

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5666447号  
(P5666447)

(45) 発行日 平成27年2月12日(2015.2.12)

(24) 登録日 平成26年12月19日(2014.12.19)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 1/14	(2006.01)	C07K 1/14
C07K 1/34	(2006.01)	C07K 1/34
C07K 1/36	(2006.01)	C07K 1/36
C07K 1/22	(2006.01)	C07K 1/22

請求項の数 25 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2011-522953 (P2011-522953)
(86) (22) 出願日	平成20年8月14日 (2008.8.14)
(65) 公表番号	特表2011-530592 (P2011-530592A)
(43) 公表日	平成23年12月22日 (2011.12.22)
(86) 國際出願番号	PCT/US2008/073179
(87) 國際公開番号	W02010/019148
(87) 國際公開日	平成22年2月18日 (2010.2.18)
審査請求日	平成23年8月12日 (2011.8.12)

(73) 特許権者	509012625 ジェネンテック, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(72) 発明者	ブラウン, アリック アメリカ合衆国 カリフォルニア 94044, パシフィカ, モアナ ウエイ 421

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】常在性タンパク質置換イオン交換メンブレンクロマトグラフィを用いた混入物除去方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

抗体と少なくともチャイニーズハムスター卵巣タンパク質(CHOP)とを含む組成物からの少なくともCHOPを除去して抗体を精製する方法であって、

(a) 0.1~100  $\mu$ mの孔径を有するイオン交換メンブレンに組成物を通し、このとき抗体とメンブレンは反対の電荷を有しており、抗体の電荷を高めるために抗体のpIとは十分に異なるpHと、バッファイオンによる電荷の遮蔽を妨げるために有効な低イオン強度と40mS/cm以下の伝導率とを有するバッファからなる操作条件で行い、これによつて抗体と少なくともCHOPへのメンブレンの結合が引き起こされる、工程と、

(b) 破過容量を超えたメンブレンのフィードストリーム負荷により得られる流出物から精製された抗体を回収する工程、

である、逐次的な工程を含む方法。

## 【請求項 2】

前記イオン交換メンブレンが陽イオン交換メンブレンであり、前記工程(a)のバッファが抗体のpIの1から5pH単位低いpHを有する、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

pHが、抗体のpIの1から4pH単位低い、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 4】

pHが、抗体のpIの1から3pH単位低い、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 5】

10

20

pHが、抗体のpIの1から2pH単位低い、請求項2に記載の方法。

【請求項6】

伝導率が20mS/cm以下である、請求項2に記載の方法。

【請求項7】

伝導率が10mS/cm以下である、請求項2に記載の方法。

【請求項8】

前記イオン交換メンブレンが陰イオン交換メンブレンであり、前記工程(a)のバッファが抗体のpIの1から5pH単位上回るpHを有する、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

pHが抗体のpIを1から4pH単位上回る、請求項8に記載の方法。

10

【請求項10】

pHが抗体のpIを1から3pH単位上回る、請求項8に記載の方法。

【請求項11】

pHが抗体のpIを1から2pH単位上回る、請求項8に記載の方法。

【請求項12】

伝導率が20mS/cm以下である、請求項8に記載の方法。

【請求項13】

伝導率が10mS/cm以下である、請求項8に記載の方法。

【請求項14】

メンブレンが混合様式の吸着体である、請求項1から13の何れか一に記載の方法。

20

【請求項15】

抗体がCH2/CH3領域を含む、請求項1から14の何れか一に記載の方法。

【請求項16】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

(a)から(b)の工程の前、最中又は後に、抗体を含む組成物に一又は複数の更なる精製工程を施すことを更に含み、この精製工程がプロテインA親和性クロマトグラフィである、請求項1から16の何れか一に記載の方法。

【請求項18】

(a)から(b)の工程の前、最中又は後に、抗体を含む組成物に一又は複数の更なる精製工程を施すことを更に含み、この精製工程がイオン交換クロマトグラフィである、請求項1から16の何れか一に記載の方法。

30

【請求項19】

抗体を含む組成物に、(a)から(b)の工程の間に連続的に実施する一又は複数の更なる精製工程を施すことを更に含み、この精製工程がイオン交換クロマトグラフィである、請求項1から16の何れか一に記載の方法。

【請求項20】

精製した抗体を薬学的に許容可能な担体と組み合わせることによって薬学的組成物を調整することを更に含む、請求項1から19に記載の方法。

40

【請求項21】

抗体が、HER2抗体、EGFR抗体、CD20抗体、CD22抗体、VEGF抗体、VEGFレセプター抗体、IgE抗体、APO-2レセプター抗体及びTNF-抗体からなる群から選択される、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片である、請求項1から20の何れか一に記載の方法。

【請求項22】

抗体が、トラスツズマブ及びパーツズマブからなる群から選択されるHER2抗体である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

抗体がCD20抗体リツキシマブである、請求項21に記載の方法。

【請求項24】

50

抗体が V E G F 抗体ベバシズマブである、請求項 2\_1 に記載の方法。

【請求項 2\_5】

抗体が I g E 抗体オマリズマブである、請求項 2\_1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は概して、タンパク質精製に関する。特に、本発明は、常在性タンパク質置換イオン交換メンブレンクロマトグラフィを用いた混入物を除去するための方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

タンパク質の大規模で経済的な精製は、バイオテクノロジー産業にとってますます重要な問題となっている。一般に、タンパク質は、そのタンパク質の遺伝子を含む組換え型プラスミドの挿入により対象となるタンパク質を産生するように操作された真核細胞又は原核細胞株を用いて、細胞培養によって産生される。典型的に使用される細胞株は生きている生物体であるので、それには、通常は動物の血清の調製物から供給される増殖因子、アミノ酸、糖を含む複合増殖培地を与えなければならない。細胞に与えた化合物の混合物から、また細胞自体の副生成物から所望のタンパク質を、ヒトの治療用として使うために十分な純度で分離することは、大変な挑戦である。

細胞片からタンパク質を精製する手順は、最初はタンパク質の発現部位に依存する。細胞から周囲の増殖培地中へ直接分泌せしめられるタンパク質があり；細胞内で生産されるタンパク質もある。後者のタンパク質の場合、精製プロセスの最初の工程は、機械的剪断、浸透圧ショック、あるいは酵素処理を含む様々な方法により行うことができる細胞の溶解を含む。このような破壊は、細胞の全内容物をホモジネート中へ放出し、加えて、その微小なサイズのために取り除くことが難しい細胞内断片を作り出す。これらは一般に分画遠心法又は濾過法で取り除かれる。小規模ではあるが、細胞の自然死やタンパク質生工程の過程での細胞内宿主細胞タンパク質の放出のために直接分泌されるタンパク質の場合にも同じ問題が生じる。

【0 0 0 3】

対象タンパク質を含む精製液が一旦得られれば、細胞によって産生される他のタンパク質からの分離は、通常、異なるクロマトグラフィー法の組合せを用いて試みられる。これらの技術は、その電荷、疎水性の程度、又は大きさに基づいてタンパク質混合物を分離する。幾つかの異なるクロマトグラフィー用樹脂を、これらのそれぞれの技術に使用することができ、関与する特定のタンパク質にこれらの分離スキームを正確に適合化することが可能である。これらそれぞれの分離法の本質は、タンパク質を、異なる速度で長いカラムを流下させ、それらがカラムを更に流下するにつれて増加する物理的分離を達成するか、又は、分離媒体に選択的に付着するようにし、ついで異なる溶媒によって差次的に溶出させるかのいずれかである。場合によっては、不純物が特異的にカラムに付着し、対象のタンパク質が付着しない場合、つまり、対象のタンパク質が「フロースルー」中に存在する場合に、所望のタンパク質が不純物から分離される。

【0 0 0 4】

タンパク質精製に関する出版物には、Fahrner et al., Biotechnol Genet Eng Rev. 2001;18:301-27が含まれる。

典型的な大規模精製工程は、一次キャプチャとして固定したプロテイン A と、他のカラム操作と組み合わせた精製工程を用いることを中心に構築されていることが多い。プロテイン A カラム操作は、通常は、フロースルー分画において流されるほとんどの工程不純物を含んだ 98 % 以上の生成物純度を供給する。このため、続く工程の操作ユニットは、生成物の異性体を分離し、宿主細胞タンパク質 / DNA、浸出したプロテイン A およびウイルスの残りの量を除去するための、濃縮工程、精製工程、又は研磨工程であると考えられる。

【発明の概要】

10

20

30

40

50

## 【0005】

本明細書中の発明は、ポリペプチドと少なくとも一の混入物とを含む組成物からのポリペプチドの精製方法であって、(a)イオン交換メンブレンに組成物を通す、このときポリペプチドとメンブレンは反対の荷電を有しており、ポリペプチドの荷電を高めるためにポリペプチドのpIとは十分に異なるpHと、バッファイオンによる荷電の遮蔽を妨げるために有効な低イオン強度とを有するバッファからなる操作条件で行い、これによってポリペプチドと少なくとも一の混入物へのメンブレンの結合が引き起こされる、そして(b)流出物から精製されたポリペプチドを回収する、といった逐次的な工程を含む方法に関する。

あるいは、本発明は、ポリペプチドと少なくとも一の混入物とを含む組成物からのポリペプチドの精製方法であって、(a)陽イオン交換メンブレンに組成物を通す、このときポリペプチドとメンブレンは反対荷電を有しており、ポリペプチドのpIよりおよそ1からおよそ5pH単位低いpHと、およそ40mS/cm以下の伝導率とを有するバッファからなる操作条件で行い、これによってポリペプチドと少なくとも一の混入物へのメンブレンの結合が引き起こされる、そして(b)流出物から精製されたポリペプチドを回収する、といった逐次的な工程を含む方法に関する。

あるいは、本発明は、ポリペプチドと少なくとも一の混入物とを含む組成物からのポリペプチドの精製方法であって、(a)陰イオン交換メンブレンに組成物を通す、このときポリペプチドとメンブレンは反対荷電を有しており、ポリペプチドのpIよりおよそ1からおよそ5pH単位高いpHと、およそ40mS/cm以下の伝導率とを有するバッファからなる操作条件で行い、これによってポリペプチドと少なくとも一の混入物へのメンブレンの結合が引き起こされる、そして(b)流出物から精製されたポリペプチドを回収する、といった逐次的な工程を含む方法に関する。

## 【0006】

一態様では、混入物は、チャイニーズハムスター卵巣タンパク質(CHOP)である。他の態様では、ポリペプチドはCH2/CH3領域を含む。さらに別の態様では、ポリペプチドは抗体である。さらに他の態様では、抗体はモノクローナル抗体である。

他の態様では、前記方法は、aからbの工程の前、最中又は後に、ポリペプチドを含む組成物に一又は複数の更なる精製工程を施すことを更に含み、この精製工程は、結合/溶出、フロースルー又は常在性タンパク質置換の様式で動作される、場合によってプロテインA親和性クロマトグラフィ、場合によってイオン交換クロマトグラフィである。

さらに、本発明は、精製されたポリペプチドを薬学的に許容可能な担体と組み合わせることによる、医薬組成物の調製を提供する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0007】

【図1】pH 5.5、6.0mS/cm、Mustang<sup>TM</sup>S(小規模、0.18mL/MV、667MV/時間)のmA b 1陰イオン交換プールのCHOPクリアランス。

【図2】pH 5.5および6.4mS/cmと、pH 8.0および5.0mS/cmの、Mustang<sup>TM</sup>S(小規模、0.18mL/MV、667MV/時間)のmA b 2陰イオン交換プールのCHOPクリアランス。

【図3】pH 5.5および6.4mS/cmと、pH 8.0および5.0mS/cmの、Mustang<sup>TM</sup>S(小規模、0.18mL/MV、667MV/時間)のmA b 2陰イオン交換プールの収率。

【図4】pH 5.5、3.2mS/cm、Mustang<sup>TM</sup>S(小規模、0.18mL/MV、1333MV/時間)のmA b 1プロテインAプールのCHOPクリアランス。

【図5】pH 8.0、Mustang<sup>TM</sup>Q(小規模、0.35mL/MV、600MV/時間)のmA b 3のCHOP(棒グラフ)および抗体結合能(線グラフ)。

【図6】pH 8.0、Mustang<sup>TM</sup>Q(小規模、0.35mL/MV、600MV/時間)のmA b 3陽イオン交換プールの収率。

【図7】pH 8.0および4.0mS/cm、Mustang<sup>TM</sup>Q(小規模、0.18

10

20

30

40

50

mL MV、1333MV/時間)、その後pH 5.5および6.1mS/cm、Mustang<sup>TM</sup>S(小規模、0.18mL MV、1333MV/時間)でのmAb 4のCHOPレベル。

【図8】100cm/時間のフロースルーモードで実行したQセファロースファストフローカラムによりpH 8.0および4.7mS/cm(ストライプ)、その後更に、およそpH 5.5および6mS/cm(小規模、0.18mL MV、538MV/時間)のバッチ様式(菱形)および連続様式(灰色)のMustang<sup>TM</sup>Sによって更に精製したmAb 1のCHOPクリアランス。

【図9】pH 5.5および6mS/cm、Sartobind<sup>TM</sup>S(小規模、0.14mL MV、857MV/時間)でのmAb 1のCHOPクリアランス。 10

【図10】pH 5.5および6mS/cm、Mustang<sup>TM</sup>S(小規模、0.18mL MV)でのmAb 1のCHOPクリアランス。

【図11】pH 5.5および6mS/cm、Mustang<sup>TM</sup>S(パイロットスケール、10mL MV、546MV/時間)でのmAb 1のCHOPクリアランス。

【図12】陽イオン交換クロマトグラフィが結合/溶出モードで実行されるタンパク質産生の概略。

【図13】常在性タンパク質置換モードで実行したカチオン交換メンブレンにより結合/溶出モードで実行した陽イオン交換クロマトグラフィを置換するタンパク質産生の概略。

【発明を実施するための形態】

【0008】

(好適な実施態様の詳細な説明)

定義:

ここで、「約」なる用語で前置きされた数的範囲又は量は、正確な範囲又は正確な数量を明示的に含む。

ここで精製される「組成物」は、対象のポリペプチドと一又は複数の混入物を含有する。組成物は「部分的に精製」(すなわち、プロテインAクロマトグラフィといった一又は複数の精製工程が施されている)されてもよく、又は抗体を産生する宿主細胞又は生物体から直接得てもよい(例えば、組成物は、収集された細胞培養液を含んでいてもよい)。

