

(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2011-523408

(P2011-523408A)

(43) 公表日 平成23年8月11日(2011.8.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/00 (2006.01)	C07K 16/00	4D006
B01D 61/14 (2006.01)	B01D 61/14 500	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2011-508933 (P2011-508933)	(71) 出願人	596113096 ノボ・ノルディスク・エー/エス
(86) (22) 出願日	平成21年5月15日 (2009.5.15)		デンマーク国, バッグスヴァエルト ディー
(85) 翻訳文提出日	平成23年1月17日 (2011.1.17)		ケーター 2880, ノボ アレー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/055900	(74) 代理人	100109726
(87) 国際公開番号	W02009/138484		弁理士 園田 吉隆
(87) 国際公開日	平成21年11月19日 (2009.11.19)	(74) 代理人	100101199
(31) 優先権主張番号	08156274.6		弁理士 小林 義教
(32) 優先日	平成20年5月15日 (2008.5.15)	(72) 発明者	ニールセン, ビャルネ レンフェルト
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		デンマーク国 ディーケーター 2830 ヴ
			ィルム, リグステルヴァンイェット 2
			7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体精製方法

(57) 【要約】

本発明は、抗体を工業的に生産する方法に関するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体化合物を該抗体化合物を含有する懸濁液から精製する方法であって、

i) 該懸濁液を所定の条件下でプロテイン A 誘導体 / アナログと接触させ、ここで、プロテイン A 誘導体 / アナログが抗体化合物と結合し、

ii) 前記プロテイン A 誘導体 / アナログ結合抗体を適切なバッファーで洗浄し、

iii) 前記抗体化合物を、適切なバッファーを用いてプロテイン A 誘導体 / アナログから溶出させ、生じた溶出液に収集する方法。

【請求項 2】

前記プロテイン A 誘導体 / アナログ樹脂が、Mab Select SureTMである、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

工程 i) から iii) の一又は複数が、室温以下の温度で実施される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

抗体化合物を該抗体化合物を含有する懸濁液から精製する方法において、

i) 前記懸濁液を、所定の条件下で該抗体に対して親和性を有するリガンドと接触させ、ここで、該リガンドが抗体化合物と結合し、

ii) 前記リガンド結合抗体を適切なバッファーで洗浄し、

iii) 前記抗体化合物を適切なバッファーを用いてリガンドから溶出させ、溶出液に収集し、 20

工程 iii) からの溶出液にカチオンクロマトグラフィーを施す方法。

【請求項 5】

前記リガンドがプロテイン A である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

工程 iii) からの溶出液にカチオンクロマトグラフィーを施す、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

工程 iii) からの溶出液に、カチオンクロマトグラフィーが施される前にウイルス不活化が施される、請求項 4 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 8】

カチオンクロマトグラフィーが、室温以下の温度で実施される、請求項 4 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

工程 iii) からの溶出液にアニオンクロマトグラフィーが施される、請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

工程 iii) からの溶出液に、アニオンクロマトグラフィーが施される前にウイルス不活化が施される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】 40

カチオンクロマトグラフィーからの溶出液にアニオンクロマトグラフィーが施され、ここでカチオンクロマトグラフィーからの溶出液に、場合によっては、アニオンクロマトグラフィーが施される前に、ウイルス濾過が施される、請求項 4 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

カチオンクロマトグラフィーからの溶出液に、アニオンクロマトグラフィーが施される前に、ウイルス濾過が施される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

アニオンクロマトグラフィーが、室温以下の温度で実施される、請求項 9 から 12 のいずれか 1 項に記載の方法。 50

【請求項 14】

前記アニオンクロマトグラフィーが、膜又は固形樹脂を使用するフロースルーとして実施される、請求項 9 から 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

アニオンクロマトグラフィーからの溶出液にウイルス濾過が施される、請求項 9 から 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

最終溶出液にダイアフィルトレーション及び/又は限外濾過が施される、請求項 1 から 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

最終溶出液が製薬用調製物に処方される、請求項 1 から 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

抗体精製プラットフォームであって、請求項 1 から 17 のいずれか 1 項に記載の方法を含むプラットフォーム。

【請求項 19】

I g G 抗体を精製するのに適した抗体精製プラットフォームであって、請求項 1 から 17 のいずれか 1 項に記載の方法を含むプラットフォーム。

【請求項 20】

治療用 I g G 抗体の生成に使用される、請求項 18 に記載の抗体精製プラットフォーム。

【請求項 21】

抗体を工業的に精製するプロセスであって、請求項 1 から 17 のいずれか 1 項に記載の方法を含むプロセス。

【請求項 22】

プロテイン A 誘導体 / アナログクロマトグラフィーからの溶出後の工程が、貯蔵タンクを使用することなく、連続したプロセス方式で実施される、請求項 21 に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は組換え的に発現された抗体の精製に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体を精製する方法は、典型的には、プロテイン A を捕捉するためのアフィニティークロマトグラフィーと、続いてのイオン交換及び/又は疎水性相互作用及び/又は混合方式クロマトグラフィー工程に一般的に基づく。このような方法は、少なくとも 2 つのウイルス低減工程、典型的には親和工程で溶出される pH を低下させる、また方法の適切な位置でウイルス濾過を実施することによる低減を含む。m A b 精製方法により除去される不純物には半抗体 (half antibody)、抗体断片、ダイマー、及び凝集体、DNA、ウイルス、H C P、プロテイン A 漏出、内毒素、及び他の関連する不純物が含まれる。

【0003】

プロテイン A は、元来は、細菌である黄色ブドウ球菌の細胞壁に見出される 40 - 60 k D a の表面タンパク質である。それは、免疫グロブリン、ほとんどの場合、特に I g G に結合する能力があるために、生化学研究に使用されることが見出されている。それは、重鎖と相互作用し、免疫グロブリンの F c 領域に結合する。

WO9856808 及び WO2005016968 には、プロテイン A 精製の例が記載されている。

またプロテイン A 精製は、WO2004076485、US20070060741、及び Kelley BD Biotechnol Bioeng. 101(3). 553-66 (2008) にも記載されている。

組換え抗体を工業的に生成するための効果的な方法が、必要とされ続けている。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【0004】

本発明は、抗体化合物を含有する懸濁液から、該抗体化合物を精製する方法に関し、ここで、

i) 所定の条件下、該懸濁液をプロテイン A 誘導体 / アナログと接触させ、プロテイン A 誘導体 / アナログと抗体化合物とを結合させ、

i i) 該プロテイン A 誘導体 / アナログ結合抗体を適切なバッファーで洗浄し、

i i i) 適切なバッファーを用い、該抗体化合物をプロテイン A 誘導体 / アナログから溶出させ、得られた溶出液を収集する。

【0005】

本発明は、抗体化合物を含有する懸濁液から、該抗体化合物を精製する方法に関し、ここで、

i) 所定の条件下、このような抗体への親和性を有するリガンドと該懸濁液とを接触させ、該リガンドと抗体化合物とを結合させ、

i i) 該リガンド結合抗体を適切なバッファーで洗浄し、

i i i) 適切なバッファーを用い、該抗体化合物をリガンドから溶出させ、溶出液を収集し、工程 i i i) の溶出液をカチオンクロマトグラフィーにかける。

【0006】

本発明は、抗体精製プラットフォームに関し、該プラットフォームは本発明の方法を含む。

また本発明は、抗体を工業的に生成するプロセスに関し、該プロセスは本発明の方法を含む。

【発明を実施するための形態】

【0007】

抗体を精製するための一般的な方法は当該分野でよく知られており、例えば、Pete Gagnon: Purification Tools for monoclonal Antibodies (1996) ISBN-9653515-9-9に記載されている。この発明は、抗体化合物を精製するための新規の方法の開発に関連している。この出願において、抗体化合物は免疫グロブリンである。「免疫グロブリン」なる用語は、2対のポリペプチド鎖からなり、一方が軽(L)鎖対であり、他方が重(H)鎖対であり、4つ全てがジスルフィド結合により相互結合している、構造的に関連した糖タンパク質のクラスに属する分子である。免疫グロブリンの構造は十分に特徴付けられている。例えば、Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W編, 第2版. Raven Press, N.Y. (1989))を参照。簡単には、各重鎖は、典型的には、重鎖可変領域(V_H)と重鎖定常領域(典型的には3つのドメイン C_{H1} 、 C_{H2} 、及び C_{H3} を含む)からなる。各軽鎖は、典型的には、軽鎖可変領域(V_L)と軽鎖定常領域(典型的には1つのドメイン C_L を含む)からなる。

【0008】

本発明において「抗体化合物」なる用語は、免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子の断片、又はそのいずれかの誘導体で、例えば少なくとも約30分、少なくとも約45分、少なくとも約1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約4時間、少なくとも約8時間、少なくとも約12時間、約24時間又はそれ以上、約48時間又はそれ以上、約3、4、5、6、7日又はそれ以上のかなりの時間、又は任意の他の関連する機能的に定められた期間(例えば、抗体が抗原に結合するのに関連した生理学的反応を誘発、促進、向上、及び/又は調節するのに十分な時間)、典型的な生理学的条件下で、抗原に特異的に結合する能力を有するものを称する。

【0009】

免疫グロブリン分子の重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体(Abs)の定常領域は、免疫系の種々の細胞(例えばエフェクター細胞)及び古典的な補体系の第1成分(C1q)を含む、宿主組織又は因子に対する、免疫グロブリンの結合性を媒介し得る。

【0010】

10

20

30

40

50

上述したように、特に示さず、又は本文中において明確に矛盾しない限りは、ここで抗体なる用語は、任意の適切な全長抗体の断片を含み、該断片は、抗原に対して特異的に結合する能力を保持し、プロテインAに結合可能であり、それをプロテインA誘導体/アナログに結合させることができる。

抗体は、上述したような「典型的な」免疫グロブリン構造以外の他の構造を有していてもよい。それは、単鎖抗体、ダイアボディ、及び全ての種類の断片、及び軽鎖と重鎖の組合せとすることができる。このような抗体の記述は、文献に沢山ある。本発明の目的にとって、抗体化合物がプロテインA及び抗原に結合することは十分である。

