

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6807859号
(P6807859)

(45) 発行日 令和3年1月6日(2021.1.6)

(24) 登録日 令和2年12月10日(2020.12.10)

(51) Int.Cl.	F 1
C07K 1/22	(2006.01) C07K 1/22
C07K 16/00	(2006.01) C07K 16/00
A61K 39/395	(2006.01) A61K 39/395 K
B01D 15/20	(2006.01) B01D 15/20
B01D 15/36	(2006.01) B01D 15/36

請求項の数 13 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-548109 (P2017-548109)
(86) (22) 出願日	平成28年3月11日 (2016.3.11)
(65) 公表番号	特表2018-510867 (P2018-510867A)
(43) 公表日	平成30年4月19日 (2018.4.19)
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/021984
(87) 国際公開番号	W02016/149088
(87) 国際公開日	平成28年9月22日 (2016.9.22)
審査請求日	平成31年2月8日 (2019.2.8)
(31) 優先権主張番号	62/132,974
(32) 優先日	平成27年3月13日 (2015.3.13)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	391015708 ブリストルマイヤーズ スクイブ カンパニー
	B R I S T O L - M Y E R S S Q U I B B C O M P A N Y
	アメリカ合衆国O 8 5 4 3 ニュージャージー州 プリンストン、ルート206アンド ・プロビンス・ライン・ロード
(74) 代理人	100100158 弁理士 鮫島 瞳
(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】クロマトグラフィーにおける不純物を取り除くためのアルカリ洗浄の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象のタンパク質および一以上の混入物を含む混合物から対象のタンパク質を精製する方法であって、対象のタンパク質が抗体であり、混合物が、哺乳類培養細胞であり、以下を含む方法：

a) 混合物を第1のクロマトグラフィーマトリックスにさらす、ここで対象のタンパク質は第1のクロマトグラフィーマトリックスに結合し、第1のクロマトグラフィーが、プロテインAアフィニティーコロマトグラフィーおよびプロテインGアフィニティーコロマトグラフィーから選択されるアフィニティーコロマトグラフィーである；

b) 第1のクロマトグラフィーマトリックスを第1の洗浄溶液と接触させる、ここで第1の洗浄溶液はpHが約9.5から約10.5の間であり、第1の洗浄溶液は約0.01~1.0Mの範囲の濃度の炭酸ナトリウムおよび約0.5~2Mの範囲の濃度の塩化ナトリウムを含み、アルギニンまたはアルギニン誘導体を含まない；および

c) 第1のクロマトグラフィーマトリックスから溶出溶液中に対象のタンパク質を溶出する。

【請求項 2】

アフィニティーコロマトグラフィーがプロテインAアフィニティーコロマトグラフィーである、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

モノクローナル抗体がヒト抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体からなる群から選択される、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

第 1 の洗浄溶液の pH が約 9.6 である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

第 1 の洗浄溶液の pH が約 10.4 である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

第 1 の洗浄溶液の後に、第 1 のクロマトグラフィーマトリックスを第 2 の洗浄溶液と接觸させることをさらに含む、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法、ここで第 2 の洗浄溶液は pH が少なくとも 9.0 であり、アルギニンまたはアルギニン誘導体を含まない。

10

【請求項 8】

第 2 の洗浄溶液の後に、第 1 のクロマトグラフィーマトリックスを第 3 の洗浄溶液と接觸させることをさらに含む、請求項 7 記載の方法、ここで第 3 の洗浄溶液は pH が約 6 と約 7 の間であり、アルギニンまたはアルギニン誘導体を含まない。

【請求項 9】

第 2 の洗浄溶液が約 0.01 ~ 1.0 M の範囲の濃度の炭酸ナトリウムを含む、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

混合物を一以上のさらなるクロマトグラフィーマトリックスにさらす、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 11】

一以上のさらなるクロマトグラフィーマトリックスが、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、陰イオン交換クロマトグラフィーまたは陽イオン交換クロマトグラフィー）、疎水性相互作用クロマトグラフィー、およびミックスモードクロマトグラフィーから選択される、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

混合物が、回収された培養細胞液、培養細胞上清、および条件培養細胞の上清、細胞溶解物、および清澄化したバルクから選択される、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 13】

哺乳類培養細胞がチャイニーズハムスター卵巣（CHO）培養細胞である、請求項 1 から 12 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【背景技術】****【0001】**

関連する出願への相互参照

この出願は 2015 年 3 月 13 日に出願された、米国仮出願番号 No. 62/132,974 の優先権を主張し、それらの全ての内容は引例により本明細書に含まれる。

【0002】

40

本発明の背景

タンパク質の大規模かつ経済的な精製は、バイオ医薬品業界のますます重要な問題である。治療用タンパク質は通常、対象のタンパク質をコードする遺伝子を含む組み替えプラスミドから対象のタンパク質を発現するように設計された、原核生物または真核生物の細胞株を用いて生成する。細胞に与えられる成分と細胞の副産物との混合物からの所望のタンパク質の十分な（例えばヒトの治療に十分使用できる）純度での分離は、生物製剤の製造者に対して恐るべき課題として提起されている。

【0003】

従って当分野において、培養細胞から得られる抗体などのタンパク質に基づく治療薬の大規模な処理を促進するために用いることができる、別のタンパク質精製法が必要とされ

50

ている。

【発明の概要】

【0004】

ある実施態様において、本発明は、対象のタンパク質および一以上の混入物を含む混合物から対象のタンパク質を精製する方法を提供する、ここでこの方法は以下を含む：a) 混合物を第1のクロマトグラフィーマトリックスにさらす、ここで対象のタンパク質は第1のクロマトグラフィーマトリックスに結合する；b) 第1のクロマトグラフィーマトリックスを第1の洗浄溶液と接触させる、ここで第1の洗浄溶液はpHが少なくとも9.0であり、アルギニンまたはアルギニン誘導体を含まない；c) 第1のクロマトグラフィーマトリックスから溶出溶液に対象のタンパク質を溶出する。例示すると、混入物は、宿主細胞タンパク質、宿主細胞の代謝物、宿主細胞の構成タンパク質、核酸、内毒素、ウイルス、生成物に関連する混入物、脂質、培地添加物および培地派生物から選択される。場合により、第1のクロマトグラフィーはアフィニティークロマトグラフィー（例えば、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーまたはプロテインGアフィニティークロマトグラフィー）である。好ましくは、アフィニティークロマトグラフィーはプロテインAアフィニティークロマトグラフィーである。例示すると、対象のタンパク質は、抗体、抗体断片、およびFc融合タンパク質から選択される。代表的な対象のタンパク質はモノクローナル抗体（限定されないが、ヒト、ヒト化およびキメラ抗体を含む）などの抗体である。

【0005】

ある特徴的な実施態様において第1の洗浄溶液のpHは約9から約11の間である。場合により、第1の洗浄溶液のpHは約9.5から約10.5の間である（例えば、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、または10.5）。第1の洗浄溶液の代表的なpHは約9.6である。第1の洗浄溶液の別の代表的なpHは約10.4である。

【0006】

ある特徴的な実施態様において、この方法は、第1の洗浄溶液の後、第1のクロマトグラフィーマトリックスを第2の洗浄溶液と接触させることをさらに含む、ここで第2の洗浄溶液はpHが少なくとも9.0であり、アルギニンまたはアルギニン誘導体を含まない。例えば第1の洗浄溶液は、約0.01～1.0Mの範囲の濃度の炭酸ナトリウムおよび約0.5～2Mの範囲の濃度の塩化ナトリウムを含む。例えば第2の洗浄溶液は、約0.01～1.0Mの範囲の濃度の炭酸ナトリウムを含む。

【0007】

ある特徴的な実施態様において、混合物は一以上のさらなるクロマトグラフィーマトリックスにさらされる。例示すると、第1のクロマトグラフィーはアフィニティークロマトグラフィーであり、一以上のさらなるクロマトグラフィーマトリックスは、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、陰イオン交換クロマトグラフィーまたは陽イオン交換クロマトグラフィー）、疎水性相互作用クロマトグラフィー、およびミックスモードクロマトグラフィーから選択される。場合により、混合物は、回収された培養細胞液、培養細胞上清、条件培養細胞の上清、細胞溶解物、および清澄化したバルク(clarified bulk)から選択される。例えば、培養細胞(cell culture)は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)培養細胞など、哺乳類培養細胞である。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、標準的な精製方法および新規の方法の概観を示す。

【図2】図2は、CHO-HCPの減少に対する様々なpHでの洗浄の効果を示す。

【図3】図3は、CHO-HCPの減少に対する高いpHでの洗浄の効果を示す。

【図4】図4は、CHO-DNAの排除能のレベルに対する高いpHでの洗浄の効果を示す。

【図5】図5は、残留しているプロテインAのレベルに対する高いpHでの洗浄の効果を

10

20

30

40

50

示す。

【図6】図6は、CHO-HCPレベルの減少における、別 の方法での効率の比較を示す。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明の詳細な説明

本発明は、アフィニティーコロマトグラフィーを用いるタンパク質の精製中に不純物を除去する、効果の高い、独特な手段を提供する。具体的には、本手法は非常に高いpH(例えば、9~11)のアルカリ洗浄溶液を利用する。アルカリ洗浄溶液の別の特徴は、それらはアルギニンまたはアルギニン誘導体の存在を必要としないことである。アルカリ洗浄溶液は、アフィニティーコロマトグラフィーマトリックスに適用されるフィード物質からの、宿主細胞のタンパク質(HCP)の除去に極めて効果的である。下記の研究例に示すように、この手法は頑強で、異なるmAbサブクラスに効果的に利用できる。アフィニティーコロマトグラフィーにおけるこのような洗浄溶液の使用は、高い処理収率および生成物の完全性を維持する。加えてこの手法は、処理の効率を上げ、展開時間を短くする。

【0010】

ある実施態様において、本発明は、対象のタンパク質および一以上の成分を含む混合物から、対象のタンパク質を精製する方法を提供する、ここでこの方法は以下を含む：a)混合物を第1のクロマトグラフィーマトリックスにさらす、ここで対象のタンパク質は第1のクロマトグラフィーマトリックスに結合する；b)第1のクロマトグラフィーマトリックスを第1の洗浄溶液と接触させる、ここで第1の洗浄溶液はpHが少なくとも9.0であり、アルギニンまたはアルギニン誘導体を含まない；c)第1のクロマトグラフィーマトリックスから溶出溶液に対象のタンパク質を溶出する。例示すると、混入物は、宿主細胞タンパク質、宿主細胞の代謝物、宿主細胞の構成タンパク質、核酸、内毒素、ウイルス、生成物に関連する混入物、脂質、培地添加物および培地派生物から選択される。場合により、第1のクロマトグラフィーはアフィニティーコロマトグラフィー(例えば、プロテインAアフィニティーコロマトグラフィーまたはプロテインGアフィニティーコロマトグラフィー)である。好ましくは、アフィニティーコロマトグラフィーはプロテインAアフィニティーコロマトグラフィーである。例示すると、対象のタンパク質は、抗体、抗体断片、およびFc融合タンパク質から選択される。代表的な対象のタンパク質はモノクローナル抗体(限定されないが、ヒト、ヒト化およびキメラ抗体を含む)などの抗体である。

【0011】

ある特徴的な実施態様において、第1の洗浄溶液のpHは約9から約11の間である。場合により、第1の洗浄溶液のpHは約9.5から約10.5の間である(例えば、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、または10.5)。第1の洗浄溶液の代表的なpHは約9.6である。第1の洗浄溶液の別の代表的なpHは約10.4である。

【0012】

ある特徴的な実施態様において、この方法はさらに、第1の洗浄溶液の後、第1のクロマトグラフィーマトリックスを第2の洗浄溶液と接触させることを含む、ここで第2の洗浄溶液は最低でもpH9.0であり、アルギニンまたはアルギニン誘導体を含まない。場合により、この方法はさらに、第2の洗浄溶液の後、第1のクロマトグラフィーマトリックスを第3の洗浄溶液と接触させることを含む、ここで第3の洗浄溶液のpHは約6から約7の間であり、アルギニンまたはアルギニン誘導体を含まない。例えば第1の洗浄溶液は、約0.01~1.0Mの範囲の濃度の炭酸ナトリウムおよび約0.5~2Mの範囲の濃度の塩化ナトリウムを含む。例えば第2の洗浄溶液は、約0.01~1.0Mの範囲の濃度の炭酸ナトリウムを含む。

