(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-509735
(P2025-509735A)
(43)公表日　令和7年4月11日(2025.4.11)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N	*1/02 (2006.01)*	C12N	1/02	4B065
C12N	*5/071(2010.01)*	C12N	5/071	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全20頁）

(21)出願番号	特願2024-555116(P2024-555116)
(86)(22)出願日	令和5年3月15日(2023.3.15)
(85)翻訳文提出日	令和6年11月15日(2024.11.15)
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/056537
(87)国際公開番号	WO2023/174965
(87)国際公開日	令和5年9月21日(2023.9.21)
(31)優先権主張番号	22163007.2
(32)優先日	令和4年3月18日(2022.3.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
	最終頁に続く

(71)出願人	591032596 メルク パテント ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング Ｍｅｒｃｋ Ｐａｔｅｎｔ Ｇｅｓｅｌｌｓｃｈａｆｔ ｍｉｔ ｂｅｓｃｈｒａｅｎｋｔｅｒ Ｈａｆｔｕｎｇ ドイツ連邦共和国 デー－６４２９３ ダルムシュタット フランクフルター シュトラーセ ２５０ Ｆｒａｎｋｆｕｒｔｅｒ Ｓｔｒ． ２５０，Ｄ－６４２９３ Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，Ｆｅｄｅｒａｌ Ｒｅｐｕｂｌｉｃ ｏｆ Ｇｅｒｍａｎｙ
(74)代理人	110003971 弁理士法人葛和国際特許事務所
	最終頁に続く

(54)【発明の名称】　小型細胞外小胞を精製するための方法および組成物

(57)【要約】
本発明は、陽イオン交換混合モードクロマトグラフィーによって小型細胞外小胞を精製するための方法に関する。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
小型細胞外小胞を精製する方法であって、以下のステップを含む、前記方法：
a)小型細胞外小胞を含む試料を混合モード陽イオン交換クロマトグラフィーマトリックスと接触させること、
b)任意に、クロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、
c)ステップa)においてクロマトグラフィーマトリックスに結合した小型細胞外小胞を、溶離緩衝液で溶離させることであって、それは溶離緩衝液のpHが4～7の間のpHから8.5以上のpHまで段階的にまたは勾配として上昇することによる。
【請求項２】
溶離緩衝液のpHが、直線勾配として上昇する、請求項1に記載の方法。
【請求項３】
請求項1～2のいずれか一項に記載の方法であって、クロマトグラフィーマトリックス内をそれに結合することなく通り抜けて流れる小型細胞外小胞を回収することを包含する、前記方法。
【請求項４】
クロマトグラフィーマトリックスが、膜またはモノリスである、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
クロマトグラフィーマトリックスが、ヒドロゲル膜である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
溶離緩衝液の導電率が、一定レベルに保たれる、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
ステップc)における溶離が、4～7の間のpHから8.5を超えるpHまでの直線pH勾配で行われ、および、小型細胞外小胞の異なる亜集団を含む2以上の画分が異なるpH範囲において溶離される、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
小型細胞外小胞が、エキソソームである、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
請求項1～8のいずれか一項に記載の方法に従って小型細胞外小胞を精製することにより、細胞培養上清から小型細胞外小胞を精製する方法。
【請求項１０】
請求項7または9に記載の方法であって、以下のステップの1以上を含む、前記方法：
－　清澄化
－　濾過
－　透析／透析濾過
－　タンジェンシャルフロー濾過
－　ヌクレアーゼ、例としてRNaseおよび/またはDNaseを用いる処置
－　クロロホルムを用いる処置
－　イオン交換クロマトグラフィー
－　親和性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
－　遠心分離
－　PEG沈殿
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、陽イオン交換混合モードクロマトグラフィーによって小型細胞外小胞(smal

l extracellular vesicle)を精製するための方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

小型細胞外小胞は、小さな脂質二重層ベシクルである。それらは細胞内空間内で形成され、および細胞によって分泌される。それらは、典型的には直径が５０～１５０ｎｍの間の範囲にある。それらの球状の脂質二重層はテトラスパニンなどの様々なタンパク質に富んでいる。それらは、特異的な複合糖質を持つ複雑なグリコシル化パターンをそれらの表面上に示す。例示の小型細胞外小胞は、エキソソームである。

【０００３】

小型細胞外小胞は、タンパク質、脂質、および核酸などの、小さな生体分子を運ぶことができる。小型細胞外小胞の組成および積み荷は、親細胞および生物学的状態に依存して変動する。近年、診断および治療用途のためのエキソソームへの関心が高まっている。臨床診断において、エキソソームは、体液中の疾患を検出するためのバイオマーカーの調査のための液体生検の分野においてそれらの価値を証明することができる。しかし、それらはまた治療目的のためにも注目されてきている。それらの人工ナノ粒子と比べた利点のため、それらは薬物送達のために理想的に適している。

【０００４】

エキソソームは天然起源であり、エンドソーム系を起源とて生じ、および、毒性が低く免疫原性が小さいものと見受けられる。それらの表面およびローディング(loading)は、細胞にまたは標的に特異的に適合されることができる。ネイティブなエキソソームは本来生物活性であり、したがって、がん免疫療法または再生医療における使用が想定できる。進行中のエキソソームの前臨床研究においては、バルク単離物が展開されている。これらの単離物は、それらの組成および積み荷が極めて不均一であり、そのため現在、エキソソームの治療上の可能性は残念ながら十分に利用されていない。

【０００５】

亜集団の分離は現在、密度勾配、免疫吸着法、および親和性ビーズによって実現可能である。これらの方法は、スケーラブルでないか、または純度および収率に関して制限がある。エキソソームの内容物の不均一性は、治療効果を増強させおよび望ましくない副作用を低減させるために、亜集団の分離を余儀なくさせる可能性がある。その結果として、エキソソームの亜集団のための大規模な精製方法を開発することが求められる。

【０００６】

ＷＯ２０１９/２４１８３６は、エキソソームの結合のために、陰イオン性のまたは電子豊富な基を含むポリマーを持つある種の表面の使用を開示している。

ＷＯ２０２０/１９１３６９は、細胞外小胞の精製のための複合イオン交換精製ステップの使用を開示している。混合モードクロマトグラフィーもまた言及されるが、しかし、常に他のいくつかのイオン交換クロマトグラフィーのステップと組み合わせられる。

【発明の概要】

【０００７】

混合モード陽イオン交換クロマトグラフィーは、宿主細胞タンパク質のようなプロセス関連の不純物からエキソソームを精製することにおいて、ならびにエキソソームの亜集団の分離のために、特に効果的であるということが今では見出されている。さらなるイオン交換クロマトグラフィーステップは必要ではない。特に好適なのは、ｐＨ勾配の使用である。