【0011】

一実施態様において、抗体化合物は治療用抗体である。

10

一実施態様において、抗体化合物はIgG抗体である。

【0012】

一実施態様において、本発明は、抗体化合物を精製する方法を提供するものであって、該方法は、従来のプロテインAカラムとは対照的に、プロテインA誘導体/アナログをベースにしたアフィニティークロマトグラフィーを使用することを含む。このようなプロテインA誘導体/アナログカラムでは、リガンド漏出が低減し、生成のランニングコストが改善され、生成物の品質が改善される。さらに、伝統的なプロテインA工程と比較して、少ない塩分量で使用される溶出条件により、アフィニティ及びイオン交換工程の間の、任意の濃縮工程、例えばUF/DFが回避される。

【0013】

20

一実施態様において、本発明は、抗体化合物を含有する懸濁液から、抗体化合物を精製する方法を提供するものであって、ここで、

i) 所定の条件下、プロテインA誘導体/アナログと該懸濁液とを接触させ、プロテインA誘導体/アナログと抗体化合物とを結合させ、

i i) 該プロテインA誘導体/アナログ結合抗体を適切なバッファーで洗浄し、

i i i) 適切なバッファーを用い、該抗体化合物をプロテインA誘導体/アナログから溶出させ、得られた溶出液を収集する。

【0014】

本発明において、プロテインA誘導体/アナログは、プロテインA誘導体/アナログリガンドであり、ここで、プロテインAのIgG結合ドメインにおけるアルカリに不安定なアミノ酸は、よりアルカリ安定したアミノ酸で置換されている。一実施態様において、プロテインA誘導体/アナログはプロテインA分子であり、ここで一又は複数のアスパラギン(A s n)残基は、アルカリ条件下でもタンパク質安定性が増加するように修飾されている。一実施態様において、2又はそれ以上のA s n残基が修飾されている。一実施態様において、全てのA s n残基が修飾されている。一実施態様において、前記A s n残基はリジン、アスパラギン酸及びロイシンから選択されるアミノ酸で置換されている。一実施態様において、プロテインA誘導体/アナログが、先に記載された様にして修飾されたドメインZである。一実施態様において、プロテインA誘導体/アナログは、EP1123389A1及び/又はUS6831161に記載されているような、プロテインA誘導体/アナログである。親プロテインA分子は、例えば性能を増加させ得る、他の方法で修飾することもできる。

30

40

【0015】

一実施態様において、前記プロテインA誘導体/アナログは不活性樹脂に共有的に結合している。一実施態様において、前記プロテインA誘導体/アナログ樹脂は、マブセレクト(MabSelect) S u R e ^T Mである。M a b S e l e c t S u R e ^T MはGE Healthcare Life Sciences (<http://www.gelifesciences.com>)から入手可能である。

【0016】

一実施態様において、プロテインA誘導体/アナログを使用するアフィニティークロマトグラフィーは、室温以下の温度で実施される。一実施態様において、プロテインA誘導体/アナログを使用するアフィニティークロマトグラフィーは、2~25、例えば5~25、例えば10~25、例えば15~25の温度、又は2~20、例えば5~20

50

、例えば10～20、例えば15～20の温度、又は2～15、例えば5～15、例えば10～15の温度、又は2～10、例えば5～10の温度、又は2～5の温度で実施される。一実施態様において、プロテインA誘導体/アナログを使用するアフィニティークロマトグラフィーは、2、5、10、15、20又は25の温度で実施される。

一実施態様において、工程i)、ii)及びiii)は、膜又は固形樹脂を使用する、フロースルーとして実施されてよい。

【0017】

一実施態様において、プロテインA誘導体/アナログクロマトグラフィーからの溶出液はウイルス不活化にかけられる。一実施態様において、前記ウイルス活性化は、プロテインA誘導体/アナログクロマトグラフィーからの溶出液のpHを低下させることによって実施される。一実施態様において、溶出液のpHは、5分～1日の期間で、3～4のpHまで低下させる。一実施態様において、pHは、3.1～4、例えば3.2～4、例えば3.3～4、例えば3.4～4、例えば3.5～4、例えば3.6～4、例えば3.7～4、例えば3.8～4のpH、例えば4のpHまで低下させる。一実施態様において、pHは、3～3.9、例えば3.1～3.9、例えば3.2～3.9、例えば3.3～3.9、例えば3.4～3.9、例えば3.5～3.9、例えば3.6～3.9、例えば3.7～3.9のpH、例えば3.9のpHまで低下させる。一実施態様において、pHは、3～3.8、例えば3.1～3.8、例えば3.2～3.8、例えば3.3～3.8、例えば3.4～3.8、例えば3.5～3.8、例えば3.6～3.8のpH、例えば3.8のpHまで低下させる。一実施態様において、pHは、3～3.7、例えば3.1～3.7、例えば3.2～3.7、例えば3.3～3.7、例えば3.4～3.7、例えば3.5～3.7のpH、例えば3.7のpHまで低下させる。一実施態様において、pHは、3～3.6、例えば3.1～3.6、例えば3.2～3.6、例えば3.3～3.6、例えば3.4～3.6のpH、例えば3.6のpHまで低下させる。一実施態様において、pHは、3～3.5、例えば3.1～3.5、例えば3.2～3.5、例えば3.3～3.5のpH、例えば3.5のpHまで低下させる。一実施態様において、pHは、3～3.4、例えば3.1～3.4、例えば3.2～3.4のpH、例えば3.4のpHまで低下させる。一実施態様において、pHは、3～3.3、例えば3.1～3.3のpH、例えば3.3のpHまで低下させる。一実施態様において、pHは3～3.2のpH、例えば3.2のpHまで、又は3.1のpHまで、又は3のpHまで低下させる。

【0018】

上述したように、プロテインA誘導体/アナログクロマトグラフィーからの溶出液は、5分～1時間の期間に、これらのpH値を保持していてもよい。一実施態様において、この期間は10分～240分、例えば20～90分である。

以後、溶出液のpHは4.5～5.5のpH、又は任意の以下の抗体に適するように調節される。

【0019】

一実施態様において、プロテインA誘導体/アナログクロマトグラフィーからの溶出液は、pH値を低下させる前及び/又はpHを再調節した後に濾過される。

本発明の一実施態様において、プロテインA誘導体/アナログクロマトグラフィーから得られた溶出液は、上述したpH低下にかけなくても、カチオン交換工程にかけられる。アフィニティー工程の下流にカチオン交換を配することは、得られた溶出液のpHが7以下であり、mAbの等電点とクロスしうるさらなる調節やpH調節の潜在的な付加調節をすることなく、溶出液を処理できるという利点がある。さらなるpH調節の回避は、沈殿及び凝集体形成の回避の助力となる

【0020】

カチオンクロマトグラフィーは、酢酸ナトリウムバッファーでpH4.5～6.0に前平衡されたカラムに、プロテインA(可能であれば、ウイルス不活化後)プールからの溶出液を充填することにより実施され得る。未結合の物質はカラムから洗い流されて、酢酸ナ

10

20

30

40

50

トリウムバッファーに、0-0.03 Mの塩化ナトリウムが入ったものからの線形勾配を使用し、mAbを溶出させる。凝集体は、生成物の後のピークとして溶出する。不純物、例えば宿主細胞タンパク質、DNA、及びプロテインAの漏洩も、かなり低減する。

【0021】

一実施態様において、カチオンクロマトグラフィーは室温以下の温度で実施される。一実施態様において、カチオンクロマトグラフィーは、2~25℃、例えば5~25℃、例えば10~25℃、例えば15~25℃の温度、又は2~20℃、例えば5~20℃、例えば10~20℃、例えば15~20℃の温度、又は2~15℃、例えば5~15℃、例えば10~15℃の温度、又は2~10℃、例えば5~10℃の温度、又は2-5℃の温度で実施される。一実施態様において、カチオンクロマトグラフィーは、2、5、10、15、20又は25℃の温度で実施される。

10

【0022】

一実施態様において、カチオンクロマトグラフィーは、膜又は固形樹脂を使用する、フロースルーとして実施される。

ランスルーモードでは、カラム又は膜は、酢酸ナトリウムバッファーにて、pH 4.5~6.0に平衡にされる。カラムは、収集されたプール(試料/生成物の画分)中に存在する、HCP(宿主細胞タンパク質)、凝集体又は他の不純物のいずれかに許容できない増加が生じるまで充填される。

【0023】

一実施態様において、ウイルス濾過は室温以下の温度で実施される。一実施態様において、ウイルス濾過は、2~25℃、例えば5~25℃、例えば10~25℃、例えば15~25℃の温度、又は2~20℃、例えば5~20℃、例えば10~20℃、例えば15~20℃の温度、又は2~15℃、例えば5~15℃、例えば10~15℃の温度、又は2~10℃、例えば5~10℃の温度、又は2-5℃の温度で実施される。一実施態様において、ウイルス濾過は、2、5、10、15、20又は25℃の温度で実施される。

20

ウイルス濾過は、例えばPete Gagnon: Purification Tools for monoclonal Antibodies (1996) ISBN-9653515-9-9に記載されているようなウイルス用フィルターを使用し、当該分野で知られているようにして実施可能である。

【0024】

一実施態様においては、第2のウイルス濾過用に、同様のウイルス濾過フィルター又は異なるウイルス濾過フィルターを使用して、ウイルス濾過工程が繰り返される。一実施態様において、第1のフィルターは第2のフィルターよりも多孔質である。これにより、第1工程で、より効果的に凝集体を除去し、第2工程で、より効果的にウイルスを除去することができる。

30

【0025】

一実施態様において、カチオンクロマトグラフィーからの溶出液は、可能であれば、上述したようなウイルス濾過工程の後に、アニオンクロマトグラフィーにかけてもよい。

アニオンクロマトグラフィーは、リン酸バッファーで、予めpH 6-8に平衡にされた膜又はカラムにおいて、カチオン交換クロマトグラフィー工程からのプールを充填することにより実施されてよい。充填前、物質は、2-12 mS/cmの伝導率まで、水を用いて希釈され、標的pHにpHが調節される。生成物はフロースルー画分に収集される。

40

【0026】

一実施態様において、ウイルス濾過は、アニオンクロマトグラフィーの後に実施される。ウイルス濾過は上述したように実施されてよい。一実施態様において、ウイルス濾過は、カチオンクロマトグラフィーの後、及びアニオンクロマトグラフィーの後の双方で実施される。