【0013】

ある特徴的な実施態様において、混合物は一以上のさらなるクロマトグラフィーマトリ

ックスにさらされる。例示すると、第1のクロマトグラフィーはアフィニティークロマトグラフィーであり、一以上のさらなるクロマトグラフィーマトリックスは、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、陰イオン交換クロマトグラフィーまたは陽イオン交換クロマトグラフィー）、疎水性相互作用クロマトグラフィー、およびミックスモードクロマトグラフィーから選択される。場合により、混合物は、回収された培養細胞液、培養細胞上清、条件培養細胞の上清、細胞溶解物、および清澄化したバルクから選択される。例えば、培養細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）培養細胞など、哺乳類培養細胞である。

【0014】

I. 定義

10

本開示はより簡単に理解されるように、特定の用語を最初に定義する。本出願において、本明細書で他に明確に与えられる場合を除き、下記の各用語は下記で説明する意味を持つものとする。さらなる定義は、本出願のあらゆる場所で、説明される。

【0015】

本明細書において、用語「対象のタンパク質」は、最も広い意味で用いられ、混合物内に存在する、精製が望まれるあらゆるタンパク質（天然または組み替え体のどちらでも）を含む。そのような対象のタンパク質は、限定ではなく、ホルモン、成長因子、サイトカイン、免疫グロブリン（例えば、抗体）、および免疫グロブリン様ドメインを含む分子（例えば、アンキリンまたはフィブロネクチンドメインを含む分子）を含む。

【0016】

20

本明細書において、「培養細胞」は液体培地中の細胞を指す。場合により、培養細胞はバイオリアクターに含まれている。培養細胞中の細胞は、例えば細菌、菌、昆虫、哺乳類または植物を含む、あらゆる組織由来で良い。特別な実施態様において、培養細胞中の細胞は、対象のタンパク質（例えば、抗体）をコードする核酸を含む発現コンストラクトを遺伝子導入された細胞を含む。適切な液体培地は、例えば、栄養培地および非栄養培地を含む。特別な実施態様において、培養細胞は、例えば濾過または遠心分離による精製を受けていない、栄養培地中のチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株を含む。

【0017】

本明細書において、用語「清澄化したバルク」は粒子状物質が十分に除去された混合物を指す。清澄化したバルクは、培養細胞、または例えば濾過や遠心によって、細胞もしくは細胞のデブリが十分に除去された細胞溶解液を含む。

30

【0018】

本明細書において、「バイオリアクター」は当該技術において認識される意味を持ち、培養細胞の成長を制御するために設計されたチャンバーを指す。バイオリアクターは細胞、例えば哺乳類細胞、の培養のために有用である限り、いかなるサイズでもよい。通常、バイオリアクターは少なくとも30mLであり、少なくとも1、10、100、250、500、1000、2500、5000、8000、10,000、12,000リットルもしくはそれ以上、またはいかなるその中間の容積でもよい。限定されないが、pHおよび温度を含むバイオリアクターの内部状態は、通常、培養期間中は制御されている。適切なバイオリアクターは、ガラス、プラスチックもしくは金属を含む、培養条件下で培地中に懸濁された培養細胞を保持するのに適切な、そして細胞の成長および生存能力を助長する、いかなる物質でできていてもよい（すなわち、構成されていてもよい）；ここでこの物質は対象のタンパク質の発現または安定性を妨害すべきでない。当業者は本発明を実行する際に使用する適切なバイオリアクターを知っており、選択できる。

40

【0019】

本明細書において、「混合物」は、（精製が望まれる）対象のタンパク質および一以上の混入物、すなわち不純物、を含む。一つの実施態様において、混合物は対象のタンパク質（天然または組み替え）を発現する宿主細胞または組織から生成する。このような混合物は、例えば、培養細胞、細胞溶解液、および清澄化したバルク（例えば、清澄化した培養細胞上清（clarified cell culture supernatant））を含む。

50

【0020】

本明細書において、用語「分離する」および「精製する」は可換的に用いられ、対象のタンパク質（例えば抗体）を含む混合物からの混入物の選択的な除去を指す。

【0021】

本明細書において、用語「混入物」は、最も広い意味で用いられ、混合物中のあらゆる望まれない成分または化合物を包含する。培養細胞、細胞の溶解液、または清澄化したバルク（例えば、清澄化した培養細胞上清）において、混入物は、例えば培養細胞の培地中に存在する宿主細胞の核酸（例えば、DNA）および宿主細胞タンパク質を含む。宿主細胞の混入物であるタンパク質は、限定ではなく、宿主細胞から生成した天然または組み替え体、同様に対象のタンパク質（例えば、タンパク質分解の断片）に関連または由来するタンパク質、および他の方法に関連する混入物を含む。ある実施態様において、混入物の沈殿は、当分野で認められた方法、例えば遠心分離、無菌濾過、深層濾過およびタンジェンシャルフローフィルトレーション、を用いて培養細胞から分離される。

【0022】

本明細書において、「遠心分離」は、産業および研究室環境で使用される、遠心による不均一な混合物の沈降のための、遠心力の使用を含む方法である。この方法は、二つの混ざらない液体を分離するために用いられる。例えば、本発明の方法では、遠心分離は、限定ではないが、培養細胞または精製した培養細胞上清またはキャップチャーカラムに捕捉された溶出プールを含む混合物から、混入物の沈殿を除去するために用いることができる。

【0023】

本明細書において、「無菌濾過」は膜フィルターを用いる濾過法である。ここで膜フィルターは通常、微生物や小さな粒子を効率的に除去するため、孔のサイズが0.2 μmであるフィルターである。例えば、本発明の方法では、無菌濾過は、限定ではないが、培養細胞または清澄化した培養細胞上清またはキャップチャーカラムに捕捉された溶出プールを含む混合物から、混入物の沈殿を除去するために用いることができる。

【0024】

本明細書において、「深層濾過」は深層フィルターを用いる濾過法である。ここで深層フィルターは通常、フィルターマトリックス内の孔のサイズの範囲による粒子を保持する設計によって特徴付けられる。深層フィルターの容量は通常、深さ、例えば10インチまたは20インチのマトリックス、つまり固体の保持容量によって定義される。例えば、本発明の方法では、深層濾過は、限定ではないが、培養細胞または清澄化した培養細胞上清またはキャップチャーカラムに捕捉された溶出プールを含む混合物から、混入物の沈殿を除去するために用いることができる。

【0025】

本明細書において、用語「タンジェンシャルフローフィルトレーション」は、試料の混合物は膜の上部を横切るように循環するが、特定の溶質および小さな分子は加えた圧力によって膜を通過する、濾過法を指す。例えば、本発明の方法では、タンジェンシャルフローフィルトレーションは、限定ではないが、培養細胞または清澄化した培養細胞上清またはキャップチャーカラムに捕捉された溶出プールを含む混合物から、混入物の沈殿を除去するために用いることができる。

【0026】

本明細書において、用語「クロマトグラフィー」は、混合物中の対象の溶質、例えば対象のタンパク質を、吸着剤を通じる混合物の浸出によって、混合物中の他の溶質から分離する方法を指す。ここで吸着剤は、この方法における特定の緩衝液条件下において、溶質の性質、例えばpI、疎水性、サイズおよび構造、によって程度の差はあるが強く、溶質を吸着または保持する。本発明の方法では、クロマトグラフィーは、限定ではないが、培養細胞または清澄化した培養細胞上清またはキャップチャーカラムに捕捉された溶出プールを含む混合物から沈殿が除去された後、混入物を除去するために用いることができる。

【0027】

用語「イオン交換」および「イオン交換クロマトグラフィー」は、対象の溶質が、混合

10

20

30

40

50

物中の溶質の不純物または混入物よりも多くまたは少なく、帯電している化合物と非特異的に相互作用するようにするようなpHおよび伝導率の適切な条件下において、対象のイオン化できる溶質（例えば、混合物中の対象のタンパク質）を、固相のイオン交換物質と連結（例えば、共有結合によって）した逆に帯電するリガンドと相互作用させる、クロマトグラフィーの方法を指す。混合物中の混入物の溶質は、対象の溶質よりも早くまたは遅く、イオン交換物質のカラムから洗浄され得、また樹脂に結合もしくは樹脂から排除される。「イオン交換クロマトグラフィー」は特に、陽イオン交換、陰イオン交換、およびミックスマードクロマトグラフィーを含む。

【0028】

語句「イオン交換物質」は、負に帯電している（すなわち、陽イオン交換樹脂または膜）または正に帯電している（すなわち陰イオン交換樹脂または膜）固相を指す。一つの実施態様において、電荷は、一以上の帯電しているリガンド（または吸着剤）と固相との結合、例えば共有結合、によって与えられ得る。あるいは、または加えて、電荷は、固相の本質的な性質であり得る（例えばシリカのように、全体に負の電荷を持つ場合）。

【0029】

「陽イオン交換樹脂」または「陽イオン交換膜」は、負に帯電し、固相を通過するまたは通る水溶液中の陽イオンとの交換のための遊離の陽イオンを有する、固相を指す。陽イオン交換樹脂の形成に適した固相と結合するあらゆる負に帯電したリガンドが使用できる（例えば、カルボン酸塩、スルホン酸塩、および下記のような他のリガンド）。商業的に利用できる陽イオン交換樹脂は、限定されないが、例えば、スルホン酸塩をベースにする群（例えば、GE HealthcareのMonoS、MiniS、Source 15Sおよび30S、SP SEPHAROSE（登録商標）Fast Flow、SP SEPHAROSE（登録商標）High Performance、TosohのTOYOPEARL（登録商標）SP-650SおよびSP-650M、BioRadのMACRO-PREP（登録商標）High S、Ceramic HyperD S、TRISACRYL（登録商標）MおよびLS SPならびにPall TechnologiesのSpherodex LS SP）；スルホエチルをベースにする群（例えば、EMDのFRACTOGEL（登録商標）SE、Applied BiosystemsのPOROS（登録商標）S-10およびS-20）；スルホプロピルをベースにする群（例えば、TosohのTSK Gel SP 5PWおよびSP-5PW-HR、Life TechnologiesのPOROS（登録商標）HS-20、HS 50、ならびにPOROS（登録商標）XS）；スルホイソブチルをベースにする群（例えば、EMDのFRACTOGEL（登録商標）EMD SO₃⁻）；スルホキシエチルをベースにする群（例えば、WhatmanのSE52、SE53およびExpress-Ion S）、カルボキシメチルをベースにする群（例えば、GE HealthcareのCM SEPHAROSE（登録商標）Fast Flow、Biochrom Labs Inc.のHydrocell CM、BioRadのMACRO-PREP（登録商標）CM、Pall TechnologiesのCeramic HyperD CM、TRISACRYL（登録商標）M CM、TRISACRYL（登録商標）LS CM、MilliporeのMatrx CELLUFINE（登録商標）C500およびC200、WhatmanのCM52、CM32、CM23およびExpress-Ion C、TosohのTOYOPEARL（登録商標）CM-650S、CM-650MならびにCM-650C）；スルホン酸およびカルボン酸をベースにする群（例えば、J.T. BakerのBAKERBON D（登録商標）Carboxy-Sulfon）；カルボン酸をベースにしている群（例えば、J.T. BakerのWP CBX、Dow Liquid SeparationsのDOWEX（登録商標）MAC-3、Sigma-AldrichのAMBERLITE（登録商標）Weak Cation Exchangers、DOWEX（登録商標）Weak Cation Exchanger、およびDIAION（登録商標）Weak Cation ExchangersならびにEMDのFRACTOGEL（登録商標）EMD COO-）；スルホン酸をベースにする群（例えば、Biochrom Labs Inc.のHydrocell SP、Dow Liquid SeparationsのDOWEX（登録商標）Fine Mesh Strong Acid Cation Resin、J.T. BakerのUNOsphere S、WP Sulfonic、SartoriusのSARTOBIND（登録商標）S membrane、Sigma-AldrichのAMBERLITE（登録商標）Strong Cation Exchangers、DOWEX（登録商標）Strong CationおよびDIAION（登録商標）Strong Cation Exchanger）；およびオルトリン酸塩をベースにする群（例えば、WhatmanのP11）を持つものを含む。

