は、詳細な説明を通じて述べられる。

【0032】

I. 定義

本明細書において使用される場合、「プロテインA」または「PrA」という用語は、は、天然源から、例えば、細菌スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) から回収されたプロテインA、合成的に (例えば、ペプチド合成によってまたは組み換え技術によって) 製造されたプロテインA、例えば、免疫グロブリンなどの C_{H2} / C_{H3} 部位を有するタンパク質に結合する能力を保持する、その変異体または誘導体などを包含する。PrAの市販源は、Repligen、GE Healthcare、Fersenius MedicalおよびFermentechを含む。

10

【0033】

「クロマトグラフィー」という用語は、本明細書において使用される場合、例えば、固体基質と、限定されないが、溶液、緩衝液または溶媒を含む移動相との間の分配におけるこれらの差異によって、混合物中の他の分子から関心対象の分析物 (例えば、免疫グロブリンまたはIg) を分離し、関心対象の分析物を単離することができる、任意の種類の精製技術を指す。

【0034】

本明細書において使用される場合、「アフィニティークロマトグラフィー」、「アフィニティー分離」または「アフィニティー精製」という用語は、本明細書において使用される場合、標的分析物または分子 (例えば、免疫グロブリンまたはIg) を含有するサンプルを、分析物に結合するタンパク質、例えば、PrA、PrGおよびPrLをその上に担持する固体支持体に添加することを含む、任意の精製技術またはアッセイ技術を指す。標的分析物または分子 (例えば、Ig) をタンパク質 (例えば、PrA) に結合させ、望ましくない不純物を貫流させた後、標的分析物または分子は、適した手段を使用して溶出され得る。例えば、IgGなどの分析物は、適したpH、例えば、約2から約5までの範囲のpHまたは約2から約4までの範囲のpHを有する適した溶出緩衝液を使用して回収され得る。この目的のための溶出緩衝液の例は、クエン酸塩、グリシンまたは酢酸塩の緩衝液を含む。

20

30

【0035】

「PrAをベースとするアフィニティークロマトグラフィー」または「プロテインAをベースとするアフィニティークロマトグラフィー」という用語は、本明細書において使用される場合、一般に固体支持体に固定されるプロテインAまたはこの誘導体もしくは変異体を使用した、免疫グロブリンなどの物質および/または分子の分離または精製を指す。

【0036】

「PrGをベースとするアフィニティークロマトグラフィー」または「プロテインGをベースとするアフィニティークロマトグラフィー」という用語は、本明細書において使用される場合、一般に固体支持体に固定されるプロテインGまたはこの誘導体もしくは変異体を使用した、免疫グロブリンなどの物質および/または分子の分離または精製を指す。

40

【0037】

「PrLをベースとするアフィニティークロマトグラフィー」または「プロテインLをベースとするアフィニティークロマトグラフィー」という用語は、本明細書において使用される場合、一般に固体支持体上に固定されるプロテインLまたはこの誘導体もしくは変異体を使用した、免疫グロブリンなどの物質および/または分子の分離または精製を指す。

【0038】

「固体相」または「固体支持体」という用語は、一般に、関心対象の分析物または分子を単離するまたは除去するために使用されるタンパク質、例えば、プロテインA (PrA)、プロテインG (PrG) またはプロテインL (PrL) が、付着するまたは共有結合

50

することができる非水性マトリックスを指す。例えば、PrAは、例えば、アガロース、多糖、デキストラン、シリカゲル、合成ポリマー（ポリスチレン-ジビニルベンゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリスルホン、ポリカーボネート、ポリビニルエーテルおよびこれらの相当するコポリマー）ならびにガラスビーズなどの種々の材料に結合し得る。固体支持体形式は、限定されないが、精製カラム、別個の粒子の不連続相、充填床カラムおよび膨張床カラム、膜などを含む。いくつかの実施形態において、場合による予備ステップとして、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーのための固体相は、関心対象のタンパク質のクロマトグラフィー前に、適した緩衝液と平衡化され得る。例示的な平衡緩衝液は、10 mMリン酸生理食塩緩衝液pH7.4を含有する。

