

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6039828号  
(P6039828)

(45) 発行日 平成28年12月7日 (2016. 12. 7)

(24) 登録日 平成28年11月11日 (2016. 11. 11)

(51) Int. Cl.

F I

<b>C O 7 K</b>	<b>1/22</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>C O 7 K</b>	<b>1/22</b>
<b>C O 7 K</b>	<b>1/20</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>C O 7 K</b>	<b>1/20</b>
<b>C O 7 K</b>	<b>1/18</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>C O 7 K</b>	<b>1/18</b>
<b>C O 7 K</b>	<b>1/34</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>C O 7 K</b>	<b>1/34</b>
<b>C O 7 K</b>	<b>16/18</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>C O 7 K</b>	<b>16/18</b>

請求項の数 32 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-563045 (P2015-563045)  
 (86) (22) 出願日 平成26年6月25日 (2014. 6. 25)  
 (65) 公表番号 特表2016-525500 (P2016-525500A)  
 (43) 公表日 平成28年8月25日 (2016. 8. 25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IN2014/000421  
 (87) 国際公開番号 W02014/207763  
 (87) 国際公開日 平成26年12月31日 (2014. 12. 31)  
 審査請求日 平成27年12月21日 (2015. 12. 21)  
 (31) 優先権主張番号 2145/MUM/2013  
 (32) 優先日 平成25年6月25日 (2013. 6. 25)  
 (33) 優先権主張国 インド (IN)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 507365927  
 カディラ・ヘルスケア・リミテッド  
 インド・グジャラート・アーメダバッド・  
 380・015・サテライト・クロス・ロ  
 ーズ・(番地なし)・ザイダス・タワー  
 (74) 代理人 100108453  
 弁理士 村山 靖彦  
 (74) 代理人 100110364  
 弁理士 実広 信哉  
 (74) 代理人 100133400  
 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体の精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の逐次的な工程

(a) アフィニティークロマトグラフィー

(b) 疎水性相互作用クロマトグラフィー、場合によって次いで他の適切な精製工程

を含む、細胞培養液からモノクローナル抗体を精製するための方法であって、  
 工程(a)が、結合のための適切なpH及び/又は伝導性での、所望の抗体を含む未精製混合物  
 のカラムへの添加、次いで単一ピークの形態での所望の抗体の溶出に先立つ、カラム洗浄  
 を含む、

カラム洗浄が:

(i) 適切なpH及び/又は伝導度での平衡化バッファーでの第1洗浄

(ii) 第1洗浄バッファーと同じpH及び/又は第1洗浄バッファーよりも高い伝導度での第2洗  
 浄

(iii) 第2洗浄バッファーよりも低いpH及び/又は伝導度での第3洗浄

(iv) 第3洗浄バッファーよりも低いpH及び/又は高い伝導度での抗体の溶出  
 を含む、方法。

【請求項 2】

アフィニティークロマトグラフィーマトリックスがプロテインA、プロテインG及びプロ  
 テインLから選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

アフィニティークロマトグラフィーマトリックスがプロテインAである、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

カラム洗浄が：

(i) pH7.4及び/又は1mS/cmから30mS/cmの範囲の伝導度の平衡化バッファーでの第1洗浄

(ii) pH7.4及び/又は30mS/cmを超える伝導度の第2洗浄

(iii) pH5からpH6.5の範囲のpH及び/又は1mS/cmから5mS/cmの範囲の伝導度での第3洗浄

(iv) pH3.5及び/又は5mS/cmより高い伝導度での抗体の溶出

を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

バッファー成分がTris、酢酸及びクエン酸バッファーから選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

抗体の溶出がpH3.5からpH4の範囲のpHで行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

溶出を、バッファー内における塩化ナトリウム、アルギニン、グリシン等の添加物で行う、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

工程(a)の後の抗体調製物における凝集体の量が、5%以下である、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

工程(b)がpH5からpH7の範囲のpH及び/又は100mS/cmを超える伝導度で行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

工程(b)において、抗体が下方勾配塩濃度でカラムから溶出される、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

塩が、硫酸アンモニウム、塩化ナトリウム、塩化アンモニウム及び硫酸ナトリウムから選択される、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

疎水性カラムマトリックスが、フェニルセファロース、ブチルセファロース、オクチルセファロースから選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

(a) プロテインAアフィニティークロマトグラフィー

(b) 疎水性相互作用クロマトグラフィー

(c) イオン交換クロマトグラフィー

の工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

工程(a)が、請求項2から8のいずれか一項における工程(a)に基づいて実行される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

工程(b)が、請求項9から11のいずれか一項における工程(b)に基づいて実行される、請求項13に記載の方法。

【請求項16】

イオン交換クロマトグラフィーが、陽イオン交換クロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィーから選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項17】

イオン交換クロマトグラフィーが、陰イオン交換クロマトグラフィーである、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

10

20

30

40

50

陰イオン交換クロマトグラフィーのためのカラムマトリックスがDEAEセファロース、Mono Q及びQセファロースXLから選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項19】