一実施態様において、アニオンクロマトグラフィーは、膜又は固形樹脂を使用する、フロースルーとして実施される。

【0027】

バッファー交換及び抗体濃縮は、所望するならば、最後のクロマトグラフィー工程後に

50

実施されてよく、例えば、Pete Gagnon: Purification Tools for monoclonal Antibodies (1996) ISBN-9653515-9-9、及びWO2009010269が参照される。

また、抗体試料は、当該分野で公知であるように、製薬用途に適した調製物等の、製薬用調製物に処方されてもよい。

【0028】

さらに本発明は、豊富な選択の幅の種々の抗体を、フリーサイズで生成するのに有用な、標準化された方法である抗体精製プラットフォームであって、本発明の方法を含むプラットフォームを提供するものである。

このような標準化されたプラットフォームは、生産において、以下のような利点を有する：

- 各プロジェクトに対して、同じ方法が利用されるので、開発/試験コスト及び時間が節約される
- 同様の装置及び原料、バッファー等が適用され、よって余分な試験や承認されるさらなる仕入れ先を得る必要がない
- ウイルスの有効性を検証する研究は、このプロジェクトから次に再利用されうる
- 労働力が節約され、生成物の品質が保証される。

【0029】

一実施態様において、このような抗体はIgG抗体である。

本発明の方法を含む抗体生成プラットフォームは、例えば、同様の条件下で、種々のIgGサブタイプが溶出する可能性、及びアフィニティーリガンドの漏洩の低減といった、さらなる利点を有する。

従って、本発明は、抗体を工業的に生成するプロセスを提供するものであり、該プロセスは、抗体化合物を精製するための、本発明の方法を含む。一実施態様において、このような抗体化合物は治療用抗体である。一実施態様において、このような抗体化合物はIgG抗体である。

一実施態様において、本発明は、抗体を工業的に生成するプロセスを提供するものであり、該プロセスは、抗体化合物を精製するための、本発明の方法を含み、プロテインA誘導体/アナログクロマトグラフィーからの溶出後の工程が、貯蔵タンクを使用することなく、連続したプロセス方式で実施される。

【0030】

以下は、本発明の実施態様の非限定的列挙である。

実施態様1：抗体化合物を含有する懸濁液から、該抗体化合物を精製する方法であって、ここで、

- i) 所定の条件下、該懸濁液とプロテインA誘導体/アナログとを接触させ、プロテインA誘導体/アナログと抗体化合物とを結合させ、
- ii) 該プロテインA誘導体/アナログ結合抗体を適切なバッファーで洗浄し、
- iii) 適切なバッファーを用い、該抗体化合物をプロテインA誘導体/アナログから溶出させ、得られた溶出液を収集する方法。

実施態様2：プロテインA誘導体/アナログが、IgG結合ドメインにおけるアルカリに不安定なアミノ酸が、よりアルカリ安定したアミノ酸で置換されているプロテインA誘導体/アナログである、実施態様1の方法。

実施態様3：プロテインA誘導体/アナログが不活性樹脂に結合している、実施態様1又は2の方法。

実施態様4：前記プロテインA誘導体/アナログ樹脂が、MabSelect SuReTMである、実施態様3の方法。

【0031】

実施態様5：工程i)ないしiii)の一又は複数が、室温以下の温度で実施される、実施態様1ないし4のいずれかの方法。

実施態様6：工程i)、ii)及びiii)の全てが、室温以下の温度で実施される、実施態様5の方法。

10

20

30

40

50

実施態様 7：室温以下の温度が、2～25、例えば5～25、例えば10～25、例えば15～25の温度である、実施態様 5 又は実施態様 6 の方法。

実施態様 8：室温以下の温度が、2～20、例えば5～20、例えば10～20、例えば15～20の温度、又は2～15、例えば5～15、例えば10～15の温度から選択される温度である、実施態様 5 又は実施態様 6 の方法。

実施態様 9：室温以下の温度が、2～10、例えば5～10の温度から選択される温度である、実施態様 5 又は実施態様 6 の方法。

実施態様 10：室温以下の温度が2～5の温度である、実施態様 5 又は実施態様 6 の方法。

実施態様 11：クロマトグラフィーが、膜又は固形樹脂を使用する、フロースルー方式で実施される、実施態様 1 ないし 7 のいずれかの方法。

【0032】

実施態様 12：抗体化合物を含有する懸濁液から、該抗体化合物を精製する方法であって、ここで、

i) 所定の条件下、このような抗体への親和性を有するリガンドと該懸濁液とを接触させ、該リガンドと抗体化合物とを結合させ、

i i) 該リガンド結合抗体を適切なバッファーで洗浄し、

i i i) 適切なバッファーを用い、該抗体化合物をリガンドから溶出させ、溶出液を収集し、工程 i i i) の溶出液をカチオンクロマトグラフィーにかける方法。

実施態様 13：前記リガンドがプロテイン A である、実施態様 12 の方法。

実施態様 14：工程 i i i) からの溶出液がカチオンクロマトグラフィーにかけられる、実施態様 1 ないし 11 のいずれかの方法。

実施態様 15：工程 i i i) からの溶出液が、カチオンクロマトグラフィーにかけられる前にウイルス不活化にかけられる、実施態様 12 ないし 14 のいずれかの方法。

【0033】

実施態様 16：工程 i i i) からの溶出液の pH が、5分～1日の期間で、3～4の pH まで低下され、ついで、カチオンクロマトグラフィーの前に再調節される、実施態様 15 の方法。

実施態様 17：pH が、20～90分の期間で、3.4～3.9の pH まで低下される、実施態様 16 の方法。

【0034】

実施態様 18：カチオンクロマトグラフィーが、室温以下の温度で実施される、実施態様 12 ないし 17 のいずれかの方法。

実施態様 19：室温以下の温度が、2～25、例えば5～25、例えば10～25、例えば15～25の温度である、実施態様 18 の方法。

実施態様 20：室温以下の温度が、2～20、例えば5～20、例えば10～20、例えば15～20の温度、又は2～15、例えば5～15、例えば10～15の温度から選択される温度である、実施態様 18 又は実施態様 19 の方法。

実施態様 21：室温以下の温度が、2～10、例えば5～10の温度から選択される温度である、実施態様 18 又は実施態様 19 の方法。

実施態様 22：室温以下の温度が2～5の温度である、実施態様 18 又は実施態様 19 の方法。

実施態様 23：前記カチオンクロマトグラフィーが、膜又は固形樹脂を使用する、フロースルー方式で実施される、実施態様 12 ないし 22 のいずれかの方法。

【0035】

実施態様 24：工程 i i i) からの溶出液がアニオンクロマトグラフィーにかけられる、実施態様 1 ないし 7 のいずれかの方法。

実施態様 25：工程 i i i) からの溶出液の伝導率が、充填前に2～12 mS / cm の伝導率に調節される、実施態様 24 の方法。

実施態様 26：工程 i i i) からの溶出液が、アニオンクロマトグラフィーにかけられ

10

20

30

40

50

る前にウイルス不活化にかけられる、実施態様 2 4 又は実施態様 2 5 の方法。

【 0 0 3 6 】

実施態様 2 7 : 工程 i i i) からの溶出液の pH が、5 分 ~ 1 日の期間で、3 ~ 4 の pH まで低下され、ついで、アニオンクロマトグラフィーの前に再調節される、実施態様 2 6 の方法。

実施態様 2 8 : pH が、2 0 ~ 9 0 分の期間で、3 . 4 - 3 . 9 の pH まで低下される、実施態様 2 7 の方法。

【 0 0 3 7 】

実施態様 2 9 : カチオンクロマトグラフィーからの溶出液がアニオンクロマトグラフィーにかけられ、ここでカチオンクロマトグラフィーからの溶出液が、場合によっては、アニオンクロマトグラフィーにかけられる前に、ウイルス濾過にかけられる、実施態様 1 2 ないし 2 3 のいずれかの方法。

実施態様 3 0 : カチオンクロマトグラフィーからの溶出液が、アニオンクロマトグラフィーにかけられる前に、ウイルス濾過にかけられる、実施態様 2 9 の方法。

実施態様 3 1 : ウイルス濾過が、第 1、ついで第 2 のフィルターにおける、カチオンクロマトグラフィーからの溶出液の濾過を含む、実施態様 3 0 の方法。

実施態様 3 2 : 第 1 のフィルターが第 2 のフィルターよりも多孔質である、実施態様 4 2 の方法。

実施態様 3 3 : カチオンクロマトグラフィーからの溶出液の伝導率が、充填前に 2 ~ 1 2 m S / c m に調節される、実施態様 2 9 の方法。

【 0 0 3 8 】

実施態様 3 4 : アニオンクロマトグラフィーが、室温以下の温度で実施される、実施態様 2 4 ないし 3 3 のいずれかの方法。

実施態様 3 5 : 室温以下の温度が、2 ~ 2 5 、例えば 5 ~ 2 5 、例えば 1 0 ~ 2 5 、例えば 1 5 ~ 2 5 の温度である、実施態様 3 4 の方法。

実施態様 3 6 : 室温以下の温度が、2 ~ 2 0 、例えば 5 ~ 2 0 、例えば 1 0 ~ 2 0 、例えば 1 5 ~ 2 0 の温度、又は 2 ~ 1 5 、例えば 5 ~ 1 5 、例えば 1 0 ~ 1 5 の温度から選択される温度である、実施態様 3 4 又は実施態様 3 5 の方法。

実施態様 3 7 : 室温以下の温度が、2 ~ 1 0 、例えば 5 ~ 1 0 の温度から選択される温度である、実施態様 3 4 又は実施態様 3 5 の方法。

実施態様 3 8 : 室温以下の温度が 2 ~ 5 の温度である、実施態様 3 4 又は実施態様 3 5 の方法。

実施態様 3 9 : 前記アニオンクロマトグラフィーが、膜又は固形樹脂を使用する、フロースルーとして実施される、実施態様 2 4 ないし 3 8 のいずれかの方法。

