

【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】令和 2 年 4 月 16 日 (2020.4.16)

【公表番号】特表 2019-511498 (P2019-511498A)

【公表日】平成 31 年 4 月 25 日 (2019.4.25)

【年通号数】公開・登録公報 2019-016

【出願番号】特願 2018-548754 (P2018-548754)

【国際特許分類】

C 0 7 K 1/34 (2006.01)

C 0 7 K 1/18 (2006.01)

C 0 7 K 1/20 (2006.01)

C 0 7 K 14/78 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 0 7 K 1/34

C 0 7 K 1/18

C 0 7 K 1/20

C 0 7 K 14/78

C 1 2 N 15/09 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 3 月 9 日 (2020.3.9)

【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】

細胞培養からの組換え 7 型コラーゲン生成物を捕捉する方法において、

a) 細胞培養から採取された上清をデプスフィルタに供するステップであって、上清は組換えヒト 7 型コラーゲンを含有する、上清をデプスフィルタに供するステップと、

b) デプスフィルタを通り抜ける溶液を収集するステップと、

c) ステップ b) からの溶液を限外濾過ステップに供するステップであって、組換えヒト 7 型コラーゲンは限外濾過膜に隣接する層の中に集積する、溶液を限外濾過ステップに供するステップと、

d) 第 1 の保持液を廃棄するステップであって、第 1 の保持液は、ステップ b) からの溶液の中に含まれた不純物を含んでなる、第 1 の保持液を廃棄するステップと、

e) 組換えヒト 7 型コラーゲンを回収し、かつ組換えヒト 7 型コラーゲンを含んでなる第 2 の保持液を得るために、限外濾過膜に隣接する層を可溶化剤及び界面活性剤のうち少なくともいずれか一方に供するステップと、

f) 組換え 7 型コラーゲンを含んでなる未精製バルク液体を得るために第 2 の保持液を透析濾過ステップに供するステップと、

g) 任意選択で未精製バルク液体を凍結するステップとを備え、

前記可溶化剤は尿素、チオ尿素、アルギニン、ブタノール、エタノール、過塩素酸リチウム、酢酸リチウム、酢酸マグネシウム、フェノール、プロパノール、硫酸ドデシルナトリウム、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスコルビン酸、グルタミン、アスパラギン、及びグアニジンのうち少なくとも 1 つを含有する、方法。

【請求項 2】

ステップ a) の前に：

I) 組換えヒト 7 型コラーゲンを生産する宿主細胞を培養するステップ；及び

I I) 培養された宿主細胞から上清を採取するステップ

をさらに含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

未精製バルク液体は、ステップ I I) から収集された上清中の組換えヒト 7 型コラーゲンのうち 40～80%を含有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

細胞培養は、少なくとも 200 リットルの量を用いてバイオリアクタ中で宿主細胞を培養することを含んでなる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

バイオリアクタは灌流バイオリアクタ又は流加培養式バイオリアクタである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

未精製バルク液体は 50 グラムを上回る組換えヒト 7 型コラーゲンを含有する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

可溶化剤は、アルギニンを含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

組換えヒト 7 型コラーゲンを精製する方法において、

a) 組換えヒト 7 型コラーゲンを含有する試料を、混合モードのフロースルー式樹脂に供するステップであって、混合モードのフロースルー式樹脂はリガンド活性化コア及び不活性シェルを含んでなり、不活性シェルは組換えヒト 7 型コラーゲンがリガンド活性化コアに入るのを防止し、かつ十分に小さい不純物は不活性シェルを通り抜けてリガンド活性化コアに結合する、試料を混合モードのフロースルー式樹脂に供するステップと、

b) 混合モードのフロースルー式樹脂を通り抜け、かつ組換えヒト 7 型コラーゲンを含有する、第 1 の流出液を収集するステップと、

c) ステップ b) からの第 1 の流出液を、組換えヒト 7 型コラーゲンが陽イオン交換クロマトグラフィ樹脂に結合することを可能にする条件下で陽イオン交換クロマトグラフィ樹脂に供するステップと、

d) 陽イオン交換クロマトグラフィ樹脂から組換えヒト 7 型コラーゲンを溶出させるステップと、

e) ステップ d) からの溶出した組換えヒト 7 型コラーゲンを、フロースルーモードの疎水性相互作用クロマトグラフィ樹脂に供し、疎水性相互作用クロマトグラフィ樹脂を通り抜ける第 2 の流出液を収集するステップと、