カラムマトリックスがQセファロースである、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

工程(c)での抗体の溶出が、フロースルー及び洗浄モード又は結合-溶出モードで行われる、請求項13に記載の方法。

【請求項21】

a)細胞分離

b)プロテインAクロマトグラフィー

c)低pHインキュベーション

d)中性化及びリコンディショニング

e)疎水性相互作用クロマトグラフィー

f)限外ろ過-ダイアフィルトレーション

g)陰イオン交換クロマトグラフィー

h)ナノろ過

i)限外ろ過-ダイアフィルトレーション

j)マイクロフィルター法

からなる、請求項1に記載の方法。

【請求項22】

工程(a)が請求項2から7のいずれか一項における工程(a)に基づいて実行される、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

工程(b)が請求項8から10のいずれか一項における工程(b)に基づいて実行される、請求項21に記載の方法。

【請求項24】

ダイアフィルトレーション媒体がリン酸、酢酸、クエン酸、コハク酸及びその組み合わせから選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項25】

抗体が、クエン酸、酢酸、リン酸から選択されるバッファー成分でカラムから回収される、請求項1から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

抗体が、塩化ナトリウム、アルギニン、グリシンから選択される添加物でカラムから回収される、請求項1から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

抗体の溶出が、pH5からpH7の範囲のpHで行われる、請求項1から26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

抗体の全体の回収率が、最初の量の50%以上の範囲である、請求項1から27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】

精製した抗体調製物が1%以下の凝集体を含む、請求項1から28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

抗体が、抗HER抗体、抗TNF抗体、抗VEGF抗体、抗CD20抗体、抗CD52抗体、抗RANKL、抗IgE抗体から選択される、請求項1から29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項31】

抗体が、トラスツズマブ、ペルツズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、ベバシズマブ、ラニビズマブ、リツキシマブ、ベクツモマブ(bectumomab)、エブラツズマブから選択される、請求項1から30のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 3 2】

抗体が、アダリムマブ、トラスツズマブ及びリツキシマブである、請求項1から31のいずれか一項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、細胞培養液からのモノクローナル抗体の精製のための改良方法を提供する。所望のモノクローナル抗体の精製方法には、アフィニティー、疎水性相互作用及び場合によってイオン交換カラムクロマトグラフィーが含まれる。それによって、所望のモノクローナル抗体の99%を超える純度が得られる。

10

## 【背景技術】

## 【0002】

細胞培養培地からの医薬品グレードのモノクローナル抗体タンパク質の精製には、採取/清澄に次いで、膜限外ろ過及びダイアフィルトレーションを組み合わせた一連のカラムクロマトグラフィー工程を用いた精製が含まれる。精製後、所望の抗体調製物が適切に処方され、適切な条件下で保存される。しかしながら、これらの工程によっては、その医薬用途として必要な望ましいレベルの純度及び品質の抗体が提供されないことが度々ある。時には、方法に関連した及び生成物に関連した不純物が、カラム精製の間に所望の抗体とともに共溶出されることが観察される。従って、所望の調製物からそのような不純物を減少させる又は除去することが重要である。更に、タンパク質凝集は、モノクローナル抗体(mAb)生産の間の主要な懸念事項である。凝集体が存在すると、モノクローナル抗体の治療効果が減少する可能性があり、ヒトにおいて免疫原性反応を引き起こすことが知られている。従って、精製の下流段階の間に、主にカラムクロマトグラフィーによって、所望のモノクローナル抗体の調製物から凝集体を除去する必要がある。この問題を解決する目的で、本発明は、特定の様式で一連のカラムクロマトグラフィーを用い、目的の抗体を含む無細胞培養培地から高分子量凝集体とともに関連及び生成物関連の不純物を所望のレベルまで除去することに役立つ、抗体精製の新規の方法を提供する。本発明において、抗体精製の該方法は、80%を超える回収率で高度に精製された抗体調製物を産生するよく制御された直接的な精製方法を実証する。本発明において、高度に精製された抗体調製物とは、方法関連及び生成物関連の不純物が実質的に無く、本質的にタンパク質の高分子量凝集体が欠如した少なくとも99%の純度の抗体調製物を意味する。更に、本発明は、高度に拡張性があり、再現性のある、モノクローナル抗体の精製方法を提供する。記載される新規の精製方法は、プロセス経済及び産業的パイアビリティーの観点で、治療用途のための様々な抗体の精製のための共通のプラットフォームを提供する。

20

30

## 【0003】

そのような技術のいくつかは、下記の特許文献に開示されている：

## 【0004】

米国特許第6417335号は、抗体及び混入物を含む組成物から抗体を精製するための方法を開示しており、その方法には：(a)組成物を陽イオン交換樹脂に添加する工程であって、陽イオン交換樹脂に添加する抗体の量が陽イオン交換樹脂1mLあたり約20mgから約35mgの抗体である工程；及び(b)抗体を陽イオン交換樹脂から溶出する工程が含まれる。

40

## 【0005】

米国特許第7863426号は、イオン交換分離工程を含む、抗体及び少なくとも1つの宿主細胞タンパク質(host cell protein; HCP)を含む混合物からHCP低減抗体調製物を産生する方法であって、前記混合物は、HCP低減抗体調製物が得られるように、第1イオン交換材料に供される方法を記載している。