【０００８】

本発明は、よって、エキソソームのような小型細胞外小胞を精製するための方法であって、以下のステップを含むものに向けられる:

a)小型細胞外小胞を含む試料を混合モード陽イオン交換クロマトグラフィーマトリックスと接触させること。該クロマトグラフィーマトリックスは、陽イオン交換基および疎水性基を含む。

b)任意に、クロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、

c)ステップa)においてクロマトグラフィーマトリックスに結合した小型細胞外小胞を、溶離緩衝液で溶離させることであって、それは溶離緩衝液のpHが4～7の間のpHから8.5以上のpHまで段階的にまたは勾配として上昇することによる。

【０００９】

好ましい態様において、pHは、直線勾配として上昇する。

別の態様において、方法は、クロマトグラフィーマトリックス内をそれに結合することなく通り抜けて流れる小型細胞外小胞を回収することを包含する。

【００１０】

好ましい態様において、クロマトグラフィーマトリックスは、膜またはモノリスである。

極めて好ましい態様において、クロマトグラフィーマトリックスは、膜、特にヒドロゲル膜である。

【００１１】

別の好ましい態様において、ステップc)における溶離は、導電率を一定レベルに保ちながら、4～7の間のpHから8.5～10の間のpHまでの直線pH勾配で行われ、および、小型細胞外小胞の異なる亜集団を含む2以上の画分が異なるpH範囲において溶離される。例えば、第1の亜集団を含む1の画分は7～8の間のpHで溶離され、および別の亜集団は8～9の間のpHで溶離される。

【００１２】

別の好ましい態様において、小型細胞外小胞は、エキソソームである。

本発明はさらに、小型細胞外小胞を、本発明の方法に従う混合モード陽イオン交換クロマトグラフィーマトリックスとこれらを接触させることによって単離および/または精製することによる、細胞培養上清から小型細胞外小胞を精製する方法に向けられる。

【００１３】

一態様において、本発明の方法は、1以上の以下のステップを含む：

－ 清澄化
－ 濾過
－ 透析／透析濾過
－ タンジェンシャルフロー濾過
－ ヌクレアーゼ、例としてRNaseおよび/またはDNaseを用いる処置
－ クロロホルムを用いる処置
－ イオン交換クロマトグラフィー
－ 親和性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
－ 遠心分離
－ PEG沈殿

【発明を実施するための形態】

【００１４】

本発明を詳細に説明する前に、本発明は特定の組成物またはプロセスステップに限定されるものではなく、かかるものは様々に変化してもよいということを理解されたい。なお、本明細書および添付の請求項において使用されるとき、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明確に別様に指示しない限り、複数の指示対象を包含するということに留意されなければならない。よって、例えば、「リガンド」への言及は複数のリガンドを包含し、および「抗体」への言及は複数の抗体を包含する等とする。

【００１５】

別様に定義されない限り、本明細書に使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が関連する技術分野における当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のとおりの本発明の目的上、以下の用語が定義される。

【００１６】

小型細胞外小胞(EV)は、ほぼすべてのタイプの細胞によって放出される、ナノサイズ

の細胞由来の粒子である。これらは小さな脂質二重層ベシクルであり、および、20～200nmの間の、好ましくは50～150nmの間の直径を有する。それらの生物発生およびサイズに依存して、EVは、3つのサブグループ：エキソソーム、微小胞およびアポトーシス小体に、一般的に分けることができる。微小胞は、エキソソームとは対照的に、細胞膜の外向きのブレブ形成によって形成される。しかしながら、エキソソームと微小胞とはサイズが重なっており、常に簡単に明確に区別できるわけではない。したがって、エキソソームおよび微小胞は、しばしば、小型EV(sEV)ともまた称され、かつ互換性のあるものとして使用されていた。

【００１７】

典型的には、試料は、小型細胞外小胞の2以上の異なる亜集団を含む。かかる亜集団は、それらの組成、例えばグリコシル化パターンおよびそれらの表面タンパク質パターン、および/または積み荷の点で異なる。小型EVは、ネイティブなものかまたは操作されたものであり得る。

【００１８】

本明細書に使用されるとき、用語「細胞」または「細胞株」は、単一の細胞を、または細胞集団を指す。細胞は、in vitroで連続的または持続的な成長および分裂を可能とし得る。いくつかの態様において、例として用語「HEK293細胞」、「293細胞」またはそれらの文法的等価物は、ここでは互換的に使用され、および、本明細書に開示される方法において使用される宿主/パッキング細胞株を指す。細胞はまた、動物、ヒト対象などの生物を起源として生じるものであってもよく、および組織細胞、血液細胞またはその他を包含してもよい。

【００１９】

好適な細胞および細胞株は、エキソソームの産生における使用のために記載されている。細胞それ自体は、原核生物(例として、細菌性)細胞ならびに昆虫細胞、酵母細胞および哺乳動物の細胞を包含する真核細胞を包含する、あらゆる生物学的生物から選択されてもよい。殊更望ましい宿主細胞は、あらゆる哺乳動物種から選択され、限定せずに、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギおよびハムスターを包含する哺乳動物に由来する間葉系幹細胞(MSC)、ケラチノサイト、初代線維芽細胞、肝細胞および筋芽細胞のような初代細胞、または、A549、WEHI、3T3、10T1/2、BHK、MDCK、COS 1、COS 7、BSC 1、BSC 40、BMT 10、VERO、WI38、HeLa、HEK 293細胞、Saos、C2C12、L細胞、HT1080、およびHepG2のような細胞株を包含する。

【００２０】

精製は、例として1以上の不純物を除去することによって、標的分子、この場合においてはエキソソームの純度を増大させることを意味する。

本明細書中に使用されるときの用語「不純物」または「夾雑物」は、DNA、RNA、1以上の宿主細胞タンパク質、核酸、エンドトキシン、脂質などの生物学的高分子、界面活性剤のような合成起源の不純物、ならびに、不純物の1以上から精製されおよびそれによって分離されるエキソソームを含有する試料中に存在し得る1以上の添加物を包含する、あらゆる異物または有害分子もしくは種を指す。

【００２１】

本明細書に使用されるとき、かつ別様に述べられない限り、「試料」という用語は、エキソソームを含有するあらゆる組成物または混合物を指す。試料は、好ましくは、エキソソームを含む液体試料である。試料は、生物学的供給源に由来しても、他の供給源に由来してもよい。生物学的供給源は、植物および動物細胞、組織および器官などの真核生物および原核生物の供給源を包含する。試料はまた、希釈剤、緩衝液、界面活性剤、および、標的分子すなわち小型細胞外小胞と混合していることが見出される汚染種、デブリ等も包含し得る。試料は、「部分的に精製」(すなわち、濾過ステップなどの1以上の精製ステップに供されている)されていてもよく、または、小型細胞外小胞を産生する生物または細胞から直接的に得られてもよく、例として、試料は、採取された細胞培養液を含んでいてもよい。