f) ステップ g) に先立ち、ステップ e) からの第 2 の流出液に可溶化剤及び界面活性剤のうち少なくともいずれか一方を添加するステップと、

g) ステップ f) の第 2 の流出液を、組換えヒト 7 型コラーゲンを濃縮するために限外濾過ステップに供するステップと、

h) ステップ g) からの濃縮された組換えヒト 7 型コラーゲンを、少なくとも 1 つの塩と、可溶化剤と、糖と含有するバッファーを用いて透析濾過するステップと、

i) 精製された組換えヒト 7 型コラーゲンを回収するステップと
を含んでなり、

1 以上のウイルス低減ステップ及びエンドヌクレアーゼ処理ステップを含んでなる方法。

【請求項 9】

限外濾過ステップは接線流フィルタを含んでなり、接線流フィルタは親水性膜を含んでなる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

1以上のウイルス低減ステップは、ステップa)に先立ち組換えヒト7型コラーゲンを含有する試料に放射線照射するステップ、ステップb)からの第1の流出液に界面活性剤を添加するステップ、及びステップe)からの第2の流出液を多孔質フィルタに供するステップ、を含んでなる、請求項8に記載の方法。

【請求項11】

エンドヌクレアーゼ処理ステップは、ステップd)からの溶出された組換えヒト7型コラーゲンを、エンドヌクレアーゼで処理することを含んでなる、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

バッファは、少なくとも1つの塩、可溶化剤、及び糖質を含んでなり、前記可溶化剤は尿素、チオ尿素、アルギニン、ブタノール、エタノール、過塩素酸リチウム、酢酸リチウム、酢酸マグネシウム、フェノール、プロパノール、硫酸ドデシルナトリウム、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスコルビン酸、グルタミン、アスパラギン、及びグアニジンのうち少なくとも1つを含有する、請求項8に記載の方法。

【請求項13】

少なくとも1つの塩は、塩化ナトリウム、クエン酸塩、及びリン酸ナトリウムのうち1以上であり、可溶化剤はアルギニンであり、糖質はスクロースである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

ステップ*i*)の精製された組換えヒト7型コラーゲンは、ステップa)からの試料中の組換えヒト7型コラーゲンの量の平均15～30%を含有する、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

ステップa)における試料は少なくとも25グラムの組換えヒト7型コラーゲンを含有する、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

少なくとも4.0グラムの精製された組換えヒト7型コラーゲンがステップ*i*)において回収される、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

ステップ*i*)の精製された組換えヒト7型コラーゲンは、宿主細胞タンパク質を組換えヒト7型コラーゲン1mgあたり600ng/mg以下しか含有しない、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

ステップ*i*)の精製された組換えヒト7型コラーゲンは、宿主細胞DNAを組換えヒト7型コラーゲン1mgあたり15pg/mg以下しか含有しない、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

ステップ*i*)の精製された組換えヒト7型コラーゲンは、エンドトキシンを組換えヒト7型コラーゲン1mgあたり0.50EU/mg以下しか含有しない、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

ステップI)の前に：

I)細胞培養から採取された上清をデプスフィルタに供するステップであって、上清は組換えヒト7型コラーゲンを含有する、上清をデプスフィルタに供するステップと、

II)デプスフィルタを通り抜ける溶液を収集するステップと、

III)ステップII)からの溶液を限外濾過ステップに供するステップであって、組換えヒト7型コラーゲンは限外濾過膜に隣接する層の中に集積する、ステップIII)からの溶液を限外濾過ステップに供するステップと、

IV)第1の保持液を廃棄するステップであって、第1の保持液は、ステップIII)からの溶液中に含まれた不純物を含んでなる、第1の保持液を廃棄するステップと、

V) 組換えヒト7型コラーゲンを回収し、かつ組換えヒト7型コラーゲンを含んでなる第2の保持液を得るために、限外濾過膜に隣接する層を可溶化剤及び界面活性剤のうち少なくともいずれか一方に供するステップと、

VI) 組換えヒト7型コラーゲンを含んでなる未精製バルク液体を得るために第2の保持液を透析濾過ステップに供するステップと、

VII) 任意選択で未精製バルク液体を凍結するステップと
をさらに備え、

前記可溶化剤は、尿素、チオ尿素、アルギニン、ブタノール、エタノール、過塩素酸リチウム、酢酸リチウム、酢酸マグネシウム、フェノール、プロパノール、硫酸ドデシルナトリウム、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスコルビン酸、グルタミン、アスパラギン、及びグアニジンのうち少なくとも1つを含んでなる、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記可溶化剤はアルギニンを含んでなる、請求項20に記載の方法。