

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成 29 年 3 月 30 日 (2017.3.30)

【公表番号】特表 2016-519052 (P2016-519052A)

【公表日】平成 28 年 6 月 30 日 (2016.6.30)

【年通号数】公開・登録公報 2016-039

【出願番号】特願 2015-562513 (P2015-562513)

【国際特許分類】

C 0 7 K 1/22 (2006.01)

B 0 1 J 20/281 (2006.01)

B 0 1 J 20/34 (2006.01)

B 0 1 D 15/08 (2006.01)

G 0 1 N 30/88 (2006.01)

C 0 7 K 14/705 (2006.01)

C 0 7 K 16/00 (2006.01)

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

【F I】

C 0 7 K 1/22

B 0 1 J 20/26 L

B 0 1 J 20/34 G

B 0 1 D 15/08

G 0 1 N 30/88 2 0 1 R

G 0 1 N 30/88 J

C 0 7 K 14/705

C 0 7 K 16/00

C 0 7 K 16/46

【手続補正書】

【提出日】平成 29 年 2 月 17 日 (2017.2.17)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

スーパー抗原クロマトグラフィーによって、少なくとも一つの混入物を含む溶液からタンパク質を精製するための方法であって、a) 固体支持体に固定化されたスーパー抗原にタンパク質を吸着させるステップ、b) 吸着されたタンパク質を含む固定化されたスーパー抗原を、脂肪族カルボキシレートを含む第一の洗浄バッファーと接触させることによって、少なくとも一つの混入物を除去するステップであって、脂肪族カルボキシレートが 6 ~ 12 の炭素骨格を含む前記ステップ、及び c) 固体支持体に固定化されたスーパー抗原からタンパク質を溶出させるステップを含む、前記方法。

【請求項 2】

スーパー抗原が、プロテイン A、プロテイン G、及びプロテイン L からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

脂肪族カルボキシレートが、カプロエート、ヘプタノエート、カプリレート、デカノエート、及びドデカノエートからなる群より選択される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

脂肪族カルボキシレートの供給源が、脂肪族カルボン酸、脂肪族カルボン酸のナトリウム塩、脂肪族カルボン酸のカリウム塩からなる群より選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5】**

洗浄バッファが、ナトリウムカプリレート、ナトリウムデカノエート、又はナトリウムドデカノエートを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

洗浄バッファが、約10 mM ~ 約125 mMのナトリウムカプリレート、約1 mM ~ 約30 mMのナトリウムデカノエート、又は約1 mM ~ 約30 mMのナトリウムドデカノエートを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 7】**

洗浄バッファが、約100 mMのナトリウムカプリレート、約20 mMのナトリウムデカノエート、又は約20 mMのナトリウムドデカノエートを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 8】**

洗浄バッファが、さらに約100 mM ~ 約400 mMの酢酸ナトリウムを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 9】**

洗浄バッファが、約300 mMの酢酸ナトリウムを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 10】**

少なくとも一つの混入物が、宿主細胞タンパク質又は宿主細胞DNAである、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 11】**

宿主細胞が、CHO細胞、NS0細胞、Sp2/0細胞、COS細胞、K562細胞、BHK細胞、PER.C6細胞、及びHEK細胞からなる群より選択される哺乳動物細胞である、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

宿主細胞が、E.coli、真菌細胞又は酵母細胞からなる群より選択される、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 13】**

固体支持体が、アガロース、ポリメタクリレート、架橋ポリ(スチレン-ジビニルベンゼン)、及びアガロースとデキストランの表面増量剤からなる群より選択される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 14】**

タンパク質が、可溶性受容体、抗体、抗体断片、免疫グロブリン単一可変ドメイン、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、ジスルフィド結合Fv、scFv、閉鎖コンフォメーションの多重特異性抗体、ジスルフィド結合scFv、又は二重特異性抗体からなる群より選択される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 15】**

溶液が細胞培養濾液である、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 16】**

ステップc)後の宿主細胞タンパク質の相対的低減倍数が、約2 ~ 約10倍である、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 17】**

ステップc)後の宿主細胞タンパク質の相対的低減倍数が、約5倍である、請求項 16 に記載の方法。

**【請求項 18】**

ステップc)後のDNAの相対的低減倍数が、約2倍 ~ 約150倍である、請求項 1 ~ 17 のい

ずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

ステップc)後のDNAの相対的低減倍数が、約100倍である、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

ステップc)後の宿主細胞タンパク質又はDNAの量が、約5000 ppm、4000 ppm、3000 ppm、2,500 ppm、2000 ppm、1500 ppm、1000 ppm、約900 ppm、約800 ppm、約700 ppm、約600 ppm、約500 ppm、約400 ppm、約300 ppm、約200 ppm、約100 ppm、約90 ppm、約80 ppm、約70 ppm、約60 ppm、又は約50 ppm未満である、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

ステップc)後にタンパク質がいずれかのさらなるアフィニティークロマトグラフィーに供されない、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

洗浄バッファーが、有機酸、アルカリ金属、又は有機酸の共役塩基のアンモニウム塩、及び有機塩基をさらに含み、洗浄バッファーがNaClの添加なしに作られる、請求項1～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

有機酸が、ギ酸、酢酸、乳酸、クエン酸、リンゴ酸、マレイン酸、グリシン、グリシルクリシン(glycylglycine)、コハク酸、TES(2-[[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ]エタンスルホン酸)、MOPS(3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸)、PIPES(ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸))、及びMES(2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)からなる群より選択される、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