10

【0039】

「アフィニティー樹脂」または「アフィニティークロマトグラフィー樹脂」という用語は、本明細書において使用される場合、クロマトグラフィーリガンド（例えば、PrAまたはPrGまたはPrL）が吸着されているクロマトグラフ支持体を指す。リガンドは、混合物から精製されるまたは除去されることになっている関心対象の分子（例えば、免疫グロブリン）に結合することができる。プロテインAをベースとするアフィニティークロマトグラフィーに使用するための、例示的なプロテインAをベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂は、細孔制御ガラスバックボーン（controlled pore glass backbone）、例えば、PROSEP A（商標）およびPROSEP vA（商標）樹脂、High Capacity、UltraおよびPROSEP Ultra Plus（Millipore Inc.）上に固定されるプロテインA；ポリスチレン固体相、例えば、POROS 50A（商標）樹脂およびPOROS MabCapture A（商標）（Applied Biosystems Inc.）上に固定されるプロテインA；またはアガロース固体相、例として、rPROTEIN A SEPHAROSE FAST FLOW（商標）もしくはMABSELECT（商標）樹脂（GE Healthcare）上に固定されるプロテインAを含む。

20

【0040】

溶出されたIg（例えば、IgG）は、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーステップの前または後の、追加の精製ステップに供され得る。例示的なさらなる精製ステップは、限定されないが、ろ過、ヒドロキシアパタイト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（HIC）、硫酸アンモニウム沈殿、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、エタノール沈殿、逆相HPLC、弱分配クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲルろ過などを含む。

30

【0041】

いくつかの実施形態において、溶出されたIg（例えば、IgG）は、薬学的に許容される担体に製剤することができ、そのような分子で知られている、種々の診断上の使用、治療上の使用または他の使用のために使用される。

【0042】

本明細書において使用される場合、「タンパク質浸出」、「タンパク質漏出」、「浸出されたタンパク質」、「Pr浸出」、「Pr漏出」および「浸出されたPr」という用語は、タンパク質（Pr）（無傷のものおよび/またはこの断片を含む）の、それが結合している固体相からの剥離または流失を指す。いくつかの実施形態において、PrA、PrGまたはPrLの漏出は、PrA、PrGまたはPrLをベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂から、本発明の方法を使用して定量される。タンパク質漏出は、多くのさまざまな理由のために生じ得る。例えば、PrA漏出またはPrA浸出は、機械的剪断、低/高pHに曝されること、免疫グロブリンへの接触、タンパク質分解活性などの理由のために生じ得る。プロテインA浸出は、当技術分野においてよく知られている、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、SDS PAGE、ウェスタンブロット、高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）、質量分析法などを含む種々の技術を使用して、定性的に測定することができる。浸出されたPrAの量は、一般に、アフィニティマトリ

40

50

ックス 1 m l 当たりの P r A n g として表されるまたはそれは、抗体 1 m g 当たりのプロテイン A n g として表され得る。

【 0 0 4 3 】

本明細書において使用される場合、（本明細書において同義的に使用される）「免疫グロブリン」、「I g」または「抗体」という用語は、2本の重鎖および2本の軽鎖からなる基本的な4本のポリペプチド鎖構造を有するタンパク質を指し、前記鎖は、例えば、鎖間ジスルフィド結合によって安定化され、かかるタンパク質は、抗原に特異的に結合する能力を有する。（本明細書において同義的に使用される）「単鎖免疫グロブリン」または「単鎖抗体」という用語は、1本の重鎖および1本の軽鎖からなる2本のポリペプチド鎖構造を有するタンパク質を指し、前記鎖は、例えば、鎖間ペプチドリンカーによって安定化され、かかるタンパク質は、抗原に特異的に結合する能力を有する。「ドメイン」という用語は、例えば、 β -ブリーツシートおよび/または鎖間ジスルフィド結合によって安定化されたペプチドループを含む（例えば、3から4つまでのペプチドループを含む）重鎖または軽鎖ポリペプチドの球状領域を指す。ドメインはさらに、本明細書において「定常」または「可変」と称され、これは、「定常」ドメインの場合には、種々のクラスメンバーのドメイン内部の配列変異の相対的欠如に基づいておりまたは「可変」ドメインの場合には、種々のクラスメンバーのドメイン内部の著しい変異に基づいている。抗体またはポリペプチド「ドメイン」は、当技術分野において同義的に、抗体またはポリペプチド「領域」と称されることが多い。抗体軽鎖の「定常」ドメインは、「軽鎖定常領域」、「軽鎖定常ドメイン」、「C L」領域または「C L」ドメインと同義的に称される。抗体重鎖の「定常」ドメインは、「重鎖定常領域」、「重鎖定常ドメイン」、「C H」領域または「C H」ドメインと同義的に称される。抗体軽鎖の「可変」ドメインは、「軽鎖可変領域」、「軽鎖可変ドメイン」、「V L」領域または「V L」ドメインと同義的に称される。抗体重鎖の「可変」ドメインは、「重鎖可変領域」、「重鎖可変ドメイン」、「V H」領域または「V H」ドメインと同義的に称される。