【００２２】
本明細書において互換的に使用されるときの用語「精製すること」、「分離すること」または「単離すること」は、標的エキソソームと1以上の不純物および/または非標的エキソソームとを含む組成物または試料からの標的エキソソームの純度を増大させることを指す。
【００２３】
用語「クロマトグラフィー」は、試料中に存在する他の分子から関心のあるアナライト(例として、標的エキソソーム)を分離するあらゆる種類の技法を指す。大抵、標的エキソソームは、混合物の個々の分子が、移動相の影響下において、クロマトグラフィーマトリックスへ結合するおよび/またはそれを通って移動する速度の違いの結果として、他の分子から分離される。
【００２４】
用語「マトリックス」または「クロマトグラフィーマトリックス」は、本明細書において互換的に使用され、および、クロマトグラフィー分離の過程において試料が通過する固相を指す。マトリックスは、典型的には、基材および基材へ共有結合的に結合したリガンドを含む。本発明のマトリックスは、好ましくは粒子、膜またはモノリスを含むかまたはそれらからなり、好ましくは、基材は、膜またはモノリスであり、最も好ましくは膜である。
【００２５】
「リガンド」は、クロマトグラフィーマトリックスの一部である、典型的にはそれはマトリックスの基材に付着しており、かつ、マトリックスの結合特性および相互作用特性を決定する、官能基である。「リガンド」の例は、これらに限定されないが、イオン交換基、疎水性相互作用基、親水性相互作用基、チオ親和性相互作用基、金属親和性基、親和性基、生体親和性基、および混合モード基(先述のものの組み合わせ)を包含する。1のリガンドが1より多くの結合/相互作用特性を有することもまた考えられる。
【００２６】
本発明のマトリックスは、少なくとも陽イオン交換基および疎水性相互作用基を含む。それは、混合モード陽イオン交換クロマトグラフィーマトリックスである。陽イオン交換基は、例えば、スルホン酸基のような強陽イオン交換基であってもよい。それらはまた、カルボキシメチルまたはカルボン酸などの弱陽イオン交換基であってもよい。疎水性相互作用基の例は、フェニル、ブチル、プロピル、ヘキシルのような疎水性基である。マトリックスは、2以上の異なる陽イオン交換基、例として、弱および強陽イオン交換基を含んでもよい。それはまた、2以上の異なる疎水性相互作用基を含んでもよい。それは、加えて、さらなる他のタイプのリガンドを含んでもよい。基は、基材の一部であってもよく、それらはまた、リガンドの一部であってもよい。1のリガンドが、1または複数の異なる陽イオン交換基および/または疎水性基を含んでもよい。
【００２７】
リガンドは、あらゆるタイプの共有結合的な付着によってマトリックスの基材上へ付着することができる。共有結合的な付着は、例えば、OH、NH2、カルボキシル、フェノール、無水物、アルデヒド、エポキシド、またはチオール等のような基材上の好適な残基に官能基を直接的に結合させることによって行うことができる。好適なリンカーを介してリガンドを付着させることもまた可能である。リガンドおよび重合性部分を含むモノマーを重合させることにより、マトリックスを生成することもまた可能である。好適なモノマーの重合によって生成されるマトリックスの例は、好適なスチロールまたはアクリロイルモノマーを重合させることによって生成されたポリスチレン、ポリメタクリルアミドまたはポリアクリルアミドベースのマトリックスである。
【００２８】
別の態様において、クロマトグラフィーマトリックスは、リガンドを基材上へとまたは基材からグラフトすることによって生成することができる。グラフトには、例えば、原子移動フリーラジカル重合(ATRP)の方法など、制御されたフリーラジカル重合を伴うプロ

セスからが好適である。例としてイオン性、親水性または疎水性基で官能化されたアクリルアミド、メタクリラート、アクリラート、メタクリラート等の重合反応からの、極めて好ましいワンステップのグラフトは、ヒドロキシル含有支持体上のセリウム(IV)によって開始することが、支持体を活性化させることを要することなくできる。

【００２９】

クロマトグラフィーマトリックスがクロマトグラフの分離において使用されるとき、それは典型的には、マトリックスを保持する手段としての、ハウジングとも呼ばれる分離デバイス内で使用される。

【００３０】

一態様において、デバイスは、入口および出口ならびに入口と出口との間の流体経路を持つハウジングを含む。好ましい態様において、デバイスは、クロマトグラフィーカラムである。クロマトグラフィーカラムは、当業者に公知である。それらは通常、固定相を充填した円筒形のチューブまたはカートリッジ、ならびにフィルター、および/またはチューブもしくはカートリッジ内に固定相を固定するための手段、および任意にはチューブまたはカートリッジとの間で行き来させる溶媒送達のための接続部を含む。クロマトグラフィーカラムのサイズは、例として分析または分取の、用途に応じて変動する。一態様においてカラムまたは一般に分離デバイスは、単回使用デバイスである。

【００３１】

「緩衝液」は、その酸塩基共役成分の作用によってpHの変化に抵抗する溶液である。例えば、緩衝液の所望のpHに依存して採用することができる様々な緩衝液が、Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975)において記載されている。緩衝液の非限定例は、MES、MOPS、MOPSO、トリス、HEPES、リン酸、酢酸、クエン酸、コハク酸、およびアンモニウム緩衝液、ならびにこれらの組み合わせを包含する。

【００３２】

本発明に従うと、用語「緩衝液」または「溶媒」は、クロマトグラフィーマトリックスをロード、洗浄、溶離、再平衡化、揮散および/または消毒することに使用されるあらゆる液体組成物について使用される。

【００３３】

クロマトグラフィーカラムを結合および溶離モードで「ローディング」するとき、標的分子と1以上の不純物とを含む試料または組成物をクロマトグラフィーカラム上へとロードする。分取クロマトグラフィーにおいて、試料は、好ましくは、ローディング緩衝液の添加なしに直接的にロードされる。ローディング緩衝液が使用される場合、緩衝液は、標的エキソソームが固定相へ結合し、その一方で理想的には、宿主細胞タンパク質のような不純物がすべて結合されずにカラム内を通り抜けて流れるような、組成、導電率、および/またはpHを有する。典型的には、ローディング緩衝液は、使用される場合には、ローディングのためのカラムを準備するのに使用される平衡化緩衝液と同じかまたは同様の組成を有する。

カラム上へロードされる試料の最終的な組成は、フィードと呼ばれる。フィードは、試料およびローディング緩衝液を含んでもよいが、好ましくは、それは試料のみである。

【００３４】

クロマトグラフィーマトリックスを「洗浄」または「洗浄すること」とは、適切な液体、例として緩衝液を、マトリックス内を通ってまたはマトリックスの上に、通過させることを意味する。典型的には、洗浄は、標的分子を溶離させる前に、結合/溶離モードでマトリックスから弱く結合した不純物を除去するために使用される。加えて、洗浄ステップは、残留した界面活性剤のレベルを低減する、ウイルスクリアランスを増強する、および/または溶離の間の導電率のキャリーオーバーを変更するために、使用することができる。