## 【0006】

本発明分野の他の関連特許は、米国特許第6489447号、欧州特許第1075488号；欧州特許第1308455号；欧州特許第1308456B号などである。それらの各々はその全体が引用として取り込まれる。

50

## 【 0 0 0 7 】

本発明は、従来のカラムクロマトグラフィー技術を独自の様式で用いて、高度に精製された所望の抗体調製物を得る一方で、方法及び生成物関連不純物、特にタンパク質凝集体を除去することにより、新規の抗体の精製方法を提供する。本発明者らは本明細書においてそのような精製方法を開示する。

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 8 】

【 特許文献 1 】 米国特許第6417335号

【 特許文献 2 】 米国特許第7863426号

10

【 特許文献 3 】 米国特許第6489447号

【 特許文献 4 】 欧州特許第1075488号

【 特許文献 5 】 欧州特許第1308455号

【 特許文献 6 】 欧州特許第1308456B号

## 【 発明の概要 】

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 9 】

本発明は、細胞培養液由来の未精製混合物からモノクローナル抗体を精製するための方法を提供する。

## 【 0 0 1 0 】

20

1つの態様において、本発明は、一連のクロマトグラフィー及び限外ろ過-ダイアフィルトレーション工程を含む、未精製混合物からのモノクローナル抗体の精製方法を提供するのである。

## 【 0 0 1 1 】

別の態様において、本発明は、プロテインAアフィニティークロマトグラフィー及び疎水性相互作用クロマトグラフィー工程の使用を含む、未精製混合物からのモノクローナル抗体の精製方法を提供する。プロテインG又はプロテインLは、アフィニティークロマトグラフィー工程においてカラムマトリックスとして使用可能である。

## 【 0 0 1 2 】

更なる態様において、プロテインAアフィニティークロマトグラフィー工程には、所望の抗体を含む未精製混合物を適切なpH及び/又は結合の伝導性でカラムに添加する工程が含まれ、その後、単一ピークの形態での所望の抗体の溶出の前のカラム洗浄が続く。

30

## 【 0 0 1 3 】

別の態様において、本発明に記載の方法には、3つのカラム洗浄工程が含まれ、それは(i)平衡化バッファーでの第1洗浄、(ii)同じpH及び/又は第1洗浄バッファーよりも高い伝導度での第2洗浄(iii)第2洗浄よりも低いpH及び/又は伝導度での第3洗浄(iv)第3洗浄よりも低いpH及び/又は高い伝導度での抗体の溶出である。

## 【 0 0 1 4 】

別の態様において、本発明に記載の疎水性相互作用クロマトグラフィーは下方勾配塩濃度で行われる。

40

## 【 0 0 1 5 】

更なる態様において、本発明は、プロテインA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及びイオン交換カラムクロマトグラフィーを含む、未精製混合物からのモノクローナル抗体の精製方法を提供する。

## 【 0 0 1 6 】

更に別の態様において、本発明は、タンパク質溶液のリコンディショニングのための限外ろ過-ダイアフィルトレーションを組み合わせ、プロテインA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及びイオン交換カラムクロマトグラフィーを含む、未精製混合物からのモノクローナル抗体の精製方法を提供する。タンパク質溶液とは、ここでは本明細書に記載の方法によって得られた混入タンパク質と所望の抗体の混合物又は比較

50

的純粋な所望の抗体調製物いずれかのことを称した。

【0017】

更なる態様において、本発明に記載のイオン交換クロマトグラフィーは、陽イオン交換クロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィー、好ましくは陰イオン交換クロマトグラフィーから選択される。

【0018】

好ましい実施態様において、本発明は下記の工程を含む、モノクローナル抗体の精製方法を提供する：

1. プロテインAクロマトグラフィー
2. 疎水性相互作用クロマトグラフィー
3. 陰イオン交換クロマトグラフィー

10

【0019】

疎水性相互作用クロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィー工程は任意の順序で実行してもよい。

【0020】

プロテインAカラム工程は未精製混合物からモノクローナル抗体を捕獲し、結合-溶出モードにおいて所望のモノクローナル抗体を高レベルの純度でカラムから溶出するために有用である。疎水性相互作用クロマトグラフィー工程は、結合-溶出モードにおいて方法及び生成物関連不純物の更なる除去のために使用される。陰イオン交換クロマトグラフィーは、フロースルーモードにおいて方法関連不純物を更に除去するために利用される。

20

【0021】

1つの態様において、本発明に記載の精製できる抗体には、抗HER2抗体、抗TNF 抗体、抗VEGF抗体、抗CD20抗体、抗CD52、抗RANKL、抗IgE抗体などが含まれる。