【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態において、免疫グロブリンは I g G 抗体である。免疫グロブリンまたは抗体は、モノクロナルまたはポリクロナルであってよく、単量体または重合体で存在することができ、例えば、I g M 抗体は、五量体で存在しおよび/または I g A 抗体は、単量体、二量体または多量体で存在する。「断片」という用語は、無傷のまたは完全な抗体または抗体鎖よりも少ないアミノ酸残基を含む、抗体または抗体鎖の一部または部分を指す。断片は、無傷のまたは完全な抗体または抗体鎖の化学的処理または酵素的処理を介して得ることができる。断片は、組み換え手段によっても得ることができる。例示的な断片は、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ')₂ 断片、F c 断片および/または F v 断片を含む。

【 0 0 4 5 】

「抗原結合断片」という用語は、抗原に結合するまたは抗原結合（すなわち、特異的な結合）のための無傷の抗体と（すなわち、それらが誘導される無傷の抗体と）競合する、免疫グロブリンまたは抗体のポリペプチド部分を指す。結合断片は、組み換え D N A 技術によってまたは無傷の免疫グロブリンの酵素的切断もしくは化学的切断によって形成することができる。結合断片は、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、単鎖および単鎖抗体を含む。

【 0 0 4 6 】

I I . w t P r A 構造および免疫グロブリン結合部位

P r A は、細菌スタフィロコッカス・アウレウスから誘導される約 4 2 - k D a のタンパク質であり、N 末端に、E、D、A、B および C と呼ばれる 5 つの縦列型の高相同性の細胞外免疫グロブリン (I g) 結合ドメインを含有する。P r A の細胞外ドメインはそれぞれ、別個の I g 結合部位を所有する。一方の部位は、F c y (I g の I g G クラスの定常領域) に対するものであり、他方の部位は、ある特定の I g 分子の F a b 部分 (抗原認識に関与している I g の部分) に対するものである。ドメインのそれぞれは F a b 結合部

位を含有することが報告されている。S p A の非 I g 結合部分は C 末端に位置され、X 領域または X - ドメインと呼ばれている。

【0047】

w t P r A をコード化する遺伝子のクローニングは、米国特許第 5 , 1 5 1 , 3 5 0 号に記載されており、この全内容は、参照により本明細書に完全に組み込まれる。

【0048】

I I I . 例示的な P r をベースとするアフィニティークロマトグラフィー媒質

本発明の方法は、タンパク質アフィニティークロマトグラフィー媒質または樹脂からのタンパク質の漏出を定量するために使用することができ、そのようなタンパク質をベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂は、タンパク質に結合している分子を単離するまたは除去するために使用される。例示的な実施形態において、本発明の方法は、アフィニティークロマトグラフィー媒質または樹脂からのタンパク質の漏出を定量するために使用され、そのような媒質または樹脂は、限定されないが、P r A、P r G および P r L ならびにこれらの誘導体、変異体および断片を含む混合物から、免疫グロブリンを単離するまたは免疫グロブリンから除去するために使用される。

【0049】

本発明の方法において使用され得る、例示的なプロテイン A をベースとする樹脂は、限定されないが、PROSEP v A High Capacity、PROSEP A Ultra、PROSEP Ultra Plus (Millipore)、Protein A Sepharose FastFlow、rmp Protein A Sepharose FastFlow、MabSelect、MabSelect Xtra、MabSelect Sure (GE Healthcare)、POROS A、POROS MabCapture A (Applied Biosystems) および Sartobind Protein A (Sartorius) を含む。例示的なプロテイン G をベースとする樹脂は、限定されないが、PROSEP - G (Millipore)、Protein G Sepharose (商標) 4 Fast Flow (GE Healthcare)、POROS G (Applied Biosystems) を含む。