【００３５】

マトリックスから分子(例として、標的エキソソーム)を「溶離させる」ことは、分子が

それから除去されることを意味する。溶離は、ローディング緩衝液および/または洗浄緩衝液とは異なる緩衝液が、マトリックス上のリガンド部位に対して、関心のある分子と競合するように、または、標的分子が優先的に溶離緩衝液中に存在するようになるように固定相と移動相との間の標的分子の平衡を変更するように、溶液条件を変更することによって起こり得る。

【００３６】

非限定的な例は、緩衝液がイオン交換材料上の荷電部位に対して分子と競合するように、イオン交換材料を取り囲む緩衝液のイオン強度を変化させることによって、イオン交換樹脂から分子を溶離させることである。あるいは、pH変化もまた好適である。

【００３７】

本明細書において互換的に使用されるときの用語「フロースループロセス」、「フロースルーモード」、および「フロースルー操作」は、1以上の不純物とともに試料中に含有される少なくとも1つの標的分子(例として、エキソソーム)が、大抵1以上の不純物を結合させるクロマトグラフィーマトリックス内を通り抜けて流れることを意図し、ここでは標的分子は大抵結合せず(すなわち、通り抜けて流れ(flows through))、および、ローディング緩衝液とともにクロマトグラフマトリックスから溶離する、クロマトグラフィープロセスを指す。

【００３８】

本明細書において使用されるときの用語「結合および溶離モード」および「結合および溶離プロセス」は、試料中に含有される少なくとも1つの標的分子(例として、エキソソーム)が好適なクロマトグラフィーマトリックスへ結合し、およびその後、ローディング緩衝液とは異なる緩衝液で溶離される、分離技法を指す。

【００３９】

本明細書に使用されるときの用語「イオン密度」は、所与の分離材料の単位体積または質量あたりのイオンの数、より具体的には、分離材料の単位体積または質量あたりの所与のタイプのイオン(例として、正イオンまたは負イオン)の数を指す。大抵、イオンの数は、与えられた分離材料を滴定することによって推計される。その上、イオンの量は、分離材料についての質量または体積単位あたりの当量(eq)で与えられる。

【００４０】

本明細書に使用されるときの用語「導電性」は、電流に対してそれがいかに強い抵抗を持つかまたは伝導させるかを定量化する、ほとんどの材料の固有の特性を指す。緩衝液などの水溶液中において、電流は、帯電したイオンによって運ばれる。導電率は、帯電したイオンの数、それらが運ぶ電荷の量、およびそれらがどれだけ速く動くかによって決定される。ゆえに、ほとんどの水溶液では、溶解した塩の濃度が高いほど、導電率が高くなる。温度を上げると、イオンがより速く動くことを可能にし、ゆえに導電率を増大させる。典型的には、別様に指定されない限り、導電率は室温で定義される。コンダクタンスの基本単位は、ジーメンス(S)である。これは、液体の1cm立方体の互いに反対側の面間で測定された、オーム(Ohms)での抵抗の逆数として定義される。したがって、値はS/cmで推計される。

【００４１】

対数減少(Log reduction)は、精製プロセスが夾雑物の濃度をどれだけ徹底的に低減させるかの尺度である。それは、プロセスの前と後との汚染のレベルの比率の常用対数として定義され、1の増加幅は10分の1の濃度の低減に対応する。一般に、nの対数減少は、残存する夾雑物の濃度が元のそれの10-n倍にしかならないということを意味する。よって例えば、0の対数減少は、まったく低減がないことである一方で、1の対数減少は、元の濃度からの90パーセントの低減に対応し、および、2の対数減少は、元の濃度からの99パーセントの低減に対応する。

【００４２】

クロマトグラフのマトリックスとしての膜は、溶質、例として、標的エキソソームまたは夾雑物とマトリックスとの間の相互作用が、粒子の行き止まりのある細孔では起こらな

いが、主に膜の貫通孔の中で起こるという事実によって、粒子ベースのクロマトグラフィーとは区別することができる。例示の膜のタイプは、フラットシートシステム、膜のスタック、組み込まれたセルロース、ポリスチレンまたはシリカベースの膜を伴う微多孔性ポリマーシート、ならびにラジアルフローカートリッジ、中空糸モジュールおよびヒドロゲル膜である。好ましいのはヒドロゲル膜である。かかる膜は、膜支持体、および該支持体の細孔内に形成されたヒドロゲルを含む。膜支持体は、ヒドロゲルに機械的強度を提供する。ヒドロゲルは、細孔サイズおよび結合化学のような、最終産物の特性を決定する。

【００４３】

膜支持体は、ポリマー膜、セラミックベースの膜、織布または不織布繊維材料のようなあらゆる多孔質膜からなるものとすることができる。膜支持体に好適なポリマー材料は、セルロースまたはセルロース誘導体、ならびにポリエチレン、ポリプロピレン、ポリブチレンテレフタレートまたはポリ二フッ化ビニリデンのような、他の、好ましくは不活性なポリマーである。

【００４４】

ヒドロゲルは、1以上の重合性モノマーと1以上のクロスリンカーおよび/または1以上の架橋性のポリマーとのその場での反応を通して形成され得、好ましくはマクロ細孔を有する架橋ゲルを形成する。好適な重合性モノマーは、ビニル基またはアクリル基を含有するモノマーを包含する。好ましいのは、マトリックスのリガンドを直接的に形成しているか、またはリガンドを付着させるのに好適であるかのいずれかである、追加の官能基を含むモノマーである。好適な架橋剤は、少なくとも2つのビニルまたはアクリル基を含有する化合物である。

【００４５】

好適な膜支持体、モノマー、架橋剤等、ならびに好適な生産条件についてのさらなる詳細は、WO04073843およびWO2010/027955において見出すことができる。特に好ましいのは、Natrix(登録商標)型膜, Merck KGaA, Germanyのような、繊維網状支持体の内部および周囲に、陽イオン交換基ならびに疎水性基を持つ多孔質ポリアクリルアミドヒドロゲルのアセンブリを含む、不活性で柔軟な繊維網状支持体で作られた膜である。好適なヒドロゲル混合モード膜についてのさらなる詳細は、WO2014018635において見出すことができる。

【００４６】

使用される膜デバイスに依存して、夫々のプロセスは、デッドエンド操作、クロスフロー操作およびラジアルフロー操作系のような種々の操作原理によって実行される。デッドエンド操作が、好ましい。

【００４７】

本発明の方法において使用するのに好適である膜の例は、以下である：

－ Mustang(登録商標)型膜, Pallのような、ポリエーテルスルホン(PES)ベースの支持体と好適なリガンドで官能化された架橋ポリマーコーティングとを持つ膜。

－ Sartobind(登録商標)型膜, Sartoriusのような、好適なリガンドで官能化された安定化強化セルロースで作られた膜。

－ 安定化強化セルロースで作られたSartobind(登録商標) Jumbo Membranes, Sartoriusのような、好適なリガンドを持つヒドロゲルを含む安定化強化セルロースで作られた膜。