【0022】

更なる態様において、本発明は、プロテインAアフィニティークロマトグラフィー工程後に5%以下の凝集体の量の抗体調製物を提供する。

【0023】

別の態様において、本発明は、1%以下、より好ましくは0.5%以下の凝集体の量の抗体調製物を提供する。

【0024】

30

本明細書において使用される略称は下記に定義されるとおりである：

プロテインA: アガロースカラムに架橋結合させたプロテインA。

HIC: 疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー。

AEX: 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー。

HP-SEC: 高速サイズ排除クロマトグラフィー。

MWCO: 分子量カットオフ。

NaCl: 塩化ナトリウム。

WFI: 注入水。

【図面の簡単な説明】

【0025】

40

【図1】図1はプロテインAアフィニティークラムクロマトグラフィーを通したアダリムマブの溶出プロファイルを図示する図である。

【図2】図2は分析HP-サイズ排除クロマトグラフィー(HP-SEC)によるプロテインAアフィニティークラム精製アダリムマブの純度を図示する図である。図は第1カラム精製の後に99%を超えるアダリムマブの純度が達成されることを示している。

【図3】図3は疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーを通したアダリムマブの溶出プロファイルを図示する図である。

【図4】図4は分析HP-サイズ排除クロマトグラフィー(HP-SEC)によるHIC精製アダリムマブの純度を図示する図である。図は第2カラム精製の後に99%を超えるアダリムマブの純度が達成されることを示している。

50

【図5】図5はアダリムマブの陰イオン交換カラムクロマトグラフィープロファイルを示す図である。

【図6】図6は分析HP-サイズ排除クロマトグラフィー(HP-SEC)によるAEXカラム精製アダリムマブの純度を図示する図である。図はAEXカラム精製の後に99%を超えるアダリムマブの純度が達成されることを示している。

【図7】図7は分析HP-サイズ排除クロマトグラフィー(HP-SEC)による精製アダリムマブの純度を図示する図である。図は最終調製における精製の最後に99%を超えるアダリムマブの純度が達成されることを示している。

【図8】図8は分析HP-サイズ排除クロマトグラフィー(HP-SEC)によるHIC精製リツキシマブの純度を図示する図である。図は第2カラム精製の後に99%を超えるリツキシマブの純度が達成されることを示している。

10

【図9】図9は分析HP-サイズ排除クロマトグラフィー(HP-SEC)によるHIC精製トラスツズマブの純度を図示する図である。図は第2カラム精製の後に99%を超えるトラスツズマブの純度が達成されることを示している。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明は限外ろ過及びダイアフィルトレーションを組み合わせたアフィニティークラム、疎水性相互作用カラム及びイオン交換カラムクロマトグラフィーを含む一連のカラムクロマトグラフィー工程を使用した、細胞培養液由来のモノクローナル抗体の精製方法を記載する。

20

【0027】

1つの実施態様において、本発明はプロテインAカラムクロマトグラフィーを使用して、最初は捕獲し、続いてタンパク質をカラムから高レベルの純度、低いpHで、場合によって添加物/塩の存在下で溶出することによる、未精製混合物からの細胞培養液由来のモノクローナル抗体の精製方法を提供する。未精製混合物は、目的のタンパク質のものに加えて、宿主細胞由来の混入タンパク質、生成物関連物質及び他の不純物を含んでいてもよい。プロテインG又はプロテインLをアフィニティークロマトグラフィー工程におけるカラムマトリックスとして使用することができる。

【0028】

別の実施態様において、本発明に記載の方法として、3つのカラム洗浄工程が含まれ、それは(i)平衡化バッファーでの第1洗浄、(ii)同じpH及び/又は第1洗浄バッファーよりも高い伝導度での第2洗浄(iii)第2洗浄よりも低いpH及び/又は伝導度での第3洗浄(iv)第3洗浄よりも低いpH及び/又は高い伝導度での抗体の溶出である。

30

【0029】

好ましい実施態様において、本発明に記載のカラム洗浄工程は:(i)約pH7.4及び/又は約20mS/cm、好ましくは1mS/cmから30mS/cmの範囲の伝導度での平衡化バッファーでの第1洗浄(ii)約pH7.4及び/又は20mS/cmを超える伝導度での第2洗浄(iii)pH7.4よりも低いpH、好ましくはpH5からpH6.5の範囲、及び/又は20mS/cm未満、好ましくは1mS/cmから5mS/cmの範囲の伝導度での第3洗浄(iv)約pH3.5及び/又は5mS/cmより高い伝導度での抗体の溶出を含んでいる。

40

【0030】

1つの実施態様において、プロテインAクロマトグラフィー精製工程のためのバッファー成分は、Tris、酢酸及びクエン酸バッファーから選択される。

【0031】

好ましい実施態様において、本発明に記載の抗体の溶出は、約pH3.5から4、好ましくは3.5から3.7の範囲のpHにおいて行われる。

【0032】

1つの実施態様において、本発明に記載の方法は、塩化ナトリウム、アルギニン、グリシン、好ましくは塩化ナトリウムから選択される添加物/塩を含む。

【0033】

50

本発明はまた、塩存在下、低バッファpH条件において最大の回収率でカラムから目的のタンパク質を溶出する一方で、プロテインAカラムクロマトグラフィーによる宿主細胞混入タンパク質の大部分の除去を実証する。

【0034】

1つの実施態様において、本発明はまた、酸性pH条件下でのプロテインAカラムからの溶出後に所望のモノクローナル抗体の分子整合性が、分析HP-SECにより評価した場合に、少なくとも約1時間の間、変化せずに保たれることを実証する。