【0050】

I V . 例示的な蛍光タグおよび蛍光の測定

タンパク質を標識することができる任意の適した蛍光タグまたは色素が、本発明の方法に使用され得る。一般に、 $70,000\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ 以上の吸光係数 ϵ_{max} を有し、80% を超える量子収量を有し、最小限の光退色または消光を示す、蛍光タグまたは色素を使用することが望ましい。使用される色素は、実験の条件下、例えば、約 1.0 から約 10.0 までの pH 範囲の下で安定であるべきである。タンパク質をベースとするアフィニティークロマトグラフィー媒質に関して、アミン、チオールおよびカルボキシ反応性色素を使用することが望ましい。例示的なアミン反応性蛍光色素は、限定されないが、スルホスクシンイミジルエステルを含むスクシンイミジルエステル、イソチオシアネート、塩化スルホニルおよびテトラフルオロフェニルエステルを含む。例示的なチオール反応性色素は、限定されないが、マレイミド、フェニル水銀、ヨードアセトアミド、チオ硫酸塩、ローダミン誘導体およびベンゾオキサジアゾ誘導体を含む。例示的な実施形態において、タンパク質をベースとするアフィニティークロマトグラフィー媒質を標識するために使用され得る色素は、AlexaFluor 488 (Invitrogen、Carlsbad、CA)、Dylight 488 (ThermoFisher、Waltham、MA)、HiLyte Fluor (商標) 488 ならびに 5 - FAM、SE および 6 - FAM、SE (Anaspec、San Jose、CA) を含む。

【0051】

本発明の方法は、一般に、蛍光の測定に基づいている。一般に、蛍光は、分子が紫外線、可視光線または近赤外線照射の吸収によって電子的に励起された状態に促進される、光学分光法的一种である。次いで、励起された分子は、光の放出によって、基底状態または

より低い位置にある励起された電子状態に戻り、この光の放出が、蛍光光度計などの機器を使用して検出される。本発明の方法の場合には、蛍光色素は、タンパク質、例えば、PrAに結合する反応性色素である。そのような色素は、本発明の方法において使用される実験条件下、例えば、約1.0から約10.0までの範囲のpHの使用下で、少なくとも30分間、最大強度の約20%の範囲内の蛍光強度を維持することが望ましい。

【0052】

V. タンパク質をベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂から標識されたタンパク質を解離させる方法

タンパク質をベースとするクロマトグラフィー媒質または樹脂中のタンパク質を標識した後、共有結合しているタンパク質は、アフィニティークロマトグラフィー媒質または樹脂から解離される。共有結合している標識されたタンパク質をアフィニティークロマトグラフィー媒質から解離させる方法は、限定されないが、化学的方法または酵素的方法を含む。例示的な化学的处理方法には、UV吸収に著しく干渉しない、酸または塩基触媒による加水分解が使用され得る。本発明の方法に使用され得る例示的な酸は、限定されないが、塩酸などの一価の酸、硫酸などの二価の酸およびリン酸などの三価の酸を含む。本発明の方法に使用され得る例示的な塩基は、限定されないが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムおよび水酸化セシウムを含む。加えて、ある特定のペプチド結合を切断し、これによって、標識されたタンパク質を、これが吸着している固体支持体から解離させることができる、CNBrなどの化学物質が使用され得る。例えば、UhlenおよびNilsson、In Proc. Biotech 85 (Europe)、173頁(1985)を参照されたい。

【0053】

例示的な酵素的处理方法は、限定されないが、タンパク質を消化することができる酵素の使用を含む。例示的な酵素は、限定されないが、例えば、トリプシン、ペプシン、キモトリプシン、サーモリシンおよびスブトレリシンを含む。