－ 3M(商標) Emphaze(商標) Hybrid Purifier型膜, 3Mのような、好適なリガンドを持つヒドロゲルを含むファインファイバー不織布骨格で作られた膜。

－ Natrix(登録商標)型クロマトグラフィー膜, Merck KGaA, Germanyのような、繊維網状支持体の内部および周囲に、好適な陽イオン交換および疎水性リガンドを持つ多孔質ポリアクリルアミドヒドロゲルを含む、不活性で柔軟な繊維網状支持体で作られた膜。

【００４８】

モノリスまたはモノリシック吸着剤は、膜と同様に、液体がモノリスの一方の側からモノリスを通ってモノリスの反対側へ流れることができるように、相互接続されたチャネル

のような、貫通孔を有する。
移動相が、これらの貫通孔を通って流れることから、分離される分子は、拡散によってよりもむしろ対流によって輸送される。モノリシック吸着剤は、それらの構造に起因して、流量に依存しない分離効率および動的容量を示す。
【００４９】
モノリスは典型的には、反応物溶液からその場で形成され、およびあらゆる形状または拘束された幾何学的形状を有することができ、典型的にはフリットフリー構造であり、これが操作の利便性を保証する。好ましくは、モノリシック材料は、二元多孔質構造、メソ細孔およびマクロ細孔を有する。ミクロンサイズのマクロ細孔は、貫通孔であり、および適用において高速動的輸送および低い背圧を確実にし、メソ細孔は、十分な表面積に、およびよって高いローディング容量に寄与する。
【００５０】
モノリスは、有機、無機、または有機/無機ハイブリッド材料で作ることができる。好ましいものは、有機ポリマーベースのモノリスである。
有機ポリマーモノリスの合成は、典型的には、目的に合った官能基を有する調節可能な多孔質構造を提供する、ワンステップ重合によって行われる。一般に、適切な比率における、モノマー、架橋剤、ポロゲン性溶媒(porogenic solvent)、および開始剤からなる、重合前混合物は、モノリスの形式を決定する、モールドともまた呼ばれる好適な容器の中で重合される。重合は、典型的には、開始剤の存在下で、加熱、UV照射、マイクロ波またはγ線の使用によって開始される。適切な温度で規定の時間反応させた後、その結果得られる材料は、典型的には、未反応の構成成分およびポロゲン性溶媒を除去するために溶媒で洗浄される。
【００５１】
好適な有機ポリマーは、ポリ(メタクリル酸-エチレンジメタクリラート)、ポリ(グリシジルメタクリラート-エチレンジメタクリラート)またはポリ(アクリルアミド-ビニルピリジン-N,N’-メチレンビスアクリルアミド)のような、ポリメタクリラート、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリウレタン等々である。
【００５２】
無機モノリスは、シリカまたは他の無機酸化物で作ることができる。好ましくは、それらはシリカで作られている。シリカモノリスは、通常、相分離を伴うゾル－ゲル法を介して調製される。これは主にシリカ前駆体の加水分解、縮合、および重縮合を包含する。典型的には、ポロゲン(porogen)(例として、ポリ(エチレングリコール)(PEG))の存在下で好適な溶媒中にテトラエトキシシラン(TEOS)またはオルトケイ酸テトラメチル(TMOS)を分散させ、これに続いて順次、触媒、酸または塩基、または二元触媒、酸および塩基の添加が行われる。所定の時間反応させた後、その結果得られたゲル様産物は、溶媒で洗浄されることで、未反応の前駆体、ポロゲン、および触媒が除去され、これに続いて適切な後処理、典型的には熱処理が行われる。
【００５３】
モノリスは、好適な官能基、この場合においては陽イオン交換基および疎水性相互作用基、で修飾され得ることで、標的分子を含む試料との標的にされた相互作用を生じさせ、およびよって標的にされた分離を生じさせ得る。
典型的には、モノリスは、カラムのようなハウジング内に含有される。
膜およびモノリスはまた、3Dプリントプロセスによっても産生することができる。
【００５４】
粒子状基材は、例えば有機ポリマーから調製することができる。このタイプの有機ポリマーは、アガロース、デキストラン、デンプン、セルロース等々といった多糖類、またはポリ(アクリルアミド)、ポリ(メタクリルアミド)、ポリ(アクリラート)、ポリ(メタクリラート)、親水性置換ポリ(アルキルアリルエーテル)、親水性置換ポリ(アルキルビニルエーテル)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(スチレン)、および対応するモノマーの共重合体などの合成ポリマーであり得る。これらの有機ポリマーは、好ましくはまた、架橋され

た親水性ネットワークの形態で採用することもできる。これは、スチレンおよびジビニルベンゼンで作られたポリマーもまた包含し、それは好ましくは、他の疎水性ポリマーのように、親水化された形態で採用することができる。

【００５５】

あるいは、シリカ、酸化ジルコニウム、二酸化チタン、酸化アルミニウム等々といった無機材料を、粒子状基材として採用することができる。複合材料、すなわち、例えば、磁性粒子または磁性コアの共重合によってそれ自体が磁化することができる粒子を採用することも同じく可能である。シェル、すなわち、少なくとも表面またはコーティングがOH基を有することによる、コアシェル材料を使用することもまた可能である。

【００５６】

しかしながら、本発明に従う材料は、好ましくは長期間の使用期間にわたって、例として、塩基性pHでのアルカリ洗浄または再生に耐えるべきであるため、加水分解に対して安定であるかまたは加水分解ができても困難である親水性の基材の使用が選好される。

【００５７】

ベースマトリックスは、不規則な形状または球状の粒子からなるものであってもよく、その粒子サイズは、2～1000μmの間であり得る。3～300μmの間の平均粒子サイズが選好され、最も好ましい態様においては平均粒子サイズは20～63μmの間である。

【００５８】

粒子状基材は、とりわけ、非多孔質または好ましくは多孔質粒子の形態であってもよい。平均細孔サイズは、2～300nmの間であり得る。5～200nmの間の細孔サイズが選好され、最も好ましい平均細孔サイズは40～110nmの間である。

【００５９】

極めて好ましい態様において、粒子状基材は、1,4-ブタンジオールモノビニルエーテル、1,5-ペンタンジオールモノビニルエーテル、ジエチレングリコールモノビニルエーテルまたはシクロヘキサンジメタノールモノビニルエーテルの群から選択される親水性置換されたアルキルビニルエーテルおよび架橋剤としてのジビニルエチレン尿素(1,3-ジビニルイミダゾリン-2-オン)の共重合によって形成されている。

好適な市販のビニルエーテルベースの基材の一例は、Eshmuno(登録商標), Merck KGaA, Germanyである。

【００６０】

好ましい粒子マトリックスは、弱陽イオン交換、強陽イオン交換および疎水性基を持つ、例として、Eshmuno(登録商標)HCX, Merck KGaA, Germanyのように、スルホン酸、カルボン酸およびフェニル基を持つマトリックスである。