【0030】

「陰イオン交換樹脂」または「陰イオン交換膜」は、正に帯電している固相を指し、したがってその固相は自身に結合する一以上の正に帯電するリガンドを持つ。陰イオン交換樹脂の形成に適した固相と結合するあらゆる正に帯電したリガンドが使用できる（例えば

10

20

30

40

50

、四級アミノ基）。商業的に利用できる陽イオン交換樹脂は、Applied BiosystemsのDEAE cellulose、POROS（登録商標）PI 20、PI 50、HQ 10、HQ 20、HQ 50、D 50、Sartorius のSARTOBIND（登録商標）Q、GE HealthcareのMonoQ、MiniQ、Source 15Qおよび30Q、Q、DEAEおよびANX SEPHAROSE（登録商標）Fast Flow、Q SEPHAROSE（登録商標）High Performance、QAE SEPHADEX（登録商標）およびFAST Q SEPHAROSE（登録商標）、J.T. Baker のWP PEI、WP DEAM、WP QUAT、Biochrom Labs Inc.のHydrocell DEAEおよびHydrocell QA、BioradのUNOsphere Q、MACRO-PREP（登録商標）DEAEおよびMACRO-PREP（登録商標）High Q、Pall TechnologiesのCeramic HyperD Q、ceramic HyperD DEAE、TRISACRYL（登録商標）MおよびLS DEAE、Spheredex LS DEAE、QMA SPHEROSIL（登録商標）LS、QMA SPHEROSIL（登録商標）MおよびMUSTANG（登録商標）Q、Dow Liquid SeparationsのDOWEX（登録商標）Fine Mesh Strong Base Type IおよびType II Anion ResinsおよびDOWEX（登録商標）MONOSPHERE 77、weak base anion、MilliporeのINTERCEPT（登録商標）Q membrane、Matrex CELLUFINE（登録商標）A200、A500、Q500、およびQ800、EMDのFRACTOGEL（登録商標）EMD TMAE、FRACTOGEL（登録商標）EMD DEAEおよびFRACTOGEL（登録商標）EMD DMAE、Sigma-AldrichのAMBERLITE（登録商標）weak strong anion exchangers type IおよびII、DOWEX（登録商標）weakおよびstrong anion exchangers type IおよびII、DIAION（登録商標）weakおよびstrong anion exchangers type IおよびII、DUOLITE（登録商標）、TosohのTSK gel QおよびDEAE 5PWおよび5PW-HR、TOYOPEARL（登録商標）SuperQ-650S、650Mおよび650C、QAE-550Cおよび650S、DEAE-650Mおよび650C、WhatmanのQA5 2、DE23、DE32、DE51、DE52、DE53、Express-Ion DおよびExpress-Ion Q、ならびにSartorius Corporation, New York, USAのSARTOBIND（登録商標）Qを含む。
10

【0031】

「ミックスモードイオン交換樹脂」、「ミックスモードイオン交換膜」、または「ミックスモード」は、陽イオン性、陰イオン性、および／または疎水性部分で共有結合的に修飾した固相を指す。ミックスモードイオン交換樹脂の例は、BAKERBOND（登録商標）ABX (J.T. Baker; Phillipsburg, NJ)、ceramic hydroxyapatite type IおよびIIおよびfluoride hydroxyapatite (BioRad; Hercules, CA)ならびにMEPおよびMBI HyperCel (Pall Corporation; East Hills, NY)を含む。

【0032】

「疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂」または「疎水性相互作用クロマトグラフィー膜」は、フェニル、オクチル、またはブチルの化合物で共有結合的に修飾した固相を指す。疎水性相互作用クロマトグラフィーは、疎水性の性質を利用してタンパク質同士を分離する、分離技術である。この種類のクロマトグラフィーでは、フェニル、オクチル、またはブチルのような疎水基が固相のカラムに結合している。その表面に疎水性アミノ酸側鎖を持つ、カラムを通るタンパク質は、カラム上の疎水基と相互作用し、結合できる。疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂の例は以下を含む：(1) Butyl FF、Butyl HP、Octyl FF、Phenyl FF、Phenyl HP、Phenyl FF (high sub)、Phenyl FF (low sub)、Capto Phenyl ImpRes、Capto Phenyl (high sub)、Capto Octyl、Capto Butyl ImpRes、Capto Butyl (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)；(2) TOYOPEARL（登録商標）Super Butyl-550 C、TOYOPEARL（登録商標）Hexyl-650C、Butyl-650C、Phenyl-650C、Butyl 600 M、Phenyl-600M、PPG-600M、Butyl-650M、Phenyl-650M、Ether-650M、Butyl-650S、Phenyl-650S、Ether-650S、TSKgel Phenyl-5PW、TSKgel Ether-5PW (Tosoh Bioscience, Tokyo, Japan)；(3) MACRO-PREP（登録商標）-butyl、MACRO-PREP（登録商標）-methyl (Bio-Rad)；および(4) SARTOBIND（登録商標）Phenyl (Sartorius corporation, New York, USA)。
30

。

【0033】

I I . 対象のタンパク質

ある態様において、本発明の方法は、商業、実験、または他の応用において有益である、製薬、診断、農業、および／またはあらゆる多様な他の性質を持つタンパク質を含むが、これらに限定されない、いかなる対象のタンパク質の精製に使用してもよい。加えて、
40

対象のタンパク質はタンパク質治療薬であってもよい。ある実施態様において、本発明の方法で精製されたタンパク質を、プロセシングまたは修飾しても良い。例えば、本発明に従って得られる対象のタンパク質をグリコシル化しても良い。

【0034】

したがって、本発明は、薬剤または商業に関連する酵素、レセプター、レセプター融合タンパク質、抗体（例えば、モノクローナルまたはポリクローナル抗体）、抗体の抗原結合性フラグメント、Fc融合タンパク質、サイトカイン、ホルモン、調節因子、成長因子、凝固／凝血因子、または抗原結合性物質などの、いかなる治療用タンパク質生成のための細胞を培養するのに用いてもよい。上記のタンパク質のリストは実際には単なる代表例であり、限定列挙の意図はない。当業者は、本発明に従って他のタンパク質が生成できることがわかり、そのようなタンパク質を生成するために本明細書に開示された方法を用いることができる。

【0035】

本発明の一つの特別な実施態様において、本発明の方法で精製されるタンパク質は抗体である。用語「抗体」は、モノクローナル抗体（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）、抗体断片、イムノアドヘシンおよび抗体-イムノアドヘシンキメラを包含する最も広い意味で用いる。

【0036】

「抗体断片」は全長抗体の少なくとも一部分、および通常、その抗体結合領域または可変領域を含む。抗体断片の例はFab、Fab'、F(ab')₂、およびFvフラグメント；单鎖抗体分子；二重特異性抗体；直鎖状抗体；および設計された抗体断片から形成する多重特異性抗体を含む。

【0037】

用語「モノクローナル抗体」は、通常の意味で用いられ、集団を構成する個々の抗体が、少量存在し得る天然に生じ得る変異を除いて同一であるような、ほぼ均一な抗体の集団から得られる抗体を指す。モノクローナル抗体は高い特異性を持ち、单一の抗原部位に対して作られる。これは、抗原の種々の決定因子（エピトープ）から作られる多様な抗体を通常含む、ポリクローナル抗体の調製とは対照的である。一方、モノクローナル抗体は抗原の単一の決定因子に対して作られる。用語「モノクローナル」は、抗体を述べる場合、抗体のほぼ均一の集団から得られるという、抗体の特徴を示し、ある特定の方法による抗体の生成が必要であるとは解釈されない。例えば、本発明で使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)が最初に述べた従来のハイブリドーマ技術を用いて生成してもよく、または組み替えDNA法（例えば、U.S. Patent No. 4,816,567参照）を用いて作成してもよい。モノクローナル抗体はまた、ファージ抗体ライブライマーから、例えばClackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); ならびにU.S. Patent Nos. 5,223,409; 5,403,484; 5,571,698; 5,427,908; 5,580,717; 5,969,108; 6,172,197; 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; および6,593,081)に記述された技術を用いて単離してもよい。

【0038】

本明細書に記載されるモノクローナル抗体は、重鎖および/または軽鎖の一部分が、特定の種に由来するまたは特定の抗体の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、同一または相同であるが、鎖の残部は、別の種に由来するまたは別の抗体のクラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同である、「キメラ」および「ヒト化」抗体を含み、所望の生物活性を示す限り、そのような抗体のフラグメントも同様に含む（U.S. Patent No. 4,816,567; およびMorrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)）。非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態とは、非ヒトイムノグロブリン由来の極小の配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域の残基を、所望の特異性、親和性、および容量を持つマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト靈長類などの非ヒト種（ドナー抗体）の

10

20

30

40

50

超可変領域の残基と置換した、ヒトイムノグロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの例において、ヒトイムノグロブリンにおける Fv フレームワーク領域（FR）の残基を対応する非ヒト残基によって置換する。さらに、ヒト化抗体はレシピエント抗体またはドナー抗体内にない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の能力をさらに洗練するためになされる。一般的に、ヒト化抗体はほぼ全ての、少なくとも一つ、通常二つの、可変領域を含み、ここで、全てまたはほぼ全ての超可変ループは非ヒトイムノグロブリンのものに対応し、全てまたはほぼ全ての FR 領域はヒトイムノグロブリン配列のものである。場合により、ヒト化抗体はまたイムノグロブリン（通常はヒトイムノグロブリン）の定常部（Fc）の少なくとも一部分を含む。さらなる詳細は、Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); および Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992) 参照。 10

【0039】

キメラまたはヒト化抗体は上記の様に調製するマウスモノクローナル抗体の配列に基づいて調製できる。重鎖および軽鎖イムノグロブリンをコードする DNA は対象のマウスのハイブリドーマから得られ、通常の分子生物学の技術を用いて非マウス（例えばヒト）イムノグロブリン配列を含むように設計できる。例えば、キメラ抗体を作製するため、当分野で知られた方法（例えば、U.S. Patent No. 4,816,567 to Cabilly et al. 参照）を用いて、マウスの可変領域をヒトの定常部と連結してもよい。ヒト化抗体を作製するため、当分野で知られた方法（例えば、U.S. Patent No. 5,225,539 to Winter、ならびに U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762; および 6,180,370 to Queen et al. 参照）を用いて、マウスの CDR 領域をヒトのフレームワークに挿入してもよい。 20

【0040】

本明細書で記述するモノクローナル抗体はまた「ヒト」抗体を含み、これは、例えばヒト患者の血液を含む様々な供給源から単離でき、またはトランスジェニック動物を用いて組換えにより調製できる。このようなトランスジェニック動物の例は、ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖の導入染色体(transchromosome) (WO 02/43478 参照) を持つ KM-MOUSE (登録商標) (Medarex, Inc., Princeton, NJ)、XENOMOUSE (登録商標) (Abgenix, Inc., Fremont CA; 例えば、U.S. Patent Nos. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584; および 6,162,963 to Kucherlapati et al. に記述)、および HUMAB-MOUSE (登録商標) (Medarex, Inc.; 例えば、Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research, 20:6287-6295 (1992); Chen, J. et al., International Immunology, 5:647-656 (1993); Tuailion et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:3720-3724 (1993); Choi et al., Nature Genetics, 4:117-123 (1993); Chen, J. et al., EMBO J., 12:821-830 (1993); Tuailion et al., J. Immunol., 152:2912-2920 (1994); Taylor, L. et al., International Immunology, 6:579-591 (1994); および Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology, 14:845-851 (1996); U.S. Patent Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 5,770,429; および 5,545,807; ならびに PCT Publication Nos. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884, WO 99/45962, および WO 01/14424 to Korman et al. に記述) を含む。本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト抗体応答が免疫によって発生できるように、ヒト免疫細胞を再構成した SCID マウスを用いて調製できる。このようなマウスは例えば、U.S. Patent Nos. 5,476,996 および 5,698,767 to Wilson et al. で記述されている。 40