【 0 0 3 9 】

実施態様 4 0 : アニオンクロマトグラフィーからの溶出液がウイルス濾過にかけられる、実施態様 2 4 ないし 3 9 のいずれかの方法。

実施態様 4 1 : ウイルス濾過が、第 1、ついで第 2 のフィルターにおける、アニオンクロマトグラフィーからの溶出液の濾過を含む、実施態様 4 0 の方法。

実施態様 4 2 : 第 1 のフィルターが第 2 のフィルターよりも多孔質である、実施態様 4 2 の方法。

実施態様 4 3 : 最終溶出液がダイアフィルトレーション及び / 又は限外濾過にかけられる、実施態様 1 ないし 4 2 のいずれかの方法。

実施態様 4 4 : 最終溶出液が製薬用調製物に処方される、実施態様 1 ないし 4 3 のいずれかの方法。

実施態様 4 5 : 抗体化合物が I g G 抗体である、実施態様 1 ないし 4 4 のいずれかの方法。

実施態様 4 6 : 抗体化合物が治療用抗体である、実施態様 1 ないし 4 5 のいずれかの方法。

【 0 0 4 0 】

10

20

30

40

50

実施態様 47：抗体精製プラットフォームであって、実施態様 1 ないし 46 のいずれかの方法を含むプラットフォーム。

実施態様 48：IgG 抗体を精製するのに適した抗体精製プラットフォームであって、実施態様 1 ないし 46 のいずれかの方法を含むプラットフォーム。

実施態様 49：IgG 抗体の生成に使用される、実施態様 47 又は実施態様 48 の抗体精製プラットフォーム。

実施態様 50：治療用抗体の生成に使用される、実施態様 47 ないし 49 のいずれかの抗体精製プラットフォーム。

【0041】

実施態様 51：抗体を工業的に生成するプロセスであって、実施態様 1 ないし 46 のいずれかの方法を含むプロセス。

実施態様 52：プロテイン A 誘導体 / アナログクロマトグラフィーからの溶出後の工程が、貯蔵タンクを使用することなく、連続したプロセス方式で実施される、実施態様 51 のプロセス。

【0042】

ここに引用された刊行物、特許出願及び特許を含む全ての文献は、各文献が、出典明示により個々にかつ特に援用され、その全体が説明されているならば、同程度で出典明示によりここに援用される。

全ての表題及び副題は、ここでは便宜的にのみ使用されており、決して本発明を限定するものとは解釈されない。

その全ての可能性のある変形例における、上述した要素の任意の組合せは、ここで特に示され、又は文脈においてははっきりと矛盾していない限りは、本発明に含まれる。

【0043】

本発明で記載されて使用されている「a」及び「an」及び「the」及び類似指示対象なる用語は、ここで他に示されず、又は文脈においてははっきりと矛盾していない限りは、単数形及び複数形の双方をカバーすると解釈される。

ここで他に示されない限りは、ここでの値の範囲の記述は、単に、範囲内に入るそれぞれ別個の値を個々に称する省略方法として提供することを意図しているものであって、ここで個々に列挙されているかのように、それぞれの別個の値が明細書に導入される。特に示さない限り、ここで提供される全ての正確な値は、対応する近似値の代表例である(例えば、特定の要因又は測定値に関して提供される全ての正確な例示的値は、適切な場合は、「約」により修飾される、対応する近似測定値を提供するとみなすことができる)。

ここに記載されている全ての方法は、ここで他に示されず、又は文脈においてははっきりと矛盾していない限りは、任意の適切な順番で実施することができる。

ここに提供される任意かつ全ての実施例、又は例示的言語(「例えば」、「等」)の使用は、単に本発明をより例証することを意図しており、他に示されない限り、本発明の範囲に限定をもたらすものではない。明確に記載していない限りは、明細書中の如何なる語句も、任意の要素が本発明の実施に必須であることを示しているものと解すべきではない。

【0044】

ここでの特許文献の引用及び援用は単に便宜上なされているもので、そのような特許文献の有効性、特許性、及び / 又は権利行使性についての見解を反映させるものではない。

特に明記せず、文脈においてははっきりと矛盾していない限りは、成分又は成分類に関して、「含有する」、「有する」、「含む」又は「含める」等の用語を使用する、本発明の任意の側面又は実施態様のここでの記載は、特定の成分又は成分類「からなる」、「本質的になる」、又は「実質的に含有する」といった本発明の類似した側面又は実施態様を支持することを意図したものである(例えば、特定の成分を含有するここに記載の組成物は、特に明記しない又は文脈においてははっきりと矛盾していない限りは、その成分からなる組成物を記載するものとして理解される)。

この発明は、適用される法律に容認される最大範囲まで、ここに提供される請求項又は

10

20

30

40

50

側面に列挙された主題事項の全ての修正点及び等価物を含む。

【実施例】

【0045】

実施例 1

抗体精製方法

CHO細胞培養からのmAbs(例えばWO2006070286及びWO2008009545に記載の抗-NKG2A、例えばWO2005097160に記載の抗-NKG2D、例えばWO2003062278 and WO2008022390に記載の抗-C5aR)の精製方法は、いくつかの工程を含む。細胞培養上清を濾過し、106mlのMabSelect SuReアフィニティーカラム(長さ11cm)(溶媒及び条件に応じて、以下参照)に充填した。溶出した生成物のプールを、0.2Mのクエン酸を用い、pHをpH3.7に調節することにより、ウイルス不活化にかけ、1時間、室温で保持した。また、低pKaの他のバッファー、例えば5-100mM濃度のクエン酸又は酢酸を使用し、さらなる溶出を実施してもよい。続いて、0.5MのNa₂HPO₄を用いてプールをpH5.0に調節し、ついで、94mlのポロス(POROS)50HSカチオン交換カラム(長さ4.8cm)に充填した。pH調節後、溶液中に不純物が沈殿する場合もあり、これを、カチオン性カラムに充填する前に、濾過又は遠心分離によって除去しなければならない。溶出は、25mMのCH₃COONa、pH5.0、0-0.3mol/kgのNaCl勾配、10CV超により実施した。実際のmAbのpIに応じて、この工程のpHを調節してもよい。0.5MのNa₂HPO₄溶液を用い、mAbプールをpH7.0に調節し、0.1µmフィルター(4.52cm²)、続いてプラノバ(Plano)20Nウイルスフィルター(0.001m²)からなるフィルタートレーンを通して濾過した(ミレックス(Millex)-VVフィルターの代替は、0.1µmのミリポア・オプティキャップ(Millipore Opticap)XLT20フィルターである)。ウイルス濾液を、室温にて水で7.0mS/cmまで希釈し、サルトバインド(Sartobind)Qシングルセブ(Single Sep)カプセル(75cm²)アニオン交換膜に充填した。また、伝導率の低下はUF/DFにより達成されてもよい。アニオン交換膜工程を、非結合条件下で、フロースルー方式で実施し、最後に、10mMのヒスチジンバッファー、pH6.2にて、続いて0.01%までトゥイン80を添加することにより、アクタクロスフロー(Akta cross-flow)装置において、50cm²のバイオマックス(Biomax)30k膜を用い、濾液を限外濾過又はダイアフィルトレーションした。製剤原料処方物の最終組成は、40mgのmAb/mL、25g/Lのスクロース、0.01%w/wのトゥイン80、10mMのヒスチジン、pH6.2であった。抗-NKG2A、抗-NKG2D及び抗-C5aRについての工程収率及び他の条件/結果を、それぞれ表1、2及び3に付与する。最も高い可能性のある収率を有する、不純物の最大低下が達成されるように、伝導率、及びQ膜工程のpH、及び膜を通過する充填溶液は、各mAbに対して調節される。よって、伝導率及びpHは、それぞれ2-12mS/cm(NaCl含有量によりコントロール)及びpH5.8-8.0の範囲で変えてよい。

【0046】

溶媒及び条件：

プロテインA誘導体/アナログの捕捉 - MabSelect SuRe

- ・室温
- ・流量：1時間あたり20カラム容量(CV/h)
- ・充填：30gのmAb/L樹脂、しかしながら、1-50g/L樹脂の範囲で変えてよい。
- ・装置及び洗浄バッファー：11.5mmol/kgのNaH₂PO₄、38.5mmol/kgのNa₂HPO₄、300mmol/kgのNaCl
- ・洗浄バッファー：6.5mmol/kgのNaH₂PO₄、43.5mmol/kgのNa₂HPO₄、1000mmol/kgのNaCl
- ・溶出バッファー：10mmol/kgのギ酸、pH3.5
- ・段階勾配を使用して溶出

10

20

30

40

50

・ pH 3.7 (0.2 M のクエン酸) で 1 時間のウイルス不活化、続いて 0.5 M の Na_2HPO_4 を用いて pH 5.0 に pH 調節

【0047】

CIE X-ポロス 50HS、pH 5

- ・ 室温
- ・ 流量：25 CV/h
- ・ 充填：45 g の mAb / L 樹脂、しかしながら、40 - 120 g / L 樹脂の範囲で変えてよい。

・ 装置及び洗浄バッファー：25 mmol/kg の CH_3COONa 及び 12.5 mmol/kg の CH_3COOH

・ 溶出バッファー：25 mmol/kg の CH_3COONa 及び 10.1 mmol/kg の CH_3COOH 、300 mmol/kg の NaCl

・ 平衡/溶出バッファーに 300 mmol/kg の NaCl 段階勾配を使用して溶出。バッファー、pH 5。

【0048】

ウイルス濾過 - プラノバ 20N

- ・ 室温
- ・ 濾過中の圧力、0.8 バール
- ・ 充填：110 kg/m²、しかしながら、500 kg/m² までであってよい。

・ 0.5 M の Na_2HPO_4 溶液を用い、7.0 に pH 調節。

・ 装置及び洗浄バッファー：7.7 mmol/kg の NaH_2PO_4 、12.2 mmol/kg の Na_2HPO_4 、50 mmol/kg の NaCl

・ 0.1 μm フィルターを用いた予備濾過

・ プラノバ 20N を用いた濾過

【0049】

Q 膜フロースルー、pH 7

- ・ 室温
- ・ 流量：300 CV/h
- ・ 充填：483 g/m²、しかしながら、充填は 200 - 3000 g/m² の範囲で変えてよい。

・ 水を用い、7 mS/cm までプールの希釈

・ 装置及び洗浄バッファー：7.7 mmol/kg の NaH_2PO_4 、12.2 mmol/kg の Na_2HPO_4 、50 mmol/kg の NaCl