【0054】

VI. 化学的または酵素的に処理された樹脂からの蛍光およびタンパク質濃度の測定

化学的または酵素的に処理された樹脂は、続いてろ過され、微粒子が含まれていない上清を得る。上清は、消化された標識されたタンパク質(例えば、PrA)を含有し、この蛍光が、例えば、UV/Vis分光光度計を使用して、275nmにて測定され得る。この示数は、消化されたタンパク質(例えば、樹脂から消化されたプロテインAおよびプロテインA断片)によって寄与されるUV吸収を含む。タンパク質の濃度(PrA濃度または[PrA])を特異的に得るために、蛍光示数における化学物質または酵素および蛍光色素からの寄与は、差し引かれる必要がある。タンパク質(例えば、PrA)を解離させるために使用される化学物質または酵素からの寄与、UV_{enz/chem}は、希釈係数中に要因として含める化学物質または酵素の出発濃度を測定することによって検出することができる。同様に、蛍光タグまたは色素からの寄与は、通常は励起波長、UV_{max}におけるUVである、蛍光タグまたは色素のピークにおけるUV吸収を得ることによって計算することができる。それぞれの色素についての比UV₂₇₅/UV_{max}(f)は、典型的には、製造供給元から得ることができる。例として、プロテインAの吸光係数が0.149であると仮定すれば、プロテインA濃度は、式：[UV₂₇₅ - UV_{enz/chem} - UV_{max} × f] / 0.149を使用して得ることができる。

【0055】

蛍光は、ある特定の波長における分子の励起および発光スペクトルを受け取るためのより長い波長における検出によって発生される。一般に、蛍光色素の製造供給元によって推奨される最適な励起波長および発光波長が使用され得る。例えば、Invitrogenからの色素Alexa Fluor 488に関して、励起波長は495nmであり、発光波長は519nmである。同様に、蛍光示数は、必要ならば連続希釈を用いて、上清から得ることができる。蛍光は、典型的には、キュベットまたはウェル-プレート形式の蛍光光度計を用いて、25などの設定温度にて読み取られる。

【0056】

V I I . 溶出液濃度の測定

請求されている本発明による種々の方法において、関心対象の溶出された分子または分析物（例えば、免疫グロブリンまたは I g ）の濃度が、浸出されたタンパク質の計算に必要とされ、これは、溶出された分子 1 m g 当たりの浸出されたタンパク質の n g として測定される。本発明による例示的な方法において、溶出された分子は免疫グロブリンであり、これは、P r A、P r G または P r L をベースとするアフィニティークロマトグラフィー媒質を使用して単離される。いくつかの実施形態において、溶出された分子、例えば、免疫グロブリンは、アフィニティークロマトグラフィー媒質から、p H、イオン強度 / 塩濃度および / または温度における勾配または段階変化による変化を使用して放出される。例えば、I g G の場合には、P r A をベースとするクロマトグラフィー媒質からの溶出は、典型的には、溶出 p H を 5 未満であるが 2 以上に低下させ、最も望ましくは p H 2 と 4 との間に低下させることによって達成される。例示的な溶出緩衝液は、酢酸、グリシンおよびクエン酸を含む。いくつかの実施形態において、I g G の溶出は、2 0 0 0 c m / 時以下、1 0 0 0 c m / 時以下、8 0 0 c m / 時以下、6 0 0 c m / 時以下、2 0 0 c m / 時以下、1 0 0 c m / 時以下または 5 0 c m / 時以下の速度での溶出緩衝液の流れによって達成される。一般に、流速が遅ければ遅いほど、より多くの I g G が媒質に結合し、溶出 I g G 濃度が典型的に、より高くなる。溶出流速が 5 c m / 時未満の場合には、媒質は、これが結合することができる I g G の最大量に近い I g G に結合し、ひいては静的結合容量に到達する。過剰量の I g G が、静的結合容量試験に使用され、通常は、媒質の最大結合容量の 3 - 5 倍を超える。したがって、浸出されたプロテイン A の量は通常、溶液中の I g G 1 m g 当たりのプロテイン A の n g として定義される。

10

20

【 0 0 5 7 】

本発明は、限定するものとして解釈されるべきではない以下の実施例によって、さらに説明される。本出願の全体にわたって引用されている、すべての文献、特許および公開特許出願の内容ならびに図は、参照により本明細書に組み込まれる。