【0009】

ここで使用される場合、「ポリペプチド」とは、一般的に約10以上のアミノ酸を有するペプチド及びタンパク質を意味する。好ましくは、ポリペプチドは哺乳動物タンパク質であり、例えばレニン;ヒト成長ホルモン及びウシ成長ホルモンを含む成長ホルモン;成長ホルモン放出因子;副甲状腺ホルモン;甲状腺刺激ホルモン;リポタンパク質;-1-アンチトリプシン;インスリンA鎖;インスリンB鎖;プロインスリン;濾胞刺激ホルモン;カルシトニン;黄体形成ホルモン;グルカゴン;第VIIIC因子、第IX因子、組織因子、及びフォン・ウィルブランド因子などの凝固因子;プロテインC等の抗凝固因子;心房性ナトリウム利尿因子;肺表面活性剤;プラスミノーゲン活性化剤、例えばウロキナーゼ又はヒト尿素又は組織型プラスミノーゲンアクチベータ(t-PA);ポンベシン;トロンビン;造血増殖因子;腫瘍壊死因子-<sub>1</sub>及び-<sub>2</sub>;エンケファリン分解酵素;RANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted);ヒトマクロファージ炎症タンパク質(MIP-1<sub>-1</sub>);ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン;ミューラー阻害物質;リラキシンA-鎖;リラキシンB-鎖;プロレラキシン;マウスゴナドトロピン関連ペプチド;-ラクタマーゼ等の微生物タンパク質;DNアーゼ;IGE;CTL A-4等の細胞毒性Tリンパ球関連抗原(CTL A);インヒビン;アクチビン;血管内皮増殖因子(VEGF);ホルモン又は増殖因子のレセプター;プロテインA又はD;リウマチ因子;神経栄養因子、例えば脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン-3、-4、-5又は-6(NT-3、NT-4、NT-5、又はNT-6)、又は神経増殖因子、例えばNGF-<sub>1</sub>;血小板誘導増殖因子(PDGF);aFGF及びbFGF等の線維芽細胞増殖因子;上皮増殖因子(EGF);TGF-<sub>1</sub>、TGF-<sub>2</sub>、TGF-<sub>3</sub>、TGF-<sub>4</sub>、又はTGF-<sub>5</sub>を含む、TGF-<sub>1</sub>等のトランスフォーミング 40

増殖因子(TGF)；インスリン様増殖因子-I及び-II(IGF-I及びIGF-II)；d e s(1-3)-IGF-I(脳IGF-I)、インスリン様増殖因子結合タンパク質；CD3、CD4、CD8、CD19及びCD20等のCDタンパク質；エリスロポエチン；骨誘導因子；免疫毒素；骨形成タンパク質(BMP)；インターフェロン-α、-β、及び-γ等のインターフェロン；コロニー刺激因子(CSF)、例えば、M-CSF、GM-CSF、及びG-CSF；インターロイキン(IL)、例えば、IL-1ないしIL-10；スーパーオリゴシドジスムターゼ；T細胞レセプター；表面膜タンパク質；崩壊促進因子；ウイルス性抗原、例えばAIDSエンベロープの一部；輸送タンパク質；ホーミングレセプター；アドレシン；調節タンパク質；インテグリン、例えばCD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4及びVCAM；腫瘍関連抗原、例えばHER2、HER3又はHER4レセプター；及び上に列挙したポリペプチド並びに抗体の何れかの断片及び/又は変異体、例えば上に列挙したポリペプチドの何れかに結合する抗体断片が含まれる。好ましいポリペプチドは、例えばリツキシマブ等、ヒトCD20に結合する無傷抗体又は抗体断片；又は例えばベバシズマブ等、ヒト血管内皮増殖因子(VEGF)に結合する無傷抗体又は抗体断片である。

## 【0010】

「混入物」は所望のポリペプチド産物とは異なる物質である。混入物には、限定されるものではないが、宿主細胞物質、例えばチャイニーズハムスター卵巣タンパク質(CHOP)；浸出プロテインA；核酸；所望のポリペプチドの変異体、断片、凝集体、異性体又は誘導体；他のポリペプチド；エンドトキシン；ウイルス性混入物；細胞培養培地成分(例えば、ガラマイシン；ゲンタマイシン(登録商標))等が含まれる。

本明細書中の対象のポリペプチドは、CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>領域を含むものであって、したがって、プロテインA親和性クロマトグラフィによる精製に適する。本明細書中で用いる「CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>領域」なる用語は、プロテインAと相互作用する免疫グロブリン分子のFc領域中のアミノ酸残基を指す。好ましい実施態様では、CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>領域は、完全なCH<sub>2</sub>領域の後に完全なCH<sub>3</sub>領域、最も好ましくは免疫グロブリンのFc領域を含む。CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>領域含有ポリペプチドの例には、CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>領域と融合したか又はコンジュゲートした対象のポリペプチドを含む融合タンパク質、免疫アドヘシンおよび抗体が含まれる。

本発明の好ましい実施態様では、本明細書において精製される抗体は組み換え抗体である。「組み換え抗体」は、抗体をコードする核酸により形質転換又は形質移入されているか、又は相同組み換えの結果として抗体を產生する宿主細胞において產生されたものである。「形質転換」および「形質移入」は交換可能に用いられ、核酸を細胞に導入する方法を指す。形質転換又は形質移入後に、核酸が、宿主細胞ゲノムに統合されてもよいし、細胞質因子として存在してもよい。「宿主細胞」には、インビトロ細胞培養物中の細胞並びに宿主動物内の細胞が含まれる。ポリペプチドの組み換え製造方法は、例えば米国特許第5534615号に記載されており、出典明記によってここに明示的に援用される。

## 【0011】

「抗体」なる用語は、最も広義に使用され、特にモノクローナル抗体(完全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、及び、ここで定義するCH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>領域を保持するか又は含むように変更される限りこれらの抗体断片を包含する。

ここでの抗体は関心ある「抗原」に対するものである。好ましくは、抗原は、生物学的に重要なポリペプチドであり、疾病や疾患を患っている哺乳動物への抗体の投与によりその哺乳動物に治療的恩恵がもたらされうる。しかしながら、非ポリペプチド抗原(例えば腫瘍関連糖脂質抗原；米国特許第5091178号参照)に対する抗体もまた考慮される。抗原がポリペプチドである場合、それは膜貫通型分子(例えばレセプター)又はリガンド、例えば増殖因子でありうる。例示的な抗原には上述したポリペプチドが含まれる。本発明に包含される抗体に対する好ましい分子標的は、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、及びCD34のようなCDポリペプチド；HERレセプターファミリーのメン

10

20

30

40

50

バー、例えばEGFレセプター(HER1)、HER2、HER3あるいはHER4レセプター；細胞接着分子、例えばLFA-1、Mac1、p150、95、VLA-4、ICAM-1、VCAM及びav/b3インテグリンで、そのa又はb何れかのサブユニットを含むもの(例えば、抗CD11a、抗CD18あるいは抗CD11b抗体)；VEGFのような増殖因子；IgE；血液型抗原；f1k2/f1t3レセプター；肥満(OB)レセプター；mp1レセプター；CTL A-4；プロテインC等を含む。他の分子に場合によってはコンジュゲートした可溶型抗原あるいはその断片も、抗体産生のための免疫原として用いることができる。レセプターのような膜貫通型分子については、これらの断片(例えば、レセプターの細胞外ドメイン)を免疫原として用いることができる。あるいは、膜貫通型分子を発現する細胞を免疫原として用いることができる。そのような細胞は、天然源(例えば癌細胞株)に由来しうるか、あるいは膜貫通型分子を発現させるために組換え技術によって形質転換された細胞でありうる。

## 【0012】

精製される抗体の具体例には、限定されるものではないが、トラスツズマブ(ハーセチン(登録商標))(Carterら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289(1992), 米国特許第5725856号)及びペルツズマブ(OMNITARG<sup>TM</sup>)(国際公開第01/00245号)を含む抗HER2抗体；CD20抗体(以下参照)；IL-8抗体(St John., Chest, 103:932(1993)、及び国際公開第95/23865号)；例えばヒト化VEGF抗体huA4.6.1ベバシズマブ(AVASTIN(登録商標))及びラニビズマブ(Kimら, Growth Factors, 7:53-64(1992)、国際公開第96/30046号、及び国際公開第98/45331号、1998年10月15日公開)のようなヒト化及び/又は親和成熟VEGF抗体を含むVEG又はVEGFレセプター抗体；PSCA抗体(国際公開第01/40309号)；エファリズマブ(RAPTIVA(登録商標))を含むCD11a抗体(米国特許第5622700号、国際公開第98/23761号、Steppeら, Transplant Intl. 4:3-7(1991)、及びHourmantら, Transplantation 58:377-380(1994))；オマリズマブ(XOLAIR(登録商標))を含むIgEに結合する抗体(Prestaら, J. Immunol. 151:2623-2632(1993)、及び国際公開第95/19181号；1998年2月3日に公開された米国特許第5714338号、又は1992年2月25日に公開された米国特許第5091313号、1993年3月4日に公開された国際公開第93/04173号、又は1998年6月30日に出願された国際出願第PCT/US98/13410号、米国特許第5714338号)；CD18抗体(1997年4月22日に公開された米国特許第5622700号、又は1997年7月31日に公開された国際公開第97/26912号)；APO-2レセプター抗体(1998年11月19日に公開された国際公開第98/51793号)；組織因子(TF)抗体(1994年11月9日に許可された欧州特許出願公開第0420937B1号)；4-7インテグリン抗体(1998年2月19日に公開された国際公開第98/06248号)；EGFR抗体(例えば、キメラ又はヒト化225抗体、セツキシマブ、ERBUTIX(登録商標)、1996年12月19日に公開された国際公開第96/40210号)；CD23抗体、例えばOKT3(1985年5月7日に公開された米国特許第4515893号)；CD25又はTac抗体、例えばCHI-621(SIMULECT(登録商標))及びZENAPAX(登録商標)(1997年12月2日に公開された米国特許第5693762号を参照)；CD4抗体、例えばcM-7412抗体(Choyら Arthritis Rheum 39(1):52-56(1996))；CD52抗体、例えばCAMPATH-1H(ILEX/Berlex)(Riechmannら Nature 332:323-337(1988))；Fcレセプター抗体、例えばFcに対するM22抗体(Grazianoら J. Immunol. 155(10):4996-5002(1995)にあるようなRI)；癌胎児性抗原(CEA)抗体、例えばhMN-14(Sharkeyら Cancer Res. 55(23Suppl): 5935s-5945s(1995)))；hubER-3、hub-Mc3及びCHL6を含む乳房上皮細胞に対する抗体(Cerianiら, Cancer Res. 55(23): 5852s-5856s(1995)；及びRichmanら, Cancer Res. 55(23 Supp): 5916s-5920s(1995))；C242のような大腸癌腫細胞に結合する抗体(Littonら, Eur J. Immunol. 26(1):1-9(1996))；CD38抗体、例えばAT13/5(Ellisら, J. Immunol. 155(2):925-937(1995))；HuM195(Jurcicら, Cancer Res 55(23 Suppl):5908s-5910s(1995))及びCMA-676又はCDP77

10

20

30

40

50

1のようなCD33抗体；EpCAM抗体、例えば17-1A(PANOREX(登録商標))；GpI Ib / IIa抗体、例えばアブシキシマブ又はc7E3-Fab(Reopro(登録商標))；RSV抗体、例えばMED1493(SYNAGIS(登録商標))；CMV抗体、例えばPROTOVIR(登録商標)；HIV抗体、例えばPRO542；肝炎抗体、例えばHep B抗体OSTAVIR(登録商標)；CA125抗体OvaRex；イディオタイプGD3エピトープ抗体BEC2；v3抗体(例えば、VITAXIN(登録商標)；Medimmune)；ヒト腎臓細胞癌腫抗体、例えばc-h-G250；ING-1；抗ヒト17-1An抗体(3622W94)；抗ヒト結腸直腸腫瘍抗体(A33)；GD3ガングリオシドを指向する抗ヒト黒色腫抗体R24；抗ヒト扁平上皮細胞癌腫(SF-25)；ヒト白血球抗原(HLA)抗体、例えばSmart ID10及び抗HLA DR抗体Oncolym(Lym-1)；CD37抗体、例えばTRU016(Trubion)；IL-21抗体(ZymoGenetics/Novo Nordisk)；抗B細胞抗体(Impheron)；B細胞標的MAb(Immunogen/Aventis)；1D09C3(Morphosys/GPC)；LymphoRad 131(HGS)；Lym-1抗体、例えばLym-1Y-90(USC)、又は抗Lym-1 Oncolyt(USC/Peregrine)；LIF 226(Enhanced Lifesci.)；BAFF抗体(例えば、国際公開第03/33658号)；BAFFレセプター抗体(例えば、国際公開第02/24909号を参照)；BR3抗体；B1ys抗体、例えばベリムマブ(belimumab)；LYMPHOSTAT-B™；ISF154(UCSD/Roche/Tragen)；ゴミリキシマブ(gomilixima)(Idec 152；Biogen Idec)；IL-6レセプター抗体、例えばアトリズマブ(atlizumab)(ACTEMRA™；Chugai/Roche)；IL-15抗体、例えばHuMab-IL-15(Genmab/Amgen)；ケモカインレセプター抗体、例えばCCR2抗体(例えば、MLN1202；Millieum)；抗補体抗体、例えばC5抗体(例えば、エクリズマブ5G1.1；Allexion)；ヒト免疫グロブリンの経口製剤(例えばIgPO；Protein Therapeutics)；IL-12抗体、例えばABT-874(CAT/Abbott)；テネリキシマブ(Teneliximab)(BMS-224818；BMS)；CD40抗体、特にS2C6及びそのヒト化変異体(国際公開第00/75348号)及びTNX 100(Chiron/Tanox)；TNF-抗体、特にcA2、又はインフリキシマブ(REMICADE(登録商標))、CDP571、MAK-195、アダリムマブ(HUMIRA™)、ペグ化TNF-抗体断片、例えばCDP-870(Celltech)、D2E7(Knoll)、抗TNF-ポリクローナル抗体(例えば、Pass TNF；Verigen)；CD22抗体、例えばLL2又はエピラツズマブ(LYMPHOCIDE(登録商標)；Immunomedics)、特にエピラツズマブY-90、及びエピラツズマブI-131、アビオゲン(ABIogen)製CD22抗体(ABIogen, Italy)、CMC 544(Wyeth/Celltech)、コンボトックス(combotox)(UT Southwestern)、BL22(NIH)、及びLymphoScantec 99(Immunomedics)が含まれる。