・ フロースルーの適用及び収集

【0050】

UF/DF - 30 kDa のバイオマックス

・ 10 mmol/kg のヒスチジン、pH 6.2 - 6.5 にバッファー交換

・ 25 g/L のグルコース及び 0.01% のツイーン 80、pH 6.2 - 6.5 において 30 - 60 mg/mL に濃縮及び処方

【0051】

10

20

30

40

表 1. 抗NKG 2 Aの精製のまとめ

プロセス工程	pH	伝導率 (ms/cm)	含有量 (mg/ml)	収率 (%)	HMWP (%)	HCP (ppm)
細胞培養	7.0	-	2.6	-	-	540000
親和性プール	6.4	4.1	-	-	-	-
親和性プールII	5.0	-	9.0	92	0.90	849
CIEC充填	5.1	-	8.9	-	0.96	264
CIECプール	4.8	18.5	6.1	86	0.99	60
AIE膜充填	7.1	7.0	1.8	-	0.91	63
Q膜プール	7.1	7.6	1.8	102	0.87	51
UF/DF充填	7.0	7.4	1.7	-	-	-
UF/DF濾液	6.2	-	40.0	81	1.18	45

分析方法の説明は実施例 9 において行う。

【 0 0 5 2 】

表 2. 抗NKG 2 Dの精製のまとめ

プロセス工程	pH	含有量 mg/ml	収率 (%)	HMWP (%)	HCP (ppm)	プロテインA 漏出(ppm)
細胞培養	7.0	3.5	-	-	-	-
親和性プール	-	11.8	-	-	-	-
CIECプール	5.0	11.8	96	1.0	286	0.09
Q膜プール	7.0	2.8	98	0.90	10	-
UF/DF濾液	6.2	38.2	91	0.90	4.6	0.08

分析方法の説明は実施例 9 において行う。

【 0 0 5 3 】

表 3. 抗C 5 a Rの精製のまとめ

プロセス工程	pH	含有量 mg/ml	DNA (ppm)	HMWP (%)	HCP (ppm)	プロテイン A漏出(ppm)	純度(%) SDS-PAGE
細胞培養	7.0	1.2	-	-	515000	-	-
親和性プール	-	9.6	760	1.3	950	1.7	98.8
CIECプール	5.0	7.8	<50	0.8	22	0.3	99.4
Q膜プール	7.0	2.0	-	1.0	< 18	-	99.4
UF/DF濾液	6.2	40.1	0.02	1.6	2.5	0.3	99.6

分析方法の説明は実施例 9 において行う。

【 0 0 5 4 】

実施例 2

マブセレクト S U R E における抗-インターフェロン-アルファ(抗-I F N)の捕捉

C H O 細胞培養からの細胞培養上清を、予備フィルターとして 1 . 2 μ m のフィルターを使用し、0 . 4 5 μ m のフィルターにおいて濾過した。細胞により生成された抗-I F N の力価(例えば、W02006086586に記載)は 2 m g / m l であった。

モノクローナル抗体の p I は 7 . 6 であった。マブセレクト S U R E カラム(5 6 m l 容量、高さ 1 0 . 5 c m、直径 2 . 6 c m)を、1 0 カラム容量(C V)の 5 0 m M のリン酸ナトリウム、3 0 0 m M の N a C l、p H 7 . 0 を用いて、予め平衡にしておいた：流量は 2 0 C V / h であった。カラムに、流量 2 0 C V / h で操作される、8 4 0 m l の濾

10

20

30

40

50

過された細胞培養上清を充填した；充填容量は約30mg/mlのマトリックス物質であった。

【0055】

溶出前、カラムを、10CVの50mMのリン酸ナトリウム+300mMのNaCl、pH7.0で洗浄し、続いて6CVの50mMのリン酸ナトリウム+1000mMのNaCl、pH7.0で洗浄し、5CVの50mMのリン酸ナトリウム+300mMのNaCl、pH7.0で洗浄した。

10mMのギ酸、pH3.5からなる溶出バッファーを使用し、溶出を実施した。溶出の直後、抗体プールを含有する溶出液の画分を、0.2Mのクエン酸溶液を使用してpH3.7に調節し、pH3.7で1時間保持した。次に、0.5MのNa₂HPO₄を使用し、溶液をpH5.0に調節した。

抗体の濃度を、上述したようにして測定した。充填前の細胞培養上清溶液の力価に基づいた回収率は78%であった；溶出液中の抗体濃度は7mg/mlであった。

【0056】

実施例3

マブセレクトSUREにおける抗-第IX因子(抗-FIX)の捕捉

CHO細胞培養からの細胞培養上清を、サルトブラン(Sartobran)P10、0.65µm+0.45µmのフィルターにおいて濾過した。細胞により生成された抗-FIXの力価は2mg/mlであった。

モノクローナル抗体のpIは7.5であった。マブセレクトSUREカラム(2.4l容量)を、10カラム容量(CV)の50mMのリン酸ナトリウム、300mMのNaCl、pH7.0を用いて、予め平衡にしておいた；流量は12.5CV/hであった。カラムに、流量30CV/hで操作される、9lの濾過された細胞培養上清を充填した；充填容量は約7.5g/mlのマトリックス物質であった。

【0057】

溶出前、カラムを、2CVの50mMのリン酸ナトリウム、300mMのNaCl、pH7.0で洗浄し、続いて6CVの50mMのリン酸ナトリウム、1000mMのNaCl、pH7.0で洗浄し、5CVの50mMのリン酸ナトリウム、300mMのNaCl、pH7.0で洗浄した。

10mMのギ酸、pH3.5からなる溶出バッファーを使用し、溶出を実施した。溶出の直後、抗体ピークを含有する溶出液の画分を、0.2Mのクエン酸溶液を使用してpH3.7に調節し、pH3.7で1時間保持した。次に、0.5MのNa₂HPO₄を使用し、溶液をpH5.0に調節した。

溶出プールにおける抗体の濃度を、1.71cm⁻¹の伸び率を使用し、280nmでの吸光度を測定することにより決定した。培養上清の抗体濃度を、モノマーIgG含有量を測定するために使用されるSE-HPLC法により、%HMWPを公知の濃度の参照試料を用いた抗-FIXモノマーピークの面積と比較することにより決定した。

充填前の細胞培養上清溶液の力価に基づく抗-FIXの回収率は、約100%であった；溶出液における抗体の濃度は5g/lであった。

【0058】

実施例4

ポロス50HSにおける抗インターフェロナルファ(抗-IFN)のCIEX

2.6mg/mlの濃度で、実施例2に記載したように調製されたpH、及びマブセレクトSUREカラムにおいて予め精製された1519mlの抗-IFNを、SartoriusからのHVLP型0.45µmフィルターにおいて濾過した。濾過された抗体溶液を、10カラム容量(CV)の25mMの酢酸ナトリウム、12.4mMの酢酸、pH5.0で予め平衡にされたポロス50HSカラム(94mlの容量、高さ4.8cm、直径5.0cm)に充填した；流量は25CV/hであった；充填容量は約43mg/mlのマトリックス物質であった。

溶出前、カラムを、10CVの25mMの酢酸ナトリウム、12.4mMの酢酸で洗浄

した。

【0059】

25 mMの酢酸ナトリウム、10.1 mMの酢酸、300 mMのNaCl、pH 5.0からなる10 CV超の溶出バッファの線形勾配を使用し、溶出を実施した。抗IFN含有溶液を、先端のOD 0.250から後端のOD 1.125までを集めることによって達成した。

溶出プール及び充填溶液における抗体の濃度を、 $1.63 \text{ cm}^{-1} \cdot (\text{g/L})^{-1}$ の伸び率を使用し、試料における280 nmでの吸光度を測定することにより決定した。抗IFNの回収率は72%であった；溶出液における抗IFNの濃度は5.4 mg/mlであった。

CIE X精製工程上では、プロセス流体における高分子量のタンパク質の量(上述したSE-HPLC法を使用)は、14.5%から2%に低下した。

【0060】

実施例 5

ポロス50HSにおける抗第IX因子(抗-FIX)のCIE X

2.7 mg/mlのタンパク質濃度で、pH 5.5にて、リン酸ナトリウム緩衝液中に490 mlの抗-FIX(実施例3に記載したように調整されたpH及びマブセレクトSURカラムにおいて予め精製されたもの)を、5カラム容量(CV)の25 mMの酢酸ナトリウム、12.4 mMの酢酸、pH 5.0で予め平衡にされたポロス50HSカラム(45 mlの容量、高さ8.5 cm、直径2.6 cm)に充填した；流量は25 CV/hであった；充填容量は約43 mg/mlのマトリックス物質であった。

溶出前、カラムを、10 CVの25 mMの酢酸ナトリウム、12.4 mMの酢酸で洗浄した。

【0061】

25 mMの酢酸ナトリウム、10.1 mMの酢酸、300 mMのNaCl、pH 5.0からなる10 CV超の溶出バッファの線形勾配を使用し、溶出を実施した。抗FIX含有溶液を、先端のOD 0.20から後端のOD 0.4までを集めることによって達成した。

溶出プール及び充填溶液における抗体の濃度を、 $1.71 \text{ cm}^{-1} \cdot (\text{g/L})^{-1}$ の伸び率を使用し、試料における280 nmでの吸光度を測定することにより決定した。抗FIXの回収率は91%であった；溶出液における抗体の濃度は3.6 mg/mlであった。

【0062】

実施例 6

サルトバインドQシングルセプナノカプセルQ膜における抗第IX因子(抗-FIX)のフロースルーAIE X

伝導率15.7 mS/cmで、pH 5.1にて、酢酸ナトリウム溶液に含有される、実施例5に記載されたようにして予め精製された180 mlの抗-FIXを、0.5 Mのリン酸二ナトリウムを用いてpH 7.0に調節した(温度15.7)。水を用い、伝導率を7.00 mS/cmに調節した。伝導率の調節後、pHを7.03にした(温度20.1)。pH及び伝導率が調節された試料の容量は540 mlであり、抗体の濃度は1.15 mg/mlであった。

【0063】

500 mlの溶液を、15の膜容量(MV)の20 mMのリン酸ナトリウム、50 mMのNaCl、pH 7.0で予め平衡にされたシングルセプナノカプセルQ膜に通した；流量は10 MV/hであった。続いて、10 MVの20 mMのリン酸ナトリウム、50 mMのNaCl、pH 7.0で膜を洗浄した。