【００６１】

以下のことを特徴とする、共有結合によってポリマー鎖がその表面へグラフトされたヒドロキシル基含有基材、好ましくはビニルエーテルベースの基材を含んでなる、粒子クロマトグラフィーマトリックスもまた好ましい：

a)ポリマー鎖は、ヒドロキシル基を介してベースマトリックスへ共有結合しており、

b)ポリマー鎖は、末端基-N(Y)-R3を含み、

Yは、互いに独立してHまたはCH_3であり、好ましくはHであり、

R3は、-CHCOOMR4であり、

R4は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチルのようなC1～C4アルキルであり、好ましくはイソプロピルおよびイソブチル、極めて好ましくはイソブチル、またはC1～C4ペルフルオロアルキルであり、

および、Mは、互いに独立して、H、Na、K、またはNH_4^+である。

【００６２】

一例は、Eshmuno(登録商標)CMX, Merck KGaAである。

基材は、同じくまた、繊維、中空繊維、またはコーティングの形態であってもよい。

【００６３】

本発明は、小型細胞外小胞を分離または精製する方法を提供する。これは、小型細胞外

小胞の1以上の亜集団を、小型細胞外小胞の1以上の他の亜集団からおよび/または試料中の他の不純物から分離できるということを意味する。好ましくは、少なくとも1つの小型細胞外小胞が、少なくとも1つの不純物、特にDNAから、および少なくとも1つの他の小型細胞外小胞の亜集団から分離される。

【００６４】

溶離のためにpH変化を使用した、少なくとも1種類の陽イオン交換基と1種類の疎水性基とを含む混合モード陽イオン交換クロマトグラフィーマトリックス上でのクロマトグラフの分離は、小型細胞外小胞の亜集団さえも分離するのに好適であるということが見出されている。異なるグリコシル化パターン、異なる表面タンパク質パターン、および/またはベシクル内の異なる積み荷が、ベシクルの電荷にわずかな違いを結果としてもたらすものと仮定される。予想外なことに、かかる最小限の違いは、混合モード陽イオンクロマトグラフィーマトリックスにpH勾配を適用したときに、分画された溶離を結果としてもたらすのに充分である。

【００６５】

本発明の方法によって、小型細胞外小胞、好ましくはエキソソームを、分離、濃縮および/または精製することができ、効率的な分離が可能となる。本発明の特定の側面においては、1のクロマトグラフィーステップで標的エキソソームを不純物および他の非標的エキソソームから分離することができる。高分解能の分離を達成することができ、および、異なるエキソソーム種の亜集団を単離することができる。

【００６６】

本発明の方法は、DNAおよび宿主細胞タンパク質のようなプロセス関連の不純物からエキソソームを分離するのに特に好適であることが見出された。加えて、陽イオン交換混合モードクロマトグラフィーは、エキソソームを、好ましくはそれらのグリコシル化率に基づいて分離するのに好適であることが見出された。エキソソームの表面のグリコシル化率が高いほど、エキソソームのクロマトグラフィーマトリックスとの相互作用が高くなり、これはクロマトグラフィーマトリックス上のより高い保持力につながる。特に良好な結果は、膜ベースのクロマトグラフィーマトリックスで得られる。

【００６７】

小型細胞外小胞を含む細胞の産生は、当業者に公知である。典型的には、選択された細胞は、好適な条件下のバイオリアクター内において好適な培養培地中で増え広がる。細胞は、接着または浮遊培養物として成長していてもよい。

【００６８】

一態様において、本開示は、(i)バイオリアクター内で細胞を培養すること、(ii)iv)エキソソームを単離および/または精製すること、のステップを含み、そこでのステップiv)が、混合モード陽イオン交換クロマトグラフィーマトリックス上でのクロマトグラフの精製を含むことによる、エキソソームを製造するための方法を提供する。エキソソームは、ネイティブのまたは操作されたエキソソームの可能性がある。

【００６９】

任意に、細胞採取の後、得られた混合物はまず濾過および/または遠心分離される。

一態様において、混合物は、大きな分子夾雑物および細胞デブリを除去するがしかし小型細胞外小胞がそこを通過することは許容するフィルターを通じて、濾過される。

【００７０】

一態様において、放出された小型細胞外小胞は、清澄化を使用して、細胞培養培地から分離および精製することができる。清澄化は、溶解された細胞および/または不純物などの相対的により大きな構成成分が溶液から除去される精密濾過プロセスであり得る。清澄化フィルターは、深層濾過、荷電深層濾過、および同様の精密濾過技法を包含する。

【００７１】

タンジェンシャルフロー濾過は、精製された小型細胞外小胞の混合物を濃縮するために、ならびに、塩およびタンパク質を除去するために使用され得る。タンジェンシャルフロー濾過(TFF)は、標的産物および/または不純物を含有する溶液の濾過または精製のため

の一般に迅速かつ効率的な方法であって、その間に溶液または液体流が濾過膜に対して平行に流れるものを指す。

【００７２】

遠心分離は、例えば細胞のデブリのようなより大きな粒子を除去するための低速遠心分離であり得る。これは、例えば、10000～12000gにて10～30分間行うことができる。放出される小型細胞外小胞は、上清中に見出すことができる。

【００７３】

小型細胞外小胞の単離および/または精製は、典型的には、以下のプロセスステップの1以上を包含する：

－ 清澄化
－ 濾過
－ 透析／透析濾過
－ タンジェンシャルフロー濾過
－ ヌクレアーゼ、例としてRNaseおよび/またはDNaseを用いる処置
－ クロロホルムを用いる処置
－ イオン交換クロマトグラフィー
－ 親和性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
－ 遠心分離
－ PEG沈殿

【００７４】

いくつかの態様において、ヌクレアーゼ、典型的にはエンドヌクレアーゼが、例として宿主細胞DNAの量を低減するために、添加される。それは、バイオリアクター内の混合物へ直接的に添加することができる。ヌクレアーゼは、DNAおよびRNAの両方を分解するものであってもよい。一態様において、エンドヌクレアーゼは、名称Benzonase(登録商標)(EMD Millipore, US)下で販売されるSerratia marcescensからの遺伝子学的に改変されたエンドヌクレアーゼである。

【００７５】

陽イオン交換混合クロマトグラフィーステップにおいて、標的の小型細胞外小胞が試料中の少なくとも1つの不純物から分離され、それは小型細胞外小胞を含む試料がクロマトグラフィーマトリックスと接触させられることによる。接触時間は、大抵、30秒から24時間までの範囲である。混合モード陽イオン交換クロマトグラフィーマトリックスを含有するクロマトグラフィーカラムを通じて液体を通すことによって、液体クロマトグラフィーの原理に従って作業することが有利である。液体は、単にその重力を通じてカラムを通過するか、またはポンプの手段によってポンプ送出されることができる。