【 0 0 1 3 】

004/035607号及び米国特許出願公開第2004/0167319号(Teelingら)に説明されているヒトモノクローナル抗体;米国特許第2004/0093621号(Shitaraら)に記載されているような、Fc領域に結合した複合N-グリコシド-結合糖鎖を有する抗体;CD20に結合するモノクローナル抗体及び抗原結合断片(国際公開第2005/000901号、Tedderら)、例えばHB20-3、HB20-4、HB20-25、及びMB20-11;CD20結合分子、例えばAMEシリーズの抗体、特に国際公開第2004/103404号及び米国特許出願公開第2005/0025764号(Watkinsら, Eli Lilly/Applied Molecular Evolution, AME)に説明されているようなAME33抗体;米国特許出願公開第2005/0025764号(Watkinsら)に記載されているようなCD20結合分子;A20抗体又はその変異体、例えばキメラ又はヒト化A20抗体(それぞれ、cA20、hA20)又はIMMU-106(米国特許出願公開第2003/0219433号、Immunomedics);CD20-結合抗体、特にエピトープ枯渇Leu-16、1H4、又は2B8で、米国特許出願公開第2005/0069545A1号及び国際公開第2005/16969号(Carrら)のような、場合によってはIL-2とコンジュゲートしているもの;CD22及びCD20に結合する二重特異性抗体、例えばhLL2×hA20(国際公開第2005/14618号、Changら);International Leukocyte Typing Workshopから入手可能なモノクローナル抗体L27、G28-2、93-1B3、B-C1又はNU-B2(Valentineら: Leukocyte Typing III(McMichael編, p. 440, Oxford University Press(1987)); 1H4(Haismaら Blood 92:184(1998)); 抗CD20オーリスタチン(auristatin)Eコンジュゲート(Seattle Genetics);抗CD20-IL2(EMD/Biovation/City of Hope);抗CD20 MAb治療(EpiCyte);抗CD20抗体TRU 015(Trubion)が含まれる。

#### 【0014】

ここで使用される「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能性がある突然変異を除いて同一な抗体を意味する。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に対するものである。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的には含む一般的な(ポリクローナル)抗体調製物に対して、各モノクローナル抗体は抗原の単一の決定基に対するものである。「モノクローナル」との修飾語句は、実質的に均一な抗体の集団から得たものとしての抗体の性質を表すものであり、抗体が何か特定の方法によって生産されることを必要としていると解してはならない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、最初にKohler等, Nature, 256: 495 (1975)に記載されたハイブリドーマ法によって产生でき、あるいは組換えDNA法によって作ることができる(例えば米国特許第4816567号を参照)。さらなる実施態様では、「モノクローナル抗体」は、例えば、McCafferty等, Nature, 348: 552-554(1990)に記載されている技術を使用して作製される抗体ファージライブラリーから単離することができる。Clacksonら, Nature, 352:624-628(1991)及びMarksら, J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991)には、それぞれファージライブラリーを使用するマウス及びヒト抗体の分離について記述されている。続く文献には、チェインシャッフリング(Marksら, Bio/Technology, 10:779-783(1992))による高親和性(nM範囲)ヒト抗体の生産、並びに非常に大きなファージライブラリーを構築するための戦略としてのコンビナトリアル感染及びインビオ組換え(Waterhouseら, Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266(1993))について記載がある。よって、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離のための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術の実行可能な代替策である。別法として、内因性の免疫グロブリン産生がなくともヒト抗体の全レパートリーを免疫化することで生成することのできるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが今は可能である。例えば、キメラ及び生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(J<sub>H</sub>)遺伝子の同型接合除去が内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。このような生殖系列突然変異体マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子列の転移は、抗原投与時にヒト抗体の生成をもたらす。Jakobovitsら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:2551(1993); Jakobov

10

20

30

40

50

itsら, *Nature* 362:255-258(1993); Bruggermanら, *Year in Immuno.*, 7:33(1993); 及び Duchosalら, *Nature* 355:258(1992)を参照。

【0015】

ここでモノクローナル抗体は、その重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種由来又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同であり、残りの鎖が、他の種由来又は他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同的のものである「キメラ」抗体(免疫グロブリン)と、所望の生物学的活性を表す限り、このような抗体の断片を特に包含する(米国特許第4 8 1 6 5 6 7号; Morrisonら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。

【0016】

ここで使用される場合「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合の原因である抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は、「相補性決定領域」あるいは「CDR」(つまり、軽鎖可変ドメイン中の残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)と、重鎖可変ドメイン中の残基31-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3); Kabatら, *Sequences of Polypeptides of Immunological Interest*, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991))からのアミノ酸残基及び/又は「高頻度可変ループ」(つまり、軽鎖可変ドメイン中の残基26-32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)と、重鎖可変ドメイン中の残基26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3); Chothia及びLesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987))からの残基を含む。「フレームワーク」あるいは「FR」残基は、ここに定義される高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0017】

非ヒト(例えば、マウス)抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。通例、ヒト化抗体は、所望の特異性、親和性及び能力を持つマウス、ラット、ウサギあるいは非ヒト靈長類のような非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変領域からの残基によってレシピエントの高頻度可変領域からの残基が置き換えられたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基が対応する非ヒト残基と置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体中あるいはドナー抗体中に見出されない残基を含みうる。これらの改変は抗体の性能をさらに洗練するためになされる。一般に、ヒト化抗体は、高頻度可変ループの全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、また、場合によつては、典型的にはヒト免疫グロブリンのものである免疫グロブリン定常領域(Fc)の一部分を少なくとも含むであろう。

【0018】

ヒト化抗体を作るのに使用されるヒト可変ドメインの選択は、軽鎖でも重鎖でも、抗原性を低減させるために非常に重要である。いわゆる「ベストフィット(best-fit)」法によれば、齧歯類抗体の可変ドメインの配列は、既知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対してスクリーニングされる。齧歯類の配列に最も近いヒト配列は、ヒト化抗体のためのヒトフレームワーク(FR)として受容される(Simsら, *J. Immunol.*, 151:2296(1993); Chothiaら, *J. Mol. Biol.*, 196:901(1987))。

別の方法は、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列に由来した特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークを、幾つかの異なるヒト化抗体のために使用することができる(Carterら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285(1992); Prestaら, *J. Immunol.*, 151:2623(1993))。

抗体は抗原への高親和性及び他の好ましい生物学的性質を保持したままヒト化されることがさらに重要である。この目標を達成するために、好ましい方法では、ヒト化抗体は、親及びヒト化配列の三次元モデルを用いて、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析プロセスによって調製される。三次元の免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能で、当業

10

20

30

40

50

者にはなじみが深い。選択された候補免疫グロブリン配列の有望な三次元立体構造を例証し表示するコンピュータプログラムを利用することができます。これらの表示の検査により、候補免疫グロブリン配列の機能中で残基の可能な役割の分析、つまり、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、標的抗原に対する親和性の増大のような、所望の抗体特性が達成されるように、F R 残基をレシピエント及びインポート配列から選び、組み合わせることができる。一般に、C D R 残基は、抗原結合に影響を及ぼすことに直接的かつ最も実質的に関与している。

#### 【 0 0 1 9 】

「抗体断片」は、全長抗体の一部、一般的にはその抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例には、F a b、F a b'、F (a b')<sub>2</sub> 及びF v 断片；ダイアボディ；線形抗体；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多特異性抗体が含まれる。抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されていた(例えば、Morimotoら, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) 及びBrennanら, *Science*, 229:81(1985)を参照)。しかし、これらの断片は現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、抗体断片は上述において検討した抗体ファージライブラリーから分離することができる。別法として、F a b'-S H 断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合してF (a b')<sub>2</sub> 断片を形成することができる(Carterら, *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。他の実施態様では、F (a b')<sub>2</sub> はロイシンジッパーG C N 4を使用して形成され、F (a b')<sub>2</sub> 分子のアセンブリが促進される。他のアプローチでは、F (a b')<sub>2</sub> 断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。抗体断片の生産のための他の技術は当業者には明らかであろう。

#### 【 0 0 2 0 】

他の実施態様では、選択された抗体は一本鎖F v 断片(s c F v)である。国際公開第93/16185号を参照。「一本鎖F v」又は「s F v」抗体断片は、抗体のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。一般的に、F vポリペプチドはV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメイン間にポリペプチドリンクーをさらに含み、それはs F vが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。s F vの概説については、*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照。

#### 【 0 0 2 1 】

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)内で軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)に結合した重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)を含む。非常に短いために同一鎖上で二つのドメインの対形成ができないリンクーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディは、例えば、欧州特許出願公開第404097号；国際公開第93/11161号；及びHollingerら, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)にさらに詳細に記載されている。

#### 【 0 0 2 2 】

この出願を通して使用される場合「線形抗体」なる表現は、Zapataら, *Polypeptide Eng.* 8(10):1057-1062(1995)において記載されるような抗体を意味する。簡潔に述べると、これらの抗体は、一対の抗原結合領域を形成する一対のタンデム型F dセグメント(V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1)を含む。線形抗体は二重特異性又は単一特異性であってよい。

#### 【 0 0 2 3 】

「多重特異性抗体」は、少なくとも2の異なるエピトープに対する結合特異性を有し、該エピトープが通常異なる抗原からのものである。このような分子は、通常の2つの抗原のみに結合する(すなわち、二重特異性抗体、B s A b s)が、さらなる特異性を有する抗体、例えば三重特異性抗体も、ここで使用される場合はこの表現に含まれる。B s A b sには、一本のアームが腫瘍細胞抗原に対し、他のアームが、細胞障害誘発分子、例えば抗F c R I / 抗C D 1 5、抗p 1 8 5<sup>H E R 2</sup> / F c R I I I (C D 1 6)、抗C D 3 /

10

20

30

40

50

抗悪性 B-細胞(1D10)、抗 CD3 / 抗 p185<sup>HER2</sup>、抗 CD3 / 抗 p97、抗 CD3 / 抗腎細胞癌、抗 CD3 / 抗 OVCAR-3、抗 CD3 / L-D1(抗結腸癌)、抗 CD3 / 抗メラニン細胞刺激ホルモン類似体、抗 EGFRセプター / 抗 CD3、抗 CD3 / 抗 CAMA1、抗 CD3 / 抗 CD19、抗 CD3 / MoV18、抗神経細胞接着分子(NCAM) / 抗 CD3、抗葉酸結合タンパク質(FBP) / 抗 CD3、抗パン(pan)癌腫関連抗原(AMOC-31) / 抗 CD3 に対するもの；腫瘍抗原に特異的に結合する一本のアームと、毒素、例えば抗サポリン / 抗 IgD-1、抗 CD22 / 抗サポリン、抗 CD7 / 抗サポリン、抗 CD38 / 抗サポリン、抗 CEA / 抗リシンA鎖、抗インターフェロン- (IFN-) / 抗ハイブリドーマイディオタイプ、抗 CEA / 抗ビンカアルカロイドに結合する一本のアームを有する BsAbS；抗 CD30 / 抗アルカリホスファターゼ(マイトイシンホスフェートプロドラッグのマイトイシンアルコールへの転換を触媒)等、転換酵素活性化プロドラッグ用の BsAbS；抗フィブリン / 抗組織プラスミノーゲンアクチベーター(tPA)、抗フィブリン / 抗ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター(uPA)等、線維素溶解剤として使用可能な BsAbS；抗低密度リポタンパク質(LDL) / 抗 Fc レセプター(例えば、Fc RI、又は Fc RIII)等、細胞表面レセプターへ免疫複合体を標的化するための BsAbS；抗 CD3 / 抗単純ヘルペスウイルス(HSV)、抗 T 細胞レセプター : CD3 複合体 / 抗インフルエンザ、抗 Fc R / 抗 HIV 等の感染症の治療に使用するための BsAbS；抗 CEA / 抗 EOTUBE、抗 CEA / 抗 DPTA、抗 p185<sup>HER2</sup> / 抗ハプテン等、インビトロ又はインビボにおいて腫瘍を検出するための BsAbS；ワクチンアジュvantとしての BsAbS；抗ウサギ IgG / 抗フェリチン、抗西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP) / 抗ホルモン、抗ソマトスタチン / 抗サブスタンスP、抗 HRP / 抗 FITC、抗 CEA / 抗 ガラクトシダーゼ等、診断ツールとしての BsAbS が含まれる。三重特異性抗体の例には、抗 CD3 / 抗 CD4 / 抗 CD37、抗 CD3 / 抗 CD5 / 抗 CD37、及び抗 CD3 / 抗 CD8 / 抗 CD37 が含まれる。二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片(例えば、F(ab')<sub>2</sub> 二重特異性抗体)として調製可能である。

#### 【0024】

2 以上の結合価を有する抗体が考慮される。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttら J. Immunol. 147: 60(1991)。

ここでの目的に対して「ネイキッド抗体」とは、細胞障害性部分又は放射標識にコンジュゲートしない抗体である。

ここで「インタクトな抗体」とは、2つの抗原結合領域と Fc 領域を含むものである。好ましくは、インタクトな抗体は機能的 Fc 領域を有する。

#### 【0025】

「処置」とは、治療的処置、及び予防的又は防止的対策の双方を意味する。処置が必要なものには、既に疾患を患っているもの、並びに疾患が予防されるものが含まれる。

「疾患」とは、ここで記載されたようにして精製された抗体を用いた処置で利益を受ける任意の病状である。これには、慢性及び急性の疾患及び病気、及び当該問題の疾患に哺乳動物がかかりやすい病的状態を含む。

#### 【0026】

「イオン交換クロマトグラフィ」なる表現は、化合物がその総電荷に基づいて分離される分離技術を指す。分子は、陰イオン(陰電荷を有する)と陽イオン(正電荷を有する)のいずれかに分類される。いくつかの分子(例えばポリペプチド)は、陰イオンと陽イオンの両方の基を有してよい。

イオン交換クロマトグラフィメンブレンは、総体的に陽性か又は陰性に荷電した化合物を結合する。結合部位は吸着体の孔に沿って位置する。化合物は、対流によって結合部位へ輸送される。正に荷電したメンブレン(陰イオン交換体)は、概して陰性に荷電した化合物を結合する。反対に、負に荷電するメンブレン(陽イオン交換体)は、概して陽性に荷電した化合物を結合する。

イオン交換メンブレンは強いか弱いかに更に分類することができる。強いイオン交換メ

10

20

30

40

50

ンブレンは、pHレベルの広範囲にわたって荷電している(イオン化している)。弱いイオン交換メンブレンは、狭いpH範囲でイオン化している。4つの最も一般的なイオン交換の化学的性質は、以下の通りである。