【0035】

別の実施態様において、本発明は、疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーを結合-溶出モードにおいて使用することによる、所望のタンパク質画分からの残留した方法関連及び生成物関連不純物の除去を提供する。所望のタンパク質の溶出は下方勾配塩濃度で、主要ピークの形態で行われる。

10

【0036】

更なる実施態様において、疎水性相互作用クロマトグラフィーのためのカラムマトリックスは、フェニルセファロース、ブチルセファロース、オクチルセファロース、好ましくは、フェニルセファロースから選択される。

【0037】

更なる実施態様において、疎水性相互作用クロマトグラフィー工程での所望のタンパク質の溶出のための塩は、硫酸アンモニウム、塩化ナトリウム、塩化アンモニウム、硫酸ナトリウム、好ましくは、硫酸アンモニウムから選択される。

20

【0038】

別の実施態様において、疎水性相互作用クロマトグラフィーはpH5からpH7の範囲のpHで、及び/又は100mS/cmを超える伝導度で行われる。

【0039】

1つの実施態様において、本発明に記載のイオン交換クロマトグラフィーは、陽イオン交換クロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィー、好ましくは陰イオン交換クロマトグラフィーから選択される。

【0040】

別の実施態様において、陰イオン交換クロマトグラフィー工程のためのカラムマトリックスは、DEAEセファロース、Mono Q及びQセファロースXL、好ましくはQセファロースから選択される。

30

【0041】

1つの実施態様において、本発明はまた、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによるフロースルー及び洗浄モードでの又は陽イオン交換クロマトグラフィーによる結合-溶出モードでの所望のモノクローナル抗体の精製を説明する。

【0042】

好ましい実施態様において、細胞培養液由来の所望のモノクローナル抗体の精製は、下記のように実行される：

1. プロテインAクロマトグラフィー
2. 疎水性相互作用クロマトグラフィー
3. 陰イオン交換クロマトグラフィー

40

【0043】

疎水性及び陰イオン交換クロマトグラフィー工程は、プロテインAカラムクロマトグラフィー工程の後で、任意の順序で行うことができる。

【0044】

好ましい実施態様において、細胞培養液由来の所望のモノクローナル抗体の精製は下記のように行われる：

1. プロテインAクロマトグラフィー
2. 低pHインキュベーション
3. 中性化及びリコンディショニング

50



- 4.疎水性相互作用クロマトグラフィー
- 5.限外ろ過-ダイアフィルトレーション
- 6.陰イオン交換クロマトグラフィー
- 7.ナノろ過
- 8.限外ろ過-ダイアフィルトレーション

## 【0045】

ここで、疎水クロマトグラフィー、限外ろ過-ダイアフィルトレーション及び陰イオン交換クロマトグラフィー工程は、プロテインAクロマトグラフィー工程の後で、任意の順序で行うことができる。

## 【0046】

更なる実施態様において、ダイアフィルトレーション媒体は、水、クエン酸バッファー、リン酸バッファー、コハク酸エステルバッファー、酢酸バッファー及びそれらの組み合わせから選択される。

## 【0047】

1つの実施態様において、本発明に記載の抗体のカラムからの回収は、塩化ナトリウム、アルギニン、グリシン、好ましくは塩化ナトリウムから選択される添加物/塩とともに行われる。

## 【0048】

1つの実施態様において、本発明に記載の抗体の全体の回収は、最初の量の50%以上、好ましくは70%以上の範囲、より好ましくは、85%から90%の範囲である。

## 【0049】

好ましい実施態様において、抗体は、抗HER抗体、抗TNF抗体、抗VEGF抗体、抗CD20抗体、抗CD52抗体、抗RANKL抗体、抗IgE抗体などから選択される。

## 【0050】

より好ましい実施態様において、抗体は、トラスツズマブ、ベルツズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、ベバシズマブ、ラニビズマブ、リツキシマブ、ベクツモマブ(bectumomab)、エブラツズマブなどから選択される。

## 【0051】

更なる実施態様において、本発明は、プロテインAアフィニティークロマトグラフィー工程の後で、5%以下、好ましくは2%以下の凝集体の量の精製した抗体調製物を提供する。

## 【0052】

別の実施態様において、本発明は、1%以下、より好ましくは0.5%以下の凝集体の量の抗体調製物を提供する。

## 【0053】

所望のモノクローナル抗体の精製方法には下記の工程が含まれる：

- 遠心分離法及び深層ろ過、次いでリコンディショニングによる細胞分離及び培養液上清の清澄

- プロテインAカラムクロマトグラフィー
- 低pHインキュベーション
- 中性化及びリコンディショニング
- 疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー
- 限外ろ過-ダイアフィルトレーション
- 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー
- ナノろ過
- 限外ろ過-ダイアフィルトレーション
- マイクロフィルター法