【００７６】

代替の方法は、エキソソームがクロマトグラフィーマトリックスに結合可能になるために必要な長さだけ攪拌または振とうすることによって分離材料を液体と混合する、バッチクロマトグラフィーである。分離しようとする液体を、例えば、クロマトグラフィーマトリックスを含む懸濁液中へと導入することにより、クロマトグラフ流動床の原理に従って機能を果たすことも同じく可能であり、そこでは、クロマトグラフィーマトリックスは、その高密度および/または磁性コアゆえに、それが所望の分離に好適であるように選択される。

【００７７】

クロマトグラフのプロセスは、結合および溶離モードで実行され、および、標的の小型細胞外小胞がクロマトグラフィーマトリックスへ結合する。クロマトグラフィーマトリックスは、その後、1以上の洗浄緩衝液で洗浄することができ、これは好ましくは試料がクロマトグラフィーマトリックスと接触する液体と同じイオン強度および同じpHを有する。洗浄緩衝液は、クロマトグラフィーマトリックスに結合しない物質を除去する。他の好適な緩衝液でのさらなる洗浄ステップが、標的の小型細胞外小胞を脱離することなくこれ

に続いてもよい。

【００７８】

結合した小型細胞外小胞の脱離は、少なくとも溶離液中のpHを変化させることによって実施される。加えて、溶離緩衝液のイオン強度および/または溶離緩衝液中に含まれる溶媒は、ローディングの条件と比較して変化する可能性がある。よって、標的の小型細胞外小胞は、溶離液中で精製および濃縮された形態で得ることができる。標的の小型細胞外小胞は、大抵、脱離後、70パーセント～99パーセント、好ましくは85パーセント～99パーセント、殊更好ましくは90パーセント～99パーセントの純度を有する。

【００７９】

陽イオン交換混合モード材料は、小型細胞外小胞の精製のために使用することができ、宿主細胞タンパク質のような不純物の効率的な除去を可能にする。その上、好ましくは、同じクロマトグラフィーステップが、非標的の小型細胞外小胞の除去を加えて提供する。好ましい態様において、クロマトグラフィーマトリックスは、膜、特にヒドロゲル膜である。

【００８０】

使用されるクロマトグラフィーマトリックスの性質(すなわち、強および/または弱陽イオン交換体、疎水性基のタイプ)、ならびに塩濃度、使用される緩衝液、およびpH の条件は、標的の小型細胞外小胞として選択された小型細胞外小胞のバリアントに依存して変動することになる。公知の小型細胞外小胞のバリアントはすべて、サイズおよび形状などの特色を共有している一方で、それらは分子トポロジーおよび表面電荷分布の細部の点で異なる。

【００８１】

ゆえに、すべての小型細胞外小胞のバリアントは混合モード陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製に適していることが予期される一方で、最適な方法は、クロマトグラフィー樹脂および緩衝液のスクリーニング実験を使用して体系的に決定することができ、効率的な精製を達成するには、各々の小型細胞外小胞のバリアントのために異なる条件が要求されることになる。かかる条件の決定は、当業者には容易に明白である。

【００８２】

好ましくは、クロマトグラフの精製は、導電率を一定レベルに保ちながら、勾配またはステップモードで、4～7から、8.5以上のpHまで、好ましくは8.5～10の間、最も好ましくはpH8.5～9.5の間のpHまでの、pH変化を使用することによって行われる。クロマトグラフマトリックスに適用される試料は、pH勾配が始まるpHへ調整される。

【００８３】

使用するのに好適である緩衝液は、例えば、以下のものである：pH4.5およびおよそ24mS/cmの導電率の、0.00796Mクエン酸、0.009068Mリン酸二水素ナトリウム、0.021543Mグリシン、0.010668M TRIS、0.007666M 4 コハク酸、0.0111M NaOH、および0.2889M NaClおよびB緩衝液(例として、pH8.5およびおよそ24mS/cmの導電率の、0.00796Mクエン酸、0.009068Mリン酸二水素ナトリウム、0.021543Mグリシン、0.010668M TRIS、0.007666Mコハク酸、0.046M NaOH、および0.254M NaCl)。好適な代替品は、リン酸緩衝液またはトリス緩衝液である。

【００８４】

直線またはステップモードのpH勾配を、直線またはステップモードの塩勾配と組み合わせることによって、クロマトグラフのマトリックスからの溶離を行うこともまた可能である。塩は、NaCl、KCl、硫酸塩、ギ酸塩および酢酸塩からなる群から選択してもよく、好ましくは、NaClであってもよい。典型的には、勾配は、低い塩濃度、例として、10～100mMの間の塩で始まり、それは次いで、標的の小型細胞外小胞が溶離するまで、例として、250～500mMの塩まで、増大させられる。

【００８５】

用語「カラム体積」は、クロマトグラフィーマトリックスによって占められていない充填カラムの内部の体積を指す。この体積は、間隙体積(マトリックスの外側の体積)とマト

リックス自体の内部の多孔性(細孔体積)との両方を包含する。

【００８６】

好ましい態様において、適用される直線勾配は、ほぼ60～120カラム体積(CV)、加えて任意に少なくとも20CVの標的溶離緩衝液での追加の保持ステップまでは続く。

標的産物の回収率は、60%を超え、好ましくは80%を超える。

【００８７】

さらに、本発明は、再生することができ、かつ、広い操作ウィンドウ、例としてpH3～10、導電率1mS/cm～50mS/cmにおいて適用可能である、クロマトグラフィーベースの小型細胞外小胞精製ステップを提供する。

【００８８】

好ましい態様において、本発明の方法は、10^{9}～10^{12}個の小型細胞外小胞/ml試料を含む試料を精製するために使用される。

導電率のウィンドウスパンは、1mS/cm～50mS/cmの間であり、より好ましい態様においては、2～30mS/cmの間の導電率の範囲である。

好ましくは、クロマトグラフィーマトリックスのイオン密度は10～1200μeq/gの間である。

【００８９】

本発明の方法は、先のプロセスステップを必要とすることなく、すべての小型細胞外小胞に対して適用することができる。好ましくは、粗細胞培養上清(ヌクレアーゼで処置および清澄化されたもの)をクロマトグラフィーマトリックスへ直接的に適用することができる。

【００９０】

極めて好ましい態様において、試料が、例として、Benzonase(登録商標)(Merck GaA, Germany)のようなヌクレアーゼで処置されてかつ清澄化された粗細胞培養上清の形態で、4.5～5.5の間のpHおよびほぼ20mS～30mSの導電率にて、陽イオン交換基および疎水基を持つ膜へ適用される。

溶離は、試料pHに依存して、4.5～5.5の間のpHから、8.5～10.5の間のpHまで、一定の導電率で、例として150mM Na^{+}で、直線pH勾配を適用することによって行われる。

【００９１】

溶離は、好ましくは、少なくとも2つの画分を結果としてもたらす。画分1は、プロセス関連の不純物の大部分を含む。画分2は、小型細胞外小胞が高度に濃縮された部分、および2～3logの不純物の対数減少を含む。極めて好ましい溶離は、小型細胞外小胞の異なる亜集団を含む少なくとも2つの画分を結果としてもたらす。