イオン交換の種類	共通の略語	官能基
強い陰イオン	Q	第四アンモニウム
弱い陰イオン	D	ジエチルアミン
強い陽イオン	S	スルホン酸
弱い陽イオン	C	カルボン酸

10

### 【0027】

通常は、イオン交換メンブレンは、0.1～100μmの孔径を有する。参考として、Sartobind Q (Sartorius AG)は、3～5μmの公称孔径を有する強い陰イオン交換メンブレンであり、单一又は複数の層様式で市販されており、Mustang Q (Pall Corporation)は、0.8μmの公称孔径を有する強い陰イオン交換メンブレンであり、同様に单一又は複数の層様式で市販されている。また参考として、Sartobind S (Sartorius AG)は、3～5μmの公称孔径を有する強い陽イオン交換メンブレンであり、单一又は複数の層様式で市販されており、Mustang S (Pall Corporation)は、0.8μmの公称孔径を有する強い陽イオン交換メンブレンであり、同様に单一又は複数の層様式で市販されている。

20

「公称」孔径評点は、評された孔径の粒子を60～98%といった主要に有するメンブレンの能力を表す。

### 【0028】

溶液の「pH」は、水試料のイオン化と比較したときの酸性度又はアルカリ度を計量する。水のpHは中性、すなわち7である。ほとんどのpH読み取り値は0から14である。水(7未満のpH)より高い[H+]溶液は酸性であり、水(7を超えるpH)より低い[H+]溶液は塩基性又はアルカリ性である。pHはpHメータを使用して測定されてよい。バッファpHは、HCl又はNaOHのような酸又は塩基を使用して調整されてよい。

30

ポリペプチドといった分子の「pI」又は「等電点」は、ポリペプチドが等しい数の陽電荷と陰電荷を含むpHを指す。pIは、ポリペプチドのアミノ酸残基の総電荷から算出しても、等電点電気泳動で測定してもよい。陰イオンと陽イオンの両方の基を有するポリペプチドの両性性質は制御されうる。ポリペプチドのpHは、所望のポリペプチドが陽イオン(正電荷を有する)となるまで下げられてよい。あるいは、ポリペプチドのpHは、所望のポリペプチドが陰イオン(陰電荷を有する)となるまで上げられてよい。

### 【0029】

「伝導率」なる用語は、2つの電極間の電流を伝えるための溶液の能力を指す。伝導率の塩基性の単位はシーメンス(S)であり、以前は、mhoと称されていた。伝導率はmS/cmの単位で共通して表される。溶液中のイオンへの電荷により電流のコンダクタンスが促され、溶液の伝導率は、そのイオン濃度と比例している。測定値はいずれも、イオン強度と十分に相関している。イオン強度は、電解質の濃度に密接に関連があり、特定のイオンへの電荷が電解質中の他のイオンによってどれくらい効果的に保護されるかまたは安定するかを表す。イオン強度と電解質濃度との間の主な相違は、イオンのいくらかがより多く荷電している場合に、前者が高いことである。この2つの他の相違は、イオン強度は遊離イオンの濃度を反映しており、溶液に添加した塩の量を示してはいない。伝導率は、様々なモデルのオリオン導電率計といった導電率計を使用して測定されてよい。溶液の伝導率は、そのイオンの濃度を変えることによって変更しうる。例えば、緩衝剤の濃度およ

40

50

び／または溶液の塩(例えば塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム又は塩化カリウム)の濃度は、所望の伝導率を達成するために変更してよい。好ましくは、様々なバッファーの塩濃度を改変して、所望の伝導率を達成する。

メンブレンクロマトグラフィについて、「流速」は、通常時間当たりのメンブレン体積(MV/h)として表す。

メンブレンクロマトグラフィについて、「負荷(load)密度」は、1リットルのメンブレン当たりの処理した組成物のグラムとして表されることが多い。

#### 【0030】

「バッファー」は、酸-塩基のコンジュゲート成分の作用によるpHの変化に抗する溶液である。例えば所望するバッファーのpHに応じて使用可能な種々のバッファーは、Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gutfroy, D., Calbiochem Corporation編(1975)に記載されている。10

抗体と一又は複数の混入物を含有する組成物から抗体を「精製」するとは、組成物から少なくとも一の混入物を(完全に又は部分的に)除去することにより、組成物における抗体の純度を増加させることを意味する。「精製工程」は「均質」な組成物にする全体的な精製プロセスの一部であってもよい。ここで使用される「均質」とは、組成物の全重量に基づき少なくとも約70重量%、好ましくは少なくとも約80重量%、より好ましくは少なくとも約90重量%、さらに好ましくは少なくとも約95重量%の関心ある抗体を含有する組成物を意味する。20

#### 【0031】

イオン交換メンブレンに分子を「結合」させると、分子とイオン交換メンブレンの荷電基又は荷電基群との間の静電気的相互作用により、イオン交換メンブレン内又は上に、分子が可逆的に固定化されるように、適切な条件下(pH及び／又は伝導率)で、分子をイオン交換メンブレンに暴露させることを意味する。

イオン交換メンブレンを「洗浄する」とは、イオン交換メンブレン上に又はこれに通して、適切なバッファーを通過させることを意味する。

イオン交換メンブレンから分子(例えば、抗体又は混入物)を「溶出させる」とは、そこから分子を除去することを意味する。

#### 【0032】

メンブレンクロマトグラフィについて、「フロースルー」は、化合物が再び保持される間のメンブレンへの不純物の結合を指す。30

「混合様式」なる表現は、2つの異なるメカニズムに基づいて化合物を分離する、例えば総電荷に基づく分離の際に覆われたポリペプチド間の親水性／疎水性相違に基づく分離の能力を有する吸着剤を指す。これは、イオン相互作用および水素結合又は疎水的相互作用を含む様々な異なる方法で標的分子と相互作用しうる多様式リガンドを用いることによって達成されることが多い。GE Healthcare Capto<sup>TM</sup> MMCおよびCapto<sup>TM</sup> Adhereのような吸着剤は、「混合様式」クロマトグラフィ樹脂の例である。

#### 【0033】

発明を実施するための形態40

ここでの発明は、ポリペプチドと一又は複数の混入物を含有する組成物(例えば水溶液)からポリペプチドを精製するための方法を提供する。組成物は、一般的にポリペプチドの組換え生産から得られるが、ペプチド合成(又は、他の合成手段)によるポリペプチドの生成から得てもよく、又はポリペプチドは、ポリペプチドの天然源から精製されてもよい。好ましくは、ポリペプチドは、C<sub>H</sub>2/C<sub>H</sub>3領域含有ポリペプチドである。好ましい実施態様では、C<sub>H</sub>2/C<sub>H</sub>3領域含有ポリペプチドは抗体である。

#### 【0034】

抗体の組換え生産

抗体の組換え生産のために、それをコードする核酸が単離され、さらなるクローニング(DNAの增幅)又は発現のために、複製可能なベクター内に挿入される。抗体をコードす50

るDNAは容易に単離され、一般的な手順を使用(例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用)して配列化される。多くのベクターが入手可能である。ベクター成分は、一般的に、これらに限定されるものではないが、次のものの一又は複数：シグナル配列、複製開始点、一又は複数のマークー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列(例えば、特に出典明示によりここに援用される米国特許第5534615号に記載されているもの)を含む。

### 【0035】

ここで、ベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母、又は高等真核生物細胞である。この目的に適切な原核生物は、真正細菌、例えはグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えは大量菌類、特に大腸菌、エンテロバクター、エルウィニア、クレブシエラ、プロテウス(*Proteus*)、サルモネラ、例えはネズミチフス菌、セラチア、例えは、セラチア・マルセサンス(*Serratia marcescans*)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えはバシリ・スブチリス(*B. subtilis*)及びバシリ・リチエニフォルミス(*B. licheniformis*)(例えは、1989年4月12日公開のDD266710に記載されたバシリリチエニフォルミス41P)、シュードモナス、例えは緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。好ましい大腸菌クローニング宿主は大腸菌294(ATCC 31,446)であるが、他の菌株、例えは大腸菌B、大腸菌X1776(ATCC 31,537)、及び大腸菌株W3110(ATCC27,325)も適している。これらの例は限定というよりは、例示的なものである。

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母のような真核微生物は、抗体コード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシア、又は通常のパン酵母が、下等真核生物宿主微生物の中で最も一般的に使用されている。しかしながら、他の多くの属、種及び菌株、例えはシゾサッカロミセス・プロンブ(*Schizosaccharomyces pombe*)；クルベロミセス・ホスト(*Kluveromyces hosts*)、例えはケーラクチス(*K. lactis*)、ケーフラギリス(*K. fragilis*)(ATCC 12,424)、ケーブルガリクス(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045)、ケーウィケラミイ(*K. wickeramii*)(ATCC 24,178)、ケーワルチイ(*K. waltii*)(ATCC 56,500)、ケードロソフィラルム(*K. drosophilae*)(ATCC 36,906)、ケーテルモトレラヌス(*K. thermotolerans*)及びケーマルキシアヌス(*K. marxianus*)；ヤロウイア(*yarrowia*)(欧州特許出願公開第402226号)；ピッチャ・パストリス(*Pichia pastoris*)(欧州特許出願公開第183070号)；カンジダ；トリコデルマレーシア(*reesia*)(欧州特許出願公開第244234号)；アカパンカビ；シュワニオマイセス(*Schwanniomyces*)、例えはシュワニオマイセス・オクシデンタリス(*occidentalis*)；及び糸状真菌、例えは、ニューロスボラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(*Tolypocladium*)、及びコウジ菌、例えは偽巣性コウジ菌及びクロコウジカビも、ここでは一般的に入手可能で有用である。

### 【0036】

グリコシリ化抗体の発現に適切な宿主細胞は多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例には、植物及び昆虫細胞が含まれる。多くのバキュロウイルスの菌株及び変異体、宿主、例えはヨトウガ(イモムシ)、ネッタイシマカ(蚊)、ヒトスジシマカ(蚊)、キイロシヨウショウバエ(ショウジョウバエ)、及びカイコからの対応する許容的昆虫宿主細胞が同定されている。形質移入用の様々なウイルス株、例えはオートグラファ・カリフォルニカ(*Autographa californica*)NPVのL-1変異体、及びカイコNPVのBm-5株も公に入手可能であり、このようなウイルスは、本発明では、特にヨウトガ細胞の形質移入用のウイルスとして使用されてよい。綿、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト、及びタバコの植物細胞培養体も、宿主として利用可能である。

しかしながら、脊椎動物細胞にも大きな興味があり、培養(組織培養)における脊椎動物細胞の増殖は、常套的な手順でなされる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例には、限定されるものではないが、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651)；ヒト胚腎臓細胞(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された2

10

20

30

40

50

93細胞、Graham等、J. Gen Virol., 36:59 (1977))；ベビーハムスター腎臓細胞(BHK, ATCC CCL 10)；チャイニーズハムスター卵巣細胞/-D H F R (CHO, Urlaubら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980))；マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980))；サル腎臓細胞(CV1 ATCC CCL70)；アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；ヒト子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)；イヌ腎臓細胞(MDC K, ATCC CCL 34)；バッファロラット肝臓細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065)；及びマウス乳房腫瘍(MMT 060562, ATT C CCL51)；T R I 細胞(Matherら, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982))；M R C 5細胞；F S 4細胞；及びヒト肝細胞腫(Hep G2)が含まれる。多くの場合、抗体の発現にはCHO細胞が好ましくは、本発明で精製される抗体を產生するのに有利に使用される。

10

### 【0037】

宿主細胞は、抗体生成用の上述した発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターの誘発、形質転換体の選択、又は所望の配列をコードする遺伝子の増幅に適するように改変された従来からの栄養培地で培養される。

この発明の抗体の生成に使用される宿主細胞は、様々な培地で培養されてよい。商業的に入手可能な培地、例えばハム(H a m)のF 1 0 (Sigma)、最小必須培地((M E M)、Sigma)、R P M I - 1 6 4 0 (Sigma)及びダルベッコの改良イーグル培地((D M E M)、Sigma)が、宿主細胞の培養に適している。さらに、Hamら, Meth. Enz. 58:44(1979)、Barnesら, Anal. Biochem. 102:255(1980)、米国特許第4767704号；同4657866号；同4927762号；同4560655号；又は同5122469号；国際公開第90/03430号；国際公開第87/00195号；又は米国特許第R e. 30985号に記載されている任意の培地も、宿主細胞用の培養培地として使用されてよい。これらの培地はいずれも、ホルモン及び/又は他の増殖因子(例えばインスリン、トランスフェリン、又は表皮増殖因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばH E P E S)、ヌクレオシド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えばガラマイシン：ゲンタマイシン(登録商標))、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は同等のエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について以前から用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

20

組換え技術を使用する場合、抗体は細胞膜周辺腔で細胞内で產生されるか、あるいは直接培地へ分泌されるかである。最初の段階として、タンパク質が、微粒子状破片、宿主細胞あるいは溶解された断片(例えば、ホモジナ化の結果)のいずれかから細胞内で產生されるなら、例えば、遠心分離又は限外濾過によって除去される。抗体が培地へ分泌される場合には、このような発現系からの上清は、商業的に入手可能なタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はMillipore Pellicon限外濾過ユニットを使用して濃縮されうる。

30

### 【0038】

本発明のメンブレンイオン交換クロマトグラフィー法

40

本発明の好ましい実施態様では、ここでの精製方法にかけられる組成物は、組換え生産された抗体、好ましくはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)組換え宿主細胞培養で発現した無傷抗体である。場合によって、組成物は、メンブレンイオン交換クロマトグラフィーの前に、少なくとも一の精製工程にかけられる。組成物は関心ある抗体と一又は複数の混入物、例えばチャイニーズハムスター卵巣タンパク質(CHOP)；浸出プロテインA；核酸；所望する抗体の変異体、断片、凝集体又は誘導体；他のポリペプチド；エンドトキシン；ウイルス性混入物；細胞培養培地成分(例えばガラマイシン：ゲンタマイシン(登録商標))等を含有する。