## 【0054】

本発明に記載の精製工程は、更なる詳細について下記に記載される。

## 【0055】

1) プロテインAカラムクロマトグラフィー：

所望のモノクローナル抗体及び他の混入物を含む細胞培養液由来の清澄した上清を、中性近くのpHに適切なバッファーで平衡化させたプロテインAカラムに添加する。所望のモノクローナル抗体はアフィニティーマトリックスに結合するが、混入物の大部分はカラムからフロースルーへ通り抜ける。所望のタンパク質の溶出に先立って、カラムは複数の洗浄工程により洗浄される。第1洗浄は、カラム添加の完了の後、同じ平衡化バッファーで行われる。第2洗浄は、第1洗浄バッファーのものよりも高い伝導度を持つ同じpHのバッファーで行う。第3洗浄は第1及び第2洗浄工程のものとは異なるpH及び伝導度のバッファーで実行する。所望のタンパク質の溶出は、第3洗浄工程のものよりも低いpHであるがより高い伝導性で実行する。最後にカラム浄化はアルカリ溶液で行われる。

【0056】

10

II)疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー:

少なくとも1つの望まれない混入物を含む混合物からの所望のモノクローナル抗体タンパク質の精製は、結合-溶出モードにおいての疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーにより実施される。カラムへのタンパク質添加の完了の後、所望のモノクローナル抗体は、下方勾配塩濃度、つまり、平衡化バッファーの伝導度のものと比較して減少した伝導度でカラムから溶出する。所望のモノクローナル抗体タンパク質の溶出は単一のブロードなピークの形態で起こる。溶出したタンパク質は画分として回収し、所望のレベルの純度を含む画分をまとめてプールされる。

【0057】

III)陰イオン交換カラムクロマトグラフィー:

20

所望のモノクローナル抗体を含むタンパク質溶液は、陰イオン交換カラム平衡化条件のpH及び伝導度に合わせるように実質的にリコンディショニングされる。カラムはpH約6.5のバッファーで平衡化される。所望のタンパク質は、カラムからフロースルー及び洗浄画分に回収される。本発明に記載の陰イオン交換クロマトグラフィーを実行するために使用することもできる他の陰イオン交換体は、DEAEセファロース、Mono Q、QセファロースXLなどから選択される。陰イオン交換体Qセファロースが本発明において使用されている。

【0058】

分析技術:300mM NaClの存在下でpH6.8のリン酸ナトリウムバッファーで平衡化したTSK-3000カラムを用いて、分析サイズ排除クロマトグラフィー(HP-SEC)を行われる。タンパク質は0.5mL/分でのアイソクラチックモードにおいて溶出される。

30

【実施例】

【0059】

ここで、以下の非限定的な例で本発明を説明するが、それはいかなる状況においても発明の範囲を制限するものと解釈されるべきではない:

【0060】

(実施例1)

アダリムマブの精製(抗TNF 抗体)

工程1:細胞分離/清澄/リコンディショニング

バッチを採取した後、目的のタンパク質を他の可溶性混入物とともに含む澄んだ上清を得るために、細胞は、最初は遠心分離法により、次いで深層ろ過により培養ブロスから分離した。遠心分離は10000g×30分で実行した。深層ろ過は0.45 0.22 µmメンブレンを用いて行われた。清澄した上清は、pH及び伝導性について、プロテインAカラム平衡化バッファー条件に調整するためにリコンディショニングさせた。

40

【0061】

工程2:プロテインAカラムクロマトグラフィー

リコンディショニング後の清澄させた上清は、プロテインAアフィニティーマトリックスによりアダリムマブを捕獲し、次いで低pHでカラムから溶出させた。添加に先立って、カラムはpH7.4、10~25mS/cmの範囲の伝導性の適切なバッファーで平衡化させた。添加に続いて、カラムは同じバッファーで洗浄した(第1洗浄)。第1洗浄工程に次いで、カラムはpH7.4であるがより高い伝導性(>25mS/cm)の同じバッファ

50

ーで洗浄した。第3洗浄工程は、1～5mS/cmの範囲の伝導性を有するpH5.5の適切なバッファにより行った。第3洗浄、所望のタンパク質の溶出工程の後、アダリムマブは、図1に示すように、pH3.5～3.7、5mS/cmを超える伝導性の適切なバッファにより実施された。この工程の後に溶出されたアダリムマブは、分析HP-SECで分析した場合、図2に示したように、少なくとも98%の純度を示した。

【0062】

#### 工程3: 低pHインキュベーション

プロテインAカラムから溶出された所望のタンパク質画分は、同じ溶出pH条件で約45～0分間、室温条件下でウイルス不活性化のためにインキュベートし、その後、タンパク質溶液は0.22μmフィルターを通した。

【0063】

#### 工程4: 中性化及びリコンディショニング

低pH処理に次いで、中性化工程を、制御した様式のアルカリ溶液の添加により行った。タンパク質溶液は、次のカラム平衡化条件に合わせるように30kDa MWCOメンブレンフィルターを用いたUF/DFによりpH及び伝導性の調節とともにリコンディショニングさせた。伝導性の調節のために、濃縮した硫酸アンモニウム溶液をタンパク質溶液に加えた。リコンディショニングの後に、タンパク質溶液は0.22μmメンブレンフィルターを通し、疎水性相互作用カラムに添加した。