収集されたフロースループール及び充填溶液における抗体の濃度を、 $1.71 \text{ cm}^{-1} \cdot (\text{g/L})^{-1}$ の伸び率を使用し、試料における280 nmでの吸光度を測定することにより決定した。抗FIXの回収率は95%であり、溶出液における抗体の濃度は1.1

10

20

30

40

50

mg/mlであった。

【0064】

実施例7

バイオマックス30K限外濾過フィルターにおける抗インターフェロナルファ(抗-IFN)の限外濾過/ダイアフィルトレーション

約0.2MのNaCl、及びpH5.0の酢酸ナトリウムに5.7mg/mlの濃度で含有された520mlの抗-IFNを、34mMのヒスチジン、pH6.5で予め平衡にされたバイオマックス30KペリコンXLフィルターにおいて、45ml、及び51mg/mlの抗体濃度まで濃縮した。50mlの34mMヒスチジン、pH6.5を用いて6回、バイオマックス30KペリコンXLにおいて、濃縮試料をバッファー交換した。限外濾過及びダイアフィルトレーション後に、77%の抗体が回収された。

10

【0065】

14mlのバッファー交換された抗-IFN濃縮物を、最終濃度86mg/mlまでスクロース、最終濃度0.03%までトゥイーン80に添加した。最終的に、溶液を0.22µmフィルターを通して濾過した。

抗-IFNの濃度を、 $1.63\text{ cm}^{-1}(\text{g/L})^{-1}$ の伸び率を使用し、試料における280nmでの吸光度を測定することにより決定した。抗-FIXの回収率は95%であり、溶出液における抗体の濃度は1.1mg/mlであった。

【0066】

実施例8

冷たい部屋でのMabSelect SuReにおけるmAbの精製

抗体、抗-IL20を、捕捉用にMabSelect SuRe樹脂を使用して精製した。冷室温で実験を実施した。冷室温実験を、室温で実施した同様の実験と比較した。条件は以下の通りである：

CHO細胞培養からの細胞培養上清(2.6g/ml)を濾過し、カラムを10CVの11.5mmol/kgの NaH_2PO_4 +38.5mmol/kgの Na_2HPO_4 +300mMのNaCl、pH7.0で平衡にした後、MabSelect SuReカラムに充填した。5mlのカラムを流量20CV/hで操作し、カラムを10CVの平衡バッファー、続いて10CVの6.5mmol/kgの NaH_2PO_4 +43.5mmol/kgの Na_2HPO_4 +1000mMのNaCl、pH7.0、続いて10CVの平衡バッファーを用いて、溶出前に洗浄した。10mMのギ酸、pH3.5の溶出バッファーを使用し、溶出を実施し、溶出後、mAbを含有するプールを、0.2Mのクエン酸を用いてpH3.7に調節し、続いて0.5Mの Na_2HPO_4 を用いてpH5.0に調節した。プロテインA誘導体/アナログの漏出及び凝集のレベルを表4に示す。

30

【0067】

表4

	プロテインA誘導体/アナログ漏出 (ppm)	凝集物 (%)
MabSelect SuRe プール - 寒冷	0.3	0.86
MabSelect SuRe プール - 室温	3.4	1.68

40

結論：表2から、冷室温にて、プロテインA誘導体/アナログをベースにしたアフィニティーカラムにおいて抗体を精製することで、室温で同様の抗体を精製した場合と比較して、プロテインA誘導体/アナログの漏出(~10倍)及びプールにおけるHMWP(凝集)レベル(~2倍)がかなり低減することがわかった。

【0068】

実施例9

分析方法

50

プロテイン A HPLCによる抗体含有量の測定

抗体含有量をプロテイン A HPLC法を使用して測定した。免疫検出カートリッジプロテイン A カラム(直径 2.1 mm、長さ 3 mm)を使用し、試料を分析した。流量 1 ml / 分にて、25 mM のリン酸ナトリウム、0.5 M の NaCl、pH 7.5 を用いて 3 分、カラムを平衡にした。約 30 µg の抗体がカラムに充填された。平衡バッファーでカラムを洗浄し、最終的に、10 mM の HCOONa、pH 3.5 を含有するバッファーを用い、1 ml / 分で 2 分溶出させた。

抗体含有量を、公知の抗体濃度を有する参照試料を用い、溶出した主要ピーク下の面積を比較することにより測定した。

【0069】

モノマー IgG 含有量及び%高分子量タンパク質(HMW P)の測定

HPLCによる純度を、サイズ排除クロマトグラフィー(SE-HPLC法)を使用して測定する。TSK G3000SWXLカラム(直径 7.8 cm、長さ 30 mm)、定組成溶離(溶出バッファー、200 mM のリン酸ナトリウム、300 mM の NaCl、10% の 2-プロパノール、及び pH 6.9)及び後述する 280 nm での UV 検出を使用し、試料を分析する。この方法は、モノマー IgG 含有量(保持時間、約 9.5 分)、及びゲル樹脂によりサイズに応じて分離されるダイマー種又はより大きいものからなる、%HMW P(保持時間、7-8.5 分)を測定するために使用される。モノマー含有量及び%HMW Pを、本方法により検出される全タンパク質含有量に対して測定する。

【0070】

CHO 宿主細胞タンパク質の測定

CHO 宿主細胞タンパク質を 2 工程のサンドイッチ ELISA 法により測定する。測定は、マイクロタイタープレートに固定化されたポリクローナルウサギ HCP 抗体を用い、試料に存在する任意の宿主細胞タンパク質を捕捉することを含む。結合した HCP を、ビオチンとコンジュゲートしたポリクローナルウサギ HCP 抗体を続けて添加することで検出し、順に、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートしたアビジンにより検出する。発色基質 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)と共にインキュベートすることに基づき、定量を行う。マイクロタイタープレートを 450 nm で読み取る(参照波長は 620 nm)。

【0071】

プロテイン A 誘導体漏出の測定

プロテイン A 誘導体漏出を、商業的に入手可能なキットを使用し、2 工程のサンドイッチ ELISA 法により測定する。生成物におけるプロテイン A 誘導体の測定は、マイクロタイタープレートに固定化されたポリクローナルチキン抗-プロテイン A 抗体を用い、試料に存在するプロテイン A 誘導体を捕捉することを含む。プロテイン A 誘導体を、ビオチンとコンジュゲートしたポリクローナルウサギ抗-プロテイン抗体を続けて添加することで検出し、順に、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートしたアビジンにより検出する。発色基質 TMB と共にインキュベートすることに基づき、定量を行う。マイクロタイタープレートを 450 nm で読み取る(参照波長は 620 nm)。

【0072】

実施例 10

4 でのポロス 50HS における抗体(抗-KIR)の CIE X

クロマトグラフィーシステム(アクタ・イクスプローラー(Akta Explorer) 100)及び溶媒を、4 に設定された冷蔵庫に配した。

6.2 mg / mL の濃度で、20.3 mL の抗体(例えば、W02005003168、W02005003172 又は W02006003179 に記載されたような抗-KIR)を、10 カラム容量(CV)の 25 mM の酢酸ナトリウム、12.4 mM の酢酸、pH 5.0 で予め平衡にされたポロス 50HS カラム(3.1 mL の容量、直径 1 cm、長さ 4 cm)に充填した；流量は 25 CV / h であった。

溶出前、カラムを、10 CV の 25 mM の酢酸ナトリウム、12.4 mM の酢酸で洗浄

10

20

30

40

50

した。

【0073】

25 mMの酢酸ナトリウム、10.1 mMの酢酸、300 mMのNaCl、pH 5.0からなる10 CV超の溶出バッファの線形勾配を使用し、溶出を実施した。抗体(抗KIR)含有溶液を、先端のOD 1.0から後端のOD 1.0までを集めることによって達成した。カラムを、5 CVの1 M NaOH、続いて5 CVの2 M NaCl、50 mMの酢酸、及び10 CVの25 mMの酢酸ナトリウム、12.4 mMの酢酸、pH 5.0で再生させた。

溶出プールにおける抗体の濃度をクロマトグラムから測定した(280 nmでの吸光度、伸び率 = $1.49 (g/L) \cdot cm^{-1}$)。充填溶液における濃度に基づいた抗体の回収率は97%であった；溶出液における抗体の濃度は3.7 mg/mlであった。

CIE X精製工程上では、プロセス流体におけるHCP(宿主細胞タンパク質)の量は、因子3に低下した。室温(20)での参照実験(厳密には同様の方法及び出発物質)の収率は92%であった。低温でのCIE Xでは、好ましくは室温で不安定な抗体に使用することができた。

【0074】

実施例 1 1

非常に高充填でのポロス50HSにおける抗-IL20のCIE X(フロースルー方式)

クロマトグラフィシステム(アクタ・イクスプローラー100)及び溶媒を、20 に配した。10 mg/mlの濃度で、215 mLの抗体(例えば、WO9927103に記載されたような抗-IL20)を、10カラム容量(CV)の25 mMの酢酸ナトリウム、12.4 mMの酢酸、pH 5.0で予め平衡にされたポロス50HSカラム(3.1 mLの容量)に充填した；流量は25 CV/hであった。充填後、カラムを5 CVの25 mMの酢酸ナトリウム、12.4 mMの酢酸で洗浄した。

【0075】

収集したフロースループールにおける抗体の濃度をクロマトグラムから測定した(280 nmでの吸光度、伸び率 = $1.52 (g/L) \cdot cm^{-1}$)。充填溶液における濃度に基づいた抗体の回収率は91%であった；収集されたプールにおける抗体の濃度は9 mg/mlであった。CIE X精製工程上では、プロセス流体におけるHCP(宿主細胞タンパク質)の量は、因子7に低下した。不純物の最大低下を得るために、クロマトグラフィプロセスのためのpH調節は、pH 4.5-6.0の範囲であることが必要である。

収集されたプールは、実施例6に記載したように、フロースルーAIE Xを通した流れにおいて、さらに処理することができる。

【0076】

実施例 1 2

Mab Select Sureにおける抗-IFNaの捕捉

CHO細胞培養からの細胞培養上清を、濾過により粗く精製した(クラリガード(Clarigard) 3.0 μm、ポリセプ(Polysep) 1/0.5 μm、デュラポア(Durapore) 0.22 μm)。細胞により生成された抗体の力価は3.4 mg/mlであった。