メンブレンイオン交換クロマトグラフィー法の前、実施中又は後に実施されてもよいさ

50

らなる精製手順の例には、疎水性相互作用クロマトグラフィー(例えば、フェニル-セファロース<sup>TM</sup>)における分画、エタノール沈殿、熱沈殿、ポリエチレングリコール(P E G)沈殿、等電点電気泳動、逆相HPLC、シリカにおけるクロマトグラフィー、ヘパリンセファロース<sup>TM</sup>におけるクロマトグラフィー、アニオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、混合モードイオン交換、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈降、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、親水性電荷誘導クロマトグラフィー、高性能クロスフロー濾過(HPTFF)、及びアフィニティクロマトグラフィー(例えば、プロテインA、プロテインG、抗体、又は特定の基質、リガンド、又はキャプチャーツ試薬としての抗原を使用)が含まれる。

## 【0039】

10

組換え技術を使用する場合、抗体は、細胞内の細胞膜周辺腔に生産されても、培地に直接分泌されてもよい。抗体が細胞内で生産される場合、第一段階として、宿主細胞又は溶解断片といった微粒子のデブリは、例えば、遠心分離法又は濾過によって取り除かれる。抗体が培地に分泌される場合、組換え宿主細胞は、例えば遠心分離法又は濾過によって細胞培養培地から単離されてもよい。

プロテインA親和性クロマトグラフィの間に大部分が精製される。プロテインAは、抗体のFc領域に特異的に結合する細菌細胞壁タンパク質である。クロマトグラフィ培地へ固定する場合、複合溶液中の抗体を選択的に結合しうるので、プロテインAにより組み換え抗体を精製するための技術が提供され、これにより不純物が流れ出る。

プロテインA親和性カラムの基本プロトコールは簡単であり、およそ中性のpHで結合し、酸性のpHで溶出する。固相に固定されるプロテインAを用いて、CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>領域含有のポリペプチドを精製する。固相は、プロテインAを固定するためのガラス、シリカ又はアガロース表面を含むカラムが好ましい。好ましくは、固相は、調整した孔ガラスカラム、珪酸カラム又は十分に架橋されたアガロースカラムである。GE Healthcareから市販されているMabselect Sure<sup>TM</sup>カラムは、抗体を精製する際に有用な十分に架橋されたアガロースプロテインAカラムの例である。時に、カラムは、カラムへの非特異的な接着を防ぐために、グリセロールといった試薬にてコートされている。Millipore Corporationから市販されているPROSEPA(TM)カラムは、グリセロールでコートされたプロテインA調整孔ガラスカラムの例である。プロテインAクロマトグラフィのための固相は、適切なバッファにて平衡化する。

## 【0040】

30

組換え宿主細胞から得られる混合した調製物は、平衡化バッファと同じでもよい負荷バッファ(ローディングバッファ)を用いて平衡化した固相に添加する。混入した調製物が固相を流れるので、ポリペプチドは、固定したプロテインAに吸着され、他の混入物(CH<sub>0</sub>細胞中で生産されるポリペプチドである、チャイニーズハムスター卵巣タンパク質、CHOP)は固相に非特異的に結合する。

続いて実施する次の工程は、中間洗浄工程で塩、アミノ酸および/または疎水性電解質溶媒を含む溶液にて固相を洗浄することによって固相へ結合した混入物を取り除くことを必要とする。好ましい実施態様では、この洗浄の塩はリン酸カリウムであり、アミノ酸はアルギニンであり、疎水性電解質はTEMACおよび/またはTEACである。単一の溶質が洗浄中に存在するが、ある実施態様では、2又はそれ以上の溶質が使われてよい。溶質(一又は複数)は、およそ中性のpHを有するpH緩衝溶液に添加されるのが好ましい。前段落の中間洗浄工程後に、対象のポリペプチドはカラムから回収する。これは通常、好適な溶出バッファを用いて達成される。ポリペプチドは、例えばおよそ2からおよそ5、好ましくはおよそ2.5からおよそ3.5の低いpHを有する溶出バッファを用いてカラムから溶出されてよい。この目的のための溶出バッファの例には、クエン酸塩又は酢酸塩のバッファが含まれる。

メンブレンイオン交換クロマトグラフィは本明細書中で主張するように実行する。陰イオンと陽イオンの何れの交換メンブレンを用いるべきかは初めに決定する。いくつかの抗体の等電点(pI)はおよそ6.7から9.4であるが、多くの抗体のpIは高い(しばし

40

50

ば 8 より大きく、 9 より大きいこともある)。通常は、陽イオン交換メンブレンはおよそ 8 より大きい p I を有する抗体について用いられてよく、陰イオン交換メンブレンはおよそ 8 より小さい p I を有する抗体について用いられてよい。

#### 【 0 0 4 1 】

常在性タンパク質置換様式で実行するメンブレン陽イオン交換クロマトグラフィのために、充填材(load material)の pH を抗体の p I のおよそ 1 ~ よおよそ 5 pH 単位以下に調整し、pH に応じて、充填材の伝導率をおよそ 40 mS / cm 以下に調整し、次いで抗体をメンブレンにポンプで通す。いくつかの実施態様では、充填材の pH は、抗体の p I の、およそ 1 ~ よおよそ 4 pH 単位、およそ 1 ~ よおよそ 3 pH 単位、およそ 1 ~ よおよそ 2 pH 単位、又はおよそ 1 pH 単位以下に調整される。他の実施態様では、pH に応じて、充填材の伝導率は、およそ 20 mS / cm 以下、又はおよそ 10 mS / cm 以下に調整される。充填材の pH が抗体の p I よりも小さいので、抗体(陽性荷電しているもの)は初めは流れでないであろう。むしろ、抗体は、陽イオン交換体の陰性官能基に静電的に結合しているであろう。これは、抗体(陽性)とメンブレン(陰性)が逆の電荷を有するからであろう。プロテイン A 親和性クロマトグラフィの間に抗体にて溶出する多くの混入物、例えば C H O P のような宿主細胞タンパク質の p I は抗体の p I と僅かにしか違わない。つまり、p I はおよそ 0 . 0 5 からおよそ 0 . 2 pH 単位しか異ならず、「塩基性」抗体のようなこれらの混入物はメンブレンにも結合するであろう。理論によるものではないが、常在性タンパク質置換様式で実行されるメンブレン陽イオン交換クロマトグラフィでは、ごく僅かなイオンシールドを有する電荷を誘導する pH および伝導率の条件で、混入物は、メンブレンに優先的に結合するか、又はメンブレンからの抗体を効率よく「置換し」(RR Drager , FE Regnier, J Chromatogr. 359:147-55 (1986))、これにより抗体は結合した後にマトリックス又は流出物から溶出でき、溶出物に回収される。

#### 【 0 0 4 2 】

常在性タンパク質置換様式で実行されるメンブレン陰イオン交換クロマトグラフィでは、充填材の pH は抗体の p I よりおよそ 1 ~ よおよそ 5 pH 単位高く調整し、pH に応じて、充填材の伝導率はおよそ 40 mS / cm 以下に調整し、次いで抗体をメンブレンにポンプで通す。いくつかの実施態様では、充填材の pH は、抗体の p I の、およそ 1 ~ よおよそ 4 pH 単位、およそ 1 ~ よおよそ 3 pH 単位、およそ 1 ~ よおよそ 2 pH 単位、又はおよそ 1 pH 単位高く調整する。他の実施態様では、pH に応じて、充填材の伝導率は、およそ 20 mS / cm 以下又はおよそ 10 mS / cm 以下に調整する。充填材の pH が抗体の p I より大きいので、抗体(陰性に荷電したもの)は初めは流れないであろう。むしろ、抗体は、陰イオン交換体の陽性官能基に静電的に結合しているであろう。これは、抗体(陰性)とメンブレン(陽性)が逆の電荷を有するからである。プロテイン A 親和性クロマトグラフィの間に抗体にて溶出する多くの混入物、例えば C H O P のような宿主細胞タンパク質の p I は抗体の p I と僅かにしか違わない。つまり、p I はおよそ 0 . 0 5 からおよそ 0 . 2 pH 単位しか異ならず、「酸性」抗体のようなこれらの混入物はメンブレンにも結合するであろう。理論によるものではないが、常在性タンパク質置換様式で実行されるメンブレン陰イオン交換クロマトグラフィでは、ごく僅かなイオンシールドを有する電荷を誘導する pH および伝導率の条件で、混入物は、メンブレンに優先的に結合するか、又はメンブレンからの抗体を効率よく「置換し」(RR Drager , FE Regnier, J Chromatogr. 359:147-55 (1986))、これにより抗体は結合した後にマトリックス又は流出物から溶出でき、溶出物に回収される。

#### 【 0 0 4 3 】

ある例では、メンブレンクロマトグラフィは、ポンプ制御装置に加えて圧力計、センサーおよびポンプを備えている A K T A <sup>T M</sup> エクスプローラ(GE Healthcare)のようなカスタムクロマトグラフィシステム又は標準のクロマトグラフィシステムの何れかで実行する。この例において、メンブレン装置は圧力計の下流に取り付けられる。前記例において、pH および電導度検出器は、メンブレン装置の下流に取り付けられる。この例のために、システムは、水にて完全に洗い流し、その後メンブレンの設置前に平衡化バッファにて洗

10

20

30

40

50

い流す。更にこの例のために、メンブレンを有するシステムは、溶液 pH と伝導率出路が平衡化バッファの詳細と一致するまで平衡化バッファにて洗い流し(およそ 5 メンブレン容量)、安定な基準値を観察する。更にこの例のために、供給材料は、333-2667 MV / 時、pH 5.5 (仮想「塩基性」抗体の精製のため)又は pH 8.0 (仮想「酸性」抗体の精製のため)、およびおよそ 4 mS / cm の伝導率で、ポンプによって添加する。また更にこの例のために、動作を記録する間に、動作背圧、pH および伝導率を変化させる。最後に、この例では、280 nm の紫外線(UV)吸光度痕跡が基準値に対して 0.2 吸光度単位である場合に、メンブレン溶出物中のポリペプチドをすぐに回収し、280 nm の UV 痕跡が 0.2 吸光度単位以下になったら貯蔵物回収を止め、メンブレン溶出分画のプールからの試料を、ポリペプチド濃度、二量体 / 凝集レベル、宿主細胞タンパク質、DNA 及び溶出したプロテイン A について分析する。回収工程は、一般に、メンブレン溶出物中のポリペプチドと溶出したポリペプチドを用いて算出する。メンブレンは従来より使い捨てである。

#### 【0044】

分析物アッセイに関して、ポリペプチド含量(抗体濃度)は、ベックマンの分光光度計を用いて 280 nm の吸光度によって決定してよい。抗体集合は、サイズ排除クロマトグラフィによって測定してよい。宿主細胞タンパク質、例えば CHOP のレベルは、酵素結合抗体免疫吸着アッセイ(ELISA)によって分析してよい。宿主細胞 DNA は、TaqMAN PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)の使用によって定量化してよい。溶出したプロテイン A は、プロテイン A 樹脂販売会社によって推奨される免疫化学的な ELISA ベースの方法を使用して実行してよい。

以下のバッファを仮に設定し、S メンブレンと共に使用するために試験する。(1) 8.9 mM 酢酸、127 mM TRIS ベース、21 mM クエン酸、pH 5.5、6.0 mS / cm、(2) 28 mM MES、95 mM NaCl、pH 6.0、11 mS / cm、(3) 200 mM NaOAc、pH 5.5、12 mS / cm、(4) 100 mM NaOAc、pH 5.5、6.4 mS / cm、そして、(5) 96 mM 酢酸、65 mM TRIS、pH 5.0、3.6 mS / cm。

以下のバッファを仮に設定し、Q メンブレンと共に使用するために試験する。(1) 5.0 mM TRIS、15 mM NaCl、pH 8.0、4.3 mS / cm、(2) 25 mM TRIS、pH 8.0、1.3 mS / cm、(3) 60 mM TRIS、118 mM NaCl、pH 8.0、15.7 mS / cm、(4) 50 mM TRIS、50 mM NaOAc、pH 8.0、7.0 mS / cm、(5) 25 mM HEPES、85 mM NaOAc、pH 7.0、6.5 mS / cm、そして、(6) 91 mM 酢酸、130 mM TRIS、pH 8.0、5.0 mS / cm。

更に、何れのバッファ系も、適切な pH にするために、酢酸、クエン酸、HEPES、塩酸、リン酸、水酸化ナトリウム、TRIS、又は他の酸性ないし塩基性バッファを添加して、上げる又は下げるなどして pH を調整することができる。また、何れのバッファ系も、適切な伝導率にするために、純水、注射用蒸留水(WFI)、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、リン酸カリウム、又は他の低及び高塩含有バッファを用いて、上げる又は下げるなどして伝導率を調整することができる。

#### 【0045】

常在性タンパク質置換メンブレンクロマトグラフィ工程の進行は簡単である。充填材は、様々なレベルの pH および伝導率でメンブレンに通される。分子が大きな静電的相互作用を有する場合、抗体又は混入物のポリペプチドの保持率が高まりうる。ポリペプチドが十分に荷電している状態、すなわち、ポリペプチドの pI とは十分に異なった pH を有し、ポリペプチドの電荷を促すバッファと、バッファイオンによる電荷のシールドを妨げるための低イオン強度とを用いた条件下で操作するとき、静電的相互作用が高まりうる。対照的に、ポリペプチドがさほど荷電していない状態、すなわち、ポリペプチドの pI と非常に近い pH を有し、ポリペプチドの電荷を減少させるバッファと、バッファイオンによる電荷のシールドを受け入れる高イオン強度とを用いた条件下で操作するとき、静電的相

10

20

30

40

50

互作用が減少しうる。その結果、異なる物理化学的性質を有するポリペプチドは、バッファ溶液を最適化することによって、メンブレン吸着により単離されうる。所定のメンブレンに保持される分子もあれば、バッファのpHおよびイオン強度の適切な選択に応じて流れ出る分子もある。

本明細書中のメンブレンイオン交換クロマトグラフィ法によって得た抗体調製物は、必要に応じて更なる精製工程に供してよい。例示的な更なる精製工程は先に論じた。

【0046】

図12に関して、成功した精製体系の一つの例は、プロテインA親和性クロマトグラフィの最初の分画化工程を必要とする回収工程、結合／溶出様式で動作する陽イオン交換クロマトグラフィの中間精製工程、およびフロースルー様式で動作する陰イオン交換クロマトグラフィの最終的な研磨工程である。

図13に関して、改良した精製体系の一つの例は、プロテインA親和性クロマトグラフィの最初の分画化工程を必要とするが、結合／溶出様式で動作する陽イオン交換カラムクロマトグラフィを常在性タンパク質置換様式で動作する陽イオン交換メンブレンに置き換える回収工程である。これは、中間及び研磨の工程が一つの連続する操作、つまり単一工程に組み合わされるなどの多くの理由のために有用であろう。