【0064】

#### 工程5: 疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー

リコンディショニングの後、アダリムマブを含むタンパク質溶液は、更なる結合-溶出モードにおける精製のために、疎水性相互作用クロマトグラフィーマトリックス、フェニルセファロースを通した。カラムは90mS/cmを超える伝導性を有するpH約6.5からpH7.0の適切なバッファで平衡化させた。カラムマトリックスへの結合の後、アダリムマブは、図3に示すように下方への塩勾配を有する同じバッファ内でカラムから溶出させた。図4に示したHP-SECにより評価したように、このカラム工程の後、99%を超える純度のアダリムマブが達成された。

【0065】

#### 工程6: 限外ろ過-ダイアフィルトレーション(UF/DF)

疎水性カラムから溶出したプール画分は、次のカラム(Qカラム)工程の平衡化バッファ条件(例えば、pH及び伝導性)に合わせるために、30kDa MWCOメンブレンフィルターを用いたUF/DFにより、pH6.5の低イオン強度クエン酸ナトリウムバッファ溶液に対して、実質的に、リコンディショニングさせた。ダイアフィルトレーションしたタンパク質溶液は0.22μmフィルターに通して、Qカラムに添加した。

【0066】

#### 工程7: 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

所望のモノクローナル抗体を含むダイアフィルトレーションしたタンパク質溶液は、図5に示したように、フロースルー及び洗浄モードにおいてpH6.5、10mS/cmより低い伝導性の適切なバッファとともに、Qセファロースカラムを通した。Qカラム工程の後、図6に示したHP-SECで評価したように、アダリムマブの純度は>99%であることを観察した。

【0067】

#### 工程8: ナノろ過

Qカラム工程の後、所望のモノクローナル抗体を含むタンパク質溶液はナノろ過工程を行った。ナノろ過の後、アダリムマブの純度は99%を超えたままであることを観察した。

【0068】

#### 工程9: 限外ろ過-ダイアフィルトレーション

ナノろ過の後、タンパク質溶液は、バルク薬剤物質の調製のために所望の媒体でダイアフィルトレーションした。

【0069】

#### 工程10: マイクロフィルター法

10

20

30

40

50

最後に、所望のモノクローナル抗体を含む精製した調製物は、無菌的に、0.22  $\mu$ mメンブレンフィルターを通し、保存のために、液体形態、低温条件下又は凍結条件下のいずれかにて保存した。最終調製物におけるタンパク質の濃度は、1mg/mLから60mg/mLまで変化してもよい。最終的に精製されたモノクローナル抗体アダリムマブは、図7に示したHP-SECにより評価されるように、99%を超える純度を示した。

【0070】

(実施例2)

リツキシマブ(抗CD20抗体)の精製

抗CD20抗体、リツキシマブのための精製方法は、例1に記載されたような様式で実行された。最終的に精製されたモノクローナル抗体は、図8に示したHP-SECにより評価されるように、99%を超える純度を示した。

10

【0071】

(実施例3)

トラスツズマブ(抗HER2抗体)の精製

抗HER2抗体、トラスツズマブのための精製方法は、例1に記載されたような様式で実行された。最終的に精製されたモノクローナル抗体は、図9に示したHP-SECにより評価されるように、99%を超える純度を示した。