【 実施例 】

【 0 0 5 8 】

（実施例 1） P r A をベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂の蛍光タグでの標識

細孔制御ガラスをベースとするプロテイン A アフィニティークロマトグラフィー樹脂（例えば、P r o S e p（登録商標）- v A H i g h C a p a c i t y および P r o S e p（登録商標）U l t r a P r A（M i l l i p o r e））を、A l e x a F l u o r 4 8 8 色素で標識した。簡単に言えば、1 m g の A l e x a F l u o r 4 8 8 色素（I n v i t r o g e n、C a r l s b a d、C A）を、約 1 m l の D M S O 中に溶かした。P r A 樹脂のそれぞれおよそ 3 m l を N a H C O₃（0 . 1 M p H 8 . 4）で処理し、真空乾燥させ、1 5 m l E v e r g r e e n カラム（E v e r g r e e n S c i e n t i f i c、L o s A n g e l e s、C A）中に充填した。およそ 3 m l の N a H C O₃ をそれぞれのカラムに加え、カラムに蓋をし、アルミ箔で覆った。約 1 0 0 μ l の色素をそれぞれのカラムに加え、振盪機上に約 0 . 5 時間置いた。さらに 1 0 0 μ l の色素溶液をカラムに加え、さらに 1 時間振盪した。続いて、カラムをスラリーにし、各回約 2 カラム体積の N a H C O₃ を用いて 3 回洗浄し、各回約 2 カラム体積の 2 0 % エタノールを用いて 3 回洗浄し、各回約 2 カラム体積の N a H C O₃ を用いて 2 回洗浄した。

30

40

【 0 0 5 9 】

標識された樹脂を、続いて 1 m l の部分に分割し、バイアル中に移した。

【 0 0 6 0 】

（実施例 2） 蛍光タグ標識された P r A 樹脂の酵素的処理

蛍光標識された P r A 樹脂の一方の画分を、続いて酵素的に消化した。蛍光標識されていない P r A 樹脂を、対照として使用した。簡単に言えば、P r A 樹脂のそれぞれ 1 m l を 0 . 1 M N H₄ H C O₃ で処理し、真空乾燥させた。トリプシンを 0 . 1 M N H₄ H C O₃ 中に溶かし、2 7 5 n m における U V 測定が、0 . 7 と 1 との間であるように測

50

定を行った。続いて、約 3 ml のトリプシン溶液をそれぞれの樹脂に加え、37℃にて約 2 時間インキュベートした。インキュベートされた媒質スラリーを、7 mL の Evergreen 滴下カラムを通してろ過し、媒質から上清を除去した。ろ液の測定を UV_{275nmD} に行い、トリプシンの UV_{275nmT} を、この値から差し引いた。同様に、ろ液の UV_{495nmF} 測定を行った。プロテイン A 濃度を得るために、0.149 の吸光係数を使用し、式 $(UV_{275nmD} \times \text{希釈係数} - UV_{275nmT} - f \times UV_{495nmF} \times \text{希釈係数}) / 0.149$ を使用して、消化されたプロテイン A の濃度である $[PA]$ を得た。f の値は、 UV_{275nm} / UV_{495nm} における色素の UV 吸光係数の比であり、蛍光色素の製造供給元によって提供される。

【0061】

10

上記ろ液の蛍光を、約 2000 倍希釈 (0.1 M グリシンを用いて) にて測定し、 $[FL_{digest}]$ 値を得た。

【0062】

(実施例 3) 標識されたおよび標識されていない樹脂の IgG 溶出液濃度 / 静的容量の測定

標識されたおよび標識されていないプロテイン A をベースとするアフィニティークロマトグラフィー樹脂の IgG 溶出液濃度 / 静的容量を、以下のように決定した。静的容量の測定はまた、PrA 樹脂が、例えば、PrA 樹脂と IgG との相互作用を阻害する蛍光タグで標識されているかどうかの指標である。