モノクローナル抗体のpIは7.7であった。Mab Select Sureカラム(1000 ml容量、高さ13 cm、直径10 cm)を、5カラム容量(CV)の20 mMのホスファート(Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4)、150 mMのNaCl、pH 7.2を用いて、予め平衡にしておいた；流量は24 CV/hであった。カラムに、流量18 CV/hで操作される、10750 mlの濾過された細胞培養上清を充填した；充填容量は約36 mg/mlのマトリックス物質であった。

【0077】

溶出前、カラムを、4 CVの20 mMのホスファート(Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4)、150 mMのNaCl、pH 7.2で洗浄した。6 CV/hの流量で、10 mMのギ酸、pH 3.5からなる10 CVの溶出バッファを使用し、溶出を実施した。溶出の直後、抗体プールを含有する溶出液の画分を、0.2 Mのクエン酸溶液を使用してpH 4

10

20

30

40

50

・0 (伝導率 0.12 mS/cm) ~ pH 3.7 に調節し、pH 3.7 で1時間、室温で保持した。次に、 0.5 M の Na_2HPO_4 を使用し、溶液を pH 6.1 に調節した。ついで、保管する前に、物質を濾過した ($0.8 + 0.45 \mu\text{m}$ 、サルトポア 2300、 0.03 m^2)。

この工程からの抗体収率は 62% であり、溶出液中の抗体濃度は 9.1 mg/ml であった。

【0078】

実施例 13

Mab Select SuRe における抗体抗-IL20 の捕捉

一時的に形質移入された培養からの細胞培養上清を、濾過により粗く精製した。モノクローナル抗体の pI は 7.1 であった。Mab Select SuRe カラム (1 ml 容量、高さ 2.5 cm 、直径 0.7 cm) を、10 カラム容量 (CV) の 20 mM のホスファート ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$)、 150 mM の NaCl 、pH 7.2 を用いて、予め平衡にしておいた：流量は 60 CV/h であった。カラムに、流量 $30-60 \text{ CV/h}$ で操作される、 500 ml の濾過された細胞培養上清を充填した。

【0079】

溶出前、カラムを、 25 CV の 20 mM のホスファート ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$)、 150 mM の NaCl 、pH 7.2 で洗浄した。 20 CV の溶出バッファーを使用し、 $0-100\%$ の線形勾配において、溶出を実施した。試験した溶出バッファーは、(1) 10 mM のクエン酸、pH 3.0、(2) 0.1 M のグリシン、pH 3.0、又は (3) 10 mM のギ酸、pH 3.5 からなる。溶出を 60 CV/h の流量で実施した。カラムを付加的な 10 CV の溶出バッファー ((1) 10 mM のクエン酸、pH 3.0、(2) 0.1 M のグリシン、pH 3.0、又は (3) 10 mM のギ酸、pH 3.5)、ついで 5 CV の 0.1 M の NaOH で再生させた。カラムを、 10 CV の 20 mM のホスファート ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$)、 150 mM の NaCl 、pH 7.2 を用いて、再度平衡にした。収率は $85-90\%$ の範囲であった。

【0080】

実施例 14

Fab₂ 精製プロセス

CHO 細胞培養からの抗-KIR の Fab₂ 断片の精製プロセスは、以下の工程からなる：親和性捕捉、ウイルス不活化 / 切断 (ペプシン処理)、及びカチオン交換クロマトグラフィー。精製は以下に記載するようにして実施した。

【0081】

全体的なプロセス：

CHO 細胞培養からの細胞培養上清を濾過し、 500 ml の Mab Select SuRe アフィニティーカラム (溶媒及び条件に応じて、以下参照) に充填した。 60 mM のクエン酸ナトリウム、pH 4.0 の溶出バッファーを用いて、溶出を実施し、溶出後、mAb プールを、 0.5 M の HCl を用いて pH 3.75 に調節した。 10 mg のペプシン / g mAb を添加し、 37°C で 3 ~ 6 時間インキュベートした。続いて、 0.5 M の冷 NaOH を添加することにより、プールを pH 7.0 に調節し、4 時間で少なくとも 8 時間インキュベートした。インキュベート後、プールの pH を 5.0 に調節した。さらに、 H_2O を用いて、伝導率が 2 mS/cm 以下になるまでプールを希釈し、ファインライン (FineLINE) 100 カラムにおいて、 500 ml のソース (SOURCE) 30 S に充填した。 20 mM の NaOAc 、pH 5.0 バッファーにおいて、 20 CV 超の $0-0.2 \text{ M}$ の NaCl の線形勾配を用い、溶出を実施した。

【0082】

溶媒及び条件：

アフィニティークロマトグラフィー：

充填：細胞上清を $0.45 \mu\text{m}$ フィルターを通して濾過する

pH 及び伝導率の測定

10

20

30

40

50

カラム物質：M a b S e l e c t S u R e、5 0 0 m l のカラム X K 5 0
 バッファー A：2 0 m M のリン酸ナトリウム、p H 7 . 2 + 1 5 0 m M の N a C l
 バッファー B：6 0 m M のクエン酸ナトリウム、p H 4 . 0
 バッファー D：0 . 1 M の N a O H
 サイクル：3 C V のバッファー B を用いて再生
 1 0 C V のバッファー A を用いて平衡化
 1 0 C V のバッファー A を用いて洗浄(広範囲の洗浄により、ある程度の内毒
 素が除去されるであろう)
 1 5 C V のバッファー B を用いて段階溶出
 5 C V のバッファー D を用いて C I P
 バッファー A を用いて再平衡化

10

流量：3 0 - 1 8 0 C V / h

クロマトグラフィーの温度：室温

【 0 0 8 3 】

切断(ペプシン処理)

Sigma-Aldrich からの、3 2 0 0 - 4 5 0 0 単位 / m g タンパク質量で、ブタの胃粘膜を凍結乾燥させたパウダーのペプシンを、切断に使用した。

ペプシン保存溶液の調製：1 0 m g / m l の濃度で、H₂O にペプシンを溶解。

ペプシン溶液の保管を - 2 0 で実施。

m A b 試料：0 . 5 M の冷 H C l を用いて、アフィニティー工程からのプールを、p H 3 . 7 5 に調節。

20

ペプシン処理：試料に 1 0 m g ペプシン / g m A b を添加し、混合し、3 7 で 3 ~ 6 時間インキュベート。S E C - H P L C により反応をコントロール。0 . 5 M の冷 N a O H を p H 7 . 0 まで添加して反応を停止させ、続いて 4 で少なくとも 8 時間(一晚)インキュベート。

【 0 0 8 4 】

カチオン交換クロマトグラフィー

充填溶液の調製：ペプシン処理工程から得られた溶液を、伝導率が 2 m S / c m 以下になるまで、H₂O で希釈する。ついで、p H を 5 に調節する。

カラム物質：ソース 3 0 S、カラムサイズ 5 0 0 m l

30

限界容量：少なくとも 1 0 m g / m l カラム物質

バッファー A：2 0 m M の N a O A c、p H 5 . 0

バッファー B：2 0 m M の N a O A c、p H 5 . 0 + 1 . 0 M の N a C l

保存溶液 1：1 0 0 m M の E D T A + 1 0 0 m M のベンズアミジン H C l

サイクル：1 0 C V のバッファー A を用いて平衡化

試料の充填

1 0 C V のバッファー A を用いて洗浄

塩勾配を用いた第 1 溶出；0 - 2 0 % のバッファー B、2 0 C V 超

5 C V の 1 0 0 % バッファー B を用いて最終溶出

1 M の N a O H を用いて再生

40

流量：画分の収集中、1 0 0 m l / 分

クロマトグラフィーの温度：室温

【 0 0 8 5 】

実施例 1 5

マウス抗 - C 5 a R 及びヒト化抗 - C 5 a R のアフィニティークロマトグラフィー精製

C H O 細胞培養からの m A b のアフィニティー精製を次のようにして実施した。C H O 細胞培養からの細胞培養上清を濾過し、1 m l の M a b S e l e c t S u R e アフィニティークラム(溶媒及び条件に応じて、以下参照)に充填した。1 0 m M のギ酸、p H 3 . 0 又は 1 0 m M のクエン酸、p H 3 . 0 の溶出バッファーを用いて、溶出を実施し；溶出後、m A b プールを、0 . 5 M の N a H₂P O₄、p H 7 . 6 に調節した。

50

【 0 0 8 6 】

溶媒及び条件：

カラム物質：M a b S e l e c t S u R e (GE HealthCare cat no 17-5438-01)、1 m l
のカラム、高さ5 c m x 直径0 . 5 c m

バッファーA：2 0 m Mのリン酸ナトリウム、p H 7 . 2 + 1 5 0 m MのN a C l

バッファーB 1：5 m Mのクエン酸水素二ナトリウム、p H 3

バッファーB 2：1 0 m Mのギ酸ナトリウム、p H 3

バッファーD：0 . 1 MのN a O H

バッファーE：0 . 5 MのN a H ₂ P O ₄、p H 7 . 6

サイクル：3 C VのバッファーB 1又はB 2を用いて再生

1 0 C VのバッファーAを用いて平衡化

試料の充填

1 0 C VのバッファーAを用いて洗浄

1 5 C VのバッファーB 1又はB 2を用いて段階溶出

5 C VのバッファーDを用いてC I P

バッファーAを用いて再平衡化

画分の収集：生成物の画分をプールし、バッファーEを用いてp Hを7 . 2に調節。

流量：3 0 - 1 8 0 C V / h

クロマトグラフィーの温度：室温

分析方法の記載は実施例9に付与する。

【 0 0 8 7 】

実施例16

製剤

実施例1に記載したU F / D F工程を、バッファーを以下の溶液に交換することにより、抗-K I Rについて適用した。

・5 0 m Mのホスファート、2 5 0 m Mのスクロース、0 . 0 0 1 %のトウイーン8 0、
p H 7

・2 0 m Mのホスファート、2 2 0 m Mのスクロース、0 . 0 0 1 %のトウイーン8 0、
p H 7

抗体の最終濃度は、双方の溶液において1 0 m g / m lであった。

【 0 0 8 8 】

実施例17

非常に高充填(フロースルー方式)でのC I E X、続くフロースルーA I E X

クロマトグラフィーシステム(アクタ・イクスプローラー1 0 0)及び溶媒を、2 0 に配した。

5 . 2 m g / m Lの濃度で、4 7 8 m Lの抗体(抗-N K G 2 A)溶液(アフィニティークロマトグラフィー捕捉)を、1 0カラム容量(C V)の2 5 m Mの酢酸ナトリウム、1 2 . 4 m Mの酢酸、p H 5 . 0で予め平衡にされたボロス5 0 H Sカラム(3 . 1 m Lの容量)に、2 5 C V / hの流量を使用して充填した。