【0047】

場合によっては、抗体は、所望の場合は一又は複数の異種分子にコンジュゲートされる。異種分子は、例えば抗体の血清半減期を増加させるもの(例えば、ポリエチレングリコール、PEG)であり得、又は標識(例えば、酵素、蛍光標識及び／又は放射性核種)、又は細胞障害性分子(例えば、毒素、化学治療剤、又は放射性同位元素)でありうる。

場合によっては異種分子とコンジュゲートした抗体を含有する治療用製剤は、所望の純度を有する抗体を、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で、任意の薬学的に許容可能な担体、賦形剤又は安定剤(Remington's pharmaceutical Sciences 第16版, Osol, A. 編(1980))と混合することにより調製されてよい。「薬学的に許容可能な」担体、賦形剤、又は安定剤は、用いられる用量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトарат、及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤(例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド；ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテーテール；レゾルシノール；シクロヘキサンオール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール)；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む单糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖類；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体)；及び／又はトウイーン(TWEEN)<sup>TM</sup>、フルロニクス(PLURONICS)<sup>TM</sup>、又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0048】

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルション中に包括されてもよい。これらの技術はRemington's Pharmaceutical Science 第16版, Osol, A. 編(1980)に開示されている。

インピボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

【0049】

徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の好適な例は、抗体を含有する固体疎水

10

20

30

40

50

性ポリマーの半透性マトリックスを含み、このマトリックスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。除放性マトリックスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール)、ポリアクチド(米国特許第3773919号)、L-グルタミン酸及び-D-エチル-L-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON D E P O T<sup>TM</sup>(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドからなる注射可能なミクロスフィア)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸を含む。

#### 【0050】

ここで開示されたようにして精製される抗体、又は抗体と薬学的に許容可能な担体を含有する組成物は、種々の診断、治療、及びこのような抗体及び組成物に公知の他の用途に使用される。例えば、治療的有効量の抗体を哺乳動物に投与することにより、哺乳動物における疾患を処置するために、抗体を使用してよい。

10

#### 【0051】

次の実施例は例証のために提供されるものであって、限定するためのものではない。本明細書における全ての引用の開示は、出典明示により明示的にここに援用される。

#### 【実施例】

#### 【0052】

はじめに

細胞培養条件が向上するにつれて、モノクローナル抗体(mAb)のバイオリアクタ力価は増加する。大きなバッチのmAbは、従来のカラムクロマトグラフィを使用して精製するのが困難かもしれない。結合能が高い新規の樹脂は、平衡して複数のカラムをサイクルするか又は実施する必要を避けられない。大きなバッチを効率良く扱うことができないことは、商品のコストおよび設備収容量に負の影響を与える。更に、バイオプロセス産業は、商品のコストを抑えるために、より便利で費用効果の良いツールを必要とする。同時に確認および人件費を低減しうる、小さい、処理可能な精製技術が、望ましい。産業が発達するにつれて、イオン交換メンブレンはmAb処理のためにより有利になってきている。

20

カラムクロマトグラフィ法が強力で確実であるにもかかわらず、分離性能が孔拡散に依存しているので、一般に低い質量処理量を有する。生成物および不純物はゆっくりと孔内に拡散して、結合部位にアクセスしなければならない。それに反して、メンブレンは孔拡散が制限されない。分離性能は流速とは無関係であるので、メンブレンは樹脂より高い質量処理量が可能である。また、メンブレンはカラム体、カラムパッキング/脱パッキング、又は資格を必要としないので、樹脂よりも便利である。工業規模のメンブレンは、1回使用の後に捨てることができるカートリッジ又は自己被包型の様式に有用であり、さらに再利用及び貯蔵に関する検証費用がかからない。また、メンブレンは、樹脂が充填したカラムよりも小さく、非常に軽く、製造施設の中での取扱いが容易である。

30

#### 【0053】

メンブレンにはいくつかの欠点がある。樹脂と比較して、メンブレンは、まだ工業規模で広範囲にわたって利用されていない相対的に新規な技術である。市販のメンブレンの種類と十分に特徴付けされたりガンドの選択には制限がある。また、メンブレンはイオン交換樹脂よりかなり高価である。さらに、メンブレンは、工業規模の結合及び溶出クロマトグラフィを実施するための好適な媒体ではない。メンブレンは相対的に低い結合能を有するので、サイクルによって経済的に補うことが難しい。メンブレンの生成が新たに発達するにつれて、これらの問題の多くが解決されそうである。

40

欠点があるにもかかわらず、メンブレンは終了段階の精製に適している。イオン交換メンブレンは、プロテインA mAbキャプチャに続く工程として成功したことが明らかとなつた。不純物レベルが低いのでこの状況でメンブレンは理想的であり、フロースルーモードで用いる場合、結合能はもはや限定するものではない。フロースルーモトグラフィは、適切に荷電した不純物が吸着されながら標的タンパク質が結合することなく吸着媒体

50

を流れるクロマトグラフィの動作と定義される。メンブレンクロマトグラフィに応用した場合、メンブレンとmAbとの間に生じる反発力を利用し、大多数の結合部位が逆に荷電したCHOP種の吸着に利用可能なままとなっている技術である。

#### 【0054】

この研究は、常在性タンパク質置換様式でイオン交換メンブレンを用いたモノクローナル抗体の精製に取り組んでいる。mAbは生成物吸着が生じるpHおよび伝導率の条件でメンブレンにて処理されるので、手法はフロースルーと異なる。これは、低イオン強度、そして陰イオン交換の間にはmAbのpIより大きいpH、そして陽イオン交換の間にはmAbのpIより低いpHで操作することによって達成される。これらの条件で、反発力は、生成物吸着が生じるメンブレンとmAbとの間で生じる。フィードストリーム負荷(loading)は破過容量を超えて続け、メンブレン溶出物は精製された形で回収する。常在性タンパク質置換様式の実験的データにより高い精製と収率が示され、メンブレンとmAbとの間に強い静電的相互作用が明らかに生じたのではなかった。

4つの組換えDNA由来のmAbは、等電点(pI 6.7 - 9.3、アミノ酸配列に基づいて算出した)の範囲に基づいて、分析のために選択した。4つすべてのmAbは、ジエネンテック社のCHO細胞培養物において製造し、一又は複数のカラムクロマトグラフィ工程(プロテインA又はプロテインA及びイオン交換)にて部分的に精製した。フィードストリームは、チャイニーズハムスター卵巣タンパク質(CHOP)の残留するレベルに基づいて選択した。

この研究は、イオン交換メンブレンMustang™S、Mustang™QおよびSartobind™Sの、mAb吸着も生じるpHおよび伝導率条件でCHOPを除去する能力を調べるものである。CHOP精製および収率は、pH、伝導率、負荷(load)密度、流速およびメンブレン種類に応じて調査した。また、メンブレンスケールアップおよび再生成を試験し、連続操作の実現可能性を調べた。

#### 【0055】

##### 材料および方法

###### フィードストリーム

フィードストリームは、商業目的又は研究目的のために最初に製造される、産業的、試験的又は小規模の細胞培養バッチ(Genentech Inc., South San Francisco, California)から採取した。各フィードストリームは部分的に精製し、目的の細胞を分離し、分離した液体を少なくとも一のカラムクロマトグラフィ工程(プロテインA又はプロテインA及びイオン交換)により精製した。各フィードストリームは、標的治療的モノクローナル抗体(IgG1又はIgG4)と定量可能なレベルの宿主細胞不純物を含んでいた。各フィードストリームの組成物は、個々のmAbプロセス及び精製のレベルに応じて変化した。通常、フィードストリームのpHは5.5 - 8.0、伝導率は3.2 - 9.0 mS/cm、そして、生成物濃度は3.5 - 6.9 mg/mLであった。表1は、この研究において使用した各mAbについてのフィードストリーム特徴を示す。

#### 【0056】

###### mAb定量化

mAbの濃度は、280及び320nmのUV分光光度スキャンを用いて決定した。CHOPレベルは非常に低いので、UV吸光度にかなり影響する。mAbを含む試料は、適切な非妨害希釈物にて0.1 ~ 1.0 AUの範囲に希釈した。試料調整物および仕様スキャン読み取り値は複数して実行し、平均値を記録した。試験したmAbの吸収係数は1.45 - 1.70 (mg/mL) - 1 cm - 1であった。280及び320nmの吸光度、希釈因子、パス長(1 cm)及び吸収係数を用いて、ランベルト・ベールの法則として知られる方程式を用いてmAb濃度を算出した。

10

20

30

40

$$\text{タンパク質濃度 (mg/mL)} = \frac{A_{280} - A_{320}}{abs.coeff.} \times \text{希釈因子}$$

## 【0057】

## C H O 宿主細胞タンパク質(C H O P)定量化

酵素結合免疫測定法(E L I S A)を用いて、C H O Pのレベルを定量化した。親和性精製したヤギ抗C H O P抗体は、マイクロタイタープレートウェルに固定した。C H O P、標準物質およびコントロールを含有している試料の希釈物は、ウェルで培養し、その後西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートしたヤギ抗C H O P抗体と共にインキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素活性はo-フェニレンジアミンジヒドロクロライドにて検出した。C H O Pは、マイクロタイタープレート読み取り機で492 nmの吸光度を読むことによって定量化した。コンピュータ曲線フィッティングプログラムを用いて、標準曲線を生成し、自動的に試料濃度を算出した。E L I S Aのアッセイ範囲は典型的に5 ng / m l ~ 320 ng / m l であった。各試料について、2 ~ 4の希釈物を検定し、値を平均した。C H O P値はm A b濃度で割り、結果をp p mの単位(n g C H O P / m g m A b)で記録した。

定量化の限界(L O Q)以下のC H O Pレベルを示す濾過試料を続いて濃縮し、定量化可能な結果を得た。試料は、A m i c o n(登録商標)U l t r a - 1 5 遠心1 0 k D M W C O フィルター(Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts)、そして、5 ~ 2 5 、3 2 0 0 ~ 4 0 0 0 r p mで1 0 ~ 2 0 分間のエッペンドルフ5 8 1 0 R遠心機(Eppendorf AG, Hamburg, Germany)を用いて1 0倍に濃縮した。

## 【0058】

## メンブレン

試験したメンブレンは、Mustang<sup>TM</sup>SおよびQ(Pall Corporation, East Hills, New York)およびSartobind<sup>TM</sup>S(Sartorius-Stedim Biotech S.A., Aubagne, France)であった。Mustang<sup>TM</sup>SおよびSartobind<sup>TM</sup>Sは強力な陽イオン交換メンブレンであり、Mustang<sup>TM</sup>Qは強力な陰イオン交換メンブレンである。Mustang<sup>TM</sup>SおよびSartobind<sup>TM</sup>Sはスルホン酸の様式によって変更し、Mustang<sup>TM</sup>Qは第四級アミンの様式によって変更する。Mustang<sup>TM</sup>SおよびQは0.8 m孔を有するポリエーテルサルホン(P E S)でできており、Sartobind<sup>TM</sup>Sは3 ~ 5 m孔を有する再生セルロースでできている。結合能を増やすために、各製造業者は、複数層のメンブレンを各装置に組み合わせている。層の合計数と厚さは、製造業者と造られた装置の大きさに応じて異なる。メンブレン体積(M V)は、メンブレンの物理的な体積(固体および空所)であって、m Lを単位にして測定される。複数のスケールを表す様々なメンブレン装置をこの研究に用いた。表2は試験した各メンブレンの付属詳細を挙げる。

## 【0059】

## 濾過システム

小規模の試験は、統合した定量ポンプ、圧力センサおよびインラインp H、伝導率およびU Vセンサを含むプログラム可能なプロセス精製システムであるAKTA Explorer<sup>TM</sup>1 0 0(GE Healthcare, Fairfield, Connecticut)にて実施した。エクスプローラシステムは、コンピュータ実行UNICORN<sup>TM</sup>v 5.1 0 ソフトウェア(GE Healthcare, Fairfield, Connecticut)によりプログラムし、制御した。また、小規模試験は、Masterflex<sup>TM</sup>L / S(登録商標)デジタルエコノミードライブペリスタル型ポンプ(Cole-Parmer, Vernon Hills, Illinois)、インラインD T X<sup>TM</sup>プラスT N F - R圧力センサ(Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey)およびA N D E K - 1 2 0 0 i バランス(A & D Company, Ltd., Tokyo, Japan)からなる手動システムを用いて実施した。バランスを用いて、質量蓄積を測定することによってポンプの流速を物理的に

10

20

30

40

50

モニターした。質量は体積に変換して 1.0 g / mL のフィードストリーム密度とみなした。インライントランスデューサからの圧力とバランスからの質量は、コンピュータ実行 TrendLink™ バージョン 3.1.1 (Canary Labs Inc., Martinsburg, Pennsylvania) 及び ResCom バージョン 2.40 (A&D Company, Ltd., Tokyo, Japan) ソフトウェアをそれぞれ圧力及び質量採取のために連結している NetzDAQ™ 2640A / 41A ネットワークデータ獲得システム (Fluke, Everett, Washington) を使用して継続的にモニターした。スケールアップ研究は、AKTA Pilot™ (GE Healthcare, Fairfield, Connecticut) 実行 UNICORN™ v 5.10 ソフトウェアを使用して実施した。Pilot は大きなポンプを具備しているが、エクスプローラと機能的に同等であった。

## 【0060】

10

## 濾過試料採取技術

濾過液は 3 つの異なる方法で採取した。任意抽出試料および分画は最も共通していた。任意抽出試料は、特定の流量で行われる濾過液の瞬間的な一定量である。分画は、より大きな濾過液試料であって、流量範囲によって定められる。また、濾過液は、単一の大きなプールとして回収した。プール分析は有効であるが、連続的な試料を組み合わせて傾向を示すので、任意抽出試料および分画は mAb および CHOP レベルをモニターするために概して有用である。

## 【0061】

20

## 実験

原料は、低温貯蔵 (2 ~ 8 又は -70 以下) から取り出し、室温に戻した。その後場合によって、適切な滴定試薬 (すなわち 1.5 M トリス塩基又は 1 M クエン酸塩) 又は希釈液 (精製水又は 5 M 塩化ナトリウム) を用いて表 1 に示す条件から調整した pH および / または伝導率とした。次いで、0.2 mM Millipak-20 (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts)、Acropak™ 20 (Pall Corporation, East Hills, New York) 又は 1000 mL 真空フィルター (Thermo Fisher Scientific, Rochester, New York) を用いてオフラインで濾過し、低温貯蔵又は調整している間に形成された沈殿物を取り除いた。