有機塩基が、トリス塩基、ビス-トリス、ビス-トリス-プロパン、ピシン(N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン)、HEPES(4-2-ヒドロキシエチル-1-ピペラジエタンスルホン酸)、TAPS(3-[[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ]プロパンエタンスルホン酸)、及びトリシン(N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン)からなる群より選択される、請求項22に記載の方法。

【請求項 25】

有機酸の共役塩基が、有機酸の共役塩基のナトリウム、カリウム、又はアンモニウム塩である、請求項22～24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

有機酸が酢酸である、請求項22～25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

有機塩基がトリス塩基である、請求項22～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

有機酸が酢酸であり、酢酸の共役塩基がナトリウム塩である、請求項22～27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

プロテインAクロマトグラフィーによって、混入したタンパク質の溶液からタンパク質を精製するための方法であって、

(a) 固相に固定化されたプロテインAを、プロテインA平衡化バッファーにより平衡化するステップ、

(b) タンパク質を、混入した溶液から固相に固定化されたプロテインAに吸着させるステップ、

(c) 固相を、約50 mM～約55 mMのトリス塩基、約45 mM～約55 mMの酢酸、少なくとも一つの脂肪族カルボキシレートを含み、約pH 7.2～約8.0の第一のプロテインA洗浄バッファーによって洗浄することによって少なくとも一つの混入物を除去するステップであって、脂肪族カルボキシレートが、約100 mMのナトリウムカプリレート、約20 mMのナトリウムデカノエート、及び約20 mMのナトリウムドデカノエートからなる群より選択される前記

ステップ、並びに

(d) プロテインA溶出バッファーにより固相からタンパク質を回収するステップを含み、全てのバッファーが、NaClの添加なしに作られる、前記方法。

【請求項 30】

平衡化バッファーが、約50 mM～約55 mMのトリス塩基、約45 mM～約50 mMの酢酸を含み、約pH 7.2であり、溶出バッファーが1.8mMの酢酸ナトリウム及び約28.2 mM～約300 mMの酢酸を含み、約pH 2.4～約pH 3.6である、請求項 29に記載の方法。

【請求項 31】

ステップ(c)の後及びステップ(d)の前に以下のステップ：固相を、約50～55 mMのトリス塩基、約45～50 mMの酢酸を含み、約pH 7.2の第二のプロテインA洗浄バッファーによって洗浄することによって混入物を除去するステップであって、第二のプロテインA洗浄バッファーがNaClの添加なしに作られるステップをさらに含む、請求項 29又は30に記載の方法。

【請求項 32】

ステップ(d)の後に以下のステップ：(e)回収されたタンパク質を含む溶液を、30 mMの酢酸、100 mMのHClにより、約pH3.0に用量設定するステップ、(f)ステップ(e)の溶液を約pH3.0に約30～約60分保つステップ、及び(g)ステップ(f)の溶液のpHを、1Mトリスにより約pH7.5に調整する前記ステップをさらに含む、請求項 29～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

ステップ(g)により生産される溶液を濾過するステップをさらに含む、請求項 32に記載の方法。

【請求項 34】

プロテインLクロマトグラフィーによって、混入したタンパク質の溶液からタンパク質を精製するための方法であって、

(a) 固相に固定化されたプロテインLを、プロテインL平衡化バッファーにより平衡化するステップ、

(b) タンパク質を、混入した溶液から固相に固定化されたプロテインLに吸着させるステップ、

(c) 固相を、約50 mM～約55 mMのトリス塩基、約45 mM～約50 mMの酢酸、少なくとも一つの脂肪族カルボキシレートを含み、約pH 7.5の第一のプロテインL洗浄バッファーによって洗浄することによって少なくとも一つの混入物を除去するステップであって、脂肪族カルボキシレートが、約100 mMのナトリウムカプリレート、約20 mMのナトリウムデカノエート、及び約20 mMのナトリウムドデカノエートからなる群より選択される、前記ステップ、並びに

(d) プロテインL溶出バッファーにより固相からタンパク質を回収するステップを含み、全てのバッファーが、NaClの添加なしに作られる、前記方法。

【請求項 35】

平衡化バッファーが、約50 mM～約55 mMのトリス塩基、約45 mM～約50 mMの酢酸を含み、約pH 7.2であり、溶出バッファーが、約1.8 mMの酢酸ナトリウム、約28.2 mM～約300 mMの酢酸を含み、約pH 2.4～約pH 3.6である、請求項 34に記載の方法。

【請求項 36】

ステップ(c)の後及びステップ(d)の前に以下のステップ：固相を、約55 mMのトリス塩基、約45 mMの酢酸を含み、約pH 7.2の第二のプロテインL洗浄バッファーによって洗浄することによって混入物を除去するステップであって、第二のプロテインL洗浄バッファーがNaClの添加なしに作られるステップをさらに含む、請求項 34又は35に記載の方法。

【請求項 37】

ステップ(d)の後に以下のステップ：(e)回収されたタンパク質を含む溶液を、30 mMの酢酸、100 mMのHClにより、約pH3.0に用量設定するステップ、(f)ステップ(e)の

溶液を約pH3.0に約30～約60分保つステップ、及び(g)ステップ(f)の溶液のpHを、1M トリスにより約pH7.5に調整するステップをさらに含む、請求項34～36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項38】

ステップ(g)により生産される溶液を濾過するステップをさらに含む、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

プロテインA又はプロテインL洗浄バッファーが、約1 mM～約500 mMの酢酸ナトリウムをさらに含む、請求項29又は34に記載の方法。

【請求項40】

プロテインA又はプロテインL洗浄バッファーが、約300 mMの酢酸ナトリウムをさらに含む、請求項39に記載の方法。