【0041】

I.I.I. 対象のタンパク質を含む混合物

本発明の方法は、対象のタンパク質を含むあらゆる混合物に適用できる。一つの実施態様において、混合物は、精製しようとするタンパク質（例えば、天然または遺伝子的に設計される）を発現する生細胞から得られるか、または、それによって生成される。場合により、培養細胞中の細胞は、対象のタンパク質をコードする核酸を含む発現コンストラクトを遺伝子導入した細胞を含む。タンパク質を生成するために、細胞を遺伝子操作する方法は当分野でよく知られている。例えば、Ausubel et al., eds., Current Protocols in 50

Molecular Biology, Wiley, New York (1990)ならびにU.S. Patent Nos. 5,534,615および4,816,567参照、これらはそれぞれ、引用により本明細書に明確に組み入れられる。このような方法は、タンパク質をコードし、発現を可能にする核酸を、生きた宿主細胞に導入することを含む。これらの宿主細胞は、培養液中で成長する、細菌性細胞、真菌細胞、昆虫細胞または、好ましくは動物細胞であり得る。細菌性宿主細胞は、限定されないが、大腸菌細胞を含む。適切な大腸菌株の例は：HB101、DH5、GM2929、JM109、KW251、NM538、NM539、および外来のDNAを切断できないかなる大腸菌株をも含む。用いられる真菌宿主細胞は、限定ではないが、サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)、ピキア・パストリス(Pichia pastoris)およびアスペルギルス(Aspergillus)細胞を含んでもよい。昆虫細胞は、限定ではないが、カイコ(Bombyx mori)、ヨトウガ(Mamestra brassicae)、ツマジロクサヨトウ(Spodoptera frugiperda)、イラクサギンウワバ(Trichoplusia ni)、キイロショウジョウワバ(Drosophila melanogaster)を含んでもよい。

【0042】

多くの哺乳類細胞株は、対象のタンパク質発現のための適切な宿主細胞である。哺乳類宿主細胞株は、例えば、COS、PER.C6、TM4、VERO076、DXB11、MDCK、BRL-3A、W138、Hep G2、MMT、MRC 5、FS4、CHO、293T、A431、3T3、CV-1、C3H10T1/2、Colo205、293、HeLa、L cells、BHK、HL-60、FRhL-2、U937、HaK、Jurkat cells、Rat2、Baf3、32D、FDCP-1、PC12、M1x、マウスミエローマ(例えば、SP2/0およびNS0)およびC2C12細胞、ならびに形質転換した靈長類細胞株、ハイブリドーマ、正常二倍体細胞、ならびに一次組織および初代外植片のインビトロ培養由来の細胞株を含む。当業者がよく知る方法を用いて、新しい動物細胞株を樹立できる(例えば、形質転換、ウイルス感染、および/または選定)。対象のタンパク質を発現できるあらゆる真核細胞を、開示する培養細胞法において使用してよい。多数の細胞株が、アメリカン・タイプ・カルチャ・コレクション(American Type Culture Collection)(ATCC(登録商標))のような、商業的供給源から利用できる。本発明の一つの実施態様において、細胞培養、例えば大規模細胞培養、はハイブリドーマ細胞を用いる。抗体を生成するハイブリドーマ細胞の構成は当分野でよく知られている。本発明の一つの実施態様において、細胞培養、例えば大規模細胞培養、はCHO細胞を用いて、抗体などの対象のタンパク質を生成する(例えば、WO 94/11026参照)。様々な種類のCHO細胞が当分野で知られている(例えば、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DXB11、CHO/dhfr⁻およびCHO-S)。

【0043】

特徴的な実施態様において、本発明の方法は高濃度の対象のタンパク質(例えば、抗体)を含む混合物(例えば、培養細胞、細胞溶解液または清澄化したバルク)からの混入物の効率的な除去を含む。例えば、対象のタンパク質の濃度は、約0.5から約50mg/ml(例えば、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50mg/ml)の範囲でもよい。

【0044】

混合物の調製はまずタンパク質の発現様式に依存する。いくつかの細胞系は細胞から周囲の成長培地へタンパク質(例えば、抗体)を直接分泌するが、他の細胞系では細胞内に抗体を保持する。細胞内に生成するタンパク質のために、細胞は、機械的剪断、浸透圧刺激、および酵素処理など、あらゆる多様な方法を用いて破壊され得る。この破壊は細胞の全内容物をホモジネートへ放出し、加えて遠心分離や濾過で除去できる細胞内断片を生じる。細胞の自然死およびタンパク質生成の実行中における細胞内宿主細胞タンパク質の放出のため、直接分泌するタンパク質においても、より少ない程度ではあるが、同様の問題が生じる。

【0045】

一つの実施態様において、細胞または細胞のデブリは、例えば、清澄化したバルクの調製のため、混合物から除去される。本発明の方法では、細胞または細胞のデブリを除去するあらゆる適切な方法論が使用できる。タンパク質が細胞内に生成する場合、第1の工程として、本明細書に記述した(すなわち対象のタンパク質を精製する)方法に従って精製

10

20

30

40

50

をする混合物の調製のために、宿主細胞または溶解したフラグメントのどちらかである粒子状のデブリを、例えば遠心分離または濾過の工程によって除去できる。タンパク質が培養液内に分泌される場合、対象のタンパク質を精製する混合物の調製のために、組み替え宿主細胞を、例えば、遠心分離、タンジェンシャルフローフィルトレーションまたは深層濾過によって培養細胞培地から分離できる。

【0046】

I V . 高い pH (アルカリ性) の洗浄溶液

本発明の方法は第1のクロマトグラフィーマトリックス (例えば、アフィニティーコロマトグラフィーマトリックス) を pH が少なくとも 9.0 であるアルカリ洗浄溶液と接触させることを含む。このようなアルカリ洗浄溶液はアルギニンまたはアルギニン誘導体の存在を必要としない。場合により、このようなアルカリ洗浄溶液は、緩衝作用のない塩を含んでも含まなくてもよい。

10

【0047】

ある実施態様において、アルカリ洗浄溶液の pH は約 9 から約 11 の間である。場合により、第1の洗浄溶液の pH は約 9.5 から約 10.5 の間 (例えば、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、または 10.5) である。第1の洗浄溶液の代表的な pH は約 9.6 である。第1の洗浄溶液の別の代表的な pH は約 10.4 である。場合により、アルカリ洗浄溶液は炭酸ナトリウムを含む。場合により、アルカリ洗浄溶液は塩化ナトリウムを含む。特徴的な実施態様において、アルカリ洗浄溶液は約 0.01 ~ 1.0 M の範囲の濃度の炭酸ナトリウムおよび約 0.5 ~ 2 M の範囲の濃度の塩化ナトリウムを含み、約 9.5 から約 10.5 の間の pH を持つ。

20

【0048】

場合により、本方法はさらに第1のクロマトグラフィーマトリックス (例えば、アフィニティーコロマトグラフィーマトリックス) を第2のアルカリ洗浄溶液と接触させることを含む。第2のアルカリ洗浄溶液は pH が少なくとも 9.0 であり、アルギニンまたはアルギニン誘導体を含まない。例えば、第2のアルカリ洗浄溶液は約 0.01 ~ 1.0 M の範囲の濃度の炭酸ナトリウムを含む。

【0049】

ある実施態様において、第1のクロマトグラフィー精製に続いて、混合物を一以上のさらなるクロマトグラフィーマトリックスにさらす。例えば、一以上のさらなるクロマトグラフィーマトリックスは、イオン交換クロマトグラフィー (例えば、陰イオン交換クロマトグラフィーまたは陽イオン交換クロマトグラフィー) 、疎水性相互作用クロマトグラフィー、およびミックスモードクロマトグラフィーから選択される。

30

【0050】

本開示をさらに、さらなる限定として解釈すべきでない下記の例によって、説明する。全ての図ならびに本出願の至る所で引用する全ての参考文献、特許および公開された特許出願の内容は、引用により文書全体を本明細書内に明確に組み入れる。

【実施例】

【0051】

イントロダクション

40

臨床の要求のため、多数のモノクローナル抗体が現在、治療に用いるための開発下にある。市場の競合において、バイオ医薬品会社は継続して、前臨床および臨床上の製造における、開発のタイムライン (timeline) の加速およびより効率的な方法の作成に目を向けている。ひとつの手法は、必要な生成物の仕様を満たすように精製のスキームを改良し、合理化することである。この理由のため、各ユニット操作における不純物の排除能の最大化が望まれている [1,4]。しかしながら、精製のフィードストリームは、宿主細胞タンパク質、DNA、外来性および内在性ウイルス、内毒素、および凝集体を含む、除去が重要であり、かつ、困難であり得る様々な不純物を含む。産業上の精製の開発は、これらの生成物の品質特性に追随しており、生成物の承認基準のための一般的なガイドラインを定めて

50

きた（表1）[2,3,4]。不必要な精製の工程はよくタンパク質の回収率を下げ、操作時間および費用を増やし得るため、理想的には、多段階精製スキームにおける各ユニットの操作は全体の生成物の質に対して、指定された役割を持つべきである。にもかかわらず、大規模な精製スキームおよび無関係な手法はよく、方法の頑強性を保証するため、不純物の排除に必要とされる。

【0052】

アフィニティー分離は、mAbとマトリックスに共有結合的に結合しているリガンドとの間の可逆的で特異性の高い相互作用に基づいて分離するため、最も選択的な種類のクロマトグラフィーである[1,4,16]。モノクローナル抗体のフィードストリームから不純物を98%を超えて除去できるため、プロテインAを用いるアフィニティークロマトグラフィーはよく、下流の精製スキームにおいて重要な選定となっている[1,5]。しかしながら、プロテインAを利用する方法は未だ、よく二つから三つの続くクロマトグラフィーのポリッシング工程を必要とする[2,3]。さらに、アフィニティークロマトグラフィーは、下流の処理における最も高価なユニットの操作の一つである[15]。これらの理由のため、開発努力はよく、プロテインAを用いるアフィニティーキャプチャーコロマトグラフィー(affinity capture chromatography)における、不純物の排除能の最大化に焦点を置く。

【0053】

それゆえ、不純物の排除能の改良によってなされる、アフィニティークロマトグラフィーの性能の最適化は大きな興味の対象となっている。20年以上の間、強化した溶出前洗浄の開発は、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーに適用されてきた。いくつかの系統の根拠は、塩、有機溶媒、非イオン性界面活性剤、カオトロープ、疎水性修飾因子、およびアミノ酸の添加は全て、溶出したIgGにおけるHCP含量および凝集体含量の減少を示すことを明らかにしてきた[1,6,7,18,19]。有望である一方で、抗体に対するそれら全体の効果の特徴解析はわずかであるか、存在しないものであった。本研究では、アフィニティークロマトグラフィー中での不純物の排除能を改善するため、出願人はアルカリ洗浄溶液を用いた一般的でない戦略をテストする。出願人はpH9.6および10.4におけるアルカリ性の溶出前洗浄の適用を報告し、溶出した抗体の状態および質を特徴付けるため、一連の分析技術を適用する。これらの分析は、SEC-UPLC、IEF、CE-SDS、SEC-MALS、結合ELISA(Binding ELISA)、示差走査熱量測定、円二色性、CHO-HCP ELISA、DNA、および残留しているProAを含む。

【0054】

「ベースライン」のProA捕捉方法（図1）は一般的に業界標準と考えられている条件を利用する、よって全てのクロマトグラフィーの緩衝液はmAbの等電点より以上低いpHを持つ。結合および洗浄の工程は中性pHで実行し、生成物を酸性pHで溶出する[3,5,6]。ここで、独特な「アルカリ性pH洗浄戦略」の開発によって、ベースラインの捕捉工程をより効率的にした（図1）。結合後、アルカリ性pH洗浄を適用した。ベースラインの工程と同様に、mAbを続けて中性pHの緩衝液で洗浄し、溶出する。