濾過システムは、精製水又は適切なバッファを使用して負荷 (load) および濾過ラインを水で流すことによって調整した。メンブレンは、給水ポンプおよび圧力センサの下流にインラインで配置し、次いで、50 ~ 500 MV の精製水又は平衡化バッファにて洗い流した。洗い流した後、供給口をメンブレンに向かわせ、333 ~ 2667 MV / 時間の一定流速で様々な量を流した。負荷 (load) 段階の間、濾過液は必要に応じて試料採取した。次いで、メンブレンはバッファにて追跡し、残留する生成物を採取した。メンブレン上の不純物の保持を維持するために、追跡 (a.k.a バッファ) バッファは、概して pH を同じにし、供給口への伝導率と等しいか又は低くした。

場合によって、メンブレン吸着体を溶出した。メンブレン溶出は、Explorer 又は Pilot を用いてのみ行い、インライン UV センサによって貯蔵を容易にした。メンブレンは、高塩バッファ (20 mM 酢酸ナトリウム及び 350 mM 塩化ナトリウム, pH 5.5 又は 25 mM トリス及び 250 mM 塩化ナトリウム, pH 8.0) を用いて、333 ~ 2667 MV / 時間の一定流量で溶出し、0.5 - 0.5 OD からプールした。

## 【0062】

40

## 連続操作

AKTA Explorer にて連続操作実験を行った。これらの実験において、Q カラムフロースルーパーは、インラインで pH 調整し、Mustang™ S メンブレンへ直ちにロードした。Q カラムは、Q セファロースファストフロー樹脂 (直径 × 長さ : 1.1 cm × 20 cm) を含む。カラム放出口は、T 型接続の入口に付着させ、「B ポンプ」を T 型接続の逆の入口に向けることによってインラインで pH 調整を行った。T 型接続により十分に混合し、pH 調整した溶液を Mustang™ S メンブレンの入口に向かわせた。カラムの流速は、100 cm / 時間 (1.58 mL / 分) に維持した。メンブレンの流速は、インライン pH 調整による液体添加により、わずかに高かった (およそ 2.2 %)。

50

## 【0063】

## 結果

## 小規模陽イオン交換(CEX)メンブレン性能

pH 5.5 および 6.0 mS/cm の MAb1 陰イオン交換プールは、667 MV / 時間の一定流速の小規模 0.18 mL の Mustang<sup>TM</sup> S メンブレンにて処理した。MAb1 の pH は pI の 3.4 pH 単位以下であるので、抗体は正に荷電した。フィードおよび濾過液任意抽出試料は MAb および宿主細胞不純物について分析した。図 1 は、Mustang<sup>TM</sup> S がまず最初に 38 から 4.3 ppm へ CHOP を稀釀したことを示す。負荷(load)密度が 16000 g/L へ増加するにつれ、CHOP は 5.7 ppm まで僅かに上昇した。また結果から、5000 g/L の後におよそ 100% に達する高収率が達成されたことが示された。  
10

MAb および電荷依存性を同定するために、MAb2 陰イオン交換プールは、pH 5.5 および 8.0 の Mustang<sup>TM</sup> S にて処理した。MAb2 のフィードストリームを等しく分け、第一のものは pH 8.0 および 5.0 mS/cm に維持し、第二のものは 1 M のクエン酸を使用して pH 5.5 および 6.4 mS/cm に調整した。両方のフィードストリームは、667 MV / 時間の一定流速の小規模 0.18 mL の Mustang<sup>TM</sup> S メンブレンにより処理した。pH 5.5 および 8.0 の MAb2 は pI 以下であったので、正に荷電した。フィードおよび濾過液任意抽出試料を分析し、CHOP の結果を図 2 に示す。pH 5.5 では、Mustang<sup>TM</sup> S はまず最初に 51 から 3.0 ppm へ CHOP を低減し、MAb1 と同様に、負荷密度によってレベルが増加した。メンブレン性能は pH 8.0 で激減したことから、明らかに CHOP 吸着は pH 依存的であることが示された。図 3 は、収率が両 pH 条件で同じであり、96% 以上は、およそ 5000 g/L の負荷密度の後に達成できることを示す。  
20

粗フィードストリームにおける吸着性能を評価するために、pH 5.5 および 3.2 mS/cm の MAb1 プロテイン A プールは、1333 MV / 時間の一定流速の小規模 0.18 mL の Mustang<sup>TM</sup> S メンブレンにて処理した。MAb1 負荷は算出した pI の 3.4 単位以下であったので、抗体は正に荷電した。負荷、濾過液分画および溶出試料を分析し、CHOP の結果を図 4 に示す。データは、Mustang<sup>TM</sup> S がまず最初に 438 から 109 ppm へ CHOP を低減したことを示す。負荷密度が 55, 300 g/L に近づくにつれ、CHOP は 318 ppm へ増加した。メンブレンは、高い塩を含有する溶液を使用して溶出した。塩イオンを用いて電荷を保護し、それにより静電的相互作用を崩壊させ、タンパク質をメンブレン表面から脱着させ、移動相に遊動する。溶出プールの分析により不純物の濃縮が示され、このことから CHOP が静電力によりメンブレンに結合することが確認される。  
30

## 【0064】

## 小規模の陰イオン交換(AEX)メンブレン性能

比較のために、MAb3 は、7.7 の等電点より上の陰イオン交換メンブレンを用いて試験するために選択した。タンパク質は高 pH で脱アミドおよび凝集する傾向があるので、MAb1 および 2 について同様な試験を行わなかった。pH 5.5 および 9 mS/cm の陽イオン交換プールは、1.5 M のトリス塩基を使用して 8.0 に pH 調整した。次いで、フィードストックを 3 つの異なるプールに分け、伝導率は純水を使用して調整した。第一プールは 10 mS/cm、第二および第三のプールはそれぞれ 7 mS/cm および 4 mS/cm に調整した。3 つすべてのプールは pH 8.0 に維持した。次いで、各フィードストリームは、600 MV / 時間の一定流速の小規模 0.35 mL の Mustang<sup>TM</sup> Q にて処理した。pH 8.0 の MAb3 は pI より 0.3 pH 単位上であったので、抗体は負に荷電した。負荷および濾過液プールを分析し、CHOP の結果を図 5 に示す。データから、4 mS/cm では、Mustang<sup>TM</sup> Q が 180 から 0.6 ppm へ CHOP を低減し、不純物クリアランスが、おそらくイオンシールドによって高い伝導率で減少したことが示される。図 5 は、pH が pI よりたった 0.3 単位のみ上であったにもかかわらず、MAb3 の電荷が強く、10 mg/mL より多くの結合が可能であったことを示す。  
40  
50

す。CHOPクリアランスと同様に、mAb3結合も高い伝導率で減少した。図6は、mAb3の収率が急増し、およそ1000g/Lの後に96%を上回ったことを示す。

#### 【0065】

##### AEXメンブレンとCEXメンブレンを組み合わせた方法

MAb4を用いて、陰イオンおよび陽イオン両方の交換メンブレンを使用して連続的な常在性タンパク質置換工程を使用することの実現可能性を試験した。6.7のpIが非常に低く、等電点より上および下両方のpH条件での処理が可能であったので、MAb4は望ましかった。pH5.0および3.5mS/cmのプロテインAプールは、1.5Mのトリス塩基を使用してpH8.0および4mS/cmに調整した。次いで、フィードストックは、1333MV/時間の一定流速の小規模0.18mLのMustang<sup>TM</sup>Qメンブレンにより処理した。pH8.0のmAb4はpIの1.3単位上であったため、抗体は負に荷電した。Mustang<sup>TM</sup>Q濾過液分画の試料を採取し、次いで組み替えて、1Mのクエン酸を使用してpH5.5および6.1mS/cmに調整した。次いで、組み替えたプールは、1333MV/時間の一定流速の小規模0.18mLのMustang<sup>TM</sup>Sメンブレンにより処理した。pH5.5のmAb4はpIの1.2pH単位より小さかったので、抗体は正に荷電した。負荷および濾過液分画を分析し、両メンブレンのCHOP結果を図7に示す。データは、Mustang<sup>TM</sup>Qがまず最初に1215から555ppmへCHOPを低減し、負荷密度が1700g/Lに近づくにつれ、レベルが徐々に726ppmまで増加したことを示す。また、結果から、組み替えたMustang<sup>TM</sup>Q濾過液分画を5.5にpH調整した後、CHOPは375ppmに減少したことが示される。CHOPの減少の正確な原因はわからない。Mustang<sup>TM</sup>Sを用いたその後の試験の結果は、負荷密度が1500g/Lに近づくにつれ、CHOPレベルが143ppmまでさらに低減し、再びおよそ168ppmまで徐々に増加したことを示す。まとめると、結果から、宿主細胞不純物をさらに低減するためにメンブレン工程を組み合わせることが実行可能であることが示される。

#### 【0066】

##### カラムとメンブレンを組み合わせた連続法

MAb1を用いて、常在性タンパク質置換様式で動作するイオン交換メンブレンと直列にしたおよび連続的なカラムクロマトグラフィの使用の実現可能性を試験した。2回実行した。Run1の間、カラムとメンブレンを別々に分析し(バッチ様式)、Run2の間、カラムとメンブレンを順次同時に行った(連続様式)。Run1のバッチ操作は、以下の通りである。調整したmAb1プロテインAプール(pH8.0および4.7mS/cm)は、Qセファロースファストフローカラムに流した。Q Seph FF負荷のpHはpIより0.9pH単位低かったので抗体が正に荷電したことから、樹脂とmAbとの間に反発力が生じた。作動モードは、従来のフロースルーカラムクロマトグラフィとして特徴を表されてよい。フロースルー任意抽出試料を実行全体にわたって採取した。カラムは、およそ136g/Lの樹脂を負荷した。Q Seph FFプールを採取し、1Mのクエン酸を使用してpHを5.5および6mS/cmに調整した。次いで、およそ15,000g/Lのメンブレンの負荷密度に対して、538MV/時間の小規模0.18mLのMustang<sup>TM</sup>Sメンブレンにて処理した。メンブレン負荷のpHは算出したpIよりもおよそ3.4単位低かったので、抗体は正に荷電した。メンブレン溶出物任意抽出試料は、実行全体を通して採取した。用いたMustang<sup>TM</sup>Sメンブレンを破棄し、Q Seph FFカラムは0.5MのNaOHを使用して再生し、そして0.1NのNaOHに貯蔵した。Run2は、Run1と同様の方法で行った。しかしながら、Q Seph FFフロースルーはインラインでpH調整し、次いでMustang<sup>TM</sup>Sメンブレン上にすぐに流した。負荷およびカラム/メンブレン任意抽出試料を分析し、CHOP結果は、バッチ(Run1)および連続的(Run2)実験について図8にまとめる。データから、プロテインAプールのCHOPがQセファロースカラムにより1450ppmからおよそ16.8ppmに低減したことが示される。16.8ppmのQプール値は実行全体で得た任意抽出試料結果に基づいて算出した。バッチおよび連続的なMustang<sup>TM</sup>S結

10

20

30

40

50

果(12.7および11.1 ppm)は、良好な一致を示す。まとめると、このデータから、単一の連続工程にカラムとメンブレンの工程を連結することが可能であり、従来のバッヂ操作に相当する結果が得られることが示される。

#### 【0067】

##### メンブレン製造業者間の比較

Sartobind<sup>TM</sup> Sメンブレンはメンブレン供給元間の性能を比較するためにmAb1を用いて試験した。pH 5.5および6 mS/cmのmAb1陰イオン交換プールは、857 MV / 時間の一定流速の小規模0.14 mLのSartobind<sup>TM</sup> Sメンブレンにて処理した。mAb1負荷pHはpIより3.4 pH単位低かったので、抗体は正に荷電した。フィードおよび濾過液分画をCHOPについて分析し、結果を図9に示す。データから、Sartobind<sup>TM</sup> Sはまず最初に29から3.3 ppmへCHOPを低減し、およそ11,500 g / Lの後に、レベルは5.6 ppmまで僅かに増加したことが示される。このデータは、Sartobind<sup>TM</sup> SおよびMustang<sup>TM</sup> Sのメンブレンが同様なCHOP吸着を有することを示す。

#### 【0068】

##### 流速効果

Mustang<sup>TM</sup> S CHOPクリアランスは、333~2667 MV / 時間で調べ、流速の影響を試験した。pH 5.5および6 mS/cmのMAb1陰イオン交換プールは、同じ装置ロットからの4つの異なる小規模0.18 mLのMustang<sup>TM</sup> Sメンブレンにて処理した。mAb1負荷はpIより3.4 pH単位低かったので、抗体は正に荷電した。フィードおよび濾過液任意抽出試料はCHOPについて分析し、結果を図10に示す。データは、Mustang<sup>TM</sup> Sがまず最初に45からおよそ6.9 ppmまでCHOPを低減したことを示す。16,000 g / Lの後、CHOPは、8.7 ppmの平均へ増加した。孔拡散が制限されていないメンブレン装置について予測されたように、この結果はCHOP吸着が流速依存性であることを示す。

#### 【0069】

##### スケールアップ

試験規模Mustang<sup>TM</sup> Sメンブレンを用いて、スケールアップによるCHOPクリアランスおよび収率を検査した。最小の完全な代表装置が有用だったので、10 mLの16層装置を選択した。メンブレン層の数、プリーツおよび装置の組み立ては大きな産業規模カプセルと同じだったので、完全な代表であると考えた。10 mLの装置は、既に試験した小規模装置のスケールの55倍の増加を表す。pH 5.5および6 mS/cmのMAb1陰イオン交換プールは、AKTA Pilot<sup>TM</sup>を使用して試験規模の吸着体により処理した。mAb1負荷はpIより3.4 pH単位低かったので、抗体は正に荷電した。再現性の感覚を得るために、mAb1負荷を同じ10 mL装置にて2回試験した。サイクルの間に、メンブレンは、高塩バッファ(2 mM 酢酸ナトリウム、350 mM 塩化ナトリウム、pH 5.5)にて溶出させ、0.5 MのNaOHを使用して再生した。すべての相間の流速は546 MV / 時間とした。フィードおよび濾過任意抽出試料および溶出プールはCHOPについて分析し、結果を図11に示す。このデータは、サイクル間で良好な再現性を示したことから、Mustang<sup>TM</sup> Sが少なくとも一回再生しうることを示す。溶出試料の分析により不純物の濃縮が示されたことから、CHOPが静電力によってメンブレンに結合することが二度確認された。mAb1の前述の小規模結果との比較から、CHOPおよび収率の良好な一致が示された。このデータは、小規模の装置が大規模の性能を予測することが可能なことを示す。