【0072】

精製された調製物は、その後、ヒトへの使用のための医薬的物質として使用するために、適切に処方されてもよい。

20

【図1】

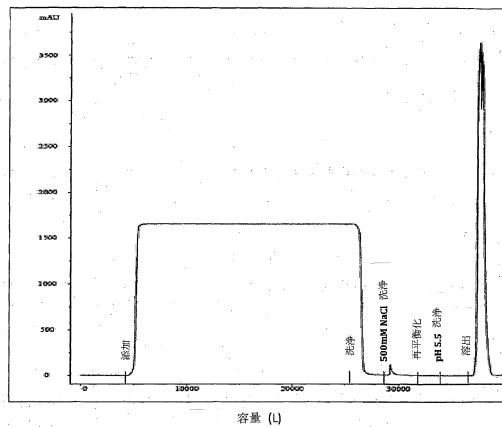


Figure 1

【図2】

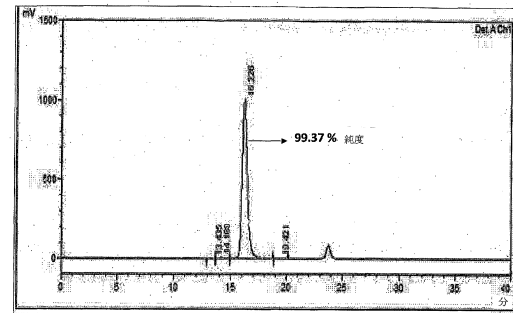


Figure 2

【図 3】

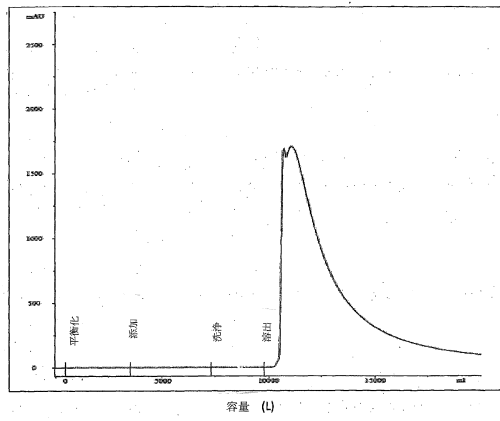


Figure 3

【図 4】

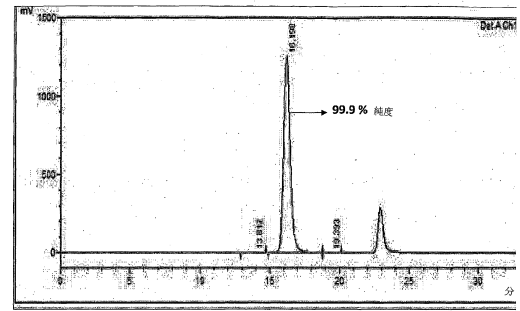


Figure 4

【図 5】

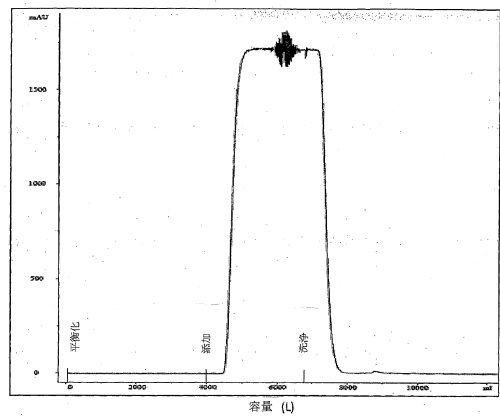


Figure 5

【図 6】

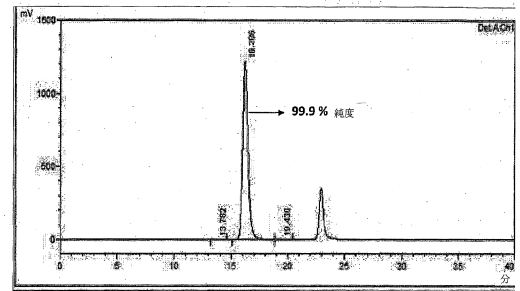


Figure 6

【図 7】

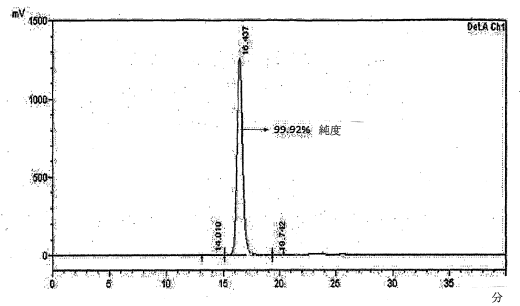


Figure 7

## 【図 8】

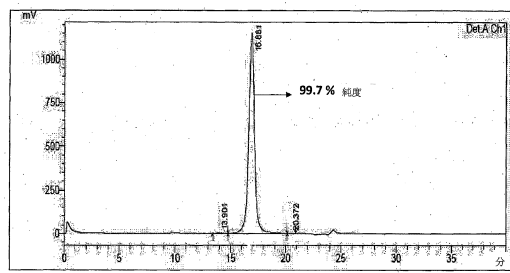


Figure 8

## 【図 9】

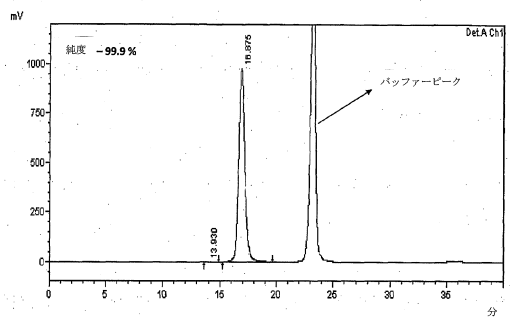


Figure 9

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 0 7 K 16/30 (2006.01) C 0 7 K 16/30

- (72)発明者 サンジーヴ・クマール・メンディラッタ  
インド・グジャラート・380015・アーメダバッド・サテライト・クロス・ローズ・(番地なし)・ザイダス・タワー・カディラ・ヘルスケア・リミテッド
- (72)発明者 サンジェイ・バンディオパディアイ  
インド・グジャラート・380015・アーメダバッド・サテライト・クロス・ローズ・(番地なし)・ザイダス・タワー・カディラ・ヘルスケア・リミテッド
- (72)発明者 アヴァニッシュ・クマール・シン  
インド・グジャラート・380015・アーメダバッド・サテライト・クロス・ローズ・(番地なし)・ザイダス・タワー・カディラ・ヘルスケア・リミテッド

審査官 長部 喜幸

- (56)参考文献 特表平09-509658(JP,A)  
国際公開第2012/051147(WO,A1)  
特表2008-533473(JP,A)  
国際公開第2013/66707(WO,A1)  
国際公開第2014/209508(WO,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)  
C 0 7 K 1 / 0 0  
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 )