【0055】

アルカリ性pH洗浄戦略の実行は精製のスキームをより効率的にし、二番目のポリッシングの工程の除去を可能とした。この戦略の懸念の一つは、アルカリ性pH条件の使用が、生成物の不安定性、例えば脱アミド化、タンパク質アンフォールディング、および凝集形成、を伴い得ることである[3,8]。3つの異なる生成物において、ベースラインのクロマトグラフィー法と高いpHでの洗浄を用いた捕捉方法との比較後、仮説を立てた生成物の不安定化は観察されなかった。さらに、アルカリ性pH洗浄の実行は生成物に関連する不純物の除去について、特に効果的であった。ここで、我々は、ある工程の必要性を除去するような、アルカリ性pH洗浄を用いる一般的でない戦略を述べ、それにより、より効率的で、費用面も効率的な方法を作成する。

本研究で用いる重要な品質特性および認容された承認基準

【表1】

	品質特性	承認基準
不純物	残留CHO-DNA	≤ 10 pg/mg
	残留CHO-HCP	≤ 100 ng/mg
	残留プロテインA	≤ 100 ng/mg
	残留インスリン	≤ 100 ng/mg
純度	SEC-HPLC (%モノマー)	≥ 95%
	SEC-HPLC (%HMW)	≤ 4%
	pIチャージバリアント (ICIEF)	標準試料と同等
	% SDS-非還元 主要なバンドの純度	≥ 90%
	% SDS-還元 重鎖および軽鎖バンドの純度	≥ 90%

【0056】

試料と方法

培養細胞

完全なヒトモノクローナル抗体を含むチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞の培養細胞上清を用いた。mAb 1 は pI 7.6 の 4 型 IgG 分子であり、mAb 2 は pI 8.4 の IgG1 分子であり、mAb 3 は pI 9.2 の IgG1 分子である。

【0057】

クロマトグラフィー

全てのキャプチャーコロマトグラフィー実験には、GE HealthcareのMabSelect樹脂を用いた。調整用の規模でのカラムベースのクロマトグラフィー実験は、Unicorn 6.3ソフトウェアで制御するAKTA Avant装置(GE Lifesciences)を用いて実行した。全てのカラムは樹脂の製造者の推奨に従って、研究室内で充填した。

【0058】

ベースラインProA 捕捉および洗浄の添加物スクリーン

ロード処理後、カラムを最初に PBS、pH 7.4、二番目に 5 mM コハク酸、pH 5.8 で洗浄する。10 mM リン酸、pH 3.0 緩衝液を用いてカラムから mAb を溶出する。洗浄の添加物の添加による、クロマトグラフィーの性能を評価するため、追加の種々の洗浄を洗浄 1 と洗浄 2 の間に挿入した。テストした種々の洗浄は、20 mM コハク酸 500 mM NaCl、500 mM L-アルギニン pH 5.8、20 mM コハク酸 5% PEG 400 pH 5.8、および 17 mM リン酸ナトリウム 4% カプリル酸 pH 7.4 を含んでいた。

【0059】

高い pH での洗浄戦略を用いる ProA の捕捉

ロード処理後、カラムを最初に PBS、pH 7.4 緩衝液で洗浄し、次に 200 mM 炭酸ナトリウム、1 M 塩化ナトリウム緩衝液、pH 9.6 または 10.4 を用いて、第 2 の洗浄工程を行った。第 2 の洗浄工程の次に、100 mM 炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9.6 または 10.4 を用いて第 3 の洗浄工程に進み、次に 35 mM リン酸ナトリウム、pH 6.0 緩衝液を用いて第 4 の洗浄工程を行う。10 mM リン酸、pH 3.0 緩衝液を用いてカラムから mAb を溶出する。

【0060】

ウイルス不活化、中和および濾過

溶出後、アフィニティーコロマトグラフィーからの生成物のプールは、0.1 N 塩酸を用いて生成物を低い pH (3.4 から 3.6) に調製し、その後 1 時間保つことによって

10

20

30

40

50

、低いpHでのウイルス不活化を受けた。生成物を次に2Mトリスで中和(7.0から7.4)した。中和後の生成物のプールを0.2μMのフィルターで濾過した。

【0061】

ELISA - CHO宿主細胞タンパク質の分析

残留しているCHO宿主細胞タンパク質(CHO - HCP)の定量化のためのELISAを、TECAN(登録商標)リキッドハンドリングシステムを用いて、ハイスループット方式で行った。試料中の宿主細胞タンパク質のレベルを、CHO宿主細胞タンパク質第三世代キット(CHO Host Cell proteins 3rd generation kit)(Cat# F550, Cygnus Technologies, Southport, NC)を用いて、製造者のプロトコルに従って、定量化した。TECAN(登録商標)インフィニットM1000Proリーダーを用いて、450/650nmにおける吸光度を測定した。 10

【0062】

残留しているDNAの分析

試料中に残留しているCHO - DNAのレベルを決定するため、リアルタイム定量PCR(RT - PCR)を用いた。RT - PCRは、MyiQシングルカラーリアルタイムPCR解析システム(Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)を用いて、製造者の指示に従い、SYBR(登録商標)グリーンPCRマスター・ミックス(SYBR(登録商標)green PCR master mix)(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)で行った。

【0063】

残留しているプロテインAの分析

20

残留しているプロテインA(rProA)の定量化のためのELISAを、TECAN(登録商標)リキッドハンドリングシステムを用いて、ハイスループット方式で行った。残留しているプロテインAを、残留プロテインAキット(residual protein A kit)(Cat # 9333-1, Repligen)を用いて、製造者のプロトコルに従って定量化した。TECAN(登録商標)インフィニットM1000Proリーダーを用いて、450/650nmにおける吸光度を測定した。

【0064】

円二色性

円二色性スペクトルを、恒温六連セルチェンジャーを備えるJasco J-815CD分光光度計で収集した。mAb試料を対応する緩衝液に0.25mg/mLとなるように希釈し、スペクトルを260から195nm、1.0mmの経路長の石英セルで25で収集した。データをSpectraManagerソフトウェア(Jasco)で処理し、緩衝液で収集したスペクトルを、各mAbにおける実験上のペプチドの濃度、MW、およびアミノ酸数に基づいて、平均残基構円率に規準化した。 30

30

【0065】

示差走査熱量測定

熱安定性のプロファイルを確認するため、DSCを各ロットのmAbに対して行った。試料を対応する処理緩衝液で0.75mg/mLに標準化した。走査は、10~100の温度勾配を用いて90/時間の勾配速度で、MICROCAL(登録商標)キャピラリーディスク上で行った。緩衝液のみにおける走査のプロファイルを試料の信号から引き、変性中間点(Tm)の値を得るために、データをMICROCAL(登録商標)Origin 7.0分析ソフトウェアを用いて非2状態モデルでフィットした。 40

40

【0066】

SEC - UPLC

サイズ排除クロマトグラフィーを、各捕捉戦略による精製後のmAbの純度を評価するため、Waters' Acuity H-Class Bio UPLC(登録商標)を用いて行った。この検定を行ったため、Acuity UPLC(登録商標)BEH200 SEC 1.7μmカラム(4.6×150mm)を用いた。ここで、移動相はpH 6.8のPBSからなり、1mL/分の流速で実行された。実行中はカラムを常に25で維持した。

【0067】

50

S E C - M A L S

mAbを、インライン inlineの多角度光散乱検出器と連結したサイズ排除クロマトグラフィー(S E C - M A L S)で調べた。Prominence Shimadzu UFCを連結したShodex PROTEIN KW-803カラムで、200 mMリン酸カリウム150 mM塩化ナトリウム、pH 6.8を含み、0.02%アジ化ナトリウムを含む緩衝液中で、0.5 mL/分の流速で、無勾配分離を行った。50 µgの試料をSIL-20AC Prominence Shimadzuオートサンプラーを用いてカラム上に注入し、データを直列につないだ三つのオンライン(online)の検出器から得た；Prominence SPD-20ADダイオードアレイUV/VIS分光光度計に続く、Wyatt miniDAWN TREOS(登録商標)多角度光散乱検出器の後の、Wyatt OPTILAB(登録商標)T-REX示差屈折率検出器。Astra(Wyatt)およびLabsolutions(Shimadzu)を用いて、データを収集し、分析した。分子量およびサイズバリエントのパーセンテージを、分析の専門家によって得られ、同等であるまたは同等でないと要約されたものとして報告した。 10

【0068】

i C I E F

mAbの等電点(pI)のアイソフォームおよび分解物における相対的存在量の分布を知るため、全カラムイメージングのキャピラリー等電点電気泳動(iCIEF)を行った。試料のpI分布を三つの区分：酸性の群、主要なピーク、および塩基性の群、で報告し、各実験における標準試料のpI分布と比較した。pIマーカー(6.14および9.46)を含め、各注入におけるpI値の較正に用いた。試料由来のピーク下の面積を積分し、各区分におけるピークの合計を全面積の積分に対する割合として表すことによって、相対的存在量を各電気泳動図から計算した。 20

【0069】

C E - S D S

mAbに関連するタンパク質種(サブユニット、混入物および分解物)の相対的存在量の分子量(MW)分布を測定するために、SDSを含むゲルを充填したキャピラリー内におけるキャピラリー電気泳動を行った。サイズおよび電気泳動の移動度に基づいて、タンパク質を分離する。この方法では全長30 cm(50 µm ID)、有効な長さ20 cmのキャピラリーおよび214 nmの吸収の定点検出を用いた。注入内の相対的な泳動時間を全ての試料に存在する内部標準(10 kDa)で較正する。相対的な泳動時間および補正したピークの面積を計算し、両脇の標準試料の注入と比較した。CE-SDS分布の相対的存在量を還元条件および非還元条件で別々に評価した。 30

【0070】

結合E L I S A

マイクロプレートを0.5~2.0 µg/mLの抗体で覆った。このプレートを0.05%P B S Tで洗浄し、ブロックした。このプレートを次に再度洗浄し、12の種々の濃度のmAbを添加し、インキュベートした。洗浄後、HRP結合二次抗体を添加した。インキュベーション後、プレートを洗浄し、TMB基質を添加した。プレートリーダー(Tecan Infinite M1000 Pro)で450 nmおよび650 nmにおける信号を測定した。結合曲線を基準試料と比較し、パーセント結合能を決定した。 40

【0071】

溶解度マッピング

それぞれのテストした洗浄緩衝液の溶解度を検査するため、製造者のプロトコルに従つて、脱塩プレート(Thermo Scientific, Cat# 89808)を用いて、ハイスループット方式で、mAbを緩衝液交換した。緩衝液交換後、mAbを19~25で24時間インキュベートし、上記のようにS E - U P L Cで溶解度を評価した。

【0072】

L C / M Sによるトリプシンペプチドマッピング

抗体の試料を還元し、アルキル化し、トリプシンで消化した。トリプシンペプチドをC-18カラム(Waters BEH C18, 1.7 µm 2.1*100 mm 130A)で分離し、215 nmおよび280 nmにおいてUV検出器で検出し、次に質量分析計で検出した(LTQ-Orbitrap-Elite) 50

。無処理のペプチドと、イオンクロマトグラムで選択した修飾したペプチドのピーク面積を比較することにより、相対定量を達成した。

【0073】

結果と考察

アフィニティーコロマトグラフィー中におけるpH 9.6および10.4でのアルカリ性洗浄の有用性を評価するため、方法および生成物の品質特性を調べた。不純物の排除能を、CHO-HCP、CHO-DNA、およびrProAの分析によって調べた。純度のプロファイルを、SEC-HPLC、ICIEF、CE-SDS、およびSEC-MALSを用いて調べた。機能的および構造的な分子の完全性を、結合ELISA、CD、DSC、インタクトマス(intact mass)、N末端ペプチドマッピングを用いて調べた。高いpHでの洗浄およびベースライン洗浄を伴って精製した生成物は同等の回収量であった。mAb 1においては、回収量は90%から99%、mAb 2では84%から90%そしてmAb 3では93%から97%であった。