#### 【0070】

##### 結論

イオン交換メンブレンは、フロースルー様式のクロマトグラフィと同じ様式であるが、mAb結合を引き起こすpHおよび伝導率の条件でCHOPを除去するのに有効であることが示された。この技術は、常在性タンパク質置換イオン交換メンブレンクロマトグラフィと呼ばれている。この技術を用いて、収率、精製および工程時間を維持するために従来

10

20

30

40

50

の樹脂充填カラムサイズによっては生じ得た実質的な収率損失を伴わないで、C H O P を浄化することができることが、結果から示された。このデータは、プロテイン A およびイオン交換カラムクロマトグラフィを用いて既に部分的に精製が行われた m A b を、M u s t a n g <sup>T M</sup> S、S a r t o b i n d <sup>T M</sup> S および M u s t a n g <sup>T M</sup> Q を用いて 96 % 以上の収率で 10 ppm より低い C H O P レベルにまでさらに精製することができることを示した。低 C H O P レベルは高い負荷密度で維持され、場合によって、性能は 16,000 g / L に維持された。結果は、不純物クリアランスが負荷 pH に依存しており、通常は、より高い伝導率により減少することを示した。さらに、実現可能性試験により、複数のメンブレンを組み合わせて用いると不純物レベルがさらに低減できること、そして、カラムおよびメンブレン工程を単一の連続する精製工程に統合することができることが示された。M u s t a n g <sup>T M</sup> S と S a r t o b i n d <sup>T M</sup> S との間の比較から、同様な不純物クリアランスが示された。メンブレンには顕著な差異があるが、結果は類似していたことから、不純物除去のメカニズムはメンブレン依存性でない。333 ~ 2667 M V / 時間の流速での試験結果は、メンブレン性能は流速とは無関係であるとする理論および文献と一致していた。。最後に、55 倍の規模を表す中間装置による実験は、小規模メンブレンと同様な性能を示した。このデータから、小規模の装置から産業規模の性能を予測することが可能であることが確認された。さらに、二重反復試験間の試験規模装置の塩化ナトリウムおよびその後の水酸化ナトリウムクリーニングは、メンブレン吸着体が再生し、性能を損なうことなく 2 回以上使うことができるることを示した。

さらに良好な精製技術が必要とされていることは明らかである。バイオリアクタータイマーの増加はカラムベースの精製基盤に過度な負担をかけ、単に樹脂結合能を増すだけではその必要に応じ得ない。さらに、商品のコストを抑えるために、この産業界はより便利で、費用効果の高い方法を必要としている。質量処理量を増やす一方で、メンブレン吸着体は小さくかつ使い捨てであり、検証や人件費を抑える。常在性タンパク質置換モードで作動されるイオン交換メンブレンの実験結果が高い不純物クリアランスおよび収率を示したことから、この技術は生物学的処理の魅力的な選択肢となる。

#### 【 0 0 7 1 】

表 1 : フィードストリーム特徴。

生成物	上流の工程	名称	pH	伝導率 mS/cm	濃度 g/L	IgG 種類	pI <sup>b</sup>
mAb 1	プロテイン A <sup>a</sup>	プロテイン A プール	5.5	3.2	5.9-6.9	1	8.9
mAb 1	プロテイン A、その後陰イオン交換フロースルー <sup>a</sup>	陰イオン交換 プール	5.5	6.0	4.8	1	8.9
mAb 2	プロテイン A、その後陰イオン交換フロースルー	陰イオン交換 プール	8.0	5.0	5.4	1	9.3
mAb 3	プロテイン A、その後陽イオン交換結合／溶出	陽イオン交換 プール	5.5	9.0	4.1	1	7.7
mAb 4	プロテイン A プール <sup>a</sup>	プロテイン A プール	5.0	3.5	3.2	4	6.7

フィードストック試料は、産業規模、試験的規模および小規模の工程から採取した。

<sup>a</sup> プールの pH および伝導率は、十分な生成物安定性を確認するために予め調整した。

<sup>b</sup> 等電点 (p I) は、各 m A b のアミノ酸配列に基づいて算出した。

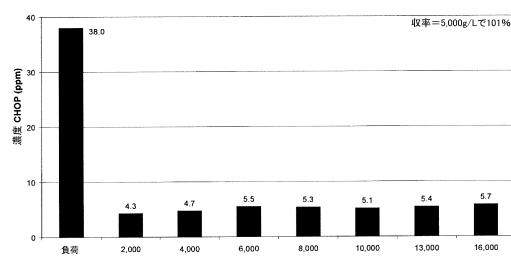
#### 【 0 0 7 2 】

表 2 : メンブレン特性

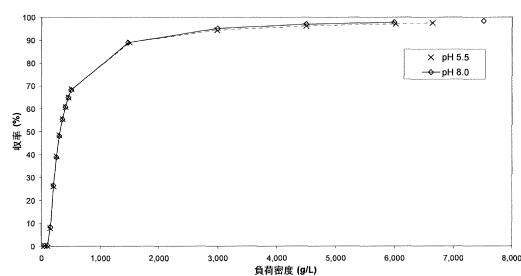
メンブレン	装置	部品番号	層 No.	メンブレン 体積(MV) mL	孔径 μm
Mustang <sup>TM</sup> S	25 mm Acrodisc <sup>®</sup>	MSTG25S6	6	0.18	0.8
Mustang <sup>TM</sup> S	Capsule	CLM05MSTGSP1	16	10	0.8
Sartobind <sup>TM</sup> S	25 mm MA5	S5F	1	0.14	3-5
Mustang <sup>TM</sup> Q	Coin	MSTG18Q16	16	0.18	0.8
Mustang <sup>TM</sup> Q	25 mm Acrodisc <sup>®</sup>	MSTG25Q6	6	0.35	0.8

10

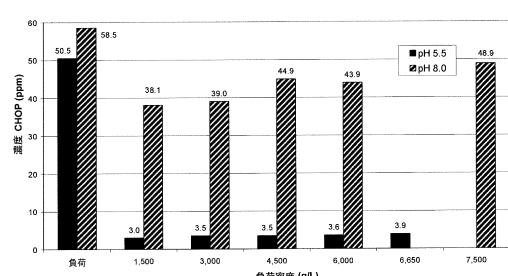
【図1】

図1:pH5.5, 6.0mS/cm, Mustang<sup>TM</sup> S(小規模, 0.18mL MV, 667MV/時間)のmAb1陰イオン交換プールのCHOPクリアランス。

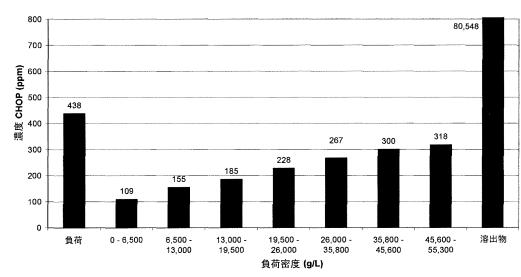
【図3】



【図2】

図2:pH5.5および6.4mS/cmとpH8.0および5.0mS/cmのMustang<sup>TM</sup> S(小規模, 0.18mL MV, 667MV/時間)のmAb2陰イオン交換プールのCHOPクリアランス。

【図4】



【図5】

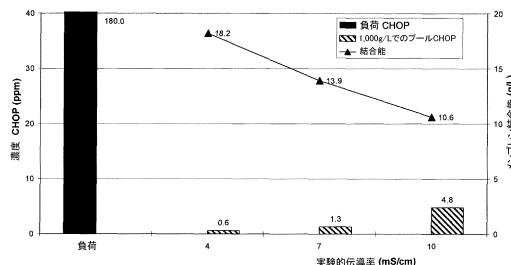


図5:pH8.0、Mustang™ Q(小規模、0.35mL MV、600MV／時間)のmAb3のCHOP(棒グラフ)および抗体結合能(線グラフ)。

【図6】

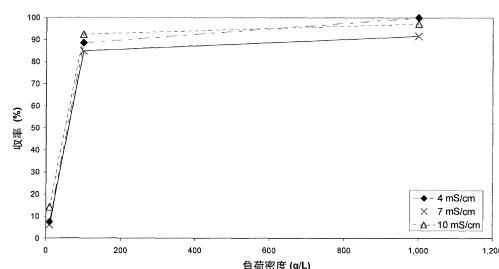


図6:pH8.0、Mustang™ Q(小規模、0.35mL MV、600MV／時間)のmAb3陽イオン交換プールの収率。

【図7】

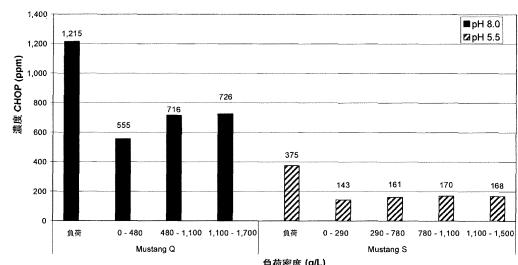


図7:pH8.0および4.0mS/cm、Mustang™ Q(小規模、0.18mL MV、1333MV／時間)、その後pH5.5および6.1mS/cm、Mustang™ S(小規模、0.18mL MV、1333MV／時間)でのmAb4のCHOPレベル。

【図8】

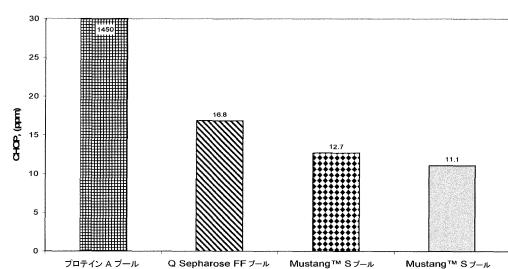


図8:100cm／時間のフロースター様式で実行したQセファロースファストフローカラムによりpH8.0および4.7mS/cm(ストライプ)、その後pH5.5および6mS/cm(小規模、0.18mL MV、538MV／時間)のハッチ様式(菱形)および連続様式(灰色)のMustang™ Sによって更に精製したmAb1のCHOPクリアランス。

【図9】

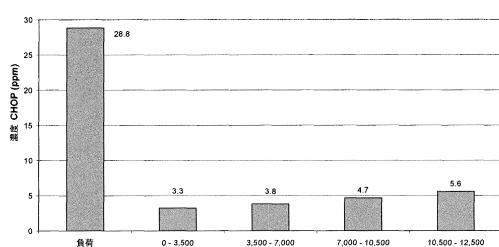


図9:pH5.5および6mS/cm、Sartobind™ S(小規模、0.14mL MV、857MV／時間)でのmAb1のCHOPクリアランス。

【図11】

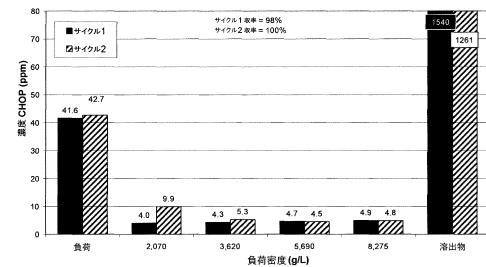


図11:pH5.5および6mS/cm、Mustang™ S(バイロットスケール、10mL MV、546MV／時間)でのmAb1のCHOPクリアランス。

【図10】

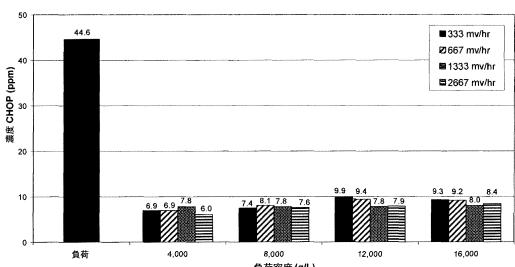
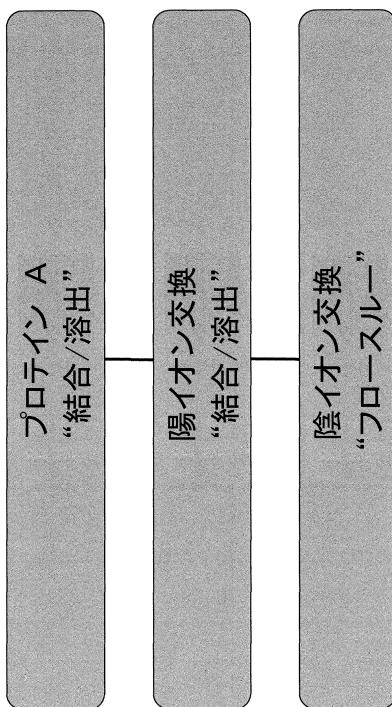
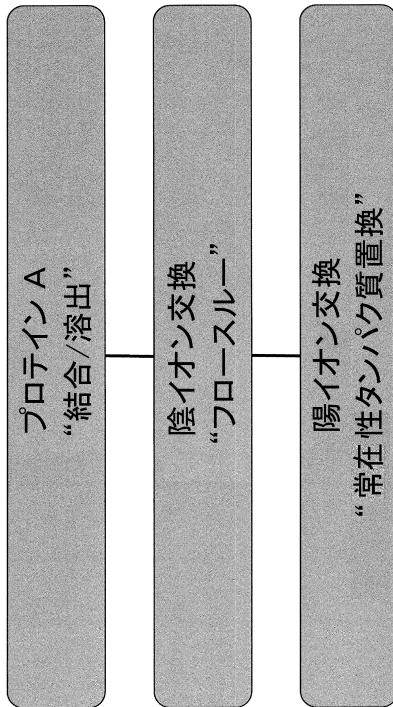


図10:pH5.5および6mS/cm、Mustang™ S(小規模、0.18mL MV)でのmAb1のCHOPクリアランス。

【図12】

**Figure 12**

【図13】

**Figure 13**

---

フロントページの続き

(72)発明者 ピル, ジェローム, ジュニア  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94117, サンフランシスコ, オークストリート 1  
032

(72)発明者 タリー, ティモシー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94110, サンフランシスコ, ドロレスストリート  
1004

(72)発明者 ダウド, クリストファー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002, ベルモント, アニタアヴェニュー 921

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 國際公開第2008/057683 (WO, A1)  
J.Chromatogr., Vol.591(1992)p.107-113  
Biotechnol.Prog., Vol.22(2006)p.341-349  
J.Chromatogr.A, Vol.907(2001)p.145-154

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 1/36  
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)