【００９２】

好ましい緩衝液組成は、4～11の広いpH範囲を持つ緩衝液であり、例として、これらに限定されないが、トリス、リン酸塩および酢酸ならびにアミノ酸を含有するGood緩衝液系である。

【００９３】

本発明の方法では、小型細胞外小胞を効率的に精製することができる。典型的には、夾雑物、DNAでさえも、2log以上の対数減少で低減させることができる。好ましくは、この方法は、2logよりも高い宿主細胞タンパク質およびDNAの低減を達成する。加えて、異なる小型細胞外小胞集団は、それらのグリコシル化率、グリコシル化パターン、表面タンパク質パターンおよび/または積み荷に基づいて、好ましくはそれらのグリコシル化率およびグリコシル化パターンに基づいて、分離することができる。よって、プロセスおよび製品関連の不純物を、1の単一ステップで除去することができる。

【００９４】

本発明は、以下の図および例によってさらに説明され、しかしながら、それに制限されるものではない。

上記および下記において引用されるすべての出願、特許、および刊行物、ならびに20

22年3月18日に出願された対応するEP出願であるEP第22163007.2号の全体の開示が、参照によって本明細書に組み込まれる。

【００９５】

例

HEK293T細胞を、L-グルタミンを用いてかつFBSなしで調製された合計20mlのDMEM中で、T-75培養フラスコ内において24時間の間成長させた。細胞上清を使用して、EVを単離した。あらゆる細胞を除去するために、まず、培地を300xgで10分間遠心分離した。次いで上清を清潔なチューブへ移し、および、他のデブリを除去するために2,000xgで15分間再び遠心分離した。この時点で、100kDa MWCO限外濾過デバイス(Amicon(登録商標)Ultra-15, Millipore)を使用して1000xgで10分間遠心分離することにより、培地を3mlまで濃縮した。100kDa MWCO限外濾過デバイスを使用して1000xgで10分間3回再び遠心分離して、緩衝液A(表1)との緩衝液交換を行った。クロマトグラフの分離の前に、馴化培地を、0.22μmフィルター(Millipore)に通して濾過した。

【００９６】

Eshmuno(登録商標)CMX上でのクロマトグラフの結合および溶離分離には、表1および2に示される緩衝液を使用した。表3は、Aekta(商標)システムを使用した方法をまとめている。

【００９７】

【表１】

表 1:緩衝液 A(pH5)

化学薬品	濃度[mol/L]
クエン酸一水和物	0.00796
リン酸二水素ナトリウム一水和物	0.009068
グリシン	0.021543
TRIS	0.010668
コハク酸二ナトリウム	0.007666
NaOH 32%	0.0111
NaCl	0.2889

【００９８】

【表２】

表 2:緩衝液 B(pH8.5)

化学薬品	濃度[mol/L]
クエン酸一水和物	0.00796
リン酸二水素ナトリウム一水和物	0.009068
グリシン	0.021543
TRIS	0.010668
コハク酸二ナトリウム	0.007666
NaOH 32%	0.046
NaCl	0.254

【００９９】

【表３】

表 3:クロマトグラフのステップ

ステップ	溶液	体積
平衡化	100% 緩衝液 A	10CV
試料の適用	馴化細胞培養上清	15CV
洗浄	100% 緩衝液	10CV
勾配溶離	0～100% 緩衝液 B	60CV
溶離	100% 緩衝液 B	5CV
CIP	1M NaOH	6CV
再平衡化	100% 緩衝液 A	10CV

【０１００】

Eshmuno(登録商標)ＣＭＸを充填したカラムを、緩衝液Ａを使用して少なくとも１０ＣＶで平衡化した。１５ＣＶの馴化細胞上清をカラム上へと適用した。勾配溶離の前に弱く結合したあらゆる不純物を溶離させるために、緩衝液Ａを使用した１０ＣＶの洗浄ステップを行った。次いで、６０ＣＶで直線ｐＨ勾配においてエキソソームを溶離させた。固く結合したタンパク質、ベシクルまたは他の不純物を溶離するために、カラムを６ＣＶの１Ｍ水酸化ナトリウム溶液で洗浄し、これに続いて緩衝液Ａでの再平衡化を行った。溶離は、０.５ｍＬの画分へと分画した。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/056537

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K35/12 B01D15/16 B01D15/36 B01D15/38 C07K14/47
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K B01D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020/191369 A1 (CODIAK BIOSCIENCES INC [US]) 24 September 2020 (2020-09-24) cited in the application paragraph [0136]; claim 1	1-10
A	WO 2021/062290 A1 (CODIAK BIOSCIENCES INC [US]) 1 April 2021 (2021-04-01) claims 1,32	1-10
A	WO 2021/092193 A1 (CODIAK BIOSCIENCES INC [US]) 14 May 2021 (2021-05-14) claim 37	1-10
A	WO 2021/062317 A1 (CODIAK BIOSCIENCES INC [US]) 1 April 2021 (2021-04-01) paragraph [0357]	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 June 2023	14/06/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Oikonomou, Evdokia

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/056537

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020191369 A1	24-09-2020	EP 3941607 A1	26-01-2022
		US 2022387906 A1	08-12-2022
		WO 2020191369 A1	24-09-2020
WO 2021062290 A1	01-04-2021	EP 4034276 A1	03-08-2022
		US 2023103726 A1	06-04-2023
		WO 2021062290 A1	01-04-2021
WO 2021092193 A1	14-05-2021	US 2022390437 A1	08-12-2022
		WO 2021092193 A1	14-05-2021
WO 2021062317 A1	01-04-2021	AU 2020355240 A1	21-04-2022
		BR 112022005614 A2	12-07-2022
		CA 3152478 A1	01-04-2021
		CN 114727947 A	08-07-2022
		EP 4034081 A1	03-08-2022
		IL 291690 A	01-05-2022
		JP 2022549328 A	24-11-2022
		KR 20220092654 A	01-07-2022
		WO 2021062317 A1	01-04-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

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

(72)発明者　ベスト，タチアーナ
ドイツ連邦共和国　６４２９３　ダルムシュタット、フランクフルター　シュトラーセ　２５０、シー／オー　メルク　ライフ　サイエンス　カーゲーアーアー
(72)発明者　ウェステンハーゲン，エレナ
ドイツ連邦共和国　６４２９３　ダルムシュタット、フランクフルター　シュトラーセ　２５０、シー／オー　メルク　ライフ　サイエンス　カーゲーアーアー
(72)発明者　ルンモ，オリバー
ドイツ連邦共和国　６４２９３　ダルムシュタット、フランクフルター　シュトラーセ　２５０、シー／オー　メルク　ライフ　サイエンス　カーゲーアーアー

Ｆターム（参考）　4B065　AA90X AA90Y BD15 BD17 BD18 CA46