10

【0074】

不純物の排除能

アフィニティーコロマトグラフィー中における不純物の排除能を最大化するため、出願人は最初にCHO-HCPにおける洗浄のpHの影響に目を向けた。伝統的に、プロテインAクロマトグラフィーでは、ロード処理およびチェイス(chase)に続き、溶出前にpH移行洗浄が適用される。移行洗浄はpHを下げ、溶出のために樹脂を調製することを意図する。ここで、最適なHCP排除能のpH範囲を決定するために、出願人はチェイスと同じ伝導率を用いてpH 7.0ないし10.4の範囲のさらなる洗浄を加えた。図2は洗浄のpHが増加すると、溶出液中のCHO-HCPのレベルが減少することを示す。これらの結果を基に、最も良い不純物の排除能がpH 9.0を超えるpHで観察され、洗浄はテストした最も高いpH(10.4)で、特に有効であった。これらの結果を確かめ、この現象がこのモノクローナル抗体に特異的でないことを確定するため、3つの異なるmAbの精製を、pH 9.6および10.4の洗浄で行った。ここで本研究は、アフィニティーキャプチャー中のアルカリ性pH洗浄の戦略の利用が、mAbのフィードからのCHO宿主細胞タンパク質の除去に有効であることを示す。アフィニティーキャプチャークロマトグラフィー中のアルカリ洗浄の使用は、mAb、rProAリガンド、およびCHO-HCPタンパク質表面の静電的な性質を変えることで、生成物/不純物および/または不純物/樹脂の相互作用を攪乱し、一方、その間にmAbはカラムと結合している。アフィニティーコロマトグラフィー中に、CHO-HCPは、mAbにも、ベースマトリックス(base matrix)にも、rProAリガンドにも結合できる。HCPとmAbとの相互作用が支配的な機構であるという根拠が存在する[6,9,12]。しかしながら、HCPのある一部がベースマトリックス自身[1,2,6]またはrProAリガンド[12,17]と相互作用し得ることもまた明らかである。例えば、二つの異なるpHにおけるアフィニティーカラムからの溶出は、結果として著しく異なった溶出HCPのレベルとなり得る。HCPがmAb、ベースマトリックス、またはrProAリガンドのどれと相互作用するかに関わらず、非常に高いpHでのタンパク質-タンパク質相互作用の攪乱は、非常に有効であることを示す。生成物-不純物相互作用は主に静電的であるが、Mabとリガンドとの結合はより強い。プロテインAは主に、疎水性相互作用に由来する結合エネルギーの大部分による誘導適合により、四つの安定化する水素結合で、抗体と結合する[20,21]。加えて、ファンデルワールス力、疎水性相互作用および静電力のような相互作用もまた、rProA-Mab結合に寄与する[13]。ここでデータは、高いpHでの洗浄を使用して、不純物とmAb間および/または不純物と樹脂間の相互作用を選択的に攪乱する一方で、抗体は樹脂に結合させ得ることを示唆する。

20

【0075】

図3に示すように、CHO-HCP排除能はアルカリ洗浄の使用によって、全ての分子におけるベースライン条件と比較して、著しく増強した。アルカリ洗浄を用いることで、CHO-HCP排除能は、mAb 1では~2から3倍、mAb 2では~6から13倍、m

30

40

50

A b 3 では ~ 1 7 から 2 3 倍増加した。C H O - H C P 排除能の増加は、m A b のサブクラスに関係なく観察された。これらの結果を基に、出願人は、生成物の品質に対する洗浄の影響を理解することを目的とした次の研究として、p H 9 . 6 および 1 0 . 4 でのアルカリ洗浄を調べることを選択した。

【 0 0 7 6 】

プロテイン A クロマトグラフィーはまた 1 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 分の 1 まで宿主細胞 D N A を除去できる[2]。当然のことだが、高い p H での洗浄を利用すると、溶出液中の D N A ははるかに低いレベルであったことが観察された。図 4 に示すように、溶出液中の C H O - D N A 排除能のレベルは、全ての分子について、アルカリ性 p H 洗浄の使用によって、ベースライン条件と比較して、著しく減少した。アルカリ洗浄を用いることで、C H O - D N A のレベルは、m A b 1 では約 5 から 1 9 倍、m A b 2 では約 2 0 9 から 4 9 0 倍、m A b 3 では約 6 2 7 から 1 9 1 3 倍減少した。アフィニティーキャプチャー中の高い p H での洗浄の使用による D N A 排除能の増強は、別々の D N A 除去の工程、例えば陰イオン交換クロマトグラフィー、の重要性を下げる。

【 0 0 7 7 】

さらに、残留しているプロテイン A をモニターし、プロテイン A クロマトグラフィーにおけるアルカリ性 p H 洗浄の影響を評価した。プロテイン A の浸出の機構は未だ明確にされていない。アフィニティークロマトグラフィー中の p H サイクルは、アガロースベースマトリックス内のグリコシド結合の化学的な切断を生じ、m A b を伴う P r o A の共溶出を導き得る。遊離の P r o A が樹脂上で非特異的かつ非共有結合的に I g G と結合するならば、これは明白だろう[4]。高い p H での洗浄戦略を用いると、浸出する P r o A の量は 2 5 ないし 4 5 0 p p m となることがわかった。この浸出した P r o A のレベルは一般的に低いと考えられ、我々の方法には許容される。しかしながら、樹脂のサイクリングに対する浸出の影響は未だ調べられていない。さらに、残留しているプロテイン A が次のウイルス不活化の工程で除去されることを観察した。P r o A の浸出の増加レベルは未だかなり低く、相対的に簡便に除去できるが、P r o A の浸出を防ぐために探索できる多くの経路があり、それは第一に塩基に安定な樹脂、例えば MabSelect Sure の使用である。出願人は、精製した生成物がフィードに使われる場合、浸出はそれほど明白ではないことを観察してきた。それゆえ、より高い p H に活性があるプロテアーゼなどのフィード中の不純物が、P r o A の浸出の量が増加する原因である可能性もある。実際、いくつかの参考文献はこの考えを支持する[2]。この場合、一つの解決法は、フィード中にプロテアーゼ阻害剤を加えることであろう。図 5 に示すように、観察されたより高いレベルでの r P r o A の浸出は、続くウイルス不活化および濾過の工程によって効果的に除去された。

【 0 0 7 8 】

それゆえ、表 1 に示すように、アフィニティークロマトグラフィー中のアルカリ性 p H 洗浄の利用は、全分子において、不純物を許容できるレベルまで除去することができた。単一の工程におけるこの排除能のレベルの増強は、方法の頑強さを増し、これらの不純物を除去するための続くポリッシング工程の排除を潜在的に可能にし得る。

【 0 0 7 9 】

生成物の純度

S E - U P L C 、 i C I E F 、 C E - S D S 、および S E C - M A L S を用いて、純度のプロファイルを調べた。表 2 に示すように、S E - U P L C 分析は、テストした全ての三つの m A b において、アルカリ性 p H 洗浄の使用によって生成物の純度が一パーセント以上増加したことを示す。i C I E F を用いる生成物の質の分析は、アルカリ性 p H 洗浄の使用によって、酸性またはアルカリ性の種のレベルが増加せず、分子の p I が変化しなかったことを示した。アルカリ性 p H 洗浄を用いてテストしたどの m A b においても脱アミドは観測されなかった。還元および非還元の C E - S D S で測定した全体の純度は、ベースライン条件と比較して有意な差を示さなかった。

10

20

30

30

40

50

10

20

30

表 2
m A b における生成物の純度のプロファイル

【表2】

試料 【0080】	SE-UPLC (%モノマー)	SE-UPLC (%HMW)	ICIEF (%主要なビーグ)	ICIEF (%酸性のビーグ)	ICIEF (%アルカリ性 のビーグ)	CE-SDS (R)	CE-SDS (N.R.)
mAb1 ベースライン	97.1	2.9	44.3	21.5	4.3	100.0	96.0
mAb1 pH9.6	99.2	0.9	43.7	19.4	4.5	100.0	98.3
mAb1 pH10.4	98.8	1.2	45.0	23.1	4.8	100.0	96.0
mAb2 ベースライン	98.7	1.3	44.8	21.1	5.3	98.8	95.0
mAb2 pH9.6	99.5	0.5	43.1	21.0	5.2	98.7	91.1
mAb2 pH10.4	99.3	0.7	42.7	22.4	5.2	98.6	90.7
mAb3 ベースライン	95.4	4.6	39.8	27.1	4.3	99.2	97.5
mAb3 pH9.6	99.6	0.4	36.2	30.1	4.2	99.2	97.5
mAb3 pH10.4	99.5	0.5	35.8	29.3	3.9	99.1	97.6

【表2】

キャップチャーコロマトグラフィー中の大規模なアルカリ性pH洗浄後、mAbの機能的および構造的な完全性は維持された

mAbは相対的に安定なタンパク質であり、薬剤の理想的な候補だが、mAbは、製剤原料および製剤の製造中の分解やダメージなど、化学的および物理的变化に脆弱であり得る。我々の方法の戦略はアルカリ性pH洗浄を含んでいたため、各mAbの物理化学的および構造的な完全性を評価するために研究を行った。円二色性によって、二次構造の同一性または内容には差は検出されなかった。mAbのフォールディングの程度の別の尺度である融点もまた影響がなかった。加えて、ELISA結合による活性（正常なフォールディングの尺度）は、アルカリ性pH洗浄がmAbのフォールディング、活性、および全体の機能性に影響を与えないことを示した。等電点電気泳動またはLC/MSによるトリプシンペプチドマッピングによって、高いpHで洗浄したmAbにおいて、チャージバリアント、酸化または脱アミド化に差は観察されなかった。

10

【0081】

多角度光散乱

各組のmAb試料において、アルカリ性pH洗浄を用いて二つの試料を作成し、ベースラインの方法を用いて別の二つの試料を作成した。対照として、ベースラインの試料を緩衝液交換し、アルカリ性pH洗浄を用いて作成した二つの試料と同様の緩衝液種中の試料を作成した。結果は、全ての試料において、凝集が1%未満であることを示す。検出された凝集体のオリゴマーの状態には、ほんのわずかの差しかなかった。各試料の主要なピークにおける分子量の値は使用装置の誤差内である。

表3

SEC-MALS分析

【表3】

20

試料名	UVによるSE積分			MALS MW (kDa)	
	%モノマー	%ダイマー	%HMW (>ダイマー)	ピーク1	ピーク2
mAb1 ベースライン	99.45	0.55	0.00	140.1	272.6
mAb1 pH 9.6	99.44	0.00	0.56	141.1	646.0
mAb1 pH 10.4	99.27	0.73	0.00	139.9	297.4
mAb1 (緩衝液交換したベースライン)	99.12	0.88	0.00	140.1	254.5
mAb2 ベースライン	99.58	0.00	0.42	143.6	3282.2
mAb2 pH 9.6	99.50	0.00	0.50	143.5	345.4
mAb2 pH 10.4	99.41	0.59	0.00	142.5	289.1
mAb2 (緩衝液交換したベースライン)	99.46	0.54	0.00	143.5	265.2
mAb3 ベースライン	100.00	0.00	0.00	141.8	N/A
mAb3 pH 9.6	99.71	0.29	0.00	141.6	216.9
mAb3 pH 10.4	99.75	0.25	0.00	141.6	296.3
mAb3 (緩衝液交換したベースライン)	99.90	0.00	0.10	143.5	2063.9

30

【0082】

結合ELISA

結合ELISAは、ある分子がその特異的なレセプターに結合する能力を調べ、正常に

40

50

フォールドしたモノクローナル抗体に直接関連する。結合 E L I S A のデータは、洗浄の戦略に関わらず、全ての m A b が標準試料と同様に結合することを示す。これは、アルカリ性 pH 洗浄が分子の三次構造に有意な影響を与えたかったことを示す。