充填手順中に、フロースルー画分に抗体を収集した。収集したフロースループールにおける抗体の濃度を吸光度により測定した(2 8 0 n m、伸び率 = 1 . 5 8 (g / L) - 1 . c m - 1)。フロースルー画分における抗体の回収率は9 2 %であった。この画分におけるH C P(宿主細胞タンパク質)及びH M W P(凝集体)は、それぞれ因子1 0及び3まで低下した。同様に、捕捉工程からのプロテインA誘導体の漏出もかなり低下した。抗体は樹脂に対して非常に高充填されているため、結合したモノマーは、充填中にH M W P及びH C P(宿主細胞タンパク質)に置き換えられた。不純物の最大低下を得るために、クロマトグラフィープロセスのためのp H調節は、p H 4 . 5 - 6 . 0の範囲であることが必要である。同様に、伝導率は0 - 1 0 0 m MのN a C lの範囲で最適化され得る。試料溶液及びフロースルー画分におけるH C P及びH M W Pのレベルを表5に示す。

10

20

30

40

表 5

-	体積	濃度	収率	単量体	HMWP	HCP	
-	[ml]	[mg/ml]	[%]	[%]	[%]	(ng/ml)	ppm
試料溶液	477.8	5.2	-	98.12	1.88	3060	587.3
フロースルー画分	477.8	4.8	92.1	99.25	0.75	321	66.9

【 0 0 8 9 】

収集した C I E X フロースループールを、0.5 M のリン酸水素二ナトリウムを用いて pH 7.0 に調節した。伝導率を、水を用いて 7.0 mS/cm に調節した。充填溶液の容量は 825 mL であり、抗体の濃度は 2.7 mg/mL であった。溶液を、35 の膜容量 (MV) の 20 mM のリン酸ナトリウム、50 mM の NaCl、pH 7.0、流量 300 MV/h で予め平衡にされたサルトバインド Q-MA75 (膜容量 2.1 mL) に通した。続いて、20 MV の 20 mM のリン酸ナトリウム、50 mM の NaCl、pH 7.0 で膜を洗浄した。

10

【 0 0 9 0 】

抗体をフロースループールに収集した。プールにおける抗体の濃度は 24.8 mg/mL に測定された。工程収率は 99% 超であり、HCPCHOP の低下因子は 3 であった。試料溶液及びフロースルー画分における HCP 及び HMWP のレベルを表 6 に示す。

表 6

20

-	体積	濃度	収率	単量体	HMWP	HCP	
-	[ml]	[mg/ml]	[%]	[%]	[%]	(ng/ml)	ppm
試料溶液	825.0	2.7	-	99.25	0.75	321	119.3
フロースルー画分	830.3	2.66	99.5	99.24	0.76	99.3	37.3

【 0 0 9 1 】

実施例 18

2 工程アプローチを使用する抗-NKG2D の精製

CHO 細胞培養からの細胞培養上清 (3.5 g/L) を濾過し、106 mL のプロテイン A 誘導体 (Mab Select Sure) アフィニティーカラム (長さ 11 cm) (溶媒及び条件に応じて、実施例 1 を参照) に充填した。全ての工程を室温で実施した。10 mM のギ酸、pH 3.5 の溶出バッファーを使用し、溶出を実施した。溶出した生成物のプールを、0.2 M のクエン酸を用い、pH を pH 3.6 に調節することにより、ウイルス不活化にかけ、1 時間、室温で保持した。続いて、0.5 M の Na₂HPO₄ を用いて溶出液を pH 7.0 に調節し、沈殿物を除去した。サルトバインド Q シングルセブカプセル (75 m²) アニオン交換膜に充填する前に、室温で、溶液を 7.0 mS/cm (水又は NaCl) に調節した。さらにアニオン交換樹脂を使用してもよい。アニオン交換膜工程を、非結合条件下で、フロースルー方式で実施し、最後に、10 mM のヒスチジンバッファー、pH 6.2 にて、続いて 0.01% までツイーン 80 を添加することにより、アクタクロスフロー装置において、50 cm² のバイオマックス 30k 膜を用い、濾液を限外濾過又はダイアフィルトレーションした。ウイルス濾過をアニオン交換工程の後に追加することができる。製剤原料処方物の最終組成は、50 mg/mL の mAb、80 g/L のスクロース、0.03% w/w のツイーン 80、10 mM のヒスチジン、pH 6.2 であった。精製の結果を表 7 に付与する。最も高い可能性のある収率を有する、不純物の最大低下が達成されるように、伝導率、及び Q 膜工程の pH、及び膜を通過する充填溶液は、各 mAb に対して調節される。よって、伝導率及び pH は、それぞれ 2-12 mS/cm (NaCl 含有量によりコントロール) 及び pH 5.8-8.0 の範囲で変えてよい。

30

40

表 7

抗NKG 2 Dの2工程プロセスのまとめ

プロセス工程	pH	伝導率 (ms/cm)	含有量 mg/ml	収率 (%)	HMWP (%)	HCP (ppm)
細胞培養	7.0	-	3.5	-	-	-
親和性プール	-	-	10.6	96	1.6	592
Q膜プール	7.0	7.1	9.0	86	1.5	120
UF/DF濾液	6.2	-	55.7	95	1.5	105

分析方法の説明は実施例 9 において行う。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/055900

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/06		
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) C07K		
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, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	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	1, 2, 18, 19, 21, 22
X	WO 2005/016968 A (GENENTECH INC [US]; FAHRNER ROBERT L [US]; LAVERDIERE AMY [US]; MCDONA) 24 February 2005 (2005-02-24) the whole document	1, 3, 18-22
----- -/--		
<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 *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 18 November 2009		Date of mailing of the international search report 02/12/2009
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 Heder, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/055900

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	KELLEY BRIAN D ET AL: "Weak partitioning chromatography for anion exchange purification of monoclonal antibodies." BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 15 OCT 2008, vol. 101, no. 3, 15 October 2008 (2008-10-15), pages 553-566, XP002545519 ISSN: 1097-0290 -----	
X	TUGCU NIHAL ET AL: "Maximizing productivity of chromatography steps for purification of monoclonal antibodies." BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 15 FEB 2008, vol. 99, no. 3, 15 February 2008 (2008-02-15), pages 599-613, XP002556043 ISSN: 1097-0290 -----	18-22
Y	the whole document -----	4-17
Y	WO 2004/076485 A (LONZA BIOLOGICS PLC [GB]; BONNERJEA JULIAN [GB]; PRENETA ANNA [GB]) 10 September 2004 (2004-09-10) the whole document -----	4-22
Y	LUTE SCOTT ET AL: "Characterization of coliphage PR772 and evaluation of its use for virus filter performance testing." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY AUG 2004, vol. 70, no. 8, August 2004 (2004-08), pages 4864-4871, XP002556044 ISSN: 0099-2240 the whole document -----	4-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

international application No.
PCT/EP2009/055900

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2009 /055900

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-3 (entirely), 18-22 (partially)

Method for purifying antibody (Ab) compound involving Protein A, and uses

Technical problem:

Provision of an Ab purification method by Protein A affinity chromatography

Invention 2: claims 4-17 (entirely), 18-22 (partially)

Method for purifying antibody (Ab) compound by affinity chromatography, followed by cation chromatography, and uses

Technical problem:

Provision of an Ab purification method by affinity chromatography followed by cation chromatography

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/055900

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005016968 A	24-02-2005	AU 2004265253 A1	24-02-2005
		CA 2531595 A1	24-02-2005
		EP 1648940 A2	26-04-2006
		JP 2007526897 T	20-09-2007

WO 2004076485 A	10-09-2004	AU 2004215653 A1	10-09-2004
		CA 2516518 A1	10-09-2004
		DK 1601697 T3	01-10-2007
		EP 1601697 A1	07-12-2005
		PT 1601697 E	04-09-2007

フロントページの続き

(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, 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, 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, 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

(72)発明者 クリステンセン, ハンネ
デンマーク国 ディーケー - 2000 フレデリックスベリ, 3. ティーヴィ., エー. デイ
. ヨルゲンセンズ ヴェイ 19

(72)発明者 ラスムセン, ダニエル イー.
デンマーク国 ディーケー - 2100 コペンハーゲン エー, 3., ヘデマンスギャーゼ
6

(72)発明者 ハンセン, トーマス ブッデ
デンマーク国 ディーケー - 2200 コペンハーゲン エヌ, エギルスギャーゼ 70 2.
ティヴィ.

(72)発明者 ニールセン, ジョン ストリカート
デンマーク国 ディーケー - 2791 ドラオール, ディー ビー デイルシュセンズ アレ
2

(72)発明者 ハルキヤール, エリック
デンマーク国 ディーケー - 2700 プロンショイ, プラステゴールズ アレ 49

(72)発明者 ニールセン, リkke クリスティナ
デンマーク国 ディーケー - 2000 フレデリックスベリ, 1. レイル. 1, ボーメスタ
ー フィッシャーズ ヴェイ 5エー

(72)発明者 イエスパースガールド, クリスティーナ
デンマーク国 ディーケー - 1709 コペンハーゲン ヴィ, ティーエイチ, スキデバネギ
ャーゼ 40 2

(72)発明者 スタビー, アルネ
デンマーク国 ディーケー - 2880 バックスヴァエルド, グンナルスヴェイ 17

Fターム(参考) 4D006 GA06 GA07 HA41 KA01 KA52 KA55 KA57 KA72 KB13 KB14
KB30 MA03 PA01 PB15 PB20 PB55 PC80
4H045 AA11 AA20 CA40 DA75 GA23 GA26