【0063】

20

標識されたおよび標識されていない PrA 樹脂を、それぞれ 1 ml 体積で測定し (Evergreen Scientific, Los Angeles, CA)、タッピングした。それぞれのサンプルを、10 ml の 10 mM リン酸生理食塩緩衝液 (PBS) を用いて再度スラリーにし、平衡化した。PBS の重力による溶出液を捨てた後、5 ml の 0.1 M pH 2 グリシンを加えた。溶出液を捨てた。さらに 5 ml の 0.1 M pH 2 グリシンを加え、溶出液を FR_{bkgd} として集めた。各 5 ml の PBS を 2 回分加え、媒質を平衡化した後、5 ml の約 50 mg/mL ポリクロナル hIgG (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI) を加えた。この後、さらに各 5 ml の PBS を 2 回分加えた。すべての PBS および IgG の重力による溶出液を捨てた。グリシン (5 ml、0.1 M、pH 2) を加え、溶出液を集め、 FR_1 と名称をつけた。さらに 5 ml のグリシン溶液を加え、溶出液を集め、 FR_2 と名称をつけた。280 nm にて UV 測定を行い、溶出 IgG 濃度 $[IgG]$ を得た。PrA 樹脂の静的容量を測定する 1 つのそのような実験の結果を、図 2 に描く。図 2 によって実証されているように、PrA 樹脂のそれぞれと IgG との相互作用は、樹脂に蛍光色素を加えることによって阻害されなかった。同様に、静的容量の測定を、図 2 の表に示す。

30

【0064】

溶出液濃度 $[IgG]$ を、 FR_1 を使用した $A_{280nm} \times \text{希釈係数} + FR_2$ の $A_{280nm} \times \text{希釈係数}$ / IgG の吸光係数より測定する。続いて、Jasco FP-6500 蛍光光度計 (Great Dunmow, UK) を使用して、蛍光を 519 nm にて、励起波長 495 nm を用いて測定する。標識されていない媒質の FR_1 および FR_2 の蛍光値を、対応する標識された媒質の値から差し引く。上記の値から、画分 1 および画分 2 の蛍光シグナルの合計を FR_{bkgd} によってさらに差し引き、 $[FL_{IgG}]$ を得る。樹脂から浸出されたプロテイン A を、以下の式： $\{ (FL_{IgG}) / ((FL_{digest}) / [PrA]) \} / [IgG]$ を使用して計算する。

40

【0065】

本明細書は、参照により本明細書に組み込まれる、本明細書内に引用されている参照の教示を考慮に入れると、最も完全に理解される。本明細書内の実施形態は、本発明における実施形態を説明するものであり、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。当業者は、多くの他の実施形態が本発明によって包含されることを、容易に認識する。すべての出版物および発明は、参照により完全に組み込まれる。参照により組み込

50

まれる材料が、本明細書に矛盾するまたは一致しない程度まで、本明細書は、そのような任意の材料に優先する。本明細書における任意の参照の引用は、そのような参照が本発明に対する先行技術であることを認めるものではない。

【0066】

他に特に指示がない限り、特許請求の範囲を含む本明細書において用いられている成分の量、細胞培養物、処理条件などを表現するすべての数は、すべての場合に、「約」という語によって変更されるものと理解されるべきである。したがって、他に特に逆の指示がない限り、数値パラメータは近似値であり、本発明が得ようとする所望の特性に応じて変化する可能性のある値である。他に特に指示がない限り、一連の要素に先行する「少なくとも」という語は、連続したすべての要素を指すことを理解されるべきである。当業者であれば、単なる通常の実験手順を使用するだけで、本明細書に記載されている本発明の特定の実施形態に対して、多くの相当物を認識するまたは確認することができる。そのような相当物は、以下の特許請求の範囲によって包含されることを意図したものである。

【0067】

本発明の多くの変更および改変は、本発明の精神および範囲から逸脱することなく行われ得るが、このことは当業者には明らかである。本明細書に記載されている特定の実施形態は、例としてのみ提示されるものであり、何らかの限定をされるつもりはない。本明細書および実施例は、単なる例証とみなされることを意図したものであり、本発明の真の範囲および精神は、以下の特許請求の範囲によって示されている。