表 4

結合 E L I S A

【表 4】

試料	m A b 1	m A b 2	m A b 3
	%標準試料との比較による結合		
溶出液 ベースライン	90. 0	100. 5	98. 0
溶出液 pH 9. 6	109. 3	99. 6	100. 2
溶出液 pH 10. 4	113. 1	87. 7	96. 1
バルク ベースライン	106. 0	95. 3	98. 2
バルク pH 9. 6	105. 4	102. 6	103. 3
バルク pH 10. 4	104. 6	102. 8	105. 5
緩衝液交換した溶出液	103. 7	97. 0	103. 7

【0083】

D S C

部分的に変性した m A b は正常にフォールドしている時よりも低い融解温度を示すため、示差走査熱量測定 (D S C) は、 m A b の構造上の性質を示すことができる生物物理学における技術である。抗体の融点に対する洗浄の影響を知るため、アルカリ性 pH 洗浄およびベースラインプロトコルを用いて精製した様々な m A b について、 D S C を測定した。

【0084】

各組の m A b 試料において、表 5 に示すように、第 1 の二つの試料をアルカリ性 pH 洗浄を用いて作成し、後の二つの試料はベースラインの方法で作成した。アルカリ性 pH 洗浄を用いて作成した二つの試料と同様の緩衝液種中の試料を作成するため、試料 3、 7 および 11 をベースラインプロトコルから緩衝液交換した。 D S C に対する緩衝液の影響を制御するため、試料を緩衝液交換した。

【0085】

結果は、試料 4 の T m 値が同じ m A b 群の他の分子より 1 下であることを示す。図 6 に示すように、 T onset もまたより低くシフトしているように見え、これは緩衝液または方法に対する感受性の可能性を示している。緩衝液交換した試料 (試料 3) の T m 値はアルカリ性 pH 洗浄の試料 (試料 1 および 2) と同様であったため、この試料での T m の変化は D S C に対する試料の緩衝液の組成の影響によるものであると推定できる。それゆえ、 m A b 1 では、 T m に対するアルカリ性 pH 洗浄の有意な影響はない。 m A b 2 では、 T m 1 または T m 2 値において有意な差は観察されず、これは異なる洗浄条件がこの試料の融点に影響を与えないことを示す。 m A b 1 と同様に、 m A b 3 では他の条件よりも試料 1 2 がわずかに低い T m であり、これはおそらくこの緩衝液条件または方法でのわずかに低い安定性を示す。緩衝液交換した試料 (試料 11) の T m 値はアルカリ性 pH 洗浄の試料 (試料 9 および 10) と同様であり、それゆえこの試料での T m の変化は D S C に対する試料の緩衝液の組成の影響によるものである。したがって、 m A b 3 では、 T m に対するアルカリ性 pH 洗浄の有意な影響はない。

表 5

示差走査熱量測定

10

20

30

40

【表5】

試料ID	試料名	Tm1, °C	Tm2, °C
1	mAb1 pH 9.6	65.3	—
2	mAb1 pH 10.4	65.4	—
3	mAb1 (緩衝液交換したベースライン)	65.2	—
4	mAb1 ベースライン	64.2	—
5	mAb2 pH 9.6	67.3	82.8
6	mAb2 pH 10.4	67.2	82.8
7	mAb2 (緩衝液交換したベースライン)	67.2	82.7
8	mAb2 ベースライン	67.3	82.8
9	mAb3 pH 9.6	65.6	80.8
10	mAb3 pH 10.4	65.7	80.8
11	mAb3 (緩衝液交換したベースライン)	65.8	80.7
12	mAb3 ベースライン	65.1	80.6

【0086】

円二色性

遠紫外の円二色性(CD)分光を用いて、両方の手順を用いて精製した三つのmAbの二次構造を特徴付けた。260 nmから195 nmまでの波長間における、様々な条件下での標準試料およびmAbのCDスペクトルを評価した。それぞれのmAbのアミノ酸配列に基づいて算出した分子量とアミノ酸残基の数を用いて、CD信号をミリ度から平均残基構造率に変換した。遠紫外CDスペクトルは、mAb1では217および229 nm、mAb2では217~218 nm、およびmAb3では217~218 nmに極小値を示した。mAb1の平均の平均残基構造率は、217 nmでは-3128±358 deg cm² dmol⁻¹残基⁻¹(4条件における平均±標準偏差)および229 nmでは-1738±204 deg cm² dmol⁻¹残基⁻¹であった。mAb2の平均の平均残基構造率は、217 nmにおいて-3477±454 deg cm² dmol⁻¹残基⁻¹であった。mAb3の平均の平均残基構造率は、217 nmにおいて-3392±83 deg cm² dmol⁻¹残基⁻¹であった。mAbの精製に用いたプロトコルに関わらず、極小値およびスペクトルの形状はそれぞれのmAbで維持された。CDスペクトルの形状および強度に関する定性的な類似は、アルカリ性pH洗浄の戦略が研究中のmAbの二次構造に影響を与えないことを示す。mAb間に違いはあるが、それぞれ個別のmAbにおいて、テストした全ての洗浄条件下のCDスペクトルは定性的に似ていた。全ての試料のスペクトルはシートの内容と一致した。

【0087】

LC/MSによるトリプシンペプチドマッピング

三つの方法によって製剤原料を還元し、アルキル化し、トリプシンで消化する。トリプシンペプチドをC-18カラムで分離し、215および280 nmにおいてUV検出器で検出し、その後質量分析計で検出した(LTQ-Orbitrap-Elite)。無処理のペプチドと、イオノクロマトグラムで選択した修飾したペプチドのピーカ面積を比較することにより、相対定量を達成した。重鎖のインジケータペプチドからの酸化生成物のピーカ面積のパーセンテージによって、酸化をモニターし、重鎖における別のインジケータペプチドからの四つの脱アミド化生成物のピーカ面積のパーセンテージによって、脱アミド化をモニターした。酸化および脱アミド化のレベルは、全ての三つのmAbにおけるベースライン試料およびアルカリ性pH試料において、同等であった。

表6

LC/MSによるトリプシンペプチドマッピング

10

20

30

40

【表6】

試料	酸化 %	脱アミド化 生成物1 %	脱アミド化 生成物2 %	脱アミド化 生成物3 %	脱アミド化 生成物4 %	脱アミド化 生成物合計 %
mAb ベースライ ン	3.0	3.3	4.1	2.0	3.6	13.0
mAb1 pH 9.6	2.1	3.8	4.4	2.0	3.8	13.9
mAb1 pH 10. 4	1.7	3.9	4.9	2.0	4.0	14.8
mAb2 ベースライ ン	2.5	3.1	3.5	1.9	4.3	12.8
mAb2 pH 9.6	3.2	3.1	4.0	1.9	4.3	13.2
mAb2 pH 10. 4	2.6	3.8	4.9	1.8	4.2	14.6
mAb3 ベースライ ン	3.9	2.1	6.0	2.8	5.5	16.4
mAb3 pH 9.6	3.3	3.8	4.7	2.1	4.5	15.1
mAb3 pH 10. 4	3.4	2.3	6.6	2.6	5.3	16.8

10

20

30

【0088】

pH 9.6 から 10.4 でのアルカリ洗浄を用いる戦略は一部は可能である、なぜならリガンド - レセプター結合は、mAb をその正常な立体構造に保持し、mAb を変性や他のダメージから保護し得る強い相互作用であるためである。測定した親和定数の範囲は、抗体 / 抗原結合において 105 M⁻¹ 以下から 1012 M⁻¹ 以上であり [13]、プロテイン A リガンドと Fc において中性 pH および室温で 107 ~ 108 である [14]。リガンドのレセプターへの結合は mAb の構造を、非結合の mAb の構造より低いエネルギー状態にする。そのため、結合すると、mAb は変性の遷移状態からさらに離れ、保護される。リガンドと結合すると mAb はより安定な状態になるが、出願人はまた、リガンドが存在しない場合にアルカリ性 pH 緩衝液にさらされた時の mAb の凝集の可能性に目を向けて (表7)。室温での 24 時間のインキュベーション後、モノマー含量に変化はなく、これは非結合の mAb はこれらの条件で安定であることを示す。

40

表7

mAb の緩衝液溶解性

【表7】

緩衝液条件	pH	mAb 1 (%汚染マーカー)			mAb 2 (%汚染マーカー)			mAb 3 (%汚染マーカー)		
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
200 mM 塩酸ナトリウム、1M 塩化ナトリウム	9.6	9.9.6	9.8.4	9.8.5	9.4.9	9.9.2	9.9.2	9.9.8	9.8.6	9.8.6
100 mM 塩酸ナトリウム	10.0	9.8.5	9.8.3	9.8.4	9.9.3	9.9.3	9.9.3	9.8.6	9.8.6	9.8.6
1X PBS	7.4	9.9.4	9.9.6	9.9.5	9.8.4	9.9.3	9.9.3	9.8.7	9.8.6	9.8.6

【0089】

不純物の排除能を増強する代替の戦略は、捕捉中の洗浄において添加物の使用を含むことである（例えば塩、有機溶媒、非イオン性界面活性剤、カオトロープ、疎水性修飾因子

10

20

30

40

50

、およびアミノ酸) [6,7]。図6は、アルカリ性pH洗浄の戦略は洗浄の工程を用いてCH₂O-HCPを減少する最も有効な方法の一つであることを示す。加えて、アルカリ性pH洗浄の戦略は、後の排除及びモニタリングで必要となり得る添加物を利用しない。不純物の排除能をさらに増強するため、アルカリ性pH洗浄の緩衝液中へ添加物を入れるという可能性もある。

【0090】

Shukla et. al.は、捕捉中の洗浄中へのアルギニンの添加が、溶出液中の不純物を減らす有効な方法であることを示してきた[6]。アルギニンありおよびなしでアルカリ性pH洗浄を利用した場合の不純物の除去を比較する研究を行った(表8)。結果は、アルカリ洗浄において、添加なしの排除能はアルギニン添加の排除能に達したことを示す。

表8

アルカリ性pH洗浄の戦略とアルギニン洗浄の戦略の両方を用いて精製したmAbの生成物及び方法の質の比較

【表8】

戦略	%回収率	SE-UPLC 溶出液			CHO-HCP (ng/mg)	rProA (ng/mg)
		% HMW	% LMW	% モノマー		
ロード	N/A	N/A	N/A	N/A	716255	N/A
緩衝液+0.5M L-アルギニン pH 9.6	80	2.5	BDL	97.5	1160	125
緩衝液pH 9.6	82	2.6	BDL	97.4	1274	122

【0091】

mAbの精製スキームにおいて、アルカリ性pH洗浄の戦略の実行はさらなるポリッシング工程の必要性を排除できる

多くの精製の方法では、産業における品質基準に見合うように、2~3のポリッシングクロマトグラフィーの工程を用いる。相互に関係しない不純物の排除法は、方法の頑強性を増加し得るが、製造業の経済は合理化した方法を作成するための発展を推進する。ここで、出願人は、アフィニティーコロマトグラフィーにおいて、洗浄工程をさらに有効にでき、そしてそれは一以上のポリッシング工程の排除を可能にし得ることを示す。表9は、キャプチャーコロマトグラフィー中の高いpHでの洗浄の使用が、CEXポリッシング工程が必要なくなる程度に不純物の排除能を改善することを示す。アフィニティーコロマトグラフィー中の結合の広範な性質を探索することによって、出願人は、攻撃的なpHでの洗浄を使用して、不純物の排除能を増強できることを示す。

表9

2つの工程 v/s 3つの工程での精製

10

20

30

40

【表9】

アッセイ	2つの工程での方法 高い洗浄での捕捉戦略		3つの工程での方法 ベースライン捕捉戦略	
	プロテインA 溶出液	AEK 溶出液	プロテインA 溶出液	CEX AEK
CHO-HCP (n g/mg)	≤4.4	1.5	B DL	6.7.9
CHO-DNA (p g/mg)	B DL	B DL	B DL	ND
r Pro A (n g/mg)	≤4.8	≤2.8	6	4
%毛細マニ(SEC -HPLC)	9.9.4	9.9.2	9.9.5	9.9.6

【0092】

参考文献

10

20

30

40

50

- [1] F. Hui Liu, M. Junfen, C. Winter, R. Bayer, Recovery and purification process development for monoclonal antibody production, *mAbs* 2:5, Sept/Oct (2010) 480-499
- [2] P. Gagnon, Purification tools for monoclonal antibodies. *Validated Biosystems Inc.*, Tucson, AZ (1996) 155-198
- [3] L. Hagel, G. Jagschies, G. Sofer, *Handbook of Process Chromatography*, 2nd Ed., Academic Press, London, (2008)
- [4] U. Gottschalk, *Process Scale Purification of Antibodies*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ (2009)
- [5] A. Rathore, R. Godavarti, V. Kumar, T. Tugcu, Evolution of the Monoclonal Antibody Purification Platform, *BioPharm Int.*, 26, 11 (2013) 32-37 10
- [6] A. Shukla, P. Hinckley, Host Cell Protein Clearance During Protein A Chromatography: Development of an Improved Column Wash Step, *Biotechnology Progress*, 24 (2008) 1115-1121
- [7] T. Breece, R. Fahrner, J.R. Gorrell, K.P. Lazzareschi, P. Lester, D. Peng, Protein Purification. U.S. Patent No. 6,870,034 B2 (2005)
- [8] A. Pace, R. Wong, Y. T Zhang, Y-H Kao, J. Wang, Asparagine Deamidation Dependence on Buffer Type, pH, and Temperature, *J. Pharmaceutical Sciences*, 6, 102 (2013) 1712-1723
- [9] Q. Zhang, A. Goetze, H. Cui, J. Wylie, S. Trimble, A. Hewig, G. Flynn, Comprehensive Tracking of Host Cell Proteins during Monoclonal Antibody Purifications Using Mass Spectrometry, *mAbs*, 6, 3 (2014) 659-670 20
- [10] A. Shukla, B. Hubbard, T. Tressel, S. Guhan, D. Low, Downstream Processing of Monoclonal Antibodies-Application of Platform Approaches. *J Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci* 848 (2007) 28-39
- [11] N. Levy, K.N. Valente, L.H. Choe., K.H. Lee, A.M. Lenhoff, Identification and Characterization of Host Cell Protein Product Associated Impurities in Monoclonal Antibody Processing, *Biotechnol. Bioeng*, 111, 5 (2014) 904-912
- [12] B. Nogal, K. Chhiba, J.C. Emery, Select Host cell proteins coelute with Monoclonal Antibodies in Protein A Chromatography, *Biotechnol Prog* 28 (2012) 454-458 30
- [13] E. Harlow, D. Lane, *Antibodies - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 26
- [14] P.W. Roben, A.N. Salem, G.J Silverman, Vh3 family antibodies bind domain D of staphylococcal protein A. *J. Immunology*, 154 (1995) 6437-6445
- [15] D.K. Follman, R.L. Rahrner, Factorial screening of antibody purification processes using three chromatography steps without protein A, *Journal of Chromatography A* 1024(1-2) (2004) 79-85
- [16] S. Ghose, M. Allen, B Hubbard, C. Brooks, S. Cramer, antibody variable region interactions with Protein A: Implications for the development of generic purification process, *Biotechnol Bio-eng*. 92 (2005) 655-673 40
- [17] I.Bjorck, B. Akerstrom, in; M.Boyle (Ed.), *Bacterial Immunoglobulin-Binding Proteins*, Vol. 1, Academic Press, San Diego, p. 113
- [18] S. Sun, Arginine wash in protein purification using affinity chromatography, U.S. Patent No. 8,350,013 B2 (Jan. 2013)
- [19] R. Yumioka, K. Tsumoto, T. Arakawa, D. Ejima, Screening of effective column rinse solve for Protein A chromatography, *Protein Expr Purif*, 70(2) (2010) 218-23
- [20] J. Deisenhofer, Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment of B of Protein A from *Staphylococcus au* 50

reus at 2.9 and 2.8 Å resolution, Biochemistry 20 (1981) 2361-2370

[21] J. Desienhofer, T. Jones, R. Huber, J. Sjodahl, J. Sjoquist, Crystallization, crystal structure analysis and atomic model of the complex formed by human Fc fragment and fragment B of Protein A from *Staphylococcus aureus*, Hoppe-Seylars Z. Physiol. Chem. 359 (1978) 975-985

【0093】

相当するもの

当業者は、日常的な実験法に過ぎないものを用いる、本明細書で述べる発明の特徴的な実施態様に相当する多くのものを認識するまたは確認することができる。このような同等のものは下記の特許請求の範囲に包含される。

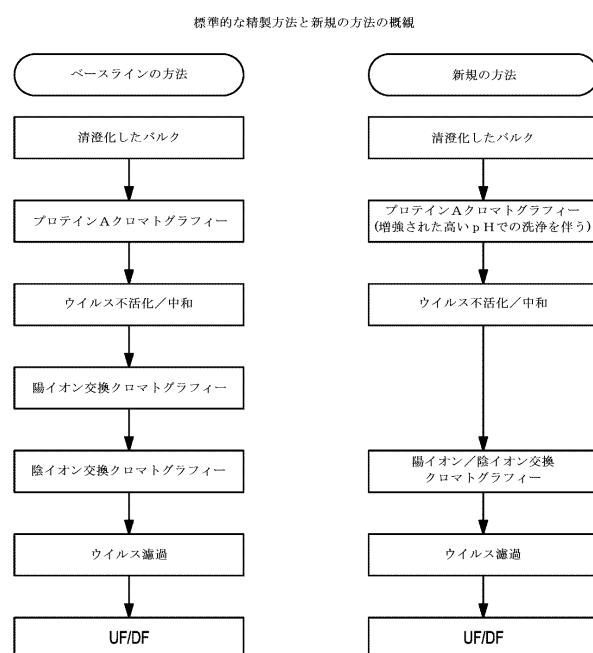
10

【0094】

引用による組み入れ

本明細書で引用する全ての特許、公開された特許出願、および他の論文は、引用により文書全体を本明細書に組み入れる。

【図1】



【図2】

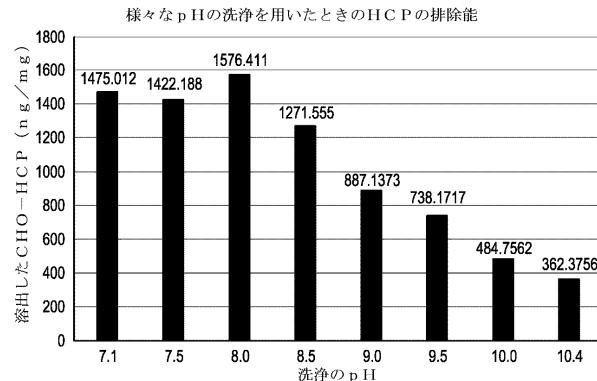


FIG. 2

FIG. 1

【図3】

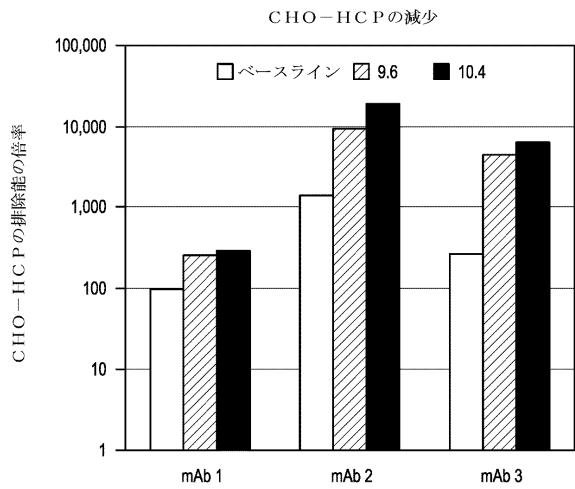


FIG. 3

【図4】

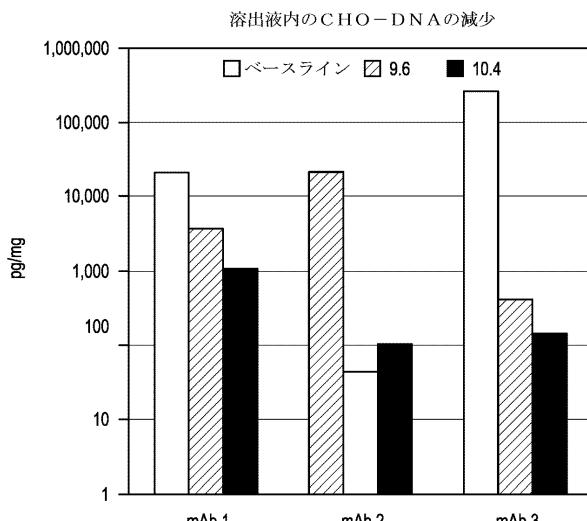


FIG. 4

【図5】

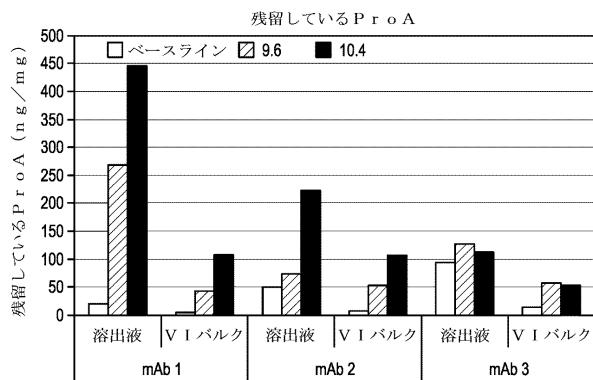


FIG. 5

【図6】

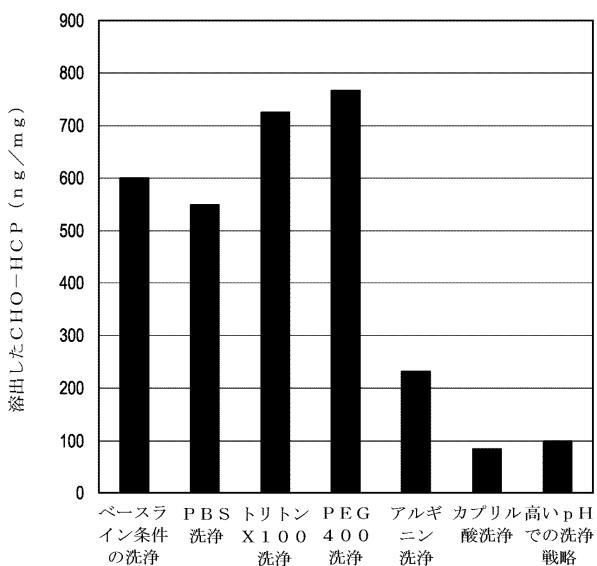


FIG. 6

フロントページの続き

(51) Int.CI. F I
B 0 1 D 15/38 (2006.01) B 0 1 D 15/38

(72) 発明者 ジュー・ワン
アメリカ合衆国 0 7 9 2 1 ニュージャージー州ベドミンスター、ラージャー・クロス・ロード 3 2
5 番
(72) 発明者 ニール・イー・ジャフィ
アメリカ合衆国 0 8 5 4 0 ニュージャージー州ホープウェル、カーター・ロード 3 5 0 番、プリス
トル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
(72) 発明者 クリナ・パテル
アメリカ合衆国 0 8 5 4 0 ニュージャージー州ホープウェル、カーター・ロード 3 5 0 番、プリス
トル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

審査官 馬場 亮人

(56) 参考文献 特開 2 0 1 2 - 0 0 1 4 6 2 (JP, A)
国際公開第 2 0 1 6 / 0 3 1 9 3 2 (WO, A 1)

(58) 調査した分野(Int.CI., DB名)

C 0 7 K 1 / 2 2
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
B 0 1 D 1 5 / 2 0
B 0 1 D 1 5 / 3 6
B 0 1 D 1 5 / 3 8
C 0 7 K 1 6 / 0 0
W P I
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)