【図1】

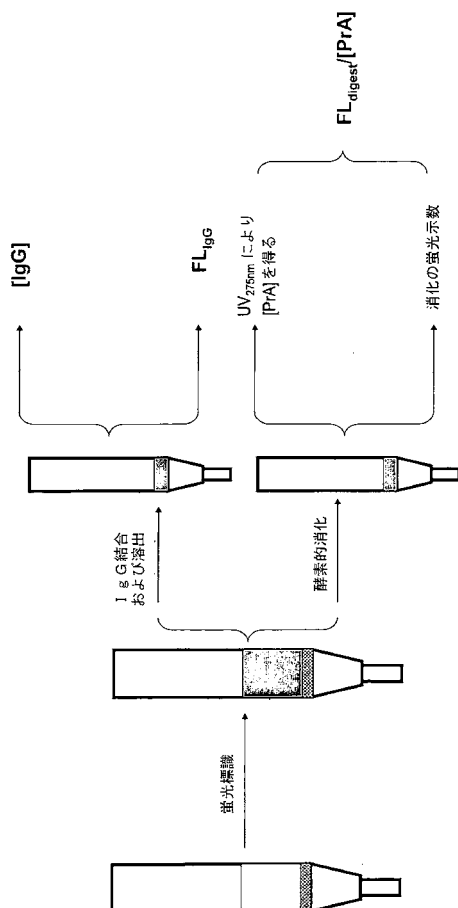


FIG. 1

【図2】

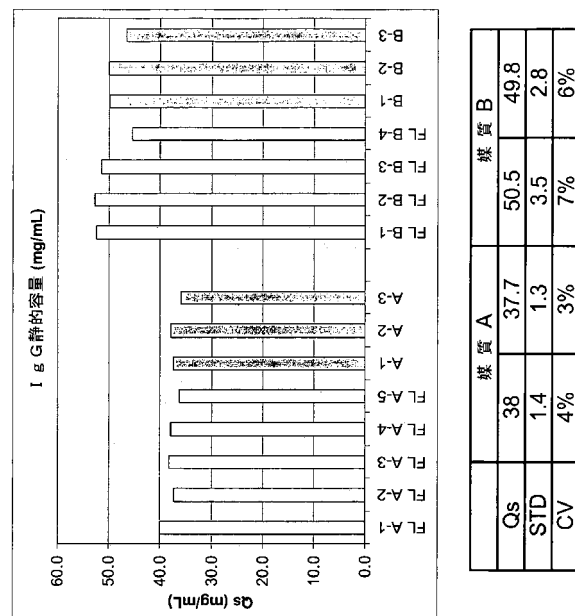


FIG. 2

【 図 3 】

媒 質 B	セット1	セット2	平 均	sd	cv
ロット 1	59.9	57.5	58.7	1.7	2.9%
ロット 2	51.9	46.1	49.0	4.1	8.4%
ロット 3	68.7	69.2	69.0	0.3	0.5%
ロット 4	80.1	80.1	80.1	0.0	0.0%
ロット 5	71.4	70.9	71.2	0.4	0.6%

FIG. 3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/005142

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68		
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) G01N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005/038231 A1 (FAHRNER ROBERT L [US] ET AL) 17 February 2005 (2005-02-17) the whole document paragraph [0117] - paragraph [0118]	1-26
A	HAHN R ET AL: "Comparison of protein A affinity sorbents III. Life time study" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 1102, no. 1-2, 13 January 2006 (2006-01-13), pages 224-231, XP024968385 ISSN: 0021-9673 [retrieved on 2006-01-13] the whole document page 225, paragraph 2 - page 226, paragraph 1 ----- -/-	1-26
☒ 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 "E" earlier document 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 4 January 2010		Date of mailing of the international search report 13/01/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Jenkins, Gareth

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/005142

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BLOOM J W ET AL: "Detection and reduction of Protein A contamination in immobilized Protein A purified monoclonal antibody preparations" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 117, no. 1, 8 February 1989 (1989-02-08), pages 83-89, XP023975279 ISSN: 0022-1759 [retrieved on 1989-02-08] the whole document	1-26
A	NILSSON ELIN ET AL: "Chicken anti-protein L for the detection of small amounts of protein L in the presence of IgG" HYBRIDOMA, vol. 24, no. 2, April 2005 (2005-04), pages 112-114, XP002559085 ISSN: 1554-0014 the whole document	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/005142

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005038231 A1	17-02-2005	US 2009099344 A1	16-04-2009

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/37 (2006.01) C 1 2 Q 1/37

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

F ターム (参考) 4B063 QA01 QQ20 QQ79 QQ91 QR16 QR66 QS03 QS28 QX02